

· 论 著 ·

## 人剪切修复基因 XPD 对肝癌细胞中 p8/TTDA 基因的调控作用\*

杜芳腾, 付 晓, 张吉翔<sup>△</sup>

(南昌大学第二附属医院消化科, 江西 330006)

**摘要:**目的 探讨人剪切修复基因 XPD 对 p8/TTDA 基因的调控作用。方法 用 pEGFP-N2/XPD 重组质粒、pEGFP-N2 空载质粒分别稳定转染人肝癌细胞 SMMC-7721, 并用具有相同遗传背景和代数的 SMMC-7721 细胞作为空白对照。用 RT-PCR、Western blot 法检测转染前后 p8、XPD、p53、c-myc 表达量的变化, 四甲基偶氮唑盐(MTT)法观察细胞增殖活力。结果 (1)RT-PCR 检测示:p8 mRNA 在人肝癌细胞 SMMC-7721 是低表达的, 稳定转染野生型 XPD 后, p8 mRNA 和 XPD mRNA 表达量明显增高( $P < 0.001$ )。稳定转染重组质粒细胞组 p53 mRNA 表达量亦明显增高( $P < 0.05$ ), c-myc mRNA 表达量则明显下降( $P < 0.001$ )。(2)Western blot 法检测示:p8 蛋白在人肝癌细胞 SMMC-7721 是低表达的。稳定转染野生型 XPD 后, p8 蛋白、XPD 蛋白、p53 蛋白表达量明显增高( $P < 0.05$ ), c-myc 蛋白表达量则明显下降, 差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。(3)MTT 检测示:稳定转染重组质粒细胞组细胞增殖率明显减弱( $P < 0.001$ )。结论 人剪切修复基因 XPD 可调控 p8/TTDA 基因的表达。野生型 XPD 转染后亦可上调 p53 表达, 下调 c-myc 表达, 从而在分子途径上抑制 SMMC-7721 细胞增殖, 促进其凋亡。

**关键词:** XPD; p8/TTDA; 肝癌

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.22.001

中图分类号: R735.7; R730.231

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)22-3001-03

## Investigate of XPD gene regulating expression of p8/TTDA and inhibit lepatoma cell growth\*

DU Fang-teng, FU Xiao, ZHANG Ji-xiang<sup>△</sup>

(Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Nanchang University, Jiangxi 330006, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the role of xeroderma pigmentosum D(XPD) gene in regulating the expression of p8/TTDA. **Methods** The recombinant plasmid pEGFP-N2/XPD and empty plasmid pEGFP-N2 were transfected into SMMC-7721 by lipofectamine and selected in medium containing G-418, 800  $\mu\text{g/ml}$  for SMMC-7721-pEGFP-N2/XPD, SMMC-7721-pEGFP-N2; Cell lines for comparison were matched on the same genetic background and passage. The expression of p8, XPD, p53 and c-myc were detected by RT-PCR and Western blot. Cell growth was detected by MTT. **Results** (1)The p8 mRNA in SMMC-7721 cells were low expressions. The relative expressions of p8 and XPD mRNAs in SMMC-7721-pEGFP-N2/XPD were significantly higher than SMMC-7721-pEGFP-N2, lipofectamine control group and blank control group( $P < 0.001$ ). The relative expressions of p53 mRNA in SMMC-7721-pEGFP-N2/XPD were significantly higher compared with the controls, the difference were statistically significant( $P < 0.05$ ). The relative expression of c-myc mRNA in SMMC-7721-pEGFP-N2/XPD significantly lower than those in the controls( $P < 0.001$ ). (2)The p8 protein in SMMC-7721 cells was low expression; p8 protein, XPD protein and p53 protein in SMMC-7721-pEGFP-N2/XPD significantly were more than those in the controls ( $P < 0.05$ ). Compared with the controls, c-myc protein in SMMC-7721-pEGFP-N2/XPD was less with a significant difference( $P < 0.001$ ). (3)Compared with the control groups, cell growth of the SMMC-7721-pEGFP-N2/XPD was inhibited. **Conclusion** XPD gene can regulate the expression of p8/TTDA. Wild-type XPD could enforce the expression of p8/TTDA and p53 and inhibit the activity of c-myc and cell growth in vitro.

