

成年 SHR 动脉平滑肌细胞端粒酶活性和周期蛋白 D₁ 的研究*

杨善民

(厦门大学生命科学学院、抗癌研究中心 厦门 361005)

高血压病是我国最常见的心血管疾病。近年来,高血压病的流行呈上升趋势,它引起心、肾功能衰竭和脑卒中,也是冠心病发生的主要危险因素之一。自发性高血压大鼠(SHR)是一种中风倾向可遗传的大鼠。SHR在4周龄时血压急骤上升,到第9周成年SHR大鼠血压可超过150mmHg,呈高血压状态,最高达170mmHg以上^[1]。高血压引起SHR大动脉中层平滑肌细胞(SMC)肥大、多倍体化,可伴有增生;高血压亦引起小动脉(150—300 μ m)中层SMC增生,这两种病理改变都伴有SMC的DNA复制过程^[2]。已知道,由于存在DNA复制的不完全性,细胞每次分裂—DNA复制,染色体端粒就会缩短50—150bp,增殖分裂的母细胞靠端粒酶活化来延伸端粒丢失的部分^[3]。成年(10周龄)SHR大动脉中层SMC的肥大、多倍体化和/或增生是否也有端粒酶激活目前尚未见报道。我们发现成年SHR胸、腹主动脉组织及其分离的SMC有端粒酶的激活,并伴有DNA合成的增加,现报道如下。

材料与方 法

1. 动物

雄性、10周龄的SHR和WKY大鼠来自美国Massachusetts Wilmington Charles River动物中心。每组动物各5只。所有动物独立圈养,恒温(23—25 $^{\circ}$ C)恒湿(60%),光照周期为12hr/日。大鼠血压测定采用鼠尾箍套血压测定仪测定。动物实验遵照加拿大多伦多大学医学院实验动物管理条例进行。

2. 细胞

HeLa细胞来自America Type and Culture Collection。细胞在20%胎牛血清DMEM培养液中置37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱内培养。细胞传代时用1%胰蛋白酶和1mmol/L EDTA(Difco公司),收获附壁细胞。

3. 药品

胎牛血清、DMEM培养液(Gibco公司),青霉素、链霉素(Gibco公司),胶原酶(华盛顿Biochemicals公司),胰蛋白酶(Difco公司),N-双(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-(乙磺酸)(HEPES)、 β 巯基乙醇、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、二巯基苏糖醇(DTT)、3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-fonate(CHAPS)乙二醇-双(2-氨基乙基)四乙酸(EGTA)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、焦碳酸二乙酯(DEPC)和扩增石蜡小丸(Ampliwax Sigma公司),聚丙烯酰胺、亚甲叉聚丙烯酰胺、耐热DNA多聚酶(Taq)、T4g32蛋白、RNA酶和蛋白酶K(Boehringer Mannheim公司),微量蛋白检测试剂盒(Bio-Rad公司), α -³²P dATP(ICN Biomedical Canada公司),Trizol RNA提取试剂盒(Life Technologies公司),³H-TdR(DuPont公司)等。

4. 方法

(1)端粒酶活性检测 将解剖分离胸、腹主动脉组织块和动脉分离培养的SMC依文献[4]端粒酶提取方法进行。端粒酶提取液依微量蛋白检测试剂盒说明书进行检测。50 μ l TRAP PCR反应体系中模板含

本文1998年9月15日收到,1999年7月5日接受。

*本文在加拿大多伦多大学医学院心脏基因研究室进修完成,受教育部细胞生物学和肿瘤细胞工程重点实验室开放研究经费部分资助。

衷心感谢 Dr. Choong-Chin Liew, Dr. Adolfo Borges 和曾定教授对本工作的支持和帮助。

6 μ g 的蛋白。各管分别加入 0.1 μ g CX 和一粒扩增石蜡小丸,加热至 70 $^{\circ}$ C 2min,冷却后分别加入 5 μ l 10 \times TRAP,5 μ l 500 μ mol/L dNTP,0.1 μ g TS,1 μ g T4g32 蛋白,0.4 μ l α - 32 P dATP,2uTaq 酶和相应容积的水,混匀后置于 25 $^{\circ}$ C 水浴中反转录 30min。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 2min,1 循环;94 $^{\circ}$ C 30sec,50 $^{\circ}$ C 30sec,72 $^{\circ}$ C 90sec,30 循环;72 $^{\circ}$ C 3min 1 循环;4 $^{\circ}$ C 储存。扩增后产物经非变性、10%聚丙烯酰胺凝胶电泳(180V/4 小时),凝胶固定后覆盖保鲜膜和 Kodak X 光底片。经 12-16 小时放射自显影,显影、定影和影象分析。实验重复 3 次。

