

- protein kinase C. Biochem J, 1988, **255** (1): 309~ 318
- 14 Takaya J, Kimura M, Lasker N *et al.* Phorbol 12, 13-dibutyrate binding to intact human platelets. the role of cytosolic free Ca^{2+} . Biochem J, 1991, **278**: 411~ 4114
- 15 Sag S O, Rink T J. Kinetic differences between thrombin-induced and ADP-induced calcium influx and release from internal store in fura-2 loaded human platelet. Biochem Biophys Res Commun, 1986, **163** (3): 1124~ 1128
- 16 Daniel J L, Molish I R, rigmaiden M *et al.* Evidence for a role of myosin phosphorylation in the inhibition of the platelet shape change response. J Biochem Chem, 1984, **259** (15): 9826~ 9831
- 17 Hartwig J H. Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. J Cell Biol, 1992, **118** (6): 1421~ 1442
- 18 Waston S P, McNally J, Shipman L J *et al.* The action of the protein kinase C inhibitor, staurosporine, on human platelet. evidence against a regulatory role for protein kinase C in the formation of inositol triphosphate by thrombin. Biochem J, 1988, **249** (2): 345~ 350

Effects of A23187 on Platelet Aggregation and Protein Phosphorylation.

CHEN Rí yan, JIANG Lì ming, QIN Yarr mei, LIANG Niarr ci (Department of Biochemistry, Guangdong Medical College, Zhanjing 524023, China).

Abstract To study further the role of Ca^{2+} and protein kinase C in platelet aggregation, suspen-

sions of aspirin-treated, ^{32}P -prelabeled, washed pig platelets containing ADP scavenger in the buffer were stimulated by Ca^{2+} ionophore A23187 and PMA, a stimulator of protein kinase C. The results indicated that: (1) 1~ 20 $\mu\text{mol/L}$ A23187 induced platelet aggregation, as well as the phosphorylation of 40 ku and 20 ku proteins. There were dose-response and time-response effects of the protein phosphorylation in A23187-induced platelet activation. (2) A23187 and PMA were synergistic in platelet aggregation and protein phosphorylation. (3) Staurosporine, a protein kinase C inhibitor, in concentration of 1 $\mu\text{mol/L}$, largely suppressed platelet aggregation and completely suppressed phosphorylation of 40 ku and 20 ku proteins induced by 20 $\mu\text{mol/L}$ A23187. The results imply that Ca^{2+} mobilization alone could activate protein kinase C in platelet, and Ca^{2+} -induced platelet aggregation is largely dependent on activation of protein kinase C.

Key words A23187, PMA, platelet aggregation, protein kinase C

人 I 型胶原基因第一内含子调节转录的研究

陈俊杰 杨绍华¹⁾ 王若菡 彭文珍²⁾ 马英红 刘智敏 李昌龙

(华西医科大学重组 DNA 研究室, 成都 610041)

摘要 人 I 型胶原 $\alpha 1$ (I) 链 (COL I A1) 基因内含子序列在不同细胞内有不同的转录调节活性. 报道了含人 COL I A1 基因内含子 I 不同区段 (+ 544~ + 855 和 + 820~ + 1 093) 的重组质粒 pSCEP-CAT 和 pSCIP-CAT 的构建并转染人胚肌腱成纤维细胞和 Tca 8113 舌癌细胞. 地高辛标记抗 CAT-ELISA 检测结果显示: pSCEP-CAT 在两种细胞均获表达; pSCIP-CAT 在人成纤维细胞未表达, 但在舌癌细胞其表达量明显高于 pSCEP-CAT. 这表明人 COL I A1 基因内含子 I + 544~ + 855 区段增强氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 表达; + 820~ + 1 093 区段则抑制人成纤维细胞但显著增强舌癌细胞的 CAT 表达.

关键词 胶原基因, 内含子, 人成纤维细胞, 转录调节, 报告基因, 酶联免疫吸附分析

学科分类号 Q523

¹⁾ 中国科学院上海细胞生物学研究所, 上海 200031. ²⁾ 华西医科大学医学分子生物学研究室, 成都 610041.

