文章编号:1000-5404(2006)03-0195-03

论著

低氧对大鼠肺动脉平滑肌细胞中 Gax 基因表达及细胞增殖的影响

夏世金,钱桂生,胡明冬,黄 勇,谭永红 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

提 要: 目的 探讨低氧对肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PASMCs)中生长终止特异性同源盒(growth arrest-specific homeobox, Gax)基因表达及细胞增殖的影响。**方法** 以 RT-PCR 法、免疫细胞化学法和 Western blot 法测定经低氧处理后的大鼠 PASMCs 中 Gax mRNA 和蛋白表达。^{3}H-TdR 掺入法观察低氧处理后 PASMCs 增殖情况。**结果** RT-PCR、免疫细胞化学和 Western blot 检测证实低氧(2.5% O_2)处理后的 PASMCs 中 Gax mRNA 和蛋白的表达逐渐降低;与常氧组比较,低氧组 Gax mRNA 和蛋白的表达显著下降。^{3}H-TdR 掺入法测定结果示 PASMCs ^{3}H-TdR 掺入量在低氧 6 h 开始增加,随着低氧时间延长,^{3}H-TdR 掺入量逐渐增加,至低氧 24 h 时 ^{3}H-TdR 掺入量最高。**结论** 低氧可下调大鼠 PASMCs 中 Gax mRNA 和蛋白的表达并诱导 PASMCs 增殖,提示 Gax 基因在低氧性 PASMCs 增殖过程中可能起着重要作用。

关键词: Gax 基因;低氧;肺动脉平滑肌细胞;增殖
中图法分类号: R322.121; R329.24; R364.4 **文献标识码**: A

Effects of hypoxia on Gax gene expression and proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells

XIA Shi-jin, QIAN Gui-sheng, HU Ming-dong, HUANG Yong, TAN Yong-hong (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the effects of hypoxia on the expression of Gax gene and proliferation of rat pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs). **Methods** Under hypoxia (2.5% O_2) condition, the expression of Gax mRNA and protein in PASMCs of rat was detected by RT-PCR, immunocytochemistry and Western blotting. ^{3}H-TdR incorporation was used to observe the PASMCs proliferation. **Results** The expression of Gax mRNA and protein in PASMCs treated by hypoxia was confirmed to decrease by RT-PCR, immunocytochemistry and Western blotting. Compared with that in the control group, Gax mRNA and protein level decreased significantly in hypoxia PASMCs. With prolongation of time of hypoxia, ^{3}H-TdR incorporation in PASMCs was significantly higher at 6 h, and reached a maximum at 24 h. **Conclusion** Hypoxia can downregulate the expression of Gax mRNA and protein in PASMCs and induce PASMCs proliferation, implying that Gax gene might play an important role in hypoxia-induced PASMCs proliferation.

Key words: Gax gene; hypoxia; pulmonary artery smooth muscle cells; proliferation

低氧可导致低氧性肺动脉高压。低氧性肺动脉高压(hypoxic pulmonary hypertension, HPH)是肺心病发病过程中的中心环节,它的产生及严重程度明显影响着肺心病和慢性阻塞性肺疾病的发生、发展、病程及预后。因此,有关 HPH 发病机制和治疗研究一直是国内外研究的重点、难点和热点。目前研究认为,HPH 血管病变主要是肺血管收缩反应增强和肺血管结构重建(pulmonary vascular structural remodeling, PVSR)。尽管引起 PVSR 的原因多种多样多环节,然而 PASMCs 异常增殖则是 PVSR 的关键环节[1]。Gax 基因是一个主要存在于心血管系统的同源异形盒基因。国内外研究表明 Gax 基因过表达可以抑制血管平滑肌细胞的增殖[2,3]。但 Gax 基因在 PASMCs 中有没有表达且是否与其增殖有关?低氧能否对大鼠肺动脉平滑肌细胞中 Gax 基因表达产生影响?以及 Gax 基因可否作为 HPH 基因治疗的靶基因?目前尚无答案。本实验以大鼠肺

作者简介:国家自然科学基金资助项目(39970329)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(39970329)
作者简介:夏世金(1965-),男,湖北省麻城市人,博士研究生,主治医师,主要从事低氧性肺动脉高压发病机制及防治方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)65230657,E-mail:kimxiasj@yahoo.com.cn
通讯作者:钱桂生,电话:(023)68755603,E-mail:qiangs@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2005-09-21;修回日期:2005-12-25

