

- duced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Mol Gen Genet*, 2000, 263(5): 812 - 827
- 6 Chang JH, Kim JJ, Choi JM, *et al.* Crystal structure of the Mus81 - Emel complex[J]. *Genes Dev*, 2008, 22(8): 1093 - 1106
- 7 Jiang Z, Hu J, Li XG, *et al.* Expression analyses of 27 DNA repair genes in astrocytoma by TaqMan low - density array[J]. *Neurosci Lett*, 2006, 409(2): 112 - 117
- 8 Wu F, Liu SY, Tao YM, *et al.* Decreased expression of methyl methan sulfonate and ultraviolet - sensitive gene clone 81 (Mus81) is correlated with a poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer*, 2008, 112(9): 2002 - 2010
- 9 李婵媛, 王淑云, 袁海明. MUS81 基因在喉癌中的突变和表达 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2008, 25(5): 560 - 565
- 10 Shimada K, Sano T, Sakamoto Y, *et al.* A long - term follow - up and management study of hepatocellular carcinoma patients surviving for 10 years or longer after curative hepatectomy[J]. *Cancer*, 2005, 104(9): 1939 - 1947
- 11 O'Connor K, Chen M. Dynamic functions of RhoA in tumor cell migration and invasion[J]. *Small GTPases*, 2013, 10(4): 3
- 12 Pouliot N, Kusuma N. Laminin - 511: a multi - functional adhesion protein regulating cell migration, tumor invasion and metastasis[J]. *Cell Adh Migr*, 2013, 7(1): 142 - 149
- (收稿日期: 2014 - 03 - 21)
- (修回日期: 2014 - 03 - 31)

HRSP12 慢病毒表达载体的构建及对宫颈癌 HeLa 细胞凋亡及增殖的影响

谭 宽 张 璇 马晓璐 黄秉仁 陈 虹 陈 等

摘 要 **目的** 构建热反应蛋白 12(heat - responsive protein 12, HRSP12)慢病毒表达载体 pWPI - HRSP12, 包装慢病毒颗粒并感染宫颈癌细胞 HeLa, 分析过表达的 HRSP12 对 HeLa 细胞凋亡和增殖的影响。**方法** 用反转录 PCR 扩增 HRSP12 全长编码顺序, 构建慢病毒表达载体, 利用人胚肾细胞 HEK293T 包装重组的慢病毒颗粒, 感染 HeLa 细胞, 用蛋白免疫印迹法检测剪切的半胱氨酸/天冬氨酸蛋白水解酶 - 3(caspase - 3)并用 MTS 比色法检测 HeLa 细胞增殖的情况。**结果** 编码全长 HRSP12 的 cDNA 片段为 414bp, 克隆至 pWPI - linker 载体成功构建了慢病毒表达载体 pWPI - HRSP12, 包装的慢病毒颗粒能够高效感染 HeLa 细胞, 在细胞内表达 Flag - HRSP12 融合蛋白。HRSP12 的过表达能够引起 HeLa 细胞 caspase - 3 的剪切体增多, 能够抑制 HeLa 细胞的增殖。**结论** 成功构建了慢病毒表达载体 pWPI - HRSP12, 初步结果表明, HRSP12 可能具有诱导 HeLa 细胞凋亡、抑制细胞增殖的活性, 为进一步研究 HRSP12 的生物学功能奠定了基础。

关键词 HRSP12 慢病毒载体 细胞凋亡

[中图分类号] R34 [文献标识码] A

Construction of a Lentiviral Vector Carrying HRSP12 Gene and Its Effect on HeLa Cell Apoptosis and Proliferation. Tan Kuan, Zhang Xuan, Ma Xiaoli, Huang Bingren, Chen Hong, Chen Deng. *National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS and PUMC, Beijing 100005, China*

Abstract **Objective** To construct a lentiviral vector pWPI - HRSP12 which was packaged into lentiviral particles and infected cervical carcinoma cell line HeLa and to analyze the effect of HRSP12 over - expressing on cell apoptosis and proliferation. **Methods** HRSP12 full length coding sequence was amplified by reverse transcription PCR and lentiviral vector pWPI - HRSP12 was constructed. Next, recombinant virus particles were harvested from the culture medium of packaging cell HEK293T. Western blot was used to analyze the expression of Caspase3 and MTS was applied to analyze the cell proliferation. **Results** It was showed that the lentiviral particles infected HeLa cells with high efficiency and the expressed fusion protein flag - HRSP12 was also detected by Western blot. In addition, the over - expressed HRSP12 lead to the increase of cleaved - Caspase3 in HeLa cells. What's more, the over - expressed HRSP12 can inhibit the proliferation of HeLa cell. **Conclusion** A lentiviral expression vector pWPI - HRSP12 was successfully constructed, and the results showed that over - expressed HRSP12 may induces HeLa cells apoptosis and inhibits their proliferation, and these will lay a solid founda-

