论著

文章编号:1000-5404(2008)10-0950-03

PDGF-BB 和 SDZ RAD 对血管平滑肌细胞 p27 基因启动子活性和 p27 mRNA 表达的影响

冉擘力,何国祥,王 耿,宋治远,舒茂琴 (第三军医大学西南医院心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨重组大鼠血小板衍化生长因子(platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB)和抗增殖剂 SDZ RAD 对大鼠血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)p27 基因启动子活性和 p27 mRNA 表达的影响。**方法** 构建含 p27 基因启动子序列与氯霉素乙酰基转移酶(chloramphenicol acetyl transferase, CAT)报告基因的重组体 pXp27,将这个重组体瞬时转染大鼠 VSMC,加入 PDGF-BB 和 SDZ RAD 干预,测定 CAT 活性。用 RT-PCR 法测定其对 p27 mRNA 表达的影响。**结果** 10 ng/ml 的 PDGF-BB 使转染后的重组体 CAT 活性降低,且使 VSMC p27 mRNA 表达量显著下降。10 ng/ml 的 SDZ RAD 则使重组体 CAT 活性增高,并使 VSMC p27 mRNA 表达量显著增加。**结论** PDGF-BB 或 SDZ RAD 分别在基因转录水平或促进 p27 抑制基因启动子活性,进而减少或增加其 mRNA 的表达。

关键词: 血小板衍化生长因子;p27;启动子;血管平滑肌细胞

中图法分类号: R322.12;R329.26;R394.3 **文献标识码:** A

Effect of platelet-derived growth factor-BB and SDZ RAD on the promoter activity of p27 gene and p27 mRNA expression in rat vascular smooth muscle cell

RAN Bo-li, HE Guo-xiang, WANG Geng, SONG Zhi-yuan, SHU Mao-qin (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effect of platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) and SDZ RAD on the promoter activity of p27 gene and p27 mRNA expression in rat vascular smooth muscle cells (VSMCs). **Methods** The deletion constructs, pXp27, containing region of p27 gene promoter ligated to the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter gene, were transiently transfected into VSMCs. The transfected VSMCs were subsequently treated with PDGF-BB or SDZ RAD. Twenty-four hours later, the CAT activity and the expression level of p27 mRNA were detected by CAT enzyme-linked immunosorbent assay and RT-PCR, respectively. **Results** PDGF-BB (10 ng/ml) decreased the CAT activity of pXp27 and significantly decreased p27 mRNA expression level, while SDZ RAD (10 ng/ml) increased the CAT activity of pXp27 and significantly decreased p27 mRNA expression level. **Conclusion** PDGF-BB inhibits and SDZ RAD increases the promoter activity of p27 gene in rat VSMCs, then both further act on the mRNA expression of p27 gene.

Key words: platelet-derived growth factor; p27; promoter; vascular smooth muscle cell

p27 属于细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI)家族,在调节细胞周期中起着"分子开关"的作用。p27 基因转染能显著抑制血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)异常增殖和迁移,为临床防治冠心病和经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)术后再狭窄(restenosis, RS)提供了一种很好的措施,但在将这一方法推广运用之前,有必要进一步阐明调控 p27 基因表达的确切机制。

研究显示,血小板衍化生长因子(platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB)或抗增殖药 SDZ RAD 分别能促进或抑制 VSMC 增殖和迁移[1,2],其具体机制尚不清楚。本实验通过构建携带 p27 基因启动子的荧光报告质粒(pXp27),转染大鼠培养 VSMC,并加入 PDGF-BB 或 SDZ RAD 对其进行干预,观察转染后 VSMC 氯霉素乙酰基转移酶(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)活性和 p27 mRNA 表达的变化,从转录水平探讨调节 p27 基因表达的确切机制。

作者简介: 冉擘力,男,重庆市人,博士,主治医师,主要从事冠心病及心脏电生理方面的研究。电话:(023)68765671

收稿日期: 2007-11-30;**修回日期:** 2008-01-04

1　材料与方法

1.1　细胞培养

大鼠主动脉 VSMC 培养采用 McMurray 等[3]报道的组织块贴壁法获得。简言之,颈离断法处死 Wistar 大鼠,无菌条件下分离主动脉血管,剥除血管外膜,钝性刮除血管内膜后,将血管中膜组织剪碎成约 1 mm × 1 mm 大小,移入细胞培养瓶中,间距 0.3 ~ 0.5 cm,翻转培养瓶使组织块贴壁面朝上,加入含 20% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养液 3 ~ 5 ml,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养 2 ~ 4 h,待组织块干涸贴壁后缓慢翻正培养瓶,使组织块完全浸于培养液中,继续静置培养约 1 周可见 VSMC 从组织块周围游出,以差速贴壁法纯化 VSMC。纯化细胞用光镜及抗 α-SM actin 免疫细胞化学鉴定。选用 5 ~ 6 代细胞作为实验细胞。

