



投稿



查稿



网上商城



考试



期刊



视频

专科文献

在线投稿 稿件查询 期刊阅读

搜索: 请输入您想要的信息 搜索 高级搜索

您当前位置: 首页 >> 专科文献 >> 心血管科

心血管科

### CBP基因沉默抑制血管平滑肌细胞增殖的研究

发表时间: 2011-12-9 8:16:46 来源: 创新医学网医学编辑部推荐

作者: 魏云杰,江洪,陈静,张静,徐昌武 作者单位: 武汉大学人民医院心血管内科, 湖北 武汉 430060

**【摘要】**目的: 探讨RNA干扰大鼠CREB结合蛋白(rCBP)基因对大鼠血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖的影响。方法: 根据CBP cDNA序列构建可同时表达4条针对rCBP mRNA特异的短发夹RNA(shRNA)、携带绿色荧光蛋白的腺病毒(CBP-shRNA/Ad)。以空腺病毒为转染对照组、含非特异性shRNA编码序列的腺病毒为阴性对照组、感染复数为12、16、25、50的CBP-shRNA/Ad为干预组, 转染 0.1 U/mL凝血酶预处理的VSMCs 2 d。RT-PCR法、蛋白印记法分别检测rCBP mRNA和蛋白质的表达变化。流式细胞技术检测细胞周期, 评价细胞增殖能力。倒置显微镜观察CBP-shRNA/Ad对细胞的毒副作用。结果: 不同剂量的CBP-shRNA/Ad可在mRNA和蛋白质水平, 明显抑制凝血酶诱导CBP高表达(P<0.05), 具有量效依赖性。CBP-shRNA/Ad通过下调

CBP含量, 可使G0/G1期细胞比例显著升高(P<0.05), S期细胞比例下降(P<0.05), 细胞周期被阻滞。倒置显微镜观察细胞贴壁状况良好。结论: RNA干扰技术可通过选择性下调rCBP的表达, 显著抑制VSMCs的增殖, 无明显细胞毒性。

**【关键词】** 血管平滑肌细胞;RNA干扰;环磷腺苷反应原件结合蛋白结合蛋白;基因治疗

[ABSTRACT] Objective: To explore the effect of CREB binding protein (rCBP) gene-silencing on vascular smooth muscle cells (VSMCs) proliferation by RNA interference. Methods: According to the CBP cDNA sequence, adenovirus with green fluorescent protein was constructed which could encode specific short hairpin RNA (shRNA) of rCBP mRNA (CBP-shRNA/Ad). Empty adenovirus was taken as transfection control group, adenovirus with non-specific shRNA coding sequence as negative control group, and CBP-shRNA/Ad with multiplicity of infection 12, 16, 25 and 50 as intervention groups, VSMCs 2d primed by 0.1U/mL thrombin was transfected. Then the change of CBP mRNA and protein were detected by RT-PCR and western blot; cell cycle was examined by flow cytometry to evaluate VSMCs proliferation. The adverse effect of CBP-shRNA/Ad on VSMCs was investigated by invert microscope. Results: CBP-shRNA/Ad could obviously inhibit CBP high-expression induced by thrombin at mRNA and protein level(P<0.05) in dose-dependence. CBP-shRNA/Ad increased cells rate in G0/G1 phase (P<0.05)and decreased cells rate in S phase(P<0.05)via reduction of CBP content. Results of invert microscope showed cells had the good adherence ability. Conclusions: RNA interference could down regulate rCBP expression selectively, inhibit VSMCs proliferation apparently, without obvious adverse effect.

