

[文章编号] 1007-3949(2004)12-05-05

• 实验研究 •

反义凝血酶受体基因序列对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响

王启贤¹, 肖丽梅¹, 李继梅², 郝萍², 杨源¹, 黄韬³, 肖践明¹, 杨西云¹, 山路¹, 唐睿珠²

(昆明医学院附属第一医院 1. 心内科, 2. 临床实验中心, 3. 胸外科, 云南省昆明市 650032)

[关键词] 病理学与病理生理学; 血管平滑肌细胞增殖; 凝血酶; 受体, 凝血酶; 基因序列反义技术; 动脉粥样硬化

[摘要] 为了研究凝血酶受体在血管平滑肌细胞增殖中的作用, 探讨反义凝血酶受体基因序列对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响, 通过培养 SD 大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞, 以³H-TdR 掺入率作为评价反义凝血酶受体基因序列抑制血管平滑肌细胞增殖的指标; 用反转录聚合酶链反应检测反义凝血酶受体基因序列抑制血管平滑肌细胞凝血酶受体 mRNA 的表达; 用 Western blot 检测反义凝血酶受体基因序列抑制血管平滑肌细胞凝血酶受体蛋白质的表达; 用³H-肌醇掺入率检测反义凝血酶受体序列抑制血管平滑肌细胞磷酸肌醇代谢的影响。结果发现, 反义凝血酶受体基因序列明显抑制血管平滑肌细胞的增殖(与对照组相比, $P < 0.05$); 明显抑制血管平滑肌细胞的凝血酶受体 mRNA 和蛋白的表达; 明显抑制了血管平滑肌细胞磷酸肌醇代谢。提示反义凝血酶受体基因序列明显抑制血管平滑肌细胞的增殖; 凝血酶受体反义序列明显抑制血管平滑肌细胞的增殖是通过抑制凝血酶受体基因的表达(特别是通过抑制 DNA、mRNA 和蛋白的表达), 抑制细胞内信号传递来完成。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Antisense Sequences of Thrombin Receptor Arrest of rat Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation

WANG Qi-Xian, XIAO Li-Mei, LI Ji-Mei, HAO Ping, YANG Yuan, HUANG Tao, XIAO Jian-Ming, YANG Xi-Yun, SHAN Lu, and TANG Rui-Zhu

(The First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, China)

[KEY WORDS] Vascular Smooth Muscle Cells; Proliferation; Thrombin; Thrombin Receptor; Antisense Oligonucleotide

[ABSTRACT] **Aim** To study the influence of thrombin receptor on the proliferation of rat vascular smooth muscle cells, probe into mechanism of antisense sequence of thrombin receptor restrained the proliferation of rat vascular smooth cells.

Methods Take the incorporation of ³H-thymidine as the target to evaluate vascular smooth muscle cells proliferation; Antisense sequence of thrombin receptor restrained the expression of mRNA of thrombin receptor in vascular smooth cells was detected by RT-PCR; Antisense sequence of thrombin receptor restrained the expression of protein of thrombin receptor was detected by Western blot; The influence of antisense sequence of thrombin receptor on phosphate inositol of vascular smooth cells was detected by incorporation of ³H-inositol.

Results Antisense sequence of thrombin receptor restrained vascular smooth muscle cells proliferation markedly (compared with control $P < 0.05$), restrained expression of mRNA and protein of thrombin receptor markedly; Also restrained metabolism of phosphate inositol in vascular smooth cells.

Conclusion Antisense sequence of thrombin receptor restrained SD rat vascular smooth muscle cells proliferation markedly; Antisense sequence of thrombin receptor restrained vascular smooth muscle cells proliferation which could arrested gene expression of thrombin receptor, restrained signal transduction of vascular smooth muscle cells.

