

• 论 著 •

野生型 P53 基因诱导血管平滑肌细胞 P21 基因表达

唐蔚青 王 抒 黎 健

(卫生部北京老年医学研究所, 卫生部老年医学重点实验室, 北京 100730)

Expression of P21 Gene in Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Wild-Type P53 Gene

TANG Wei-Qing, WANG Shu and LI Jian

(Department of Biochemistry, Beijing Institute of Geriatrics, Beijing 100730, China)

ABSTRACT

Aim To study the expression of P21 gene in vascular smooth muscle cells (VSMC) induced by introduction of wild-type P53 gene and explore the mechanism of regulation for cell cycle progression by wild-type P53 gene.

Methods A P53 gene recombinant adenovirus vector, AdCMVP53, was transfected into the cultured SMC derived from human umbilical artery. The gene expression of P21 was quantified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The content of P21 was detected by immunochemical staining.

Flow cytometry was used for cell cycle analysis.

Results The level of P21 mRNA and protein was increased in VSMC transfected with AdCMVP53. Overexpression of wild-type P53 could arrest the SMC at G0/G1 phase of the cell cycle.

Conclusion Wild-type P53 gene could induce the expression of P21 gene, leading to repression of cell cycle progression.

KEY WORDS P53 gene; P21 gene; Gene expression; Vascular smooth muscle cell

摘 要 为研究野生型 P53 基因导入诱导血管平滑肌细胞 P21 基因的表达, 探讨 P53 基因调节细胞周期

进程的作用机理, 体外培养了人脐动脉平滑肌细胞。将野生型 P53 基因导入细胞后, 应用逆转录-聚合酶链反应半定量测定 P21 mRNA 水平, 以免疫组织化学法观察 P21 蛋白表达的变化, 并用流式细胞术分析细胞周期。结果发现, 正常生长的血管平滑肌细胞中 P21 mRNA 水平较低, 用免疫组织化学法检测不到 P21 蛋白。野生型 P53 基因导入并在平滑肌细胞中表达后, 显著增加了 P21 mRNA 水平, 在免疫组织化学检测中呈现很强的阳性显色反应, 引起平滑肌细胞停滞在 G0/G1 期。以上结果提示, 野生型 P53 基因通过诱导 P21 基因表达调控血管平滑肌细胞周期。

关键词 P53 基因; P21 基因; 基因表达; 血管平滑肌细胞

P21 基因编码的蛋白是一种细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)的抑制蛋白, 它通过调控细胞周期的进程, 参与细胞的生长、分化及死亡^[1]。腺病毒载体介导 P21 基因导入血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的研究表明, P21 能抑制 VSMC 增殖, 防止血管损伤和经皮腔内冠状动脉成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)后再狭窄^[2]。

国外及我室的研究结果显示, 野生型 P53 基因导入可阻断 VSMC 周期的进程^[3,4]。由于 P21 蛋白又称为 P53 活化片段 1(wild-type P53-activated fragment 1, WAF1), 可被 P53 诱导, 因此, 我们推测 P53 基因通过诱导 P21 基因表达抑制细胞增殖。本文旨在观察野生型 P53 基因导入对血管平滑肌细胞 P21 基因表达的调控作用, 探讨 P53 基因阻断细胞周期进程的机理。

1 材料与方法

1.1 P53 基因重组腺病毒载体构建

含有编码 P53 蛋白的人 P53 cDNA 的重组腺病毒载体(AdCMVP53), 含 LacZ 基因的重组腺病毒载体(AdCMVLacZ)的构建及病毒的筛选与纯化见文献[3]。病毒滴度为 10^{10} pfu/L, 转染效率达 100%。

1.2 血管平滑肌细胞培养

取人脐动脉, 剥离中膜, 贴块法接种于培养瓶, 用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养, 传 2~3 代后用于实验。

1.3 免疫组织化学法测定 P21 蛋白

将 VSMC 种子于盖玻片上, 24 h 后换含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基并加入 AdCMV P53, 28 h 后固定细胞 30 min, 依次加入一抗(兔抗人 P21 抗血清)室温过夜, 二抗(生物素标记的羊抗兔 IgG)室温 3 h, 辣根过氧化物酶标记的 ABC 复合物室温 30 min, 最后用 DAB 染色并封片[3]。

1.4 半定量检测 P21 mRNA 水平

应用 Promega 公司的总 RNA 提取试剂盒和逆转录试剂盒提取未转染和转染 AdCMVP53 及转染空腺病毒载体 AdCMVLacZ 28 h 的 VSMC 的总 RNA 并合成 cDNA。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)基因为内对照,

