

G蛋白反义寡核苷酸对血管平滑肌细胞增殖的影响

李朝红^① 邓漪平

(中山医科大学组织学与胚胎学教研室; 广州, 510089)

摘要 使用硫代修饰的 G 蛋白 ($G_{\alpha q/11}$ 亚基和 ras 蛋白) 反义寡聚脱氧核苷酸 ($G_{\alpha q/11}$ 亚基和 ras 蛋白 AS-ODNs) 作用于含 20% 胎牛血清 DM E 培养液培养基的血管平滑肌细胞 (vSMC)。通过细胞计数和免疫细胞化学方法, 观察了 $G_{\alpha q/11}$ 亚基和 ras 蛋白 AS-ODNs 对 vSMC 增殖和 PCNA 表达的影响。结果表明, $G_{\alpha q/11}$ 亚基和 ras 蛋白 AS-ODNs 联合应用能明显抑制 vSMC 增殖; 免疫细胞化学分析亦显示 vSMC 中 PCNA 蛋白表达显著减少。而相同浓度的正义 ODNs 只有微小抑制作用。结果提示, $G_{\alpha q/11}$ 亚基和 ras 蛋白 AS-ODNs 有可能应用于防治临床血管活性物质依赖性细胞增生性疾病的研究。

关键词 G 蛋白类; ras 蛋白类; 肌, 平滑, 血管; 增殖细胞核抗原 药物作用; 基因表达 药物作用

中图分类号 R 363.1; R329

资料显示, 目前还没有一种药物能有效的降低血管成形术 (PTCA) 后再狭窄的发生率以及动脉粥样硬化 (AS) 的逆转^[1]。其原因主要是受损后的血管平滑肌细胞 (vSMC) 同时受到体内多种血管活性多肽和生长因子的作用^[2-6] 而增生。近年研究证明: 上述血管活性物质对 vSMC 的作用分别受 $G_{\alpha q/11}$ 亚基和小分子 G 蛋白 (ras 蛋白) 调控^[2-7]。显然, $G_{\alpha q/11}$ 亚基和 ras 蛋白可能与 AS 再狭窄和高血压病有关。本实验使用了反义 $G_{\alpha q/11}$ 亚基和 ras 蛋白寡聚脱氧核苷酸 (AS-ODNs), 作用于胎牛血清 (fetal calf serum, FCS) 体外培养的 vSMC, 观察其对 vSMC 增殖及增殖细胞核抗原 (PCNA) 蛋白表达的影响, 初步揭示 G 蛋白在调控促细胞增殖的信号传导通路中的分子机制及阐明抑制 vSMC 增殖的可能性。

1 材料与方 法

1.1 G 蛋白 ODNs 的序列设计、合成

通过基因文库 (中山医科大学分子医学研究中心) 查出 G 蛋白基因的 cDNA 序列, 通过计算机设计出特异性结合到相应 G 蛋白 mRNA 上的反义 ODNs 序列 (1, 2, 3, 4), 同时设置相应的正义的 ODNs 序列 (5, 6, 7, 8), 以作对照。各序列如下:

1. 5'-AGCTTGTATTCTGTCATCG-3';
2. 5'-CAGTTTGTACTCAGTCAT-3';
3. 5'-CAAGTTTATACTCAGTCAT-3';
4. 5'-TGATGGACTCCAGAGTCAT-3';

5. 5'-CGATGACAGAATACAAGCT-3';
6. 5'-ATGACTGAGTACAAACTG-3';
7. 5'-ATGACTGAGTATAAACTTG-3';
8. 5'-ATGACTCTGGAGTCCATCA-3'.

为确保 ODNs 进入细胞后既不易被 RNA 酶降解, 又使其能容易结合到相应的 mRNA 上, 在 ODNs 的两端分别进行了硫代磷酸修饰。ODNs 由中国科学院上海细胞生物学研究所合成。

1.2 细胞培养

无菌条件下分离 Wistar 大鼠的主动脉, 去内膜和外膜, 将中膜平滑肌组织剪碎, 用 2.5 mL 20% FCS DM E 培养液一同种植到 25 mL 的培养瓶中。静置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养。20 d 左右细胞达融合。用 0.0625% 胰蛋白酶 (0.5% 胰蛋白酶: 0.04% EDTA D-Hank 液 = 1: 2: 5) 消化后, 弃细胞, 留组织块继续培养, 待细胞融合后消化传代。实验用 vSMC 为第 3 代~ 第 10 代。

