

文章编号:1005-6947(2006)12-0912-05

· 基础研究 ·

反义 mTOR 逆转录病毒载体对血管平滑肌细胞增殖的抑制作用

胡新华, 张强, 杨军, 刘程伟, 张志深

(中国医科大学附属第一医院 外科, 辽宁 沈阳 110001)

摘要:目的 观察反义雷帕霉素靶蛋白(mTOR)逆转录病毒载体对血管平滑肌细胞(VSMC)增殖活性的影响。方法 采用脂质体介导转染包装细胞后构建mTOR的反义重组逆转录病毒载体(pLXIN-AmTOR)感染VSMC,检测mTOR及其下游底物包括真核细胞启动子4E结合蛋白1(4E-BP1)和核糖体蛋白S6激酶(p70S6k)的表达变化,以及VSMC细胞增殖周期和增殖活性的改变。结果 反义逆转录病毒载体转染PT67细胞后感染VSMC,能显著抑制mTOR的mRNA和蛋白产物表达,mTOR通路下游p70S6k表达相应减少,而4E-BP1的表达却显著增强;感染后的VSMC的分裂、增殖过程受阻,更多细胞停滞在G₁期。结论 成功构建反义mTOR逆转录病毒载体;感染VSMC后能明显抑制VSMC的分裂、分化和增殖。

关键词:雷帕霉素靶蛋白;肌,平滑,血管/病理学;细胞分裂

中图分类号:R654;R337.1 **文献标识码:**A

The inhibition of antisense RNA retroviral vector of mTOR on proliferation of vascular smooth muscle cells

HU Xin-hua, ZHANG Qiang, YANG Jun, LIU Cheng-wei, ZHANG Zhi-shen

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

Abstract: **Objective** To study the effect of antisense RNA retroviral vector of mTOR on the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** The conservative region of mTOR gene was inserted into pLXIN reversedly, then the vector was packaged in PT67 cells by transfection with lipofectamine and transfected to VSMC. The efficiency of antisense inhibition was verified, and the changes of p70S6k and 4E-BP1 were also determined at the same time. The proliferation activity was determined by flowcytometry and MTT. **Results** After the vector was successfully transfected to the cells. pLXIN-A-mTOR vector could efficiently decrease mRNA and protein expression of mTOR and p70S6k of the cell, while the expression of 4E-BP1 increased significantly. The cell cycle and proliferation activity of VSMC was also stunned in phase G₁. **Conclusions** The mTOR antisense retroviral vector, pLXIN-A-mTOR, has been constructed successfully, which can significantly inhibit the proliferation of VSMC.

Key words: mTOR; Muscle, Smooth, Vascular/pathol; Cell Division

CLC number: R654; R337.1 **Document code:** A

基金项目:国家自然科学基金项目(30400435;30371401);辽宁省博士启动基金项目(20041053)。

收稿日期:2006-06-15; **修订日期:**2006-09-16。

作者简介:胡新华,男,辽宁清原人,中国医科大学附属第一医院副教授,主要从事移植血管狭窄、闭塞机制方面的研究。

通讯作者:胡新华 E-mail:xinhua@126.com。

新近研究表明,雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)作为一种重要的信号传导分子,参与细胞的多种生理和病理过程,其对基因的转录调控发挥重要作用^[1]。mTOR 调控在翻译过程中起重要作用的有3种蛋白质:真核细胞启动子4E结合蛋白1(4E-BP1)、核糖体蛋白S6激酶(p70S6k)和真核细胞翻译起始因子4GI(eIF-4GI)^[2]。为此,本研究拟构建 mTOR 的反义 RNA 逆转录病毒载体真核表达载体,观察其感染血管平滑肌细胞(VSMC)后对 VSMC 增殖活性的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

