

• 短篇论著 •

β₁ 整合素反义脱氧寡核苷酸抑制精氨酸加压素诱导下心脏成纤维细胞的 DNA 合成

彭育红, 赵连友, 汝磊生, 杨学东, 陈永清, 范延红

【关键词】 心肌成纤维细胞; 高血压; 结合素类; 反义寡核苷酸类; 精氨酸加压素

【中图分类号】 R392.12

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-5403(2010)06-0548-02

β₁ 整合素介导细胞外基质(extracellular matrix, ECM)与细胞骨架相连,引发一系列信号转导通路,影响心脏成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CF)的生长、分化、黏附和迁移等生物学功能,在心脏间质重构形成中具有重要的桥梁作用^[1]。设法抑制或降低 CF 表面 β₁ 整合素表达可能会控制增殖和神经体液因素刺激的心肌纤维化,故本研究运用硫代修饰的 β₁ 整合素反义脱氧寡核苷酸(antisense oligodeoxynucleotides, ASODN)导入体外培养的 CF,观察它对 CF 及精氨酸加压素(arginine vasopressin, AVP)刺激下的 CF DNA 的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料 新生 SD 大鼠(1~3 日龄),由第四军医大学实验动物中心提供。AVP(美国 Peninsular Lab);2500 型 CO₂ 培养箱(美国 NuAire 公司)。将新生 SD 大鼠的心室剪碎,用 1.25 g/L 胰酶消化成单细胞悬液,过滤,以 1 000 r/min 离心 4 min。用含 100 ml/L 胎牛血清的 DMEM 培养液重悬浮细胞,以差速贴壁法分离纯化,实验采用 2~4 代的细胞。

1.2 寡核苷酸的设计与合成 根据 GenBank 中大鼠 β₁ 整合素基因序列^[2],选择 mRNA 起始密码子周围区域,采用序列局部相似性查询 BLAST 系统分析软件,设计出相应的反义、正义寡核苷酸序列反义链:5'-CATCTTTTCG-CAGCGTC-3';正义链:3'-GTAGAAAAGCGTCGCAG-5'。

1.3 实验分组 基础状态下设空白对照组、反义链组和正义链组;AVP 诱导下设空白对照组、1×10⁻⁷ mol/L AVP 组、反义链+1×10⁻⁷ mol/L AVP 组和正义链+1×10⁻⁷ mol/L AVP 组,每组均为 8 个复孔。

1.4 CF 的 DNA 合成功能测定 以³H-胸腺嘧啶核苷(³H-TdR)掺入率反映 CF 的 DNA 合成功能。CF 经不同试剂干预培养 48 h 后加入³H-TdR(2 μCi/ml)和维生素 C(50 mg/L),12 h 后吸弃上清液,二蒸水冲洗,加 10 ml/L 三氯乙酸洗 5 min,加 0.3 mmol/L NaOH 处理 30 min,收集细胞裂解液至玻璃纤维滤纸上,将玻璃纤维滤纸置于闪烁计数管中,每管加入闪烁液 0.5 ml,液态闪烁计数仪测定放射性。结果以 cpm 值表示。

1.5 统计学处理 所获数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间均数比

较采用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 β₁ 整合素 ASODN 对 CF DNA 合成的影响 对照组、反义链组和正义链组 CF³H-TdR 掺入率分别为(2094±414),(757±110),(1500±453)cpm/2000 细胞。其中,反义链组的 CF³H-TdR 掺入率明显低于对照组及正义链组,并且有统计学意义(*P*<0.01,*P*<0.05);正义链组与对照组比较无统计学意义(*P*>0.05)。

