

fied yet. In this study, we isolated the extracellular domain of the CD34 cDNA and expressed as a fusion protein. The results from DNA sequencing and specific binding assay demonstrated that we have obtained a purified recombinant protein of the extracellular domain of CD34 molecule. It will be very helpful for our further studies on the physiological significance of the CD34 molecule.

Key words: CD34 antigen Hematopoietic stem/progenitor cell Prokaryotic expression

Supported By the Foundation of Science and Technology Committee in Tianjin(003119611), China

* Corresponding author. E-mail: hesong@public.tpt.tj.cn

非折叠蛋白质应答对人胚肾细胞 293A 迁移特性的影响

苏荣健 陈誉华 宋今丹*

(中国医科大学发育生物学研究室, 卫生部细胞生物学重点实验室 沈阳 110001)

摘要 为了研究非折叠蛋白质应答对器官发生的影响,应用衣霉素诱导非折叠蛋白质应答并观察其对入胚肾细胞系 293A 迁移特性的影响。在实验中,应用划痕法对细胞迁移进行观察,并应用细胞黏附实验、荧光染色技术、扫描电镜技术及免疫印迹实验分别对细胞黏附特性、微管及微丝、细胞表面边缘的突起及小分子 GTPase 的表达水平进行研究。结果表明,非折叠蛋白质应答可以抑制细胞迁移,进一步的研究发现,非折叠蛋白质应答可以降低细胞的黏附能力、引起细胞骨架的重排、抑制伪足的形成并降低 RhoA 的表达水平。这提示,非折叠蛋白质应答可能通过抑制应激细胞的迁移为应激细胞的功能修复赢得了时间,在器官发生过程中发挥作用。

关键词: 细胞迁移 非折叠蛋白质应答 器官发生

非折叠蛋白质应答 (the unfolded protein response, UPR) 是指真核细胞在受到某些刺激导致错误折叠或未折叠的蛋白质在内质网中聚集时,通过上调分子伴侣等某些基因的表达,使错误折叠或未折叠的蛋白质正确折叠;对不能正确折叠的蛋白质,通过内质网相关的降解作用 (ER associated degeneration, ERAD) 使之降解。非折叠蛋白质应答是细胞的一种应激反应。

近年来的研究表明,非折叠蛋白质应答在胚胎发育、人类疾病等生理和病理过程中具有重要的意义^[1]。本研究应用内质网糖基化抑制物衣霉素诱导非折叠蛋白质应答以观察其对入胚肾细胞系 293A 迁移特性的影响,旨在对非折叠蛋白质应答在器官发生中的作用加以研究。

材料与方 法

1. 细胞培养和内质网非折叠蛋白质应答的诱导

人胚肾细胞系 293A (美国南加州大学医学院惠赠) 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中;为诱导内质网非折叠蛋白质应答,向培养液中加入终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的衣霉素,继续培养 6 h^[2]。

2. 划痕法 (scratch wound assay) 检测细胞迁移特性

在 35mm 的培养皿中接种 2×10^5 个 293A 细胞,待细胞汇合成细胞单层后,用灭菌移液器头在细胞单层上小心的做一个划痕,用 PBS 彻底漂洗 3 次,加入含 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 衣霉素的培养液继续培养 24 h,观察划痕愈合指数,该实验反复进行 3 次,比较划痕愈合指数^[3]。

3. 细胞黏附实验

将 293A 细胞在含 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 衣霉素的培养液中培养 6 h 以诱导非折叠蛋白质应答,胰蛋白酶消化,用含 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 衣霉素的培养液稀释细胞至 3×10^5 个/ml,接种于纤粘连蛋白处理的 24 孔板中,每孔加 100 μl 继续培养。分别于 30、40、50、60、90 min,计数贴壁细胞数,计算黏附指数,黏附指数 = 贴壁细胞数/贴壁细胞数 + 未贴壁细胞数^[4]同时以正常培养

