

[文章编号] 1000-4718(2008)07-1313-04

## 曲古菌素 A 抑制血清诱导血管平滑肌细胞 p27kip1 表达的降解

邹琛, 吴春芳, 徐志红, 陆国平  
(上海交通大学附属瑞金医院心脏科, 上海 200025)

**[摘要]** 目的: 探讨组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古菌素 A (TSA) 对血管平滑肌细胞 (VSMCs) p27kip1 表达的影响和调控机制。方法: 半定量逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 p27kip1 mRNA 水平, 蛋白印迹测定 p27kip1 和 skp2 蛋白表达, 荧光分光光度法测定 20S 蛋白酶体活性。结果: 100 μg/L TSA 不影响 VSMCs 中 p27kip1 的 mRNA 水平。100 μg/L TSA 显著抑制血清诱导的 p27kip1 蛋白下调, 并延长 p27kip1 蛋白的半衰期。100 μg/L TSA 抑制血清诱导的 skp2 表达上调, 且 skp2 表达与相应时点 p27kip1 蛋白呈负相关。100 μg/L TSA 对 20S 蛋白酶体活性无影响。结论: TSA 对 VSMCs 的 p27kip1 表达调控不是在转录水平上, 而是通过翻译后机制抑制血清诱导 VSMCs 的 p27kip1 蛋白降解, 其机制可能与 TSA 抑制泛素连接酶亚单位 skp2 表达有关。

**[关键词]** 曲古菌素 A; 血管平滑肌细胞; 基因, p27kip1; S 期激酶相关蛋白 2

**[中图分类号]** R966 **[文献标识码]** A

### Trichostatin A inhibits serum - induced p27kip1 protein degradation in vascular smooth muscle cells

ZOU Chen, WU Chun - Fang, XU Zhi - Hong, LU Guo - ping

(Department of Cardiology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China. E - mail: gplu52@hotmail.com)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate the effect of trichostatin A (TSA) on p27kip1 gene expression in vascular smooth muscle cells. **METHODS:** Reverse transcription - polymerase chain reaction (RT - PCR) was used to measure the level of p27kip1 mRNA. The protein levels of p27kip1 and S - phase kinase - associated protein - 2 (skp2) were determined by Western blotting. 20S proteasome activity was quantified by using a fluorogenic proteasome - specific substrate. **RESULTS:** TSA did not affect mRNA level of p27kip1 in VSMCs, but attenuated serum - induced downregulation of p27kip1 through stabilizing p27kip1 turnover. In addition, TSA decreased the expression of skp2, an F - box protein that targets p27kip1 for degradation, but had no effect on proteasome activity. **CONCLUSION:** TSA regulates p27kip1 expression at the post - translational level in VSMCs.

**[KEY WORDS]** Trichostatin A; Vascular smooth muscle cells; Genes, p27kip1; S - phase kinase - associated protein - 2

组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 抑制剂是新型抗肿瘤药物, 能通过调节细胞周期蛋白激酶抑制物的表达, 诱导肿瘤细胞发生细胞周期停滞<sup>[1,2]</sup>。最近研究显示, HDAC 抑制剂可以促进 p21waf1 基因转录和表达, 诱导血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 停滞于 G<sub>1</sub> 期, 抑制 VSMCs 增殖<sup>[3]</sup>。p27kip1 是细胞周期依赖性激酶抑制物家族的重要成员, 也是治疗 VSMCs 异常增生的靶点之一。HDAC 抑制剂对 VSMCs 的 p27kip1 表达调控模式尚不清楚。本研究观察了 HDAC 抑制剂曲古菌素 A (trichostatin A, TSA) 对 VSMCs 的 p27kip1 基因表达

的影响, 并初步分析其调控的机制。

### 材 料 和 方 法

#### 1 材料

TSA 购于 Upstate 公司; DMEM 培养液、胎牛血清和胰蛋白酶为 Gibco 公司产品; Trizol 为 Invitrogen 公司产品, Taq 酶购自 Promega 公司; 兔抗大鼠 skp2 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司, 小鼠抗大鼠 p27kip1 单克隆抗体购自 BD 公司, 抗 GAPDH 单抗为上海康城公司产品; 20S 蛋白酶体检测试剂盒购于 Biomol 公司。