2.2 β₁ 整合素 ASODN 对 AVP 促 CF DNA 合成的影响 空白对照组、AVP 组、反义链+AVP 组和正义链+AVP 组 CF³H-TdR 掺入率分别为(3726±751),(5990±628),(1428±263)和(537±385)cpm/2000 细胞。其中,AVP 组和正义链+AVP 组的 CF³H-TdR 掺入率均高于空白对照组,并且有统计学意义(*P*<0.01),反义链+AVP 组的 CF³H-TdR 掺入率明显低于空白对照组,AVP 组和正义链+AVP 组,并且均有统计学意义(*P*<0.01);正义链+AVP 组与 AVP 组比较无统计学意义(*P*>0.05)。

3 讨 论

业已证实,多种体液因素可诱导成年大鼠 CF β₁ 整合素 mRNA 和蛋白的表达,并伴有左室肥厚的形成^[3,4]。其中与高血压密切相关的 AVP 具有促 CF 增殖、β₁ 整合素表达的作用,β₁ 整合素 ASODN 序列特异性地阻断 β₁ 整合素的介导,抑制 AVP 促 CF 表面 β₁ 整合素表达及细胞增殖的作用^[5],抑制 AVP 促胶原凝胶收缩^[6],而正义及错配寡核苷酸均无此效应,本研究在此基础上进一步探讨 β₁ 整合素 ASODN 对 AVP 诱导大鼠 CF DNA 合成功能的抑制作用。

研究结果表明,预先用 β₁ 整合素 ASODN 干预的 CF 不仅细胞数目少,细胞的³H-TdR 掺入率也明显低于只用含血清培养液培养的 CF,而正义链组的细胞数目,³H-TdR 掺入率与对照组之间的差异均无显著意义。由此可见,β₁ 整合素 ASODN 抑制 DNA 合成代谢,从而抑制增殖,使数目减少,而正义序列并不能产生这样的生物学效应。这说明通过

(下转第 553 页)

作者单位:050081 石家庄市,中国人民解放军白求恩国际和平医院(彭育红,汝磊生);070038 西安市,第四军医大学唐都医院(赵连友,杨学东,陈永清,范延红)

通讯作者:赵连友, Tel: 029-83577656, E-mail: zhaoly. fmmu@yahoo. com. cn

及引起血小板减低,更换为达肝素钠 5000 U/12 h,此后病情平稳,APTT45~50 s,于7月20日转出ICU。

2 临床病例讨论

岳慧医师:患者老年男性,本次以“咳痰、胸闷不适、左侧胸痛2个月”入院,入院后确诊肺癌,并化疗,住院过程中先后出现静脉、动脉血栓及肺栓塞,考虑与高龄、肺癌及化疗有关。给予抗凝治疗,应用肝素抗凝(3~8 mg/h),APTT维持在80 s左右。之后因拔除PICC过程中出现肺栓塞,加强肝素用量后,患者好转转出ICU病房。治疗过程中,肝素抗凝治疗方案正确有效,是延缓血栓进展、病情好转的关键。

周飞虎副主任医师:在患者治疗过程中,肝素治疗方案有效。应用肝素3~8 mg/h,APTT维持在80 s左右,后因出现眼结膜出血,肝素用量下调,维持APTT在50 s左右。拔除PICC管后出现肺栓塞,不除外与肝素用量下调有关,但应注意不应以眼结膜出血为肝素下调的指标,并且拔除发生静脉血栓的PICC管应循序渐进,避免一次拔除。

宋青主任医师:同意以上两位医师的分析。癌症患者静脉血栓及肺栓塞的风险相应增加。癌症患者的特征如老龄、反复住院也同时是易发生血栓的因素。在接受癌症治疗、如化疗的患者,血栓风险进一步升高。癌症患者易发生血栓与癌症导致高凝状态及引起促血栓形成的改变有关,也与纤溶系统的异常有关。动脉血栓也与内皮细胞、血小板功能、凝血因子、抗血栓及纤溶因素的异常有关。

