

抑制人巨细胞病毒 UL83 基因对人脑动脉平滑肌 22 α 及血管紧张素受体表达的影响

王佳伟, 脱厚珍, 王瑞金, 李伟荣, 冯子敬, 陈 璐, 王得新

(首都医科大学附属北京友谊医院神经内科, 北京市 100050)

[关键词] 分子生物学; 人巨细胞病毒; 平滑肌 22 α ; 血管紧张素受体; 脑动脉; UL83 基因; RNA 干扰; 基因沉默

[摘要] 目的 探讨人巨细胞病毒 UL83 基因对人脑动脉平滑肌 22 α 及血管紧张素受体表达的影响。方法 利用转染技术把 RNA 干扰转染到人巨细胞病毒感染的体外培养的人脑动脉血管平滑肌细胞中, 建立 RNA 干扰人巨细胞病毒 UL83 基因的细胞模型。采用免疫荧光技术、逆转录聚合酶链反应和蛋白电泳等技术观察平滑肌 22 α 及血管紧张素 1 型受体和 2 型受体基因的表达变化。结果 利用 RNA 干扰技术成功干扰了人巨细胞病毒 UL83 基因 mRNA 的复制和蛋白表达, 沉默人巨细胞病毒 UL83 基因后血管紧张素 1 型受体基因表达下调, 而血管紧张素 2 型受体基因和平滑肌 22 α 基因表达上调。结论 成功建立了人巨细胞病毒感染体外培养的人脑动脉血管平滑肌细胞 UL83 基因沉默的细胞模型。人巨细胞病毒 UL83 基因可能通过激活血管紧张素 1 型受体, 抑制血管紧张素 2 型受体和平滑肌 22 α mRNA 的转录表达来发挥作用。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

The Expression of Smooth Muscle 22 α and Angiotensin Receptors in Human Brain Artery After Human Cytomegalovirus UL83 Gene Inhibited by RNA Interference

WANG Jia Wei, TUO Hou Zhen, WANG Rui Jin, LI Wei Rong, FENG Zi Jing, CHEN Jun, and WANG De Xin

(Department of Neurology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

[KEY WORDS] Human Cytomegalovirus; Smooth Muscle 22 α ; Angiotensin Receptor; Brain Artery; UL83 Gene; RNA Interference; Gene Silencing

[ABSTRACT] **Aim** To study the pathogenesis of atherosclerosis by the expressions of smooth muscle 22 α (SM22 α) and angiotensin receptors in vascular smooth muscle cells (VSMC) of human brain artery after human cytomegalovirus (HCMV) UL83 inhibited by RNA interference (RNAi). **Methods** HCMV AD169 strain infected VSMC in vitro, which were used to build beforehand cell model with HCMV UL83 inhibited by RNAi. The expressions of SM22 α and angiotensin receptors in VSMC were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), Western blotting, immunofluorescence and RNAi techniques. **Results** By comparison with control (RNA), down regulation of expression of UL83 and HCMV pp65 were 18.1% and 10.7% after silencing UL83 by RNAi, respectively. There was significant discrepancy of expression between nontransfection group and control. After interference of HCMV UL83, the expression of SM22 α and angiotensin \oplus receptor type 2 (AT2R) were upregulated, as compared to control (RNA), but expression of angiotensin \oplus receptor type 1 (AT1R) were downregulated.

Conclusions Utilization of RNAi technique successfully established the cell model of infected VSMC with HCMV after silencing UL83 in vitro. It indicated that transcription of SM22 α mRNA and AT2R were inhibited by AT1R which might be excited by HCMV UL83 with HCMV infection.

