

[文章编号] 1000-4718(2007)02-0209-04

· 论 著 ·

siRNA 沉默 P21 表达对细胞周期解偶联 和细胞凋亡的影响*

杨 英, 付士波, 鞠桂芝[△]

(吉林大学公共卫生学院卫生部放射生物学重点实验室, 吉林 长春 130021)

[摘要] 目的: 利用 RNAi 技术探讨 P21 蛋白表达对 HeLa 细胞周期解偶联和细胞凋亡的影响。方法: 丝裂霉素刺激 HeLa 细胞后可诱导 P21 蛋白高表达, 采用脂质体转染技术将 p21 siRNA 载体转染至 HeLa 细胞 48 h 后给予 MMC 刺激, 利用流式细胞术检测 HeLa 细胞的 P21 蛋白表达、细胞倍体的形成和细胞凋亡的改变。结果: p21 siRNA 载体可有效干扰经 MMC 诱导的 HeLa 细胞中 P21 蛋白表达, MMC 刺激后 24 h 和 48 h 细胞 2 倍体百分数明显少于对照组 ($P < 0.01$), 4 倍体和 8 倍体细胞百分数明显多于对照组 ($P < 0.01$)。p21 siRNA 沉默 HeLa 细胞 p21 后, 凋亡细胞百分率明显高于空质粒对照组 ($P < 0.01$)。结论: p21 siRNA 可有效沉默 HeLa 细胞 P21 蛋白表达, 在 P21 蛋白低表达的情况下, HeLa 细胞可通过 p53 非依赖途径诱导细胞死亡, 可能与细胞周期解偶联和 p53 非依赖的细胞凋亡有关。

[关键词] 蛋白质 P21; 细胞周期; 细胞凋亡; RNA 干扰; 解偶联

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Effects of p21siRNA on cell cycle uncoupling and apoptosis

YANG Ying, FU Shi-bo, JU Gui-zhi

(Ministry of Health Radiation Research Unit, School of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, China. E-mail: jugz@jlu.edu.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effects of P21 protein on cell cycle uncoupling and cell apoptosis with RNA interference assay. **METHODS:** The expression of P21 protein in HeLa cells was induced by mitomycin (MMC). Lipofect transfection assay was used to take the p21 siRNA into HeLa cells and MMC was given 48 h after transfection. FCM assay was applied to detect the expression of P21 and ratio of polyploid cells and apoptosis. **RESULTS:** p21 siRNA plasmid interfered the expression of P21 protein in HeLa cells. The number of 2 haploid cells was decreased obviously ($P < 0.01$). The number of 4 haploid and 8 haploid cells was increased significantly ($P < 0.01$) compared with control plasmid 24 and 48 h after MMC was given. **CONCLUSION:** p21 siRNA silenced the P21 protein and cell death in HeLa cells was induced by p53-independent pathway in the condition of lower expression of P21 protein. The mechanism may be related to cell cycle uncoupling and apoptosis by p53-independent pathway.

[KEY WORDS] Protein P21; Cell cycle; Apoptosis; RNA interference; Uncoupling

p21^{WAF1/Cip1} 第一个被定义为周期素依赖性激酶抑制剂 (cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI), 为 p53 诱导的细胞生长阻滞的调节子, 也是 CDK 活性的直接调节子之一^[1]。p21 属于 CKIs 中的 Cip/Kip 家族成员, 在氨基末端具有共同的结构域, 其可识别大部分 cyclin/CDK 复合物, 进而抑制周期素及其激酶的活性, 从而影响细胞周期进程。其羧基末端主要与增殖核抗原 (proliferating nuclear antigen, PCNA) 有关, 可直接抑制 DNA 复制, 而不影响 DNA

修复^[2]。在细胞有丝分裂过程中, 细胞中的 DNA 经过复制加倍, 进而随着纺锤丝的牵拉一分为二, 平均分配至两个子代细胞中。当细胞在有丝分裂时受到外界因素的刺激后, 处于细胞周期中的 G₂ 期细胞既不能进入有丝分裂 M 期, 也不发生 G₂ 期阻滞, 而是返回到 S 期, 继续进行 DNA 复制, 使细胞形成含数倍 DNA 的多倍体巨细胞 (polyploid giant cell), 最终死亡, 即细胞周期解偶联 (uncoupling)。P21 蛋白是否与细胞周期解偶联有关还不是很清楚。本研究利

[收稿日期] 2005-05-30 [修回日期] 2005-08-29

* [基金项目] 国家自然科学基金资助课题 (No. 30270346)