限制性内切酶、连接酶、质粒抽提试剂盒、胶回收试剂、pLXIN 载体及其他主要试剂为 Promega 公司和华美生物公司产品。逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自大连宝生物公司。扩增用引物由 Primer 5 软件设计,由大连宝生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物设计 在 GenBank 中查到大鼠 mTOR 基因的 mRNA 序列,通过 Primer5 软件设计引物,选择扩增 mTOR 基因的 cDNA 序列(347-981)。上游引物 5'-ggatcccAACGGTTGATGGAAGCCTTG-3', 5'端引入 BamH I 酶切位点;下游引物 5'-ctcgagGCT-GGTGAAGGGAGTGATGT-3', 5'端引入 Xho I 酶切位点。

1.2.2 RT-PCR 取体外培养的大鼠胸主动脉 VSMC 组织约 50mg, TRIZOL 试剂盒提取总 RNA。紫外分光光度仪下测定 OD 值(A260/A280),凝胶电泳判断其完整性。取 5 μ L 总 RNA,按逆转录试剂盒说明逆转录为 cDNA。20 μ L 反应体系: Taq DNA 聚合酶 1U,引物各 50pmol。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 变性 2min 后,94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 45s,72 $^{\circ}$ C 60s 顺序共循环 35 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。1%琼脂糖水平板电泳,EB 染色,凝胶自动成像系统上摄像。

1.2.3 T 载体克隆 快速凝胶回收试剂盒纯化 RT-PCR 产物,将目的片段与 pGEM-T 载体连接。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 RT-PCR 产物(约 0.25 μ g)、1

μ L T4 连接酶,4 $^{\circ}$ C 过夜。TSS 法制备感受态细胞。然后将上述连接产物加入感受态细胞中。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,与 GenBank 中 mTOR 基因 cDNA 序列比较。

1.2.4 反义 RNA 逆转录病毒载体的构建 BamH I 和 Xho I 分别双酶切重组 pGEM-T 载体,凝胶电泳后回收目的片段。建立连接反应体系, BamH I 和 Xho I 双酶切 pLXIN 载体,采用一端为黏端、另一端为平端的连接策略,将 mTOR 的 cDNA 序列反向插入 pLXIN 载体,构建反义逆转录病毒载体(pLXIN-A-mTOR),转化大肠杆菌 DH5 α ;氨苄青霉素培养基筛选阳性菌落,碱裂解法提取重组质粒,酶切鉴定并测序。

1.2.5 包装重组病毒载体 按脂质体试剂说明书,将 pLXIN-A-mTOR 质粒转染到包装细胞 PT67 中。挑取阳性克隆,用含 200 μ g/mL 的 G418 培养液培养。进行病毒原液提取和滴度测定;氯化铯法进行密度梯度离心提高病毒滴度。

1.2.6 pLXIN-A-mTOR 感染 VSMC 分离大鼠胸主动脉,I型胶原蛋白酶消化分离 VSMC,培养于含 10%小牛血清的 DMEM 培养液中;鉴定后,培养 3~5 代细胞用于实验。VSMC 按 2 \times 10⁵ 个细胞/孔,接种于 6 孔板中培养,使达到 60% 融合。用 1 \times 10⁹ pfu/mL 的 pLXIN-A-mTOR 50 μ L 感染 VSMC,于 6,24,72h 后用荧光显微镜观察 VSMC 形态学改变及感染情况。4% 锥虫蓝染色,400 倍光镜下计数 VSMC 活细胞数。

1.2.7 pLXIN-A-mTOR 对 VSMC 中 mTOR 信号通路的影响 按《分子克隆》^[3]检测 mTOR 信号通路的改变。Northern blot 检测 mRNA 表达:制备 mTOR 及其下游的 4E-BP1 和 p70S6k 3 种 cDNA 探针。Prime-a-Gene 随机引物标记法进行 α -32P-dCTP 标记。取 30 μ g 总 RNA,经 1% 琼脂糖甲醛凝胶变性电泳分离,转移 RNA 到硝酸纤维素滤膜,预杂交 3h,再加入 cDNA 探针进行杂交 16~18h;洗膜,-70 $^{\circ}$ C 放射自显影 48h 后洗片。免疫蛋白印迹检测蛋白表达:提取总蛋白质,凝胶电泳,转膜,封闭、加入一抗室温下反应 2h 后常规洗膜,加入过氧