动脉平滑肌细胞作为细胞模型观察低氧条件下 Gax 基因的表达，为解答上述问题奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

兔抗大鼠 Gax 多克隆抗体（美国 Tufts 大学 Tamar 博士惠赠），肺动脉平滑肌细胞（组织块贴壁种植法获得传代第 5～10 代用于实验），DEME 培养基和胎牛血清（Hyclone 公司），胰酶（Gibco 公司），Tripure 试剂盒（Promega 公司），S-P 试剂盒（北京中山公司），^{3}H-TdR（上海原子能研究所），其余试剂是国产分析纯。

1.2 细胞的缺氧培养及分组

取 150～200 g 成年 Wistar 大鼠，购自第三军医大学实验动物中心。在无菌条件下打开大鼠胸腔取出肺动脉干和左右肺动脉，组织块法培养 PASMCs，并经 α-平滑肌肌动蛋白免疫细胞化学鉴定。培养液为含 10% 胎牛血清 DMEM，取第 5～10 代细胞用于本实验。用 0.25% 胰酶消化细胞并传代。之后将细胞放置于自动常压缺氧孵箱（德国贺氏公司）中进行低氧处理。在常氧（21% O_2）（N）和低氧（2.5% O_2）处理 2 h（H2）、6 h（H6）、12 h（H12）、24 h（H24）进行各指标的检测。待细胞长至瓶底的 70% ～80%，换含 0.4% 胎牛血清 DMEM 培养基使 PASMC 同步生长 48 h。

1.3 肺动脉平滑肌细胞中 Gax 基因在低氧前后指标的检测

1.3.1 RT-PCR 检测细胞中 Gax mRNA 表达 Tripure 试剂盒提取总 RNA，紫外分光光度计测定 RNA 纯度，RNA 1 μl RT 反应，合成的 cDNA 在 -20 ℃保存，各取 5 μl 行 PCR 反应，以 β-actin 为内参照。参照文献[3]设计引物。Gax 引物：上游：5′-ACA TGT CCT ACC CCG AAC TCT CCA-3′；下游：5′- TCG CTT TTT CTT TTG CTG CCA CTT-3′；产物 403 bp。β-actin 引物：上游：5′-CCA AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA C-3′；下游：5′-AGG GTA CAT GGT GGT GGC GCC AGA C-3′；产物 587 bp。循环完成后，采用自动电泳凝胶成像仪进行电泳、照相。凝胶分析系统测定各条带积分灰度值。Gax mRNA 表达值为 Gax 基因积分灰度值/β-actin 积分灰度值，并作数据分析。

1.3.2 免疫细胞化学法检测细胞中 Gax 蛋白表达 参照 S-P免疫组化试剂盒方法进行，Gax 抗体工作浓度为 1∶100。DAB 显色，苏木精复染。

1.3.3 Western blot 检测细胞中 Gax 蛋白表达 取待测的平滑肌细胞裂解产物 20 μl 进行 12% SDS-聚丙烯胺凝胶电泳，将蛋白电转至硝酸纤维膜上，脱脂奶粉封闭后，加入1∶1 000兔抗大鼠 Gax 多抗孵育，用 1∶3 000 羊抗鼠二抗孵育 2 h。将膜置于 DAB 显色液中显色至条带清晰显示时用清水终止反应。图像扫描，测定杂交带的光密度值，进行条带的蛋白含量分析。

1.3.4 ^{3}H-TdR 掺入检测细胞增殖 计数细胞调整细胞浓度为 2×10^5/ml。分别取各组细胞各 1 ml 接种于 96 孔培养板，每组设 3 个重复孔。培养 24 h 后每孔加入 37 kBq ^{3}H-TdR（37 kBq/孔），再培养 6 h 后弃培养基，PBS 液终止掺入，加入 0.25% 胰酶消化细胞，收集细胞于玻璃纤维纸上，生理盐水冲洗 3 次，用 10% 三氯乙酸（TCA）固定，无水乙醇脱色，80 ℃干烤 30 min，滤膜烘干后置于闪烁瓶中加入闪烁液，用液体闪烁计数仪计数（Bq）。

