

# GSK-3β 特异的 siRNA 腺病毒对高脂诱导内皮细胞 GSK-3β 表达的影响

陈玉芳, 陈刚, 林丽香

基金项目: 福建省自然科学基金(2007J 0072)

作者单位: 350003 福州, 福建医科大学省立临床学院内分泌科

作者简介: 陈玉芳(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 糖尿病慢性血管并发症的发生机理。E-mail: 124863160@qq.com

通讯作者: 陈刚(1971-), 男, 博士, 教授, 研究生导师。E-mail: chengangfj@163.com

**【摘要】** 目的 构建糖原合成酶激酶 3β(GSK-3β)特异的 RNA 干扰(RNAi)腺病毒,观察其抑制高游离脂肪酸(FFA)诱导下人脐静脉内皮细胞(HUVEC)GSK-3β 的表达情况。方法 利用体外同源重组技术构建 GSK-3β 特异的 siRNA 腺病毒表达载体,在 HEK293A 细胞中包装并扩增病毒、空斑以实验法测定病毒滴度。GSK-3β 特异的 siRNA 腺病毒感染 HUVEC,以 Western 印记法测定其对 GSK-3β 蛋白表达的影响。结果 成功构建了 GSK-3β 特异的 siRNA 腺病毒,获得高滴度的腺病毒液;构建的重组腺病毒感染 HUVEC,可显著抑制正常培养及游离脂肪酸诱导下的细胞的 GSK-3β 蛋白的表达,Ad-DEST 组与 Ad-640 组比较,Ad-640 组明显下降( $P < 0.05$ )。结论 构建的 GSK-3β 特异的 RNAi 腺病毒能有效抑制 HUVEC GSK-3β 蛋白的表达,有可能保护高脂诱导的 HUVEC 损伤。

**【关键词】** RNA 干扰; 糖原合成酶激酶 3β; 游离脂肪酸; 人脐静脉内皮细胞

**【中图分类号】** R 587.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-3806(2010)01-0001-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2010.01.01

**Effect of GSK-3β-targeting RNAi recombinant adenovirus on the GSK-3β expression of human umbilical vein endothelial cells induced by high free fatty acid** CHEN Yu-fang, CHEN Gang, LIN Li-xiang. Department of Endocrinology, Fujian Provincial Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350003, China

**【Abstract】** **Objective** To construct RNAi recombinant adenovirus expressive vectors specific to GSK-3β and explore if it can inhibit the GSK-3β expression of human umbilical vein endothelial cells induced by high free fatty acid. **Methods** Homologous recombination and cloning techniques were used to construct RNAi recombinant adenovirus expressive vectors specific to GSK-3β. Then, the adenovirus plasmids was transfected into HEK293A cells to produce adenovirus and amplify the adenovirus stock. Plaque forming assay was used to titer the adenovirus stock. The GSK-3β expression were detected by Western blot. **Results** The RNAi adenovirus vectors specific to GSK-3β were successfully produced with high titer. The expression of GSK-3β protein could be down-regulated efficiently by the RNAi adenovirus in HUVEC both in the condition of normol and high free fatty acid( $P < 0.05$ ). **Conclusion** RNAi adenovirus is an important tool that inhibit the expression of GSK-3β efficiently. It may partly protect HUVEC from impairment which induced by FFAs.

**【Key words】** RNA interference; Glycogen synthetase kinase-3 beta (GSK-3β); Free fatty acid(FFA); Human umbilical vein endothelial cells(HUVEC)

近年来关于糖尿病血管病变的机理研究表明,血管内皮细胞功能损伤是一个关键因素。游离脂肪酸可刺激内皮细胞凋亡,其具体的分子和细胞学机制尚未完全阐明。有研究显示一种 GSK-3β 抑制剂—锂剂,对棕榈酸诱导的内皮细胞有明显的保护

作用,故推测 GSK-3β 在脂肪酸诱导的内皮细胞凋亡中起作用<sup>[1]</sup>。GSK-3β 是一种凋亡前激酶,它的过度表达使细胞更易于凋亡。而其抑制剂减少了细胞色素 C 从线粒体释放<sup>[2,3]</sup>。GSK-3β 主要通过 PI3K 导致的 Akt 的磷酸化而失活。因为 Akt 信号

的激活是一种重要的由生长因子产生的存活信号。这提示 GSK-3 $\beta$  参与了内皮细胞的脂毒性,抑制 GSK-3 $\beta$  的活性将起着重要的保护作用。本实验通过构建 GSK-3 $\beta$  特异的 siRNA 腺病毒,观察其抑制高游离脂肪酸 (FFA) 诱导下人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) GSK-3 $\beta$  的表达情况,从而寻找保护内皮细胞的靶点。

1 材料与方**法**

1.1 材料 (1) M199 培养基、PVDF 膜、Western Brizee 试剂盒、蛋白质分子量 Marker(美国 Invitrogen 公司);(2)胰蛋白酶/EDTA、胎牛血清(美国 Gibco 公司);(3)Hepes、肝素钠(美国 Merk 公司);(4) II 型胶原酶、明胶(美国 Sigma 公司);(5) RIPA 细胞裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒(杭州碧云天);(6)鼠抗人 GSK-3 $\beta$  抗体(美国 BD Biosciences 公司);(7)兔抗人第八因子相关抗原免疫组化多克隆抗体(福州迈新公司);(8)鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体(上海康成公司);(9)其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方**法**

