

蛋白激酶 B 短发夹环 RNA 表达载体的构建及其对血管平滑肌细胞增殖活性的影响

于维东¹, 胡新华², 范红杰³, 杨 军², 张 强²

(中国医科大学附属第一医院 1. 干诊三病房; 2. 外科, 辽宁省沈阳市 110001;

3. 中国医科大学附属盛京医院神经内科, 辽宁省沈阳市 110003)

[关键词] 病理学与病理生理学; 血管平滑肌细胞; 增殖活性; 蛋白激酶 B; 表达载体; 短发夹环 RNA; RNA 干扰

[摘要] 目的 构建靶向蛋白激酶 B 基因的短发夹环 RNA 表达载体, 观察其对血管平滑肌细胞增殖活性的影响。方法 设计多个针对大鼠蛋白激酶 B 基因的短发夹环 RNA 序列, 化学合成方法合成并经 pGEM-T 载体克隆后双酶切, 将 cDNA 序列插入逆转录病毒载体 pLXIN, 包装后获得蛋白激酶 B 的逆转录表达载体, 感染血管平滑肌细胞, Northern blot 和 Western blot 法检测蛋白激酶 B 及其下游底物的表达变化, 流式细胞仪检测细胞周期变化, MTT 法检测血管平滑肌细胞增殖活性的改变。结果 成功构建蛋白激酶 B 基因的逆转录病毒载体并包装, 感染血管平滑肌细胞, 证实其能显著抑制蛋白激酶 B 的 mRNA 和蛋白产物表达, 下游的 p70s6k 表达相应减少; 被感染血管平滑肌细胞的分裂、增殖过程受阻, 更多细胞停滞在 G₀/G₁ 期。结论 成功构建蛋白激酶 B 基因逆转录病毒 RNA 干扰表达载体, 感染血管平滑肌细胞能够明显抑制其分裂、分化和增殖。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Construction of Short Hairpin RNA Vector Targeting PKB/Akt and Its Effect on the Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cell

YU Wei Dong, HU Xir-Hua, FAN Hong-Jie, YANG Jun, and ZHANG Qiang

(Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Vascular Smooth Muscle Cell; Proliferation Activity; PKB/Akt; Expression Vector; shRNA; RNA Interference

[ABSTRACT] **Aim** To construct short hairpin RNA (shRNA) retroviral vector of PKB/Akt and study the effect on the proliferation of vascular smooth muscle cell (VSMC). **Methods** The sequence of shRNA of PKB/Akt was constructed by the software and synthesized by chemical method and then was cloned into pGEM-T vector, which was certified by DNA sequencing.

The sequence was inserted into a retroviral vector pLXIN, then the vector was packaged in PT67 cells. The efficiency of inhibition was verified by Northern blot and Western blot after transfection to VSMC. The change of p70s6k was also determined at the same time. The proliferation activity was determined by flow cytometry and MTT. **Results** The PKB/Akt shRNA vector was successfully constructed by means of recombinant DNA technology and cell transfection. Additionally, the vector could efficiently decrease mRNA and protein expression of PKB/Akt, while the expression of p70s6k also decreased significantly. The cell cycle VSMC was also stunned in phase G₀/G₁.

Conclusion The PKB/Akt shRNA retroviral vector has been constructed successfully, which can significantly inhibit the proliferation of VSMC.

蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 是一种分子质量为 60 kDa 的蛋白激酶, 由于这种激酶是逆转录病毒 Akt8 癌基因 ν -Akt 编码的蛋白产物, 故也称为 Akt。PKB 是磷脂酰肌醇三磷酸激酶 (phosphatidylinositol 3-OH kinase, PI3K) 下游的一个靶位点。活化后的 PKB 在糖代谢、蛋白合成以及基因表达等过程

中起着重要的调节作用^[1]。PKB 是细胞存活信号通路中的关键调节者, 能够促进细胞存活、抑制细胞凋亡。为此, 本研究拟构建靶向 PKB 基因的 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 表达载体, 转染离体培养的血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC), 观察其对 VSMC 增殖活性的影响, 探讨其机制及意义。

[收稿日期] 2006-12-07 [修回日期] 2007-08-20

[基金项目] 国家自然科学基金 (30672048, 30400435); 辽宁省博士启动基金 (20041053); 辽宁省教育厅高等学校科研项目 (05L485)

[作者简介] 于维东, 硕士, 主治医师, 研究方向为缺血性脑血管病的防治, E-mail 为 yuweidongcmu@126.com。通讯作者胡新华, 博士, 副教授, 主要从事血管外科疾病的研究工作。范红杰, 博士, 副教授, 研究方向为缺血性脑血管病再灌注损伤机制。

1 材料与方法

1.1 材料

限制性内切酶、连接酶、质粒抽提试剂盒、胶回

收试剂、pLXIN 载体及其他主要试剂为 Promega 公司和华美生物公司产品。pGEM-T 载体、PT67 细胞、大肠杆菌 DH5 α 由本校细胞生物重点实验室馈赠。扩增用引物由 Primer5 软件设计, 大连宝生物公司合成。转染用脂质体为美国 GIBCO/BRL 公司产品。

1.2 PKB 短发夹环 RNA 的设计

在 GeneBank 中查到大鼠 PKB 的基因序列(登录号:NM_033230) 并输入到 RNAi 设计软件中, 选择 RNAi 片段序列, 用 BLAST 软件进行同源性分析。短发夹环 RNA(shRNA) 序列的排列顺序均为: BamH I 酶切位点+ 反义序列+ Loop+ 正义序列+ 终止信号+ Hind III 酶切位点。具体序列如下:

shRNA1: 针对 129~ 157 之间的 29 bp, 5'-GGA TCC CGT GTA GCC AAT AAA GGT GCC ATC ATT CTT GTT GAT ATC CGC AAG AAT GAT GGC ACC TTT ATT GGC TAC ATT TTT TCC AAA AGC TT-3'。

shRNA2: 针对 561~ 589 之间的 29 bp, 5'-GGA TCC CGT CTT GAG GAT CTT CAT GGC ATA GTA GCG ATT GAT ATC CGT CGC TAC TAT GCC ATG AAG ATC CTC AAG ATT TTT TCC AAA AGC TT-3'。

1.3 T 载体克隆

采用化学合成法合成单链寡核苷酸, 通过 BamH I 和 Hind III 位点酶切、回收, 经 T₄ 连接酶插入 pGEM[®]-T 载体。连接反应体系体积 10 μ L, 含 5 μ L 2 \times 连接反应缓冲液、1 μ L T 载体、1 μ L RT-PCR 产物(约 0.25 μ g)、1 μ L T₄ 连接酶, 4 $^{\circ}$ C 过夜。同时用 TSS 法制备感受态细胞: 大肠杆菌 DH5 α 在 LB 培养基中振荡至 A_{600 nm} 为 0.3~ 0.4, 取 1 mL 菌液, 4 $^{\circ}$ C 1000 RPM 离心 10 min, 将菌体重悬于 100 μ L TSS 液中。然后将上述连接产物加入感受态细胞中, 冰浴 30 min, 加入 500 μ L LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 1 h, 最后将菌液均匀涂布在含 IPTG/XGal/氨苄青霉素的 LB 平板上, 筛选阳性菌落, 提取重组质粒, 酶切鉴定。将筛选的重组子进行序列分析, 确认所得到克隆的序列正确。