**Key words:** XPD; p8/TTDA; hepatoma

核苷酸切除修复(NER)的机制聚集和调控了大概 25 种蛋白对损伤结构进行识别和切除, 其中包括针对紫外线诱发的损伤。这一修复机制的中心成员是一种由 10 个亚基的转录/修复因子 II H (transcription/repair factor II H, TF II H) 组成的复合物——正如名字暗示的那样, 除了具有修复 DNA 作用外, 这一复合物还具有调节转录的作用。

目前发现, TF II H 复合物是由 10 个亚基(XPB、XPD、p8/TTDA、p62、p52、p44、p34、cdk7、cyclin H 和 MAT1)组成的多酶复合物<sup>[1]</sup>。p8/TTDA 是 3 种 TF II H 修复基因(XPB、XPD 和 p8/TTDA)之一, 被证实与一种稀少的光敏型遗传早熟老化综合征——毛发硫营养不良(TTD)相关, 该综合征的特点是毛发和指甲易碎, 鳞状皮肤和神经恶化<sup>[2]</sup>。

p8/TTDA 是 TF II H 的第 10 亚基, 在 DNA 修复中起着关键性的作用, 它通过刺激 XPB ATP 依赖的单链 DNA(ssDNA)解旋酶活性和激活损伤识别因子 XPC-hHR23B, 从而触发 DNA 解旋。且荧光抗体标记还发现 p8/TTDA 可促进 DNA 解旋所需的 XPA 聚集至损伤位点处。在 TTD-XPD 细胞中 p8/TTDA 过表达可阻碍 XPD 突变所产生的有害作用, 前者其主要是通过恢复 TF II H 表达水平起作用的。在 TF II H 复合物中, p8/TTDA 与 XPD、XPB 共同在核苷酸切除修复功能中起着必不可少的作用<sup>[3-4]</sup>。

XPD 是 TF II H 的第二大亚基。在核苷酸切除修复过程中, 它负责从 5'→3' 方向打开受损位置的 DNA 双链, 从而允许损伤特异性核酸酶从两侧切下受损 DNA, 在转录过程中, XPD

的作用是维持 TF II H 复合物的结构稳定,并促进转录活性的放大。它的功能受阻可导致突变的基因不能得到有效的修复,同时也会干扰一些调节细胞周期和细胞凋亡因子的功能,从而导致细胞正常生长和凋亡改变<sup>[5-6]</sup>。

因此,本研究用 pEGFP-N2/XPD 重组质粒稳定转染人肝癌细胞 SMMC-7721,检测转染前后对 p8/TTDA 表达情况的影响,探讨它们之间的相互作用,并检测其下游基因 p53 及 c-myc 等的表达;观察转染前后人肝癌细胞 SMMC-7721 所发生的生物学变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞株和质粒来源** 人肝癌细胞 SMMC-7721 购自中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC)。pEGFP-N2/XPD 重组质粒由南昌大学第二附属医院分子医学重点实验室构建,通过用聚合酶链反应、酶切及基因测序三重鉴定所构建的克隆<sup>[7]</sup>。

**1.1.2 主要试剂和产地** RPMI-1640 购自美国 Gibco BRL 公司, FBS 购自澳大利亚 Hyclone 公司, Lipofectamine 2000TM、TrizolTM 试剂购自美国 Invitrogen 公司。M-MLV Reverse Transcriptase、Rnasin、dNTP、Oligo(dT)15 购自美国 Promega 公司。PCR 引物、G-418 Sulfate (进口分装)购自上海生工生物工程有限公司, EndoFree Plasmid Kit、2 X Tag PCR MasterMix、Markr I 购自北京天根生化科技有限公司。单克隆抗体 XPD、p53、c-myc 购自美国 Santa Cruz 公司,单克隆抗体 p8 购自美国 Sigma 公司,山羊抗鼠 IgG-辣根过氧化物酶、山羊抗兔 IgG-辣根过氧化物酶购自北京中杉金桥生物技术有限公司。MTT 购自上海普飞生物技术有限公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 稳定转染** 传代 24 h 后,用重组质粒 pEGFP-N2/XPD、空载质粒 pEGFP-N2 分别通过 Lipofectamine 2000 转染 SMMC-7721 细胞。以  $2 \times 10^5$  细胞/孔的密度将 SMMC-7721 细胞平铺于 6 孔板内,24 h 细胞铺 90%,pEGFP-N2/XPD、pEGFP-N2 每孔 4.0  $\mu$ g,脂质体每孔 10  $\mu$ L 介导转染。转染 48 h 后用选择培养基(含 G-418 800  $\mu$ g/mL),经有限稀释法筛选 4 周,获得稳定转染重组质粒 pEGFP-N2/XPD 的 SMMC-7721 细胞(SMMC-7721-pEGFP-N2/XPD)及稳定转染空载质粒 pEGFP-N2 的 SMMC-7721 细胞(SMMC-7721-pEGFP-N2)。

