DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.05.006
第25卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 5
2003年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2003

文章编号:1000-5404(2003)05-0385-03

论著

核酶对大鼠肺动脉平滑肌 NHE-1 活性及细胞增殖的作用

姚 伟,陆俊羽,钱桂生,杨晓静 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要:目的 探讨锤头状核酶对大鼠肺动脉平滑肌细胞 Na^+/H^+ 交换器-1 表达和活性、pHi 的影响,及其与细胞增殖的关系。方法 构建含锤头状核酶序列的 pLXSN 反转录病毒重组载体,将其转染体外培养的大鼠肺动脉平滑肌细胞,G418 筛选后获取含有重组载体的细胞克隆。检测细胞 NHE-1 mRNA 表达、pHi、pHi 恢复速率、^{22}Na 摄取量和 ^3H-TdR 掺入量变化。结果 与转染 pLXSN 空载体的细胞和正常对照组细胞比较,转染了重组载体的肺动脉平滑肌细胞中 NHE-1 mRNA 表达、^{22}Na 摄取量减少,同时伴有 pHi 降低、pHi 恢复速率下降和 ^3H-TdR 掺入量减少。结论 所设计的锤头状核酶可对 NHE-1 mRNA 进行特异性切割,减少其表达,使其活性下降,从而诱导细胞酸化,抑制肺动脉平滑肌细胞增殖。

关键词:锤头状核酶;Na^+/H^+ 交换器;肺动脉平滑肌细胞;增殖
中图法分类号:R329.28;R337;R342.2 文献标识码:A

Effects of hammerhead ribozyme on NHE-1 activity and proliferation in pulmonary artery smooth muscle cells of rats *in vitro*

YAO Wei, LU Jun-yu, QIAN Gui-sheng, YANG Xiao-jing (Institute of Respiratory Disease of PLA, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of hammerhead ribozyme on the expression and activity of NHE-1 and pHi in pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) of rats and its role in PASMCs proliferation *in vitro*. **Methods** According to the secondary structure of NHE-1 mRNA in rats, NHE-1 specific hammerhead ribozyme was designed with the assistance of computer. The recombinant vector of retroviral plasmid pLXSN and hammerhead ribozyme, PRZ, was transfected into the cultured PASMCs. G418 resistant cell clones were screened with 100 μg/ml G418. Then, the expression of NHE-1 mRNA was detected by RT-PCR, intracellular pH (pHi) value and recovery rate of pHi after intracellular acid loading were measured by fluorescent probe-BCECF. ^{22}Na uptake and ^3H-TdR incorporation were determined, respectively. **Results** Compared with the cells transfected with pLXSN and non-transfected cells, NHE-1 mRNA, pHi value, pHi recovery rate, ^{22}Na uptake and ^3H-TdR incorporation decreased significantly in cells transfected with recombinant vector PRZ. No significance was found between the pLXSN transfected group and non-transfected group. **Conclusion** Hammerhead ribozyme can cleave the target NHE-1 mRNA specifically, reduce the expression of NHE-1 mRNA, induce intracellular acidosis and consequently suppress the proliferation of PASMCs.

Key words: hammerhead ribozyme; sodium hydrogen exchanger; pulmonary artery smooth muscle cell; proliferation

肺血管重构是肺动脉高压的主要特征,主要表现为肺动脉平滑肌细胞(Pulmonary artery smooth muscle cells, PASMCs)过度增殖。其机制尚不完全明确,可能与生长因子和血管活性物质等激活细胞 Na^+/H^+ 交换有关。Na^+/H^+ 交换器-1(Sodium hydrogen exchanger, NHE)激活后,使肺动脉平滑肌细胞在增殖早期即出现细胞内 pH(pHi)明显增高,对其增殖具有容许性作用[1,2]。本研究通过将 NHE-1 特异性锤头状核酶(Hammerhead ribozyme)体外转染肺动脉平滑肌细胞,并检测细胞中 NHE-1 表达、Na^+/H^+ 交换活性、pHi 的变化,及其与细胞增殖变化的关系,探讨 NHE-1 在肺动脉平滑肌细胞增殖中的作用。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870352)
作者简介:姚 伟(1973-),男,河南省长垣市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事低氧性肺动脉高压发病机制方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68754230
收稿日期:2002-04-24;修回日期:2002-06-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

pLXSN 反转录病毒质粒，FuGENE6 转染试剂、Tripure RNA 提取试剂(Roche 公司)，BCECF/AM、Nigericin(Sigma 公司)[22]NaCl(英国 Amersham Pharmacia 公司，462.5 TBq/ml，比活度> 3.7 GBq/mg)，^{3}H-TdR(中国科学院上海原子能研究所，37 TBq/ml，比活度 1 110 GBq/mg)，PTC-200 DNA 扩增仪(美国 MJ 公司)，LS-50B 荧光分光光度计(美国 Perkin Elmer 公司)，SX-100 凝胶成像分析系统(上海四星公司)。

