DOI:10.16016/j.1000-5404.201511156

核酸纳米材料携带的 mTOR 小干扰 RNA 对肺动脉平滑肌细胞自噬和增殖的影响

杜 鹃[1],尤再春[2],贺斌峰[1],王应明[1],杨俊俊[1],毛诚德[3],王关嵩[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院:全军呼吸内科研究所[1],急诊科[2];Department of Chemistry, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA[3])

[摘要] **目的** 研究自组装核酸纳米材料携带的 mTOR 小干扰 RNA(self-assembled nucleic acid nanoparticles loaded mTOR small interfering RNA, siRNA-NPs)对大鼠肺动脉平滑肌细胞(rat pulmonary arterial smooth muscle cells, RPASMCs)自噬和增殖的影响。**方法** 设计并合成 DNA 序列 mT-2A、mT-1A3 以及 5′端标记 Cy3 的 mTOR siRNA,共设计 mTOR siRNA 序列 3 条,选其中最佳序列,将上述核酸材料按照操作步骤自组装合成三角板型的核酸纳米材料。实验分 4 组:核酸纳米材料携带的 mTOR siRNA 组(siRNA-NPs 组)、单纯纳米材料组(NPs 组)、单独的 siRNA 组和空白对照组。各组材料分别转染 RPASMCs 24 h,激光共聚焦显微镜观察 RPASMCs 对核酸纳米材料携带的 mTOR siRNA 的摄取情况;应用 RT-PCR 检测各组细胞中 mTOR mRNA 的表达水平,应用 Western blot 检测 p-mTOR、LC3B 蛋白的表达水平;激光共聚焦、透射电镜检测细胞自噬水平;MTT 及 ^{3}H-TdR 检测各种材料处理后对细胞的生长的影响。**结果** 激光共聚焦显微镜下可见 siRNA-NPs 组细胞质内均匀分布大量呈颗粒状的红色荧光物质,其荧光强度均显著高于单独的 siRNA 组($P<0.05$);而且 siRNA-NPs 组处理的 mTOR mRNA 和 p-mTOR 蛋白表达显著低于单独的 siRNA 组、NPs 组及空白对照组($P<0.05$);而 LC3B 蛋白表达显著高于其他各组($P<0.05$),激光共聚焦检测显示 siRNA-NPs 组标记自噬小体的绿色荧光明显强于单独的 siRNA 组、NPs 组及空白对照组($P<0.05$),电镜结果显示 siRNA-NPs 能明显诱导细胞自噬小体形成;MTT 及 ^{3}H-TdR 检测 siRNA-NPs 和单独 siRNA 处理 RPASMCs 后明显抑制其生长,且 siRNA-NPs 组细胞生长抑制率又显著高于单独的 siRNA 组($P<0.01$)。**结论** siRNA-NPs 能被 RPASMCs 有效摄取并明显抑制靶基因的表达,进而诱导细胞自噬并且抑制其细胞增殖。

[关键词] 核酸纳米材料;mTOR;小分子干扰 RNA;肺动脉平滑肌细胞
[中图法分类号] R322.121; R329.28; R394.2 [文献标志码] A

Effect of nucleic acid nanoparticle-loaded mTOR siRNA on autophagy and proliferation in pulmonary arterial smooth muscle cells

Du Juan[1], You Zaichun[2], He Binfeng[1], Wang Yingming[1], Yang Junjun[1], Mao Chengde[3], Wang Guansong[1] ([1]Institute of Respiratory Diseases, [2]Department of Emergency, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China; [3]Department of Chemistry, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of self-assembled nucleic acid nanoparticle-loaded mammalian target of rapamycin (mTOR) small interfering RNA (siRNA) on the autophagy and proliferation in rat pulmonary arterial smooth muscle cells (RPASMCs). **Methods** DNA oligonucleotides, mT-2A, mT-1A3 and mTOR siRNA with Cy3-labeling in the 5′ terminal, were designed and synthesized. Three mTOR siRNA sequences were designed and the best one was used. According to the instructions, these oligonucleotides were assembled to triangular nucleic acid nanoparticles. Four experimental groups were setup: DNA-loaded mTOR siRNA (siRNA-NPs), DNA nanoparticles (NPs), mTOR siRNA alone and control.

