

·分子生物学·

反义肽核酸对促甲状腺激素受体 mRNA 表达的影响

黄丽娟 陈宁 叶静 沈炳玲 朱云娟 孟涛 张志洋 朱学良

【摘要】 目的 探讨反义肽核酸 (asPNA) 对大鼠甲状腺细胞的细胞膜表面促甲状腺激素受体 (TSHR) 表达的影响。方法 设计两种与 TSHR mRNA 不同片段互补的 asPNA, 分别为核定位信号-asPNA1(NLS-asPNA1)和 NLS-asPNA2, 另外合成一段非相关的干扰肽核酸(NLS-scrPNA)序列, 用荧光显微镜观察 NLS-asPNA 能否进入细胞, 采用噻唑蓝法检测 asPNA 对细胞是否具有毒性作用, 然后用实时定量 RT-PCR 检测 NLS-asPNA 对 TSHR mRNA 表达的影响。结果 荧光显微镜观察发现, asPNA 可以进入到细胞中去。噻唑蓝法检测发现 asPNA 对细胞没有毒性作用。实时定量 RT-PCR 结果显示, NLS-asPNA1 和 NLS-asPNA2 可以抑制 TSHR mRNA 表达, 表现为随着 NLS-asPNA 与细胞培养时间的延长, TSHR cDNA 的拷贝数逐渐下降, 且呈现时间依赖性, 而 NLS-scrPNA 对 TSHR mRNA 的表达没有明显的影响。结论 NLS-asPNA 可以进入到细胞中去, 并且能够下调 TSHR mRNA 的表达。

【关键词】 肽核酸类; 受体, 促甲状腺素; RNA, 信使

The effects of antisense peptide nucleic acid on the expression of thyroid stimulating hormone receptor mRNA HUANG Li-juan*, CHEN Ning, YE Jing, SHEN Bing-ling, ZHU Yun-juan, MENG Tao, ZHANG Zhi-yang, ZHU Xue-liang. *Tianjian Biotechnologies (Tianjin) Limited Company, Tianjin 300457, China

Corresponding author: HUANG Li-juan, Email: tech@tj-bio.com

【Abstract】 Objective To study the effects of antisense peptide nucleic acid (asPNA) on thyroid stimulating hormone receptor (TSHR) of Fisher rat thyroid cells membrane. **Methods** Two kinds of asPNA which could hybridized to the TSHR mRNA named as nuclear localization signal-asPNA1(NLS-asPNA1) and NLS-asPNA2 were designed, and a control PNA with a scramble sequence named as NLS-scrPNA was synthesized. The cellular uptake of peptide nucleic acids were analyzed by fluorescence microscopy, and the toxic effect of asPNA to Fisher rat thyroid cells was evaluated by MTT assay. The effect of NLS-asPNA on the expression of TSHR mRNA was detected by realtime quantitative RT-PCR. **Results** Fluorescence microscopy indicated that asPNA were taken up by the cells. The results of MTT assay showed that all the asPNA had no toxic effect on the cells. The results of realtime quantitative RT-PCR showed that NLS-asPNA1 and NLS-asPNA2 could inhibit the expression of TSHR mRNA, the copies of TSHR cDNA decreased gradually along with the prolongation of culture time. But NLS-scrPNA had no significant effect on the expression of TSHR mRNA. **Conclusion** NLS-asPNA could be taken up by the cells and down-regulate the expression of TSHR mRNA.

【Key words】 Peptide nucleic acids; Receptors, thyrotropin; RNA, messenger

肽核酸是 20 世纪 80 年代由有机化学家 Ole Buchardt 和生物化学家 Peter Nielsen 共同研制合成的一种新型的序列特异性核酸制剂, 是以不带电的、非手性的肽键(NH-CO)替代核酸的天然骨架 3', 5'-

磷酸二酯键的核酸类似物^[1-2]。尽管肽核酸的骨架不同于天然核酸, 但是它仍然遵守 Watson-Crick 原则, 肽核酸与 DNA 或 RNA 的亲合力比 DNA 与 DNA、DNA 与 RNA 的亲合力强^[3]。核酸在体内容易被核酸内切酶和核酸外切酶水解, 而肽核酸不易被蛋白酶和核酸酶水解。有研究通过在肽核酸分子上连接正电荷基团, 如赖氨酸或精氨酸残基, 或通过配体、核定位信号 (nuclear localization signal, NLS) 提高细胞对肽核酸的通透性^[4-6]。

