

3 讨论

VEGF 是目前所知最强的内皮细胞选择性促有丝分裂因子和血管生成因子,它能在数分钟内增加微血管对血浆蛋白的通透性,其作用比组胺强 50 000 倍,这一独特的生物学效应使它对一些疾病的发生发展产生不良影响。

笔者前期的电镜学观察显示,大鼠暴露于 8 Hz、130 dB 次声作用下血-视网膜屏障通透性增高^[1],然而其分子机制还不清楚。本实验采用免疫组织化学方法进行研究,结果发现正常大鼠视网膜组织几乎无 VEGF 表达,而随次声暴露时间的延长,视网膜组织 VEGF 的免疫活性增强。在对以视网膜微血管高通透性为特点的糖尿病视网膜病变的研究中,人们发现视网膜及玻璃体下液中 VEGF 的表达增高^[2]。Yaccina 等^[3]利用生长在多聚碳酸酯滤膜(polycarbonate filter)上致密融合的牛视网膜微血管内皮细胞单层模拟血-视网膜屏障的功效,发现 VEGF 可显著增加内皮单层对大分子,如白蛋白的通透系数。缺氧是刺激 VEGF mRNA 表达的最强因素^[4]。视网膜局部缺氧不仅诱导 VEGF 产生,还可使内皮细胞上 VEGF 受体数目增加 5%,并保持受体的高亲和力^[5]。笔者认为在次声作用后,视网膜存在缺血缺氧状态,诱导 VEGF 大量产生,并作用于微血管内皮细胞,导致血-视网膜屏障开放,通透性发生改变。

Dorey 等^[6]观察饲养于缺氧环境中新生大鼠视网膜组织,发现 Müller 细胞 VEGF mRNA 表达最强阳性,RPE 细胞、星型胶质细胞、无长突细胞居中,神经

节细胞和其他内核层细胞次之^[6]。笔者的实验却并未观察到 RPE 细胞的 VEGF 免疫活性,而以内核层和神经节细胞的高表达为特征。这说明次声对血-视网膜屏障的损害与单纯缺氧视网膜损伤在机制上可能存在差异。作者认为此时次声的能量还不足以造成整个视网膜血液供应的损害,而耗氧量大的内侧视网膜神经层,加之仅接受视网膜血管供应,较敏感的出现了缺血、缺氧症状,从而诱导内层视网膜组织 VEGF 的表达增加。

参考文献

- 1 邱萍,姜勇,张作明,等.次声暴露对大鼠血-视网膜屏障超微结构的损害.中华眼科杂志,2002,38:499-501.
- 2 Burgos R, Simo R, Audi L, et al. Vitreous levels of vascular endothelial growth factor are influenced by its serum concentrations in diabetic retinopathy. Diabetologia, 1997, 40:1107-1109.
- 3 Yaccina JA, Chang YS, Hollis TM, et al. Physiological transport properties of cultured retinal microvascular endothelial cell monolayers. Curr Eye Res, 1997, 16:761-768.
- 4 Kuroki M, Voest EE, Amano S, et al. Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression *in vitro* and *in vivo*. J Clin Invest, 1996, 98:1667-1675.
- 5 Thieme H, Aiello LP, Takig H, et al. Comparative analysis of vascular endothelial growth factor receptor on retinal and aortic endothelial cells. Diabetes, 1995, 44:98-103.
- 6 Dorey CK, Aouididi S, Reynaud X, et al. Correlation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor with extraretinal neovascularization in the rat. Arch Ophthalmol, 1996, 114:1210-1217.

