

[文章编号] 1007-3949(2010)18-03-0177-04

• 实验研究 •

蛋白激酶 G α 基因在血性脑脊液致大鼠 脑动脉平滑肌细胞增殖中的作用

罗春霞¹, 易斌², 陈志¹, 唐卫华¹, 冯华¹

(第三军医大学附属西南医院 1. 神经外科; 2. 麻醉科, 重庆市 400038)

[关键词] 脑动脉平滑肌细胞; 蛋白激酶 G; 脑血管痉挛; 蛛网膜下腔出血

[摘要] 目的 观察血性脑脊液对大鼠脑动脉平滑肌细胞蛋白激酶 G α mRNA 及其蛋白表达水平变化与增殖的关系, 探讨蛋白激酶 G α 基因在蛛网膜下腔出血后继发慢性脑血管痉挛分子机制中的调控作用。方法 组织块法原代培养脑动脉平滑肌细胞。采用半定量逆转录多聚酶链反应技术检测对照组、血性脑脊液处理 24 h 组、血性脑脊液处理 48 h 组蛋白激酶 G α 基因 mRNA 的表达水平; 采用蛋白质印迹技术检测相应的蛋白的表达水平。采用甲基噻唑基四唑法、氘标记胸腺嘧啶核苷掺入法检测脑动脉平滑肌细胞增殖改变。结果 血性脑脊液诱导脑动脉平滑肌细胞不断增殖。各组均检测出蛋白激酶 G α 基因的 mRNA 以及蛋白表达的变化, 图像定量分析光密度值显示各组表达的 mRNA 以及蛋白表达与细胞增殖改变密切相关。结论 蛋白激酶 G α 基因可能在蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛中调节脑动脉平滑肌细胞增殖。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Changes of Pkg α Expression in Cerebral Arterial Smooth Muscle Cells Induced by Bloody Cerebrospinal Fluid in Rats

LUO Chun-Xia¹, YI Bin², CHEN Zhi¹, TANG Wei-Hua¹ and FENG Hua¹

(1. Department of Neurosurgery; 2. Department of Anesthesia, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[KEY WORDS] Cerebral Arterial Smooth Muscle Cells Proteinase G α Cerebral Vasospasm; Subarachnoid Hemorrhage

[ABSTRACT] **Aim** To observe the changes of PKG α mRNA and protein expressive level in cerebral arterial smooth muscle cells (CASM C) induced by bloody cerebrospinal (BCSF) in rats and to investigate the value of PKG α signaling pathway in cerebral vasospasm (CVS) after subarachnoid hemorrhage (SAH). **Methods** The pure CASM C were cultured by tissue-sticking methods. Semi-quantitative reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to examine the PKG α mRNA expression after CASM C were exposed to BCSF for 24 h and 48h respectively. And PKG α protein expressions were determined by Western blotting. The changes of CASM C proliferation were determined by MTT and ³H-TdR incorporated way. **Results** BCSF could stimulate CASM C proliferating. The mRNA and protein of PKG α could be detected in all groups and the expressive level of mRNA and protein had a possible relationship with CASM C proliferation. **Conclusion** The results suggested that PKG α signaling pathway might play an important role in the CVS after SAH.

高血压动脉硬化性动脉瘤破裂所致蛛网膜下腔出血 (subarachnoid hemorrhage SAH) 是临床常见危急重症。SAH 后继发的慢性脑血管痉挛 (cerebral vasospasm, CVS) 是致死和致残的主要原因, 但其机制迄今尚未能完全阐明。研究显示血管平滑肌细胞

的异常增殖在 CVS 发生中起到十分重要的作用^[1], 但是调控机制不明。既往研究发现蛋白激酶 G (proteinase G, PKG) α 与血管平滑肌细胞的增殖、迁移等基本生命活动密切相关^[2]。本研究采用血性脑脊液 (bloody cerebrospinal fluid BCSF) 模拟 SAH 刺激因素作用培养的大鼠脑动脉平滑肌细胞 (cerebral arterial smooth muscle cell CASM C), 观察细胞增殖、PKG α mRNA 及蛋白表达的变化, 旨在探讨 PKG α 在 SAH 后 CVS 中 CASM C 异常增殖调控中的可能作用, 为 CVS 分子机制的阐明和防治提供新思路。