[KEY WORDS] Vascular smooth muscle cells; RNA interference; CREB binding protein; Gene therapy

血管损伤后新生内膜形成是动脉粥样硬化、再狭窄等血管增殖性疾病发生的根本原因[1]。它主要表现为血管平滑肌细胞迁移增殖, 大量细胞外基质分泌合成。CREB结合蛋白(cAMP response element binding protein binding protein, CBP)通过协助众多转录因子和内在乙酰基转移酶活性, 上调VSMCs(vascular smooth muscle cells)增殖相关蛋白的表达, 参与多基因表达改变介导的血管损伤处VSMC增殖[2-4]。RNA干扰(RNA interference, RNAi)可高效特异阻断体内同源基因表达, 促使同源mRNA降解, 诱

特色服务 Serves

- 在线投稿 投稿指南
- 绿色通道 特色专区
- 服务流程 常见问题
- 编辑中心 期刊阅读

期刊约稿

- 中国社区医师
- 医学信息
- 吉林医学
- 按摩与康复医学
- 临床合理用药杂志

推荐期刊

吉林医学



- 期刊介绍
- 在线阅读
- 在线订阅
- 在线投稿

论文修改实例

使细胞出现特定基因缺失的表现[5]。因此, 本实验根据大鼠CBP(rCBP) cDNA 序列构建可同时表达4条针对rCBP mRNA特异的短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA) 腺病毒(CBP-shRNA/Ad), 探讨RNAi沉默rCBP基因对大鼠胸主动脉平滑肌细胞增殖的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

SD雄性大鼠购自武汉大学医学部动物实验中心, 150 g左右。凝血酶、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自美国Sigma-Aldrich Chem公司。DMEM培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国HyClone公司。Trizol购自美国Invitrogen公司。一步法RT-PCR试剂盒购自大连宝生物公司;兔抗大鼠CBP抗体、兔抗大鼠 $\beta$ -actin抗体购自美国Santa Cruz公司;Protein A+G Agarose购自江苏碧云天公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 血管平滑肌细胞培养

无菌条件下分离SD大鼠胸主动脉, 以含20%FBS的DMEM培养液行组织贴壁法原代培养;用0.25%胰蛋白酶消化细胞, 以含10%FBS、2 mmol/L谷氨酰胺、100 U/mL青霉素、100  $\mu$ g/mL链霉素的DMEM培养液行传代培养。实验采用融合度90%左右的第3~4代VSMCs。细胞鉴定采用肌动蛋白( $\alpha$ -actin)免疫荧光染色。

#### 1.2.2 CBP-shRNA/Ad的设计及构建可编码

根据GeneBank中rCBP cDNA序列(NM\_133381)和RNAi原理, 构建可同时编码4条针对rCBP mRNA特异的、含绿色荧光蛋白标记的shRNA真核表达穿梭质粒(Pgenesil4-rCBP-EGFP)。再将Pgenesil4-rCBP-EGFP与腺病毒骨架体外重组构建CBP-shRNA/Ad。随机选取一段与大鼠基因无同源性的基因序列构建可编码非特异序列的shRNA腺病毒(非CBP同源序列-shRNA/Ad)。其中4条CBP-shRNA靶向序列分别是5' - AAACAGTGGGAACCTTGTCC-3' (182-202);5' - AACTGTCAGAGCTTCTTAGAG-3' (226-246);5' - AATCCCAACCTCCACATTCCA-3' (7087-7097);5' - AATGCTCCCCAGCTGAATAC-3' (7244-7264)。非CBP同源序列shRNA靶向序列是5' - AAGCTTCATAAGCGCATAGC-3'。腺病毒经放大培养收集后, TCID<sub>50</sub>法检测滴度在10<sup>8</sup>~10<sup>9</sup>pfu/mL之间, 无细菌、支原体污染, 分装后-70℃保存。

#### 1.2.3 CBP-shRNA/Ad转染效率检测

取0.5 × 10<sup>5</sup>个/mL浓度的VSMCs 2 mL接种于24孔板内, 常规培养1 d。分别用感染复数(multiplicity of infection, MOI)为12、16、25、50的CBP-shRNA/Ad与无血清、无抗生素的DMEM培养液混合, 转染VSMCs 4 h左右, 期间每隔30 min轻微摇晃培养板。弃上清后, 以含10%FBS的DMEM培养液继续常规培养。2 d后于免疫荧光显微镜下检测荧光表达。计算光镜下总细胞数中呈绿色荧光表现的细胞比例, 取5个视野均值进行统计学分析, 即为腺病毒转染效率。

