

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.02.021 [http://www.crter.org]
杨水祥, 魏晓菲, 崔涓夏, 周勇. RNA 干扰抑制内皮细胞韦伯潘力氏小体的释放[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(2):301-308.

RNA干扰抑制内皮细胞韦伯潘力氏小体的释放*☆

杨水祥, 魏晓菲, 崔涓夏, 周勇

北京世纪坛医院心内科, 北京市 100038

文章亮点:

实验不仅构建了腺病毒介导的抑制 N-己基顺丁烯二酰亚胺敏感因子表达的 shRNA, 并通过转染内皮细胞, 抑制 N-己基顺丁烯二酰亚胺敏感因子表达, 进一步在细胞层面证实 N-己基顺丁烯二酰亚胺敏感因子-shRNA 转可染明显抑制韦伯潘力氏小体的释放。

关键词:

组织构建; 组织构建细胞学实验; 韦伯潘力氏小体; RNA 干扰; N-己基顺丁烯二酰亚胺敏感因子; 内皮细胞; 腺病毒; 省级基金; 组织构建图片文章

缩略语:

N-己基顺丁烯二酰亚胺敏感因子: N-ethylmaleimide-sensitive factor, NSF

摘要

背景: 利用 RNA 干扰和沉默基因达到临床治疗效果, 已经越来越受到重视。

目的: 探讨利用小干扰 RNA 方法抑制内皮细胞韦伯潘力氏小体释放的效果和意义。

方法: 设计腺病毒介导的针对调节韦伯潘力氏小体释放的关键蛋白 N-己基顺丁烯二酰亚胺敏感因子 N 端功能区 shRNA, 筛选鉴定收获病毒, 转染人主动脉内皮细胞, 携带 N-己基顺丁烯二酰亚胺敏感因子 shRNA 的腺病毒感染设为实验组、单纯病毒表达载体转染设为阴性对照组, 空白对照组未加任何东西。

结果与结论: 用携带 N-己基顺丁烯二酰亚胺敏感因子 shRNA 的腺病毒感染内皮细胞后, 3 组 N-己基顺丁烯二酰亚胺敏感因子 mRNA 表达比较, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$); 实验组的表达随时间变化持续下降, 24, 48, 72 h 组间比较差异有显著性意义 ($P=0.048$)。N-己基顺丁烯二酰亚胺敏感因子蛋白表达实验组低于两对照组, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$); 而两对照组之间比较差异无显著性意义 ($P=0.249$)。免疫荧光染色显示, N-己基顺丁烯二酰亚胺敏感因子 shRNA 腺病毒感染, 明显抑制凝血酶诱导的韦伯潘力氏小体的释放。说明携带 N-己基顺丁烯二酰亚胺敏感因子 shRNA 的腺病毒感染人主动脉内皮细胞, 能明显抑制 N-己基顺丁烯二酰亚胺敏感因子 mRNA 及蛋白表达, 抑制凝血酶诱导的韦伯潘力氏小体释放。

杨水祥☆, 男, 1957 年生, 陕西省扶风县人, 1983 年解放军第三军医大学毕业, 博士, 博士后, 主任医师, 教授, 博士生导师。主要从事冠状动脉硬化性心脏病、心力衰竭的临床与基础研究。
sxyang68@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2013)02-00301-08

收稿日期: 2012-05-04
修回日期: 2012-06-05
(20120104007/D · C)

RNA interference inhibits Weibel-Palade body release from endothelial cells

Yang Shui-xiang, Wei Xiao-fei, Cui Yu-xia, Zhou Yong

Department of Cardiology, Beijing Shijitan Hospital, Beijing 100038, China

Abstract

BACKGROUND: RNA interference and silent genes have got more and more attention as they can achieve the clinical effect.

OBJECTIVE: To explore the effect of small hairpin RNA in inhibiting the Weibel-Palade body release in endothelial cell.

METHODS: A small hairpin RNA mediated with an adenovirus vector was designed depending upon the N-terminal functional area of N-ethylmaleimide sensitive factor which act as a key protein in Weibel-Palade body release in endothelial cell. Being screened and identified, the harvested viruses were transfected into human aortic endothelial cell. The adenovirus vector with N-ethylmaleimide sensitive factor small hairpin RNA was regarded as the experimental group, and the pure adenovirus vector was regarded as negative control group, the blank control group without any treatment.

Yang Shui-xiang☆, Doctor,
Chief physician, Professor,
Doctoral supervisor,
Department of Cardiology,
Beijing Shijitan Hospital, Beijing
100038, China
sxyang68@163.com

Supported by: Beijing Natural
Foundation Committee, No.
7083108*

Received: 2012-01-04
Accepted: 2012-06-05

RESULTS AND CONCLUSION: There was significant difference of N-ethylmaleimide sensitive factor mRNA expression in the endothelial cell in three groups after transfected with N-ethylmaleimide sensitive factor small hairpin RNA ($P < 0.05$); the expression of N-ethylmaleimide sensitive factor mRNA in the experimental group was decreased with time prolonged, and there was significant difference of the N-ethylmaleimide sensitive factor mRNA expression in the experimental group at 24, 48 and 72 hours ($P=0.048$). The expression of N-ethylmaleimide sensitive factor protein in the experimental group was lower than that in the negative control group and blank control group, and the difference was significant ($P < 0.05$); there was no significant difference between negative control group and blank control group ($P=0.249$). The immunofluorescence staining showed that the release of Weibel-Palade body in endothelial cell induced with thrombin was inhibited obviously after transfected with N-ethylmaleimide sensitive factor small hairpin RNA. The expression of N-ethylmaleimide sensitive factor mRNA and protein in endothelial cell transfected with harvested adenoviruses which carried the N-ethylmaleimide sensitive factor small hairpin RNA were significantly decreased, and the release of Weibel-Palade Body induced with thrombin was inhibited dramatically.