1.4 RNAi 逆转录病毒载体的构建

BamH I、Xho I 分别双酶切重组 pGEM-T 载体, 凝胶电泳后回收目的片段。建立连接反应体系, 10 μ L 反应体系中含 5 μ L 2 \times 连接反应缓冲液、1 μ L 逆转录病毒载体 pLXIN、1 μ L 插入片段(约 0.25 μ g)、1 μ L T₄ 连接酶, 4 $^{\circ}$ C 过夜。BamH I、Xho I 双酶切 pLXIN 载体, 采用一端为粘端、另一端为平端的连接策略, 将 PKB 的 cDNA 序列反向插入 pLXIN 载体, 构建 RNAi 逆转录病毒载体, 转化大肠杆菌 DH5 α , 氨苄青霉素培养基筛选阳性菌落, 碱裂解法提取重组质粒, 酶切

鉴定并测序。

1.5 包装重组病毒载体

按照 Lipofectamine2000 脂质体试剂说明书, 将 pLXIN-PKB-RNAi 质粒转染到包装细胞 PT67 中, 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h, 然后用含 600 mL/L 的 G418 的培养基培养 10 天。挑取阳性克隆, 用含 200 mL/L 的 G418 的培养基培养。同样方法包装非重组 pLXIN 空载体病毒, 作为实验对照。进行病毒原液提取和滴度测定, 以氯化铯法进行密度梯度离心提高病毒滴度。

1.6 pLXIN-PKB-RNAi 感染血管平滑肌细胞

分离大鼠胸主动脉, iv 型胶原蛋白酶消化分离 VSMC、培养于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中, 鉴定后, 培养 3~ 5 代细胞用于实验。VSMC 按 2×10^5 个细胞/孔, 接种于 6 孔板中培养, 使达到 60% 融合。用 1×10^9 pfu/mL 的 pLXIN-PKB-RNAi 50 μ L 感染 VSMC, 于 6 h、24 h、72 h 后用荧光显微镜观察 VSMC 形态学改变及感染情况, 4% 锥虫蓝染色, 400 倍光镜下计数 VSMC 活细胞数。

1.7 pLXIN-PKB-RNAi 对血管平滑肌细胞中 PKB 信号通路的影响

Northern blot 检测 mRNA 表达: 收集 VSMC 细胞, 提取总 RNA, RT-PCR 方法分别置备 PKB 及其下游的 p70s6k 的 cDNA 探针, 采用 Primer α Gene 随机引物标记试剂盒(Promega 公司) 分别进行 α -³²P-dCTP 标记。取 30 μ g 总 RNA, 经 1% 琼脂糖-甲醛凝胶变性电泳分离, 转移 RNA 到硝酸纤维素滤膜, 42 $^{\circ}$ C 条件下预杂交 3 h, 再加入 cDNA 探针进行杂交 16~ 18 h, 杂交膜先后经 2 \times SSC (0.5% SDS)、2 \times SSC (0.1% SDS)、0.1 \times SSC (0.5% SDS)、0.1 \times SSC 分别漂洗, -70 $^{\circ}$ C 放射自显影 48 h 后洗片。凝胶成像系统摄像, 分析各条带吸光度值, 与对应的 28S rRNA 条带比较。Western blot 检测蛋白表达: 细胞裂解提取总蛋白质, 凝胶电泳, 转膜。5% 脱脂奶粉封闭、一抗 1: 1000 稀释, 室温下反应 2 h 后常规洗膜、按 1: 1000 加入过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG-HRP 60 min, 洗膜后加入 ECL 2~ 3 min, 暗室显影 2 min 后冲洗胶片。凝胶成像系统上分析。PKB、p70s6k 和 GAPDH 抗体均为 Santa Cruz 公司产品(兔 IgG 多抗)。

1.8 pLXIN-PKB-RNAi 对血管平滑肌细胞增殖活性的作用

采用流式细胞仪检测细胞周期的相关细胞量的变化。四甲基偶氮唑盐(MTT) 比色法检测 VSMC 增殖活性: 细胞接种于 96 孔培养板, 移入 CO₂ 孵箱中, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养 24 h。生长