1.2.1 GSK-3 $\beta$  特异的 RNAi 腺病毒表达载体的构建参照文献<sup>[4]</sup>的方法进行。

1.2.2 HUVEC 原代培养 HUVEC 取自健康剖宫产孕妇的脐静脉,以 II 型胶原酶消化分离,用第八因子抗体直接免疫标记法鉴定内皮细胞的比例  $\geq 98\%$ 。

1.2.3 Western 免疫印迹法检测 RNAi 腺病毒对 HUVEC GSK-3 $\beta$  表达的影响 取生长状态良好的第 3 代 HUVEC 按  $1.0 \times 10^6$ /板接种 6cm 培养皿。(1)RNAi 腺病毒组:1 次/d(24 h 内)进行病毒感染,病毒感染的 MOI 值取 50,在病毒感染后 3 d 提取细胞总蛋白;(2)RNAi 腺病毒 + FFAs 组:1 次/d(24 h 内)进行病毒感染,病毒感染的 MOI 值取 50,48 h 内(病毒感染后 24 h 内)加入所需 FFA。分别在病毒感染后 24、48、72、96 h 提取蛋白。各组蛋白经 BCA 法测定浓度后,取总蛋白 20  $\mu$ g,12% SDS-PAGE 胶电泳,转膜,加一抗和二抗孵育。曝光胶片扫描后,Quantity One 软件分析各条带灰度值,结果以目的蛋白与 GAPDH 蛋白条带灰度值的相对比值记录。

1.3 统计学方法 用 SPSS13.0 软件包进行统计分析,数据用( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$  表示差异有统计学显著意义。

2 结**果**

2.1 细胞培养及鉴定 培养的内皮细胞呈短梭形、鹅卵石样单层排列。第八因子相关抗原免疫组织化学染色可见胞浆内有棕色的免疫沉积物。

2.2 RNAi 腺病毒对 HUVEC 中 GSK-3 $\beta$  蛋白表达的影响 (1)根据统计结果分析,与 Ad-DEST 组相比,Ad-640 组的 GSK-3 $\beta$  表达明显下降( $P < 0.05$ ) (见图 1);(2)分析高脂刺激下, RNAi 腺病毒感染后不同时间 GSK-3 $\beta$  表达:在高脂干预下,从病毒感染后 48 h 到 96 h, Ad-640 对 GSK-3 $\beta$  蛋白抑制水平仍呈时间依赖性,随着时间的延长, GSK-3 $\beta$  蛋白表达水平进一步下降( $P < 0.05$ ) (见图 2);而 Ad-DEST 作用后不同时间,对 GSK-3 $\beta$  蛋白表达水平无影响( $P > 0.05$ ) (见图 3)。

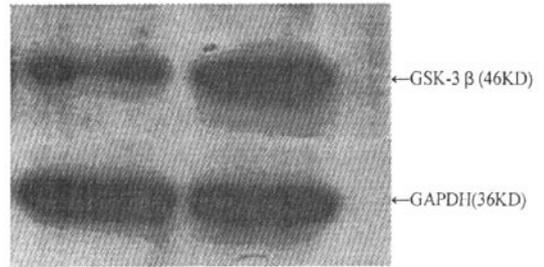


图 1 RNAi 腺病毒对正常培养下 HUVEC GSK-3 $\beta$  表达的影响

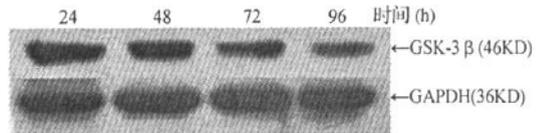


图 2 RNAi 腺病毒在高脂刺激下, Ad-640 感染后不同时间 GSK-3 $\beta$  表达

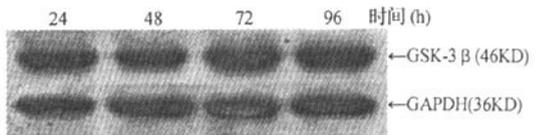


图 3 Ad-DEST 对高脂下 GSK-3 $\beta$  表达的影响

3 讨**论**

3.1 本研究利用 GSK-3 $\beta$  特异的 siRNA 腺病毒感染人脐静脉内皮细胞,取抑制作用最佳时的 MOI 值 50<sup>[4]</sup>。Michaela 等<sup>[5]</sup> 研究报道游离脂肪酸中油酸 0.5 mmol/L 和棕榈酸 0.25 mmol/L 分别作用于血管内皮细胞 48 h 后就能诱导细胞出现凋亡现象,故含高脂组选用 0.75 mmol/L 的 FFA。细胞干预后,用 Western 印迹法检测各组 GSK-3 $\beta$  表达水平的变