[基金项目] 国家自然科学基金(81429001)
[通信作者] 王关嵩,电话:(023) 68755644,E-mail: wanggs2003@163.com
尤再春,E-mail:872084135@qq.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160201.1434.028.html(2016-02-01)

siRNA-NPs, NPs and mTOR siRNA were transfected into rat RPASMCs for 24 h, respectively. Confocal microscopy was used to observe the uptake of mTOR siRNA in PASMCs. The expression of mTOR mRNA was detected by RT-PCR, and the protein levels of p-mTOR and LC3B were detected by Western blotting. The autophagy levels of PASMCs were observed by confocal microscopy and transmission electron microscopy (TEM). The growth rate of PASMCs was detected by MTT and ^{3}H-TdR assays. **Results** Confocal microscopy showed a large number of brightly red-fluorescent granules distributed in the cytoplasm of PASMCs in siRNA-NPs group. The red fluorescence intensity was significantly higher than that of mTOR siRNA group ($P<0.05$). Green fluorescence intensity that labels autophagosome was found significantly higher in siRNA-NPs compared to other 3 groups ($P<0.05$). This was confirmed by TEM imaging that siRNA-NPs induced autophagosome formation in PASMCs. The expression of mTOR mRNA and p-mTOR protein was significantly increase and LC3B protein significantly decreased ($P<0.05$) in siRNA-NPs vs. other three groups. In MTT and ^{3}H-TdR assays, PASMCs transfected with siRNA-NPs and mTOR siRNA had reduced growth rate. The inhibition of cell growth was stronger in siRNA-NPs group than that of mTOR siRNA group ($P<0.01$). **Conclusion** Our data demonstrated that siRNA-NPs, self-assembled nucleic acid nanoparticle-loaded mTOR siRNA, could be effectively uptaken in PASMCs and target mTOR to reduce its expression, thereby inducing autophagy and inhibiting proliferation.

[**Key words**] Nucleic acid nanoparticle; mammalian target of rapamycin; Small interfering RNA; Pulmonary arterial smooth muscle cells

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81429001). Corresponding author: Wang Guansong, E-mail: wanggs2003@163.com; You Zaichun, E-mail: 872084135@qq.com

肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是一种以肺血管压力增高为主要特征的临床综合征,在各种损伤因素的长期作用下,肺血管的内膜、中膜及外膜细胞增殖,管壁增厚,并有血管周围炎症及局部血栓形成,最终导致肺血管腔狭窄,肺动脉压力增高。它的持续发展会导致一系列的心肺疾病,包括慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肺源性心脏病等,其最终结果会导致右心负荷增加,右心衰竭甚至死亡[1]。肺血管重构是肺动脉高压最重要的病理基础[2],以往的研究表明,肺动脉平滑肌细胞(pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMCs)的异常增殖和凋亡失衡在肺血管重构中发挥关键作用[3],并且近来的研究证实,自噬对哺乳动物细胞具有强大的调控机制,自噬在肺血管疾病发病机制中扮演重要作用[4],并且自噬缺乏与衰老、肿瘤、神经退行性病变、炎症、动脉粥样硬化等多种疾病相关[5]。那么通过自噬调控 PASMCs 的增殖进而逆转肺血管重构,是治疗 PAH、COPD、肺心病的一个重要方向。

哺乳动物雷帕霉素蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR),一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是细胞应对生理条件及环境压力时调控自噬及生长的关键成分。研究表明,mTOR 激活可以抑制细胞自噬,促进其增殖[6],这些都表明了以 mTOR 作为靶点是治疗上述心肺疾病的新策略。而纳米载体因其转染效率高、低毒等特点被广泛应用于基因靶向治疗中。本实验旨在通过构建能够高效转载 mTOR 小干扰 RNA 的新型核酸纳米载体,将其转入肺动脉平滑肌细胞,观察纳米载药系统的转染效率,并研究其对肺动脉平滑肌细胞自噬和增殖的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

SD 大鼠由第三军医大学实验动物中心提供,胎牛血清(美国 GIBCO 公司),高糖 DMEM(美国 Hyclone 公司),Opti-MEM(美国 Invitrogen 公司),0.25% 胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司),DAPI 染色液(中国江苏碧云天生物技术研究所),X-tremeGENE siRNA 转染试剂(瑞士罗氏公司),Cyto-ID® Green 自噬染色试剂盒(美国 Enzo Life Sciences 公司),细胞总蛋白提取试剂盒 M-PER Mammalian Protein ExtractionReagent (Thermo fishe 公司),兔抗大鼠 p-mTOR、LC3B 多克隆抗体及 β-actin 单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司),辣根酶标记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 寡核苷酸、mTOR 小干扰 RNA (siRNA)的设计与合成 DNA 序列由计算机程序 SEQUIN 设计[7],DNA 序列如下:mT-2A:5′-AGTACTTGTCAT-

GTACCAGCTGCTGTTAGAGATTGAAGGACGGAATA-3′; mT-1A3: 5′-TTCAATCTCTATCATTCCGTCCTTCAATC-TCTATCATTCCGTCCTTCAATCTCTATCATTCCGTCC-3′。在 GenBank 上检索到 mTOR mRNA 的序列,设计 mTOR siRNA 序列 1: 5′-AAGGCAGATTTGCCAAC-TATCTATAGT-3′,序列 2: 5′-GGATCCTAATACGACT-CACTATAGGCA-3′, 序列 3: 5′-CAGCAGCUGGUA-CAUGACAAGUACUUU-3′,该序列在 5′端用 Cy3 红色荧光标记。各序列均由上海生物工程有限公司合成。