[收稿日期] 2009-08-26 [修回日期] 2010-02-05

[基金项目] 国家自然科学基金资助 (30700347, 30500662); 重庆市自然科学基金资助 (2007BB5045)

[作者简介] 罗春霞, 博士研究生, 主治医师, 讲师, 主要从事脑血管病的基础与临床研究, E-mail 为 huochx@sina.com。通讯作者易斌, 博士, 副教授, 副主任医师, 主要从事血管平滑肌细胞信号转导途径的研究, E-Mail 为 ybin1974@163.com。3 陈志, 硕士, 副教授, 副主任医师, 主要从事脑血管病的基础与临床研究, E-mail 为 zh@med.umich.edu。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

低糖 EMEM 培养基 (PAA, 美国), DHanks 液 (hyclone, 美国), 兔多克隆抗大鼠 PKG Ia 磷酸化蛋白 (NeoMarkers 美国), SP 免疫组织化学试剂盒 (Sa1021, 武汉博士德), AMV 逆转录酶 (Promega 美国), Taq DNA 聚合酶、Oligo (dT) 15, dNTP (北京鼎国生物技术发展公司), 其余试剂均为国产分析纯。Alpha Imager 凝胶成像分析系统 (Alpha Innotech 美国)。PTC-200DNA 扩增仪 (MT research, 美国)。

1.2 脑动脉平滑肌细胞的培养及分组

购自本校实验动物中心的 SD 大鼠, 体重 180~220 g 大鼠 CASC 的原代培养、传代、纯化、鉴定参考文献 [1, 3]。第 3~5 代 CASC 细胞用于试验。相同密度 (10^6 个 / cm^2) 接种后分为对照组、BCSF 处理 24 h 组 (H24)、BCSF 处理 48 h (H48) 组。待细胞长至瓶底 80% 左右换含 0.1% 胎牛血清 DMEM 培养基同步生长 24 h 后进行相应处理。BCSF 处理方法参考文献 [4]。

1.3 逆转录多聚酶链反应技术检测蛋白激酶 G Ia 基因 mRNA 的表达

Tripure 试剂盒提取各组的总 RNA 进行 RT-PCR 检测, 以 GAPDH 为内参照。PKG Ia 基因引物及反应条件参考文献 [2]。扩增完成后, 取 10 μL PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳, Alpha Imager 图像分析仪进行灰度扫描, 读取各带的吸光值 (A), 结果以 PKG Ia/GAPDH 的吸光值之比 ($A_{\text{PKG Ia}} / A_{\text{GAPDH}}$) 进行数据分析。试验重复 4 次。

1.4 蛋白质印迹技术检测蛋白激酶 G Ia 磷酸化蛋白的表达

蛋白激酶 G Ia 磷酸化蛋白分子量为 60 kDa。各组细胞用 RIPA 液 (含 1% PMSF) 裂解, 紫外分光光度计蛋白定量, -70°C 保存。取 30 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳; 随后将蛋白质电转印 (恒流 40 mA, 电压上限 16 V, 转膜时间 70 min) 至 PVDF 膜; 封闭液 1: 500 稀释的兔多克隆抗人 PKG Ia 磷酸化蛋白 4 $^\circ\text{C}$ 过夜。封闭液 1: 1000 稀释的结合有 HRP 的二抗 (羊抗兔)。DAB 显色液中显色, 凝胶成像系统扫描存盘, Alpha Imager 图像分析仪测定杂带的光密度值, 并进行条带的蛋白含量分析。试验重复 4 次。

1.5 氚标记胸腺嘧啶核苷掺入法检测

各组细胞消化后, 制成 CASC 细胞悬液, 进行计数细胞数, 调整细胞浓度为 2×10^7 个 / L。分别取

各组细胞接种于 96 孔培养板。每个时相点设 3 个重复孔。培养 2 天后进行 BCSF 处理。分别在各时相点终止培养前 6 h 加入 1 μCi ^3H -TdR (1 μCi / 孔), 在相应时相点终止培养, 弃去培养液, 冷 PBS 液终止掺入, 加入 0.25% 胰酶消化细胞, 使之脱离孔壁, 用多头细胞样品收集器收集细胞于玻璃纤维膜上, 生理盐水冲洗 3 次, 然后用 10% 三氯乙酸固定, 无水乙醇脱色, 80 $^\circ\text{C}$ 干烤 30 min, 放入闪烁液中, 于液体闪烁计数器计数 (counts/min cpm)。

