

参 考 文 献

- Jenkins G H, Sabrahnamyam G, Anderson R A, *et al.* Purification and reconstitution of phosphatidylinositol 4-kinase from human erythrocyte. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991, **1080** (11): 11~ 18
- Yamakawa A, Takenawa T. Phosphatidylinositol 4-kinase from bovine brain. *Methods in Neuroscience*, 1993, **18** (1): 93~ 99
- Scholz G, Barritt G J, Kwok F. Purification and chemical modification of a phosphatidylinositol kinase from sheep brain. *Eur J Biochem*, 1991, **201** (1): 249~ 255
- Macdonald M L, Mack K F, Glomser J A. Regulation of phosphoinositide phosphorylation in Swiss 3T3 cells stimulated by platelet-derived growth factor. *J Biol Chem*, 1987, **262** (3): 1105~ 1110
- Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193** (1): 265~ 275
- Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 1970, **227** (3): 680~ 685
- Carpenter C L, Cantley L C. Phosphoinositide kinases. *Current Opinion in Cell Biology*, 1996, **8** (2): 153~ 158
- Pike L J. Phosphatidylinositol 4-kinases and the role of polyphosphoinositides in cellular regulation. *Endocrine Review*, 1992, **13** (4): 4692~ 4706

High Yield Purification and Characterization of Membrane-associated Phosphatidylinositol 4-Kinase from Bovine Cerebella Cortex. YUE Jia-Chang,

GAI Li-Yun (*National Biological Macromolecule Laboratory, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract A membrane-bound phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K) has been purified approximately 11 500-fold from bovine cerebella cortex. The purification procedure involves: solubilisation of the membrane fraction with TritonX-100, ammonium sulfate fractionation and cation-exchanger chromatography on phosphocellulose followed by affinity chromatography on heparin-sepharose CL-6B. The enzyme was further purified through DEAE-10 FPLC chromatography at last. The purified enzyme exhibited a final specific activity of 450 nmol/mg·min. The molecular mass of the enzyme was estimated to be 56 ku by SDS-PAGE. Kinetic measurements showed that the apparent K_m value of PI kinase for the utilization of PtdIns is 6.6×10^{-7} mol/L and for ATP 7.9×10^{-7} mol/L. In addition adenosine was found to be a strong inhibitor, Enzymatic activity was found to be stimulated by Triton X-100.

Key words phosphatidylinositol 4-kinase, bovine cerebellar, purification

Rb、P₅₃调控平滑肌细胞 c-fos 和 c-jun 基因表达*

王 抒 唐蔚青 黎 健

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

摘要 为研究外源性 Rb 和 P₅₃ 基因导入血管平滑肌细胞后对 c-fos 和 c-jun 基因表达的调控作用, 将 Rb 基因或 P₅₃ 基因重组腺病毒载体转染人脐动脉血管平滑肌细胞, 应用 RT-PCR 和免疫组化法检测 c-fos、c-jun 的 mRNA 及蛋白质表达水平, 以 DNA 琼脂糖凝胶电泳和 β-半乳糖苷酶染色分别观察细胞凋亡和细胞衰老。结果显示, 野生型 P₅₃ 基因导入可诱导平滑肌细胞凋亡, c-fos 和 c-jun mRNA 及蛋白质表达水平显著增高。外源性 Rb 基因导入能促进细胞衰老, 下调 c-fos 基因表达, 但对 c-jun 基因表达没有明显影响。

关键词 抑癌基因, 原癌基因, 基因调控, 平滑肌细胞

学科分类号 Q753

c-Fos 和 c-Jun 蛋白是原癌基因 c-fos 与 c-jun 编码的核蛋白。它们作为转录因子在细胞周期、细胞增殖、分化及肿瘤发生等生理病理过程中发挥重要作用^[1]。c-Fos 和 c-Jun 易被多种因素诱导表达, 参与基因表达的复杂调控网络^[2]。据报道, 凋亡细胞的 c-fos 和 c-jun 基因表达增加^[3], 相反, 衰老

细胞的 c-fos 基因表达被抑制^[4]。但其调控机制尚不清楚。我室曾用腺病毒载体介导野生型 P₅₃ 基因和 Rb 基因转入平滑肌细胞。结果显示, P₅₃ 基因可诱导细胞凋亡^[5], 而外源性 Rb 基因导入可促进细

