

野生型 P53 基因导入诱导血管平滑肌细胞凋亡

唐蔚青 王 抒 黎 健

(卫生部北京老年医学研究所, 北京 100730)

Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Introduction of 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 observe the induction of apoptosis in vascular smooth muscle cell (SMC) by the introduction of wild-type P53 gene and investigate the mechanism of inhibition for SMC proliferation by wild-type P53 gene.

Methods A replication-deficient adenovirus vector encoding a wild-type P53, AdCMV P53, was constructed and transfected into the cultured rabbit aortic SMC. The cell cycle of SMC was analysed with flow cytometry. The ^3H -thymidine incorporation assay was used to measure DNA synthesis in SMC. The apoptotic cells was determined by terminated deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) and agarose gel electrophoresis.

Results Introduction of wild-type P53 gene into SMC can arrest 77% of AdCMV P53-infected cells at G0/G1 phases of the cell cycle, leading to inhibition of DNA synthesis. Overexpression of wild-type P53 induced apoptosis of cells infected with AdCMV P53 as detected by TUNEL and flow cytometry. Electrophoresis of genomic DNA showed internucleosomal fragments of DNA isolated from the AdCMV P53-infected SMC.

Conclusion Wild-type P53 gene suppress SMC pro-

liferation by induction of apoptosis in SMC.

KEY WORDS P53 gene; Smooth muscle cell; Apoptosis

摘要 为观察野生型 P53 基因诱导血管平滑肌细胞凋亡的现象,探讨野生型 P53 基因导入抑制平滑肌细胞增殖的作用机理,构建了野生型 P53 基因的重组腺病毒载体,体外转染兔主动脉血管平滑肌细胞。应用流式细胞仪分析细胞周期,羧基末端脱氧核糖核苷酸掺入试验检测 DNA 合成,琼脂糖凝胶电泳观察 DNA 区带图谱,末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的 dUTP 切口末端标记技术原位检测细胞凋亡。结果发现,野生型 P53 基因重组腺病毒载体转染平滑肌细胞后,细胞内 DNA 合成减少。流式细胞仪分析显示 77% 的平滑肌细胞生长停滞在 G0/G1 期,约 45% 的细胞发生细胞凋亡。dUTP 切口末端标记阳性细胞百分率为 40%~50%。DNA 在琼脂糖凝胶电泳中呈现阶梯状区带图谱。以上结果提示,野生型 P53 基因通过诱导细胞凋亡对血管平滑肌细胞增殖起抑制作用。

关键词 P53 基因; 平滑肌细胞; 细胞凋亡

血管内皮细胞损伤引发的平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) 大量增殖是动脉粥样硬化及经皮腔内冠状动脉成形术后血管再狭窄发生过程中的关键因素。动脉粥样硬化斑块中的 SMC 主要来自中膜,中膜的 SMC 向内膜迁移并大量增殖的机理非常复杂,如何有效地特异性控制 SMC 增殖,一直未找到满意的方法。近年的研究表明,将抑制细胞生长的外源基因直接导入血管壁以抑制 SMC 增殖,可能是治疗血管再狭窄的一种有效途径^[1,2]。P53 基因是一种重要的抑癌基因,它的突变可以引起细胞增殖。研究发现,在家兔动脉粥样硬化斑块中有突变型 P53 存在,而且有野生型 P53 基因低表达,故认为 SMC 的异常增殖与 P53 基因的突变

有关。我室曾应用野生型 P53 基因重组腺病毒载体转染体外培养的兔主动脉血管 SMC。结果发现,导入野生型 P53 基因可以有效地抑制 SMC 的增殖^[3]。由于 P53 基因与细胞凋亡有着密切关系,本文对野生型 P53 基因导入诱导的 SMC 细胞凋亡及 P53 基因抑制 SMC 增殖的作用机理进行探讨。

1 材料与方法

1.1 野生型 P53 基因重组腺病毒载体的构建

将编码入 P53 蛋白的 P53 cDNA 插入 PRC/CMV 载体(美国 Invitrogen 公司),酶切和回收含有 CMV 启动子、P53 cDNA 及 BGH 加 poly A 信号的片段,将此片段插入腺病毒质粒载体 pXCJL-1 的 BamH 1 位点,以此质粒与质粒 PJM17 共转染入 293 细胞,筛选并克隆复制缺陷型重组腺病毒载体,经 293 细胞扩增得到病毒颗粒,将此病毒转染的兔主动脉血管 SMC 经免疫组织化学及多聚酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)检测,说明野生型 P53 基因在腺病毒载体介导下可以有效地导入 SMC,在转染 24 h 后,100%的 SMC 可以表达外源性 P53。含有 LacZ 基因的重组腺病毒作为对照载体也以同样方法构建。

