

蛋白磷酸酯酶-1 和-2A 抑制剂对 NG108-15 细胞 tau 蛋白磷酸化的影响

朱粹青 曹小定

(复旦大学医学院医学神经生物国家重点实验室 上海 200032)

Alzheimer(AD)痴呆是目前最为常见的老年痴呆症之一,也是迄今为止最难治的疾病之一。AD 的主要脑病理特征是一种以脑内老年斑的大量沉积,大量神经原纤维缠结(neurofibrillary tangle, NFT)形成,神经元缺失^[1],其中 NFT 的数量明显与痴呆程度有关^[2]。NFT 主要由超磷酸化的微管相关蛋白 tau 形成的双股螺旋丝(paired helical filament)堆积而成^[3]。研究资料表明 AD 的 tau 蛋白磷酸化与蛋白磷酸酯酶系统缺陷有关^[4]。因此,研究建立 AD 样 tau 蛋白磷酸化细胞模型,不仅有利于进一步研究 tau 蛋白磷酸化的机理,而且也可用于防治 AD 药物的研究。

材料和方法

1. 细胞培养

大鼠神经母细胞和小鼠胶质细胞瘤细胞的杂交细胞系 NG108-14(中科院细胞所提供),用 1640 培养液(Gibco BRL)含 15% 小牛血清培养,在 5% CO₂, 37℃ 培养。用于 MTT 研究,以每孔 1×10^5 细胞接种于 96 孔板; 4×10^5 每孔接种于 24 孔板,用于免疫印迹研究或免疫组化研究。

2. MTT 测定法

96 孔板内的细胞分别每孔加入含 1-100nmol/L 磷酸酯酶(PP)-2A 和-1 抑制剂冈田酸(okadaic acid, OA, Sigma)的 1640 培养液 100 μ l,每种浓度 6 孔,培养 12 小时。加 MTT (5mg/ml)10 μ l,再继续培养 4-6 小时,弃上清,用无血清培养液洗一次,每孔加 100 μ l DMSO,溶解生成的深蓝色结晶,用 BIO-RAD Model 450 酶标仪测 OD₅₇₀值,作为反映细胞代谢状况的参数。

3. 蛋白样品处理

NG-细胞经过 0、10、20nmol/L OA 处理 12h。细胞在 4℃ 用细胞裂解液裂解[1% NP-40, 10mmol/L Tris-HCl(pH7.5), 0.5mol/L NaCl, 1mmol/L EGTA, 蛋白酶抑制剂(Complete^R, Boehringer)],离心 12,000rpm, 10min, 取上清蛋白定量(Bradford 法)。

由于 tau 蛋白有热稳定性,取未经 OA 处理的 NG 细胞裂解液样品,100℃ 处理 10min,离心 12,000rpm 10min,取上清。另外,取该热稳定上清液,用 1mol/L Tris 液调 pH 至 9.0,加入 MgCl₂ 至终浓度为 1mmol/L,以 10U/ml 加入细菌磷酸酯酶,67℃ 孵育 1h。

4. 免疫印迹法

10% SDS-PAGE 胶电泳,并用湿式转移法转至 PVDF 膜上,PVDF 膜用含 4% 脱脂奶粉 TBS 封闭,随后用不同的抗 tau 蛋白单克隆抗体(PHF1 识别 tau 的磷酸化的 Thr396 位点——日本东北大学荒井启行赠送,C5 识别 Ser396 位磷酸化的——日本东京大学顾拥军博士提供,tau1 抗 tau 的非磷酸化的 Ser199/202 位点-Boehringer Mannheim Biochemica 公司)1:1000 室温孵育 2h,TTBS 漂洗后,HRP 结合的抗小鼠 IgG 抗体(Santa Cruz)1:1000 孵育 1h。PVDF 膜用 ECL kit 反应 1min,X-光片曝光,显影,定影后,X-光片用 Image Master^R VDS(Pharmacia Biotech)透射扫描保存图片。

结 果

1. OA 对 NG 细胞代谢的影响

NG 细胞经不同浓度的 OA 处理 12 小时后进行 MTT 测定,结果如图(1)所示,1nmol/L 的 OA 已经可使 MTT 显色减弱,但其 OD₅₇₀ 值(0.264 ± 0.225)与对照(0.290 ± 0.025)差异不明显,OA 达 10nmol/L 时 OD₅₇₀ 值(0.249 ± 0.031)与对照比较 P 值为 0.03,而 OA 为 20nmol/L 时与对照比较 P 值为 0.011。以后随 OA 浓度的升高,MTT 不断下降与对照的差异也更为明显。