* 国家自然科学基金资助项目 (39570775)。

收稿日期: 1998-08-24, 修回日期: 1998-12-15

胞发生衰老^[6]。因此, 本文将研究 P₅₃ 和 Rb 基因对平滑肌细胞 *c-fos* 和 *c-jun* 表达的调控, 探讨它们与细胞凋亡及细胞衰老的关系。

1 材料和方法

1.1 P₅₃ 基因或 Rb 基因重组腺病毒载体的构建

含有编码全长 p53 蛋白或 Rb 蛋白的人 P₅₃ cDNA 或 Rb cDNA 的重组腺病毒载体的构建及病毒的筛选与纯化见文献 [7, 8]。两种重组病毒分别命名为 AdCMVP₅₃ 和 AdCMVRb。含有 LacZ cDNA 的重组腺病毒载体 (AdCMVLacZ) 作为对照载体。病毒滴度为 10¹⁰ pfu/ml, 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 c-Fos 和 c-Jun 蛋白测定

AdCMVP₅₃ 或 AdCMVRb (MOI: 100) 转染平滑肌细胞 28 h 后, 应用免疫组化法测定细胞内 c-Fos 和 c-Jun 蛋白, 所用抗体均为兔抗人抗血清 (Santa Cruz)。

1.4 RT-PCR 检测 c-fos 和 c-jun mRNA 水平

应用 Promega 公司的总 RNA 提取试剂盒提取未转染和转染 AdCMVP₅₃ 或 AdCMVRb 28 h 的平滑肌细胞的总 RNA 并合成 cDNA。以 GAPDH 基因为内对照, 进行半定量 RT-PCR 反应。c-fos 的引物为 5' GAATAAGATGGCTGCAGCCAAATGCGCAA3' 和 5' CAGTCAGATCAA GGGAAGC-CACAGACATCT3'; c-jun 引物为 5' GGAAACGACCTTCTATGACGATGCCCT CAA 3' 和 5' GAACCCCTCCTGCTCATCTGTACGTTCTT3'; GAPDH 引物为 5' TGAAGG TCGGAGTCAACGGATTTT3' 和 5' CATGTGGCCATGAGGTCCACCAC3'。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 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析细胞凋亡

AdCMV P₅₃ 或 AdCMVLacZ (MOI: 100) 转染平滑肌细胞 48 h 后收集细胞, 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, pH 8.0), 50℃ 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℃ 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% 琼脂糖凝胶上电泳, 溴乙锭染色分析。

1.6 β-半乳糖苷酶 (β-gal) 染色观察细胞衰老

按文献 [6] 所述的方法操作。固定 AdCMVRb 转染 48 h 后的平滑肌细胞, 用 X-gal 染液 (pH 6.0) 37℃ 保温 4~8 h, 在显微镜下观察结果。

2 结 果

2.1 c-Fos 和 c-Jun 蛋白的免疫组化检测

正常生长的平滑肌细胞中 c-fos 和 c-jun 表达水平很低, 应用免疫组化法检测不到 c-Fos 和 c-Jun 蛋白。用 AdCMVP₅₃ 转染细胞后, c-Fos 和 c-Jun 蛋白水平显著增高, 说明野生型 P₅₃ 基因导入可诱导 c-Fos 和 c-Jun 蛋白表达。而外源性 Rb 基因和 LacZ 基因导入平滑肌细胞后, 用免疫组化法仍然检测不到 c-Fos 和 c-Jun 蛋白, 结果见图 1 (见图版 I) 和图 2 (见图版 II)。