**1.2.2 实验分组** 实验设 4 组,分别为稳定转染重组质粒细胞组(SMMC-7721-pEGFP-N2/XPD)、稳定转染空载质粒细胞组(SMMC-7721-pEGFP-N2)、脂质体转染对照组、无转染空白对照组。

**1.2.3 RT-PCR 检测各组细胞基因表达量** 使用 Trizol 试剂提取各组细胞总 RNA,合成 cDNA。应用 Primer Premier 5 软件设计引物,p8 正义:5'-CAA TGC CCT GGG GAA GAA G-3',反义:5'-TAA TTC ACC CAC TCG CTC C-3',扩增片段长度 103 bp;XPD 正义:5'-TCT GCC TCT GCC CTA TGA T-3',反义:5'-CGA TTC CCT CGG ACA CTT T-3',扩增片段长度 363 bp;p53 正义:5'-TTG AGG TGC GTG TTT GTG-3',反义:5'-TTT ATG GCG GGA GGT AGA-3',扩增片段长度 335 bp;c-myc 正义:5'-AAC CCT TGC GCA TCC AC-3',反义:5'-CCT CCT CGT CGC AGT AGA AA-3',扩增片段长度 317 bp; $\beta$ -actin 正义:5'-CTT CCT GGG CAT GGA GTC-3',反义:5'-GCC GAT CCA CAC GGA GTA-3',扩增片段长度 232 bp。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳(含 5  $\mu$ g/L 溴化

乙锭)后,在紫外灯下观察结果。并通过 FR200 图像分析软件(上海复日公司)观察目的电泳条带的斑点密度扫描值,以各组  $\beta$ -actin 条带的扫描值标化其相应组的 p8、XPD、p53、c-myc 条带的密度扫描值,获得其相对表达量,并进行统计学分析。

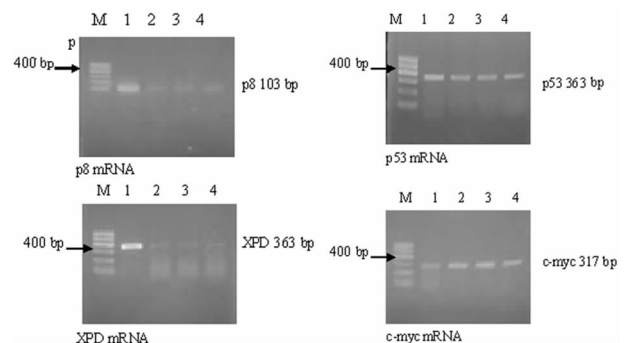
**1.2.4 Western blot 法检测各组细胞蛋白表达量** 使用总蛋白提取试剂盒分别提取 4 组细胞的总蛋白,使用全自动生化分析仪(Beckman, USA)测定蛋白浓度。取同量蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳,继而转移蛋白于硝酸纤维素膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭后,分别先后加入一抗和二抗孵育,BeyoECL Plus 荧光检测试剂显色。经曝光、显影、定影后照相,通过 FR200 图像分析软件读取目的电泳蛋白的斑点密度扫描值,以各组  $\beta$ -actin 条带的扫描值标化其相应组的 p8、XPD、p53、c-myc 条带的密度扫描值,测得其相对表达量,并进行统计学分析。

**1.2.5 四甲基偶氮唑盐(MTT)法观察细胞增殖活力** 使用 0.25% 胰淀粉酶消化收集细胞,每组细胞以  $10^4$  细胞/孔浓度平铺于 96 孔培养板中,每组 6 孔,常规培养 48 h 后吸出培养基,每孔加入 5 mg/L MTT 20  $\mu$ L,继续培养 4 h,弃上清液,每孔加入 DMSO 150  $\mu$ L,振荡 10 min。使用酶标仪(Labstems, 芬兰)测定 492 nm 各孔吸光度(A)值,取每孔平均值,计算细胞抑制率,以间接反映各组活细胞数量。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS12.0 统计软件进行统计分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析。