该患者癌症化疗后先后出现上肢静脉血栓,动脉血栓以及肺栓塞,为血栓高发病例,这是本病例的特殊之处。在血栓治疗中,肝素及低分子肝素都推荐应用,低分子肝素有出血风险小的优势。但对于血栓高危患者,在早期上肢静脉血栓的治疗当中,如给予肝素抗凝治疗,有可能避免动脉血栓的发生。并且在肝素治疗血栓过程中,不宜因眼结膜出血而将肝素减量,也不宜一次拔除有血栓的PICC管,以避免出现肺栓塞。因此,在血栓高危患者的治疗当中,应以APTT在80s左右为最佳抗凝剂量。肝素抗凝的优点在于价格实惠,效果明确,便于监测,可以拮抗。而在血栓预防及栓塞急性期后,可给予低分子肝素抗凝,减少肝素相关血小板减少及出血风险。

3 总结

癌症患者血栓风险增加,与一系列疾病、治疗、患者相关的因素有关。对于癌症并血栓高危患者,应尽早给予低分子肝素预防治疗。在血栓治疗中,肝素较低分子肝素有效果更明确、更易于监测等优点。在肝素应用时严密监测APTT指标,维持在80 s左右,有利于延缓血栓进展、改善预后。在临床工作中,要注意血栓的预防以及肝素用量的精确调控及把握,平衡血栓再发及出血风险。

(参加讨论医师:岳慧,周飞虎,宋青)

(岳慧整理)

(收稿日期:2010-09-29;修回日期:2010-10-21)

(上接第548页)

β_1 整合素 ASODN 特异性封闭 β_1 整合素表达可以抑制体外培养的 CF 的生长和代谢,为下一步研究 ASODN 对 AVP 作用下细胞功能的影响奠定了基础。

结果表明,AVP 单独作用后,CF 的细胞数目、 $^3\text{H-TdR}$ 掺入率均高于未经 AVP 刺激的细胞。 β_1 整合素 ASODN 与 AVP 共同作用后 CF 的细胞数目、 $^3\text{H-TdR}$ 掺入率均明显降低,而正义序列和 AVP 共同作用于 CF 后与 AVP 单独作用组无甚差别。由此可见, β_1 整合素 ASODN 抑制了 AVP 促 CF 增殖、DNA 合成功能的作用,说明针对特异性靶基因片段合成的 ASODN 可能通过作用于 β_1 整合素遗传信息传递的某个环节,影响 β_1 整合素介导的 CF 与 ECM 的黏附,从而产生逆转 AVP 促 CF 增殖的作用,拮抗 AVP 刺激心脏间质重构的形成。进一步提示应用反义药物防治高血压心脏间质重构的可能性。

【参考文献】

[1] Krishnamurthy P, Subramanian V, Singh M, et al. Beta 1 integrins modulate beta-adrenergic receptor-stimulated cardiac myocyte apoptosis and myocardial remodeling[J].

Hypertension, 2007, 49(4): 865-872.

- [2] Malek-Hedayat S, Rome LH. Cloning and sequence of the cDNA encoding the rat oligodendrocyte integrin beta 1 subunit[J]. Gene, 1995, 158(2): 287-290.
- [3] 赵连友,曹世平.高血压患者血浆精氨酸加压素浓度的变化及其与病情的关系[J].中华心血管病杂志,1993,21(2): 147-149.
- [4] Hiroyama M, Wang SY, Aoyagi T, et al. Vasopressin promotes cardiomyocyte hypertrophy via the vasopressin V1A receptor in neonatal mice[J]. Eur J Pharmacol, 2007, 559(1): 89-97.
- [5] 赵连友,彭育红,陈永清,等.反义寡核苷酸对精氨酸加压素诱导心脏成纤维细胞 β_1 整合素表达的抑制作用[J].中华心血管病杂志,2003,31(7): 523-527.
- [6] 彭育红,赵连友,陈永清,等.反义 β_1 整合素寡核苷酸对精氨酸加压素促胶原凝胶收缩的抑制作用[J].心脏杂志,2001,13(2): 112-114.

(收稿日期:2009-06-27,修回日期:2009-12-23)