本文 2003 年 5 月 29 日收到,9 月 6 日接受。

* 通讯作者。E-mail: jdsong@mail.cmu.edu.cn

细胞作为对照。

4. 荧光法观察微管

将 293A 细胞以 10^5 个/ml 的密度接种于用 $50 \mu\text{g/ml}$ 的多聚左旋赖氨酸处理过的盖玻片上,待细胞充分伸展后加入衣霉素,终浓度为 $10 \mu\text{g/ml}$ 继续培养 6 h,取出盖玻片,PBS 漂洗, 3.7% 甲醛固定 30min, 0.2% Triton-X-100 透化 5min, 10% BSA 封闭 30min,加一抗(鼠抗人 α -tubulin,中山公司)室温温育 1h,PBS 漂洗,二抗(Rodamine 标记的山羊抗小鼠 IgG)室温孵育 1h, 95% 甘油封片,荧光显微镜下观察。

5. 荧光法观察微丝

将 293A 细胞以 10^5 个/ml 的密度接种于用 $50 \mu\text{g/ml}$ 的多聚左旋赖氨酸处理过的盖玻片上,待细胞充分伸展后加入衣霉素,终浓度为 $10 \mu\text{g/ml}$ 继续培养 6 h,取出盖玻片,PBS 漂洗, 3.7% 甲醛固定 30 min, 0.2% Triton-X-100 透化 5 min, 10% BSA 室温封闭 30 min,罗丹明标记的毒伞素室温染色 1 h,PBS 漂洗, 95% 甘油封片,荧光显微镜下观察。

6. 扫描电镜观察引导缘与丝状伪足

将 293A 细胞以 10^5 个/ml 的密度接种于用 $50 \mu\text{g/ml}$ 的多聚左旋赖氨酸处理过的盖玻片上,待细胞充分伸展后加入衣霉素,终浓度为 $10 \mu\text{g/ml}$ 继续培养 6 h,取出盖玻片,PBS 漂洗,戊二醛固定,镀金,扫描电镜下观察。

7. Western blotting 检测 RhoA、Grp78 在 293A 细胞中的表达

将细胞样品用 PBS 漂洗后加入 RIPA 缓冲液(1% NP-40, 0.5% 脱氧胆酸钠, 1% SDS, 0.1% PMSF)裂解细胞,考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度。加热变性,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜, 5% 脱脂奶粉封闭过夜,加入 $1:500$ 倍稀释的一抗(兔抗人 RhoA,山羊抗人 Grp78,Santa Cruz 公司)杂交 2 h,PBST 洗膜后加入二抗孵育 1 h,PBST 洗膜后进行 ECL 显色。

8. 统计学分析

应用 SPSS11.0 统计软件对数据进行 t 检验。

结 果

1. 非折叠蛋白质应答抑制 293A 细胞的迁移

划痕法结果显示 24h 后,经衣霉素诱导的细胞创口愈合率明显低于未经衣霉素诱导的细胞。48h 后,未经衣霉素诱导的细胞创口基本愈合(图 1)。这表明,内质网非折叠蛋白质应答抑制了 293A 细胞的迁移。

2. 非折叠蛋白质应答减弱 293A 细胞与底物的黏附

细胞黏附实验的结果显示衣霉素诱导细胞的黏附指数在接种后 30、40、50、60、90min 明显低于未经衣霉素诱导的细胞(图 2)。这表明,内质网非折叠蛋白质应答可以降低 293A 细胞与底物间的黏附形