#### 1.2.4 VSMCs形态学改变

在倒置相差显微镜下观察细胞生长情况, 于转染2 d后照相分析。

#### 1.2.5 RT-PCR 分析

Trizol抽提VSMCs总RNA。定量后取1  $\mu$ g mRNA应用PCR一步法试剂盒进行RT-PCR, 扩增CBP和GAPDH, 后者作为内参照。CBP引物序列是: 上游5' - CGCAAGACTAATGGAGGATG-3', 下游5' - TGTGCTGGGCTGCTGTGTAG-3', 扩增长度为260 bp;GAPDH引物序列: 上游5' - GAAACCTGCCAAGTATGATG-3', 下游5' - ACCAGGAAATGAGCTTGAGA-3', 扩增长度为191 bp。RT-PCR 反应条件: 50℃孵育30 min进行RT反应;94℃ 2 min RTase失活;94℃ 30 s变性;CBP 59.8℃退火30 s、GAPDH 55.6℃退火30 s;72℃延伸45 s;共35个循环。扩增产物于1.5%琼脂糖凝胶(含0.5  $\mu$ g/mL溴化乙锭)进行电泳。采用BioD1凝胶成像分析系统软件对RT-PCR图片扫描, 以CBP与GAPDH的电泳条带的光密度比值作为CBPmRNA的相对表达量, 进行半定量分析。

#### 1.2.6 Western blot分析

采用含10  $\mu$ g/mL蛋白酶抑制剂PMSF的RIPA裂解液(江苏碧云天公司)裂解VSMCs, 离心收集上清液以获取细胞总蛋白, BCA蛋白浓度测定试剂盒(江苏碧云天公司)测定蛋白浓度[6]。CBP蛋白需做免疫沉淀[7]。总蛋白(每泳道40  $\mu$ g)经过12%聚丙烯酰胺凝胶200 V电泳40 min分离 $\beta$ -actin后, 25 V恒压电转至NC膜上。免疫沉淀后的CBP蛋白样品(每泳道10  $\mu$ L)经过6%聚丙烯酰胺凝胶200 V电泳90 min后, 140 mA恒流4℃过夜电转至NC膜上。用含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液室温封闭2 h, 洗膜后加兔抗大鼠 $\beta$ -actin抗体(1:1000)或兔抗大鼠CBP抗体(1:500)4℃过夜, 然后用结合辣根过氧化物酶的山羊抗兔的IgG抗体(1:3000)结合 $\beta$ -actin一抗或(1:1500)结合CBP一抗室温孵育1 h。洗膜后采用增强化学发光检测系统进行观察。

#### 1.2.7 流式细胞仪的细胞周期分析

将细胞悬液密度调整为1 × 10<sup>5</sup>/mL细胞接种于25 cm<sup>2</sup>细胞培养瓶中, 生长至细胞密度达到1 × 10<sup>6</sup>/mL后, 撤去血清24 h, 使细

胞生长同步化。再加入含10%FBS的DMEM培养液培养22 h。用不同的干预措施干预VSMCs 2 d。VSMCs制成单个细胞悬液，取 $1 \times 10^6$ 个细胞离心后弃上清液，70%乙醇4℃固定保存。测定时离心除去乙醇，1 mg/mL RNA酶37℃温浴30 min消化RNA；加入终浓度为100 μg/mL的碘化吡啶，冰上避光孵育1 h，400目尼龙网过滤后流式细胞仪检测，Multicycles软件分析结果。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS10.0软件包进行统计学处理。计量资料用( $\bar{x} \pm s$ )表示。多组间比较采用单因素方差分析，当总体有差异时使用Duncan法进行两两比较。P<0.05有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 大鼠VSMCs鉴定

血管平滑肌肌动蛋白 $\alpha$ -actin作为一抗，免疫荧光染色可见平滑肌细胞特有的肌纤维，证实为VSMCs(图1)。图1 VSMCs  $\alpha$ -actin免疫荧光染色 $\times 400$

