

[文章编号] 1000-4718(2008)03-0582-04

PDGF - B 反义寡脱氧核苷酸对大鼠肝星状细胞增殖及 I 型胶原合成的影响

杨雅丽, 韩跃武

(兰州大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 甘肃 兰州 730000)

[摘要] 目的:探讨 PDGF - B 反义寡脱氧核苷酸(ASODN)对大鼠肝星状细胞(HSCs)增殖及 I 型胶原合成的影响。方法:合成了特异性的 PDGF - B 硫代磷酸 ASODN 及其对照错义寡脱氧核苷酸(MSODN),并将其加入至培养的 HSCs。采用 MTT 法检测 PDGF - B ASODN 对 HSCs 的增殖抑制作用,RT - PCR 检测 PDGF - B 和 collagen - I mRNA 的表达,流式细胞仪与 ELISA 法分别检测 PDGF - B 的表达和 I 型胶原的合成。结果:PDGF - B ASODN 在终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$,作用 HSCs - T₀ 细胞 48 h 时,能明显地抑制其增殖,降低 PDGF - B 和 collagen - I mRNA 的表达;FCM 与 ELISA 分析表明,HSCs 表达 PDGF - B 和合成 I 型胶原都明显低于对照组,而对对照组寡脱氧核苷酸在相同浓度下未见抑制效应。结论:PDGF - B ASODN 可以抑制 HSCs 的增殖、I 型胶原的合成、内源性 PDGF - B 的表达,可能成为一种有用的抗肝纤维化基因治疗的药物。

[关键词] 血小板源性生长因子;肝星状细胞;肝硬化;寡核苷酸类,反义

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Effects of proliferation of rat hepatic stellate cells and collagen - I production by antisense oligodeoxynucleotides against platelet - derived growth factor B - chain

YANG Ya - li, HAN Yue - wu

(Department of Biochemistry & Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China. E - mail: yali5672@163.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effect of antisense oligodeoxynucleotides against platelet - derived growth factor B - chain (PDGF - B) in the proliferation of cultured rat hepatic stellate cells and collagen - I production. **METHODS:** The phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides and missense oligodeoxynucleotides were synthesized. The rat hepatic stellate cells (HSCs) were treated with these oligodeoxynucleotides at different concentrations, respectively. The inhibition of the proliferating of cultured rat hepatic stellate cells was assayed by MTT method. The expressions of PDGF - B and collagen - I mRNA were detected by means of reverse transcription - polymerase chain reaction (RT - PCR). The expression of endogenous PDGF - B was determined by flow cytometry (FCM). Collagen - I in the supernatant was determined by ELISA. **RESULTS:** The results showed that the ASODN against the PDGF - B at a final concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$ inhibited the HSCs proliferation, the expressions of PDGF - B and collagen - I mRNA. FCM and ELISA demonstrated that the expression of endogenous PDGF - B and the production of collagen - I in HSCs were significantly lower than those in controls, whereas the controls (missense oligodeoxynucleotides) had no effect at the same concentration. **CONCLUSION:** PDGF - B ASODN inhibits the proliferation of cultured rat hepatic stellate cells, the endogenous expression of PDGF - B and the production of collagen. PDGF - B ASODN might be useful for gene therapy in liver fibrosis.

[KEY WORDS] Platelet - derived growth factor; Hepatic stellate cells; Liver cirrhosis; Oligonucleotides, antisense

肝纤维化(liver fibrosis, LF)是一种常见的慢性 HSCs)是肝纤维化形成的细胞学基础。血小板衍生进行性肝病。肝星状细胞(hepatic stellate cells, 生长因子(platelet - derived growth factor, PDGF)是

[收稿日期]2006-02-28 [修回日期]2006-05-25

Tel:0931-8626542; E-mail:yali5672@163.com

HSCs 最强的有丝分裂原^[1], 激活 HSCs 增殖、活化, 并合成、分泌大量细胞外基质 (extra cellular matrix, ECM)^[2], 参与肝纤维化的发生。因此, 抑制 PDGF 的产生或对其作用进行拮抗是抗肝纤维化的重要途径。反义寡脱氧核苷酸 (antisense oligodeoxynucleotides, ASODN) 能够抑制靶基因的表达, 作为一种潜在的治疗药物被广泛地研究^[3]。本研究针对 PDGF-B mRNA 的翻译起始区设计了 ASODN 及其对照错义寡脱氧核苷酸 (missense oligodeoxynucleotides, MSODN), 并观察它们对 HSCs 的增殖和胶原合成的抑制作用, 为寻找一种新的抗肝纤维化治疗药物提供理论基础。

