

[文章编号] 1007-3949(2004)12-03-0305-04

·实验研究·

核因子 κ B 反义和诱骗寡核苷酸联合作用对培养人脐静脉内皮细胞血管细胞粘附分子 1 表达的影响

陈桢玥, 陆国平

(上海第二医科大学附属瑞金医院心内科, 上海市 200025)

[关键词] 细胞生物学; 核因子 κ B 影响人脐静脉内皮细胞血管细胞粘附分子 1 的表达; 核酸干预研究; 血管细胞粘附分子 1; 人脐静脉内皮细胞; 动脉粥样硬化

[摘要] 为探讨在人脐静脉内皮细胞中,核因子 κ B 的反义核酸及诱骗性寡核苷酸联合作用对肿瘤坏死因子 α 诱导的血管细胞粘附分子 1 表达的影响,采用培养的人脐静脉内皮细胞株 ECV304,分别和联合应用反义核酸和诱骗性寡核苷酸干预,流式细胞仪检测寡核苷酸转染效率,并用逆转录—聚合酶链反应和流式细胞仪测定其对肿瘤坏死因子 α 诱导的血管细胞粘附分子 1 的表达。结果发现,联合应用反义核酸及诱骗性寡核苷酸,可使肿瘤坏死因子 α 刺激的人脐静脉内皮细胞中血管细胞粘附分子 1 的表达明显下调,且下调幅度显著大于反义核酸或诱骗性寡核苷酸的单独作用。由此提示,核因子 κ B 的反义核酸及诱骗性寡核苷酸可显著下调核因子 κ B 调控的与动脉粥样硬化相关的粘附分子的表达,且联合作用效果强于单独作用,可能为核酸干预防治动脉粥样硬化提供新的思路。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

The Simultaneous Effect of Antisense and Decoy Oligonucleotides of Nuclear Factor- κ B on Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression in Human Vascular Endothelial Cells

CHEN Zhen-Yue, and LU Guo-Ping

(Department of Cardiology, Ruijin Hospital, Shanghai the Second Medical University, Shanghai 200025, China)

[KEY WORDS] Nuclear Factor kappa B; Antisense Oligonucleotides; Decoy Oligonucleotides; Vascular Cell Adhesion Molecule-1; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the simultaneous effects of antisense and decoy oligonucleotides of nuclear factor (NF)- κ B on expression of adhesion molecules induced by tumor necrosis factor(TNF)- α in vitro. **Methods** Intracellular uptake of fluorescein isothiocyanate (FITC) -labeled oligonucleotides was detected by fluorescence active cell sort (FACS); Adhesion molecules expression was presented by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) at RNA level, FACS at protein level.

Results Simultaneous incubation with antisense P65 and decoy oligonucleotides (ODN) of NF- κ B, the inhibitory effect of VCAM-1 was 59.0%, 41.1% and 35.2% at mRNA level, 85.5%, 44.3% and 49.2% on human vascular endothelial cells (hUVEC) surface compared with control group, decoy group and antisense group. The inhibitory effect of simultaneous incubation with antisense and decoy oligonucleotides was stronger than the effect of incubation with one of them. **Conclusion** It was demonstrated that a simultaneous administration of antisense and decoy oligonucleotides of NF- κ B was effective and necessary if a sufficient inhibition of NF- κ B mediated activities should be achieved.

核因子 κ B 是调节多种炎症和免疫基因的转录因子,能被多种信号激活,在核内与靶基因序列结合,增强其表达,参与多种病理生理过程。血管细胞粘附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 是最重要的粘附分子之一,核因子 κ B 能与其上的 κ B 序列结合,上调它们的表达,促进单核细胞趋化并粘附于血管壁。核因子 κ B 的反义核酸和诱骗性

寡核苷酸可分别通过降低核因子 κ B 的合成和与其下游基因竞争结合位点从而下调粘附分子等的表达。目前,这两种寡核苷酸分别干预的在体和离体研究已在国内外开展,但联合作用的效果如何,尚未见报道。我们对此进行了研究,旨在探索以核酸为干预手段防治动脉粥样硬化等疾病的新举措。

1 材料与方 法

1.1 材料

RPMI-1640 培养基、Trizol 和 DEPC、脂质体和脂质体培养基均自美国 GIBCO 公司,小牛血清自杭州四季青公司,重组人肿瘤坏死因子(tumor necrosis

