论著

文章编号:1000-5404(2012)03-0210-04

Geminin 基因 RNA 干扰对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响

张园园,李林峪,周叶萍,舒茂琴 (400038 重庆,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)

[摘要] **目的** 以 RNA 干扰抑制血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs) Geminin 基因的表达观测 VSMCs 增殖情况及表型标志物。**方法** 分别利用 RT-PCR,Western blot 检测 VSMCs 中 Geminin 基因、蛋白表达的变化,筛选出干扰效果最为显著的序列用于构建慢病毒包裹的稳定干扰模型。应用[^{3}H]-TdR、EdU 掺入试验检测 VSMCs 增殖的情况;同时使用 Western blot 分别检测干扰前后相关标志性基因的表达。**结果** ① siRNA 转染后,以第 1 亚组干扰效果最为显著,与另外 2 个阳性亚组及对照组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。②[^{3}H]-TdR、EdU 掺入实验显示:阳性干扰组的掺入量较两对照组明显升高($P<0.05$)。③siRNA 转染使 Geminin 基因表达减弱后,阳性组 VSMCs 合成型标志物骨桥蛋白(osteopontin,OPN) 表达水平显著升高,收缩型标志物平滑肌肌动蛋白(smooth muscle actin,α-Actin)表达水平明显降低,与对照组间比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** RNA 干扰介导的 Geminin 基因沉寂可显著增强 VSMCs 的增殖能力,并有助于 VSMCs 的表型由收缩型向合成型转化。

[关键词] Geminin;RNA 干扰;血管平滑肌细胞;表型;细胞增殖
[中图法分类号] R322.12; R329.28; R394.3 [文献标志码] A

Effect of RNA interference targeting geminin on proliferation of vascular smooth muscle cells in rats

Zhang Yuanyuan, Li Linyu, Zhou Yeping, Shu Maoqin (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the proliferation and phenotypic markers of rat vascular smooth muscle cells (VSMCs) by using RNA interference targeting geminin. **Methods** VSMCs were transfected with siRNA for knockdown of geminin. Changes of geminin at protein and mRNA levels were detected by Western blotting and RT-PCR, and siRNA-geminin that exhibited the most significant inhibitory effect was used to construct lentivirus-packaged stable interference model. The proliferation of VSMCs was observed by [^{3}H]-TdR and EdU incorporation. The changes of phenotype-dependent markers were analyzed by Western blotting. **Results** After VSMCs transfected with three pairs of siRNA targeting geminin, a significant decrease of geminin expression was observed in one pair, as compared with that of the other two pairs and the controls ($P<0.05$). [^{3}H]-TdR and EdU incorporation showed a higher proliferation index in the positive interference group than that in the control groups ($P<0.05$). In the positive interference group, level of synthetic marker osteopontin (OPN) increased and level of contractile marker smooth muscle actin (α-Actin) decreased, and the differences were significant as compared with those of the control groups ($P<0.05$). **Conclusion** Geminin silencing by siRNA can promote VSMCs proliferation and phenotype transformation from contractile phenotype to synthetic phenotype.

[**Key words**] geminin; siRNA; vascular smooth muscle cells (VSMCs); phenotypes; proliferation

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30971228). Corresponding author: Shu Maoqin, Tel: 86-23-68773050, E-mail: shumaoqin@sina.com

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs)的增殖、迁移及其合成细胞外基质是导致动脉粥样硬化、血管成形后再狭窄等增生性血管疾病的共同发病基础[1],而表型的转化是导致上述病理过程的关键环节[2]。新近发现的一种被称为多功能小分子蛋白 Geminin 在真核细胞增殖-分化过程中发挥着重要的协同作用。提示这个基因参与 VSMCs 表型转化调控。但是 Geminin 对 VSMCs 增殖影响如何?是否通过调控表型影响增殖?知之甚少。本研究对大鼠血管平滑肌细胞 Geminin 进行干扰,观察和分析其对 VSMCs 增殖及其表型的影响。为其运用于动脉粥样硬化及其血管成形术后再狭窄的防治提供一定的实验基础。