材 料 和 方 法

1 材料

DMEM (高糖型) 培养基、胎牛血清为 Gibco 公司产品, MTT 购自华美生物工程公司, UNIQ-10 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒、AMV 一步法 RT-PCR 扩增试剂盒购自上海生物工程公司, 兔抗大鼠 PDGF-B 单克隆抗体购自武汉博士德公司, 羊抗兔 IgG-FITC 购自华美生物工程公司, I 型胶原 ELISA 试剂盒购自北京尚柏生物工程公司, 其它试剂均为分析纯。

2 细胞培养

大鼠 HSC-T₀ 细胞由上海中医药大学肝病研究所徐列明教授提供, 该细胞株为 SV40 转染的 SD 大鼠 HSC, 其表型为活化的 HSC^[4]。于含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM (高糖型) 培养基中培养, 37 °C、50 mL/L CO₂ 孵箱内贴壁生长, 用 2.5 g/L 胰酶消化传代, 以台盼蓝法测定细胞活力。

3 寡核苷酸的设计与合成

利用 GenBank 上查得大鼠 PDGF-B cDNA, 根据其翻译起始区域 18 个碱基序列 (包括起始密码 ATG) 为模板, 设计针对 PDGF-B 的 ASODN 和 MSODN, 并对 3' 末端 3 个碱基进行硫代磷酸化修饰, 提高 ASODN、MSODN 的血清稳定性。ASODN 序列如下: 5' - CAGCGATTCATGCCGACTCC - 3', MSODN 序列为: 5' - CTGGTCTGCGATAGACGCAG - 3'。寡核苷酸的合成和修饰均由上海生物工程公司完成。

4 MTT 法测细胞增殖活性

采用 MTT^[5] 法测定 HSC-T₀ 细胞增殖活性。

4.1 实验分组 按实验目的将 HSC-T₀ 细胞分为以下几组: ASODN 组、MSODN 组、对照组 (3% FCS), 各组分别设 2.5 μmol/L、5 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L 浓度, 寡核苷酸使用前用不含血清不含抗生素的 DMEM 稀释成所需浓度。

4.2 细胞增殖实验 取对数生长期 HSC-T₀ 细胞

用含 100 mL/L 胎牛血清 DMEM 配制成 1×10^7 cells/L 细胞悬液接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μL (另设不加细胞只加培养基的空白调零孔), 在 37 °C、50 mL/L CO₂ 孵箱中孵育 24 h, 弃培养液, 各组分别加入不同浓度寡核苷酸 50 μL, 对照组加入不含血清不含抗生素的 DMEM 50 μL, 继续培养 4 h 后, 加入 30 mL/L 胎牛血清的 DMEM 150 μL, 继续培养至 24 h、48 h、72 h 后 (每组设 4 个复孔), 吸出培养液, 每孔加入 5 g/L MTT 液 (20 μL/well), 孵育 4 h 后弃上清液, 轻轻叩干, 每孔分别加入二亚基甲砒 (DMSO) 150 μL, 振荡裂解 10 min 后, 等蓝色结晶溶解后, 用酶标仪在 490 nm 波长、空白孔调零, 测定吸光度 (A) 值, 用以代表 HSCs 增殖抑制率。抑制率 = $(1 - \text{处理组 } A \text{ 值} / \text{对照组 } A \text{ 值}) \times 100\%$ 。根据实验结果选择 ASODN 作用 HSC-T₀ 细胞的最佳浓度和最佳时间。

5 ASODN 对 PDGF-B 和 collagen-I mRNA 表达的影响

参照文献^[6], 寡核苷酸作用 HSC-T₀ 细胞 48 h 后, 按照试剂盒说明书操作, 用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 以 GAPDH 为内参照, AMV 一步法 RT-PCR 检测 PDGF-B 和 collagen-I mRNA 的表达。引物序列分别为: PDGF-B 上游 5' - GGCTGCCGT-GTTCCTTTT - 3', 下游 5' - GCTCAGCCCCATCTTCGT - 3', 扩增产物为 555 bp; collagen-I 上游 5' - AC-CAAGGCTGCAACCTGGAC - 3', 下游 5' - GAATC-CATCGGTCATGCTCT - 3', 扩增产物为 167 bp; GAPDH 上游 5' - TGCTGAGTATGTCGTGGAG - 3', 下游 5' - GTCTTCTGAGTGGCAGTGAT - 3', 扩增产物为 288 bp; PCR 扩增条件: 逆转录 37 °C 35 min; 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 15 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物凝胶电泳, 凝胶图像分析系统 (Syngene ChemiGenius 2) 分析。

