

ANALYSIS OF GENOMIC DNA BETWEEN MALE AND FEMALE IN A DIOECIOUS PLANT, *GINKGO BILOBA*

WANG Xiao Mei SONG Wen Qin LI Xiu Lan CHEN Rui Yang
(Department of Biology Nankai University Tianjin 300071)

ABSTRACT

In this paper, the genomic DNA polymorphisms of male and female in *Ginkgo Biloba* were detected by using RAPD technique with 300 primers and 200 primer combinations. The result indicated that the genomic DNAs of male and female have a high similarity. Only one out of 3450 RAPD markers was related to the male genome. Southern hybridization analysis with this RAPD marker showed that the hybridization signal is polymorphic between male and female, and this marker maybe useful in screening the sex specific probe of *Ginkgo Biloba*.

Key words: *Ginkgo Biloba* L Sex-related marker RAPD

转化生长因子 β_1 在肾小管上皮细胞的信号介导分子

马春艳 王海燕

(北京大学第一医院肾内科 北京大学肾脏病研究所 北京 100034)

在肾小球疾病慢性化进程中,肾小管间质病变可能是较肾小球病变本身更为重要的因素,小管间质病变的程度与肾功能的进行性丧失密切相关。转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF β) 是一种多功能的细胞因子。在肾纤维化疾病中, TGF β 的作用有利亦有弊,一方面它通过抑制细胞增殖而维持正常的细胞数量,另一方面它通过促进细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 形成而加重纤维化。在重度系膜增生性肾小球肾炎病人,肾小管 TGF β_1 表达增加较肾小球的更为显著^[1]; 给予治疗后,伴随着肾硬化的减轻,肾小管 TGF β_1 表达显著下降^[2]。在培养的人肾小管上皮细胞, TGF β 不仅促进 FN 等 ECM 合成增加,而且通过上调 ECM 降解酶抑制剂 TIMP-1 的表达而抑制 ECM 的降解。TGF β 通过与其受体结合发挥生物学效应,但受体后信号转导途径迄今所知甚少,目前研究得比较热门的是 SMADs 信号蛋白和促有丝分裂素活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号转导途径^[3]。本研究应用人近曲肾小管上皮细胞系 (HK-2), 观察介导 TGF β 抑制增殖与促进 ECM 沉积二种生物学效应的信号转导途径,以期进一步了解 TGF β 在肾小管间质病变中的作用机制。

材料和方法

一、细胞培养

人肾小管上皮细胞系 (HK-2) 培养于含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI1640 培养液中,实验前以含 1% 胎牛血清的

培养液培养 24 小时,使细胞基本趋于同步化。

二、材料

HK-2 细胞由美国华盛顿大学 Zager 教授惠赠, TGF- β_1 购自 R&D 公司, FN 抗原和抗体均购自北京医科大学细胞生物学教研室, 抗 TGF β_1 受体 RI、RII、Smad2 及 Smad6 等抗体为 Santa Cruz 公司产品, 逆转录试剂盒购自 Promega 公司, 预染蛋白 marker 购自 Bio Rad 公司; ³H-脯氨酸、100bp DNA ladder 及 MBP 均购自 Sigma 公司。

三、细胞增殖的测定

细胞以 $10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$ 的密度接种于 96 孔细胞培养板, 采用 ³H-TdR 掺入法测定细胞增殖。

四、培养液内纤连蛋白 (fibronectin, FN) 含量测定

收集细胞上清液, 4℃, 2000g 离心 10 分钟, 去除细胞沉渣, 取上清液, 以间接竞争抑制 ELISA 法测定 FN 含量。

五、细胞总胶原合成和分泌的测定^[4]

制备 $10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$ 细胞悬液, 接种于 24 孔板, 当细胞长至融合状态时, 以含 1% 胎牛血清的培养液培养 24 小时, 然后加入 TGF β_1 , 作用 24 小时后, 测定细胞内 ³H-脯氨酸掺入量及培养液内 ³H-羟脯氨酸的放射性以判断细胞总胶原的合成和分泌情况。