(2) 动脉 SMC 分离和培养 参照文献[5]方法稍作改进,简述如下。将 10 周龄 SHR、WKY 大鼠吸入过量 CO₂ 处死,在无菌操作下分离胸、腹主动脉段,朝动脉腔内灌入 0.1% (W/V) 胶原酶和 0.2% (W/V) 胰蛋白酶,30min 后用 20% 胎牛血清、DMEM 培养液终止反应。冲刷掉动脉管内的内皮细胞,剥离剩下动脉中层继续用 0.1% 胶原酶处理 1hr,将分离下的细胞在 20% 胎牛血清、DMEM 培养液洗两次,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内培养,每 3-4 天换培养液一次。实验重复 2 次。

(3) 动脉 SMC³H-TdR 掺入率检测 将培养 3 天的 SMC (腹主动脉段分离) 加入 ³H-TdR (0.5 μ ci/ml),每两天换培养液一次。继续培养 SMC 至 80% 汇合时,加入 0.25% 胰蛋白酶消化、收集细胞。细胞计数以 3 \times 10⁴/孔接种于 96 孔板上,每组 4 个孔。向每孔细胞加入等量冷的、10% 三氯乙酸,将液体转移到玻璃纤维膜上 (Brandel Inc),然后在液体闪烁计数仪 (Beckman DLS 500TD) 计数。实验重复 2 次。

(4) SMC 细胞周期蛋白 D₁ RT-PCR 依 Trizol RNA 提取试剂盒说明书提取 SHR 和 WKY 腹主动脉段 RNA。简述如下:取 100mg 腹主动脉组织,加入 1ml Trizol 提取液,匀浆 2min,加入 0.1ml 氯仿,充分混匀 15sec,置室温 2-3min 15000rpm 离心 15min 4 $^{\circ}$ C。取上清,加入冷异丙醇 0.5ml,室温 10min,15000rpm 离心 15min,去上清。沉淀用 75% 冷乙醇洗二次,用 DEPC 液溶解沉淀。样品 RNA 浓度用紫外分光光度计检测,稀释成 0.5 μ g/ μ l 于 1% 琼脂糖、甲醛凝胶内电泳。采用 Boehringer RT-PCR 试剂盒进行 RT-PCR,细胞周期蛋白 D₁ RT-PCR 引物 F 设计为 5'-ACCTGGATGCTGGAGGTCT-3', 引物 R 5'-GAACTTCATCTGTGGCAC-3',反应条件稍作改良。RT-PCR 反应体系为 50 μ l,加入模板 3 μ l,5 \times 酶缓冲液 10 μ l,DEPC 液 24 μ l,dNTP (1mmol/ μ l),Tth 酶 2 μ l,含锰离子的

缓冲液 5 μ l,5% DMSO,混匀后体外逆转录 60 $^{\circ}$ C 30min。将反应产物 90 $^{\circ}$ C 90sec 处理后置于 Gene Amp 2400 (PE 公司) 扩增仪上扩增。反应条件:94 $^{\circ}$ C 30sec,55 $^{\circ}$ C 1min,60 $^{\circ}$ C 5min 40 循环,72 $^{\circ}$ C 3min 4 $^{\circ}$ C 储存,RT-PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳,100V 10min。

结果和讨论

1. 出生后 4 周的 SHR 与其同源、同龄的 WKY 大鼠尾动脉血压相近,在 110-120mmHg 上下^[6,7]。10 周龄 SHR 尾动脉血压高达 159.9 \pm 5.4mmHg,而 WKY 大鼠尾动脉血压为 119.2 \pm 4.3mmHg。成年大鼠血压超过 150mmHg 为高血压状态^[1]。我们在成年 10 周龄 SHR 胸、腹动脉组织都检测到端粒酶活性,以腹主动脉远端为最高,而 WKY 者为阴性(图 1),提示 SHR 各动脉组织端粒酶的再激活存在种属的特异性,而不存在解剖位置的差异,提示端粒酶可能与 SHR 的高血压状态有关。