[收稿日期] 2007-02-27 [修回日期] 2007-08-31

Tel: 021-64370045-665451; E-mail: gplu52@hotmail.com

## 2 方法

**2.1 平滑肌细胞体外培养和处理** 用组织贴块法培养血管平滑肌细胞:取 180 - 200 g Sprague - Dawley 大鼠颈椎脱臼致死,无菌条件下打开胸腔,取出胸主动脉,浸泡于无菌 Hanks 液。剥去血管内膜和外膜,取血管中层剪成体积约 0.5 mm × 1 mm × 1 mm - 1 mm × 1 mm × 1 mm 的小块,接种于培养瓶中,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 2 h,加入含 15% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 DMEM 培养液,待细胞生长融合,以 0.25% 胰蛋白酶 + 0.2% EDTA 消化液消化传代,取 4 - 10 代用于实验。按每平方毫米 1 × 10<sup>3</sup> 个细胞的密度接种于直径 60 mm 培养皿中,待细胞贴壁后,更换含 0.4% FBS DMEM 培养 48 h 使细胞同步化,换新鲜培养基,加入终浓度为 100 μg/L TSA 开始实验。

**2.2 半定量逆转录聚合酶链反应 (RT - PCR) 检测 p27kip1 mRNA 表达** TSA 处理后分别于相应时点用 Trizol 抽提细胞 RNA,分光光度计测定波长 260nm 和 280nm 吸光度,计算总 RNA 浓度并估计其纯度。取总 RNA 1 μg 逆转录合成 cDNA 第 1 链,取 cDNA 合成产物 2 μl 作为模板按照以下条件进行扩增反应:94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 45 s, 共 30 个循环。p27kip1: 上游引物 5' - GAG GGC AGA TAC GAG TGG CAG - 3', 下游引物 5' - CTG GAC ACT GCT CCG CTA ACC - 3'; GAPDH: 上游引物 5' - ATG GTG AAG GTC GGT GTG AAC G - 3', 下游引物 5' - GTT GTC ATG GAT GAC CTT GGC C - 3'。取 PCR 产物 10 μL, 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察并摄像。结果用 Bio - Rad 数码凝胶分析系统分析,以 p27kip1 基因与 GAPDH 基因扩增产物电泳带的灰度比值表示 p27kip1 的 mRNA 水平。

**2.3 蛋白印迹法检测蛋白表达** TSA 处理后分别于相应时点提取细胞总蛋白。PBS 洗涤细胞 3 次,每皿加入细胞裂解液 [50 mmol/L Tris - HCl (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 1% NP - 40, 1 mmol/L EDTA, 20 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mmol/L PMSF, 10 g/L aprotinin, 10g/L leupeptin] 150 μL, 冰上静置 15 min, 刮下细胞,12 000 r/min 离心 30 min,取上清,BCA 法测定蛋白浓度。取 30 μg 总蛋白,以 5% 的 SDS - PAGE 积层胶和 12% 分离胶电泳分离,转 PVDF 膜 (Millipore)。5% 的脱脂牛奶封闭 1 h, 分别以抗 p27kip1、skp2 和 GAPDH I 抗 4 °C 冰箱过夜, II 抗常温下孵育 1 h, 化学发光显影系统 (Amershan) 检测。

**2.4 蛋白酶体活性测定** TSA 处理 24 h 后,用 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞,预冷的 PBS 洗细胞 1 次,加入裂解缓冲液 (0.1% Triton X - 100, 0.5 mmol/L DTT) 冰上放置 1 h, 4 °C 下 12 000 r/min

离心 20 min, 收集上清液并 BCA 法蛋白定量。取 10 μg 样品和 10 μL 的 Suc - LLVY - AMC (375 μmol/L), 再加入反应缓冲液使反应体系为 50 μL。37 °C 孵育 30 min, 荧光酶标仪 (激发波长 360 nm, 发射波长 460 nm) 测定游离 AMC 的荧光强度。

