文章编号:1000-5404(2006)06-0543-03

论著

ORC1与大鼠血管平滑肌细胞DNA复制的关系及意义探讨

江明宏,舒茂琴,覃跃龙 (第三军医大学西南医院心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨大鼠血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)增殖过程中DNA复制与起始识别复合物1(origin recognition complex 1, ORC1)基因表达的关系及意义。**方法** 采用组织块贴片法培养大鼠胸主动脉VSMCs,利用MTT法绘制生长曲线,分析不同生长状态VSMCs的DNA合成与ORC1 mRNA和蛋白表达的关系。**结果** 静止状态的VSMCs无ORC1 mRNA及蛋白质表达,血清刺激后12~24 h VSMCs DNA的合成量显著增加,ORC1 mRNA及蛋白质表达量与VSMCs DNA的合成量相一致。**结论** ORC1与大鼠VSMCs增殖过程中的DNA复制密切相关。

关键词: 起始识别复合物;血管平滑肌细胞;DNA复制
中图法分类号: R322.74;R329.28;R394.2 **文献标识码:** A

Significance of ORC1 during the DNA replication of rat vascular smooth muscle cells

JIANG Ming-hong, SHU Mao-qin, QIN Yue-long (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the expression of origin recognition complex1 (ORC1) during DNA replication progress of rat vascular muscle cells (VSMCs). **Methods** VSMCs of rat thoracic aorta were obtained by the adherence method of tissue culture. The growth curve was drawn by MTT. The association between DNA replication and the expression of ORC1 mRNA and protein in different growth phases of VSMCs was analyzed. **Results** The expression of ORC1 mRNA and protein in quiescence stage of VSMCs was not found. After stimulated with serum, the expression of ORC1 mRNA in rat VSMCs increased significantly, peaked at 12 – 24 h. The expression of ORC1 protein was similar to ORC1 mRNA in VSMCs. Meanwhile, the higher DNA replication of stimulated VSMCs was observed, peaked at 12 – 24 h after serum addition. **Conclusion** ORC1 may be involved in the DNA replication of rat VSMCs during the progress of proliferation.

Key words: origin recognition complex 1; vascular smooth muscle cells; DNA replication

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)增殖是动脉粥样硬化及血管成型术后再狭窄的关键病理过程,而DNA复制是血管VSMCs增殖的基本特征。DNA复制发生在两个连续的时相:启动和延长,目前绝大多数研究集中在DNA复制延长的相关因子,如增殖细胞核抗原、DNA多聚酶,而DNA复制启动的研究甚少。起始识别复合物(origin recognition complex, ORC)是真核细胞DNA复制起始蛋白,与染色体上的多种复制启动因子协同作用,参与DNA复制的启动[1]。ORC最早在酵母菌中发现,ORC中最大的亚基是ORC1,ORC1在肿瘤细胞株DNA复制启动的调控作用研究较多,目前ORC1在VSMCs增殖过程中DNA复制启动的研究甚少。我们的前期已经证实了ORC1与大鼠VSMCs细胞周期变化密切相关[2]。本研究检测SD大鼠胸主动脉VSMCs的DNA复制启动与ORC1表达关系,以探讨ORC1在VSMCs增殖过程中DNA复制启动的作用及意义。

1 材料与方法

1.1 材料

SD雄性大鼠共20只,体质量120~150 g,由第三军医大学实验动物中心提供;ORC1引物由上海基康生物工程公司合成:P1 5′-ACGCAATGAAGTCTCTGGAATGTG-3′, P2 5′-ACGGGCACGAAGAGAAGTATGGA-3′, β-actin: P1 5′-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3′, P2 5′-CATCTCTTGCTCGAAGTCTA-3′。本实验主要的试剂如下: DMSO(Sigma),MTT试剂(Sigma),其余试剂见参考文献[2]。

1.2 方法

1.2.1 大鼠血管平滑肌细胞细胞生长曲线的变化[3] 采用噻唑蓝(MTT)法以10^3~10^4/孔接种细胞于96孔培养板中,按

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470727)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30470727)
作者简介:江明宏(1975-),男,江西省永新县人,硕士研究生,医师,主要从事动脉粥样硬化发病机制的基础方面的研究,现在河北保定252医院。电话:(023)60636004
通讯作者:舒茂琴,电话:(023)68754223, E-mail:Shumaiqin@sina.com
收稿日期:2005-11-21;修回日期:2006-02-18