1.2.2 自组装携带 mTOR 小干扰 RNA 的核酸纳米材料(siRNA-NPs) 将 mTOR siRNA、mT-2A 和 mT-1A3 的冻干干粉 2 000 r/min 4 ℃离心 5 min,分别加 DEPC 水稀释为 0.2 μg/μL,混匀;按 mTOR siRNA、mT-2A 和 mT-1A3 的摩尔比为 3∶3∶1合成纳米材料。取 mTOR siRNA 溶液加入等体积的 mT-2A 溶液,放入 90 ℃水浴中室温自然冷却至 37 ℃,随后加入相应体积的 mT-1A3 溶液,充分混匀,37 ℃水浴 30 min,室温下放置 30 min,4 ℃放置 20 min,得到携带 mTOR siRNA 的自组装核酸纳米材料。按上述步骤,不添加 mTOR siRNA 溶液则得到单纯的自组装纳米材料。

1.2.3 RPASMCs 的培养 RPASMCs 从雄性 SD 大鼠肺动脉中分离得到,鉴定及培养的具体方法参照文献[8],将 RPASMCs 培养于含青霉素 100 U/mL、链霉素 100 U/mL、10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中,置于条件为 37 ℃、5% CO_2的细胞培养箱中传代培养,选用第 4 ~ 10 代细胞用于实验。

1.2.4 实验分组 本实验分 4 组:核酸纳米材料携带的 mTOR siRNA 组(siRNA-NPs 组)、单纯纳米材料组(NPs 组)、单独的 siRNA 组和空白对照组。

1.2.5 核酸纳米材料携带的 mTOR siRNA 转染 RPASMCs 转染前 1 d 将 RPASMCs 分别接种覆有盖玻片的 24 孔细胞培养板,每孔 8×10^3个细胞。倒置显微镜下观察细胞生长情况,待培养板中细胞约 60% ~ 70% 融合时开始转染。按照罗氏公司推荐的 X-tremeGENE siRNA 转染试剂操作说明制备转染混合液。以 Opti-MEM 稀释转染试剂及各实验组。siRNA-NPs 组转染终浓度以 siRNA 计算为 50 nmol/L,NPs 组加入等量的单纯纳米载体,单独的 siRNA 组加入 50 nmol/L 的 siRNA,空白对照组只加入等量培养液。置于 37 ℃、5% CO_2细胞培养箱中继续培养 24 h。

1.2.6 激光共聚焦观察 RPASMCs 对核酸纳米材料携带的 mTOR siRNACy3 的摄取 各实验组转染 RPASMCs 24 h,用 0.01 mol/L PBS 洗涤细胞后,加入 4% 多聚甲醛 500 μL 室温固定 20 min,吸出固定液后用 PBS 洗涤 3 次,每次 3 min,小心夹取出盖玻片,滴加 DAPI 50 μL 染核,避光染色 5 min,PBS 洗涤 5 次,每次 3 min,抗荧光淬灭封片剂封片,用激光共聚焦显微镜观察细胞摄取 siRNACy3 的情况。Image-Pro Plus 10.0 软件对图像进行荧光半定量分析。

1.2.7 RT-PCR 检测 mTOR mRNA 的表达 采用 TRNZOL 提取细胞总 RNA,使用核酸蛋白检测仪测定纯度并定量,光密度 $D(260)/D(280)$ 比值均在 1.9 左右。依据 RT-PCR 试剂盒说明进行逆转录和扩增,引物由捷瑞生物工程有限公司合成。设计总反应体系为 50 μL,其中 Premix Taq 酶 25 μL,模板 RNA 3 μL,上下游引物各 2 μL,灭菌 DEPC 水 18 μL。mTOR 上游引物: 5′-CGCAGGGAAGGTGATGAGGAAT-3′,下游引物: 5′-GCTAAGGAGCAGCCAGGGAGAT-3′,扩增产物片段长度为 195 bp。β-actin 上游引物: 5′-TCAG-GTCATCACTATCGGCAAT-3′, 下游引物: 5′-AAA-GAAAGGGTGTAAAACGCA-3′,扩增产物片段长度为 432 bp。扩增条件为:94 ℃ 5 min 预变性;94 ℃变性 40 s,54 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 45 s,35 个循环;72 ℃后延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物,采用自动电泳凝胶成像分析仪进行图像扫描和分析。