[基金项目] 国家自然科学基金(30971228)
[通信作者] 舒茂琴,电话:(023)68773050,E-mall:shumaoqin@sina.com

1 材料与方法

1.1 主要试剂

A10 细胞(大鼠胸主动脉平滑肌细胞株),由美国 Georgetown 大学 Dr. pedro. A. Jose 实验室提供;培养基 DMEM (高糖型)(Gibco 公司)、胎牛血清(FBS,Gibco 公司)、兔抗大鼠 Geminin 多克隆抗体及羊抗大鼠 Geminin 多克隆抗体(Santa Cruz 公司),兔抗大鼠 Osteopontin 一抗(Santa Cruz 公司),兔抗大鼠 α-Actin 一抗(Santa Cruz 公司),FITC 一小鼠抗羊 IgG 及 TRITC 一驴抗兔 IgG (Thermo 公司),脂质体 Lipofectamine2000 (Invitrogen 公司)、蛋白酶抑制剂(Invitrogen 公司),SDS - PAGE 蛋白上样缓冲液(碧云天公司),针对 Geminin 基因的阳性 siRNA 及阴性 siRNA (晶赛公司),RT-PCR 试剂盒(TaKaRa),溴化乙啶(EB)(Sigma),^{3}H 标记胸腺嘧啶核苷([^{3}H]-TdR)(上海原子能研究所)、EdU 掺入试剂盒(锐博生物有限公司),其余试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 VSMCs 培养及转染时间的选定 无菌条件下对 A10 细胞进行培养,当细胞融合度达到 80% 左右换无血清培养观察细胞活力状态变化,共设置 3 个时间点(即饥饿 0、24、48 h)观察其细胞活力的变化,选定最佳转染时刻点,本实验选择饥饿 24 h 用于后续分化型细胞 siRNA 转染实验。

1.2.2 针对 Geminin 基因 siRNA 序列的合成及其效果的检测 根据 Geminin 的基因序列和二级结构设计 3 对特异性 siRNA,分别命名为: Geminin + AsiRNA: 正义链 5′-GGUCCUGAAGCCAAUGAAA-3′, 反义链 5′-UUUCAUUGGUTTUAGGAUU-3′; Geminin + B siRNA:正义链 5′-GUAUUGGAAAGAAGUGGCA-3′,反义链 5′-UGCCACUUCUUUCCAAUAC-3′; Geminin + C siRNA:正义链 5′-GUAAUCGAGAGGCUGAGUA-3′, 反义链 5′-UACUCAGCCUCUCGAUUAC-3′(上海晶赛公司)。阴性 siRNA 同样购于晶赛公司, 序列为: 正义链 5′-CGGCTTCGCGGGCGACGGA-3′, 反义链 5′-GAGGAGCTGGAAGCAGCCG-3′;实验共设置有 3 组,将 VSMCs 传至入 6 孔板中,当细胞生长至融合度为 50% 左右,利用脂质体转染法将序列转染至 A10 细胞,以阴性及空白组为对照(参照脂质体转染说明书)。2 d 后收集细胞采用下述免疫印迹法检测其干扰效率。

1.2.3 RT-PCR 检测阻断后 Geminin mRNA 的表达 按常规 RT-PCR 方法操作,具体步骤参考 TaKaRa 公司试剂盒说明书。

1.2.4 稳定干扰模型的建立 根据 RNAi 干扰靶点,向上海英骏订购 PAGE 纯化的 shRNA Oligo 片段;将其加水溶解至 0.4 mmol/L,在退火体系中加入正义,反义 Oligo 片段各 18 μl,再加入 10 × 退火 Buffer 4 μl,混匀后,水浴加热至 95 ℃ 10 min,取出使之自然冷却;取载体 2 μg,分别用 *Age* Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ 酶切(各 1 μl 酶,NE Buffer1 补足至 40 μl),37 ℃ 1 h,经琼脂糖凝胶电泳测得载体大小约为 7.5 kb 并回收目的片段;然后将载体与目的片段用 T_4 连接酶连接构建重组载体,将其转化入感受态细胞;测序鉴定转化进入细胞中的序列(由上海纽恩生物有限公司完成)。

1.2.5 将构建的慢病毒稳定干扰模型转染入 A10 细胞 将 VSMCs 传至入 6 孔板中,当细胞生长至融合度为 30% 左右,每组每孔加入 5 μl 病毒液,培养 72 h 后于荧光显微镜下检测其转染效率。

