

RNA 干扰沉默生存素基因表达对移植静脉内膜增生的影响

胡新华¹, 张宏伟², 张 强¹, 张志深¹, 杨 军¹

(1. 中国医科大学附属第一医院外科, 辽宁省沈阳市 110001; 2. 营口市中心医院普外科, 辽宁省营口市 115002)

[关键词] 病理学与病理生理学; 移植血管; 内膜增生; 免疫蛋白印迹分析; 生存素; 基因表达; RNA 干扰

[摘要] 目的 研究 RNA 干扰沉默生存素基因表达对移植静脉内膜增生的抑制作用。方法 Wistar 大鼠 48 只, 建立自体静脉移植模型, 术后随机分为对照组、空载体组、shRNA 对照组、shRNA 组, 施加不同的处理因素, 在移植 1、2 周取材。比较内膜增生程度, 半定量逆转录聚合酶链反应检测生存素基因的 mRNA 表达, Western blot 检测生存素基因的蛋白产物表达, 免疫组织化学法检测生存素及增殖细胞核抗原的表达, TUNEL 法检测血管平滑肌细胞凋亡的变化。结果 移植 1、2 周内膜增生明显, 局部转染靶向生存素基因的 shRNA 表达载体能够明显抑制内膜增生 ($P < 0.05$)。血管移植后, 对照组及空载体组生存素的 mRNA 及蛋白产物表达显著增加, 而 shRNA 组却显著减少 ($P < 0.05$), 血管平滑肌细胞中增殖细胞核抗原表达减少, 而 TUNEL 法阳性细胞明显增加。结论 采用 RNA 干扰沉默生存素基因表达可显著抑制移植静脉的内膜增生, 其作用机制可能是通过抑制生存素的基因及蛋白产物表达, 从而抑制血管平滑肌细胞增殖, 促进其凋亡而实现的。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of RNA Interference Targeting Survivin on the Intimal Hyperplasia in Vein Graft

HU Xin-Hua, ZHANG Hong-Wei, ZHANG Qiang, ZHANG Zhi-Shen, and YANG Jun

(Department of Surgery, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Vein Graft; Intimal Hyperplasia; Survivin; Gene Expression; RNA Interference

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of RNA interference targeting survivin on the the intimal hyperplasia (IH) in vein graft in rats. **Methods** Autogenous vein graft model was established in 48 Wistar rats, transplanting the interior jugular vein to common jugular artery by microsurgical technique. The rats were divided into 4 groups according to different processing methods, including control team, empty vector team, shRNA control team and shRNA targeting surviving team. Vein graft samples were harvested on 1 or 2 weeks after surgery and survivin mRNA were measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Western blotting and immunohistochemistry were also used to detect the expression of survivin and proliferation cell nuclear antigen (PCNA). Apoptosis of vascular smooth muscle cells (VSMC) was detected by TUNEL. IH was compared at the same time. **Results** The IH was evident 1 or 2 weeks after vein grafting, and ameliorated by transfection of shRNA vector of survivin ($P < 0.05$). The expression of survivin mRNA was also inhibited significantly by shRNA of survivin.

Expression of survivin and PCNA decreased greatly in shRNA team, but the positive cells of TUNEL increased significantly.

Conclusion Local transfection of shRNA expression vector targeting survivin can inhibit the IH after vein graft, which maybe accomplished by the inhibition of gene and protein expression of survivin.