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81272229)

作者单位: 100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院生物化学与分子生物学系、医学分子生物学国家重点实验室

通讯作者: 陈等, 电子信箱: chendeng2001@hotmail.com

tion for the study of biological functions of HRSP12 in the future.

Key words HRSP12; Lentiviral vector; Cell apoptosis

热反应蛋白 12 (heat-responsive protein 12, HRSP12) 又称为 PSP、PSP1、UK114, 于 1995 年从溶于 5% 高氯酸的大鼠肝脏组织中首先被发现, 属于 YER057c/YIL051c/YjgF 家族成员, 从细菌到人的生物中具较高同源性^[1]。研究表明, HRSP12 主要表达于肝脏、肾脏、肺、脑和小肠等组织, 具有核酸内切酶活性, 通过降解 mRNA、抑制蛋白质合成, 进而抑制细胞增殖, 促进细胞分化, 其 mRNA 和蛋白质水平在包括肝脏、肾脏和肺等癌组织中表达降低, 因而可能与肿瘤的发生发展密切相关^[2,3]。此外, 研究发现, HRSP12 能够激活钙蛋白酶 (calpain), 参与细胞分化及发育等重要的生命进程的调节^[4]。慢病毒载体是指以人类免疫缺陷 I 型病毒 (HIV-1) 发展而来的病毒载体, 能够有效地感染神经元、肝细胞、原代细胞、干细胞、肿瘤细胞以及内皮细胞等多种类型的细胞, 可以长时间稳定的表达外源基因, 感染分裂期和非分裂期的细胞, 因而被广泛的应用于基因功能和基因治疗的研究^[5]。caspase 即半胱氨酸/天冬氨酸蛋白水解酶, 包括起始 caspase 和效应 caspase。起始 caspase 包括 caspase-2、8、9、10 及 12 等, 与促凋亡信号 FasL、TNF- α 及 DNA 损伤密切相关, 一旦激活以后, 这些蛋白酶发生剪切并激活下游的效应 caspase (包括 3、6 及 7), 而这些活化的效应 caspase 反过来参与剪切细胞骨架以及细胞核蛋白 PARP、 α -fodrin、DFF 以及 Lamin A, 然后引起了细胞的凋亡^[6]。

本研究构建了携带 Flag-HRSP12 融合基因的慢病毒表达载体, 在 HEK293T 细胞中包装成慢病毒颗粒后感染宫颈癌细胞 HeLa, 观察了 Flag-HRSP12 蛋白的表达, 以及对宫颈癌 HeLa 细胞凋亡和增殖的影响, 旨在为深入研究 HRSP12 在肿瘤发生中的作用机制提供新的研究工具。

材料与方法

1. 材料: DH5 α 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。人胚肾细胞株 HEK293T 为本室保存。人宫颈癌细胞株 HeLa 购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。改装的慢病毒表达质粒 pWPI-linker 由本实验室构建, 包装质粒 pMD2G (Addgene plasmid 12259) 和 psPAX2 (Addgene plasmid 12260) 由瑞士洛桑联邦理工学院的 Didier Trono 博士馈赠^[7]。转染试剂 VifoFect 及质粒大提试剂盒购自威格拉斯生物技术北京有限公司。DNA 胶回收试剂盒购自北京原平皓生物有限公司。蛋白酶抑制剂 Cocktail 购自 Roche 生物

公司。DNA 连接试剂盒、高保真 DNA 聚合酶、限制性内切核酸酶 Nde I 及 BamH I 购自宝生物工程 (大连) 有限公司。 β -tubulin 抗体和 Flag 抗体购自美国西格玛-奥德里奇中国有限公司。caspase-3 抗体购自 CST 公司。MTS 细胞增殖检测试剂盒购自普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司。羊抗鼠和羊抗兔的二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。ECL 化学发光底物和 BCA 蛋白质定量试剂盒购自 Pierce 公司。引物序列均由北京天一辉远生物科技有限公司合成。