1.2.6 [^{3}H]-TdR 掺入试验检测细胞增殖[3] 将 A10 细胞消化制成细胞悬液,计数后以 3×10^4 个/ml,按 1 ml/每孔分别将阳性组,阴性组及空白对照组接种于 24 孔培养板中, 阳性 siRNA 组、阴性和空白对照组各设 8 个复孔。37 ℃, 5% CO_2 培养 24 h,待细胞的融合度达 50% 左右加入[^{3}H]-TdR,使之终浓度为 3.7×10^4 Bq/ml;继续培养 24 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,用无水乙醇洗去细胞表面的三氯乙酸,将滤膜置于烤箱烘干后,置于闪烁瓶中,每孔加入 5 ml 闪烁液,置于测定仪上测定其放射性强度。

1.2.7 EDU 掺入法测定细胞增殖 取对数生长期的细胞,分别取阳性,阴性,空白组细胞以每孔 $4 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ 细胞接种于 96 孔板,培养至合适阶段,每孔加入 100 μl 0.5 mmol/L EdU 培养基,孵育 2 h,固定细胞,并对细胞打孔,将 EdU 进行染色,再对其 DNA 进行染色处理,每孔加入 PBS 100 μl 保存,于荧光显微镜下观察(其具体步骤参考锐博生物公司试剂盒说明)。

1.2.8 免疫印迹法检测蛋白质的表达 提取细胞总蛋白,各取 50 μg/孔行 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,待电泳完毕后 50 V,150 min 电转印至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温振荡封闭 2 h。加入兔抗大鼠 Geminin 多克隆 IgG 抗体(1∶200 稀释),兔抗大鼠 α-actin 多克隆 IgG 抗体(1∶200 稀释),兔抗大鼠 Osteopontin 多克隆 IgG 抗体(1∶200 稀释) 4 ℃过夜,TBST 洗涤 3 次。二抗为 HRP 耦联的羊抗兔 IgG(1∶5 000 稀释),室温孵育 60 min,TBST 洗涤 3 次,加入发光液于暗室发光。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 18.0 统计软件进行单因素方差分析及均数间多重比较。

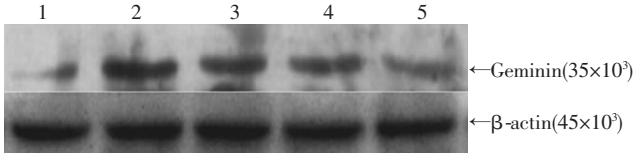
2 结果

2.1 阳性 siRNA 的筛选及 RNA 干扰抑制效果检测

阳性 siRNA-Geminin 转染后,第 1 阳性亚组 Geminin 蛋白表达量较其余 2 个阳性亚组及空白,阴性组有显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。而 2 个阳性亚组的 Geminin 表达量与 2 个对照组无明显差异 (图 1)。

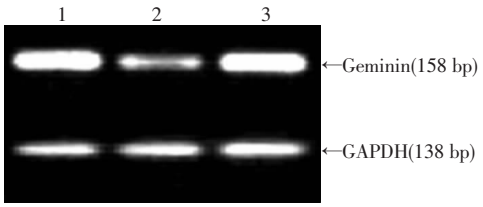
2.2 Geminin mRNA 表达水平的检测

为进一步验证第 1 亚组的干扰效果,分别提取了阴性、阳性转染组及空白组的总 RNA,通过逆转录 PCR 的方法检测各组 Geminin 的 mRNA 的表达(图 2),经 GAPDH 校正后,与两对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)提示阳性干扰组 Geminin 基因 mRNA 表达量明显减少。



