

· 基础研究 ·

蛋白激酶 C 亚型在小鼠胚胎干细胞中的表达研究

高前应, 葛 坚, 王智崇, 杨智宽, 黄丹平, 袁钊辉, 陈慧怡, 陶 靖
(中山大学中山眼科中心, 广东 广州 510060)

摘 要:【目的】研究 5 种蛋白激酶 C(PKC)亚型 PKC α 、PKC β 、PKC γ 、PKC δ 和 PKC ϵ 在小鼠胚胎干细胞(ES 细胞)株 ES-BALB/c 的表达情况。【方法】ES-BALB/c 细胞株用普通 ES 细胞培养液培养, 分别种植于预置有盖玻片的 6 孔板和直径 100 mm 的培养皿, 培养 2 d 和 4 d 后分别进行 PKC 亚型免疫组织化学和 Western 印迹检测。【结果】免疫组化发现 PKC α 在 ES-BALB/c 细胞有广泛的棕黄色的阳性表达, 以细胞浆和细胞核最甚, 而 PKC β 、PKC γ 、PKC δ 和 PKC ϵ 4 种亚型无明显表达; Western 印迹发现 PKC α 出现一条蛋白印迹条带, 分子量约为 84 ku, 而 PKC β 、PKC γ 、PKC δ 和 PKC ϵ 4 种亚型无蛋白印迹条带。【结论】PKC α 在 ES 细胞阶段即有表达, 在将来的细胞分化阶段可能有非常重要的作用, 而 PKC β 、PKC γ 、PKC δ 和 PKC ϵ 4 种亚型在 ES 细胞阶段没有表达。

关键词: 胚胎干细胞; 蛋白激酶 C; 蛋白表达; 小鼠

中图分类号: Q51

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2003)04-0312-04

Study on the Expressions of Protein Kinase C Isoenzyme in Embryonic Stem Cells of Mouse

GAO Qian-ying, GE Jian, WANG Zhi-chong, YANG Zhi-kuan, HUANG Dan-ping,
YUAN Zhao-hui, CHEN Hui-yi, TAO Jing
(Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract:【Objective】To study the expressions of the protein kinase C(PKC) isoenzyme PKC α , PKC β , PKC γ , PKC δ and PKC ϵ in embryonic stem cells(ES cells) of mouse.【Methods】ES-BALB/c cells were incubated in the ES conditioned medium, and cultured in 6-well culture dishes with coated glass coverslip and in 100-mm dishes for 2 and 4 days, respectively. Immunohistochemistry and Western blot assay were performed to identify the PKC isoform expression.【Results】Staining of PKC α but PKC β , PKC γ , PKC δ and PKC ϵ was strong and distributed throughout the cells, especially in the cytoplasm and nucleus. Western blot analysis exhibited a band of approximately 84 ku with the antibody specific to PKC α . No reactions were shown for other four PKC isoenzyme, PKC β , PKC γ , PKC δ and PKC ϵ .【Conclusion】PKC α is expressed at the stage of ES cells and probably plays an very important role in differentiation, while PKC β , PKC γ , PKC δ and PKC ϵ are not expressed at the same time.

Key words: embryonic stem cells; protein kinase C; protein expression; mouse

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2003, 24(4):312~315]

自 Nishizuka 1977 年发现蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)以来, 因其广泛参与细胞信息传递、

分泌、离子通道调节、细胞增殖、分化及癌变等一系列与生命现象相关的过程而成为生物界和医学界

收稿日期: 2003-02-20

基金项目: 国家重点基础研究发展规划基金资助项目(973)子项目(G1999054301); 国家自然科学基金资助项目(30171001); 广东省重点科技攻关项目(A302020101); 广东省自然科学基金资助项目(990093)