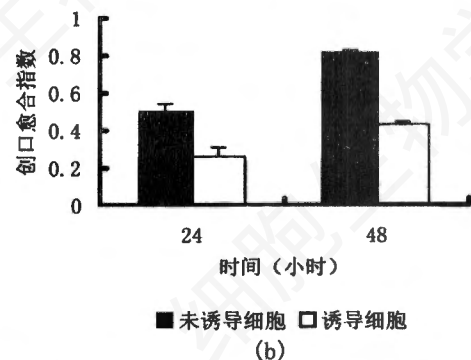
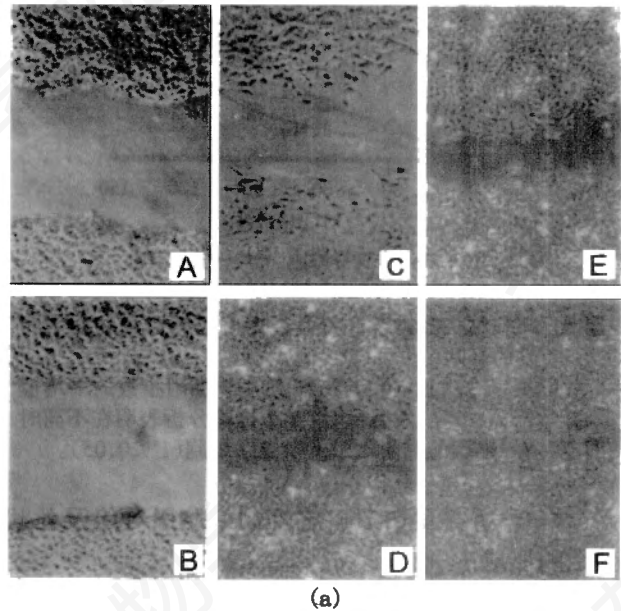


图 1 划痕法 (scratch wound assay) 检测内质网非折叠蛋白质应答对 293A 细胞的迁移特性的影响

(a) .A 为诱导细胞($T=0$),B 为未诱导细胞($T=0$),经过 24 小时后诱导细胞(C)的创口愈合程度明显低于未诱导细胞(D);48 小时后,未诱导细胞的创口基本愈合(F)。(b).创口愈合指数的直方图,数据以 3 次独立实验的创口愈合指数的平均值加减 1 倍标准差表示,经统计学 t 检验分析表明在不同时间点 24、48 小时诱导细胞与未诱导细胞的创口愈合指数存在显著差异($P < 0.05$)。

成能力。

3. 非折叠蛋白质应答导致微管解聚

免疫荧光实验结果显示衣霉素诱导细胞的微管解聚,排列紊乱。而未经衣霉素诱导的细胞微管均匀分布(见封面 A、B)。这表明,非折叠蛋白质应答可以导致微管解聚。

4. 非折叠蛋白质应答引起微丝的重排

荧光法观察微丝显示未经衣霉素诱导的细胞微丝主要分布于细胞的边缘,诱导细胞微丝主要分布于细胞体(见封面 C、D)。这表明,非折叠蛋白质应答可以引起微丝的重新排列。

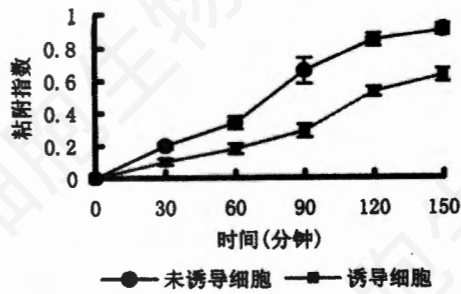


图2 细胞黏附曲线示非折叠蛋白质应答对细胞黏附特性的影响

数据以3次独立实验的细胞-底物黏附指数的平均值加减1倍标准差表示,经统计学 *t* 检验分析表明在不同时间点,诱导细胞的黏附指数低于正常细胞($P < 0.05$)。

5. 非折叠蛋白质应答抑制细胞引导缘及丝状伪足的形成

扫描电镜可见未诱导细胞边缘形成稳定的引导缘,丝状伪足的数量明显多于诱导细胞(图3)。这表明,内质网非折叠蛋白质应答可以抑制细胞引导缘及丝状伪足的形成。

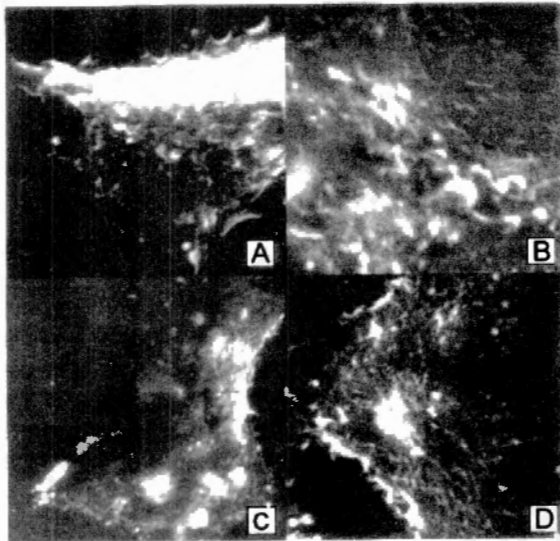


图3 扫描电镜观察细胞边缘突起

可见未诱导细胞边缘伸出突起(A, 2000 \times),引导缘表面丝状伪足丰富(B, 4000 \times);而诱导细胞边缘光滑(C, 2000 \times),引导缘丝状伪足的数量明显少于未诱导细胞(D, 4000 \times)。