2.2 半定量 RT-PCR 测定 c-fos 和 c-jun mRNA 水平

为了研究野生型 P₅₃ 和 Rb 基因对 c-fos 和 c-jun 基因表达的调控, 应用半定量 RT-PCR 检测 c-fos 和 c-jun mRNA 水平。结果如图 3 所示 (见图版 I)。在转染 AdCMVP₅₃、AdCMVRb 的平滑肌细胞与对照的平滑肌细胞中均检出 c-fos 和 c-jun mRNA, 电泳图谱显示两条区带, 一条为对照基因 GAPDH 的扩增产物, 另一条为 c-fos 或 c-jun 基因的 PCR 产物, 根据核苷酸序列推算, GAPDH、c-fos、c-jun 基因的扩增片段长度分别为 983 bp、236 bp、325 bp。从图 3 可以看出, 野生型 P₅₃ 基因导入平滑肌细胞后, 上调了 c-fos 和 c-jun mRNA 水平。提示 P₅₃ 基因是在转录水平上调 c-fos 和 c-jun 基因表达。相反, 外源性 Rb 基因下调了 c-fos mRNA 水平, 但 c-jun mRNA 水平与对照相比变化不大。提示 Rb 基因导入能抑制 c-fos 基因表达, 但对 c-jun 基因表达没有影响。

2.3 平滑肌细胞凋亡分析

凋亡细胞的一个特征性标志是在琼脂糖凝胶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平滑肌细胞中提取 DNA, 进行电泳分析, 发现细胞中有 DNA ladder 存在, 而对照组和用 LacZ 基因重组腺病毒转染的平滑肌细胞均未发现阶梯状的 DNA 区带图谱。图 4 结果显示, 野生型 P₅₃ 基因能诱导

平滑肌细胞凋亡。

2.4 平滑肌细胞衰老观察

Dimri 等^[9]发现, 在 pH6 的条件下进行 β -gal 染色, 只有衰老细胞呈现蓝色的阳性反应, 因此称此 β -gal 为衰老相关的 β -gal, 将其作为衰老细胞的生物标记。如图 5 (见图版 II) 所示, AdCMVRb 转染的平滑肌细胞出现 β -gal 显色反应, 说明外源性 Rb 基因导入可以促进细胞衰老。

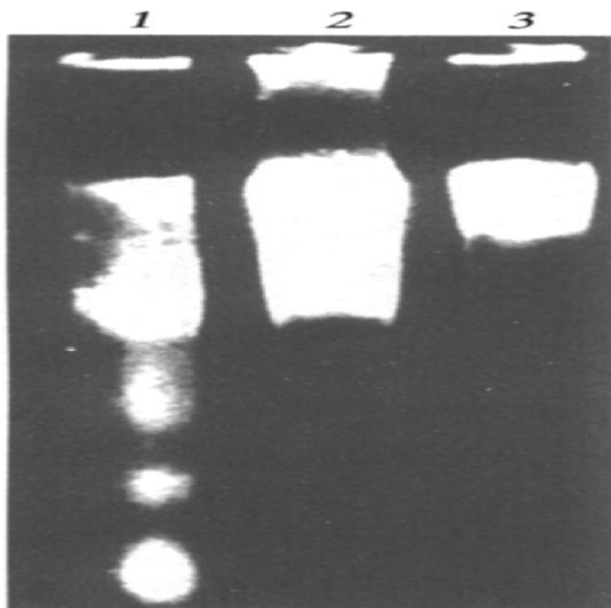


图 4 平滑肌细胞的 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱

1: AdCMVP₅₃ 转染的平滑肌细胞的 DNA; 2: AdCMVLacZ 转染的平滑肌细胞的 DNA; 3: 对照平滑肌细胞的 DNA。

3 讨论

研究表明, c -fos 和 c -jun 与细胞凋亡有密切关系。这些原癌基因编码的蛋白, 在细胞核内起转录因子作用, 它们在凋亡过程中被激活^[3]。c-Fos 和 c-Jun 蛋白组成异源二聚体 Fos-Jun, 称为 AP-1。AP-1 是一个重要的转录因子, 结合于 DNA 上, 可诱导细胞凋亡或细胞增殖。Wang 等^[10]用去除血清来诱导成纤维细胞凋亡, 发现凋亡细胞中 c -fos 和 c -jun 基因表达均增加。本文将野生型 P₅₃ 基因导入平滑肌细胞后, 导致细胞发生凋亡, 同时 c -fos 和 c -jun 的 mRNA 和蛋白质水平均增加, 提示 P₅₃ 基因可诱导平滑肌细胞 c -fos 和 c -jun 基因表达, 但其调控机制以及 c -fos 和 c -jun 的表达在细胞凋亡发生过程中的确切作用还有待进一步研究。

通过研究 c -fos 和 c -jun 等与生长密切相关的基因在衰老过程中的变化, 发现 c -jun 在衰老细胞中并无明显变化, 只有 c -fos 的表达显著下降^[11]。

