

CONSTRUCTION OF RECOMBINANT hNaDC3/GFP AND ITS LOCALIZATION IN RENAL PROXIMAL TUBULE EPITHELIA

CHENG Gen Yang CHEN Xiang Mei* BAI Xue Yuan FENG Zhe FU Bo HONG Quan
(The Department of Nephrology, the PLA General Hospital, Beijing 100853 China)

LIU Zhangsuo

(The Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052 China)

ABSTRACT To construct the fusion gene of hNaDC3 with green fluorescent protein(GFP), and study the localization of the fusion protein in renal proximal tubule epithelia, the full length cDNA of hNaDC3 was amplified by RT-PCR from normal human renal tissues, and then cloned into pGEM-T vector. After DNA sequencing, the hNaDC3 was inserted into mammalian expression plasmid pEGFP-C3 successfully. The fused gene was then transfected into LLC-PK1 cell with lipofectamine. Confocal fluorescence microscopy showed that green fluorescence spread over the whole cell transfected with pEGFP-C3. After transfection with pEGFP-C3-hNaDC3, fluorescence distributed in both the cytoplasm and on the plasma membrane first day, located mainly on the plasma membrane fifth day. It is suggested that the hNaDC3 protein localizes on the plasma membrane.

Key words: Human Na⁺/dicarboxylate cotransporter 3 Green fluorescent protein
Fusion gene

Supported by:

National Key Basic Research Program of China(973 program, No. G2000057000).

National creative research group fund from NSFC(No. 30121005).

National Natural Science Foundation of China(NSFC)(No. 30270505).

* Corresponding author. E-mail: xmchen@public.bta.net.cn

小鼠受精卵早期发育过程中 PKA 在 M/G1 期进程中的作用

王亚杰*** 刘莹* 陈菲* 于爱鸣** 宗志红** 于秉治****

(* 中国医科大学基础医学院生物化学教研室 ** 中国医科大学基础医学院病理生理教研室 沈阳 110001)

摘 要 为研究小鼠体内 1-细胞期受精卵蛋白激酶 A(PKA)对 M/G1 期进程的影响,应用热稳定性抑制剂 PKI 显微注射入 1-细胞期受精卵内,观察 M 期促进因子(MPF)及 PKA 活性变化以及 MPF 调节亚基 Cyclin B 含量情况。发现 PKI 显微注射后 PKA 活性低,而 MPF 活性在 hCG 后 27.5 h 即达高峰,较对照组提前 30 分钟。PKI 达一定浓度则 MPF 活性不下降,出现 M/G1 阻滞;与此同时 Western blotting 法显示 PKI 注射后 Cyclin B 含量在 M 末期相当于 M 中期水平。结果表明,PKI 显微注射抑制 PKA 活性后 MPF 活性呈高峰值,高浓度 PKI 显微注射可引起 M/G1 阻滞,其机制与 PKI 干扰了 Cyclin B 降解有关。

关键词: M 期促进因子 蛋白激酶 A 1-细胞期受精卵

MPF(M 期促进因子 M-phase promoting factor, MPF, 又可称为成熟促进因子 maturation promoting factor, MPF)的调节亚基 Cyclin B 含量在细胞周期中呈周期性变化, S 期开始产生, G2-M 增加, 并与活性亚基 Cdc2 结合, 使 MPF 具有活性。M 末期 Cyclin B 在泛素介导的蛋白水解酶作用下发生降

解, MPF 活性下降, 细胞进入下一个分裂间期 G1

本文 2002 年 11 月 27 日收到, 2003 年 3 月 8 日接受。

本研究项目受国家自然科学基金重点课题(39730460)及国家重点基础研究发展规划(973)项目(G1999055900-2)资助。

*** 通讯联系人。E-Mail: yzbiochem@yeah.net

期。非洲爪蟾受精卵细胞提取液研究发现,PKA 活性抑制可干扰 Cyclin B 降解^[1],但在其他种属尚未见相关报道。小鼠受精卵是脊椎动物中与人类种属较为接近的简单而天然的细胞周期模型,本实验室前期实验曾证实 PKI (protein kinase inhibitor, type II) 显微注射入小鼠受精卵抑制 PKA 活性后可使 MPF 活性提前出现^[2]。为进一步揭示 PKA 在 M 末期的作用,本实验观察了 PKI 对 MPF 活性的影响并应用免疫蛋白印迹法监测 Cyclin B 含量,为揭示哺乳动物细胞周期调控机制,对生长、发育、癌变、死亡的研究提供依据。

