

# 多囊蛋白-1 氨基段融合蛋白对大鼠肾小球系膜细胞周期及其调控基因表达的影响

关天俊 梅长林\* 孙田美 付莉莉 赵海丹<sup>1</sup> 蔡厚安

(第二军医大学附属长征医院肾内科, 解放军肾脏病中心, 上海 200003;

<sup>1</sup>海军总医院肾内科, 北京 100037)

**摘要** 研究多囊蛋白-1 氨基段(PC-1NF)融合蛋白对大鼠肾小球系膜细胞(MC)周期及其调控基因表达的影响。应用 Brdu-ELISA 法检测 PC-1NF 融合蛋白对 MC 增殖的作用, 流式细胞术观察 PC-1NF 融合蛋白对 MC 周期的影响, 实时荧光定量 RT-PCR 方法检测 PC-1NF 融合蛋白对 MC 周期调控基因 cyclin D1、p21<sup>WAF1</sup> 表达的作用。结果表明 PC-1NF 融合蛋白能抑制 MC 增殖, 呈现良好的时效与量效关系; PC-1NF 融合蛋白能影响 MC 周期, 使 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞增加, S 期细胞减少; 4 μg/ml PC-1NF 融合蛋白作用后, cyclin D1 mRNA 水平比对照组明显下调(P<0.05); 而 p21<sup>WAF1</sup> mRNA 水平比对照组显著上调(P<0.01)。PC-1NF 融合蛋白能抑制 MC 增殖及周期的进展, 其机制可能是通过下调 cyclin D1、上调 p21<sup>WAF1</sup> 的表达, 抑制细胞通过 G<sub>1</sub>-S 调控点而介导的。

**关键词** 常染色体显性多囊肾病; 多囊蛋白-1; 系膜细胞; 细胞周期

常染色体显性多囊肾病(autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD)是最常见的遗传性肾脏疾病, 约占终末期肾衰病因的 5%~10%。研究发现, 85%~90% 的 ADPKD 发生是由多囊肾病 1 基因(PKD1)的编码产物多囊蛋白 1 (polycystin-1, PC-1)的结构和功能异常所致<sup>[1,2]</sup>。PC-1 是一个分子量约 460 kDa 的跨膜糖蛋白, 由 1 个氨基端胞外区、11 个跨膜区和 1 个短的羧基端的胞浆尾组成<sup>[3]</sup>。PC-1 胞外区所拥有的众多复杂的蛋白质模体决定了它的胞外部分对其行使正常的生理功能非常重要<sup>[4]</sup>。近年来, PC-1 的结构研究取得长足进步, 但功能研究刚刚起步。国外报道 PC-1 能抑制肾小管上皮细胞增殖和囊肿形成<sup>[5,6]</sup>。我们前期应用基因工程方法成功合成了 PC-1 氨基段(PC-1NF)特征性的 LRR-WSC 区融合蛋白, 该肽段对应于 PC-1 胞外区的第 47~202 位氨基酸残基, 相对分子质量为 18.9 kDa<sup>[7]</sup>, 本实验观察该融合蛋白对大鼠肾小球系膜细胞(MC)增殖、周期及其调控基因表达的影响, 旨在部分阐明 PC-1 的功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大鼠肾小球系膜细胞株由本科实验室建立<sup>[8]</sup>,

PC-1NF 融合蛋白由本实验室合成, DMEM、F12 培养液为 Gibco 公司产品, 新生小牛血清为杭州四季青公司产品, 5-溴-2-脱氧尿苷酶联免疫吸附测定(Brdu-ELISA)试剂盒为 Roche 公司产品, SYBR Green I 为 Bio-Rad 公司产品, 逆转录酶、RNasin 为 Invitrogen 公司产品, 荧光定量 PCR 检测试剂盒为日本 TaKaRa 公司产品, PCR 引物由上海生工公司合成, 其他试剂均为 Sigma 公司产品及进口分析纯。仪器有: 酶标仪(美国 Labsystems MK3), 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad iCycler), 流式细胞仪(美国 Epics XL, Coulter)。

### 1.2 方法

**1.2.1 PC-1NF 融合蛋白对 MC 增殖的影响** 应用 Brdu-Elisa 试剂盒测定细胞增殖。细胞传代后取对数生长期 MC 接种于 96 孔板(1×10<sup>4</sup> 个/孔), 用含 10% 小牛血清的 DMEM+F12 培养液温育 24 h(37 °C, 5%CO<sub>2</sub>)后, 换无血清 DMEM+F12 培养液再温育 24 h, 使细胞生长同步进入休止期。弃上清液, 加入