2. 方法: (1) 细胞培养: HeLa 和 HEK293T 细胞悬液分别加入到细胞培养瓶内, 补充含有 10% 胎牛血清及双抗 (100U/ml 青霉素和 0.1mg/ml 链霉素) 的 DMEM 培养基, 放到 37℃ 和 5% CO₂ 的培养箱中培养。(2) HRSP12 全长编码序列的克隆: 以 HEK293T 细胞的 cDNA 为模板, 用下列引物扩增全长的 HRSP12 编码序列: P1: 5'-CGG GAT CCA TGT CGT CCT TGA TCA GAA GG-3'; P2: 5'-GGA ATT CCA TAT GTT ATA GTG ATG CCG TTG TCA GTG-3', PCR 的反应条件为: 98℃ 预变性 10s, 98℃ 变性 10s, 58℃ 退火 5s, 72℃ 延伸 30s, 循环 35 次, 最后 72℃ 再延伸 5min, 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后, 切胶回收, 与 pWPI-linker 载体一道分别用 BamH I 和 Nde I 双酶切后 4℃ 连接过夜, 连接产物转化 DH5 α 感受态, 然后菌落 PCR 鉴定阳性菌株, 摇菌后提取质粒, 最后用 BamH I 和 Nde I 双酶切鉴定阳性质粒后送样测序。(3) 慢病毒的制备: 转染前 24h 将生长状态良好的 HEK293T 细胞按照 75% 左右的密度接种于 60mm 培养皿。第 2 天, 把 5 μ g 的慢病毒表达载体 pWPI-linker 或 pWPI-HRSP12 分别与 3 μ g 的 psPAX2 以及 2 μ g 的 pMD2G 于无菌生理盐水中稀释后, 室温放置 5min, 再与同样条件处理的转染试剂 VifoFect 混匀, 所得的转染工作液室温放置 15min 后, 逐滴加入到提前 1h 换液的 HEK293T 包装细胞, 轻轻混匀培养液, 置 37℃, 5% CO₂ 培养。转染 12h 后, 更换为新鲜的完全培养基 (含 27% 胎牛血清), 培养 48h 后, 吸取含有病毒的上清液, 3000r/min 离心 10min, 按照每管 1ml 的规格分装后冻存在 -80℃ 冰箱备用。(4) 蛋白免疫印迹 (Western blot) 法检测慢病毒介导的 HRSP12 在 HeLa 细胞中的表达: 感染的前 1 天将 HeLa 细胞接种到 60mm 培养皿中, 使感染前的细胞密度达到 20% 左右。感染时, 弃去培养皿内的培养基, 然后加入收集的病毒上清液 1ml 及新鲜的完全细胞培养基 0.5ml。感染 24h 后更换成完全培养基, 继续培养至 48h 后收集细胞, PBS 清洗后加入适量的 NP-40 细胞裂解液 (50mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1.0% NP-40, 1mmol/L EDTA, 137mmol/L NaCl 和蛋白酶抑制剂混合液) 4℃ 裂解 30min, 13000r/min 离心 15min 后收集上清液, BCA 法测定细胞总蛋白的浓度。取 100 μ g 的总蛋白上样, SDS-PAGE 电泳分离后, 转膜到硝酸纤维素膜上, 经 5% 的脱脂牛奶室温封闭 1h, 分别用 β -tubulin、Flag 及 caspase-3 抗体 4℃ 孵育过夜,

然后加二抗室温孵育 1h, TBST 洗膜后, 加入 ECL 化学发光液做 X 线片显影。(5) MTS 法检测细胞的存活率: 感染前 24h 将 HeLa 细胞按照约 4×10^3 个细胞/孔接种到 96 孔板, 每个实验组做 5 个复孔。感染时, 用 pWPI - HRSP12 制备的慢病毒溶液感染细胞, 并以 pWPI - linker 空载体制备的慢病毒溶液和未感染的细胞做对照, 分别在 24、48 以及 72h 后每孔加入 20 μ l 的 MTS 溶液, 在温箱内继续孵育 1h 后, 用酶联免疫检测仪在 490nm 波长下测定每孔的 OD 值。各组细胞的相对细胞存活率按以下公式计算: 相对细胞存活率 (%) = 空载体对照组或实验组 OD490 平均值/24h 空载体对照组 OD490 平均值 $\times 100\%$ 。(6) 统计学方法: 采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析, 数据用 *t* 检验和单因素方差分析进行处理, 以 *P* < 0.05