血管移植后狭窄、闭塞的关键环节就是血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖、凋亡, 两者之间的失衡是重要的致病因素。生存素 (survivin) 是一个近期发现的凋亡蛋白抑制剂 (inhibitor of apoptosis protein, IAP) 家族成员^[1]。生存素有调节细胞有丝分裂的功能, 是联系细胞周期和细胞凋亡的重要因子, 是目前发现的作用最强的凋亡抑制因子。我们拟采用 RNA 干扰方法 (RNA interfer-

ence, RNAi) 沉默生存素基因表达, 增加血管移植早期 VSMC 凋亡, 观察内膜增生的改变。

1 材料与方法

1.1 短发夹环 RNA 的设计

在 GeneBank 中查到大鼠生存素的基因序列 (登录号为 AF276775) 并输入到 RNAi 设计软件中, 选择 RNAi 片段序列, 同时选择一无关寡核苷酸序列作对照, 用 BLAST 软件进行同源性分析。短发夹环 RNA (shRNA) 序列的排列顺序均为: BamH I 酶切位点 + 反义序列 + Loop + 正义序列 + 终止信号 + Hind III 酶切位点。shRNA 对照为针对无关的 29 bp 序列 (TTG

[收稿日期] 2006-07-06 [修回日期] 2006-11-09

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30400435, 30371401), 辽宁省博士启动基金资助项目 (20041053)

[作者简介] 胡新华, 博士, 副教授, 主要从事血管外科疾病的基础和临床研究, E-mail 为 xinhua@126.com。张宏伟, 副主任医师, 主要从事普通外科临床工作。张强, 教授, 博士研究生导师, 主要从事血管外科疾病的基础和临床研究。

ACA CTG AAC CAT CAA CGA GAC AAT AA) 5'-GGA TCC CGT TGA CAC TGA ACC ATC AAC GAG ACA ATA ATT GAT ATC CGT TAT TGT CTC TCG TTG ATG GTT CAG TGT GAA TTT TTT CCA AAA GCT T3'; 生存素 shRNA 为针对 261~289 之间的 29 bp 序列(TCC TTA CAG TCA AGA AGC AGG TGG AAG AA) 5'-GGA TCC CGT TCT TCC ACC TGC TTC TTG ACT GTA AGG ATT GAT ATC CGT CCT TAC AGT CAA GAA GCA GGT GGA AGA ATT TTT TCC AAA AGC TT3'。

1.2 T 载体克隆

采用化学合成法合成单链寡核苷酸序列, 通过 BamH I 和 Hind III 位点酶切、回收, 经 T4 连接酶插入 pGEM-T 载体。连接反应体系体积 10 μ L, 含 5 μ L 2 \times 连接反应缓冲液、1 μ L T 载体、1 μ L 逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 产物(约 0.25 μ g)、1 μ L T4 连接酶, 4 $^{\circ}$ C 过夜。同时用 TSS 法制备感受态细胞: 大肠杆菌 DH5 α 在 LB 培养基中振荡至 A_{600 nm} 为 0.3~0.4, 取 1 mL 菌液, 4 $^{\circ}$ C 1 000 r/min 离心 10 min, 将菌体重悬于 100 μ L TSS 液中。然后将上述连接产物加入感受态细胞中, 冰浴 30 min, 加入 500 μ L LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 1 h, 最后将菌液均匀涂布在含 IPTG/XGal/氨苄青霉素的 LB 平板上, 筛选阳性菌落, 提取重组质粒, 酶切鉴定。将筛选的重组子进行序列分析(由大连宝生物公司完成), 确认所得克隆的序列正确。

1.3 短发夹环 RNA 表达载体的构建

BamH I 和 Hind III 分别双酶切重组 pGEM-T 载体, 凝胶电泳回收目的片段。建立连接反应体系, 将 RNAi 序列分别插入 pEGP-C1 载体, 构建 shRNA 真核表达载体。转化大肠杆菌 DH5 α , 卡那霉素筛选阳性菌落。提取重组质粒。双酶切鉴定并测序。分别命名为 pEGP-shRNA-C 对照和 pEGP-生存素-shRNA。