血管平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)增殖在动脉粥样硬化及冠状动脉血管腔内成形后再狭窄形成中起到关键作用。血管 SMC 增殖调节机制可

能与血管壁内分泌和旁分泌生长因子有关; 凝血酶作为关键酶, 除在动脉损伤血管壁血栓形成中起重要作用, 可通过多个环节调节血管 SMC 增殖。研究表明, 凝血酶对血小板、血管内皮细胞和 VSMC 的作用都是通过激活不同类型细胞表面的凝血酶受体(thrombin receptor, TR)而实现的。在动脉粥样硬化病灶中内皮细胞、内膜血管 SMC 和巨噬细胞从蛋白水平和 mRNA 水平显示阳性信号。球囊损伤动脉内膜后 6 h, TR mRNA 即在中层平滑肌细胞显著表达,

[收稿日期] 2003-10-06 [修回日期] 2004-03-16

[基金项目] 云南省应用基础研究基金(1999C0067M)资助

[作者简介] 王启贤, 医学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为介入心脏病学和心血管分子生物学, 联系电话 0871-5377618, E-mail 为 wqxian@sina.com。肖丽梅, 硕士研究生, 研究方向为心血管病分子生物学。郝萍, 副教授, 硕士研究生导师。

且在整个新内膜形成和血管病变发展过程中, TR mRNA 表达均明显增加^[1]。因此, 应用人工合成的反义 TR 基因序列(oligodeoxynucleotides, ODN)抑制凝血酶诱导的血管 SMC 增殖效应, 探讨抑制血管 SMC 增殖机制, 并为下一步应用反义核酸技术治疗血管性疾病奠定基础。

1 材料和方法

实验参照文献[1, 2]进行。

1.1 材料

实验用 8~10 周龄 SD 大鼠; 新生牛血清购自杭州四季青生物材料研究所; DMEM 培养基、Trizol、阳离子脂质体(LipofectAMINE)为 GIBCO-BRL 公司产品; 凝血酶为 Sigma 产品; ³H-TdR、³H-肌醇购自中国科学院上海原子核研究所; DNA 分子质量标准(DL 2000)购自大连宝生生物工程有限公司; RNA 试剂提取(Takara RNA LA PCR TM, AMV) Ver1. I 购自宝生生物工程有限公司; TR 单克隆抗体来自华美生物有限公司; 其余材料和试剂为进口分装和国内产品。

1.2 血管平滑肌细胞培养

贴块法原代培养 SD 大鼠胸主动脉 SMC, 倒置显微镜下细胞具有典型的“峰谷”结构。实验用第 4~6 代细胞。

1.3 引物和反义寡核苷酸的合成

凝血酶受体(TR)基因序列的上游引物为 5'-CAGCCAGAATCTGAGAGGAT-3', 下游引物为 5'-GACCCGAAGTCCGAATCGGT-3', 由大连宝生生物工程有限公司合成和纯化, 扩增长度 430 bp。β-actin 序列的上游引物为 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3', 下游引物为 5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3', 扩增长度 300 bp。TR 反义硫代寡核苷酸片段序列为反义 5'-CAGCAAGCGCCGGGGCCC-3', 正义 5'-GGGCCCCGGCGCTTGCTG-3', 由宝生生物工程有限公司合成和纯化; 5'端荧光修饰 TR 反义硫代寡核苷酸, FAM 标记在 5'端, 激发波长 470 nm。

1.4 细胞转染及分组

采用阳离子脂质体介导的 DNA 片段转染方法进行反义 TR 基因 DNA 片段进行转染, 操作步骤如下: (1)用适量 0.25% 胰蛋白酶消化培养瓶中的细胞 1~2 min, 显微镜下计数细胞, 100 mL 培养瓶中加入 4×10^6 细胞, 添加培养基至 15 mL/瓶, 在 37℃培养 24 h, 至细胞贴壁生长达 80% 时, 准备转染。(2)在无菌玻璃试管中配制下列溶液: 溶液 A 按实验所需将相应的 TR 反义硫代寡核苷酸片段稀释在不含