• 基础研究 •

RON 基因反义核酸真核表达载体的构建及其对 A549 的体外作用

潘铁成 徐利军 李军 赵金平 陈涛 魏翔

【摘要】 目的 肺癌的发生是多因素作用的结果, RON 基因参与其中,但它在肺癌的基因治疗中意义尚不明确。本研究旨在探讨 RON 能否作为肺癌的基因治疗靶点及针对该基因跨膜区段(RONm)反义核酸对肺癌细胞的生物学功能的影响。方法 从人肺鳞癌细胞提取总 RNA 进行 RT-PCR、T 载体克隆和测序,获得 RON 基因的跨膜区段,并将其反向插入真核表达载体中,转染肺癌细胞,利用 ELISA 检测细胞模型 RON 基因表达后的蛋白水平,同时

收稿日期:2004-08-26

作者单位:430030 武汉市,华中科技大学同济医学院附属同济医院胸心外科

作者简介:潘铁成,男,1953 年 1 月生,湖北省武汉市人,医学硕士,教授,主任医师,科主任。Tel: 027-83662589

利用 MTT 和细胞计数方法监测细胞的生物学活性的变化。结果 用 RT-PCR 亚克隆 RONm, 测序结果与 GenBank (X70040) 一致。构建的 RONm 反义真核表达载体, 转染后的肺癌细胞株 A549 RON 基因表达量和细胞活性明显降低。结论 成功构建 RONm 反义核酸真核表达载体, RON 能作为肺癌的基因治疗靶点; RONm 反义核酸可有效抑制 RON 基因的表达阳性肺癌细胞的生长, 为进一步研究将 RONm 反义核酸作为一种的肺癌基因治疗方法打下了分子生物学基础。

【关键词】 RON 基因; 受体酪氨酸激酶; 核酸类, 反义; 肺癌 A549; 抑制

Construction of the antisense nucleic acid eukaryotic expressing vector of the RON gene and its effect on lung cancer cell line A549 in vitro

PAN Tiecheng, XU Lijun, LI Jun, et al

Department of Cardiothoracic Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objectives To investigate *in vitro* inhibition of RON gene expression and the effect of anti-sense nucleic acid of transmembrane domain of RON gene (RONm) on biological functions of lung cancer cell line A549, and to explore the possibility of the anti-sense nucleic acid of RON gene as a candidate for lung cancer gene therapy. Methods Total RNA from lung cancer cells of human squamous carcinoma was extracted. The cDNA encoding RONm was cloned by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and inversely inserted into BamH I and Hind III sites of the eukaryotic expression vector pcDNA3.1, then the anti-sense nucleic acid of this domain was transferred into the studied cells, A549. The expression of RON gene in the experimental and control groups were monitored by ELISA and the alteration of cell proliferation was examined by MTT assay and cell count. Results The cDNA encoding RONm was cloned and its sequence accorded with the data from GenBank (X70040). The pcDNA 3.1 vector contained the RONm antisense nucleic acid. The expression level of RON gene in the transfected lung cancer cells was reduced and the cell proliferation was inhibited as compared with the control cell lines. Conclusion

The RONm antisense nucleic acid eukaryotic expressing vector was successfully constructed and the anti-sense nucleic acid of RONm significantly reduces the expression of RON gene in the highly expressed lung cancer cell line A549 and might inhibit the growth of this cell line.

【Key Words】 RON; tyrosine kinase receptor; nucleic acid, antisense; lung cancer cell line A549; inhibition

RON(recepteur d'origine nantais)基因是 MET 原癌基因家族一员, 参与肺癌等肿瘤的发生和发展^[1-3], 其编码产物为 RON-RTK(receptor tyrosine kinase RON, 受体酪氨酸激酶 RON)。RON 在动物和人类肺癌中普遍过分表达^[1]。人为使 RON 基因在动物肺组织中过分表达, 可导致肺癌形成^[4,5]。这些研究提示 RON 可能作为肺癌基因治疗的新靶点。

RON-RTK 跨膜区段是该受体功能的重要区域, 该区域的缺失会导致信号传导的中断, 从而丧失应有的生物学活性。为了探讨 RON 在肺癌基因治疗中的意义和价值, 本实验研究了 RON-RTK 跨膜区段反义核酸对肺癌细胞的生物学活性影响, 为进一步研究 RON 反义核酸进行肺癌基因治疗提供依据和实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 pMD18-T 载体为大连宝生物工程公司产品, 表达载体及大肠杆菌宿主菌由本实验室保存。肺癌组织取自手术患者病检样本。人肺癌细胞系 A549、人肺二倍体细胞系 CCL-135 由本室保存。

