

# GnRH类似物对培养的大鼠胃平滑肌细胞 蛋白激酶C活性的影响\*

陈 蕾 李东红 姚元庆 刘丽宏 黄威权 \*\*

( 第四军医大学组织胚胎学教研室, 西安 710032) ( 第四军医大学唐都医院妇产科, 西安 710038)

( 第四军医大学药理学教研室, 西安 710032)

**摘 要** 研究 GnRH 类似物阿拉瑞林 (Alarelin) 对大鼠胃平滑肌细胞蛋白激酶 C (PKC) 活性的影响, 采用放射性同位素法测定 PKC 的活性, 发现: (1) 阿拉瑞林可使培养的大鼠胃平滑肌细胞中 PKC 活性明显升高, 3 min 时达高峰, 10 min 后作用明显降低, 且成剂量依赖性。当阿拉瑞林为  $10^{-5}$  mol/L 时, PKC 活性最高,  $10^{-9}$  mol/L 时其对 PKC 的作用基本消失; (2) 当用佛波醇酯 (phorbol 12 myristate 13-acetate, PMA) 短期作用激活 PKC 后, 再加入阿拉瑞林, 仍可使 PKC 活性略有升高, 但无显著性差异; 当用 PMA 长期持续作用耗竭 PKC 后, 再加入阿拉瑞林作用 3 min, 它不能激活 PKC, 与单纯的阿拉瑞林作用 3 min 组相比差异显著; (3) 在无外  $Ca^{2+}$  时, 阿拉瑞林也可使 PKC 活性升高, 但不如单独用阿拉瑞林作用 3 min 组的高。因此 PKC 活性的增高, 并不完全依赖细胞外  $Ca^{2+}$ , 它可以动员胞内  $Ca^{2+}$  的释放激活 PKC, 说明 GnRH 类似物可使胃平滑肌细胞中 PKC 活性增加, PKC 参与阿拉瑞林对胃平滑肌细胞调控的信号转导过程。

**关键词** GnRH 类似物 PKC 放射性化学分析测定 大鼠胃平滑肌细胞

越来越多的实验已经表明, 消化系统广泛存在有促性腺激素释放激素 (Gonadotropin-releasing hormone, GnRH) 受体 (金花淑等, 1998; 姚兵等, 1999; 姚兵等, 2000), 我们先前的实验已证明, 大鼠胃平滑肌细胞能表达 GnRH 受体 (陈蕾等, 2002), 而且 GnRH 类似物对胃平滑肌细胞内钙离子浓度变化有一定的影响, 说明  $Ca^{2+}$  是 GnRH 对平滑肌细胞调节的信号转导分子 (陈蕾等, 2000), 但还有哪些转导分子参与该信号转导过程, 值得深入研究。本实验采用放射性化学分析测定的方法, 观察了阿拉瑞林对培养的大鼠胃平滑肌细胞中蛋白激酶 C (PKC) 活性的影响, 为了解 GnRH 对平滑肌细胞调控的信号转导机制提供新的依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂

阿拉瑞林购自上海丽珠东风生物技术有限公司, PPO、POPOP、胶原酶购自 Sigma 公司, 胰蛋白酶购自华美公司; DMEM 培养粉、PKC 活性

检测试剂盒为 Gibco 产品; [ $^{32}$ P] ATP 购自北京亚辉生物医学工程公司; EDTA、小牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所。

### 1.2 大鼠胃平滑肌细胞的培养

根据参考文献 (Fatigati, 1984) 介绍的方法并稍作修改。选用 1~3 d 的雄性 SD 大鼠, 75% 酒精消毒腹部后, 暴露腹腔。剪取胃部, 立即置冰冷的 Hanks 液中, 仔细刮除食物残渣及粘膜, 留下肌层和外膜, 用冰冷的 Hanks 冲洗 3~4 次。用剪刀剪碎后, 置于一定量的 1 g/L 胶原酶中, 放置 37℃ 搅拌消化 60 min, 每 20 min 收集一次细胞, 离心中止消化, 以 DMEM 培养液 (含 100 mg/L 小牛血清) 制备成细胞悬液, 并调整细胞密度为  $1 \times 10^6$ /ml。种植入培养瓶中, 置 37℃, 50 mL/L  $CO_2$  培养箱中孵育, 贴壁 90 min 后, 将细胞悬液移入另一培养瓶, 以后每 3 d 换液一次。至平滑肌细胞长满成单层, 此时细胞呈典型的“峰谷”状排列。免疫组化显示, 培养细胞为  $\alpha$ -actin 反应阳性, 证实为平滑肌细胞。以 250 mg/L 胰酶消化传代。将 3~5 代 SSMC 接种于 10 cm 的培养皿中, 待细

