

PLC- β 对血小板生长因子介导的细胞增殖的影响

杨 霖 罗 深秋(第一军医大学细胞生物学和遗传学教研室 广东 广州 510515)

摘要目的 观察磷酸脂酶 C- β (PLC- β) 对血小板生长因子(PDGF)介导的细胞增殖的影响。方法 应用无内源性 PLC- β 小鼠成纤维细胞株观察在 PDGF 作用下细胞增殖情况,包括细胞内钙离子动员及 DNA 合成,并与正常细胞株对照。结果 缺失 PLC- β 的细胞与正常细胞 DNA 合成显著增强,均出现细胞内钙动员,但 PLC- β 细胞 DNA 合成时间显著延长,流式细胞仪检测 PLC- β 值小且峰值出现较晚($P < 0.01$)。结论 PLC- β 在 PDGF 作用下成纤维细胞的增殖过程中有重要作用,当其缺乏时功能可被其他途径代偿。

关键词 磷酸脂酶 C- β 血小板生长因子 细胞增殖

中图分类号 R329.2 文献标识码 A 文章编号 1000-2588(2001)07-0485-03

杨霖,罗深秋. PLC- β 对血小板生长因子介导的细胞增殖的影响. 第一军医大学学报, 2001, 21(7): 485-487.

YANG Lin, LUO Shen-qiu

Department of Cellular Biology and Medical Genetics, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract To study the effect of PLC- β on cell proliferation induced by platelet-derived growth factor (PDGF). The immortalized fibroblasts genetically deficient in PLC- β (PLC- β ^{-/-}) was used to investigate the role of PLC- β in cell proliferation induced by PDGF, which involves the mobilization of intracellular Ca²⁺ and DNA synthesis. Results DNA synthesis was increased and intracellular Ca²⁺ mobilization detected in both PLC- β ^{-/-} and PLC- β ^{+/+} cells, but in the former, the time consumption of DNA synthesis was prolonged, and the mobilization of Ca²⁺ attenuated and postponed. Conclusion PLC- β is important in cellular mitogenic signal transduction induced by PDGF, but its deficiency may be compensated through other signal transduction pathways.

Key words PLC- β ; platelet-derived growth factor; cell proliferation

磷酸脂酶 C- β (PLC- β) 在细胞增殖信号传递中是否必需,目前各家说法不一。Ji 等^[1]应用基因打靶技术证实 PLC- β 在小鼠胚胎早期发育过程中至关重要,缺失 PLC- β 的小鼠胚胎发育至第 9 天时死亡。

在本研究中,我们观察了两种 PLC- β 细胞的生长及血小板生长因子 PDGF 介导下 PLC- β 对细胞内钙流的产生和 DNA 合成的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞

不含内源性 PLC- β 的小鼠成纤维细胞株 PLC- β ^{-/-} 及正常对照细胞株 PLC- β ^{+/+} 均来源于小鼠 8.5d 胚胎细胞,由本室冀群升提供。

1.2 试剂材料及仪器

DMEM 培养基(高糖,美国 Gibco 公司),胎牛血清(美国 Hyclone 公司),H-TdR (上海核工业所),

Fluo-3-AM 荧光染料(美国 Sigma 公司),96 孔板(美国 Eagle 公司产品),Petri 培养皿(美国 Falcon 公司产品),粘附式细胞仪(美国 Meridian 公司),S-6500 闪烁记数仪(美国 Beckman 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞生长曲线 取生长状态良好的两种细胞分别接种于 96 孔板中,每 30 孔,细胞浓度为 2 × 10⁴/ml,每天取出 3 孔的细胞进行计数,计算均值,以培养时间为横轴,细胞数为纵轴,连接成曲线后即为该细胞的生长曲线。

1.3.2 细胞内钙离子浓度变化 取处于指数生长期的 PLC- β ^{+/+} 与 PLC- β ^{-/-} 细胞,用 0.25% 的胰蛋白酶消化后,加入适量含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基,吹打后按每皿含细胞 1 × 10⁵ 的密度接种到 Petri 培养皿中,在 95% 空气,5% 二氧化碳,37 °C 饱和湿度条件下孵育 8~10d,使细胞完全贴壁并伸展呈梭形,将培养皿取出,室温下 Hanks 液漂洗 3 次,加入 20 μmol/ml 荧光染料 Fluo-3-AM,80~100 μmol/ml,标记胞内 Ca²⁺,37 °C 避光孵育 20~30min,再用 Hanks 液漂洗 3 次后加入 0.5ml Hanks 液待检测,将含已染色细胞的培养皿置于 ACAS570 交互式激光细胞仪载物台上,直观地扫描测定细胞内染料初始荧光强度,得到细胞图