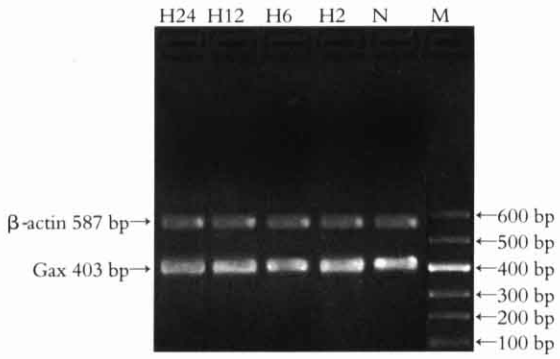
1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 软件进行 F 检验和 q 检验。

2 结果

2.1 RT-PCR 法检测 Gax mRNA 表达

电泳结果显示，常氧和低氧条件下均检测到 Gax mRNA 在肺动脉平滑肌细胞中的表达。与常氧时比较，低氧条件下 Gax mRNA 的表达下调（$P<0.05$，$P<0.01$），并且随着低氧时间的延长，Gax mRNA 的表达逐渐降低且有显著差异（$P<0.05$，$P<0.01$）（图 1，表 1）。



M：DNA 标准；N：常氧 PASMCs；H2－H24：低氧 2、6、12、24 h PASMCs

图1 RT-PCR 显示常氧和低氧时 PASMCs 中 Gax mRNA 的表达

表1 低氧对 PASMCs 中 Gax mRNA 及其蛋白表达影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	Gax mRNA（$D_{gax}/D_{\beta\text{-actin}}$）	Gax 蛋白
N	0.53 ± 0.06	146.73 ± 12.27
H2	0.46 ± 0.09[a]	131.21 ± 13.54[a]
H6	0.37 ± 0.05[a]	120.35 ± 18.59[a]
H12	0.19 ± 0.02[bc]	86.67 ± 11.47[bc]
H24	0.08 ± 0.03[bd]	45.83 ± 13.78[bd]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 N 组比较；c：$P<0.01$，与 H2 组比较；d：$P<0.01$，与 N 组比较

2.2 细胞中 Gax 蛋白的表达

免疫细胞化学结果显示，常氧和低氧条件下细胞核内出现棕黄色颗粒，提示 Gax 蛋白在细胞核中表达。与常氧时比较，低氧条件下细胞核中出现的棕黄色颗粒减少，表明 Gax 蛋白表达下调（图 2A、B）。

2.3 细胞中 Gax 蛋白的定量表达

Western blot 检测到，在 33.6×10^3 处出现表达程度不一的

蛋白印迹杂交结果，表明系 Gax 蛋白产物。且随着低氧时间的延长，Gax 蛋白的表达逐渐降低且差异越来越显著（$P<0.05$，$P<0.01$）（表 1）。

2.4　细胞增殖情况

^{3}H-TdR 掺入检测细胞增殖结果，常氧、低氧 6、12 和 24 h 的 ^{3}H-TdR 掺入量分别为 5 683.24 ± 2 516.20、8 953.47 ± 5 012.33、11 698.33 ± 1 673.32 和 14 273.10 ± 3 527.15。在低氧状态下，与常氧组比较，PASMCs 的 ^{3}H-TdR 掺入量从 6 h 开始明显增加（$P<0.05$），12 h 增加 1 倍多（$P<0.01$），至 24 h 最高超出 2 倍，差异非常显著（$P<0.01$）。