收稿日期: 2005-08-05 接受日期: 2005-09-27

国家高技术研究发展计划(863 计划)(No.2002AA2Z3130)、国家自然科学基金(No.30330640, No.30170901, No.30271523)及上海市科委重大基础研究项目基金(No.02JC14029)资助

\* 通讯作者。Tel: 021-63521416, Fax: 021-63521416, E-mail: chlmei@public1.sta.net.cn

含不同浓度 PC-1NF 融合蛋白(0、0.5、1、2、4  $\mu\text{g/ml}$ )的无血清 DMEM+F12 培养液分别作用 24、48、72 及 96 h, 每组设 6 个复孔, 每次实验重复 3 次。经锥虫蓝染色, 活细胞达 95% 以上。按照试剂盒说明, 每孔加入 110  $\mu\text{mol/L}$  的 Brdu 标记溶液温育 6 h(37  $^{\circ}\text{C}$ , 5% $\text{CO}_2$ ), 清洗后固定(-20  $^{\circ}\text{C}$ , 30 min), 核酸酶充分裂解 DNA 后加入抗 Brdu 单克隆抗体(37  $^{\circ}\text{C}$ , 30 min), 最后加入反应底物充分显色, 酶标仪参考波长 492 nm, 读数波长 405 nm 处读取光密度值。实验重复 3 次。细胞增殖抑制率=(对照组 A 值-PC-1NF 融合蛋白组 A 值)/对照组 A 值 $\times 100\%$ , 式中 A 值为波长 405 nm 及 492 nm 处光密度值之比。

**1.2.2 流式细胞仪观察 PC-1NF 融合蛋白对大鼠 MC 细胞周期的影响** 取对数生长期 MC 接种于 6 孔板, 细胞生长至 70% 融合时, 用含不同浓度 PC-1NF 融合蛋白(0、0.5、1、2、4  $\mu\text{g/ml}$ )的无血清 DMEM+F12 培养液作用 48 h(37  $^{\circ}\text{C}$ , 5% $\text{CO}_2$ )后, 胰蛋白酶消化, PBS 清洗, 70% 预冷乙醇悬浮固定细胞, -20  $^{\circ}\text{C}$  过夜。加入等量 PBS 再洗 2 遍, 碘化丙啶避光显色, 流式细胞仪检测, MCYCLE 软件分析细胞周期。增殖指数 PI(%)按下式计算:  $\text{PI}(\%) = (\text{S} + \text{G}_2/\text{M}) / (\text{G}_0/\text{G}_1 + \text{S} + \text{G}_2/\text{M}) \times 100\%$ 。

**1.2.3 细胞周期调控基因 cyclin D1、p21<sup>WAF1</sup> mRNA 的检测** 取对数生长期 MC 接种于 6 孔板, 细胞生长至 70% 融合时, 用含 4  $\mu\text{g/ml}$  PC-1NF 融合蛋白的无血清 DMEM+F12 培养液作用 48 h (37  $^{\circ}\text{C}$ , 5% $\text{CO}_2$ ), 0.25% 胰蛋白酶消化后收集细胞。加入 1 ml Trizol 裂解, 200  $\mu\text{l}$  氯仿抽提细胞 RNA, 1% 甲醛琼脂糖凝胶电泳及分光光度计鉴定 RNA 质量。去除基因组 DNA 后进行逆转录, 反应体系 20  $\mu\text{l}$ , 含 2  $\mu\text{g}$  RNA、20 U RNasin、100 U SSII、4  $\mu\text{l}$  5 $\times 1^{\text{st}}$  strand buffer、0.5  $\mu\text{mol/L}$  引物、1  $\mu\text{l}$  10 mmol/L dNTP, 混匀, 25  $^{\circ}\text{C}$  温浴 10 min, 42  $^{\circ}\text{C}$  温浴 1 h, 52  $^{\circ}\text{C}$  温浴 15 min, 70  $^{\circ}\text{C}$  终止反应 15 min。荧光定量 PCR 为 25  $\mu\text{l}$  反应体系, 含 1.0  $\mu\text{l}$  cDNA、2.5  $\mu\text{l}$  10 $\times$ buffer、0.3  $\mu\text{l}$  250 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$ 、0.3  $\mu\text{l}$  25 mmol/L dAGCU、1.0  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{mol/L}$  有义、反义