[△]通讯作者 E-mail: jugz@jlu.edu.cn

用 RNA 干扰技术,沉默 P21 表达后,观察细胞倍体的形成和细胞凋亡的发生,初步探讨 P21 与细胞周期解偶联的机制。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 主要试剂 脂质体 lipofectamine (美国),丝裂霉素 (MMC, 浙江海正药业)。

1.2 空质粒 pRE(X+4) 和 p21siRNA 载体由美国国家肿瘤研究所傅海青博士惠赠,p21siRNA 载体由 U6 启动子及序列 5' - GGGTCGAAAACGGCGGC-AGACC -3' 克隆至 pREP4 载体构建,pRE(X+4) 为含 U6 启动子且不含该序列的对照载体。

1.3 细胞株 人宫颈癌细胞株 HeLa 细胞,由本室保存。HeLa 细胞培养于含 10% 小牛血清的 RPMI - 1640 培养液中(含 1×10^5 U/L 青霉素和链霉素),于 37 °C、5% CO₂ 传代培养。

2 方法

2.1 细胞转染 取对数生长期 HeLa 细胞接种于 6 孔培养板 (1×10^6 cells/well),培养 18 - 24 h 待细胞完全贴壁后进行转染,设空白质粒转染组 [pRE(X+4)] 和 p21siRNA 转染组,分别以 2 μg 质粒和 10 μg 脂质体转染细胞,转染后 6 h 换全新培养基,继续培养 48 h 后给予 4 mg/L 丝裂霉素刺激诱导 HeLa 细胞表达 P21。收集细胞并固定于 70% 冷乙醇中,待测。

2.2 P21 蛋白表达检测 将固定于 70% 冷乙醇中的细胞用 PBS 洗 2 次,每 1 样品加 P21 单克隆抗体 (mouse anti - human P21, Santa Cruz, 美国) 50 μL (1:50 稀释),4 °C 反应 45 min, PBS 洗 2 次。用正常山羊血清 (1:10 稀释) 4 °C 封闭 30 min 以阻止非特异结合,用 PBS 洗 1 次。每 1 样品加 II 抗 (FITC - goat anti - mouse IgG, Santa Cruz, 美国) 50 μL (1:100 稀释), 4 °C 反应 45 min, PBS 洗 2 次,加 PBS 200 μL,流式细胞仪(美国 BD 公司)检测 P21 蛋白表达。每一样品均设非特异对照,即用 PBS 代替第 I 抗体,其余步骤同上。用 CellQuest 软件收集细胞并分析数据,结果以阳性细胞百分率表示。抗体均为新鲜配制。

2.3 细胞倍体检测 采用碘化丙锭 (PI, Sigma, 美国) 标记,流式细胞术 (FCM) 检测细胞倍体的变化。细胞接种和转染方法同上。加入 MMC 培养 24 h 和 48 h 后收集细胞,用 PBS 洗 2 次,RNase 消化 30 min 后加入 5 % PI 200 μL,4 °C 避光孵育 30 min,流式细胞仪测定细胞倍体,用 CellQuest 软件收取细胞(每份样品收取 1×10^4 个细胞),用 CellQuest 软件

分析细胞倍体,结果以细胞百分数表示。

2.4 细胞凋亡检测 采用 PI 标记,流式细胞术 (FCM) 检测细胞凋亡的变化。细胞接种,转染和处理方法同上。加入 MMC 培养 24 h 和 48 h 后收集细胞,流式细胞仪测定细胞凋亡,用 CellQuest 软件收取细胞(每份样品收取 1×10^4 个细胞),用 ModFit 软件分析细胞凋亡,结果以凋亡细胞百分数表示。

3 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Student's *t* 检验方法进行统计学分析。

结 果

1 MMC 刺激后 P21 表达的时程变化

从图 1 中可以看出,HeLa 细胞经 MMC 刺激 12 - 72 h 后各个时点 P21 表达量均高于对照组,在 24 h 为对照组的 2.5 倍,在 48 h 约为对照组的 6.8 倍,72 h 时 P21 表达量为对照组的 12 倍。

2 p21siRNA 抑制 HeLa 细胞 P21 表达的效率

HeLa 细胞转染后给予 MMC 刺激,分别检测了处理后 24 h 和 48 h 的 P21 表达水平。图 2 和 3 显示,p21siRNA 载体可有效干扰 P21 表达,在 MMC 刺激后 24 h 和 48 h 均可抑制 P21 表达,与单纯 MMC 处理组比较有显著差异 ($P < 0.01$),与空白质粒对照组比较也有显著差异 ($P < 0.05$)。因此,可利用该细胞模型进行与 P21 相关的实验研究。