## 3 统计学处理

数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (One - way ANOVA)。

## 结 果

### 1 TSA 对 p27kip1 mRNA 水平的影响

如图 1 所示, 10% FBS 刺激对 p27kip1 mRNA 水平无明显影响, 在各个观察时点上, p27kip1 mRNA 水平基本不随时间发生显著的变化。而 100 μg/L TSA 干预也不影响 p27kip1 的 mRNA 表达, 相应时点的 mRNA 水平与单纯 10% FBS 刺激组无显著差别。

### 2 TSA 对 p27kip1 蛋白表达和半衰期的影响

如图 2 所示, 10% FBS 刺激诱导 p27kip1 蛋白下调, 此作用呈时间依赖性, 10% FBS 刺激 16 h 后的 p27kip1 蛋白水平与 0 h 的差异显著, 10% FBS 刺激 24 h 后 p27kip1 蛋白水平进一步下降。而在 100 μg/L TSA 干预组可见, p27kip1 蛋白水平并不因血清刺激而显著减低, 直至 24 h 时, p27kip1 蛋白水平仍保持与 0h 的相近水平, 显著高于单纯 10% FBS 刺激组。

为了测定 p27kip1 蛋白的半衰期, 我们加入了 20 mg/L 亚胺环己酮 (cycloheximide) 阻断蛋白质的重新合成。如图 3 所示, 10% FBS 刺激组 p27 蛋白的半衰期为 8.18 h, 而在 TSA 干预组, p27kip1 的半衰

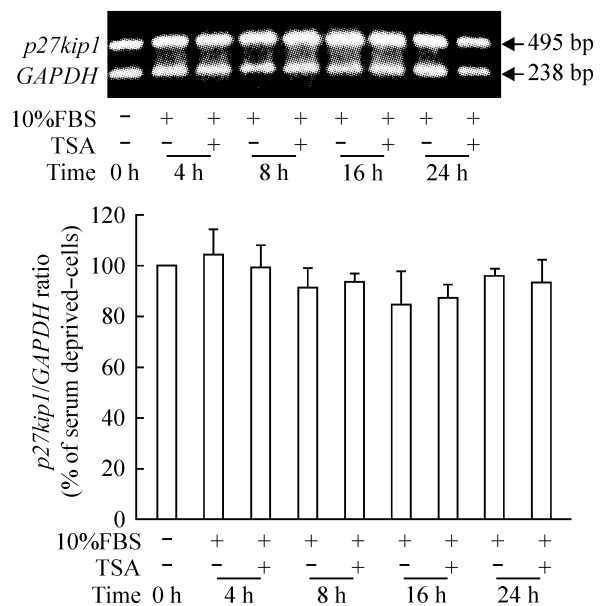


Fig 1 The effect of TSA (100 μg/L) on the level of p27kip1 mRNA.

图 1 100 μg/L TSA 不同时点对 p27kip1 mRNA 影响

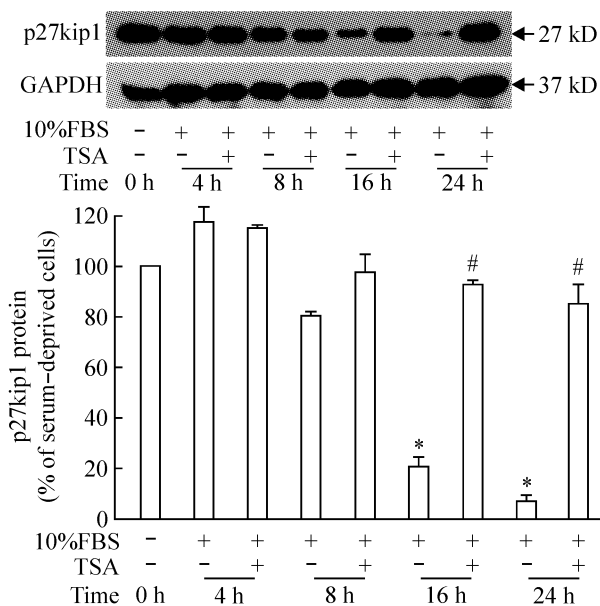


Fig 2 The effect of TSA (100 μg/L) on the level of p27kip1 protein. \*  $P < 0.05$  vs 0 h; #  $P < 0.05$  vs 10% FBS stimulated control.

