论著

文章编号:1000-5404(2010)17-1816-04

Geminin在血管平滑肌细胞分化表型转化中的介导作用

周叶萍,舒茂琴 (400038 重庆,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)

【摘要】 目的 通过比较静止状态的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs)与血清刺激后的VSMCs在分化表型改变中Geminin的表达变化情况,探讨Geminin对VSMCs表型转化的影响。方法 实验设置静止状态(血清饥饿)对照组、血清刺激组,研究不同时相两个组Geminin的分布、活性及表达水平的差异。血清饥饿法可以诱导出VSMCs表型分化及活性差异;免疫荧光染色后激光共聚焦显微镜观察Geminin核内定位;应用PCR检测Geminin基因表达的变化;Western blot检测Geminin蛋白、VSMC合成型标志物骨桥蛋白(osteopontin,OPN)及收缩型标志物平滑肌肌动蛋白相关蛋白(actin-related proteins,ARP)表达的变化。结果 ①静止状态下(血清饥饿)VSMCs以收缩型为主,血清刺激后以合成型为主;②静止状态Geminin几乎全部存在于细胞质内,而血清刺激后Geminin几乎全部定位于胞核内;③Geminin mRNA在血清刺激时明显升高,且在刺激48 h时差异表达最明显,与无血清比较差异具有统计学意义($P<0.05$);④Geminin蛋白和骨桥蛋白在血清刺激时均明显升高,与无血清比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论 Geminin参与介导了VSMCs由收缩型向合成型的转化。

【关键词】 Geminin;血管平滑肌细胞;表型转化
【中图法分类号】 R322.12;R329.24;R394.2 【文献标志码】 A

Role of Geminin in mediating phenotype transformation of vascular smooth muscle cells in rats

Zhou Yeping, Shu Maoqin (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Geminin on phenotype transformation of vascular smooth muscle cells (VSMC) in rats by comparing the expressions of Geminin in resting and serum-simulated VSMC. Methods VSMC were divided into control group (serum starvation group) and serum stimulation group. Differences in distribution, activity, and expression of Geminin were studied between the two groups. Serum starvation was used to induce phenotype differentiation and activity of Geminin. Expression of Geminin was detected by PCR while expression of Geminin protein, synthetic biomarker osteopontin (OPN), SM-2 actin-related proteins (ARP) was detected by Western blotting. Results The contractible form of VSMC was mainly observed in control group followed by synthetic form after serum stimulation. Almost all kinds of resting Geminin were found in cytoplasm and located in nuclei after serum stimulation. The expression levels of Geminin mRNA and protein as well as OPN were significantly higher after serum stimulation than before serum stimulation, especially 48 h after serum stimulation ($P<0.05$). Conclusion Geminin participates in transforming VSMC from contractile to synthetic form.

【Key words】 Geminin; vascular smooth muscle cell; phenotype transformation

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30971228). Corresponding author: Shu Maoqin, Tel: 86-23-68773050, E-mail: shumaoqin@sina.com

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs)表型转化(phenotypic modulation)是高血压、动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄等血管疾病增殖和迁移的关键性起始步骤[1-3]。研究已经证实,Geminin也称为起始特许阻遏子(a repressor of origin licensin),是一种特异性细胞周期相关因子。由Geminin基因编码,存在于细胞核内[4]。本研究通过分析不同表型VSMCs的Geminin表达水平、活性及其分布,旨在探讨Geminin在VSMCs表型转化过程中的作用,从而阐明Geminin在调控VSMCs分化表型过程中的开关作用及其机制,为增生性血管疾病的防治提供更新更合理的作用靶点和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

SD雄性大鼠年龄28~40 d,共25只,体质量115~160 g,由第三军医大学实验动物中心提供;Geminin引物由TaKaRa生

【基金项目】 国家自然科学基金(30971228)
【通信作者】 舒茂琴,电话:(023)68773050,E-mail:shumaoqin@sina.com

物有限公司合成：P1 5′-ATTCCAGCACTTGCACCATGTA-3′，P2：5′-TCACCGGATAGTCAAGAATTTG-3′，长度 22 bp；β-actin：P1：5′-AGCGAGCATCCCCCAAAGTT-3′，P2：5′-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3′，长度 22 bp。本实验所用 RT-PCR 试剂盒为 TaKaRa 公司生产，Santa Cruz 公司生产的兔抗大鼠 Geminin 多克隆抗体。主要试剂有：DMEM 高糖培养基（HyClone），Tripure（Roch 公司），DAPI 染色剂（碧云天），溴化乙锭（EB，Sigma），乙酰胆碱（Sigma）。