6 流式细胞仪测定 PDGF-B 的表达^[7]

收集寡核苷酸作用 48 h 的 HSC-T₀ 细胞 1×10^6 个, PBS 洗涤, 加入 FIX&PERM 各孵育 15 min, PBS 洗涤, 加入兔抗鼠 PDGF-B I 抗, 室温孵育 15 min, PBS 洗涤, 再加入羊抗兔 IgG-FITC II 抗孵育 15 min, PBS 洗涤, FCM 检测。

7 ELISA 法 (双抗体夹心法) 检测 I 型胶原的合成^[8]

寡核苷酸作用 HSC-T₀ 细胞 48 h 后收集细胞上清液, 按照 I 型胶原 ELISA 试剂盒操作说明书操作。上清和不同浓度的 I 型胶原标准品加入已包被抗大鼠 collagen-I 单抗的酶标板上, 37 °C 反应 120 min, 洗板, 继之加入第 I 抗体工作液、酶标抗体工作液, 邻苯二胺显色, 酶标仪波长 492 nm 测定吸光度 (A) 值, 绘出标准曲线, 根据样品吸光度值在该曲线

图上查出相应 collagen - I 含量。

8 统计学处理

采用 SPSS 10.0 for Windows 软件包处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,根据方差齐性检验结果,两组间比较采用独立样本 *t* 检验或 Mann - Whitney *U* 检验。多组间比较采用单因素方差分析或 Kruskal - Wallis *H* 检验。

结 果

1 细胞活力测定

HSC - T₆ 细胞活力 > 95 %。

2 ASODN 对 HSC - T₆ 增殖的影响

结果见表 1。与对照组相比 ASODN 呈浓度依赖

性抑制 HSC - T₆ 细胞增殖,其浓度在 2.5 - 10 μmol/L 时显著,当 ASODN 为 10 μmol/L,作用 HSC - T₆ 细胞 48 h 时,细胞数量减少达最大值(51.69%),而且当 ASODN 达到 20 μmol/L 或 ASODN 作用 72 h 时,其抑制细胞增殖的作用不再增加,并有所减弱。MSODN 在高浓度 20 μmol/L 时,对 HSC - T₆ 细胞具有细胞毒作用。在 2.5 - 10 μmol/L 浓度区间仅有浓度依赖性轻度细胞毒作用的趋势,无统计学上的差异。说明 ASODN 在 2.5 - 10 μmol/L 浓度区间抑制 HSC - T₆ 细胞增殖为序列特异性作用,而 ASODN 在 20 μmol/L 浓度时抑制 HSC - T₆ 细胞增殖既有序列特异性的作用,也有非序列特异性细胞毒作用。

表 1 ASODN 对 HSC - T₆ 增殖的影响

Tab 1 Effects of ASODN on the proliferation of HSC - T₆ cells ($\bar{x} \pm s$, *n* = 4)

Group	24 h		48 h		72 h		
	A value	IR (%)	A value	IR (%)	A value	IR (%)	
Normal control	0.548 ± 0.014	-	0.561 ± 0.011	-	0.574 ± 0.008	-	
ASODN	2.5 μmol/L	0.508 ± 0.006	7.29*	0.503 ± 0.013	10.34*	0.514 ± 0.009	10.63*
	5 μmol/L	0.456 ± 0.006	16.78**	0.418 ± 0.012	25.49**	0.431 ± 0.020	24.91**
	10 μmol/L	0.369 ± 0.009	34.85**	0.271 ± 0.009	51.69**	0.284 ± 0.014	50.52**
	20 μmol/L	0.389 ± 0.007	28.96**	0.329 ± 0.014	41.35**	0.343 ± 0.014	40.24**
MSODN	2.5 μmol/L	0.541 ± 0.004	1.28	0.551 ± 0.002	1.78	0.565 ± 0.007	1.57
	5 μmol/L	0.539 ± 0.012	1.64	0.549 ± 0.006	2.14	0.562 ± 0.017	2.09
	10 μmol/L	0.534 ± 0.006	2.55	0.544 ± 0.005	3.03	0.556 ± 0.017	3.14
	20 μmol/L	0.457 ± 0.011	16.61**	0.438 ± 0.012	21.92**	0.467 ± 0.012	18.64**

* *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs control. IR:inhibition rate.