Riabowol 等^[4]发现在衰老细胞中转录因子 AP-1 与 DNA 结合的数量及 AP-1 促转录的活性均显著降低。进一步研究发现, 衰老细胞中 AP-1 复合物的组成发生了变化, 主要由 Jun-Jun 组成, 而不是 Fos-Jun 复合物, 这可能是由于衰老细胞中 c -fos 表达的显著降低及 Fos 蛋白的修饰变化所致。用 cAMP、血清、血小板源生长因子分别刺激人二倍体成纤维细胞, 它们虽然可分别通过 c -fos 启动子中的不同顺式作用元件起作用, 但衰老细胞中 c -fos 表达的诱导仍比年轻细胞显著降低。说明衰老细胞中 c -fos 的表达受到抑制, 提示有一种显性的转录抑制因子在起作用。本文的结果提示, Rb 蛋白可能就是抑制因子, 因为将外源性 Rb 基因导入平滑肌细胞后, 细胞发生衰老, 同时, c -fos 基因表达受到抑制。事实上, Rb 在衰老细胞与年轻细胞中的表达并无明显变化, 但 Rb 蛋白的存在形式不同, 在非增殖状态的细胞中 Rb 蛋白以非磷酸化的活性形式存在, 一旦细胞进入增殖状态, Rb 蛋白则在 G1/S 交界处发生磷酸化成为无活性状态。但衰老细胞经血清刺激后, Rb 蛋白并不能磷酸化, 细胞亦不能进入 S 期, 可见在衰老细胞中 Rb 蛋白以非磷酸化的活性形式存在^[12]。我们的研究发现, 在正常生长的平滑肌细胞中, Rb 蛋白主要以磷酸化形式存在, 但外源性 Rb 基因导入细胞后, 诱导了 P₂₁ 基因的表达, 使 Rb 不被磷酸化, Rb 以非磷酸化形式存在 (结果另文发表)。提示只有活性形式存在的 Rb 才能调控 c -fos 表达。Rb 蛋白可能通过 E2F 结合位点调控 c -fos 基因表达。因为 c -fos 基因中有 E2F 结合位点。非磷酸化 Rb 与 E2F 转录因子结合后, 抑制了 E2F 的活性, 使 E2F 不能与 c -fos 基因上的 E2F 结合位点作用, 从而抑制了 c -fos 基因的转录。此外, Rb 蛋白可作用于 c -fos 启动子^[13], 抑制 c -fos 的转录, 进而抑制 AP-1 的促转录活性。

参 考 文 献

- 1 Jehn B, Costello E, Marti A, *et al.* Overexpression of Mos, Ras, Src and Fos inhibits mouse mammary epithelial cell differentiation. *Mol Cell Biol*, 1992, **12** (5): 3890-3902
- 2 Morgan S, Greenberg M E. The regulation and function of c -fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, 1990, **4** (4): 477-485
- 3 Smeyne R J, Vendrell M, Hayward M, *et al.* Continuous c -fos expression precedes programmed cell death *in vivo*. *Nature*, 1993, **363** (6425): 166-169
- 4 Riabowol K, Schiff J, Gilman M Z. Transcription factor AP-1 activity is required for initiation of DNA synthesis and it lost during

- cellular aging. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, **89** (1): 157~161
- 5 唐蔚青, 王 抒, 黎 健 (Tang W Q, Wang S, Li J). 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 (Chin J Arterioscler), 1997, **5** (3): 194~ 198
 - 6 王 抒, 唐蔚青, 黎 健 (Wang S, Tang W Q, Li J). 野生型 Rb 基因导入促进血清平滑肌细胞衰老. 中华老年医学杂志 (Chin J Geriatrics), 1998, **17** (4): 223~ 226
 - 7 蒋 雷, 夏永静, 黎 健 (Jiang L, Xia Y J, Li J). 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 (Chin J Cardiology), 1997, **25** (4): 301~ 304
 - 8 Li Jian, Xia Y J, Jiang L, *et al.* Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by introduction of retinoblastoma gene via a recombinant adenovirus vector. Chinese Medical J, 1997, **110** (12): 950~ 954
 - 9 Dimri G P, Lee, Basile G, *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, **92** (20): 9363~ 9367
 - 10 Wang E, Lee M J, Pandey S. Control of fibroblast senescence and activation of programmed cell death. J Cell Biochem, 1994, **54** (4): 432~ 439
 - 11 Irving E T, Feng J L, Wistron C, *et al.* An altered repertoire of fos/jun (AP-1) at the onset of replicative senescence. Exp Cell Res, 1992, **202** (1): 161~ 166
 - 12 Stein G H, Beeson M, Gordon L. Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senescent human fibroblasts. Science, 1990, **249** (4969): 666~ 669
 - 13 Robbins P D, Horowitz J M, Mulligan R C. Negative regulation of human c-fos expression by the retinoblastoma gene product. Nature, 1990, **346** (6285): 668~ 671

