

p21^{WAF1}在丁酸钠诱导的人成纤维细胞 凋亡中的表现*

黄 英 张宗玉¹⁾ 童坦君

(北京医科大学生物化学与分子生物学系, 北京 100083)

摘要 用丁酸钠 (NaBu) 诱导了人胚肺二倍体成纤维细胞凋亡 (2BS), 检测其诱导过程中凋亡相关基因的表达变化, 结果表明, p21^{WAF1}的表达在凋亡发生前即有明显下降, 并持续至凋亡发生时, bcl-2 的表达仅在凋亡发生时有所下降, c-myc 和 c-fos 的表达有所上升, 而 p53 和 HER-2 的表达无明显变化. 用稳定转染了不同长度 p21^{WAF1}启动子片段和下游绿色荧光蛋白 (GFP) 报告基因的 2BS-WP 系列细胞进一步研究发现, 其 GFP 的表达水平在 NaBu 诱导过程中下降, 主要调控区域为 p21^{WAF1}启动子的 TATA box 上游 0~ - 800 bp. 说明 NaBu 诱导的人胚肺二倍体成纤维细胞凋亡与 p21^{WAF1}启动子的转录活性下降与密切相关, 并且可能不依赖于 p53.

关键词 细胞凋亡, 基因表达, p21^{WAF1}, 丁酸钠

学科分类号 Q753, Q343

一般来讲, 细胞发生凋亡需经历特异遗传信号的活化, 涉及基因调控. 近来有研究提示, 正常细胞发生凋亡与细胞增殖能力有关, 许多细胞生长调节基因不仅控制着细胞周期监控点 (checkpoints), 且在某些生理情况下也影响了细胞凋亡事件^[1,2]. p21^{WAF1}作为细胞周期检查点的重要调控基因, 与细胞增殖、分化、衰老、DNA 的损伤修复等密切相关, 但它在细胞凋亡中的作用尚无定论. 我室曾成功地用丁酸钠 (NaBu) 诱导了正常人胚肺二倍体成纤维细胞凋亡 (黄 英等, 中华老年医学杂志, 2000, 19 (3)), 本文侧重研究 p21^{WAF1}在这凋亡过程中的表现.

1 材料和方法

1.1 材料

人胚肺二倍体成纤维细胞 (2BS 细胞) 由卫生部北京生物制品研究所建株, 30 代以下为年轻细胞, 55 代以上为衰老细胞, 本实验所用的 2BS 细胞为 25 代. 2BS-WP1, 2BS-WP2, 2BS-WP3 细胞为本室构建的低代龄转染细胞, 其稳定转染的 pDOR-WP 系列逆转录病毒载体中含不同长度的 p21^{WAF1}启动子片段和下游绿色荧光蛋白 (GFP) 报告基因. DMEM 高糖培养基为 Gibco 公司产品. 胎牛血清购自北京市北郊奶牛二厂. 丁酸钠 (NaBu) 购自日本 Osaka 公司. α -³²P-dCTP 为亚辉生物医学工程公司产品. 随机引物试剂盒 (Prime-a-Gene Labeling System) 为 Promega 公司产品. 杂交用探针为本室自备. 荧光分光光度计为日本 Hitachi F-3000 型. 图像分析仪为德国 IBAS

2000 型.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及凋亡诱导: 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 5% CO₂, 于 37℃ 培养至 80% 汇合. 换新鲜培养基, 加入 NaBu (2.0 mol/L, 溶于三蒸水中, 过滤除菌, 4℃ 储存) 至终浓度为 50 mmol/L.

1.2.2 RNA 印迹: 细胞总 RNA 的提取采用一步法^[3], RNA 电泳转膜及杂交按标准方法. 探针标记按试剂盒说明. 杂交结果以 β -肌动蛋白为内标进行密度灰度扫描分析.

1.2.3 胞浆蛋白的提取: 用细胞刮收集细胞 (约 5×10^6 个) 于 EP 管中, PBS 洗二遍, 悬浮于 500 μ l Tris-HCl (25 mmol/L, pH 8.0) 中, 转入 EP 管; 液氮-37℃ 水浴反复冻融三次并振荡, 8 000 r/min 离心 5 min, 取上清用三蒸水稀释至 800 μ l, -20℃ 保存备用.

1.2.4 GFP 表达量的测定: 取 100 μ l 上述胞浆蛋白提取液, 用考马斯亮蓝 (G250) 法测定总蛋白浓度 A_{595} . 将余下的 700 μ l 胞浆蛋白提取液转入荧光分光光度计的荧光比色杯中, 测定发射波长 470 nm, 吸收波长 505 nm 处的荧光强度 (Fluorescence Strength, FS). FS/ A_{595} 即可代表 GFP 的相对表达量.

