

质粒 DNA 增强大鼠缺血骨骼肌肌浆网钙转运功能^{*}

姜志胜, 赵文¹, 杨永宗, 唐朝枢^{1, **}, 汤健¹, 贾弘², 刘乃奎¹

(衡阳医学院心血管病研究所, 衡阳 421001;

¹ 北京医科大学心血管基础研究所, ² 生物化学与分子生物学系, 北京 100083)

摘要: 在大鼠肢体缺血模型上观察了质粒 pcDNA3 对缺血骨骼肌肌浆网(SR) Ca^{2+} 转运的影响。结果显示, 骨骼肌缺血时 SR Ca^{2+} 转运(Ca^{2+} 摄入与释放)较非缺血肌肉增强, 而质粒 pcDNA3 与 SR 上 DNA 结合蛋白结合之后, 可进一步增强缺血骨骼肌 SR Ca^{2+} 摄入($P < 0.01$)及释放速率($P < 0.05$)。提示质粒 DNA 对正常及缺血大鼠骨骼肌的 SR Ca^{2+} 转运能力均有影响, 其临床病理生理意义值得进一步研究。

关键词: 肢体缺血; 钙摄入/释放; DNA 结合蛋白; 骨骼肌肌浆网; 大鼠

学科分类号: Q445; Q593+.3

Plasmid pcDNA3 enhances Ca^{2+} transport of sarcoplasmic reticulum in ischemic skeletal muscle of rats^{*}

JIANG Zhi-Sheng, ZHAO Wen¹, YANG Yong-Zong, TANG Chao-Shu^{1, **},

TANG Jian¹, JIA Hong-Ti², LIU Nai-Kui¹

(Research Institute of Cardiovascular Diseases, Hengyang Medical College, Hengyang 421001;

¹ Institute of Cardiovascular Research and ² Department of Biochemistry and

Molecular Biology, Beijing Medical University, Beijing 100083)

Abstract: The effects of plasmid pcDNA3 on Ca^{2+} transport of sarcoplasmic reticulum (SR) in ischemic skeletal muscle was investigated. The results show that Ca^{2+} transport (including Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} release) rate of SR in ischemic skeletal muscle was markedly increased compared with that in non-ischemic muscle ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). After plasmid pcDNA3 bound to the DNA binding proteins of SR, Ca^{2+} transport of SR was further increased. The results suggest that the effect of plasmid DNA on the ability of Ca^{2+} transport in SR of ischemic skeletal muscle is the same as is observed in normal skeletal muscle. The pathophysiological significance of the present finding deserves further exploration.

Key words: limb ischemia; Ca^{2+} uptake/release; DNA binding protein; skeletal muscle sarcoplasmic reticulum; rat

DNA 结合蛋白不仅存在于细胞核内, Hagstrom 及本实验室分别在家兔及大鼠发现骨骼肌肌浆网(sarcoplasmic reticulum, SR)膜上也存在 DNA 结合蛋白^[1, 2]。非核 DNA 结合蛋白的生理意义尚不清楚, 尤其是基因治疗时的病理生理意义目前尚未见报道。我们观察到质粒 DNA 与 SR 上 DNA 结合蛋白结

合之后, 明显影响 SR 功能, 促进 SR Ca^{2+} 转运, 即 Ca^{2+} 摄入与释放均增加^[3]。本实验进一步在大鼠肢体缺血模型上观察了质粒 pcDNA3 对缺血骨骼肌 SR Ca^{2+} 转运的影响, 以进一步了解病理情况下 SR 上 DNA 结合蛋白对 SR 功能的影响。

Received 1999-08-02 Revised 1999-11-15

^{*} Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.39900057)

^{**} Corresponding author. Tel : 010-66171122-2577; E-mail : tangchaoshu@263.net