Regulation of c-fos and c-jun Gene Expression by Wild Type P₅₃ Gene and Rb Gene. WANG Shu, TANG Wei-Qing, LI Jian (*Department of*

Biochemistry, Beijing Institute of Geriatrics, Beijing 100730, China).

Abstract To study the regulation of c-fos and c-jun gene expression by introduction of wild-type P₅₃ gene and Rb gene, a P₅₃ gene recombinant adenovirus vector, AdCMV P₅₃, and a Rb gene recombinant adenovirus vector, AdCMV Rb, were transfected into the cultured vascular smooth muscle cells derived from human umbilical artery. The level of c-fos, c-jun mRNA was quantified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The content of c-Fos and c-Jun protein were detected by immunohistochemical staining. The senescent cells were characterized by β-galactosidase staining. Agarose gel electrophoresis of DNA was used for analysis of apoptosis. The results showed that introduction of wild-type P₅₃ could increase the level of c-fos, c-jun mRNA and protein, inducing the apoptosis of vascular smooth muscle cells. The introduction of exogenous Rb gene could induce cell senescence and down regulate c-fos gene expression. However, c-jun expression in vascular smooth muscle cells remained constant following transfection with AdCMV Rb.

Key words tumor suppressor gene, proto-oncogene, gene regulation, smooth muscle cell