[收稿日期] 2003-07-11 [修回日期] 2004-03-19

[作者简介] 陈桢玥,硕士,住院医师,主要从事冠状动脉硬化发病机理及药物和基因干预治疗的研究,联系电话为 13651759851 或 021-64370045-665256, E-mail 为 zhenyue@rjh.zjhu.net。陆国平,主任医师,教授,博士研究生导师,从事冠心病和脂质代谢的药物和基因治疗。

factor, TNF) α 购自 BD 公司, 琼脂糖购自美国 AMRESCO 公司, M-MLV 逆转录酶、随机引物和 dNTP 购自美国 Promega 公司, RINA 酶抑制剂(Rnasin)购自上海华美生物技术公司, Taq 酶购自加拿大 Biostar 公司, 鼠抗人 VCAM-1 抗体购自 R&D 公司, 人脐静脉内皮细胞株 ECV304 购自中国科学院细胞研究所。

1.2 细胞培养及刺激

将 ECV304 细胞种于 6 孔板中, 用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 24 ~ 48 h。显微镜下发现细胞贴壁生长, 并有 50% ~ 80% 融合。

1.3 核因子 κ B 寡核苷酸序列

核因子 κ B 诱骗寡核苷酸序列^[1]及反义核酸序列^[2]经国际互联网查阅文献获得, 具体序列如下: 核因子 κ B 诱骗寡核苷酸为 5'-AGAGTGGGAATTC-CACTCA-3', 突变对照体为 5'-AGAGTGGTCCTTTC-CACTCA-3'; 核因子 κ B p65 反义核酸为 5'-GGGGAA-CAGTTCCTCCATGGC-3', 正义核酸为 5'-GCCATG-GACGAACTGTTCCCC-3'; 全硫代修饰及异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记, 由上海生物工程有限公司合成。

1.4 脂质体介导的短暂转染

将各组 DNA (即核因子 κ B 的反义核酸、正义核酸、诱骗寡核苷酸及其突变体、反义核酸 + 诱骗性寡核苷酸) 2 μ g (联合转染组共 4 μ g) 分别加入培养基并与脂质体混匀后室温孵育 45 min, 形成脂质体-DNA 复合体后加入种有 (1 ~ 3) $\times 10^5$ 个 ECV304 细胞的 6 孔板中, 37℃、5% CO₂ 孵育 6 h, 用含 10% 小牛血清的 1640 培养基替换培养 18 h 后, 用 10 μ g/L 的 TNF- α 作用 30 min。

1.5 细胞对寡核苷酸摄取情况的检测

异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的单链、双链及单链 + 双链寡核苷酸转染细胞, 24 h 后收集, 用 PBS 清洗并重悬; 流式细胞仪检测, Cell Quest 软件分析, 计算荧光强度。

1.6 流式细胞仪检测血管细胞粘附分子 1 的表达

转染后收集细胞, 每管加入 10 μ L FITC 标记的鼠抗人的 VCAM-1 单抗, 4℃ 孵育 30 min 后, 洗去未结合抗体, 用 200 μ L PBS 重悬, 流式细胞仪检测, Cell Quest 软件分析, 计算细胞阳性率。

1.7 逆转录—聚合酶链反应检测血管细胞粘附分子 1 mRNA 的表达

采用逆转录—聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测 VCAM-1

mRNA 的表达。转染后收集细胞, Trizol 抽提 RNA。引物根据文献[3]及国际互联网 cDNA 文库检索设计, 由上海生物工程公司合成。VCAM-1 (194 bp) 为 5'-CCAGATAGACAGCCCTCTGA-3' (上游) 和 5'-CCACCCTCATCTCGATTTC-3' (下游); 条件为 94℃ 5 min 后开始循环, 94℃ 30 s \rightarrow 62℃ 30 s \rightarrow 72℃ 1 min, 共 30 次循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。 β -actin (532 bp) 为 5'-AAGGATTCCTATGTGGCC-3' (上游) 和 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTC-3' (下游)。2% 琼脂糖凝胶电泳后, 生物图像分析仪检测密度。

1.8 统计学分析

实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表述。统计分析用 *t* 检验或单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 细胞对寡核苷酸的摄取情况

脂质体介导法能有效地将单链寡核苷酸 (single strand oligonucleotides, ssODN)、双链寡核苷酸 (double strands oligonucleotides, dsODN) 及单链 + 双链寡核苷酸转染内皮细胞, 其绝对荧光强度 (absolute fluorescence intensity, AFI) 较基线明显升高。联合转染时, 因寡核苷酸总量的增加, 细胞摄取也有所增加, 均有统计学差异 ($P < 0.01$) (图 1, Figure 1)。