1.2 平滑肌细胞的培养

取兔主动脉,剥离中膜,贴块法接种于培养瓶,用含 20%胎牛血清(美国 GIBCO 公司)的 DMEM 培养基(GIBCO 产品)培养,传 2~3 代后用于实验。

1.3 氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入实验

将 5×10^4 SMC 接种于 24 孔培养板,生长 20 h 后换无血清 DMEM 培养基继续培养 72 h。用病毒转染 24 h,换含 10%胎牛血清的 DMEM 继续培养 24 h 后,48 h 和 72 h。检测前 4 h,每孔加入 $2.5 \mu\text{L}$ 氚标胸腺嘧啶脱氧核苷(^3H -thymine deoxyriboside, ^3H -TdR, 3.7 TBq/L , 中国原子能研究所)。收集细胞,破膜,液体闪烁计数器计数。

1.4 流式细胞仪分析细胞周期与细胞凋亡

平滑肌细胞在无血清 DMEM 培养基中培养 24 h,野生型 P53 基因重组腺病毒载体转染 48 h,换含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养 24 h,收集细胞,RNA 酶 37°C 处理 1 h,碘化丙啶 4°C 避光染色后行流式细胞仪分析。

1.5 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

收集细胞,加提取液(100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L

Tris, 10 mmol/L EDTA, 0.5% SDS 和 0.1 g/L 蛋白酶 K, pH8.0), 50°C 消化过夜,用酚/酚/氯仿和氯仿/异戊醇(24:1)抽提上清,乙醇沉淀,重悬于 TE 中,加 5 mg/L RNase, 37°C 消化 1 h,重新沉淀 DNA,用适量 TE 溶解后测光密度值定量,取 10 μg 的 DNA 在 1.5% 凝胶上电泳,溴乙锭染色分析。

1.6 脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 切口末端标记技术原位检测细胞凋亡

应用原位细胞凋亡测定试剂盒(德国 Boehringer 公司),按试剂盒说明书操作。用 4% 甲醛室温固定细胞 30 min,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)洗 3 次。加入预渗透液(0.1% Triton X-100, 0.1% 柠檬酸钠),置 4°C 2 min, PBS 洗 2 次。加入脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 切口末端标记(terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)反应液, 37°C 温育 1 h, PBS 洗 3 次。加入碱性磷酸酶标记的抗荧光素抗体, 37°C 30 min, PBS 洗 3 次。加入底物溶液室温 20 min, PBS 洗 3 次,封片,在显微镜下观察。

2 结果

2.1 野生型 P53 基因导入对平滑肌细胞 DNA 合成的影响

从图 1(Figure 1)可见,SMC 在无血清条件下培养 72 h 后, ^3H -TdR 的掺入量处于较低的水平,但是在加入 10%胎牛血清后,SMC 增殖

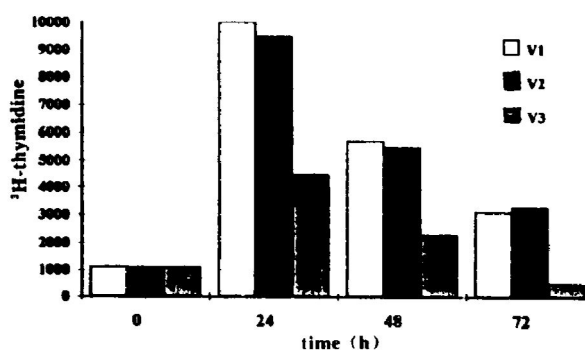


Figure 1. Effect of AdCMV P53 infection on SMC DNA synthesis. Replicate cultures of quiescent, serum-starved rabbit aortic SMC were infected with AdCMV P53 (V3) or AdCMV β -gal(V2) or uninfected(V1), and then stimulated with 10% FBS. Cells were labeled for 4 h with ^3H -thymidine and harvested 0, 24, 48 and 72 h after stimulation.

The data are shown as mean ($n=3$).