收稿日期: 1997-05-02, 修回日期: 1997-10-30

胶原 (collagen) 是结缔组织的重要组成部分, 它是由原胶原 (procollagen) 三股螺旋分子聚集形成的超分子结构. 迄今发现至少有 13 种 (I ~ X III) 类型的胶原, 其中以 I 型胶原在人体内分布最广, 含量最多. I 型胶原由两条氨基酸序列完全相同的 $\alpha 1$ (1) (即 COL I A1) 链和另一条 $\alpha 2$ (1) (即 COL I A2) 链构成, COL I A1 和 COL I A2 基因分别含 51 和 52 个外显子. 近年研究表明: COL I A1 基因内含子 I 序列在爪蟾卵细胞、NIH-3T3 成纤维细胞和鸡胚肌腱成纤维细胞中具有增强或抑制该基因转录的活性, 有明显的细胞特异性; 但是, 有关该内含子在成人成纤维细胞调节转录的活性, 国内外尚未见报道^[1~4]. 研究该内含子在人体细胞内调节转录活性, 对了解 I 型胶原基因的表达调控及其相关的成骨不全等遗传性疾病发病的机理具有重要的理论和医学价值^[5]. 鉴于此, 作者构建了含有人 COL I A1 基因启动子, 不同区段的内含子 I (+544 ~ +855 和 +820 ~ +1093) 以及氯霉

素乙酰转移酶 (CAT) 报告基因的重组质粒并转染人胚肌腱成纤维细胞和 Tca 8113 舌癌细胞, 用地高辛 (DIG) 标记 Anti-CAT-ELISA 检测转染细胞氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 表达水平, 分析内含子 I 序列的转录调节活性.

1 材料与方法

1.1 材料

人胚肌腱组织 (华西医科大学附属第二医院妇产科提供). Tca 8113 舌鳞状上皮癌细胞株 (华西医科大学医学分子生物学研究室提供). pGCEP436 和 pGCIP14 克隆分别含人 COL I A1 内含子 I +544 ~ +855 (310 bp) 和 +820 ~ +1 093 (274 bp) 片段其 3' 端均与 -332 ~ -15 (317 bp) 的启动子序列相连 (本室构建). pGEM-3zf (+), pCATTM-Basic plasmid、牛小肠碱性磷酸酶 (CIAP)、Klenow 酶、T4 DNA 连接酶 (Promega), 培养液 F12 和 PRMI1640、Lipofect AMINETM、1 kb Ladder (G_{IBCO} BRL)、DIG-Anti-CAT ELISA 试剂盒 (BOEHRINGER), 其余试剂为国产分析纯.

