

p21 对血管平滑肌细胞的增殖调控

卢晓男 综述 楼定安 单让茵 审校

(浙江医科大学病理学教研室, 杭州 310006)

主题词 肌, 平滑, 血管; p21 蛋白; 增殖调控; 细胞; 动脉粥样硬化; 血管成形术

摘要 动脉粥样硬化和气囊血管成形术后再狭窄是以血管平滑肌细胞增殖为主要病理特征的疾病, 研究血管平滑肌细胞增殖调控机制对揭示这类疾病的发病机理具有重要意义。p21 蛋白是一种细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂, 通过调控细胞周期的进程而参与细胞的生长、分化、衰老及死亡。p21 对血管平滑肌细胞增殖、移行有显著的抑制作用, 因此对血管增生性疾病具有较高的研究价值。

血管平滑肌细胞的增殖是某些血管增生性疾病的重要的病理基础, 如动脉粥样硬化及气囊血管成形术后再狭窄^[1]。近年来, 对动脉损伤引起的血管平滑肌细胞增殖的分子学机制的研究正在不断深入, 这将有可为冠心病患者提供有效的治疗手段。p21 蛋白是一种细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(cyclin-dependent kinase inhibitor, CDI), 通过调控细胞周期的进程, 参与细胞的生长、分化、衰老及死亡。而 p21 对血管平滑肌细胞的增殖、移行及相关疾病的作用机制是近年来的研究热点之一, 本文就此作一综述。

1 p21 简介

细胞周期是细胞活动的基本过程, 细胞在周期时相的变化中进入增殖、分化、衰老和死亡等生理状态。若细胞周期调控异常, 细胞将进入病理状态。CDI 是参与细胞周期调控的分子之一, 主要通过和细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)、细胞周期蛋白(cyclin)或 cyclin-cdk 复合物结合, 抑制 CDK 活性。在众多的 CDI 家族成员中, p21 参与多种功能活动, 在细胞生物学中的地位令人瞩目。

p21 命名很多, 如 CIP 1、WAF 1、CAP 20、mda-6 和 SDI 1。p21 基因为单拷贝基因, 定位在染色体 6 P 21.2, 由三个外显子组成, 长度分别为 68 bp、450 bp 和 1 600 bp, 翻译起始信号位于第 2 个外显子^[2]。p21 蛋白定位在细胞核中, 由 164 个

氨基酸组成。N 端第 21~26 位氨基酸与 cyclin D 和 E 结合, 第 49~72 位氨基酸与 cdk 2 结合, C 末端第 124~164 位氨基酸与增殖细胞核抗原结合^[3, 4]。因此 p21 能广泛地抑制各种 cyclin-cdk 复合物, 抑制增殖细胞核抗原与 DNA 多聚酶 δ 结合^[3, 5~7], 以及抑制应激激活蛋白激酶^[8]。

p21 mRNA 表达受 p53 或其它外源性因子在转录水平的调控。许多实验证明, 细胞 DNA 损伤时(γ 辐射), p53 作为转录因子启动 p21 表达, p21 与 cyclin E-cdk 2 复合物结合, 抑制视网膜母细胞瘤蛋白磷酸化, 导致细胞生长停滞, 不能进入 S 期, 同时 p21 与增殖细胞核抗原结合, DNA 复制受阻, 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^[9]。

生长因子如血小板源性生长因子、成纤维细胞生长因子和转化生长因子 β 等作为细胞外信号, 通过激活 p53 发挥对 p21 的调控作用, 主要是经丝裂原激活蛋白激酶途径调节 p21 转录, 使其在 G₁ 早期表达^[10]。

此外, p21 的转录还受定位于转录起始部位下游的 cis 元件的抑制。Rishi 等^[11]运用复制与转染技术发现一段约 48 bp 的 DNA 序列位于 p21 cDNA 3' - UTR, 且含有 cis 元件, 引起 p21 的表达显著下降, 同时发现 cis 元件的抑制作用与其定位及与转录起始位置的距离均无关。

