

血管紧张素 II 和 DPDPE 对 NG108-15 细胞 c-fos 的影响*

陈素珍** 韩济生

(北京医科大学神经科学研究中心, 北京 100083)

摘 要

本文应用免疫组化, 免疫沉淀和点杂交方法研究了血管紧张素 II(angiotensinII, AII)和 δ 阿片受体激动剂 DPDPE 对 NG108-15 细胞原癌基因 c-fos 表达的影响. 结果表明, 10^{-7} mol/L AII 可诱导 NG108-15 细胞 c-fos 的表达, 显著增加 Fos 样免疫活性 (FLI), Fos 蛋白含量及 c-fos mRNA 的表达, 这些作用能被特异性 AII 受体拮抗剂 Saralasin 拮抗. 10^{-7} mol/L DPDPE 也能加速 NG108-15 细胞 c-fos 的表达, 该效应可被阿片受体阻断剂纳洛酮阻断. 在等摩尔浓度下, AII 的作用显著大于 DPDPE. 将 AII 和 DPDPE 同时作用于细胞, c-fos 被诱导表达的水平等于或反而低于 AII 单独作用时的水平. 以上结果首次报道, 在神经母细胞和胶质细胞杂交株 NG108-15 细胞上, 激活 AII 和 DPDPE 受体均可诱导 c-fos 原癌基因的表达, 而两者同时作用时则有相互抑制效应.

关键词 血管紧张素 II(AII), DPDPE, c-fos, NG108-15 细胞

近年来随着方法学的进展, 新的神经肽不断被发现. 这些神经肽之间是否存在着相互作用, 是一个值得深入研究的前瞻性课题. 在各种神经肽中, 阿片肽是研究较多的一类^[1], 而血管紧张素 II 则被认为具有对抗阿片肽的作用^[2]. 关于阿片肽与 AII 的作用, 曾在整体水平(中枢核团)^[3]、离体器官水平^[4]得到研究, 但至今尚未见在基因水平相互作用的报道.

大量的研究表明, 原癌基因 c-fos 的表达产物 Fos 蛋白, 是跨膜信息传导中的细胞核内信使. Fos 蛋白与 c-jun 原癌基因的表达产物 Jun 蛋白形成二聚体, 作为基因转录调节因子与靶基因上的 AP-1(activator protein-1)位点结合, 从而调节它们的表达. c-fos 及其表达产物是将细胞膜外的刺激与细胞核内基因转录相偶联的因子, 对神经细胞功能尤其是基因的转录调节

1993-01-18 收稿, 1993-06-25 收修改稿.

* 国家自然科学基金、国家博士后基金资助项目.

** 现在地址: 复旦大学遗传学研究所, 上海 200433.

本文缩写: DPDPE — [D-pen², D-pen⁵]Enkephalin; FLI — Fos-like immunoreactivity; DAB — Diaminobenzidine; PMSF — Phenylmethylsulfonyl fluoride; SDS-PAGE — SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

中起重要作用^[5]。

为了研究阿片肽和 AII 对原癌基因 c-fos 表达的影响及两者之间的相互关系,需要一种细胞株在其细胞膜上同时带有阿片受体和 AII 受体。NG108-15 细胞株具备这一条件,并已确定该细胞上的阿片受体属于 δ 受体^[6]。本工作首先观察了选择性的 δ 阿片受体激动剂 DPDPE 以及 AII 单独作用时对 NG108-15 细胞中 c-fos 表达的影响,然后观察两者合并作用时的效果。

1 材 料 与 方 法

1.1 材料

神经母细胞和神经胶质细胞杂交瘤细胞株 NG108-15 细胞由中国医学科学院基础医学研究所药理室任民峰教授惠赠。Fos 多克隆抗体为美国 Oncogene Science Inc. 产品。³⁵S-methionine (met), 1128.5 Ci/mmol 和 α -³²P-dCTP(3000 Ci/mmol) 为美国 NEN 公司产品。c-fos 原癌基因探针由华美生物工程公司提供,片段长度为 1.6kb。随机引物法标记药盒(Random Primer Labeling Kit),美国 Promega 公司产品。ABC 药盒,德国 Vector Labs 产品。无甲硫氨酸的 DMEM 培养基和 10% 金黄色葡萄球菌,美国 GIBCO 公司产品。AII, DPDPE, Saralasin, 盐酸纳洛酮、DAB, DMEM 培养基、HAT 培养添加剂等均为 Sigma 公司产品。