导致 ^3H -TdR 掺入量显著升高。然而,与正常 SMC 相比,转染 P53 基因重组腺病毒的 SMC 的 ^3H -TdR 掺入量明显减少,72 h 后, ^3H -TdR 掺入的抑制率为 84% ($P < 0.001$)。提示导入野生型 P53 基因,可使细胞 DNA 合成减少。此外,导入含 LacZ 基因的腺病毒载体不抑制 SMC 的 ^3H -TdR 掺入,说明抑制 DNA 合成的作用是由野生型 P53 基因引起的,与病毒载体无关。

2.2 细胞周期分析

本实验在接种 SMC 后,先以无血清的

DMEM 培养,使 SMC 生长停滞,然后用含 10% 胎牛血清的 DMEM 继续培养。细胞在血清刺激下进入生长旺盛阶段,这种状态与体内血管内皮损伤后 SMC 增殖的情况有相似之处。图 2(Figure 2)显示,SMC 在无血清 DMEM 中培养 72 h 后生长停滞,86% 的 SMC 处于 G0/G1 期,在加入胎牛血清刺激后,只有约 50% 的 SMC 还停留在 G0/G1 期。然而,野生型 P53 基因重组腺病毒转染的 SMC 在血清刺激下,有 77% 的细胞仍停留在 G0/G1 期。结果说明,野生型 P53 基因的导入可阻断细胞周期。

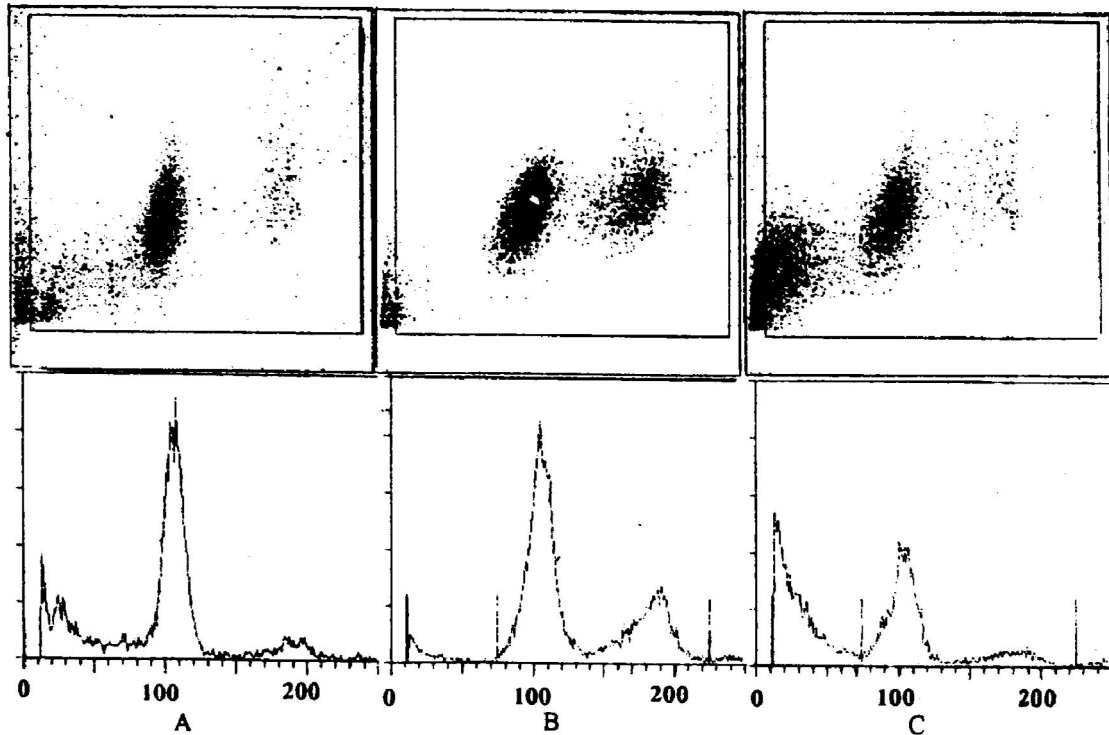


Figure 2. Flow cytometric determination of cell cycle progression. Vascular SMC were made quiescent by incubation for 72 h in serum free medium (A), and then stimulated to proliferate by exposure to medium containing 10% FBS (B). The quiescent SMC were infected with AdCMV P53 before serum stimulation (C).

