论著

文章编号:1000-5404(2005)05-0388-04

腺病毒介导BTEB2反义RNA对血管平滑肌细胞增殖的抑制作用

李 德,何国祥,唐 波,唐 兵 (第三军医大学西南医院心血管内科,重庆介入心脏病学研究所,重庆 400038)

提 要: 目的 构建携带反义锌指转录因子2(basic transcription element binding protein 2, BTEB2)基因的重组腺病毒载体并研究BTEB2反义RNA对平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖的影响。**方法** 从培养的大鼠VSMC中提取总RNA,通过RT-PCR制备BTEB2 cDNA,将其反向克隆至腺病毒载体,构建携带反义BTEB2基因的重组腺病毒Ad. ASBTEB2;用Ad. ASBTEB2转染VSMC,通过RT-PCR检测BTEB2反义RNA在VSMC中的表达;经免疫印迹法分析BTEB2反义RNA对BTEB2蛋白质表达的抑制作用;通过MTT比色法和流式细胞仪分别检测BTEB2反义RNA对VSMC增殖及细胞周期的影响。**结果** 构建的重组腺病毒载体经鉴定正确,其滴度为5×10^9/ml;VSMC被重组腺病毒感染后,可检测到BTEB2反义RNA的表达;Ad. ASBTEB2转染可明显抑制VSMC的BTEB2蛋白表达及血清诱导的VSMC增殖,使VSMC出现明显的G_0/G_1期阻滞。**结论** 成功构建了携带反义BTEB2基因的重组腺病毒载体;重组腺病可在VSMC中表达BTEB2反义RNA;BTEB2反义RNA对VSMC增殖有明显的抑制作用。

关键词: BTEB2;反义RNA;腺病毒载体;血管平滑肌细胞

中图法分类号: R322.12; R329.28; R394-33 **文献标识码**: A

Inhibitory effect of BTEB2 antisense RNA mediated by recombinant adenoviral vector on proliferation of vascular smooth muscle cells

LI De, HE Guo-xiang, TANG Bo, TANG Bing (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct recombinant adenoviral vector expressing basic transcription element binding protein 2 (BTEB2) antisense RNA and study the effects of BTEB2 antisense RNA on the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCS). **Methods** BTEB2 cDNA was prepared by RT-PCR technique and was subcloned reversedly into the shuttle plasmid to construct recombinant shuttle plasmid, and then the recombinant shuttle plasmid and adenovirus genomic plasmid pBHG were cotransfected into 293 cells to obtain the recombinant adenovirus. The PCR technique was used to detect the target gene fragment and adenovirus genomic characteristic fragment. After transfection of the recombinant adenovirus into VSMCs, BTEB2 antisense RNA was detected by RT-PCR. The effects of BTEB2 antisense RNA on BTEB2 protein expression, proliferation, and cell cycles of VSMCs were analyzed by Western blot, MTT test, and flow cytometry, respectively. **Results** The recombinant adenovirus was proved correct by PCR. The expression of BTEB2 antisense RNA was very obvious in VSMCs after infection by recombinant adenovirus. Recombinant adenovirus infection significantly inhibited BTEB2 protein expression and proliferation of VSMCs and resulted in G_0/G_1 block. **Conclusion** The recombinant adenoviral vector expressing BTEB2 antisense RNA has been constructed. BTEB2 antisense RNA can significantly inhibit the proliferation of VSMCs.

