

p27^{kip1} 基因在大鼠自体静脉移植中的表达

郎晓讴¹, 刘明辉¹, 杨德华^{1△}, 冀慎泉², 段志泉¹

(1. 中国医科大学附属第一医院血管外科, 辽宁 沈阳 110001; 2. 沈阳医学院奉天医院普外科)

[摘要] 目的: 观察 p27^{kip1} 基因在静脉移植模型中的动态表达及与内膜增生的关系。方法: 建立大鼠自体静脉移植动物模型, 分别于术后 1, 2, 3, 7, 14, 28 d 取材。Verhoeff 染色观察各时间点内膜厚度及管壁厚度; RT-PCR、原位杂交、Western blot 检测 p27^{kip1} mRNA 及蛋白的变化, 免疫组化(SABC)法检测 p27^{kip1}、增殖细胞核抗原(PCNA)的表达。结果: 术后 7 d 内膜明显增厚, 14 d 内膜增厚达到高峰($P < 0.01$)。p27^{kip1} 蛋白在正常对照血管可见表达, 术后 3 d 内无表达, 术后 7 d 开始表达, 14 d 明显增高, 28 d 达到高峰($P < 0.01$)。mRNA 的表达于术后 7 d 出现增高, 持续表达至 28 d, 其间各时间点之间表达无明显差异。PCNA 的表达于术后 7~14 d 达到高峰。结论: p27^{kip1} 基因的表达可能是抑制移植静脉内膜增生的环节之一, 其可能成为治疗移植血管狭窄、闭塞的目的基因。

[关键词] 基因表达; 静脉; 移植

[中图分类号] R654.3

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-4646(2007)02-0128-03

Expression of p27^{kip1} gene in autogenous vein grafts in rats

LANG Xiao-ou¹, LIU Ming-hui¹, YANG De-hua^{1△}, JI Shen-quan², DUAN Zhi-quan¹

(1. Department of Vascular Surgery, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. Department of General Surgery, Fengtian Hospital, Shenyang Medical College)

[Abstract] **Objective:** To investigate the relationship between p27^{kip1} mRNA and protein expression and intimal hyperplasia in rat vein grafts. **Methods:** Autogenous vein graft model was established in 120 Wistar rats by transplanting internal jugular vein to carotid artery. The grafted veins were harvested 1, 2, 3, 7, 14, and 28 days after the operation, respectively. Intimal hyperplasia was observed after Verhoeff staining. The expressions of p27^{kip1} mRNA and protein were determined by reverse transcription polymerase chain reaction, in situ hybridization, and Western blotting. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was detected by SABC method. **Results:** The intimal thickness significantly increased on day 7 and reached the peak on day 14. The expression of p27^{kip1} protein was found in normal carotid veins; in grafted veins, it significantly increased on day 7 and reached the peak on day 28. The expression of p27^{kip1} mRNA significantly increased on day 7 and remained high until day 28, and no difference was found among different time points. The expression of PCNA reached the peak from day 7 to day 14. **Conclusion:** The expression of p27^{kip1} may be a new target for the gene therapy of intimal hyperplasia and stenosis after vein graft.

[Key words] gene expression; vein; graft

p27^{kip1} 作为周期素依赖激酶抑制物 (cyclin dependent Kinase inhibitors, CKIs) 家族的一个成员, 在细胞周期的调控中所起的作用已引起广泛的关注。本实验利用自体移植静脉动物模型, 检测 p27^{kip1} 基因的动态表达与自体移植静脉内膜增殖的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

雄性 Wistar 大鼠 120 只, 体质量 300~350 g (中国医科大学实验动物中心), 增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、p27^{kip1}、SABC 试

剂盒 (武汉博士德生物制品有限公司), 总 RNA 提取试剂 TRIzol Reagent (GIBCOBRL 公司产品), cDNA 双链合成试剂盒 Universal RiboClone Cdna Synthesis System (Promega 公司产品), RNA PCR Kit (AMV) 试剂盒 (TaKaRa 公司产品), 引物由上海生工生物技术服务有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 建立大鼠自体静脉移植模型: 大鼠随机分成 1, 2, 3, 7, 14, 28 d 组, 每组 20 只, 取大鼠的颈总静脉侧支 0.5 cm, 切断同侧颈总动脉, 应用 11-0 无创缝合线将静脉段端端吻合于同侧颈总动脉。分别于规定时间取下移植静脉段, 3, 7, 14, 28 d 组 10% 中性福尔马林液固定 6 条移植静脉, 其余冻存于液氮中。取同侧正常颈静脉做对照。