2 p21 对血管平滑肌细胞的增殖和移行作用

2.1 p21 对血管平滑肌细胞增殖的抑制作用

为研究 p21 对血管平滑肌细胞生长及周期过程的作用, Yang 等^[12] 在体外利用腺病毒介导将 p21 基因转染到处理后的血管平滑肌细胞上发现, p21 明显表达, 并有效地抑制了 90% 以上血管平滑肌细胞的增殖, 同时发现细胞停滞在 G₀/G₁ 期。在体内实验时, 首先用带气囊导管摩擦引起猪髂股动脉损伤, 在第 1、7、14、21 及 60 天后分析受损部位 p21 表达情况及血管平滑肌细胞增殖情况。结果发现, 在损伤后第 1 天内膜平滑肌细胞开始增殖, 在小于 5% 内膜细胞中检测到 p21 蛋白; 第 7 天平滑肌细胞增殖达到高峰, 在一定数量的平滑肌细胞中检测到 p21; 第 14 天平滑肌细胞增殖下降至 2%, 而第 21 天在大多数平滑肌细胞中仍有 p21 蛋白表达, 第 60 天后内膜不再表达 p21。由此表明, p21 表达对平滑肌细胞增殖的抑制作用有时序性。故推测在动脉受损后 p21 及可能的相关 CDIS 能调节平滑肌细胞和新内膜的增殖, 因此促进其表达将有助于治疗这类血管增生性疾病。

Chang 等^[1] 最近发现视网膜母细胞瘤基因产物是血管平滑肌细胞增殖的重要的负调控因子。在静止期, 血管平滑肌细胞中视网膜母细胞瘤呈去磷酸化状态, 当视网膜母细胞瘤发生磷酸化, 促进血管平滑肌细胞从 G₁ 到 S 期转变并发生增殖, 实验用腺病毒介导 p21 转染静止状态的鼠血管平滑肌细胞, 48 h 后, 血管平滑肌细胞中的视网膜母细胞瘤均未磷酸化, 并停留在 G₀/G₁ 期, 即 p21 的过度表达能有效地降低体内视网膜母细胞瘤磷酸化过程。鉴于视网膜母细胞瘤是 G₁ 期 cyclin- cdk 介导的磷酸化作用的共同限速底物^[13], 因而推测 p21 能抑制 cyclin- cdk 介导的视网膜母细胞瘤磷酸化。

p21 不但能抑制 cyclin- cdk 复合物的激酶活性, 而且能与 DNA 多聚酶 δ 因子增殖细胞核抗原结合, 抑制其活性, 阻碍 DNA 合成。p21 蛋白不同区域可与 CDKs 和增殖细胞核抗原结合, p21 可能通过这两种分子机制对细胞周期进行调控。为了直接测试血管平滑肌细胞中 p21 过度表达是否导致 p21/增殖细胞核抗原复合物形成, Chang 等^[1] 用腺病毒介导 p21 转染于静止期小鼠主动脉平滑肌细胞, 在 10% 胎牛血清中培养 24 h, 对其溶解产物进行免疫沉淀和印迹分析, 结果发现增殖细胞核抗原与 p21 被共同沉淀下来。因此证明了 p21 转染血管平滑肌细胞后与增殖细胞核抗原结合形成复合物。

综上所述, 所有这些发现阐明了一种关于动脉损伤后血管平滑肌细胞发生增殖的调控机制(图 1)。

新近有学者提出, p21 调节细胞周期的机制可能与细胞凋亡密切相关, Matsushita 等^[14] 用凝血病毒介导 p21 转染到人主动脉平滑肌细胞上, 不但观测到平滑肌细胞中 p21 蛋白有明显增加, 而且经 p21 转染的平滑肌细胞有显著地减少, 这些细胞表现出典型的凋亡特征。因而认为 p21 诱导了一种凋亡启动蛋白, 从而加速了平滑肌细胞的凋亡。该理论对 p21 调控机制的解释提出了新思路。关于这方面的研究有待于进一步深入。