1.2　重组体的构建

将携带 p27 基因启动子的质粒 pMOSBlue(古巴 Alejandro Moro 教授惠赠)和无启动子的荧光报告质粒 pXp1(Promega 公司)用 *Hind*Ⅲ限制性内切酶消化后,用 T_4 连接酶(华美公司)连接,用连接混合物转染大肠杆菌 DH5α。经氨苄青霉素抗性筛选并扩增、纯化,得到携带 p27 基因启动子的荧光报告质粒 pXp27 重组体。

1.3　实验分组

以正常培养的血管平滑肌细胞为对照组,在培养细胞中加入 PxP27 后再分别加入 PDGF-BB 和 SDZ-RAD,分别为 PDGF-BB 组和 SDZ-RAD 组。

1.4　重组体瞬时转染

6 孔板每孔接种细胞 3×10^5,加 2 ml DMEM 培养液(含 10% FBS)。37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 至 50% ~ 80% 融合汇片。用 DOTAP 转染试剂(Roche 公司)转染重组体质粒或无启动子活性的荧光报告质粒 pXp1 5 μg,同时每孔转染碱性磷酸酶表达质粒 pSVAP2(华美公司)作内对照及含 CAT 的表达质粒(pGL2)作阳性对照。转染 6 h 后,加入 1 ml 含 20% FBS 培养液至孔内,但不移除转染混合液。同时,按实验分组分别加入 PDGF-BB(10 ng/L, R&B 公司)和 SDZ-RAD(10 ng/ml, Novartis pharmaceuticals 公司),继续培养 24 h 后加入新鲜的 DMEM 培养液(含 10% FBS)。移除培养液,换新鲜的含 10% FBS 的 DMEM 培养液继续培养 24 h 后终止培养,测定 CAT 值。

1.5　氯霉素乙酰基转移酶(CAT)活性及碱性磷酸酶(ALP)活性的检测

终止培养的细胞用预冷的 PBS 洗 3 遍,以裂解缓冲液裂解细胞后,测定蛋白浓度(Bradford 法)、ALP 活性(ALP 试剂盒)及 CAT 表达量(CAT-ELISA, Promega 公司)检测。ALP 活性作为内参照以保证在转染效率相同的条件下比较 CAT 表达量。CAT 测定结果用相应蛋白含量及 ALP 活性校正后,以未经处理的细胞转染 pGL2 后 CAT 表达量为 1。每次实验作 2 复孔,重复 3 次。

1.6　RT-PCR 检测 p27 mRNA 表达量

用 Tripure 试剂盒(R&B 公司)提取各组细胞总 RNA,按 RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司)检测说明检测 p27 mRNA 表达。p27 引物序列(上海基康工程公司合成):正义 5′-CGTGCGAGT-GTCTAACGG-3′,反义 5′-CGGATCAGTCTTTGGGTC-3′,扩增片段为 453 bp。三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)PCR 作为内参照,扩增片段长度为 254 bp[3]。

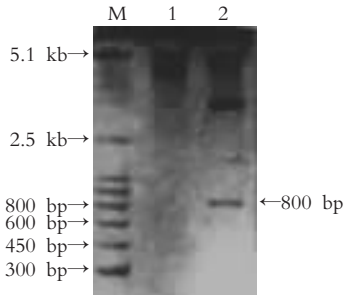
1.7　统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件,对 CAT 相对表达量进行非配对 t 检验分析。

2　结果

2.1　重组体鉴定

所构建的重组体 pXp27 经 *Hind* Ⅲ 酶切鉴定正确,即载体 pXp1 为 5.1 kb,插入 p27 基因启动子片段为 800 bp(图 1)。经测序,插入片段与 GenBank(登录号 X98705)报告的序列完全一致。