六、TGF β_1 、RI、RII、Smad2 及 Smad6 蛋白的测定

以 Western blot 法检测。细胞裂解后, 收集于 Eppendorf 管中, 4℃, 12000g 离心 10 分钟, 取上清。测定蛋白浓度后, 取 50 μg (检测 TGF β_1 、RI、RII) 或 100 μg (检测 Smad2、Smad6) 样品, 于 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分子量在 14Kd-220Kd 的预染蛋白 marker 作为分子量标准, TGF β_1 、RI、RII 蛋白条带相应的分子量为 53Kd 和 70Kd; Smad2 和 Smad6 蛋白条

本文 2000 年 7 月 10 日收到, 12 月 19 日接受。
本课题受教育部博士点专项基金资助。

带都在 50Kd 左右。电泳后将凝胶上蛋白转移至硝酸纤维素膜(PVDF),以抗体杂交,采用化学发光法检测蛋白条带。以图像分析仪进行吸光度扫描。

七、FN、IV 型胶原和组织型金属蛋白酶抑制剂 1 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP-1) mRNA 水平的测定

以逆转录 PCR(RT-PCR)方法检测。应用 TRIzol 试剂提取 HK-2 细胞总 RNA,定量并按照逆转录试剂盒要求制备 cDNA,随后进行 PCR 以扩增目的片段,GAPDH 作为内参照,100bp DNA ladder 为 marker。FN、IV 型胶原、TIMP-1 及 GAPDH 引物由上海博亚生物技术公司合成,PAGE 纯化,片段大小分别为 451bp、699bp、228bp 和 300bp,引物序列参见参考文献^[5,6]。

八、细胞外信号调节的蛋白激酶(extracellular signal regulated protein kinase, ERK)活性测定^[7]

以特异性底物(MBP)磷酸化测定 ERK 活性。在反应终体积 40 μ l 中含 12.5mmol/LMgCl₂、50 μ g/ml 蛋白激酶抑制剂,1mg/ml MBP 和 50 μ mol/L γ -³²P-ATP。反应在 30 $^{\circ}$ C 水浴中进行,15min 后用 25% 三氯醋酸终止反应。取 25 μ l 样品终产物点在磷酸纤维素滤膜上,经磷酸洗并干燥后于 β 液闪计数器上检测。ERK 活性单位为 pmols³²P \cdot min⁻¹ \cdot mg⁻¹蛋白。

九、统计学处理

以上实验均重复三次,实验数据以均数 \pm 标准差表示,多组资料用方差分析,两两比较用 *q* 检验作统计学处理, $P < 0.05$ 被视为有统计学意义。

结 果

一、TGF β_1 对 HK-2 细胞的生物学效应

1. 抑制 HK-2 细胞增殖 细胞增殖程度以 ³H-TdR 掺入 DNA 的量来判断。TGF β_1 (10ng \cdot ml⁻¹) 作用 2-24 小时,显著抑制 ³H-TdR 掺入 HK-2 细胞,具有时效关系 ($P < 0.01$); TGF β_1 还呈浓度依赖性抑制 HK-2 细胞增殖, TGF β_1 浓度在 2ng \cdot ml⁻¹ - 10ng \cdot ml⁻¹ 时, HK-2 细胞增殖被抑制了 54% - 83% ($P < 0.01$)。

2. 促进细胞 ECM 成分合成和分泌 TGF β_1 呈浓度和时间依赖性促进 HK-2 细胞分泌 FN。TGF β_1 (5ng \cdot ml⁻¹) 刺激 3 小时,培养上清液内 FN 含量即有增加,但无统计学差异 ($P > 0.05$); 于 18 小时较对照组增加了 86% ($P < 0.01$),一直持续至 24 小时。TGF β_1 浓度在 1ng \cdot ml⁻¹ - 10ng \cdot ml⁻¹ 时, FN 含量较对照组增加了 32% - 138% ($P < 0.01$)。此外, TGF β_1 还呈浓度依赖性促进胶原的合成和分泌, TGF β_1 5ng \cdot ml⁻¹ 和 10ng \cdot ml⁻¹ 促进胶原的合成和分泌分别增加了 2 倍、4 倍和 2 倍、3 倍 ($P < 0.05$)。