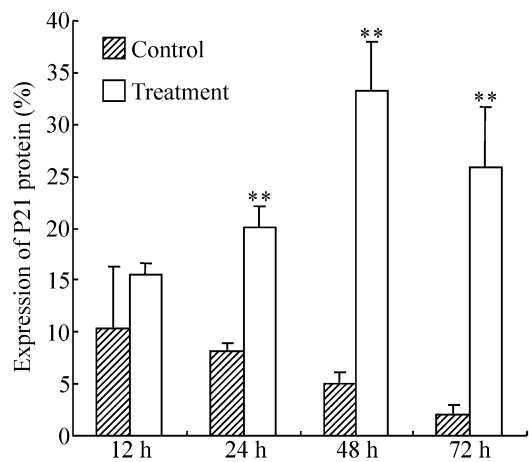


Fig 1 Changes of P21 protein expression in HeLa cells after treatment with MMC. $\bar{x} \pm s$. $n = 4$. ** $P < 0.01$ vs control.

图 1 HeLa 细胞经 MMC 刺激后 P21 蛋白表达的改变

3 转染 p21siRNA 的 HeLa 细胞倍体形成

MMC 刺激 24 h 和 48 h 后转染 p21siRNA 的 HeLa 细胞 2 倍体细胞百分数明显少于空质粒对照组 ($P < 0.01$), 4 倍体和 8 倍体细胞百分数明显多于空质粒对照组 ($P < 0.01$),见表 1 和表 2。

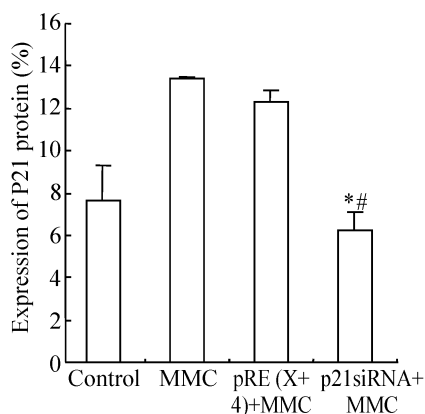


Fig 2 Changes of P21 protein expression in HeLa cells transfected with p21siRNA plasmid following treatment with 4 mg/L MMC for 24 h. $\bar{x} \pm s$. $n=4$. * $P < 0.05$ vs pRE (X+4) + MMC; # $P < 0.05$ vs control.

图2 HeLa 细胞转染 p21siRNA 后给予 4 mg/L MMC 刺激 24 h 后 P21 蛋白表达的变化

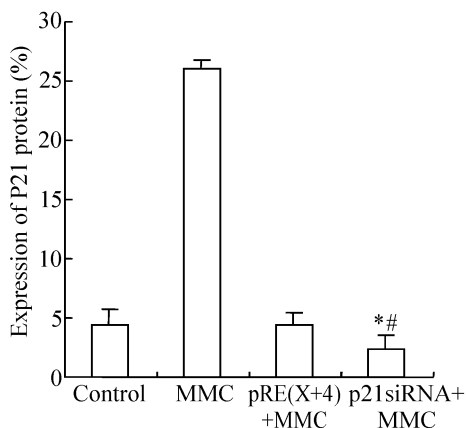


Fig 3 Changes of P21 protein expression in HeLa cells transfected with p21siRNA plasmid following treatment with 4 mg/L MMC for 48 h. $\bar{x} \pm s$. $n=4$. * $P < 0.05$ vs pRE (X+4) + MMC; # $P < 0.05$ vs control.

图3 HeLa 细胞转染 p21siRNA 后给予 4 mg/L MMC 刺激 48 h 后 P21 蛋白表达的变化

表1 HeLa 细胞转染 p21siRNA 质粒经 MMC 处理后 24 h 细胞倍体的变化

Tab 1 Changes of polyploid cells in HeLa cells transfected with p21siRNA following treatment with MMC for 24 h (%. $\bar{x} \pm s$. $n=4$)

Group	Polyploid cells		
	2 N	4 N	8 N
Control	68.14 ± 2.47	21.26 ± 0.39	10.78 ± 2.60
MMC	45.22 ± 6.93 ^{##}	42.50 ± 3.78 ^{##}	12.83 ± 3.39
pRE(X+4) + MMC	54.35 ± 1.49 ^{##}	36.03 ± 1.03 ^{##}	9.98 ± 0.79
p21siRNA + MMC	36.10 ± 1.59 ^{##**}	47.75 ± 1.83 ^{##**}	16.55 ± 2.50 ^{##**}