作者简介: 高前应(1969-), 男, 安徽肥西人, 中山眼科中心在站博士后; 葛 坚, 通讯作者。

研究的重点之一。目前发现 PKC 家族至少有 12 种亚型^[1-3],各亚型显示了不同的酶学特性及不同的组织表达和特定的细胞内定位,不同的亚型具有不同的功能。胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES 细胞)为一种具有发育全能性的高度未分化细胞,已在个体发育研究、基因功能研究以及制备转基因动物等许多医学研究领域发挥重要作用^[4-6]。然而,迄今为止人们没有对 ES 细胞的 PKC 亚型进行研究,我们采用免疫组织化学和 Western 印迹两种方法研究 ES 细胞的 5 种常见的 PKC 亚型表达,为进一步研究 PKC 调控 ES 细胞的分化奠定了实验基础。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

PKC α 、PKC β 、PKC γ 、PKC δ 和 PKC ϵ , 鼠单克隆抗体(BD Transduction Laboratories);辣根过氧化物酶标记兔抗鼠抗体(BD Transduction Laboratories);免疫组化二步法染色试剂盒(Immunostain Elivision Kit)(福州迈新生物技术开发公司);胎牛血清(杭州四季青生物制品公司)、小鼠白血病抑制因子(mouse leukemia inhibitory factor, mLIF, GIBICO 公司)。

1.2 细胞培养

ES 细胞为 ES-BALB/c 细胞株第 20 代^[7],由中山大学北校区动物实验中心黄冰副教授提供。在细胞扩大培养时用有饲养层的条件培养基(无 2-巯基乙醇和 mLIF);实验时 ES 细胞用常用的 ES 细胞条件培养基培养。培养液含:高糖 DMEM 培养基、非必需氨基酸、L-谷氨酰胺,100 mL/L 的胎牛血清、100 μ mol/L 的 2-巯基乙醇、10⁶ U/L mLIF。

1.3 细胞爬片制备

ES-BALB/c 细胞长满培养瓶 80% 时,用 D-Hanks 液清洗后,再用 2.5 g/L 的胰蛋白酶-EDTA 室温消化 0.5 min 后,用毛细吸管轻柔反复吹打,将细胞吹散,接种于预置盖玻片的 6 孔板中,加入 ES 细胞培养液孵箱培养 48 h 后取出细胞爬片。0.01 mol/L PBS 洗 2 次,丙酮固定 60 min, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 免疫组织化学检查

按免疫组化二步法染色试剂盒说明书进行。第一抗体为鼠抗 PKC α 、PKC β 、PKC γ 、PKC δ 和 PKC ϵ 。基

本步骤为:取出细胞爬片,加过氧化酶阻断剂(试剂 A),室温 10 min; PBS 洗后非免疫性动物血清(试剂 B)室温孵育 10 min;加 1:600 稀释的第一抗体,室温孵育 60 min; PBS 洗后加辣根过氧化物酶标记的第二抗体(试剂 C),室温孵育 30 min; PBS 洗后,加现配的试剂 D,显微镜下观察 5 min,自来水冲洗,苏木素复染,脱水、中性树胶封固。实验的对照设计如下:阳性对照,用小鼠大脑细胞与待检标本平行染色;空白对照,第一抗体用 PBS 代替;替代对照,用兔正常血清替代第一抗体。

1.5 Western 印迹

将 5 \times 10⁶ ES 细胞接种到 10 mm 直径的培养皿中,培养 4 d 细胞刮匙将细胞收集,液氮冻存。实验时将冰冻细胞用细胞裂解液(0.1 mol/L NaCl, 0.01 mol/L Tris \cdot HCl(pH 7.6), 0.001 mol/L EDTA (pH 8.0), 1 μ g/L Aprotinin 和 100 μ g/L 苯甲基磺酰氟)裂解,作用 30 min,离心(上海安亭 GL-16G-II 离心机, $r = 25$ cm, 1200 r/min, 15 min)后取上清。以考马斯亮蓝法(Bradford)测定蛋白含量。然后加入 1/5 体积的 5 \times 上样缓冲液,经沸水煮沸 5 min 处理后以 100 μ g/道上样。参照《分子克隆实验指南》中的方法^[8]进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳及 Western blot 检测。积层胶浓度为 4.5%,分离胶浓度为 10%。将电泳分离的蛋白质转移至 PVDF 膜上,在封闭后的 PVDF 膜上加入 1:1 000 的 PKC α 、PKC β 、PKC γ 、PKC δ 和 PKC ϵ 小鼠单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 下过夜,在室温下与 1:200 辣根过氧化物酶标记的兔抗小鼠 IgG 孵育 3 h,清洗后在 DAB 溶液中呈色。阳性对照:用大脑溶解产物代替标本。每个实验重复 3 次。