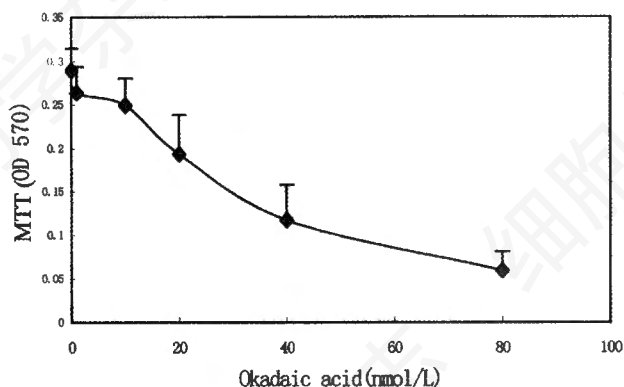


图 1 岗田酸对 NG 细胞代谢的影响

2. NG 细胞的 tau 蛋白分析

本文 2000 年 9 月 25 日收到,2001 年 3 月 22 日接受。
国家自然科学基金 39830450、国家重点基础研究基金 G1999054007 和教技司 2000-66 资助。

NG 细胞是一种神经母细胞和胶质细胞的杂交瘤细胞,用 tau1、C5 和 PHF1 抗体进行免疫印迹观察,都显示 NG 细胞含有高分子量和低分子量两大主分(图 2)。为了说明这两个组分是否都是 tau 蛋白,用 NG 细胞裂解液样品经过 100℃ 热处理和离心,发现其上清中仍然含有这两大主分,该上清用磷酸酯酶处理可加强 tau1 的免疫印迹染色(图 3),结果表明这两个组分都是 tau 蛋白。另外在这一结果中可以观察到在分子量分别在 45 - 60kD 和 75 - 96kD 的两大 tau 蛋白组分中有非常相似的带型。

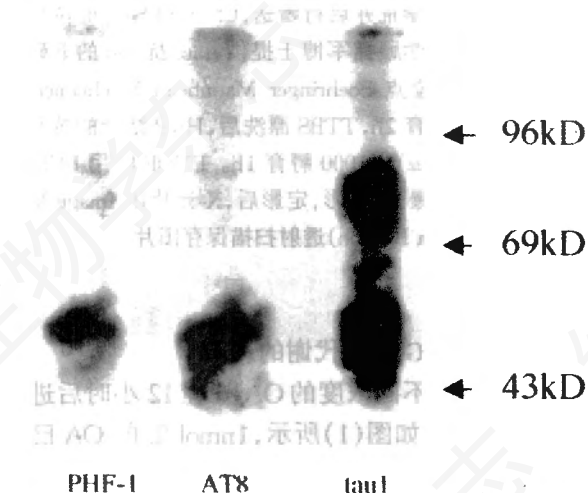


图 2 不同 tau 蛋白抗体对 NG108-14 细胞裂解液的检测

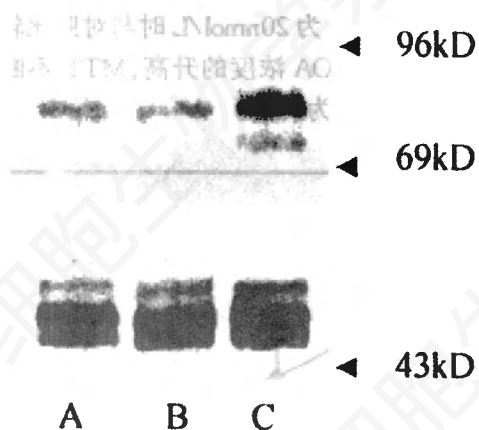


图 3 Tau1 抗体对不同处理的 NG 细胞裂解液的检测
A. 未热处理 B. 热处理 C. 碱性磷酸酯酶处理。

3. 岗田酸对 tau 蛋白磷酸化的影响

NG 细胞经 OA 处理后,用可识别磷酸化 tau 蛋白的 PHF1 抗体进行免疫印迹研究,结果(图 4)观察到 10nmol/L OA 就可使高分子量组 tau 蛋白磷酸化程度加强,但低分子量组变化不明显;而 20nmol/L OA 处理样品 tau 蛋白两大组份都有明显的磷酸化程度的加强。

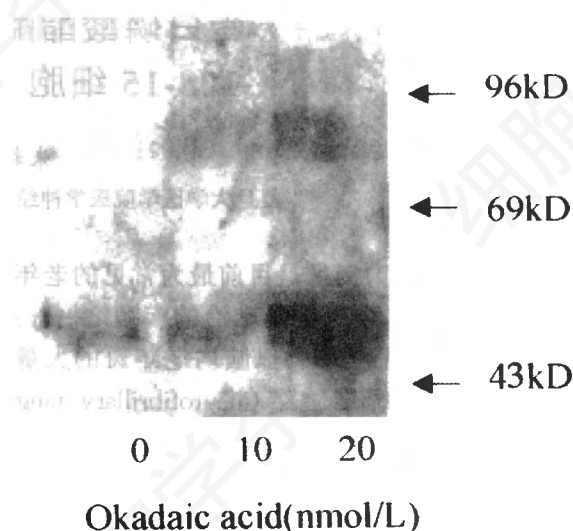


图 4 岗田酸对 NG 细胞 tau 蛋白磷酸化的影响(PHF1 抗体)