1.3 vSMC 形态学鉴定

ITM-2 型 Olympus 倒置相差显微镜直接观察细胞。vSMC 先用 PBS (pH 7.3) 洗 2~3 次, 2.5% 戊二醛固定 30 min, 用细胞利器将细胞刮下, 离心, 2.5% 琼脂预包埋。再按常规透射电镜方法制作切片。在透射电镜下观察 vSMC 的形态结构。

1.4 实验分组及数据统计

20% FCS+ PBS 为阳性对照组, 0.5% FCS 的 DM E+ PBS 为阴性对照组, 20% FCS+ G 蛋白反义

^① 第一作者, 1958 年出生, 男, 博士研究生

ODNs为实验组 1, 20% FCS+ G蛋白正义 ODNs为实验组 2 每组实验设 3孔, 重复 3次。取 3次实验的均值±标准差, 对阳性对照组与各实验组之间先进行方差齐性检验后, 再相应用 t 和 t' 检验, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著性判断。

1.5 细胞生长抑制实验

将 2.5×10^5 个/L的细胞悬液 $100 \mu\text{L}$ 种植到 96孔培养板中, 以 20% FCSDME培养 24 h, 弃换 0.5% FCS DME培养液培养 72 h, 弃换含 20% FCS DME培养液, 同时加入反义或正义 ODNs至终浓度 1.5 3 6和 $9 \mu\text{mol/L}$, 培养 72 h后用胰蛋白酶消化, 计数板计数。每组实验设 3孔, 每孔计数 3次, 重复 3次实验。结果取 3次实验的均值±标准差, 进行统计处理。按下式计算细胞抑制率:

$$\text{细胞生长抑制率} = \left(1 - \frac{\text{实验组净生长数}}{\text{阳性对照组净生长数}}\right) \times 100\%$$

其中, 实验组生长数 = ODNs实验组细胞数 - 阴性对照组细胞数; 净阳性对照组净生长数 = 阳性对照组细胞数 - 阴性对照组细胞数

1.6 免疫细胞化学检测 vSMC PCNA 蛋白表达

鼠抗 PCNA 抗体及 LASB试剂盒 (Dako公司) 细胞以 2.5×10^5 个/L的密度种植 $100 \mu\text{L}$ 到 96孔培养板中, 24 h后弃换 DME(含 0.5% 的胎牛血清及浓度为 $6 \mu\text{mol/L}$ 的正、反义 ODNs), 对照组加等量的 PBS 72 h后加 20% FCS, 继续培养 24 h, 用于免疫细胞化学检测。即 PBS(pH 7.3)洗 3次, 4% 甲醛固定 2 min, PBS洗, 甲醇固定 10 min (-20°C), 漂洗, 3% H_2O_2 10 min, 漂洗 (Tris缓冲液, pH 7.6), 加正常兔血清 (1:20稀释) 孵育, 室温孵育 10 min, 弃血清后加抗 PCNA 抗体 (1:150稀释) 孵育 10 min, 漂洗。加兔抗鼠二抗 (1:400稀释) 孵育 10 min, 漂洗, SA(streptavidin) (1:400稀释) 孵育 10 min, 漂洗, 加 0.006% 的 DAB, 镜下显色 10~20 min, 水洗后用 PBS终止反应, 滴加 90% 的甘油。分别在倒置镜下观察和拍照。

2 结果

2.1 vSMC鉴定

光镜下, vSMC呈梭形, 生长样式示谷与丘状。透射电镜下, 细胞内可见典型的 vSMC独有的密体密斑, 胞浆中可见较多的肌丝及胞外基膜。

2.2 G蛋白 ODNs对经 20% FCS作用后 vSMC 增殖的影响

G蛋白 AS-ODNs对经 20% FCS作用后 vSMC增殖具有明显的抑制作用 (图 1)。加入浓度为 1.5 3 6和 $9 \mu\text{mol/L}$ G蛋白 AS-ODNs 72 h后, 对 vSMC增殖抑制率分别为 21%、36% ($P < 0.05$)、88% ($P < 0.001$) 和 96% ($P < 0.001$)。而相同浓度的正义 ODNs抑制率分别为 13.6%、16.2%、34% 和 36% ($P < 0.05$)。