进行半定量逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR), P21 的引物为 5' CGG AAT TCA TGT CAG AAC CGG CTG G3' 和 5' GCG GAT CCT TAG GGC TTC CTC TTG 3'; GAPDH 的引物为 5' TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTT 3' 和 5' CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC 3'。变性、退火、延伸分别为 95℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 共进行 30 次循环, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。

1.5 流式细胞仪分析细胞周期

AdCMVP53 转染 VSMC 48 h 后, 收集细胞, RNA 酶(200 mg/L)37℃ 处理 1 h, 碘化丙啶(50 mg/L)4℃ 避光染色后行流式细胞仪分析。

2 结果

2.1 野生型 P53 基因对 P21 蛋白表达的影响

免疫组织化学检测结果(图 1, Figure 1)显示, 正常生长的 VSMC 中 P21 表达水平很低, 应用免疫组织化学法检测不到 P21 蛋白。用 AdCMVP53 转染细胞后, P21 蛋白水平显著增高, 说明野生型 P53 基因导入可诱导 P21 蛋白表达。

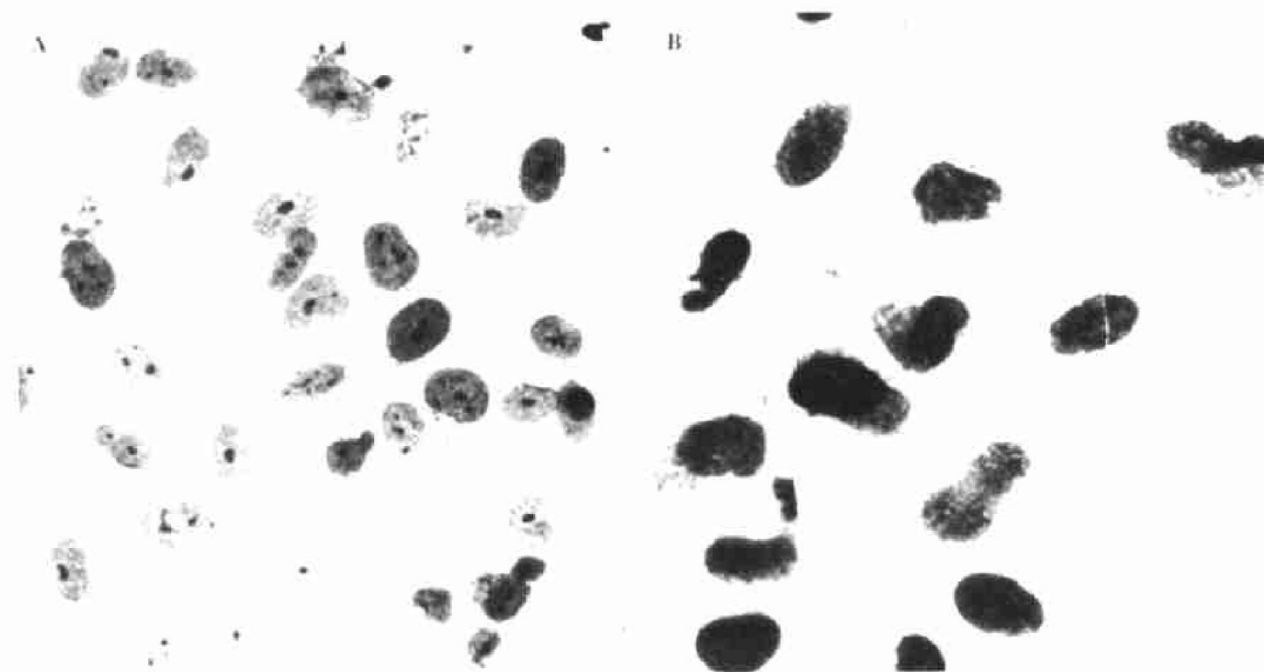


Figure 1. Immunohistochemical staining for P21 protein expression in AdCMVP53-infected VSMC. $\times 400$.

A: cultured VSMC. B: AdCMVP53-infected VSMC.

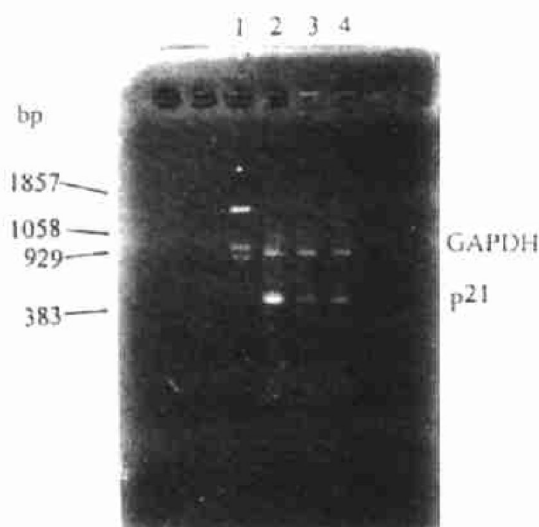


Figure 2. RT-PCR analysis of P21 mRNA level in VSMC. Lane 1: PBR322/BstNI marker. Lane 2: RT-PCR products of AdCMVP53-infected VSMC. Lane 3: RT-PCR products of AdCMVLacZ-infected VSMC. Lane 4: RT-PCR products of cultured VSMC.

