

hhlim 基因表达产物的亚细胞定位 及其在细胞肥大中的意义*

郑 斌¹⁾ 温进坤^{1)**} 韩 梅¹⁾ 周爱儒²⁾

(¹⁾河北医科大学基础医学研究所, 河北省医学生物技术重点实验室, 石家庄 050017;

²⁾北京大学医学部生物化学与分子生物学系, 北京 100083)

摘要 hhlim 是从胎儿心脏中新近分离和克隆得到的与心脏发生相关的基因, 其表达产物作为转录因子参与多种基因的转录调控和细胞的发育与分化过程. 用细胞转染方法将外源性 hhlim 基因导入处于分化过程中的小鼠成肌细胞 C2C12, 发现该基因强制性表达可使 C2C12 细胞体积明显增大. RT-PCR 和蛋白质印迹结果表明, hhlim 促细胞肥大与诱导 α -肌动蛋白 (α -actin) 过表达及重新启动胚胎基因 BNP 表达有关. 用绿色荧光蛋白-hhlim 融合蛋白表达载体转染处于分化过程的 C2C12 细胞, 发现转染不同时间, 表达产物的亚细胞定位发生动态变化, 表现为先在胞核和胞质中均有分布, 而后定位于胞质的变化规律. 应用免疫共沉淀证实, hhlim 在胞质中以与 α -actin 相互缔合的方式存在.

关键词 hhlim 基因, 细胞肥大, 亚细胞定位, α -肌动蛋白, 脑钠肽

学科分类号 Q78

hhlim 最初是从胎儿心脏中分离和克隆的与心脏发生相关的基因, 之后的研究相继发现: 转染 hhlim 表达质粒的原代心肌细胞生长速度明显加快; 在自发性高血压大鼠和心肌肥厚大鼠的心肌细胞中, hhlim 基因表达活性增强^[1]; 促心肌肥大的刺激因素, 如内皮素-1 (ET-1) 和碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 等可诱导 hhlim 基因在心肌细胞中进行表达^[2]. 这些研究结果提示, hhlim 基因可能参与心肌肥厚的发生发展过程. 然而, 关于 hhlim 是否能直接引起心肌细胞肥大及其引起心肌细胞肥大的作用机制还不十分清楚. 本实验以与心肌细胞结构相似, 且易于转染外源基因的小鼠成肌细胞 C2C12 为强制性表达外源性 hhlim 基因的细胞, 观察 hhlim 基因表达产物的亚细胞定位及其在细胞肥大中的作用.

1 材料和方法

1.1 细胞培养

小鼠成肌细胞 C2C12 细胞株为本室保存. 在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中生长的 C2C12 细胞作为未分化型细胞 (MB); C2C12 细胞生长至 70%~80% 密度时, 换成含 2% 马血清的 DMEM 培养液刺激细胞分化, 继续培养 48 h 至细胞铺满培养皿后, 作为分化型细胞 (MT).

1.2 细胞转染

在含 10% 胎牛血清的 DMEM 中培养 C2C12 细

胞生长至 60% 密度时, 用脂质体介导法, 将表达全长 hhlim 的 pcD2-hhlim 真核重组子 (陈光慧教授馈赠) 和 pEGFP-N1 共转染 C2C12 细胞. 之后, 将细胞分为两组. 一组继续用含 10% 胎牛血清的 DMEM 进行培养 (未分化型); 另一组换成含 2% 马血清的培养液诱导细胞分化. 转染 48 h 后, 用 PBS 缓冲液冲洗, 4% 多聚甲醛固定后, 在荧光显微镜下观察细胞的形态.

1.3 hhlim 表达产物的亚细胞定位

将 hhlim cDNA 克隆到 pEGFP-C3 载体的绿色荧光蛋白 (GFP) 基因上游, 获得 hhlim-GFP 融合蛋白表达载体, 经筛选鉴定后, 用其转染在含 10% 胎牛血清的培养液中生长的 C2C12 细胞, 同时换成含 2% 马血清的培养液诱导细胞分化. 24, 48 和 72 h 后, 用 PBS 缓冲液冲洗细胞, 4% 多聚甲醛固定, 荧光显微镜观察 hhlim 的亚细胞定位.

1.4 蛋白质印迹

用 RIPA 细胞裂解液 (1% NP40, 1% SDS, 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 10% 甘油, 1 mmol/L 钒酸钠, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (PMSF)) 分别裂解转染 pcD2-hhlim 的分化

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G2000056905-Z).