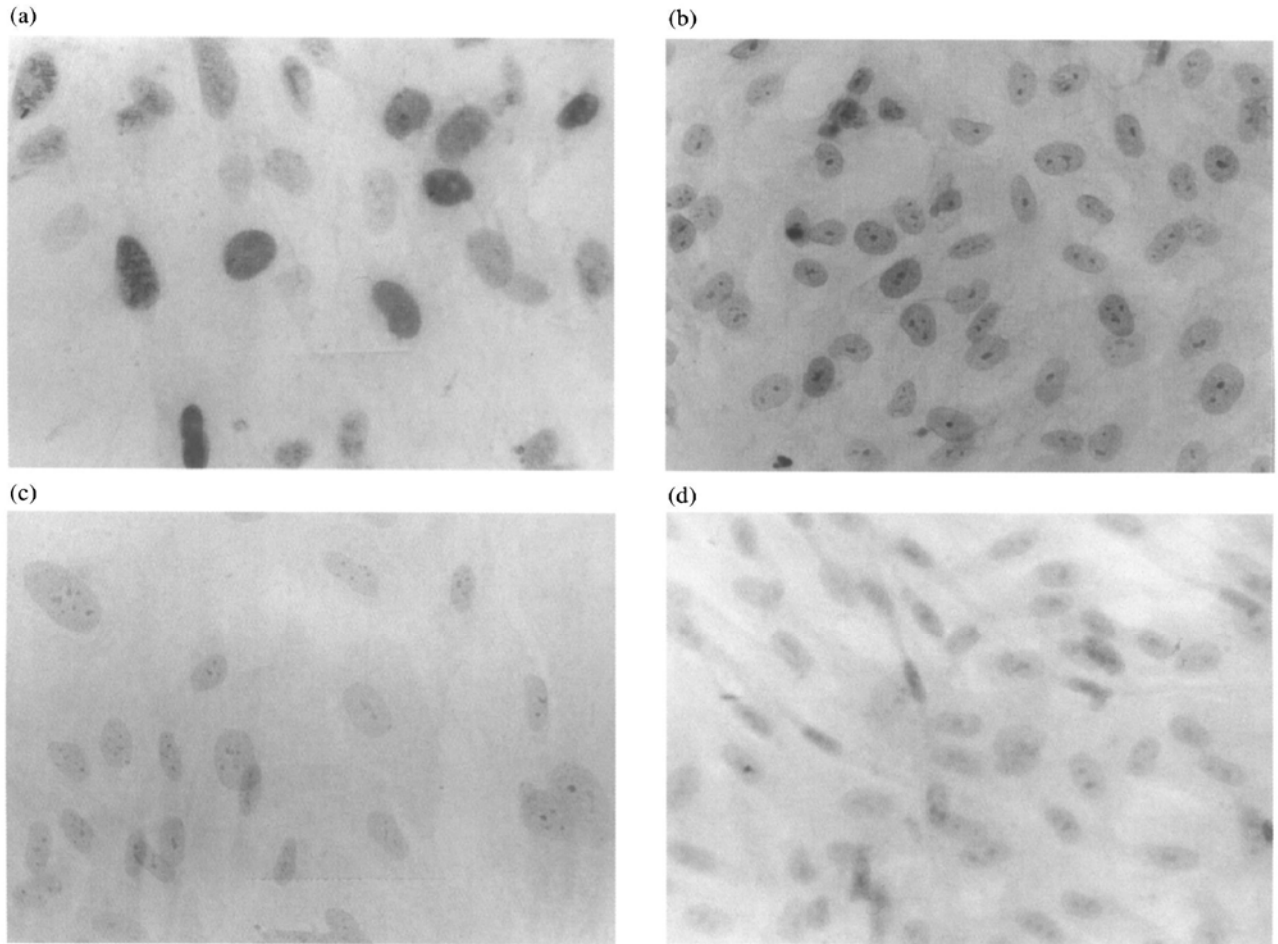


图 1 免疫组化法检测 c-Fos 蛋白

(a) AdCMVP₅₃转染的平滑肌细胞中 c-Fos 蛋白检测; (b) AdCMVLacZ 转染的平滑肌细胞中 c-Fos 蛋白检测; (c) AdCMVRb 转染的平滑肌细胞中 c-Fos 蛋白检测; (d) 未转染的平滑肌细胞中 c-Fos 蛋白检测. 放大倍数: ×400