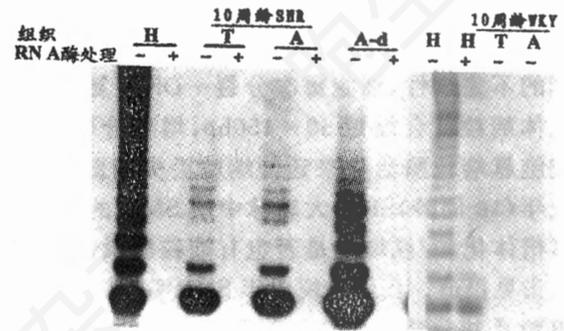


图 1 10 周龄 SHR 和 WKY 大鼠胸、腹主动脉端粒酶活性
H: HeLa 细胞, T: 胸主动脉, A: 腹主动脉, A-d: 腹主动脉远端。

2. 从成年 SHR 胸、腹主动脉段分离的 SMC 生长较快,倒置显微镜下 SMC 呈典型卵丘状生长,培养的 SMC 经抗平滑肌 α -actin 抗体荧光染色显示阳性(资料未显示)。从成年 SHR 腹主动脉段分离的 SMC³H-TdR 放射性计数率 (CPM) 为 2430 \pm 192,明显高于 WKY 的 CPM 1690 \pm 99,DNA 合成率约提高了 43%

(图 2)。成年 SHR 胸、腹主动脉段分离的 SMC 端粒酶显示 6 个碱基间隔的电泳梯带为阳性, 而 WKY 者无梯带出现为阴性(图 3)。Owens 先前的研究^[2]表明, SHR 胸主动脉等大动脉中层 SMC 增厚, 其中的 SMC 以细胞肥大和多倍体化为主, 可伴有增生。Schwartz 等^[8]认为: 在动脉粥样硬化病变早期内膜增生的 SMC 可能来自于干细胞样的幼稚 SMC。后来他们^[9]总结他人和自己的研究结果认为: 动脉的 SMC 为异质性群体细胞, SHR 动脉中部分 SMC 对高血压等病变的反应是去分化后增生; 而另一部分则不增生, 保持原有 SMC 表型。这些结果表明: SHR 大动脉分离、培养具端粒酶活性的

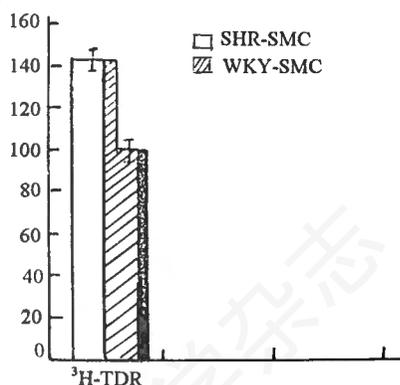


图 2 SHR 和 WKY 的 SMC 掺入³H-TdR 柱形图

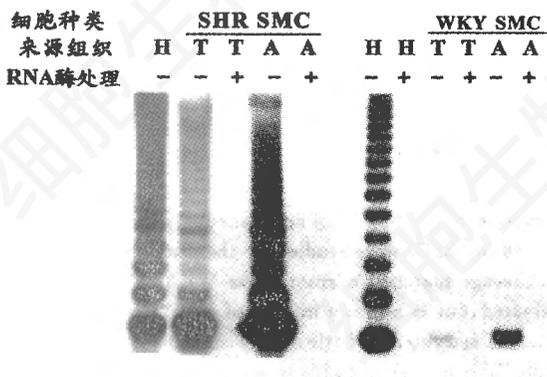


图 3 成年 SHR、WKY 大鼠主动脉 SMC 端粒酶活性

H: HeLa 细胞, T: 胸主动脉, A: 腹主动脉。

SMC 至少与自身动脉组织内 SMC 直接相关, 它是动脉中层内反应性增生、幼稚的 SMC 端粒酶活化还是肥大、多倍体化的 SMC 伴有端粒酶活性有待进一步研究。

