

· 论 著 ·

10-23 脱氧核酶对新生大鼠心肌细胞 ET-1 mRNA 表达的影响

潘秀颀¹, 林 丽¹, 潘燕霞^{1,2}, 袁文俊^{1*}

(1. 第二军医大学基础医学部生理学教研室, 上海 2004332; 2 福建医科大学生理学与病理生理学系, 福州 350004)

[摘要] 目的: 将体外筛选具有切割内皮素-1(endothelin-1, ET-1) mRNA 的 10-23 脱氧核酶转染原代培养新生大鼠心肌细胞, 观察其对心肌细胞 ET-1 mRNA 的影响。方法: 体外转录 ET-1 全长 RNA 底物, 设计并合成 5 条 ET-1 10-23 脱氧核酶 (DZ1~ DZ5), 其 5 及 3 端各有 2 个核苷酸硫代修饰, 体外切割 ET-1 RNA 底物, 筛选有效脱氧核酶; 5 标记荧光素 FAM 的 10-23 脱氧核酶瞬间转染新生大鼠心肌细胞以观察对 10-23 脱氧核酶的摄取; 采用半定量 RT-PCR 检测 ET-1 基因的表达。结果: DZ2、DZ3、DZ4 及 DZ5 在体外均可切割 RNA 底物, 其中 DZ4 两侧结合区结合自由能之差最大, 其切割效率最高, 达 83.5%, 而 DZ3 两侧结合区结合自由能之差最小, 其切割效率亦最低 (47.3%); 瞬间转染新生大鼠心肌细胞 24 h, 心肌细胞内可见 10-23 脱氧核酶的分布, 半定量 RT-PCR 结果显示转染 24 h 后的 DZ4 (0.2 μmol/L) 可减少血清诱导肥大心肌细胞 ET-1 mRNA 及细胞总蛋白, 降低细胞活力与蛋白质合成速率 ($P < 0.05$)。结论: 本研究设计的 10-23 脱氧核酶能切割体外转录的 ET-1 全长 RNA 底物, 转染心肌细胞后, 可抑制 ET-1 mRNA 的表达, 减缓血清诱导心肌细胞肥大, 10-23 脱氧核酶两侧结合区自由能的差值与切割效率有关。

[关键词] 10-23 脱氧核酶; 内皮素; 心肌细胞; 肥大

[中图分类号] R 331.31 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X (2004)10-1106-04

Effects of 10-23 deoxyribozyme on endothelin-1 mRNA expression in rat neonatal cardiomyocytes

PAN Xiu-Jie¹, LIN Li¹, PAN Yan-Xia^{1,2}, YUAN Wen-Jun^{1*} (1. Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Physiology and Pathophysiology, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To design and select 10-23 deoxyribozyme cleaving ET-1 mRNA *in vitro*, and to detect ET-1 mRNA expression in cultured neonatal rat cardiomyocytes after 10-23 deoxyribozyme transfection. **Methods:** Five 10-23 deoxyribozymes (DZ1~DZ5) with 2 phosphorothioate groups at 5' and 3' end were designed and synthesized. Full-sequence ET-1 RNA was transcribed and FAM-labeled 10-23 deoxyribozyme was used to select cleavable 10-23 deoxyribozyme *in vitro* and to detect intracellular uptake. The content of ET-1 mRNA was measured by semi-quantitative RT-PCR after 10-23 deoxyribozyme was transfected into cultured neonatal rat cardiomyocytes. **Results:** All ET-1 10-23 deoxyribozymes, excluding DZ1, cleaved ET-1 RNA substrates efficiently during the 1st h and DZ4, with largest free energy difference of 2 hybridizing domains, cleaved the substrates most efficiently, while DZ3, with lowest free energy difference, cleaved the substrates least efficiently. At 24 h after transfection, DZ4 was seen intracellularly. DZ4 decreased the content of ET-1 mRNA, the cell viability, the content of total protein and protein synthesis rate of serum-induced hypertrophic cardiomyocytes 24 h after transfection. **Conclusion:** The 10-23 deoxyribozyme designed in this study can cleave full-length ET-1 substrates efficiently, which decrease the content of ET-1 mRNA and inhibit cardiomyocyte hypertrophy induced by serum after transfection. The free energy difference of 2 hybridizing domains of 10-23 deoxyribozymes plays an important role in cleavage.