1.6 甲基噻唑基四唑法比色实验

以每孔 $10^3 \sim 10^4$ 个细胞将 CASC 接种于 96 孔培养板中, 每孔体积 200 μL , 各组每个实验条件设 5 孔, 置 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养 24 h 后, 按分组处理。到达时相点的细胞, 更换无血清培养基, 加入 MTT 溶液 (5 g/L) 20 μL , 37 $^\circ\text{C}$ 常氧继续孵育 4 h。小心吸弃培养孔内上清液。每孔加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min 使结晶物完全溶解。选择 490 nm 波长, 参照波长 280 nm, 在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值。空白对照孔调零。以时间为横轴, 光吸收值 (A) 为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.7 统计学处理

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Excel2003 软件进行 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 血性脑脊液诱导对脑动脉平滑肌细胞中蛋白激酶 G Ia mRNA 表达水平的影响

血性脑脊液诱导下, PKG Ia mRNA 表达逐渐降低, 48 h 到达最低。和对照组比较, H24 和 H48 组的变化差异有显著性 ($P < 0.05$)。和 H24 组比较, H48 组变化有显著性 ($P < 0.05$) (图 1 和表 1)。

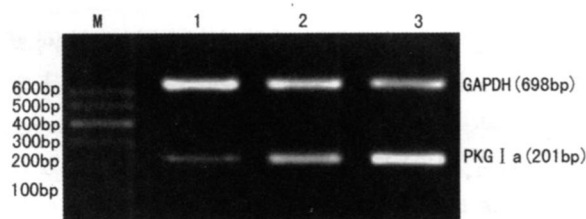


图 1 脑动脉平滑肌细胞蛋白激酶 G Ia mRNA 在血性脑脊液诱导不同时相点的表达 1 为 Mark, 2 为 48 h 组, 3 为 24 h 组, 4 为对照组。

2.2 血性脑脊液对脑动脉平滑肌细胞中蛋白激酶 G Ia 磷酸化蛋白表达的影响

检测的 PKG Ia 磷酸化蛋白的分子量为 60 kDa。

CASMC 中 PKG Ia 磷酸化蛋白的表达量随着时间延长而逐渐降低, H 24 和 H 48 组的表达量显著低于对照组 ($P < 0.05$); H 48 组的表达量显著低于 H 24 组 ($P < 0.05$ 图 2 和表 1)。

表 1. 血性脑脊液对脑动脉平滑肌细胞蛋白激酶 G Ia mRNA、蛋白激酶 G Ia 磷酸化蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

分 组	PKG Ia mRNA	PKG Ia 磷酸化蛋白
对照组	51.23 \pm 4.22	93.33 \pm 8.57
H 24 组	35.11 \pm 3.29 ^a	73.23 \pm 18.47 ^a
H 48 组	21.94 \pm 2.33 ^{ab}	33.10 \pm 11.52 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与 H 24 组比较。

2.3 氚标记胸腺嘧啶核苷掺入法检测血性脑脊液对脑动脉平滑肌细胞增殖的影响

脑动脉平滑肌细胞 ^3H -TdR 掺入量在血性脑脊液作用后开始增加, 随着时间的延长, ^3H -TdR 掺入量逐渐增加, 48 h 组 ^3H -TdR 掺入量最高 ($P < 0$

表 2. 血性脑脊液对脑动脉平滑肌细胞增殖的影响 (% , $n = 4$)

方 法	对照组	H 24 组	H 48 组
MTT	0.30% \pm 0.04%	0.58% \pm 0.10% ^a	0.98% \pm 0.08% ^{ab}
^3H -TdR	8.194 \pm 2.3% \pm 753.24%	12.913 \pm 1.9% \pm 854.29% ^{ab}	6.603 \pm 4.4% \pm 957.43% ^{ab}