材料与方法

1. 小鼠超排卵及取卵^[3]

中国医科大学实验动物部提供昆明系小白鼠,5-6 周龄成熟雌鼠,腹腔注射孕马血清促性腺激素(PMSG)10 IU,46-48 小时后腹腔注射人绒毛膜促性腺激素(hCG)10 IU,当晚与 8 周龄以上成熟雄性昆明系小鼠合笼过夜,次晨检查雌鼠阴栓,有阴栓者定为交配成功,脱颈处死雌鼠,取双侧输卵管,实体镜下于 M2 培养液中撕开壶腹膨大处,见有絮状物流出,用透明质酸酶除颗粒细胞,移入 1 ml M16 培养液中,于 37℃,5% CO₂ 孵箱中培养(每 ml M16 培养液卵细胞数不超过 200 个)。

2. PKI 显微注射^[4]

NARISHIGE 显微操作系统(日本产),Olympus IX-70 倒置显微镜,Hoffman 调制相差观察^[2]。注射量为细胞总体积 5% (10 μ l)。PKA 抑制剂 PKI 溶于 5 mmol/L 的 2-(N-吗啡啉)乙磺酸[2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, MES], pH 6.5, 浓度分别为 200 μ mol/L, 800 μ mol/L, 2 mmol/L。

3. MPF 及 PKA 活性测定^[5]

根据实验需要每隔 30 min 从培养基中取出 3 个受精卵,收集液中清洗 3 次,同 5 μ l 收集液一起移入 0.5 ml 的 Eppendorf 管中,随后立即放入 -70℃ 冰箱中速冻保存直至测活前。收集液成分:1 g/L 聚乙烯醇,5 mmol/L 乙二醇四乙酸,10 mmol/L 原硫酸钠,10 mmol/L 氯化钠的磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L, pH 7.4)。

将收集的鼠卵冻融 3 次,使细胞裂解,分别加入 MPF 反应液 25 μ l。MPF 反应液为:54 mmol/L β -甘油磷酸盐,14.5 mmol/L 对硝基苯磷酸盐,24 mmol/L 吗啡代丙烷磺酸, (MOPS), pH 7.2, 14.5 mmol/L 氯化镁,14.5 mmol/L 乙撑双(氧乙撑氮川)四乙酸,0.12 mmol/L 乙二胺四乙酸,1 mmol/L 二硫苏糖醇,2.4 μ mol/L 蛋白激酶 A 抑制剂,75 μ mol/L 酪氨酸蛋白激酶抑制剂,10 μ mol/L 1-(5-氟萘-1-磺酰)-1H-六氢化-1,4-二氮杂(ML-9),1 g/L 组蛋白 H1(III-s 型),1 mg/L 下述蛋白酶抑制剂:亮氨酸,抑肽酶,胃酶抑素,抑糜蛋白酶素,胰蛋白酶-胰凝乳蛋白酶抑制剂,20 μ Ci/ml γ -³²P 三磷酸腺苷,30℃ 水浴反应 7 min。取 25 μ l 点于 What-

man P81 强阳离子交换滤纸(1 cm $\times$ 2 cm)上,75 mmol/L 磷酸溶液反复洗 3 次,每次 2 min,最后将滤纸置于含 10 ml 蒸馏水的液闪瓶内,用 Beckman 液闪计数器测定 cpm 值。

PKA 活性测定与 MPF 活性测定过程相同,只除 PKA 反应液中 PKA 的特异性底物肯普肽(kemptide)替代了 MPF 的特异底物组蛋白 H1,反应液中不含 PKA 抑制剂。