2.3 野生型 P53 基因诱导平滑肌细胞凋亡

2.3.1 流式细胞仪分析 从图 2(Figure 2) 结果可见,野生型 P53 基因诱导约 45% 的 SMC 发生凋亡。

2.3.2 DNA 琼脂糖电泳图谱 凋亡细胞的一个特征性标志是在琼脂糖电泳可以观察到阶梯状的 DNA 区带图谱(DNA ladder),从野生型 P53 基因重组腺病毒转染的 SMC 中提取

DNA,进行电泳分析,发现细胞中有 DNA 片段的存在,片段大小相距约 200 碱基对(base pair, bp),而对照 SMC 和用 LacZ 基因重组腺病毒转染的 SMC 未发现 DNA 区带图谱(图 3, Figure 3)。

2.3.3 凋亡细胞原位检测 末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 切口末端标记 (TUNEL) 技术可用于检测凋亡细胞数量。如图

4(Figure 4)结果所示,约40%~50%的SMC在野生型P53基因诱导下呈现TUNEL阳性。

达,使细胞周期终止在G1期和G2期与M期之间,有大量G1期细胞堆积。

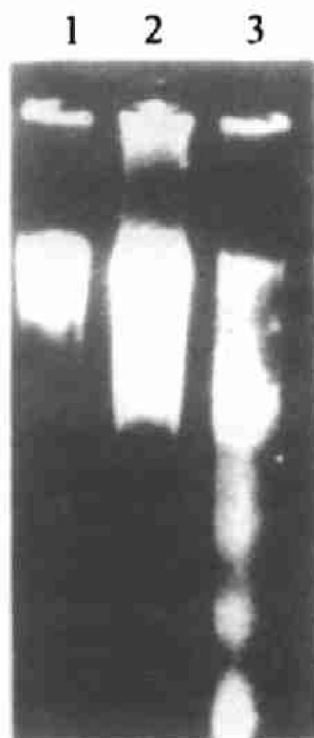


Figure 3. Introduction of wild-type P53 gene into SMC induces oligonucleosomal fragmentation. The low molecular weight DNA fraction prepared from AdCMV P53-infected cells was displayed by agarose gel electrophoresis. Lane 1: uninfected SMC; lane 2: AdCMV β -gal-infected SMC; lane 3: AdCMV P53-infected SMC.

3 讨论

P53基因是一种重要的抑癌基因。野生型P53基因可将DNA受损的细胞封闭在G1期,待其损伤修复后再进入细胞周期。野生型P53基因能以序列专一的方式与DNA结合。与DNA结合后,P53蛋白可以起转录因子作用,激活WAG1/CIP1/SDI1基因,使其产物P21抑制了周期蛋白依赖性激酶,这些激酶的作用是使G1细胞进入S期^[4]。本文将野生型P53基因导入体外培养的兔主动脉SMC并在其中表达后,使SMC的S期细胞数下降,G0/G1期细胞增加,表明P53基因能有效地通过抑制细胞进入S期而抑制细胞增殖。Katayose等^[5]也证实腺病毒载体转染引起P53基因诱导的P21的表

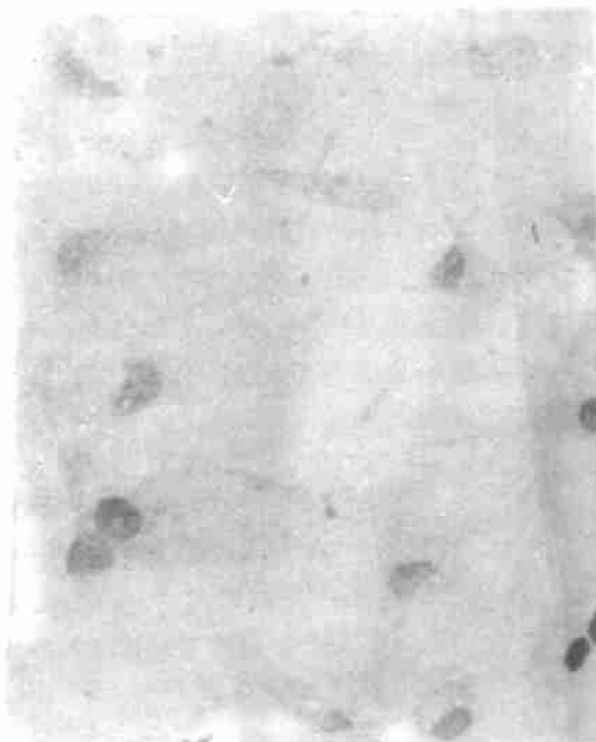


Figure 4. Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling identify apoptotic nucleus of vascular SMC infected with AdCMV P53.

