文章编号:1000-5404(2009)06-0491-04

论著

ORC1基因RNA干扰对大鼠血管平滑肌细胞表型的影响

李建涛,舒茂琴,冯媛媛 (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)

摘 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基因表达抑制后对VSMCs表型的影响。**方法** 实验设置正常对照组、阴性siRNA组及阳性siRNA组。应用Western blot检测ORC1基因表达的变化;免疫荧光染色后激光共聚焦显微镜观察细胞形态结构;应用流式细胞仪检测细胞表型标志蛋白表达。**结果** ① siRNA转染后,阳性siRNA组ORC1基因表达水显著降低,而正常对照组及阴性siRNA组间ORC1基因表达水平无显著差异。② siRNA转染后,阳性转染组细胞呈现收缩型形态特征,空白对照组及阴性对照组细胞呈现合成型形态特征。③ siRNA转染使ORC1表达减弱后,VSMCs收缩型标志物α-平滑肌肌动蛋白(α-SM actin)和平滑肌肌动蛋白重链2(SM-2)表达水平明显升高,合成型标志物骨桥蛋白(osteopontin)表达水平明显降低,空白对照组及阴性对照组间3种标志物表达水平无显著差异。**结论** RNA干扰介导的ORC1基因沉寂可促使VSMCs由合成型向收缩型转化。

关键词: ORC1; RNA干扰;血管平滑肌细胞;表型
中图法分类号: R322.12;R329.25;R394.2 **文献标识码:** A

Effect of RNA targeting ORC1 gene on phenotype of rat vascular smooth muscle cells

LI Jian-tao, SHU Mao-qin, FENG Yuan-yuan (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 phenotype of rat vascular smooth muscle cells (VSMCs). **Methods** VSMCs were transfected with siRNA targeting ORC1 gene by liposome. The expression of ORC1 protein was detected by Western blotting. The changes of phenotype-dependent markers was analyzed by flow cytometry. **Results** After transfected of siRNA targeting ORC1 genes, the expression of ORC1 was lower than that in the control groups (non-transfection and negative siRNA). ORC1 gene silencing increased the expression of VSMC contractile markers α-SM actin and SM-2, and decreased the expression of synthetic marker osteopontin. ORC1 gene silencing greatly affected VSMC differentiated morphology. **Conclusion** ORC1 gene silenced by RNA interference can mediate the transition of VSMCs from synthetic phenotype to contractile phenotype.

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

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)的增殖是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)、经皮冠状动脉介入治疗术后(percutaneous coronary intervention, PCI)再狭窄等血管疾病的主要病理特征,血管平滑肌细胞表型的转化是平滑肌细胞增殖和迁移的关键性起始步骤[1],抑制VSMCs的增殖并使其维持在分化状态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。发育成熟的正常动脉组织中,VSMCs处于分化状态,具有收缩能力,形态呈纺锤形并表达与收缩功能相关的标志蛋白。血管损伤后,位于中膜的VSMCs增殖转化为去分化表型,迁移至内膜,处于去分化状态的VSMCs失去其特有的形态和功能特征,分化型特异性标志蛋白消失[2]。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[3],其亚基ORC1是调节ORC活性的关键因素[4]。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

基金项目:国家自然科学基金(30470727)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470727)
作者简介:李建涛,男,河南省漯河市人,硕士研究生,医师,主要从事动脉粥样硬化发病机制方面的研究。电话:(023)67495606, E-mail: woshilijiantao.student@sina.com
通信作者:舒茂琴,电话:(023)68765671,E-mail: Shumaoqin@sina.com
收稿日期:2008-10-06;修回日期:2008-10-22

mRNA,从而抑制宿主细胞某种蛋白质表达的技术。我们的前期研究已经证实由 siRNA 介导的 ORC1 基因沉寂可以显著抑制 VSMCs 增殖[5]。本实验利用脂质体介导的 siRNA 抑制 ORC1 基因的表达,检测 VSMCs 的形态结构及表型标志物表达量是否改变,探讨 ORC1 基因抑制后 VSMCs 的表型转化,旨在为血管损伤性疾病的防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