引物、0.8  $\mu\text{l}$  25 $\times$ SYBR green I, 1.0  $\mu\text{l}$  10 $^3\times$  调校液、1.25 U *Taq* 酶、0.4 U UNG。反应条件为: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 90 s, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 15 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 20 s, 5 个循环后, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 共 40 个循环, 每次循环后于 60  $^{\circ}\text{C}$  收集荧光信号。制作熔解曲线的循环程序为: 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 之后每 10 s 增加 0.5  $^{\circ}\text{C}$ /循环, 共 80 个循环。GAPDH 为看家基因, 以相对于每百万看家基因的拷贝数作为目的基因的相对含量。每组重复 3 次, 进行 *t* 检验统计学分析。所用引物序列见表 1。

#### 1.4 统计学处理

所有结果用( $\bar{x} \pm s$ )表示, 数据分析采用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 PC-1NF 融合蛋白对 MC 增殖的影响

在所用浓度范围内, PC-1NF 融合蛋白对 MC 均无明显毒副作用。Brdu-ELISA 检测发现 4  $\mu\text{g/ml}$  PC-1NF 融合蛋白作用 24 h 即能够有效抑制 MC 增殖, 与对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 其抑制作用随时间延长而加强, 96 h 达到高峰。不同浓度 PC-1NF 融合蛋白作用 96 h 都能够明显抑制 MC 增殖, 与对照组及相同浓度 24 h、48 h 和 72 h 相比, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ), 而且抑制作用随着浓度增加而增强, 4  $\mu\text{g/ml}$  PC-1NF 融合蛋白对细胞增殖抑制率可达 61.3%。见表 2、图 1、图 2。

### 2.2 PC-1NF 融合蛋白对 MC 周期与增殖指数的影响

流式细胞仪检测表明, PC-1NF 融合蛋白作用 48 h 后, 随着 PC-1NF 融合蛋白浓度增加, S+G<sub>2</sub>/M 细胞逐渐减少, 细胞逐渐停滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期, 增殖指数逐渐降低, 见表 3。

### 2.3 PC-1NF 融合蛋白对 MC 周期调控基因 cyclin D1、p21<sup>WAF1</sup> 表达的影响

实时荧光定量 PCR 检测发现, PC-1NF 融合蛋白作用 48 h 后, 细胞周期调控基因 cyclin D1 的 mRNA 水平显著下调, 与对照组相比差异有统计

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

基因	引物序列	
	有义	反义
cyclin D1	5'-GATGCTGGAGGTCTGCGAGGAA-3'	5'-AGAGGCCACGAACATGCAAGT-3'
p21 <sup>WAF1</sup>	5'-ATGAGTTGGGAGGAGGCAGG-3'	5'-CGGCGTTTGGAGTGGTAGAA-3'
GAPDH	5'-GGTATCGTGAAGAAGTCAATGAC-3'	5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAC-3'

表2 不同浓度PC-1NF融合蛋白在不同时间对MC增殖指数(PI)的影响

PC-1NF 融合蛋白 浓度(μg/ml)	时间(h)			
	24	48	72	96
0	0.29±0.02	0.36±0.02	0.58±0.03	1.06±0.12
0.5	0.28±0.03	0.33±0.05	0.53±0.03	0.89±0.04 <sup>a,c</sup>
1	0.27±0.02	0.32±0.04	0.49±0.04	0.81±0.04 <sup>b,c</sup>
2	0.26±0.04	0.28±0.04	0.42±0.03	0.65±0.05 <sup>b,c</sup>
4	0.21±0.02 <sup>b</sup>	0.23±0.02 <sup>b,c</sup>	0.24±0.04 <sup>b,c</sup>	0.41±0.05 <sup>b,c</sup>

与阴性对照组相比, <sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01; 与24 h、48 h和72 h同浓度相比, <sup>c</sup>*P*<0.01。