* 国家自然科学基金资助重点项目 (39930170), 国家重点基础研究发展规划资助项目 (G1999053906).

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (010) 62091454, E-mail: biochem@mail.bjmu.edu.cn

收稿日期: 1999-02-03, 修回日期: 1999-08-20

2 实验结果

2.1 凋亡过程中相关基因表达的变化

NaBu 诱导年轻 2BS 细胞 48 h 发生凋亡 (图 1), RNA 印迹检测诱导 0~48 h 的过程中 p21^{WAF1}、p53 和 bcl-2 基因表达的情况, 密度灰度扫描结果表明, p21^{WAF1} 的表达在 24 h 后即有明显

下降, 并持续下降至凋亡发生时; bcl-2 的表达在 48 h 前无明显变化, 但在 48 h 时下降; p53 的表达在整个过程中均无明显变化 (图 2). 检测诱导 0~48 h 的过程中 c-myc、c-fos 和 HER-2 基因表达的结果表明, c-myc 和 c-fos 的表达在 24 h 后呈逐渐上升趋势; HER-2 的表达无明显变化 (图 3).

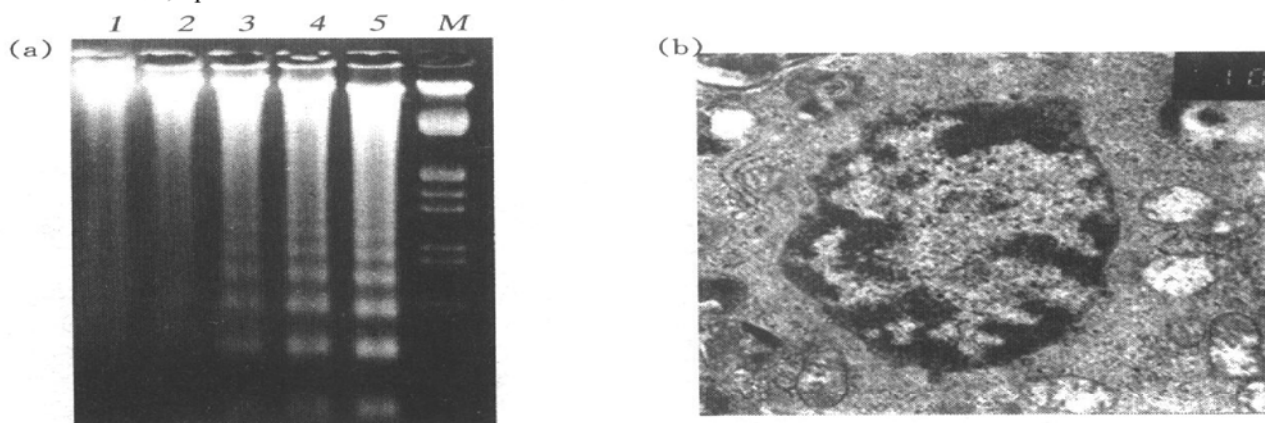


图 1 NaBu 诱导 2BS 细胞凋亡

(a) 1~5 分别为 0、24、48、72、96 h DNA 断裂电泳图谱, M: *N* EcoRI + *H*ind III; (b) 48 h 细胞核电镜形态 ($\times 5000$).