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

图 1 Geminin-siRNA 转染入 A10 细胞后 Geminin 蛋白的表达变化

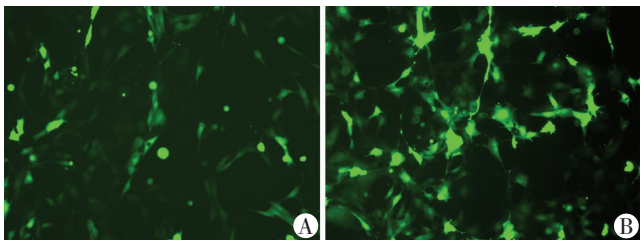


1:阴性转染组; 2:阳性转染组;3:空白组

图2 RT-PCR检测Geminin mRNA在阳性、阴性转染组及空白组中表达的变化

2.3 针对Geminin +A siRNA序列构建稳定转染模型

将已包裹第1亚组阳性序列的慢病毒转染入A10细胞分别于普通光镜和荧光显微镜下观察同一区域细胞,然后将同一视野叠加,利用相关图像处理软件计算出其转染效率为90%左右(图3),符合实验要求,故将转染后的A10细胞用于后续的实验。



A:为慢病毒包裹siRNA-Geminin阳性干扰组; B:阴性对照组

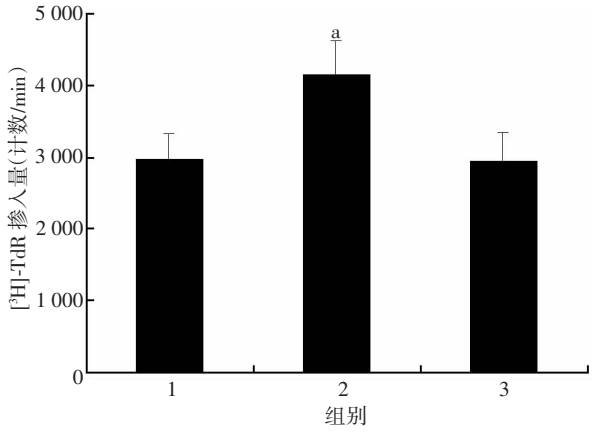
图3 将慢病毒包裹的序列转染入A10细胞后的荧光表达
(荧光显微镜×10)

2.4 Geminin基因干扰后VSMCs增殖活性的影响

分别观察了阴性,阳性,空白组[^{3}H]-TdR的掺入量,结果表明:将Geminin基因干扰之后,A10细胞的增殖能力显著高于阴性及空白组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。提示Geminin基因沉默后VSMCs的增殖能力较两对照组有显著提高(图4)。

2.5 Geminin基因干扰后通过EdU掺入法检测细胞的增殖活性

为进一步了解Geminin干扰之后对A10细胞增殖的影响,利用EdU掺入的方法观察细胞增殖(图5),结果显示:与阴性组及空白组比较,阳性干扰组可明显促进VSMCs的增殖,差异具有统计学意义($P<0.05$),所得结果与[^{3}H]-TdR掺入实验结果一致。