## 2 结果

**2.1 各组细胞 p8、XPD、p53、c-myc mRNAs 的表达情况** RT-PCR 检测结果显示:稳定转染重组质粒细胞组、稳定转染空载质粒细胞组、脂质体转染对照组和无转染空白对照组中 p8/TTDA mRNA 相对表达量分别为:0.624  $\pm$  0.055、0.179  $\pm$  0.084、0.159  $\pm$  0.093、0.156  $\pm$  0.060。4 组细胞中 XPD mRNA 相对表达量为:0.972  $\pm$  0.078、0.295  $\pm$  0.040、0.219  $\pm$  0.072、0.280  $\pm$  0.081。4 组细胞中 p53 mRNA 相对表达量为:0.829  $\pm$  0.023、0.567  $\pm$  0.018、0.566  $\pm$  0.052、0.516  $\pm$  0.064;4 组细胞中 c-myc mRNA 相对表达量为:0.212  $\pm$  0.027、0.862  $\pm$  0.013、0.887  $\pm$  0.067、0.816  $\pm$  0.069。p8 mRNA 在人肝癌细胞 SMMC-7721 是低表达的,稳定转染野生型 XPD 后,p8 mRNA 和 XPD mRNA 表达量明显增高( $P < 0.001$ )。稳定转染重组质粒细胞组 p53 mRNA 表达量亦明显增高( $P < 0.05$ ),c-myc mRNA 表达量则明显下降( $P < 0.001$ )。而 p8、XPD、p53、c-myc mRNAs 表达量在稳定转染空载质粒细胞组、脂质体转染对照组及无转染空白对照组之间差异均无统计学意义( $P > 0.1$ ),见图 1。



1: 稳定转染重组质粒细胞组; 2: 稳定转染空载质粒细胞组; 3: 脂质体转染对照组; 4: 无转染空白对照组。Marker: 100、200、300、400、500、600 bp。

图 1 4 组细胞中 p8、XPD、p53、c-myc mRNAs 的表达情况

**2.2 各组细胞 p8、XPD、p53、c-myc 蛋白的表达情况** Western blot 法检测结果显示:p8 蛋白在 4 组细胞中的相对表达量分别为: $0.516 \pm 0.093$ 、 $0.257 \pm 0.086$ 、 $0.287 \pm 0.044$ 、 $0.252 \pm 0.084$ ;XPD 蛋白相对表达量分别为: $0.606 \pm 0.076$ 、 $0.264 \pm 0.083$ 、 $0.223 \pm 0.086$ 、 $0.276 \pm 0.053$ ;p53 蛋白相对表达量分别为: $0.894 \pm 0.046$ 、 $0.455 \pm 0.038$ 、 $0.443 \pm 0.051$ 、 $0.405 \pm 0.072$ ;c-myc 蛋白相对表达量分别为: $0.233 \pm 0.040$ 、 $0.529 \pm 0.067$ 、 $0.500 \pm 0.052$ 、 $0.521 \pm 0.062$ 。p8 蛋白在人肝癌细胞 SMMC-7721 是低表达的。稳定转染野生型 XPD 后,p8 蛋白、XPD 蛋白、p53 蛋白表达量明显增高( $P < 0.05$ ),c-myc 蛋白表达量则明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。而在稳定转染空载质粒细胞组、脂质体转染对照组及无转染空白对照组之间差异均无统计学意义( $P > 0.1$ )。各分子蛋白表达水平的变化趋势与其 mRNA 变化趋势相一致,见图 2。



1: 稳定转染重组质粒细胞组;2: 稳定转染空载质粒细胞组;3: 脂质体转染对照组;4: 无转染空白对照组。

图 2 4 组细胞中 p8、XPD、p53、c-myc 蛋白的表达情况

**2.3 各组细胞增殖活力的变化情况** MTT 检测显示:以无转染空白对照组生长率为 1,脂质体转染对照组为  $1.014 \pm 0.025$ ,稳定转染空载质粒组为  $0.981 \pm 0.042$ ,稳定转染重组质粒细胞组为  $0.616 \pm 0.055$ ,稳定转染重组质粒细胞细胞的吸光度与其他两组比较明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.001$ );稳定转染空载质粒细胞组、脂质体转染对照组与无转染空白对照组之间相互比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 3 讨 论