除蛋白水平增加外, RT-PCR 结果显示 TGF β_1 还促进 IV 型胶原 mRNA 的表达。如图 1 所示,在

本实验条件下, IV 型胶原的基础表达非常低,在正常对照组几乎检测不到 IV 型胶原 mRNA 的表达; 而 TGF (5ng \cdot ml⁻¹) 显著上调 IV 型胶原 mRNA 的表达。同样, RT-PCR 检测结果也发现 TGF β_1 明显促进 FN mRNA 的表达。

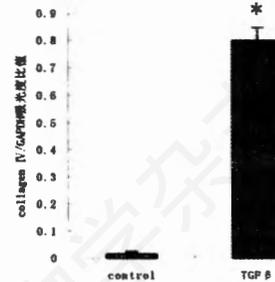


图 1 TGF β 促进 IV 型胶原 mRNA 表达 (n=3)

IV 型胶原 RT-PCR 产物经琼脂糖电泳后,电泳条带吸光度扫描结果,纵坐标为 IV 型胶原/GAPDH 吸光度比值, * $P < 0.05$ vs 对照组。

本研究还观察了 TGF β_1 (5ng \cdot ml⁻¹) 对 ECM 降解酶抑制剂 TIMP-1 mRNA 表达的影响。结果表明, TGF β_1 明显上调 TIMP-1 mRNA 的表达,较对照组增加了 2 倍 ($P < 0.05$)。见图 2 所示。

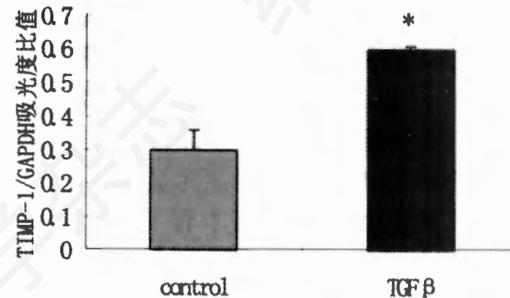


图 2 TGF β 促进 TIMP-1 mRNA 表达 (n=3)

TIMP-1 RT-PCR 产物经琼脂糖电泳后,电泳条带吸光度扫描结果,纵坐标为 TIMP-1/GAPDH 吸光度比值, * $P < 0.05$ vs 对照组。

二、HK-2 细胞 TGF β_1 信号的介导分子

(1) TGF β_1 RI 和 RII 的表达 TGF β_1 RI 和 RII 的分子量大小分别是 53KD 和 70KD。Western blot 结果显示 HK-2 细胞表达 RI 和 RII, TGF β_1 (5ng \cdot ml⁻¹) 作用 1、4、8、24 和 48 小时, RI、RII 的表达没有明显变化,与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。见图 3。