1.2　方法

1.2.1　Geminin 核内定位　　VSMCs 爬片培养 24 h 后，用 4% 多聚甲醛固定，进行大鼠抗平滑肌 Geminin 蛋白表达的双标免疫荧光、激光共聚焦检测。一抗为大鼠抗 Geminin 多克隆抗体，二抗为红色荧光标记的抗大鼠 IgG 及绿色荧光的 DAPI 染色剂。

1.2.2　细胞表型分化　　以 10^5 ~ 10^6 将细胞接种于培养皿中，待细胞融合至 90% 时，全部换成无血清培养基，分别于饥饿 24、48 h，将对照组换含 10% FBS DMEM 高糖培养基刺激，分别加入 100 μmol/L 的乙酰胆碱，在显微镜高倍视野下观察细胞形态的变化，以加入乙酰胆碱 30 s 内引发细胞长度明显变短作为判断细胞收缩的标准。

1.2.3　Geminin mRNA 表达的检测　　分别于静止期、血清刺激后 0、6、12、24、48 h 提取总 RNA，进行 RT-PCR 检测。具体步骤如下：①总 RNA 提取：弃去细胞培养液，室温下每 10 cm^2 细胞生长面积（不论细胞数量）加 1 ml Tripure，按试剂盒说明书抽提总 RNA，紫外分光光度计测定 RNA 浓度、纯度符合要求后，进行逆转录。②cDNA 合成：反应体系中按以下顺序取量（参考 TaKaRa 公司试剂盒）：$MgCl_2$ 2 μl，10 × RT Buffer 1 μl，RNaseFree H_2O 3.75 μl，dNTP Mixture 1 μl，RNase inhibitor 0.25 μl，AMV Reverse Transcriptase 0.5 μl，Oligo dT-Adaptor Primer 0.5 μl，RNA 样品 1 μl（≤1 μg total RNA）混匀后，按 30 ℃ 10 min，42 ℃ 30 min，99 ℃ 5 min，5 ℃ 1 min 行反转录反应。立即使用或于 -20 ℃深冻保存。③PCR 反应：用大鼠 Geminin mRNA 引物扩增 cDNA 片段，并与内参对照（β-actin）同时扩增检测转录效率。建立 50 μl 的扩增反应体系，反应条件为 94 ℃ 2 min 1 次，然后 94 ℃ 30 s，52 ℃ 30 s，72 ℃延伸 1 min，共循环 35 次。RT-PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭显色扫入凝胶系统进行成像。

1.2.4　细胞表型标志物及 Geminin 蛋白表达的检测　　VSMCs 培养皿培养，分别于静止期血清刺激后 0、6、12、24、48 h 提取蛋白，Western blot 法进行大鼠抗平滑肌肌动蛋白相关蛋白（actin-related proteins，ARP）多克隆抗体、骨桥蛋白和 Geminin 蛋白表达测定。