至 60% 融合时分组处理,再培养 24 h。检测前 4 h 吸去孔内培养上清液,按每孔 20 μ L (5 μ g/L) 加入 MTT 溶液,37 $^{\circ}$ C 继续培养至检测时点,终止培养。加入二甲基亚砜振荡,使紫色结晶物溶解。酶联免疫检测仪 490 nm 波长上检测各孔吸光度值(A 值)。

1.9 统计学处理

SPSS10.0 统计软件处理数据,组内差异采用方差分析,组间比较采用配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 T 载体克隆鉴定

T 载体克隆后挑选阳性菌落,提取质粒,采用 BamH I、Xho I 双酶切,筛选含正向插入目的片段的克隆。重组 T 载体长约 3.1 kb,双酶切后产生 135 bp 目的片段及 2.9 kb 载体片段(图 1),初步证实为目的片段。

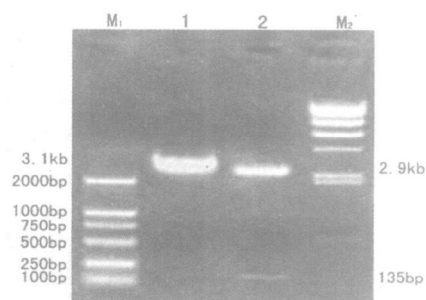


图 1. 重组 pGEM-T 载体酶切凝胶电泳图 M1 为 DL 2000 Marker, 1 为 BamH I 单酶切, 2 为 BamH I、Xho I 双酶切, M2 为 DNA/Hind EcoRI Marker。

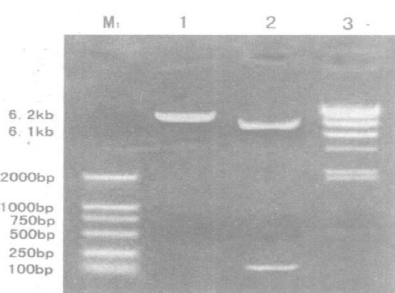


图 2. 重组 pLXIN-PKB-RNAi 载体酶切电泳图 M1 为 DL2000 Marker, 1 为 BamH I 单酶切, 2 为 BamH I、Xho I 双酶切, M2 为 DNA/Hind EcoRI Marker。

2.2 pLXIN-PKB-RNAi 载体的鉴定及包装

pLXIN-PKB-RNAi 重组质粒转化大肠杆菌,筛选阳性菌落并提取质粒 DNA,经 BamH I、Xho I 双酶切鉴定。含插入片段的重组质粒长约 6.2 kb,双酶切产生 135 bp 目的片段及 6.1 kb 载体片段,酶切结果见图 2。测序进一步验证。以 Lipofectamine 2000 为

转染介质,将 pLXIN-PKB-RNAi 转入 PT67 细胞,透射电子显微镜观察到 PT67 细胞中含有大量的多边形病毒颗粒,收获的病毒滴度达 1.8×10^8 cfu/mL。

2.3 感染血管平滑肌细胞及对蛋白激酶 B 表达的影响

正常 VSMC 呈梭形、胞质伸展、较多分支状突起、周界不清、放射性生长,部分区域多层重叠,部分区域单层,呈现 VSMC 特征性“峰”、“谷”状生长。感染 pLXIN-PKB-RNAi 细胞呈狭长梭形。锥虫蓝染色见感染后 VSMC 活细胞数明显减少,与对照组比较差异有显著性(表 1)。经过 Northern blot 和 Western blot 检测, VSMC 感染 pLXIN-PKB-RNAi 后, PKB 的 mRNA 和蛋白产物表达均显著降低,感染 72 h 降低最为显著,表达量降低为 1/5 左右, p70s6k 的 mRNA 和蛋白产物表达也显著减少,变化趋势与 PKB 一致(图 3、图 4)。