为差异有统计学意义。

结 果

1. pWPI - HRSP12 重组质粒的鉴定: PCR 扩增 HRSP12 全长的编码序列, 得到约 414bp 的特异扩增片段, 与预期大小相符(图 1A), 将 PCR 片段克隆到 pWPI - linker 载体, 获得的重组质粒经双酶切鉴定可见有预期大小的插入片段(图 1B), DNA 测序结果表明, 插入序列与 GenBank 中公布的 HRSP12 全长编码序列(NM_005836.2)完全一致, 读码框正确, 定名为 pWPI - HRSP12(图 1C)。

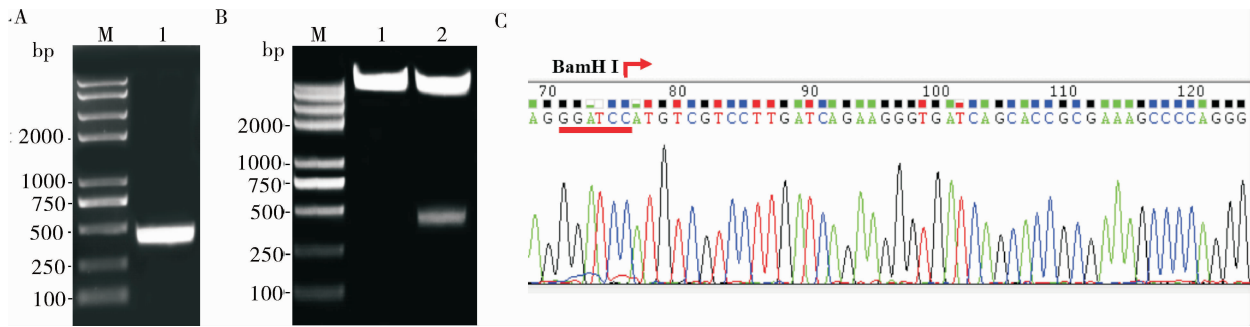


图 1 HRSP12 全长编码序列的克隆及鉴定

A. 琼脂糖凝胶电泳检测 HRSP12 全长编码序列 PCR 结果; M. DNA 分子质量标记, 1. HRSP12 PCR 产物; B. pWPI - HRSP12 重组质粒双酶切 (BamH I + Nde I) 鉴定结果, 1. pWPI - linker, 2. pWPI - HRSP12; C. pWPI - HRSP12 重组质粒的部分测序结果

2. HRSP12 慢病毒感染 HeLa 细胞并诱导 HeLa 细胞凋亡: 将 pWPI - HRSP12 和 pWPI - linker 分别与包装质粒共转染 HEK293T 细胞制备慢病毒溶液, 感染 HeLa 细胞, 48h 后, 在倒置荧光显微镜下观察。由于 pWPI - linker 载体是以 pWPI - IRES - EGFP 质粒为基础, 引入了 5 个单克隆位点以及编码 Flag 标签蛋白的 DNA 片段, 以方便目的基因的克隆及表达蛋白的鉴定^[7]。因此被慢病毒感染的细胞可以表达绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 或 GFP - HRSP12 融合蛋白, 镜下可以见到细胞内有绿色荧光信号, 感染的阳性细胞可达约 90% (图 2)。收集并提取细胞总蛋白, 行 Western blot 法检测, 用 Flag 标签抗体检测 HRSP12 的表达, 同时检测 caspase - 3 的表达, 结果如图 3 所示, 在 HRSP12 慢病毒感染细胞中可以看到分子质量约为 15kDa 的特异性 Flag - HRSP12 融合蛋白条带, 而在空载体慢病毒感染细胞中未检测到相应的蛋白条带。