1.2 Fos 免疫组织化学和半定量方法

传代细胞在载玻片上过夜,无血清培养 18h 后,加各种药品孵育不同时间,对照组在同样条件下培养但不加药品处理。孵育完成后用 PBS(pH7.4)洗载玻片,在 4% 多聚甲醛中 4°C 固定 10min,然后按 Hsu 等的 ABC 方法^[7]进行免疫组织化学反应。Fos 抗体浓度为 1:1000(v/v),孵育 36—48h(4°C)。以二氨基联苯胺(DAB)显色。非特异性结合对照组以正常兔血清代替 Fos 抗体孵育。载玻片封片于 IBAS(Image Analysis System, OPTON)图象扫描系统中进行细胞染色密度半定量测定。每个处理选三块载玻片上共 6 个区域(每片任选两个区域,每个区域计数 100 个细胞)进行细胞核染色密度定量。

1.3 细胞标记和免疫沉淀

培养细胞的 ³⁵S-甲硫氨酸标记基本按 Togni 等的方法^[8]进行。细胞接种于 100mm 的培养皿中,待 80—90% 铺满时(约 5×10^7 细胞)于无甲硫氨酸无血清的 DMEM 培养液中孵育 60min 后,换 2ml 含 100 μ Ci/ml ³⁵S-met 和各种处理药物的上述培养液(所有药物浓度均为 10^{-7} mol/L), 37°C 孵育 2h。Fos 蛋白的提取和免疫沉淀按 Curran 等的方法^[9]。分离细胞核,于 RIPA 缓冲液(10mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 150mmol/L NaCl, 1% NP-40, 1% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 1% aprotinin, 0.25mmol/L PMSF)中抽提得细胞核混悬液。1ml 悬液中加 10 μ l (1:10, v/v) c-fos 多克隆抗体, 4°C 孵育 24h 后,加 10 μ l 羊抗兔 IgG 再孵育 1h。加入 250 μ l 10% 金黄色葡萄球菌悬液沉淀免疫复合物。免疫沉淀蛋白质 10% SDS-PAGE 电泳后干胶和放射自显影,并用 IBAS 系统进行条带的密度扫描^[10]。

1.4 斑点杂交

5×10^7 NG108-15 细胞于无血清 DMEM 培养液中培养 18h 后,分别给予药物处理(各种药物浓度均为 10^{-7} mmol/L), 1h 后收集细胞,按 Gough 的方法^[11]提取 RNA, RNA 溶于 1 $\times$ TE 溶液中(0.01mol/L Tris-HCl, pH8.0, 0.001mol/L EDTA), O. D.₂₆₀/O. D.₂₈₀ ≥ 1.80 , 根据 O. D. 值相当于 40 μ g 计算 mRNA 含量。c-fos 原癌基因探针片断长度约为 1.6kb。按随机标记法引

物探针, 标记率为 45%, 比活性约为 $5 \times 10^7 \text{cpm}/\mu\text{g}$. 打点杂交每一样品的总 RNA 用量为 6.25—50 μg (以 $10 \times \text{SSC}$ 连续倍比稀释). 吸印至硝酸纤维素膜上, 杂交过程详见文献 [12]. 应用 IBAS 图象分析仪杂交斑点进行光密度扫描, 作 mRNA 定量分析.

1.5 数据处理

所有实验重复三次以上. 以 IBAS 扫描每一区域 (FLI)、每一条带 (Fos 蛋白)、每一斑点 (c-fos mRNA), 所得密度数值减去其相应的背景值, 计算定量结果. 各次实验结果是相对于对照组所变化的量 (均数 $\pm$ 标准差). 用 ANOVA 加 Duncan's 检验测定其差异显著性.