### 2.2 CBP-shRNA/Ad转染效率检测

用MOI12、MOI16、MOI25、MOI50的CBP-shRNA/Ad转染VSMCs 2 d，各组许多贴壁细胞都表达绿色荧光，转染效率均达到90%以上，说明CBP-shRNA/Ad成功转染了VSMCs(图2A-D)。A-D图分别是MOI12、MOI16、MOI25、MOI50的CBP-shRNA/Ad转染VSMCs 2 d后荧光显微镜观察情况图2 CBP-shRNA/Ad转染原代培养的VSMCs效率检测( $\times 100$ )

### 2.3 CBP-shRNA/Ad转染VSMCs细胞形态学改变

MOI12、MOI16、MOI25、MOI50的CBP-shRNA/Ad转染VSMCs 2 d，倒置显微镜见各组细胞贴壁良好，未见细胞变圆、体积缩小及细胞脱落(图3A-D)。

### 2.4 CBP-shRNA/Ad对VSMCs CBP mRNA和蛋白质表达的影响

除空白对照组外，其余各组均用0.1 U/mL凝血酶刺激VSMCs上调CBP含量[8]。较空白对照组，0.1 U/mL凝血酶刺激VSMCs 2 d可明显上调VSMCs CBP mRNA( $q=18.065$ ,  $P<0.05$ )和蛋白质( $q=16.526$ ,  $P<0.05$ )表达水平；其中空腺病毒转染对照组和非CBP同源序列-shRNA/Ad阴性对照组转染细胞后，与凝血酶预处理组相比，CBP mRNA和蛋白质水平无明显变化( $P>0.05$ )。与凝血酶预处理组相比，MOI12、MOI16、MOI25、MOI50的CBP-shRNA/Ad各组CBP mRNA表达量分别下调26.5%、31.9%、37.1%、53.1%( $q=12.046$ 、14.657、17.172、24.877,  $P<0.05$ )；CBP蛋白质表达量分别下调10.4%( $q=2.332$ ,  $P>0.05$ )。A-D分别是MOI12、MOI16、MOI25、MOI50的CBP-shRNA/Ad转染VSMCs图3 CBP-shRNA/Ad转染VSMCs 2 d后倒置显微镜结果 $\times 200$ 。1.3%、58.3%、69.4%( $q=4.806$ 、13.142、15.644,  $P<0.05$ ) (图4、5)。与空白对照组相比， $\Delta P<0.01$ ；与0.1 U/mL凝血酶刺激2 d组相比，\* $P<0.01$  A为RT-PCR产物凝胶电泳图。B为以GAPDH内参进行标化的CBP mRNA相对光密度值：1：为空白对照组，2：为0.1 U/mL凝血酶刺激2 d组，3：0.1 U/mL凝血酶预处理2 d+CBP非同源序列shRNA/Ad干预2 d组，4：0.1 U/mL凝血酶预处理2 d+空腺病毒干预2 d组，5：0.1 U/mL凝血酶预处理2 d+MOI12 CBP-shNA/Ad干预2 d组，6：0.1 U/mL凝血酶预处理2 d+MOI16 CBP-shNA/Ad干预2 d组，7：0.1 U/mL凝血酶预处理2 d+MOI25 CBP-shNA/Ad干预2 d组，8为0.1 U/mL凝血酶预处理2 d+MOI50 CBP-shNA/Ad干预2 d组。图4 半定量RT-PCR分析CBP-shNA/Ad对VSMCs CBP mRNA表达的影响与空白对照组相比， $\Delta P<0.01$ ；与0.1 U/mL凝血酶刺激2 d组相比，\* $P<0.01$  A为Western blot结果。B为以 $\beta$ -actin内参进行标化的CBP蛋白质相对光密度值：1-8同图4图5 Western blot分析CBP-shNA/Ad对VSMCs CBP蛋白质表达的影响