不同分组分别加 200 μl 含 10% 血清浓度的培养基，于培养后第 1、2、3、4、5、6、7 天。细胞生长曲线的绘制各组分别取 3 孔进行检测；每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20 μl，置于恒温细胞培养箱继续培养 4 h，弃培养液，加入 DMSO 150 μl，振荡 10 min，使结晶物充分溶解“用酶联免疫检测仪（波长 490 nm）检测”以天数为横轴，吸光度为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.2.2 流式细胞仪测定不同时相的细胞周期（$n=3$） 按血清饥饿法培养 24 h 后，分别用 DMEM（含 10% 胎牛血清）刺激 0、6、12、24、48 h，用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞，见到细胞变圆，用含 10%（胎牛血清）DMEM 终止消化，吹打后以 5 min，1 000 r/min 离心，然后用 0.01 mol/L PBS 冲洗 1 遍，用 75% 冷乙醇固定，4 ℃过夜，细胞悬液加等体积 PI 染液，室温下染色 30 min；将所制样品加入 FCM 的加样室，以激发光波长 488 nm，测定细胞 DNA；计算机自动作图，并分析不同增殖周期细胞所占比例。

1.2.3 ORC1 mRNA 表达的检测 参照文献[4]的方法。

1.2.4 流式细胞仪检测 ORC1 蛋白表达[5,6] 经血清饥饿法 24 h 后，用 DMEM 培养基（含 10% 胎牛血清）按 0、6、12、24、48 h 刺激 VSMCs，0.01 mol/L PBS 冲洗 2 遍，用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞，见到细胞变圆，用含 10%（胎牛血清）DMEM 终止消化，吹打后以 5 min，1 000 r/min 离心，然后用 0.01 mol/L PBS 冲洗 1 遍，离心，去掉上清液，用 1 ml 枪头迅速注入冷 4% 多聚甲醛，4 ℃保存，至少 18 h。离心收集细胞，加入 PBS（含 0.1% Triton-100 和 0.1% 小牛血清白蛋白）常温 7 min 后，用 PBS（含 1% BSA）冲洗 2 遍后，加入抗 ORC1（羊抗人）抗体 100 μl（1∶1 000），4 ℃过夜，PBS 冲洗 2 次后，加入荧光标记的二抗（1∶512）（兔抗山羊 FITC），4 ℃ 15 min，0.01 mol/L PBS 冲洗 2 次，上机调节检测背景的正常细胞不加一抗工作液，直接加二抗工作液；进行流式细胞仪检测。

2 结果

2.1 VSMCs 生长曲线

采用贴壁法培养 VSMCs，光镜、电镜鉴别，抗肌动蛋白单克隆抗体鉴定 VSMCs。选用细胞活性良好（图 1）、4～6 代细胞用于本研究。

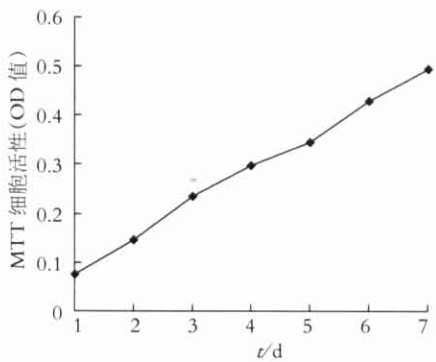


图 1 VSMCs 生长期曲线图

2.2 血清刺激对 VSMCs 增殖过程中 DNA 合成的影响

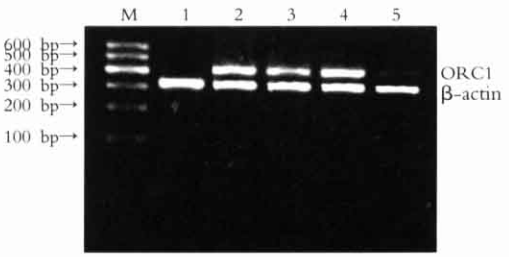
饥饿 24 h 后，VSMCs 处于 G_0/G_1 期，DNA 合成最少，血清刺激 6 h，DNA 合成开始轻度增加，12～24 h DNA 合成增加明显，48 h DNA 合成又减少。结果提示血清刺激 12～24 h VSMC 的 DNA 合成明显增加（表 1）。

表 1 不同生长状态的细胞周期变化[$n=3$，($\bar{x}\pm s$)%]

	0 h	时间（t/h）			
		6 h	12 h	24 h	48 h
G_0G_1	87.60±5.80	86.11±10.47	70.37±8.05	66.09±13.41	85.34±2.27
S	3.88±3.40	5.63±3.20	22.45±6.84	17.53±11.11	5.62±4.34
G_2/M	8.52±3.95	8.25±7.47	7.18±6.41	6.38±5.56	9.03±2.23