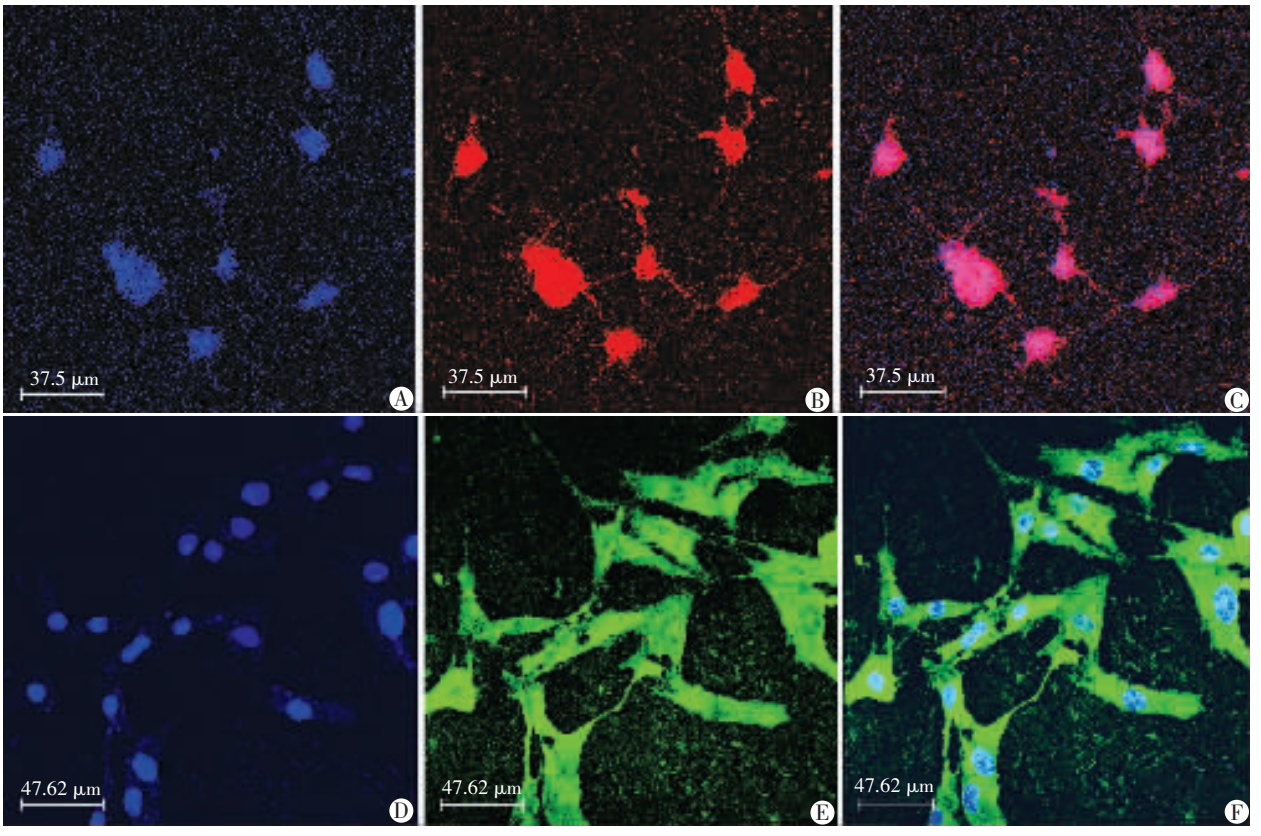
1.3　统计学方法

数据统计分析采用 Sigma plot 11.0 软件，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用 t 检验，各组间的比较采用单因素方差分析。

2　结果

2.1　Geminin 的核内定位

血清培养 24 h 激光共聚焦检测：Geminin 几乎全部定位于细胞核内，细胞质内很少（图 1A ~ C）；而无血清者 Geminin 几乎全部存在于细胞质内，细胞核内几乎无表达（图 1D ~ F）。

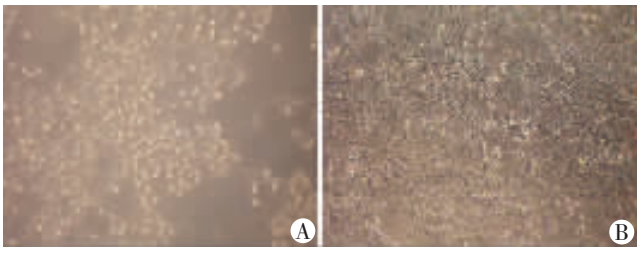


A ~ C：有血清培养；D ~ F：无血清培养；A、D：核染色；B、E：Geminin 染色；C、F：核染色与 Geminin 染色叠加

图 1　免疫荧光染色观察有血清与无血清培养 24 h Geminin 的核内定位　（激光共聚焦显微镜）

2.2 血清饥饿诱导大鼠平滑肌细胞表型分化

用乙酰胆碱(100 μmol/L)处理血清饥饿的VSMC,可在刺激30 s内引发细胞的收缩,于显微镜下可见细胞长度逐渐缩短,由细长的纺锤形变成椭圆形,其收缩强度在血清饥饿48 h达高峰(图2A),在同等条件下,有血清培养的VSMC所产生的收缩反应不明显(图2B)。