6. RhoA 及 Grp78 在 293A 细胞中的表达

Western blotting 结果显示在诱导细胞中 RhoA 的表达水平低于未诱导细胞,而 Grp78 的表达水平明显高于正常细胞(图4)。这表明,内质网非折叠蛋白质应答被成功诱导,同时表明非折叠蛋白质应

答可以下调 RhoA 的表达。

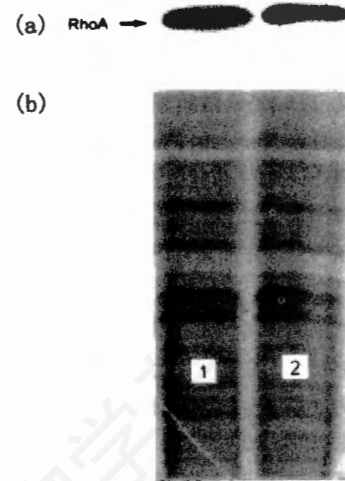


图4 Western blotting 检测细胞中 RhoA 的表达水平

(a) Western blotting 显示在未诱导细胞中 RhoA 的表达水平高于诱导细胞。(b) ECL 显色前的 PVDF 膜用丽春红 S 进行染色作为对照。1 为未诱导细胞,2 为诱导细胞。

讨 论

内质网是一种重要的细胞器,内质网在细胞中与微管伴行,其结构与功能与微管密切相关。微管结构的改变可以导致内质网结构与功能的改变^[5]。内质网非折叠蛋白质应答时内质网的功能发生适应性改变,内质网功能的这种适应性改变是否会引起微管结构与功能的改变从而影响细胞的迁移特性却未见报道。

为了研究非折叠蛋白质应答是否会通过影响细胞骨架、细胞的黏附特性以及信号分子的表达从而影响细胞的迁移,我们应用内质网糖苷化特异性抑制剂衣霉素处理细胞以建立非折叠蛋白质应答的模型,并对内质网分子伴侣 Grp78 的表达进行检测以确定非折叠蛋白质应答是否诱导成功。结果表明,在诱导细胞中 Grp78 的表达水平明显高于未诱导细胞(资料未示)。应用该模型,我们引用划痕法对非折叠蛋白质应答状态下 293A 细胞的迁移特性进行检测,结果表明在非折叠蛋白质应答状态下,创口愈合速度与正常细胞相比明显减慢,这表明非折叠蛋白质应答对细胞迁移具有抑制作用。

细胞迁移是细胞的一种重要生物学特性,在真核生物的器官发生过程中具有重要意义。研究表明,细胞迁移受细胞内外多种因素的调节,是严格受

控的过程。微丝和微管在细胞迁移中具有重要作用,它们不仅对细胞迁移具有直接的调节作用,而且是细胞内外细胞迁移调节信号的效应器官。在细胞迁移过程中,肌动蛋白为细胞迁移提供动力,并参与细胞与基质间黏附的形成;而微管结构与分布与细胞的迁移特性也密切相关,在细胞迁移过程中,营养成分、细胞器和细胞核沿微管形成轨道以向引导缘迁移,供给引导缘所必需的营养成分并稳定引导缘;微管与 RhoA 协同作用还可以确定细胞的迁移方向^[6]。