2 结 果

2.1 AII 和 DPDPE 对 NG108-15 细胞 FLI 的影响以及它们的相互作用

利用免疫组织化学法细胞染色结果表明, 经 18h 无血清培养后对照组 NG108-15 细胞的细胞核只有微弱的 FLI 显现. 在 10^{-7}mol/L AII 刺激 2h 后, FLI 迅速显著增加至高峰, 细胞核染色密度 O.D. 值较对照组增强 66.7%, 之后逐渐下降, 至 8h 后基本恢复到对照水平. 该作用能被 10^{-7}mol/L Saralasin 完全拮抗 (图 1(a)). 图 1(b) 表明, 用 10^{-7}mol/L DPDPE 处理 NG108-15 细胞 2h 后, FLI 较对照组也有增加, 细胞核染色密度较对照组增加 35.5%, 阿片受体阻断剂纳洛酮 (10^{-7}mol/L) 能拮抗 DPDPE 的这种作用. 图 1(c) 表明, 用 AII 和 DPDPE 同时处理 NG108-15 细胞 2—4h 后, 细胞 FLI 较对照组增加 38.7%, 虽仍显著高于空白对照组 ($p < 0.01$), 但明显低于 AII 单独诱异的 FLI 值 ($p < 0.05$), 与 DPDPE 单独诱异的 FLI 水平相接近 ($p > 0.05$). 结果表明它们共同处理细胞后, 对 c-fos 表达的影响不是相加作用, 而可能是 DPDPE 削弱了 AII 的作用.

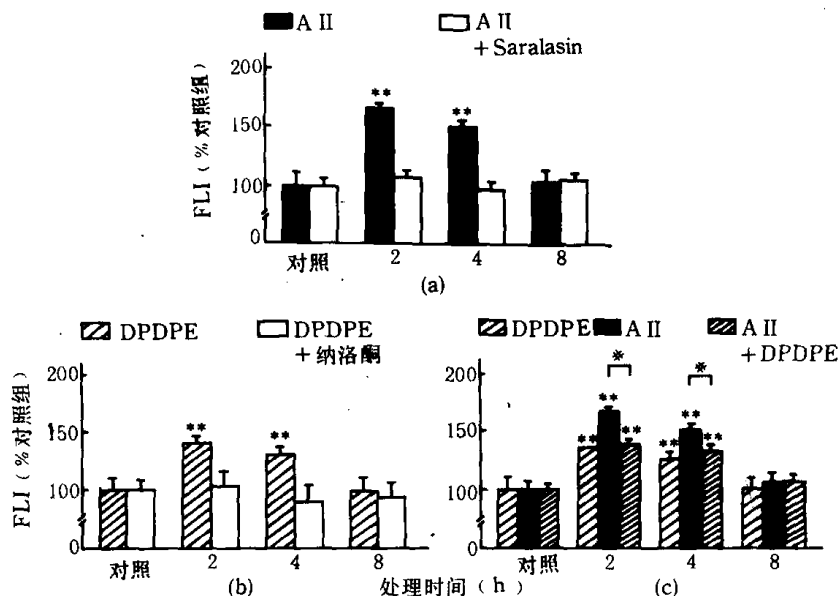


图 1 AII 和 DPDPE 对 NG108-15 细胞 Fos 样免疫活性 (FLI) 的影响以及它们的相互作用

(a) AII 对 FLI 的作用和 Saralasin 的拮抗作用, (b) DPDPE 对 FLI 的作用及纳洛酮的作用, (c) AII 和 DPDPE 的全并作用与空白对照组 (未加药物处理) 比较, ** $p < 0.01$. 两组间比较 # $p < 0.05$

2.2 AII 和 DPDPE 对 NG108-15 细胞 Fos 蛋白的影响以及它们的相互作用

利用 ^{35}S -met 参入和抗体免疫沉淀, SDS-PAGE 和放射自显影结合条带的光密度扫描技术, 发现分别用 10^{-7}mol/L AII 和 DPDPE 处理 NG108-15 细胞 2h 后均能诱导 Fos 蛋白的生成增加, AII 的作用大于 DPDPE, 它们的作用可被相应的受体拮抗剂 Saralasin 和纳洛酮阻断. 10^{-7}mol/L AII 和 10^{-7}mol/L DPDPE 同时处理细胞后, Fos 蛋白的形成低于 AII 或 DPDPE 单独诱导的 Fos 蛋白水平 (图 2). 说明两者的相互作用不是加强而可能是相互拮抗的. 免疫沉淀得到的 Fos 蛋白生成结果与免疫组化的结果基本符合.