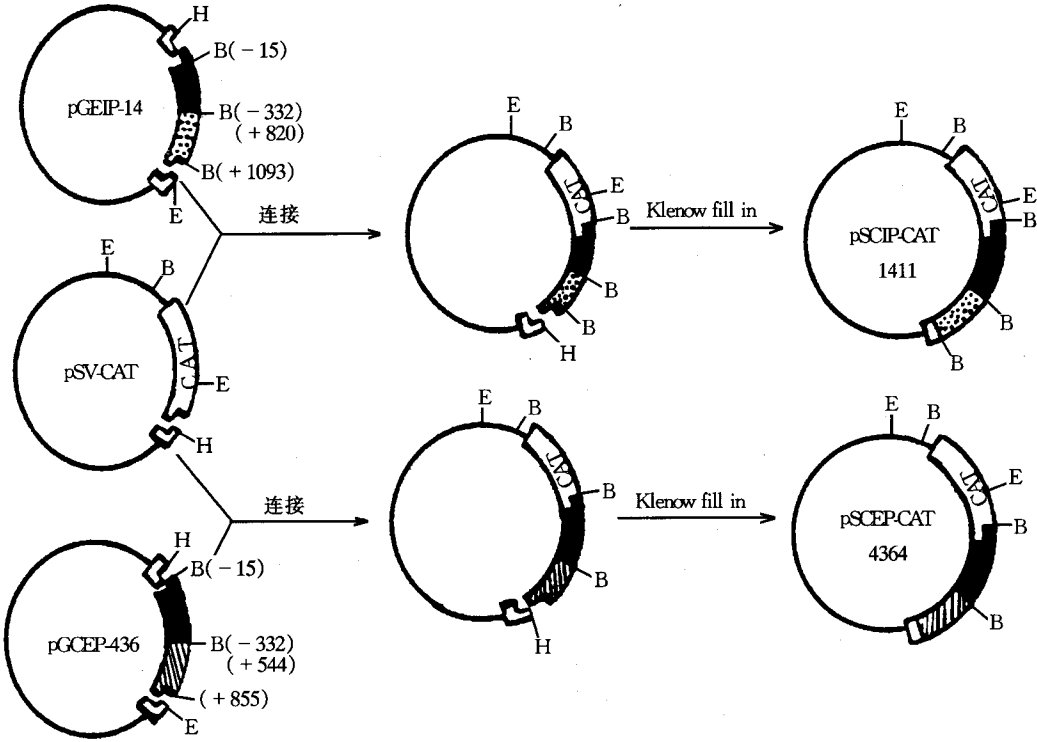


图 1 pSCEP-CAT 和 pSCIP-CAT 的构建

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pSCEP-CAT 和 pSCIP-CAT 的构建和鉴定^[6]: 取 10 μg pSV-CAT 经 *Hind*Ⅲ 和 *CIAP* 处理后, 分别与 0.3 μg pGCEP436 和 pGCIP14 的 *Eco*R I - *Hind*Ⅲ 酶切片段混合并加 T4 DNA 连接酶 2U, 单端连接后, 加 Klenow 酶在 22℃ 补平反应, 再平端连接, 构建 pSCEP-CAT 和 pSCIP-CAT 表达载体如图 1 所示; 按常规 CaCl_2 转化宿主菌 JM109, 挑选阳性菌落, 抽提质粒 DNA 并经 *Eco*R I - *Bam*H I 消化和 1.2% 琼脂糖电泳鉴定.

1.2.2 细胞培养与转染: 参照文献 [7] 分离培养人胚肌腱成纤维细胞, 按 5×10^5 细胞/ml 接种于 F-12 培养液 (含 20% 小牛血清) 中, 置于 37℃ CO_2 孵箱培养; 取 Tca 8113 舌癌细胞株在 37℃ 快速复苏, 按 2×10^5 细胞/ml 接种于 PRMI 1640 培养液 (含 15% 小牛血清) 中同上培养. 待细胞生长至 80% 融合后, 按 LipofectAMINE™ 转染试剂盒说明操作^[8], 分别取 10 μg pSCEP-CAT 4 364 和 pSCIP-CAT 1 411 和对照质粒转染人成纤维细胞和舌癌细胞.

1.2.3 CAT 蛋白表达产物检测: 人成纤维细胞与舌癌细胞培养 64 h 后, 倾弃培养液, 加入 1 ml 细胞裂解液并置室温 30 min, 于 12 000 r/min 离心 5 min, 收集上清, 存于 -70℃ 备用. 按 Folin-Denis 法测定细胞抽提液蛋白质总量^[9]. 按 DIG-Anti-CAT-ELISA 试剂盒说明, 测定各组细胞 CAT 含量.

2 结 果

2.1 重组体限制性分析鉴定

从 Amp 平板随机挑取单个转化菌落经 *Eco*R I 和 *Bam*H I 酶切分析. 结果表明 pSCEP-CAT4364 和 pSCIP-CAT 1 411 为阳性克隆. 它们仅有单一 *Hind*Ⅲ 酶切位点, pSCEP-CAT 有 3 个 (311、1 925 和 3 431 bp) *Bam*H I 片段和 5 个 (311、525、750、1 320 和 2 681 bp) *Bam*H I / *Eco*R I 片段 (图 2); pSCIP-CAT 有 4 个 (274、320、1 624 和

3 280 bp) *Bam*H I 片段和 5 个 (274、320、750、1 400 和 2 511 bp) *Bam*H I / *Eco*R I 片段 (图 3). 这表明上述两个重组体 COL I A1 启动子均为正向插入, 各自第 1 内含子 +544 ~ +855 和 +822 ~ +1 093 为反向位于启动子 5' 端.

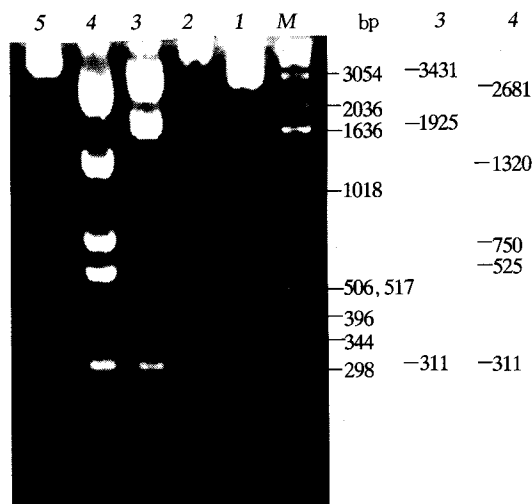


图 2 pSCEP-CAT 质粒 DNA 限制性分析

M: 1 kb Ladder; 1: pSV-CAT (对照); 2: pSCEP-CAT (对照); 3: pSCEP-CAT + *Bam*H I; 4: pSCEP-CAT + *Eco*R I - *Bam*H I; 5: pSCEP-CAT + *Hind*Ⅲ.