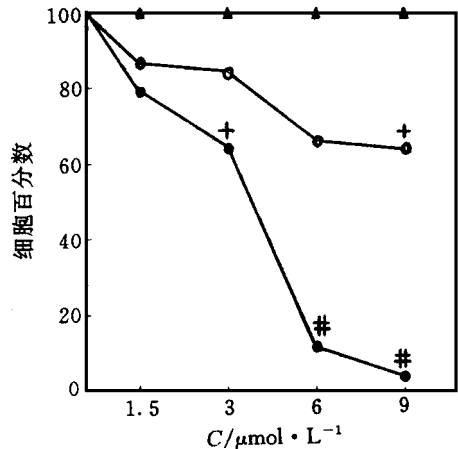


图 1 不同浓度寡聚脱氧核苷酸对 vSMC 增殖的影响
细胞百分数以未加 ODNs 阳性对照组为 100%。▲: 阴性对照组; ●: 实验组 1; ○: 实验组 2 与阳性对照组相比: +, $P < 0.05$; #, $P < 0.001$

2.3 G蛋白 ODNs对经 20% FCS作用后 vSMC 的 PCNA 蛋白表达的影响

光镜下 vSMC 的 PCNA 蛋白表达阳性的细胞核呈棕色, 阴性细胞核不着色或很浅色。G蛋白 AS-ODNs 可减少 vSMC 的 PCNA 蛋白的表达, 与阳性对照组相比, PCNA 蛋白阳性的细胞明显减少 (图 2A), 与阴性对照组 vSMC 的 PCNA 蛋白表达相似。正义组 vSMC (图 2B) 与阳性对照组 vSMC 的 PCNA 蛋白表达阳性的细胞数相近。

3 讨论

动脉粥样硬化、血管成形术后再狭窄的发病机理十分复杂, 除了与多基因遗传有关外, 与环境 (内、外环境) 因素的关系甚为密切。其病变的重要病理基础主要是血管平滑肌的张力增高和异常增殖等血管壁的异常改变。许多研究显示, 生长因子和血管活性多肽可分别通过酪氨酸激酶受体、小分子 G 蛋白途

径和 $G\alpha_q/11$ 亚基 - 肌醇磷酸途径促进细胞增殖^[2-6]。显然, G蛋白与血管壁细胞增生性疾病如 AS 血管成形术后再狭窄和高血压病发生有关。FCS 富含多种生长因子、血管活性多肽及神经递质等。血管壁受损后, vSMC 受到来自于血液中多种活性物质的共同作用。体外 vSMC 在 FCS 中培养增殖, 比较接近在体环境。然后施加 G蛋白 AS-ODNs, 通过减少 G蛋白表示而截止多种生长因素信号进入胞内, 探讨抑制 vSMC 增殖的可能性。实验发现: G蛋白 AS-ODNs 对 FCS 培养的 vSMC 的增殖具有明显的抑制作用, 呈剂量依赖性; 而相同浓度的正义

ODNs 只有微小抑制作用。提示 G蛋白 AS-ODNs 可以同时阻断 FCS 中的活性成分对 vSMC 的促增殖作用从而抑制 vSMC 的增生。以往研究用小分子 G蛋白抗体注入静止期的 NIH3T3 细胞, 可同时拮抗多种生长因子对细胞的促增殖作用^[6], 但对 FCS 培养的细胞抑制作用不完全。将 $G\alpha_q$ 蛋白 AS-ODNs 注入蟾蜍卵细胞 (xenopus oocytes) 中可阻断 Ca^{2+} 释放^[7], 但未见抑制细胞增殖方面的报道。我们在单独使用 ras 蛋白 AS-ODNs 和 $G\alpha_q/11$ 亚基 AS-ODNs 作用于 vSMC 时, 发现均可分别抑制 bFGF 和 ET-1 对 vSMC DNA 合成以及 PCNA 蛋白的表达。



图 2 寡聚脱氧核苷酸对 SMC 的 PCNA 蛋白表达的影响 (LASB 法 $\times 200$)
箭头所指为 PCNA 蛋白表达阳性细胞; A: 反义组; B 正义组

PCNA 蛋白在细胞周期中促使细胞由 G1 期进入 S 期, 并在 S 期时作为 DNA delta 多聚酶的复合因子促进 DNA 的复制和转录, 导致细胞的增殖^[8]。有文献报道^[9], 在新生内膜增厚组织、动脉粥样斑块组织以及血管成形术后再狭窄的管壁 vSMC 中, PCNA 蛋白表达非常高。因此, 目前均认为 PCNA 蛋白可作为细胞增殖的标志。本实验观察了 G蛋白 AS-ODNs 对 vSMC PCNA 蛋白表达的影响, 结果显示: G蛋白 AS-ODNs 可使细胞中 PCNA 蛋白表达减少, 与 Speir^[8]报道的结果相一致。我们推测, 减少 PCNA 蛋白的表达以抑制 vSMC 增殖, 可能亦是 G蛋白 AS-ODNs 作用的分子机制之一。

