

大鼠组织中三磷酸肌醇受体亚型基因的表达

刘乃丰 董莉 何家声

(南京铁道医学院附属医院心血管内科, 南京 210009)

关键词 三磷酸肌醇: 受体: 基因表达: 信号转导: 肌. 平滑: 逆转录: 聚合酶链式反应: 大鼠

摘要 为观察大鼠心肌、小脑和培养的主动脉血管平滑肌细胞中三磷酸肌醇受体亚型的基因表达, 用异硫氰酸胍- 酸酚氯仿一步法抽提组织总 RNA, 用特异性引物进行逆转录- 聚合酶链式反应, β - actin 为内标半定量检测三磷酸肌醇受体亚型 mRNA 的表达。将 II 型 PCR 产物重组、克隆并测序。发现三磷酸肌醇受体三个亚型在心肌、小脑和平滑肌细胞中均有表达, 小脑组织中表达水平较高。PCR 扩增片段分别为: iv 型三磷酸肌醇受体 525 bp (小脑) 或 405 bp (心肌和平滑肌细胞); ③三磷酸肌醇受体 405 bp; ④型三磷酸肌醇受体 169 bp。序列分析发现克隆的 ③三磷酸肌醇受体 cDNA 序列与设计的目的 cDNA 一致, 提示建立的逆转录- 聚合酶链式反应方法能可靠地研究动物组织中三磷酸肌醇受体不同亚型的基因表达。

Expression of Inositol Trisphosphate Receptor Subtypes mRNA in Rat Brain, Myocardium and Cultured Vascular Smooth Muscle Cells

LIU Nai- Feng, DONG Li and HE Jia- Sheng

(Division of Cardiology, the Affiliated Hospital, Nanjing Railway Medical College, Nanjing 210009, China)

MeSH Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate; Receptors; Gene Expression; Signal Transduction; Muscle, Smooth; Revers Transcriptase; Polymers Chain Reaction; Mice

ABSTRACT **Aim** To establish a RT- PCR method for detecting expression of mRNA for inositol trisphosphate receptor (IP₃R) and to investigate expression of IP₃R subtypes in rat brain, myocardium and cultured vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** Total RNA was isolated from different tissue of rat and was reversibly transcribed into cDNA. RT- PCR was performed with β - actin as internal label. Three oligonucleotide primers for each subtype of IP₃R were employed to amplify predicted DNA. **Results** It was found that all subtypes of IP₃R were expressed in cultured SMC. DNA sequencing indicated that amplified products of IP₃R ③ subtype was identical to reported sequence from gene bank. **Conclusion** Our results suggested that RT- PCR established by us can be used as a reliable method for investigating expression of mRNA for IP₃R subtypes.

细胞的肌醇磷脂途径是近年来发现的有别于腺苷酸环化酶- cAMP- 蛋白激酶系统的另一重要信号转导途径^[1]。当激活剂与细胞膜上特异性 G 蛋白偶联受体和酪氨酸激酶受体结合后^[2], 诱导磷脂酰肌醇- 4, 5- 磷酸 (PI_{4, 5}P₂) 被相关的磷脂酶 C 水解, 产生二酰基甘油 (DG) 和三磷酸肌醇 (inositol trisphosphate, IP₃)。IP₃ 可与三磷酸肌醇受体 (IP₃ receptor, IP₃R) 特异性结合, 促使钙池内的 Ca²⁺ 释放入胞浆中, 而胞浆游离钙 [Ca²⁺]_i 的变化是钙离子跨膜转运和细胞内钙库释放、回摄取钙等过程动态平衡的结果, 组成了复杂的钙信号时空转导形式^[3], 控制着细胞的许多生理、病理过程。本文研究 IP₃R 及其亚型基因在大鼠组织中的表达。