[KEY WORDS] 10-23 deoxyribozyme; endothelin; cardiomyocytes; hypertrophy

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(10): 1066-1069]

* 1982 年 Kruger 等^[1]首次在四膜虫核糖体 RNA 中发现的一段具有自身切割活性的 RNA 序列, 命名为核酶 (ribozyme)。随后, 在多种生物包括人体内发现了多种核酶。近年来, 一类新的、由单链 DNA 构成的催化分子 (脱氧核酶) 已由人工方法筛选获得, 特别是一类称之为“10-23 脱氧核酶”的分子^[2~8], 只需改变底物结合区的核苷酸构成, 即能阻断特定基因的表达。10-23 脱氧核酶由 2 部分组成:

中心 15 个保守核苷酸的催化区及两侧 7~9 个核苷酸组成的底物序列识别区。通过碱基配对, 10-23 脱氧核酶与 RNA 底物特异性结合, 切断两结合区间未配对的嘌呤与相邻嘧啶间的磷酸二酯键^[3~5]。10-

* [基金项目] 国家重点基础研究规划 (“973”计划) 课题 (G2000056905); 国家自然科学基金 (30070306)。

[作者简介] 潘秀颀 (1976-), 男 (汉族), 博士

* Corresponding author. E-mail: yuanwj@smmu.edu.cn



23 脱氧核酶催化效率高, 且相对分子质量较小, 稳定性好, 易于制备。但目前多数实验采用人工合成的包含切割位点的小片段 RNA 或 mRNA 中的局部序列作为底物, 以研究 10-23 脱氧核酶的特性^[5-8], 但忽略了 mRNA 空间结构对 10-23 脱氧核酶的影响, 故整体应用效率较低。本实验采用内皮素-1 (endothelin, ET-1) 全长 cDNA 体外转录的 RNA 作为底物, 以筛选体内具有较高切割效率的 ET-1 10-23 脱氧核酶, 并为 10-23 脱氧核酶的筛选提供试验方法。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 10-23 脱氧核酶及所用引物均由上海生工生物技术公司合成并纯化; *Pfu* 高保真 DNA 聚合酶购自上海生工生物技术公司; *Taq* 酶为 Promega 公司的产品; pGEM-3Z 质粒购自华美生物工程公司; SD 大鼠 (体质量 250~300 g, 60~100 d 龄) 及乳鼠 (1~3 d 龄) 自上海西普尔-必凯公司购得; 胰蛋白酶及其他生化试剂购自 Amresco 公司; DMEM 培养基购自 Sigma 公司; 胎牛及小牛血清为杭州四季青公司的产品; FuGENE 6 为 Roche 公司产品; α -³²P-UTP 自北京亚辉生物技术公司。

1.2 切割 ET-1 mRNA 脱氧核酶的设计选择 ET-1 mRNA 切割位点为起始位点 AUG 与 ET-1 编码区末之间 (即第 1~156 位核苷酸) 的所有 AU 及 GU 连接, 两侧底物结合区均为 9 个核苷酸, 其 5 及 3 端各有 2 个核苷酸硫代修饰。排除所有与底物结合的自由能 (ΔG) > 24 kcal/mol (1 kcal = 4.187 kJ) 及与大鼠非 ET-1 mRNA 发生交叉反应的脱氧核酶, 共选出 5 条脱氧核酶, 序列分别为 DZ1: 5'-CTC CCA A GA GGC TAG CTA CAA CGA AGC TGT TTC-3'; DZ2: 5'-GGC TCT GCA GGC TAG CTA CAA CGA TTC CTT CTC-3'; DZ3: 5'-TCT CCA GGA GGC TAG CTA CAA CGA GTG CTG GGA-3'; DZ4: 5'-ACG CTT GGA GGC TAG CTA CAA CGA CTG CGG GGT-3'; DZ5: 5'-CAG GA G CAA GGC TAG CTA CAA CGA GCT TGG ACC-3'。

1.3 切割底物的制备 切割底物通过体外转录制备而得。抽提正常 SD 大鼠心脏组织总 RNA, 逆转录后, *Pfu* 高保真 DNA 聚合酶扩增 ET-1 全长 cDNA, 插入 pGEM-3Z 质粒中, 筛选后测序。线性化

后在 α -³²P-UTP 存在下体外转录核素标记的 ET-1 RNA, 5% 含 7 mol/L 尿素的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 电泳洗脱后, 乙醇沉淀, -80 保存^[3]。