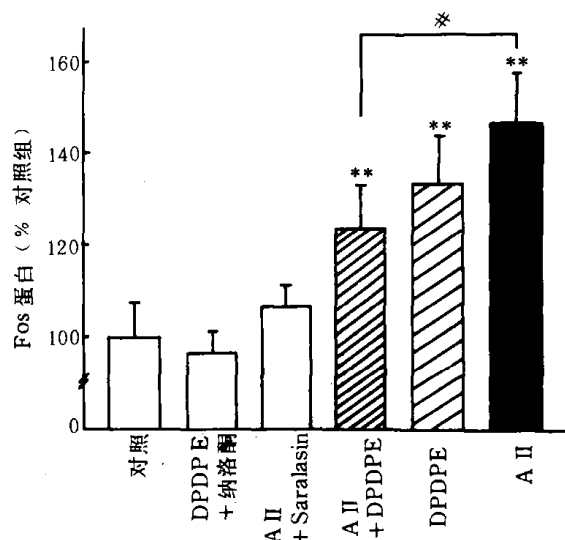


图 2 AII 和 DPDPE 对 NG108-15 细胞 Fos 蛋白的影响以及它们的相互作用

与空白对照组 (未加药物处理) 比较, ** $p < 0.01$. 两组间比较, # $p < 0.05$.

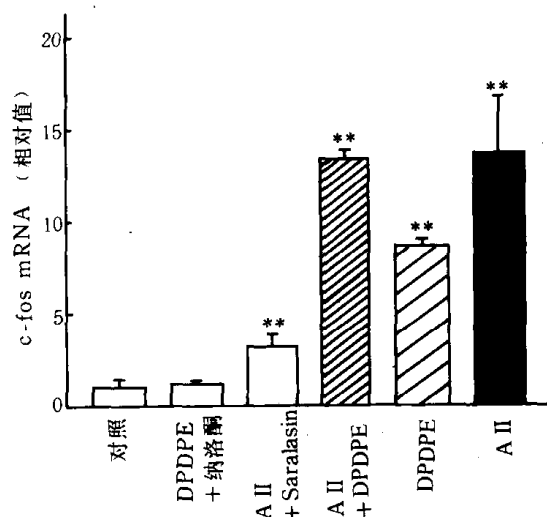


图 3 AII 和 DPDPE 对 NG108-15 细胞 c-fos mRNA 的影响以及它们的相互作用
与空白对照组比较, ** $p < 0.01$

2.3 AII 和 DPDPE 对 NG108-15 细胞 c-fos mRNA 表达的影响以及它们的相互作用

在了解了 AII 和 DPDPE 对 Fos 蛋白生成的影响之后, 我们又进一步观察了它们对 c-fos mRNA 合成的作用. 由图 3 可见, AII 和 DPDPE 处理 NG108-15 细胞 1h 后, 均能使该细胞的 c-fos mRNA 的合成显著增加, AII 的作用大于 DPDPE, 纳洛酮能完全阻断 DPDPE 的作用, Saralasin 也能大部分阻断 AII 的作用. AII 和 DPDPE 共同处理细胞后, c-fos mRNA 的合成没有进一步增加, 而是与 AII 单独作用的水平相似 ($p > 0.05$).

3 讨 论

原癌基因是一类广泛存在于真核细胞核内的基因. 近年来的研究证明原癌基因的正常细胞的增殖、分化和细胞信息传递过程中起着十分重要的作用. 近年来的一些实验证明, c-fos 原癌基因与调节细胞的功能有关, 许多细胞外刺激能诱导 c-fos 转录增加, 一些能激活钙通道的条件和神经递质均能引起 c-fos 转录增加. 许多作者已将 c-fos 视为核内第三信使, 它可通过调节靶基因表达而使短时程的细胞外刺激转化为细胞功能的长时程作用的一个重要介体^[13].