脑血管病具有发病率高、致残率高、死亡率高和复发率高的特点, 是中老年人致死和致残的主要疾病之一。脑血管病最主要的病因之一是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)。As 的发病机制尚未完全明了^[1,2]。有证据表明感染因素参与 As, 有可能是

As 病理过程的一种启动因子, 而人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV) 是备受瞩目的病原生物之一。我们以往的研究已证实在人脑动脉粥样硬化斑块中检测到 HCMV DNA^[3,4]。研究显示, 血管平滑肌细胞(smooth muscle cells, SMC) 的增殖与血管狭窄和再狭窄有密切关系, 血管紧张素受体细胞表型转化的标志基因平滑肌 22 α (smooth muscle 22 α , SM22 α) 以及 HCMV 感染可能在此过程中发挥重要作用。UL83 基因是 HCMV 活动性感染的标志基因, 该基因表达 pp65 蛋白, 它在 As 形成过程的信号转

[收稿日期] 2006-09-19 [修回日期] 2006-12-02

[基金项目] 北京市科技新星计划(2005B42)

[作者简介] 王佳伟, 博士, 副主任医师, 研究方向为神经病毒学, E-mail 为 jw_wang2000@yahoo.com.cn。脱厚珍, 博士, 副主任医师, 研究方向为神经病毒学。通讯作者王得新, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为神经病毒学。

导机制中发挥重要的调控作用。本文采用 RNA 干扰(RNA interference, RNAi) 技术沉默 HCMV UL83 基因, 产生类似基因敲除的效应, 以研究 HCMV UL83 基因对 VSMC 血管紧张素受体基因和 SM22 α 基因的表达, 进而探讨 HCMV UL83 基因在脑血管动脉硬化及血管狭窄和再狭窄中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

HCMV AD169 毒株由中国预防医学科学院病毒研究所肿瘤室提供。人脑动脉血管 SMC 及 DMEM 培养基购于美国 ScienCell 公司。Lipofectamine2000 转染试剂、逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒由 Invitrogen 公司提供。RNAi 试剂盒及带有荧光标记的质粒购于上海吉凯基因化学技术有限公司。引物由赛百盛公司合成。兔抗 HCMV pp65 抗体及羊抗兔 IgG 购于北京博奥森生物技术有限公司。更昔洛韦为上海新先锋药业有限公司出品。

1.2 血管平滑肌细胞的培养

购置的血管 SMC 从液氮中取出, 置 37 $^{\circ}$ C 水浴箱中, 复苏后置于预先用 L-多聚赖氨酸(4 mg/L) 包被过的 75 cm² 培养瓶中, DMEM 培养基含 4% 小牛血清、细胞生长因子和抗生素, 放置在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中 24 h 换液。以后 2~3 天换液一次, 逐日观察细胞生长状态, 待细胞呈亚单层状态, 用 0.25% 胰蛋白酶消化液消化, 按 1:3 比例以常规方法进行传代培养, 并把细胞接种于 6 孔板内待用。

1.3 实验分组

实验分为 5 组: 对照组、病毒组、RNA+ 病毒组、RNAi+ 病毒组及 RNAi+ 病毒+ 更昔洛韦组。病毒毒力 10⁵PFU, 更昔洛韦工作浓度 1.8 mg/L。

1.4 病毒感染血管平滑肌细胞

RNA 转染过程严格按说明书操作。RNA 转染 24 h 后, 用 5 \times 10⁸PFU/L 的病毒悬液感染血管 SMC。感染前吸去营养液, 用不含血清的 DMEM 轻轻冲洗一遍。培养箱中孵育 1 h, 吸去病毒悬液, 更换新鲜营养液。置培养箱中 10 h 后待用。

1.5 逆转录聚合酶链反应

用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 一步法 RT-PCR 操作按试剂盒说明书进行。HCMV UL83 基因正向引物为 5'-ATT CTG ACC CTG AAC CGT AG-3', 反向引物为 5'-GAT ATC GAC TTG CTG CTG CA-3'。血管紧张素 $\text{\textcircled{E}}$ 1 型受体(angiotensin $\text{\textcircled{E}}$ receptor type 1,

