

内皮素促进细胞增殖相关基因的表达和血管平滑肌细胞增殖*

温进坤 贾根深 魏素珍

(河北医学院基础医学研究所生物化学研究室, 石家庄 050017)

Endothelin Stimulates Expression of Genes Related to Cell Proliferation and Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells

WEN Jin-Kun, JIA Gen-Shen and WEI Su-Zhen

(Department of Biochemistry, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical College, Shijiazhuang 050017, China)

ABSTRACT The effects of endothelin-1 on DNA synthesis and expression of genes related to cell proliferation in rat vascular smooth muscle cells (VSMC) were investigated by ^3H -TdR incorporation and Northern blot analysis. The results suggest that ^3H -TdR uptake increased at 12 h after stimulation with endothelin-1, with reaching a peak at 24 h. Endothelin-1 induced rapidly and transiently the expression of the proto-oncogenes c-fos and c-jun, the activity of their expression peaked at 30 min after stimulation, and rapidly declined there after. The expression of the p34^{cdc2} kinase gene augmented at 12 h after endothelin-1 stimulation and continuously expressed at relatively high levels until 24 h. These data indicate that endothelin-1 stimulates DNA synthesis of VSMC by inducing the transcription of genes related to cell proliferation.

KEY WORDS Endothelin-1; Gene expression; Vascular smooth muscle cell

摘要 通过 ^3H -TdR 掺入实验和 RNA 印迹分析, 观察了内皮素-1 对大鼠血管平滑肌细胞 DNA 合成及

细胞增殖相关基因表达的影响。结果表明, 内皮素-1 作用于血管平滑肌细胞 12 h, ^3H -TdR 掺入开始增加, 24 h 达到峰值。在内皮素-1 作用下, 原癌基因 c-fos 和 c-jun 进行快速瞬间表达, 其表达活性在 30 min 达到峰值, 3 h 后恢复到原来水平; p34^{cdc2} 激酶基因在内皮素-1 刺激 12 h 后表达活性开始增加, 至 24 h 仍维持在较高的水平。本文提示, 内皮素-1 对血管平滑肌细胞 DNA 合成的诱导作用与促进细胞增殖相关基因表达有关。

关键词 内皮素-1; 基因表达; 血管平滑肌细胞

细胞增殖丝裂信号传递途径中的主要成员包括细胞膜受体、G 蛋白、胞质蛋白激酶及细胞核内蛋白。原癌基因 c-fos、c-jun 和 c-myc 表达产物是细胞核中与细胞增殖调控相关的主要核蛋白, p34^{cdc2} 激酶通过调节核蛋白的功能在细胞周期不同时相的转换中起关键作用。已经证明, 当细胞受到外界丝裂原刺激时, c-fos、c-jun 和 c-myc 都快速瞬间进行表达^[1], p34^{cdc2} 激酶活性经磷酸化与脱磷酸修饰发生显著变化^[2]。内皮素作为血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的强效丝裂原, 其诱发血管平滑肌细胞增殖的作用机理近年引起人们的关注。本研究探讨内皮素对血管平滑肌细胞增殖调控相关基因表达的影响及其与血管平滑肌细胞增殖之间的关系, 以揭示内皮素引起血管平滑肌细胞增殖的作用机理。

1 材料与方法

1.1 试剂

核酸探针随机引物标记试剂盒为 Promega 公司产品, M₁₉₉ 培养液购于 GIBCO 公司, α - ^{32}P -dCTP (3 000 mCi \cdot mol⁻¹) 购自北京亚辉生物医学工程公司, ^3H -TdR

* 河北省自然科学基金资助项目

为中国原子能科学研究院产品,其它试剂为进口或国产分析纯。

1.2 细胞培养

大鼠血管平滑肌细胞按本室以前报道的方法^[1]分离和培养,3~4日传代一次,全部实验采用第4~10代的细胞。

1.3 ^3H -TdR 掺入实验

将传代培养的血管平滑肌细胞接种于25 ml培养瓶中,每瓶细胞数为 1.5×10^4 。随机分组,每组4瓶细胞,实验组分别于细胞培养结束前0.5、1、3、6、12、24 h加入内皮素-1至终浓度为 $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。回收细胞前6 h,向各组细胞(包括未用内皮素-1处理的对照细胞)的培养液中加入 ^3H -TdR至终浓度为 $2 \text{ mCi} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养至预定时间后,按前文方法^[1]回收血管平滑肌细胞,用液体闪烁计数器测定各组细胞的cpm值。