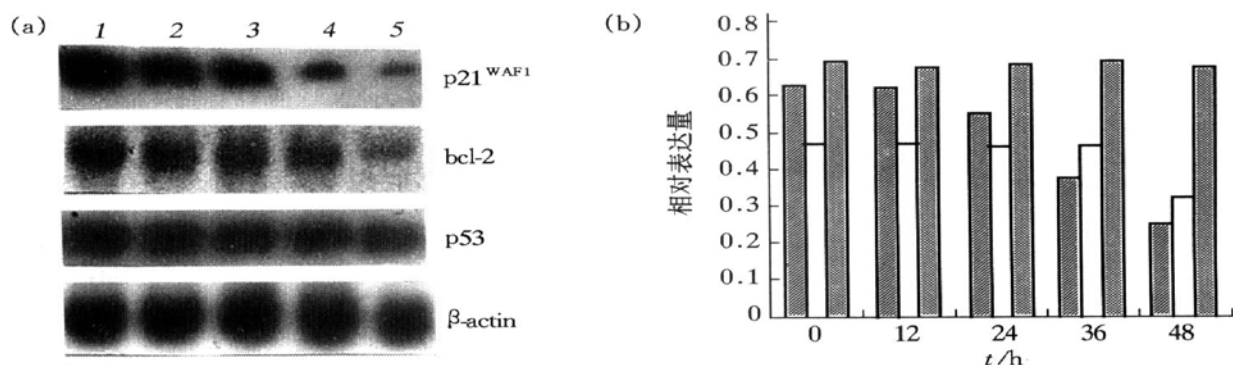


图 2 NaBu 诱导 0~48 h p21^{WAF1}、bcl-2、p53 基因的表达

(a) RNA 印迹结果, 1: 0 h; 2: 12 h; 3: 24 h; 4: 36 h; 5: 48 h. (b) 密度灰度扫描结果. ■: p21; □: bcl-2; ▨: p53.

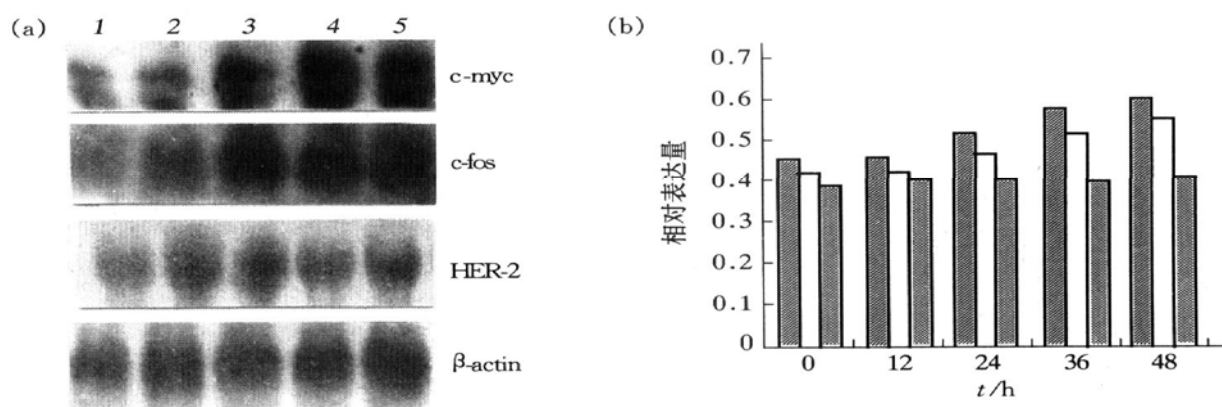


图 3 NaBu 诱导 0~48 h c-myc、c-fos、HER-2 基因的表达

(a) RNA 印迹结果, 1: 0 h; 2: 12 h; 3: 24 h; 4: 36 h; 5: 48 h; (b) 密度灰度扫描结果. ■: c-myc; □: c-fos; ▨: HER-2.

2.2 凋亡过程中 p21^{WAF1} 启动子活性的变化

2BS-WP1 细胞含有 p21^{WAF1} 启动子 TATA box 上游 0~ - 3 550 bp 片段, 在 NaBu 诱导凋亡的过程中, 启动子片段下游的报告基因产物——绿色荧光蛋白 GFP 的表达量 (反应启动子活性) 下降, 且与前述 p21^{WAF1} 表达的下调基本同步 (图 4). 进一步比较 2BS-WP1、2BS-WP2 (含 p21^{WAF1} 启动子 TATA box 上游 0~ - 1 620 bp 片段) 和 2BS-WP3 (含 p21^{WAF1} 启动子 TATA box 上游 0~ - 800 bp 片段) 细胞在凋亡发生时 GFP 表达量下降的幅度, 结果表明 2BS-WP1 的下降幅度最大, 为 43.4%, 2BS-WP2 和 2BS-WP3 的下降幅度分别为 32.6% 和 32.3% (图 5). 提示 NaBu 诱导 2BS 细胞发生凋亡

的过程中, p21^{WAF1} 的下调主要是其启动子 0~ - 800 bp 和 - 1 620~ - 3 550 bp 区域的转录活性下降, 尤其以 0~ - 800 bp 区域为主.