AT1R) 正向引物为 5'-GCA TTG ATC GAT ACC TGG CT-3', 反向引物为 5'-TTA CAT TAT CTG AGG GCG GG-3'。血管紧张素 $\text{\textcircled{E}}$ 2 型受体(angiotensin $\text{\textcircled{E}}$ receptor type 2, AT2R) 正向引物为 5'-GCT TGT GAA CAT CTC TGG CA-3', 反向引物为 5'-TTC ATT AAG GCA ATC CCA GC-3'。SM22 α 受体正向引物为 5'-ACA AGT CTT CAC TCC TTC CTG C-3', 反向引物为 5'-TCA AAG AGG TCA ACA GTC TGG A-3'。 β -actin 正向引物为 5'-AGA GCT ACG AGC TGC CTG AC-3', 反向引物为 5'-TGC CAC AGG ACT CCA TGC CT-3'。cDNA 合成均为 50 $^{\circ}$ C、30 min, 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s \rightarrow 57 $^{\circ}$ C 退火 40 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 34 个循环。取 5 μ L 反应产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统扫描图像, 比较目的片断和内对照灰度比值。

1.6 Western blotting 检测

将预染蛋白分子量标准和待检样品进行 SDS-PAGE 电泳, 电转移过程在冰浴中进行, 电压 100 V, 电流 360~420 mA, 时间 1.5 h; 将硝酸纤维素膜置于用抗体稀释液以 1:30 稀释的兔抗 HCMV pp65 抗体中, 室温孵育 1 h; 弃去一抗孵育液, 以 1:80 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体, 室温下孵育 1 h。用化学发光检测试剂盒显影。

1.7 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血管平滑肌细胞形态学变化

倒置显微镜下, 血管 SMC 大小略有差异, 形状多样。接种于六孔板中 24 h 后, 多数细胞已贴壁伸展。开始时细胞呈圆形, 不透明, 边缘清楚, 而后逐渐伸展, 透明度增高, 周界不清, 呈典型的“峰与谷”样生长。经 RNA 转染后病毒感染第 3 天, 细胞形态有所改变, 较前相比胞体变圆变亮。转染各组间形态变化不明显。荧光显微镜下观察转染细胞表达率在 85% 以上。

2.2 RNA 干扰对人巨细胞病毒 UL83 基因表达的影响

与 RNA 组相比, RNAi 组 HCMV UL83 基因表达量下降至 RNA 组的 18.1%, 干扰效率为 81.9%; 而非转染组与 RNA 组相比无明显差异(图 1)。

2.3 RNA 干扰后人巨细胞病毒 pp65 蛋白的表达

与 RNA 组相比, RNAi 组 HCMV pp65 蛋白表达量下降至 RNA 组的 10.7%, 干扰效率为 89.3%; 更

昔洛伟组 HCMV pp65 蛋白表达量下降至 RNA 组的 4.8%, 干扰效率为 95.2%; 非转染组与 RNA 组相比无明显差异(图 2)。

2.4 RNA 干扰人巨细胞病毒 UL83 基因后血管紧张素受体及平滑肌 22 α 的表达

RNAi 组 AT1R、AT2R 及 SM22 α 的相对表达量与 RNA 组相比差异显著 ($P < 0.01$), 而非转染组与 RNA 组相比差异无显著性(表 1 和图 3)。

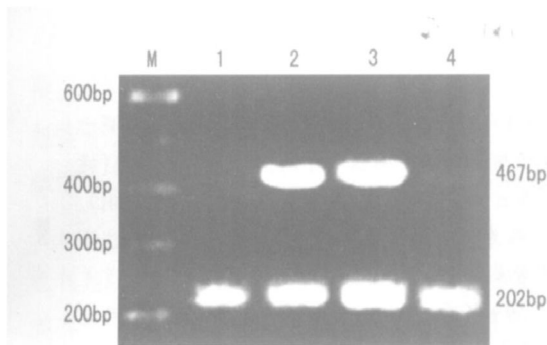


图 1. RNA 干扰对人巨细胞病毒 UL83 基因表达的影响 M 为 marker, 1 为对照组, 2 为 HCMV 组, 3 为 RNA+ HCMV 组, 4 为 RNAi+ HCMV 组。