1.4 Northern 印迹分析

采用酸性异硫氰酸胍-酚-氯仿方法^[1],分别从用内皮素-1处理不同时间和未处理的血管平滑肌细胞中提取RNA。取RNA 30 μg ,经1%琼脂糖-甲醛变性凝胶电泳后^[1],转移到尼龙膜上,按Sambrook等方法^[1]分别与 ^{32}P 标记的c-fos DNA片段(本室保存)、c-jun DNA片段(北京医科大学汤健教授赠送)和p34^{cdc2} cDNA(日本信州大学医学部二阶堂敏雄博士提供)进行杂交。

2 结果

2.1 对血管平滑肌细胞 DNA 合成的影响

内皮素-1能显著促进大鼠血管平滑肌细胞DNA合成。血管平滑肌细胞在含 $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内皮素-1的 M_{199} 培养液中(含10%胎牛血清)培养12 h后, ^3H -TdR掺入开始增加,到24 h, ^3H -TdR掺入达到峰值(Figure 1),其掺入量为对照细胞的2倍左右。因为未经内皮素-1处理的血管平滑肌细胞在含有胎牛血清的培养液中培养,在这种条件下培养的血管平滑肌细胞一部分呈增殖状态,一部分处于静止期,成为不均一的细胞群^[6],所以在所观察的各个时间点, ^3H -TdR掺入到对照细胞DNA中的量未出现明显变化。

2.2 对原癌基因 c-fos 和 c-jun 表达的影响

Figure 2是被内皮素-1处理不同时间的血管平滑肌细胞中c-fos mRNA与c-fos探针进

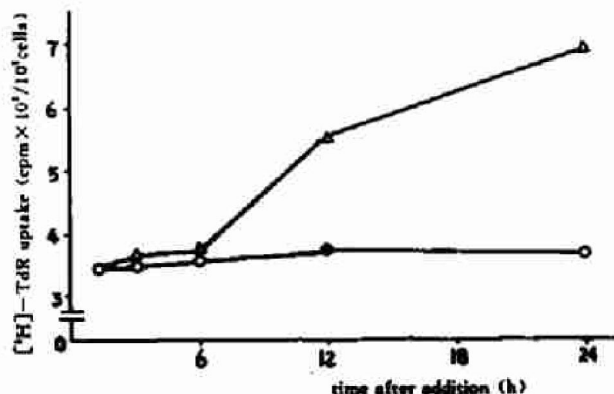


Figure 1. Effect of endothelin-1 on ^3H -TdR incorporation into rat VSMC. —○—, control VSMC; —△—, VSMC treated by endothelin-1 for different time periods.

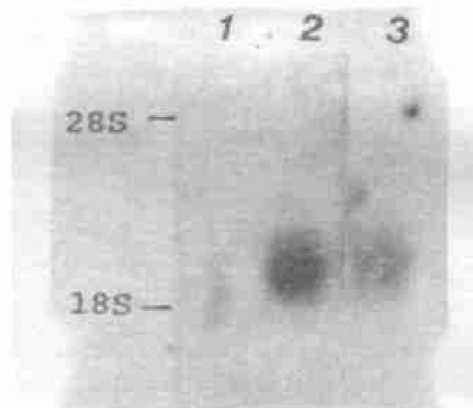


Figure 2. c-fos mRNA expression in rat VSMC after stimulation with endothelin-1. Lane 1, RNA from control VSMC; Lane 2 and 3, RNA from VSMC treated with endothelin-1 for 30 min and 3 h, respectively.

行杂交的结果。由Figure可见,在未经内皮素-1处理的细胞,未检出明显的杂交信号;内皮素-1作用于细胞30 min,其RNA与c-fos探针杂交后出现很强的杂交带(即c-fos基因表达显著增强)。此后,随时间延长,杂交信号逐渐减弱。与c-fos基因不同,在正常情况下(未经内皮素-1处理),从血管平滑肌细胞中提取的RNA与c-jun探针杂交出现较强的杂交信号,用内皮素-1刺激细胞30 min后,杂交信号比对照细胞增强3倍以上,3 h后,c-jun mRNA恢复到内皮素-1处理前的水平(Figure 3)。