胎牛血清(FBS)(杭州四季青),培养基 DMEM(高糖型)(Gibco 公司),兔抗大鼠 ORC1 一抗及小鼠抗大鼠 α-SM actin 一抗(Santa Cruz 公司),兔抗大鼠 Osteopontin 一抗及小鼠抗大鼠 SM-2 一抗(Abcam 公司),FITC-羊抗兔 IgG 及 FITC-兔抗小鼠 IgG(中杉公司),HRP 耦联山羊抗兔 IgG(Santa Cruz 公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Pierce 公司),脂质体 Lipofectamine2000、蛋白酶抑制剂(上海康成),SDS-PAGE 蛋白上样缓冲(碧云天公司),针对 ORC1 基因的阳性 siRNA(Ambion 公司),阴性 siRNA(上海吉凯),ECL 化学发光试剂盒(Pierce 公司)其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 VSMCs 的培养 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 大鼠断颈处死,无菌条件下取出胸主动脉,去除血管内膜和外膜,采用组织块贴壁法行原代细胞培养,细胞融合后用 0.25% 的胰蛋白酶消化传代,实验采用第 5 ~ 8 代细胞。

1.2.2 细胞鉴定 形态学鉴定:倒置显微镜下观察细胞形态及生长方式;免疫荧光鉴定:一抗为小鼠抗大鼠 α-SM actin 单克隆抗体,二抗为绿色荧光标记的抗小鼠 IgG,细胞核采用 DAPI 蓝染。

1.2.3 ORC1 基因 siRNA 序列的确定和合成 该课题组前期实验已经证实,化学合成的特异性阳性 siRNA 能够有效介导 ORC1 基因沉寂,其序列为:正义链 5′-GGAGACACUGUUUGUGAAGTT-3′,反义链 5′-CUUCACAAACAGUGUCUCCTT-3′[5],本实验亦采用该序列。合成方法: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′。

1.2.4 siRNA 技术方法及其抑制效果检测

1.2.4.1 siRNA 技术方法 siRNA 技术采用脂质体转染法。脂质体转染试剂为 Lipofectamine2000。实验设置正常对照组、阴性 siRNA 组及阳性 siRNA 组。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,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 组转染阳性 siRNA,转染 48 h 后,去除转染液待用。

1.2.4.2 Western blot 检测抑制效果 转染后的细胞加入含 10% FBS 的培养基继续培养 24 h。细胞总蛋白的提取:用移液器吸去培养瓶内培养液,每瓶细胞加 4 ml 4 ℃ 预冷的 0.01% PBS 洗涤细胞,弃去洗液,重复以上操作 3 次。将培养瓶置于冰上。按 1 ml RIPA 裂解液加 100 mmol/L PMSF 和蛋白酶抑制剂各 10 μl,摇匀置于冰上;每瓶细胞加 200 μl 含 PMSF 的裂解液,于冰上裂解 30 min;用细胞刮将细胞刮于培养瓶的一侧,移液枪将细胞碎片和裂解液移至 1.5 ml 离心管中;4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min;取上清分装转移到 0.5 ml 的离心管中放于 -20 ℃ 保存。按 BCA 法定量总蛋白后,加入等体积 5 × SDS 上样缓冲液,100 ℃ 加热变性 5 min。免疫印迹方法:各取 30 μg/孔,行 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。待电泳完毕后 50 V 电转印 150 min 至 PVDF 膜,在室温下封闭 60 min。加入兔抗大鼠 ORC1 多克隆 IgG 抗体(1∶200 稀释),TBST 4 ℃ 过夜。二抗为 HRP 耦联的抗兔 IgG(1∶2 000 稀释),室温孵育 60 min,化学发光法显示抗原抗体复合物,放入冷 CCD 成像仪(Bio-Rad 公司)曝光成像。用 Quantity One 4.4 软件分析图像。

1.2.5 免疫荧光染色和激光共聚焦显微镜检测 将 VSMCs 传入 24 孔板中爬片,对照组,阴性 siRNA 组和阳性 siRNA 组各设 3 个样本,如前转染 48 h 后,去转染液,加入含 10% FBS 的培养基,继续培养 72 h 后弃去培养基,0.01% PBS 洗涤 3 次,然后用 4% 多聚甲醛室温下固定 30 min。0.01% PBS 洗涤 3 次,加入 0.1% Triton X-100 室温通透 15 min,5% 牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin,BSA)常温封闭 10 min,吸除剩余封闭液。加小鼠抗大鼠 α-SM actin 一抗 4 ℃ 孵育 16 h。0.01% PBS 洗涤 3 次,加 FITC 标记的相应二抗,37 ℃ 避光孵育 1 h,0.01% PBS 洗涤 3 次,加 4,6 二脒基-2 一苯吲哚盐酸(4,6-diamidino-2-phenylindole hydrochloride, DAPI, Sigma, 美国)复染 1 min,0.01% PBS 洗涤 3 次,50% 丙三醇封片,激光共聚焦显微镜观察。