Key Words: tissue construction; cytological experiments of tissue construction; Weibel-Palade body; RNA interference; N-ethylmaleimide-sensitive factor, endothelial cells; adenovirus; provincial grants-supported paper; tissue construction photographs-containing paper

Yang SX, Wei XF, Cui YX, Zhou Y. RNA interference inhibits Weibel-Palade body release from endothelial cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(2): 301-308.

0 引言

利用小干扰RNA(small linterfering RNA, siRNA 或interfering RNAs, iRNAs) 特异性抑制靶基因表达, 近年来在心血管疾病的防治方面也受到了越来越多的重视^[1-5]。

内皮细胞韦伯潘力氏小体的释放与动脉粥样硬化、急性冠脉综合征等心血管疾病的发生发展密切相关^[6-10]。N-己基顺丁烯二酰亚胺敏感因子(N-ethylmaleimide-sensitive factor, NSF)是介导韦伯潘力氏小体膜与细胞膜融合从而导致韦伯潘力氏小体释放的关键蛋白^[6-8]。但迄今为止, 尚未见利用RNA干扰技术抑制NSF蛋白的表达, 从而抑制韦伯潘力氏小体释放的研究报道。在以往研究NSF释放机制的基础上^[6-10], 实验设计合成针对NSF基因功能区的shRNA, 进行了抑制韦伯潘力氏小体释放的研究。该研究对动脉粥样硬化和冠心病的防治有一定的参考价值。

1 材料和方法

设计: 细胞组织构建实验。

时间及地点: 于2008年9月至2011年6月在首都医科大学附属北京世纪坛医院中心实验室及心内科实验室完成。

材料:

主要仪器设备: 超净工作台购自苏州净化设备厂; Universal 32 高速冷冻离心机为 Hettich 产品; 深低温冰箱为 Heraeus 公司产品; 荧光倒置显微镜购自 IX-71 OLYMPUS(Japan); 荧光定量 PCR 仪为 FTC2000 Canada 产品。

主要试剂:

Main reagents:

试剂	来源
割胶回收试剂盒、小量质粒抽提试剂盒	闪晶生物试剂公司
感受态细胞 DH-5α	GenScript 公司
pRNAT-H1.1/Adeno、293 细胞、人主动脉内皮细胞	Invitrogen 公司
LipofectamineTM2000	ShineGene 公司
RT-PCR 引物探针、RT 试剂、荧光定量 PCR 试剂、PCR 退火试剂盒	Abcam 公司
NSF 一抗	南京金思特公司
内参一抗、HRP 二抗 DEPC	Sigma

注: 其他普通化学试剂为上海化学试剂厂生产的分析级试剂。

方法:

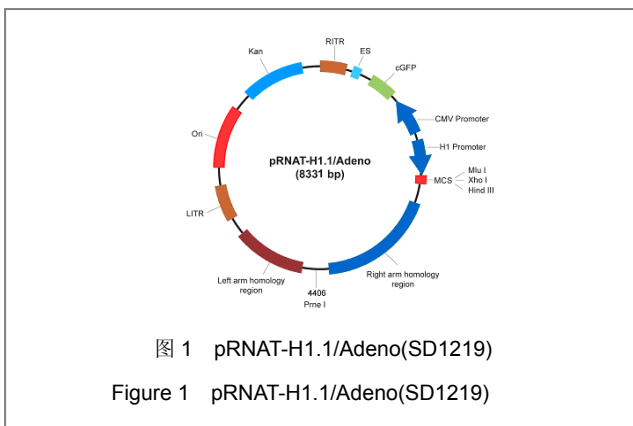
NSF特异性siRNA的设计与合成:

NSF特异性siRNA的设计: 从GeneBank中选取人NSF基因序列(基因收录号: N_006178)), 采用siRNA Target Designer- Version 1.51设计软件, 设计针对NSF基因N-末端区(1-205个氨基酸)的19nt寡核苷酸干扰序列(5'-TAG GAC TGG TTG TTG GAA ACA-3')设计NSF-shRNA序列。

NSF-shRNA的合成: 合成编码NSF-shRNA的DNA模板的两条单链, 模板链后面连接RNA PolyIII聚合酶转录中止位点, 同时两端分别设计 *Mlu* I 和 *Hind* III 酶切位点, 可以克隆至siRNA载体SD1219多克隆位点的 *Mlu* I 和 *Hind* III 酶切位点之间(DNA模板由上海Shinegene公司合成)。

NSF-shRNA腺病毒表达载体(pRNAT-NSF-shRNA)的构建及鉴定:

腺病毒载体的构建: 使用pRNAT-H1.1/Adeno (SD1219) 腺病毒载体, 见图1。经 *Mlu* I 和 *Hind* III 双酶切SD1216, 凝胶电泳, 回收纯化后, 与新合成的两端分别带有 *Mlu* I 和 *Hind* III 酶切位点NSF-shRNA DNA模板进行连接。50 ng的退火产物, 在3单位的T₄ DNA连接酶作用下, 10 μ L反应体积内16 $^{\circ}$ C过夜, 连接产物转化DH5 α 感受态细菌, 将5 μ L连接产物与50 μ L感受态细胞混匀, 冰浴30 min, 42 $^{\circ}$ C热休克90 s, 再冰浴3-5 min, 加入400 μ L 预冷的LB液体培养基, 37 $^{\circ}$ C轻摇培养45-60 min, 取200 μ L在LB-Kana(卡那霉素)固体培养基(卡那霉素浓度为25 mg/L)上铺板接种, 自然干燥5-10 min, 37 $^{\circ}$ C倒置培养过夜, 收获细菌, 使用闪晶公司的小量质粒抽提试剂盒提取质粒DNA, 并使用 *Mlu* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定和测序鉴定后标记冻存。