M: 标准; 1: pXp1; 2: p27 启动子

图 1　重组体 pXp27 酶切鉴定

2.2　CAT 及 ALP 活性测定结果

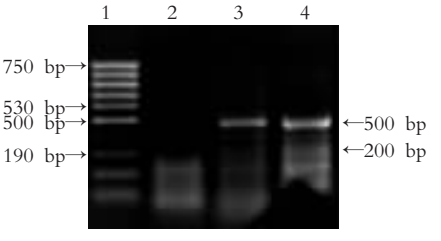
大鼠培养 VSMC 在转染上述含 p27 基因启动子的重组体后 24 h, ELISA 测定细胞 CAT 表达量,同时测定蛋白浓度及 ALP 活性(表 1)。与对照组比较,PDGF-BB 刺激 VSMC 后,p27 基因启动子的 CAT 表达量(0.31 ± 0.01)显著下降($P < 0.05$);而 SDZ RAD 则使 CAT 表达量(1.20 ± 0.01)显著增加($P < 0.01$)。

表 1　VSMC 蛋白含量、ALP 和氯霉素乙酰基转移酶(CAT)表达量的检测($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	蛋白含量	ALP	CAT
对照组	0.18 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.35 ± 0.05
PDGF-BB 组	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.36 ± 0.05
SDZ-RAD 组	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.93 ± 0.07

2.3　p27 mRNA 表达量的检测结果

结果显示,对照组 p27 mRNA 表达强度为 2.55,SDZ RAD 的干预使其表达强度增加到 3.92,而 PDGF-BB 10 ng/ml 刺激后则未见其表达。见图 3。



1:标准; 2: PDGF-BB 10 ng/ml 刺激组; 3: 对照组; 4: SDZ RAD 处理组

图 3　PDGF-BB 和 SDZ RAD 对 p27 mRNA 表达的影响

3　讨论

腺病毒介导 p27 基因转染引起 p27 蛋白的过度表达,能显著抑制 VSMC 增殖和迁移。为进一步了解

p27 基因转录水平的调节机制,本实验通过将携带 p27 基因启动子的荧光报告质粒 pXp27,用脂质体瞬时转染大鼠 VSMC,同时进行细胞因子 PDGF-BB 干预性研究。结果显示,PDGF-BB 处理后的 VSMC 的 CAT 表达量较对照组 VSMC 显著下降,说明 PDGF-BB 对 p27 启动子活性有显著的抑制作用,p27 基因 mRNA 水平也显著下降,其具体机制尚不清楚。研究发现,p27 基因是 c-myc 转录抑制的一个靶基因。当 p27 基因启动子与 c-myc 表达载体共转染 WEHI 231 细胞时,其活性被显著抑制[4]。在 VSMC 上也观察到 c-myc 可抑制缺乏 TATA 盒的 p27 启动子活性。初步研究表明,介导 p27 基因转录活性和 c-myc 抑制作用的序列定位于 p27 基因 -20 ~ 20 bp。PDGF 能诱导原癌基因的转录,其机制可能涉及了转录和转录后机制,使 p27 基因转录显著下降并引起 p27 mRNA 积聚下降[5,6]。因此,我们推测,PDGF 通过促进 c-myc 基因转录,影响了 p27 基因中与 c-myc 转录抑制有关的序列,从而抑制 p27 基因启动子活性,进而减少 p27 mRNA 水平。

SDZ RAD 是 Rapamycin(雷帕霉素)的衍生物,属于大环内酯类抗生素,具有抗真菌和免疫抑制活性。他们能刺激 p27 表达增加并减少有丝分裂原刺激引起的 p27 表达下降和视网膜母细胞瘤蛋白(pRb)磷酸化增加,从而抑制离体和在体 VSMC 增殖和迁移[7]。其具体机制尚不清楚。因此,本实验用 SDZ RAD 干预 p27 基因启动子的活性,拟从基因转录的角度,探讨其对 p27 mRNA 水平影响。结果提示,SDZ RAD 处理后的 VSMC 的 CAT 表达量较对照组 VSMC 显著增加,p27 mRNA 水平也明显上升。说明 SDZ RAD 对 p27 基因启动子活性有显著的促进作用。