1.2 锤头状核酶基因的合成和载体构建

根据 Orlowski 等克隆的大鼠 NHE-1 mRNA 序列，RNA draw (1.1 b2 版)软件对其二级结构进行计算机模拟分析，选择 NHE-1 mRNA 2234 位点 GUC 为切割位点。核酶 DNA 合成序列为：模板链 DNA：5′-GATCC TCA TCA CC GTT TCG TCC TCA CGG ACT CAT CAG ATC TTC TT G-3′编码链 DNA：3′-G AGT AGT GG CAA AGC AGG AGT GCC TGA GTA GTC TAG AAG AA CTTAA-5′。下单线部分为特异性结合序列，下波浪线部分为核酶核心序列(根据 Symons 模型)，两端分别为 *Bam*HⅠ 和 *Eco*RⅠ 的粘性末端。上海生工生物工程公司合成。将上述两个片段经 95 ℃变性、退火后，形成双链。pLXSN 经 *Bam*HⅠ 和 *Eco*RⅠ 双酶切并纯化，并与核酶双链序列经 T4 DNA 连接酶 16 ℃连接 12 h，产物采用电穿孔法转化入大肠杆菌菌株 XL-1Blue 中扩增，质粒提取后送上海生工生物工程公司进行测序鉴定。所构建的携带有核酶基因的质粒命名为：PRZ。

1.3 质粒的细胞转染、筛选及鉴定

采用组织块种植法培养 PASMCs，免疫细胞化学 S-P 法检测血管平滑肌细胞 α-actin 表达。选取第 2～4 代的细胞用于实验。参照 FuGENE6 说明书进行转染。将重组载体 PRZ 和未携带核酶序列的 pLXSN 空载体(PX)转染入 PASMCs，正常 PASMCs 为对照。转染载体的两组细胞均获得 G418 抗性细胞克隆，G418 浓度为 100 μg/ml。

1.4 RT-PCR 法检测 NHE-1 mRNA 表达

Tripure 法提取细胞总 RNA，以β-actin 为内参照进行 RT-PCR。NHE-1 引物序列如下：上游引物 5′-TTCCCCATGTGT-GATCTGTTCC-3′，下游引物 5′-TCTCCATCTTGTGGTAGAAGC-3′，PCR 扩增产物为 325 bp；以β-actin 为内参照，引物序列如下：5′端引物 5′-CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC-3′，3′端引物 5′-AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC-3′，PCR 扩增产物为 587 bp。反转录参照试剂说明。PCR 变性、退火和延伸条件为：94 ℃ 40 s；62 ℃ 50 s；72 ℃ 90 s，共 30 个循环；末次延伸时间为 10 min。取 10 μl 反应产物在 2%琼脂糖凝胶电泳，凝胶分析系统进行摄像、条带光密度值分析，以 NHE-1 和β-actin 电泳条带吸光度之比 $A_{NHE/actin}$ 作数据分析，以反映 NHE-1 mRNA 的表达程度。

1.5 pHi 测定

采用本实验室建立的荧光探针 BCECF-AM 法检测[3]。激发波长为：495 nm，440 nm；发射波长为：530 nm。激发波和发射波狭缝为：10 nm。每张玻片测定时间为：30 s。Nigericin 法作 pHi 标准曲线。溶液中 BCECF-AM 终浓度为 2 μg/ml，Nigericin 终浓度为 5 μg/ml。

1.6 诱导细胞内酸化后 pHi 恢复速率测定

参照 Boron、Silverman 等[4,5] 方法，并加以改进。PASMCs 按 1×10^5/ml 接种于 0.5 cm×0.5 cm 的盖玻片上，待细胞基本铺满玻片(80%～90%)后进行测定。采用“铵冲击”法诱导细胞酸化，从 pHi 最低点算起，每 15 s 测算 pHi 1 次，根据恢复速率 V (mmol·L^{-1}·min^{-1}) = Bi× △pHi×4，求出最大恢复速率 V_{max}。其中 Bi 为细胞内缓冲能力，采用递减梯度 NH_4Cl 法。