2001-02-02 收稿, 2001-06-30 修回

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39770388)

\*\* 通讯作者 E-mail: huangwq@fmmu.edu.cn

第一作者简介 陈蕾, 36 岁, 女, 博士。研究方向: 胃肠激素。

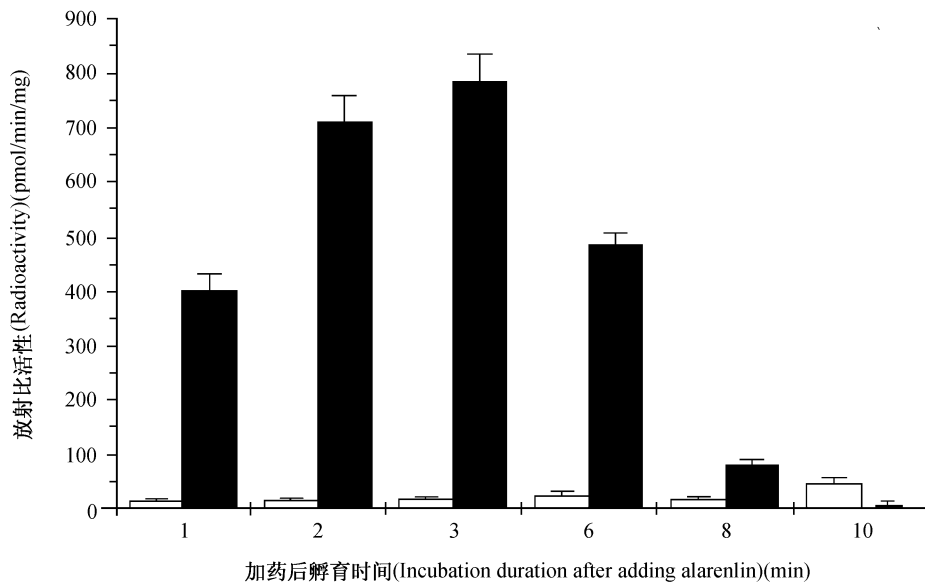


图 1 GnRH 类似物对培养的大鼠胃平滑肌细胞 PKC 活力影响的时间依赖性

Fig. 1 Effect of Alarelin on PKC activity in time-dependence in cultured rat SSMC

: 胞浆 PKC 活性 (PKC of cytosol) : 胞膜 PKC 活性 (PKC of membrane) : 标准差的误差线 (Error line for SD)

胞长满后, 换用无血清的 DMEM 培养液, 按不同的时间段, 不同浓度的阿拉瑞林, 同时观察在 PMA 作用下和有外钙时, GnRH 类似物对 PKC 活性的影响, 而在研究 PMA 作用时又分为 A、B、C 三组。按不同时间段进行孵育, 然后收集细胞, 置 -70 °C 冰箱保存备用。

### 1.3 PKC 活性测定

**1.3.1 细胞浆和细胞膜 PKC 的制备** 在细胞收集之前, 先加入 PKC 提取液, 内含: Tris-HCl (pH7.5) 20 mmol/L, EGTA 0.5 mmol/L, EDTA 0.5 mmol/L, Triton X-100 25 μg/ml, 1 mol/L 巯基乙醇 10 μl/ml, 在冰浴下超声粉碎, 900 rpm 4 °C 离心 5 min 去除碎片和胞核, 得上清为胞浆和胞膜的组分, 然后将上清经低温 100 000 ×g 离心 30 min, 上清为胞浆组分; 残渣垂悬于含 1% 的 Triton X-100 4 °C 以下的 PKC 提取液中再次冰浴下超声粉碎, 置冰上震荡 45 min, 然后 4 °C、100 000 ×g 离心 30 min, 取上清作为胞膜的部分。

