DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.11.014
第23卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 11
1282 2001年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)11-1282-03

NHE-1核酶基因转染对大鼠肺动脉平滑肌细胞凋亡的影响

陆俊羽,姚 伟,钱桂生,吴国明 (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NHE-1核酶基因转染对大鼠肺动脉平滑肌细胞(PASMC)凋亡的影响。方法 构建NHE-1核酶基因逆转录病毒载体,转染体外培养的大鼠PASMC,应用半定量RT-PCR法(sqRT-PCR)测定细胞内NHE-1 mRNA的表达、BCECF法测定pHi、流式细胞仪测细胞周期、电镜及原位细胞凋亡检测(TUNEL法)观察细胞凋亡情况。结果 转染NHE-1核酶基因的细胞,NHE-1 mRNA表达量及pHi较空载体转染细胞及未转染细胞显著降低,细胞凋亡率显著增加,电镜示细胞凋亡,凋亡小体形成。结论 NHE-1核酶基因转染可通过NHE-1抑制、细胞内酸化,显著诱导肺动脉平滑肌细胞凋亡。

关键词:肺动脉平滑肌细胞;NHE-1;细胞凋亡;核酶
中图法分类号:R322.121;R329.28;R394.2 文献标识码:A

Effects of transfected NHE-1 ribozyme gene on apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells of rats *in vitro*

LU Jun-yu, YAO Wei, QIAN Gui-sheng, WU Guo-ming (Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the effects of transfected NHE-1 ribozyme gene on apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells(PASMC) *in vitro*. Methods NHE-1 ribozyme gene was designed, synthesized and cloned into plasmid PLXSN, the recombined plasmid was tansfered into cultured PASMC. Expression of NHE-1 mRNA was detected by sqRT-PCR. Intracellular pH(pHi) was measured by fluorescence dye BCECF-AM. Cell cycle was measured by flow cytometric DNA analysis. Cell apoptosis was observed with electron microscopy and terminal deoxynucleotidyl transferase-medited dUTP nick end labeling(TUNEL) respectively. Results The NHE-1 mRNA expression and pHi of cells transfected with NHE-1 ribozyme gene decreased significantly than those of cells transfected with PLXSN and nontransfected control. Meanwhile, the apoptosis rate of cells transfected with NHE-1 ribozyme gene increased significantly. Electron microscopy showed apoptosis of cells transfected with NHE-1 ribozyme gene. Conclusion Transfected NHE-1 ribozyme gene can induce apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cell by inhibiting NHE-1 and intracellular acidification.

Key words: pulmonary artery smooth muscle cells(PASMC); NHE-1; apoptosis; ribozyme

肺动脉平滑肌细胞(Pulmonary artery smooth muscle cells, PASMC)由收缩型向合成型转化,并从中膜迁移至内膜大量增殖,可能是缺氧性肺动脉高压形成的重要环节。研究发现,存在于PASMC上的Na^+/H^+交换蛋白-1(Na^+/H^+ exchanger-1, NHE-1)活化所致的细胞内碱化在PASMC增殖中起"容许性"作用[1]。因此,抑制NHE-1,可能防止细胞内碱化而抑制PASMC增殖,诱导其凋亡。本研究对大鼠NHE-1 mRNA二级结构进行计算机模拟,设计合成NHE-1核酶基因,构建于逆转录病毒载体上,转染体外培养的大鼠PASMC,观察转染后细胞内NHE-1的表达及细胞凋亡情况。

1 材料和方法

1.1 材料和主要试剂

质粒PLXSN(我所保存),质粒提取试剂盒(Promega公司),FuGENETM6转染试剂、Tripure(Roche公司),BCECF/AM(Eugene公司),Nigericin(Sigma公司),原位凋亡试剂盒(Boehringer Mannheim公司),α-SM actin抗体及SABC试剂盒(博士德公司)。

1.2 核酶基因的合成及载体构建

根据Orlowski等[2]克隆的大鼠NHE-1基因序列,用RNA draw软件对其mRNA二级结构进行模拟,选择位于环状部位的2231位GUC为切割位点。核酶(RZ)DNA合成序列为:

模板链DNA:5′> GATCC TCATCACCGTTTCGTCCTCACGGA CTCATCAGATCTTCTT G< 3′

编码链DNA:3′> G AGTAGTGGCAAAGCAGGAGTGCCTGAGT AGTCTAGAAGAA CTTAA< 5′

两端分别为*BamH*Ⅰ和*EcoR*Ⅰ的粘性末端。由上海生工生物公司合成的上述两条核苷酸链经退火,PLXSN经*BamH*Ⅰ和*EcoR*Ⅰ双酶切并纯化后,用T4DNA连接酶16℃连接12 h,产物经电穿孔法转化入XL_1-Blue大肠杆菌中扩增,并送上海生工生物公司测序鉴定。