1.4 动物模型的建立及标本收集

Wistar 大鼠 48 只(由中国医科大学实验动物中心提供), 雌雄不拘, 体重 200~250 g。10% 水合氯醛水溶液 300 mg/kg 腹腔注射麻醉。行无菌显微外科手术操作: 取大鼠右颈静脉后支长约 4 mm, 肝素盐水冲洗, 11-0 血管缝合线一端吻合移植于同侧颈总动脉, 每个吻合口结节缝合 6~8 针, 随机分为对照组、空载体组、shRNA 对照组、生存素 shRNA 组, 每组再分两个亚组(各 6 只)。吻合前将移植静脉段置于阳离子脂质体 Lipofectin (GIBCO/BRL) 包装的 DNA 质粒溶液中浸泡 30 min, 应用 11-0 无创缝合线将静脉段一端吻合移植于同侧颈总动脉。空载体组使用 pEGP-C1 空质粒, 对照组使用生理盐水。

分别在移植后 1、2 周切取移植静脉, 液氮中冻存。

1.5 组织形态学观察

移植静脉制成 4 μ m 厚冰冻切片, 荧光显微镜下测质粒转染及表达情况。标本于 10% 中性福尔马林中固定, 常规脱水、透明、浸蜡包埋制成蜡块, 切成 4 μ m 厚切片。然后常规脱蜡至水, HE 和弹力纤维 VG 染色, 应用计算机图像分析系统采集图像, 每个标本至少随机取 5 处, 测增生内膜厚度, 取平均值。

1.6 半定量逆转录聚合酶链反应

各取约 100 mg 血管组织, 加 1 mL Trizol 裂解, 提取总 RNA 并逆转录为 cDNA。根据 GenBank 序列设计引物, 生存素引物正义链: 5'-CTG ATT TGG CCC AGT GTT TT-3', 反义链: 5'-AAG CTG GGA CAA GTG GCT TA-3', 产物长度 336 bp; 内参照引物正义链: 5'-CTG TGC CCA TCT ATG AGG GT-3', 反义链: 5'-CAT CGT ACT CCT GCT TGC TG-3', 产物长度 606 bp。20 μ L PCR 反应体系, Taq DNA 聚合酶 1 u, 引物各 50 pmol。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s \rightarrow 55 $^{\circ}$ C 复性 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 循环 30 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。2% 琼脂糖电泳, 凝胶自动成像系统上摄像, 分析各条带吸光度值。

1.7 免疫组织化学染色及凋亡检测

抗生存素及增殖细胞核抗原(proliferation cell nuclear antigen, PCNA) 多克隆抗体均购自武汉博士德公司(兔 IgG 多抗, 工作浓度 1:100)。SABC 法染色, DAB 显色。TUNEL 法凋亡检测试剂盒购自武汉博士德公司, 按试剂盒说明染色, DAB 显色。正常静脉作为自身对照, PBS 代替一抗作阴性对照。400 倍光镜下观察, 细胞浆或胞核出现棕黄色颗粒为阳性, 计数单位视野内阳性细胞占总细胞数的百分比。

1.8 免疫蛋白印迹分析

按《分子克隆》^[2] 配制细胞裂解液, 剪碎血管组织后, 机械匀浆, 4 $^{\circ}$ C 低温 12 000 r/min 离心 10 min。考马氏亮蓝 R250 染色法测总蛋白质浓度, 将各组浓度调到同一水平。制备 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 样品加热变性后每孔加蛋白样品 100 μ g, 电泳后将蛋白转到硝酸纤维素滤膜。丽春红 S 染色确定转膜情况并标记蛋白 Marker 位置。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 一抗 1:1 000 稀释, 室温下摇 2 h 后 TBS 洗膜 4 次; 按 1:1 000 加入马抗兔 IgG-HRP, TBS 洗 4 次后加入 ECL 显色液 2 min, 暗室显影 2 min 后冲洗胶片。凝胶成像分析系统上摄像分析, 计算吸光度值。

1.9 统计学处理方法

组内差异用方差分析, 组间比较用 q 检验。

2 结果

2.1 T 载体克隆鉴定

T 载体克隆后挑选阳性菌落, 提取质粒, 用 BamH I 和 Hind III 双酶切, 筛选含正向插入目的片段克隆。重组 T 载体长约 3.1 kb, 双酶切后产生 135 bp 目的片段及 2.9 kb 载体片段, 证实为目的片段。