** 通讯联系人.

Tel: 0311-62655563, E-mail: wjk@hebmh.edu.cn

收稿日期: 2002-05-22, 接受日期: 2002-06-28

型和未分化型 C2C12 细胞, 提取细胞总蛋白质. 用改良酚法测定蛋白质含量后, 取 50 μ g 蛋白质样品经 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离、转膜和脱脂奶粉 4℃ 封闭过夜后, 依次加入兔抗鼠 α -actin 一抗和羊抗兔二抗室温反应 2 h, 四氯-1-萘酚显色.

1.5 RT-PCR

按异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法^[3]从转染 pcD2-hhlim 的分化型和未分化型 C2C12 细胞中提取 RNA, 按照 Taqman Gold RT-PCR 试剂盒说明书进行反转录后, 用扩增脑钠肽 (BNP) cDNA 的引物 (上、下游引物序列分别为 5' GCTGCTGGA-GCTGATAAG 3' 和 5' TTTGAGGTCTCTGCTGGA 3') 进行荧光定量 PCR.

1.6 免疫共沉淀

用三去污裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.1% SDS, 100 mg/L PMSF, 1% NP40, 0.5% 脱氧胆酸钠) 分别裂解转染 pcD2-hhlim 的分化型和未分化型 C2C12 细胞, 收集细胞裂解液, 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清加入 NET-明胶缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl,

pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.1% NP40, 1 mmol/L EDTA, 0.25% 明胶) 至总体积为 0.5 ml 后, 加入 hhlim 抗体 20 μ l, 4℃ 摇动 2 h, 然后, 加入蛋白 A-Sepharose 50 μ l, 4℃ 摇动过夜. 4℃, 12 000 r/min 离心 20 s, 收集 A 蛋白-抗原-抗体三元复合物. 依次用 1 ml NET-洗涤缓冲液 I、II、III 于 4℃ 洗涤沉淀 20 min, 4℃, 12 000 r/min 离心 20 s, 最后用 2×SDS 上样缓冲液悬浮沉淀, 100℃ 加热 3 min, 12 000 r/min 离心 20 s, 取上清进行 SDS-PAGE、转膜、脱脂奶粉 4℃ 封闭过夜后, 依次加入兔抗鼠 α -actin 一抗和羊抗兔二抗室温反应 2 h 后, 四氯-1-萘酚显色^[4].

2 结 果

2.1 细胞的形态学改变

如图 1a 所示, 被 pcD2-hhlim 与 pEGFP-N1 共转染的未分化型 C2C12 细胞经马血清诱导分化后, 其细胞体积比单纯转染 pEGFP-N1 的细胞 (图 1b) 明显增大 (约增加 1.5 倍). 被两种质粒共转染的细胞在不经马血清诱导时, 其细胞体积不发生明显变化.

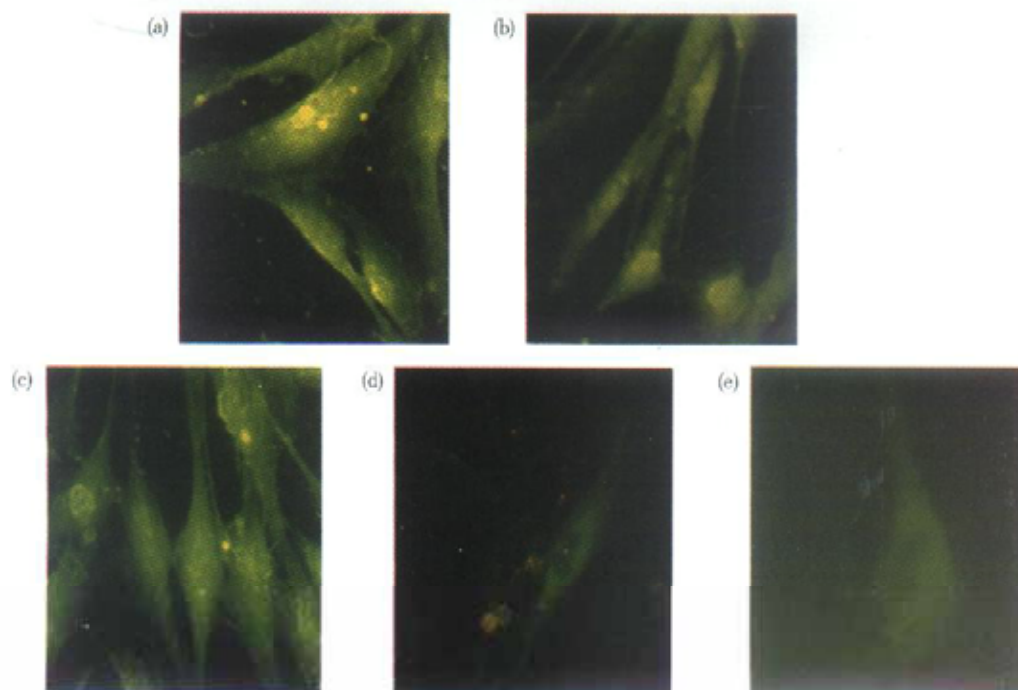


Fig 1 pcD2-hhlim and pEGFPN1 co infected MT and distribution of GFP-hhlim fusion protein expressed in the C2C12 muscle cells on 1 day, 2 days and 3 days after transfected with pEGFP-hhlim expression vector