2.2 p21 对血管平滑肌细胞移行的抑制作用

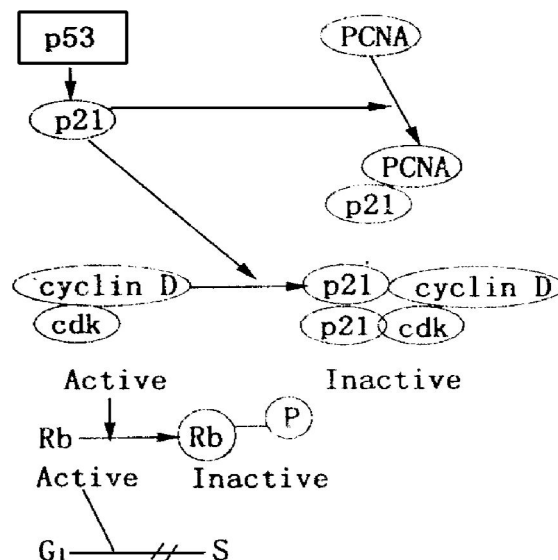


图 1. 血管平滑肌细胞的周期调节途径 p53 上调 p21 转录, p21 抑制 cyclin D/cdk 复合物活性, 有活性的 cyclin D/cdk 复合物使视网膜母细胞瘤(Rb)磷酸化并失活。Rb 去磷酸化后能抑制 VSMC 从 G₁ 进入 S 期, p21 也能结合增殖细胞核抗原(PCNA)并抑制其活性。

血管平滑肌细胞受到生理性或病理性因素作用后发生增殖, 同时血管平滑肌细胞由中膜穿过内弹力膜向内膜移行, 并积聚在内皮下层, 形成特征性的“内膜增厚”^[15]。

为探讨 p21 对平滑肌细胞的作用, 尤其是对其形态、移行以及细胞外基质粘附作用的改变, Fukui 等^[16] 将 p21 转染到一种家兔主动脉平滑肌细胞(SM3 细胞)后发现, p21 的转染改变了 SM3 细胞形态, 抑制了 α -actin、integrin $\alpha_5\beta_1$ 和 vinculin 这些细胞骨架蛋白的伸展, 但所有这些分子的总量并没有显著性减少, p21 转染的 SM3 细胞在 fibronectin 中仍保持圆形, 这说明了 p21 能限制 SM3 细胞的扩展。实验还发现, p21 转染的 SM3 细胞附着于细胞外基质显著减少, 而分离出来的悬浮细胞中 p21 表达明显高于粘附的细胞。这一结果证明 p21 抑制 SM3 细胞与细胞外基质之间的粘附, 推测 p21 可能是一种粘附抑制剂, 阻碍了 actin 纤维的组装。

Dimilla 认为细胞移行主要受粘附特性的影响, 中等适宜的附着强度能引起平滑肌细胞最大限度地移行。因此 p21 对平滑肌细胞在 fibronectin 上移行的抑制可认为是与 fibronectin 粘附作用降低所引起的。

3 p21 与疾病治疗的关系

血管平滑肌细胞存在于血管壁中膜, 在正常情况下, 血管张力主要靠它的收缩功能来维持。近年来的研究表明, 在各种刺激因素和生长因子作用下, 血管平滑肌细胞可从中膜迁移到内膜, 在内膜中大量增殖, 成为引起动脉粥样硬化和血管再狭窄等疾病的主要原因。动脉粥样硬化引起冠状动脉疾病在美国的发病率和死亡率占到首位。经皮腔内冠状动脉成形术是治疗冠状动脉疾病的主要手段, 手术初期能有效地缓解大部分患者的动脉狭窄, 但有近 40% 患者术后发生血管再狭窄。目前认为再狭窄的发生主要与血管平滑肌细

