

# p21 和 p27 在兔晶状体上皮细胞中的表达

王晓辉, 谢茂松, 徐国兴

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 81070715); 福建医科大学苗圃科研基金 (No. 2010MP014)

作者单位: (350005) 中国福建省福州市, 福建医科大学附属第一医院眼科

作者简介: 王晓辉, 硕士, 主治医师, 研究方向: 白内障、干眼症。  
通讯作者: 徐国兴, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 玻璃体视网膜病。fjmutexguoxing@hotmail.com

收稿日期: 2012-06-27 修回日期: 2012-08-02

## Expression of p21 and p27 in rabbit lens epithelial cells

Xiao-Hui Wang, Mao-Song Xie, Guo-Xing Xu

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81070715); Scientific Research Foundation of Fujian Medical University, China (No. 2010MP014)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China

Correspondence to: Guo-Xing Xu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China. fjmutexguoxing@hotmail.com

Received: 2012-06-27 Accepted: 2012-08-02

### Abstract

• AIM: To investigate the expression of cyclin dependent kinase inhibitors p21 and p27 in different ages of rabbit lens epithelial cells (LEC).

• METHODS: p21 and p27 in lens anterior capsule membranes in 10, 20 and 30 weeks old rabbits were measured by RT-PCR and Western blot in levels of mRNA and protein.

• RESULTS: p21 in rabbit lens anterior capsule membranes had similar expression with p27 in levels of mRNA and protein. Their expressions were highest in youth rabbits, while lowest in middle aged rabbits. The differences of both p21 and p27 among different ages of rabbit LEC were significant ( $P < 0.05$ ).

• CONCLUSION: p21 and p27 may play a balancing role in the process of cycle regulation in rabbit LEC, which provides a reference for researches related to prevent posterior capsular opacification (PCO).

• KEYWORDS: cell cycle; inhibitor; lens epithelial cell; posterior capsular opacification

Citation: Wang XH, Xie MS, Xu GX. Expression of p21 and p27 in rabbit lens epithelial cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012; 12(9):1629-1632

### 摘要

目的: 研究细胞周期蛋白激酶抑制因子 p21 和 p27 蛋白在不同年龄段兔晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 中的表达规律。

方法: 分别取 10, 20, 30 周龄兔晶状体前囊膜组织, 采用 RT-PCR 和 Western-blot 检测该组织中 p21 和 p27 的 mRNA 水平和蛋白水平。

结果: 兔晶状体前囊膜组织中 p21 与 p27 的 mRNA 水平和蛋白水平相似, 青年最高, 老年次之, 中年最低。p21 和 p27 在青年、中年及老年兔 LECs 中的表达水平有差异 ( $P < 0.05$ )。

结论: p21 和 p27 在兔 LECs 周期调控过程中可能起着平衡作用, 对防止 PCO 的研究具有一定参考价值。

关键词: 细胞周期; 抑制因子; 晶状体上皮细胞; 后囊膜混浊

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.09.06

引用: 王晓辉, 谢茂松, 徐国兴. p21 和 p27 在兔晶状体上皮细胞中的表达. *国际眼科杂志* 2012; 12(9):1629-1632

### 0 引言

后囊膜混浊 (posterior capsular opacification, PCO) 是白内障手术后最常见的并发症之一, 即后发性白内障, 主要是由术后残留的晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 过度增殖所致<sup>[1]</sup>。因此, 抑制 LEC 增殖可能成为预防 PCO 的途径之一。细胞周期调控是一个极其复杂的过程, 最近细胞周期调控理论认为其核心机制是细胞周期蛋白激酶 (cyclin dependent kinase, CDK) 和细胞周期素 (cyclin) 的正调控和 CDK 依赖性抑制因子 (cyclin-dependent kinase inhibitors, CKI) 的负调控共同作用<sup>[2-4]</sup>, 使其处于一种动态平衡。p21 基因是早期发现的 CKI 基因之一, p27 基因是 1994 年发现的细胞周期调控的抑癌基因, 其表达产物 KIP1 是一种广谱的细胞周期素依赖性激酶抑制因子 (CDKIS)<sup>[5-7]</sup>。本研究的目的是测定不同年龄段兔 LECs 中 p21 和 p27 的表达, 讨论 p21 和 p27 在不同年龄段兔 LECs 的表达规律。