1.4 体外切割活性测定 所有体外切割活性测定均在近似于生理条件的缓冲液中进行: 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4, 37 °C), 2 mmol/L MgCl₂, 150 mmol/L NaCl 及 0.01% 十二烷基磺酸钠 (SDS), 反应体积为 10 μ l。底物及脱氧核酶的终浓度分别为 5 μ mol/L 及 1 μ mol/L, 分别在 37 °C 预热 10 min, 混合后 37 °C 孵育 1 h, 加入等体积用冰预冷的终止液 (8 mol/L 尿素, 20% 蔗糖, 90 mmol/L Tris-硼酸盐 (pH 8.3), 20 mmol/L Na₂EDTA, 0.05% 溴酚蓝, 0.05% 二甲苯青及 0.1% SDS), 5% 含 7 mol/L 尿素的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 放射自显影后分析, 测定 1 h 切割率。所有体外切割活性测定均在不同时间重复 2 次^[3]。

1.5 心肌细胞培养及对脱氧核酶的摄取 取出生 1~3 d 的 SD 大鼠数只, 无菌条件下取出心脏, 去除心房后, 将心室组织剪碎, 0.2% 胰蛋白酶逐次消化, 制成单细胞悬液, 差速贴壁后收集未贴壁细胞, 接种于培养板, 接种密度为 5.0×10^4 /cm², 37 °C、5% CO₂ 孵箱中继续培养 24 h 后换成含 10% 小牛血清、不含抗生素的 DMEM。心肌细胞接种于盖玻片上, 培养至细胞融合达 60%, 采用脂质体 FuGENE 6 将 0.2 μ mol/L 5' 端标记荧光素 FAM 10-23 脱氧核酶转染心肌细胞, 转染过程按 FuGENE 6 转染试剂说明进行, 10-23 脱氧核酶与 FuGENE 6 的比值均为 2 μ g : 3 μ l。12 及 24 h 后取出盖玻片, 在荧光显微镜下 (激发波长 494 nm, 512 nm 波长) 观察。

心肌细胞培养至细胞融合达 60%, 换成无血清培养基, 继续培养 12 h 后分为 3 组: (1) 血清对照组: 单纯加入胎牛血清至终浓度 10% (v/v), 诱导心肌细胞肥大; (2) 10-23 脱氧核酶组: 即在血清诱导心肌细胞肥大的同时应用 FuGENE 6 将 DZ 转染心肌细胞; (3) 脂质体 FuGENE 6 对照组: 血清诱导心肌细胞肥大的同时单纯应用相同量的 FuGENE 6。脱氧核酶的剂量分别为 0.1 及 0.2 μ mol/L。

1.6 半定量 RT-PCR 检测 ET-1 mRNA 的表达 提取心肌细胞总 RNA, 取 2 μ g 总 RNA, 以 oligo dT₁₈ 为引物, M-MLV 逆转录酶逆转录成 cDNA, 反应体积 25 μ l。各取 3 μ l cDNA 进行 PCR 反应, β -actin 为内参照。ET-1 正义引物序列为 5'-CAG AGG CGA

TCA GAG CAA CCA -3, 反义引物序列为 5'-CAA GGA GGA GCA GGA GCA ACG-3, 扩增产物长度 296 bp。β-actin 正义引物序列为 5'-CCC ATT GAA CAC GGC ATT-3, 反义引物序列为 5'-GGT ACG ACC A GA GGC A TA CA -3, 扩增产物长度为 236 bp。PCR 反应体系为 50 μl, 条件为 94 预变性 10 min, 94 30 s, 58 15 s, 72 30 s, ET-1 扩增 30 个循环, β-actin 扩增 23 个循环。各取 20 μl PCR 产物, 1.5% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳分离后, 凝胶成像系统分析。以 ET-1 条带与 β-actin 条带光密度之比(ET-1/β-actin)反映 ET-1 mRNA 含量。

1.7 测定细胞活力、总蛋白含量和蛋白合成速率 心肌细胞接种于 96 孔培养板(10⁵/mL, 0.1 mL/孔)。培养结束前 4 h 每孔加入噻唑蓝(MTT)溶液(5 mg/mL) 20 μl, 继续孵育 4 h 后, 吸弃上清液, 每孔加入 150 μl DM SO, 震荡 10 min, 用酶联免疫分析仪于 490 nm 测定光密度值。

将心肌细胞接种于 24 孔培养板(10⁵/mL, 1 mL/孔)。培养结束后, 提取总蛋白, 用 BCA 法以可见光分光光度计在 562 nm 测定溶液的光密度值, 以溶剂为空白对照, 牛血清白蛋白为标准品作标准曲线, 测定各孔心肌细胞总蛋白含量。