(2) 胞浆信号蛋白 Smad2 和 Smad6 的表达

在 HK-2 细胞可检测到 Smad2 和 Smad6 的表达,两者蛋白条带相应的分子量大小均在 50Kd 左

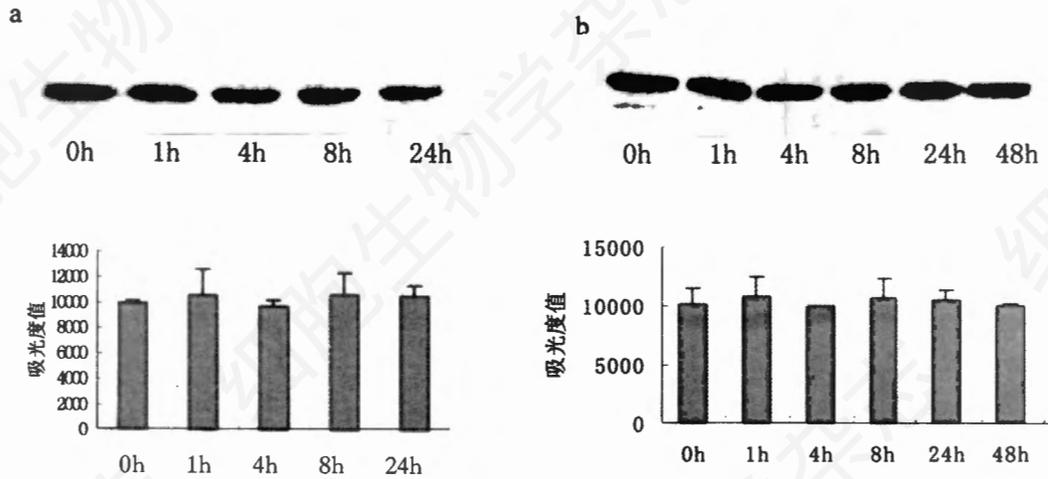
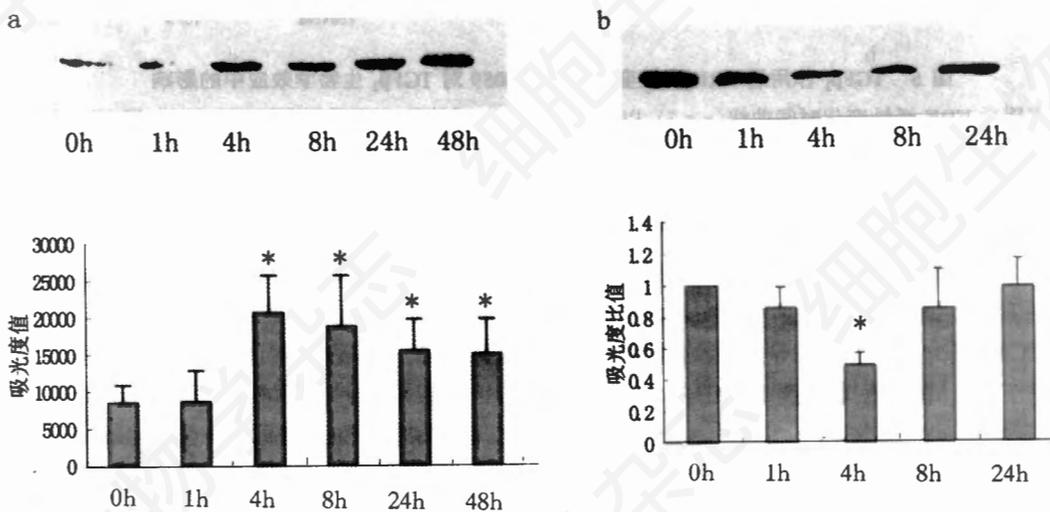


图3 TGFβ对其受体表达的影响(n=3)

Western blot分析 TGFβ₁ 作用不同时间后 RI(a)和 RII(b)表达及显影胶片扫描的吸光度值,RI 蛋白条带在 53Kd,RII 蛋白条带在 70Kd.各时间点与 0h 比较,均无显著性差异($P>0.05$).

图4 TGFβ对 SMAD₂ 蛋白表达的影响(n=3)

a. Western blot分析 TGFβ₁ 作用不同时间后 Smad2 表达及显影胶片扫描的吸光度值,Smad2 蛋白条带在 50Kd 左右,以吸光度值作为纵坐标,* $P<0.05$ vs 0h,# $P<0.05$ vs 4h。

b. Western blot分析 TGFβ₁ 作用不同时间后 Smad6 表达及显影胶片扫描的吸光度值,Smad6 蛋白条带在 50Kd 左右,以 0h 组的吸光度值作为 1,不同时间组与 0h 组吸光度比值作为纵坐标,* $P<0.05$ vs 0h。