DNA 修复是保持人类基因组完整性的核心,DNA 修复能力的减低常易发生癌变,而机体常暴露于各种有害内外物质中,致使 DNA 的结构受损,导致生命体重要的遗传信息的丢失。为维持基因组稳定性和完整性,可促使充足的 DNA 修复基因表达,通过多种途径(如核酸切除修复、同源重组修复、非同源重组修复、碱基切除修复和错配修复等)促使各种损伤得到有效修复。其中核酸切除修复是最多样和最普遍的 DNA 修复机制,而 TF II H 则在核苷酸切除修复功能中发挥着重要作用。XPB、p8/TTDA、p62、p52、p44 和 p34 组成一个核心亚复合物,cdk7、cyclin H 和 MAT1 组成一个具有 CDK 活化的激酶(CAK)亚复合物,而 XPD 则作为一个支架,介导着 CAK 亚复合物与核心亚复合物的结合。XPD 以 N-末端与 MAT1 的卷曲结构域连接,同时以 C-末端与 p44 亚基的 N-末端相连,从而把 cdk7 以及整个 CAK 亚复合物锚定在核心复合合物上,这就形成了 TF II H 多酶复合物。XPD、XPB、p8/TTDA 则是 TF II H 中的 3 种起修复作用的基因<sup>[3]</sup>。

有研究证实,XPD 除了在 TF II H 介导的核酸切除修复和

转录过程中发挥主要作用外,还参与了细胞的增殖、凋亡,肿瘤的发生甚至化疗药物抗药性的产生等多种生理及病理机制<sup>[6]</sup>。因此,有理由认为,XPD 基因表达下降则有利于肿瘤的发生、发展。本研究亦发现,在人肝癌细胞 SMMC-7721 中 p8 和 XPD mRNAs 和蛋白均为低表达。现今,有研究者发现在 TTD-XPD 细胞中 p8/TTDA 过表达可阻碍 XPD 突变所产生的有害作用<sup>[2]</sup>。故本研究使用重组质粒 pEGFP-N2/XPD 转染 SMMC-7721 细胞,从而研究人剪切修复基因 XPD 对 p8/TTDA 基因的影响。结果证实,转染野生型 XPD 后,p8 mRNA 和蛋白表达量均明显增高。

Giglia-Mari 等<sup>[7]</sup>通过绿色荧光蛋白(GFP)标记 TTDA 和 XPD 亚基,并利用高分辨率的共聚焦显微镜进行观察。结果发现 TTDA-GFP 与 XPD-GFP 稳定地组成 TF II H 并且参与 DNA 修复,而且与仅定位于细胞核内的 XPB 亚基相比,在细胞质和细胞核中都可以观察到 TTDA-GFP 和 XPD-GFP。还通过光脱色荧光恢复技术(FRAP)得出结论,在核心的 TF II H 复合体吸附到 DNA 损伤处后,一旦 TTDA 进入到正确的位置,将会引起构象上的改变来召集其他一些用于修复的亚基。TTDA 也可帮助 TF II H 正确折叠,防止它的降解和积累 TF II H 到达一种进行核苷酸切除修复功能所需的水平。本研究发现转染野生型 XPD 基因增加了 SMMC-7721 细胞生长的抑制率,并导致稳定转染重组质粒细胞进入 S 期出现障碍,停滞在 G<sub>1</sub> 期的细胞增多,抑制了癌细胞的增殖,促进了癌细胞的凋亡。p8 基因和蛋白表达水平增高,可促进恢复 TF II H 表达水平,从而有助于抑制癌细胞生长。

抑癌基因 p53 可通过抑制细胞周期、促进细胞凋亡、稳定染色体基因组及抑制血管生成等途径来防止细胞恶变,抑制肿瘤生长。有研究认为,p53 参与调节核酸切除修复途径,p53 C-末端释放的多肽可与 XPB 相互作用从而增加 p53 促凋亡活性;同时 p53 C-末端也可抑制 TF II H 复合物的解旋酶活性。当 DNA 受到损伤时,XPB 和 XPD 可识别损伤部位并与 p53 结合,促使损伤部位得到修复或诱导细胞凋亡<sup>[8]</sup>。本实验亦发现,在 SMMC-7721-pEGFP-N2/XPD 组中 p53 mRNA 和蛋白表达量明显增高。野生型 XPD 转染后可上调 p53,而 p53 又可与 XPB 相互作用,促进癌细胞凋亡。所以,作者认为 XPD 可能在 TF II H 复合物中发挥着核心调节作用,但尚需进一步研究证实。