1 材料和方法

1.1 材料

Sprague- Dawley (SD) 大鼠由本校实验动物中心提供。从 1 个月龄的幼鼠 (体重 100~ 150 g) 取材进行细胞原代培养, 成熟大鼠 (体重 250~ 300 g) 用于基因表达实验。小牛血清为杭州四季青生物工程材料研究所产品。低糖培养基 (dulbecco modified eagle's medium, DMEM) 为 GIBCO 产品。牛血清白蛋白, 组分 VI, B. M 产品。AMV 逆转录酶 (10 × 10⁶ u/L)、5 × AMV 逆转录缓冲液、Taq DNA 聚合酶 (5 × 10⁶ u/L) 和 10 × Taq 聚合酶缓冲液均为 Promega 产品。dNTPs (Pharmacia 产品) 含 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 各 10 mmol/L。Rnasin (SABC 产品) 40 × 10⁶ u/L。随机引物 (Random primer) 为上海生物工程公司产品, 6 mer OligoDNA, 0.1 g/L。α- ³²PdCTP 为北京亚辉生物医学工程公司产品, 3.0 × 10⁶ Ci/mol。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的制备 SD 大鼠心肌、小脑及培养的平滑肌细胞用异硫氰酸胍- 酸酚氯仿一步法提取 RNA。RNA 在室温空气中干燥 10~ 15 min 后, 溶于 0.1% DEPC 水中, - 70℃冻存。读 A_{260}/A_{280} 比值, 计算总 RNA 浓度。

1.2.2 逆转录 以 2 μ g 总 RNA 为模板, 用随机引物逆转录合成 cDNA 第一条链。在反应体系中依次加入 4 μ L 5 \times AMV 逆转录反应缓冲液(250 mmol/L Tris - HCl, pH 8.3, 42℃, 250 mmol/L KCl, 50 mmol/L MgCl₂, 50 mmol/L DTT, 2.5 mmol/L Spermidine), 2 μ L 10 mmol/L dNTPs, 0.2 μ g Random Primer,

20 u RNasin, 10 u AMV 逆转录酶, 2 μ g RNA, 补 0.1% DEPC 水至总体积 20 μ L, 混匀、离心(3 000 rpm, 5 s)。反应混合物于 42℃保温 55 min, 然后升温至 95℃加热 5 min 以终止反应, 立即浸入冰浴冷却, 短暂离心(3 000 rpm, 5 s, 4℃)以恢复体积。

1.2.3 聚合酶链反应引物 三磷酸肌醇受体寡核苷酸引物根据小鼠 IP₃R iv型、大鼠 IP₃R ⑦型和 ④型 cDNA 序列由上海赛尔生物工程公司合成, 各引物在原序列中对应的碱基对位置以及由引物介导扩增的 cDNA 产物长度见表 1 (Table 1)。

表 1. 三磷酸肌醇受体 iv、⑦、④型及 β - actin 聚合酶链反应扩增的寡核苷酸引物

mRNA	序列(5' - 3')	位置(bases)	扩增片段(bp)	退火温度(℃)
IP ₃ R iv型	GGT TTC ATC TGC AAG CTA ATA AAA	5276	525 (405)	56
	AAT GCT TTC ATG GAA TAC TCG GTC	5777		
IP ₃ R ⑦型	GCA GTG GCG ATC TGC AGG TCT ATG	7054	183	57
	TCG GTT TCC CAC AAA ACT CAC CAG	7236		
IP ₃ R ④型	CAC GGA GCT GCC ACA TTT ATG GGC	7845	169	59
	TCC TCA GTC CGT GGT TCA TGA CGG	8014		
β - actin	GGT ATG GGT CAG AAG GAC TCC	138~ 156	844	55
	TGA TCT TCA TGG TGC TAG GAG CC	960~ 981		

在 0.5 mL 聚合酶链反应(polymers chain reaction, PCR) 扩增管中依次加入 5 μ L 10 \times PCR 缓冲液(100 mmol/L Tris- HCl, pH 9.0, 25℃, 500 mmol/L KCl, 0.1% Gelatin, 1% Triton X- 100, 25 mmol/L MgCl₂)、4 μ L 10 mmol/L dNTPs、各 15 pmol IP₃R 上、下游引物、2.5 u Taq DNA 聚合酶和 3 μ L RT 后 cDNA, 补去离子灭菌水至 50 μ L, 混匀, 离心(3 000 rpm, 5 s, 4℃), 上覆 20 μ L 石蜡油, 在热循环扩增仪(DNA Thermal cycler 480) 中进行扩增。参数为: 94℃变性 45 s, 不同适宜退火温度下退火 30 s, 72℃延伸 40 s, 循环 36 次, 终末延伸 72℃ 5 min。根据所用引物的 T_m 值及扩增片段之长短调整退火温度, IP₃R iv型为 56℃, IP₃R ⑦型为 57℃, IP₃R ④型为 59℃。

取 10 μ L PCR 产物经 7% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 用 X- ray 底片 4℃曝光 24 h。在 LKB 激光光密度计上对胶片上的条带进行光积分光密度分析。并切取各条带对应的凝胶, 应用液体闪烁计数器进行测定。以 β - actin 为内标分别计算各 IP₃R 与 β - actin 积分光密度比值和放射性 β 计数比值(cpm),