2 结 果

2.1 ES-BALB/c 细胞观察

ES-BALB/c 细胞在有饲养层的培养基上呈集落生长,呈卵圆形或结节状,体积大,边界清晰光滑,散在黏附在梭形的滋养层细胞上,集落内细胞排列紧密,边界不清(图 1)。在无饲养层时仍能保持其高度未分化状态,呈小集落、贴壁生长,边缘清晰,细胞排列紧密,细胞之间界限不清(图 2)。用胰酶消化后细胞涂片观察见:细胞为圆形,呈链状、半环状和小片状排列,胞质少,胞核大、略深染。

2.2 免疫组织化学染色

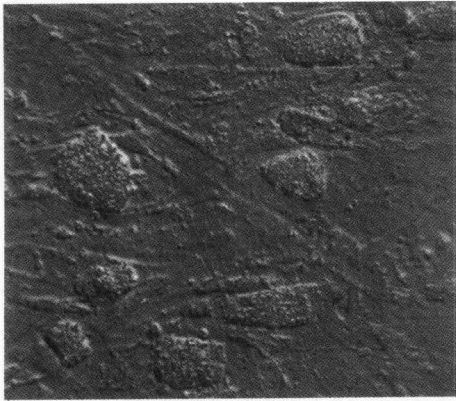


图 1 在饲养层上生长的 ES-BALB/c 细胞

Fig. 1 ES-BALB/c cells grew on the feeder layer ($\times 200$)

PKC α 在 ES-BALB/c 细胞有广泛的棕黄色的阳性表达,以细胞浆和细胞核最甚,细胞膜也有一定的阳性表达(图 3),而 PKC β 、PKC γ 、PKC δ 和 PKC ϵ 4 种亚型在细胞中无明显表达(图 4),空白对照均不着色;阳性对照可见大脑细胞胞浆和细胞核呈棕黄色着色。

2.3 Western 印迹

PKC α 出现一条蛋白印迹条带,分子质量与蛋白质分子质量 Marker 相比,约为 84 ku, PKC β 、PKC γ 、PKC δ 和 PKC ϵ 均未出现蛋白印迹条带(图 5),而它们的阳性对照均出现分子质量不等的蛋白杂交条带。

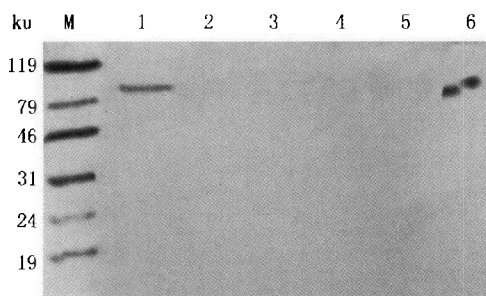


图 5 PKC 亚型的 Western 印迹

Fig. 5 Western blot of PKC isoforms

Lane 1: PKC α ; Lane 2: PKC β ; Lane 3: PKC γ ; Lane 4: PKC δ ; Lane 5: PKC ϵ ; Lane 6: positive control of PKC α ; M: marker

3 讨论

PKC 是从脑组织中分离出来的是一种磷脂依赖性丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,分子质量为 80 ~

