文章编号:1000-5404(2006)11-1161-03

论著

ORC1 基因 RNA 干扰对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响

覃跃龙,舒茂琴,江明宏 (第三军医大学西南医院心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所,重庆 400038)

提 要: 目的 以 RNA 干扰抑制血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)ORC1 基因,探讨 ORC1 基因表达抑制后 VSMCs 增殖的变化。**方法** 实验设置正常对照组、阴性 siRNA 组及阳性(ORC1 + A、ORC1 + B、ORC1 + C)siRNA 组。应用 Western blot 检测 ORC1 基因表达的变化;应用 MTT 比色试验、^{3}H-TdR 掺入试验检测 VSMCs 增殖的情况。免疫细胞化学染色观察增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)表达。**结果** ①siRNA 转染后,3 个阳性 siRNA 转染组 ORC1 基因表达水平均降低,尤以第 2 对阳性 siRNA 抑制效果最为显著,而空白对照组及阴性对照组间 ORC1 基因表达水平无显著差异。②siRNA 转染使 ORC1 表达减弱后,VSMCs 的 MTT 吸光度值、^{3}H-TdR 掺入量和 PCNA 表达量均较空白对照组及阴性对照组显著降低。**结论** RNA 干扰介导的 ORC1 基因沉寂可显著抑制 VSMCs 增殖。

关键词: ORC1;RNA 干扰;血管平滑肌细胞;细胞增殖
中图法分类号: R322.12; R329.28; R394.2 **文献标识码**: A

Effect of RNA interference for ORC1 gene on proliferation of rat vascular smooth muscle cells

QIN Yue-long, SHU Mao-qin, JIANG Ming-hong (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the influence of RNA interference targeting ORC1 gene on the proliferation of rat vascular smooth muscle cells (VSMCss). **Methods** VSMCss were transfected with siRNA targeting ORC1 gene by liposome. The expression of ORC1 protein was detected by Western blotting. MTT test and ^{3}H thymidine (^{3}H-TdR) incorporation were used to detect VSMCss proliferation. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in VSMCss was detected by immunocytochemistry. **Results** After transfected of the three pairs of siRNA targeting ORC1 genes respectively, the expression of ORC1 was all lower than that in the control group (non-transfection and negative siRNA). Especially, that in the group transfected of the second pair positive siRNA decreased most significantly. The optical density of MTT, ^{3}H thymidine incorporation and the expression of PCNA decreased significantly in VSMCss transfected with siRNA targeting ORC1 gene as compared with that in the control group. **Conclusion** ORC1 gene silenced by RNA interference can inhibit VSMCss proliferation.

Key words: ORC1; RNA interference; vascular smooth muscle cell; cell proliferation

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)的过度增殖是动脉粥样硬化、血管成形术后再狭窄的共同病理特征,抑制 VSMCs 的增殖是防治这类病理生理过程发生、发展从而减轻血管重构的重要环节。由于 VSMCs 的增殖同时受到多种血管活性多肽和生长因子的作用,故单纯阻断某种细胞外信号分子或某条信号通路难以取得相应的作用。目前认为,起始识别复合物(origin recognition complex, ORC)是真核细胞增殖所必需的[1],其亚基 ORC1 是调节 ORC 活性的关键因素[2]。RNA 干扰技术(RNA interference, RNAi)是通过 21 ~ 23 个核苷酸双链小分子干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)片段与细胞内相应的 mRNA 结合,激活内源性 RNA 内切酶,特异性降解 mRNA,从而抑制宿主细胞某种蛋白质表达的技术。本实验利用脂质体介导的 siRNA 抑制 ORC1 基因的表达,检测 VSMCs 的增殖能力是否改变,血清刺激对 ORC1 基因沉默的 VSMCs 的作用有无相应的变化。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470727)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30470727)
作者简介:覃跃龙(1976 -),男,贵州省清镇市人,硕士研究生,医师,主要从事冠心病方面的研究。电话:13594132519,E-mail:qinyuel@yeah.net
通讯作者:舒茂琴,电话:(023)68773050
收稿日期:2005-12-01;**修回日期**:2006-03-15

1 材料与方法

1.1 主要试剂

胎牛血清(FBS)(杭州四季青生物制品工程公司)、培养基DMEM(高糖型)(Gibco公司)、Ⅰ型胶原酶(Roche公司)、胰酶(Americo公司)、PCNA一抗(武汉博士德生物工程公司)、ORC1一抗(Santa公司)、抗山羊IgG(中杉公司)、S-P免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程公司)、脂质体RNAiFect(Qiagen公司)、^{3}H标记胸腺嘧啶核苷(^{3}H-TdR)(上海原子能研究所)、MTT(Americo公司)、其余试剂均为国产分析纯。