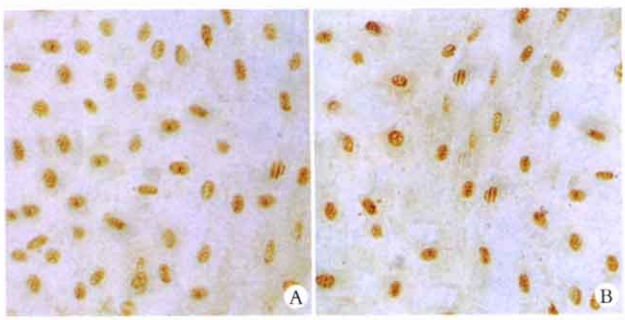


图 2　常氧时（A）和低氧 24 h（B）时 PASMCs 细胞核内 Gax 蛋白表达　（S-P × 200）

3　讨论

Gax 基因属于同源盒基因（homeoboxgene，HOX）家族中的一员。HOX 由 McGinnis 等在 1984 年发现。这类基因编码的蛋白质基本上都是转录因子，定位于细胞核，通过 helix-turn-helix（螺旋-转折-螺旋）结构模式与启动子或增强子序列结合，从而实现基因调控作用。它们都具有一个特征性的 homeodomain，这是一个含有 60 个氨基酸的 DNA 结合区，在进化过程中具有高度的保守性。大鼠 Gax 基因编码的蛋白质分子量为 33.6×10^3，含有 303 个氨基酸。目前研究证实 Gax 基因在成年大鼠的心、肺、肾、血管尤其是血管平滑肌细胞中表达。Gax 基因在静止期和收缩型的血管平滑肌细胞中高表达，但当血管平滑肌细胞被有丝分裂原刺激后，Gax 基因的表达迅速下降。Gax 基因高表达可以抑制血管平滑肌细胞的增殖及迁移，并诱导细胞凋亡；能够抑制人脐静脉内皮细胞增殖和血管重建[4-6]。Yamashita 等[7]研究发现，在体内利用复制缺陷的腺病毒载体携带 Gax 基因，导入内皮损伤的血管，可以抑制血管平滑肌细胞增殖，并明显减少内膜的增生和再狭窄的发生。

Gax 基因与血管平滑肌细胞增殖的关系密切，即当血管平滑肌细胞增殖时 Gax 基因的表达下调，而 Gax 基因的过表达又能抑制血管平滑肌细胞的增殖。PASMCs 的异常增殖是低氧性肺动脉高压肺血管结构重建的基本病理变化。低氧能导致 PASMCs 的增殖，那么可以推测 Gax 基因可能在 PASMCs 中表达，并且因低氧所引起增殖的 PASMCs 中 Gax 基因的表达可能发生下调的变化。本实验证实了这一推测。RT-PCR、免疫细胞化学和 Western blot 检测表明 Gax mRNA及其蛋白在常氧状态的肺动脉平滑肌细胞中高表达，而经低氧处理后 PASMCs 中的 Gax mRNA 及其蛋白的表达下调，并且随着低氧程度的加重其表达下调更加明显。同时，^{3}H-TdR 掺入量在低氧 6 h 开始增加，随着低氧时间的延长，^{3}H-TdR 掺入量逐渐增加，至低氧 24 h 时 ^{3}H-TdR 掺入量最高，提示低氧致 PASMCs 增殖的同时，伴有 Gax 基因表达下调，因此推测 Gax 基因可能参与低氧性 PASMCs 增殖和肺血管结构重建的发病机制。

总之，本实验表明在 PASMCs 中检测到 Gax 基因的表达，低氧能导致 PASMCs 增殖的同时使 PASMCs 中的 Gax 基因表达下调，且 Gax 基因表达下调的水平与低氧的时间成正比。研究 Gax 基因在低氧性 PASMCs 中表达的变化，目的是探讨调控 Gax 基因对于防治因低氧性 PASMCs 异常增殖所导致的 HPH 可能有效，可望成为 HPH 基因治疗的候选基因。本研究为此目的提供前期实验依据。

参考文献：

[1] 白　莉，钱桂生，余祖滨，等. 缺氧对大鼠肺动脉平滑肌细胞 STAT3 表达及细胞增殖的影响[J]. 解放军医学杂志，2004，29(9)：792－794.

[2] MAILLARD L，VAN BELLE E，SMITH R C，*et al*. Percutaneous delivery of the Gax gene inhibits vessel stenosis in a rabbit model of balloon angioplasty[J]. Cardiovasc Res，1997，35(3)：536－546.

[3] 王　耿，何国祥，张　萍，等. 腺病毒介导 gax 基因转染在培养的血管平滑肌细胞中的表达[J]. 高血压杂志，2003，11(2)：173－177.

[4] LEPAGE D F，ALTOMARE D A，TESTA J R，*et al*. Molecular cloning and localization of the human Gax gene to 7p21[J]. Genomics，1994，24(3)：535－540.

[5] MAILLARD L，WALSH K. Growth-arrest homeobox gene Gax：a molecular strategy to prevent arterial restenosis[J]. Schweiz Med Wochenschr，1996，126(41)：1721－1726.

[6] GORSKI D H，LEAL A J. Inhibition of endothelial cell activation by the homeobox gene Gax[J]. J Surg Res，2003，111(1)：91－99.

[7] YAMASHITA J，ITOH H，OGAWA Y，*et al*. Opposite regulation of Gax homeobox expression by angiotensin II and C-type natriuretic peptide[J]. Hypertension，1997，29(1 Pt 2)：381－387.

[8] 王　耿，何国祥，冉擎力，等. 腺病毒介导 Gax 基因转染对血管平滑肌细胞迁移的影响[J]. 第三军医大学学报，2005，27(14)：1443－1445.

（编辑　张大春）