### 2.5 CBP-shRNA/Ad对VSMCs细胞周期的影响

流式细胞仪检测结果显示，较空白对照组，凝血酶预处理组G0/G1期细胞比例下降16%( $q=9.868$ ,  $P<0.05$ )，S期细胞比例升高5.4%( $q=7.991$ ,  $P<0.05$ )；空腺病毒转染对照组和非CBP同源序列-shRNA/Ad阴性对照组转染细胞后，较凝血酶预处理组相比，G0/G1期和S期细胞比例无明显变化( $P>0.05$ )。MOI12、MOI16、MOI25、MOI50的CBP-shRNA/Ad各组与凝血酶预处理组相比，VSMCs G0/G1期细胞比例呈明显上升趋势( $q=4.332$ 、9.029、18.311、20.246,  $P<0.05$ )，S期细胞比例下降( $q=3.439$ 、10.786、10.553、12.950,  $P<0.05$ ) (图6)。与空白对照组相比， $\Delta P<0.01$ ；与0.1 U/mL凝血酶刺激2 d组相比，\* $P<0.01$ 图6 流式技术分析CBP-shNA/Ad对VSMCs细胞周期的影响(1-8同图4,5)

## 3 讨论

RNAi诱导的基因沉默具有低毒性、特异性、高效性的特点，作为基因治疗方法引起了许多研究者的兴趣[9]。我们根据RNAi原理，构建CBP-shRNA/Ad，经酶切电泳分析证实可同时编码4条针对rCBP mRNA特异的shRNA目的基因准确插入了腺病毒载体。腺病毒转染VSMCs后免疫荧光显微镜下出现大量表达绿色荧光蛋白的贴壁细胞，证实构建的CBP-shRNA/Ad能有效转染VSMCs。MOI为12、16、25、50的CBP-shRNA/Ad转染VSMCs 2 d，倒置显微镜下观察未见细胞变圆或体积减小、未见细胞脱落或碎片浮起，证明在该实验浓度范围内CBP-shRNA/Ad转染VSMCs是安全的。在CBP-shRNA/Ad组，RNAi可以抑制凝血酶诱导的VSMCs CBP mRNA和蛋白质高表达。这种作用未在空腺病毒转染对照组和非CBP同源序列-shRNA/Ad阴性对照组中出现，证实RNAi具有特异性。

动脉粥样硬化和再狭窄等血管增殖性疾病主要表现为血管平滑肌细胞的迁移增殖，血管壁的增厚[10]。有研究提示调节子

CBP作为许多细胞信号传导途径的共通通路,参与多基因表达改变介导的血管损伤处VSMCs在增殖 [11]。CBP协助转录因子NF- $\kappa$ B[12]、CREB[13]、Src-3[14]、STAT-3[15]等,上调VSMC增殖相关蛋白的表达,刺激VSMCs增殖。此外, CBP的内在乙酰基转移酶活性可以乙酰化组蛋白,导致染色体重构,加强增殖相关基因转录,促进VSMC增殖[16]。Kawahara等[8]研究显示凝血酶通过上调VSMCs核中调节子CBP水平,诱导冠状动脉损伤处VSMCs增殖。因此,本研究采用0.1 U/mL凝血酶干预VSMCs 2 d,模拟损伤血管的病理生理状态,发现凝血酶可明显上调CBPmRNA和蛋白质表达含量,刺激VSMCs从G0/G1期进入S期。CBP-shRNA/Ad干预VSMCs,可高效下调凝血酶诱导的VSMCs CBP mRNA表达含量,导致蛋白质表达含量降低;与凝血酶预刺激组相比,流式细胞技术提示随着CBP-shRNA/Ad干扰作用的增强, G0/G1期细胞比例逐渐上升, S期细胞比例逐渐下降,细胞周期被阻滞。提示CBP-shRNA/Ad通过减少CBPmRNA和蛋白质表达含量,抑制VSMCs增殖。