(a) pcD2-hhlim and pEGFPN1 co-infected MT; (b) pEGFPN1 infected MT; (c) pEGFP-hhlim infected C2C12 muscle cells on 1 day induced with horse serum; (d) pEGFP-hhlim infected C2C12 muscle cells on 2 days induced with horse serum; (e) pEGFP-hhlim infected C2C12 muscle cells on 3 days induced with horse serum.

2.2 hhlim 的细胞定位

将 pEGFP-hhlim 融合蛋白表达载体转染未分化型 C2C12 细胞, 经马血清对其诱导 1 天, 2 天和 3 天后, 用荧光显微镜观察 hhlim 在细胞中的分布. 如图 1c 所示, 转染 1 天和 2 天后, 细胞表达的融合蛋白在细胞质和细胞核中均有分布, 3 天后, 细胞核中的绿色荧光明显减弱, 胞质荧光强度显著增强. 为了证明图 1c~e 所示的绿色荧光确系 GFP-hhlim 融合蛋白, 采用 pEGFP-N1 (图 1b) 为对照转染 C2C12 细胞, 发现细胞被转染 1 天, 2 天和 3 天后, GFP 的绿色荧光始终存在于全细胞. 提示在图 1c~e 所观察到的绿色荧光确系 GFP-hhlim 融合蛋白.

2.3 hhlim 基因强制性表达对 α -actin 表达的影响

用蛋白质印迹分析, 在未分化型 C2C12 细胞中检测不到 α -actin 的存在, 未分化型 C2C12 细胞被 pcD2-hhlim 转染后, α -actin 出现低量表达, 说明 hhlim 强制性表达可诱导未分化型 C2C12 细胞表达 α -actin, 但此时细胞不具备收缩活性 (结果另文发表); 在被马血清诱导分化的 C2C12 细胞中, α -actin 含量急剧增加, 比未分化细胞增加 8.07 倍, 并使细胞产生收缩活性 (结果另文发表). hhlim 基因在分化型 C2C12 细胞中的强制性表达, 使 α -actin 的含量比未转染 pcD2-hhlim 的细胞升高 1.71 倍 (图 2).

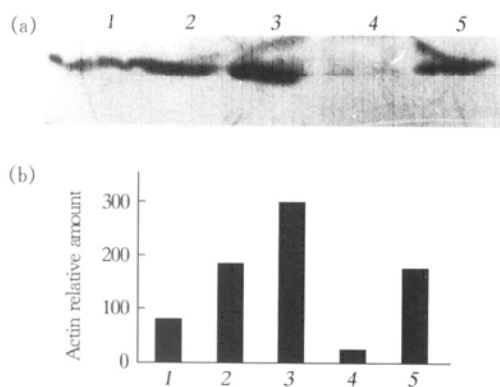


Fig 2 Western blot analysis for α -actin expression in C2C12 cells

(a) Western blot analysis; (b) densitometric scanning. 1: pcD2-hhlim infected MB; 2: pCMV-IGF-1 infected MT; 3: pcD2-hhlim infected MT; 4: pcD2 infected MB; 5: pcD2 infected MT.

2.4 hhlim 基因强制性表达对 BNP 表达的影响

如图 3 所示, 在未分化型 C2C12 细胞中 BNP 表达活性较高, 在被马血清诱导分化成熟的 C2C12

细胞中 BNP 不再表达, C2C12 细胞被转染 pcD2-hhlim 后经马血清诱导时, 该基因的表达又被显著诱导.

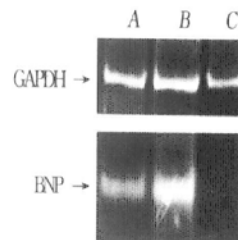


Fig 3 BNP mRNA expression in C2C12 cells

A: pcD2-hhlim infected MT; B: pcD2 infected MB; C: pcD2 infected MT.