腺病毒包装及收获: 生长旺盛的293细胞, 配成 $2 \times 10^9 - 2 \times 10^{11}$ L⁻¹细胞悬液, 进行重组腺病毒DNA转染, 加入50 μ L无血清培养基于两管中, 一管加入0.8 μ g

DNA, 另一管加入2 μ L脂质体2000, 5 min后将两管溶液混合, 静置20 min, 加入24孔板, 6 h后, 更换1 mL 5%血清培养液继续培养10 d, 将已经出毒的细胞反复冻融3次, 收获原代病毒。

病毒滴度测定: 75 cm²培养瓶中加入10 mL、 5×10^6 293A细胞, 取0.5 mL原代病毒保存液, 加入培养瓶, 晃动3次, 37 $^{\circ}$ C CO₂孵箱中培养90 min, 加入5%DMEM培养液9 mL, 72 h后收集细胞, 600 \times g离心5 min, 去上清, 加入1 mL病毒保存溶液, -20 $^{\circ}$ C/37 $^{\circ}$ C冻融3次, 离心收集上清, 使用TCID₅₀(50% tissue culture infective dose)法进行病毒滴度测定(参考说明书), 并使用荧光PCR检测病毒干扰效率, 检测后冻存于-80 $^{\circ}$ C。

人主动脉内皮细胞转染: 采用脂质体LipofectamineTM2000进行细胞转染。 2×10^8 L⁻¹种植于6孔板, 80%的融合时, 使用NSF-shRNA腺病毒和单纯病毒表达载体感染人主动脉内皮细胞分别设为实验组和阴性对照组, 空白对照组不加任何东西, 每孔加病毒液60 μ L, 分为0(感染后即刻), 24, 48, 72 h组分别收获细胞。

RT-PCR检测目的基因表达:

总RNA的提取: 使用TRIZOL法提取总RNA。分组转染的细胞, 每孔加入200 μ L TRIZOL试剂, 吹打裂解细胞, 4 $^{\circ}$ C 8 000 \times g离心5 min, 弃上清, 50 μ L H₂O(DEPC处理)溶解RNA, 55-60 $^{\circ}$ C, 5-10 min, 测A值定量RNA浓度, 并电泳检测总RNA。

引物设计与合成: 根据人NSF mRNA序列(基因收录号: NM_006178), 设计的PCR引物分别为: 上游: TGG GCT GGG CTT TCT ATT G; 下游: TGC CAT CTT GTC GGT GTC A; PCR扩增片段长150 bp。 β -肌动蛋白(β -actin)为参照: 上游引物: TGA CGT GGA CAT CCG CAA AG; 下游引物: CTG GAA GGT GGA CAG CGA GG; PCR扩增片段长度205 bp。引物由上海Shinegene公司设计合成。

荧光定量PCR实时检测NSF mRNA表达: 利用实时荧光定量PCR(RT-PCR)荧光信号的积累实时监测整个PCR进程, 建立扩增曲线, 准确确定Ct值(每个反应管内的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数), 按照试剂盒说明书进行操作。根据预实验确定的反应条件: 25 $^{\circ}$ C 10 min 42 $^{\circ}$ C 60 min, 85 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C冷却。荧光定量PCR扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 20 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 循环35次。

Western Blot检测NSF蛋白表达: 转染腺病毒的细胞用3 mL 4 $^{\circ}$ C预冷的PBS(0.01 mmol/L pH 7.2-7.3)洗涤3

次, 加裂解液1 mL摇匀, 置于冰上裂解30 min, 4 °C 12 000 r/min离心15 min, 取上清液进行SDS-PAGE 电泳, 转膜, 压片曝光和进行斑点扫描。

免疫荧光染色检测NSF重组腺病毒对韦伯潘力氏小体释放的作用: 采用上述同样方法培养转染NSF-siRNA重组腺病毒的人主动脉内皮细胞, 转染72 h后收集细胞, 用4 U/L凝血酶(Thrombin)处理培养细胞1 h, 同时以不加任何干预的正常细胞为对照, 以鼠抗人VWF抗体为一抗对上述4组细胞进行免疫荧光染色, 观察韦伯潘力氏小体的释放的抑制情况。

主要观察指标: 主要观察内皮细胞韦伯潘力氏小体的释放, 以免疫荧光染色显示; 观察主要调控蛋白NSF的mRNA及蛋白质表达, 分别以PCR和Western Blot显示。

统计学分析: 3次重复的实验数据, 使用SPSS 13.0统计软件进行分析, 对计量资料进行正态分布检验, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。先进行方差齐性检验, 如不齐则采用变量变换达到齐性, 采用one-way ANOVA分析进行组间比较, 两两比较用LSD法, $\alpha=0.05$, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 NSF-shRNA 序列及腺病毒表达载体鉴定
NSF-shRNA序列 设计的针对NSF基因N-末端区(1-205个氨基酸)的19nt寡核苷酸干扰序列(5'-TAG GAC TGG TTG TTG GAA ACA-3')NSF-shRNA, 见图2。该序列经过Blast数据库分析, 与其他分子无同源序列, G+C含量接近50%, 正义链和反义链, 以Loop(9nt)相连, 称为NSF-shRNA, 并分别在5'和3'端引入Mlu I和Hind III酶切位点, 总长度为76 bp。