讨 论

人编码 Tau 蛋白基因定位于 17 号染色体^[5],通过 mRNA 水平的不同剪接形成成熟脑神经元的有六种氨基酸长度的 tau 蛋白^[6],免疫印迹显示一般在 50 - 70kD。我们在 NG 细胞中观察到两大组分,低分子量组分与成熟人脑神经元的 tau 比较接近,而高分子量的组分的 tau 蛋白可能是因为它们含有 4A 外显子。含 4A 外显子的 tau 蛋白一般存在于外周神经元或其他非神经元的其他组织细胞^[7,8]。而 NG 细胞是一种神经母细胞瘤和胶质细胞的杂交细胞系,这可能是其含有两大组份 tau 蛋白的原因。由于该细胞株 tau 蛋白含量较高,所以我们选用它可进行 tau 蛋白相关的研究。

AD 脑内的标志性病理变化为老年斑和神经原纤维缠结,老年斑是细胞之间的基质的病理变化,而神经原纤维缠结是细胞内的病理变化,有报道认为神经原纤维缠结的多寡与 AD 的痴呆程度有明显的关联^[2]。神经原纤维缠结由双股螺旋细丝(Paired helical filament)为主要物质堆积形成,这种双股螺旋细丝由过度磷酸化的 tau 蛋白形成^[3]。AD 脑内的神经元的蛋白激酶系统和磷酸酯酶系统之间的失衡被认为是 tau 蛋白过度磷酸化的原因^[4]。

以往研究发现 AD 脑提取液中 Tau 蛋白相关的磷酸酯酶活性比对照约低 30%^[9],PP-1,PP-2A 在体外使 PHF-tau 蛋白特异的磷酸化位点去磷酸化,说明 AD 的 tau 蛋白异常磷酸化与这些蛋白磷酸酯酶缺陷有关。因此我们用 PP-1,PP-2A 特异抑制剂

OA处理细胞。有报道磷酸酯酶抑制剂三氟吡啦嗪可导致细胞损伤、代谢障碍和死亡^[10],我们用 NG 细胞经低浓度的 OA 处理,也观察到 MTT 染色减弱。其次用 PHF-1 抗体免疫印迹和形态上的免疫荧光实验都表明 OA 处理可导致 tau 蛋白磷酸化明显增加。因此该细胞模型可用于我们对 tau 蛋白磷酸化的机理的研究和防治 AD 药物的研究。尽管在本实验用 OA 部分复制了细胞内 AD 相关的 tau 蛋白磷酸化,但是如何复制形成细胞内 PHF 结构和 NFT,目前仍是当今 AD 研究领域的难题。

摘 要

Alzheimer 痴呆(AD)的主要病理变化之一为由超磷酸化的 tau 蛋白组成的神经原纤维缠结(Neurofibrillary tangle, NFT)。AD 的 Tau 蛋白异常磷酸化与蛋白磷酸酯酶(PP)-2A 和-1 缺陷有关。本文首先用免疫印迹法显示 NG 含两大组分的 tau 蛋白。MTT 方法观察到 PP-2A 和 PP-1 抑制剂冈

田酸(Okadaic acid, OA)处理 NG108-14 细胞能导致细胞代谢明显下降,同时免疫印迹法显示 OA 能导致的 NG 细胞 Tau 蛋白磷酸化。该研究为建立 AD 样蛋白磷酸酯酶缺陷引起的 tau 蛋白磷酸化的细胞模型奠定了基础。

关键词: Alzheimer 病 冈田酸 tau 蛋白

参 考 文 献

- [1] Morrison JH. et al., 1997, *Science*, 278:412-419.
- [2] Wisniewski HM. et al., 1989, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 48:606-615.
- [3] Lee VM-Y. et al., 1991, *Science*, 251:675-678.
- [4] Gong CX. et al., 1993, *J. Neurochem.*, 61:921-927.
- [5] Hotton M. et al., 1998, *Nature*, 393:702-705.
- [6] Goedert M. et al., 1989, *Neuron*, 3:519-526.
- [7] Gu Y. J. et al., 1996, *J. Neurochem.*, 67:1235-1244.
- [8] Goedert M. et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:1983-1987.
- [9] Gong CX. et al., 1995, *J. Neurochem.*, 65:732-737.
- [10] 郝天玲, et al., 1999, 中国临床神经科学, 7:198-200.

EFFECT OF PROTEIN PHOSPHATASE-1 AND 2A INHIBITOR ON TAU PROTEIN PHOSPHORYLATION OF NG108-14 CELL

ZHU Cui Qing CAO Xiao Ding.

(Medical Center of Fudan University College, National Key Laboratory of Medical Neurobiology, Shanghai 200032)

ABSTRACT

One of Alzheimer dementia(AD)pathological hallmark in brain is the large amount of neurofibrillary tangles which are made by hyperphosphorylated tau protein. The deficiency of protein phosphatases(PP)-1 and -2A is involved in abnormal phosphorylation of tau of AD cases. In this study, tau protein of NG108-14 cells was analyzed by western blot. After treated with PP-1 and PP-2A specific inhibitor-okadaic acid(OA), reduction of MTT of NG108-14 decreased as well as the elevating phosphorylated tau protein was showed by western blots. This study has provided the AD like tau phosphorylation cell model for our further research.

