DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.04.015
第23卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 4
2001年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2001

文章编号:1000-5404(2001)04-0401-03

论著

转染血管紧张素Ⅱ受体反义核苷酸对心肌细胞生长的作用

杨永健[1],祝善俊[1],祝之明[2],胡厚祥[2], 丁钢[2] (第三军医大学:[1]附属新桥医院心血管内科,重庆 400037;[2]附属大坪医院野战外科研究所高血压中心,重庆 400042)

提 要:目的 评价转染AT_1反义核苷酸(AT_1A)对心肌细胞血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)受体亚型mRNA表达,及蛋白质和核酸合成的作用。方法 RT-PCR克隆AT_1 cDNA序列(476 bp),将克隆的AT_1 cDNA反向插入PcDNA3.1(5.4 kb),构建一完整的含AT_1A的质粒(PAT_1A),并转染入培养的心肌细胞,RT-PCR和免疫印迹鉴定其转染后AT_1 mRNA和蛋白表达。比较AngⅡ 10^{-7} mol/L刺激24 h后的转染及非转染的心肌细胞AT_1及AT_2 mRNA表达(RT-PCR)、蛋白质和核酸合成(^{3}H-Leu及^{3}H-TdR掺入量)。结果 成功构建PAT_1A。转染心肌细胞AT_1 mRNA和蛋白表达量显著减少,与正常对照心肌细胞相比差异有非常显著性($P<0.01$)。AngⅡ 10^{-7} mol/L刺激24 h后,与非转染心肌细胞相比,转染组AT_1 mRNA表达明显减少,AT_2 mRNA表达明显增加($P<0.01$),但两组间^{3}H-Leu及^{3}H-TdR掺入量差异均无显著性($P>0.05$)。结论 经AT_1A封闭后,心肌细胞AT_1 mRNA表达显著抑制,同时AT_2 mRNA上调。单纯封闭AT_1 mRNA并不能有效阻断AngⅡ介导的心肌细胞生长。

关键词:血管紧张素Ⅱ;受体;反义核苷酸;心肌细胞;细胞生长
中图法分类号:R322.11;R392.13 文献标识码:A

Role of transfected angiotensin Ⅱ receptor anti-sense nucleotide in the growth of cardiomyocytes

YANG Yong-jian, ZHU Shan-jun, ZHU Zhi-ming, HU Hou-xiang, DING Gang (Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the role of transfected angiotensinⅡ(Ang Ⅱ) receptor AT_1 anti-sense nucleotide (AT_1A) in the expression of subtypes of AngⅡ receptor mRNA, synthesis of protein and nucleic acid in cardiomyocytes. **Methods** AT_1 cDNA sequence (476 bp) was cloned with RT-PCR and reversely inserted into PcDNA3.1 (5.4 kb) to construct an intact plasmid containing AT_1A (PAT_1A). The plasmid was then transfected into the cultured cardiomyocytes and identified with RT-PCR and Western blot. The synthesis of protein and nucleic acid identified by ^{3}H-Leu and ^{3}H-TdR incorporation, and expressions of AT_1 and AT_2 mRNA by RT-PCR, were compared between transfected and nontransfected cardiomyocytes after being stimulated with 10^{-7} mol/L AngⅡ for 24 h. **Results** The plasmid PAT_1A were successfully constructed. The AT_1 mRNA and its protein were expressed significantly less in the transfected cardiomyocytes than in the control ($P<0.01$). In the transfected cardiomyocytes, AT_1 mRNA expression was markedly decreased, but that of AT_2 mRNA obviously increased ($P<0.01$) when compared with the nontransfected cardiomyocytes after stimulation for 24 h with AngⅡ 10^{-7} mol/L; no significant difference was found in ^{3}H-Leu and ^{3}H-TdR incorporation between them. **Conclusion** After the cardiomyocytes was tranfected with AT_1A, the expression of AT_1 mRNA was markedly suppressed, while AT_2 mRNA up-regulated at the same time. Our results indicate that AT_1A blocking can not effectively interrupt the AngⅡ-induced synthesis of the protein and nucleic acid in cardiomyocytes.