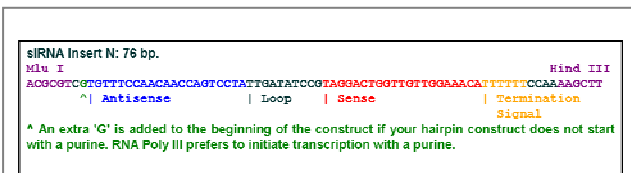


图2 设计的NSF-shRNA具体序列

Figure 2 Specific sequence of N-ethylmaleimide sensitive factor small hairpin RNA

重组腺病毒载体NSF-shRNA测序结果: 将设计合成的NSF-shRNA序列与腺病毒载体pRNAT-H1.1/Adeno(SD1219), 见图1, 连接, 转化连接子, 获得真

核表达质粒阳性克隆。测序鉴定及序列比对结果, 见图3, 均正确。

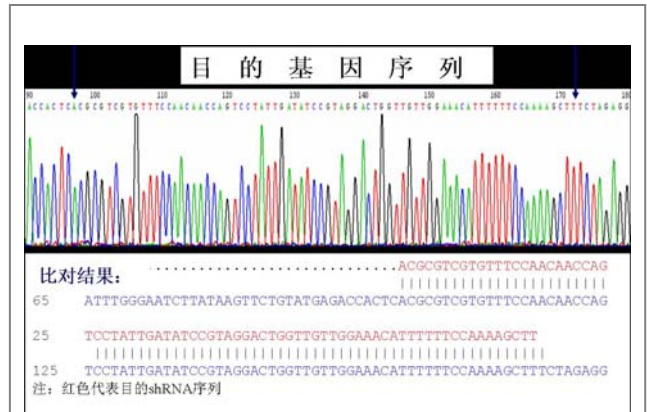
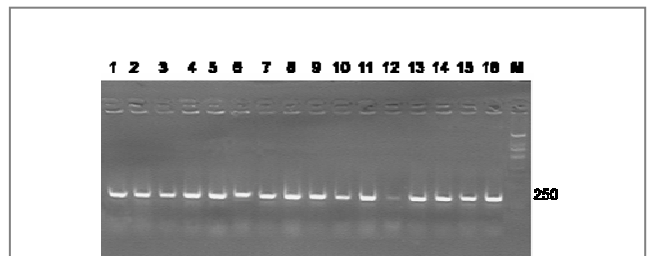


图3 重组质粒测序图, 测序鉴定及序列比对结果正确

Figure 3 Recombinant plasmid sequencing diagram, right sequenced identification and sequence alignment results

PCR产物电泳鉴定结果, 见图4, Lane 1-11、13-16为阳性克隆, 出现大小为250 bp的扩增条带; Lane12为阴性克隆, 未出现特异性扩增条带。引物为pRNA-H1(正义链): 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG3'; pShuttle-H1.1(反义链): CAA AAC TAC ATA AGA CCC CCA C。



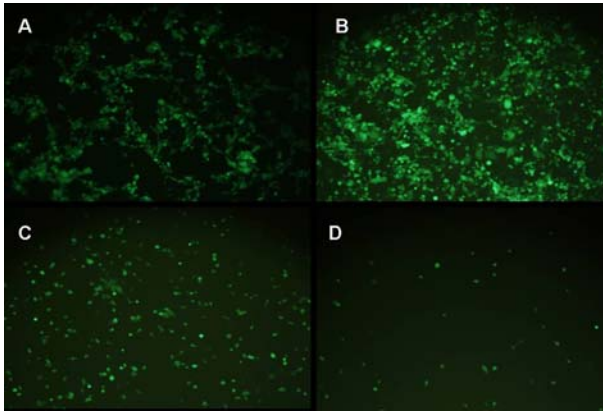
注: Lane 1-11、13-16为阳性克隆, 出现大小为250 bp的扩增条带; Lane12为阴性克隆, 未出现特异性扩增条带

图4 重组腺病毒NSF-shRNA载体PCR产物电泳图

Figure 4 PCR product electrophoresis pattern of recombinant adenovirus N-ethylmaleimide sensitive factor small hairpin RNA carrier

2.2 重组腺病毒鉴定

重组腺病毒滴度测定: 使用TCID50法进行病毒滴度测定。pRNAT-H1.1(SD1219)腺病毒载体携带cGFP基因, 使用不同浓度腺病毒悬液感染293细胞48 h后荧光显微镜下的结果, 见图5, 显示0.1 μL病毒感染293A细胞48 h, 感染效率最高, 荧光表达最好。并根据TCID50法计算滴度公式计算出本次病毒制备的滴度为 2×10^9 TU/mL。



A: 1 μL 时荧光显微镜显示感染效率高, 荧光表达丰富;
 B: 0.1 μL 时显示感染效率最高, 荧光表达最好;
 C: 0.01 μL 时显示感染效率差;
 D: 0.001 μL 时感染效率最差。

图 5 不同浓度腺病毒感染 293A 细胞 48 h 的比较 ($\times 200$)

Figure 5 Comparison results of 293A cells after transfected with different-concentration adenovirus for 48 h ($\times 200$)

重组腺病毒NSF-mRNA荧光PCR检测结果: 重组腺病毒收获及测定滴度后, 感染QBC939细胞, 感染后收集细胞、提取总RNA、检测目的NSF-mRNA表达。结果显示, 与对照组相比, NSF基因在干扰病毒转染后表达降低, 表明重组腺病毒具有干扰效果, 干扰病毒包装成功, 检验结果见表1。

表 1 重组腺病毒感染 QBC939 细胞后目的基因表达

Table 1 Target gene expression of recombinant adenovirus transfected QBC939 cells