1.2.2 组织形态学染色: 标本石蜡包埋作 4 μm 血

[基金项目] 辽宁省教育厅基金资助项目(202013161); 辽宁省自然科学基金资助项目(20022049)

[作者简介] 郎晓讴(1970 -)女, 副教授, 博士。

△Corresponding Author's E-mail: yangdehua88@yahoo.com.cn

管横断面切片, Verhoeff 弹力纤维染色, 应用计算机图像分析仪, 测量内膜及血管壁厚度。

1.2.3 免疫组织化学染色: 切片常规脱蜡, 抗原热修复, 滴加 $p27^{kip1}$ 或 PCNA 兔单克隆抗体; 滴加辣根-生物素化的过氧化物酶复合物(SABC), 二氨基联苯胺(DAB)光镜下显色; 胞核呈棕黄色染色为阳性细胞。×400 光学显微镜下观察, 每张随机选取 5 个视野, 计数每个视野阳性细胞数和细胞总数, 计算阳性细胞百分率。

1.2.4 原位杂交: 取部分冻存于液氮中的标本, OGT 胶包埋后作 4 μm 血管横断面冰冻切片。标本处理及原位杂交步骤参见试剂盒说明, DAB 显色后, ×400 光镜下观察, 计算单位视野内阳性细胞(胞浆染成棕黄色)百分率。

1.2.5 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR): TRIzol 液提取标本中总 RNA, 按照 RT-PCR 试剂盒的说明将 RNA 逆转录合成 cDNA。进行 PCR 扩增。

1.2.6 Western blot 检测: 酚试剂法蛋白定量。取 50 μg 上样, 经 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(120 V, 1.5 h)后, 转移至硝酸纤维素膜上(50 V, 2 h), 用 BlottoA(1 × TBS, 5% 脱脂奶粉, 0.05% 吐温 20) 封闭 40 min 后, 与 $p27^{kip1}$ 抗体(1 : 500)结合 4 $^{\circ}\text{C}$, 过夜。再与二抗(1 : 500)结合 2 h, AKP 显色, 凝胶成像仪成像分析结果。

1.3 统计学分析

SPSS10.0 统计软件处理数据, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 形态学观察结果

大鼠正常颈静脉内膜由单层内皮细胞构成, 中膜为几层平滑肌细胞, 静脉移植术后 3 d 时, 内膜无明显增厚。7 d 时可见内膜、中膜有大量增殖平滑肌细胞及合成、分泌的基质, 内膜、管壁明显增厚达 $(26.4 \pm 4.1) \mu\text{m}$, 14 d 达到高峰 $(35.1 \pm 5.3) \mu\text{m}$, 28 d 略有下降 $(28.8 \pm 6.2) \mu\text{m}$, 与对照组 $(6.1 \pm 1.4) \mu\text{m}$ 相比, 差异有统计学意义($n=6, P<0.05$)。

2.2 原位杂交及免疫组化结果

$p27^{kip1}$ mRNA 原位杂交可见对照、3、7 d 组有少数细胞出现阳性表达, 细胞浆或少数细胞核出现棕黄色颗粒状沉淀, 在术后 14~28 d 表达明显增强, 与对照组相比差异显著($P<0.05$)。变化趋势与半定量 RT-PCR 结果基本一致。阳性表达多位于血管中层 VSMCs 和增生内膜中。

$p27^{kip1}$ 蛋白产物在正常静脉可见阳性细胞, 约为 10.5%。术后 3 d 内, 检测不到 $p27^{kip1}$ 阳性细胞。7

d 阳性细胞少有表达, 与对照组 $(10.5 \pm 4.5)\%$ 相比, 14 d $(18.5 \pm 6.8)\%$ 明显增多, ($P<0.05$), 28 d 达到高峰 $(20.6 \pm 5.7)\%$, ($P<0.05$)。变化趋势与蛋白印迹结果基本一致。PCNA 阳性细胞在正常静脉无表达, 与对照组 $(6.2 \pm 3.9)\%$ 相比, 术后 3 d 阳性细胞明显增多 $(25.4 \pm 7.9)\%$, ($P<0.05$), 7 d 达到高峰 $(44.2 \pm 7.5)\%$, ($P<0.01$), 14 d 略有下降 $(31.5 \pm 6.4)\%$, ($P<0.01$), 28 d 下降明显 $(19.6 \pm 6.5)\%$, ($P<0.01$)。 $p27^{kip1}$ 及 PCNA 阳性表达多定位于移植血管中层或增生内膜中的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)。