1.2 主要试剂 各种限制性内切酶、连接酶为 NEB 公司产品, RNA 提取、RT-PCR 试剂盒、Taq 酶为 Promega 公司产品, 脂质体 Lipofectamine 为 Gibco 公司产品。兔抗人 RON-RTK 多克隆抗体及相关二抗为 Santa Cruz 产品, 鼠抗人 RON-RTK 单克隆抗体为 R&D 公司产品。DMEM、F12 培养基及胎牛血清为 Gibco 公司产品。

1.3 实验方法 (1)引物设计与合成: 根据文献报道的序列(Genbank 登录号: NM002447), 用软件进行

引物设计,并依据实验目的优化。PCR 产物包含 RON 基因跨膜区段(+2799~+2963)的 165 bp,加上保护性碱基和酶切位点,产物片段总长度应为 180 bp。上游引物 P1 包含 *Xho* I 位点,序列为 5'-CACTCGAGGTCTGCGTAGATGCTGAATGTCATA-3';下游引物 P2 包含了 *Bgl* II 位点,序列为 5'-GAAGATCTAGCTGCTTCTCCGCCACCAG-3',在上海生工合成。(2)RNA 的提取:按试剂盒推荐方法提取。(3)RT-PCR:取 2 μ g 肺癌组织总 RNA 为模板,5 μ l 10 倍反应缓冲液,5 μ l 2.5 mmol/L 的 dNTP,1 μ l Reversase,1 μ l Taq,和终浓度 1 μ mol/L 的 P1、P2 特异性引物,配置反应体系,按试剂盒推荐的反应条件进行 RT-PCR 反应。(4)载体构建与鉴定:DNA 胶回收、连接、转化、质粒提取、酶切鉴定等方法参见《分子克隆实验指南》(第二版)。(5)RON-RTK 跨膜区段基因的 T 载体鉴定:用 *Xho* I/*Bgl* II 酶切鉴定,电泳出现 180 bp 和 2.7 kb 共 2 条带为阳性质粒。命名为 pT-RONm。(6)DNA 测序:利用双脱氧末端终止法双向测序,测序引物为 RV-M 和 M13,测序仪为 Beckman CEQ2000 XL。(7)反义真核表达载体的构建:用 *Xho* I/*Bgl* II 酶切 pT-RONm,回收 180 bp 的 RON 跨膜区段基因,插入 pcDNA3.1(+)的 *Bam* HI 和 *Xho* I 位点,此时为反向插入。鉴定后该载体命名为 pcDNA-RONm。(8)细胞的转染:将 2 μ g 质粒与 5 μ l Lipofectamine 转染 ϕ 35 mm 板融合率 80%左右的细胞,转染 6 h 后换去转染液,加入 15% FBS 的 DMEM 继续培养 24 h。空白组不加质粒,仅用 Lipofectamine 处理。细胞处理分组见表 1。(9)细胞生长曲线的测定:将上述处理后的细胞按 1×10^3 个/孔,接种于 96 孔板中,每 12 h 取 6 孔细胞/组分别进行 MTT 法检测和台盼蓝染色记数,至 72 h 为测定终点,绘制生长曲线。(10)MTT 法检测细胞生长抑制效应:将 A549 细胞的各处理组按 1×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,72 h 后 MTT 法测定各细胞组的 OD490,RON 跨膜区段反义核酸对 A549 的生长抑制率=(对照组平均 OD 值-RON 抑制组平均 OD 值)/对照组平均 OD 值 $\times 100\%$ 。(11)ELISA 检测 RON 表达产物的变化:对上述 6 种细胞系记数和处理后,用双抗体夹心法 ELISA 检测 RON 的表达量。各组均设立本底对照,以 PBS 代替一抗进行实验。待测样品按 2 倍梯度进行稀释,在线性范围内取相同稀释度的结果进行分析。