1.2.6 流式细胞仪检测表型标志物 分组同前,细胞生长至 50% 融合时,如前转染 48 h,去除转染液,加入含 10% FBS 的培养基,继续培养 72 h 后弃去培养基。用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,见到细胞变圆,用含 10%(胎牛血清)DMEM 终止消化,吹打后以 5 min、1 000 r/min 离心,然后加入 500 μl 含 1% BSA 的 PBS 浸洗后转移至 1.5 ml EP 管,离心,去除上清液。加入 500 μl 4% 多聚甲醛室温固定 20 min,以 5 min、1 500 r/min 离心(下同),去除上清液。加入 200 μl 0.1% Triton X-100 室温通透 5 min,离心后去除上清液。500 μl 含 1% BSA 的 PBS 浸洗 2 次,离心 5 min 后去除上清液。每 EP 管 200 μl 相关一抗(稀释 50 倍)4 ℃ 孵育 1 h。用 500 μl 含 1% BSA 的 PBS 浸洗 2 次,离心,去除上清液。加入 200 μl FITC 荧光标记相关二抗(稀释 100 倍)室温避光 1 h,离心 5 min,去除上清液。PBS 冲洗 2 次,上机调节检测背景的正常细胞不加一抗工作液,直接加二抗,进行流式细胞仪检测。

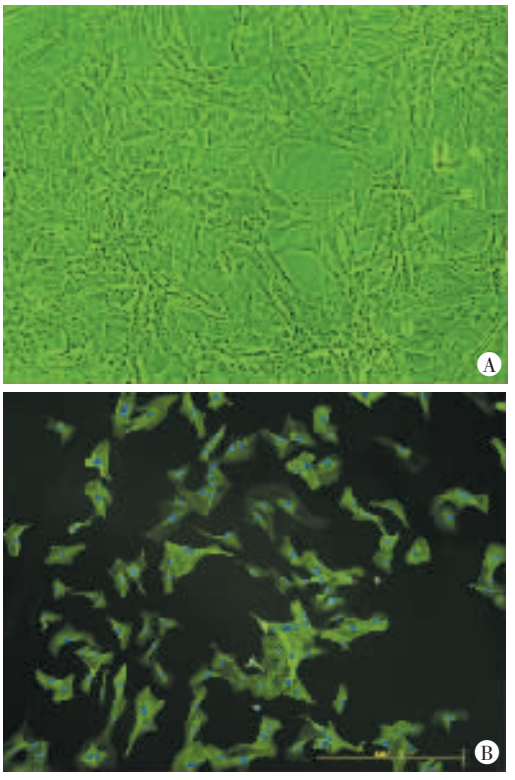
1.3 统计学处理

计数资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　VSMCs 的培养及鉴定

倒置显微镜下观察:细胞呈梭形、三角形或多角形,有1~2个核仁,密度较高时呈峰/谷状生长(图 1A)。用 α-SM actin单克隆抗体进行免疫荧光鉴定,在荧光显微镜下全部细胞细胞质可见绿色荧光(图 1B),证实培养的细胞为 VSMCs。

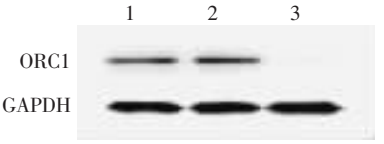


A:倒置显微镜下 VSMCs 形态学特征(×100); B:α-SM actin 免疫荧光鉴定

图 1　VSMCs 形态学特征及免疫荧光鉴定

2.2　RNA 干扰抑制效果检测

各组 Western blot 分析结果见图 2。正常对照组、阴性 siRNA 组和阳性 siRNA 组相对光密度平均值分别为(0.96 ± 0.12)、(0.96 ± 0.10)和(0.12 ± 0.00),阳性 siRNA 转染后的 VSMCs 的 ORC1 蛋白质表达量较正常对照组和阴性 siRNA 组显著降低($P<0.01$),正常对照组及阴性 siRNA 组差异不显著($P>0.05$)。