心肌细胞接种于 96 孔培养板(10⁵/mL, 0.1 mL/孔)。培养结束前 12 h, 各孔加入 18.5 kBq/孔 ³H-亮氨酸, 继续培养 12 h 后, 多头收集器收集于玻璃纤维滤膜, 干燥后置于闪烁瓶, 加入闪烁液, 用液闪计数器测定掺入量, 结果以 cpm 值表示, 反映心肌细胞蛋白合成速率。

1.8 统计学处理 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差齐性的多组数据采用方差分析, 方差不齐的数据则采用秩和检验。

2 结果

2.1 底物的制备 体外转录产生的 RNA 长短不一, 无法直接用于体外切割率的测定。采用 5% 含 7 mol/L 尿素的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化 RNA 底物, 电洗脱回收后, 经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、放射自显影鉴定, 其条带较为均一。

2.2 体外切割活性测定 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 放射自显影成像, 观察到 DZ2、DZ3、DZ4 及 DZ5 均可切割 ET-1 RNA 底物, 仅 DZ1 对底物无切割作用。其中切割位点位于 G¹⁴⁷U 的 DZ4, 其两侧结

合区结合自由能之差最大, 1 h 切割率最高, 达 83.5%; 而 DZ3 两侧结合区结合自由能之差最小, 其切割效率亦最低(47.3%); 而 DZ2 和 DZ5 虽两侧结合区结合自由能之差相同, 但 DZ2 总的结合自由能高于 DZ5, 其切割效率也高于 DZ5(1 h 切割率分别为 68.1% 和 50.8%)。

2.3 心肌细胞对 DZ 的摄取 采用脂质体 FuGENE 6 将 5 端标记荧光素 FAM 的 DZ4 转染心肌细胞, 12 h 后出现较弱荧光, 而转染 24 h 后, 心肌细胞中呈现较为明显的荧光, 主要分布于细胞核, 胞质中的荧光较胞核为弱(图 1)。故心肌细胞在转染后继续培养 24 h, 抽提总 RNA 用 RT-PCR 检测 ET-1 mRNA 的变化。

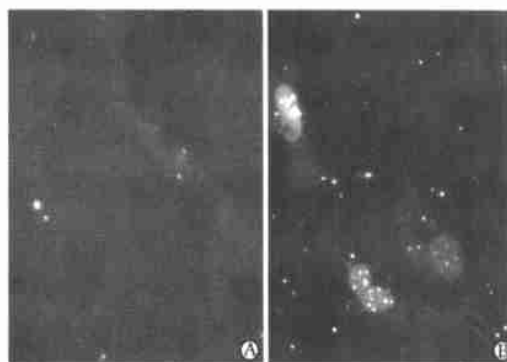


图 1 培养新生大鼠心肌细胞对 FAM 标记 10-23 脱氧核酶的摄取
Fig 1 Uptake of FAM-labeled 10-23

deoxyribozyme by cultured neonatal cardiomyocytes

A: 12 h after transfection; B: 24 h after transfection

2.4 DZ 对心肌细胞 ET-1 mRNA 的作用 半定量 RT-PCR 结果显示, 空白对照组 ET-1/β-actin 之比为 0.615 ± 0.044; 0.1 μmol/L DZ4 组 ET-1/β-actin 之比为 0.566 ± 0.046, 与空白对照组及相应脂质体对照组(0.617 ± 0.050)比较无显著差异; 0.2 μmol/L DZ4 组 ET-1/β-actin 之比为 0.471 ± 0.053, 较空白对照组及相应脂质体对照组(0.607 ± 0.058)明显降低($n=5, P < 0.05$)。空白对照组与 2 个脂质体对照组(0.1, 0.2 μmol/L DZ4)之间, ET-1/β-actin 无统计学意义。

2.5 DZ 对心肌细胞活力及蛋白质合成的影响 血清对照组与 2 个脂质体对照组(0.1, 0.2 μmol/L DZ4)之间细胞活力、细胞总蛋白及蛋白质合成速率相比无统计学差异; 0.1 μmol/L DZ 组的细胞活力、细胞总蛋白及蛋白质合成速率与相应脂

质体对照组比较差异亦无统计学意义; 而 0.2 $\mu\text{mol/L}$ DZ 组的细胞活力与相应脂质体对照组比较细胞活力下降了 26.6%, 细胞总蛋白下降 54.5%, 蛋白质合成速率下降 34.1% ($n=5, P<0.05$)。