2.5 hhlim 与 α -actin 的相互作用

以 hhlim 抗体和蛋白 A-Sepharose 对 C2C12 细胞裂解液进行免疫沉淀后, 用抗 α -actin 抗体进行蛋白质印迹的实验结果表明: 在分化型细胞, hhlim 抗体可以使 α -actin 共沉淀, 即出现明显的 α -actin 条带; 在转染 hhlim 后的分化型细胞, 条带明显加深; 转染 pcD2-hhlim 的未分化型细胞 α -actin 条带很浅, 在未分化型 C2C12 中检测不到 α -actin 的存在. 这些结果一方面说明 hhlim 可诱导 α -actin 表达, 另一方面提示, hhlim 在胞质中以与 α -actin 相互缔合的方式存在.

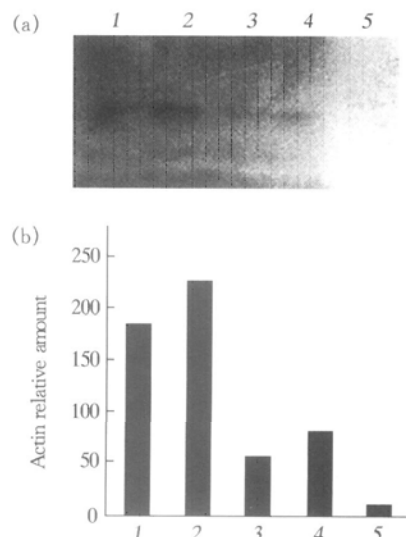


Fig 4 Western blot of co-immunoprecipitation between hhlim and α -actin

(a) Western blot of co-immunoprecipitation; (b) densitometric scanning. 1: pcD2 infected MT; 2: pcD2-hhlim infected MT; 3: pcD2-hhlim infected MB; 4: pCMV-IGF-1 infected MT; 5: pcD2 infected MB.

3 讨 论

hhlim 是新近从胎儿心脏中克隆得到的与心脏发育相关的基因, 因其与已发现的 LIM 蛋白家族中的 60 多个成员具有高度的同源性而得名^[1]. 已经证明, LIM 蛋白家族作为转录因子参与多种基因的转录调控和细胞的发育与分化过程^[5]. 根据 hhlim 蛋白的亚细胞定位、致心肌肥厚因子可诱导其表达, 以及转染 hhlim 基因可加速心肌细胞生长等一系列实验结果, 我们推测, hhlim 基因可能作为转录因子和/或胞质中的功能蛋白参与心肌肥厚的发生发展过程.

心肌肥厚是许多心血管疾病, 如高血压、心肌梗死、心脏瓣膜症等共同的病理生理过程, 主要表现在心肌细胞体积增大, 蛋白质蓄积, 肌原纤维新形成的肌节增加和胚胎基因再表达. 但目前关于心肌肥厚的发生机制尚不十分清楚^[6].

本研究发现, 转染 pcD2-hhlim 的未分化型 C2C12 细胞经马血清诱导分化后, 其细胞体积比单独用马血清诱导分化的细胞增加 1.5 倍. 外源性 hhlim 基因在 C2C12 细胞中的强制性表达既可诱导未分化型细胞表达 α -actin, 又可诱导分化型细胞表达 α -actin, 且对后种表型的作用强度远远大于前者, 并强于目前已知的促分化因子 IGF-1 诱导 α -actin 表达的作用 (图 2 和图 4). 这些结果提示, hhlim 促心肌细胞肥大可能是通过诱导 α -actin 过表达而实现的. 在外源性 hhlim 基因强制性表达的同时, 与心肌发育相关的胚胎基因 BNP 在分化型细胞中被诱导活化, 由此表明, hhlim 表达产物不仅参与细胞肥大的发生, 而且也与细胞肥大的启动有关.

本研究证实, hhlim-GFP 融合蛋白表达质粒转染的 C2C12 细胞被马血清诱导分化的过程中, 所表达的融合蛋白的亚细胞定位发生动态变化, 表现为表达产物的绿色荧光先在胞质与胞核均有分布, 而后定位于胞质中. 从用 hhlim 抗体可使 α -actin 免疫共沉淀这一现象可知, 胞质中存在的 hhlim 是以与 α -actin 相互缔合方式存在的. 由此可以得出 hhlim 可能参与心肌肥厚时以 α -actin 为基础的细胞骨架重构过程的结论. 根据 hhlim 强制性表达可使胚胎基因 BNP 重新表达, 我们推测, 在 C2C12 细胞从未分化型向分化型转变的早期, 存在于核内的 hhlim 蛋白可能具有启动心肌细胞肥大相关基因表达的作用.