**1.3.2 PKC 活性测定** 按参考文献 (Andrews, 1990) 进行, 把 [<sup>32</sup>P] ATP 配成含 20 ~ 25 μCi/ml 的溶液中, 并加入 5 × PKC 的底物溶液中, 内含 (250 μmol/L M Ac-MBP, 100 μmol/L ATP, 5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 100 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 20 mmol/L Tris pH 7.5), 取 5 μl 加入测量管中, 立即放入 30 °C 水浴锅中孵育 5 min, 然后将样品点到磷酸纤

维素膜, 并用 1% 磷酸振洗膜 5 min ×2 以终止反应, 37 °C 烘干, 将每个膜放入测试管中, 加入闪烁液, 置 Beckman LS 3801 上测量。

**1.3.3 蛋白定量** 按 Lowry 法测定 (Lowry, 1951)。

**1.3.4 PKC 活力定义** 一个酶活力单位相当于每 mg 蛋白每分钟向底物转运磷酸的 pmol 数。

**1.3.5 统计方法** 采用 SPSS 统计软件对不同时段和组间的数据进行单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 GnRH 类似物对培养的大鼠胃平滑肌细胞 PKC 活力影响的时间依赖性

以阿拉瑞林配制成终浓度为 10<sup>-5</sup> mol/L 的无血清培养液与胃平滑肌细胞共同孵育不同的时间后, 分别测定其胞浆和胞膜的 PKC 活性。结果显示阿拉瑞林可明显促进胃平滑肌细胞中 PKC 的活性, 3 min 时其活性达到峰值, 胞膜的 PKC 活性最大, 然后逐渐下降, 至 10 min 时, 其活性基本消失, 而胞浆的 PKC 除 10 min 无明显变化 (n = 4, 图 1)。

### 2.2 不同浓度的阿拉瑞林对胃平滑肌细胞中 PKC 活力的影响

分别把阿拉瑞林配制成终浓度为 10<sup>-9</sup>、10<sup>-8</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-6</sup> 和 10<sup>-5</sup> mol/L 五个浓度梯度, 孵育

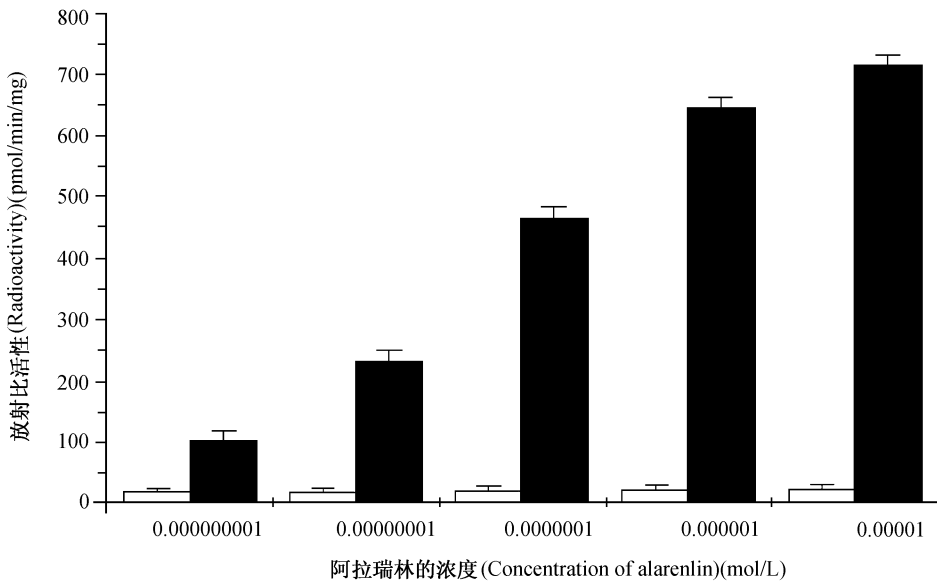


图 2 不同浓度的阿拉瑞林对胃平滑肌细胞中 PKC 活力的影响

Fig. 2 Effect in various concentration of Alarelin on PKC activity in cultured rat stomach smooth muscle cell  
: 胞浆 PKC 活性 (PKC of cytosol) : 胞膜 PKC 活性 (PKC of membrane) : 标准差的误差线 (Error line for SD)