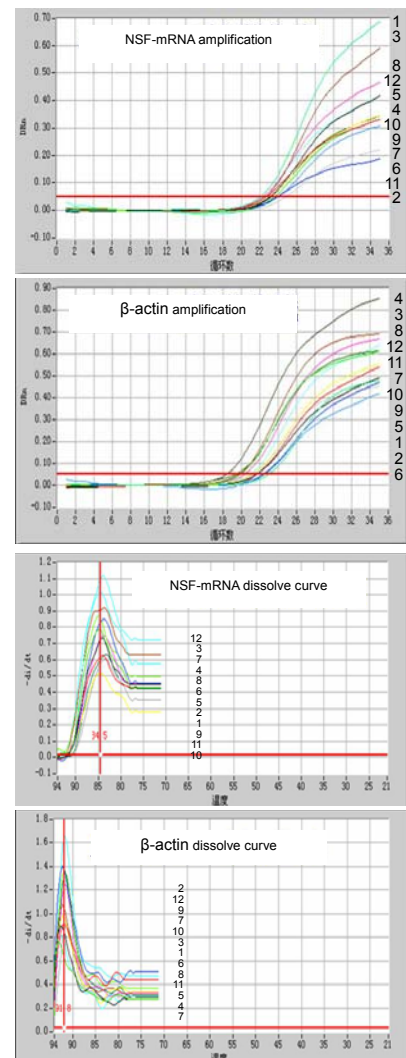
样本编号	内参 (β -actin)				
	Ct1	Ct2	Ct3	平均 Ct 值	平均相对拷贝数
S007	18.787	19.418	19.244	19.149 9	9.55×10^7
对照	20.621	21.250	21.004	20.958 1	2.82×10^7
样本编号	NSF				
	Ct1	Ct2	Ct3	平均 Ct 值	平均相对拷贝数
S007	24.421	25.048	24.651	24.706 5	2.26×10^6
对照	25.403	26.030	25.593	25.675 5	1.18×10^6

2.3 转染人主动脉内皮细胞后NSFmRNA的表达

总RNA质量检测: 利用紫外分光光度计检测样品12份, A_{260}/A_{280} 在1.8~2.0, 均合格; 2%凝胶电泳, 18 s和28 s两条带明亮清晰, 亮度比值2:1, 说明RNA质量

良好(图省略)。

RT-PCR实时定量NSF-mRNA扩增曲线: 实时荧光定量PCR(RT-PCR)根据反应体系中的荧光基团, 建立实时扩增曲线, 内参基因及NSF-mRNA的扩增曲线如下, 见图6。该反应体系中, Ct值的重现性极好, 即同一模板不同时间扩增或同一时间不同管内扩增, 得到的Ct值恒定, 并可利用标准曲线对未知样品进行定量测定。溶解曲线是内嵌染料在反应末尾时对扩增产物溶解而产生的溶解峰, 单峰表明扩增产物特异性好。本实验各组中目的基因及对照基因的溶解曲线均为单峰, 表明扩增结果具有特异性, 见图6。



注: 1-4 分别代表空白对照组 0, 24, 48, 72 h; 5-8 分别代表阳性对照组 0, 24, 48, 72 h; 9-12 分别代表实验组 0, 24, 48, 72 h。

Figure 6 Amplification curve and melting curve of real-time quantitative-PCR N-ethylmaleimide sensitive factor small hairpin RNA

图 6 RT-PCR 实时定量 NSFmRNA 扩增曲线与溶解曲线

转染后NSF-mRNA的表达量: 通过检测每个样品的对照基因, 计算目的基因的相对表达量。计算方法:
 $\Delta Ct(\text{相对表达量}) = Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{内参})$ 。
 NSF-mRNA的表达情况, 见图7(以 $2^{-\Delta Ct}$ 为观察指标)。如图所示, 各组比较, 实验组与空白对照组($P=0.02$)、实验组与阴性对照组($P=0.035$)之间有显著性差异; 而空白对照组与阴性对照组之间比较, 差异无显著性意义($P=0.25$)。在各组内部不同时间点的比较上, 空白对照组($P=0.988$)和阴性对照组($P=0.955$)内各时间点NSF-mRNA的表达差异无显著性意义, 实验组内NSF-mRNA的表达量随着时间的变化持续下降, 差异具有显著性意义($P=0.048$)。