半定量反映 IP₃R mRNA 的表达水平。

1.2.4 逆转录- 聚合酶链反应产物克隆 取 2.5 μ g 总 RNA 逆转录成 cDNA, 用 IP₃ ⑦型引物行 PCR 扩增。PCR 参数为: 94℃变性 45 s, 57℃退火 30 s, 72℃延伸 40 s, 终末延伸 72℃ 25 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳观察, 结果阳性。用 WizardTM PCR Preps DNA Purification System (Promega) 纯化 100 μ L PCR 产物, 按试剂盒说明书操作。经离子交换树脂(Resin) 柱层析后用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, UV 灯下见 183 bp 的单一一条带。

用 Promega pGEM- T vector Systems kit, 以 T4 连接酶催化 PCR 产物与 pGEM- T vector 连接, 按试剂盒说明书操作。热休克促使重组质粒转化入高感受态 DH 52 细菌体内, 经含 IPTG 和 X- gal 的 LB/ AP 半固体培养基 37℃培养 16 h 后, 分离筛选出两种单个菌落。挑取转化好的白色菌落, 采用涂布 X- gal 和 IPTG 含 AP 的 LB 琼脂平板进行再次阳性筛选。挑选再次长成的白色菌落到 20 μ L 无菌去离子水中, 100℃煮沸 10 min 裂解菌体, 后以 12 000 rpm, 4℃离

心 10 min, 取 4 μ L 上清液为模板, 进行 IP₃R ③型上、下游引物介导的 PCR 扩增并行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 另以已知阳性扩增产物同时电泳作为对照。

1.2.5 重组质粒 DNA 提取 取 PCR 扩增阳性的菌落接种到含氨苄青霉素的 Luria- Bertani 液体培养基, 37℃ 300 rpm 振荡过夜。次日转移至 15 mL 灭菌离心管中, 以 4 000 rpm 4℃ 离心 10 min, 去上清。菌体沉淀用 100 μ L 溶液 iv, 振荡混匀并转入 1.5 mL EP 管中, 冰浴 10 min。加入 200 μ L 溶液 ⑤, 充分混匀, 冰浴 10 min。加入 150 μ L 溶液 ⑥温和振荡 10 s, 冰浴 30 min。12 000 rpm 4℃ 离心 10 min, 沉淀大分子量 RNA, 将上清液转入新的 1.5 mL EP 管中。加入等体积 3 mol/L 乙酸钠, 2 倍体积的无水乙醇, -20℃ 静置 1 h 后, 12 000 rpm 4℃ 离心 10 min, 去上清, 沉淀于空气中干燥 15 min 后再溶于 TE。加入 RNase 混匀后, 50℃ 水浴 1 h。以 Tris 饱和酚/氯仿/异戊醇(25:24:1) 抽提数次, 12 000 rpm, 4℃ 离心 15 min, 取上层水相, 加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc, 2/3 体积预冷于 -20℃ 的无水乙醇, 混匀后冷冻于 -70℃ 1 h, 后以 12 000 rpm 4℃ 离心 10 min, 沉淀用 70% 乙醇漂洗, 干燥后再溶于 60 μ L TE。行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 另以 100 bp Ladder Marker 作为分子量标准。在紫外灯下检测电泳结果并作图象分析。

1.2.6 重组质粒 DNA 测序 将纯化的重组质粒 DNA 真空干燥, 标本送往大连宝生物工程公司, 采用 PE Cetus 公司生产的 ABI PRISMTM 377 DNA 测序仪, 以 T₇ 启动系列引物, Dye terminator Cycle Sequencing Kit with Ampili TaqR DNA Polymerase, FS(PE 公司产品) 进行自动化测序。

2 结果

2.1 三磷酸肌醇受体 mRNA 在正常大鼠小脑、心肌和血管平滑肌细胞中的表达

以来源于大鼠小脑、心肌组织和血管平滑肌细胞的总 RNA 为模板, 分别采用 IP₃R iv型、③型和 ④型寡核苷酸引物, 进行各自的 RT-PCR 扩增, 发现 IP₃R mRNA 在上述三种组织细胞中均有特异性表达, 且每种组织中均表达三种 IP₃R 亚型, 小脑表达水平较高。除小脑 IP₃R ④型外, 各 PCR 产物均与预计的目的 DNA 一致(表 2, Table 2)。