3 ASODN 降低 HSC - T₆ 细胞 PDGF - B 和 collagen - I mRNA 的表达

10 μmol/L 的 PDGF - B ASODN 作用 HSC - T₆ 细胞 48 h 后可明显降低 PDGF - B 和 collagen - I mRNA 的表达,而 MSODN 在相同浓度下无此作用。经计量分析,10 μmol/L ASODN 处理 HSC - T₆ 细胞 48 h 的抑制率分别为 48.7%、53.9%,见图 1。

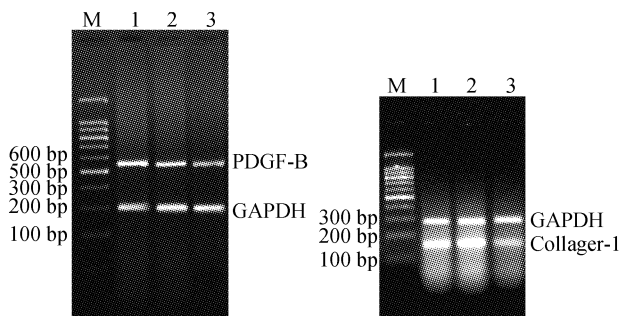


Fig 1 Expression of PDGF - B and collagen - I mRNAs in HSC - T₆ cells by 10 μmol/L ASODN after 48 h. M: marker; 1: normal control; 2: MSODN group; 3: ASODN group.

图 1 10 μmol/L ASODN 作用 HSC - T₆ 细胞 48 h 后 PDGF - B、collagen - I mRNA 的变化

4 ASODN 对 HSC - T₆ 细胞内源性 PDGF - B 表达的影响

如图 2 所示,10 μmol/L 的 PDGF - B ASODN 对 HSC - T₆ 细胞内源性 PDGF - B 的表达有明显的抑制作用,而 MSODN 组及对照组无抑制作用。

5 ASODN 抑制 HSC - T₆ 细胞合成 I 型胶原

表 2 结果显示,10 μmol/L 的 PDGF - B ASODN 作用 HSC - T₆ 细胞 48 h 后可以显著抑制 (*P* < 0.01) HSC - T₆ 细胞合成 I 型胶原,而对对照组以及相同浓度的 MSODN 无此抑制作用 (*P* > 0.05)。

讨 论

肝纤维化是各种慢性肝病共有的病理学改变,其形成是由于 ECM 合成和降解比例失调所致。肝纤维化的防治是当今肝病治疗的难点之一,也是国际上研究的热点。目前对肝纤维化及肝硬化的生物治疗已经成为人们关注的一个焦点,生物治疗包括免疫治疗和基因治疗,其中比传统的治疗有更高特异性的反义核酸技术已受到人们的关注。Erawan 等^[10] 研究证明,反义抑制 PDGF - B 链的翻译在体外

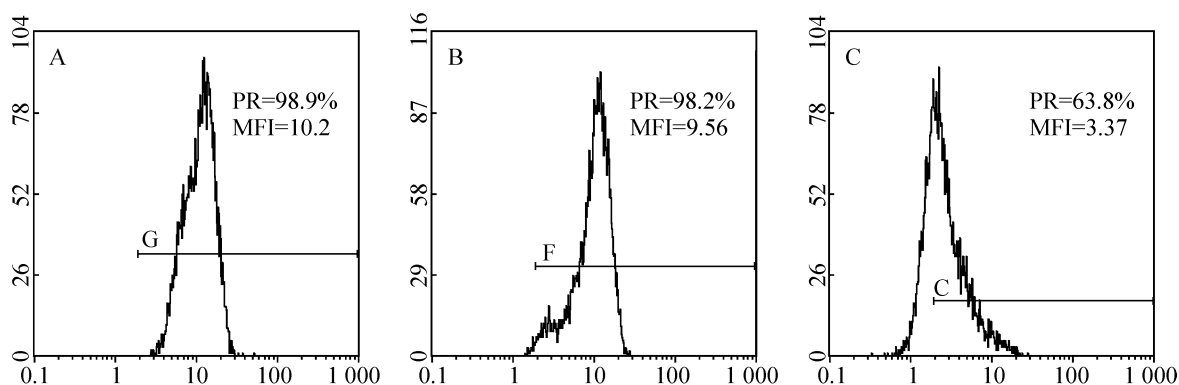


Fig 2 Effect of 10 $\mu\text{mol/L}$ ASODN on PDGF - B expression of HSC - T_6 cells. A: normal control; B: MSODN group; C: ASODN group. PR: positive rate; MFI: mean fluorescence intensity.