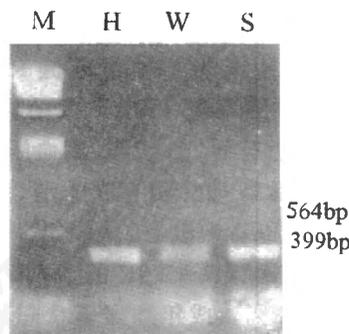


图 4 SHR 和 WKY 大鼠腹主动脉段 SMC 的细胞周期蛋白 D1 基因 RT-PCR 电泳图谱

M: λ DNA Hind III H: HeLa 细胞
W: WKY 大鼠 S: SHR

3. 成年 SHR 和 WKY 大鼠腹主动脉段 SMC 分离的 RNA 经 RT-PCR 扩增后 SHR 腹主动脉段 SMC 显示略浓染的 DNA 扩增带(图 4)。Weber 研究^[10]表明: 血管紧张素 I (Ang I) 使 SHR 动脉的 SMC 表达内源性的生长因子, 刺激 SMC 增生。Watanabe^[11]等发现 Ang I 诱导人肾上腺细胞 c-Fos 和 c-Jun 基因表达, 其产物结合于细胞周期蛋白 D₁ 起动子而促进细胞周期蛋白 D₁ 表达的增高。研究表明: Ang I 亦诱导 SHR 动脉血管 SMC 的 c-Fos 和 c-Jun 基因表达^[12,13]。Soonpaa 等^[14]证明: 转基因小鼠心肌细胞周期蛋白 D₁ 的过度表达促进心肌细胞 DNA 合成和细胞多倍体化。Bukenburg 等^[15]发现 SHR 动脉 SMC 的 Ang I 受体密度比 WKY 者高。SHR 动脉 SMC 受到 Ang I 过度刺激, 引起 SMC 细胞肥大和/或增生, 其是否与端粒酶的再激活以维持细胞 DNA 复制所引起端粒的缩短有关有待进一步研究。本研究初步提示: 在高血压状态下的成年 SHR 和 WKY 大鼠腹主动脉段 SMC 细胞周期蛋白 D₁ 基因的 RT-PCR 产物溴乙烷染色略有区别, 但

相差不明显,其区别有待进一步做细胞周期蛋白 D₁ RNA 表达的定量检测。

摘 要

为探索自发性高血压大鼠动脉平滑肌细胞(SMC)增生的机理,采用³H-TdR 标记、端粒酶活性以及细胞周期蛋白 D₁ 基因 RT-PCR 检测分别对 10 周龄 SHR、WKY 大动脉及其体外分离的 SMC 进行研究。成年、高血压状态的 SHR 胸、腹主动脉段端粒酶有高的活性,而同龄、同源 WKY 大鼠者则没有。从成年 SHR 腹主动脉段分离的 SMC ³H-TdR 的掺入率比 WKY 者约提高了 43%。成年高血压状态下的 SHR 腹主动脉 SMC 细胞周期蛋白 D₁ 基因的 RT-PCR 的产物与 WKY 者相差不明显。

关键词:SHR 动脉平滑肌细胞 端粒酶
细胞周期蛋白 D₁ RT-PCR

参 考 文 献

- [1] Black M. J., et al., 1989, *J Hypertens*, 7: 997-1003.
[2] Owens G. K., 1989, *Am J Physiol*, H 1755

-1765.

- [3] Counter C. W., 1996, *Annu Rev. Biochem*, 65, 337-365.
[4] Kim N. W., et al., 1994, *Science*, 266: 2011-2015.
[5] Black M. J., et al., 1988, *Blood Vessels*, 25: 89-100.
[6] Dickhout J. G., Lee R. M. K. W., 1997, *Hypertens*, 29: 781-789.
[7] Uyehara C. F. T., Gellai M., 1993, *Am J Physiol*, 265: R943-950.
[8] Schwartz S. M., et al., 1985, *Ann NY Acad Sci*, 454: 292-304.
[9] Schwartz S. M., et al., 1990, *Physiol Rev*, 70: 1177-1209.
[10] Weber H., et al., 1994, *J Clin Invest*, 93: 788-798.
[11] Watanabe G., et al. 1996, *J Biol Chem*, 271: 22570-22577.
[12] Taubman M. B., et al. 1989, *J Biol Chem*, 264: 526-530.
[13] Naftilan A. J., et al., 1990, *Mol Cell Biol*, 10: 5536-5540.
[14] Soonpaa M. H., et al., 1997, *J Clin Invest*, 99: 2644-2654.
[15] Bukenburg B., et al., 1992, *Hypertens*, 20: 746-754.