1.2 大鼠VSMCs培养及鉴定

健康SD大鼠,体质量120~150 g,由第三军医大学实验动物中心提供。SD大鼠用戊巴比妥麻醉,无菌条件下取出胸主动脉,去除血管内膜和外膜,采用组织块法行原代细胞培养,细胞融合后用0.25%的胰蛋白酶消化传代。倒置显微镜下观察,呈现平滑肌细胞特征性的"峰"、"谷"状生长。小鼠抗大鼠α-SM-actin单克隆抗体免疫荧光鉴定,实验用第4~8代细胞[3]。

1.3 针对ORC1基因siRNA序列的确定和合成

通过Ambion公司网址http://www.genscript.com在线寻找ORC1的siRNA靶点靶序列并设计对应的寡核苷酸序列,根据ORC1的基因序列和二级结构,筛选出3对特异性siRNA,分别命名为:ORC1+A siRNA:正义链5′-GGCAUUUGUUAGGACGGAGtt-3′,反义链5′-CUCCGUCCUAACAAAUGCCtt-3′;ORC1+B siRNA:正义链5′-GGAGACACUGUUUGUGAAGtt-3′,反义链5′-CUUCACAAACAGUGUCUCCtt-3′;ORC1+C siRNA:正义链5′-GGAUUGAAUCAAGUCAUUCtt-3′,反义链5′-GAAUGACUUGAUUCAAUCCtt-3′。利用DNA/RNA合成仪首先合成长为21 nt的siRNA分子,然后在体外将它们退火形成双链siRNA。经层析柱纯化后,以无RNA酶的去离子水调整浓度至20 μmol/L放入-20℃备用(由Ambion公司完成)。

阴性siRNA购自吉凯公司,序列为:正义链5′-UUCUCCGAACGUGUCACGUtt-3′,反义链5′-ACGUGACACGUUCGGAGAAtt-3′。

1.4 siRNA技术方法及其抑制效果的检测

1.4.1 siRNA技术方法 siRNA技术采用脂质体转染法。实验设置正常对照组、阴性siRNA组及阳性(ORC1+A、ORC1+B和ORC1+C)siRNA组。将VSMCs传入10 cm培养皿中,当细胞生长为50%融合时,去除原培养液,按脂质体转染试剂盒方法配制转染液(分别取适量的siRNA原液,加无RNA酶的去离子水至100 μl,充分混匀。加入体积与siRNA质量比为3:1的脂质体转染试剂,混匀。室温静置15 min,待siRNA-脂质体复合物形成后,将其加入适量的无血清培养基中,配成siRNA浓度为80 nmol/L的转染液),在各组中加入相应的转染液(正常对照组不转染任何siRNA,阴性siRNA组转染阴性siRNA,阳性siRNA组分别转染ORC1+A、ORC1+B及ORC1+C siRNA),转染3 d后,去除转染液待用。

1.4.2 免疫印迹法检测 转染后的细胞加入含10% FBS的培养基继续培养12 h。参照文献[4]的方法提取细胞总蛋白。考马斯亮蓝定量总蛋白后,用5×SDS上样缓冲液调整总蛋白浓度一致。保存在-70 ℃备用。免疫印迹方法:各取60 μl/孔,行10% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。待电泳完毕后24 V电转印16 h至PVDF膜,在室温下封闭2 h。加入山羊抗大鼠ORC1多克隆IgG抗体(1∶200稀释),37 ℃孵育1 h。二抗为HRP耦联的抗山羊IgG(1∶1 000稀释),37 ℃孵育1 h,DAB显色至出现棕色条带后在蒸馏水中终止显色。

1.5 MTT比色试验

取3×10^{3}个细胞接种于96孔培养板中,各组每个实验条件设16孔,分别siRNA转染(对照组、阴性和阳性siRNA+B组)VSMCs,去转染液,加入含10% FBS的培养基继续培养24 h,培养板中每孔终体积100 μl;检测时,每孔加入MTT溶液(5 mg/ml)20 μl,37 ℃继续孵育4 h;吸弃培养孔内上清液,每孔加入100 μl DSMO,振荡10 min,使结晶物完全溶解;选择490 nm波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值[D(490)]。