图2 100 μg/L TSA 不同时间点对 p27kip1 蛋白表达影响

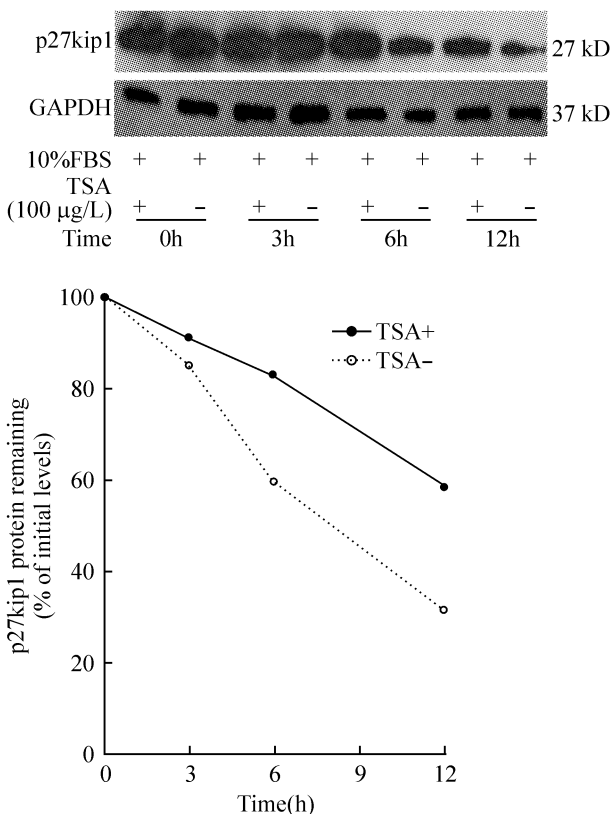


Fig 3 The effect of TSA (100 μg/L) on the half-life of p27kip1 protein.

图3 100 μg/L TSA 对 p27kip1 蛋白半衰期的影响

期显著延长,说明 TSA 对 p27kip1 的调控发生在翻译后的水平上能抑制血清诱导 p27kip1 蛋白质的降解。

### 3 TSA 对 20S 蛋白酶体活性和 skp2 表达的影响

细胞内蛋白质主要通过泛素蛋白酶体系统降解。

泛素修饰酶通过级联反应对目的蛋白进行泛素化修饰,最终由蛋白酶体降解。蛋白酶体由多个亚基组成,其中 20S 核心亚单位负责泛素化蛋白降解。如图 4 所示,10% FBS 激活 20S 亚单位的蛋白酶活性较静止期细胞的蛋白酶体活性显著升高。100 μg/L TSA 干预对 10% FBS 激活蛋白酶体活性的作用无明显影响,提示 TSA 是通过其它途径实现提高蛋白稳定性。

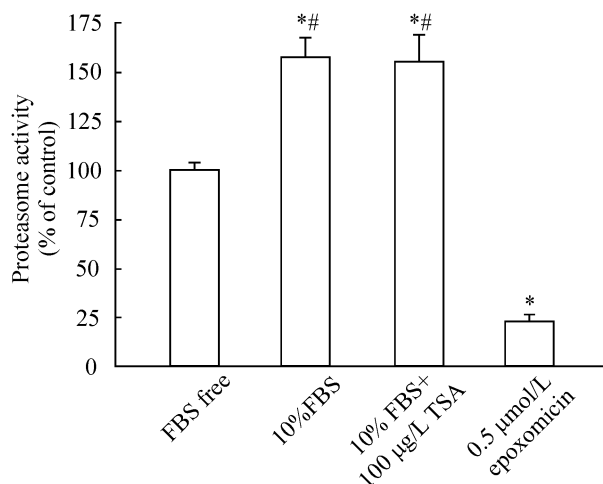


Fig 4 The effect of TSA (100 μg/L) on the activity of 20 S proteasome. \*  $P < 0.05$  vs FBS free control; #  $P < 0.05$  vs positive control (epoxomicin).