细胞增殖与DNA复制密切相关。P53参与了DNA复制的负调节,P53作为转录因子,通过和TATA结合蛋白结合,抑制*c-fos*、*c-jun*、Rb、IL-6及增殖细胞核抗原(proliferating cell nucleus antigen, PCNA)的转录^[6]。PCNA作为DNA聚合酶 δ 的附属蛋白,是DNA复制体系和修复体系中的必需成分。P53通过抑制PCNA的转录,使DNA合成减少。P53还可和复制因子A相互作用,抑制DNA复制^[7]。本文应用³H-TdR掺入实验观察SMC的DNA合成,结果显示,与正常生长的SMC相比,转染P53基因重组腺病毒的SMC的³H-TdR掺入量明显减少,72h后³H-TdR掺入的抑制率为84%。表明导入野生型P53基因,可抑制SMC的DNA合成。

P53基因与细胞凋亡有密切的关系。野生型P53基因和突变型P53基因均参与细胞凋亡

的调节,但二者的作用不同,野生型 P53 基因对凋亡有促进作用,而突变型 P53 基因则有抑制作用。国外对动脉粥样硬化和血管再狭窄过程中发生的细胞凋亡和 P53 基因的作用进行了一些研究。Cheng 等^[8]用 TUNEL 技术检测到动脉粥样硬化血管壁内膜的两种主要细胞成分即 SMC 和巨噬细胞均发生了凋亡。Murie-Luce 等^[9]和 Han 等^[10]动态研究了动脉粥样硬化中细胞凋亡的规律,发现 SMC 凋亡贯穿于内膜损伤修复全过程。Isner 等^[11]观察了动脉粥样硬化和血管再狭窄患者粥样斑块中的细胞凋亡现象,结果发现血管再狭窄患者较原发动脉粥样硬化患者更易发生细胞凋亡。推测在血管狭窄的发生过程中,SMC 的凋亡不足有可能是再狭窄发生的一个重要机制。Bennett 等^[12]研究证明 SMC 发生凋亡有 P53 基因依赖性和非依赖性两种途径,正常的 SMC 在去除生长因子后发生的凋亡不依赖于表达 P53 基因,但腺病毒 EIA 及基因 *c-myc* 诱导的凋亡是 P53 基因依赖性。值得注意的是,Bennett 等将野生型或突变型 P53 基因导入正常 SMC 对细胞凋亡无明显影响。与此相反,Katayose 等^[5]证实,野生型 P53 基因导入可以诱导 SMC 发生凋亡。我们的实验结果与 Katayose 等的结果一致。我们认为,出现截然不同结果的原因可能是所用的基因转移载体不同。Bennett 等用的是逆转录病毒载体,该载体的缺点是转染效率低,一般只有 10%左右,也就是说,只有约 10%的 SMC 导入野生型 P53 基因。我们与 Katayose 所用的载体相同,都是腺病毒载体,此载体的优点是转染效率高达 100%。因此,几乎所有的 SMC 都可表达外源性 P53 基因,从而诱导 SMC 的凋亡。

参考文献

- 1 Ohno T, Gordon D, San H, et al. Gene therapy for vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury. *Science*, 1994, **265** (5): 781~784.
- 2 Barinaga M. Gene therapy for clogged arteries passes in pigs. *Science*, 1994, **265** (5): 738.
- 3 蒋雷,夏永静,黎健. 野生型 P53 基因导入对培养的兔血管平滑肌细胞生长的抑制作用. *中华心血管病杂志*, 1997, **25** (4): 301~304.
- 4 Harper JW, Adami GR, Nan Wei, et al. The P²¹ cdk-interacting protein Cipl is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 1993, **75** (4): 805~816.
- 5 Katayose D, Wersto R, Cowan K, et al. Consequences of P53 gene expression by adenovirus vector on cell cycle arrest and apoptosis in human aortic vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **215** (2): 446~451.
- 6 Seto E, Vsheva A, Zambett GP, et al. Wild-type P53 binds to the TATA binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (23): 12 028~32.
- 7 Dutta A, Ruppert JM, Aster JC, et al. Inhibition of DNA replication factor RPA by P53. *Nature*, 1993, **365** (6 441): 79~82.
- 8 Geng YJ, Libby P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. *Am J Pathol*, 1995, **147** (2): 251~266.
- 9 Murie-Luce BP, Gabbiani F, Redard M, et al. Apoptosis participates in cellularity regulation during rat aortic intimal thickening. *Am J Pathol*, 1995, **146** (5): 1 059~64.
- 10 Han DK, Haudenschild CC, Hong MK, et al. Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol*, 1995, **147** (2): 267~277.
- 11 Isner JM, Kearney M, Bortman S, et al. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation*, 1995, **91** (11): 2 703~711.
- 12 Bennett MK, Evan GI, Schwartz SM. Apoptosis of rat vascular smooth muscle cells is regulated by P53-dependent and independent pathways. *Circ Res*, 1995, **77** (2): 266~273.

(1997-07-21 收到)