2.3 血清刺激后不同时相点 VSMCs 的 ORC1 mRNA 表达

饥饿培养 24 h 的大鼠 VSMCs 无 ORC1 mRNA 表达，血清刺激 6 h，ORC1 mRNA 开始轻度增加，12～24 h 增加最为显著。即 ORC1mRNA 在 401 bp 处条带表达。内参对照 β-action 在 318 bp 处有区带。结果提示 ORC1mRNA 的表达与 VSMCs 的 DNA 合成密切相关，ORC1 在增殖活跃的细胞表达明显，见图 2。

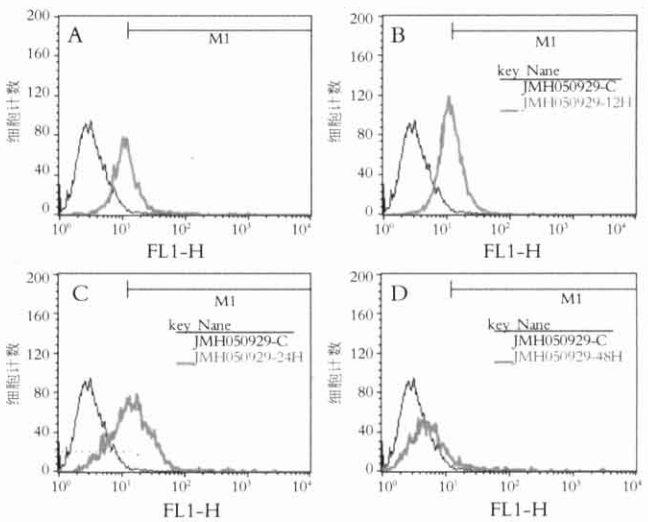


M：DNA 标准；1：血清刺激 0 h ORC1 mRNA 表达；2：血清刺激 6 h ORC1 mRNA 表达；3：血清刺激 12 h ORC1 mRNA 表达；4：血清刺激 24 h ORC1 mRNA 表达；5：血清刺激 48 h ORC1 mRNA 表达

图 2 不同生长状态 VSMCs 的 ORC1 mRNA 表达

2.4 不同增殖状态 VSMCs 的 ORC1 蛋白表达

流式细胞仪检测结果如图 3 所示，饥饿培养 24 h 后 ORC1 蛋白表达极弱（0.46%），未显示；血清刺激后表达逐渐升高，刺激后 6、12 h 的表达分别为 4.37%、12.49%；24 h 达到高峰（22.55%），48 h 显著降低（2.64%）。同样提示，ORC1 蛋白表达与 VSMCs 的 DNA 合成量的多少相关。



A：血清刺激后 6 h ORC1 蛋白表达；B：血清刺激后 12 h ORC1 蛋白表达；C：血清刺激后 12 h ORC1 蛋白表达；D：血清刺激后 24 h ORC1 蛋白表达

图 3 不同生长状态的 ORC1 蛋白表达变化

3　讨论

ORC 周期[7]，是调控真核生物 DNA 复制的关键途径，ORC1 是 ORC 最大的亚基，ORC2-5/ORC2-6 结合在启动点上，在每一个细胞增殖启动点的活性是由 ORC1 或 ORC1/CDC6 来决定。前期研究[2]，ORC1 参与 VSMCs 细胞周期过程，而对于 ORC1 与 VSMCs DNA 启动与合成未进行探讨。

Ohtani 等[8-10]研究发现，ORC1 在人类 293 细胞株、HelaS3 细胞以及 HEp-2 细胞增殖过程中 DNA 复制的启动有着重要调控作用。Mehra 等[11]在人类恶性疟原虫通过免疫印迹和 RT-PCR 最近发现，ORC1 在滋养体和裂殖体阶段有大量表达，且能阻止人类恶性疟原虫成熟与发育。有文献报道，细胞周期是依靠 ORC 来调控，而 ORC1 的变化，影响着细胞增殖（如基因表达和 DNA 复制），同时也是细胞是否正常进行还是异常的标志[12]。以上研究结果提示，ORC1 在人类肿瘤细胞（如 HeLaS3 细胞、293 细胞）及真核生物增殖过程中 DNA 复制的启动起着重要作用。