2.2 核因子 κ B 诱骗寡核苷酸和反义核酸对人内皮血管细胞粘附分子 1 表达的影响

2.2.1 转染后血管细胞粘附分子 1 mRNA 的表达情况 在人血管内皮细胞中, 转染诱骗性寡核苷酸和反义核酸能显著降低 VCAM-1 mRNA 的表达, 可分别较 TNF- α 刺激组降低 30.3% 和 36.7%; 而联合转染 (诱骗寡核苷酸 + 反义核酸) 的细胞中, VCAM-1 mRNA 的表达较单一转染时下调更明显, 分别为 41.1% 和 35.2%, 均有统计学差异 ($P < 0.05$)。各对照组与 TNF- α 刺激组相似, 无抑制效应 (图 2 和表 1, Figure 2 and Table 1)。

2.2.2 转染后血管细胞粘附分子 1 在细胞表面的表达 用直接抗体荧光标记流式细胞仪检测各组 VCAM-1 的表达发现, 核因子 κ B 的诱骗性寡核苷酸组、反义核酸组及联合转染组 VCAM-1 的表达分别较 TNF- α 刺激组降低 47.8%、48.3% 和 81.4%。联合转染组中 VCAM-1 的表达较单独转染核因子 κ B 的诱骗性寡核苷酸或反义核酸时下降明显, 分别为 64.4% 和 64.0%, 均有统计学差异 ($P < 0.05$)。对照组无此效应 (图 3, Figure 3)。

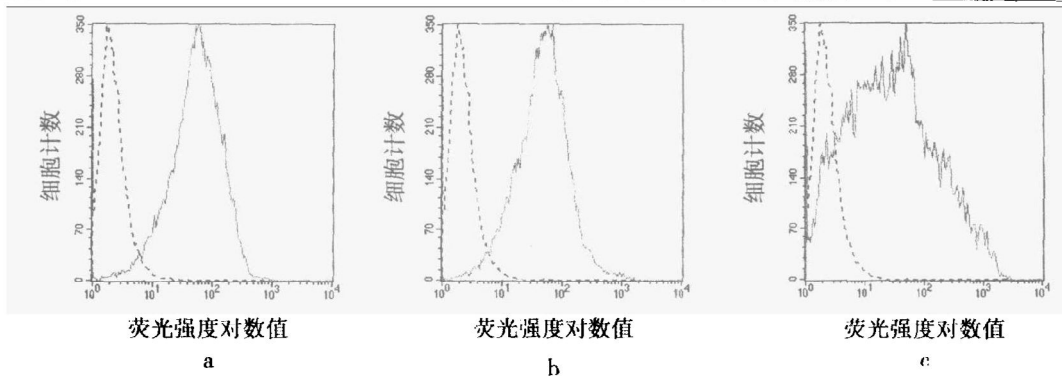


图 1. 细胞对寡核苷酸的摄取情况的曲线叠加图 虚线为对照组,实线分别为 FITC 标记的单链寡核苷酸(图 a)、双链寡核苷酸(图 b)和单链 + 双链寡核苷酸转染组(图 c)。

Figure 1. The Comparative FACS profiles of intracellular uptake of FITC-labeled oligonucleotides

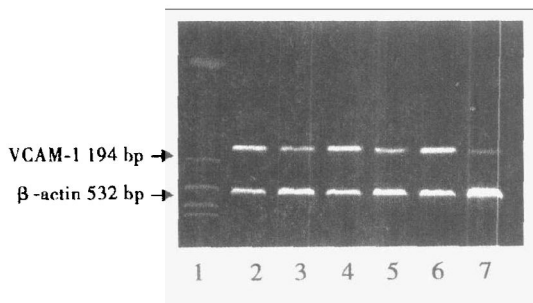


图 2. 血管细胞粘附分子 1 mRNA 的表达 1 为 C316A 聚合酶链反应标识物,2 为 10µg/L TNFα 刺激组,3 为诱骗寡核苷酸组,4 为突变体组,5 为反义核酸组,6 为正义核酸组,7 为联合转染组。