④型 IP₃R mRNA 的 RT-PCR 产物约为 200 bp 大小, 重复实验 3 次, 均得到相同的结果, 在 200 bp 附近出现一明亮的条带, 而在 169 bp 处条带不明显。类似的结果亦出现于人脑 ④型 IP₃R mRNA RT-PCR 结果中。

分别对小脑、心肌和平滑肌细胞的总 RNA 进行 I 型 IP₃R 引物特异性介导的 RT-PCR 扩增, 发现 PCR 扩增产物的大小分别为 525 bp、405 bp 和 405 bp, 与目的 DNA 片段相同, 说明在神经系统和外周组织中分别表达长型和短型两种不同的 iv型 IP₃R。

表 2. 各亚型三磷酸肌醇受体 mRNA 在心、脑和血管平滑肌细胞中的表达

组织细胞类型	扩增片段 (bp)		
	IP ₃ R iv型	IP ₃ R ③	IP ₃ R ④型
小脑	525	183	169
心肌	405	183	169
ASMC	405	183	200

2.2 重组质粒 DNA 的克隆产物

如图 1(Figure 1), PCR 产物重组质粒 DNA 经涂布 X-gal 和 IPTG 的 LB/AP 固体培养基 37℃ 培养后, 分离为两种单个菌落, 白色和蓝色。经二次筛选培养, 挑选白色菌落, 煮沸法提取质粒 DNA, 并进行 ③型 IP₃R 引物特异性介导的 PCR, 以 ③型 IP₃R PCR 阳性产物为标准对 PCR 产物进行电泳分析, 发现产物均为单一 183 bp 条带, 说明转化阳性。

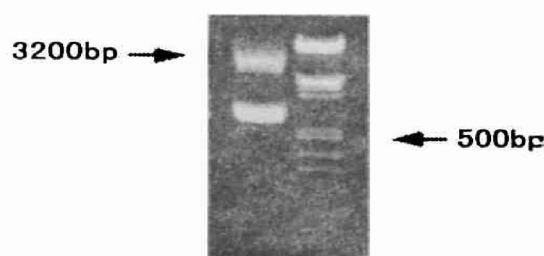


图 1. 来自三磷酸肌醇受体 ③型克隆的 PCR 扩增产物

Figure 1. PCR products of extracted from the clones for types ③ IP₃R. AF: products from the clones, G: standard from defined PCR products of type 2 IP₃R mRNA

2.3 重组质粒的提取结果

如图 2(Figure 2), 重组的质粒经细菌培养、碱裂解法提取以及酚/氯仿抽提乙醇沉淀法纯化后, 行琼脂糖凝胶电泳分析。结果显示提取效果好, 参照分子量标准推测较小的片段为超螺旋 DNA(共价闭合质粒 DNA), 较大的片段为双链缺口 DNA, 大小 3 200 bp 左右, 待测 PCR 产物 cDNA 即存在于此条带中。

2.4 重组质粒 DNA 的测序结果

将所检出的序列与文献报道的 ③型 IP₃R cDNA 序列相比较, 基本一致, 进一步证实 RT-PCR 结果

的正确性。

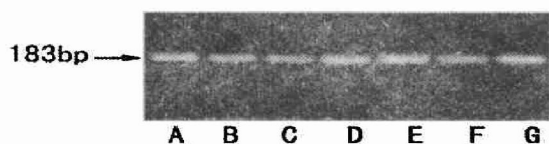


图2. EB染色的重组质粒DNA

Figure 2. Recombinant plasmid DNA of pGEM T vector stained by ethidium bromide

3 讨论

$[Ca^{2+}]_i$ 升高有两大来源: 内贮 Ca^{2+} 释放和胞外 Ca^{2+} 内流, 前者使 $[Ca^{2+}]_i$ 迅速增高到峰值, 后者是维持 $[Ca^{2+}]_i$ 于平台期持续性增高及贮钙池再充盈的重要来源。IP₃ 除动员储存钙外, 还可促进细胞外钙内流, 即所谓的钙池耗竭依赖性 Ca^{2+} 内流。现普遍认为, 跨膜 Ca^{2+} 内流主要是由内贮钙池排空诱发质膜 Ca^{2+} 通道开放而进行的, 这一通道称之为“获得性 Ca^{2+} 通道”(Capacitive Ca^{2+} Channel)。细胞内钙释放形成钙波和钙震荡, 控制细胞许多生理、病理过程。