2.2 短发夹环 RNA 载体的鉴定及包装

shRNA 表达载体重组质粒转化大肠杆菌后, 筛选阳性菌落提取质粒 DNA, BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定。含插入片段的重组质粒长约 4.9 kb, 双酶切产生 135 bp 目的片段及 4.7 kb 载体片段, 酶切结果见图 1。测序结果表明, RNAi 片段插入 pEGP-C1 载体, 成功构建 RNAi 表达载体。

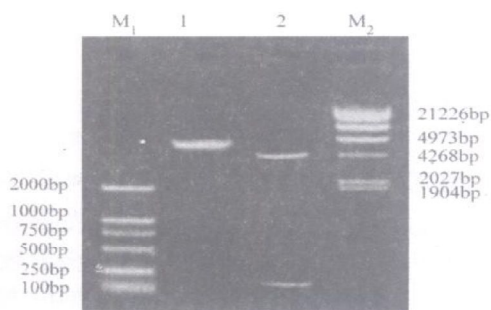


图 1. 重组 pEGP-C1-shRNA 载体酶切电泳图 M₁ 为 DL2000 Marker, 1 为 BamH I 单酶切, 2 为 BamH I、Hind III 双酶切, M₂ 为 DNA / HindIII+ EcoRI Marker。

2.3 组织形态学染色结果

移植 1 周, 荧光显微镜下可见移植静脉中层及内膜有较多基因表达; 移植 2 周, 表达有所减少。HE 染色及弹力纤维 VG 染色可见静脉移植后 1、2 周内膜增厚。术后 2 周内膜增生更为明显: 空载体组、shRNA 对照组与对照组内膜增生程度相似, 差异无显著性 ($P > 0.05$); 生存素 shRNA 组内膜增生明显减轻 (表 1)。

表 1. 移植静脉内膜增生厚度比较 ($\bar{x} \pm s$, μm)

组别	移植静脉吻合口		移植静脉中段	
	1 周	2 周	1 周	2 周
对照组	16.0 \pm 7.2	22.6 \pm 6.2	13.6 \pm 7.0	17.0 \pm 8.0
空载体组	16.4 \pm 8.1	21.4 \pm 6.8	12.6 \pm 8.2	16.6 \pm 8.5
shRNA 对照组	15.8 \pm 7.3	22.0 \pm 6.4	12.8 \pm 5.8	16.5 \pm 6.9
生存素 shRNA 组	8.6 \pm 4.2 ^{ab}	12.6 \pm 5.9 ^{ab}	6.0 \pm 3.2 ^{ab}	10.1 \pm 3.4 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 shRNA 对照组相比。

2.4 免疫组织化学、凋亡检测及免疫蛋白印迹结果

正常静脉极少有生存素蛋白产物和 PCNA 阳性表达。移植后 1~2 周, 对照组血管外膜附近生存素和 PCNA 阳性细胞明显增多, 细胞质或胞核染成棕黄色; 生存素 shRNA 组术后 1、2 周, 生存素和 PCNA 蛋白表达均低于对照组, 凋亡细胞却增加 ($P < 0.05$, 表 2 和图 2)。免疫蛋白印迹与免疫组织化学染色结果基本一致, 转染生存素 shRNA 表达载体后生存素蛋白表达量减少 (图 3)。