Figure 2. Expression of vascular cell adhesion molecule 1 mRNA

表 1. 血管细胞粘附分子 1 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1. Expression of vascular cell adhesion molecule 1 mRNA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分 组	mRNA 相对表达量
阳性对照组	96.1% ± 5.3%
诱骗寡核苷酸转染组	66.9% ± 8.2% ^b
诱骗寡核苷酸突变体转染组	86.6% ± 7.4% ^{ac}
反义核酸转染组	60.8% ± 2.7% ^{bd}
正义核酸转染组	90.8% ± 2.3% ^{ac}
联合转染组	39.4% ± 7.8% ^{cd}

a: $P > 0.05$, b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$. 与阳性对照组比较; e: $P < 0.05$, 与诱骗寡核苷酸转染组比较; f: $P < 0.05$, 与诱骗寡核苷酸突变体转染组比较。

3 讨论

大量证据表明,动脉粥样硬化是一种有免疫系统参与的慢性炎症性疾病^[1]。核因子 κB 作为一种调节炎症和免疫相关基因的转录因子,在动脉粥样

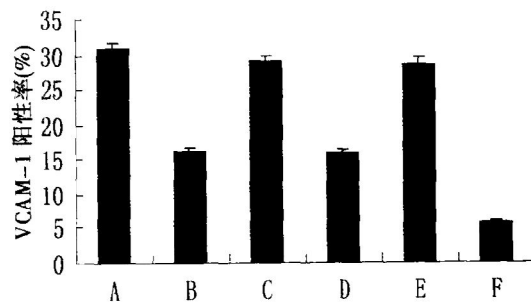


图 3. 血管细胞粘附分子 1 在细胞表面的表达 A 为阳性对照组, B 为诱骗寡核苷酸转染组, C 为诱骗寡核苷酸突变体转染组, D 为反义核酸转染组, E 为正义核酸转染组, F 为诱骗性寡核苷酸和反义核酸联合转染组。

Figure 3. Expression of VCAM-1 on cellular surface of hUVEC

硬化的早期和再狭窄阶段发挥至关重要的作用^[5,6]。目前,以反义核酸、诱骗性寡核苷酸等干预核因子 κB 作用的在体和离体研究已广泛开展。反义核酸技术是根据 Watson-Crick 基本配对法则,使反义链与特定的 DNA 正义链结合,抑制基因产物的复制合成。据文献[6]报道,在人血管内皮细胞中,核因子 κB P65 的反义核酸对 T 核因子 α 调控的粘附分子的表达有抑制效应,而 P50 的反义核酸则无此效应或效果不显著,故本研究采用核因子 κB P65 的反义核酸作为干预手段抑制核因子 κB 的合成,观察其所调控因子的表达。核因子 κB 的诱骗性双链寡核苷酸是一种顺式作用元件,与转录因子 DNA 结合位点的序列相同或相似,在与转录因子结合的基因启动子的调控区域中与内源的顺式 DNA 序列元件竞争^[7],诱骗转录因子与它结合,下调转录因子所调控的基因表达。目前,就两者联合干预的效果尚不明确,研究亦甚少。

本研究采用脂质体介导的转染法是基于其已被批准为临床体内直接基因导入的方法,而本研究又是临床研究的前期探索之故。为了监测脂质体介导的短暂转染的效率,即细胞对寡核苷酸的摄取率,我们运用了流式细胞仪对 FITC 标记的单链、双链寡核苷酸的细胞内摄取情况进行了评估。据文献[8]报道,人脐静脉内皮细胞对寡核苷酸的摄取开始于转染后 1 h,在 8 h 达到高峰并持续 24 h。本研究在转染后 24 h 测定寡核苷酸在细胞内的摄取情况。结果表明:细胞能摄取脂质体介导的寡核苷酸,且单链寡核苷酸和双链寡核苷酸联合转染组因转染核苷酸的总量增加而使细胞内的寡核苷酸摄取量相应增加,但并非为单链寡核苷酸组和双链寡核苷酸组总量的叠加,这可能与脂质体转染体系中 DNA-脂质体复合物的结合情况和体系中单位体积中的 DNA 浓度不同等有关。由于转染组的细胞内寡核苷酸的量较基线水平明显增加,该结果与文献[9,10]报道一致,故可认为此法是有效和可靠的。