Key words: BTEB2; antisense RNA; adenoviral vector; vascular smooth muscle cell

冠状动脉腔内介入治疗已成为目前治疗冠心病的重要手段,但无论是经皮冠状动脉腔内成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)还是支架植入术都存在术后冠脉再狭窄(restenosis, RS)的问题。目前,平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖是RS的主要病理机制的观点已得到公认。反义锌指转录因子2(basic transcription element binding protein 2, BTEB2)是锌指转录因子家族的典型成员。近年的研究表明BTEB2可调节多个VSMC增殖相关基因

作者简介:李 德(1966-),男,四川省乐至县人,博士研究生,主治医师,主要从事冠心病发病机制方面的研究。电话:13760690992

收稿日期:2004-11-15;修回日期:2004-12-15

的表达,从多个方面促进 VSMC 增殖[1,2],而且临床研究也表明 BTEB2 可作为冠状动脉再狭窄的预测因子[3],因此以 BTEB2 为目标的干预实验可能为冠状动脉再狭窄的防治开辟新的途径。

1　材料与方法

1.1　材料

人 5 型腺病毒载体系统 pDC315、pBHGloxΔE1,3Cre(简称 pBHG)购自 Microbix 公司;293 细胞及腺病毒 Ad.LacZ 由西南医院心血管内科钟理博士提供;限制性内切酶、T4DNA 连接酶及病毒 DNA 提取试剂盒购自 TaKaRa 公司;TriPure 和 DOTAP 脂质体购自 Roche 公司; RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司;山羊抗人 BTEB2 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;RIPA 购自上海申能博彩生物科技公司。BTEB2 扩增引物(P1: 5′CGCGGATCCATGCCCAGTTCGACAAA 3′和 P2: 5′ CCGGAATTCCTCTG GTGGCGCTTCA3′)及腺病毒基因组特征片段引物(P1:5′GTG GCA GCG GCG CGG AAG AGA AC3′和 P2: 5′ CGG GAA AGC GAT TGA ACA CG3′)由上海生工生物工程公司合成。基因测序由上海博亚生物工程公司完成。

1.2　方法

1.2.1　重组腺病毒载体 Ad.ASBTEB2 的构建　　用 TriPure 从原代大鼠 VSMC 提取总 RNA,经 RT-PCR 扩增得到 BTEB2 cDNA 片段。用 *Eco*RⅠ和 *Bam*HⅠ双酶切 BTEB2 cDNA 和 pDC315,然后用 T4DNA 连接酶将 BTEB2 cDNA 反向连接到 pDC315 上,构建重组穿梭质粒 pDC315ASBTEB2。连接产物转化大肠杆菌,从抗性平板上挑取菌落抽取质粒 DNA,进行酶切鉴定及测序。用脂质体法将 pDC315ASBTEB2 和 pBHG 共转染 293 细胞构建重组腺病毒 Ad.ASBTEB2。采用 PCR 方法对 Ad.ASBTEB2 进行鉴定,按文献[4]报道的方法对 Ad.ASBTEB2 及对照用病毒 Ad.LacZ进行扩增及纯化。

1.2.2　重组腺病毒对 VSMC 转染效率的测定[5]　　将 VSMC 接种于 24 孔培养板,24 h 后换成无血清培养液再培养 24 h;按感染复数(MOI)25、50、100、200 加入 Ad.LacZ 转染 30 min,而后加入含 10% FBS 的 DMEM 继续培养,分别于 12、24、48 h 检测 β-gal 的表达。检测方法:弃培养液,PBS 洗 3 次,加入 0.25% 戊二醛 4 ℃固定 5 min,弃固定液,PBS 振洗 3 次,加 X-gal 染色,37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 30 min。在光学显微镜下观察染色情况,计算蓝染细胞百分率。

1.2.3　反义 BTEB2 重组腺病毒在 VSMC 中表达的检测　　用 Ad.ASBTEB2 和 Ad.LacZ 按 MOI 100 感染 VSMC。分别于 6、12、24 h 及 3 d 后提取总 RNA,用 BTEB2 正义引物作逆转录引物进行 RT-PCR,检测 BTEB2 反义 RNA 的表达。