胞的增殖及血管的重塑有关。

目前已试用了多种方法,包括抗血小板类药、抗凝血剂及血管紧张素转换酶抑制剂,还有一些细胞毒性试剂,但效果都不理想。最近 Takahashi 等^[17]对一种名为 Tranilast 的抗过敏类药物进行了研究,发现该药具有预防血管成形术后再狭窄的潜在效应。研究表明,Tranilast 主要通过增加 p21 表达且降低 CDK₂/CDK₄ 的活性,从而达到抑制血管平滑肌细胞的增殖和预防血管成形术后再狭窄的目的。该药在临床上的应用还有待进一步研究。

p21 基因治疗是一种细胞稳定性治疗,它主要采用腺病毒介导 p21 基因转录的方法,从而抑制视网膜母细胞瘤蛋白磷酸化最终可以抑制血管平滑肌细胞增殖和血管重塑。研究表明其有效地抑制血管再狭窄达 46%^[1]。目前研究认为这种治疗不引起明显的炎症反应,也没有临床毒性。但是用腺病毒介导 p21 过度地表达还有许多其它方面的作用,所以用 p21 治疗是否会在体内产生其它副作用?腺病毒介导 p21 过度地表达与腺病毒介导有活性的视网膜母细胞瘤去磷酸化形成共同作用是否会更有效?这些问题有待于更深入的研究。

参考文献

- 1 Chang MW, Barr E, Lu MM, et al. Adenovirus- mediated over- expression of the cyclin/ cyclin- dependent kinase inhibitor, p21 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and formation neointima in the rat carotid artery model of balloon angioplasty. *J Clin Invest*, 1995, **96** (5): 2 260- 268
- 2 Hannon GJ, Beach D. P15(INK4B) is a potential effector of TGF- β - induced cell cycle arrest. *Nature*, 1994, **371**: 257
- 3 Lin JY, Reichner C, Wu XW, et al. Analysis of wild- type and mutant p21(WAF- 1) gene activities. *Mol Cell Biol*, 1996, **16**: 1 786 - 793
- 4 Luo Y, Hurwitz J, Massague J. Cell- cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21(CIP1). *Nature*, 1995, **375**: 159
- 5 Gulbis JM, Kelman Z, Hurwitz J, et al. Structure of the c- terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell*, 1996, **87**: 297
- 6 Chen J, Peter R, Saha P. A 39 amino acid fragment of the cell cycle regulator p21 is sufficient to bind PCNA and partially inhibit DNA replication in vivo. *Nucleic Acids Res*, 1996, **24**: 1 727
- 7 Umar A, Buemeyer AB, Simon JA. Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell*, 1996, **87**: 65
- 8 Shim J, Lee H, Park J. A non- enzymatic p21 protein inhibitor of stress- activated protein kinases. *Nature*, 1996, **381**: 804
- 9 Zhang W, Grasso L, Meclain CD. p53- independent induction of WAF1/CIP1 in human leukemia cells is correlated with growth arrest accompanying monocyte/ macrophage differentiation. *Cancer Res*, 1995, **55**: 668
- 10 Liu Y, Martindale JL, Gorospe M. Regulation of p21(WAF1/CIP1) expression through mitogen- activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res*, 1996, **56**: 31
- 11 Rishi AK, Hsu CK, Li XS, et al. Transcriptional repression of the cyclin- dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 gene mediated by cis elements present in the 3' - untranslated region. *Cancer Res*, 1997, **57** (22): 5 129- 136
- 12 Yang ZY, Simari RD, Rerkins ND. Role of the p21 cyclin- dependent kinase inhibitor in limiting intimal cell proliferating in response to arterial injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (15): 7 905- 910
- 13 Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 1995, **81** (3): 323- 330
- 14 Matsushita H, Morishita R, Kida I, et al. Inhibition of growth of human vascular smooth muscle cells by overexpression of p21 gene through induction of apoptosis. *Hypertension*, 1998, **31** (1 Pt 2): 493- 498
- 15 Stary HC. The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life. *Eur Heart J*, 1990, **11** (suppl E): 3- 19
- 16 Fukui R, Shibata N, Kohbayashi E, et al. Inhibition of smooth muscle cell migration by the p21 cyclin- dependent kinase inhibitor. *Atherosclerosis*, 1997, **132** (1): 53- 59
- 17 Takahashi A, Taniguchi T, Ishikawa Y, et al. Tranilast inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia by induction of p21(waf 1/ cip 1/ sdi1) and p53. *Circ Res*, 1991, **64** (5): 543- 550

(此文 1998- 10- 19 收到, 1999- 06- 14 修回)

(此文编辑 文玉珊)