



金钱鱼凋亡相关基因SaAR对NIH-3T3细胞凋亡的影响

成纤维细胞的激活、向血管内膜迁移以及增殖在血管阻塞性疾病的发生发展中起着重要的作用[1][2]。在特定的时间点上诱导新生内膜中的成纤维细胞凋亡能够限制血管新生内膜的形成[2]。本实验室从金钱鱼毒腺cDNA文库中新得到了一个与细胞凋亡相关的cDNA克隆,命名为金钱鱼凋亡相关基因SaAR (Scatophagus argus apoptosis related gene)。本研究观察了SaAR对NIH-3T3细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM培养基、胎牛血清(FBS)、0.25%胰酶均购自Hyclone公司;一次性细胞培养瓶、96孔板购自Corning公司;HEPES为美国Sigma公司产品;其它均为国产分析纯。

金钱鱼采自广东省湛江市南海海域。对金钱鱼毒腺cDNA文库克隆的大规模序列测定,序列测定方法为随机挑选文库克隆,按OMEGA BIOTEK Plasmid Miniprep Kit的方法提取质粒。使用ABI PRISM 377 DNA Analyzer (Applied Biosystems),采用T7和SP6通用引物为测序引物,进行正反向序列测定,对cDNA片段超过1000 bp的序列,根据已测得的序列设计引物,继续测通cDNA。测序工作由中山大学生命科学学院国家高技术计划海洋生物功能基因组开放实验室完成。序列分析采用Altschul[3]描述的方法进行。获得了一个编码SaAR的cDNA克隆。

1.2 细胞培养

NIH-3T3细胞株购自ATCC(American Type Culture Collection)。细胞以含10%胎牛血清的DMEM培养基培养,置于37℃、5%CO₂孵箱中,当细胞生长达到亚融合状态时收获细胞供实验所用。

1.3 质粒pcDNA3-SaAR转染NIH-3T3细胞

按Clontech公司CLONfectin™说明书的操作进行,空载体pcDNA3质粒转染作为对照,空白对照为含10%FBS的DMEM培养基。

1.4 流式细胞仪检测NIH-3T3细胞凋亡百分率

转染后48 h,4℃、1 000 r/min离心5 min以收获细胞;PBS洗两次,4℃、1 000 r/min离心5 min,弃上清,用含2%FBS的PBS制备单细胞悬液,使细胞数为 1×10^6 / ml;吸取1 ml细胞至15 ml离心管中,加3 ml冰无水乙醇;4℃固定细胞24 h。PBS洗两次,加入1 ml的PI染色液,而后加入50 μg /ml的RNase A,4℃孵育3 h;在流式细胞仪Elite(美国Coulter公司)上进行分析。以Sub-G₁的细胞百分率为凋亡百分率。

1.5 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS11.0软件包,采用ANOVA One-way 和Student-Newman-Keuls检验。

pcDNA3-SaAR真核表达质粒经CLONfectin™试剂被转染至NIH-3T3细胞中，通过瞬时表达SaAR蛋白，研究其对NIH-3T3细胞凋亡的影响。SaAR转染后48 h用流式细胞仪测定NIH-3T3细胞DNA结合PI的荧光强度，在DNA的荧光直方图中，凋亡细胞表现为G₁/G₀峰前低宽的亚二倍体峰(图1)。统计分析表明，SaAR蛋白有诱导NIH-3T3细胞凋亡的活性，且活性的高低呈现出一定程度的剂量依赖性(P<0.05，表1)。

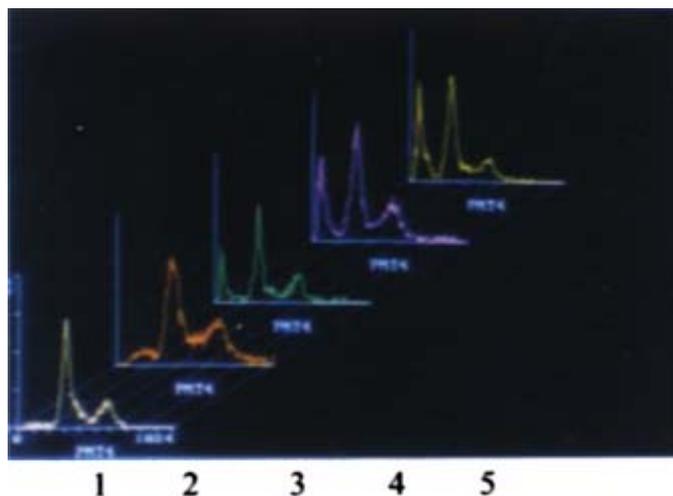


图1 SaAR蛋白转染后NIH-3T3细胞的荧光强度

Fig.1 Fluorescence intensity of NIH-3T3 cells induced by SaAR protein
Line 1: Control; Line 2: pcDNA3; Line 3: 2 µg /ml SaAR; Line 4: 3 µg /ml SaAR; Line 5: 4 µg /ml SaAR