1 材料和方法

1.1 动物及试剂 雄性 SD 大鼠(150 ~ 250 g, bw)由北京医科大学动物部提供; $^{45}\text{CaCl}_2$ 购自 Amersham 公司, caffeine 购自 Sigma 公司, 其余均为国产及进口分析纯试剂。

1.2 大鼠肢体缺血模型制备^[4] 大鼠用 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后, 用止血带结扎右侧后肢根部, 造成右后肢缺血, 2 h 后处死动物, 迅速摘取缺血肢体和对侧(左侧)非缺血肢体(作为对照)肌肉, 放于冰冷的生理盐水中, 用以分离 SR 囊泡。

1.3 骨骼肌肌浆网膜囊泡制备^[5,6] 将所取肌肉于冰浴中剪碎, 加入 7.5 倍体积的缓冲液 A (w/v)。缓冲液 A (mmol/L): 焦磷酸钠 20, 磷酸缓冲液 20, MgCl_2 1, 蔗糖 0.303, EDTA 0.5, aprotinin 76.8×10^{-2} , leupeptin 1.1×10^{-6} 和 PMSF 0.23。4℃ 差速离心 10000 r/min, 15 min; 16000 r/min, 30 min; 30000 r/min, 30 min。沉淀即为 SR 膜囊泡粗提物, 用缓冲液 B 复溶, 缓冲液 B 中含 20 mmol/L Tris-maleate, 0.1 mmol/L PMSF 和 0.303 mol/L 蔗糖, pH 7.0, 应用文献^[6]方法分别测定肌肉匀浆及 SR 膜制备的 Ca^{2+} -ATPase (肌浆网标志酶), Na^{+} - K^{+} -ATPase (质膜标志酶) 及 azide-ATPase (线粒体标志酶) 的活性, 以鉴定 SR 制备的纯度。用考马斯亮蓝法进行蛋白定量, 并贮存于 -80℃ 备用。

1.4 质粒 DNA 的制备 质粒 pcDNA3 (invitrogen 公司), 经转化大肠杆菌进行扩增, 应用聚乙二醇纯化, 获得闭合环状 DNA, 于 -20℃ 贮存备用。

1.5 大鼠骨骼肌肌浆网 Ca^{2+} 摄取功能测定 参照 Ortega 等^[7]报道的方法测定 SR Ca^{2+} 摄入, 反应体系每管 200 μl , 反应混合液组成 (mmol/L): KCl 100, MgCl_2 5, CaCl_2 0.05, HEPES 10, pH 7.1, 含 200 g SR 蛋白, 37 kBq $^{45}\text{CaCl}_2$ 。加入 5 mmol/L Ca_2 -ATP, 37℃ 启动 Ca^{2+} 摄取反应, 反应时间 30 min, 经微孔滤膜抽滤后液闪仪测定 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 放射强度。实验分为 4 组: 正常对照组, 对照 pcDNA3 组, 缺血组及缺血 pcDNA3 组。质粒 DNA 处理组预先将缺血及对照 SR 膜囊泡 (200 μg) 与 20 μg pcDNA3 室温共同孵育 30 min 后, 离心弃上清以去除游离 pcDNA3, 沉淀以反应混合液复溶, 再测定 SRCa^{2+} 摄入。

1.6 大鼠骨骼肌肌浆网 Ca^{2+} 释放功能测定^[7] 大鼠骨骼肌 SR 主动负载 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 反应体系及反应过程同上, 37℃ 孵育 30 min 后, 离心 12000 r/min, 5 min, 弃上清, 沉淀洗涤后, 每管加入 400 μl 释放液

(mmol/L: KCl 80, Tris-HCl 20, pH 6.8, caffeine 10), 并分别于 1、3 和 5 min 各取 100 μl , 测定 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 放射性。实验分组及质粒 DNA 处理同上。

1.7 统计学处理 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, ANOVA 方差分析, 组间 q 检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 大鼠骨骼肌肌浆网纯度鉴定