右。TGFβ₁ (5ng. ml⁻¹) 作用 4 小时后,Smad2 开始增加,持续至 48 小时;相反,Smad6 于 TGFβ₁ 作用 1 小时后即开始减少,4 小时达到最低值,8 小时后开始逐渐恢复,24 小时后基本上恢复到基础水平。见图 4。

(3) ERK 信号分子 在本实验中,TGFβ₁ (5ng. ml⁻¹) 作用 5 分钟 ERK 活性开始增加,10 分钟达到高峰,以后逐渐下降,20 分钟基本恢复至正常(图 5a);TGFβ 明显抑制血清刺激的细胞增殖,ERK 阻断剂 PD98059(10⁻⁵mol. L⁻¹) 阻断了 TGFβ₁

抑制细胞增殖的效应,TGFβ₁ + PD98059 组³H-TdR 掺入较 TGFβ₁ 组增加了 86% ($P<0.05$)(图 5b);然而,PD98059 (10⁻⁵mol. L⁻¹) 对 TGFβ₁ (5ng. ml⁻¹) 刺激的细胞外基质成分 FN 的分泌却没有明显影响,TGFβ₁ + PD98059 组与 TGFβ₁ 组相比,培养液内 FN 含量无显著性差异(0.23 ± 0.03 vs 0.26 ± 0.02, $P>0.05$)(图 5c)。

讨 论

本研究证实 TGFβ₁ 对 HK-2 细胞具有抑制增殖

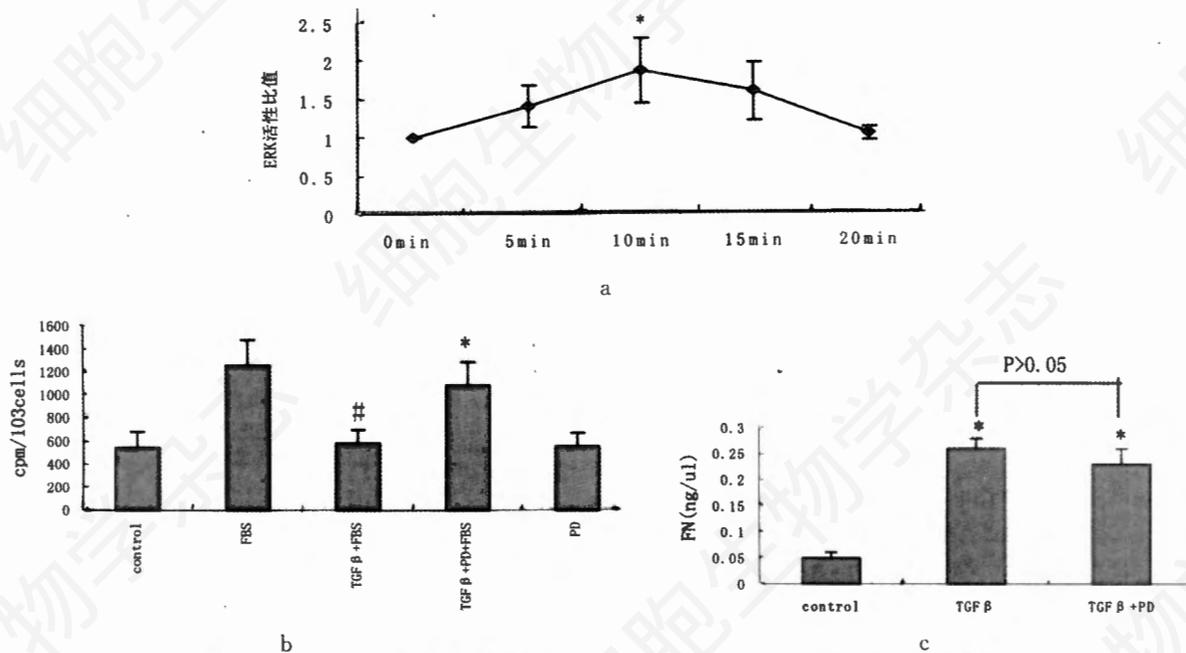


图5 TGF β_1 作用后ERK活性变化及PD98059对TGF β_1 生物学效应中的影响

a. TGF β_1 作用后ERK活性变化时间曲线(n=3),以0min组ERK活性值为1,其他时间组与0min组ERK活性比值作为纵坐标,* $P < 0.05$ vs 0min