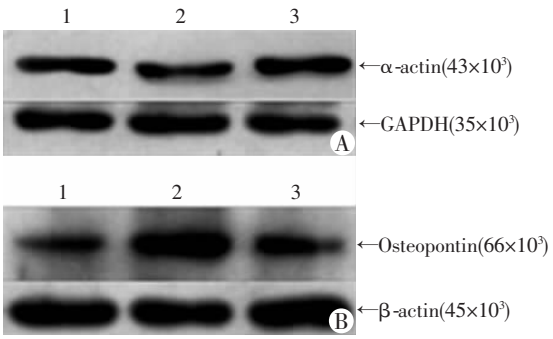


1:阴性组;2:阳性组;3:空白组;a:$P<0.05$,与两对照比较

图4 siRNA-Geminin对rat血管平滑肌增殖的影响

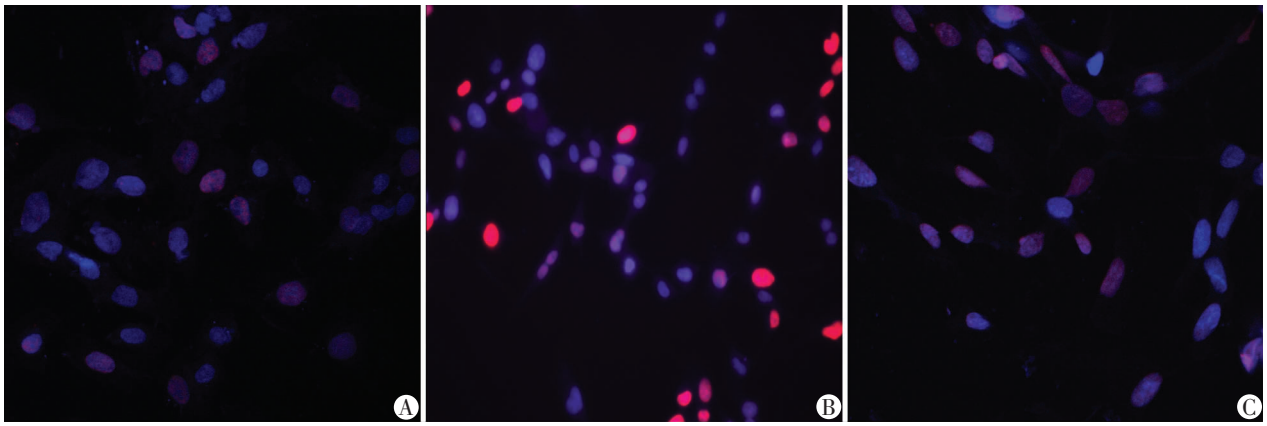
2.6 siRNA-Geminin后VSMCs表型标志物表达量变化

为验证干扰之后细胞表型的变化,对细胞表型标志物表达的变化进行检测,将细胞饥饿24 h得到分化型细胞,分别提取阴性组,空白对照组及阳性干扰组的细胞总蛋白,在蛋白水平上检测其收缩型标志物α-actin及合成型标志物骨桥蛋白(osteopontin,OPN)表达的变化。并对其条带进行灰度扫描,结果显示:与阴性干扰组和空白对照组相比较,α-Actin的表达有明显降低($P<0.05$);相反,合成型标志物OPN的表达有明显的升高($P<0.05$),差异均具有统计学意义(图6)。



A:α-actin RT-PCR结果; B: Osteopontin RT-PCR结果
1:阴性组;2:阳性组;3:空白组

图6 Western blot检测各组标志性基因的蛋白表达



A:阴性siRNA组;B:阳性siRNA组; C:正常对照组

图5 荧光显微镜下观察DAPI标记的核中掺入EdU后发出的红色荧光 (×20)

3 讨论

血管平滑肌细胞(VSMCs)存在着 2 种表型,即收缩型(分化型)和合成型(去分化型),VSMCs 由分化型向去分化型转化是 VSMCs 增殖的前提[4]。在动脉粥样硬化形成过程中,由于血管内皮损伤,位于动脉壁中膜的 VSMCs 可增殖分化迁移至内膜,使原处于分化状态的平滑肌细胞失去其特有的功能及形态,导致了粥样硬化斑块的形成。因此,研究如何使 VSMCs 持续处于分化表型是解决上述问题的关键。Geminin 是近年来发现的多细胞生物起始特许阻遏子,存在着 2 种异构体,是 1 种多功能的核定位蛋白[5],它可以与同源异型核蛋白或是基因相互作用,在调节细胞增殖与细胞分化中发挥着重要的协调作用[6-8]。Geminin 作为标记细胞增殖的生物分子,可望作为判断肿瘤患者预后的 1 项新的指标[9],最新研究发现,额外的 Geminin 可阻止 DNA 的再复制[10],它可使细胞退出细胞周期,维持神经干细胞处于原有的未分化状态[11-12]。而在 Geminin 基因缺失的果蝇及人的细胞系中,基因组出现了重复复制的现象[13]。但是,在免疫系统的研究中发现,Geminin 并不是维持 T 细胞正常分化必不可少的调控因子[14]。至今,Geminin 基因对 VSMCs 的影响知之甚少。我们既往研究发现,血清饥饿状态下 VSMCs 以分化型为主,血清刺激后以去分化型为主,Geminin mRNA 在血清刺激时有明显的升高,此外,Geminin 基因的高表达可减弱去分化型相关基因的表达,并可显著延缓 VSMCs 向去分化表型转化[15]。