2.3 半定量 RT-PCR 结果

$p27^{kip1}$ 的 mRNA 表达于术后 7 d 内与正常对照组相比无显著变化。术后 14 d 开始迅速增加, 与正常静脉比较差异显著($P<0.01$), 持续表达至 28 d, 2 组之间差异无显著性。

2.4 Western blot 蛋白印迹结果

$p27^{kip1}$ 的蛋白于正常静脉可见表达, 术后 3 d 内表达明显减少, 术后 7 d 开始出现, 14 d 明显增高, 28 d 达到高峰。

3 讨论

VSMC 的增殖是移植血管再狭窄的主要原因。 $p27^{kip1}$ 是非特异性的 CKI, 抑制不同的 CDK 复合物, 使细胞周期不能通过 G_1 -S 点而阻断于 G_1 期, 从而抑制细胞的增殖^[1]。PCNA 是 DNA 复制和细胞分裂过程中 DNA 多聚酶最重要的辅助因子。在 VSMC 增殖和再狭窄时, PCNA 基因高表达^[2]。本研究结果, 血管移植术后 7 d 时 PCNA 高表达, 而 $p27^{kip1}$ 低表达, 内膜增厚明显, 14 d 时随着 $p27^{kip1}$ 表达的增高, PCNA 基因的表达逐渐受到抑制, 内膜厚度不再明显增加。通过原位杂交我们进一步证明了 $p27^{kip1}$ mRNA 阳性细胞大多数为 VSMCs, 据此我们认为 $p27^{kip1}$ 的低表达与 VSMCs 增殖或内膜增生的关系非常密切, 说明 $p27^{kip1}$ 高表达可能起到抑制 VSMC 增殖的作用。

POLYAK^[3] 等提出, 在增殖或静止细胞中的 $p27^{kip1}$ mRNA 水平是类似的, 且在各种细胞的分期中, $p27^{kip1}$ mRNA 水平亦无显著差异。提示 $p27^{kip1}$ 蛋白的负性调节为转录后调节。SERVANT^[4] 等报道, $p27^{kip1}$ 的 mRNA 水平是有变化的。当静止 SMC 受促有丝分裂原的刺激后, $p27^{kip1}$ 的 mRNA 水平会有短暂的下调, 2 h 时内, 转录速度下降了 90%, 提示 $p27^{kip1}$ 蛋白的负性调节亦发生在转录水平。本实验

中 RT-PCR 结果, 移植术后 7 d, p27^{kip1} 的 mRNA 水平增高后保持在一个稳定的水平, 而蛋白的表达差异明显, 说明在移植静脉中 p27^{kip1} 蛋白表达的调节可能是在转录后水平实现的。

将外源性 p27^{kip1} 基因导入肿瘤细胞, 可使外源性 p27^{kip1} 基因在肿瘤细胞内高表达, 明显抑制肿瘤细胞的生长, 还可促进肿瘤细胞的凋亡^[5]。有人在大鼠动脉球囊损伤模型中转染腺病毒介导的 p27^{kip1} 基因, 发现内膜增生受到抑制, PCNA 的表达明显减少^[6]。那么对移植到动脉环境里的静脉又如何呢? p27^{kip1} 在血管移植术后 2 周表达最强, 提示其抑制细胞增殖、分化的作用在该期最活跃。若用干预的手段将 p27^{kip1} 的表达提前到与 PCNA 同一时期也就是干预内膜增生的有效时期, 可能达到抑制移植血管内膜增生的目的。因此, p27^{kip1} 基因有可能作为目的基因, 用于抑制血管移植后平滑肌细胞增殖的基因治疗。

参考文献:

[1] DIEZ-JUAN A, ANDRES V. Coordinate control of proliferation and

migration by the p27^{kip1}/cyclin-dependent kinase/retinoblastoma pathway in vascular smooth muscle cells and fibroblasts [J]. Circ Res, 2003, 92: 402-410.