1:正常对照组; 2:阴性 siRNA 组; 3:阳性 siRNA 组

图 2　VSMCs 的 ORC1 蛋白表达 Western blot 分析

2.3　RNA 干扰后 VSMCs 共聚焦显微镜下形态学变化

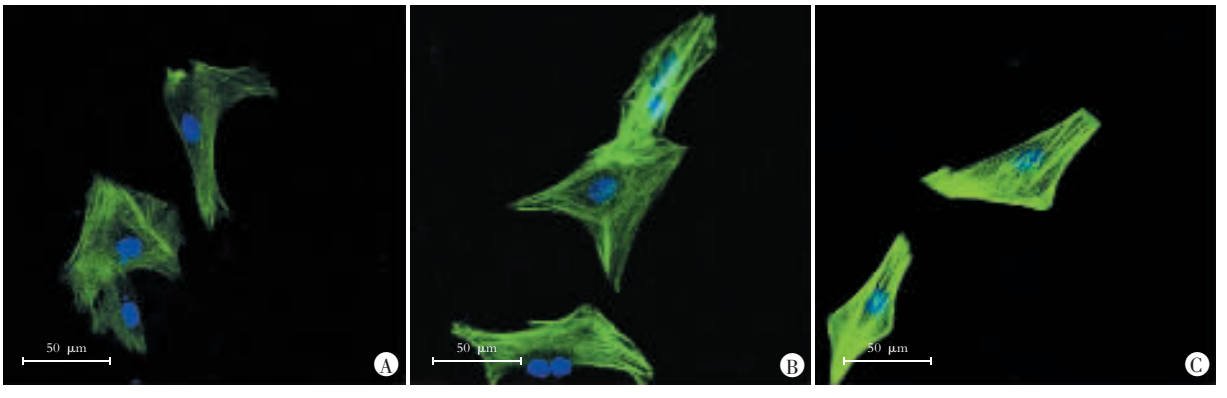
激光共聚焦显微镜下观察,见正常对照组 VSMCs(图 3A)和阴性 siRNA 组 VSMCs(图 3B)呈不规则多边型,多核,细胞棘突多,肌动蛋白排列紊乱,呈合成型形态。阳性 siRNA 组 VSMCs(图 3C)呈纺锤形或三角形,细胞边缘平整,单核,肌动蛋白排列较整齐,呈收缩型形态。

2.4　RNA 干扰后 VSMCs 表型标志物表达量变化

流式细胞仪检测结果见图 4。siRNA 转染后,阳性 siRNA 组 VSMCs 收缩型标志物 α-SM actin 及 SM-2 表达水平明显升高,合成型标志物骨桥蛋白(Osteopontin)表达水平明显降低,正常对照组及阴性 siRNA 组 3 种标志物表达水平无明显差异。

3　讨论

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[6]。其 ORC1 亚基在复制起始调控中起关键作用[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]。介导 RNA 干扰效应的双链 siRNA 片段导入细胞后,与尚未知的蛋白组装成 RNA 诱导沉默复合物(RNA induced silencing complex,RISC),该复合物可以介导靶基因 mRNA 的降解[9],该课题组前期研究证实,RNA 干扰介导的 ORC1 基因沉寂可显著抑制 VSMCs 增殖[5],而对于 ORC1 基因沉寂后 VSMCs 表型变化未进行探讨。