具有增殖潜能的 VSMCs 前期研究有 ORC1 表达[4]，但表达量的多少，与其 DNA 合成的关系，文献报道甚少，本研究通过 RT-PCR 检测技术，结果表明处于血清饥饿状态（即静止期）的 VSMCs（DNA 合成减少），未检测出 ORC1 mRNA 表达，提示不表达或者表达非常弱，而 VSMCs 被血清刺激 6 h（有些细胞开始进入 DNA 合成期），其 ORC1 mRNA 的表达明显增加，12～24 h 达到高峰（DNA 合成期活跃），到 48 h 后（DNA 合成减少），ORC1 mRNA 其后逐渐减少，基本处于静止期，各时相所处细胞周期变化如表 1 所示。流式细胞仪蛋白检测结果在 G_0 期为 0.46%，6 h 为 4.37%，12 h 为 12.49%，24 h 为 22.55%，48 h 为 2.64%，本研究提示具有增殖潜能的 VSMCs DNA 合成量的多少与 ORC1mRNA 和蛋白质的表达密切相关，即 ORC1 在血清饥饿状态下表达非常低或者不表达，随着细胞周期与增殖的继续进行，ORC1 表达在不断的变化。即处于 DNA 合成活跃期的 VSMCs 存在 ORC1 大量表达或者高表达，否则，ORC1 进入其他细胞周期阶段，ORC1 蛋白表达明显降低。结果提示，ORC1 在 VSMCs，与人类肿瘤细胞株一样，是启动细胞增殖与 DNA 复制的关键因子。

VSMCs 与人类肿瘤细胞株相似，在参与 AS 形成的细胞体系中，属于增殖体系中最活跃的细胞，其增殖过程受细胞周期的调控。而 VSMCs 在血管内膜大量增殖是血管再狭窄的主要病理特征。目前认为 VSMCs 从血管中层移动到血管内膜、并在血管内膜增殖是 AS 形成、血管再狭窄等病理过程的基本事件。本研究结果显示 ORC1 与 VSMCs DNA 合成密切相关。目前，本研究通过初步研究 ORC1 基因在启动 VSMCs 增殖过程中的可能作用，探索 ORC1 参与启动 VSMCs DNA 复制变化规律，为寻找阻止或延缓 VSMC 增殖的手段提供理论和实验依据。对研究冠状动脉粥样硬化的发病机制有重要意义。

参考文献：

[1] TATSUMI Y, OHTA S, KIMURA H, *et al*. The ORC1 cycle in human cells: I. Cell cycle-regulated oscillation of human ORC1[J]. J Biol Chem, 2003, 278(42): 41528-41534.

[2] 江明宏，舒茂琴，傅晓岚，等. ORC1 在大鼠血管平滑肌细胞 G1/S 和 S 期的表达[J]. 第三军医大学学报，2006，28（4）：301-304.

[3] 滕晓华，徐如祥，邹雨汐，等. 不同浓度血清对大鼠骨髓基质细胞生长的影响[J]. 中国病理生理杂志，2005，21(7)：1452-1454.

[4] 江明宏，舒茂琴，覃跃龙. ORC1 在大鼠血管平滑肌细胞增殖过程中表达[J]. 第三军医大学学报，2005，27（22）：2245-2247.

[5] SINDERMANN J, WEIGEL K A, BREITHARDT G. A simple method for the flow cytometric analysis of intracellular antigens in whole smooth muscle cells: quantification of cyclin-dependent kinase 2[J]. J Immunol Methods, 1997, 202(2): 205-212.

[6] 张　春，朱忠华，刘建社，等. 结缔组织生长因子对肾小管上皮细胞转分化的调节机制[J]. 中华医学杂志，2005，85(41)：2920-2925.

[7] DEPAMPHILIS M L. The "ORC cycle": a novel pathway for regulating eukaryotic DNA replication[J]. Gene, 2003, 310: 1-15.

[8] OHTANI K, DEGREGORI J, LEONE G, *et al*. Expression of the Hs-Orc1 gene, a human ORC1 homolog, is regulated by cell proliferation *via* the E2F transcription factor[J]. Mol Cell Biol, 1996, 16(12): 6977-6984.

[9] OHTA S, TATSUMI Y, FUJITA M, *et al*. The ORC1 cycle in human cells: Ⅱ. Dynamic changes in the human ORC complex during the cell cycle[J]. J Biol Chem, 2003, 278(42): 41535-41540.

[10] SEMPLE J W, DUNCKER B P. ORC-associated replication factors as biomarkers for cancer[J]. Biotechnol Adv, 2004, 22(8): 621-631.

[11] Mehra P, Biswas A K, Gupta A, *et al*. Expression and characterization of human malaria parasite Plasmodium falciparum origin recognition complex subunit 1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 337(3): 955-966.

[12] DEPAMPHILIS M L. Cell cycle dependent regulation of the origin recognition complex [J]. Cell Cycle, 2005, 4(1): 70-79.

（编辑　薛国文）