收稿日期 2000-11-03

基金项目 国家自然科学基金 (39870381),广东省自然科学基金 (98023)

作者简介 杨霖,1972 年,湖南郴州人,2000 年毕业于第一军医大学硕士,电话 020-85148207

象遥2~3min 后分别加入 PDGF 浓度 20 ng/ml 观察随时间的变化 细胞内 Ca²⁺ 的变化 绘制各时间 - 荧光值曲线图

根据时间 - 荧光值曲线所提供的两种细胞 PDGF 作用后胞内荧光值变化的情况 计算在相同时间间隔内 波峰波谷与作用点间荧光比值的差值 以及加样点与波峰时间点之间荧光值的变化率

1.3.3 细胞内 DNA 合成 将两种细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化后 以 0.5 × 10⁴ 个 / 孔接种于 96 孔板 每孔 10 孔 每孔中加入含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基 200 μl 培养 18~24 h 以含 0.5% 胎牛血清 DMEM 培养基 36 h 使细胞处于静止状态 每孔中加入 PDGF 0 ng/ml 分别刺激 0 h, 4 h, 8 h 加入 20 μl ³H-TdR 使其最终浓度达到 18.5 kPq/ml 送去培养上清液 BS 漂洗 2 次 0% 三氯乙酸预冷 益保存 10 min 漂洗 3 次 每次 5 min 每孔中加入 200 μl 0.3 mol/L NaOH 处理 30 min 制成细胞裂解液 闪烁记数仪进行检测 同时以未加 PDGF 的细胞为对照

1.4 统计处理

应用 SPSS 8.0 软件 采用 t 检验和 F 检验比较分析细胞内钙离子浓度变化 采用方差齐性检验比较分析细胞内 DNA 合成

2 结果

2.1 细胞生长

两种细胞均能正常生长,无明显差异 细胞传代后 8 h 左右贴壁 6~24 h 完全伸展开 呈三角形或梭形 2~5 d 相互接触形成网状 8 d 形成片状 细胞呈多角形 PLC-α^{-/-} 与 PLC-α^{+/+} 的生长速率相近 在 3~5 d 时 细胞增长最快 达到 1 × 10⁵/ml 8 d 细胞增长减慢并表现出接触抑制 数量均能达到 1~7 × 10⁵/ml

2.2 细胞内钙离子浓度变化

加入 PDGF 后 两种细胞均能见到细胞内游离钙流产生 但 PLC-α^{+/+} 细胞的钙流峰值出现在 80 s 左右 PLC-α^{-/-} 细胞的钙流出现在 260 s 左右 最大值前者较高 约为 1.6 后者为 1.18 左右 说明 PLC-α^{-/-} 在 PDGF 刺激下仍能使游离钙流在细胞内出现 但钙流的最大值降低了 出现的时间显著延迟 0.01

2.3 细胞内 DNA 合成

用 PDGF 刺激后 检测两种细胞进入 S 期 DNA 合成的能力 结果发现未加 PDGF 的 PLC-α^{+/+} 与 PLC-α^{-/-} 细胞之间无显著差异 加 PDGF 的在 0 h, 10 h, 20 h, 4 h 两种细胞间无显著差异 在 40 h 则有显著差异 0.01 加 PDGF 和未加 PDGF 的细胞之间有显著差异 0.01 在 20 h 两者均可出现峰值 DNA 增加约 4 倍 但到 34~40 h 时 PLC-α^{-/-} 的 ³H 仍高于基础值 而 PLC-α^{+/+} 细胞已基本恢复至基础水平 表明在 PLC-α^{-/-} 细胞中细胞仍能正常增殖 但 DNA 合成时间显著延长了 结果见表 1

表 1 血小板生长因子诱导下 PLC-α 对 DNA 合成的影响 8. 曾译

Table with 5 columns (0, 10, 20, 34, 40) and 4 rows (PLC-α+/+ + PDGF, PLC-α+/+ + PDGF, PLC-α+/+, PLC-α-/-) showing DNA synthesis data.