小牛血清的 DMEM 培养基中, 终液量为 100 mL, 每瓶 3 mL, 充分混匀待用。溶液 B 将 Lipofect2000 50 μL, 稀释在不含小牛血清的 DMEM 培养基中, 稀释终体积同溶液 A, 混匀, 室温静置 5 min。(3)将溶液 A 和溶液 B 对应混合, 室温静置 20 min, 使之充分形成 DNA 和 Lipofect2000 的复合物(溶液 C)。(4)取出培养瓶, 吸出旧的细胞培养基, 将溶液 C 放入培养瓶中, 对照组加入等体积的 DMEM 培养。(5)实验分为正义组、反义组和对照组。(6)在 37℃培养 24 h 后取出转染, 每孔重新加入 18% 牛血清, 1% 双抗的 DMEM 新鲜培养基 15 mL, 继续在 37℃, 5% 二氧化碳培养箱中培养至实验所需时间。

1.5 反义凝血酶受体寡核苷酸的影响观察

用含 15% 小牛血清的 DMEM 培养基调细胞数为 2×10^4 /孔, 于 96 孔板中培养, 第二天细胞生长达融合状态时, 吸出旧培养基。按以上方法进行细胞转染, 将反义 TR ODN 0.5 μg 和等量正义 TR ODN 导入血管 SMC 内。转染 24 h 后, 更换培养基。继续培养 48 h。

实验分为反义组、正义组、对照组, 每组 4 孔, 每孔反应体积 100 μL, 转染细胞培养 48 h 后, 加入凝血酶 10 ku/L 的同时, 每孔培养板加入 3H-TdR 1 μCi, 作用 24 h 后, 再进行下述操作^[1]: 吸出培养基, 用 PBS 洗孔三次后, 每孔用 100 μL 冰冷的 10% 三氯乙酸于 4℃固定细胞 30 min, 再用 10% TCA 洗孔一次, 每孔 100 μL 1 mol/L NaOH 裂解细胞, 显微镜下观察细胞彻底裂解后, 每孔加 100 μL 1 mol/L HCl 中和, 每孔取 200 μL 加入 5.8 mL 闪烁液中, 闪烁液成分 PoP 0.6 g, PoPoP 80 mg, 苯 22 g, 二氧六环 200 mL, 液体闪烁计数仪作每分钟计数(cpm)。

1.6 反义凝血酶受体寡核苷酸对血管平滑肌细胞凝血酶受体 mRNA 表达的影响

用含 15% 小牛血清的 DMEM 培养基调细胞数为 4×10^6 /瓶, 于 100 mL 培养瓶中培养, 第二天生长达融合状态, 吸出旧培养基。按以上方法进行细胞转染, 将反义 TR ODN 25 μg 和等量正义 TR ODN 导入血管 SMC 内。实验分为三组: 正义组、反义组和对照组。转染 24 h 后, 更换培养基。继续培养 72 h 后, 用 Trizol 试剂, 按试剂说明书方法提取总 RNA。然后进行 RT-PCR 反应。在 PCR 反应管中分别加入 MgCl₂ 6 μL, 10 × buffer (不含 Mg²⁺) 4 μL, TakaRa LA Tag 酶 0.25 μL, dNTP 1.25 μL, TR 基因序列上、下游引物各 1.5 μL, β-actin 基因内参照上、下游引物各 0.3 μL, 实验样品 cDNA 10 μL, 灭菌蒸馏水 27.9 μL, 构成 50 μL 反应体积, 轻轻混匀高速(12 kr/min)

离心 10 s, 将 PCR 管置于 2400 Gene Amp PCR System 进行扩增反应, 反应条件为 94°C 30 s \rightarrow 52°C 30 s \rightarrow 72°C 1.5 min, 28 个循环。

取 PCR 产物 9 μL 与 1 μL 10 \times buffer 混匀后, 在水平电泳仪 (GNA-100) 中进行 1.5% 核酸琼脂糖电泳, 电压 80V, 90 min, 电泳结束后, 由 Phamaga 凝胶图象分析系统扫描, 计算机存储分析。

以 β -actin 为内参照标准, 对实验结果进行半定量分析, 并与对照组、正义组细胞表达情况进行比较, 其基本计算方法为: TR 基因表达强度 = (TR 基因条带亮度 - 背景亮度) \times 条带面积 / (β -actin 条带亮度 - 背景亮度) \times 条带面积