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与 H 24 组比较。

3 讨论

蛛网膜下腔出血后 CVS 的分子机制至今尚未完全阐明, CVS 是 VSMC 持续主动收缩的结果, 还是血管壁结构性破坏、VSMC 增殖所导致的器质性管腔狭窄存在争论^[5]。既往研究主要集中在围绕引起 VSMC 持续主动收缩的因素及调节平滑肌收缩的信号转导通路来进行, 针对 VSMC 过度收缩的药物治均只能在早期或一定程度上改善 CVS, 对于后期或已形成严重的 CVS 均无法缓解^[6]。这些研究结果以及我们的前期研究结果^[11]提示 CASMC 的增殖和迁移可能在 CVS 难以逆转的病理机制中起到重要的作用, 是 CVS 基本病理生理变化之一, 亟待进行对于 SAH 后 VSMC 增殖的深入机制及针对性干预进行研究。

氚标记胸腺嘧啶核苷掺入法是检测细胞增殖较为灵敏且高效易于操作的方法, 其原理是利用细胞在增殖时细胞核可大量摄入胸腺嘧啶, 其摄入量与细胞增殖水平成正比。研究发现在 BCSF 的刺激下, ^3H -TdR 掺入量明显增多, 与对照组比较差异有显著性; 同时 H 48 组与 H 24 组差异有显著性意义,

05 表 2)。

2.4 甲基噻唑基四唑法检测血性脑脊液对脑动脉平滑肌细胞增殖的影响

对照组吸光度值较低 (0.298 ± 0.036), 在 BCSF 刺激下, 吸光度值明显升高, 并且时间的延长, 吸光度值升高越明显, 48 h 后差异有显著性 ($P < 0.05$ 表 2)。

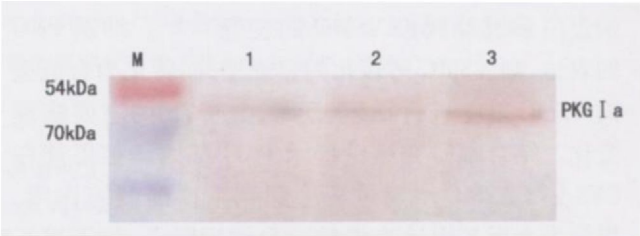


图 2 血性脑脊液对不同时相点脑动脉平滑肌细胞蛋白激酶 G Ia 磷酸化蛋白表达的影响 1 为 Mark, 2 为 48 h 组, 3 为 24 h 组, 4 为对照组。

研究结果提示在 BCSF 的刺激下, CASMC 的 DNA 合成量增高, 细胞出现明显增殖; 这种增殖效应随着时间延长而增强。MTT 的原理是为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的 MTT 还原为难溶性的蓝紫色结晶物沉淀在细胞中, 而死细胞无此功能, 用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处测定结晶物吸收值与细胞数成正比。研究发现对照组吸光度值较低, 在 BCSF 的刺激下, H 24 组吸光度值明显增高, 较对照组差异有显著性意义; H 48 组吸光度值进一步增高, 与 H 24 组比较差异有显著性; 研究结果提示在 BCSF 的刺激下, CASMC 的细胞数目增高, 表明细胞出现明显增殖, 这与 Borel^[7]等通过在体实验所观察的结果一致。研究发现在 H 24 和 H 48 出现较为明显的 CASMC DNA 合成量和细胞数目增高的同时, PKG Ia mRNA 和磷酸化蛋白的表达量亦出现显著性改变, 体现为持续性表达抑制, H 24 组和对照组比较差异有显著性, H 48 组和 H 24 组比较差异有显著性, 研究结果提示 BCSF 的刺激下, CASMC 出现逐渐增强的增殖效应的同时伴随着细胞内 PKG Ia 基因的表达抑制, 有较好的相关性。上述研究结果