我们对细胞骨架的观察表明在非折叠蛋白质应答状态下,细胞骨架发生重排。在正常细胞中,微丝分布于细胞边缘,细胞伸出细长的伪足,而在诱导细胞中,细胞向各个方向伸出短而小的伪足,微丝集中于细胞体,大多数细胞难以形成稳定的引导缘^[6]。应用扫描电镜对细胞边缘的观察发现诱导细胞边缘较为平滑,伪足的数量少于正常细胞,这表明非折叠蛋白质应答可以抑制细胞边缘伪足的形成。对微管的观察发现处于非折叠蛋白质应答状态的细胞中微管解聚,排列紊乱。这样在细胞迁移过程中,微管可能无法形成延伸至伪足的轨道,从而导致营养成分、细胞器和细胞核的迁移减慢或停止,使细胞无法形成稳定的引导缘。这些表明非折叠蛋白质应答可以引起细胞骨架的重排,抑制细胞迁移。

细胞的黏附特性在细胞迁移中也具有重要的作用。在细胞迁移过程中,细胞首先向多个方向伸出伪足,与基质形成粘着斑,并在伪足中形成微丝束,细胞黏附能力的减低将抑制细胞的迁移^[7]。我们对处于非折叠蛋白质应答状态下的细胞的黏附能力进行研究,结果表明在不同的时间点,诱导细胞的黏附指数明显低于正常细胞,这表明非折叠蛋白质应答可以减低细胞与底物形成黏附的能力,从而抑制细胞的迁移。

RhoA 是一种小分子 GTPase,参与调节细胞体的收缩和细胞与基质黏附的形成^[8]。我们应用 Western blotting 对处于非折叠蛋白质应答状态的细胞中 RhoA 的表达水平进行检测,结果表明 RhoA 的表达水平低于正常细胞,RhoA 表达水平的减低可能会导致在细胞迁移过程中,细胞与基质形成黏附的能力减弱同时发生细胞体的收缩障碍,使细胞核、细胞器等成分向引导缘的转位发生障碍,抑制细胞的迁移。

以上体外实验的结果显示非折叠蛋白质应答对细胞迁移具有抑制作用,结合近年来的研究成果,我们认为非折叠蛋白应答在真核细胞器官发生过程中可能通过抑制细胞迁移发挥一定的调节作用。在器官发生过程中,各种前体细胞由生发中心出发沿一定的路径向目的地迁移,迁移中的细胞处于不断的分化状态中,内质网不断合成各种功能蛋白质以指导细胞的分化和迁移,部分细胞中可由于大量未折叠和错误折叠的蛋白质堆积,使细胞处于应激状态,这时细胞启动非折叠蛋白质应答^[9]。对应激细胞的功能进行修复,生物学特性恢复正常的细胞将重新进入细胞迁移流,参与器官发生;而生物学特性无法恢复的细胞,将通过特定的机制启动细胞凋亡途径而使应激细胞发生凋亡^[1,10]。通过这种机制,真核生物可以确保新生器官的质量。至于非折叠蛋白质应答在器官发生过程中的具体作用,仍需进一步探讨。

图版说明

(图版见本期封面)

非折叠蛋白质应答可以引起微管的重排

A 为未诱导细胞,微管均匀分布,形成伸入引导缘的轨道;B 为诱导细胞,微管解聚,排列紊乱(200×)。

非折叠蛋白质应答可以引起微丝的重排

C 为未诱导细胞,边缘均匀着色,胞体着色较浅或不着色;D 为诱导细胞,边缘不着色或着色较浅,细胞体深染(200×)。

参 考 文 献

- [1] Randal J. Kaufman. 2002, *The Journal of Clinical Investigation*, **110**: 1389 - 1398.
- [2] Massimiliano Pagani, Marco Fabbri, Cristina Benedetti, et al., 2000, *The journal of biological chemistry*, **275**: 23685 - 23692.
- [3] Goodman, S. L, Vollmers, H. P, Birchmeier, W. 1985, *Cell*, **41**: 1029 - 1038.
- [4] Qinghui Men, Bin Gao, Itzhak D, et al., 2000, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **273**: 448 - 453.
- [5] Song jindan. 1987, *Recent development of electron micrograph* pp. 249 - 251.
- [6] Pawlak G and Helfman, 2001, *Curr. Opin. Genet. Dev*, **11**: 41 - 47.
- [7] Maria D. Martin-Bermudo, Ines Alvarez-Garcia and Nicholas H. Brown, et al., 1999, *Development*, **126**: 5161 - 5169.
- [8] Anne J. Ridley. 2001, *Journal of Cell Science*, **114**: 2713 - 2720.
- [9] 尚德淑、陈誉华、宋今丹, 2003, *解剖学报*, **34**: 162 - 167.
- [10] Urano, F. et al., *Science*, **287**: 664 - 666.