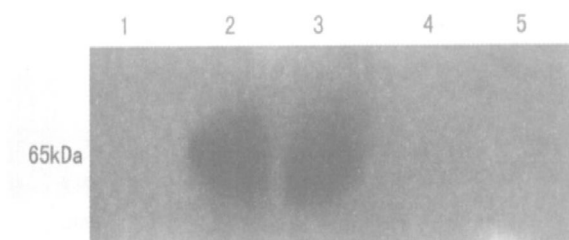


图 2. RNA 干扰对人巨细胞病毒 UL83 蛋白表达的影响 1 为对照组, 2 为 HCMV 组, 3 为 RNA+ HCMV 组, 4 为 RNAi+ HCMV 组, 5 为更昔洛伟组。

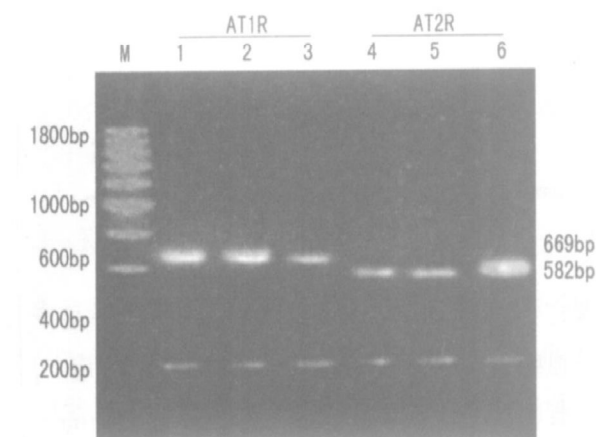


图 3. RNA 干扰人巨细胞病毒 UL83 基因后血管紧张素 AT_1 型受体和 2 型受体表达的变化 1 和 4 为 HCMV 组, 2 和 5 为 RNA+ HCMV 组, 3 和 6 为 RNAi+ HCMV 组。

表 1. RNA 干扰人巨细胞病毒 UL83 基因后血管紧张素 AT_1 型受体和 2 型受体及平滑肌 22 α 基因的相对表达量

项目	非转染组	RNA 组	RNA 干扰组
AT1R	1.869 \pm 0.00	1.866 \pm 0.002	1.522 \pm 0.003
AT2R	1.521 \pm 0.00	1.456 \pm 0.038	1.862 \pm 0.019
SM22 α	0.793 \pm 0.02	0.795 \pm 0.019	1.973 \pm 0.002

3 讨论

近来 RNAi 技术引起了研究者的极大关注。RNAi 是由 dsRNA 介导的、在转录后关闭相应序列基因表达的一个系列过程, 也就是序列特异性的转录后基因沉默 (post transcriptional gene silencing, PTGS)。病毒感染后, 由于病毒本身或者机体的免疫反应, 往往导致受染细胞的破坏。RNAi 能在细胞内部将病毒清除, 细胞又能存活下来^[5]。有关用 RNAi 研究巨细胞病毒的研究文献屈指可数, 本研究在这方面进行了初步的探索。本研究结果发现, RNAi 组 HCMV UL83 基因相对表达量与对照组相比下降至 18.1%, HCMV UL83 基因表达明显被抑制, 提示 RNA 干扰了 HCMV UL83 基因 mRNA 的合成, 从而影响其蛋白的表达。与对照组相比, RNAi 组 HCMV pp65 蛋白表达量下降 10.7%, 更昔洛伟组蛋白表达量下降 4.8%, 提示药物对病毒的蛋白表达具有抑制作用, 而有病毒感染的非转染组与对照组相比无明显差异。提示此次人工合成的小 RNA 成功地干扰了 HCMV UL83 基因的大部分表达。文献报告用脂质体转染的小 RNA 的干扰效果一般在 70% ~ 85%^[6], 本实验干扰效率为 81.9%。干扰效率的高低与选择合成的 HCMV UL83 基因的靶位、小 RNA 浓度、细胞生长状态、病毒感染的时间和强度及转染的时间和条件均有重要关系。直接向细胞内导入小 RNA 尚存在基因沉默维持时间短、体内运载难和转染效果不稳定等问题, 因此目前有学者尝试利用载体介导的 RNAi 技术来希望克服上述困难^[7]。考虑到 HCMV 感染细胞后, 再转染带有载体的小 RNA, 所产生影响因素比较复杂, 故本实验采用了体外合成小 RNA 的方法直接进行转染。