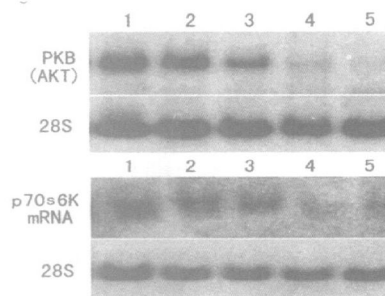


图 3. Northern blot 检测血管平滑肌细胞中 PKB 和 P70 s6k 的 mRNA 表达的变化 1 为血管平滑肌细胞, 2 为空载体, 3~5 分别为感染 shRNA1 载体 6 h、24 h 和 72 h。

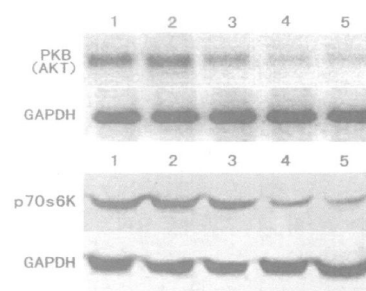


图 4. Western 蛋白印迹检测血管平滑肌细胞中 PKB 和 P70 s6k 蛋白表达的变化 1 为血管平滑肌细胞, 2 为空载体, 3~5 分别为感染 shRNA1 载体 6 h、24 h 和 72 h。

2.4 pLXIN-PKB-RNAi 感染对血管平滑肌细胞增殖活性的影响

流式细胞仪检测结果:感染前 VSMC 细胞 G_1/G_0 期比例为 68.6%, S 期为 14.4%;转染后, G_1/G_0 期比例增加, S 期比例却显著降低,凋亡细胞比例明显增加 ($P < 0.01$);表明 $G_0/G_1 \rightarrow S$ 过程受阻, VSMC 的分

裂、增殖受到抑制, 凋亡机制启动。MTT 法检测提示, 感染 VSMC 的吸光度值(A 值) 显著降低, 与正常

对照组、空载体组比较差异均有显著性意义($P < 0.01$; 表 1)。

表 1. 沉默 PKB 基因表达对血管平滑肌细胞数量、细胞周期及增殖活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

指标	对照组	空载体组	shRNA1			shRNA2		
			感染 6 h	感染 24 h	感染 72 h	感染 6 h	感染 24 h	感染 72 h
VSMC/HP	8.4 ± 2.2	8.0 ± 2.0	7.2 ± 2.4	6.0 ± 1.0 ^a	4.6 ± 1.2 ^{ab}	7.1 ± 1.6	6.2 ± 1.0 ^a	4.5 ± 0.5 ^{ab}
G ₁ /G ₀ 期(%)	68.6 ± 5.4	70.0 ± 8.6	76.0 ± 9.8	82.4 ± 8.2	87.8 ± 8.5 ^a	75.0 ± 8.2	83.2 ± 8.6	88.4 ± 8.1 ^{aa}
S 期(%)	14.4 ± 3.0	14.0 ± 3.7	11.0 ± 3.0	8.2 ± 2.0 ^a	5.2 ± 1.4 ^{ab}	11.6 ± 1.5	8.2 ± 2.5 ^a	5.8 ± 1.1 ^{ab}
凋亡(%)	1.6 ± 0.4	1.6 ± 0.8	3.4 ± 0.4	6.0 ± 1.0 ^{ab}	7.4 ± 2.8 ^a	2.2 ± 0.4	5.0 ± 1.5 ^{ab}	6.2 ± 2.4 ^a
A 值(MTT)	0.60 ± 0.08	0.56 ± 0.09	0.48 ± 0.04 ^a	0.40 ± 0.06 ^a	0.34 ± 0.08 ^{abb}	0.49 ± 0.09 ^a	0.40 ± 0.07 ^a	0.30 ± 0.04 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与前一时间组比较。