表 1 细胞的分组情况

组 号	分组类别	细胞	质粒
1	RON 抑制组 I	A549	pcDNA-RONm
2	载体对照组 I	A549	pcDNA3.1(+)
3	空白对照 I	A549	空白对照
4	RON 抑制组 II	CCL-135	pcDNA-RONm
5	载体对照组 II	CCL-135	pcDNA3.1(+)
6	空白对照 II	CCL-135	空白对照

1.4 统计学分析 采用 SPSS10.0 软件作配对计量资料 *t* 检验和 χ^2 检验。

2 结果

2.1 RT-PCR 克隆 RON 跨膜区段(RONm)基因 取 5 μ l RT-PCR 反应液进行电泳,在 180 bp 附近有特异性 DNA 带,与预计的大小相符(图 1)。

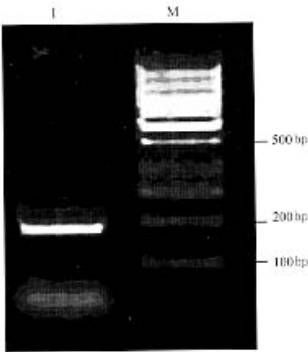


图 1 RONm RT-PCR 电泳图
M: 100bp DNA ladder; 1: RT-PCR product

2.2 RONm 基因的 T 载体克隆与测序分析 回收 DNA 片段,将其与 pMD18-T 载体连接,经酶切鉴定(图 2)后对重组质粒进行双向测序,得到 RONm 基因序列(图 3),与文献报道的一致。

2.3 细胞生长曲线的测定 通过 MTT 法和台盼蓝染色记数法绘制细胞生长曲线(图 4、5),生长曲线结果显示,RON 抑制组 I(A549)细胞生长受到明显的抑制,MTT 检测值和活细胞数量远低于其两个对照组。而 CCL-135 细胞的 3 组间则没有显著差异。表明 pcDNA-RONm 质粒可以有效抑制肺癌细胞 A549 的生长,而对正常人肺二倍体细胞 CCL-135 没有影响。

2.4 生长抑制效应的测定 利用 MTT 方法测定 72 h 的细胞活力,其中对照组(组 1、2)的平均 OD 值为

0.71 ± 0.06 ($n = 12$), 抑制组(组 3)的平均 OD 值为 0.42 ± 0.05 ($n = 12$), RON 跨膜区段反义核酸对 A549 的生长抑制率为 40.8%。

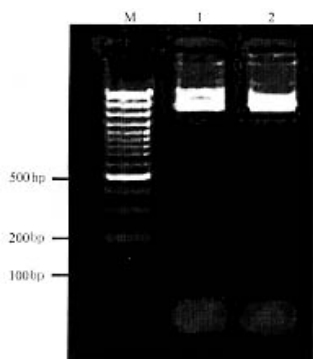


图 2 pT-RONm 质粒的酶切鉴定

M: 100bp DNA ladder; 1: digested with *Xho* I; 2: digested with *Xho* I and *Bgl* II

2.5 各处理组细胞 RON 表达的 ELISA 检测结果

通过对双抗体夹心法 ELISA 检测数据进行分析,结果显示 RON 抑制组 I(A549)细胞 RON 表达量与对照组相比显著降低($P < 0.05$),CCL-135 细胞的 3 个

处理组与本底对照组无显著差异($P > 0.05$)。表明肺癌细胞中的 RON 表达量要高于正常细胞,pcDNA-RONm 质粒可以产生 RON 跨膜区段的反义核酸,并能够在一定程度上抑制 RON 的表达。

3 讨论

肺癌是人类死亡的主要病种之一,目前手术及放化疗等治疗对其效果有限,近年来人们一直研究寻找肺癌新的治疗方法,如基因疗法。许多肿瘤中可见不同酪氨酸激酶受体的过度表达或激活,与肿瘤的发生、发展密切相关^[4]。大量研究表明,酪氨酸激酶可能成为肿瘤治疗的新靶点^[2]。反义核酸可以有效地对特定基因进行调控,其抑制肿瘤酪氨酸激酶活性的肿瘤治疗研究是许多学者关注的热点。