### 1 材料和方法

1.1 材料 健康新西兰兔 9 只, 其中 10, 20, 30 周龄 (青年、中年、老年) 各 3 只, 均为雄性, 均购自上海市松江区松联实验动物场 (合格证编号: 2007001100659); 青年组兔体质量 0.8 ~ 1.2 kg, 中年组兔体质量 1.4 ~ 1.6 kg, 老年组兔体质量 1.9 ~ 2.2 kg, 实验前行裂隙灯检查, 排除眼部异常; 实验动物的使用符合国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。主要试剂: 鼠抗兔 p21 单克隆抗体 (Abcam 公司), 鼠抗兔 p27 单克隆抗体 (Bioworld 公司), 鼠抗兔 GAPDH 单克隆抗体 (Santa Cruz 公司); 羊抗鼠

HRP 标记二抗(北京中杉金桥公司);RIPA 裂解液、BCA 法蛋白定量试剂盒和 UltraECL 底物化学发光检测试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司);荧光定量试剂盒(大连 TAKARA 公司);逆转录试剂盒(Fermentas 公司);Trizol (Invitrogen 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 取材** 青年组、中年组、老年组新西兰兔各 3 只,均采用空气栓塞处死,立即取出双眼球,将晶状体前囊膜连同赤道部囊膜撕下,每只兔的左眼行 RT-PCR 检测 p21 和 p27 mRNA 的含量,右眼行 Western-blot 检测 p21 和 p27 蛋白的表达。

**1.2.2 RNA 提取及 cDNA 合成** 晶状体前囊膜组织总 RNA 提取按 Trizol 提取说明书操作;cDNA 合成按逆转录试剂盒说明操作。

**1.2.3 RT-PCR 检测 p21 和 p27 mRNA 的含量** 各引物序列参照 GenBank 中的序列,用 primer 5.0 软件设计而成,具体序列见表 1。反应体系(共 25 $\mu$ L):2 $\times$ SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 12.5 $\mu$ L,上下游引物各 0.5 $\mu$ L,DNA 模板 2.0 $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 9.5 $\mu$ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 30s;95 $^{\circ}$ C 5s,60 $^{\circ}$ C 30s,循环 40 次;95 $^{\circ}$ C 15s,60 $^{\circ}$ C 30s,95 $^{\circ}$ C 15s。扩增完成后进行融解曲线分析,并观察其是否为单峰曲线。分别测定老年、中年和青年组兔晶状体前囊膜组织中 p21 和 p27 mRNA 的相对含量。

**1.2.4 Western-blot 检测 p21 和 p27 蛋白的表达** 晶状体前囊膜组织放入液氮冷冻(-196 $^{\circ}$ C)后研磨,取样品处理液进行 SDS-PAGE 电泳、转膜,用含 50g/L 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 1h。洗膜后将封闭后的 PVDF 膜与一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,一抗为鼠抗兔 GAPDH 和 p21 及 p27 单克隆抗体(1:1000)。洗膜后在室温条件下与二抗孵育 1h,二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体(1:5000)。洗膜后加入免疫印迹化学发光试剂(ECL),显影、洗片、晾干。用凝胶图像分析仪扫描照片,然后用四星图像处理系统测定各组特异性蛋白表达量(条带灰度值)与内参(GAPDH)表达量的比值,以此比值作为各自表达水平的参数。

**统计学分析:**采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理,计量资料采用  $\bar{x}\pm s$  表示。青年、中年和老年各组间均数的差异分析采用单因素方差分析和各组间均数的两两对比(LSD-*t*法);p21 与 p27 间的相关性采用 Pearson 相关分析,以  $P<0.05$  作为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 兔晶状体 p21 和 p27 mRNA 水平检测** 采用 RT-PCR 分别对 9 只青年、中年和老年新西兰兔 LECs 中 p21 和 p27 mRNA 水平进行了检测,实验结果发现青年、中年和老年新西兰兔晶状体上皮细胞中 p21 和 p27 mRNA 水平均为青年表达最高,老年次之,中年最低,组间差异具有统计学意义(p21:  $F=39.897, P<0.01$ ;p27:  $F=156.596, P<0.01$ ;图 1,2)。p21:中年与青年比较, $P=0.012$ ;老年与中年比较, $P=0.006$ ;青年与老年比较, $P=0.022$ 。p27:中年与青年比较, $P=0.017$ ;老年与中年比较, $P=0.004$ ;青年与老年比较, $P=0.013$ 。p21 和 p27 mRNA 表达的相关分析: $r=0.979, P<0.01$ 。

表 1 GAPDH 和 p21 及 p27 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
GAPDH	上游引物:AGCACCAGAGGAGGACGAGA
	下游引物:TCTGGGATGGAAACTGTGAAGA
p21	上游引物:CGGAACGGCCTGAGGACT
	下游引物:GACGAGTCGGCGTTTGA
p27	上游引物:AGAAGCACTGCAGAGACATGGA
	下游引物:CTGTTGGCTCTTTTCTTTTGAGG