1.7 ^{22}Na 摄取试验

采用“铵冲击”法诱导细胞酸化。96 孔培养板细胞中加入 50 mmol/L 氯化铵溶液作用 10 min 后，吸出溶液，加入氯化胆碱溶液，3～5 min 后吸出，每孔中加入^{22}NaCl 37 GBq，5 min 后吸出，冰冷的 0.1 mol/L 氯化镁溶液漂洗 3 次，细胞经胰蛋白酶消化后行γ计数。

1.8 ^{3}H-TdR 掺入试验

96 孔培养板的相应组细胞培养基内加入^{3}H-TdR 37 GBq/孔，16 h 后终止，多头细胞收集器采集细胞于玻璃纤维素膜上，生理盐水冲洗 3 次，10%三氯乙酸固定后行β液体闪烁计数。

1.9 统计学处理

所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用 Microsoft Excel 97 软件进行 F 检验和 t 检验。

2 结果

2.1 重组载体的测序鉴定

下划线部分为插入的核酶序列

GCCCTCACTCCTTCTCTAGGCGCCGGAATTCAAGAAGATCTGATGAG TCCGTGAGGACGAAACGGTGATGAGGATCCGGCTGTGGAATGTGTG TCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGT ATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGT CCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAA TTAGTCAGCAACATAGTTCCCGCCCC

2.2 NHE-1 mRNA 表达的变化

正常对照组和空载体组(PX)PASMCs 中 NHE-1 mRNA 表达明显高于 PRZ 组，正常对照组和 PX 组间无显著差异，见表 1。

2.3 pHi 测定结果

PRZ 组 PASMCs pHi 明显低于正常对照组和 PX。正常对照组和 PX 组间无显著差异，见表 1。

表 1 锤头状核酶对 PASMCs 的 pHi 及 NHE-1 mRNA 表达的影响

Tab 1 Effects of hammerhead ribozyme on pHi and NHE-1 mRNA expression in PASMCs ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

	Control	PX	PRZ
pHi	7.208±0.017	7.187±0.017	6.982±0.056 *#
$A_{NHE/actin}$	0.888±0.029	0.868±0.031	0.481±0.037 *##

*：$P<0.01$ *vs* Control；#：$P<0.05$，##：$P<0.001$ *vs* PX

2.4 pHi 最大恢复速率测定结果

PRZ 组 PASMCs V_{max} 明显低于正常对照组和 PX，正常对照组和 PX 组间无显著差异，见表 2。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2　锤头状核酶对 PASMCs NHE-1 活性及增殖的影响

Tab 2　Effects of hammerhead ribozyme on NHE-1 activity and PASMCs proliferation ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

	Control	PX	PRZ
V_{max} (mmol·L^{-1}·min^{-1})	74.33±3.14	76.50±4.67	42.33±4.12 *#
^{22}Na uptake (cpm)	1929±116	2074±413	675±124 *#
^{3}H-TdR incorporation (cpm)	7970±479	7674±621	3843±287 ##

*: $P<0.001$ *vs* Control;　#: $P<0.05$　##: $P<0.001$ *vs* PX

2.5　^{22}Na 摄取

PRZ 组 PASMCs ^{22}Na 摄取量显著低于正常对照组和 PX。正常对照组和 PX 组间无显著差异, 见表 2。

2.6　^{3}H-TdR 掺入试验

PRZ 组 PASMCs ^{3}H-TdR 掺入量明显低于正常对照组和 PX。正常对照组和 PX 组间无显著差异, 见表 2。

3　讨论

NHE 是一种离子交换蛋白, 共有 6 种亚型, 其中 NHE-1 几乎在所有真核细胞膜中均有分布, 1∶1 地介导细胞内氢离子与细胞外钠离子交换[6]。在 PASMCs 亦存在 NHE-1, 我们采用 RT-PCR 方法检测发现正常大鼠 PASMCs 中即有 NHE-1 mRNA 表达, 常压低氧 3 周和 8 周大鼠 PASMCs 中 NHE-1 mRNA 表达明显增加, 同时伴有 pHi 增高[2]。Silverman 等[5] 发现自发性高血压大鼠(SHR)与正常 Wistar-Kyoto 大鼠相比, 肺动脉平滑肌条在诱导酸化后, 其 pHi 恢复的 V_{max}、pK0.5、Hill 系数均无明显差异; 而其腹主动脉平滑肌条的 V_{max}、pK0.5 和 Hill 系数则明显增高。这表明体循环和肺循环血管平滑肌细胞具有截然不同的 Na^+/H^+ 交换特性。由于在生理和病理条件下 PASMCs 接触较大范围的 CO_2 压力水平, 所以 NHE-1 的 pHi 调节作用更有着极其重要的意义。