1.2.4　BTEB2 反义 RNA 对 BTEB2 蛋白质表达抑制作用的检测　　实验分组:分 Ad.ASBTEB2 组、Ad.LacZ 组和未转染组。将 VSMC 接种于 50 ml 培养瓶中,待细胞 80% 融汇时,无血清培养 24 h,按 100 MOI 加入 Ad.ASBTEB2 或 Ad.LacZ 转染液,1 h 后去除转染液,加入含 15% FBS 的 DMEM 培养液。未转染组除不转染病毒外,其余同转染组。血清刺激后 6 h 用 RIPA 抽提蛋白质,蛋白质经聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭后,以山羊抗人 BTEB2 多克隆抗体为一抗、辣根酶标记兔抗山羊 IgG 为二抗进行 Western Blot 分析。

1.2.5　MTT 法测定细胞生长抑制率　　实验分组同上。将 VSMC 接种于 96 孔培养板中培养至 50% ~ 60% 融汇,换用无血清 DMEM 饥饿培养 24 h。按 MOI 25、50、100、200 转染 Ad.ASBTEB2 和 Ad.LacZ,1 h 后去除转染液,重新加入含 10% FBS 的 DMEM 继续培养。48 h 后每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml) 20 μl,37 ℃继续孵育 4 h。在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光值,计算细胞生长抑制率。

1.2.6　流式细胞仪检测细胞周期　　VSMC 生长至 60% 时无血清培养 24 h, Ad.ASBTEB2 和 Ad.LacZ 按 MOI 100 进行转染,而后在含 10% FBS 的 DMEM 中继续培养 3 d,消化收集后用 75% 乙醇固定细胞。加入碘化丙锭(PI)染液,4 ℃避光 30 min,进行流式细胞仪检测。

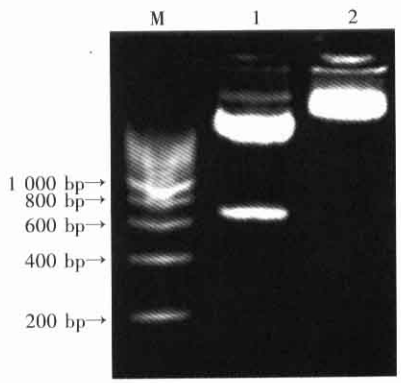
1.3　统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。

2　结果

2.1　重组腺病毒载体的构建及鉴定

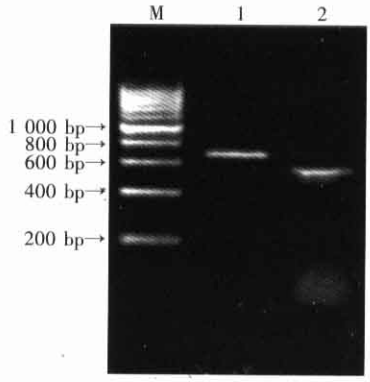
将经 RT-PCR 扩增得到的 BTEB2 cDNA 反向连接到 pDC315 上,构建了重组穿梭质粒 pDC315ASBTEB2。重组子可被 *Eco*RⅠ和 *Bam*HⅠ切为 3.9 kb 和 662 bp 大小两个片段(图 1),与预期值相符合;将重组子 pDC315ASBTEB2 的外源性基因测序结果与 Imternet GeneBank 中公布的 BTEB2 mRNA 序列比较,未发现有突变或碱基置换,说明重组质粒获得成功。用重组穿梭质粒 pDC315ASBTEB2 与腺病毒基因组质粒 pBHG 经脂质体法共转染 293 细胞,自第 8 天起 293 细胞陆续发生病变效应。收集病变细胞分离病毒,提取病毒 DNA。以收获的腺病毒 DNA 为模板,分别用 BTEB2 引物和 pBHG 引物进行 PCR 反应,结果如图 2 所示,重组腺病毒可扩增出与 BTEB2 cDNA 及腺病毒基因组特征片段大小相一致的片段,证实重组腺病毒获得成功。其滴度为 5×10^9 pfu/ml。