化。我们先前实验显示,病毒(MOI值50)感染细胞后48 h到144 h, Ad-640对GSK-3 $\beta$ 蛋白抑制水平呈时间依赖性,随着时间的延长,蛋白表达水平进一步下降<sup>[4]</sup>。本研究再次验证了Ad-640对GSK-3 $\beta$ 蛋白表达的抑制作用。而且,结果显示在游离脂肪酸诱导下,此siRNA腺病毒对GSK-3 $\beta$ 蛋白表达亦有明显的干扰效应。

**3.2** 近年来,对GSK-3 $\beta$ 的认识有了很多新进展。研究表明它与2型糖尿病、胰岛素抵抗、阿尔茨海默病、癌症等发病有关。故其抑制剂被广为研究,以试图找出治疗这些疾病的靶点。GSK-3 $\beta$ 是一种多功能的丝/苏氨酸磷酸激酶,在静息细胞中呈组成性激活,能磷酸化抑制或降解许多底物。研究显示GSK-3 $\beta$ 在细胞凋亡中发挥重要作用。在PC12细胞中,过表达活性GSK-3 $\beta$ 引起细胞凋亡。Mussmann等<sup>[6]</sup>研究也提示,抑制GSK-3 $\beta$ 可促进胰岛 $\beta$ 细胞复制和存活;同时能减弱糖脂对INS-1E细胞的毒性。在Wnt信号通路中,它是关键分子。当有Wnt信号刺激时,GSK-3 $\beta$ 的第9位和第21位丝氨酸磷酸化而失活,上调 $\beta$ -catenin表达并移位入核,激活Wnt一系列促存活基因的转录<sup>[7]</sup>。我们先前的实验也显示GSK-3 $\beta$ 特异的siRNA腺病毒抑制GSK-3 $\beta$ ,能够提高 $\beta$ -catenin蛋白水平,对HUVEC的增殖有促进作用<sup>[4]</sup>。游离脂肪酸可以诱导HUVEC凋亡,但其具体机制不明。GSK-3 $\beta$ 活性是否影响高脂下HUVEC的凋亡或增殖抑制,关键是高脂能否激活GSK-3 $\beta$ 活性,能否减少p-GSK-3 $\beta$ (Ser9)表达。Choi等<sup>[1]</sup>研究已证实用125  $\mu$ M棕榈酸干预HU-

VEC后4 h即可见GSK-3 $\beta$ 脱磷酸化,同时酶活性增强。而GSK-3 $\beta$ 抑制剂对细胞有明显的保护作用。可见,GSK-3 $\beta$ 活性对高脂下的细胞有重要的影响。本实验也证实,siRNA腺病毒能够抑制游离脂肪酸诱导下的细胞GSK-3 $\beta$ 表达,故可以推测抑制GSK-3 $\beta$ ,有望使高脂下的细胞凋亡减少,同时增殖增加。

#### 参考文献

- 1 Choi SE, Kang Y, Jang HJ, et al. Involvement of glycogen synthase kinase-3beta in palmitate-induced human umbilical vein endothelial cell apoptosis[J]. J Vasc Res, 2007, 44(5): 365-374.
- 2 Cohen P, Frame S. The renaissance of GSK3[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, 2(10): 769-776.
- 3 Watcharasit P, Bijur GN, Song L, et al. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$ (GSK3 $\beta$ ) binds to and promotes the actions of p53[J]. J Biol Chem, 2003, 278(49): 48872-48879.
- 4 陈刚, 游婷婷, 乔玉芳, 等. GSK-3 $\beta$  特异 siRNA 腺病毒对脐静脉内皮细胞增殖的影响[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2008, 24(6): 654-657.
- 5 Artwohl M, Roden M, Waldhäusl W, et al. Free fatty acids trigger apoptosis and inhibit cell cycle progression in human vascular endothelial cells[J]. FASEB J, 2004, 18(1): 146-148.
- 6 Mussmann R, Geese M, Harder F, et al. Inhibition of GSK3 promotes replication and survival of pancreatic beta cells[J]. J Biol Chem, 2007, 282(16): 12030-12037.
- 7 Yoshihiro T, Tomohiro O, Naoko K, et al. Developmental regulation of Wnt/ $\beta$ -Catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification[J]. J Biol Chem, 2005, 28(19): 19185-19195.

[收稿日期 2009-10-30][本文编辑 谭毅 刘京虹]

## 《中国临床新医学》杂志征订及征集会员启事

《中国临床新医学》杂志是卫生部主管、中国医师协会和广西壮族自治区人民医院主办的国家级医学科技期刊(CN45-1365/R, ISSN1674-3806,月刊,邮发代号48-173)。栏目设有:院士特稿、博硕论坛、基金课题报告、实验研究、临床研究、技术创新、护理研讨、循证医学、新进展综述等,欢迎投稿(附介绍信、电话和E-mail,寄打印稿和发电子邮件)和订阅。本刊征集会员,凡会员,发会员证,赠本刊12期/年,授继教学分,投稿通过编委审查后优先发表。每年交纳会员费200元。本刊地址:广西南宁市桃源路6号,邮编530021, E-mail: zglcxyzz@163.com, 电话0771-2186013。

· 本刊编辑部 ·