1.2.8 Western blot 检测 p-mTOR、LC3B 蛋白的表达 取各实验组细胞,加细胞蛋白裂解液提取总蛋白,置于冰上裂解约 20 min 后,用细胞刮收集细胞于灭菌 EP 管中,4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min,取上清用核酸蛋白检测仪测蛋白浓度,调整蛋白浓度体积一致,加入 5 × Loadingbuffer,煮沸 10 min 变性。分离 p-mTOR、LC3B 蛋白分别采用 8%、12% 分离胶,5% 浓缩胶进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。p-mTOR 转膜条件为 300 mA 湿转 300 min,LC3B 转膜条件为 300 mA 湿转 60 min。转膜后将 PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,然后置于 5% 脱脂奶粉稀释的 p-mTOR 及 LC3B 一抗(1∶500)中 4 ℃孵育过夜,次日用 TBST 漂洗 3 次,每次 10 min,放入 5 % 脱脂奶粉稀释的辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(1∶5 000) 抗体中室温孵育 1h,TBST 漂洗 5 次,每次 5 min,ECL 化学发光法显色,以 β-actin 内参蛋白进行校正。用 QuantiScan 软件对条带进行光密度值分析,将目标条带与 β-actin 条带的光密度值之比作为其蛋白表达水平的参数。

1.2.9 激光共聚焦观察核酸纳米材料携带的 mTOR siRNA 对 RPASMCs 自噬的影响 各实验组转染 RPASMCs 24 h。按照 Cyto-ID® Green 自噬染色试剂盒操作说明制备染色混合培养液,转染结束前 30 min,用 PBS 轻轻洗涤细胞后,加入 Cyto-ID® Green 自噬染色混合培养液,置于 37 ℃、5% CO_2细胞培养箱中避光孵育 30 min。然后取出培养板,用 PBS 轻轻洗涤细胞

1 次,用 4% 多聚甲醛 500 μL 室温固定 20 min,吸出固定液后用 PBS 洗涤 3 次,每次 3 min,小心夹取出盖玻片,滴加 DAPI 50 μL 染核,避光染色 5 min,PBS 洗涤 5 次,每次 3 min,抗荧光淬灭封片剂封片,用激光共聚焦显微镜观察细胞自噬的情况。Image-Pro Plus 10.0 软件对图像进行荧光半定量分析。

1.2.10　透射电镜观察携带 mTOR siRNA 的核酸纳米材料处理 RPASMCs 后的细胞超微结构及自噬小体

将各组细胞转染 48 h 后,终止培养,加入 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞,离心,用 PBS 洗涤细胞 2 次,之后加入 2.5% 戊二醛固定,4 ℃过夜,送检。

1.2.11　MTT 法测定 RPASMCs 的生长抑制率　将 RPASMCs 以每孔 1×10^3 个细胞接种于 96 孔培养板中,终体积 200 μL,每组设 5 个复孔,置于孵箱(37 ℃、5% CO_2)中培养 24 h 后进行细胞转染。各组转染 48 h 后每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL,继续孵育 4 h,然后仔细吸弃培养孔内上清液,每孔加入 150 μL DMSO,振荡溶解 10 min,酶标仪 490 nm 波长测定各孔光密度[D(490)]值,以无细胞,但添加等量培养液并相同处理的空白对照孔调零。实验重复 3 次。细胞生长抑制率 = [1 − 实验组 D(490)值/空白对照组 D(490)值] × 100%。

1.2.12　^{3}H-TdR 掺入法检测 RPASMCs 的增殖

将 RPASMCs 胰酶消化后用含 10% FBS 的 DMEM 培养基制备细胞悬液,以 1×10^5 个/孔的密度将细胞接种于 48 孔培养板中,置于孵箱(37 ℃、5% CO_2)中培养,直到细胞长至 80% 的融合度时,换用 1% FBS 的 DMEM 培养基培养 16 h 后进行转染,各组转染 48 h 结束培养,在结束培养前 8 h,每孔加入 10 μCi ^{3}H-TdR,终止培养后,吸弃上层清液,用预冷的 PBS 洗涤 2 次,加入 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞,收集细胞并采用液体闪烁计数器测定其脉冲数。实验重复 3 次。

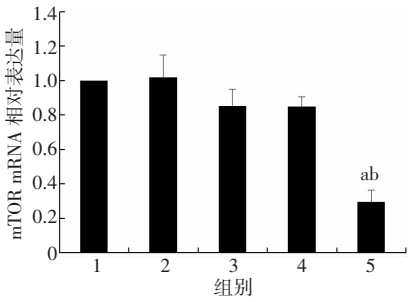
1.3　统计学处理

使用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析,各实验至少重复 3 次,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间均数比较行单因素方差分析,两组均数间比较用配对 t 检验。

2　结果

2.1　mTORsiRNA 对 PASMCs 靶蛋白 mTOR mRNA 的抑制情况

结果显示序列 3 siRNA 处理组中 mTOR mRNA 表达显著低于 NC siRNA 组和空白对照组($P<0.05$),序列 1 siRNA 处理组和序列 2 siRNA 处理组与空白对照组和 NC siRNA 组比较 mTOR mRNA 表达有所下降,但差异无统计学意义。空白对照组和 NC siRNA 组 mTOR mRNA 的表达无统计学差异(图 1)。