Key words: Alzheimer disease Okadaic acid Tau protein

大鼠心肌细胞核钙调素入核转运与核钙调节关系的探讨*

王培勇 刘 健** 唐朝枢***

(第三军医大学病理生理教研室 重庆 400038) (**第三军医大学新桥医院心内科 重庆 400037)

(***北京大学第一医院心血管病研究所 北京 100035)

钙作为细胞内最为关键的第二信使在胞浆的调节已做了较为深入的研究,近年的研究表明 Ca^{2+} 也是细胞核内的重要信号,参与核反应过程的调节,如细胞增殖分化、DNA 修复、DNA 复制、基因表达、核蛋白磷酸化以及细胞凋亡等^[1,2]。令人感兴趣的是

钙调素(CaM)作为细胞内的钙受体,最近发现也存在于细胞核内,推测除了众所周知的功能之外,还可

本文 2001 年 3 月 26 日收到,11 月 12 日接受。

* 国家自然科学基金资助课题(No. 39870347 and No. 39870392)

能参与胞浆的信号向核内快速转导^[3]。但是对于 CaM 如何进入细胞核所知甚少。Ca²⁺ 信号在心肌细胞具有特殊的重要作用,参与许多心脏生理和病理过程的调节。我们以往的研究结果已证实,分离纯化的鼠和家兔心肌细胞核上存在 Ca²⁺ 摄取和释放的调节成分^[4],本研究在离体大鼠心肌细胞核上进一步探讨 CaM 的核孔转运与钙调节系统的关系。

材料与方法

1. 材料与试剂

Alexa FluoTM488 标记的牛脑钙调素、thapsigargin、heparin、leupeptin、aprotinin、pepstatin A、cADPribose 和 8-Br cADP ribose 购自 Molecular Probes;钌红(Ruthenium Red)、苯甲基磺酰氨(PMSF)、DTT 系美国 Sigma 公司产品;其余试剂为国产分析纯。

2. 心肌细胞核的提纯

所有操作在 0-4℃ 下进行。健康雄性 Wistar 大鼠(150-200 g)麻醉后开胸迅速取出心脏,用 50 ml 冰冷 TKM 液(mmol/L: Tris/HCl 50, KCl 25, MgCl₂ 5, NaF 10, Na₃VO₄ 0.2; pH7.5)洗去红细胞,剪碎后加入 5 倍体积等渗匀浆液(mmol/L: 含蔗糖 250, EGTA 1.0, DTT 1.0, PMSF 1.0 和 leupeptin、aprotinin、pepstatin A 各 1 μg/ml 的 TKM 液)中,用内切式匀浆器低速匀浆 2.5 min(30 sec×5 次),200 目尼龙布过滤去除纤维组织,离心(1 400 g, 10 min)两次,弃上清,将沉淀加入 1 倍体积的含 1.0mol/L 蔗糖-TKM 液中,充分混匀加入 3 倍体积的 2.5mol/L 蔗糖-TKM,混匀后超速离心(120 000 g, 60 min),沉淀即为纯化的心肌细胞核。分离的细胞核纯度采用酶学方法鉴定,其他细胞器标志酶均小于 5%(细胞膜:5-核苷酸酶,肌浆网:葡萄糖-6-磷酸酶,线粒体:琥珀酸脱氢酶)。采用 Lowry 法行蛋白质定量,二苯胺法行 DNA 定量。用分离纯化的心肌细胞核进行下述实验。

3. 细胞核对钙调素转运的[Ca²⁺]依赖关系

心肌细胞核在等渗核保存液(mmol/L: HEPES 25, KCl 125.0, KH₂PO₄ 2.0, MgCl₂ 4.0, EGTA 1.0, pH7.0)中进行 CaM 的核孔转运反应,反应体积 100 μl 中,加入核蛋白 50 μg/管, Alexa FluoTM488 标记的牛脑钙调素 1.0 μg/管, ATP 1.0 mmol/L, 反应液中含有不同浓度的自由钙(0.1×10⁻⁷、1×10⁻⁶、1×10⁻⁵、1×10⁻⁴和 1×10⁻³mol/L),自由钙浓度

用 EGTA-Ca²⁺ 缓冲液控制,根据 Chris Patton 的软件 Win-MAXC(<http://www.stanford.edu/cpatton/maxc.html>)的多元缓冲对计算方法确定在 EGTA 1.0 mmol/L 情况下,配制不同浓度的自由钙所需要总[Ca²⁺]量。30℃ 下反应 30min,之后加入 10 倍体积的核保存液,用离心法(12,000r/min, 5min)洗去未转运入核的游离 CaM,用滤纸充分吸净离心管的残留液体,沉淀经洗涤后悬浮于 1.0ml 核保存液中,在由 FL Winlab 软件控制的 PERKIN ELMER LS-50B 型荧光发光分光光度计上用激发波长 494nm,发射波长 520nm 测其荧光值。均双复管测定。并取 1×10⁻³mol/L 自由 Ca²⁺ 浓度点的样品涂片后用荧光显微镜(Olympus BX60)观察照相。