2.3 对p34^{cdc2}激酶基因表达的影响

在未经内皮素-1处理的血管平滑肌细胞及内皮素-1处理时间短于12 h的细胞,其

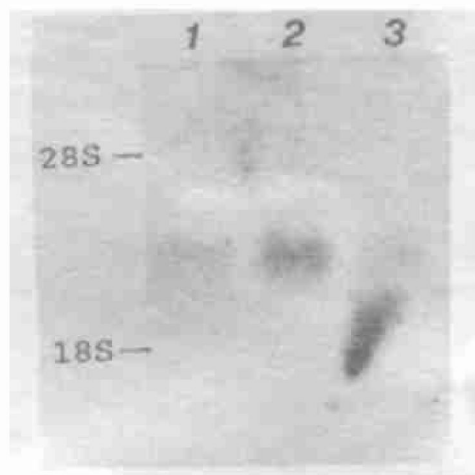


Figure 3. *c-jun* mRNA expression in rat VSMC after endothelin-1 stimulation. Lane 1, RNA from control VSMC; Lane 2 and 3, RNA from VSMC treated with endothelin-1 for 30 min and 3 h, respectively.

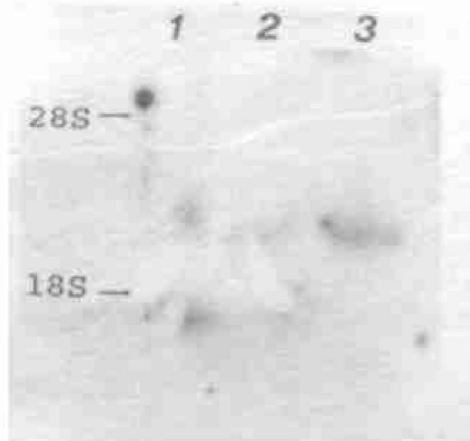


Figure 4. *p34^{cdc2}* gene expression in rat VSMC after endothelin-1 stimulation. Lane 1, RNA from control VSMC; Lane 2 and 3, RNA from VSMC treated with endothelin-1 for 12 h and 24 h, respectively.

RNA 与 *p34^{cdc2}* 探针杂交均未产生明显的杂交信号, 内皮素-1 作用于血管平滑肌细胞 12 h 后, 出现一条较浅的杂交带, 提示 *p34^{cdc2}* 基因表达开始增加, 24 h 后, 杂交信号进一步变强, 此时的信号强度比内皮素-1 作用 12 h 的血管平滑肌细胞增加 5~6 倍 (Figure 4)。

3 讨论

本文结果表明, 体外培养的血管平滑肌细胞在内皮素-1 作用下, 原癌基因 *c-fos* 和 *c-jun* 进行快速瞬间表达, 其表达活性在 30 min 达到峰值, 之后, 随时间延长, 两种基因的表达活性逐渐降低, *c-jun* 与 *c-fos* 基因的表达活性分别

于 3 h 与 6 h 后降低到对照细胞的水平。血管平滑肌细胞中的 *c-fos* 和 *c-jun* 基因在受内皮素-1 刺激后的表达谱型与血管内皮细胞受到丝裂原刺激时的表达谱型是一致的^[17]。最近, Boarder^[18] 提出, 内皮素-1 通过作用于血管平滑肌细胞上与 G 蛋白偶联的受体激活磷脂酶 D、磷脂酶 C、蛋白激酶 C 和酪氨酸激酶, 这些酶被活化后可导致胞浆内三磷酸肌醇 (inositol-1, 4, 5-trisphosphate, IP_3) 及 Ca^{2+} 浓度升高。我们推测, IP_3 和 Ca^{2+} 可通过激活某些转录因子而诱导 *c-fos* 和 *c-jun* 基因转录, 将在胞浆中合成的 Fos 和 Jun 转入细胞核内, 以异源性二聚体的方式与某些基因的 AP-1 位点相结合, 这样便将内皮素-1 的刺激信号转变为血管平滑肌细胞内基因表达与细胞增殖的刺激信号。

p34^{cdc2} 激酶控制细胞 G1→S 与 G2→M 的转换, 具有启动 DNA 复制和诱发有丝分裂的双重作用。一般认为, *p34^{cdc2}* 激酶的蛋白量在整个细胞周期中是恒定的, 其活性主要受磷酸化/脱磷酸化修饰调节^[9]。本文结果提示, 血管平滑肌细胞受到丝裂原刺激后, *p34^{cdc2}* 激酶基因的表达活性显著增强。

综上所述, 血管平滑肌细胞受细胞增殖丝裂信号刺激后, 细胞增殖相关基因的表达活性发生不同程度的改变。原癌基因 *c-fos* 和 *c-jun* 在细胞受丝裂原刺激 30 min 后, 表达活性即达到高峰。因为它们的表达是紧接第二信使后的下一个生物化学变化, 所以近年来也将其称为第三信使。血管平滑肌细胞受丝裂原刺激后, *p34^{cdc2}* 激酶基因表达活性发生改变的时间较晚, 其表达活性改变与 *c-fos* 和 *c-jun* 基因表达之间的关系尚待进一步研究。