PDGF: platelet-derived growth factor; * P < 0.01 at the same time point

3 讨论

3.1 PLC-α 对细胞生长的影响

Ji 发现 缺失 PLC-α 的小鼠胚胎至 9.0 天死亡 其组织胚胎学分析显示 PLC-α^{-/-} 胚胎在第 8.5 天时还正常 但不能继续正常发展 这意味 PLC-α 可动员的第二信使分子的缺失不能由其他信号系统代偿 但来源于此胚胎的细胞和来源于有 PLC-α 的胚胎细胞却照常增生 我们的实验也证明缺失 PLC-α 并未明显影响细胞的生长 这意味着 PLC-α 对细胞分化的影响大于对细胞增殖的作用 胚胎从第 8.5 天发育到第 9.0 天时 PLC-α 是分化过程中不可缺少的 而在细胞的生长过程中却并非必需 因此细

胞株与完整的器官组织相比对 PLC-α 的依赖性较小

3.2 PLC-α^{+/+} 与 PLC-α^{-/-} 细胞游离钙钙流产生的差异

在细胞周期中 细胞内钙流动员出现在 G₁ S 和 G₂ M 期 目前对于 G₂ M 期还了解较少 但有许多非直接的实验已证明 Ca²⁺ 在 G₁ S 期起着极为重要的作用 可能调控细胞的增殖

我们知道 细胞内游离钙主要储存于内质网 / 肌浆网中 有 IP₃ 敏感和 IP₃ 不敏感两类钙池 分别由 IP₃ 受体系统和 ryanodine 受体系统 通过 RYR 系统使钙释放

而 cADPR 活性受 cGMP 调控而 IP₃ 则由 PLC- α 分解 PIP₂ 后产生。两种系统在不同种属不同组织细胞中分布是不均一的,且发生作用所需环境 pH 值等也不尽相同。正常情况下,一个系统启动,另一个系统处于备用状态。PDGF 介导下,细胞游离钙流产生的差异尚未清楚。我们的实验发现在 PDGF 刺激下,PLC- α 细胞内有钙流出现,但大小和出现时间均较正常低。尧晚提示 PLC- α 是在 PDGF 介导下细胞内游离钙动员机制中的重要因素,但并非唯一。还存在其他通道代偿。生长因子 - PLC- α - IP₃ 通路与 cGMP - cADPR - RYR 通路以及 Ras 通路、MAPK 之间的联系还有待进一步研究。

3.3 缺乏 PLC- α 的细胞 DNA 合成时间延长,但合成量并不降低

关于 PLC- α 在增殖过程中的作用,存在不同的观点。Mohammadi^[10]和 Peters^[11]等在 L6 成肌细胞中,突变 PLC- α 与 FGF 受体的酪氨酸磷酸化结合位点。Ronnstrand^[12]等在主动脉的内皮细胞中,突变 PDGF 上的相同位点,均发现 DNA 的合成并未减少。而突变自动磷酸化位点阻止了 PLC- α 的磷酸化以及磷酸肌醇的出现。这些结果表明 PLC- α 在增殖反应过程中并非必需。但是也有人认为,在肾上皮细胞和 FDC-P2 骨髓前期细胞中,突变 PLC- α 与 PDGF 的结合位点导致 DNA 合成减少。Smith MR^[13]和 Roches^[14]等用显微注射 PLC- α 抗体或 GST-SH2 融合蛋白,作为一种竞争抑制,阻断 PLC- α 。可以阻碍 PDGF 诱导 DNA 合成。Valius^[15]等发现,在 PDGF 诱导的分裂信号传递过程中,PLC- α 和 IP₃ 激酶是必需的。而不需要 GAP 和 Syp。相反, GAP 可以抑制 PDGF 激活的 PLC- α 。我们使用缺失内源性 PLC- α 细胞株,发现 PDGF 刺激后, DNA 合成并未减少,但时间延长了。因此认为 PLC- α 在增殖过程中有重要作用。但当其缺乏时,原有作用可能被其他通路代替。