以注射 hCG 后时间为横坐标,以 cpm 值为纵坐标绘制 MPF/PKA 活性变化时间曲线。为使不同次实验值具有可比性,利用 MII 期鼠卵内 MPF/PKA 激酶具有相同活性这一点作为参照,校正各次实验结果,MPF/PKA 间活性差异以总放 cpm 值进行校正。各组实验重复 3-4 次。

4. Western 印迹分析^[6]

根据实验需要将对照组及注射组小鼠卵细胞从 M16 培养液中取出,计数,转移到 1.5 ml Eppendorf 管中,4℃ 2 000 rpm 离心 10 min,弃去上清,将卵细胞沉淀置 -70℃ 冻存。在进行免疫印迹前将冻存的卵细胞加入适量粉碎缓冲液(含 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 2 mmol/L EDTA, 10 mmol/L EGTA, 0.25 mmol/L 蔗糖),充分震荡混匀,然后经过 3-4 次冻(-70℃)融(室温)循环,迫使卵细胞裂解,加适量样品缓冲液沸水中煮 5 min 促使蛋白变性,直接用于 Western 印迹分析。

样品蛋白经 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,电转移到硝酸纤维素薄膜上,转印膜在封闭液中封闭 1 小时后,于 4℃ 用鼠周期素 B₁ 单克隆抗体(一抗,购自 Neomarkers 公司)孵育过夜。次日,转印膜充分清洗后转入 HRP 标记羊抗鼠二抗 IgG(购自北京中山生物技术有限公司)中孵育 2 小时,TTBS 中冲洗 3 次。化学发光试剂 ECL (enhanced chemiluminescence, 购自 Santa Cruz 公司)A 液与 B 液等量混合,按 0.125 ml/cm² 膜面积点于转印膜上,室温孵育 1 分钟,倾掉 ECL,保鲜膜覆盖后置暗盒中曝光 40s-1min,冲洗胶片。可重复曝光。一抗终浓度为 1:400,二抗终浓度为 1:3000。

结 果

1. 小鼠受精卵有丝分裂期 MPF/PKA 活性变化

昆明系小鼠 1-细胞期受精卵,在注射 hCG 后约 28 h(受精后 18 h)进入 M 期。为此,取 hCG 后 26.5-30 h 受精卵,观察 MPF 和 PKA 活性动态变化。发现 hCG 后 27.5 h MPF 活性上升,约 28 h 出现 MPF 高峰,29-29.5 h MPF 活性下降到升高前水平。PKA 活性在 27 h 开始下降,28.5 h 降至低点而后回升,在 29.5 h 升至间期水平(图 1)

2. MES 显微注射组与非注射组 MPF 活性变化

由于 PKI 溶于 pH 6.5, 5 mmol/L 的 MES, 为观察 MES 对 MPF 活性的影响,设立 MES 显微注射组与未经注射的对照组进行对比,发现 MPF 活性

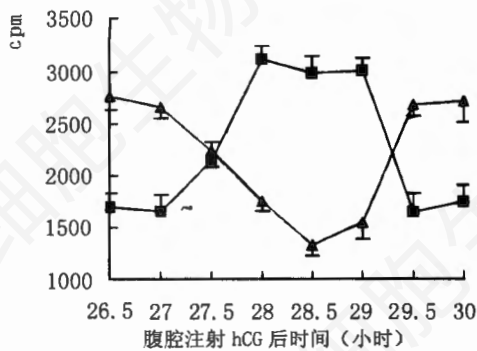


图 1 小鼠 1 细胞期受精卵 MPF 活性及 PKA 活性均随 M 期出现而变化
在 M 期 MPF 活性升高而 PKA 活性降低。
标准差表示四次实验结果。
—■— MPF 活性 —▲— PKA 活性