** $P < 0.01$ vs pRE(X+4) + MMC; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs control.

表2 HeLa 细胞转染 p21siRNA 质粒后经 MMC 处理后 48 h 细胞倍体的变化

Tab 2 Changes of polyploid cells in HeLa cells transfected with p21siRNA following treatment with MMC for 48 h (%. $\bar{x} \pm s$. $n=4$)

Group	Polyploid cells		
	2 N	4 N	8 N
Control	68.32 ± 1.55	24.36 ± 0.78	7.52 ± 1.03
MMC	10.68 ± 0.72 ^{##}	78.50 ± 0.58 ^{##}	11.16 ± 0.54 ^{##}
pRE(X+4) + MMC	36.42 ± 4.74 ^{##}	48.54 ± 2.49 ^{##}	15.44 ± 2.65 ^{##}
p21 siRNA + MMC	12.78 ± 1.37 ^{##**}	62.90 ± 2.20 ^{##**}	24.70 ± 2.58 ^{##**}

** $P < 0.01$ vs pRE(X+4) + MMC; ## $P < 0.01$ vs control.

4 转染 p21siRNA 对 HeLa 细胞凋亡的影响

流式细胞术检测凋亡的结果如表3所示。结果显示,转染 p21siRNA 后给予 MMC 刺激后 24 h, HeLa 细胞凋亡百分数明显高于空质粒对照组 ($P < 0.01$), 48 h 后凋亡百分数高于空质粒对照组。

表3 HeLa 细胞转染 p21siRNA 质粒后经 MMC 处理后 24 和 48 h 细胞凋亡的变化

Tab 3 Changes of apoptosis in HeLa cells transfected with p21siRNA following treatment with MMC for 24 h and 48 h after (%. $\bar{x} \pm s$. $n=4$)

Group	Control	MMC	pRE(X+4) + MMC	p21siRNA + MMC
24 h	1.54 ± 0.40	2.48 ± 0.60 [#]	29.04 ± 2.18 ^{##}	37.25 ± 3.51 ^{##**}
48 h	1.45 ± 0.15	3.21 ± 0.40 ^{##}	30.82 ± 2.13 ^{##}	33.77 ± 6.01 ^{##}

** $P < 0.01$ vs pRE(X+4) + MMC; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs control.

讨 论

细胞周期解偶联最终由于巨细胞的形成而导致细胞死亡,这对于处于增殖旺盛期的肿瘤细胞而言具有重大的意义。p21 是 p53 下游的一个重要的靶基因,参与细胞周期的负调控过程,主要与 G₁→S 期转换有关,可抑制细胞增殖和细胞凋亡。电离辐射主要通过 p53 依赖和 p53 非依赖途径诱导细胞死亡,前者主要通过诱导细胞发生凋亡而引起细胞死亡,其机制研究已较清楚,但对于后者的研究较少。Waldman 等^[3]于 1996 年首次报道了电离辐射可诱导 p53 功能缺失或 p21 基因缺失的人类肿瘤细胞发生了 S/M 期细胞解偶联,从而诱导细胞死亡的观点,即 p53 非依赖途径诱导细胞死亡的可能机制,但仍存在争议^[4]。Bi 等^[5]却证实 p21 可诱导 CHO 细胞周期解偶联,并提出细胞正常大小也是调控细胞周期进程的一个关键因素。De Siervi 等^[6]证实人 p21 启动子可由 Sp1 转录因子活化,该研究组克隆了多个 p21 启动子,包括不含 p53 结合位点的 p21 启动

子和缺失 Sp1 结合位点的 p21 启动子,结果均显示烷基磷脂类药物(ALK)可通过 p53 非依赖途径诱导 p21 活化,而 p21 启动子活化均需 Sp1 参与,提示了与 P21 蛋白表达相关的新的调控通路的存在。目前,对于化学药物与细胞周期解偶联的相关研究还很少见。Miura 等^[7]已证实 MMC 可诱导胃癌细胞的 p21 启动子活化。本研究组曾报道化学药物 MMC 可诱导 SKOV-3 人卵巢癌细胞, L929 人成纤维细胞和 EL-4 小鼠淋巴瘤细胞发生细胞周期解偶联^[8],其机制均与 p53 有关,但其是否与 p21 有关,还未进一步明确。Crawford 等^[9]已证实,HeLa 细胞中仅表达少量 p53,且不能由电离辐射诱导出高水平的 p53 表达。本研究利用 RNA 干扰技术从 P21 调控细胞周期进程角度,选取低表达 p53 的 HeLa 细胞,探讨了 p21 是否可以通过 p53 非依赖途径诱导细胞死亡,即在缺乏 p53 的条件下 p21 与细胞周期解偶联的关系。