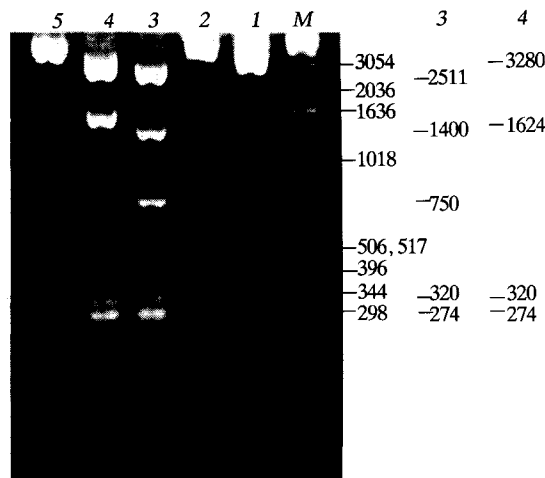


图 3 pSCIP-CAT 质粒 DNA 限制性分析

M: 1 kb Ladder; 1: pSV-CAT (对照); 2: pSCIP-CAT (对照); 3: pSCIP-CAT + *Eco*R I - *Bam*H I; 4: pSCIP-CAT + *Bam*H I; 5: pSCIP-CAT + *Hind*Ⅲ.

2.2 细胞总蛋白和 CAT 表达检测

由表 1 可见, 舌癌细胞总蛋白量较成纤维细胞高 3~ 6 倍, 将细胞抽提液按其总蛋白量的倍数相应稀释后再检测 CAT 表达量. 由表 1 显示, 在成纤维细胞仅 pSCEP-CAT 4364 获

得表达; 在舌癌细胞 pSCEP-CAT 4364 和 pSCIP-CAT 1411 均获表达, 值得注意的是 pSCIP-CAT 1411 表达量意外地增高; 转染对照 pCAT-Basic plasmid 以及未转染的成纤维细胞和舌癌细胞的 CAT ELISA 均呈阴性反应.

表 1 细胞总蛋白和 CAT 蛋白量

细 胞	质 粒	总蛋白		CAT 蛋白	
		<i>A</i> ₆₅₀	ρ/ mg· L ⁻¹	<i>A</i> ₄₁₀	ρ/ ng· L ⁻¹
成纤维细胞	—	0.098	13	0.00	0
	pSCIP-CAT 1411	0.061	8	0.00	0
	pSCEP-CAT 4364	0.087	11	0.25	130
	pCAT-Basic plasmid	0.092	11.5	0.00	0
	—	0.257	33	0.00	0
舌癌细胞	pSCIP-CAT 1411	0.503	64	0.38	1 080
	pSCEP-CAT 4364	0.486	62	0.10	300
	pCAT-Basic plasmid	0.489	63	0.00	0

注: *n* = 4.

3 讨 论

I 型胶原由两条多肽链 (COL I A1 和 COL I A2) 基因编码并在各种结缔组织细胞中协调表达, 受发育阶段、环境和激素等多种因素的影响. 有研究报道, COL I A1 基因在各细胞表达效率有显著差异, 并认为这是由于该基因 5' 侧翼序列和内含子 I 序列的转录调节元件与各细胞反式作用因子相互作用不同所致^[4]. Rossouw 等用不同长度的人 COL I A1 基因 5' 端侧翼 (均含启动子) 序列与人 α1-珠蛋白编码序列构建成嵌合基因, 再显微注入爪蟾卵细胞和转染 NIH-3T3 成纤维细胞, 发现在嵌合基因转录起点上下游插入 COL I A1 内含子 I + 822~ + 1 602 区段, 对珠蛋白基因表达均有增强效应^[1]. Bornstein 等^[3] 构建与上述类似的人 COL I A1-氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 或-人生长激素嵌合基因并转染鸡肌腱成纤维细胞, 发现该内含子+ 820~ + 1 093 区段无论正向或反向插入启动子 5' 端, 均表现抑制转录的活性. 作者首次研究人 COL I A1

内含子不同区段在人胚肌腱成纤维细胞的转录调节作用, 发现+ 544~ + 855 区段可增强 CAT 表达, 而+ 820~ + 1 093 区段则呈抑制转录的活性. 此结果与 Bornstein 等报道相近. 有趣的是本研究发现人 COL I A1 基因内含子 I + 820~ + 1 093 区段在 Tca 8 113 人舌癌细胞具有很强的刺激转录的作用, 其机理值得进一步研究. 本研究构建的重组质粒 pSCEP-CAT 4 364 和 pSCIP-CAT 1 411 含有人 COL I A1 (增强子、抑制子和启动子等) 调节序列和其 3' 端的 *Hind* III 克隆位点, 不仅可用于人 COL I A1 基因内含子 I 序列的转录调节活性及其细胞特异性研究; 也可利用这些调节元件介导任一外源基因在遍布人体全身并分泌 I 型胶原的多种结缔组织细胞中表达, 这对基因治疗研究具有广泛应用前景^[10, 11].