SR 膜 Ca^{2+} -ATPase 的活性较骨骼肌组织匀浆高 6.5 倍 [nmol/(mg·min)]: 30038 vs 4014, $P < 0.01$), Na^{+} - K^{+} -ATPase 及 azide-ATPase 的活性较骨骼肌组织匀浆分别低 22.2% ($P > 0.05$) 和 51.3% ($P < 0.05$) [nmol/(mg·min)]: 143 vs 186; 5614 vs 11521。提示制备的 SR 膜纯度较高。

2.2 质粒 pcDNA3 对大鼠缺血骨骼肌肌浆网 Ca^{2+} 摄入的作用

用 pcDNA3 处理后 SR Ca^{2+} 摄入量较正常对照组升高 52% ($P < 0.01$); 缺血 2 h 后骨骼肌 SR Ca^{2+} 摄入量较正常对照组升高 ($P < 0.05$), 应用 pcDNA3 与缺血骨骼肌 SR 共同孵育后, SR Ca^{2+} 摄入量较未经 pcDNA3 处理的缺血组升高 16% ($P < 0.01$)。提示质粒 pcDNA3 预处理可增强缺血骨骼肌 SR Ca^{2+} 摄入, 但增加幅度较其对正常非缺血骨骼肌略低 (见图 1)。

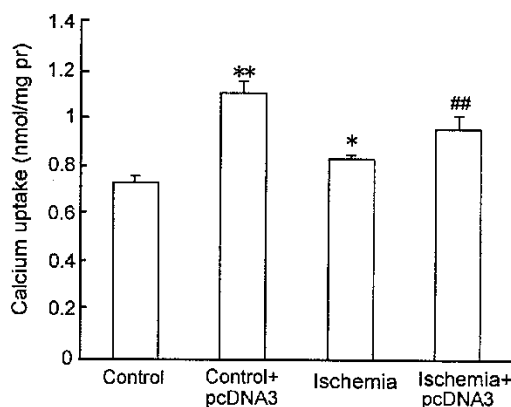


图 1. 质粒 pcDNA3 对正常及缺血大鼠骨骼肌肌浆网钙摄入的作用

Fig.1. Effect of pcDNA3 on calcium uptake of normal and ischemic sarcoplasmic reticulum in rat skeletal muscle. Data are expressed as mean $\pm$ SD, $n = 5$ in each group. ** $P < 0.01$ compared with control; ## $P < 0.01$ compared with ischemia. (ANOVA followed by q test).

2.3 质粒 pcDNA3 对大鼠缺血骨骼肌肌浆网 Ca^{2+} 释放的作用

正常对照组大鼠骨骼肌 SR Ca^{2+} 释放量在 1、3

和 5 min 分别为 0.40 ± 0.03 , 0.61 ± 0.01 和 0.76 ± 0.02 nmol/mg, 1 和 3 min 的释放量分别为总量的 $53 \pm 5\%$ 和 $80 \pm 3\%$, 5 min 时几乎完全释放。应用 pcDNA3 处理之后, SR Ca^{2+} 释放量较对照组明显升高, 且释放速率也明显加快, 1 和 3 min 的释放量分别较对照组升高 14% 和 15% (均 $P < 0.01$)。缺血后骨骼肌 SR Ca^{2+} 释放量较非缺血对照组相应升高, 释放速率亦明显加快, 1 和 3 min 的释放量分别为 $66 \pm 5\%$ 和 $89 \pm 3\%$, 与对照组相比差异具有高度显著性 (均 $P < 0.01$); 应用 pcDNA3 与缺血骨骼肌 SR 预孵育后, SR Ca^{2+} 释放量与缺血对照组相比明显升高, 释放速率也明显增强, 1 和 3 min SR Ca^{2+} 释放速率分别较缺血对照均升高 7% (均 $P < 0.05$)。提示缺血骨骼肌 SR 应用 pcDNA3 处理后其 Ca^{2+} 释放速率较缺血对照组明显增强, 但增强幅度较正常对照组低 (图 2)。