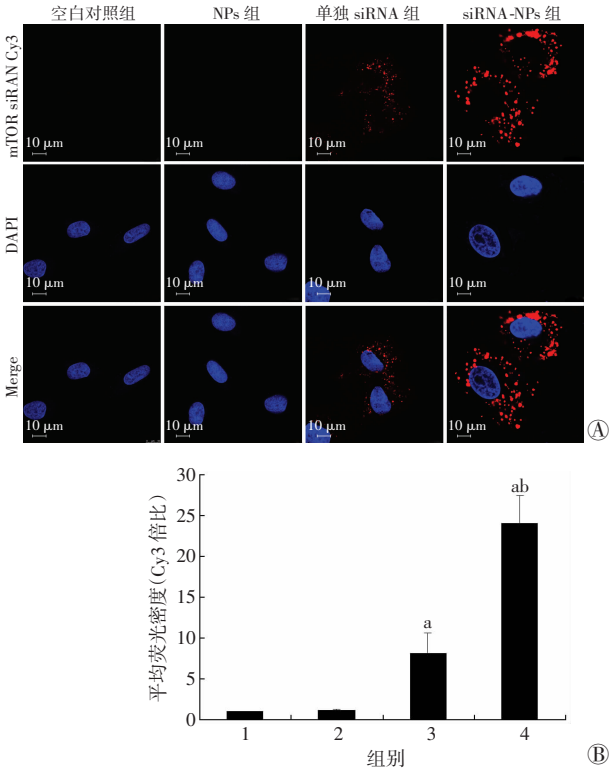


1:空白对照组;2:NCsiRNA 组;3:序列 1 转染组;4:序列 2 转染组;5:序列 3 转染组;a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与单独 NC siRNA 组比较

图 1　RT-PCR 检测各组 RPASMCs 靶蛋白 mTOR mRNA 的表达

2.2　PASMCs 对 siRNA-NPs-Cy3 的摄取情况

图中细胞质中呈颗粒状均匀分布的红色荧光代表被 PASMCs 摄入胞内的 siRNA-NPs-Cy3,在转染 12 h 后,siRNA-NPs 组的红色荧光显著强于单独的 siRNA 组,而空白对照组、NPs 组均未见红色荧光颗粒,提示 siRNA-NPs 组中 Cy3 红色荧光标记的 mTOR siRNA 被核酸纳米材料高效的转运到 RPASMCs 内(图 2A)。荧光密度半定量分析结果与激光共聚焦图一致(图 2B)。

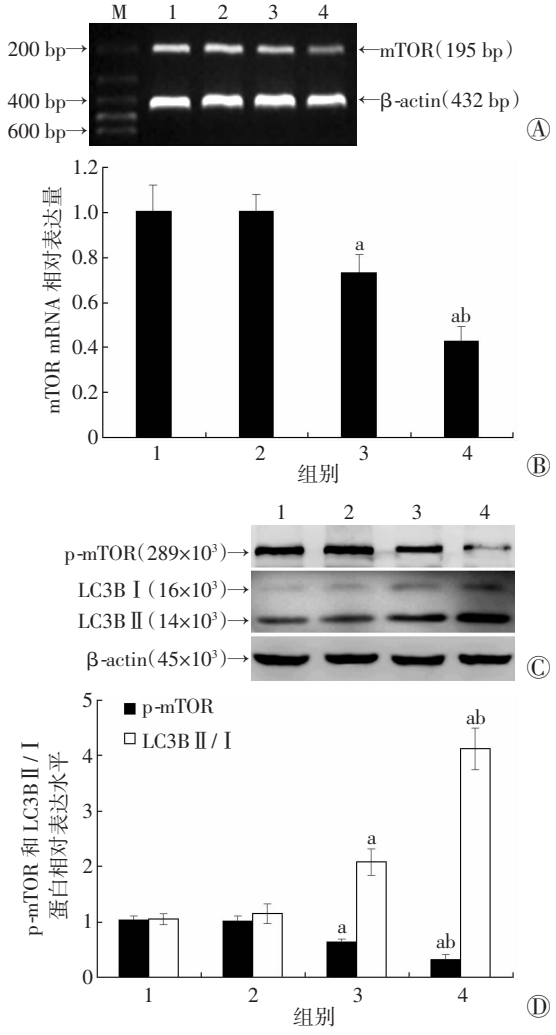


1:空白对照组;2:NPs 组;3:单独 siRNA 组;4:siRNA-NPs 组
A:各组细胞摄取 mTOR siRNACy3 的激光共聚焦图像;B:荧光密度半定量分析结果;a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与单独 siRNA 组比较