2.2 野生型 P53 基因对 P21 mRNA 水平的影响

为了研究野生型 P53 基因对 P21 基因表

达的调控,应用半定量 RT-PCR 检测 P21 mRNA 水平,结果如图 2 (Figure 2)所示。在对照的 VSMC 和转染 AdCMVP53 的 VSMC 及转染空腺病毒载体 AdCMVLacZ 的 VSMC 中均检测出 P21 mRNA,电泳图谱显示两条区带,一条为 P21 基因的 PCR 产物,另一条为对照基因 GAPDH 的扩增产物,根据核苷酸序列推算,P21 基因和 GAPDH 基因的扩增片段长度分别为 500 碱基对(base pair, bp)和 983 bp,电泳结果与之相符,从图中可以看出,野生型 P53 基因导入 VSMC 后,上调了 P21 mRNA 水平,而转染 AdCMVLacZ 的 VSMC 的 P21 mRNA 水平与对照 VSMC 无明显差异,提示 P53 基因是在转录水平上调 P21 基因表达。

2.3 野生型 P53 基因对细胞周期进程的影响

流式细胞仪检测扫描图(图 3, Figure 3)显示,与对照组相比,AdCMVP53 转染后,45% VSMC 发生凋亡,其余的 VSMC 大部分生长停滞在 G0/G1 期,S 期和 G2 期细胞明显减少。此结果提示细胞周期的阻断可能是由于野生型 P53 基因导入后诱导 P21 基因表达所引起的。

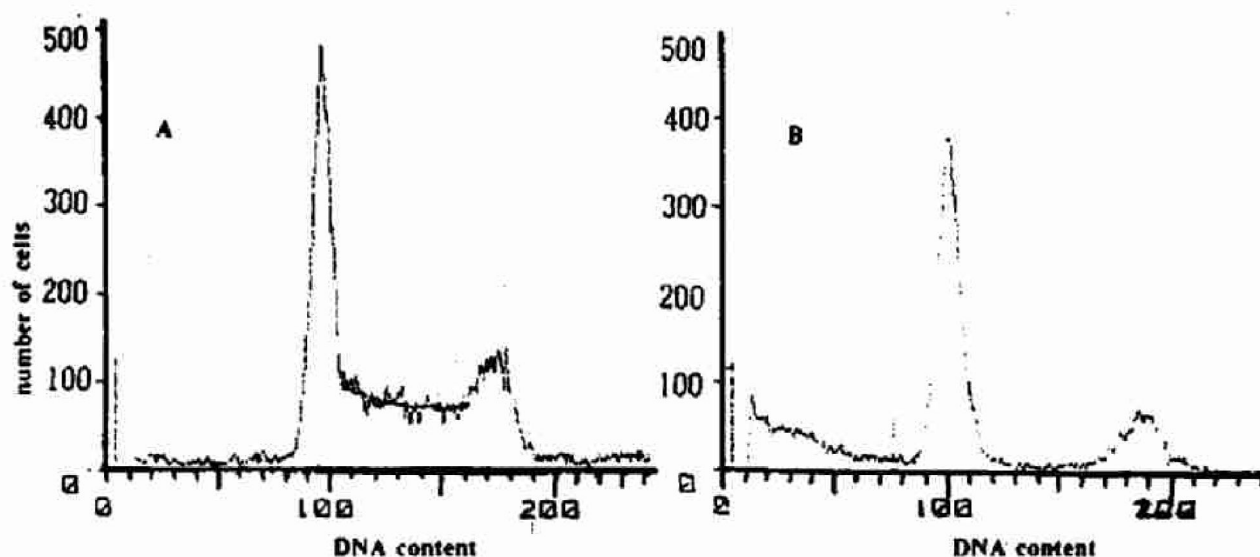


Figure 3. Flow cytometric determination of cell cycle progression
A: cultured VSMC. B: AdCMVP53-infected VSMC.