3 min 后, 分别测定胃平滑肌细胞中胞浆和胞膜的 PKC 的总活力, 发现当阿拉瑞林浓度为  $10^{-5}$  mol/L 时, 其 PKC 的活力最高, 当浓度为  $10^{-9}$  mol/L 时, 其 PKC 活性已接近基础水平 ( $n=4$ , 图 2)。

### 2.3 在 PMA 作用下 GnRH 类似物对 PKC 总活性的影响

肿瘤促进剂 PMA 对 PKC 有双重作用, 在短时间内, 它是激动剂, 长时间内则为抑制剂。组 A 为 PMA 组, 用终浓度为  $10^{-9}$  mol/L 的 PMA 刺激 SSMC 作用 10 min 可使 PKC 活性达最高峰; 组 B 为在组 A 的基础上再加入终浓度为  $10^{-5}$  mol/L 的阿拉瑞林刺激 3 min; 组 C 为 PMA 作用 12 h, 以耗竭 SSMC 内 PKC 活性, 再加入终浓度为  $10^{-5}$  mol/L 阿拉瑞林作用 3 min。结果发现, 组 B 和组 A 比, PKC 活性没有显著性差异 ( $P > 0.05$ ); 组 C 与组 A 相比, PKC 活性明显降低, 两者差别非常显著 ( $P < 0.01$ ,  $n=4$ , 图 3)。

### 2.4 GnRH 类似物对 PKC 活性影响的 $Ca^{2+}$ 依赖性

在培养液中加入 5 mmol/L EGTA 耗竭细胞外  $Ca^{2+}$  后, 再加入  $10^{-5}$  mol/L 的阿拉瑞林继续孵育 3 min, 发现在无外  $Ca^{2+}$  的情况下, PKC 活性明显降低 ( $P < 0.01$ ,  $n=4$ , 见图 4)。

## 3 讨论

自从 Schally *et al.* 在 70 年代分别从猪和羊的

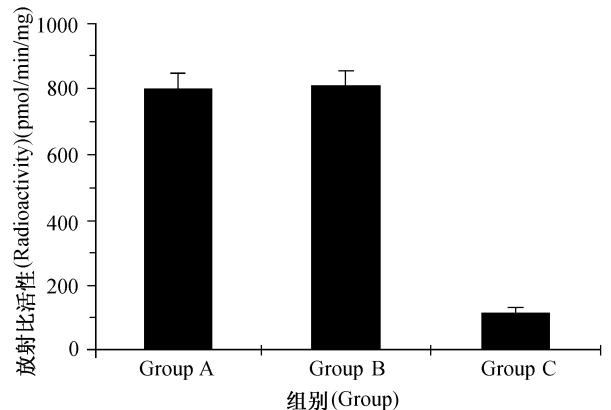


图 3 在 PMA 作用下 GnRH 类似物对 PKC 总活力的影响

Fig. 3 Effect of Alarelin on PKC total activity in cultured rat SSMC which preincubated with PMA  
: 标准差的误差线 (Error line for SD) 组 A 与组 B 无差异 (No difference exists between Group A and Group B,  $P > 0.05$ , One-Way ANOVA) 组 A、组 B 均与组 C 有显著差异 (Either Group A or Group B is significantly different from Group C, all  $P < 0.01$  One-Way ANOVA)

下丘脑分离出 GnRH 以来, 人们已经发现它广泛分布于神经、内分泌、生殖、免疫和消化系统中, 而且是这些系统相互联系的重要信使之一。GnRH 的信号转导涉及多个途径 (Lin, 1999), 其中 PKC 是最重要的转导途径之一。PKC 是一种  $Ca^{2+}$  和磷脂依赖性蛋白激酶, 通过催化多种靶蛋白磷酸