4. 钙调素经细胞核孔转运与细胞核 Ca²⁺ 摄取、释放的关系探讨

为了探讨 CaM 核孔转运的调节机制,将细胞核制备分组,在 CaM 转运反应液[Ca²⁺]为 10⁻³mol/L 的情况下,分别观察 Ca²⁺-ATP 酶抑制剂 Thapsigargin(5.0 μmol/L)、IP₃ 受体拮抗剂 Heparin(10 μg/ml)、ryanodine 受体拮抗剂 Ruthenium red(50 μmol/L)和 cADP ribose 受体拮抗剂 8-Br cADP ribose(2.0 μmol/L)等工具药物对 CaM 转运的影响,以确定钙调素细胞核孔转运与心肌细胞核 Ca²⁺ 转运调节系统的关系,反应条件同上。本实验所采用的上述工具药物有效浓度根据文献选定^[5-7]。

5. 数据处理

实验数据以均值±标准差表示(x±s),两组比较采用 Welch's t 检验,多组间比较采用方差分析(one way ANOVA)组间 q 检验。

实验结果

1. 心肌细胞核制备与鉴定

本实验采用差速离心和密度梯度离心法分离纯化大鼠心肌细胞核,所有操作均在 4℃ 进行,而且在提取介质中含有各种蛋白酶的抑制剂和 EGTA,从而在保证所提取的核完整和高纯度的同时,也保持了核的活性,防止了核内的活性成分由核孔漏出。实验中所制备的心肌细胞核,蛋白质与 DNA 比值约为 7.3,较其在胞浆的比值减少 28 倍,核回收率为 20%-30%,细胞内亚细胞成分标志酶活性小于 5%,如下表所示:

表 1 心肌细胞核制备回收率及标志酶测定

	蛋白质回收 (mg/g ww)	DNA 回收 (mg/g ww)	蛋白质/DNA	葡萄糖 6 磷酸酶 nmol/h. mg	5'-核苷酸酶 nmol/h. mg	琥珀酸脱氢酶 nmol/h. mg
匀浆	91.95±20.94	0.484±0.147	215.1±102.4	88.3±74.6	210.3±62.5	4701±831
核	0.935±0.058*	0.122±0.027*	7.32±0.87*	3.35±3.06	3.44±3.67*	58.8±47.2*

* P<0.01 与匀浆相比(n=6, x±sd)。

2. 细胞核对钙调素转运的 $[Ca^{2+}]$ 依赖关系

离体纯化的大鼠心肌细胞核在ATP存在下,能向核内转运CaM,转运入核的CaM在细胞核内呈不均匀分布,核内可见散在的聚集颗粒(如图1所示)。CaM的向核孔转运量具有显著 $[Ca^{2+}]$ 浓度依赖性特性,随核外 $[Ca^{2+}]$ 浓度的增加而呈现性递增,两者呈显著的线性正相关关系($r=0.879$, $P<0.05$)。如图2所示。

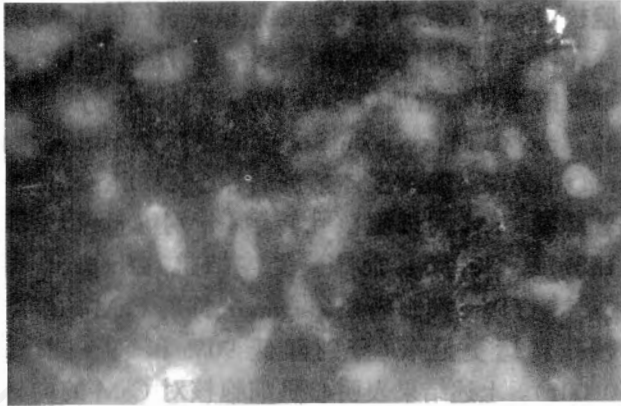


图1 大鼠心肌细胞核摄取 Alexa Fluor™488 标记 CaM 的荧光显微镜照片(自由 Ca^{2+} 浓度为 1×10^{-3} mol/L, 油物镜 $100 \times /1.30$)

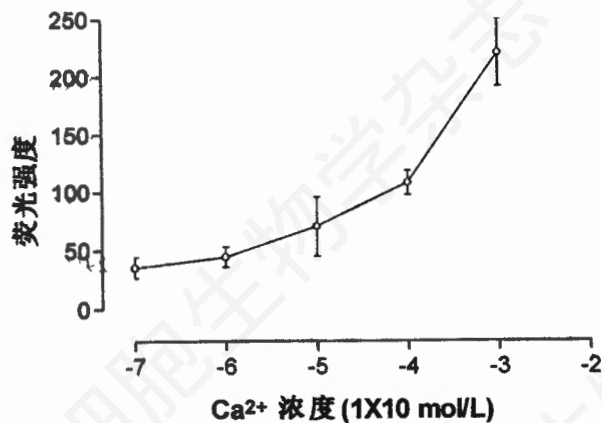


图2 大鼠离体心肌细胞核对钙调素入核转运的 $[Ca^{2+}]$ 依赖关系($n=6$, $x \pm sd$)