3 讨论

P21 基因的功能主要是参与由 P53 介导的

细胞 DNA 损伤反应,调控细胞周期的进程,维持细胞遗传信息的稳定性。P21 基因还可以通

过非依赖 P53 途径参与细胞分化、衰老等。实验证明,细胞 DNA 损伤时,在 P53^{+/+}细胞中,常有 P53 和 P21 基因表达升高,在 P53^{-/-}细胞中,则无 P21 升高,细胞也无 G1 期停滞。提示 P53 作为转录因子启动 P21 基因表达。细胞 DNA 损伤时,P21 作为 P53 的下游中介者,执行 P53 的部分功能,导致细胞停滞在 G1 期,使细胞有时间对损伤的 DNA 进行修复,从而维持细胞遗传信息的稳定性^[5]。P21 基因敲除小鼠虽可正常发育,但缺乏 G1 阻滞^[6]。反义 P21 RNA 导入可引起细胞从 G0 期进入 S 期^[7]。用腺病毒载体介导 P21 基因导入 VSMC 的研究也表明,P21 能使 VSMC 生长停滞在 G0/G1 期,从而抑制 VSMC 增殖^[2]。研究 P21 基因的抗细胞增殖和细胞周期阻滞作用将为增殖相关疾病如肿瘤、血管损伤后再狭窄的防治开拓新的思路。

P21 基因阻滞细胞周期进程的机制可能有两个方面,一方面与细胞周期蛋白 E-cdk2 复合物结合,抑制该复合物磷酸化活性,使 Rb 蛋白处于非磷酸化的活性状态,不能释放与其形成复合物的转录活化因子 E2F。而 E2F 只有与磷酸化 Rb 蛋白分离,处于游离状态时才能作为转录因子启动胸腺嘧啶激酶。进而促进 c-myc、c-myb、二氢叶酸还原酶及 DNA 聚合酶 δ 的表达。因此,P21 通过阻抑 Rb 蛋白的磷酸化而抑制 DNA 合成,使细胞不能进入 S 期而停滞在 G1 期^[8]。另一方面,P21 还可与增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)结合,使之不能与 DNA 聚合酶形成复合物,或使 DNA 全酶复合物不能在 DNA 单链上滑动,影响 DNA 复制,使细胞停滞在 G1 期^[9]。

本文的结果表明,野生型 P53 基因导入 VSMC 诱导 P21 基因表达后,不仅使 VSMC 停滞在 G0/G1 期,而且诱导了细胞凋亡。P21 与凋亡的关系众说不一,有报道说 P21 尚可介导某些类型细胞的凋亡^[10],但有些研究认为 P21 仅诱导 G0/G1 期阻滞,与凋亡无关^[11]。这

个问题尚有待进一步探讨。

参考文献

- 1 Harper JW, Adami GR, Wei N, et al. The P21 CDK-interacting protein cipl is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinase. *Cell*, 1993, **75**: 805~816.
- 2 Chang MW, Barr E, Lu MM, et al. Adenovirus-mediated overexpression of cyclin/cyclin-dependent kinase inhibitor, P21 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat carotid artery model of balloon angioplasty. *J Clin Invest*, 1995, **96**: 2 260~268.
- 3 唐蔚青,王抒,黎健. 野生型 P53 基因导入诱导血管平滑肌细胞凋亡. *中国动脉硬化杂志*, 1997, **5**: 194~198.
- 4 Yonemitsu Y, Kaneda Y, Tanaka S, et al. Transfer of wild-type P53 gene effectively inhibits vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo. *Circ Res*, 1998, **82**: 147~156.
- 5 Guadagno TM, Newport JW. cdk2 kinase is required for entry into mitosis as a positive regulator of cdc2-cyclin B kinase activity. *Cell*, 1996, **84**: 73~82.
- 6 Deng C, Zhang P, Harter JM, et al. Mice lacking P21 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell*, 1995, **82**: 675~684.
- 7 Nakanish M, Adami GR, Robetorye RS, et al. Exit from G0 and entry into the cell cycle of cells expressing P21 antisense RNA. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1995, **92**: 4 352~356.
- 8 Zhu L, Harlow E, Dynlacht BD. P107 uses a P21 related domain to bind cyclin/cdk2 and regulate interactions with E2F. *Genes Dev*, 1995, **9**: 1 740~752.
- 9 Gulbis JM, Kelman Z, Hurwitz J, et al. Structure of the C-terminal region of P21 complexed with PCNA. *Cell*, 1996, **87**: 297~306.
- 10 Skotzko M, Wu L, Anderson WF, et al. Retroviral vector-mediated gene transfer of antisense cyclin G1 inhibits proliferation of human osteogenic sarcoma cells. *Cancer Res*, 1995, **55**: 5 493~498.
- 11 Eastham JA, Hall SJ, Sehgal I, et al. In vivo gene therapy with P53 or P21 adenovirus for prostate cancer. *Cancer Res*, 1995, **55**: 5 151~155.

(此文 1998-08-25 收到, 1998-11-11 修回)

(此文编辑: 胡必利)