参 考 文 献

1 陈俊杰. 结缔组织生化. 见: 梁彦主编. 生理化学, 下册. 上海: 上海科技出版社 (Chen J J. Biochemistry of Connective Tissue. In: Liang Y ed. Physiological chemistry, Vol II. Shanghai: Shanghai Scientific Technology

- Publishing House), 1990. 607~ 648
- 2 Rossouw C M S, Vergreer W P, Plooy S J *et al.* DNA sequences in the first intron of the human pro- $\alpha 1$ (I) collagen gene enhance transcription. *J Biol Chem*, 1987, **262** (31): 15151~ 16157
 - 3 Bornstein P, McKay J, Morishina J K *et al.* Regulatory elements in the first intron contribute to transcriptional control of the human $\alpha 1$ (I) collagen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84** (24): 8869~ 8873
 - 4 Pavlin D, Lichtler A c, Bedalov A *et al.* Differential utilization of regulatory domains within the $\alpha 1$ (I) collagen promoter in osseous and fibroblastic cells. *J Cell Biol*, 1992, **116** (1): 227~ 236
 - 5 Prockop D J, Constantinou C D, Dombrowski K E *et al.* Type I procollagen: The gene-protein system that harbors most of the mutations causing osteogenesis imperfecta and probably more common heritable disorders of connective tissue. *Am J Med Genet*, 1989, **34** (1): 60~ 67
 - 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 9.4~ 9.58
 - 7 鄂 征. 组织培养技术. 北京: 人民卫生出版社 (E Z. *Technique of Tissue Culture*. Beijing: Chinese People's Publishing House), 1988
 - 8 Hawley-nelson P, Ciccarone V, Gebeyehu G *et al.* LipofectAMINETM reagent: A new, higher efficiency polycationic liposome transfection reagent. *Focus*, 1993, **15** (3): 73~ 79
 - 9 Lowry O H, Rosebrough N J, Lewis Farr A *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193** (2): 265~ 275
 - 10 Suhi S T, Gage F H. Gene therapy for neurologic disease. *Arch Neurol*, 1993, **50** (11): 1252~ 1268
 - 11 Tuszynski M H, Gabriel K, Gage F H *et al.* Nerve growth factor delivery by gene transfer induces differential outgrowth of sensory, moter, and noradrenergic neurites after adult spinal cord injury. *Exp Neurol*, 1996, **137** (1): 157~ 173

Study on the First Intron Regulating Transcription of Human $\alpha 1$ (I) Collagen Gene. CHEN Jun-jie, YANG Shao-hua¹⁾, WANG Ruo-han, PENG Wen-zhen²⁾, MA Ying-hong, LIU Zhi-min, LI Chang-long (*Recombinant DNA Laboratory, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China;* ¹⁾ *Shanghai Institute of Cell Biology, The Chinese Academy*

of Sciences, Shanghai 200031, China; ²⁾ *Department of Medical Molecular Biology, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China).*

Abstract The first intron sequence of human $\alpha 1$ (I) collagen (COL I A1) gene has been shown to have differential activities of transcription regulation in a variety of tissue cells. To determine the activity of the first intron of COL I A1 gene and then utilize the regulatory elements to perform ectopic expression of foreign genes in human fibroblasts. Two novel recombinants pSCEP-CAT and pSCIP-CAT were constructed in which the intronic + 544~ + 855 and + 820 ~ + 1 093 segment of COL I A1 gene were cloned respectively in the upstream position of the promoter sequence of this gene followed by chloramphenical acetyltransferases (CAT) gene. Human fetal tendon fibroblasts and Tca 8113 tongue cancer cells in culture were transfected with the recombinants by using LipofectAMINETM, and then tested the expression level of CAT gene with DIG-labeled anti-CAT ELISA. The results indicate that the first intronic + 544~ + 855 segment of COL I A1 gene has an enhancing effect on the expression of CAT gene driven by the promoter in the transfected human fetal tendon fibroblasts and Tca 8113 tongue cancer cells. Interestingly, the first intronic + 820~ + 1 093 segment has strongly stimulating effect on the expression of the marker gene in the tongue cancer cells, but inhibitory effect in the fibroblasts.

Key words collagen gene, intron, human fibroblast, transcriptional regulation, reporter gene, ELISA