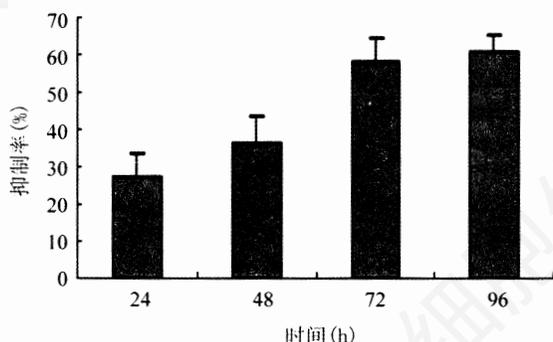


图1 4 μg/ml PC-1NF 融合蛋白在不同作用时间对MC增殖的抑制率

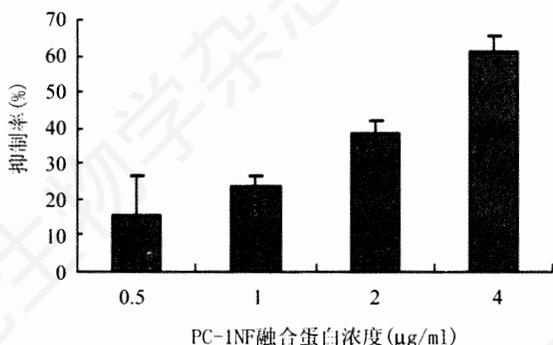


图2 不同浓度PC-1NF融合蛋白作用96 h对MC增殖的抑制率

学意义(*P*<0.05); 而p21<sup>WAF1</sup>的mRNA水平显著上调, 与对照组相比差异亦有统计学意义(*P*<0.01), 见表4。

### 3 讨论

PC-1 功能仍未阐明。以往研究表明, PC-1 是一种膜受体, 主要介导细胞-细胞和细胞-基质之间的相互作用。PC-1 的结构与功能异常引起肾小管上皮细胞增生、囊腔内液体积聚及细胞外基质重建, 最终导致肾囊肿形成及增大<sup>[9]</sup>。迄今未见全长PC-1 功能研究的报道, 主要原因是PC-1 的cDNA达14 kb, 难以在细胞表达<sup>[5]</sup>。Boletta等<sup>[5]</sup>报道, 在MDCK

表3 不同浓度PC-1NF融合蛋白对MC周期与增殖指数的影响

PC-1NF 融合蛋白浓度(μg/ml)	细胞周期比例(%)			PI(%)
	G <sub>0</sub> -G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub> -M	S	
0	27.1±2.1	28.8±2.0	44.1±6.7	72.9
1	31.2±3.4	27.1±3.0	41.7±2.8	68.8
2	36.5±1.6 <sup>a</sup>	26.8±2.1	36.6±1.8 <sup>a</sup>	63.4
4	42.0±2.3 <sup>b</sup>	26.4±1.8	31.6±4.5 <sup>b</sup>	58.0

与对照组相比, <sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01。

表4 4 μg/ml PC-1NF融合蛋白作用48 h对MC周期调控基因表达的影响(拷贝/百万GAPDH)

基因	对照组	PC-1NF融合蛋白组
cyclin D1	(4.10±0.32)×10 <sup>4</sup>	(2.44±0.27)×10 <sup>4</sup> <sup>a</sup>
p21 <sup>WAF1</sup>	(0.85±0.18)×10 <sup>2</sup>	(3.73±0.46)×10 <sup>2</sup> <sup>b</sup>

与对照组相比, <sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01。

细胞中表达PC-1能抑制细胞增殖和囊肿形成; Malhas等<sup>[6]</sup>报道, PC-1胞外段的LRR融合蛋白能抑制人胚肾上皮细胞的增殖。上述结果提示, PC-1具有抑制肾小管细胞增殖的作用。本研究发现, 微克水平的PC-1NF融合蛋白能明显抑制MC增殖, 呈现良好的时效与量效关系, 提示PC-1NF不仅能抑制肾小管细胞增殖, 也能抑制系膜细胞增殖。系膜增生性肾小球肾炎(mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN)是一种肾脏病理表现为弥漫性肾小球系膜细胞增生, 伴有不同程度的细胞外基质增加的肾小球疾病。MsPGN是我国最常见的原发性肾小球肾炎, 发病率占接受肾活检病人的50%左右<sup>[10]</sup>, 10%~40%的MsPGN患者于诊断20年内逐渐发展到终末期肾衰。但迄今为止, 尚缺乏有效的治疗药物。本研究将为未来应用电子计算机辅助药物设计(computer assisted drug design, CADD)合成小分子化合物, 治疗MsPGN打下基础。

细胞增殖是由多个水平调节的, 细胞最终必须进入细胞周期才能增殖。已发现G<sub>1</sub>期后期存在一个限制点(restriction point, R点), 细胞周期越过R点后细胞就不再依赖于细胞外促生长因子而完成整个周期, 所以G<sub>1</sub>期是细胞周期的关键和限速阶段<sup>[11]</sup>。

本研究发现, 随着 PC-1NF 融合蛋白浓度增加, S+G<sub>2</sub>/M 细胞逐渐减少, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞逐渐增多, 提示 PC-1NF 融合蛋白抑制 MC 增殖的作用与 G<sub>1</sub> 期停滞有关。