化物酶标记的羊抗兔 IgG-HRP 60 min;洗膜后加入 ECL,暗室显影 2 min 后冲洗胶片。凝胶成像分析系统上摄像分析。

1.2.8 pLXIN-A-mTOR 对 VSMC 增殖活性的作用

流式细胞仪检测细胞周期的相关细胞量的变化。四氮甲唑蓝(MTT)法检测 VSMC 增殖活性:细胞接种于 96 孔培养板,移入 CO₂ 孵箱中,在 37℃,5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养 24h。细胞生长至 60% 融合时分组处理,再培养 24h。检测前 4h 吸去孔内培养上清液,按每孔 20 μL (5 mg/mL) 加入 MTT 溶液,37℃ 继续培养至检测时相点,终止培养。加入二甲基亚砷振荡,使紫色结晶物溶解。酶联免疫检测仪 490 nm 波长上检测各孔吸光度值。

2 结果

2.1 总 RNA 提取及鉴定

结果见 28s 亮度强于 18s,5s 稍弱,提示总 RNA 完整性较好。分光光度法测得 A260nm/A280nm 值为 2.009,表明总 RNA 纯度符合 RT-PCR 要求。

2.2 RT-PCR 产物电泳结果

RT-PCR 扩增产物电泳后,在 DNA 相对分子质量标志 640bp 附近有一条亮带(图 1),与预期目的

片段大小基本一致,可能为编码 mTOR 的 cDNA 片段。

Marker: DL2000; 1: RT-PCR 产物

图 1 RT-PCR 扩增产物凝胶电泳图

2.3 T 载体克隆鉴定

重组 T 载体长约 3.6 kb,双酶切后产生 635bp 目的片段及 2.9 kb 载体片段。酶切鉴定电泳结果如图 2。测序证实为 mTOR 基因 cDNA 片段。

2.4 pLXIN-A-mTOR 载体的鉴定及包装

pLXIN-A-mTOR 经 BamH I, Xho I 双酶结果见图 3。测序进一步验证,序列拼接后与 GenBank 内 mTOR 基因 cDNA 比较。结果表明,mTOR 基因 cDNA 片段反向插入 pLXIN 载体,已经成功构建 mTOR 的反义逆转录病毒载体 pLXIN-A-mTOR。透射电子显微镜观察到 PT67 细胞中含有大量的多边形病毒颗粒(图 4)。收获的病毒滴度达 2.0×10^8 CFU/mL。

M1: DL 2000 Marker; 1: BamH I 单酶切; 2: BamH I, Xho I 双酶切; M2: DNA / HindIII + EcoRI Marker

图 2 重组 pGEM-T 载体酶切凝胶电泳图

图 3 重组 pLXIN-A-mTOR 载体酶切电泳图

2.5 感染 VSMC 及对 mTOR 表达的影响

正常 VSMC 呈梭形、胞质伸展、较多分支状突起,周界不清,放射性生长,呈现 VSMC 特征性“峰”、“谷”状生长。转染 pLXIN-A-mTOR 后细胞呈狭长梭形,锥虫蓝染色见 VSMC 活细胞数明显减少;与对照组比较差异显著(附表)。Northern blot 和 Western blot 检测结果显示,VSMC 被 pLXIN-A-mTOR

感染后,mTOR 的 mRNA 和蛋白产物表达均显著降低,感染 72h 最为显著,表达量降低为 1/10 ~ 1/5, p70S6k 的 mRNA 和蛋白产物表达也显著减少,变化趋势与 mTOR 一致;而 4E-BP1 的 mRNA 和蛋白产物表达量却明显增加,感染 72h 时的表达量提高近 4 倍(图 5)。

图4 PT67 细胞中所见多边形病毒颗粒(电子显微镜, $\times 8000$)

2.6 pLXIN-A-mTOR 感染对 VSMC 增殖活性的影响

流式细胞仪检测结果:感染前 VSMC 细胞 G_1/G_0 期比例为 74.4%, S 期为 15.2%; 转染后, G_1/G_0 期比例增加, S 期比例却显著降低, 凋亡细胞比