[2] 王新文, 张强, 黄斌, 等. 自体移植静脉内膜增殖动态性变化的实验研究 [J]. 中华实验外科杂志, 1998, 15(3): 539-540.
[3] POLYAK K, LEE MH, ERDJUMENT B H, et al. Cloning of p27^{kip1}, a cyclin dependent kinase inhibitor and apotential mediator of extra cellular anti mitogenic signals [J]. Cell, 1994, 78: 59- 66.
[4] MARE J S, PHILIPPE C, BENJAMIN T, et al. Defferential regulation of p27 expression by mitogenic and hypertrophic factors: involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms [J]. J Cell Biol, 2000, 148(3): 543-556.
[5] CHEN WJ, IN JK. Induction of G1 arrest and apoptosis in human jurkat T cells by pentagalloylglucose through inhibiting proteasome activity and elevating p27^{kip1}, p21^{Cip1}/WAF1, and Bax proteins [J]. J Biol Chem. 2004, 279:13496-13505.
[6] ANDRES V, URENA J, POCH E, et al. Role of Sp1 in the induction of p27 gene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and after balloon angioplasty [J]. Arteriose Thromb Vasc Biol, 2001, 21: 342-347.

[收稿日期] 2006-09-11

(上接第 127 页)

小亚基的结合;其次,克隆入多克隆位点的外来基因与 EGFP 共同转录,但翻译出的蛋白不融合,各具独立的空间结构,消除了融合蛋白之间可能存在的相互影响,表达出的外来蛋白的构象与天然情况最为接近^[12]。荧光定量 PCR 和免疫细胞化学染色的结果表明,本实验构建的 phPPAR γ 1- IRES2-EGFP 重组质粒在转染的 293 细胞中获得了 hPPAR γ 1 基因的高效表达, 这为进一步建立基于 PPAR γ 靶点的药物筛选分子平台打下了良好的基础。

参考文献:

[1] KLEWER SA, FORMAN BM, BLUMBERG B, et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91 (15): 7355-7359.
[2] KEPEZ A, OTO A, DAGDELEN S. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: novel therapeutic target linking adiposity, insulin resistance, and atherosclerosis [J]. BioDrugs, 2006, 20(2): 121-135.
[3] SARAFIDIS PA, LASARIDIS AN. Actions of peroxisome proliferator-activated receptors-gamma agonists explaining a possible blood pressure-lowering effect [J]. Am J Hypertens, 2006, 19(6): 646-653.
[4] DESVERGNE B, WAHLI W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism [J]. Endocr Rev ,1999, 20 (5): 649-688.
[5] GLASS CK, ROSENFELD MG. The coregulator exchange in tran-

scriptional functions of nuclear receptors [J]. Gene Dev, 2000, 14 (2): 121-141.

[6] MUELLER E, DRORI S, AIYER A, et al. Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoforms [J]. J Biol Chem, 2002, 277(44): 41925-41930.
[7] CHUI PC, GUAN HP, LEHRKE M, et al. PPARgamma regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1 [J]. J Clin Invest, 2005, 115(8), 2244-2256.
[8] HE W, BARAK Y, HEVENER A, et al. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(26), 15712-15717.
[9] MARTENS FM, RABELINK TJ, OP 'T ROODT J, et al. TNF- α induces endothelial dysfunction in diabetic adults, an effect reversible by the PPAR- γ agonist pioglitazone [J]. Eur Heart J, 2006, 27 (13): 1605-1609.
[10] CHAFFER CL, THOMAS DM, THOMPSON EW, et al. PPARgamma-independent induction of growth arrest and apoptosis in prostate and bladder carcinoma [J]. BMC Cancer, 2006, 6: 53.
[11] MUDALIAR S, CHANG AR, HENRY RR. Thiazolidinediones, peripheral edema, and type 2 diabetes: incidence, pathophysiology, and clinical implications [J]. Endocr Pract, 2003, 9(5): 406-416.
[12] WAGSTAFF MJ, LILLEY CE, SMITH J, et al. Gene transfer using a disabled herpes virus vector containing the EMCV IRES allows multiple gene expression in vitro and in vivo [J]. Gene Ther, 1998, 5 (11): 1566-1570.

[收稿日期] 2006-11-09