M: DNA marker; 1: pDC315ASBTEB2 (*Eco*RⅠ + *Bam*HⅠ);
2: pDC315ASBTEB2

图 1　pDC315ASBTEB2 酶切鉴定

Fig 1　The restriction products of pDC315ASBTEB2



M: DNA marker; 1: BTEB2 gene fragment; 2: Adenovirus genomic fragment

图 2 重组腺病毒 PCR 鉴定

Fig 2 Electrophoretic analysis of recombinant adenovirus by PCR

2.2 重组腺病毒对 VSMC 的转染效率

见表 1。

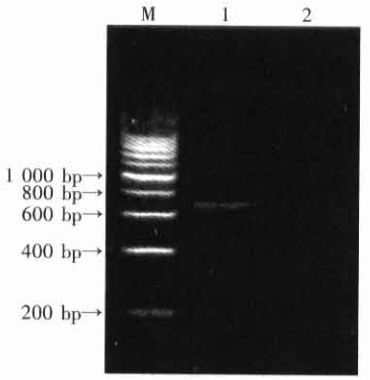
表 1 重组腺病毒转染效率测定结果(%)

Tab 1 Efficiency of recombinant adenoviruses infecting VSMC (%)

Time (h)	MOI			
	25	50	100	200
12	48	75	96	100
24	67	80	100	100
48	86	92	100	100

2.3 BTEB2 反义 RNA 在 VSMC 中的表达

在 VSMC 转染 Ad. ASBTEB2 后各时相点,经 RT-PCR 均可检测到 BTEB2 反义 RNA 的表达,Ad. LacZ 组无 BTEB2 反义 RNA 表达(图 3)。



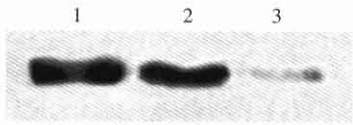
M: DNA marker; 1: Ad. ASBTEB2 group; 2: Ad. LacZ group

图 3 BTEB2 反义 RNA 在 VSMC 中表达的 RT-PCR 检测

Fig 3 Expression of BTEB2 antisense RNA in VSMC by RT-PCR

2.4 BTEB2 反义 RNA 对 BTEB2 蛋白质表达抑制作用 Western Blot 分析结果表明(图 4)

血清刺激后,VSMC 中 BTEB2 蛋白明显表达;转染 Ad. ASBTEB2 可明显抑制 BTEB2 蛋白表达;Ad. LacZ 转染对 BTEB2 蛋白表达无明显影响。



1: Uninfected group; 2: Ad. LacZ infected group; 3: Ad. ASBTEB2 infected group

图 4 BTEB2 蛋白表达的 Western Blot 分析

Fig 4 Expression of BTEB2 in VSMC by Western Blot

2.5 BTEB2 反义 RNA 对 VSMC 增殖的影响

用 MOI 分别为 25、50、100、200 的 Ad. ASBTEB2 和 Ad. LacZ 感染 VSMC 48 h 后,用 MTT 法测定细胞生长抑制率(表 2)。结果表明 BTEB2 反义 RNA 对 VSMC 的增殖有明显的抑制作用。

表 2 不同浓度的 Ad. ASBTEB2 和 Ad. LacZ 对 VSMC 的抑制率 (%, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effects of BTEB2 antisense RNA and Ad. LacZ on VSMC proliferation(%, $\bar{x} \pm s$)

MOI	25	50	100	200
Ad. ASBTEB2	20.34 ± 1.62*	29.22 ± 2.31*	38.84 ± 2.43*	49.73 ± 2.66*
Ad. LacZ	0.51 ± 0.13	0.80 ± 0.16	1.75 ± 0.20	3.64 ± 0.15