1.7 Western blot 分析

细胞转染 72 h 后, 从温箱中取出, 吸出旧培养基, 用 PBS 洗一次, 用细胞刮刮下细胞, 离心 10 min, 并弃上清, 细胞沉淀中加入 1 \times SDS 上样缓冲液 100 μL , 100°C 水浴 5~10 min, 冰水中冷却。

各取样本 20 μL 在 10% 聚丙烯酰胺浓度条件下 SDS-PAGE 凝胶电泳, 电压 120 V, 凝胶厚度 0.55 mm, 电泳结束后, 切下一条进考斯亮兰中摇动染色 30 min, 在脱色液中脱色, 观察蛋白分离情况。取出凝胶, 切除积层胶, 将分离胶转至转移缓冲液中, 剪下适当的蛋白杂交膜 PVDF 膜, 在纯甲醇溶液中泡 10 s, 迅速用蒸馏水漂洗 5 min, 在新鲜配制的含 15% 甲醇的转移缓冲液平衡杂交膜 10 min, 根据电转仪放置 PVDF 膜, 凝胶在 50 mA 条件下电转 2 h, 取出杂交膜, 切下一条在丽春红中杂色 2 min, 在双蒸馏水中漂洗。然后将 PVDF 杂交膜放置于平皿中, 加入 3% BSA 10 mL 37°C 温箱中封闭 1 h, 自封闭液中取出 PVDF 膜, 于平皿中加入 1:70 稀释的 TR 大鼠单克隆抗体孵育液 7 mL, 37°C 温育 1 h, 丢弃孵育液, 室温下用含吐温 PBS 液漂洗 5 min 共 3 次, 加入 1:5 000 HRP 标记的羊多抗 IgG, 二抗孵育液 15 mL 37°C , 室温温育 1 h, 室温下用含 PBST 漂洗 5 min, 共 3 次。用新鲜配制的 DAB 显色液滴于上, 室温下静置 20 min 显色, PBS 漂洗终止显色反应。

1.8 ^3H -肌醇掺入试验

用含 15% 小牛血清的 DMEM 培养基调细胞数为 2×10^4 /孔, 于 96 孔板中培养, 第二天生长达融合状态, 吸出旧培养基。按以上细胞转染方法进行, 将反义 TR ODN 0.5 μg 和等量正义 TR ODN 导入血管 SMC 内。转染 24 h 后, 更换培养基。继续培养 48 h。然后分为三组, 反义组、正义组、对照组, 每组 4 孔, 每孔反应体积 100 μL , 加入凝血酶 10 ku/L 的同时, 每孔培养板加入 ^3H -肌醇 15 Ci/L, 作用 24 h, 按

下述方法操作^[3]: (1)用 PBS 洗孔三次; 加入 100 μL 的氯仿: 甲醇: HCl (20: 40: 1) 混合液; (2)再加 100 μL 的氯仿: 甲醇: HCl 混合液; (3)加入 800 μL 的蒸馏水和氯仿, 分离组织和水相; (4)离心 $500 \text{ g} \times 10 \text{ min}$ 4°C ; (5)小心吸取上层水相中的磷酸肌醇; (6)加入闪烁液, 用液体闪烁计数仪测 cpm 值。

2 结果

2.1 总 RNA 质量鉴定

用 DNA/RNA 测量仪检测 RNA 的 260 nm/280 nm 的比值在 1.6~1.8 之间, 符合 Trizol 试剂要求, 说明 RNA 纯度良好。说明所提血管 SMC RNA 可用于 RT-PCR 实验。