在成功构建了沉默 HCMV UL83 基因的模型后, 在同样条件下, 利用 RNAi 技术研究 HCMV UL83 基因对脑血管 SMC AT1R 和 AT2R 及 SM22 α 基因表达的影响。结果发现, RNAi 组与 RNA 组各组间均有明显差异 ($P < 0.01$)。说明 HCMV UL83 基因对脑血管 SMC AT1R 和 AT2R 及 SM22 α 基因表达均有影

(下转第 1019 页)

(上接第 1015 页)

响,但影响的程度有所不同。沉默 HCMV UL83 基因后,AT1R 基因的相对表达量明显下调,而 AT2R 和 SM22 α 基因的表达量明显上调,提示 HCMV 感染脑血管 SMC 后,HCMV UL83 基因可能通过某些信号途径激活了 AT1R 基因而抑制了 AT2R 和 SM22 α 基因的表达。由于 AT1R、AT2R 和 SM22 α 基因的激活与 SMC 增殖和细胞表型的转换有密切关系,由此推测 HCMV UL83 基因参与了 SMC 增殖和细胞表型的转换过程。HCMV UL83 基因可能通过抑制 AT2R 途径而抑制 SM22 α 的表达。国外学者研究表明,HCMV UL83 基因在病毒诱导 TBK1/IRF-3 激活过程中起重要调控作用,后者能诱导前 As 基因趋化因子 Ccl5 (RANTES) and Cxcl10 (IP-10)。由此推测 AT1R、AT2R 和 SM22 α 基因的表达可能与前 As 基因趋化因子 Ccl5 (RANTES) and Cxcl10 (IP-10) 又有一定关系,至于经过那些信号途径发生关系目前还不清楚,需要进一步研究证实。从本实验结果还可以看出,在本实验条件下,HCMV 感染血管 SMC 时,AT1R 和 AT2R 基因表达量均有上调,而 HCMV UL83 基因对 AT1R、AT2R 基因表达的作用是相反的,提示在病毒感染时可能有多个基因参与作用。至于在不同条件下,病毒感染 SMC 时 HCMV UL83 基因对 AT1R、

AT2R 及 SM22 α 基因表达的影响情况还有待于进一步研究。

RNAi 技术在防治病毒感染的研究中还有一些问题需要解决^[8],但是我们有理由相信,随着对 RNAi 技术的深入研究,这些问题可能会迎刃而解。

[参考文献]

- [1] Tamayo A, Spence JD. Intracranial stenosis predicts higher risk of vascular events in Caucasians with asymptomatic carotid stenosis [J]. *Stroke*, 2005, **36**: 439
- [2] Martinez E, Pinero P, Gonzalez A. Silent cerebral ischemic lesions after carotid artery stenting with cerebral protection [J]. *Stroke*. 2005. **36**: 432
- [3] 易立,王得新,赵伟秦. 颅内动脉粥样硬化管壁中人巨细胞病毒的检出[J]. *中华神经科杂志*, 2003, **36** (2): 117-121
- [4] 易立,王得新,赵伟秦,冯子敬. 颅内动脉粥样硬化血管壁中人巨细胞病毒即刻早期基因的表达[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2004, **18** (1): 66-68
- [5] Kasschan KD, Carrington JC. A countendefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing [J]. *Cell*, 1998, **95** (4): 461-470
- [6] Lu der Wiebusch, Matthias Truss, Christian Hagemeier. Inhibition of human cytomegalovirus replication by small interfering RNAs [J]. *J Gen Virol*, 2004, **85**: 179-184
- [7] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells [J]. *Science*, 2002, **296** (5567): 550-553
- [8] Lichner Z, Silhay D, Burgyan J. Double-stranded RNA-binding proteins could suppress RNA interference-mediated antiviral defences [J]. *J Gen Virol*, 2003, **84**: 975-980

(此文编辑 文玉珊)