无大变化。说明 MES 对 MPF 活性几乎无影响(图 2)。同样方法发现 MES 对 PKA 活性亦无影响(数据未列出)。

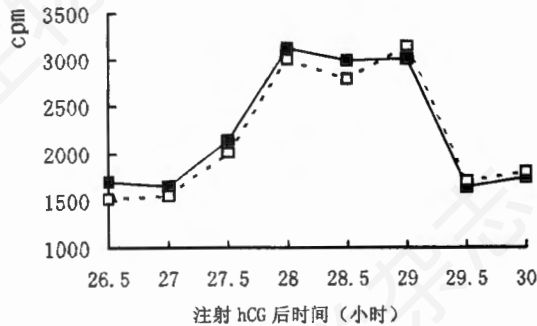


图 2 PKI 溶剂 MES 显微注射对 MPF 活性的影响
小鼠 1 细胞期胚胎 G2 期显微注射 PKI 溶剂 MES,
MPF 活性与对照组比较无明显差异(标准差未列出)。
—■— 非注射组 MPF 活性
—□— MES 注射组 MPF 活性

3. PKA 抑制剂 PKI 处理受精卵后 MPF 及 PKA 活性变化

实验组显微注射不同浓度的 PKA 抑制剂 PKI, 注射量 10 μ l, 对照组注射 PKI 溶剂 MES, 观察 MPF 及 PKA 活性变化。PKI 低浓度组 PKA 活性低于对照组, MPF 活性较对照组峰值提前 30 min 出现(图 3A); PKI 中浓度组 PKA 活性在 29 h 开始升高, MPF 活性高峰延迟至 29.5 h 才开始下降(图 3B); PKI 高浓度组 PKA 活性不升高, 而 MPF 峰值自 hCG 后 27.5 h 达高峰后不再下降(图 3C)。从不同浓度 PKI 注射后 MPF 活性变化情况(图 3D)可见 PKI 注射后 MPF 活性提前 30 min 出现; 伴随 PKI 浓度的升高, MPF 活性维持高峰时间延长, PKI 浓度达一定数值时 MPF 活性不下降, 出现 M 期阻滞。

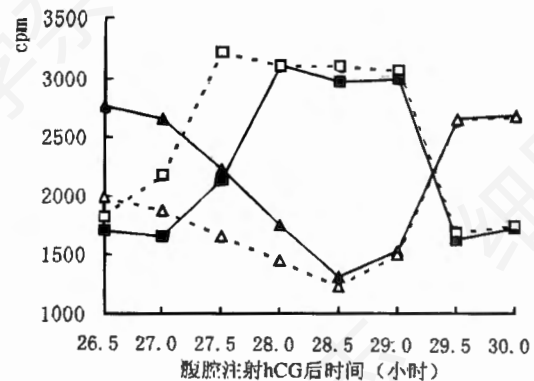


图 3A 200 μ mol/L PKI 显微注射对小鼠 1 细胞期受精卵 MPF 活性的影响。MPF 活性比对照组提前 30 分钟出现(标准差未列出)。
—■— 对照组 MPF 活性 —▲— 对照组 PKA 活性
—□— 200 μ mol/L PKI 显微注射组 MPF 活性
—△— 200 μ mol/L PKI 显微注射后 PKA 活性

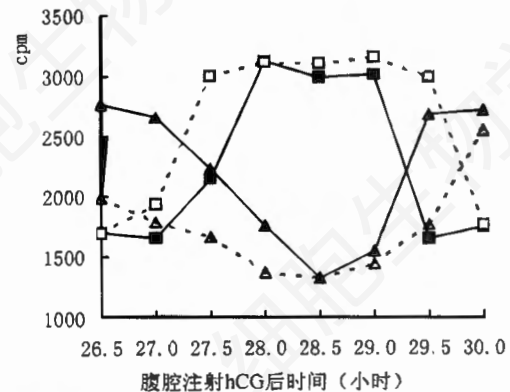


图 3B 800 μ mol/L PKI 显微注射对小鼠 1 细胞期受精卵 MPF 活性的影响
MPF 活性比对照组提前 30 分钟出现, 且持续时间延长(标准差未列出)。
—■— 对照组 MPF 活性 —▲— 对照组 PKA 活性
—□— 800 μ mol/L PKI 显微注射后 MPF 活性
—△— 800 μ mol/L PKI 显微注射后 PKA 活性