1.6 ^{3}H-TdR掺入法测定细胞DNA合成

以每孔1×10^{4}个细胞接种于24孔培养板中,对照组、阴性和阳性siRNA+B组各设5孔。37 ℃,5% CO_2培养24 h。如前述方法转染细胞。3 d后,去转染液,加入含10% FBS的培养基继续培养12 h,加入^{3}H-TdR,使之终浓度为3.7×10^4 Bq/ml;继续培养1 h后,常规消化收集细胞,经微孔滤膜抽滤细胞并用10%三氯乙酸(TCA)破碎细胞膜,滤膜烘干后置于闪烁瓶中,加入闪烁液,用液体闪烁计数仪测定放射性强度。

1.7 PCNA表达量的检测

分组同前,将VSMCs传入12孔板中爬片,每组设3个样本,如前转染3 d后,去转染液,加入含10% FBS的培养基继续培养24 h。小心取出盖玻片,以4%多聚甲醛固定30 min,1% Triton-100处理10 min。按S-P免疫组化试剂盒使用说明进行,小鼠抗大鼠PCNA单克隆抗体的工作浓度为1∶50。DAB显色后,苏木精复染,细胞核呈棕褐色为阳性细胞,细胞核呈蓝色为阴性细胞。镜下计数阳性和阴性细胞数,计算阳性细胞百分比,每张玻片随机计数3个视野(×200),取平均值。

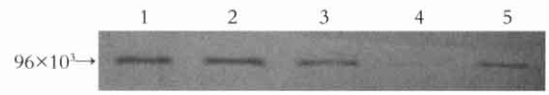
1.8 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件进行单因素方差分析及均数间多重比较。

2 结果

2.1 阳性siRNA的筛选及RNA干扰抑制效果检测

阳性ORC1+B siRNA转染后的VSMCss的ORC1蛋白质表达量显著降低,其余2个阳性转染组的ORC1表达量与对照组及阴性转染组差异不显著(图1)。



1:未转染组;2:阴性siRNA转染组;3:ORC1+A siRNA转染组;4:ORC1+B siRNA转染组;5:ORC1+C siRNA转染组

图1 VSMCs的ORC1蛋白表达Western blot分析

2.2　ORC1 + B siRNA 转染后 VSMCs 增殖活性的变化

ORC1 + B siRNA 组的增殖活性明显低于正常对照组和阴性 siRNA 干扰组。提示 ORC1 基因沉默后 VSMCs 的增殖能力明显受到抑制（表 1）。

表 1　ORC1 + B siRNA 转染后 VSMCs 增殖活性的变化（$\bar{x} \pm s$）

组别	例数	MTT 值（%）	^{3}H-TdR 掺入法（cpm）	PCNA 染色阳性率（%）
正常对照组	48	36.93 ± 2.64[a]	12 614.20 ± 2 375.26[a]	73.74 ± 7.64[a]
阴性 siRNA 转染组	15	34.53 ± 3.27[a]	8 381.40 ± 3 342.90[a]	68.11 ± 10.62[a]
ORC1 + B siRNA 转染组	27	18.07 ± 3.98	2 443.20 ± 934.99	28.89 ± 7.34

a：$P < 0.05$，与 ORC1 + B siRNA 转染组比较

2.3　ORC1 + B siRNA 转染后 VSMCss 的 PCNA 免疫组化染色变化

ORC1 + B siRNA 转染后 VSMCs 的 PCNA 阳性染色见图 2。ORC1 + B siRNA 转染组总计数 376 个细胞 PCNA 染色阳性率为（28.89 ± 7.34）%，较正常对照组［总计数 479 个细胞，阳性率为（73.74 ± 7.64）%］和阴性转染组［总计数 451 个细胞，阳性率为（68.11 ± 10.62）%］均显著下降（$P < 0.05$）。

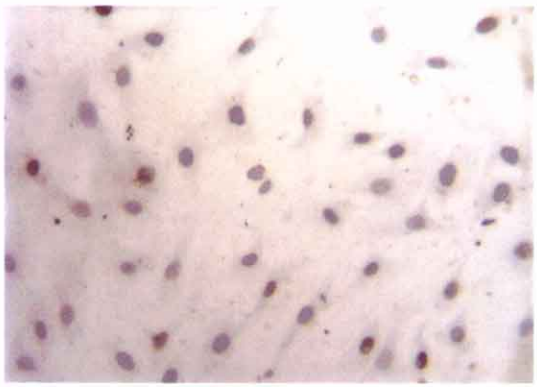


图 2　ORC1 + B siRNA 转染对 VSMCs PCNA 表达的影响　（DAB × 250）

3　讨论

研究表明，编码 ORC 蛋白基因在各种物种中呈高度保守[4]，其编码的蛋白是各种细胞进行 DNA 复制所必需的。在真核细胞增殖过程中 ORC 蛋白识别并结合核酸复制的起始位点，继而与 cdc6、MCM 等形成复制前复合物，促使细胞由 G_1 期进入 S 期[5]。其 ORC1 亚基的量在细胞周期中呈现周期性波动（G_1 中期开始积累，S 期开始减少），而 ORC2 ~ 5 在整个细胞周期保持稳定[6]。有报道免疫耗竭非洲蟾蜍卵提取物中的 ORC1 后，可以在起始阶段阻断 DNA 的复制。故目前认为 ORC 的活性由 ORC1 来调节[7]。