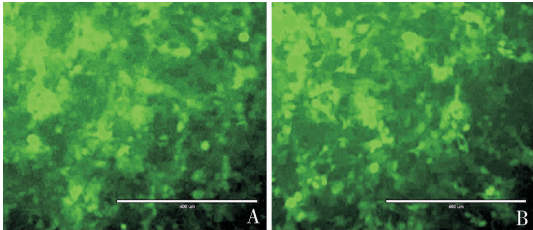


图 2 慢病毒颗粒感染 HeLa 细胞后的荧光图 ($\times 100$) 荧光显微镜下观察慢病毒感染的 HeLa 细胞中 GFP 的表达, A. pWPI - linker 制备的慢病毒溶液感染 HeLa 细胞; B. pWPI - HRSP12 慢病毒溶液感染 HeLa 细胞; 标尺: 400 μ m

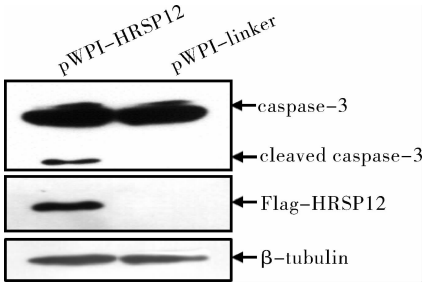


图 3 HRSP12 诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡

在 pWPI - HRSP12 慢病毒感染的 HeLa 细胞内能够检测 caspase - 3 剪切体的特异条带, 而在空载体对照的慢病毒感染细胞中未见剪切的 caspase - 3 条带。

包装好的慢病毒颗粒 pWPI - linker 及 pWPI - HRSP12 感染 HeLa 细胞后, Western blot 法分别检测了细胞内总蛋白中 Flag - HRSP12 融合蛋白、caspase - 3 全长及其剪切体的表达, β - tubulin 作为上样量对照

3. 慢病毒介导的 HRSP12 过表达可以抑制宫颈癌细胞 HeLa 的增殖: 分别用空载体 pWPI-linker 和 HRSP12 慢病毒颗粒感染宫颈癌细胞 HeLa, 用 MTS 比色法分析细胞内过表达的 HRSP12 对 HeLa 细胞增殖的影响。如图 4 所示, 与对照组相比, 随着感染时间的增加, HRSP12 的过表达能够明显抑制 HeLa 细胞的增殖, 与空载体对照相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

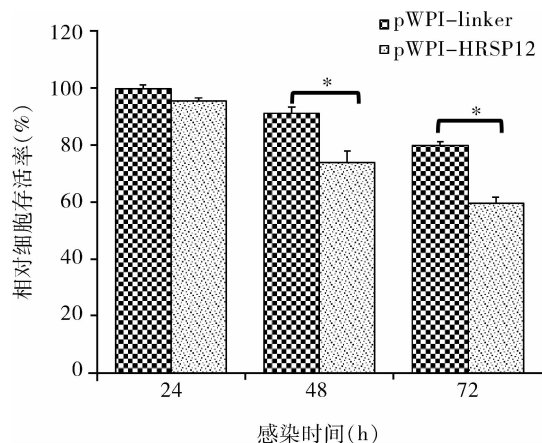


图 4 慢病毒介导的 HRSP12 过表达抑制 HeLa 细胞的增殖

对照组 pWPI-linker 慢病毒颗粒和 pWPI-HRSP12 慢病毒颗粒分别感染 HeLa 细胞, 用 MTS 比色法分析细胞的存活率; 二者相比, * $P < 0.01$

讨 论

本实验所用的载体 pWPI-linker 是由本室所改造的第 2 代慢病毒载体, 不仅携带了绿色荧光蛋白便于在荧光显微镜下观察感染效率, 还引入了常见的酶切位点以便于基因克隆。此外, 载体中还插入了 Flag 标签序列, 可以表达带有 Flag 标签的融合蛋白, 有利于目的蛋白的检测以及研究蛋白质的相互作用。在现有的转染试剂下, 肿瘤细胞的转染率往往不高, 对后续的功能研究造成很大的不便。慢病毒由于其自身的特质, 能够达到高效感染且对细胞较少毒害, 现已广泛应用于基因转染和基因治疗的研究。本实验利用优化了的慢病毒载体 pWPI-linker, 成功构建了 pWPI-HRSP12 重组质粒, 包装好病毒颗粒后, 能够高效的感染宫颈癌 HeLa 细胞, 转染率能够达到 90% 左右, 为 HRSP12 的研究提供了新的方法和工具。

HRSP12 是一种在生物进化过程中高度保守的蛋白质, 这种高度保守性表明 HRSP12 很可能具有重要的生理功能。HRSP12 主要在肝脏和肾脏组织中表达, 但在神经、小肠和肺等组织中也有表达, 提示 HRSP12 可能在多个组织器官中具有重要生理功能。