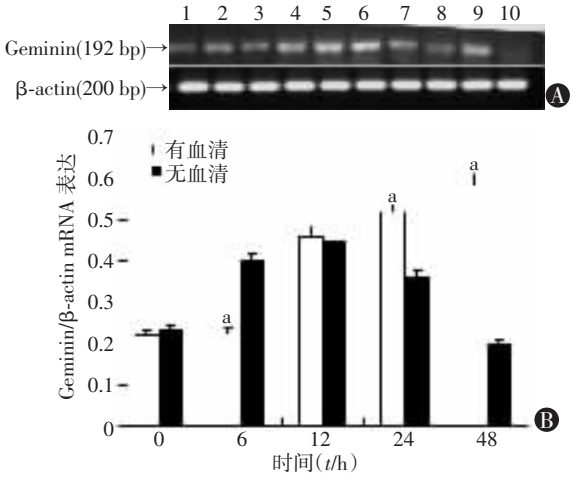


A:乙酰胆碱刺激血清饥饿48 h的细胞;B:乙酰胆碱刺激血清培养48 h的细胞

图2 光学显微镜观察不同刺激条件下细胞形态学变化 (×200)

2.3 血清刺激后不同时相点VSMCs Geminin mRNA的表达

血清刺激0、6、12 h,Geminin mRNA表达无明显差别($P>0.05$),24 h开始增强,48 h最明显,与无血清条件下比较差异有统计学意义($P<0.05$)。结果提示Geminin mRNA的表达与VSMCs的表型分化密切相关,在合成型的细胞表达明显(图3)。



A:RT-PCR结果 1、3、5、7、9:分别为血清刺激0、6、12、24、48 h;2、4、6、8、10:分别为无血清刺激0、6、12、24、48 h

B:半定量分析结果 a:$P<0.05$,与无血清刺激比较

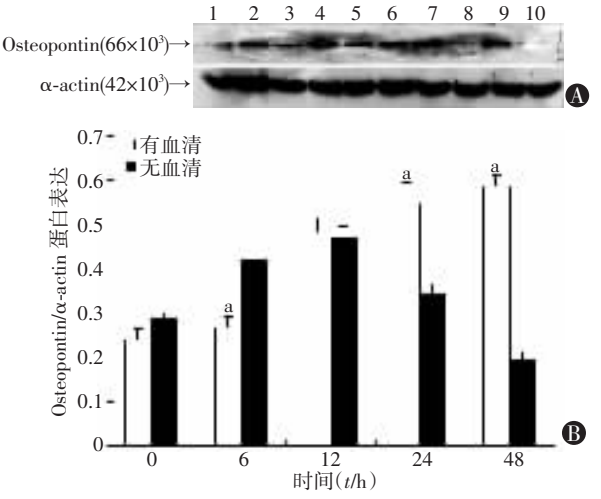
图3 有血清与无血清刺激不同时间Geminin mRNA的表达

2.4 不同分化状态VSMCs表型标志物骨桥蛋白的表达

经α-actin校正后得出:血清刺激0、6、12 h,骨桥蛋白表达无明显差别,24 h开始增强,48 h表达最明显,与无血清比较差异有统计学意义($P<0.05$,图4)。结果提示骨桥蛋白在合成型的细胞表达明显,且呈时间依赖性。

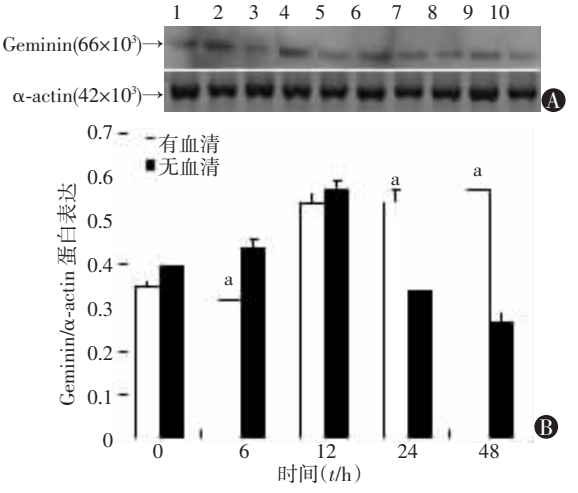
2.5 血清刺激后不同时相点VSMCs Geminin蛋白的表达

经α-actin校正后可以看出:血清刺激0、6、12 h,Geminin蛋白表达无明显差别,甚至6 h无血清刺激表达强于有血清者,这可能与Geminin在核内刚刚募集有关。24 h开始增强,48 h表达最明显,与无血清比较差异有统计学意义($P<0.05$,图5),结果提示Geminin蛋白表达与VSMCs的表型分化密切相关,在合成型的细胞表达明显,这一点与PCR结果基本一致。