3. 钙调素经细胞核孔转运与细胞核 Ca^{2+} 摄取、释放的关系

在 $[Ca^{2+}]$ 浓度为 10^{-3} mol/L 时,ryanodine 受体拮抗剂 ruthenium red ($50 \mu\text{mol/L}$)和 cADP ribose 受体拮抗剂 8-Br cADP ribose ($2.0 \mu\text{mol/L}$)显著使CaM的细胞核孔转运分别降低20%和18% ($P<0.05$),而 Ca^{2+} -ATPase 抑制剂 thapsigargin ($5 \mu\text{mol/L}$)和 IP_3 受体拮抗剂 heparin ($10 \mu\text{g/ml}$)使CaM的

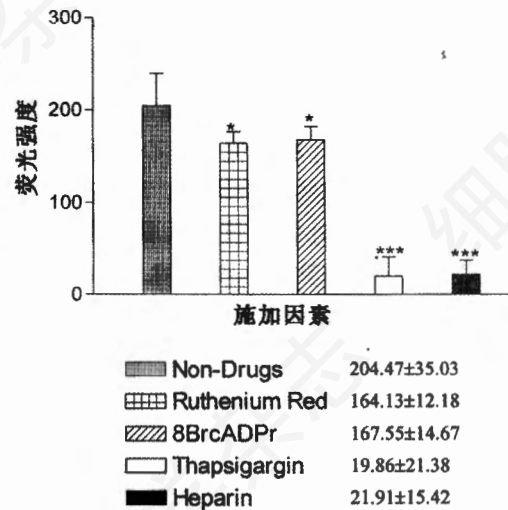


图3 Thapsigargin、Heparin、Ruthenium red 和 8-Br cADP-ribose 对 CaM 经细胞核孔入核转运的影响($n=6$, $x \pm sd$)

* $P<0.05$, *** $P<0.001$ 与不加药物组(Non-Drugs)比较。

细胞核孔转运分别降低90%和89%,呈现更显著的抑制作用($P<0.001$)。如图3所示。

讨 论

真核细胞的细胞核是细胞遗传信息和生命活动的控制中心,它由双层脂膜组成的核被膜与胞浆相分隔,并通过核孔与胞浆相连通。以往认为,核孔允许小分子物质自由通过,其被动扩散的直径约为10nm,可能使其对分子量为30-60kDa的所有分子通透^[8]。但是最近的研究发现核孔存在闸门控制机制,并非始终开放自由通透^[9,10]。其调控机制现在仍不清楚,目前已知ATP和 Ca^{2+} 可能在其中起调节作用。有些证据提示核孔复合体的性质受 Ca^{2+} 可逆调节,存在关闭和开放两种状态,因为组成核孔复合体蛋白之一含有EF臂型的 Ca^{2+} 结合主导区,它可能是核孔闸门的 Ca^{2+} 调制敏感元件。但无ATP时,核孔复合体对 Ca^{2+} 不敏感^[11]。如Jarnik和Aeb^[12]用电镜观察到非洲蟾蜍卵母细胞被去除 Ca^{2+} 后引起核孔开放,重新加入 Ca^{2+} 则使核孔关闭状态恢复。在进一步更巧妙的实验中,Perez-Terzi^[13]用原子力显微镜观察到,当 Ca^{2+} 耗尽从而导致核被膜通透性受限时,核孔实际上转为塞紧(plugged)状态,中分子物质的自由通透被阻断。

然而,心肌细胞核孔闸门调节的特征及其生理和病理意义,迄今为止尚不清楚。与其他类型细胞

的不同的是心肌细胞是可兴奋细胞,细胞内的游离钙随心脏的收缩周期呈大幅度的周期性变化。我们以往的试验初步证实了心肌细胞核存在相对独立的钙转运系统,我们推测这些钙转运系统可能参与心肌细胞核孔闸门调节,从而保证在心肌胞浆 Ca^{2+} 大幅度周期变化时核功能的精密调节。本实验应用荧光标记的 CaM 研究核外钙浓度与大鼠心肌细胞核孔转运的关系,发现 ATP 为 1.0mol/L 时,心肌细胞核的 CaM 核孔转运随核外 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度的增加而增加,说明核外钙浓度能刺激 CaM 的核孔转运。这一结果说明 CaM 虽然是中分子量的蛋白质(分子量为 13kDa),但它并不能自由通过心肌细胞核孔,而是由细胞内钙信号所调控。现在知道很多基因受 Ca^{2+} 和 CaM 调节,CaM 激酶作为核 Ca^{2+} 信号的中介起作用。CaM 激酶 I、II 和 IV 在核内均有活性,能识别 Ca^{2+} 信号的频率、幅度和持续时间,并通过磷酸化核转录因子的关键调节位点控制基因表达^[14],因此它是介导细胞核 Ca^{2+} 调节基因转录的最佳选择。有研究发现鸦片受体激活刺激 Ca^{2+} 内流,导致 CaM 核转位,进一步引起核转录因子磷酸化程度增加^[3]。胞内与胞外刺激协同调节多种 CaM 结合蛋白的活性,研究发现胞内 Ca^{2+} 增加激活 Ca^{2+} /CaM 依赖的激酶,也导致培养的心肌细胞产生肥大反应^[15]。可见,CaM 的细胞核转位,是细胞外信号通过细胞浆钙信号向核内转导的重要环节。