HRSP12 是一种内切核糖核酸酶, 促进细胞内 mRNA 的降解, 抑制蛋白质的合成和细胞增殖, 促进细胞分化及发育调节, 在人单核细胞分化成巨噬细胞过程中, 以及小鼠肾脏和大脑、猪和鸡的肝脏发育过程中, 其表达水平显著升高^[8-10]。此外, HRSP12 蛋白质在增殖和分化的细胞内的分布存在差异, 研究发现, 在增殖细胞中, HRSP12 主要分布于细胞质, 而在处于分化状态的细胞中, 主要定位于细胞核, HRSP12 在细胞不同生长状态下在胞质和胞核间转位的生物学意义值得进一步探究。HRSP12 也与肿瘤的发生相关。研究发现, HRSP12 能够抑制 DMBA 诱导的大鼠乳腺癌细胞的生长^[11]。Chong 等^[12]近期的研究发现, HRSP12 的 mRNA 和蛋白质水平在人肝细胞癌组织中的表达明显低于癌旁的正常组织。但是在肝细胞癌 HepG2 细胞中稳定表达 HRSP12 不能抑制细胞增殖, 在小鼠皮下接种表达 HRSP12 稳定细胞株, 其成瘤性与空载体对照没有差异。因此 HRSP12 在肿瘤发生发展中的作用仍需进一步的研究。

目前国内外尚缺乏对 HRSP12 蛋白的深入研究, 根据已发表的研究判断其是否是一个肿瘤抑制子还为时尚早。本实验首次利用了慢病毒表达载体携带 HRSP12 基因, 感染 HeLa 细胞, 发现过表达的 HRSP12 蛋白能够促进宫颈癌 HeLa 细胞中 caspase-3 的剪切, 并在一定程度上抑制 HeLa 细胞的增殖。这一结果还需要在其他肿瘤细胞中加以验证, 其诱导肿瘤细胞凋亡和抑制肿瘤细胞增殖的分子机制有待于进一步研究。

为了更好地研究 HRSP12 的功能, 本研究首次构建了 HRSP12 的慢病毒表达载体, 成功的感染了宫颈癌 HeLa 细胞, 细胞内有 Flag-HRSP12 融合蛋白的表达, 过表达的 HRSP12 蛋白能够促进宫颈癌 HeLa 细胞中 caspase-3 的剪切, 提示 HRSP12 的过表达在 HeLa 细胞可能具有诱导凋亡的活性。HRSP12 的过表达能够在一定程度上抑制 HeLa 细胞的增殖。总之, 本研究为认识 HRSP12 的功能提供了新的线索。

参考文献

- Leitner - Dagan Y, Ovadis M, Zuker A, et al. CHRD, a plant member of the evolutionarily conserved YjgF family, influences photosynthesis and chloroplastogenesis[J]. *Planta*, 2006, 225(1): 89-102
- Kim JM, Yoshikawa H, Shirahige K. A member of the YER057c/yjgF/Uk114 family links isoleucine biosynthesis and intact mitochondrial maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Genes Cells*, 2001, 6: 507-517
- Kaneki K, Kanouchi H, Matsumoto M, et al. Down regulation of a no-

- vel protein, PSP, in rat hepatoma cdRLh 84 - beared tumor[J]. J Vet Med Sci, 2003, 65(7): 781 - 785
- 4 Farkas A, Nardai G, Csermely P, *et al.* DUK114, the Drosophila orthologue of bovine brain calpain activator protein, is a molecular chaperone[J]. Biochem J, 2004, 383(1): 165 - 170
- 5 Segura MM, Mangion M, Gaillet B, *et al.* New developments in lentiviral vector design, production and purification[J]. Expert Opin Biol Ther, 2013, 13(7): 987 - 1011
- 6 Kuranaga E. Beyond apoptosis: caspase regulatory mechanisms and functions in vivo [J]. Genes Cells, 2012, 17(2): 83 - 97
- 7 马雯, 陈虹, 黄秉仁, 等. RYBP 慢病毒表达载体的构建及对结肠癌细胞 HCT116 增殖的影响[J]. 医学研究杂志, 2013, 42(9): 37 - 41
- 8 Suzuki K, Nishida T, Matsumoto M, *et al.* Purification, characterization and developmental expression of rat brain PSP protein[J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1527(1-2): 47 - 53
- 9 Kaneki K, Matsumoto M, Suzuki K, *et al.* Purification, characterization and developmental expression of pig liver PSP[J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2003, 134(4): 571 - 578
- 10 Nordin H, Matsumoto M, Suzuki K, *et al.* Purification, characterization and developmental expression of chick (*Gallus domesticus*) liver PSP protein[J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2001, 128(1): 135 - 143
- 11 Kaneki K, Kanouchi H, Matsumoto M, *et al.* Down regulation of a novel protein, PSP, in rat hepatoma cdRLh 84 - beared tumor[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2003, 65(7): 781 - 785
- 12 Chong CL, Huang SF, Hu CP, *et al.* Decreased Expression of UK114 Is Related to the Differentiation Status of Human Hepatocellular Carcinoma[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008, 17(3): 535 - 542