三磷酸肌醇受体广泛存在于多种组织中, 为同源四聚体, 一个受体通道复合体可以结合 4 个 IP₃ 分子^[4]。该受体由胞浆部分的长 N- 末端、细胞器腔内的短 C- 末端, 以及靠近 C- 末端的一个跨膜片段组成。IP₃R 的分子构型分为三个功能区, 跨膜片段和内质网腔内部通道区, 胞浆内的 IP₃R 结合区, 中间部分为调节区, 包括磷酸化位点和 ATP 结合位点。IP₃ 与特异性位点结合后可引起 Ca^{2+} 通道开放, PKA 磷酸化 IP₃R 可调节 IP₃ 介导的 Ca^{2+} 动员。

本文建立一种灵敏、简捷、特异的半定量 RT-PCR 检测 IP₃R mRNA 的方法。用 α -³²P dCTP 掺入 RT-PCR 扩增, 并对特异性条带进行放射性计数和光密度扫描分析, 可作为进一步比较不同组织中各亚型 mRNA 表达的一种方法。本文的 PCR 产物自动化测序结果与文献报道的目的 DNA 序列一致, 说明本文所建立的 RT-PCR 体系是一种可靠的 IP₃R mRNA 测定方法。

检测小脑、心肌和 VSMC 中 iv 型 IP₃R mRNA 的表达。发现相应扩增片段分别为 525 bp 和 405 bp, 说明在小脑 iv 型 IP₃R mRNA 存在一个由 120 bp 核苷酸序列组成的插入片段。由于 mRNA 转录水平的剪切方式不同, 形成了 S iv 和 S ①两种片段^[5,6]。S ①又

进一步分成 A、B 和 C 3 个亚片段。由此构成了 S ①、S ①B⁻、S ①(BC)⁻ 和 S ①(ABC)⁻。S ①仅存在于成熟神经系统中, SII⁻ 在外周组织中广泛表达。S ①系一个由 120 bp 核苷酸序列组成的插入片段, 位于调节区内两个 cAMP 依赖区的激酶磷酸化等位序列之间, 由此形成 PKA 作用的底物。小脑和肝细胞 iv 型 IP₃R 具有不同的 K_m 值, 且 PKC 磷酸化 IP₃R 后引起两种相反的功能变化, 即抑制 IP₃ 介导的小脑组织钙小体内 Ca^{2+} 动员, 却促进 IP₃ 介导的肝细胞贮钙释放。IP₃R ②型的结果与文献报道不一致, 原因尚不明确, 是否作为一种新的剪切方式有待进一步研究。

三磷酸肌醇受体在心血管系统的表达有重要的病理生理意义^[7], 如心衰时 IP₃R 的表达异常可能是心肌收缩力变化的机制之一^[8]。IP₃R 在神经系统的信号转导过程中也起了关键作用。本文的结果为这一领域的研究提供了有力的基础。

参考文献

- 1 Meszaros LG, Zahradnikova A, Volpe P. Kinetic basis of quantal calcium release from intracellular calcium stores. *Cell Calcium*, 1998, **23**: 43- 52
- 2 Neylon CB, Nickashin A, Tkachuk VA, et al. Heterotrimeric Gi protein is associated with the inositol 1, 4, 5- trisphosphate receptor complex and modulates calcium flux. *Cell Calcium*, 1998, **23** (5): 281- 289
- 3 Miyazaki S. Inositol trisphosphate receptor mediated spatiotemporal calcium signalling. *Curr Opin Cell Biol*, 1995, **7**: 190- 196
- 4 Mignery GA, Newton BT, Archer, et al. Structure and expression of the rat inositol 1, 4, 5- trisphosphate receptor. *J Biol Chem*, 1990, **265**(21): 12 679- 685
- 5 Katusic ZS, Stelter AM. Type I inositol- triphosphate receptor gene is alternatively spliced in human cerebral arteries. *Biochem Biophys Res Comm*, 1995, **214** (3): 803- 809
- 6 Yamada N, Makino Y, Clark RA, et al. Human inositol trisphosphate type- 1 receptor, InsP3R1: structure, function, regulation of expression and chromosomal localization. *Biochem J*, 1994, **302**: 781- 790
- 7 Moschella MC, Marks AR. Inositol 1, 4, 5- trisphosphate receptor expression in cardiac myocytes. *J Cell Biol*, 1993, **120** (5): 1 137- 146
- 8 Go LO, Moschella MC, Watras J, et al. Differential regulation of two types of intracellular calcium release channels during end- stage heart failure. *J Clin Invest*, 1995, **95**: 888- 894
(1999- 04- 27 收到, 1999- 08- 05 修回)
(此文编辑 朱雯霞)