癌基因 c-myc 可以促进细胞的生长与增殖,阻断细胞分化,促使肿瘤形成。有研究认为,XPD 可以通过 Fuse 结合蛋白(FBP)影响 c-myc 的表达;FBP 有潜在的转录活化和抑制功能,是 c-myc 表达所必需的;且当 XPD 发生缺陷或突变时 c-myc 表达量常增加;将 FBP 或(和)XPD 转入进 XPD 缺陷的细胞后 c-myc 表达量可下降<sup>[9]</sup>。本实验亦证实转染野生型 XPD 后,c-myc mRNA 和蛋白表达量均明显降低。c-myc 表达的下降,可引起癌细胞的生长力降低和细胞凋亡增加<sup>[10]</sup>。

本实验表明,人剪切修复基因 XPD 可调控 p8/TTDA 基因的表达。野生型 XPD 稳定转染 SMMC-7721 细胞后,p8 mRNA 和蛋白表达量明显增高。p8 基因和蛋白表达量水平增高,可促进恢复 TF II H 表达水平,抑制癌细胞的无限增殖。野生型 XPD 转染后亦可上调 p53 基因及蛋白表达,而 p53 又可与 XPB 相互作用,促进癌细胞凋亡。转染后,c-myc 表达下降,可引起癌细胞的增殖降低和细胞凋亡增加。本实验对 XPD 基因抑制肝癌细胞生长的分子途径进行了初步探讨,为肝癌的基因治疗提供了分子水平的实验依(下转第 3006 页)

中最常见、最严重的并发症之一,当肾组织已具有明显的病理变化,而患者往往还未出现明显临床或实验室检查方面的异常时<sup>[3]</sup>,其病理改变主要表现为肾内微血管和中等大小动脉硬化及钙化。传统观点认为血管钙化是不可调控的、不可逆的,是矿物质在血液中过度饱和造成的被动沉淀,是动脉粥样硬化自然形成部分。近年在动脉硬化研究中发现血管钙化发生在动脉粥样硬化形成早期阶段,是类似骨发育的、主动的、可调控的生物学过程。许多骨相关蛋白和血管活性物质可能参与了钙化的调控,这些蛋白在血管局部的表达以及表达变化的失调,对血管钙化的发生、发展起着非常重要的调节作用<sup>[7]</sup>。BMP-2 是与血管钙化关系密切的骨基质蛋白,BMP-2 可诱导非骨组织来源的细胞分化为成骨细胞,导致异位成骨<sup>[8]</sup>,是一种致血管钙化最强有力的蛋白,因此研究 DN 时肾实质内小动脉有无 BMP-2 表达,如有表达其变化规律如何对于探讨 DN 的发病机制以及寻求 DN 治疗的有效措施具有重要意义。

本实验生化检测结果显示, DN 组各时间点血糖及尿蛋白量(24 h)明显高于 N 组,说明造模成功,肌酐及血磷 12 周以后明显升高,提示肾脏损害进行性加重。两组 HE 染色也提示 DN 组 4 周时已出现系膜区增宽,肾小球增大,肾小管扩张。在 24 周时出现肾小球硬化征象,小管萎缩,间质大量炎症细胞浸润。茜素红染色 DN 组第 4~12 周时偶见肾内小动脉少许点状红色钙盐沉积,第 24 周时可见肾内小动脉及周围组织有较多红色点片状沉积, N 组茜素红染色为阴性。根据钙化程度分级分析, DN 组第 24 周肾内小动脉存在轻至中度钙化, N 组各时间点肾组织及肾内小动脉无钙化。免疫组化、原位杂交结果证实 DN 肾实质小动脉存在骨基质蛋白 BMP-2 表达,并随病程进展存在异常改变,早期即有 BMP-2 基因和蛋白表达,随病程进展表达逐渐增加。 N 组肾小球、肾小管间质、肾血管未见 BMP-2 表达。