b. PD98059对TGF β_1 促细胞增殖作用的影响(n=18),* $P < 0.05$ vs TGF β 组,# $P < 0.01$ vs FBR组

c. PD98059对TGF β_1 促进FN分泌的影响(n=9),* $P < 0.01$ vs 对照组

及促进ECM沉积的效应,即(1)TGF β_1 呈时间和浓度依赖性抑制HK-2细胞增殖;(2)不仅在转录和翻译水平促进ECM成分FN和III型胶原的表达,而且还通过促进ECM降解酶抑制剂ITMP-1的表达抑制ECM的降解。

在证实了TGF β 对HK-2细胞生物学效应的基础上,我们探讨了介导TGF β 生物学效应的信号分子。TGF β 通过与具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性的受体结合而发挥生物学作用。在本研究中,TGF β 并不引起HK-2细胞中其RI和RII受体表达改变。提示TGF β_1 可能是通过改变受体后的信号转导机制而发挥其生物学效应的。但TGF受体后信号转导机制目前尚不清楚,报道较多的是MAPK信号转导途径和SMAD $_5$ 信号蛋白。哺乳动物MAPK主要由3个成员组成,即细胞外信号调节的蛋白激酶(extracellular signal-regulated protein kinase, ERK)、应激活化蛋白激酶(stress-activated protein kinase, SAPK),又称JNK(c-jun N-terminal kinase)和蛋白激酶p38。本实验研究发现,TGF β 作用后ERK被激活。ERK阻断剂PD98059能够阻断TGF β_1 抑制HK-2细胞的增殖效应,但对TGF β_1 刺激的FN表达上调无明显影响,提示在本实验条件下,ERK信

号分子参与了TGF β_1 抑制HK-2细胞增殖的效应,但与TGF β_1 上调细胞外基质成分FN的作用没有明显关系。SMAD $_5$ 信号转导模式大致如下:受体激活导致通路特异性SMAD $_5$ -Smad2和Smad3等磷酸化,磷酸化的Smad随之从受体-Smad复合物中解离,和共同通路SMAD $_5$ -Smad4结合后转位至核内,而调控靶基因的转录反应。在此过程中,抑制性SMAD $_5$ 如Smad6等可与RI结合干扰Smad2、Smad3等的磷酸化,负反馈调节TGF β 的信号转导^[8]。在我们的研究中,HK-2细胞表达Smad2,且于TGF β 作用后4-48小时表达增加。这与Poncelet等人在人肾小球系膜细胞的研究有所不同^[9]。在他们的实验中,Smad2的表达于TGF β 作用1-8小时后轻度增加,24小时恢复至基础水平,48小时后又轻度降低。这一差异可能与细胞特性不同有关。我们发现,TGF β 作用的早期是引起HK-2细胞Smad6表达下调,于4小时达到最低值,以后逐渐回升,具有时间依赖性。提示TGF的早期生物学效应可能与其抑制抑制性SMAD $_5$ 分子Smad6有关。

总之,本研究表明,TGF β 能够抑制HK-2细胞增殖并促进ECM沉积。ERK信号分子参与了TGF β_1 抑制HK-2细胞增殖的效应,但与其上调细

胞外基质成分 FN 的作用没有明显关系。TGF 可能通过在其作用的早期下调 Smad6 的表达,而在中后期上调 Smad2 的表达而增强其信号转导。

摘 要

本研究在人肾小管上皮细胞系(HK-2)上探讨了介导转化生长因子 β_1 (TGF β_1)生物学效应的信号介导分子。结果表明 SMAD₅ 信号蛋白及 ERK 激酶均参与 TGF β_1 的信号转导;通路特异性 Smad2 于 TGF β_1 作用 4 小时后开始增加,持续至 48 小时;而抑制性 Smad6 于 TGF β_1 作用 1 小时开始减少,4 小时达到最低值,以后逐渐恢复;ERK 只参与 TGF β 抑制增殖效应,对 TGF β 促进 FN 分泌无影响。