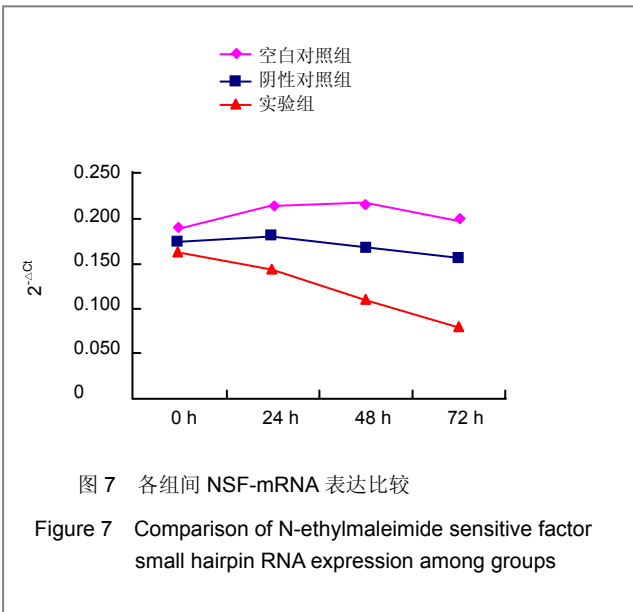
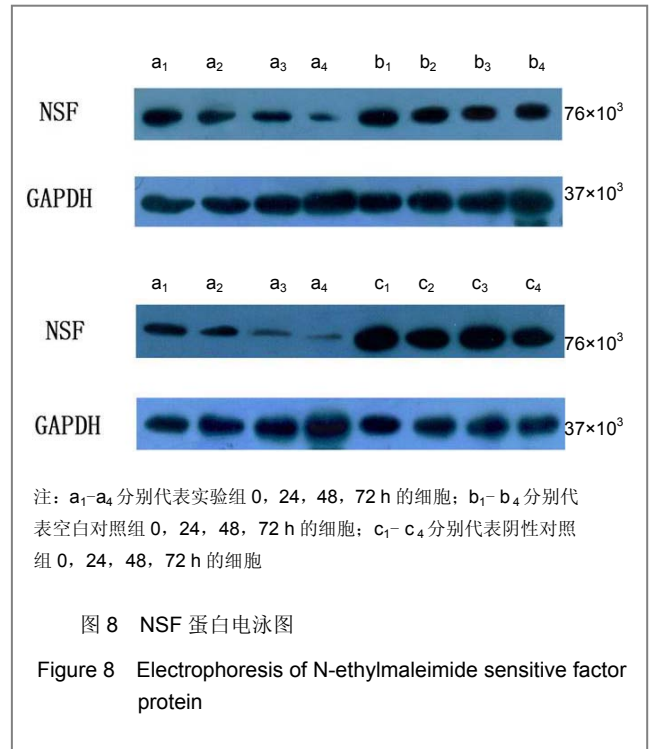


图7 各组间 NSF-mRNA 表达比较

Figure 7 Comparison of N-ethylmaleimide sensitive factor small hairpin RNA expression among groups

转染人主动脉内皮细胞后NSF蛋白表达: 与空白对照组及阴性对照组相比, 实验组NSF的表达随着培养时间的延长明显减少, 呈递减趋势, 表明重组腺病毒在人主动脉内皮细胞内大量复制并有效抑制了NSF-mRNA的表达; 而空白对照组及阴性对照组内部NSF蛋白的表达无明显变化, 3组之间GAPDH蛋白的表达量基本相同。NSF蛋白的表达量在实验组与空白对照组($P=0.031$)、实验组与阴性对照组($P=0.004$)比较, 差异有显著性意义; 而空白对照组与阴性对照组之间比较, 差异无显著性意义($P=0.249$), 见图8。

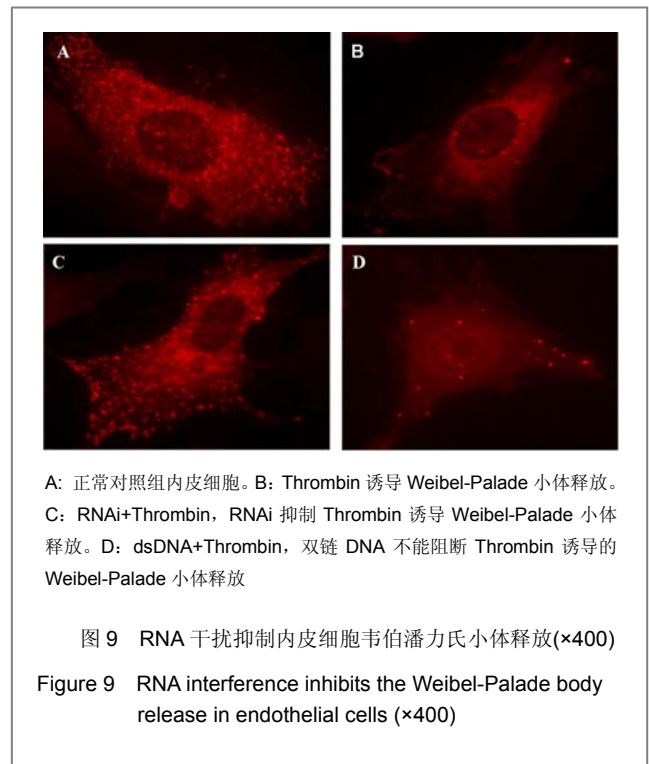
免疫荧光染色显示RNA干扰抑制韦伯潘力氏小体释放情况: 携带NSF-RNA干扰腺病毒感染人主动脉内皮细胞后可抑制凝血酶(Thrombin)诱导的韦伯潘力氏小体的释放, 而双链DNA没有这种作用, 见图9。



注: a₁-a₄ 分别代表实验组 0, 24, 48, 72 h 的细胞; b₁-b₄ 分别代表空白对照组 0, 24, 48, 72 h 的细胞; c₁-c₄ 分别代表阴性对照组 0, 24, 48, 72 h 的细胞

图8 NSF 蛋白电泳图

Figure 8 Electrophoresis of N-ethylmaleimide sensitive factor protein



A: 正常对照组内皮细胞。B: Thrombin 诱导 Weibel-Palade 小体释放。C: RNAi+Thrombin, RNAi 抑制 Thrombin 诱导 Weibel-Palade 小体释放。D: dsDNA+Thrombin, 双链 DNA 不能阻断 Thrombin 诱导的 Weibel-Palade 小体释放

图9 RNA 干扰抑制内皮细胞韦伯潘力氏小体释放(×400)

Figure 9 RNA interference inhibits the Weibel-Palade body release in endothelial cells (×400)

3 讨论

利用siRNA干扰和沉默基因达到临床治疗效果, 已经越来越受到重视^[11-12]。本文不仅构建了腺病毒介导的抑制NSF表达的shRNA, 并通过转染内皮细胞, 抑制NSF表达, 并进一步在细胞层面证实了NSF-shRNA转