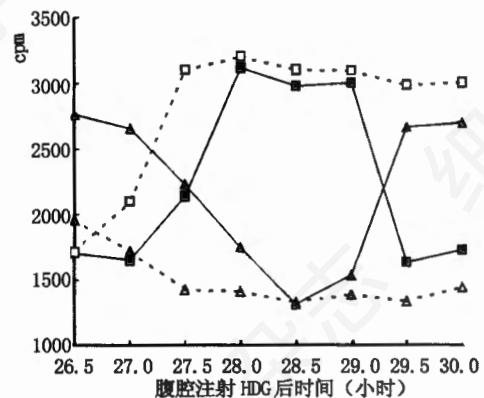


图 3C 2 mmol/L PKI 显微注射对小鼠 1 细胞期受精卵 MPF 活性的影响
MPF 活性比对照组提前 30 分钟出现, 且维持峰值不下降(标准差未列出)。
—■— 对照组 MPF 活性 —▲— 对照组 PKA 活性
—□— 2 mmol/L PKI 显微注射后 MPF 活性
—△— 2 mmol/L PKI 显微注射后 PKA 活性

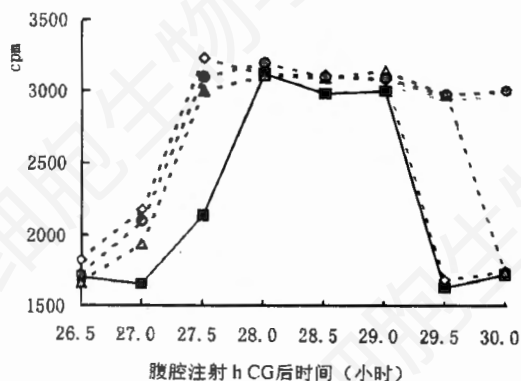


图 3D 不同浓度 PKI 显微注射对 MPF 活性的影响 (标准差未列出)。

- 对照组 MPF 活性
- ◇- 200 $\mu\text{mol/L}$ PKI 显微注射 MPF 活性变化
- △- 800 $\mu\text{mol/L}$ PKI 显微注射 MPF 活性变化
- 2 mmol/L PKI 显微注射 MPF 活性变化

4. PKI 显微注射后周期素 B 表达情况

对照组 hCG 后 28 h 细胞进入 M 期, Western 免疫蛋白印迹法显示此时周期素 B 含量高。M 末期即 hCG 后 29 h 左右周期素 B 降解, MPF 活性下降, 此时周期素 B 含量低。PKI 显微注射后 PKA 活性受抑制。在 hCG 后 29 h, 即对照组 M 末期, PKI 注射组的周期素 B 含量仍相当于对照组 M 期水平, 说明 PKI 处理后周期素 B 未发生降解。(图 4)。

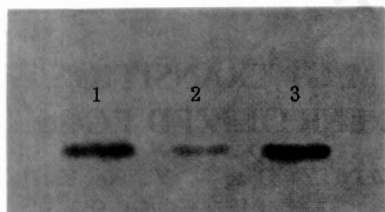


图 4 用 Western 免疫印迹法监测小鼠 1 细胞期受精卵 M 期周期素 B 含量

1. 对照组 hCG 后 28 小时, 即 M 期;
 2. 对照组 hCG 后 29 小时, 即 M 末期;
 3. PKI 显微注射组, hCG 后 29 小时。
- 每条泳道上样量为 300 个卵细胞。

讨 论

MPF 活性周期性变化决定着细胞周期进程。MPF 活性升高则细胞进入有丝分裂期进行分裂, MPF 活性下降则细胞进入分裂间期, 进行 DNA 复制及蛋白质合成。有许多因素参与 MPF 活性调节。间期 Cyclin B 积累并与 Cdc2 结合形成 MPF 激酶复合物^[7,8], 而后在 Cdc25 磷酸酶作用下使 Cdc2 抑制位点 Thr14、Tyr15 去磷酸化, MPF 活化, 细胞通过 G2/M 检测点而进入 M 期^[9,10]。M 末期 Cyclin