参考文献

- 1 Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *TINS*, 1989, 12: 459~462.
- 2 蔡家新, 曹坦村. *p34^{cdc2}* 激酶的研究进展. 生理科学进展, 1993, 24(2): 118~122.
- 3 胡静, 温进坤, 魏素珍, et al. 甲基硝基亚硝基胍对血管平滑肌细胞增殖的影响. 中华物理医学杂志, 1994, 16(4):

- 211~213.
- 4 Chomczynski R, Sacchi N. **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Anal Biochem*, 1987, **162**: 156~161.
 - 5 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**, 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
 - 6 Watson MH, Venance SL, Pang SC, et al. **Smooth muscle cell proliferation, expression and kinase activities of p34^{cdc2} and mitogen-activated protein kinase homologues.** *Circ Res*, 1993, **73** (1): 109~117.
 - 7 温进坤, 魏素珍, 张展晖, et al. **佛波酯诱导内皮素和 fos/jun 基因在血管内皮细胞中的表达及 AP-1 结合活性.** *生物化学与生物物理学报*, 1994, **26** (3): 339~343.
 - 8 Boarder MR. **A role for phospholipase D in control of mitogenesis.** *TIPS*, 1994, **15** (2): 57~62.
 - 9 谭德勇. **p34^{cdc2}与真核生物细胞周期调控.** *国外医学分子生物学分册*, 1993, **15** (1): 6~9.
- (本文 1995-02-12 收到)

中国病理生理学会动脉粥样硬化专业委员会 第四届会员代表大会暨学术会议最后通知

中国病理生理学会动脉粥样硬化专业委员会第四届会员代表大会暨学术会议经过近一年的筹备, 现已就绪, 特将有关事项通知。

一、会议日期 1995 年 8 月 3 日报到, 8 月 4 日~8 日开会。

二、会议地点 张家界市金路宾馆(湖南省张家界市永定区崇文路 20 号)。

三、收费 会务费、资料费共 500 元, 在报到时交款。

四、食宿安排 会议期间食宿由大会统一安排, 费用自理。为了便于安排, 保证床位, 请在 6 月 30 日前, 通过邮局汇寄订床费 100 元, 注明×××的订床费, 如为多人, 则每个人名字均写清楚。汇款请寄衡阳医学院财务处姜星芳收。未交订床费者会议难以保证有床位。如临时不能参加会议, 订床费不退, 但可更换同性别人选。

五、报到办法 8 月 3 日在张家界火车站和飞机场设有接待站, 全天有人接车(机), 若因故提早或推迟到会, 乘坐火车者请从火车站乘坐 1 路车(票价 1 元)或中巴(票价 2 元)到市内, 乘飞机者请坐机场客车到市内, 到市内后请坐“面的”(机动三轮车, 2 元/人)直接到金路宾馆报到。

六、返程机、车票 寄回执时请将返程日期、票种、目的地及档次填写清楚, 由旅行社和宾馆代为预订。机、车票代办费为火车卧铺票 50 元/张, 座位 5 元/张, 飞机票 10 元/张。我们将尽全力让您满意离开, 但由于人数众多, 日期集中, 购票困难, 不可能完全按您的计划订到, 请予谅解。票订到后不能更改, 如需变更或退票一律自理。如订机票请同时寄身份证复印件, 并请随身携带身份证和工作证。

大会筹备组

附录

一、张家界班机日期表

张家界→北京	星期二、五
张家界→上海	星期一、五
张家界→广州	星期一、四、六
张家界→重庆	星期六
张家界→深圳	星期二、三、五、日
张家界→汕头	星期三、日
张家界→桂林	星期三、六

二、张家界火车站时刻表

车次	起始站/终到站	到点	开点
39/42	长沙→张家界	11:58	

41/42	张家界→长沙	12:45
25/48	张家界→广州	16:25
26/27	广州→张家界	13:13
173	襄樊→柳州	19:58 20:15
174	柳州→襄樊	8:30 8:42
275	郑州→怀化	23:22 23:37
276	怀化→郑州	20:58 21:10
435	襄樊→张家界	13:20
436	张家界→襄樊	16:50
535	张家界→怀化	13:53
536	怀化→张家界	15:45