Key words: angiotensinⅡ; receptors; antisense nucleotide; cell growth; cardiomyocytes

肾素血管紧张素系统(Renin-angiotensin system, RAS)的关键效应分子血管紧张素Ⅱ(Angiotensin Ⅱ, AngⅡ)通过与特异的受体(Angiotensin type 1, AT_1)结合,引起一系列的生物效应,导致心肌细胞肥大和间质纤维化,在充血性心力衰竭的病理过程中起重要作用。心肌肥大的逆转已成为近年来研究的的重要课题,因此我们构建了含AT_1反义核甘酸的真核表达质粒(Plasmid containing angiostensin type 1A, PAT_1A),转染培养的心肌细胞,观察对心肌细胞生长的影响,为心肌重构的防治提供更多的实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

逆转录病毒载体PcDNA3.1质粒(5.4 kb)、包装细胞(PA317细胞株)(胡厚祥博士提供),JM109菌株为本实验室保存菌株。主要酶和试剂:RNA提取试剂盒(Boehringer Mannheim),AT_1(兔抗)、化学发光试剂等(Santa Cruz),逆转录(RT)试剂盒、限制性内切酶*EcoR*Ⅰ、*Hind* Ⅲ、T_4连接酶(Promega),Taq酶(Sangon),M199(GIBCO),AngⅡ(Sigma),^{3}H-Leu和^{3}H-TdR(北京原子能科学研究院)。

1.2 克隆AT_1 cDNA片段

RT-PCR法。引物设计:本实验设计AT_1 cDNA片段为476 bp,为便于PCR产物的亚克隆,3'引物的5'端加入*EcoR*Ⅰ识别位点(GCGAATTCTTGAACCTGTCACTCCACC),5'引物的5'端加入

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770314;39725013),重庆市科委资助项目
作者简介:杨永健(1965-),男,重庆市万州区人,博士研究生,主治医师,主要从事心肌重构有关信号转导方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68757745
收稿日期:2000-04-17;修回日期:2000-10-21

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

Hind Ⅲ识别位点(GCA AGCTTATGTTCCCTTTCCTTATC)。RT-PCR反应:取Wistar大鼠的心脏组织提取RNA,RT按试剂盒说明书完成,(PCR循环参数:99 ℃ 12 min plus Taqase, 88 ℃ 3 min, step3 95 ℃ 2 min; 94 ℃ 5 min, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min,循环35周期;72 ℃延伸10 min)。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳后,用V型槽回收所需DNA片段。

1.3 质粒的制备、纯化、酶切、连接[3]

PcDNA3.1的转化、小量及大量提取按常规方法进行。用*EcoR* Ⅰ + *Hind* Ⅲ切开PcDNA3.1成线性化质粒(PcDNA3.1酶切位点与AT_1cDNA酶切位点方向相反),回收线性质粒。将双酶切开的线性载体与克隆AT_1 cDNA片段按1∶3混合,T_4连接酶连接,构建成PAT_1A,扩增后由北京美国赛百盛生物工程公司进行DNA测序。

1.4 心肌细胞培养、质粒转染

取Wistar大鼠乳鼠心脏,按Scott法培养心肌细胞。用脂质体包裹PAT_1A,将该质粒导入PA317细胞株,转染后48 h更换选择培养基[3](G418, 400 μg/ml,筛选3周左右)。用构建的逆转录病毒清上清液感染无血清培养基培养的心肌细胞,RT-PCR和Western blot检测转染24 h心肌细胞AT_1 mRNA和蛋白表达。

1.5 实验分组

Ⅰ组为正常对照心肌细胞;Ⅱ组为转染心肌细胞;Ⅲ组为Ang Ⅱ 10^{-7} mol/L刺激24 h的转染心肌细胞;Ⅳ组为Ang Ⅱ 10^{-7} mol/L刺激24 h的非转染心肌细胞。

1.6 Western blot和RT-PCR

取Ⅰ组和Ⅱ组的心肌细胞提取蛋白并定量,Western blot按规方法进行,结果经凝胶成像系系分析。AT_1引物同前,AT_2(342 bp)上游5′-TGGCTTGTCTATCCTCATTG-3′,下游5′-ATCCAGGTCAGAGCATCC-3′;内对照GAPDH(231 bp)上游5′-CGGCAAATTCAACGGCACAGTCA-3′,下游5-TGGGGGCATCGGCAGAAGG-3′,以上引物均由GIBCO公司合成。将Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组分别提取总RNA,RT,PCR条件同克隆部分,产物经琼脂糖凝胶电泳及凝胶成像系统图像分析,重复3次。

1.7 ^{3}H-Leu和^{3}H-TdR掺入

将消化的乳鼠心肌细胞配制成3×10^5个/ml的细胞悬液,接种于24孔板,每孔1 ml,24 h后加入无血清M199培养24 h。Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ组,分别加入^{3}H-Leu或^{3}H-TdR 18.5 kBq/孔,每组重复3次,24 h后用0.25%的胰酶消化细胞,多管细胞收集器将细胞吸附于玻璃纤维纸上,烘干后加入闪烁液进行液闪计数,以Bq/well表示。

1.8 统计学处理

数据用$\bar{x}\pm s$表示,组间比较进行t检验。

2 结果

2.1 PAT_1A的构建

PCR扩增的AT_1 cDNA3′端加入*EcoR* Ⅰ识别位点,5′端加入*Hind* Ⅲ识别位点,插入真核表达载体PcDNA3.1上构建在含AT反义核苷酸的真核表达载体PAT_1A,构建见图1。