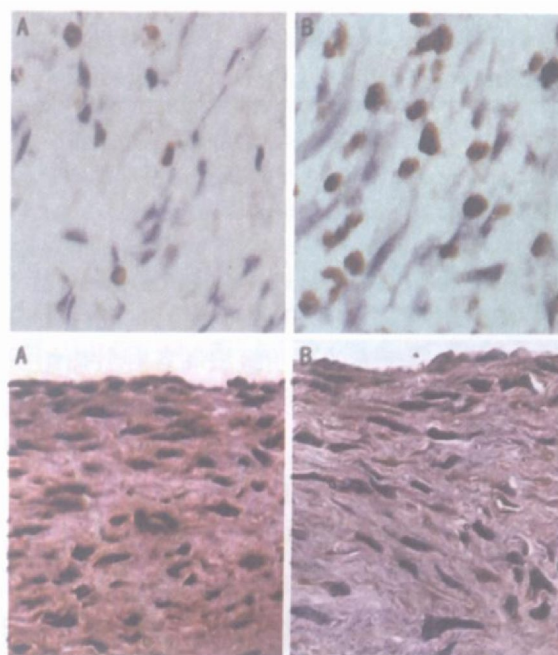


图 2. 移植 2 周对照组 (A) 和转染生存素 shRNA 组 (B) 凋亡检测 (上图) 和生存素蛋白表达检测 (下图) ($\times 40$)

表 2. 移植静脉生存素、增殖细胞核抗原免疫组织化学及 TUNEL 染色结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	生存素		PCNA		TUNEL	
	1 周	2 周	1 周	2 周	1 周	2 周
对照组	26.2% \pm 11.2%	29.4% \pm 7.8%	32.0% \pm 7.5%	38.5% \pm 7.1%	14.0% \pm 4.0%	18.5% \pm 7.0%
空载体组	26.8% \pm 10.8%	27.7% \pm 4.9%	34.9% \pm 7.4%	37.7% \pm 8.0%	14.5% \pm 7.4%	19.7% \pm 4.0%
shRNA 对照组	25.0% \pm 9.1%	28.3% \pm 6.8%	35.7% \pm 9.5%	38.8% \pm 8.2%	15.2% \pm 5.5%	20.0% \pm 8.2%
生存素 shRNA 组	13.4% \pm 3.6% ^{ab}	11.2% \pm 5.4% ^{ab}	18.6% \pm 6.0% ^{ab}	28.0% \pm 5.6% ^{ab}	25.6% \pm 8.0% ^{ab}	29.0% \pm 5.6% ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 shRNA 对照组相比。

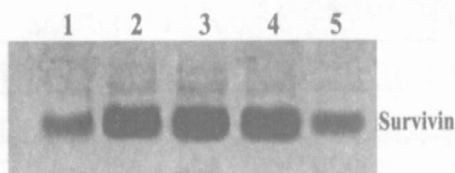


图3. 移植2周免疫蛋白印迹结果 1为正常静脉, 2为对照组, 3为空载体组, 4为shRNA对照组, 5为生存素shRNA组

2.5 半定量逆转录聚合酶链反应结果

正常静脉生存素的 mRNA 表达很少 (0.06 ± 0.03)。移植1周, 对照组生存素的 mRNA 表达明显增强; 术后2周表达最强。shRNA 组在术后1、2周生存素的 mRNA 表达显著减少(表3)。

表3. 移植静脉生存素的 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	移植1周	移植2周
对照组	0.64 ± 0.20	0.84 ± 0.30
空载体组	0.59 ± 0.18	0.86 ± 0.25
shRNA 对照组	0.58 ± 0.26	0.79 ± 0.29
生存素 shRNA 组	0.25 ± 0.12^{ab}	0.21 ± 0.04^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 shRNA 对照组相比。

3 讨论

生存素是一个新发现的 IAP 家族成员。IAP 家族是继 Bcl-2 家族后发现的又一类凋亡调控蛋白。生存素广泛表达于人的胚胎组织和各种肿瘤组织, 但仅在少数正常成人组织表达。研究表明, 生存素可抑制 Fas、caspase、bax、X 射线等多种凋亡刺激因子引起的凋亡, 是至今发现最强的凋亡抑制因子。Caspase 级联式激活并溶解蛋白质是凋亡发生的核心机制, 而生存素能抑制由 Fas/caspase8 和 Bax/细胞色素 C 诱导的 caspase 活化和凋亡, 可能通过作用于各个凋亡途径的汇集点, 即直接抑制终末效应蛋白 caspase3 和 caspase7, 从而抑制凋亡^[3]。