人类 RON 基因(MSTIR)位于 3p21.3,此区域的结构常在肺癌和其他恶性肿瘤中发生改变;RON 基因编码产物受体酪氨酸激酶(RON-RTK)由 1400 个氨基酸组成。RON 基因第 12 号外显子含 165 bp 碱基对,所含的信息用于编码 RON-RTK 的跨膜结构部分。目前研究揭示,活化的 RON 能够激活很多细胞信号通路包括 Ras,PI-3K,MAPK 和 JNK^[4];这些通路在细胞的生长、转化和生存过程中起着关键的调节

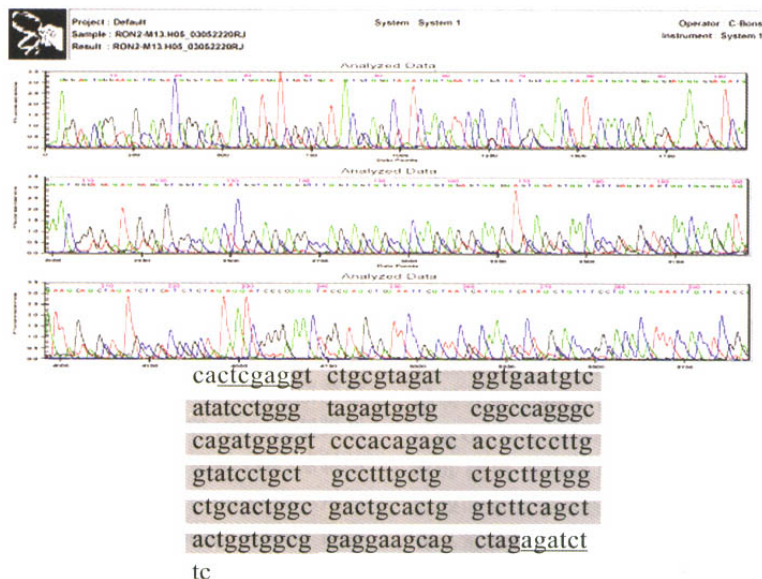


图 3 RONm cDNA 序列

下划线部分为引物引入的酶切位点,阴影部分为 RONm 的编码区域

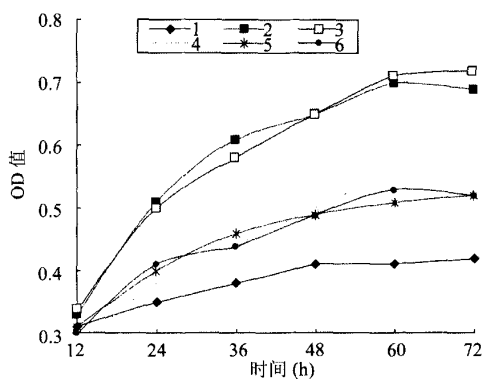


图 4 MTT 法测定各处理组细胞生长曲线

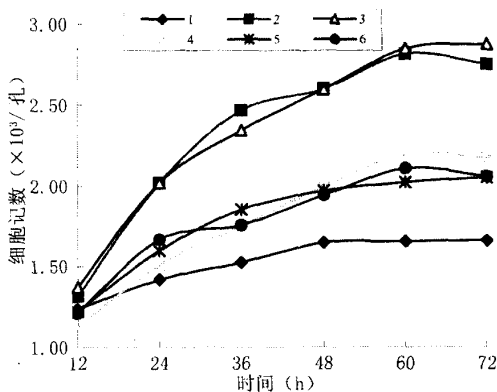


图 5 台盼蓝染色记数法测定各处理组细胞生长曲线

作用^[4,6],结果促进肺癌形成^[4,7]。在 RON 过分表达肺癌细胞中,上述信号途径的共同通路为 RON-RTK 的跨膜部分,所以跨膜部分在该基因功能研究中有着重要意义^[1]。但到目前为止,RON 基因在肺癌基因治疗中的意义和价值尚未明确。本实验中利用反义核酸技术在细胞水平上进行了研究,通过对细胞 RON 表达量和其生长状况来评价反义核酸是否能够抑制 RON 基因的表达和肺癌细胞的生长。