由上可知,肾内小动脉在 DN 早期即在发生血管钙化前就已有骨基质蛋白 BMP-2 的表达,提示 BMP-2 可能参与了早期 DN 的发生、发展, BMP-2 的表达还与肌酐及尿蛋白增高呈正

相关,说明 BMP-2 促进肾功能的恶化, DN 后期随钙化加重会导致血管顺应性下降,进一步影响肾小球的血流动力学,使病变继续恶化,最终不可避免进展到肾病终末期。而能否在发病早期阻断这一过程,可能为 DN 的防治提出新的思路。

#### 参考文献:

- [1] Riley EH, Lane JM, Urist MR, et al. Bone morphogenetic protein-2[J]. Clin Orthop, 1996, 324: 39.
- [2] Zebboudj AF, Shin V, Bostrom K. Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells[J]. J Cell Biochem, 2003, 90: 756.
- [3] Fioretto P, Steffes MW, Mauer SM. Glomerular structure in non- insulin - dependent diabetic patients with various Levels of albuminuria[J]. Diabetes, 1994, 43 : 13581.
- [4] Parhami F, Tintut Y, Patel J K, et al. Regulation of vascular calcification in atherosclerosis[J]. Z Kardiol, 2001, 90 Suppl 3: 27.
- [5] Shioi A. Significance of vascular calcification in diabetic patients with increased risks of cardiovascular disease and stroke[J]. Clin Calcium, 2003, 13(9): 1132.
- [6] Mehrotra R, Budoff M, Christenson P, et al. Determinants of coronary artery calcification in diabetics with and without nephropathy[J]. Kidney Int, 2004, 66 (5): 2022.
- [7] Chen NX, Moe SM. Vascular calcification in chronic kidney disease[J]. Sem Nephrol, 2004, 24 (1): 61.
- [8] Chen D, Harris M, Rossini G, et al. Bone morphogenetic protein 2 enhances BMP-3, BMP-4 and bone cell differentiation marker genes expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts[J]. Calcif tissue Int, 1997, 60(3): 283.

(收稿日期: 2010-05-28)

(上接第 3003 页)

据,并大胆猜测 XPD 基因在 TF II H 复合物中可能发挥着核心调节作用,其具体调节作用机制还有待于进一步研究探索。

#### 参考文献:

- [1] Giglia-Mari G, Coin F, Ranish JA, et al. A new, tenth subunit of TF II H is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A[J]. Nat Genet, 2004, 36(7): 714.
- [2] Vitorino S, Coin F, Zlobinskaya O, et al. Solution structure and self-association properties of the p8 TF II H subunit responsible for trichothiodystrophy[J]. J Mol Biol, 2007, 368(2): 473.
- [3] Coin F, Proietti De Santis L, Nardo T, et al. p8/TTD-A as a repair-specific TF II H subunit[J]. Mol Cell, 2006, 21 (2): 215.
- [4] Chiquancas D, Lima-Bessa KM, Starv A, et al. Defective transcription/repair factor II H recruitment to specific UV lesions in trichothiodystrophy syndrome[J]. Cancer Res, 2008, 68(15): 6074.

- [5] Lehmann AR. The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases[J]. Genes Dev, 2001, 15(1): 15.
- [6] Aloyz R, Xu ZY, Bello V, et al. Regulation of cisplatin resistance and homologous recombinational repair by the TF II H subunit XPD[J]. Cancer Res, 2002, 62(19): 5457.
- [7] Giglia-Mari G, Mique C, Theil AF, et al. Dynamic interaction of TTD-A with TF II H is stabilized by nucleotide excision repair in living cells[J]. PLoS Biol, 2006, 4 (6): e156.
- [8] Wang XW, Vermeulen W, Coursen JD, et al. The XPB and XPD helicases are components of the p53-mediated apoptosis pathway[J]. Genes & Dev, 1996, 10: 1219.
- [9] Liu J, He L, Collins I, et al. The FBP interacting repressor targets TF II H to inhibit activated transcription[J]. Mol Cell, 2000, 5(2): 331.
- [10] Schmidt EV. The role of c-myc in cellular growth control [J]. Oncogene, 1999, 18(19): 2988.

(收稿日期: 2010-04-19 修回日期: 2010-05-06)