图 2 10 $\mu\text{mol/L}$ ASODN 对 HSC - T_6 细胞表达 PDGF - B 的影响

表 2 ASODN 对 HSC - T_6 细胞 I 型胶原合成的抑制

Tab 2 Inhibition of ASODN on collagen - I production of HSC - T_6 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Group	A value	Collagen - I ($\mu\text{g/L}$)
Normal control	1.105 \pm 0.065	392.297 \pm 27.267
MSODN	1.042 \pm 0.060	365.593 \pm 25.411
ASODN	0.553 \pm 0.434**	159.546 \pm 18.313**

** $P < 0.01$ vs control.

培养的 HSC 以及实验性肝纤维化动物模型中抗肝纤维化均是有效的。所以,如能对 PDGF - BB 转录、翻译以及翻译后修饰等过程的任何环节实行调控均可有利于肝纤维化的治疗。

反义核酸技术一门全新的基因工程技术,是指用人工或生物合成特定互补的 DNA 或 RNA 序列,导入靶细胞,特异性地与靶 DNA 或靶 mRNA 结合,从基因复制、转录、mRNA 转运、翻译等水平抑制或封闭基因表达,使基因丧失功能,为预防和治疗某些基因相关的疾病提供了一条合理的途径。

本研究利用 PDGF - B ASODN 抑制 PDGF - B 表达的原理,探讨了 PDGF - B ASODN 对 HSCs 增殖及其胶原合成的作用。我们根据大鼠 PDGF - B mRNA 的序列,设计合成了长度为 20 个核苷酸,与 PDGF - B mRNA 翻译起始区(包括 ATG)互补的 ASODN;寡核苷酸均采用 3' 末端 3 个碱基硫代磷酸修饰,这样不易被核酸酶消化,增加了 ASODN 在细胞内的稳定性。硫代磷酸化修饰的 ODN 具有浓度依赖性的非序列特异性细胞毒作用,选择一个有效的转染方法,提高 ASODN 转入细胞内的效率可降低这种非特异性作用。

本研究显示,PDGF - B ASODN 对体外培养的 HSCs 的增殖、内源性 PDGF - B 的表达及其胶原合成均有抑制作用,而 MSODN 在相同浓度下未见有效的抑制作用。由此可见,PDGF - B ASODN 将可能成为一种有用的抗肝纤维化基因治疗的药物。提高

PDGF - B ASODN 的体内稳定性与摄入率,对加强其抗肝纤维化的作用有重要意义,值得进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Mak KM, Lieber CS. Lipocytes and transitional cells in alcoholic liver disease; a morphometric study [J]. Hepatology, 1988, 8(5): 1027 - 1033
- [2] Pnzani M, Knauss TC, Pierce GF, et al. Mitogenic signals for platelet - derived growth factor isoforms in liver fat - storing cells [J]. Am J Physiol, 1991, 260(3Pt 1): C485 - C491
- [3] Wagner RW. Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides [J]. Nature, 1994, 372(24): 333 - 335
- [4] Friedman SL, Lalazar A, Wong L, et al. HSC - T_6 cells, an immortalized rat hepatic stellate cell line [J]. Hepatology, 1997, 26(4Pt): 338A
- [5] 马金霞,潘世扬,张卫,等. MTT 比色法用于肿瘤细胞体外药物敏感性试验的检测 [J]. 临床检验杂志, 2002, 20(2): 104 - 106.
- [6] 马会慧,姚集鲁,姚春澜,等. 逆转录病毒介导的反义 c - myb 对肝星状细胞增殖及 I 型胶原基因表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(6): 726 - 729
- [7] Li WF, Zhou DB, Yu XG, et al. Inhibiting the expression of PDGF2B chain and the proliferation of C6 glioma cells with triplex 2 forming oligonucleotide [J]. Acad J PLA Postgrad Med Sch, 2004, 25(3): 161 - 163
- [8] Mallat A, Preaux AM, Blazejewski S, et al. Interferon alfa and gamma inhibit proliferation and collagen synthesis of human Ito cells in culture [J]. Hepatology, 1995, 21(4): 1003 - 1010
- [9] 冉丕鑫. 血小板生长因子研究进展 [J]. 国外医学:生理病理科学与临床分册, 1993, 13: 136 - 138.
- [10] Erawan BK, Doris S, Axel M, et al. Antisense strategy against PDGF B - chain proves effective in preventing experimental liver fibro genesis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 321(4): 413 - 423.