2.2 反义凝血酶受体寡核苷酸对血管平滑肌细胞转染情况

荧光相差显微镜对荧光标记的反义 TR ODN 在细胞内分布情况进行观察, 反义 TR ODN 在血管 SMC 内转染见图 1 (Figure 1)。

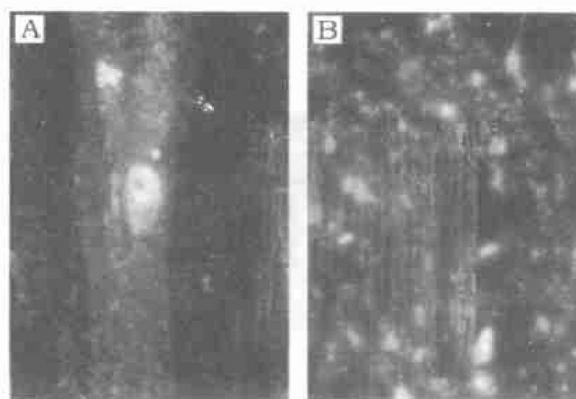


图 1. 反义凝血酶受体寡核苷酸在血管平滑肌细胞内转染

A 为单一血管 SMC 浆和细胞核都存在转染反义 TR ODN; B 为多个血管 SMC 内都已经转染了反义 TR ODN。

Figure 1. The ODN of thrombin receptor antisense sequences were transferred into cultured smooth muscle

2.3 反义凝血酶受体寡核苷酸对血管平滑肌细胞凝血酶受体 mRNA 表达的影响

血管 SMC 经 TR 基因引物引导扩增在 430 bp 处有细胞的 TR 基因的阳性出现, 但反义的 TR 基因表达明显弱于对照组, 对照组的 TR 基因表达强度是反义 TR 基因表达强度 4 倍, 正义的 TR 基因表达是反义 TR 基因表达强度的 2.5 倍 (图 2 和表 1, Figure 2 and Table 1)。

2.4 反义凝血酶受体寡核苷酸对血管平滑肌细胞凝血酶受体蛋白表达的影响

反义 TR 寡核苷酸片对 TR 基因蛋白的表达

影响, Western blot 杂交分析证实, 在 TR ODN 体外转染 72 h, TR 基因蛋白量表达水平明显下降(与对照组相比较)。



图 2. 聚合酶链反应检测反义凝血酶受体寡核苷酸对血管平滑肌细胞凝血酶受体 mRNA 表达的影响 M 为标准品, 1 为正义组, 2 为反义组, 3 为对照组。

Figure 2. Effect of thrombin receptor antisense sequences on TR mRNA in rat cultured vascular smooth muscle cells

表 1. 反义凝血酶受体寡核苷酸对血管平滑肌细胞凝血酶受体 mRNA 表达的影响

Table 1. Effect of TR antisense sequences on TR mRNA in rat cultured vascular smooth muscle cell

分 组	TR 基因表达强度
对照组	0.69
正义组	0.47
反义组	0.17

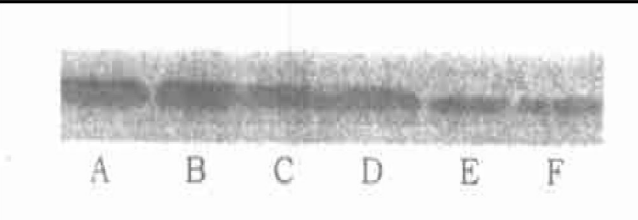


图 3. 反义凝血酶受体寡核苷酸对血管平滑肌细胞凝血酶受体蛋白表达的影响 A 和 B 为对照组, C 和 D 为正义组, E 和 F 为反义组。

Figure 3. Effect of TR antisense sequences on TR protein in cultured rat vascular smooth muscle

2.5 反义凝血酶受体寡核苷酸转染血管平滑肌细胞对血管平滑肌细胞增殖的影响

反义组³H-TdR 掺入率仅为对照组的 56.25%, 而正义组为对照组的 63.79%, 反义组与对照组之间存在统计学差异($P < 0.05$; 表 2, Table 2)。

表 2. 反义凝血酶受体寡核苷酸对血管平滑肌细胞³H-TdR 掺入率的影响

Table 2. The influence of TR antisense sequences on ³H TdR incorporation in cultured rat vascular smooth muscle