图 2　激光共聚焦观察 RPASMCs 内 siRNA-NPs 的摄取情况

2.3 siRNA-NPs 对 RPASMCs 的 mTOR、p-mTOR、LC3B 的表达影响

结果显示 siRNA-NPs 组中 mTOR mRNA 及 p-mTOR 蛋白的表达显著低于单独的 siRNA 组、NPs 组和空白对照组($P<0.05$),空白对照组和 NPs 组的两者表达无统计学差异(图 3A、B)。与此同时,siRNA-NPs 组中 LC3B Ⅱ/Ⅰ蛋白的表达显著高于单独的 siRNA 组、NPs 组和空白对照组($P<0.05$),空白对照组和 NPs 组 LC3B Ⅱ/Ⅰ蛋白的表达无统计学差异(图 3C、D)。

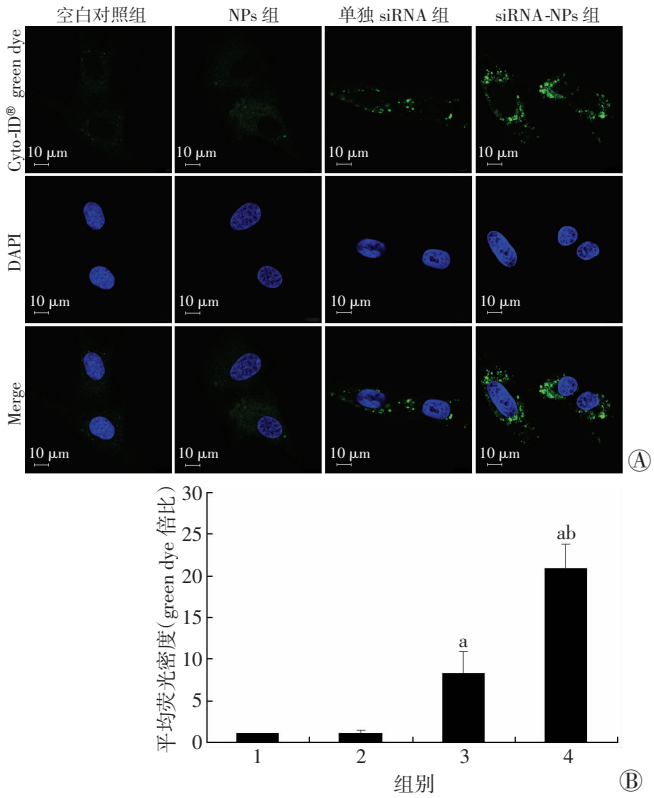


A:mTOR mRNA 的 RT-PCR 检测结果;B:RT-PCR 半定量分析结果;C: p-mTOR、LC3B 蛋白 Western blot 检测结果;D:Western blot 半定量分析结果;M:DNA 标准(100~600 bp);1:空白对照组;2:NPs 组;3:单独 siRNA 组;4:siRNA-NPs 组;a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与单独 siRNA 组比较

图 3 RT-PCR 及 Western blot 检测各组 RPASMCs 的 mTOR、p-mTOR、LC3B 的表达

2.4 siRNA-NPs 对 RPASMCs 自噬的影响

细胞质中呈颗粒状均匀分布的绿色荧光是标记自噬小体的蛋白,其荧光强弱代表了自噬水平的高低。siRNA-NPs 组细胞质中可见大量标记自噬小体的绿色荧光,且荧光强度显著高于单独的 siRNA 组、空白对照组和 NPs 组($P<0.05$),此外空白对照组、NPs 组可见低水平的绿色荧光,提示 RPASMCs 在正常生理条件下自噬水平较低,而核酸纳米材料携带的 mTOR siRNA 则明显诱导细胞自噬(图 4A)。荧光密度半定量分析结果与激光共聚焦图一致(图 4B)。



1:空白对照组;2:NPs 组;3:单独 siRNA 组;4:siRNA-NPs 组 A:各组 Cyto-ID® Green dye 标记的细胞自噬的激光共聚焦图像;B:荧光密度半定量分析结果;a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与单独 siRNA 组比较

图 4 激光共聚焦观察各组对 RPASMCs 自噬的影响

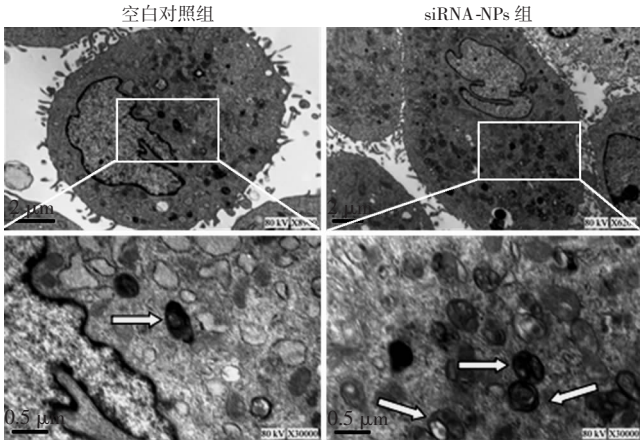
2.5 RPASMCs 各组细胞超微结构及自噬小体的变化

电镜图显示,空白对照组的细胞质中仅见见少量双层膜环绕的空泡状结构,即典型的自噬体或自噬溶酶体结构,而 siRNA-NPs 处理后 RPASMCs 中的自噬小体明显多于空白对照组($P<0.05$,图 5)。提示核酸纳米材料携带的 mTOR siRNA 能明显诱导细胞自噬小体形成(图 5)。