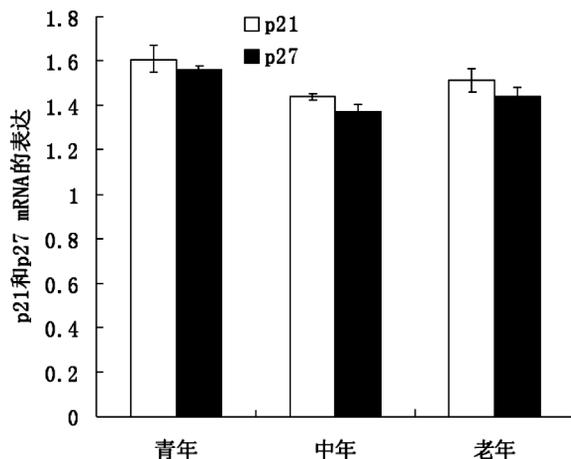


图 1 不同周龄组兔 LECs 中 p21 和 p27 mRNA 的表达水平。

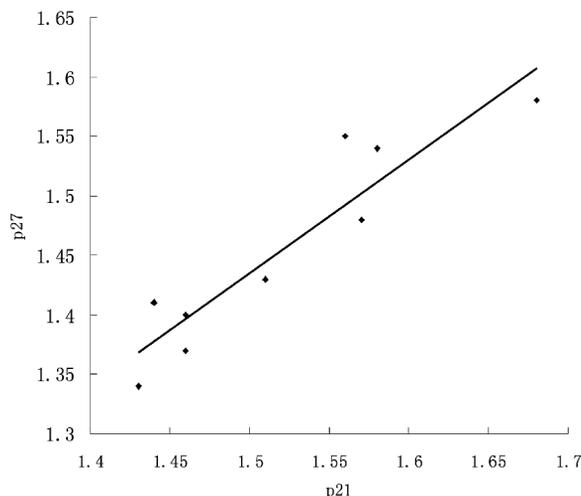


图 2 兔 LECs 中 p21 和 p27 mRNA 表达的相关分析。

**2.2 兔晶状体 p21 和 p27 蛋白水平检测** 采用 Western-blot 分别对青年、中年和老年新西兰兔 LECs 中 p21 和 p27 蛋白水平进行了检测,实验结果发现青年、中年和老年新西兰兔 LECs 中 p21 和 p27 蛋白水平为青年表达最高,老年次之,中年最低,组间差异具有统计学意义(p21:  $F=126.441, P<0.01$ ;p27:  $F=196.354, P<0.01$ ;图 3~5)。p21:中年与青年比较, $P=0.021$ ;老年与中年比较, $P=0.014$ ;青年与老年比较, $P=0.002$ 。p27:中年与青年比较, $P<0.001$ ;老年与中年比较, $P=0.008$ ;青年与老年比较, $P=0.010$ 。p21 和 p27 蛋白表达的相关分析  $r=0.994, P<0.01$ 。