染明显抑制韦伯潘力氏小体的释放。下面就相关问题予以讨论。

3.1 韦伯潘力氏小体(WPB)与心血管疾病 1975年Palade和de Duve 通过电镜发现了韦伯潘力氏小体,它是内皮细胞中的分泌颗粒。其中包含: P-选择素^[13], 介导单核中性白细胞的黏附; vWF, 促进血小板聚集; 内皮素^[14], 强烈收缩血管, 与动脉粥样硬化和急性冠脉综合征的斑快破裂有关; 白细胞介素8^[15], 不仅吸附中性白细胞, 而且激活白细胞使之释放炎性递质; 因此, 韦伯潘力氏小体的释放导致血小板聚集, 中性白细胞黏附到血管内皮和诱发血管痉挛等一系列血管壁的炎症反应及病理生理改变, 显然与动脉粥样硬化和急性冠脉综合征的发生发展密切相关。

3.2 NSF介导韦伯潘力氏小体释放 NSF是一种介导韦伯潘力氏小体膜与细胞膜融合导致细胞外吐作用(exocytosis), 即小体内容物释放起关键作用的蛋白质^[6-8]。NSF通过可溶性NSF黏附蛋白(soluble NSF attachment proteins, SNAPs)附着在细胞膜上, 而后者是通过黏附蛋白膜结合受体结合到细胞膜上。NSF蛋白作为分子伴侣, 通过水解三磷酸腺苷改变黏附蛋白膜结合受体复合物的分子构型, 使复合物解聚, 使细胞膜与囊泡膜融合, 内容物释放, 并使黏附蛋白膜结合受体的单体成分循环使用。每一个NSF单体是由三个功能区(domain)所构成^[8]: N-末端区和两个同源三磷酸腺苷结合区域。N-末端区(1-205个氨基酸)是与SNAP和SNAREs相互作用的区域。NSF的活性受翻译后修饰调节, 以保证其使囊泡膜与细胞膜融合, 使囊泡内容物释放。

3.3 抑制NSF, 调节韦伯潘力氏小体释放 鉴于韦伯潘力氏小体释放与心血管疾病的相关性, 人们积极寻求抑制NSF的方法, 从而调节韦伯潘力氏小体的释放。Ito等^[16-18]利用人免疫缺陷病毒反转录蛋白转导区(transduction domain)与NSF形成融合蛋白(TAT-NSF), 抑制NSF三磷酸腺苷酶(ATPase)活性; 他们还发现他汀类药物能抑制韦伯潘力氏小体的释放^[17-19]。研究表明, 血管内皮生长因子也是通过增加NO^[20-21], 使NSF亚硝基化从而完成调节韦伯潘力氏小体的释放。H2O2抑制NSF三磷酸腺苷酶水解活性^[17-20], 导致可溶性NSF附着蛋白受体复合物解聚, 抑制韦伯潘力氏小体释放。杨水祥等^[6, 7, 9]发现, 凝血酶介导WBP释放增加的

同时, 使Rac-GTP结合活性及ROS增加, 认为韦伯潘力氏小体释放机制是Rac1依赖的ROS调节过程。在此基础上, 作者努力寻找siRNA抑制韦伯潘力氏小体的释放途径。

3.4 siRNA干扰NSF, 抑制韦伯潘力氏小体释放 本研究结果显示, 重组腺病毒感染人主动脉内皮细胞后, 与空白对照和阴性对照组相比, 实验组NSF-mRNA的表达明显下调($P < 0.05$, 图7), 同时, 实验组NSF蛋白的表达量与空白对照及阴性对照组比较, 差异也有显著性意义($P < 0.05$, 图8), 说明NSF-shRNA介导的RNA干扰能够有效地抑制靶基因的表达; 细胞学研究也表明, NSF-shRNA腺病毒转染内皮细胞后, 免疫荧光染色显示, 凝血酶诱导的韦伯潘力氏小体释放受到明显抑制(图9)。

RNA干扰抑制韦伯潘力氏小体释放的可能的机制为: 重组腺病毒感染人主动脉内皮细胞后, 在重组腺病毒H1启动子的操纵下扩增出shRNA分子, 进一步被切割成针对NSF基因的siRNA, NSF-siRNA双链结构解旋并形成有活性的RISC(蛋白/RNA复合物), 由RISC中的NSF-siRNA反义链与NSF-mRNA互补区域结合, 切割NSF-mRNA从而达到抑制其表达的作用。同时导致编码NSF蛋白的N端功能区基因失效, 使其与 α -SNAP和SNAREs结合受阻, SNAREs复合物不能解聚, 韦伯潘力氏小体释放被抑制。

在RNA干扰沉默基因的时效性方面, 国内学者发现基于载体表达的RNA干扰具有明显的时间效应^[22]。RNA干扰作用最早在转染后12 h出现, 24-48 h干扰载体表达量持续增加, 48-72 hRNA干扰作用进一步增强, 抑制峰值在48-60 h, 随后RNA干扰作用减弱。其原因可能随着细胞分裂干扰病毒复制所致。同样, 本实验也发现了相似的时间效应。在实验组内部, NSF-mRNA基因拷贝数及NSF蛋白表达量随时间推移持续下降($P < 0.05$), 不同的是, 转染72 h RNA抑制作用最强, 可能与转染效率、时间、细胞类型及载体剂量等因素有关。

总之, 实验表明重组腺病毒介导的RNA干扰作用能够有效地抑制NSF基因的表达进而抑制韦伯潘力氏小体的释放。RNA干扰有望成为未来心血管疾病治疗的新手段。但是, RNA干扰作为一种临床治疗手段, 仍有许多问题有待解决, 如重组腺病毒的某些成分可能诱发宿