*: $P<0.01$, *vs* Ad. LacZ

2.6 BTEB2 反义 RNA 对 VSMC 细胞周期的影响

流式细胞仪检测结果见表 3。Ad. ASBTEB2 组的 G_0/G_1 期细胞较 Ad. LacZ 组明显增多,S 期、G_2/M 期细胞明显减少。表明 Ad. ASBTEB2 转染后 VSMC 出现了明显的 G_0/G_1 期阻滞。

表 3 Ad. ASBTEB2 转染对 VSMC 细胞周期的影响($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effects of BTEB2 antisense RNA on cell cycle progress of VSMC ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Group	G_0/G_1	S	G_2/M
Ad. ASBTEB2	81.9 ± 2.6**	12.0 ± 1.6*	6.1 ± 2.1**
Ad. LacZ	64.0 ± 3.8	18.3 ± 2.8	17.7 ± 3.2

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* Ad. LacZ

3 讨论

长期以来,人们一直在试图寻求高效、安全的基因转移方法用于再狭窄的基因治疗。腺病毒载体作为一种有效的基因转移工具被广泛应用于基因治疗的研究,具有众多优点[6]:能将外源基因有效地导入哺乳动物细胞,并且易于收集和浓缩;其转染不依赖细胞分裂,既可转染分裂期细胞又可转染非分裂期细胞;腺病毒本身无致瘤性,携带的外源基因不与宿主基因整合等。因此,腺病毒载体被视为心血管疾病的基因转移和基因治疗的理想载体。本研究从处于增殖状态的 VSMC 中提取 BTEB2 cDNA 片段,将其反向连接到穿梭质粒中,再与腺病毒基因组质粒共转染 293 细胞,成功

构建了反义 BTEB2 腺病毒载体。本研究表明当 MOI 为 100 时，VSMC 外源性基因表达率可达 100%。我们用重组腺病毒 Ad. ASBTEB2 按 MOI 100 转染 VSMC 后提取总 RNA，用 BTEB2 正义引物作逆转录，进行 RT-PCR，成功检测到 BTEB2 反义 RNA 的表达，说明 Ad. ASBTEB2 可将外源性基因成功导入 VSMC。

反义 RNA 技术是根据碱基互补原理，利用与目标 RNA 互补的核苷酸片段封闭基因表达的方法，包括反义寡核苷酸和载体表达的反义 RNA。本研究运用腺病毒介导 BTEB2 反义 RNA 在 VSMC 中表达，明显地抑制了 BTEB2 蛋白质的诱导表达。

VSMC 增殖是高血压、动脉粥样硬化、血管 RS 等多种心血管疾病的共同病理特征。VSMC 在各种外界刺激的作用下，细胞外信号经过细胞内信号传递系统到达核内，诱导一系列与 VSMC 增殖相关的基因表达，启动细胞周期，从而推动 VSMC 分裂、增殖。而这些基因表达又受某些核内转录因子的调控。BTEB2 是锌指转录因子家族的典型成员，它与基因启动子中的 GC 盒子结合，从而反式调节基因的表达。在正常血管平滑肌中无 BTEB2 表达，但内皮损伤可诱导其大量表达[7]。近年来的研究表明，BTEB2 促进 VSMC 表型转化及细胞周期进展[1,8]，激活某些生长因子及原癌基因的表达，从而促进 VSMC 分裂、增殖。由于 BTEB2 调节多个 VSMC 增殖相关基因的表达，从多个方面促进 VSMC 增殖，因此推测 BTEB2 的诱导表达在动脉内皮损伤后新生内膜的形成过程中起重要作用。本研究结果表明，BTEB2 反义 RNA 可影响 VSMC 细胞周期进展，引起明显的 G_0/G_1 期阻滞，对 VSMC 的增殖有明显的抑制作用。本研究结果反过来进一步证实 BTEB2 在 VSMC 增殖的过程中起着重要作用，以 BTEB2 为目标的干预对动脉内皮损伤后新生内膜增生可能具有潜在的防治作用。

参考文献：

[1] Watanabe N, Kurabayashi M, Shimomura Y, *et al*. BTEB2, a Kruppel-like transcription factor, regulates expression of the SMemb/Nonmuscle myosin heavy chain B (SMemb/NMHC-B) gene [J]. Circ Res, 1999, 85(2): 182 - 191.