许多研究证明, AII 可以促进心肌和平滑肌细胞 fos, jun 和 myc 原癌基因的作用是瞬时性的^[14]. 多数作者认为 c-fos 表达的最主要特性是多种外源刺激后均引起 c-fos 快速和瞬时表达. 我们的结果证明 AII 可通过受体激活诱导 NG108-15 细胞的 c-fos mRNA 和 Fos 蛋白生成增多. 从时间过程来看, 10^{-7}mol/L AII 处理 NG108-15 细胞后, FLI 于

2h 达高峰, 此后逐渐降低, 于 8h 基本回复到正常水平. δ 阿片受体激动剂 DPDPE 对 NG108-15 细胞 FLI 影响的时程变化基本与 AII 的作用相似, 尽管它们的作用强度显著低于 AII.

有关 c-fos 与阿片肽的关系, 曾有报道大鼠皮下注射吗啡 (10mg/kg) 可使富含 μ 受体的尾壳核 c-fos mRNA 迅速增加, 45min 达高峰, 90min 后恢复至基础水平, 这一效应可被纳洛酮完全阻断. 急性吗啡处理可明显增加下丘脑腹内侧核的 FLI, 而弓状核不受影响, 说明吗啡诱导的 c-fos 表达有部位特异性^[15]. 在细胞水平, δ 阿片受体激动剂 DPDPE 对 c-fos 的影响尚未见报道. 本文结果首次证明, 10^{-7} mol/L DPDPE 可诱导 NG108-15 细胞 FLI 增强, Fos 蛋白生成增加和相应的 c-fos mRNA 表达增多, 这种作用可被阿片受体拮抗剂纳洛酮完全阻断, 说明是阿片受体介导的.

本工作观察了 AII 和 DPDPE 对 NG108-15 细胞 c-fos 原癌基因的作用, 结果表明 AII 和 DPDPE 均可激活该细胞的 c-fos 表达, AII 的作用显著大于 DPDPE. 这两者的作用均可被各自的受体拮抗剂所阻断. 它们共同处理细胞后, Fos 蛋白的表达水平未见进一步加强, 即没有相加作用, 而是处于 AII 单独作用的水平 (c-fos mRNA) 或 DPDPE 单独作用的水平 (ELI), 甚至低于 DPDPE 单独作用的水平 (Fos 蛋白). 由于两者的作用方向是一致的, 还很难判断是 AII 削弱了 DPDPE 的作用, 抑或 DPDPE 削弱了 AII 的作用. 我们推测可能是 DPDPE 削弱了 AII 的作用.

Sonnenberg^[16]等的研究结果认为, 前脑啡肽原基因 ProEnk 可能是 Fos/Jun 复合体作用的靶基因. 已知 NG108-15 细胞可产生多种神经肽, 包括 Enk 等. AII 和 DPDPE 激活 NG108-15 细胞的 c-fos 是否作用于 ProEnk 基因而调节其表达水平, 尚需进一步研究证明. 我们认为不同刺激诱导的 c-fos 激活由于时程和水平及作用点的差异, 引起的靶基因激活也将各异.

参 考 文 献

- [1] Olson, G. A. et al., *Peptides*, 1990, 12:1407—1432.
- [2] 王克威等, 北京医科大学学报, 1989, 21:7—9.
- [3] 王晓民等, 中国药理学报, 1989, 10:294—299.
- [4] Kaneko, S. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1985, 126:587—593.
- [5] Morgan, J. I. et al., *Annu. Rev. Neurosci.*, 1991, 14:421—451.
- [6] Osugi, T. et al., *Brain Res.*, 1986, 37:84—89.
- [7] Hsu, S. M. et al., *J. Histochem. Cytochem.*, 1981, 29:577—580.
- [8] Tongi, P. D. et al., *Mol. Cell Biol.*, 1988, 8:2251—2256.
- [9] Curran, T. et al., *Cell*, 1984, 36:259—268.
- [10] Chamberlain, J. P. et al., *Anal. Biochem.*, 1979, 98:132—135.
- [11] Gough, N. M. et al., *Anal. Biochem.*, 1988, 173:93—95.
- [12] Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [13] Cantley, L. C. et al., *Cell*, 1991, 64:281—302.
- [14] Taubman, M. B. et al., *J. Biol. Chem.*, 1989, 264:526—530.
- [15] Cheng, S. L. et al., *Life Sci.*, 1990, 46:1825—1832.
- [16] Sonnenberg, J. L. et al., *Science*, 1989, 246:1662—1625.