DOI: 10.3760/j.issn.1673-4114.2012.05.011

作者单位: 300457, 天健生物制药(天津)有限公司(黄丽娟, 孟涛, 张志洋); 300070, 天津医科大学病理生理教研室(陈宁, 叶静, 沈炳玲, 朱学良); 300070, 天津医科大学寄生虫学教研室(朱云娟)

通信作者: 黄丽娟 (Email:tech@tj-bio.com)

自身免疫性甲状腺疾病 (autoimmune thyroid disease, AITD) 主要包括 Graves 病、桥本氏甲状腺炎和原发黏液性水肿, 它们的临床表现为甲状腺功能亢进或低下, 以及甲状腺组织的病理损伤。迄今为止, 国内外学者对 AITD 的发病机理尚存在许多争议, 但多数学者倾向于认为 AITD 是由与促甲状腺激素受体 (thyroid stimulating hormone receptor, TSHR) 结合的抗体所引起的^[1]。这一论点不仅通过 Graves 病患者血清中检测到的高水平甲状腺刺激性抗体 (thyroid stimulating antibody, TSAb) 得到证明, 而且新生儿 Graves 病是由母亲胎盘中的 TSAb 引发的事实也支持了这一论点。既然 AITD 是由于 TSHR 结合抗体引起的, 我们可以通过减少 TSHR 的受体数目达到控制 AITD 进程的目的。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

Fisher 大鼠甲状腺细胞系 (Fisher rat thyroid cell line, FRTL) 由天津医科大学内分泌所李兰英教授赠送, FRTL 以促甲状腺激素依赖和相应的腺苷酸环化酶活性为特征。细胞培养基为含 5% 小牛血清、5 ng/ml 氢化可的松、5 μ g/ml 转铁蛋白、10 μ g/ml 胰岛素、1 mU/ml 促甲状腺激素、谷氨酰胺、青霉素各 100 U/ml 的 Coon's F-12 培养基。将 FRTL 放在含 5% CO₂、37 °C 的培养箱内连续培养, 每隔 3 d 换液一次。

1.2 反义肽核酸 (antisense peptide nucleic acid, asPNA) 的合成

根据 Genbank 公布的 TSHR 基因的 mRNA 序列 (gi: 575923 和 6981679 的同源序列) 设计两段 asPNA。根据 TSHR 基因第一个翻译起始密码子 ATG (-6 bp~7 bp) 和 5' 非翻译区 (-38 bp~-26 bp) 设计 asPNA1、asPNA2 及干扰肽核酸 (scramble peptide nucleic acid, scrPNA), 为了提高细胞对肽核酸的通透性, 分别在 asPNA1、asPNA2 和 scrPNA 上连接上 NLS, 得到 NLS-asPNA1、NLS-asPNA2 和 NLS-scrPNA。肽核酸由北京奥科生物技术公司和美国 PrimmBiotech 公司合成。

1.3 引物的合成

根据 Genbank 中大鼠 TSHR 的 mRNA 序列, 用 Gene Runner 软件设计合成了一对引物, 其上游序列为: 5'-AAGTTTCTTGGCATTTC AATA-3', 下游

序列为: 5'-AGTGACGCTGGTGG AAG-3'。

1.4 荧光显微镜观察细胞对 asPNA 的摄取

将上述 3 种肽核酸分别标记上异硫氰酸胍 (guanine thioyanate, GITC), 得到 NLS-asPNA1-GITC、NLS-asPNA2-GITC 和 NLS-scrPNA-GITC。本实验共分 4 组: A 组: 培养基内不加肽核酸; B 组: 培养基内加入 NLS-asPNA1-GITC; C 组: 培养基内加入 NLS-asPNA2-GITC; D 组: 培养基内加入 NLS-scrPNA-GITC。首先接种细胞至 96 孔板, 浓度为 6×10^4 个/100 μ l, 细胞贴壁 2 d 后, 按照分组分别在细胞培养基内加入 10 μ M 肽核酸, 48 h 后取出 96 孔板, 细胞涂片后置于荧光显微镜下观察肽核酸是否进入到细胞中。