2.2 DNA测序

对PAT_1A中的插入片段进行序列测定,插入片段与AT_1 cDNA的片段序列完全一致且方向相反。

2.3 RT-PCR

结果经凝胶成像系统分析光密度值(AT_1/GAPDH)比值,Ⅰ组为1.134±0.121,Ⅱ组为0.586±0.116,见图2,Ⅱ组AT_1 mRNA表达明显减少($P<0.01$)。与Ⅰ组相比,Ⅳ组AT_1 mRNA表达明显增加($P<0.01$)、两组间AT_2 mRNA表达差异不显著($P>0.05$);与Ⅳ组相比,Ⅲ组AT_1 mRNA表达明显受抑制($P<0.01$),AT_2 mRNA表达明显增加($P<0.05$),见表1。



图1 PAT_1A的构建(0.8%琼脂糖凝胶)

Fig 1 Construction of PAT_1A (0.8% argrose gel)

M: Marker λDNA/*EcoR* Ⅰ + *Hind* Ⅲ; 1: PcDNA 3.1; 2: PcDNA 3.1/*EcoR* Ⅰ; 3: PcDNA 3.1/*Hind* Ⅲ; 4: PcDNA 3.1/*EcoR* Ⅰ + *Hind* Ⅲ; 5: PCR products; 6: PAT_1A; 7: PAT_1A/*EcoR* Ⅰ + *Hind* Ⅲ

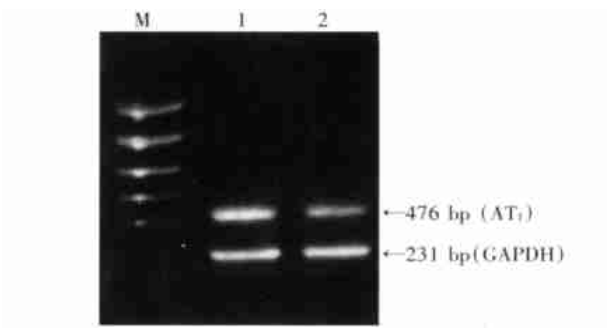


图2 正常对照心肌细胞与转染心肌细胞AT_1 mRNA表达(RT-PCR)

Fig 2 AT_1 mRNA expression in transfected and nontransfected cardiomyocytes (RT-PCR)

M: PCR marker; 1: Group Ⅰ; 2: Group Ⅱ

表1 AT亚型mRNA表达(RT-PCR)光密度比值(AT/GAPDH)

Tab 1 OD ratio of AT Subtype mRNA (AT/GAPDH), RT-PCR

AT	Group Ⅰ	Group Ⅳ	Group Ⅲ
AT_1	0.245±0.061 **	0.366±0.053	0.234±0.081 **
AT_2	0.262±0.012	0.251±0.011	0.349±0.030 *

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* group Ⅳ

2.4 Western blot

结果经凝胶成像系统分析每平方毫米光密度值Ⅰ组为3.89±0.12,Ⅱ组为2.11±0.09,Ⅱ组AT_1蛋白表达量明显受抑制,见图3。

2.5 ^{3}H-Leu及^{3}H-TdR掺入量

Ⅰ组^{3}H-Leu掺入率为(32±7) Bq/well,显著高于Ⅲ组(82±16) Bq/well和Ⅵ组的(80±14) Bq/well($P<0.01$),Ⅲ组与Ⅳ组间差异无显著性($P>0.05$);同样,Ⅰ组^{3}H-TdR掺入率为(1 219

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

±71) Bq/well, 显著高于 III组(1 718±201) Bq/well 和 VI组的(1 568±106) Bq/well($P<0.01$), III组与 IV组间差异无显著性($P>0.05$)。



图 3　正常对照心肌细胞与转染心肌细胞 AT_1 蛋白表达(Western blot)

Fig 3　Expression of AT_1 protein in transfected and nontransfected cardiomyocytes(Western blot)

1: Group Ⅰ; 2: Group Ⅱ

3　讨论

在 AT 的各亚型中, AT_1 占 90%左右。Ang II 引起心肌重构的主要细胞分子机制是 Ang II 与 AT_1 结合, 激活以下几条与心肌细胞生长有关的信号转导通路[2,4,5]: ①通过磷脂酶 C 生成甘油二酯和三磷酸肌醇, 进一步激活 PKC 和细胞内 Ca^{2+} 释放。②激活 MAPK, 使 MAPK 磷酸化, 再通过核转位调节核内转录因子, 引起细胞增殖和生长反应。③Ang II 还可通过磷脂酶 γ 引起酪氨酸激酶磷酸化, 调节细胞生长。上述几条途径启动核转录, 诱导心肌细胞肥厚相关基因如 c-fos、c-myc 等的表达, 使蛋白质核酸合成, 最终导致心肌细胞肥大。本实验结果显示: 与正常对照心肌细胞相比, Ang II 10^{-7} mol/L 刺激 24 h 后的心肌细胞 AT_1 mRNA 表达、蛋白核酸合成速率明显增加, AT_2 mRNA 表达差异无显著。说明 Ang II 介导的心肌重构主要通过 AT_1 受体起作用。