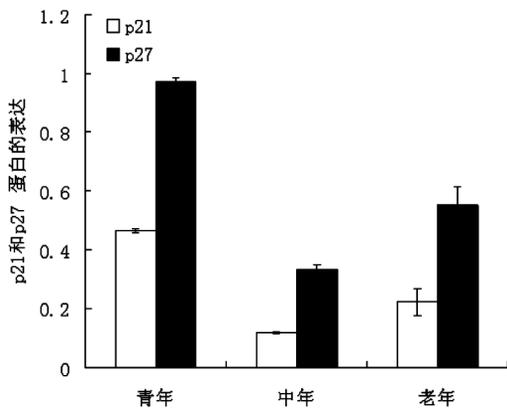


图3 不同年龄组兔 LECs 中 p21 和 p27 蛋白表达水平。

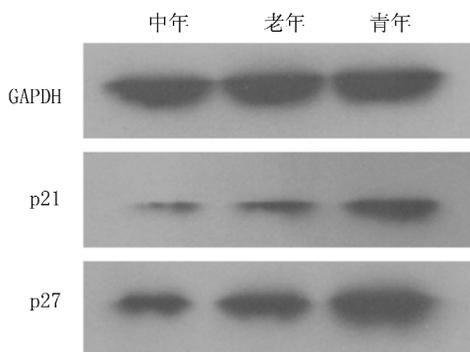


图4 Western-blot 检测不同周龄组兔 LECs 中 p21 和 p27 蛋白的表达。

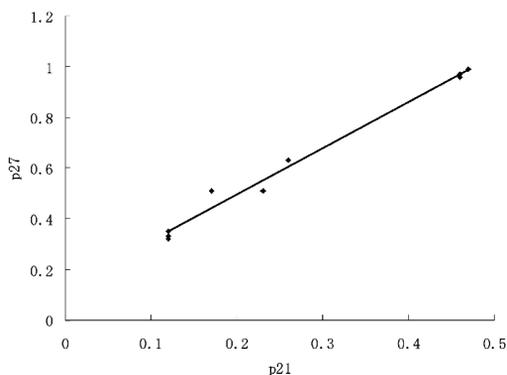


图5 兔 LECs 中 p21 和 p27 蛋白表达的相关分析。

### 3 讨论

PCO 的病理基础是白内障手术后残留的 LEC 过度增殖、向晶状体后囊膜延伸,并分泌胶原和基底膜样物质所致<sup>[1]</sup>。目前,治疗上多采用手术或激光行晶状体后囊膜切开术,暂无预防 PCO 发生的理想方法。

细胞周期调控相关研究表明,在细胞周期调控过程中,CDK 与 Cyclin 结合成复合物,推动细胞周期进程,起着正调控作用;而 CDK 的抑制因子 CKI 在细胞周期调控过程中起着负调控作用<sup>[2-4]</sup>。p21 基因属 CIP 家族成员,它位于 p53 基因下游,是一种 CDKIS。p21 可结合并抑制几乎每一个 Cyclin2CDK 复合物, p21 可以通过抑制 CyclinD12CDK4 和 CyclinE2CDK2 的活性,从而使 Rb 蛋白无法进行磷酸化反应,导致细胞周期停滞在 G<sub>1</sub> 期<sup>[8]</sup>。p27 的分子量约为 27 000,它是一种 CKI,它抑制 CDK 的活性,

进而阻断细胞的增殖。p27 几乎在各种组织均有表达,通常出现在非增生性细胞中,定位于细胞核。细胞周期中,细胞静止期 p27 蛋白水平最高,随着促有丝分裂原的刺激后水平降低,当 DNA 合成逐步达到最高点, p27 蛋白也下降到最低点,当细胞周期完成后, p27 开始重新聚积,细胞再次进入静止期, p21 及 p27 同属细胞周期抑制蛋白,他们在氨基末端的结构及功能都有高度相似性,都有一个保守的 80 个氨基酸序列<sup>[9]</sup>。这些 Cyclin, CDK 和 CKI 通过相互作用、相互制约,形成一个动态平衡的细胞周期调控系统。因此, p21 和 p27 及与其相关的 Cyclin 和 CDK 表达的失衡,可能会引起细胞的增殖或生长抑制<sup>[10]</sup>。

我们的研究显示,不仅在各年龄组的兔 LECs 中均有 p21 和 p27 的表达,而且随着年龄的变化, p21 和 p27 的表达水平也呈现一定的变化规律。青年组兔 LECs 中 p21 和 p27 表达量最高,中年组兔 LECs 中 p21 和 p27 表达量最低。老年组 LECs 中 p21 和 p27 表达介于两者之间。可能是因为青年兔 LECs 增殖相对活跃, p21 和 p27 含量升高以抑制细胞过度增殖;中年兔 LECs 增殖较慢, p21 和 p27 含量随之下降以减少对细胞的抑制作用。白内障的病理学研究显示,伴随着赤道部或后皮质的退行性变,老年人晶状体赤道部上皮细胞发生向后移行、增殖,形成囊细胞,导致后囊下型白内障的发生<sup>[11]</sup>,这说明年老后 LECs 在各种原因的作用下,其增殖又相对活跃,这也能解释在本研究中,老年组兔 LECs 中 p21 和 p27 表达水平较中年组又呈升高的趋势。然而, p21 和 p27 如何影响和抑制 LECs 的增殖尚不明确。研究表明,增殖细胞核抗原 (Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA) 是真核细胞 DNA 聚合酶  $\delta$  活化时不可缺少的辅助因子,在静止细胞中其含量较少,而到细胞周期的 S 期达到高峰; PCNA 的含量与细胞周期运行速度成正比,因此它与细胞增殖密切相关,是反映细胞增殖状态的良好指标<sup>[12]</sup>。有研究表明,当多层上皮细胞形成时, p21 的表达量明显升高,而且在多层上皮细胞中绝大多数 LECs 都是 PCNA 阳性,证明 LECs 已被激活<sup>[13]</sup>。研究也表明,在细胞周期调控过程中, p21 在抵抗 PCNA 方面起着积极的作用<sup>[14]</sup>。p21 也能与 PCNA 结合,直接抑制 DNA 的复制<sup>[9]</sup>,另有研究显示在晶状体赤道部和晶状体前囊上皮细胞中的 p27 阳性细胞数量与 PCNA 阳性细胞数量较为接近时, PCNA 的表达就会受阻,其阳性细胞数量急剧减少<sup>[7]</sup>。因此通过这些研究推测, p21 和 p27 都有可能是通过抑制 PCNA 的表达而在抑制 LECs 的增殖中起到重要作用。