3 讨论

心肌肥厚是高血压、心瓣膜病、急性心肌梗死等临床常见病的并发症, 也是预后指标之一, 持续性心肌肥大最终会导致心衰乃至猝死。Ito 等^[9]的研究表明, 外源性给予 ET-1 能增加心肌细胞表面积、刺激蛋白质合成、提高³H 亮氨酸掺入及增加胚胎型心脏特异性蛋白质表达, 可见 ET-1 具有强烈的促心肌细胞肥大的作用。本实验采用血清诱导心肌细胞肥大模型^[10], 同时给予 ET-1 10-23 脱氧核酶抑制内源性 ET-1 的表达, 结果表明, ET-1 10-23 脱氧核酶可减少内源性 ET-1 合成, 减轻血清诱导心肌细胞肥大的作用。

10-23 脱氧核酶的切割效率与其切割位点的选择关系密切, 其与底物的结合受 RNA 序列及切割位点附近空间结构的复杂性影响较大。目前尚难人工预测较长的 RNA 的空间结构, 而用于体外筛选的底物多为人工合成的包含切割位点的小片段 RNA 或 mRNA 中的局部序列^[3-5], 这类底物的空间结构对酶的影响较小, 有利于研究酶的特性。但由于忽略了 mRNA 空间结构对 10-23 脱氧核酶的影响, 筛选出的 10-23 脱氧核酶不一定适用于整体或细胞内给药。本研究采用的底物为 ET-1 全长 cDNA 体外转录的 RNA, 与天然 ET-1 mRNA 相比, 除无 5 帽结构及 3 多聚腺苷酸尾外, 其他结构非常相似。

已有实验表明, 10-23 脱氧核酶底物序列识别区与底物结合的自由能大小是影响切割效率的重要因素^[3-8]。本研究通过底物结合自由能的比较大小及实验观察, 认为底物结合的自由能与切割效率并不存在正比关系。为进一步探讨 10-23 脱氧核酶切割效率与结合自由能的关系, 除总的结合自由能外, 我们还分别比较了 5 及 3 底物结合区的结合自由能。结果显示在两侧结合区核苷酸数量相同的情况

下, DZ2、DZ3、DZ4 和 DZ5 其 5 或 3 底物结合区的结合自由能与其切割效率无直接的关系, 而两侧结合区结合自由能的绝对差值与切割效率有一定的关系。本工作设计的 10-23 脱氧核酶能切割体外转录的 ET-1 全长 RNA 底物, 转染心肌细胞后, 可抑制 ET-1 mRNA 的表达, 减缓血清诱导心肌细胞肥大, 10-23 脱氧核酶两侧结合区自由能的差值与切割效率有关。

[参考文献]

- [1] Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, *et al* Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of tetrahymena [J]. *Cell*, 1982, 31 (1): 147-157.
 - [2] Breaker RR, Joyce GF. A DNA enzyme that cleaves RNA [J]. *Chem Biol*, 1994, 1(4): 223-229.
 - [3] Santoro SW, Joyce GF. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(9): 4262-4266.
 - [4] Santoro SW, Joyce GF. Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzyme [J]. *Biochemistry*, 1998, 37 (38): 13330-13342.
 - [5] Cairns MJ, Hopkins TM, Witherington C, *et al* Target site selection for an RNA-cleaving catalytic DNA [J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(5): 480-486.
 - [6] Liu C, Cheng R, Sun LQ, *et al* Suppression of platelet-type 12-lipoxygenase activity in human erythroleukemia cells by an RNA-cleaving DNAzyme [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 284(4): 1077-1082.
 - [7] Chakraborti S, Banerjee AC. Inhibition of HIV-1 gene expression by novel DNA enzymes targeted to cleave HIV-1 TAR RNA: potential effectiveness against all HIV-1 isolates [J]. *Mol Ther*, 2003, 7(6): 817-826.
 - [8] Cieslak M, Szymanski J, Adamiak RW, *et al* Structural rearrangements of the 10-23 DNAzyme to beta 3 integrin subunit mRNA induced by cations and their relations to the catalytic activity [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(48): 47987-47996.
 - [9] Ito H, Hirata Y, Hiroe M, *et al* Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes [J]. *Circ Res*, 1991, 69(1): 209-215.
 - [10] Liu ZP, Olson EN. Suppression of proliferation and cardiomyocyte hypertrophy by CHAMP, a cardiac-specific RNA helicase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(4): 2043-2048.
- [收稿日期] 2004-03-20 [修回日期] 2004-07-14
[本文编辑] 尹 茶