1.5 噻唑蓝法检测 asPNA 对细胞的毒性作用

本实验共分 4 组, 接种细胞至细胞培养板, 每孔浓度为 3×10^4 个/200 μ l, 将 NLS-asPNA1、NLS-asPNA2 和 NLS-scrPNA 分别加入 B、C、D 3 组的培养基内, 终浓度为 10 μ M, A 组不加肽核酸, 分别于 24、48、72 h 后取出上述 4 组细胞, 吸出培养基, 用磷酸缓冲溶液清洗一次后每孔再加入培养基 100 μ l 和噻唑蓝 10 μ l (5 mg/ml), 将细胞放入孵箱内继续培养 4 h, 每孔加入二甲基亚砜 100 μ l, 在 620 nm 处测量光密度值, 结果以 T/C 值表示 (T 代表 B、C、D 3 组在各个时间点的光密度值, C 代表 A 组在各个时间点的光密度值)。

1.6 实时定量 RT-PCR 检测 asPNA 对 TSHR mRNA 表达的影响

本实验分为 A、B、C 3 组, 细胞培养基内分别加入 NLS-asPNA1、NLS-asPNA2 和 NLS-scrPNA, 终浓度为 10 μ M, 接种细胞浓度为 1.25×10^5 个/ml, 分别于 0、12、24、48 h 后将培养皿取出, 提取细胞总 RNA, 将 RNA 逆转录为 cDNA, 采用实时定量 RT-PCR 测定样品 mRNA 水平, 反应条件: 95 °C 10 min 共 1 个循环; 95 °C 10 s、58 °C 5 s、72 °C 15 s, 共 45 个循环。

1.7 统计学方法

实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组内均数比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光显微镜观察细胞对 asPNA 的摄取结果

细胞涂片后经荧光显微镜观察发现, 单纯的

FRTL 细胞(即 A 组)经过碘化丙啶染色后细胞核为红色(图 1a)。而在 B、C、D 3 组中,由于肽核酸上标记的 GITC 所发出的荧光为黄绿色,在红色的细胞核周围即胞浆中,我们可以见到黄绿色荧光,提示 NLS-asPNA 可以进入到细胞中(图 1b)。

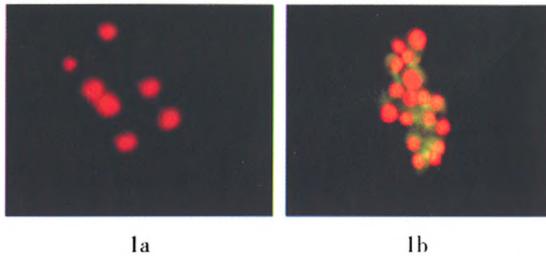


图 1 Fisher 大鼠甲状腺细胞经碘化丙啶染色后示意图($\times 100$) 图中, 1a: 未加入肽核酸; 1b: 加入异硫氰酸胍标记的肽核酸。

2.2 噻唑蓝法检测 asPNA 对细胞的毒性作用结果

将 3 种肽核酸分别加入细胞培养基中与细胞一起培养, 分别于 24、48、72 h 后测定 T/C 值(表 1), 经统计学分析后发现, B、C、D 3 组在不同时间的 T/C 值之间差异无统计学意义 ($F=0.0006$ 、 0.0007 和 0.0004 , P 均 >0.05), 表明 NLS-asPNA 对细胞没有毒性作用。

表 1 3 种肽核酸与细胞培养不同时间后的 T/C 值

| 组别 | T/C 值 | | |
|-----------------|------------------|------------------|------------------|
| | 24 h | 48 h | 72 h |
| B 组(NLS-asPNA1) | 1.036 ± 0.01 | 1.051 ± 0.02 | 1.048 ± 0.01 |
| C 组(NLS-asPNA2) | 1.051 ± 0.03 | 0.982 ± 0.02 | 0.987 ± 0.01 |
| D 组(NLS-scrPNA) | 1.007 ± 0.02 | 1.039 ± 0.01 | 1.064 ± 0.02 |

注: 表中, T 代表 NLS-asPNA1、NLS-asPNA2 和 NLS-scrPNA 组在各个时间点的光密度值, C 代表对照组在各个时间点的光密度值; NLS: 核定位信号; asPNA: 反义肽核酸; scrPNA: 干扰肽核酸。