本研究也显示,三个组兔 LECs 的 p21 的表达与 p27 的表达呈正相关,即随着 p21 的表达增高, p27 的表达亦增高,反之亦然。如前所述, p21 及 p27 同属细胞周期抑制蛋白,他们在氨基末端的结构及功能都有高度相似性,且二者都有抑制 PCNA 的作用。因此推测, p21 与 p27 在抑制和调节 LECs 的增殖过程中具有协同作用,但这是否就是二者表达呈正相关的原因尚不明确,其具体机制还有待于进一步研究。

通过本研究可以得出结论: LECs 中有 p21 和 p27 的表达,而且 p21 和 p27 对调控 LECs 的增殖起到重要的作

用。晶状体中 p21 和 p27 的表达量和 LECs 的增殖可能处于一种动态平衡,当这种动态平衡被打破,可能会导致细胞过度增殖或停止增殖。PCO 可能是因为白内障手术残留的 LEC 打破了这种动态平衡而导致 LEC 过度增殖而引起的。因此推测,p21 和 p27 在 PCO 的发生中可能起到关键性作用,但这一结论及其机制还有待进一步研究。由于 LECs 中有 p21 和 p27 的表达,就可以为进一步行病毒质粒转导入 p21 和 p27 基因从而改变 LECs 中 p21 和 p27 表达的实验研究奠定基础。也正是由于 p21 和 p27 对调控 LECs 的增殖起到重要的作用,且可能在 PCO 的发生中扮演重要的角色,就可以为进一步通过干预 LECs 中 p21 和 p27 的表达从而在 PCO 的防治中开创新的路径和思路。

#### 参考文献

- 1 Apple DJ, Solomon KD, Tetz MR, *et al.* Posterior capsule opacification. *Surv Ophthalmol* 1992;37(2):73-116
- 2 Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, *et al.* p21 is a universal inhibitor of cyclin kinase. *Nature* 1993;366(6456):701-704
- 3 Reed SI. Control of the G<sub>1</sub>/S transition. *Cancer Surv* 1997;29:7-23
- 4 Koff A, Giordano A, Desai D, *et al.* Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G<sub>1</sub> phase of the human cell cycle. *Science* 1992;257(5077):1689-1694

- 5 邵志敏,沈镇宙. Genistein 抑制乳腺癌生长的机制. *中华肿瘤杂志* 1999;5(2):325-328
- 6 Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G<sub>1</sub> cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 1994;78(1):67-74
- 7 宁宏,赵平,张劲松,等. 细胞周期素依赖激酶抑制剂 P27<sup>Kip1</sup> 在兔晶状体上皮细胞增殖过程中的作用. *中华眼科杂志* 2002;38(6):378-379
- 8 李向荣,林星余,肖忠秀,等. P21 结构功能与研究新进展. *医学综述* 2008;14(14):2094-2097
- 9 王勇,张明昌,胡义珍,等. 细胞周期依赖性激酶抑制剂及其在眼科的应用. *眼科新进展* 2004;24(4):316-318
- 10 吴明星,李绍珍,曾骏文,等. 永生化人晶状体上皮细胞细胞周期调控相关基因表达的检测. *中华眼科杂志* 2002;38(6):367-370
- 11 李凤鸣. *中华眼科学*. 第2版.北京:人民卫生出版社 2005:1413-1414
- 12 Nosrat CA, Tomac A, Lindqvist E, *et al.* Cellular Expression of GDNF mRNA suggests multiple functions inside and outside the nervous system. *Cell Tissue Res* 1996;286(2):191-207
- 13 Takamura Y, Kubo E, Tsuzuki S, *et al.* Increased expression of p21 (WAF-1/CIP-1) in the lens epithelium of rat sugar cataract. *Exp Eye Res* 2002;74(2):245-254
- 14 Waga S, Hannon GJ, Beach D, *et al.* The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 1994;369(6481):574-578