总之,本研究初步提示CBP-shRNA/Ad下调 CBP表达,可有效抑制凝血酶诱导的VSMCs的增殖,对血管增殖性疾病是一种很有前景的治疗方式。如何将其成功安全地运用于体内实验,有待进一步探讨。

#### 【参考文献】

- 1 Luscher TF, Steffel J, Eberli F R, et al. Drug-eluting stent and coronary thrombosis: biological mechanisms and clinical implications[J]. *Circulation*, 2007, 115(8): 1051-1058.
- 2 Kalkhoven E. CBP and p300: HATs for different occasions[J]. *Biochem Pharmacol*, 2004,68(6): 1145-1150.
- 3 Goodman RH, Smolik S. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development[J]. *Genes Dev*, 2000, 14(13): 1553-1577.
- 4 Kawahara K, Kawabata H, Aratani S, et al. Hyper nuclear acetylation (HNA) in proliferation, differentiation and apoptosis[J]. *Ageing Res Rev*, 2003,2(3): 287-297.
- 5 Vastenhouw NL, Brunschwig K, Okihara KL, et al. Gene expression, long-term gene silencing by RNAi[J]. *Nature*, 2006,442(7105): 882.
- 6 Wu Rc, Wang Z, Liu MJ, et al.  $\beta$ 2-integrins mediate a novel form of chemoresistance in cycloheximide-induced U937 apoptosis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61(16): 2071-2082.
- 7 Liu G, Xia T, Chen X. The activation domains, the proline-rich domain, and the C-terminal basic domain in p53 are necessary for acetylation of histones on the proximal p21 promoter and interaction with p300/CREB-binding protein[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(19): 17557-17565.
- 8 Kawahara K, Watanabe S, Ohshima T, et al. Hypernuclear acetylation in atherosclerotic lesions and activated vascular smooth muscle cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999,266(2): 417-424.
- 9 Bumcrot D, Manoharan M, Kotliansky V, et al. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs[J]. *Nat Chem Biol*, 2006,2(12): 711-719.
- 10 赵荫涛, 赵春霞, 汪培华, 等. 苯扎贝特对血管平滑肌细胞增殖和迁移的影响[J]. *中华心血管病杂志*, 2006,34(3): 267-270.
- 11 Chan HM, La Thangue NB. p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds[J]. *J Cell Sci*, 2001, 114(Pt13): 2363-2373.
- 12 Sharma RV, Gurjar MV, Bhalla RC. Selected contribution, estrogen receptor-alpha gene transfer inhibits proliferation and NF-B activation in VSM cells from female rats[J]. *J Appl Physiol*, 2001,91(5): 2400-2406.
- 13 Rius J, Martinez-Gonzalez J, Crespo J, et al. Involvement of neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) in LDL-induced mitogenic stimulus in vascular smooth muscle cells: role of CREB[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(4): 697-702.
- 14 Walcher D, Babida C, Ppotek P, et al. C-peptide induces vascular smooth muscle cell proliferation: involvement of SRC-kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, and extracellular signal-regulated kinase 1/2[J]. *Circ Res*, 2006, 99(11): 1181-1187.
- 15 Zhang Y, Sif S, Dewille J. The mouse C/EBPdelta gene promoter is regulated by STAT3 and Sp1 transcriptional activators, chromatin remodeling and c-Myc repression[J]. *J Cell Biochem*, 2007,102(5): 1256-1270.
- 16 Anne-Laurence B, Caroline R, Irina P, et al. Chromatin acetylation status in the manifestation of neurodegenerative diseases: HDAC inhibitors as therapeutic tools[J]. *Subcell Biochem*, 2007,41: 263-293.



考试宝典-高分练兵场



揭秘论文“低价”根源



医学编辑中心



邮箱投稿视频教程

相关文章



▶ CBP基因沉默抑制血管平滑肌细胞增殖的研究

2011-12-9

★ 加入收藏夹

👤 复制给朋友

🌐 分享到外站

评论内容

请文明上网，文明评论。

发表评论

重置

▲ 上一页

当前第1页，共1页

▼ 下一页