2.6 siRNA-NPs 对 RPASMCs 的活性及增殖的影响

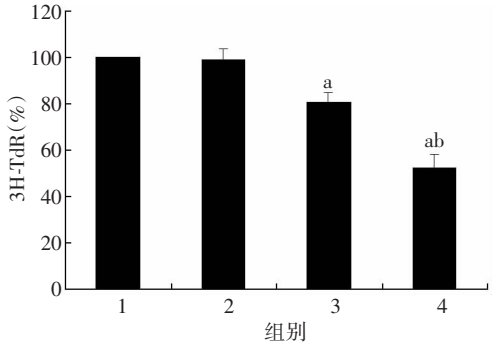
MTT 结果显示空白对照组的生长抑制率为(1.10±0.85)%,NPs 组抑制率为(2.50±1.90)%,单独 siRNA 组抑制率为(19.60±1.98)%,siRNA-NPs 组

抑制率为(50.90±1.67)%。siRNA-NPs 组和单独 siRNA 组细胞生长抑制率显著高于其他各组($P<0.01$),siRNA-NPs 组细胞生长抑制率又显著高于单独 siRNA 组($P<0.01$),NPs 组和空白对照组细胞生长抑制率无统计学差异。同时,^{3}H-TdR 结果显示与空白对照组比较,siRNA-NPs 组和单独的 siRNA 组的^{3}H-TdR 摄入量明显下降,分别降至 80%、52%($P<0.01$),说明 mTOR siRNA 处理 RPASMCs 后明显抑制其增殖。且 siRNA-NPs 组摄入量又显著低于单独的 siRNA 组($P<0.01$),NPs 组和空白对照组摄入量无统计学差异(图 6)。



下排图为线框区局部放大观察,白色箭头标示典型的自噬小体结构

图 5 透射电镜观察 mTOR siRNA 对 RPASMCs 超微结构及自噬小体的影响



1:空白对照组;2:NPs 组;3:单独 siRNA 组;4:siRNA-NPs 组;a:$P<0.01$,与空白对照组比较;b:$P<0.01$,与单独 siRNA 组比较

图 6 ^{3}H-TdR 检测各组对 RPASMCs 生长抑制的情况

3 讨论

小干扰 RNA 可高效特异地抑制靶基因,实现靶基因的表达下调,在疾病的基因治疗中显示出巨大的应用前景[9]。其发挥作用的关键在于小干扰 RNA 本身的沉默效应以及能否高效转染细胞,但 RNA 分子对核酸酶高度不稳定,半衰期短;聚阴离子性质致其不易被摄取;同时其电荷密度导致其充分水化,不易与一些蛋白相互作用而被迅速清除,这些性质导致小干扰 RNA 稳定性差,不易被细胞摄取[10]。因此,我们需要一个稳定、高效的基因装载体系来解决这些问题。而随着纳米技术的发展,通过 DNA 编程自组装纳米结构作为运载体来实现基因的高效运输。DNA 最大的优势在于相对于 RNA 更稳定,与其他的药物传递材料相比,核酸自组装纳米制剂一般具有以下优点[11-12]:生物相容性高;合成简单,操作性强;能够缓控释放;毒性低;易被标记等。

本研究运用一种新型的自组装核酸纳米材料携带 mTOR 小干扰 RNA 转染 RPASMCs,显著下调 mTOR mRNA 及蛋白的表达,增强细胞自噬水平,进而抑制 RPASMCs 的增殖。表明自组装核酸纳米材料携带的 mTOR 小干扰 RNA,两者形成稳定的运载体系,小干扰 RNA 在核酸纳米载体的保护下,不易聚集且不易被血浆中的各种酶降解;且核酸纳米结构分子量小,易被细胞摄入,能够高效的转染进入 RPASMCs,并在其胞浆内稳定释放发挥生物学效应。相对于单独小干扰 RNA,由核酸纳米载体运载的小干扰 RNA 能够更多地进入细胞内,有效的下调靶蛋白 mTOR 表达,诱导细胞自噬,引起自噬性细胞死亡,抑制 RPASMCs 的增殖。本实验证实了自噬调控药物作为治疗 PAH 的重要作用,并且提供了一个安全、高效、稳定的载药体系,为肺高压等心肺疾病的治疗提供实验基础。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋 mTOR 信号通路是调节细胞自噬、增殖、凋亡的中心环节[13],研究发现在低氧肺动脉高压小鼠模型肺组织及低氧下人 PASMCs 中 mTORC1 较正常显著增高[14];mTORC2 通过 AMPK 调控肺血管平滑肌细胞的增殖和存活,下调 mTORC2 能诱导平滑肌细胞凋亡,抑制其增殖[15]。说明 mTOR 治疗 PAH 的重要靶点,抑制其表达或活性,能明显抑制平滑肌细胞增殖,这些实验均证实我们结果的有效性和可靠性。