[2] Shindo T, Manabe I, Fukushima Y, *et al*. Kruppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling [J]. Nat Med, 2002, 8(8): 856 - 863.

[3] Hoshino Y, Kurabayashi M, Kanda T, *et al*. Regulated expression of the BTEB2 transcription factor in vascular smooth muscle cells: analysis of developmental and pathological expression profiles shows implicatiohs as a tredictivetor resterosis [J]. Circulation, 2000, 102(20): 2528 - 2534.

[4] 斯佩克特 D L，戈德曼 R D，莱因万德 L A，等. 黄培堂等译. 细胞实验指南[M]. 北京：科学出版社，2001. 814 - 834.

[5] 鲁建国，林　晨，黄志强，等. 腺病毒介导 P16 对胆管癌细胞的生长抑制作用[J]. 第四军医大学学报，2000，21(4)：394 - 398.

[6] Kouraklis G. Progress in cancer gene therapy[J]. Acta Oncol, 1999, 38(6): 675 - 683.

[7] Kawai Kowase K, Kurabayashi M, Hoshino Y, *et al*. Transcriptional activation of the zinc finger transcription factor BTEB2 gene by Egr-1 through mitogen-activated protein kinase pathways in vascular smooth muscle cells [J]. Circ Res, 1999, 85(9): 787 - 795.

[8] Sun R, Chen X, Yang V W. Intestinal-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 5) is a positive regulator of cellular proliferation[J]. J Biol Chem, 2001, 276(10): 6897 - 6900.

（编辑　薛国文）

（上接 387 页）

和其他抗结核药物不一样，它既是一种抗结核药物又是一种广谱抗生素。因此，结核病患者在接受抗结核化疗方案的过程中，如果长期服用 RFP，容易造成患者体内菌群失调，再则，大多患者的细胞免疫功能本来就存在问题。上述这些因素致使存在于呼吸道内原本不致病的曲菌活跃起来，大量增殖并诱发肺曲菌感染。

肺结核继发肺曲菌感染造成咯血的原因尚不明确，除与原发病肺结核有关外，文献[4]报道，与曲菌球活动机械摩擦致空洞壁血管损伤，或由曲菌产生的内毒素和溶蛋白酶（类胶蛋白酶）致组织坏死溶解而致出血有关。

肺结核继发肺曲菌感染，药物治疗疗效甚差，一般多主张手术治疗[5]。以下两点可作为肺结核继发肺曲菌感染患者手术适应证的参考：①经过合理的化疗方案正规抗结核治疗的肺结核患者，痰结核菌已阴转而症状无好转，胸部 X 线片病灶长期无变化，应警惕肺结核继发肺曲菌感染的可能。②经过合理的化疗方案正规抗结核治疗的肺结核患者，长期反复发生与体

关键词：结核病；肺；曲菌
中图法分类号：R521.06　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 余美由，林明忠，陈红兵，等. 肺结核合并白色念珠菌感染 64 例临床分析[J]. 中国防痨杂志，2003，25(2)：78 - 79.

[2] 梁书高，吴小海，李　平，等. 利福平与肺曲菌病[J]. 大民军医(学专刊)，1990，(1)：74 - 75.

[3] 谢思安，陈国友，林善祥，等. 现代结核病学[M]. 北京：大民卫生出版社，2000. 253 - 254.

[4] 谢士鹏，孙成祖. 肺曲菌球病 13 例临床分析[J]. 温州医学院学报，2000，30(1)：76.

[5] 林　晓，李美花，卢　伟. 肺曲菌球病 21 例的诊断与外科治疗[J]. 胸部外科，2004，15(9)：86.

（编辑　陈聪连）