3 讨论

蛋白激酶 B(PKB) 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员, 也称为 Akt。PKB 是细胞存活信号通路中的关键调节者。在细胞发育的不同阶段 PKB 所发挥的作用可能并不相同, 在未分化的胚胎干细胞 PKB 可能对其自我更新和增殖的调节发挥重要作用。在已分化的细胞, PKB 则可能在维持细胞生存的基本前提下通过调节葡萄糖代谢和蛋白质合成等来促进细胞特定功能的行使, 而其表达异常则可能导致细胞生存状态和功能的异常改变, 如细胞的死亡、过度增生或恶性转化、代谢及功能失调^[2]。所以, PKB 通过 PI3K 途径被激活, 在细胞代谢、生长调节和抑制凋亡等生物活动过程中起着重要的调节作用, 有效地将胞外存活因子与胞内生长、代谢和凋亡机制的相关性有机的联系起来, 能够促进细胞存活、抑制细胞凋亡, 目前已知在一定条件下活化 PKB 是细胞存活所必需的。PKB 的研究已经成为细胞信号转导研究领域的一个新热点^[3]。

RNA 干扰也被称为基因沉默疗法, 是近年来发现和发展起来的新型基因阻断技术, 主要利用双链 RNA 诱发对宿主细胞特异性 RNA 转录的抑制, 从而抑制特异基因的表达^[4]。具有特异性强、效率高的特点。由于双链 RNA 在体内无法稳定表达而发挥作用, 人们发现小的发夹样 RNA 可以发挥与双链 RNA 相同的作用。通过在哺乳动物细胞内转染带有 RNA 聚合酶 ③启动子 H1 或 U6 的基因, 可以形成发夹样的 RNA^[5]。PKB 表达沉默的同时也引起与 VSMC 翻译过程密切相关的 p70s6k 基因和蛋白质表达减少。P70s6K 是蛋白质合成中重要的调控因子, 是蛋白质合成的正调控信号^[6]。p70s6k 通过磷酸化起始 5' Top mRNAs 的翻译, 是蛋白质合成的基础^[7]。

p70s6k 在细胞生长、增殖过程中起关键作用, 所以作者推测这也是 VSMC 的数量减少及体积改变的内在机制。作为 PKB 的直接底物, p70s6k 表达的改变将进一步影响 VSMC 分裂、分化和增殖。流式细胞仪结果进一步表明: PKB 基因表达沉默后, VSMC 的细胞周期受阻于 G₁/G₀ 期, S 期细胞减少而凋亡细胞显著增多, 初步证实了 PKB/p70s6k 信号通路在 VSMC 增殖周期的中心调控作用。VSMC 是血管壁的主要组成部分, 已证实 VSMC 的异常增殖是动脉粥样硬化、血管成形术后再狭窄的主要病理基础, 在移植血管内膜增生及病理性重塑过程中起重要作用。VSMC 的 PKB 基因表达得到有效“沉默”, 对逆转 VSMC 异常增殖性疾病的病理进程将发挥重要作用。

[参考文献]

- [1] Hemmings BA. Akt signaling: linking membrane events to life and death decisions [J]. *Science*, 1997, **275** (5 300): 628-630.
- [2] Balendran A, Casamayor A, Deak M, Paterson A, Gaffney P, Currie R, et al. PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2 [J]. *Curr Biol*, 1999, **9** (8): 393-404.
- [3] Toker A, Newton AC. Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK22 site [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275** (12): 8 271-274.
- [4] Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells [J]. *Nature*, 2000, **404** (6 775): 293-296.
- [5] Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (9): 6 047-052.
- [6] Ohanna M, Sobering AK, Lapointe T, Lorenzo L, Praud C, Petroulakis E, et al. Atrophy of S6K1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control [J]. *Nat Cell Biol*, 2005, **7** (3): 286-294.
- [7] Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB, Thomas G, et al. Rapamycin suppresses 5' TOP mRNA translation inhibition of p70 S6K [J]. *EMBO J*, 1997, **16** (12): 3 693-704.

(此文编辑 李玲玲)