综上所述,本课题研究的核酸自组装纳米材料具有天然、非免疫原性、低毒等优越性,其携带的 mTOR 小干扰 RNA 能够被 RPASMCs 高效摄取,显著下调靶蛋白 mTOR 的表达,从而诱导 RPASMCs 的自噬,抑制细胞的增殖。这种新型材料结合靶蛋白 mTOR 小干扰 RNA 载药系统有望成为治疗肺动脉高压肺血管重构的新靶点。

参考文献:

[1] Huisman A M, Vreugdenhil S A, van-Paassen H C. Treatment of pulmonary arterial hypertension[J]. N Engl J Med, 2005, 352(3): 308 – 309. DOI: 10.1056/NEJM200501203520322

[2] Ryan J J, Marsboom G, Archer S L. Rodent models of group 1 pulmonary hypertension[J]. Handb Exp Pharmacol, 2013, 218: 105 – 149. DOI: 10.1007/978-3-642-38664-0_5

[3] Baliga R S, MacAllister R J, Hobbs A J. New perspectives for the treatment of pulmonary hypertension[J]. Br J Pharmacol, 2011, 163(1): 125 – 140. DOI: 10.1111/j.1476 – 5381.2010.01164.x

[4] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues[J]. Cell, 2011, 147(4): 728 – 741. DOI: 10.1016/j.cell.2011.10.026

[5] Yang Z, Klionsky D J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation[J]. Curr Opin Cell Biol, 2010, 22(2): 124 – 131. DOI: 10.1016/j.ceb.2009.11.014

[6] Jung C H, Ro S H, Cao J, *et al*. mTOR regulation of autophagy[J]. FEBS Lett, 2010, 584(7): 1287 – 1295. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.01.017

[7] Seeman N C, Mao C, Yan H. Guest editorial: nucleic acid nanotechnology[J]. Acc Chem Res, 2014, 47(6): 1643 – 1644. DOI: 10.1021/ar500159g

[8] Yin H, Li Q, Qian G, *et al*. Rab1 GTPase regulates phenotypic modulation of pulmonary artery smooth muscle cells by mediating the transport of angiotensin II type 1 receptor under hypoxia[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2011, 43(3): 401 – 408. DOI: 10.1016/j.biocel.2010.11.010

[9] Lares M R, Rossi J J, Ouellet D L. RNAi and small interfering RNAs in human disease therapeutic applications[J]. Trends Biotechnol, 2010, 28(11): 570 – 579. DOI: 10.1016/j.tibtech.2010.07.009

[10] Leuschner F, Dutta P, Gorbatov R, *et al*. Therapeutic siRNA silencing in inflammatory monocytes in mice[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(11): 1005 – 1010. DOI: 10.1038/nbt.1989

[11] Li J, Fan C, Pei H, *et al*. Smart drug delivery nanocarriers with self-assembled DNA nanostructures[J]. Adv Mater, 2013, 25(32): 4386 – 4396. DOI: 10.1002/adma.201300875

[12] Chou L Y, Zagorovsky K, Chan W C. DNA assembly of nanoparticle superstructures for controlled biological delivery and elimination[J]. Nat Nanotechnol, 2014, 9(2): 148 – 155. DOI: 10.1038/nnano.2013.309

[13] Guertin D A, Sabatini D M. Defining the role of mTOR in cancer[J]. Cancer Cell, 2007, 12(1): 9 – 22. DOI: 10.1016/j.ccr.2007.05.008

[14] Wang W, Liu J, Ma A, *et al*. mTORC1 is involved in hypoxia-induced pulmonary hypertension through the activation of Notch3[J]. J Cell Physiol, 2014, 229(12): 2117 – 2125. DOI: 10.1002/jcp.24670

[15] Goncharov D A, Kudryashova T V, Ziai H, *et al*. Mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) coordinates pulmonary artery smooth muscle cell metabolism, proliferation, and survival in pulmonary arterial hypertension[J]. Circulation, 2014, 129(8): 864 – 874. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.004581

(收稿:2015-11-23;修回:2016-01-06)

(编辑 邓强庭)