图4 100 μg/L TSA 对 20S 蛋白酶体活性的影响

S-phase kinase-associated protein-2 (skp2) 是泛素连接酶 SCFskp 的亚单位,负责特异性识别并结合 p27kip1。如图 5 所示,经血清饥饿 48 h,静止状态下的 VSMCs 几乎不表达 skp2。在 10% FBS 刺激下,

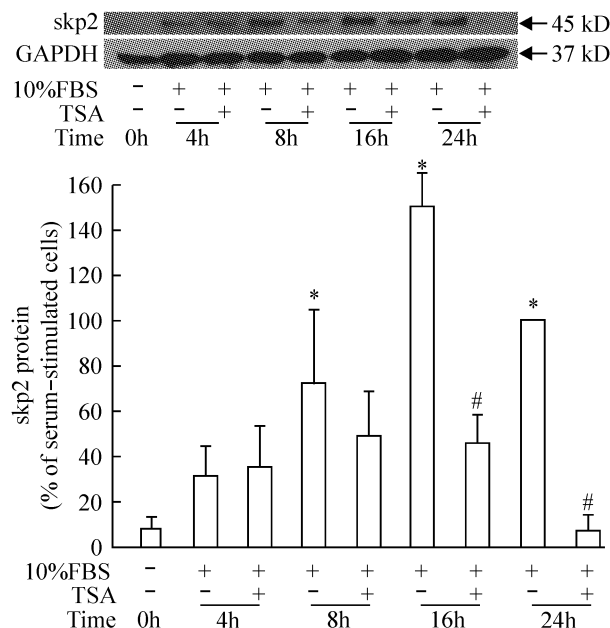


Fig 5 The effect of TSA (100 μg/L) on the level of skp2 protein. \*  $P < 0.05$  vs 0 h; #  $P < 0.05$  vs 10% FBS stimulated control.

图5 100 μg/L TSA 对 skp2 蛋白表达的影响

随着时间的延长,VSMCs内 skp2 的表达上调,与相应时点 p27kip1 蛋白水平呈反相变化。100  $\mu\text{g/L}$  TSA 干预则显著抑制血清上调 skp2 的作用,在相应时点上,skp2 蛋白表达显著低于单纯 10% FBS 刺激组。

### 讨 论

既往对多种肿瘤细胞的研究显示,HDAC 抑制剂通过促进 p27kip1 或 p21waf1 表达抑制细胞增殖<sup>[1]</sup>。近期有报道,HDAC 抑制剂具有抑制 VSMCs 增殖的作用。Okamoto 等<sup>[3]</sup>报道,TSA 显著上调 VSMCs 表达 p21waf1,但是不影响 p27kip1 蛋白的表达。但是,我们的结果提示,TSA 能抑制血清诱导的 p27kip1 蛋白降解。这与 Okamoto 的研究并不矛盾,实际上,在 Okamoto 的研究中,300  $\mu\text{g/L}$  TSA 干预 24 h 和 48 h 时的 p27kip1 蛋白水平与 0 h 相似,这与我们的结果相一致。而本研究显示,p27kip1 蛋白表达随血清刺激时间延长而下调,血清刺激 24 h 时 p27kip1 的表达已几乎检测不到,而此时 TSA 干预组 p27kip1 表达仍保持在与血清刺激前相近的水平,表明 TSA 具有显著抑制血清诱导 p27kip1 下调的作用。HDAC 抑制剂对 p27kip1 和 p21waf1 基因表达的调控机制不同。转录调控对 p21waf1 基因表达起关键作用<sup>[4]</sup>。TSA 能促进 p21waf1 启动子区域组蛋白乙酰化,进而激活 p21waf1 基因转录<sup>[5]</sup>。然而,p27kip1 基因表达调控主要是在翻译和翻译后水平上实现的<sup>[6]</sup>。在本研究中,TSA 不影响 p27kip1 的 mRNA 表达,而在蛋白合成抑制剂亚胺环己酮存在的条件下,较之血清刺激组,TSA 可以使得 p27kip1 蛋白半衰期延长,说明在此过程中无需新蛋白质合成,因此,TSA 并非通过促进 p27kip1 基因转录和翻译上调其表达,而是通过翻译后机制抑制血清诱导 p27kip1 蛋白降解,使 p27kip1 表达维持在与静止期 VSMCs 相似的水平。