(收稿日期: 2014 - 04 - 09)

(修回日期: 2014 - 04 - 30)

低氧降低大鼠肺动脉平滑肌细胞 Kv1.5 通道表达的 p38MAPK 通路机制

王园园 郑梦晓 黄林静 马迎春 钱小英 王万铁

摘要 **目的** 探讨低氧对肺细小动脉平滑肌细胞 Kv1.5 通道表达的影响及其与 p38 MAPK 通路的关系, 明确低氧性肺动脉高压(HPH)的发病机制。**方法** SPF 级雄性 SD 大鼠, 超净工作台内分离 3 ~ 4 级肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)。采用 p38MAPK 通路抑制剂 SB203580 和激活剂茴香霉素干预低氧过程。细胞传至 3 ~ 6 代后随机分为 5 组: 正常对照组(N), 低氧组(H), 低氧 + DMSO 组(HD), 低氧 + SB203580 组(HS), 低氧 + 茴香霉素组(HA), 其中 N 组继续 5% CO₂ 培养箱培养。其他组于低氧培养箱培养(5% CO₂, 2% O₂, PO₂: 25 ~ 35 mmHg), 均培养 60h。采用 RT - PCR 法测定 PASMCs Kv1.5 mRNA 含量, 采用 Western blot 法测定 PASMCs Kv1.5 蛋白含量。**结果** 与 N 组相比, H 组、HD 组、HA 组 Kv1.5 mRNA 和蛋白表达均明显降低($P < 0.05$)。较之 H 组和 HD 组, HS 组 Kv1.5 mRNA 和蛋白表达明显上升, 差异有统计学意义($P < 0.01$), H 组和 HD 组间差异无统计学意义($P > 0.05$), 与 HS 组相比, HA 组 Kv1.5 mRNA 和蛋白表达明显降低($P < 0.01$)。**结论** 低氧通过激活 p38 MAPK 信号通路降低 Kv1.5 通道表达, 这可能是(HPH)的发病机制。

关键词 低氧 K⁺通道 p38MAPK 信号通路 肺动脉高压

[中图分类号] R3 [文献标识码] A

Decreased Kv1.5 Channel of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell by the p38MAPK Signaling Pathway in Hypoxia. Wang Yuanyuan, Zheng Mengxiao, Huang Linjing, *et al.* Tongde Hospital of Zhejiang Province, Zhejiang 310012, China

Abstract Objective To explore the effect of p38MAPK signaling pathway on Kv1.5 channel in the process of hypoxia. **Methods** The SPF male Sprague - Dawley rats were used. The third or fourth division of pulmonary artery was separated in order to obtain single PASMC. The inhibitor and activator of p38MAPK signaling pathway SB203580 and anisomycin were involved in hypoxia. Cultured for 3 - 6 generations, the PASMCs were randomly divided into five groups: normal group (N), hypoxia group (H), DMSO control group (HD),

基金项目: 浙江省中医药重点学科建设计划项目(2012 - XK - A28); 温州市科技计划一般项目(Y20120161); 温州市医药卫生科学研究项目(2013B03)

作者单位: 310012 杭州, 浙江省立同德医院(王园园); 325035 温州医科大学(王园园、郑梦晓、黄林静、马迎春、王万铁); 325000 温州市人民医院(钱小英、王万铁)

通讯作者: 钱小英, 电子信箱: wqxylet@126.com; 王万铁, 电子信箱: wwt@wzmc.edu.cn