A:Western blot结果 1、3、5、7、9:分别为血清刺激0、6、12、24、48 h骨桥蛋白(Osteopontin)的表达;2、4、6、8、10:分别为无血清刺激0、6、12、24、48 h后骨桥蛋白的表达;B:半定量分析结果 a:$P<0.05$,与无血清刺激比较

图4 有血清与无血清刺激不同时间骨桥蛋白的表达



A:Western blot结果 1、3、5、7、9:分别为血清刺激0、6、12、24、48 h;2、4、6、8、10:分别为无血清刺激0、6、12、24、48 h;B:半定量分析结果 a:$P<0.05$,与无血清刺激比较

图5 有血清与无血清刺激不同时间Geminin蛋白的表达

3 讨论

动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄等增生性血管疾病是威胁人类健康最严重的疾病之一,研究其防治策略具有重要意义。血管平滑肌细胞增殖、移行并合成细胞外基质是导致上述血管疾病的共同发病基础,VSMCs表型的转化又是这种细胞增殖和迁移的关键性起始步骤[1-3]。我们的前期研究已经证明,起始特许复合物(如ORC1)是调控VSMCs去分化表型增殖能力重要的转录因子[5]。然而,对于起始特许复合物(如Geminin)与VSMCs表型转化之间的关系,国内外报道甚少,仅有一些间接的依据。我们的实验正是着眼于VSMCs表型转化过程,从而探讨Geminin在其

中所起到的介导作用的。

VSMCs 属于非终末分化细胞、具有增殖潜能。生理状态下位于血管中层的 VSMCs 处于分化表型(收缩表型),可表达至少 10 种收缩蛋白基因(标志性基因)。当血管内膜受损或 VSMCs 体外培养时,VSMCs 通过下调标志基因而使细胞转化为合成表型(去分化表型)。合成表型的标志物之一为骨桥蛋白(Osteopontin)。合成表型的 VSMCs 具有增殖、迁移及合成/分泌大量细胞外基质的能力[1-3]。文献[6]报道血清饥饿可诱导人血管平滑肌细胞再分化。我们的研究证明血管平滑肌细胞收缩强度在血清饥饿 48 h 达高峰,而在同等条件下,有血清培养的 VSMC 所产生的收缩反应不明显。研究已证实血清饥饿诱导的收缩蛋白基因表达和血清应答因子(serum response factor, SRF)与 CArG 顺式元件结合活性的增强有关[7]。随着血清饥饿培养时间的延长,VSMC 逐渐形成多层、束状、成极性排列的形式,对兴奋剂刺激产生的收缩反应明显增强。超汇合状态的去分化型 VSMC 脱离血清刺激后,可以再分化成熟并重新获得收缩能力[5]。

综合国内外研究进展我们得知:首先 Geminin 是真核细胞增殖-分化协同作用的关键分子:①真核细胞每个细胞周期只能进行一次 DNA 复制,以确保基因组的完整性[8,9]。其中特异性复制特许抑制物起到了关键性的作用。Geminin 能精确地调节 DNA 复制,在 S、G_2 和 M 期特异性聚集、阻止 MCM 2-7 与复制特许物结合,最终抑制 DNA 复制。②新近有人采用无细胞 DNA 复制系统,分析了体细胞分化程序起始特许控制的分子机制,结果显示 Geminin 表达成功与否是决定结肠上皮或成纤维细胞再次进入细胞周期的先决条件,额外的 Geminin 阻止了 DNA 再复制[10]。10T/2 成纤维细胞是公认的 VSMCs 前体细胞[9]。我们的实验正是基于这样的理论基础,进一步证明了在大鼠血管平滑肌细胞分化表型转化中 Geminin 通过整合细胞周期和细胞分化在细胞增殖-分化过程中起"开关"作用,即进入细胞周期启动 DNA 复制,退出细胞周期使细胞处于分化状态。其次,Geminin 卷曲螺旋结构确保了真核细胞分化状态的维持:①卷曲螺旋基序广泛分布在各种蛋白质中,如具有收缩特性的系统及转录调节因子等。人类 Geminin 存在卷曲螺旋二聚体基序,其功能形式是低聚物结构,这种寡聚化特征导致了 DNA 复制活性的抑制[11]。Geminin 缺失突变分析也确定了其 C 末端含有保守的亮氨酸拉链(leucine zipper, LZ)DNA 复制抑制区域[12]。②研究显示绝大多数 Geminin 位于 G_2/M 期和 G_1 期的真核细胞染色质上、参与启动/维持完整的细胞质分裂,少部分 Geminin 为细胞核提取物的可溶性成分、参与阻抑 DNA 再复制。不同部位的 Geminin 发挥协同作用,避免分裂失败造成的有丝分裂缺陷及多倍体的形成[13],最终使真核细胞维持在适当的分化状态。本实验中激光共聚焦观察结果再一次论证了上述理论:血清刺激 24 h 检测 Geminin 几乎全部定位于核内,参与调控细胞增殖过程;相反,无血清者 Geminin 几乎全部存在于胞内,确保 VSMCs 分化状态的维持。