RNA 干扰也称为转录后沉默,其含义为双链 RNA 分子阻断或者降低同源基因表达的现象。在体内,双链 RNA 可被内源的核糖核酸酶降解为 21-23 bp 的小分子干扰 RNA (small interfering RNAs, siRNAs),可作为一种抑制病毒感染和转座子跳跃的细胞防御机制^[10]。目前,RNAi 技术已被应用于实验研究中,人工合成有效的 siRNA 干扰片段,转染至细胞,可快速建立使某种基因沉默的细胞模型。本研究利用脂质体将 p21 siRNA 载体转染至经 MMC 刺激后高表达 P21 的 HeLa 细胞,结果表明,本研究中所应用的 p21 siRNA 载体可有效干扰 P21 表达,可将 P21 表达水平降至细胞对照水平,干扰效率约达 80%。进一步用流式细胞术 PI 染色的方法检测细胞倍体形成的实验表明,当用 p21 siRNA 沉默了细胞中的 P21 时,与空质粒对照组比较,细胞周期中 2 倍体数明显减少,4 倍体和 8 倍体数明显增高,说明 P21 蛋白与多倍体细胞形成有关。当细胞中的 P21 蛋白处于较低水平时,八倍体细胞含量增多,细胞周期解偶联,导致巨细胞形成,支持 Waldman 等^[3]的观点。同时,凋亡研究结果显示 P21 表达被干扰后可诱导 HeLa 细胞凋亡水平增高,与 Wolff 等^[11]和 Lawson 等^[12]的报道一致。无论发生细胞周期解偶联,还是诱导细胞凋亡,对肿瘤细胞的治疗都具有较大的意义。

本研究提示在 P21 低表达的情况下,HeLa 细胞可通过 p53 非依赖途径诱导细胞死亡,可能与细胞周期解偶联和 P53 非依赖的细胞凋亡有关,其详细机制还需进一步深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] Noda A, Ning Y, Venable SF, et al. Cloning of senescent cell - derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen[J]. *Exp Cell Res*, 1994, 211(1): 90 - 98.
- [2] Scott MT, Morrice N, Ball KL. Reversible phosphorylation at the C - terminal regulatory domain of p21 (Waf1/ Cip1) modulates proliferating cell nuclear antigen binding [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(15): 11529 - 11537.
- [3] Waldman T, Lengauer C, Kinzler KW, et al. Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21[J]. *Nature*, 1996, 381(6584): 713 - 716.
- [4] Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, et al. Requirement for p53 and p21 to sustain G₂ arrest after DNA damage[J]. *Science*, 1998, 282(5393): 1497 - 1501.
- [5] Bi JX, Shuttleworth J, Al - Rubeai M. Uncoupling of cell growth and proliferation results in enhancement of productivity in p21CIP1 - arrested CHO cells [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 85(7): 741 - 749.
- [6] De Siervi A, Marinissen M, Diggs J, et al. Transcriptional activation of p21 (waf1/cip1) by alkylphospholipids: role of the mitogen - activated protein kinase pathway in the transactivation of the human p21(waf1/cip1) promoter by Sp1[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(2): 743 - 750.
- [7] Miura Y, Kataoka H, Joh T, et al. Susceptibility to killer T cells of gastric cancer cells enhanced by mitomycin - C involves induction of ATBF1 and activation of p21 (Waf1/ Cip1) promoter[J]. *Microbiol Immunol*, 2004, 48(2): 137 - 145.
- [8] 鞠桂芝,付士波,闫凤琴,等. DNA 损伤诱导细胞周期解偶联[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2004, 30(5): 665 - 667.
- [9] Crawford DF, Piwnica - Worms H. The G₂ DNA damage checkpoint delays expression of genes encoding mitotic regulators[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(40): 37166 - 37177.
- [10] Ketting RF, Haverkamp TH, van Luenen HG, et al. Mut - 7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNase D[J]. *Cell*, 1999, 99(2): 133 - 141.
- [11] Wolff G, Schumacher A, Nuessler AK, et al. Coexpression of p21^{WAF1/CIP1} in adenovirus vector transfected human primary hepatocytes prevents apoptosis resulting in improved transgene expression[J]. *Gene Therapy*, 2003, 10(8): 668 - 677.
- [12] Lawson BR, Baccala R, Song J, et al. Deficiency of the cyclin kinase inhibitor p21 (WAF - 1/CIP - 1) promotes apoptosis of activated/memory T cells and inhibits spontaneous systemic autoimmunity[J]. *J Exp Med*, 2004, 199(4): 547 - 557.