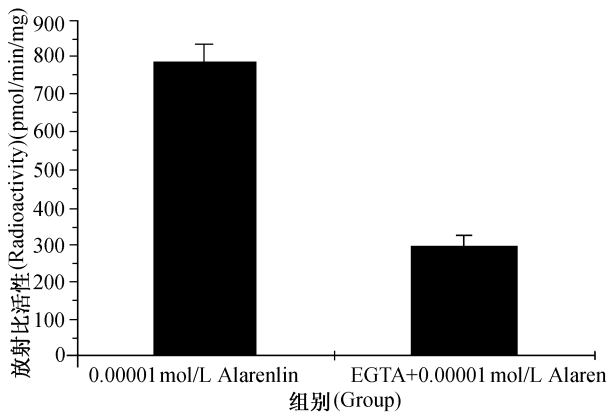


图4 GnRH类似物对PKC活性影响的Ca<sup>2+</sup>依赖性

Fig. 4 Calcium dependence of GnRH analogue-mediated PKC activity

: 标准差的误差线 (Error line for SD) 存在显著的组间差异 (Significant difference exists between the two groups,  $P < 0.01$ )

化反应, 完成细胞对外源信号的应答。PKC 主要以非活性的形式存在于胞浆部分, 以活性形式结合于细胞膜。当外来刺激它以后, 就会出现 PKC 从胞浆到胞膜的转移, 其激活以后, 可以参与介导多种生理功能。

阿拉瑞林是一种稳定的 GnRH 类似物, 它可以使 PKC 激活, 并使之发生质膜的转移, McArdle *et al.* (1986) 研究发现, 在切除卵巢的大鼠, 给予阿拉瑞林以后, 其垂体前叶细胞 PKC 活性的变化有明显的时间和剂量依赖性。本实验中, 对培养的大鼠胃平滑肌细胞给予小剂量阿拉瑞林后, 检测不同时间点的 PKC 活性, 结果显示, 在 3 min 时, PKC 的活性达到最高峰, 以后逐渐下降, 至 10 min 后其活性基本消失, 同时, 给予不同浓度的阿拉瑞林, 其对胃平滑肌细胞 PKC 活性的影响不同, 随着药物浓度的逐渐增加, 其 PKC

活性也逐渐增大,  $10^{-5}$  mol/L 最大, 而且有明显的剂量依赖性。说明阿拉瑞林可明显刺激胃平滑肌细胞中 PKC 的活性, 这一结果与 Nikula *et al.* (1998) 报道的 GnRH 类似物对 Leyding 细胞 PKC 活性影响的研究结果相一致。

肿瘤促进剂佛波醇酯 PMA 是 PKC 的激动剂, 可作用于 PKC 催化结构域 (Azzi, 1992), 引起 PKC 的活化。但是, PMA 长时间的持续作用, 则可下调甚至是耗竭 PKC 的活性 (Nishizuka, 1986; Adams, 1989)。实验中发现, PMA 作用 10 min 后, 再加入阿拉瑞林, 仍可使 PKC 的活性略有升高, 但与第一组相比, 无显著性差异; 若加入 PMA 12 h 以后再加入 GnRH 类似物, 其 PKC 活性比第一组明显降低 ( $P < 0.01$ ), 其结果与 Drouva *et al.* (1990) 在研究雌激素对垂体细胞的结果相一致, 其机制可能是 PMA 持续刺激 PKC, 使 PKC “耗竭”, 当再加入药物时, PKC 对其无反应。实验中还发现, 在无外钙的情况下, 加入阿拉瑞林, 可使 PKC 活性略有升高, 说明 GnRH 类似物在无外钙的情况下可以动员细胞内钙从钙池中释放, 其作用机制可能是 GnRH 类似物与质膜上的特异性受体结合, 进而激活磷脂酶 C (PLC), 使磷脂酰肌醇二磷酸 (PIP<sub>2</sub>) 分解为甘油二酯 (DG) 和 1, 4, 5-3, 三磷酸肌醇 (IP<sub>3</sub>), 作用于胞内 Ca<sup>2+</sup> 池, 促进内钙释放, 导致胞内 Ca<sup>2+</sup> 升高, 进一步激活 Ca<sup>2+</sup>/ 磷脂依赖的蛋白激酶 (PKC), 同时 DG 也可以激活 PKC, 这样就可以导致 PKC 活性的上升。