分 组	³ H-TdR 掺入率
对照组	840.7 ± 115.5
正义组	536.3 ± 110.6
反义组	472.9 ± 112.7

2.6 反义凝血酶受体寡核苷酸转染血管平滑肌细胞对磷酸肌醇代谢的影响

反义组细胞³H-肌醇仅为对照组的 28.85%, 正义组的³H-肌醇为对照组的 52.65%, 三组之间有统计学差异($P < 0.05$; 表 3, Table 3)。

表 3. 反义凝血酶受体寡核苷酸对血管平滑肌细胞³H-肌醇代谢的影响

Table 3. The influence of TR antisense sequences on ³H inositol in cultured rat vascular smooth muscle

分 组	³ H-肌醇
对照组	150.8 ± 16.6
正义组	79.4 ± 12.1
反义组	43.5 ± 9.9

3 讨 论

研究表明, 凝血酶对血小板、血管内皮细胞和 SMC 的作用都是通过激活不同类型细胞表面的 TR 而实现的。TR 是 G 蛋白偶联家族中的一个新成员, Vu 等^[3]从巨核样 Dami 细胞获得的 cDNA 通过微注射方法在非洲蟾蜍卵母细胞克隆和表达了对凝血酶起作用的人细胞表面受体。血小板、巨噬细胞、动脉内皮细胞和血管 SMC 都能表达 TR。此外, 成纤维细胞、心肌细胞、肾小球膜细胞、人肾小球表皮细胞、人外周血单核细胞、外周血杀伤细胞、T 淋巴细胞(而非 B 淋巴细胞)、T 原始淋巴细胞、成骨样细胞等也能表达 TR。

凝血酶受体(TR)在细胞内信息传递过程中起着重要作用。刺激 TR 引起序列细胞内信息变化。在培养的融和状态的大鼠主动脉 SMC, α 凝血酶依赖 K⁺-Na⁺ 交换体的快速酸化和随后的碱化, 在数秒钟内, α 凝血酶也激活了磷脂酶 C, 并诱导磷酸肌醇水解成 3-磷酸肌醇和 α 磷酸肌醇, 随后产生前列腺素。3-磷酸肌醇作用于内质网质, 引起细胞内

Ca^{2+} 升高, 继之激活 $\text{K}^{+}-\text{Na}^{+}$ 交换, 细胞内 Ca^{2+} 增加, 促进细胞核原癌基因 *C-fos* 和 *C-myc* 的表达, 促进了 SMC 增殖; 同时使抑制血管 SMC 增殖的腺苷酸环化酶(cAMP)下降。TR 胞内部分的磷酸化取决于 G 蛋白复合酶的启动, 而受体膜部分的磷酸化依赖于 α 凝血酶的浓度及磷脂酶 C 激活后的反向刺激 TR。

在人动脉组织中通过免疫组织化学和原位杂交发现只有内皮细胞从蛋白质水平和 mRNA 水平显示阳性信号; 在 As 病灶中内皮细胞、内膜 SMC 和巨噬细胞从蛋白质水平和 mRNA 水平显示阳性信号。球囊损伤动脉内膜后 6 h, TR mRNA 即在中层平滑肌细胞显著表达, 且在整个新内膜形成和血管病变发展过程中, TR mRNA 表达均明显增加。上述研究表明, As 病灶及冠壮动脉腔内成形术后(如 PTCA)再狭窄后局部凝血酶产生增加, 中层平滑肌细胞表面 TR 表达增加, 促进了 As 病变的发展和冠壮动脉腔内成形术后再狭的形成。可见, 研究 TR 抑制剂, 预防和治疗 As 及血管成形术后(如 PTCA)再狭窄就成当今心血管疾病的又一热点问题。水蛭素(hirudin)是高度特异的 TR 抑制剂, 它不但直接阻止凝血酶降解纤维蛋白原, 而且与凝血酶竞争结合位点, 达到阻止 TR 活化的效果。经球囊导管损伤的动物模型实验显示, 水蛭素可减少损伤后 SMC 增殖, 阻止血管病变的进展; 在治疗不稳定心绞痛的多中心随机临床研究中, γ -水蛭素改善血管病变的作用优于肝素(冠脉造影证实); 但与其它抗凝剂相似, 它亦具有并发出血的危险。PTCA 术后患者使用单克隆抗体 TE3(直接抑制血小板聚集), 降低了术后血管病变的发生率。Cook 等^[4]将 TR 抑制剂(多克隆抗体 IgG9600)用于非洲绿猴动物模型表明, 可阻止血小板 TR, 有望防止动脉受体后的血栓形成。尚有争对 TR 上 Se42-Phe55 序列的单克隆抗体抗体, 但效果不佳。上述 TR 抑制剂皆不能完全阻止损伤的血管病变发生。