在抑制区域的选择上,考虑到受体传导的特点,选取编码上述信号途径的共同通路 RON-RTK 跨膜区域的基因进行反义核酸的抑制,使受体信号传导无法正常进行。但由于 RON 在 N 端仍然有一段基因已进行了表达,因此选择针对 RON 的 C 端表达产物的抗体进行免疫学实验,以客观评价 RON 表达量的变化。细胞在进行脂质体转染后,其细胞生长、蛋白合成等都发生了一些变化,在实验设计中除设计空白对照外还使用了载体对照,通过结果分析来排

除表达载体及转染本身对细胞生长活性的影响。在本实验中采用反义核酸技术封闭 RON 基因跨膜区域段,通过对细胞 RON-RTK 表达量和其生长状况来评价反义核酸是否能够抑制 RON 基因的表达。

在研究计划中,我们拟用腺病毒进行动物体内的 RONm 反义核酸治疗,因此在引物中设计了 *Bgl* II 位点,它的粘性末端除可以与 pcDNA3.1 + 中的 *Bam*HI 相连外,又可以与腺病毒转移载体 pShuttle-CMV 连接,实现引物的通用。同时在 RONm 的 3' 端设计了 *Xho* I 位点,可以实现 RONm 的定向反向克隆,使其产生反义的 mRNA。

基因重组过程中插入片段的大小、方向是否正确,有无插入片段的基因突变,这些直接关系到目的基因能否表达,表达产物是否具有生物活性。本实验在亚克隆时,首先根据遗传表型的变化对重组子作初步鉴定。pMD18-T 载体具有编码氨苄青霉素抗性基因的序列,使含有重组子的大肠杆菌可在含氨苄青霉素的琼脂板上生长。由于上述方法获得的重组子具有假阳性的可能,因而,准确地分析重组子的结构特征非常重要。利用重组子酶切鉴定,根据目的片段大小,逐步确定重组正确后,再用 DNA 测序仪对插入片段进行序列分析,进一步验证插入片段的序列、方向完全正确。通过上述方法,证实本实验获得了构建完全正确的重组体。

本研究证实了 RON 基因与肺癌的发生、发展密切相关,并且在肺癌基因治疗中有重要的意义和价值。RON 反义核酸在一定程度上抑制 RON 基因的表达量和肺癌细胞的生长,对正常细胞影响较小,抑制作用与 RON 表达量相关。因此,利用 RON 反义核酸来进行肺癌的抑制与治疗有一定的研究前景。

参考文献

- 1 Angeloni D, Danilkovitch-Miagkova A, Ivanov SV, et al. Gene structure of the human receptor tyrosine kinase RON and mutation analysis in lung cancer samples. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000, 29:147-156.
- 2 Maggiora P, Lorenzato A, Fracchioli S, et al. The RON and MET oncogenes are co-expressed in human ovarian carcinomas and cooperate in activating invasiveness. *Exp Cell Res*, 2003, 288:382-389.
- 3 Peace BE, Hughes MJ, Degen SJ, et al. Point mutations and overexpression of RON induce transformation, tumor formation, and metastasis. *Oncogene*, 2001, 20:6142-6151.
- 4 Chen YQ, Zhou YQ, Fisher JH, et al. Targeted expression of

- the receptor tyrosine kinase RON in distal lung epithelial cells results in multiple tumor formation; potential of RON *in vivo*. *Oncogene*, 2002, 21: 6382-6386.
- 5 Chen YQ, Zhou YQ, Fu LH, et al. Multiple pulmonary adenomas in the lung of transgenic mice overexpressing the RON receptor tyrosine kinase. Recepteur d'origine nantais. *Carcinogenesis*, 2002, 23: 1811-1819.
- 6 Osada H, Takahashi T. Genetic alteration of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. *Oncogene*, 2002, 21: 7421-7434.
- 7 Wang MH, Wang D, Chen YQ. Oncogenic and invasive potentials of human macrophage-stimulating protein receptor, the RON receptor tyrosine kinase. *Carcinogenesis*, 2003, 24: 1291-1300.
- 8 Danilkovitch-Miagkova A, Miagkov A, Skeel A, et al. Oncogenic mutants of Ron and MET receptor tyrosine kinases cause activation of the β -catenin Pathway. *Mol Cell Biol*, 2001, 21: 5857-5868.
- 9 Angeloni D, Danilkovitch-Miagkova A, Miagkov A, et al. The soluble sema domain of the Ron receptor inhibits MSP-induced receptor activation. *J Biol Chem*, 2004, 279: 3726-3732.