在本实验研究中,我们选用 A10 细胞(大鼠胸主动脉平滑肌细胞株)为试验对象,针对 Geminin 基因设计了 3 段特异性的干扰序列,并从中筛选出干扰效果比较好的 A 亚组序列构建慢病毒的稳定干扰模型,用于观测细胞增殖能力以及其细胞表型标志物表达的变化。以此了解 Geminin 是否通过影响 VSMCs 表型的转化从而介导促 VSMCs 增殖的效应。分别利用[^{3}H]-TdR 及 EdU 两种掺入方法对细胞的增殖能力进行了检测[16]。发现对 VSMCs Geminin 基因进行干扰后可促进细胞的增殖。为进一步研究 Geminin 促进 VSMCs 增殖的机制,我们用免疫印迹的方法对 VSMCs 表型标志物进行了检测,结果显示:与 2 个对照组比较,阳性干扰组 VSMCs 收缩型标志性基因表达(α-Actin)明显下降,而合成表型 Osteopontin 有显著升高,说明对 VSMCsGeminin 基因干扰可促进细胞由分化型向去分化型转化,提示 Geminin 基因沉默后促 VSMCs 增殖的效应可能是 Geminin 基因通过介导 VSMCs 表型的转化而实现的。

综上所述,RNA 干扰介导的 Geminin 基因沉寂可显著增强 VSMCs 的增殖并有助于 VSMCs 由收缩型向合成型转化,说明 Geminin 基因在一定程度上可维持细胞的表型并抑制 VSMCs 的增殖,该作用可能为动脉粥样硬化的防治提供新的作用靶点和实验依据,其信号通路等相关机制有待于后续实验的进一步研究。

参考文献:

[1] Newby A C, Zaltsman A B. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia[J]. J Pathol, 2000, 190(3): 300-309.
[2] Werth D, Grassi G, Konjer N, *et al*. Proliferation of human primary vascular smooth muscle cells depends on serum response factor[J]. Eur J Cell Biol, 2010, 89(2/3): 216-224.
[3] 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.
[4] Shu M Q, Qin Y L, Jiang M H. RNA interference targeting ORC1 gene suppresses the proliferation of vascular smooth muscle cells in rats [J]. Exp Mol Pathol, 2008, 84(3): 206-212.
[5] McGarry T J, Kirschner M W. Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis[J]. Cell, 1998, 93(6): 1043-1053.
[6] Nakuci E, Xu M, Pujana M A, *et al*. Geminin is bound to chromatin in G2/M phase to promote proper cytokinesis[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38(7): 1207-1220.
[7] Miotto B, Struhl K. HBO1 histone acetylase activity is essential for DNA replication licensing and inhibited by Geminin[J]. Mol Cell, 2010, 37(1): 57-66.
[8] 杨宁, 柳惠图, 张伟. 多功能蛋白 Geminin 的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(9): 915-924.
[9] Haruki T, Shomori K, Hamamoto Y, *et al*. Geminin expression in small lung adenocarcinomas: implication of prognostic significance[J]. Lung Cancer, 2010, 71(3): 356-362.
[10] Montanari M, Macaluso M, Cittadini A, *et al*. Role of geminin: from normal control of DNA replication to cancer formation and progression? [J]. Cell Death Differ, 2006, 13(7): 1052-1056.
[11] Ding Q, MacAlpine D M. Preferential re-replication of Drosophila heterochromatin in the absence of geminin[J]. PLoS Genet, 2010, 6(9): e1001112.
[12] Schultz K M, Banisadr G, Lastra R O, *et al*. Geminin-deficient neural stem cells exhibit normal cell division and normal neurogenesis [J]. PLoS One, 2011, 6(3): e17736.
[13] Tachibana K E, Gonzalez M A, Guarguaglini G, *et al*. Depletion of licensing inhibitor geminin causes centrosome overduplication and mitotic defects[J]. EMBO Rep, 2005, 6(11): 1052-1057.
[14] Karamitros D, Kotantaki P, Lygerou Z, *et al*. Life without geminin [J]. Cell Cycle, 2010, 9(16): 3181-3185.
[15] 周叶萍, 舒茂琴. Geminin 在血管平滑肌细胞分化表型转化中的介导作用[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(17): 1816-1819.
[16] Yu Y, Arora A, Min W, *et al*. EdU incorporation is an alternative non-radioactive assay to [3H]thymidine uptake for *in vitro* measurement of mice T-cell proliferations[J]. J Immunol Methods, 2009, 350(1/2): 29-35.

(**收稿**:2011-10-24;**修回**:2011-11-21)
(编辑 王 红)