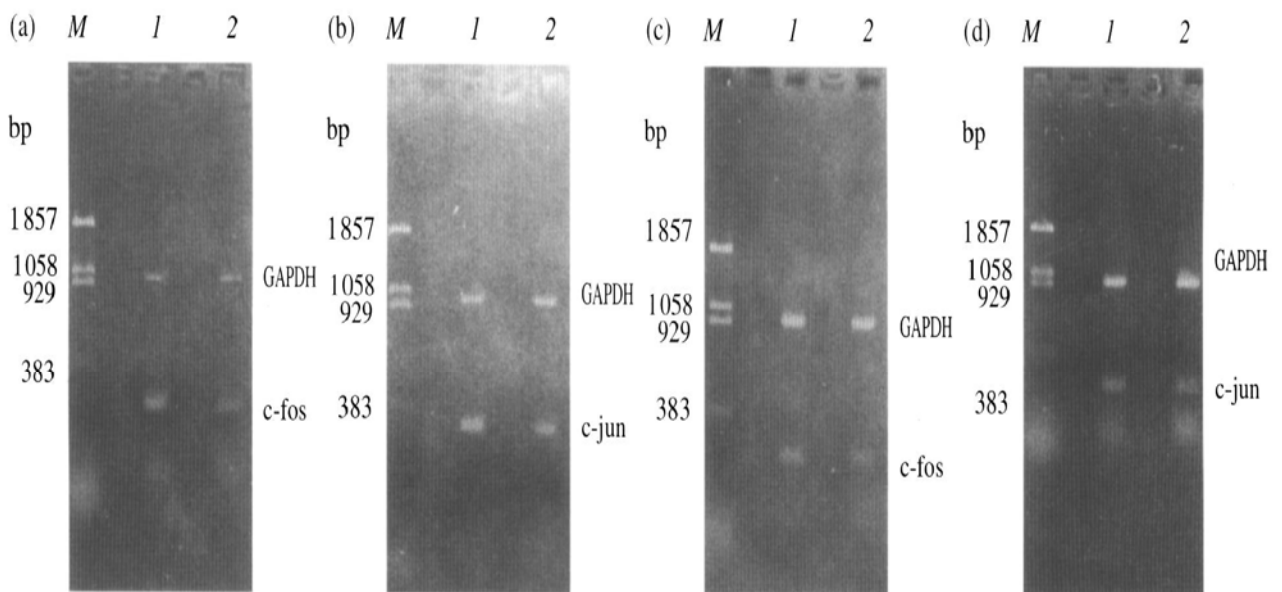


图 3 野生型 P₅₃和 Rb 基因对平滑肌细胞中 c-fos、c-jun mRNA 水平的影响

M 为 pBR322/ BstN I 分子质量标准; (a) 2、(b) 2、(c) 1 (d) 1 均为正常对照组, (a) 1、(b) 1、分别为 AdCMVP₅₃转染的平滑肌细胞中 c-fos 和 c-jun 的 PCR 产物; (c) 2、(d) 2 分别为 AdCMVRb 转染的平滑肌细胞中 c-fos 和 c-jun 的 PCR 产物.