关键词: 转化生长因子 β 增殖 细胞外基质

信号转导

参 考 文 献

- [1] 李玉瑞主编,1988.细胞外基质的生物化学及研究方法.第一版,北京:人民卫生出版社,216-219.
- [2] 魏林等,1998,中华内科杂志,37(3):151-153.
- [3] Melanie T et al.,1997,*Pharmacol Ther*,75(1):21-41.
- [4] Kribben A et al.,1993,*Am J Physiol*,265:C939-945.
- [5] Albertcht M et al.,1999,*Histochem Cell Biol*,112(1):51-61.
- [6] Huang HY et al.,1998,*J Clin Endocrinol Metab*,83:1721-1729.
- [7] 丁炜等,1998,中华肾脏病杂志,14(4):229-232.
- [8] Huwiler A et al.,1994,*FEBS Lett*,354:255-258.
- [9] Hayashida T et al.,1999,*Kidney Int*,56:1710-1720.
- [10] Poncelet AC et al.,1999,*Kidney Int*,56:1354-1365.

THE SIGNAL TRANSDUCTION OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR β IN HK-2 CELL LINE

MA Chun Yan WANG Hai Yan.

(*Institute of Nephrology The First Hospital Beijing University Beijing 100034*)

ABSTRACT

In this study, we have found that the biological events governed by TGF β_1 were mediated by SMAD₅ and ERK signal transduction pathways in HK-2 cell line. Smad2 was increased from 4-48 hours after being treated with TGF β_1 ; in contrast, Smad6 markedly decreased after 1 hour treatment of TGF β_1 , it reached the minimum at 4 hours, returned to baseline after 24 hours. ERK involved in the negative growth control of TGF β_1 , but had no effect on FN secretion stimulated by TGF β_1 .

Key Words: Transforming growth factor β Cell proliferation Extracellular matrix Signal transduction

BCL-2 反义硫代磷酸寡脱氧核苷酸对原代急性白血病细胞选择性抑制作用

林艳娟 吕联煌 陈英玉 陈志哲 张学敏

(福建医科大学附属协和医院 福建省血液病研究所 福州 350001)

BCL-2 是调节细胞凋亡的重要基因,它的过度表达可阻止细胞程序性死亡,延长细胞寿命,使细胞堆积,在许多癌肿的发生中起着不可忽视的作用。且无论是急性髓系还是淋巴细胞系白血病,原始细胞 BCL-2 高水平表达与临床化疗效果差均有关^[1-2]。基于 BCL-2 调节细胞生存的功能和潜在的抗药作用,BCL-2 基因可能代表着改进癌症治疗的一种理想的治疗策略设计,因此针对 BCL-2 的反义基因治疗技术被国内外学者用以治疗肿瘤的研究。已有研究表明 BCL-2 基因在正常骨髓原始细胞、恶

性造血细胞中均有表达^[3,4]。那么,BCL-2 反义硫代磷酸寡脱氧核苷酸(antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide, AS-PS-ODN, ASPO)在对急性白血病作用的同时,是否也对正常造血细胞产生影响尚不清楚,因此本文应用 BCL-2 ASPO 作用于正常或良性血液病骨髓细胞和原代急性白血病细胞,观察它们的增殖和 BCL-2 表达的变化,了解 BCL-2

本文 2001 年 2 月 20 日收到,5 月 23 日接受。

本课题获卫生部科研基金(98-2-337)、福建省科委优先发展基金(97-Z-47)资助。