细胞内蛋白质主要通过泛素蛋白酶体系统降解,蛋白酶体活性下降和/或泛素修饰酶功能异常都可以导致相应的蛋白质降解减少<sup>[7]</sup>。HDAC 抑制剂是否能直接抑制 20S 蛋白酶体活性还存在争议。TSA 和丁酸钠可以抑制 WI-38 细胞和大肠癌细胞系的 20S 蛋白酶体活性<sup>[8,9]</sup>,但丙戊酸对多发性骨髓瘤细胞的 20S 蛋白酶体活性无影响<sup>[10]</sup>,这可能与不同细胞系特性及药物剂量差异等因素有关。本研究中,100  $\mu\text{g/L}$  TSA 对 20S 蛋白酶体活性无影响,提示 TSA 作用于蛋白酶体上游的某因素使得 p27kip1 蛋白稳定性增加。skp2 是 SCFskp 泛素连接酶的亚单位,负责特异性识别 p27kip1 并将多聚泛素链传递给 p27kip1 蛋白<sup>[11]</sup>。在多种肿瘤组织中均发现 p27kip1 蛋白丰度与 skp2 表达负相关<sup>[6]</sup>。Wu 等<sup>[12]</sup>报道,增殖期 VSMCs 的 skp2 表达上调,而 p27kip1

蛋白下降。采用 RNA 干扰的方法抑制 VSMCs 的 skp2 表达导致 p27kip1 蛋白上调。说明在 VSMCs 中,skp2 是调控 p27kip1 表达的关键因子。我们发现,TSA 抑制血清诱导的 skp2 蛋白上调,且与 p27kip1 蛋白表达呈反相变化,提示 skp2 在 TSA 抑制血清诱导的 p27kip1 降解中起一定的作用。但是,在 TSA 对 VSMCs 的 p27kip1 调控过程中,skp2 是否必需还有待进一步研究。

### [参 考 文 献]

- [1] Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, et al. Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005, 45:495-528.
- [2] 邹琛,周俊,陆国平. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂与细胞周期和凋亡关系的研究进展[J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(12):2487-2490.
- [3] Okamoto H, Fujioka Y, Takahashi A, et al. Trichostatin A, an inhibitor of histone deacetylase, inhibits smooth muscle cell proliferation via induction of p21 (WAF1) [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2006, 13(4):183-191.
- [4] Gartel AL, Tyner AL. Transcriptional regulation of the p21 (WAF1/CIP1) gene [J]. *Exp Cell Res*, 1999, 246(2):280-289.
- [5] Sowa Y, Orita T, Hiranabe - Minamikawa S, et al. Histone deacetylase inhibitor activates the p21/WAF1/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, 886:195-199.
- [6] Blain SW, Scher HI, Cordon - Cardo C, et al. p27 as a target for cancer therapeutics [J]. *Cancer Cell*, 2003, 3(2):111-115.
- [7] Mani A, Gelmann EP. The ubiquitin - proteasome pathway and its role in cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(21):4776-4789.
- [8] Place RF, Noonan EJ, Giardina C. HDACs and the senescent phenotype of WI - 38 cells [J]. *BMC Cell Biol*, 2005, 6:37-48.
- [9] Yin L, Laevsky G, Giardina C. Butyrate suppression of colonocyte NF - kappa B activation and cellular proteasome activity [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(48):44641-44646.
- [10] Kaiser M, Zavrski I, Sterz J, et al. The effects of the histone deacetylase inhibitor valproic acid on cell cycle, growth suppression and apoptosis in multiple myeloma [J]. *Haematologica*, 2006, 91(2):248-251.
- [11] Carrano AC, Eytan E, Hershko A, et al. SKP2 is required for ubiquitin - mediated degradation of the CDK inhibitor p27 [J]. *Nat Cell Biol*, 1999, 1(4):193-199.
- [12] Wu YJ, Bond M, Sala - Newby GB, et al. Altered S - phase kinase - associated protein - 2 levels are a major mediator of cyclic nucleotide - induced inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation [J]. *Circ Res*, 2006, 98(9):1141-1150.