1.3 PASMC培养及鉴定

组织块培养法原代培养PASMC成功后,DMEM培养基加10%小牛血清,常规培养,0.1%胰蛋白酶消化传代。第二、三代的细胞用于实验。按SABC试剂盒说明书进行α-SM actin免疫组化染色鉴定。

1.4 细胞转染及筛选、鉴定

按FuGENETM6说明书进行转染。分别转染重组体(PRZ)及PLXSN空载体入PASMC,后者(PX)及未转染细胞(PA)为对

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870352)
作者简介:陆俊羽(1972-),女,云南省昆明市人,博士研究生,医师,主要从事缺氧肺动脉平滑肌细胞凋亡方面的研究。电话:(023)68755320
收稿日期:2001-07-05;修回日期:2001-10-10

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

照。G418 初步筛选后, Tripure 提取细胞总 RNA, RT-PCR 法扩增质粒 PLXSN 上的 NEO 基因序列进行转染鉴定。NEO 引物: 上游: 5' -GCG GCG ATA CCG TAA AGC AC-3' ; 下游: 5' -CAC TGA AGC GGG AAG GGA CT-3' ; 产物为 498bp。RT-PCR 参照文献[3]进行。

1.5　sqRT-PCR 法检测 NHE-1 mRNA 表达

对数生长期的单层细胞, 前述方法进行总 RNA 提取、RT-PCR, 以β-actin 为内参照。NHE-1 引物: 上游: 5' -TTCCCCATGT-GTGATCTGTTCC— 3' ; 下游: 5' -TCTCCATCTTGTGGTAGAAGGC-3' ; 产物为 325bp。β-actin 引物: 上游: 5' -CCAAGGCCAACCGC-GAGAAGATGAC-3' ; 下游: 5' -AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC-3' ; 产物为 587bp。产物电泳, 紫外灯下观察并照相。照片扫描后, 测定各条带积分光密度值(以灰度表示)。以同一管中 NHE-1 和β-actin 产物条带积分光密度值之比(e/c)反映 NHE-1 mRNA 的表达程度。

1.6　细胞形态学及细胞周期变化

对数生长期的单层细胞, 光镜和透射电镜下观察其形态变化; 对数生长期的单层细胞, 消化并制成单细胞悬液, PI 染色, 上流式细胞仪(美国 FACS)测定细胞周期。

1.7　pHi 测定

根据 Okada 等[4]方法, 细胞接种于 24 孔培养板内的玻片上, 长成单层后换含 0.1%小牛血清 DMEM 培养基, 使其处于静止状态, 于含 BCECF/AM(2μmol/L)的 PSS 液中 37℃孵育 1 h, 漂洗后在 LS-50B 型荧光分光光度计(PE 公司)上用双波长比例测量法检测, Nigericin 法测定并绘制 pH 标准曲线[4]。

1.8　原位细胞凋亡检测

细胞准备同 pHi 测定, 按原位凋亡试剂盒说明书进行检测。结果在高倍光镜(× 400)下观察, 至少观察 5 个视野, 计数 200 个细胞以上, 计算阳性细胞百分率。

1.9　统计学处理

计数资料用 χ^2 检验; 计量资料用 t 检验。

2　结果

2.1　重组载体的测序鉴定

斜体部分为插入的核酶基因: GGGCNCTTANNCN-CTCANCCATCAGCCCTCACTCCTTCTCTAGGCGCCGG *AATTCAAGAA-GATCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGGTGATGAG*GATCCGGCTGTGG-AATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAG-GCAGAAGTAT……

2.2　转染鉴定

G418(60μg/ml)筛选 1 周, PA 细胞完全死亡, 转染细胞呈集落存活。RT-PCR 后, PRZ 及 PX 均扩增出 498bp 的 NEO 基因片段, 说明转染成功, 见图 1。

2.3　细胞鉴定及形态学变化

光镜下, PASMC 为长梭形, 呈典型的"峰-谷"长势, α-SM actin 免疫组化染色见胞浆中与细胞长轴平行的细丝状棕黄色沉淀, 细胞阳性率 99%以上; PX 及 PRZ 细胞略大, 亦呈"峰-谷"长势。透射电镜下, PASMC 胞浆内肌丝束和致密斑丰富, 而细胞器较少; PRZ 部分细胞细胞器退化, 可见细胞凋亡现象, 细胞胞核、胞质固缩, 与周围细胞分离, 凋亡小体形成, 见图 2。