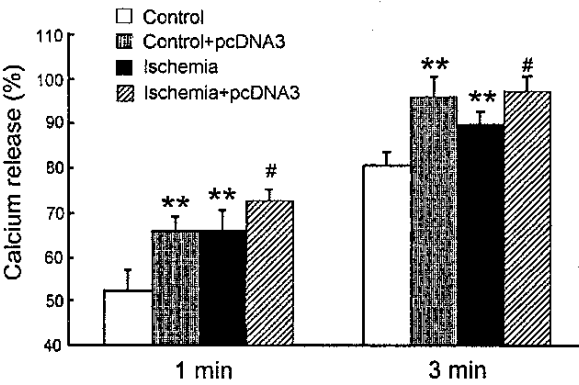


图 2. 质粒 pcDNA3 对正常及缺血大鼠骨骼肌肌浆网钙释放的作用

Fig.2. Effect of plasmid pcDNA3 on calcium release of SR in normal and ischemic rat skeletal muscle. Data are expressed as mean $\pm$ SD, $n = 5$ in each group. ** $P < 0.01$ compared with control; ## $P < 0.01$ compared with ischemia. (ANOVA followed by q test).

3 讨论

Hagstrom 等首次报道, 家兔骨骼肌 SR 上存在 DNA 结合蛋白, 分子量为 95、60 和 28 kDa, 它们可与双链 DNA 特异性结合^[1]; 本实验室发现大鼠骨骼肌 SR 上也存在 DNA 结合蛋白, 分子量分别为 83 和 58 kD^[2]。SR 上存在的这些 DNA 结合蛋白的生物学意义目前尚不清楚。我们以前的研究表明, 质粒 DNA 与 SR 上 DNA 结合蛋白结合之后可以明显促进 SR Ca^{2+} 摄入及释放, 即 turnover 加快^[3]。

本实验进一步证实, 质粒 DNA 与缺血骨骼肌

SR 上 DNA 结合蛋白结合之后其促进 SR Ca^{2+} 摄入及释放能力的作用依然存在, 提示质粒 DNA 可以影响正常及病理(缺血)条件下 SR Ca^{2+} 转运, 同时也说明质粒 DNA 对正常大鼠骨骼肌 SR Ca^{2+} 转运能力的增强作用同样也可见于缺血骨骼肌 SR。两者相比较, 质粒 DNA 对于正常大鼠骨骼肌 SR Ca^{2+} 摄入及释放能力的增强作用较其对缺血骨骼肌 SR 的作用强, 提示缺血骨骼肌 SR 对质粒 DNA 的反应性降低。

骨骼肌 SR 的主要功能为参与肌肉兴奋收缩耦联并维持肌细胞胞浆 Ca^{2+} 稳态, 其中起关键作用的环节即是 SR 对 Ca^{2+} 的主动摄取与被动释放, 肌浆网对 Ca^{2+} 的摄取主要依赖其膜上的 Ca^{2+} -ATPase 的作用; SR 钙池释放 Ca^{2+} 则主要与 SR 上存在的一种特定的 Ca^{2+} 释放通道 ryanodine 受体有关。本实验发现, 骨骼肌缺血之后 SR Ca^{2+} 摄入及释放能力均较正常对照组明显增强, 据文献报道这与缺血造成骨骼肌 SR Ca^{2+} -ATPase 的活性增强以及 ryanodine 受体的结合特性被改变有关^[4,8]。质粒 DNA 对缺血骨骼肌 SR Ca^{2+} 摄入及释放能力增强作用的机制尚不清楚。本室最近的实验证实, 质粒 DNA 对正常大鼠骨骼肌 SR Ca^{2+} 摄入及释放能力的增强作用是通过其增强 SR Ca^{2+} -ATPase 的活性以及改变 SR 钙释放通道 ryanodine 受体的结合特性所致^[9], 质粒 DNA 对缺血骨骼肌 SR Ca^{2+} 转运的作用可能也是通过这些机制实现的。本实验在观察到缺血骨骼肌 SR 较正常骨骼肌 SR Ca^{2+} 转运增强的基础上, 发现 SR 上 DNA 结合蛋白结合 DNA 后其 Ca^{2+} 转运进一步增强, 推测其机制亦可能是在缺血骨骼肌 Ca^{2+} -ATP 和 ryanodine 受体激活基础上, SR 上 DNA 结合蛋白结合 DNA 后其活性被进一步激活, 其确切机制尚需进一步证实。