实验表明, 血清、PDGF、FGF 和 EGF 等在使血管平滑肌细胞增殖的同时, 伴有 pHi 增高和 NHE-1 活化; 生长因子激活的 NHE-1 对 pHi 的敏感性发生改变, 在较高的 pHi 值时也能够被激活, 而且生长因子可以导致细胞 NHE-1 数量增加, 从而调节 NHE-1 的活性[7]。NHE-1 激活导致细胞内碱化和 Na^+ 内流增加是血管平滑肌细胞增殖所必需的。其中 Na^+ 内流增加仅在短时间内对细胞生长有影响, 随着时间延长, 细胞可代偿性地将细胞内聚集的 Na^+ 排出, 其对细胞生长的作用亦明显下降[8]。NHE-1 激活对细胞生长的影响主要是 pHi 增高的结果, 其活化所致细胞内碱化在 PASMCs 增殖中可能起容许性作用。

核酶是指具有催化作用的核糖核酸。其中锤头状核酶具有分子量小、结构较固定和容易操作等特点, 被认为是用于基因治疗最具潜力的核酶, 已被广泛应用于体外和体内对多种目的 RNA 的切割。核酶等反义技术最大的优点是能够调控靶基因的表达水平, 可被应用于特定的细胞类型或细胞的不同发育阶段, 这是采用同源重组的基因敲除技术及药物治疗等所不具备的。另外还可以通过采用不同强度的启动子来控制核酶等的基因表达水平, 从而对靶基因表达水平进行调控。

本实验参照 Symons 模型[9], 选择位于 NHE-1 mRNA 单环状结构的 5′端编码区 2 234 位 GUC 为切割位点, 其两侧的 8 个核苷酸为靶 RNA 特异性结合位点, 通过体外合成锤头状核酶序列, 并将其构建于 pLXSN 反转录病毒载体上, 转染体外培养的 PASMCs, 结果发现: 转染锤头状核酶的细胞中 NHE-1 mRNA 表达明显下降, 同时伴有 pHi 降低、pHi 恢复速率下降、^{22}Na 摄取减少, ^{3}H-TdR 的掺入量明显减少, 提示 Na^+/H^+ 交换活性和细胞增殖受到明显抑制。从而明确了 NHE-1 在肺动脉平滑肌细胞增殖中的作用, 并为进一步应用核酶等反义技术进行低氧性肺动脉高压的基因治疗提供了一定的实验基础。

参考文献:

[1] Counillon L, Pouyssegur J. Structure function studies and molecular regulation of the growth factor activatable sodium-hydrogen exchanger (NHE-1) [J]. Cardiovasc Res, 1995, 29(2): 147－154.

[2] 姚　伟, 杨晓静, 钱桂生. Na^+/H^+ 交换器在缺氧性肺动脉高压中的作用[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(4): 238－240.

[3] 姚　伟, 钱桂生, 杨晓静, 等. 小牛血清和血小板源性生长因子对肺动脉平滑肌细胞 Na^+/H^+ 交换器活性和细胞增殖的影响[J]. 中国危重病急救医学杂志, 2001, 13(12): 728－731.

[4] Boron W F, Weer P D. Intracellular pH transients in squid giant axons caused by CO_2, NH_3 and metabolic inhibitors[J]. J Gen Physiol, 1976, 67(1): 91－112.

[5] Silverman E S, Thompson B T, Quinn D A, *et al*. Na^+/H^+ exchange in pulmonary artery smooth muscle from spontaneously hypertension and Wistar-Kyoto rats[J]. Am J Physiol, 1995, 269(5 Pt 1): 673－680.

[6] Quinn D A, Honeyman T W, Joseph P M, *et al*. Contribution of Na^+/H^+ exchange to pH regulation in pulmonary artery smooth muscle cells[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1991, 5(6): 586－591.

[7] Rao G N, Sardet C, Pouyssegur J, *et al*. Differential regulation of Na^+/H^+ antiporter gene expression in vascular smooth muscle cells by hypertrophic and hyperplastic stimuli[J]. J Biol Chem, 1990, 265(32): 19393－19396.

[8] Kuriyama S, Kaguchi Y, Nakamura K, *et al*. A greater stimulation of Na-H antiporter in cultured vascular smooth muscle cells by serum from spontaneously hypertensive rats[J]. Am J Hypertens, 1991, 4(9): 780－782.

[9] Symons R H. Small catalytic RNAs[J]. Annu Rev Biochem, 1992, 61: 641－671.

（编辑　薛国文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net