1: VSMC; 2: 空载体; 3-5: 感染 pLXIN-A-mTOR 载体 6, 24, 72 h

图5 Western 蛋白印迹检测 mTOR, 4E-BP1 和 p70s6k 蛋白表达的变化

例明显增加 ($P < 0.01$)。表明 $G_1/G_0 \rightarrow S$ 过程受阻, VSMC 的分裂、增殖受到抑制, 凋亡机制启动。MTT 法检测提示, 感染的 VSMC 吸光度值 (A 值) 显著降低, 与正常对照组、空载体组比较差异均有显著性意义 ($P < 0.01$) (附表)。

附表 VSMC 数量、细胞周期及增殖活性的变化 ($\bar{x} \pm s$)

	对照组	空载体组	感染 6h	感染 24h	感染 72h
VSMC 数/HP	10.6 \pm 2.6	10.0 \pm 2.8	9.3 \pm 3.0	7.0 \pm 2.2 ^{1),2)}	6.5 \pm 2.5 ¹⁾
G_1/G_0 期 (%)	74.4 \pm 5.3	75.2 \pm 4.9	77.5 \pm 6.5	80.6 \pm 5.8	82.3 \pm 8.2 ¹⁾
S 期 (%)	15.2 \pm 2.4	14.8 \pm 2.5	12.4 \pm 3.1	9.3 \pm 3.9 ^{1),2)}	6.5 \pm 2.6 ^{1),2)}
凋亡 (%)	1.6 \pm 0.4	1.5 \pm 0.5	2.9 \pm 0.6	5.2 \pm 0.5 ^{1),2)}	7.8 \pm 0.8 ^{1),2)}
A 值 (MTT)	0.543 \pm 0.034	0.539 \pm 0.040	0.490 \pm 0.05 ^{1),2)}	0.430 \pm 0.044 ^{1),2)}	0.368 \pm 0.054 ^{1),2)}

注:1)与对照组比较, $P < 0.01$; 2)与前一时间组比较, $P < 0.01$

3 讨论

反义 RNA 是指与 mRNA 互补的 RNA 分子, 自 20 世纪 80 年代被发现后即引起广泛关注, 并成为进行基因表达调控研究的有效工具。但反义寡核苷酸存在不稳定、易降解、摄取率低等缺点, 限制了在基因治疗方面的应用。逆转录病毒载体介导反义 RNA 技术是目前进行基因治疗的可靠方法之一^[4]。新近研究表明: mTOR 是一种重要的信号传导分子, 参与细胞的多种生理和病理过程, 调节多种生物化学过程, 对基因的转录调控发挥重要作用。mTOR 是一种分子质量为 289kD 的蛋白激酶, 是 3-磷脂酰肌醇激酶相关激酶家族 (PI3Ks) 中 FK506 结合蛋白 (FKBP12) 的相关蛋白。mTOR 可

以调节翻译过程中起重要作用的 3 种蛋白质, 即 4E-BP1, p70S6k 和 4GI (eIF4GI)^[5]。大规模研究结果表明, 应用雷帕霉素药物洗脱支架可以将经皮冠状动脉腔内成形术 (PTCA) 术后再狭窄率降低 90% 以上^[6]。

本研究在载体构建中, 采用 T 载体克隆 RT-PCR 产物、酶切出目的片段、与逆转录病毒载体重组的方法, 采用一端为黏端、另一端为平端的连接策略, 通过 BamH I 和 Xho I 双酶切, 确保将 mTOR 的 cDNA 序列反向插入 pLXIN 载体, 然后通过脂质体介导转染包装细胞进行包装。Northern blot 杂交和 Western 蛋白印迹方法验证所构建载体对 VSMC 中 mTOR 表达的抑制作用, 感染后的 VSMC 的 mTOR 的 mRNA 和蛋白产物表达水平均明显下降。此外, 作为 mTOR