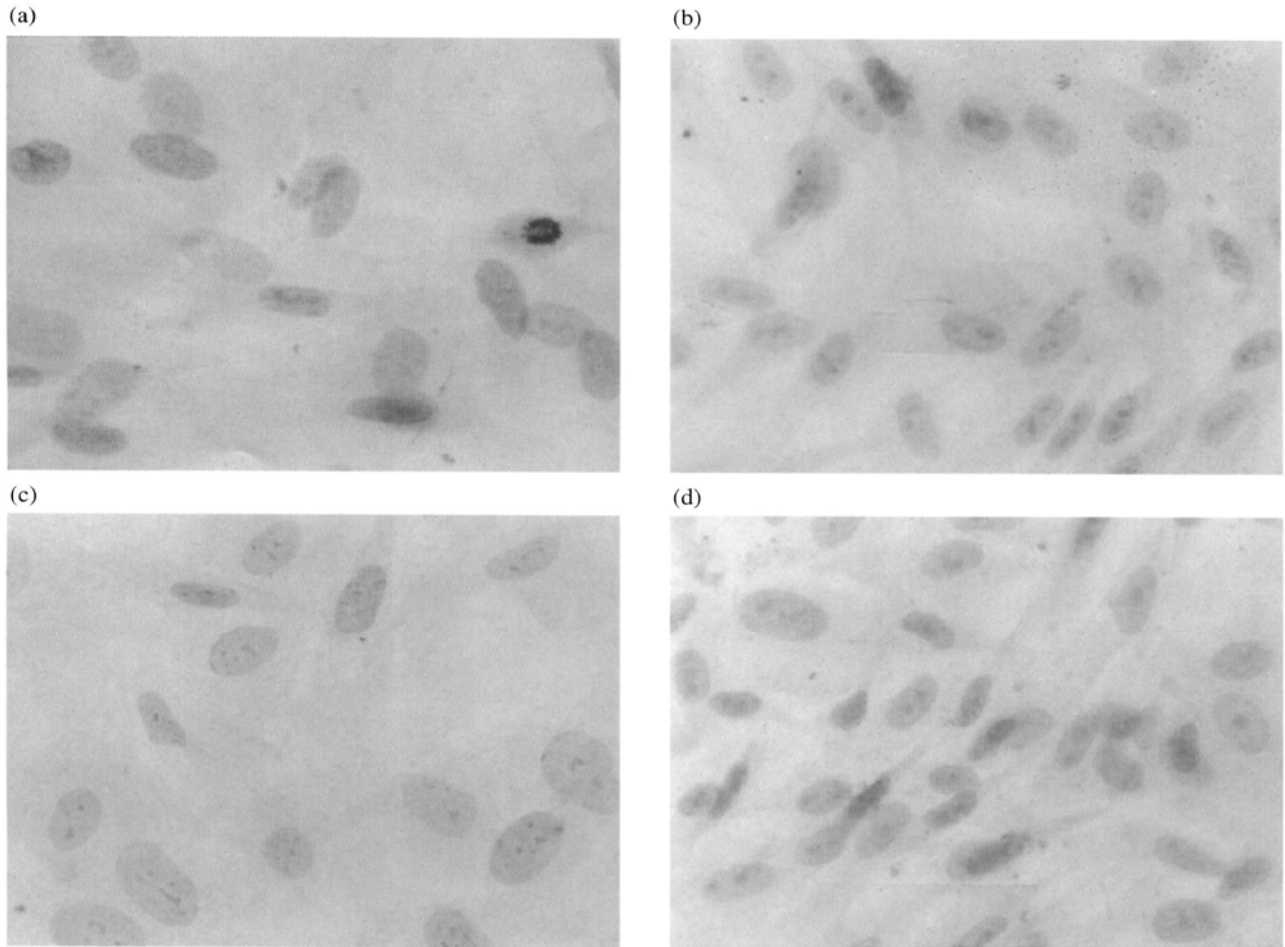


图 2 免疫组化法检测 c-Jun 蛋白

(a) AdCMVP₅₃转染的平滑肌细胞中 c-Jun 蛋白检测; (b) AdCMVLacZ 转染的平滑肌细胞中 c-Jun 蛋白检测; (c) AdCMVRb 转染的平滑肌细胞中 c-Jun 蛋白检测; (d) 未转染的平滑肌细胞中 c-Jun 蛋白检测. 放大倍数: × 400

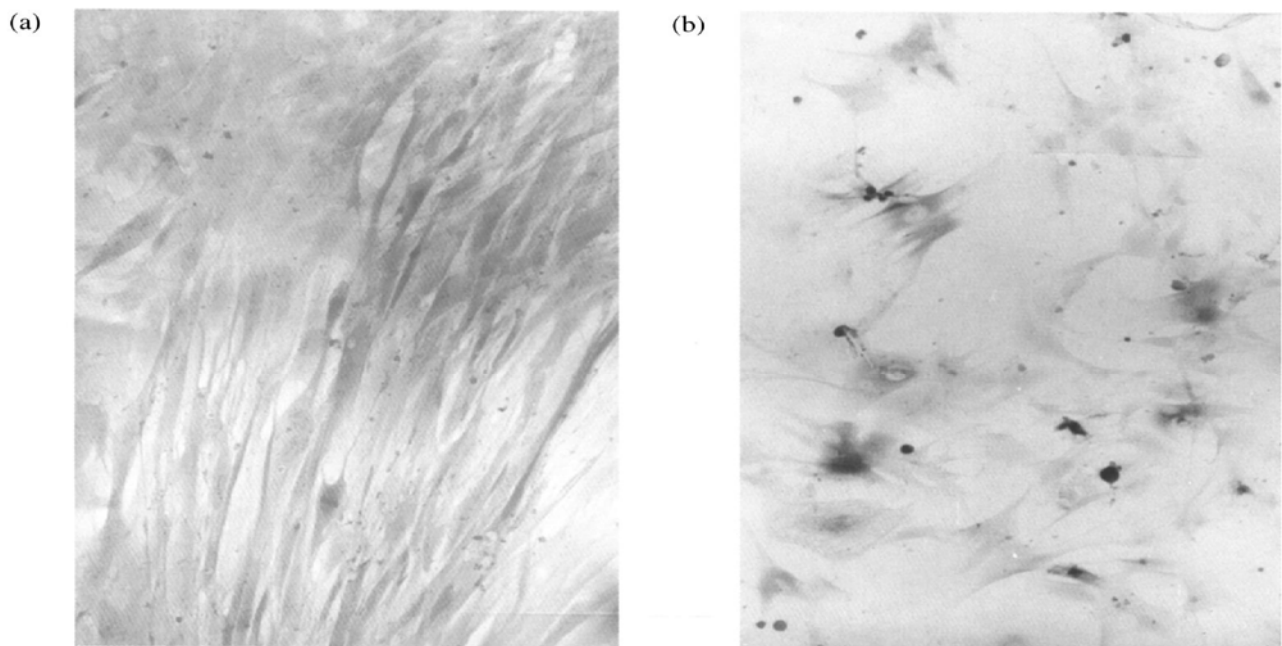


图 5 β-gal 染色观察平滑肌细胞衰老

(a) 正常对照平滑肌细胞; (b) AdCMVRb 转染的平滑肌细胞. 放大倍数: × 200