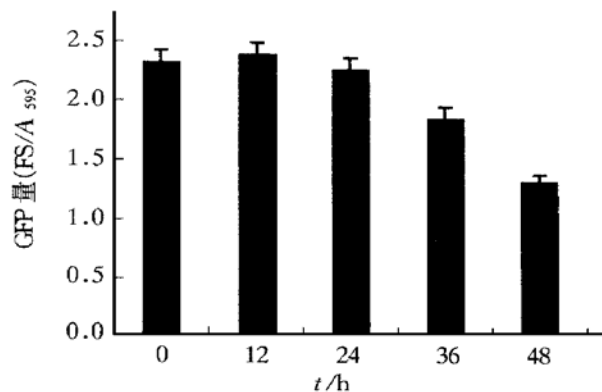


图 4 NaBu 诱导 0~ 48 h 2BS WP1 细胞 GFP 的表达量

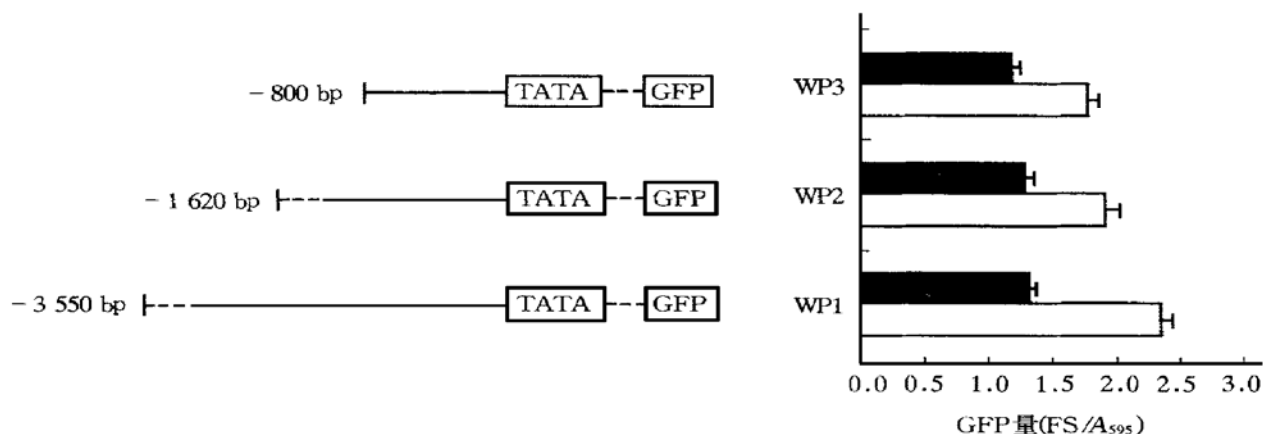


图 5 NaBu 诱导 0 h、48 h 时 2BS - WP 系列细胞 GFP 的表达量

□ : 0 h; ■ : 48 h.

3 讨 论

NaBu 具有多种生物学效应, 其作用的机制主要是通过抑制组蛋白去乙酰化改变染色质结构, 引起基因表达和调控混乱, 破坏细胞正常的信号传导通路. 在丁酸钠 (NaBu) 诱导 2BS 细胞凋亡的过程中, 凋亡相关基因 p53 的表达无甚变化, 提示该凋亡过程可能是 p53 非依赖的; 凋亡抑制基因 bcl-2 的表达在 48 h 时下降, 为凋亡事件的发生开了绿灯; 而细胞周期调控基因 p21^{WAF1} 的表达在凋亡前 (24 h) 即有所下降, 并持续下降至细胞凋亡, 提示 p21^{WAF1} 的下调与 NaBu 诱导 2BS 细胞凋亡的触发有关. 我们推测 p21^{WAF1} 的下调降低了其对 cyclin-CDK 复合物的抑制, 使 RB 蛋白磷酸化程度增加, 进而释放 E2F-1 转录因子, 调节其他基因的表达并有利于细胞进入 S 期. 然而这一细胞周期促进事件是非正常的, 最终导致了细胞凋亡. Park

等^[4]在研究中也发现 cyclin-CDK 复合物是神经细胞凋亡途径的组成部分. 虽然 Matsushita 等^[5]的研究得出与我们相反的结论, 即 p21^{WAF1} 的高表达介导了血管平滑肌细胞的凋亡, 但在这一细胞凋亡途径中 bax 与 bcl-2 基因产物比值的升高起了关键作用. c-myc 和 c-fos 是细胞周期早期基因, 它们在 2BS 细胞凋亡过程中的上调可能与细胞周期受到促进有关.