2.3 实时定量 RT-PCR 检测 asPNA 对 TSHR mRNA 表达的影响结果

从图 3 我们可以看出, NLS-asPNA1 和 NLS-asPNA2 均可以抑制 FRTL 细胞 TSHR mRNA 的表达, NLS-asPNA1 和 NLS-asPNA2 分别与细胞培养 12、24、48 h 后, TSHR cDNA 的拷贝数与 0 h 相比逐渐降低, 且呈现出时间依赖性。而 NLS-scrPNA 与细胞培养 12、24、48 h 后, TSHR cDNA 的拷贝数与 0 h 相比, 没有明显的变化。

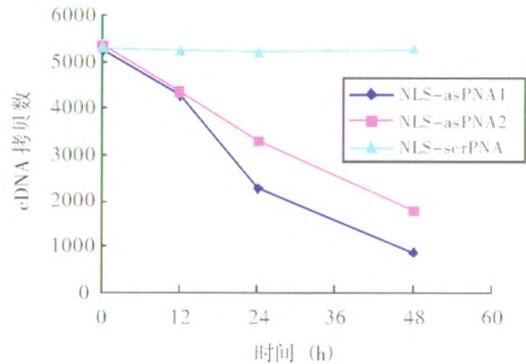


图 3 实时定量 RT-PCR 检测 3 种肽核酸对促甲状腺激素受体 mRNA 表达的影响 图中, NLS: 核定位信号; asPNA: 反义肽核酸; scrPNA: 干扰肽核酸。

3 讨论

近年来, asPNA 已在生物学及亚临床研究中得到了广泛的应用, Rappozzi 等^[8]研究证实, NLS-asPNA 和 asPNA 均可以通过非受体依赖机制进入细胞, 通过半定量 RT-PCR 发现, 与对照组相比, $10 \mu\text{M}$ asPNA 和 NLS-asPNA 分别可以使人慢性粒细胞 KYO-1 内 b_2a_2 型 bcr/abl 原癌基因的 mRNA 表达量降低 $(20 \pm 5)\%$ 和 $(60 \pm 10)\%$, 因此, 可以通过 asPNA 抑制慢性粒细胞白血病的原癌基因 bcr/abl mRNA 的表达, 从而抑制 KYO-1 细胞内 P210 蛋白的表达, 对慢性粒细胞白血病的治疗起到指导作用。韩曙光等^[9]研究表明, asPNA 可以下调树突状细胞趋化因子受体 7 基因的表达, 阻断树突状细胞的迁移和抗原提呈, 有效抑制急性排斥反应, 延长受试者存活时间。

本研究证实, NLS-asPNA 可以进入 FRTL 细胞。噻唑蓝法的检测结果也显示, 本研究中合成的 3 种肽核酸对正常的细胞没有毒性作用, 因为肽核酸是一种基因治疗制剂, 它可以通过碱基互补的原则与 DNA 和 RNA 结合, 从而抑制目的基因的复制、转录和翻译, 所以其效用和安全性非常重要。

本研究中实时定量 RT-PCR 结果显示, NLS-asPNA1 和 NLS-asPNA2 分别与 FRTL 一起培养 12、24、48 h 后, TSHR cDNA 的拷贝数与 0 h 相比逐渐降低, 且呈现出时间依赖性。本研究中设计的一段非相关肽核酸(即 NLS-scrPNA)则对 TSHR mRNA 的表达没有影响, 因为 NLS-scrPNA 不能与 TSHR

(下转第 319 页)

的和背景、基础和依据、标准的内容(包括疾病分期、临床表现、病理特点、影响因素和鉴别诊断)等方面进行了解读,对临床医师进一步认识和理解此标准,并在临床实践中正确运用将会有一定帮助。

参 考 文 献

- [1] 李国民,陈运奇,杨奕静.射线诱发的恶性肿瘤及对组织学发生的探讨.中华放射医学与防护杂志,1987,7(1):11-13.
- [2] 王绍丰,王安宇,李志尚.放射诱发头颈部恶性肿瘤.中华放射医学与防护杂志,1991,11(1):45-47.
- [3] 杨志祥.放射性皮肤癌研究进展.中华放射医学与防护杂志,1996,16(4):281-282.
- [4] 中华人民共和国职业病防治法.2001-10-27.
- [5] 翁志根,刘雁玲,杨志祥,等.GBZ106-2002放射性皮肤疾病诊断标准.北京:中国标准出版社,2002.
- [6] 中华人民共和国卫生部.国家职业卫生标准管理办法.2002-05-01.
- [7] 中华人民共和国卫生部.GBZ94-2002职业性肿瘤诊断标准.北京:中国标准出版社,2002.
- [8] 邢家骝,王桂林.辐射事故临床处理.北京:军事医学科学出版社,2006:330-332.