B 在泛素介导的蛋白水解作用下发生降解, MPF 活性下降, 细胞通过 M/G1 检测点而进入分裂间期^[1,11]。研究证实, 在有丝分裂后期细胞内存在后期促进复合物 (Anaphase promoting complex, APC), 是靶位点在 Cyclin B 上的泛素连接酶, 也是调节姐妹染色体分离以利于蛋白水解酶进行蛋白水解的因子。APC 活性升高则发生周期素降解^[11], 而 APC 的活性调节极其复杂, Cdc20/Fizzy 以及 Cdh1 作为 APC 的活性调节因子在其活性调节中起重要作用^[12]。哺乳动物的 Cdc20/Fizzy 的磷酸化对 APC 活性起负调控作用^[13]。

非洲爪蟾卵细胞提取液研究证实 CDK2 (cyclin dependent kinase 2, CDK2) 在 M 末期先于 CDK1 即 Cdc2 失活, 用一定浓度的 CDK 抑制蛋白 P21/Cip1 特异阻断 CDK2, 则 CDK2 失活可导致 Cdc2 活性下降, 并发生 Cyclin B 降解, M 期终止^[1]。M 末期 MPF 活性上升与 PKA 活性下降相对应, 应用 PKA 抑制剂阻断 PKA, 发现 CDK2 及 Cdc2 活性均维持峰值, Cyclin B 亦不降解, 出现 M 期阻滞现象。进一步在 PKA 抑制剂阻断 PKA, CDK2 及 Cdc2 处于峰值时加入 CDK2 抑制剂, 则 PKA 抑制剂引起的 Cdc2 维持峰值被中断, Cyclin B 也发生降解^[1]。推测 PKA 可能先阻断 CDK2 而下调 MPF 活性。定点突变 CDK2 的抑制位点 Tyr15 证实 PKA 作用于该位点从而抑制 CDK2 活性^[1]。而 CDK2 可能通过磷酸化 APC 的调节因子 Cdc20/Fizzy, 进而负调控 APC 活性^[1]。但在哺乳动物中有关 PKA 与 Cyclin B 降解方面研究目前国内外尚无报道。本实验采用 PKA 热稳定型抑制剂 PKI 显微注射入小鼠 1-细胞期受精卵内, 发现当 PKI 浓度达一定值时, MPF 活性持续处于峰值不降低, 同样出现 M 期阻滞现象。

哺乳动物中有两类 B 型周期素, Cyclin B1 及 Cyclin B2, 它们的 NH2 末端存在差异, 但其他部位的氨基酸有 57% 的同源性^[14]。Cyclin B1 和 B2 均在 M 期与 CDK1 结合而活化 CDK1^[15], 但两者作用不同, 缺乏 Cyclin B1 的小鼠胚胎在出生前即会死亡, 而缺乏 Cyclin B2 的小鼠胚胎与正常小鼠相比只会发生出生时体积减小^[14]; 而且 Cyclin B1 和 B2 在细胞内定位也有差异, B1 在间期定位于胞浆, M 期时转位到细胞核^[16]; 而 B2 在间期及 M 期均定位在高尔基体^[14,15]。本实验采用周期素 B1 Western 印迹法观察 M/G1 转换时周期素 B1 含量, 发现对照组 hCG 后 28 h 即 M 期, 周期素 B1 含量高, 而 29 h

M/G1转换时周期素 B1 含量低,说明周期素 B1 已发生降解;而在 PKI 处理组给予 hCG 后 29 h 即对照 M/G1 转换时 Cyclin B1 含量仍较高,表明 PKI 处理组 Cyclin B1 未发生降解。活性测定结果显示,PKI 注射后高浓度组,M 末期 MPF 活性不发生下降,出现 M/G1 阻滞。两个实验结果说明 PKI 抑制 PKA 活性后可干扰 Cyclin B 降解,从而引起 MPF 活性维持峰值,是 M/G1 阻滞的原因。

关于 PKA 在细胞周期 M 期中的作用,大部分实验集中以非洲爪蟾为实验对象,认为 PKA 可使分裂间期或 G2 期延长,抑制 PKA 活性导致 MPF 活性提前出现,细胞提前进入 M 期;高浓度 PKA 抑制剂可导致 MPF 活性持续高值,出现 M 期阻滞。但关于 PKA 在体内作用位点及活性的周期性变化机制目前尚不清楚。本实验以小鼠受精卵为实验对象观察了 PKA 抑制剂对其 M/G1 期进程的影响,对探讨 PKA 在哺乳动物细胞周期作用机制有一定意义。关于 PKA 与细胞周期关系的研究有助于进一步理解生命发生、分化、疾病、肿瘤及死亡的机制。