我们的实验结果表明:在有血清刺激时细胞以合成型为主,Geminin 在核内高表达,这一点均得到 RT-PCR 与 Western blot 结果验证,即有血清培养细胞处于合成型时,不管在基因水平还是蛋白水平,Geminin 合成型标志物骨桥蛋白升高一致。而在血清饥饿状态下表达非常低或者不表达,随着细胞周期的进行及细胞表型的变化,Geminin 表达随之改变:即表型处于合成型的细胞(即血清刺激)Geminin 大量表达或者高表达,而表型处于收缩型者(即血清饥饿)Geminin 表达明显下降。由此表明:Geminin 与血管平滑肌细胞分化表型转化关系密切,是维持大鼠 VSMCs 分化状态、阻滞去分化细胞 DNA 再复制的关键因子,它参与介导了 VSMCs 由收缩型向合成型的转化,在表型分化中起着关键性的作用。

参考文献:

[1] Newby A C, Zaltsman A B. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia[J]. J Pathol, 2000, 190(3): 300-309.
[2] 李建涛, 舒茂琴, 冯媛媛. ORC1 基因 RNA 干扰对大鼠血管平滑肌细胞表型的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(6): 491-494.
[3] 江明宏, 舒茂琴, 傅晓岚, 等. ORC1 在大鼠血管平滑肌细胞 G_1/S 和 S 期的表达[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(4): 301-304.
[4] 文川, 万伍卿. 细胞周期相关因子 Geminin 及其临床意义[J]. 医学临床研究, 2006, 23(4): 616-618.
[5] Shu M Q, Qin Y L, Jiang M H. RNA interference targeting ORC1 gene suppresses the proliferation of vascular smooth muscle cells in rats[J]. Exp Mol Pathol, 2008, 84(3): 206-212.
[6] 韩梅, 温进坤, 郑斌, 等. 血清饥饿可诱导人血管平滑肌细胞再分化[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 19(2): 250-255.
[7] Miralles F, Posern G, Zaromytidou A I, *et al*. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL[J]. Cell, 2003, 113(3): 329-342.
[8] Mechali M, Lutzmann M. The cell cycle: now live and in color[J]. Cell, 2008, 132(3): 341-343.
[9] Joo H Y, Zhai L, Yang C, *et al*. Regulation of cell cycle progression and gene expression by H2A deubiquitination[J]. Nature, 2007, 449(7165): 1068-1072.
[10] Kingsbury S R, Loddo M, Fanshawe T, *et al*. Repression of DNA replication licensing in quiescence is independent of geminin and may define the cell cycle state of progenitor cells[J]. Exp Cell Res, 2005, 309(1): 56-67.
[11] Nakuci E, Xu M, Pujana M A, *et al*. Geminin is bound to chromatin in G2/M phase to promote proper cytokinesis[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38(7): 1207-1220.
[12] Chen E S, Zhang K, Nicolas E, *et al*. Cell cycle control of centromeric repeat transcription and heterochromatin assembly[J]. Nature, 2008, 451(7179): 734-737.
[13] Caro E, Castellano M M, Gutierrez C. A chromatin link that couples cell division to root epidermis patterning in Arabidopsis[J]. Nature, 2007, 447(7141): 213-217.

(收稿:2010-02-05 修回:2010-04-09)
(编辑 张 维)