PLC- α 在 PDGF 诱导的细胞迁移过程中并非必需。分析实验结果有以下几种可能。第一,可能反映了体外培养细胞的信号传递途径,很明确。细胞株与完整的器官组织相比,对 PLC- α 的依赖性较小。也许是成纤维细胞在一些信号转导分子的基因被打靶去除后,有一定的修复。细胞只有在精敲基因同时纯合缺失的情况下,才不能生长。第二,可能是在建立细胞株的过程中,细胞逐渐适应了信号分子,例如 PLC- α 的缺失。而其他通道如 Ras 通道开放,进行代偿。第三, PLC- α 与其同功酶 PLC- β 在结构功能上极为相似。PLC- α 在大鼠脾脏高水平表达,在肺、胸腺、骨骼肌和睾丸中其表达则低。而在大脑、肝和肾脏中只能检测到 PLC- α 痕迹水平。是否有可能在 PLC- α 被打靶去除后, PLC- β 代偿性表达,增强钥基。于此观

点,进一步实验可以将刚从缺失 PLC- α 的胚胎上取下的细胞与相同大小的胚胎进行比较。或在缺失 PLC- α 的细胞株上,检测其他通道的表达。或者检测缺失 PLC- α 的细胞株, PLC- α 的表达情况。

参考文献

1. Ji QS, Winnier GE, Niswender KD. Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C-gamma in mammalian growth and development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94 (7): 2999-3003.
2. Berridge MJ. Calcium signalling and cell proliferation. *Bioessays*, 1995, 17(6):491-500.
3. Spiegel S, Foster D, Kolesnick R. Signal transduction through lipid second messengers. *Curr Opin Cell Biol*, 1996, 8(2):159-67.
4. Lei S, Dryden WF, Smith PA. Involvement of Ras/MAP kinase in the regulation of Ca²⁺ channels in adult bullfrog sympathetic neurons by nerve growth factor. *Neurophysiol*, 1998, 80(3):1352-61.
5. Mohammadi M, Dionne CA, Li W. Point mutation in FGF receptor eliminates phosphatidylinositol hydrolysis without affecting mitogenesis. *Nature*, 1992, 358:681-4.
6. Peters KG, Marie J, Wilson E. Point mutation of an FGF receptor abolishes phosphatidylinositol turnover and Ca²⁺ flux but not mitogenesis. *Nature*, 1992, 358(6388):678-81.
7. Ronnstrand L, Mori S, Arridsson AK. Identification of two C-terminal autophosphorylation sites in the PDGF receptor: involvement in the interaction with phospholipase C-gamma. *EMBO J*, 1992, 11(11):3911-9.
8. Valius M, Bazenet C, Kazlauskas A. Tyrosine 1021 and 1009 are phosphorylation sites in the carboxy terminus of the platelet-derived growth factor receptor β subunit and are required for binding of phospholipase C-gamma and a 64-kilodalton protein, respectively. *Mol Cell Biol*, 1993, 13(1):133-43.
9. Alimandi M, Herderan MA, Gutkind JS. PLC-gamma activation is required for PDGF-R-mediated mitogenesis and monocytic differentiation of myeloid progenitor cells. *Oncogene*, 1997, 15(5):585-93.
10. Smith MR, Liu YL, Kim H. Inhibition of serum- and dexamethasone-stimulated DNA synthesis by antibodies to phospholipase C-gamma. *Science*, 1990, 247(4946):1074-7.
11. Roche S, McGlade J, Jones M. Requirement of phospholipase C-gamma, the tyrosine phosphatase Syp and the adaptor protein Shc and Nck for PDGF-induced DNA synthesis: evidence for Ras-independent pathways. *EMBO J*, 1996, 15(18):4940-8.
12. Valius M, Secrist JP, Kazlauskas A. The GTPase-activating protein of Ras suppresses platelet-derived growth factor beta receptor signaling by silencing phospholipase C-gamma 1. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(6):3058-71.
13. Ji QS, Ermini S, Baulida J. Epidermal growth factor signaling and mitogenesis in PLC-gamma null mouse embryonic fibroblasts. *Mol Biol Cell*, 1998, 9(4):749-57.
14. Homma Y, Takenawa T, Emori Y. Issue-and cell-type specific expression of mRNAs for four types of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 164(1):406-12.