· 基础研究 ·

大豆低聚肽对自发性高血压大鼠降血压作用的研究

徐广飞 黄金华 吴杰 仇梁林

【摘要】 目的 探讨不同剂量的大豆低聚肽(SBOP)对自发性高血压大鼠(SHR)的降血压作用及其机制。方法 6~8 周龄雌性 SHR 大鼠 30 只及同周龄同体重 Sprague-Dawley(SD)雌性大鼠 6 只随机分为 A 组(SHR 对照组, 饮水中不加 SBOP 及药物卡托普利)、B 组[SBOP 低剂量组, 饮水中按 100 mg/(L·d)加入 SBOP]、C 组[SBOP 中剂量组, 饮水中按 500 mg/(L·d)加入 SBOP]、D 组[SBOP 高剂量组, 饮水中按 1000 mg/(L·d)加入 SBOP]、E 组[卡托普利药物处理组, 饮水中按 50 mg/(L·d)加入卡托普利]、F 组[SD 正常血压对照组, 饮水中按 1000 mg/(L·d)加入 SBOP], 实验期共 30 d。尾袖法测定大鼠尾动脉血压, 比色法测定血清及组织血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)活性。结果 给予低、中、高 3 种剂量的 SBOP 30 d 后 SHR 大鼠血压分别为(155.5 ± 15.6), (153.0 ± 4.5), (151.5 ± 5.0) mmHg, 卡托普利药物处理组为(148.0 ± 15.6) mmHg, SHR 对照组为(174.0 ± 11.5) mmHg, 正常 SD 大鼠为(136.5 ± 9.6) mmHg ($P < 0.05$)。SBOP 组与 SHR 对照组血清及主动脉 ACE 活性分别为(0.0118 ± 0.069), (0.0121 ± 0.0011), (0.0305 ± 0.0048), (0.0290 ± 0.0037) U ($P > 0.05$), 而卡托普利药物处理组为(0.0054 ± 0.0016), (0.0219 ± 0.0039) U ($P < 0.05$)。血清钠离子浓度 SBOP、卡托普利药物处理组分别为(0.0896 ± 0.0050), (0.0900 ± 0.0012) μ mol/L, SHR 对照组为(0.1028 ± 0.0056) μ mol/L ($P < 0.05$)。结论 中、高剂量 SBOP 能有效地降低 SHR 大鼠的血压, 且随剂量的增加血压有呈指数下降的趋势, 但 SBOP 的降压效果始终不及降压药物卡托普利。SBOP 对正常血压大鼠的血压无影响。SBOP 降血压作用可能与降低外周组织液钠离子浓度有关, 而与降低 ACE 活性无关。

【关键词】 大豆低聚肽; 降血压作用; 血管紧张素转移酶; 自发性高血压大鼠

Antihypertensive effect of soybean oligopeptide on spontaneously hypertensive rats

XU Guangfei, HUANG Jinhua, WU Jie, et al

Department of Nutrition, Nantong Medical College, Nantong 226001, China

【Abstract】 Objective To study the effects of soybean oligopeptide(SBOP) on spontaneously hypertensive rats(SHR).

Methods Thirty 6-8 week-old female spontaneously hypertensive rats and six 6-8 week-old female Sprague-Dawley rats were

收稿日期: 2004-04-08

作者单位: 226001 南通市, 南通医学院营养与食品卫生学教研室(徐广飞, 吴杰, 仇梁林), 机能实验室(黄金华)

作者简介: 徐广飞, 女, 1965 年 5 月生, 江苏省南通市人, 医学硕士, 副教授

通讯作者: 黄金华, E-mail: huangjinhua@ntu.edu.cn