本文结果显示, 质粒 DNA 与 SR 上 DNA 结合蛋白结合之后不仅可以影响正常骨骼肌 SR 功能, 而且也可影响病理条件下(缺血)SR Ca^{2+} 转运, 这些发现的生物学意义尚不清楚。骨骼肌因其容量大, 血流量丰富等优势被作为直接基因转移并进行基因治疗的主要靶器官, 例如转血管内皮生长因子(VEGF)和成纤维细胞生长因子(FGF)基因促进血管新生治疗肢体血管闭塞性疾病已经进入 II 期临床并取得较好疗效。但是有关 DNA 转移入细胞后对细胞功能和代谢的影响所知甚少。本实验结果提示, 基因转移入骨骼肌细胞之后除了表达目的基因之外, 尚可影响正常及病理条件下 SR 功能, 其生理及病理生理意义值得高度重视。

参 考 文 献

- [1] Hagstrom JE , Rybakova IN , Wolff JA *et al.* Nonnuclear DNA binding proteins in striated muscle. *Biochem Mol Med* , 1996 , **58** : 113 ~ 121 .
- [2] Zhao W(赵 文) , Ni JH(倪菊华) , Tan J(汤 健) *et al.* Sequence-independent DNA binding proteins in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Beijing Med Univ* (北京医科大学学报) , 1999 , **31** (1) : 5 ~ 8 (in Chinese with English abstract) .
- [3] Zhao W(赵 文) , Li ZQ(李载权) , Jiang ZS(姜志胜) *et al.* Effects of plasmid DNA on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport in rat skeletal muscle. *J Beijing Med Univ* (北京医科大学学报) , 1999 , **31** (4) : 297 ~ 299 (in Chinese with English abstract) .
- [4] Green HJ , McKee NH , Carvalho AJ *et al.* Ischemia-induced alterations in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity in rat soleus and EDL muscle. *Am J Physiol* , 1996 , **271** : C1942 ~ C1948 .
- [5] Ohlendieck K , Ervasti JM , Snook JB *et al.* Dystrophin-glycoprotein complex is highly enriched in isolated skeletal muscle sarcolemma. *J Cell Biol* , 1991 , **112** : 135 ~ 148 .
- [6] Jones LR , Besch HR Jr. Isolation of canine sarcolemmal vesicles. *Methods Pharmacol* , 1984 , **5** : 1 ~ 12 .
- [7] Ortega A , Gonzalez-Serratos H , Lepock JR. Effect of the organic Ca^{2+} channel blocker D-600 of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} uptake in skeletal muscle. *Am J Physiol* , 1997 , **272** : C310 ~ C317 .
- [8] Darling EM , Lai FA , Meissner G. Effects of regional ischemia on the ryanodine-sensitive Ca^{2+} release channel of canine cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Mol Cell Cardiol* , 1992 , **24** : 1179 ~ 1188 .
- [9] Zhao W(赵 文) , Jiang ZS(姜志胜) , Tong LJ(佟利家) *et al.* Effect of plasmid DNA on rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity and binding activity of ryanodine receptor. *J Beijing Med Univ* (北京医科大学学报) , 1999 , (in Chinese with English abstract , in the press) .