以上实验说明, PKC 参与了 GnRH 类似物对大鼠胃平滑肌细胞功能调节的信号转导过程, 但是还有哪些信号分子参与该转导过程, 有待于进一步实验加以证实。

## 参 考 文 献 (References)

- Adams, J. C. and W. J. Gullick 1989 Differences in phorbol-ester-induced down-regulation of protein kinase C between cell lines. *Bio. J.* 257: 905 ~ 911.
- Andrews, W. V., J. R. Hansen, J. A. Janovick and P. M. Conn 1990 Gonadotropin-releasing hormone modulation of protein kinase-C activity perfused anterior pituitary cell cultures. *Endocrinology* 127 (5): 2393 ~ 2399.
- Azzi, A., D. Boscoboinik and C. Hensley 1992 The protein kinase C family. *Eur. J. Biochem.* 208: 547 ~ 551.
- Chen, L., W. Q. Huang, L. H. Liu, B. Z. Lü and R. L. Pu 2000 Effect of GnRH analogue on intracellular calcium mobilization in cultured rat stomach fundus smooth muscle cells. *Acta Anatomica Sinica* 31 (suppl): 112 ~ 114. [陈 蕾, 黄威权, 刘丽宏, 吕宝真, 蒲若蕾 2000 GnRH 类似物阿拉瑞林对培养的大鼠胃平滑肌细胞中钙离子浓度变化的影响. 解剖学报 31 (增刊): 112 ~ 114.]
- Chen, L. W., Q. Huang, L. H. Liu, B. Z. Lü and R. L. Pu 2002 Immunohistochemical and *in situ* hybridization studies of GnRH in cultured rat stomach smooth muscle cells. *Acta Anatomica Sinica* 33 (2): 212 ~ 214. [陈 蕾, 黄威权, 刘丽红, 吕宝真, 蒲若蕾 2002

胃平滑肌细胞中 GnRH 受体的免疫组化与原位杂交研究. 解剖学报 33 (2): 212~214.]

- Drouva, S. V., I. Gorene, E. Laplante, E. Rerat, A. Enjalbert and C. Kordon 1990 Estradiol modulates protein kinase C activity in the rat pituitary *in vivo* and *in vitro*. *Endocrinology* 126 (1): 536~544.
- Fatigati, V. and R. A. Murphy 1984 Actin and tropomyosin variants in smooth muscles. *J. Biol. Chem.* 259 (5): 14 383~14 388.
- Jin, H. S., W. Q. Huang, J. S. Zhang, Y. Z. Wen and C. L. Zhang 1998 Immunohistochemical double-label and aged changes of GnRH and its receptor in submaxillary gland of rats. *Acta Anatomica Sinica* 29 (1): 94~97. [金花淑, 黄威权, 张金山, 文永植, 张崇理 1998 大鼠颌下腺 GnRH 及其受体的免疫组织化学双标记和年龄变化. 解剖学报 29 (1): 94~97.]
- Lin, X. W. and P. M. Conn 1999 Transcriptional activation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene by GnRH: involvement of multiple signal transduction pathways. *Endocrinology* 140 (1): 358~364.
- Lowry, O. H., N. S. Rosebrough, A. L. Farr and R. S. Randall 1951 Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265~275.
- McArdle, C. A. and P. M. Conn 1986 Hormone-stimulated redistribution of gonadotropin protein kinase C *in vivo*: dependence on  $Ca^{2+}$  influx. *Mol. Pharmacol.* 29 (6): 570~576.
- Nikula, H. and I. Huhtaniemi 1998 Gonadotropin-releasing hormone agonist activates protein kinase C in rat Leydig cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 55 (1): 53~59.
- Nishizuka, Y. 1986 Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233: 305~312.
- Yao, B., W. Q. Huang and L. Sun 1999 Immunohistochemical study of gonadotropin releasing hormone receptor in rat digestive tract. *Acta Anatomica Sinica* 30 (2): 152~154. [姚兵, 黄威权, 孙岚 1999 大鼠消化道促性腺激素释放激素受体的免疫组织化学研究. 解剖学报 30 (2): 152~154.]
- Yao, B., W. Q. Huang, R. L. Pu, L. Sun, R. Q. Zhang and L. Wang 2000 *In situ* hybridization study of gonadotropin releasing hormone receptor mRNA in rat digestive tract. *Acta Anatomica Sinica* 31 (3): 248~252. [姚兵, 黄威权, 蒲若蕾, 孙岚, 张荣庆, 王雷. 大鼠消化道促性腺激素释放激素受体 mRNA 的原位杂交研究. 解剖学报 31 (3): 248~252.]