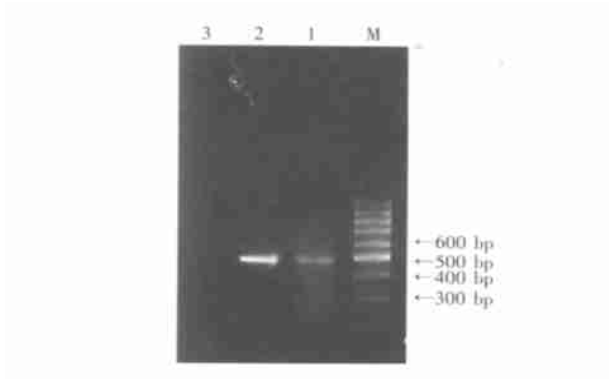


图 1　RT-PCT 扩增的 NEO 基因片段电泳结果

Fig 1　Result of NEO gene fragment by RT-PCR in 1% agarose gel

M: Marker; 1: PX; 2: PRZ; 3: PA

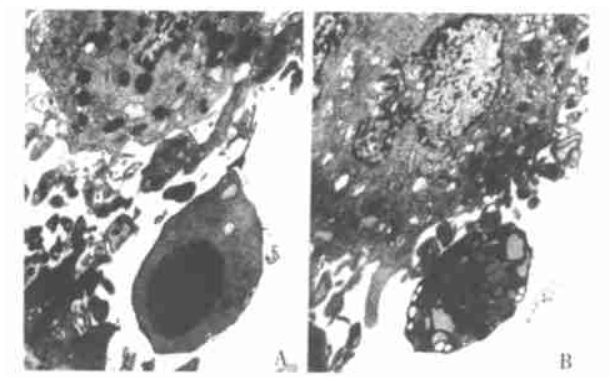


图 2　PRZ 细胞凋亡　(TEM× 4 000)

A: 凋亡细胞; B: 凋亡小体

Fig 2　Apoptosis of PRZ cells　(TEM× 4 000)

A: Apoptotic cell; B: Apoptotic body

2.4　转基因后 NHE-1 mRNA 的表达

电泳结果显示, PA、PX、PRZ 均出现两条条带, 325bp 的 NHE-1 扩增产物及 587bp 的β-actin 扩增产物, 见图 3。

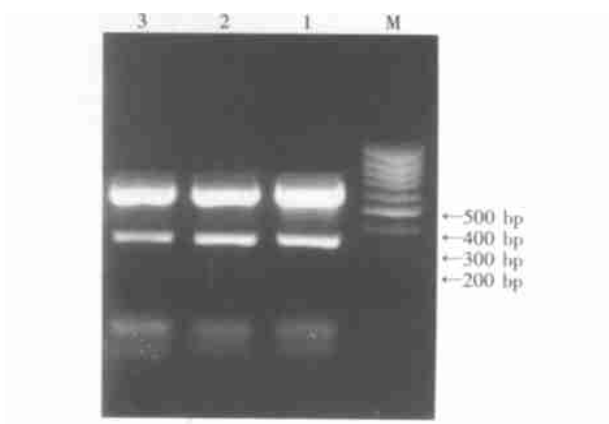


图 3　RT-PCR 扩增的 NHE-1 基因片段电泳结果

Fig 3　Result of NHE-1 gene fragment by RT-PCR in 1% agarose gel

M: Marker; 1: PA, 2: PX, 3: PRZ

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

PCR产物条带积分光密度值之比(e/c),PA(0.89±0.07)与PX(0.87±0.08)之间差异不显著($P>0.05$),而PRZ(0.48±0.09)较PA及PX降低非常显著($P<0.01$)。说明PA与PX的NHE-1 mRNA表达水平差异不显著,而PRZ的NHE-1 mRNA表达水平显著降低。

2.5 转基因对细胞周期的影响

流式细胞分析显示,与PA相比,PX细胞G_0/G_1期、G_2/M期细胞增加,而S期细胞减少,但相差不显著($P>0.05$);PRZ细胞G_0/G_1细胞显著增加,S期细胞显著减少($P<0.01$),且出现亚二倍体峰,示细胞凋亡率为10.65%,见表1。

表1 转基因后细胞周期变化

Tab 1 Changes of cell cycle of cells transfected with NHE-1 ribozyme gene

	G_0/G_1(%)	S(%)	G_2/M(%)	Apoptosis(%)
PA	61.75	31.03	7.22	0
PX	64.74*	27.05*	8.21*	0
PRZ	71.98**	19.15**	8.87*	10.65**

*: $P>0.05$, **: $P<0.01$ *vs* PA

2.6 pHi测定结果

与PA(7.21±0.04)相比,PX细胞pHi(7.19±0.13)差别不显著($P>0.05$),PRZ细胞pHi(6.98±0.14)降低非常显著($P<0.01$)。说明转染NHE-1核酶基因后,细胞内酸化。