细胞周期的完成有赖于正性、负性周期调控蛋白之间的平衡。细胞周期的正调控蛋白包括周期蛋白(cyclin)和周期蛋白依赖的激酶(CDK), 两者形成复合物才有活性, cyclin D1 是主要的 G<sub>1</sub> 期正调控蛋白, 它与 CDK4、CDK6 结合成全酶, 与底物视网膜成纤维细胞瘤蛋白(PBb)结合, 并使其磷酸化, 使 G<sub>1</sub> 期进入 S 期。p21<sup>WAF1</sup> 是主要的细胞周期负调控蛋白之一, 它通过抑制 cyclin-CDK 的磷酸化激酶活性, 阻止细胞周期进展<sup>[12]</sup>。本研究发现, 4 μg/ml PC-1NF 融合蛋白作用后, cyclin D1 mRNA 水平明显降低而 p21<sup>WAF1</sup> mRNA 水平显著增高, 提示 PC-1NF 融合蛋白可能是通过抑制 cyclin D1、促

进 p21<sup>WAF1</sup> 的表达, 抑制细胞通过 G<sub>1</sub>-S 调控点, 从而抑制细胞增殖。本研究发现 PC-1NF 融合蛋白对 MC 增殖有抑制作用, 其作用机制可能与上调细胞周期调控基因 p21<sup>WAF1</sup>、下调 cyclin D1 表达, 使细胞周期停滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期有关。

#### 参考文献 (References)

- [1] Murcia NS *et al.* *Kidney Int.* 1999, **55**: 1187
- [2] Igarashi P *et al.* *J Am Soc Nephrol.* 2002, **13**: 2384
- [3] Grantham JJ. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2001, **10**: 533
- [4] Wilson PD. *J Am Soc Nephrol.* 2001, **12**: 834
- [5] Boletta A *et al.* *Mol Cell.* 2000, **6**: 1267
- [6] Malhas AN *et al.* *J Am Soc Nephrol.* 2002, **13**: 19
- [7] 赵海丹等. *第二军医大学学报.* 2003, **24**: 25
- [8] 梅长林等. *肾脏病与透析肾移植杂志.* 1996, **5**: 90
- [9] Lakkis M *et al.* *Nephron Exp Nephrol.* 2003, **93**: e3
- [10] Li LS *et al.* *Kidney Int.* 2004, **66**: 920
- [11] Pardee AB. *Science.* 1989, **246**: 603
- [12] Sherr CJ. *Cell.* 1993, **73**: 1059

## Effect of N-terminal Fragment Fusion Protein of Polycystin-1 on Cell Cycle and Its Regulatory Gene in Rat Mesangial Cell

Tian-Jun Guan, Chang-Lin Mei\*, Tian-Mei Sun, Li-Li Fu, Hai-Dan Zhao<sup>1</sup>, Hou-An Cai

(Department of Nephrology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China;

<sup>1</sup>Division of Nephrology, Beijing Sea Army Hospital, Beijing 100037, China)

**Abstract** To investigate the effect of N-terminal fragment (LRR-WSC) fusion protein of polycystin-1 (PC-1NF) on cell cycle and its regulatory gene in rat mesangial cell and explore its mechanism. Rat mesangial cells were treated with serial concentration of PC-1NF *in vitro*. The proliferation of rat mesangial cells was measured by Brdu-ELISA. Cell cycle was analyzed by flow cytometry. The mRNA expression of cell cycle regulatory gene cyclin D1 and p21<sup>WAF1</sup> was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. Micro-gram per milliliter of PC-1NF could effectively inhibit the proliferation of mesangial cells with dose- and time-dependent correlation to some extent, and cause G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase arrest. After treatment with 4 μg/ml PC-1NF, the mRNA level of cyclin D1 was significantly decreased [(2.44±0.27)×10<sup>4</sup> copies per million GAPDH] compared with that in the control [(4.10±0.32)×10<sup>4</sup> copies per million GAPDH]. However, the mRNA level of p21<sup>WAF1</sup> was significantly increased [(3.73±0.46)×10<sup>2</sup> copies per million GAPDH] compared with that in the control [(0.85±0.18)×10<sup>2</sup> copies per million GAPDH]. N-terminal fragment fusion protein of polycystin-1 could effectively inhibit mesangial cell proliferation. The effect could be mediated by down-regulated cyclin D1 and up-regulated p21<sup>WAF1</sup> mRNA expression, subsequently blocking cells passing through G<sub>1</sub>-S checkpoint.

**Key words** autosomal dominant polycystic kidney disease; polycystin-1; mesangial cell; cell cycle

Received: August 5, 2005 Accepted: September 27, 2005

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2002AAZZ3130), the National Natural Science Foundation of China (No.30330640, No.30170901, No.30271523) and the Major Basic Science Research Foundation of Shanghai Municipal Science and Technology Commission (No.02JC14029)

\*Corresponding author. Tel: 86-21-63521416, Fax: 86-21-63521416, E-mail: chlmei@public1.sta.net.cn