反义核酸技术是跟据碱基互补原理, 用人工合成或生物体的特异互补 DNA 或 RNA 片段(或其化学修饰产物)抑制或封闭基因表达技术。反义核酸包括反义寡核苷酸(ODN)和构建反义表达载体表达的反义核酸, 反义寡核苷酸是使用 DNA 合成仪人工合成, 方便, 迅速, 目前被广泛应用。构建反义表达

载体是利用基因重组技术将一段靶基因反向插入在载体的启动子和转录终止子之间, 即构建反义表达载体, 将其导入细胞表达反义 RNA 而发挥作用。反义核酸技术的意义在于仅干扰靶基因功能, 对基因组其它基因的结构无影响, 方法简便。反义核酸技术作为基因治疗的一种方法, 在肿瘤学研究中取得颇多进展, 近期在心血管研究领域中也开始展露新的苗头。

Chaikof 等^[5]以 TR cDNA 为序列设计合成了多条反义寡核苷酸, 应用于抑制血管 SMC 增殖时发现, 反义 TR ODN 抑制血管 SMC 增殖为序列特异性, 且具有随时间和浓度不同而变化的特点。为进一步探讨 TR 在血管 SMC 增殖中的作用, 本研究通过培养 SD 大鼠主动脉血管 SMC, 应用人工合成的反义 TR ODN 抑制凝血酶诱导的血管 SMC 增殖效应, 并探讨其抑制血管 SMC 增殖机制。研究结果显示, 反义 TR ODN 显著抑制了凝血酶诱导的血管 SMC 增殖; 从受体 mRNA 水平和受体蛋白质水平抑制了 DNA 和转录和 mRNA 翻译; 反义 TR ODN 抑制凝血酶诱导的血管 SMC 磷酸肌醇代谢, 与 Chaikof 等^[5]的研究结果基本一致。因而认为, 反义 TR ODN 从多个环节抑制了血管 SMC 的信号传递, 从而抑制了血管 SMC 增殖。

该研究对探讨凝血酶及其受体在血管 SMC 增殖中的作用及其机制, 探讨 TR 在血管病变中的作用有重要意义, 并为利用核酸技术治疗血管性疾病(As 及冠壮动脉血管腔内成形术后再狭窄)中血管 SMC 增殖提供理论和实验依据。

[参考文献]

- [1] 王启贤, 吕俊升. 凝血酶对大鼠血管平滑肌细胞血小板源性生长因子基因表达的影响. 中国动脉硬化杂志, 2000, 8 (1): 26-31
- [2] 王启贤, 周兰清, 赵媛, 吕俊升. 凝血酶对大鼠血管平滑肌细胞血小板源性生长因子受体基因表达的影响. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9 (3): 253-254
- [3] Vu T-KH, Huang DT, Wheaton VI, t Coughlin. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. Cell, 1991, 64: 1 057-068
- [4] Cook JJ, Sitko GR, Bednar B, Condra C, Mellot MJ, Feng DM, et al. An antibody against the exosite of the cloned thrombin receptor inhibits experimental arterial thrombosis in the African green monkey. Circulation, 1995, 91 (12): 2 961-971
- [5] Chaikof EL, Caban R, Yan CN, Rao G. Growth-related responses in arterial smooth muscle cells are arrested by thrombin receptor antisenses. J Biol Chem, 1995, 270 (13): 7 431-436

(此文编辑 胡必利)