### 外文摘要 (Abstract)

## EFFECT OF GnRH ANALOGUE ON PKC ACTIVITY IN CULTURED RAT STOMACH SMOOTH MUSCLE CELLS \*

CHEN Lei LI Dong-Hong YAO Yuan-Qing LIU Li-Hong HUANG Wei-Quan \*\*

( Department of Histology and Embryology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

( Department of Obstetrics and Gynecology of Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

( Department of Pharmacology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Recently, Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its receptor have been found in rat digestive system. Our previous studies demonstrated that GnRH receptor and its mRNA both existed in cultured rat stomach smooth muscle cells (SSMCs), and also, we found GnRH analogue could increase the intracellular  $[Ca^{2+}]$  of SSMCs. In order to investigate the effect of GnRH analogue on protein kinase C (PKC) activity in cultured rat stomach smooth muscle cells, we used Radioimmunoassay to determine the PKC activity. SSMCs which we used in this experiment were passage 3~5. After several days in culture medium, SSMCs were washed and treated with different agents in the following manners: (1) SSMCs were treated with Alarelin at  $10^{-5}$  mol/L for different time (1, 2, 3, 6, 8 and 10 min) to find the time-dependence. (2) The SSMCs were treated for 3 min with Alarelin at  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  mol/L respectively to identify the optimal dosage of Alarelin (3) SSMCs were preincubated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) for 10 min in Group A and Group B, and 12 hr in Group C respectively. Then Group B and Group C were treated with  $10^{-5}$  mol/L Alarelin to confirm the effects of PMA on PKC activity of SSMCs. (4) In order to find the calcium-dependence

\* This work was supported by National Natural Science Foundation of China (No. 39770388)

\*\* Corresponding author. huangwq@fmmu.edu.cn

of GnRH analogue-mediated PKC activity, the SSMCs from which extracellular calcium ion were removed by the use of EGTA were treated with  $10^{-5}$  mol/L Alarelin. Then, total cells were scraped with a rubber policeman and transferred to plastic tubes containing the extraction PKC. Cell suspensions were centrifuged and cell pellets were resuspended and sonicated on ice. The homogenate was centrifuged at 100 000  $\times g$  for 30 min at 4  $^{\circ}C$ . The supernatant was used as the "cytosol" fraction, and the pellets were re-homogenized in 1% Triton X-100. The second homogenate was centrifuged at 100 000  $\times g$  for 30 min at 4  $^{\circ}C$ , and the supernatant was used as the "membrane" fraction. PKC activity in both fractions were assayed by determining the transfer rate of  $^{32}P$  from [ $^{32}P$ ] ATP to myelin basic protein (MBP). Total PKC activity refers to PKC activity in "cytosol" fraction plus the one in "membrane" fraction.

The results show that Alarelin could induce activation of PKC, which acted in time-course manner, and the peak time of PKC activity was 3 minutes after treatment. When Alarelin was  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  mol/L respectively, the PKC activity was increased gradually, and acted in dose-dependent way. The peak value reached  $781.40 \pm 14.74$  pmol/min/mg when Alarelin was  $10^{-5}$  mol/L. The smallest value was  $103.12 \pm 11.04$  pmol/min/mg. After cells were preincubated with 10 mmol/L PMA 10 min, then the  $10^{-5}$  mol/L Alarelin was administered (Group B), we found that PKC activity was not different from Group A or Group B ( $P > 0.05$ ). After PKC activity was depleted by 12 hr treatment of PMA in Group C, then incubated with  $10^{-5}$  mol/L Alarelin, we found PKC activity were significantly lower than that of Group A and Group B ( $P < 0.05$ ). It was also observed that the alarelin-stimulated PKC activity was dependent on the presence of extracellular calcium. These results indicated that PKC is an important signal molecule in the regulation of GnRH to cultured stomach smooth muscle cells and GnRH analogue could increase the PKC activity.

**Key words** GnRH analogue, PKC activity, Radiochemical assay, Stomach smooth muscle cells.