心肌细胞核钙调节系统是否参与 CaM 的细胞核转位尚未见报道。本研究还发现在 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度为 10^{-3}mol/L 时,ryanodine 受体拮抗剂 ruthenium red、cADP ribose 受体拮抗剂 8-Br cADP ribose、 IP_3 受体拮抗剂 Heparin 和钙泵抑制剂 thapsigargin 显著抑制 CaM 的细胞核孔转运,Heparin 和 thapsigargin 的作用最为显著,说明核 Ca^{2+} 摄取-释放参与大分子物质通过核孔转运过程调节,其中 IP_3 受体和 Ca^{2+} -ATPase 起主导作用。cADP ribose 是新发现的 cADP ribose 受体激活的信使,是胞内钙库释放的内源调节介质,能引起 caffeine 敏感和非敏感的钙库释放 Ca^{2+} ,且受 cAMP 和 calmodulin 调节^[16,17]。本实验的结果也提示在大鼠心肌细胞核上也可能存在 cADP ribose 受体。

本实验说明了大鼠心肌细胞核存在闸门控制机制,CaM 向细胞核转位是由 Ca^{2+} 所刺激,核 ryanodine 受体、cADP ribose 受体、 IP_3 受体和钙泵在 CaM 核孔转运调节中起重要作用。其生理和病理

生理意义有待于进一步探讨。

摘 要

最近发现,钙调素作为细胞内钙受体,除了调节胞浆的多种功能之外,可能还参与胞浆信号向核内快速传递。本研究观察大鼠心肌细胞核对钙调素的人核转运与钙浓度的关系,并初步探讨其调节机制。大鼠心肌细胞核采用差速离心和密度梯度离心分离提纯。用荧光分光光度计测定荧光标记钙调素向细胞核转入量发现,大鼠心肌细胞核对核外的 CaM 向核孔转运量具有 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度依赖性,随核外 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度的增加而增加 ($P < 0.001$),在 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度为 10^{-3}mol/L 时,ryanodine 受体的拮抗剂 ruthenium red 和 cADP ribose 受体拮抗剂 8-Br cADP ribose 显著抑制 CaM 的细胞核孔转运(分别降低 20% 和 18%, $P < 0.05$),而 IP_3 受体拮抗剂 heparin 和 Ca^{2+} -ATPase 抑制剂 thapsigargin 抑制 CaM 的细胞核孔转运更显著(分别降低 90% 和 89%, $P < 0.001$)。上述结果表明心肌细胞核对 CaM 的向核转运,受核外 $[\text{Ca}^{2+}]$ 和核钙摄取、释放所调节。

关键词: 心肌 细胞核 CaM 转运

参 考 文 献

- [1] van Haasteren G., et al., 1999, *J Recept Signa Transduct Res.*, **19**(1-4):481-492.
- [2] Hardingham GE., et al., 2001, *Nat Neurosci.*, **4**(3):261-267.
- [3] Wang D., et al., 2000, *J Neurochem.*, **74**(4):1418-1425.
- [4] 王培勇等, 1997, *生物化学与生物物理学报*, **29**(6):567-572.
- [5] Zhou Z. et al., 2000, *J Physiol.*, **15**:523:57-66.
- [6] Cadiou H, et al., 2000, *Eur J Neurosci.*, **12**(8):2805-2812.
- [7] Rakovic S, et al., 1999, *J Biol Chem*, **274**,17820:34242-34250.
- [8] Gerace I., et al., 1988, *Ann Rev Cell Biol.*, **4**:335-374.
- [9] Pauly N., et al., 2000, *Nature*, **405**(6788):754-755.
- [10] Rogue PJ., et al., 1999, *EMBO J.*, **18**(19):5147-5152.
- [11] Stoffler D., et al., 1999, *J Mol Biol.*, **287**(4):741-752.
- [12] Jarnik M., et al., 1991, *J Struct Biol.*, **107**:291-308.
- [13] Perez Terzic C., et al., 1997, *Science*, **273**:1875-1877.
- [14] Sun P., et al., 1994, *Genes Dev.*, **8**:2527-2539.
- [15] Gruver CL., et al., 1993, *Endocrinology*, **133**:376-388.
- [16] Yamaki H., et al., 1998, *J Dent Res.*, **77**(10):1807-1816.
- [17] Perez CF., et al., 1998, *Am J Physiol.*, **274**(2 Pt 1):C430-439.