参 考 文 献

- 1 陈光慧, 周子振, 张继峰, 等. 应用三元递减法筛选特异性心脏生长相关基因. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16 (3): 295~300
Chen G H, Zhou Z Z, Zhang J F, *et al.* Chin J Biochem Mol Biol, 2000, 16 (3): 295~300
- 2 郑 斌, 温进坤, 韩 梅, 等. hhlim 基因转录调控区域的鉴定及表达调控的初步研究. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29 (6): 910~914
Zheng B, Wen J K, Han M, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2002, 29 (6): 910~914
- 3 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-chloroform extraction. Anal Biochem, 1987, 162 (1): 156~159
- 4 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 等. 金冬雁等译. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 1996. 867~887
Sambrook J, Fritsch E F, *et al.* translated by Jin D Y, *et al.* Molecular Cloning. Beijing: Science press, 1996. 867~887
- 5 Bach I. The LIM domain: regulation by association. Mech Dev, 2000, 91 (1~2): 5~17
- 6 Liang Q G, Wind L J, Witt S A, *et al.* The transcript factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy *in vitro* and *in vivo*. J Biol Chem, 2001, (32): 30245~30253

Cell Localization of hhlim Gene Product and Its Effect on Cell Hypertrophy*

ZHENG Bin¹⁾, WEN Jin-Kun^{1)**}, HAN Mei¹⁾, ZHOU Ai-Ru²⁾

(¹⁾Hebei Laboratory of Medical Biotechnology, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;

(²⁾Department of Biochemistry and Molecular Biology, Health Science Center, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract hhlim was a new heart-related gene cloned from human embryonic heart whose product participated in transcriptional regulation and cell development as a kind of transcriptional factor. Over expression of hhlim gene using recombinant plasmid was sufficient to induce a greater than 1.5 fold increase in C2C12 muscle cell area compared with that untransferred with hhlim. RT-PCR and Western blot testified that transfection of hhlim into the C2C12 muscle cells could induce α -actin over expression and trigger the expression of embryonic related gene BNP, which is related to the cell hypertrophy. hhlim-green fluorescence fusion protein in hhlim-pEGFP-C3 transfected C2C12 muscle cells was recorded with fluorescence microscopy during C2C12 muscle cell

differentiation induced by horse serum. The data showed that the distribution change of green fluorescence of hhlml-GFP fusion protein from cytoplasm to nucleus was observed. Co-immunoprecipitation proved that hhlml protein exists in a manner that associates with α -actin in cytoplasm.

Key words hhlml gene, cell hypertrophy, subcellular localization, α -actin, type B natriuretic peptide (BNP)

* This work was supported by a grant from The Special Funds for Major State Basic Research of China (G2000056905-Z).

** Corresponding author. Tel: 86-311-62655563, E-mail: wjk@hebmu.edu.cn

Received: May 22, 2002 Accepted: June 28, 2002

国际生物光子学和生物光子学会议 (ICBB. 2003) (第一轮通知)

由中国生物物理学会光生物物理专业委员会和国际生物物理研究所联合主办的“国际生物光子学和生物光子学会议 (ICBB)”定于2003年10月12日至16日在北京举行。

大会组织委员会 主席: 沈恂 (中国), Fritz-Albert Popp (德国); 秘书长: 刘亚宁 (中国)

会议交流主题: 1) 生物光子的物理学、化学和生物学特性; 2) 生物光子在医学、农业和环境科学中作为诊断手段的应用潜力; 3) 光子在生物介质中的扩散、散射和反射; 4) 大分子荧光标记的新方法; 5) 肿瘤的无创伤诊断、定位和治疗的光学新方法; 6) 光学断层扫描 (OCT); 7) 亚细胞水平的光学成像; 8) 功能分子成像技术和细胞化学成像; 9) 生物医学中观察、测量分析和操作的光学新技术。

有关会议地点、会议注册费及论文摘要格式等信息请详见第二轮通知。第二轮通知将于3月底前在网上登出, 并通过E-mail或邮寄发出, 届时请见会议网址: <http://www.cicst.org.cn/ICBB>, <http://www.lifescientists.de>

会议回执: 2003年3月15日

会议回执及论文摘要请寄至:

100101 北京朝阳区大屯路15号中国生物物理学会 魏舜仪 (收)

电话: 010-64889894/64889872, 传真: 010-64871293, E-mail: sb@sun5.ibp.ac.cn

国际生物光子学和生物光子学研讨会回执 (2003年10月12日~16日, 中国北京)

姓 名	性别:	职务:
工作单位		
通讯地址		
邮政编码		
电 话	传真:	
E-mail		
☐	我拟参加国际生物光子学和生物光子学会议, 请寄第二轮通知	
☐	我拟提交会议论文摘要	