90 ku。PKC 广泛分布于几乎所有的组织细胞的细胞膜和细胞质中,有时细胞核中也有分布。PKC 参与许多细胞的调控,其作用机理是促使蛋白底物发生磷酸化从而改变其活性,调节细胞的生命活动^[9]。PKC 可分为 3 大类^[1-3]: 典型 PKC(classical PKCs, cPKC), 因其依赖 Ca²⁺, 也称 Ca²⁺ 依赖性 PKC, 包括 PKC α 、PKC β _I、PKC β _{II}、PKC γ ; 新型 PKC(new PKCs, nPKC), 包括 PKC δ 、PKC ϵ 、PKC η 、PKC θ 、PKC μ ; 非典型 PKC(atypical PKCs, aPKC), 包括 PKC ζ 、PKC ι 、PKC λ , 各亚型具有不同的组织表达和特定的细胞内定位,多种亚型可在同一组织甚至同一细胞中存在,并介导不同的信号传递功能。

我们首次用免疫组化和 Western 印迹两种方法检测 PKC 亚型在 ES 细胞中的表达,得出了相似的结果,ES 细胞的 PKC α 有广泛表达,PKC β 、PKC γ 、PKC δ 和 PKC ϵ 4 种亚型均无明显表达,而这 4 种亚型的蛋白 marker 和阳性对照均能出现正常结果,说明我们实验本身无技术因素失败;然而 PKC β 、PKC γ 、PKC δ 和 PKC ϵ 4 种亚型在组织细胞中均有不同程度的表达,如兔视网膜有 PKC α 、PKC β 和 PKC γ 3 种亚型表达^[10,11];人视网膜细胞也有 PKC α 、PKC β _{II} 和 PKC δ 3 种亚型表达^[12]。究其原因可能与细胞分化的基因表达特点有关^[13]。受精卵、卵裂球、胚胎细胞及各种类型的分化细胞都具有相同的基因组。细胞分化时,细胞内基因并非都同时表达,而是不同的基因在不同的时间点表达。在同一时间内有的基因有活性,有的基因可能无活性而处于沉默状态。在另一时期,原来有活性的基因可能继续表现活性,也可能关闭,而原来沉默的无活性基因可能被激活。在胚胎发生过程中相继出现的新细胞类型,就是有关的特定基因相继表达的结果。这种在个体发育过程中基因按照一定程序相继激活的现象,被称为基因的差异表达(differential expression)或顺序表达(sequential expression)。细胞分化的关键是细胞按一定程序发生基因差异表达,开放某些基因,关闭某些基因。鉴于 PKC α 在细胞分化中有非常重要的作用^[14,15],因此我们有理由推测:PKC α 在 ES 细胞阶段即有表达,在将来的细胞分化阶段可能有非常重要的作用,而 PKC β 、PKC γ 、PKC δ 和 PKC ϵ 4 种亚型由于基因的差异表达特点在 ES 阶段并不表达,可能是 ES 细胞分化为组织细胞之后才获得的,至于它们的时空表达特点需要进一步的研究。

(本文图 2~4 见封 2. Fig. 2~4 shown in inside front cover)

参考文献:

- [1] Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation[J]. Nature, 1988, 334(6184): 661.
- [2] Ono Y, Fujii T, Ogita K, *et al.* The structure, expression, and properties of additional members of the protein kinase C family[J]. J Biol Chem, 1988, 263(14): 6927.
- [3] Osada S, Mizuno K, Saido T C, *et al.* Phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC eta, a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin [J]. J Biol Chem, 1990, 265(36): 22434.
- [4] Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. Science, 1998, 282(5391): 1145.
- [5] Shambloot M J, Axelman J, Wang S, *et al.* Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cell[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(23): 13726.
- [6] Yu L, Ge J, Wang Z H, *et al.* The preliminary experimental study of induced differentiation if embryonic stem cells into corneal epithelial cells[J]. Eye Science, 2001, 17(3): 138.
- [7] 邱观婷, 黄冰, 唐仕波, 等. 探讨保持胚胎干细胞全能性的体外培养条件 [J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(2): 100.
- [8] Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南 [M]. 第 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1992. 880.
- [9] 林明群, 张宗梁. 蛋白激酶 C 的激活转位和它介导的信号通路 [J]. 生命科学, 1996, 8(1): 15.
- [10] Osborne N N, Barnett N L, Morris N J, *et al.* The occurrence of three isoenzymes of protein kinase C (alpha, beta and gamma) in retinas of different species [J]. Brain Res, 1992, 570(1-2): 161.
- [11] 林乃冈, 张军军. 兔视网膜中蛋白激酶 C 的定位研究 [J]. 中华眼底病杂志, 1996, 12(4): 242.
- [12] Moriarty P, Dickson A J, Erichsen J T, *et al.* Protein kinase C isoenzyme expression in retinal cells [J]. Ophthalmic Res, 2000, 32(2-3): 57.
- [13] 赵志力, 付小兵. 修复细胞分化的调控机制与鉴别 [J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(2): 120.
- [14] Balasubramanian N, Advani S H, Zingde S M. Protein kinase C isoforms in normal and chronic myeloid leukemic neutrophils. Distinct signal for PKC alpha by immunodetection on PVDF membrane, decreased expression of PKC alpha and increased expression of PKC delta in leukemic neutrophils [J]. Leuk Res, 1998, 22(7): 597.
- [15] Alrefai W A, Scaglione-Sewell B, Tyagi S, *et al.* Differential regulation of the expression of Na(+)/H(+) exchanger isoform NHE3 by PKC-alpha in Caco-2 cells [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2001, 281(5): C1551.

(编辑 刘清海)

· 简 讯 ·

我校非典研究获重大成果

最近, 我校中山大学附属第三医院传染病科李刚教授与生命科学院徐安龙教授合作撰写的论文 Profile of Special Antibody in SARS Patients (SARS 特异性抗体的变化规律) 将发表在 2003 年 7 月下旬 New England Journal of Medicine (《新英格兰医学杂志》) 上。该杂志是国际权威医学杂志, 其影响因子为 29, 高于 Science 和 Nature 等国际学术杂志。

李刚教授和徐安龙教授通过对 20 多例非典患者不同时期系列血清标本和 100 多例与非典患者密切接触的医务人员血清标本进行研究, 揭示了非典抗体的动力学变化规律。这一发现对非典疫苗研制、疾病控制、流行病学调查及治疗均有重要意义。该成果是我校医学和生命科学跨学科合作的结果, 充分显示了中山大学作为综合性大学的学科优势。

(何晓钟)