动脉粥样硬化的炎症学说认为内皮细胞受损可能是动脉粥样硬化发生的始动步骤。血循环中单核细胞和血管壁内皮细胞的粘附性的改变具有重要的病理意义。我们观察核因子 κ B 的诱骗性寡核苷酸和反义核酸对粘附分子 VCAM-1 mRNA 的表达和蛋白质的合成的影响,对评价两种干预方法及联合应用时的效应和其临床应用价值均有帮助。本研究从 mRNA 水平、蛋白质水平观察所得结果均提示,核因子 κ B 的诱骗性寡核苷酸和反义核酸作用于人血管内皮细胞时与阳性对照相比能显著抑制 TNF- α 诱导的血管内皮细胞的 VCAM-1 的表达,其相应的突变体和正义核酸无此效应。这与文献[6,8,11]报道的结果一致,但由于刺激因子的浓度、转染效率、寡核苷酸用量、测定时间点的选择不同,VCAM-1 表达的下降幅度略有差异。用核因子 κ B 的诱骗性寡核苷酸和反义核酸同时作用于 TNF- α 诱导的人血管内皮细胞时,VCAM-1 表达的抑制较两者单独应用时更为显著,且远较阳性对照组的表达弱。可见,从两个层面阻断核因子 κ B 的作用较单一层面明显,就目前的研究而言,两者的作用可能是累积效应,而非协同作用。

动脉粥样硬化并非单基因遗传病且与多因素相关,单纯封闭某一种基因不能阻止其发生发展^[12]。由于核因子 κ B 的反义核酸能抑制核因子 κ B 的复制

及合成,从源头切断核因子 κ B 的产出,而核因子 κ B 的诱骗性寡核苷酸能同时调节多种基因的转录途径,而不同于某种特异途径进行阻断^[2,13],使调控更为直接和多样化。用以上两法之一进行在体和离体研究,在国内外已有报道,但联合运用两种方法从两个层面阻断核因子 κ B 的作用,目前尚未见报道。本研究的结果表明,两法联合应用能更为有效地阻断核因子 κ B 的作用,下调相关基因的表达,为以核酸为干预手段治疗动脉粥样硬化及再狭窄提供了新的思路。

【参考文献】

- [1] De Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R, Schmid JA. The transcription factor NF- κ B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20 (11): e83-88
- [2] Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Lang Witz KL, Adelsberger H, et al. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation*, 1998, 98 (12): 1 164-171
- [3] Meagher L, Mahicuz D, Ugas K, Burrows N, Norris P, Yarwood H, et al. Measurement of mRNA for E-selectin, VCAM-1 and ICAM-1 by reverse transcription and the polymerase chain reaction. *J Immunol Meth*, 1994, 175 (2): 237-246
- [4] 张敏,陈植玥,陆国平,吴春芳. 辛伐他汀对内皮细胞株 ECV304 细胞分化抗原 40 诱导表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11 (3): 234-237
- [5] Defillipi P, Silango L, Tarone G. Regulation of adhesion receptor expression in endothelial cells. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1993, 184: 87-98
- [6] Barath P, Fishbein MC, Cao J, Berenson J, Helfant RH, Forrester JS. Tumor necrosis factor gene expression in human vascular intimal smooth muscle cells detected by in situ hybridization. *Am J Pathol*, 1990, 137 (3): 503-509
- [7] Batters LDK, Springall DR, Chester AH, Evans TJ, Standfield EN, Parums DV, et al. Inducible nitric promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest*, 1996, 75 (1): 77-85
- [8] Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of proinflammatory(Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*, 1999, 145 (1): 33-43
- [9] Voisard R, Huber N, Baro R, Susa M, Ickrath O, Both A, et al. Different effects of antisense RelA P65 and NF- κ B 1 P50 oligonucleotides on the nuclear factor- κ B mediated expression of ICAM-1 in human coronary endothelial and smooth muscle cells. *BMC Mol Biol*, 2001, 2 (1): 7
- [10] David C, Hess E, Charles C, Carroll J, Hill WD, Hsu CY. Hypertonic mannitol loading of NF- κ B transcription factor decoy in human brain microvascular endothelial cells blocks upregulation of ICAM-1. *Stroke*, 2000, 31 (5): 1 179-186
- [11] Kupatli C, Habazettl H, Goedecke A, Wolf DA, Zahler S, Boekstegers P, et al. Tumor necrosis factor-alpha contributes to ischemia-and reperfusion-induced endothelial activation in isolated heart. *Circ Res*, 1999, 84 (4): 392-400
- [12] 富路,李佳,李晖,梅雨,尹申,孔一慧. 反义纤溶酶原激活物抑制剂 1 RNA 对家兔动脉粥样硬化形成的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11 (3): 214-218
- [13] 崔华,何作云. 不同阶段食饵性动脉粥样硬化兔血管壁核因子 κ B 活化和单核细胞趋化蛋白 1 与蛋白激酶 Ca 表达的变化. *中国动脉硬化杂志*, 2002, 10 (4): 312-315

(此文编辑 胡必利)