移植血管狭窄闭塞是一个多因素、多阶段和多基因参与的复杂病理过程, 是对损伤、血流动力学或体液改变的适应性反应, 确切发生机制目前仍不清楚^[4]。近来人们逐渐认识到由于 VSMC 凋亡以及细胞外基质合成或降解所导致的血管重塑在这一过程中的重要作用。凋亡使细胞数减少而有利于扩张性血管重塑, 而 VSMC 增殖及内膜增生则导致收缩性血管重塑。这一机制的阐明有可能寻找到新的干预靶点, 从而最终解决这一临床难题。我们的既往研究结果已经证明 VSMC 的凋亡与增殖均参与了静脉

移植后的血管重塑过程, 并且 VSMC 的增殖与凋亡存在动态失衡; 除此之外, 还有多种细胞因子、转录因子以及早期应答基因均参与了这一复杂过程^[5]。但是迄今为止, 通过促进 VSMC 凋亡来防止移植血管狭窄、闭塞的研究报道不多。

RNA 干扰也被称为基因沉默疗法 (gene silencing), 是近年来发现和发展起来的新型基因阻断技术, 主要利用双链 RNA 诱发对宿主细胞特异性 RNA 转录的抑制, 从而抑制特异基因表达^[6]。由于双链 RNA 在体内无法稳定表达而发挥作用, 人们发现小的发夹样 RNA (shRNA) 可以发挥与双链 RNA 相同的作用。通过在哺乳动物细胞内转染带有 RNA 聚合酶 ④启动子 H1 或 U6 的基因, 可形成发夹样的 RNA^[7]。本研究构建了靶向生存素基因的逆转录病毒 RNAi 载体, 局部转染到移植血管后, 生存素和 PCNA 表达均明显减弱, 凋亡表达却得到增强, 同时内膜增生受到显著抑制, 初步证实通过促进 VSMC 凋亡而防止移植血管狭窄、闭塞的可行性, 为该类疾病的防治提供了新的干预靶点。VSMC 凋亡有两方面的作用: 当凋亡程度与巨噬细胞或 VSMC 吞噬作用平衡时, 可能有助于血管损伤的修复; 如果该平衡失调, 凋亡细胞或凋亡小体清除不充分会导致血管粥样硬化斑块进展, 凋亡过多如不伴适量的吞噬作用还会导致巨噬细胞增多并分泌细胞因子, 这将进一步增加 VSMC 迁移、增殖而加重粥样硬化, 可见凋亡不足或过分凋亡均会造成血管重塑障碍。移植 1~2 周是 VSMC 增殖高峰, 此时凋亡不足为 VSMC 增殖导致内膜增生提供了条件, 也提示 VSMC 凋亡不足可能是内膜增生的一个重要机制。

[参考文献]

- [1] Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice [J]. *Cancer Res*, 2004, **64** (20): 7 183-190
- [2] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 克隆化基因所表达蛋白质的检测与分析[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社, 1992; 852-898
- [3] Yang D, Wehn A, Bishop JM. Cell division and cell survival in the absence of surviving [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (42): 15 100-105
- [4] Thury A, van Langenhove G, Carlier SG, Albertal M, Kozuma K, Regar E, et al. High shear stress after successful balloon angioplasty is associated with restenosis and target lesion revascularization [J]. *Am Heart J*, 2002, **144** (1): 136-143
- [5] 胡新华, 张强, 孙达欣, 段佩琰, 王新文, 段志泉. 核转录因子 κB 及其抑制基因在自体移植静脉中的表达 [J]. *中华医学杂志*, 2002, **82** (22): 1 546-549
- [6] Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells [J]. *Nature*, 2000, **404** (6775): 293-296
- [7] Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (9): 6 047-052

(此文编辑 许雪梅)