近期,通过基因敲除技术发现,p27 基因中 -774 ~ -435 bp 区域对应的起始密码子可能包含了基本的转录因子结合位点[8]。缺失和突变分析表明[9],GGGCGG 序列(-545 ~ -539 bp)和 CCAAT 序列(-525 ~ -520 bp)对于诱导 p27 基因表达是必需的。研究显示,培养的 VSMC 由于 p27 基因中与转录因子 SP1 的结合位点发生突变,从而大大减少了 p27 基因启动子活性,说明 SP1 是 p27 基因有效转录所必需的;且凝胶电泳分析显示,SP1 结合 GGGCGG 序列[10]。进一步研究发现,p27 基因启动子转录起始位点上游 170 bp 区域足以保证 p27 基因启动子最大的转录活性。对这 170 bp 测序分析表明,其中的几个富含 GC 的序列是确切的 SP1 结合位点,且 SP1 通过锚定 1 个或 2 个富含 GC 的序列激活了 p27 结构域[11,12]。因此,我们推测,SDZ RAD 可能通过与其细胞内受体 FKBP-12 结合,抑制 $P_{70}(S_6)$激酶,干扰不同的信号传导途径,促进转录因子 SP1 的表达,从而影响 p27 基因启动子中 SP1 结合位点并促进 p27 基因启动子活性,进而增加 p27 mRNA 水平。

总之,本实验结果显示 PDGF-BB 和 SDZ RAD 分别对 p27 基因启动子活性产生促进和抑制的影响,并从 p27 基因转录水平对其分子机制进行了探讨,为临床应用 p27 基因治疗冠心病和 PCI 术后再狭窄提供了理论依据。

参考文献:

[1] Fang L H, Zhang Y H, Ma J J, *et al*. Inhibitory effects of tetrandrine on the serum- and platelet-derived growth factor-BB-induced proliferation of rat aortic smooth muscle cells through inhibition of cell cycle progression, DNA synthesis, ERK1/2 activation and c-fos expression [J]. Atherosclerosis, 2004, 174(2): 215 - 223.

[2] Laplante A, Demeule M, Murphy G F, *et al*. Interaction of immunosuppressive agents rapamycin and its analogue SDZ-RAD with endothelial P-gp[J]. Transplant Proc, 2002, 34(8): 3393 - 3395.

[3] McMurray H F, Parrott D P, Bowyer D E. A standardised method of culturing aortic explants, suitable for the study of factors affecting the phenotypic modulation, migration and proliferation of aortic smooth muscle cells[J]. Atherosclerosis, 1991, 86(2 - 3): 227 - 237.

[4] Yang W, Shen J, Wu M, *et al*. Repression of transcription of the p27 (Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc[J]. Oncogene, 2001, 20(14): 1688 - 1702.

[5] Servant M J, Coulombe P, Turgeon B, *et al*. Differential regulation of p27(Kip1) expression by mitogenic and hypertrophic factors: Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms[J]. J Cell Biol, 2000, 148(3): 543 - 556.

[6] Shibamiya A, Altincicek B, Tannert-Otto S, *et al*. Extracellular RNA potentiates Factor Ⅶ Activating Protease (FSAP)-mediated inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation induced by Platelet-Derived Growth Factor-BB (PDGF-BB) [J]. Vascul Pharmacol, 2006, 45(3): e147 - e148.

[7] Li G, Oparil S, Sanders J M, *et al*. Phosphatidylinositol-3-kinase signaling mediates vascular smooth muscle cell expression of periostin *in vivo* and *in vitro*[J]. Atherosclerosis, 2006, 181(2): 292 - 300.

[8] Moro A, Santos A, Arana M J, *et al*. Activation of the human p27 (Kip1) promoter by IFNalpha 2b[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 269(1): 31 - 34.

[9] Gizard F, Robillard R, Gervois P, *et al*. Progesterone inhibits human breast cancer cell growth through transcriptional upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 gene [J]. FEBS Letters, 2005, 579(25): 5535 - 5541.

[10] Chen F, Kim E, Wang C C, *et al*. Ciglitazone-induced p27 gene transcriptional activity is mediated through Sp1 and is negatively regulated by the MAPK signaling pathway[J]. Cell Signal, 2005, 17(12): 1572 - 1577.

[11] Zhang Y, Lin S C. Molecular characterization of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 promoter[J]. Biochim Biophys Acta, 1997, 1353(3): 307 - 317.

[12] Vanderlaag K, Samudio I, Burghardt R, *et al*. Inhibition of breast cancer cell growth and induction of cell death by 1, 1-bis(3′-indolyl) methane (DIM) and 5, 5′-dibromoDIM[J]. Cancer Lett, 2006, 236(2): 198 - 212.

(编辑 邓强庭)