- [9] 杨志祥.局部放射损伤后的恶变.人民军医,2000,43(10):566-567.
- [10] 李国民,杨奕静,李清,等.放射性皮肤癌的临床病理特征.中华放射医学与防护杂志,1999,19(3):201-202.
- [11] 杨志祥,王芳新,杨文峰,等.6例放射性皮肤恶性肿瘤的临床特征及其治疗.中华放射医学与防护杂志,1996,16(6):425-426.
- [12] 中华人民共和国卫生部.GBZ106-2002放射性皮肤疾病诊断标准.北京:中国标准出版社,2002.
- [13] 冯晓,翁志根.2例中医伤骨科工作者手部放射性皮肤癌报道.中华放射医学与防护杂志,2003,23(1):25-26.
- [14] 王正寅,盛志俭,李明义,等.放射性皮肤癌2例报告.中国公共卫生,1996,12(4):167-168.
- [15] 金家美,马希叔,张维东,等.52例放射工作者职业性放射皮肤损伤癌变前期临床分析.中国辐射卫生,1997,6(4):211-250.
- [16] 梁宏立,赵凤玲,傅宝华,等.慢性放射性皮肤损伤18例的临床分析.职业与健康,2004,20(8):19-20.

(收稿日期:2012-06-05)

(上接第312页)

mRNA 序列互补结合,无论与细胞一起培养 12 h、24 h 还是 48 h, TSHR mRNA 的表达量与对照组相比均没有显著性的变化。对上述结果可能的解释为,当 asPNA 与目的基因的 mRNA 结合后,可以进入一种代谢途径,使 mRNA 降解;另一个原因可能是,从细胞中提取的总 RNA 也包括与肽核酸结合的一部分 RNA,由于肽核酸与 RNA 的亲合力比较强,而且不易被 DNA、RNA 酶水解,所以这部分 RNA 在进行 RT-PCR 时,不能被扩增,导致最后测定的结果中 mRNA 减少。本研究结果证实,肽核酸可以进入细胞中,并且能够与目的基因的相应位点结合。由于我们设计的是 asPNA,它可以和 DNA 的编码链结合,形成 asPNA-DNA 复合物,从而阻断 DNA 的复制过程,因此必然会导致转录产物 mRNA 的减少。

从以上的实验结果我们得出,NLS-asPNA 可以在体内抑制 TSHR 的表达,因此可以对 Graves 病的治疗起到指导性的作用。

参 考 文 献

- [1] Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, et al. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted

polyamide. Science, 1991, 254(5037): 1497-1500.

- [2] Egholm M, Buchardt O, Nielsen PE, et al. Peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotide analogs with an achiral peptide backbone. J Am Chem Soc, 1992, 114(5): 1895-1897.
- [3] Egholm M, Buchardt O, Christensen L, et al. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. Nature, 1993, 365(6446): 566-568.
- [4] Filipovska A, Eccles MR, Smith RA, et al. Delivery of antisense peptide nucleic acids (PNAs) to the cytosol by disulphide conjugation to a lipophilic cation. FEBS Lett, 2004, 556(1-3): 180-186.
- [5] Boules M, Williams K, Gollatz E, et al. Down-regulation of amyloid precursor protein by peptide nucleic acid in vivo. J Mol Neurosci, 2004, 24(1): 123-128.
- [6] Karras JG, Maier MA, Lu T, et al. Peptide nucleic acids are potent modulators of endogenous pre-mRNA splicing of the murine interleukin-5 receptor-alpha chain. Biochemistry, 2001, 40(26): 7853-7859.
- [7] Weetman AP. Autoimmune thyroid disease: propagation and progression. Eur J Endocrinol, 2003, 148(1): 1-9.
- [8] Rapozzi V, Burm BE, Cogoi S, et al. Antiproliferative effect in chronic myeloid leukaemia cells by antisense peptide nucleic acids. Nucleic Acids Res, 2002, 30(17): 3712-3721.
- [9] 韩曙光,赵浩亮,董胜利,等.反义肽核酸下调树突状细胞 CCR7 基因表达抑制大鼠肝移植急性排斥反应.中华器官移植杂志,2008,29(2):73-77.

(收稿日期:2012-06-13)