主的免疫反应, 理想的空壳载体的选择、辅助病毒或质粒的选择、病毒的纯化及生物安全性等问题, 有赖于相应、必要和较大规模的基础与临床研究。

基金资助: 北京自然科学基金资助(7083108)。

作者贡献: 第一作者进行实验设计, 第二、三、四作者进行实施, 第一作者进行实验评估、资料收集并成文审校, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 未涉及相关伦理学内容。

本文创新性: 本实验表明重组腺病毒介导的 RNA 干扰作用能够有效地抑制 NSF 基因的表达进而抑制韦伯潘力氏小体的释放。RNA 干扰有望成为未来心血管疾病治疗的新手段。但是, RNA 干扰作为一种临床治疗手段, 仍有许多问题有待解决, 有赖于相应、必要和较大规模的基础与临床研究。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Sioud M. Promises and challenges in developing RNAi as a research tool and therapy. *Methods Mol Biol.* 2011;703: 173-187.
- [2] Shimizu H, Fujita T. New short interfering RNA-based therapies for glomerulonephritis. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7(7): 407-415.
- [3] Katakowski JA, Palliser D. Optimizing siRNA delivery to the genital mucosa. *Discov Med.* 2011;11(57):124-132.
- [4] Yang SX, Hu DY, Tang CS. *Zhongguo Xinxueguanbing Yanjiu Zazhi.* 2004;2(12):1-3.
杨水祥, 胡大一, 唐朝枢. 基因组学研究的革命性工具-小分子 RNA 的研究进展(一)[J]. 中国心血管病研究杂志, 2004,2(12): 1-3.
- [5] Yang SX, Hu DY, Tang CS. *Zhongguo Xinxueguanbing Yanjiu Zazhi.* 2005;3(1):14-15.
杨水祥, 胡大一, 唐朝枢. 基因组学研究的革命性工具-小分子 RNA 的研究进展(二)[J]. 中国心血管病研究杂志, 2005,3(1): 14-15.
- [6] Yang SX, Yan J, Chen MZ, et al. *Zhonghua Xinxueguanbing Zazhi.* 2004;32(2):161-165.
杨水祥, 阎娟, 陈明哲, 等. Rac1 在内皮细胞韦伯潘力氏小体释放中的作用[J]. 中华心血管病杂志, 2004,32(2):161-165.
- [7] Yang SX, Yan J, Deshpande SS, et al. Rac1 regulates the release of weibel-palade bodies in human aortic endothelial cells. *Chinese Medical Journal.* 2004;117(8):1143-1150.
- [8] Matsushita K, Morrell CN, Cambien B, et al. Nitric oxide regulates exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor. *CELL.* 2003;115(2): 139-150.
- [9] Yang SX, Quick RA, Irani K, et al. Rac1 regulates the release of Weibel-Palade Bodies in human aortic endothelial cells. *Cinese medical journal.* 2004;117(8):1143-1150.
- [10] Qian Z, Gelzer-Bell R, Yang SX, et al. Inducible nitric oxide synthase inhibition of weibel-palade body release in cardiac transplant rejection. *Circulation.* 2001;104(19):2369-75.
- [11] Ming X. Cellular delivery of siRNA and antisense oligonucleotides via receptor-mediated endocytosis. *Expert Opin Drug Deliv.* 2011;8(4):435-449.
- [12] Samuel-Abraham S, Leonard JN. Staying on message: design principles for controlling nonspecific responses to siRNA. *FEBS J.* 2010;277(23):4828-4836.
- [13] Amin HM, Ahmad S, Walenga JM, et al. Soluble P-selectin in human plasma: effect of anticoagulant matrix and its levels in patients with cardiovascular disorders. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2000;6(2):71-76.
- [14] Russell FD, Skepper JN, Davenport AP. Evidence using immunoelectron microscopy for regulated and constitutive pathways in the transport and release of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31(3):424-430.
- [15] Wolff B, Burns AR, Middleton J, et al. Endothelial cell "memory" of inflammatory stimulation: human venular endothelial cells store interleukin 8 in Weibel-Palade bodies. *J Exp Med.* 1998;188(9):1757-1762.
- [16] Ito T, Yamakuchi M, Lowenstein CJ. Thioredoxin increases exocytosis by denitrosylating N-ethylmaleimide-sensitive factor. *J Biol Chem.* 2011;286(13):11179-11184.
- [17] Lowenstein CJ. Nitric oxide regulation of protein trafficking in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res.* 2007;75(2): 240-246.
- [18] Ferlito M, Fulton WB, Zauher MA, et al. VAMP-1, VAMP-2, and syntaxin-4 regulate ANP release from cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49(5):791-800.
- [19] Goel A, Su B, Flavahan S, et al. Increased endothelial exocytosis and generation of endothelin-1 contributes to constriction of aged arteries. *Circ Res.* 2010;107(2):242-251.
- [20] Yamakuchi M, Ferlito M, Morrell CN, et al. Exocytosis of endothelial cells is regulated by N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Methods Mol Biol.* 2008;440:203-215.
- [21] Calvert JW, Gundewar S, Yamakuchi M, et al. Inhibition of N-ethylmaleimide-sensitive factor protects against myocardial ischemia/ reperfusion injury. *Circ Res.* 2007;101(12): 1247-1254.
- [22] He GP, Zhang SZ. *Shengwu Huaxue yu Shengwu Wuli Jinzhan.* 2005;32(3):258-267.
何国平, 张思仲. 短发夹 RNA 介导 RNA 干扰的时间和剂量效应研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2005,32(3):258-267.