表明 PKG Ia 基因可能在 SAH 后 CVS 的 CSMC 增殖病程中起到重要的调节作用。

蛋白激酶 G (protein kinase G, PKG) 分为胞浆可溶性 iv 型和膜结合性 G_{12} 型。近年来的研究结果显示 PKG 途径在对 VSMC 增殖起重要的调节作用^[8-9]。激活后的 PKG Ia 作用于多种底物包括肌球蛋白轻链激酶、Rho 家族、HSP27、MaxiK 通道、MAPK 等调节细胞内磷酸化和去磷酸化的平衡、G 蛋白功能、骨架蛋白系统等调控 VSMC 的表型^[10-11]。抑制 PKG 的表达, 则 VSMC 可转化为合成型, 而转化为合成型的 VSMC 能够进行增殖、迁移, 是 CVS 的主要病理变化。结合本研究结论提示 PKG 基因调控可能在 CVS 中 CSMC 增殖过程中起到重要的调控作用, 可能为今后基因治疗提供一个作用靶点, 值得进行深入的研究。

本研究仅检测了 BCSF 刺激 CSMC 增殖时 PKG Ia mRNA 及蛋白表达水平的变化情况, 因此需要上调 PKG Ia 表达和活化之后对 BCSF 刺激 CSMC 增殖是否存在影响上进一步研究。另外 PKG Ia 是独立于其他通路的一个新的信号转导系统, 与细胞代谢、生长、凋亡、恶变等密切相关, 且与 Ras、G 蛋白、PKC 等有复杂的关系^[12-13]; 研究 PKG Ia 在 SAH 后 CVS 中的作用且与其他信号通路的关系有助于阐明 CVS 的具体分子机制。

综上所述, PKG Ia 基因在 SAH 后 CVS 分子机制中可能有重要的调节作用, 可作为基因治疗的靶点之一。

[参考文献]

- [1] Weirhua Tang, Zhi Liu, John H Zhang, et al. The effect of ecdysterone on cerebral vasospasm following experimental subarachnoid hemorrhage in vitro and in vivo [J]. *Neurol Res* 2008 **30** (6): 571-580
- [2] 易斌, 陆俊羽, 钱桂生, 等. 低氧致人肺动脉平滑肌细胞 PKG Ia 表达变化与细胞表型的研究 [J]. *华南国防医学杂志*, 2008 **22** (5): 27-29
- [3] 王佳伟, 脱厚珍, 王瑞金, 等. 抑制人巨细胞病毒 UL83 基因对人脑动脉平滑肌 22a 及血管紧张素受体表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006 **14** (12): 1 013-019
- [4] Chen Z, Feng H, Zhang H, et al. Proliferation of vascular smooth muscle cells following experimental SAH and the effect of ecdysterone [J]. *Acta Neurochir Suppl* 2008 **104**: 183-189
- [5] Zhang ZD, Macdonald RL. Contribution of the remodeling response to cerebral vasospasm [J]. *Neurol Res* 2006 **28** (7): 713-720
- [6] Liu-Deryke X, Rhoney DH. Cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: an overview of pharmacologic management [J]. *Pharmacotherapy*, 2006 **26** (2): 182-203
- [7] Borel CO, McKee A, Parra A, et al. Possible role for vascular cell proliferation in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage [J]. *Stroke* 2003 **34** (2): 427-433
- [8] Barman SA, Zhu S, Han G, et al. cAMP activates BKCa channels in pulmonary arterial smooth muscle via cGMP-dependent protein kinase [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003 **284** (6): L1 004-011
- [9] Suzuki YJ, Day RM, Tan CC, et al. Activation of GATA-4 by serotonin in pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 2003 **278** (19): 17 525-531
- [10] Wang CC, Gurevich I, Draznin B. Insulin affects vascular smooth muscle cell phenotype and migration via distinct signaling pathways [J]. *Diabetes* 2003 **52** (10): 2 562-569
- [11] Jiang K, Zhong B, Ritchey C, et al. Regulation of Akt-dependent cell survival by Syk and Rac [J]. *Blood*, 2003 **101** (1): 236-244
- [12] Azusa NK, Makoto N, Hirokazu M, et al. cAMP-responsive element binding protein mediates a cGMP/protein kinase G-dependent antiapoptotic signal induced by nitric oxide in retinal neuron-gial progenitor cells [J]. *Exp Eys Res* 2007 **84** (1): 152-162
- [13] 易斌, 钱桂生, 白莉, 等. 丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶 2 蛋白表达在低氧致大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖中的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008 **16** (8): 597-599

(此文编辑 李小玲)