参 考 文 献

- [1] D'Angiolella V, Costanzo V, Gottesman ME, et al. 2001, *Curr Biol*, **11**(15): 1221 - 1226.
- [2] 王亚杰、赵咏梅、付伟等, 2002, 中国生物化学与分子生物学报, **18**(2): 222 - 226.
- [3] Hogan B, Constantini LE. 1986, *Manipulating the mouse embryos, a laboratory manual*. New York: Cold spring harbor laboratory press, 249 - 256.
- [4] Bornslaeger EA, Mattei P, Schultz RM. 1986, *Dev Biol*, **114**: 453 - 462.
- [5] Gallicani GI, Megaughey WM, Capco DG. 1997, *Mol Reprod Dev*, **46**: 587 - 601.
- [6] Mitra J, Schultz RM. 1996, *J. Cell Biol.*, **109**: 2407 - 2415.
- [7] Murray AW, Kirschner MW. 1989, *Nature*, **339**: 275 - 280.
- [8] Solomon MJ, Glotzer M, Lee TH, et al., 1990, *Cell*, **63**: 1013 - 1024.
- [9] Gould KL, Nurse P. 1989, *Nature*, **342**: 39 - 45.
- [10] Gautier J, Solomon MJ, Booher RN, et al., 1991, *Cell*, **67**: 197 - 211.
- [11] Bastians H, Topper LM, Gorbsky GL, et al., 1999, *Mol Biol Cell*, **10**(11): 3927 - 3941.
- [12] Visintin R, Prinz S, Amon A. 1997, *Science*, **278**: 460 - 463.
- [13] Yudkovsky Y, Shteinberg M, Listovsky T, et al. 2000, *Biochem Biophys Res Commun.*, **271**: 299 - 303.
- [14] Brandeis M, Rosewell I, Carrington M, et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**(8): 4344 - 4349.
- [15] Jackman M, Firth M, and Pines J. 1995, *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.*, **14**: 1646 - 1654.
- [16] Hagting A, Jackman M, Simpson K, et al. 1999, *Curr. Biol*, **9**: 680 - 689.

EFFECT OF PROTEIN KINASE A ON M/G1 TRANSITION IN EARLY DEVELOPMENT OF MOUSE FERTILIZED EGGS*

WANG Ya Jie^{***} LIU Ying^{**} CHEN Fei^{**} YU Ai Ming^{**} ZONG Zhi Hong^{**} YU Bing Zhi^{****}

(^{**} Department of biochemistry, ^{***} Department of Pathophysiology, School of Basic Medical Science, China Medical University, Shenyang 110001 China)

ABSTRACT In order to investigate the effect of Protein Kinase A (PKA) on transition from mitosis to interphase in mouse fertilized eggs, PKA inhibitor PKI (protein kinase inhibitor, type II) was microinjected into mouse 1-cell stage embryos at G2 phase, and MPF (M-phase promoting factor) activity as well as cyclin B concentration was measured. In PKI microinjected group, the PKA activity was low in the period between 27 - 29 hours after adding hCG, but MPF activity reached to a high value half an hour earlier and lasted longer than in control group. However, when high dosage PKI was microinjected, PKA activity kept low, MPF activity kept high and M/G1 arrest happened. Data from western blotting showed cyclin B concentration was high at metaphase in PKI injected group while cyclin B was degraded in the control group. These results indicated that inhibition of endogenous PKA in interphase increased MPF activity, while high dosage of PKI microinjection would induce M/G1 arrest, most probably caused by cyclin B undegradation.

Key words: M-phase promoting factor Protein Kinase A 1-cell stage fertilized eggs

* Supported by National Natural Science Foundation of China for Key Program(39730460) and National Key Program of Basic Research 973 (G1999055900-2).

**** Corresponding author. E-mail: ybzbiochem@yeah.net