TELOMERASE ACTIVITY AND CYCLIN D₁ OF SMOOTH MUSCLE CELLS FROM AORTAE IN THE ADULT SHR

YANG Shan Min

(Cancer Research Center, Xiamen University, Xiamen, China 361005)

ABSTRACT

To understand the mechanism of proliferation of smooth muscle cells (SMC) in spontaneously hypertensive rat (SHR), the aortae and the SMC separated from aortae in ten week old SHR were studied by the assay of telomerase, incorporation of ³H-TdR and cyclin D₁ RT-PCR, in contrast to the age-matched normotensive WKY. The telomerase activity of thoracic and abdominal aortae in adult SHR is reactivated, but is not any in that of WKY. Smooth muscle cells isolated from the aortae in the adult SHR expressed telomerase activity, but little, if any, in that of WKY. In vitro, incorporation of ³H-TdR in SMC from the abdominal in adult SHR is higher (43%) than that of WKY. The gene product of Cyclin D₁ amplified by RT-PCR from the SMC of hypertensive SHR abdominal aorta is no particular difference from that of WKY.

Key words: SHR Aortal smooth muscle cells Telomerase Cyclin D₁ RT-PCR

Acknowledgement The author would be very glad to thank Dr. Choong-Chin Liew, Dr. Adolfo Borges and Prof. Zeng Ding for their support and help. This work is supported in part by the Medical Research Council of Canada and by the opening research grant of The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University.

人类主要 Cyclins 在 MOLT-4 细胞 阻断动力学下的表达规律*

龚建平** 陈义发 舒丹 陶德定

(同济医科大学附属同济医院分子医学中心 武汉 430030)

细胞周期素(Cyclins)是细胞周期素依赖性蛋白激酶(Cyclin-Dependent-Kinases, CDKs)的调控亚单位,顺序激活的CDKs驱动着细胞依次通过细胞周期各时相(即G₁, S, G₂和M期)。尽管CDKs的最后激活与否,还受到CDKs抑制剂(CDK Inhibitors, CKIs)和Cdc25/Weel两个系统的调控,Cyclins的细胞周期时相性起伏(即:细胞周期特异性的Cyclins合成与降解)仍是CDKs顺序激活的基本前提^[1]。因此,Cyclins蛋白水平的表达分析,显得特别重要。

长期以来,人们分析基因的蛋白质水平表达依赖于经典的免疫印迹方法(Immunoblotting或Western Blots),尽管生命科学领域里许多重要的数据大多来自这类经典的方法学,也为现代生物学的进步做出过许多重要的贡献,但对于细胞周期特异性的基因蛋白质水平表达分析,仍暴露出其明显的局限性^[2]。基于免疫细胞化学和DNA含量分析的多参数流式细胞术分析,为这种特殊类型的基因表达分析提供可行性^[3]。本研究拟以T淋巴细胞白血病细胞MOLT-4为对象,在阻断动力学(Stathmokinesis,又称有丝分裂中期阻滞法Metaphase-arrest Technique)状态下,应用Cyclins/DNA双参数流式细胞术,阐明人类主要Cyclins在非同步化培养细胞的细胞周期特异性表达规律和该技术分析蛋白质水平基因表达的可行性。

材料与 方法

一、材料

细胞:MOLT-4细胞(美国,Dr. Darzynkiewicz惠赠)置入含有10%胎牛血清、抗生素(100u/ml的青霉素和100μg/ml的链霉素)和2mmol/L谷胺酰氨的RPMI 1640培养液中悬浮培养。细胞培养中所用培养液、胎牛血清等购自GIBCO公司。为保持细胞的非同步化生长,或处于对数生长期,培养密度保持在大约4×10⁵细胞/ml,进行细胞传代。实验中所用长春花碱(Vinblastine)购自Sigma公司,以100μg/ml溶于二甲亚砜(DMSO),储藏于-20℃备用。实验终浓度为0.05μg/ml,处理后0、3、6、9小时,收获细胞。

二、方法

1. DNA含量分析:培养细胞收获后(约2×10⁶细胞),用80%冷乙醇固定,置于-20℃冰箱过夜。固定后细胞,用PBS洗涤二次,随后温育于PC缓冲液40μl中^[12],约30min。再次洗涤细胞后,用10μg/ml PI和0.1% Rnase A(Sigma公司),在室温下进行DNA染色20min,待流式细胞术分析。

2. Cyclins/DNA双参数分析:培养细胞收获后(约2×10⁶细胞),用80%冷乙醇固定,置于-20℃冰箱过夜。固定后细胞,用PBS洗涤二次,然后用PBS稀释的0.25% Triton X-100在冰上处理5min。5min Triton X-100处理后,加以PBS 5ml,离心,洗涤二次,然后

本文1998年11月17日收到,1999年7月8日接受。

* 本研究受国家自然科学基金(39670365、39730270、39725027)和卫生部科研基金(202-01-06)资助。 **项目负责人。