表 1 SaAR 蛋白诱导的 NIH-3T3 细胞凋亡
结果 (n=6, $\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Apoptosis of NIH-3T3 cells induced
by SaAR protein (n=6, Mean±SD)

| Group | Apoptosis rate (%) |
|----------------|---------------------------|
| Control | 3.32±0.60 |
| pcDNA3 | 6.37±0.56 |
| SaAR (2 µg/ml) | 11.89±1.13* |
| SaAR (3 µg/ml) | 18.25±1.86** |
| SaAR (4 µg/ml) | 22.34±1.08** [‡] |

*P<0.05 vs control group; **P<0.05 vs SaAR 2 µg/ml group; [‡]P<0.05 vs SaAR 3 µg/ml group

3 讨论

血管损伤后，位于血管外膜的成纤维细胞由“静止”状态转为“激活”状态，迁移至内膜下区域和新生内膜中增殖，外膜成纤维细胞迁移到新生内膜发生增殖的最高峰在损伤后3 d，随后增殖指数进行性下降，在第28天降至损伤前水平[4]。细胞凋亡在胚胎发育、组织发生、造血细胞增殖与分化等许多方面起着重要的作

用。人TFAR15是细胞因子撤除后诱导TF-1细胞凋亡过程中,克隆到表达增加的一个新基因。初步研究发现,重组TFAR15蛋白对某些细胞有一定抑制凋亡的作用[5]。本实验室在对金钱鱼(*Scatophagus argus*)毒腺cDNA文库的随机测序过程中获得了一个与人类凋亡相关基因TFAR15编码蛋白同源性达76%的全长cDNA克隆命名SaAR。我们推测SaAR编码蛋白可能与TFAR15有类似的功能,经研究证明SaAR基因转染血管外膜成纤维细胞有一定的诱导凋亡作用,最高凋亡率达22.34%,并呈现剂量依赖性。利用计算机软件对金钱鱼SaAR编码蛋白的功能区进行分析,发现SaAR具有4个可能的Casein kinase II磷酸化位点(分别位于第2、94、128和145位氨基酸),4个可能的PKC磷酸化位点(分别位于第41、128、145和171位氨基酸),提示它们可能受磷酸化调节,在细胞凋亡信号传导中起一定的作用。从SaAR对成纤维细胞凋亡的诱导作用和人TFAR15对某些细胞凋亡的抑制作用来看,两者在细胞凋亡功能方面可能起着相反的作用。这可能是因SaAR与hTFAR15在一级结构氨基酸序列上的差异导致。

综上所述, SaAR基因转移对体外培养的NIH- 3T3细胞凋亡有一定的诱导作用并呈现剂量依赖性。

参考文献:

[1] Sartore S, Chiavegato A, Faggin E, et al. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant[J]. *Circ Res*, 2001, 89(12): 1111-21.

[2] Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies[J]. *Nat Med*, 2002, 8(11): 1249-56.

[3] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, et al. Gapped BLAST and PSI- BLAST: A new generation of protein database search programs[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(17): 3389-402.

[4] Shi Y, Pieniek M, Fard A, et al. Adventitial remodeling after coronary arterial injury[J]. *Circulation*, 1996, 93(2): 340-8.

[5] 王玉刚, 刘洪涛, 张颖妹, 等. 一个人类凋亡相关新基因TFAR15的cDNA 克隆化和表达[J]. *中国科学(C辑)*, 1999, 42: 323-9.

参考文献:

[1] Sartore S, Chiavegato A, Faggin E, et al. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant[J]. *Circ Res*, 2001, 89(12): 1111-21.

[2] Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies[J]. *Nat Med*, 2002, 8(11): 1249-56.

[3] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, et al. Gapped BLAST and PSI- BLAST: A new generation of protein database search programs[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(17): 3389-402.

[4] Shi Y, Pieniek M, Fard A, et al. Adventitial remodeling after coronary arterial injury[J]. *Circulation*, 1996, 93(2): 340-8.

[5] 王玉刚, 刘洪涛, 张颖妹, 等. 一个人类凋亡相关新基因TFAR15的cDNA 克隆化和表达[J]. *中国科学(C辑)*, 1999, 42: 323-9.