A:正常对照组; B:阴性 siRNA 组; C:阳性 siRNA 组

图 3　激光共聚焦显微镜下 VSMCs 阳性 siRNA 转染后形态学改变

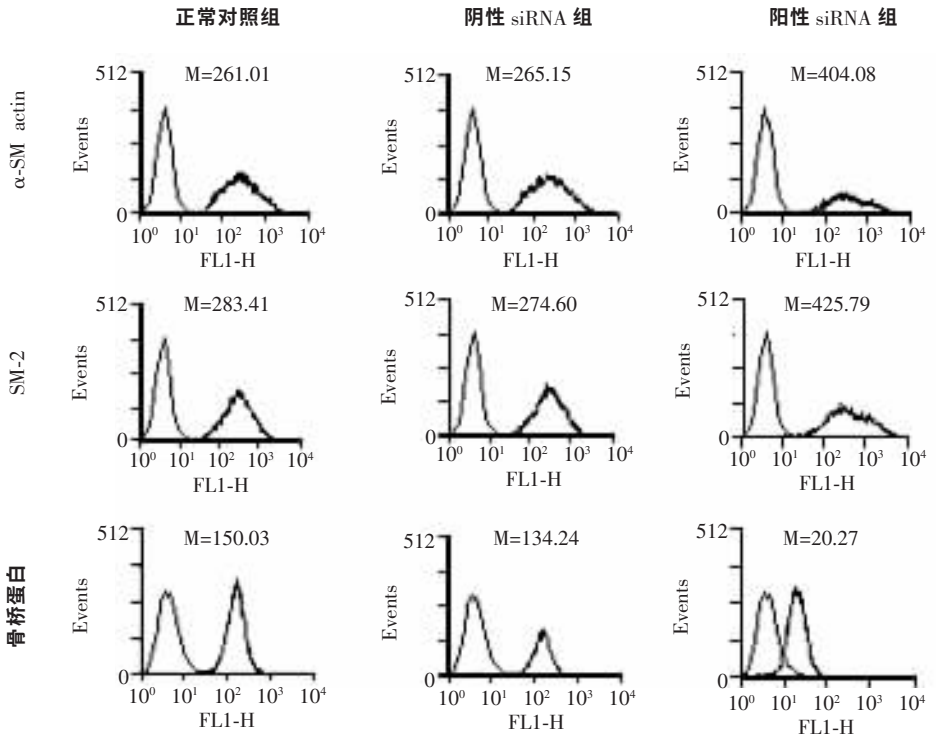


图 4　流式细胞仪检测 VSMCs 表型标志物表达变化

本研究首先通过 Western blot 检测抑制效果证实阳性 siRNA 组 ORC1 蛋白质表达量明显降低，而阴性 siRNA 组与正常对照组 ORC1 表达量无明显差异，阳性 siRNA 转染能显著抑制 ORC1 基因表达，以进一步研究 ORC1 基因沉寂后 VSMCs 表型变化。

在发育成熟的血管组织中，VSMCs 呈分化型，外型为纺锤形，可收缩，表达收缩相关蛋白。当血管受到损伤后，中膜中的 VSMCs 转化为去分化型并迁移至内膜，处于去分化状态的 VSMCs，失去其收缩功能和形态特征，收缩相关蛋白表达明显降低，分泌合成功能力增强[10]。α-平滑肌肌动蛋白（α-SM actin）及平滑肌肌动蛋白重链 2（SM-2）是收缩型的主要标志物，骨桥蛋白（Osteopontin）是合成型的主要标志物[11]。流式细胞仪检测 VSMCs 表型标志物变化，见阳性 siRNA 组收缩型标志物（α-SM actin，SM-2）表达水平明显升高，合成型标志物骨桥蛋白明显降低，正常对照组及阴性对照组 3 种标志物表达水平无明显差异，通过免疫荧光及激光共聚焦显微镜观察，见正常对照组 VSMCs 和阴性 siRNA 组 VSMCs 呈合成型形态，阳性 siRNA 组 VSMCs 呈收缩型形态。以上均说明 VSMCs 的 ORC1 基因被抑制可促使其表型由合`成型向收缩型转化。该研究结果为针对 ORC1 基因进行 RNAi 应用于动脉粥样硬化以及再狭窄的防治提供了理论依据。

参考文献：

[1] Owens G K, Kumar M S, Wamhoff B R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease [J]. Physiol Rev, 2004, 84 (3): 767 – 801.

[2] Zargham R, Thibault G. Alpha 8 integrin expression is required for maintenance of the smooth muscle cell differentiated phenotype [J]. Cardiovasc Res, 2006, 71(1): 170 – 178.

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

[4] 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.

[5] 覃跃龙，舒茂琴，江明宏. ORC1 基因 RNA 干扰对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 第三军医大学学报，2006，28(11)：1161 – 1163.

[6] 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.

[7] Mehra P, Biswas A K, Gupta A, *et al*. Expression and characterization of human malaria parasite Plasmodium falciparum origin recognition complex subunit 1 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 337 (3): 955 – 966.

[8] 唐孝清，李红生. RNA 干扰及其应用的研究进展[J]. 现代生物医学进展，2007，7(5)：787 – 789.

[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] Owens G K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells[J]. Physiol Rev, 1995, 75(3): 487-517.
[11] 张 健, 蔡生业. 血管平滑肌细胞表型转化及相关信号转导机制探讨[J]. 心血管病学进展, 2005, 26(2): 185-189.

(编辑 王 红)