的直接底物, p70S6k 和 4E-BP1 表达的改变将直接影响 VSMC 的分裂、分化和增殖周期。p70S6k 是蛋白质合成中重要的调控因子, 是蛋白质合成的正调控信号^[7]。p70S6k 在细胞生长、增殖过程中起关键作用, 笔者推测, 这可能是 VSMC 数量和体积改变的内在机制。与 p70S6k 的作用相反, 4E-BP1 作为 mTOR 的另一个下游底物则是一种翻译抑制因子^[8]。在生长信号的刺激下, 4E-BP1 可以被 mTOR 或其他因子磷酸化而失活, 调控 4E-BP1 磷酸化的基本的细胞内信号途径是 PI3K 和 mTOR, 而 mTOR 通过磷酸化 4E-BP1 的第 37 位及 46 位苏氨酸残基来进行调控。本研究发现, mTOR 表达的减少使 4E-BP1 的基因和蛋白表达增加, 从而进一步阻断 VSMC 的增殖周期。流式细胞仪结果进一步表明: 阻断 mTOR 基因表达后, VSMC 的细胞周期受阻于 G₁/G₀ 期, S 期细胞减少而凋亡细胞显著增多, 初步证实了 mTOR/p70S6k 或 4E-BP1 信号通路在 VSMC 增殖周期的调控作用。本研究构建了一个有效的反义表达系统, 对逆转 VSMC 的异常增殖性疾病的病理过程将发挥重要作用。该载体可能成为基因治疗的有力工具, 为血管移植后再狭窄机制的研究提供新途径或新思路。

参考文献:

- [1] Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth [J]. *Cell*, 2000, 103(2): 253-262.
- [2] Stabile E, Zhou YF, Saji M, *et al.* Akt control vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo by delaying G1/S exit [J]. *Circ Res*, 2003, 93(11): 1059-1065.
- [3] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 克隆化基因所表达蛋白质的检测与分析[A]. 见: 金冬雁, 黎孟枫, 译. 分子克隆实验指南(第2版)[M]. 北京: 科学出版社, 1992. 852-898.
- [4] 张翼, 孙维佳, 劳学军, 等. SV40LT 抗原逆转录病毒载体的构建及其在肝细胞中的表达[J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(8): 29-32.
- [5] Harris TE, Lawrence JC. TOR signaling[J]. *Science's STKE*, 2003(212): re15.
- [6] Moses JW, Leon MB, Popma JJ, *et al.* Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery[J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(14): 1315-1323.
- [7] Martin KA, Rzczidlo EM, Merenick BL, *et al.* The mTOR/p70S6K1 pathway regulates vascular smooth muscle cell differentiation [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 286(3): C507-517.
- [8] Fingar DC, Salama S, Tsou C, *et al.* Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E[J]. *Genes Dev*, 2002, 16(12): 1472-1487.

《国际病理科学与临床杂志》征稿、征订启事

《国际病理科学与临床杂志》是由教育部、中南大学主办的国家级医学学术期刊。原刊名《国外医学·生理、病理科学与临床分册》, 更名后, 本刊在保持特色, 致力于介绍国外医学研究领域的新动态、新技术、新经验的基础上, 加强了对国内研究成果和现状的报道。主要栏目有: 研究论著、专家论坛、综述、重点实验室、成果报道等。本刊为“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”, 并被美国《化学文摘》(CA)等国内外多家重要数据库和检索系统收录。欢迎投稿, 特别欢迎并优先刊发高水平的研究论著。

本刊具有学术水平高、指导性强、信息时效快等特点。本刊已实现“投稿-审稿-编辑”全程网上处理, 敬请登陆本刊网站投稿。

网址: www.gjbl.net; gjbl.csu.edu.cn

本刊为双月刊, 逢双月末出版, 大16开, 国内外公开发行人。期定价10元, 全年定价60元, 国内统一刊号: CN 43-1458/R, 国际标准刊号: ISSN 1673-2588; 国内邮发代号: 42-35, 国外邮发代号: BM6564; 各地邮局(所)均可订阅。

来稿、征订请寄: 湖南省长沙市湘雅路110号湘雅医学院50号信箱《国际病理科学与临床杂志》编辑部收, 邮政编码: 410078; 编辑部电话: 0731-4805495, 4805496; 传真: 0731-4804351; E-mail: gwxyxy@126.com; gwxy@xysm.net

《国际病理科学与临床杂志》编辑部