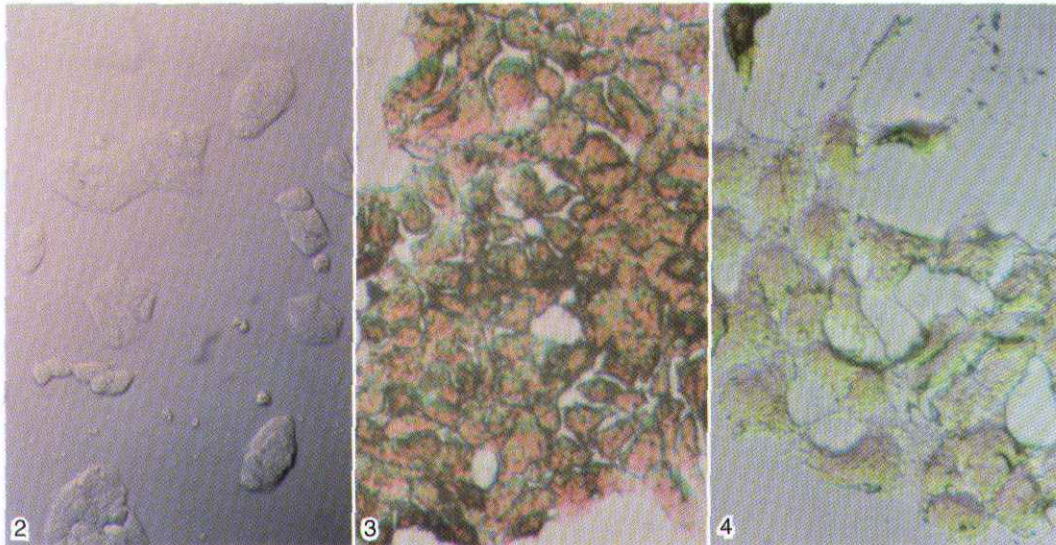


图 2 无饲养层生长的 ES-BALB/c 细胞 ×200
 图 3 ES-BALB/c 细胞的 PKC_α 免疫组化图象 ×200
 图 4 ES-BALB/c 细胞的 PKC_γ 免疫组化图象 ×200
 Fig. 2 ES-BALB/c cells grew without feeder layer
 Fig. 3 ES-BALB/c cells in PKC_α staining (positive)
 Fig. 4 ES-BALB/c cells in PKC_γ staining (negative)

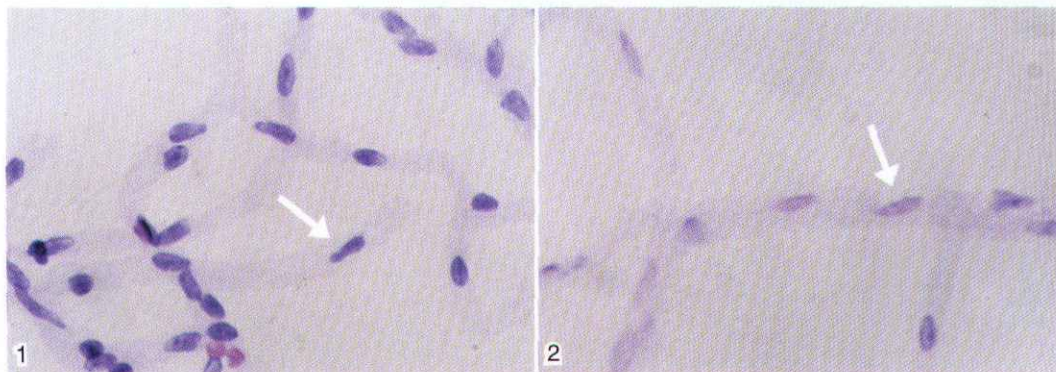


图 1 光镜下 12 周对照组大鼠的视网膜血管消化铺片
 图 2 光镜下 12 周糖尿病大鼠的视网膜血管消化铺片
 Fig. 1 The retinal digest preparation under the light microscope in the control rat at the 12th week (arrow: punctate, ×400)
 Fig. 2 The retinal digest preparation under the light microscope in the diabetic rat at the 12th week (arrow: punctate, ×400)

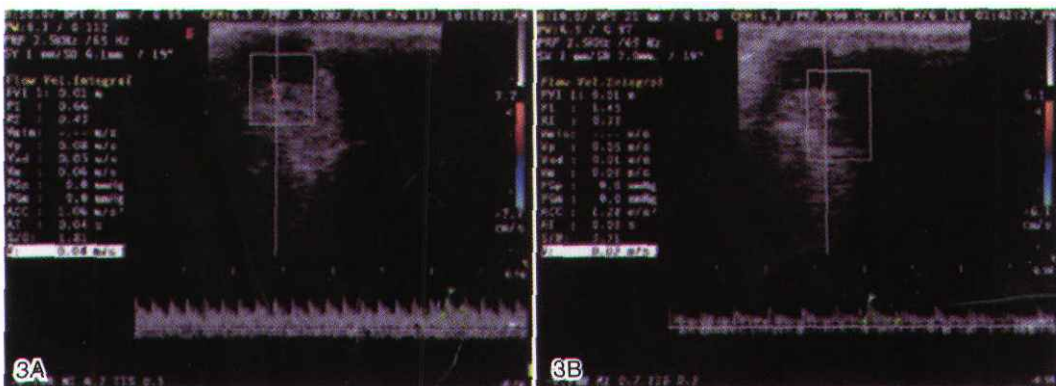


图 3 12 周大鼠视网膜中央动脉的彩色多普勒超声检查血流参数
 Fig. 3 The circulatory parameters of CRA at 12th week measured by color Doppler imaging
 A Control group, B Diabetic group