Xiao 等^[6]在研究中发现, 低剂量的 NaBu 可使小鼠 NIH3T3 细胞出现衰老样表型, 并使其 p21^{WAF1} 启动子活性上升. 我们用较高剂量的 NaBu 诱导人 2BS 细胞凋亡时却发现 p21^{WAF1} 启动子活性下降, 并以 TATA box 上游 0~ - 800 bp 为主要调控区. 前已述及, NaBu 主要是通过抑制组蛋白去乙酰化, 改变染色质结构而调节基因转录的, 不同剂量的 NaBu 所引起的染色质三维结构变化可能有所不同, 致使 p21^{WAF1} 启动子的诸多转录调控因子

对其有不同的反应,造成不同的生理生化事件。另有资料表明^[7], NaBu 还可通过特异的 DNA 序列调节基因的表达,即 NaBu 本身作为特异的调节因子,修饰特异的转录调节蛋白,从而影响它们与启动子结合蛋白之间的作用。究竟什么转录调控因子参与了 NaBu 诱导 2BS 细胞凋亡过程中 p21^{WAF1} 的表达下调尚有待研究。

总之,细胞凋亡的诱发是一个多途径、多步骤的复杂过程,涉及许多基因和生化事件。目前我们正在用正、反义 p21^{WAF1} 转染的 2BS 细胞,进一步研究 p21^{WAF1} 在人胚肺二倍体成纤维细胞凋亡中的作用。

参 考 文 献

- 1 Freeman R S, Estus S, Johnson E M. Analysis of cell cycle related genes in post-mitotic neurons: Selective induction of cyclin D1 during programmed cell death. *Neuron*, 1994, **12** (3): 343~ 355
- 2 Pandey S, Wang E. Cells en route to apoptosis are characterized by the upregulation of c-fos, c-myc, c-jun, cdc2 and RB phosphorylation, resembling events of early cell cycle traverse. *J Cell Biochem*, 1995, **58** (2): 135~ 150
- 3 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162** (1): 156~ 159
- 4 Park D S, Levine B, Ferrari G, *et al.* Cyclin dependent kinase inhibitors and dominant negative cyclin dependent kinase 4 and 6 promote survival of NGF-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci*, 1997, **17** (23): 8975~ 8983
- 5 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** (1-2): 493~ 498
- 6 Xiao H, Hasegawa T, Miyaishi O, *et al.* Sodium butyrate induces NIH3T3 cells to senescence-like state and enhances promoter activity of p21^{WAF1}/CIP1 in p53-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **237** (4): 457~ 460

- 7 Fregeau C J, Helgason C D, Bleackley R C. Two cytotoxic cell proteinase genes are differentially sensitive to sodium butyrate. *Nucleic Acids Res.* 1992, **20** (12): 3113~ 3119

The Expression of p21^{WAF1} During Sodium Butyrate-induced Apoptosis in Human Fibroblast. HUANG Ying, ZHANG Zong-Yu, TONG Tai-Jun (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract During the process of sodium butyrate (NaBu) -induced apoptosis in 2BS cells, p21^{WAF1} gene expression decreased obviously and gradually, bcl-2 gene expression did not decrease until apoptosis happened, c-myc and c-fos genes expression enhanced, while p53 and HER-2 genes expression had no obvious change. To analyze the change of p21^{WAF1} promoter activity, 2BS-WP cells were used, which were stably transfected with pDOR-WPs that containing different length of p21^{WAF1} promoter followed by green fluorescence protein (GFP) report gene. The results showed that the level of GFP expression decreased during NaBu induction, and the main regulating region was 0~ - 800 bp at upstream of TATA box of p21^{WAF1} promoter. It is suggested that down-regulation of p21^{WAF1} promoter activity was involved in the process of NaBu-induced apoptosis in 2BS cells, which was possibly p53-independent.

Key words apoptosis, gene expression, p21^{WAF1}, sodium butyrate

受精鸡蛋卵黄中 DNA 和 RNA 的分布*

雷海新 于 雷 孙立军 陈楚楚

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 通过对受精未孵育鸡蛋卵黄的不同部位加以考查,发现 DNA 和 RNA 在卵黄中的分布是广泛存在的;采用荧光试剂 Hoechst33258 和 RiboGreen 对 DNA 和 RNA 进行定量分析,结果表明:DNA 在不同部位卵黄中的分布比较均匀,且主要存在于卵黄颗粒中,而 RNA 的含量在胚下表层卵黄、侧面和植物极中有较大差异。

关键词 受精鸡蛋, 卵黄, DNA 定位, RiboGreen

学科分类号 Q344

* 国家自然科学基金资助项目 (39670361). Tel: (010) 64888568, E-mail: beisz@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 1999-02-05, 修回日期: 1999-07-13