RNA 干扰（RNAi）是双链 RNA 介导的序列特异、转录后与之同源的靶基因沉默效应[8]。目前在哺乳动物细胞中介导 RNA 之效应的双链 RNA 主要是 21 ~ 23 核苷酸长的小分子干扰 RNA 片段，当它导入细胞后与尚未知的蛋白组装成 RNA 诱导沉默复合物（RNA induced silencing complex，RISC）形成，该复合物可以介导靶基因 mRNA 的降解[9]。本研究对 3 对 ORC1 特异性 siRNA 进行筛选发现：3 组 VSMCs 的 ORC1 蛋白质表达量均有降低，转染 ORC1 + B siRNA 组 ORC1 蛋白质表达量降低尤为明显，而阴性 siRNA 转染组与正常对照组 ORC1 表达量无明显差异。故选择第 ORC1 + B siRNA 作为阳性 siRNA 干预实验，以分析 ORC1 基因沉默后 VSMCs 的增殖活性的变化。

本研究 MTT 及 ^{3}H-TdR 掺入实验显示，转染 ORC1 + B siRNA 后，VSMCs 的增殖能力较对照组及阴性 siRNA 转染组显著下降（$P < 0.05$），而阴性 siRNA 转染组与对照组 VSMCs 增殖能力无明显差异，提示 ORC1 基因沉默以及所造成的 ORC1 蛋白质表达量减少可使 VSMCs 增殖活力显著下降。PCNA 被认为是评价细胞增殖状态的另一个有用指标[10]。本实验免疫组化染色 PCNA 后显示，ORC1 + B siRNA 转染组 PCNA 染色阳性率较正常对照组和阴性转染组均显著下降（$P < 0.05$），而对照组和阴性转染组 PCNA 阳性染色的 VSMCs 数目相似，进一步说明 VSMCs 的 ORC1 基因被抑制后，其增殖能力显著下降。针对 ORC1 基因进行 RNAi 为动脉粥样硬化以及再狭窄的防治提供了新思路。

参考文献：

[1] BLOW J J. Control of chromosomal DNA replication in the early Xenopus embryo[J]. EMBO J, 2001, 20(13): 3293 - 3297.

[2] OHTA S, TATSUMI Y, FUJITA M, *et al*. The ORC1 cycle in human cells: Ⅱ. Dynamic changes in the human ORC complex during the cell cycle[J]. J Biol Chem, 2003, 278(42): 41535 - 41540.

[3] 江明宏，舒茂琴，覃跃龙. ORC1 在大鼠血管平滑肌细胞增殖过程中的表达[J]. 第三军医大学学报，2005，27(22)：2245 - 2247.

[4] BISWAS N, SANCHEZ V, SPECTOR D H. Human cytomegalovirus infection leads to accumulation of geminin and inhibition of the licensing of cellular DNA replication [J]. J Virol, 2003, 77(4): 2369 - 2376.

[5] SAITOH Y, MIYAGI S, ARIGA H, *et al*. Functional domains involved in the interaction between ORC1 and transcriptional repressor AlF-C that bind to an origin/promoter of the rat aldolase B gene [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(23): 5205 - 5212.

[6] TATSUMI Y, OHTA S, KIMURA H, *et al*. The ORC1 cycle in human cells: Ⅰ. Cell cycle-regulated oscillation of human ORC1 [J]. J Biol Chem, 2003, 278(42): 41528 - 41534.

[7] ROWLES A, CHONG J P, BROWN L, *et al*. Interaction between the origin recognition complex and the replication licensing system in Xenopus [J]. Cell, 1996, 87(2): 287 - 296.

[8] 雷迎峰，薛小平，尹　文. RNAi 研究进展[J]. 国外医学：分子生物学分册，2002，24(4)：196 - 199.

[9] PAUL C P, GOOD P D, WINER I, *et al*. Effective expression of small interfering RNA in human cells[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(5): 505 - 508.

[10] 黄杰雄，黄致治. 增殖细胞核抗原的研究进展[J]. 国外医学：生理、病理科学与临床分册，1994，14(1)：9 - 11.

（编辑　张大春）