与阳性实验组相比, 正义 ODNs 对 vSMC 也有一定的抑制作用, 可能是 ODNs 本身对细胞产生的非特异性的毒副作用, 在其它的一些反义 ODNs 的研究中也发现有高的非特异性毒副作用^[10], 尚待深入研究。

以上结果说明, G蛋白 AS-ODNs 能明显地抑制 vSMC 在 FCS 作用下的细胞增殖, 同时对调控细胞生长的 PCNA 蛋白表达也有抑制作用。目前, 对 vSMC 基因的表达及其它生物学行为的研究正在进行中, 该策略的应用有可能解决许多依赖生长因子和血管活性多肽为主的细胞增生性疾病的临床问题, 同时为新药的开发提供广阔的前景。

参 考 文 献

- 1 Shaw LA, Rudin M, Cook N. Pharmacological inhibition of restenosis learning from experience. Trends Pharmacol Sci, 1995, 16(12): 401
- 2 Noh DY, Shin SH, Rhee SG. Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling. Biochem Biophys Acta, 1995, 1242(2): 99
- 3 Fantl WJ, Johnson DE, Williams LT. Signaling by receptor tyrosine kinases. Ann Rev Biochem, 1995, 64: 441-472

- 1993, 62: 453
- 4 Watanabe T, Waga I, Honda ZI, *et al.* Prostaglandin F₂ stimulates formation of P21^{ras}-GTP complex and mitogen-activated protein kinase in NIH-3T3 cells via Gq-protein-coupled pathway. *J Biol Chem*, 1995, 270(15): 8984
- 5 Storozhevkh TP. The effect of endothelin-1 on vascular adrenoreactivity the participation of G-proteins and protein kinase C in vascular constriction under the action of endothelin-1. *Bull-Eksp Biol Med*, 1993, 1116(10): 374
- 6 Mulcahy LS, Smith MR, Stacey DW. Requirement for ras protooncogene function during serum-stimulated growth of NIH-3T3 cells. *Nature*, 1985, 313(5999): 241
- 7 Stehno-Biottel L, Krapivinsky G, Krapivinsky L, *et al.* The G protein beta gamma subunit transduces the muscarinic receptor signal for Ca²⁺ release in xenopus oocytes. *J Biol Chem*, 1995, 270(50): 30068
- 8 Speir E, Epestin SW. Inhibition of smooth muscle cell proliferating by an antisense oligonucleotide targeting the messenger RNA encoding proliferation cell nuclear antigen. *Circulation*, 1992, 86(2): 538
- 9 More RS, Underwood MJ, Brack MJ, *et al.* Changes in vessel wall plasminogen activator activity and smooth muscle cell proliferation and activation after arterial injury. *Cardiovasc Res*, 1995, 29(1): 22
- 10 孙丛梅, 王东, 周爱儒. TG_R反义寡聚核苷酸对膀胱癌 BIU87细胞株的作用. *生物化学与生物物理进展*, 1994, 21(5): 3177

(1996-09-05收稿 1996-11-01修回)

THE EFFECTS OF G PROTEIN ANTISENSE OLIGODEOXYNUCLEOTIDES ON PROLIFERATION OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS

Li Chaohong Deng Yiping

(Department of Histology & Embryology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

Antisense phosphorothioate-oligodeoxynucleotides (AS-ODNs) were added to vSMC cultured in 20% fetal calf serum DME media. Using cell count and immunocytochemistry methods, the cell growth and expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) of vSMC were studied. Results showed that the joint administration of G_q/11 subunits and small molecular G protein (ras protein) AS-ODNs could significantly inhibit vSMC proliferation. Immunocytochemistry analysis show that expression of PCNA protein in vSMCs also decreased evidently. When G_q/11 subunits and ras protein sense ODNs were used instead of AS-ODNs, only a little effect was demonstrated. In conclusion, G_q/11 subunits and ras protein AS-ODNs may be used for clinical research of prevention and treatment of vasoactive factors dependent proliferating diseases.

Subject headings G-proteins; ras proteins; muscle, smooth, vascular; proliferating cell nuclear antigen/drug effects; gene expression/drug effects