2.7 原位细胞凋亡检测结果

与PA细胞凋亡率(5.29±0.88)相比,PX细胞凋亡率(6.05±1.12)差别不显著($P>0.05$),PRZ细胞凋亡率(32.06±3.06)增加非常显著($P<0.01$)。

3 讨论

研究发现,细胞凋亡是调节血管壁平滑肌细胞数的重要方式[5]。正常情况下,肺血管壁发生的较低的增殖水平可被同时发生的相应的自发凋亡水平所平衡,以保持血管壁细胞数相对稳定。缺氧时,PASMC由收缩型向合成型转化,并从中膜迁移至内膜大量增殖,而凋亡相对减少,造成细胞增殖、凋亡失衡,使肺动脉中膜增厚和非肌性血管肌化,在缺氧性肺动脉高压形成中起关键性作用。因此抑制缺氧PASMC增殖,和/或诱导PASMC凋亡,成为缺氧性肺动脉高压治疗的一个重要思路。

NHE-1是存在于血管平滑肌细胞膜上的一种管家基因蛋白,可介导1∶1细胞外钠离子和细胞内氢离子交换,从而调节细胞内H^+、pH值、Na^+和细胞容积。Quinn等[1]研究发现,PDGF和EGF等生长因子,通过激活NHE-1,导致牛PASMC细胞内碱化,从而诱发细胞增殖;而二者的刺激细胞增殖作用都能被NHE-1特异性抑制剂二甲基氨氯吡咪(DMA)抑制。此后,Quinn等[6]分别用DMA及另一种NHE-1特异性抑制剂EIPA(Ethylisopropyl amiloride)治疗慢性缺氧大鼠,发现大鼠的肺动脉压、总肺血管阻力指数及肺血管重建都有类似下降,说明NHE-1特异性抑制剂在体内能通过干扰PASMC生长来抑制缺氧性肺动脉高压的进展。

核酶(Ribozyme,RZ)可序列特异性地结合并切割靶RNA,使其失去生物功能。本实验应用核酶技术,设计合成NHE-1核酶基因,构建于逆转录病毒载体上,转染体外培养的PASMC,采用电镜技术、sqRT-PCR法、pHi测定、流式细胞技术及原位细胞凋亡检测等多种手段,观察细胞内NHE-1的表达及细胞凋亡情况。结果显示,转染NHE-1核酶基因后,细胞内NHE-1 mRNA表达显著降低,说明核酶已发挥切割作用而抑制了NHE-1的表达。此时,电镜下见细胞凋亡,凋亡小体形成;pHi显著降低,细胞内酸化;流式细胞技术及原位细胞凋亡检测显示细胞凋亡率显著增加。说明抑制NHE-1可通过细胞内酸化,诱导PASMC凋亡。

结合Quinn等的研究,抑制NHE-1可以通过细胞内酸化来抑制PASMC增殖,并诱导其凋亡,从而抑制缺氧性肺动脉高压的进展,这为缺氧性肺动脉高压的治疗提供了一个新的思路和策略。核酶具有长期使用无毒副作用,结构简单,易于人工合成等特性,在缺氧性肺动脉高压的基因治疗中有较广阔的前景。但抑制NHE-1导致细胞内酸化后,是通过DNA酶Ⅱ的激活,还是通过一系列信号转导通路使凋亡相关基因表达,而引起PASMC凋亡,需进一步研究。

参考文献:

[1] Quinn D A, Dahlberg C G, Bonventre J P, *et al*. The role of Na^+/H^+ exchange and growth factors in pulmonary artery smooth muscle cell proliferation[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1996, 14(2): 139-145.

[2] Orlowski J, Knandasamy R A, Shull G E. Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family: cDNA cloning, deduced amino acid sequence NHE-1 and two structurally related proteins[J]. J Biol Chem 1992, 267(13): 9 331-9 339.

[3] F. 奥斯伯, R. 布伦特, R. E. 金斯顿, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 598-601.

[4] Okada K, Ishikawa S, Saito T. Effect of vasopressin on Na^+ kinetics in cultured rat vascular smooth muscle cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1990, 173(1): 224-230.

[5] Smith G L, Austin C, Crichton C, *et al*. A review of the actions and control of intracellular pH in vascular smooth muscle[J]. Cardiovas Res, 1998, 38(2): 316-331.

[6] Quinn D A, Du H K, Thompson B T, *et al*. Amiloride analogs inhibit chronic hypoxic pulmonary hypertension[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 157(4 Pt 1): 1 263-1 268.

(编辑 薛国文)

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