THE EFFECTS OF THE UNFOLDED PROTEIN RESPONSE (UPR) ON CELL MIGRATION IN ORGANOGENESIS IN VITRO

SU Rong Jian CHEN Yu Hua SONG Jin Dan*

(Department of Developmental Biology, Key Laboratory of Cell Biology,
Ministry of Public Health of China, China Medical University, Shenyang 110001 China)

ABSTRACT To investigate the influence of the unfolded protein response (UPR) on cell migration in organogenesis, we induced UPR with tunicamycin and observed the effects in vitro of UPR on the migration behaviors of human embryonic kidney cell line-293A. In the study, we examined some behaviors related to cell migration including cell adhesion, the distribution of microtubule and actin cytoskeleton, the filopodium on the leading edge and the expression level of small GTPase RhoA using scratch wound assay, cell adhesion assay, fluorescent staining, scanning electron microscopy and Western blotting respectively. The results have shown that UPR could inhibit cell migration by weakening cell adhesion to the substrate, causing the rearrangement of microtubule and actin cytoskeleton, inhibiting filopodium formation on the leading edge and decreasing the expression level of RhoA. We infer that UPR could win more time for the stressed cells for repairing their functions in the process of migration to their destination in organogenesis.

Key words: Cell migration the unfolded protein response Organogenesis

* Corresponding author. E-mail: jdsong@mail.cmu.edu.cn

SM22 α 对血管平滑肌细胞骨架及收缩功能的影响*

程云会 韩梅** 温进坤

(河北医科大学基础医学研究所 河北省医学生物技术重点实验室 石家庄 050017)

摘要 SM22 α (smooth muscle 22 alpha, SM22 α)是血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)的标志蛋白,为了探讨该蛋白与VSMC表型和功能的关系,利用血清饥饿法诱导VSMC由合成型向收缩型转变,用RT-PCR对不同表型VSMC的SM22 α 表达活性进行检测,并通过转染反义SM22 α 表达载体,观察SM22 α 表达对VSMC细胞骨架和收缩功能的影响。结果显示,在VSMC由合成型逆转为收缩型的过程中,SM22 α 和平滑肌 α -肌动蛋白(smooth muscle α -actin, SM α -actin)的表达分别被显著诱导和轻度上调,与此同时,细胞骨架由稀疏的网格状变成均匀、致密的束状,VSMC重新获得收缩功能。用反义SM22 α 抑制该基因表达后,血清饥饿诱导的VSMC细胞骨架重构受阻,乙酰胆碱刺激引发的细胞收缩消失。结果提示,SM22 α 参与VSMC细胞骨架的构成及调节细胞的收缩功能,对维持VSMC处于收缩表型具有重要作用。

关键词: 血管平滑肌细胞 平滑肌 22 α 细胞骨架 收缩

血管平滑肌细胞(VSMC)是一种非终末分化细胞,其表型具有多样性和可塑性。近年,我们及国外其他实验室对VSMC从收缩型向合成型转变的调控机制进行了一系列研究,发现以往被认为是收缩型VSMC标志基因的平滑肌 α -肌动蛋白(SM α -actin)、平滑肌肌球蛋白重链(SM-MHC)和calponin等在合成型VSMC中虽略有下调,但仍有大量表

达^[1],这与合成型VSMC丧失收缩功能的特征性改变不相吻合^[2]。SM22 α 也是收缩型VSMC的标志基因,与其他标志基因不同的是,SM22 α 仅在收缩

本文2003年6月16日受到,9月5日接受。

*基金项目:国家自然科学基金(30270499)和河北省自然科学基金(303454)资助课题

**通讯作者。E-mail: WJK@hebm. edu. cn