RELATIONSHIP BETWEEN NUCLEAR Ca^{2+} REGULATION AND CALMODULIN IMPORT TO RAT'S MYOCARDIAL NUCLEI*

WANG Pei Yong LIU Jian** TANG Chao Shu***

(Department of Pathophysiology, Third Medical University, Chongqing 400038

** Department of Cardiology, Xinqiao hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037

*** The Institute of Cardiovascular Disease, The First Hospital, Beijing University, 100035)

ABSTRACT

The intracellular Ca^{2+} receptor calmodulin(CaM) coordinates responses to extracellular stimuli by modulating the activities of its various binding proteins. Recent reports suggest that, in addition to its familiar functions in the cytoplasm, CaM may be directly involved in rapid signaling between cytoplasm and nucleus. Here the relationship between $[\text{Ca}^{2+}]$ and nuclear accumulation of CaM was studied in rat myocardial nuclei in vitro. Velocity and isopycnic gradient centrifugation was employed to fractionate rat myocardial nuclei. Alexa FluorTM 488 conjugated CaM was used as fluorescent probes to determine CaM import to nuclei. The results shown that Ca^{2+} stimulated nuclear translocation of CaM in a concentration-dependent way, and CaM nuclear translocation was down regulated significantly by ryanodine receptor antagonist Ruthenium red and cADP ribose receptor antagonist 8-Br cADPribose (by 20% and 18% respectively, $P < 0.05$), and more significantly by Ca^{2+} ATPase inhibitor thapsigargin and IP_3 receptor antagonist heparin (by 90% and 89% respectively, $P < 0.001$). These data suggest that CaM didn't diffuse freely through nuclear pores and the import of CaM to myocardial nuclei was mediated by the elevation of free Ca^{2+} and may be regulated by nuclear calcium transport systems.

Key words: Myocardium Cell nucleus Calmodulin Translocation

* Supported by NSFC(No. 39870347 and No. 39870392)

WEB2 基因参与酿酒酵母 S 期检查点调控

李新鸣 孙黎光* 宣忠信* 宋今丹**

(中国医科大学病原生物学教研室 沈阳 110001)

WEB2(Wants E1A badly2)基因是一个 4500 多碱基对的大基因,等同于 Dna2 基因,定位于酿酒酵母 8 号染色体右臂,目前已明确其编码产物具有 3' 到 5' 的 DNA 解链酶活性,在 DNA 复制中发挥作用^[1]。考虑到 WEB2 蛋白为一个 17.5 万 dal 的蛋白大分子,应具有除了解链酶外多种功能。而 Elledge 等又提出一个推测性的酿酒酵母 S 期检查点调控通路^[2],所以本实验利用一个 WEB2 突变株,根据其对 DNA 合成阻断剂 Hydroxyurea(HU)的敏感性,来判断其是否丧失 S 期检查点调控功能,从而证实 WEB2 基因是否参与 S 期检查点调控,即工作在该检查点通路上。由此可加深对真核细胞检查点控制通路的了解,为探索肿瘤的发生机制提供线索。

材料与方法

1. 材料

酵母菌 ymw2(野生株,配对型为 a),WEB2-46(WEB2

突变株,配对型为 a),美国德克萨斯州西南医学中心惠赠。培养基 YPD 培养,YPGal 培养基:将 YPD 培养基中葡萄糖替换成半乳糖。试剂 α 因子、HU、Lyticase、mouse anti-tubulin antibody、FITC-sheep anti mouse antibody, Sigma 产品。

2. 方法

(1) α 因子处理酵母细胞同步化在 G_1 期 用 YPD 液体培养基培养酵母菌,其 $\text{OD}=0.2-0.5$ ($0.1\text{OD}=2 \times 10^6$ 个细胞/ml);用含 $5\mu\text{g/ml}$ α 因子的 YPGal (ph = 4.0) 重悬起细胞,培养 3-4hr,调整 $\text{OD}=0.2$ 。

(2) HU 处理细胞阻滞在 S 期 将同步于 G_1 期的酵母菌接种于含 HU(200mol/L)的 YPGal 培养基,培养 8hrs。

(3) FACS 测定细胞 DNA 含量 从更换到 HU 培养基开始,间隔 1 小时收集酵母细胞,数目为 5×10^6 个;用 0.9% NaCl 洗涤后用 70% 乙醇悬起,充分混匀后 4℃ 放置过夜;离心沉淀并洗涤细胞,然后将细胞重悬于 $2.5\mu\text{g/ml}$

本文 2001 年 8 月 2 日收到,2002 年 1 月 3 日接受。
国家自然科学基金资助项目,39870384。

* 通讯作者:中国医科大学生物化学与分子生物学教研室

** 中国医科大学卫生部细胞生物学重点实验室