应用反义 mRNA 进行心血管病的基因治疗, 是近年发展起来的一项新技术。本研究试图用 AT_1A 在分子水平封闭 AT_1 mRNA, 以评价 AT_1 在心肌细胞生长中的作用。我们用的载体 PcDNA3.1 为逆转录病毒载体, 插入的片段为 cDNA, 不会影响病毒的转录和效价, 且包装成假病毒有较强的转染能力[3,5]; 因此将构建的 PAT_1A 转染入培养的心肌细胞后, RT-PCR 结果显示转染心肌细胞 AT_1 mRNA 明显受抑制, Western blot 显示转染组心肌细胞 AT_1 蛋白表达明显降低, 为进一步探讨 AT_1A 在心肌细胞生长中的作用打下了基础。

AT 的阻断在逆转心肌重构中起重要作用[6]。其常用方法为血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)和特异受体拮抗剂如 Losartan[7,8]。反义核苷酸技术可有效地抑制目的基因的转录、翻译或诱导目的基因的降解, 进而抑制目的基因的表达。文献[2]报道, AT_1 基因敲除后, AT 的其它受体亚型的表达可代偿性增加。本研究结果表明, Ang II 10^{-7} mol/L 刺激 24 h 后的转染心肌细胞与 Ang II 10^{-7} mol/L 刺激 24 h 后的非转染心肌细胞相比, 前者 AT_1 mRNA 表达明显受抑制, AT_2 mRNA 表达明显增加, 蛋白质和核酸合成速率差异均无显著性。我们设想封闭 AT_1 mRNA 后, Ang II 介导的心肌细胞生长相关信号转导可通过 AT_2 上调来代偿, 与文献报道的基本一致, AT_2 mRNA 上调的机制目前尚不十分清楚。

AT_1A 封闭能显著抑制心肌细胞 AT_1 mRNA 表达, 上调 AT_2 mRNA, 但封闭 AT_1 mRNA 并不能有效阻断 Ang II 介导的心肌细胞蛋白和核酸合成。本研究提示心肌细胞生长有受多个途径控制, 仅封闭 AT 某一亚型受体并不能有效地抑制 Ang II 介导的心肌细胞生长, 其他受体亚型可能起代偿作用。这提示心肌肥大影响因素较复杂, 仅阻断某一环节达不到理想的效果, 必须考虑其它因素的综合作用, 探讨更有效的逆转心肌肥大的方法仍为今后研究的重点。

参考文献:

[1] Regitz-Zagrosek V, Neuss M, Warnecke C, *et al*. Subtype 2 and atypical angiotensin receptors in human heart[J]. Basic Res Cardiol, 1996, 91(Suppl 2): 73—77.

[2] Zhu Z, Zhang S H, Wagner C, *et al*. Angiotensin AT_1B receptor mediates calcium signaling in vascular smooth muscle cells of AT_1a receptor-deficient mice[J]. Hypertension, 1998, 31(5): 1 171—1 177.

[3] 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 17—287.

[4] Nickenig G, Strehlow K, Roeling J, *et al*. Salt induces vascular AT_1 receptor overexpression *in vitro* and *in vivo*[J]. Hypertension, 1998, 31(6): 1 272—1 277.

[5] Sherry B, Torres J, Blum M A. Reovirus induction of and sensitivity to beta-interferon in cardiac myocyte cultures correlate with induction of myocarditis and are determined by viral core proteins[J]. J Virol, 1998, 72(2): 1 314—1 323.

[6] Sander G E, Mckinnie J J, Greenberg S S, *et al*. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonists in the treatment of heart failure caused by left ventricular systolic dysfunction[J]. Prog Cardiovasc Dis, 1999, 41(4): 265—300.

[7] Everett A D, Heller F, Fisher A. AT_1 receptor gene regulation in cardiac myocytes and fibroblasts[J]. J Mol Cell Cardiol, 1996, 8(8): 1 727—1 736.

[8] Regitz-Zagrosek V, Neuss M, Holzmeister J, *et al*. Molecular biology of angiotensin receptors and their role in human cardiovascular disease[J]. J Mol Med, 1996, 74(12): 233—251.

(编辑　郭建秀)

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