

野生型 *P53*、*P16* 基因协同对肺腺癌 细胞系生长抑制作用的研究

闫承慧, 王柏秋, 吴焱, 傅松滨, 李璞

(哈尔滨医科大学医学遗传学研究室, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: 为了探讨野生型 *P53* 基因及 *P16* 基因在恶性肿瘤基因治疗中的作用, 用腺病毒为载体将野生型 *P53* 基因转入高、低转移的肺腺癌细胞系 Anip973、AGZY83-a 和经野生型 *P16* 基因质粒转染的高、低转移肺腺癌细胞系 Anip973 (*Anip973 P16*)、AGZY83-a (*AGZY83-a P16*)。对各组转染细胞进行生长曲线、MTT 生长抑制率、原位末端标记、Western-blotting 等技术检测分析。结果发现: (1) 野生型 *P53* 蛋白的过表达对上述肺腺癌细胞系均呈现出较强的生长抑制作用。(2) 野生型 *P53* 蛋白的过表达对高转移肺腺癌细胞系 Anip973 的抑制作用明显高于低转移细胞系 AGZY83-a。(3) 野生型 *p53* 蛋白的过表达对经野生型 *P16* 基因转染的高、低转移的肺癌细胞 Anip973、AGZY83-a 抑制作用明显高于未经 *P16* 基因转染的细胞。野生型 *P53* 基因可以作为肺腺癌基因治疗的候选基因。肿瘤抑制基因 *P53*、*P16* 的联合转染可能是对肺腺癌进行基因治疗的有效手段。

关键词: 野生型 *P53* 基因; *P16* 基因; 腺病毒; 高转移肺腺癌细胞系 Anip973; 低转移肺腺癌细胞系 AGZY83-a

中图分类号: Q253

文献标识码: A

文章编号: 0253-977X(2001)01-0001-04

Expression of Wild-type *P53* Gene and *P16* Gene in Lung Adenocarcinoma Cell Lines

YAN Cheng-hui, WANG Bai-qiu, WU Yan, FU Song-bin, LI Pu

(Laboratory of Medical Genetics, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150086, China)

Abstract: To investigate the suppression effect of tumor suppressor genes in lung adenocarcinoma cell lines, we transferred a pair of lung adenocarcinoma cell lines with different metastasis potential, Anip973 (High-metastasis potential cell line) and AGZY83-a (Low-metastasis potential cell line) and this pair of cell lines transfected with *P16* gene: AGZY83-a *P16* and Anip973 *P16* with wild type *P53* gene with adenovirus vector. The suppression effects of *P53* gene were evaluated by cell growth curve, MTT, western-blotting analysis and TUNEL technique. Overexpression of wild-type *P53* gene in AGZY83-a, Anip973, Anip973 *P16* and AGZY83-a *P16* inhibited the growth of these four kinds of lung cancer cells and induced apoptosis of the cells. The suppression effect of *P53* gene in Anip973 and Anip973 *P16* was higher than AGZY83-a and AGZY83-a *P16* while co-expression of *P53* and *P16* in this pair of cell lines inhibited the cells more efficiently comparing with the expression of *P53* alone. Wild-type *P53* gene might act as a candidate gene in lung adenocarcinoma gene therapy while co-transfection of *P53* and *P16* genes was a more effective method.

Key words: wild-type *P53* gene; *P16* gene; adenovirus; Anip973; AGZY83-a

P53 基因和 *P16* 基因是重要的抑癌基因, 它们的表达产物在细胞周期调控中起着重要“关卡”作

用。已经发现, 人类多种恶性肿瘤的发生都与 *P53* 基因和 *P16* 基因的突变有关。近年来随着恶性肿

收稿日期: 2000-01-10; 修回日期: 2000-03-20

基金项目: 黑龙江省科学技术计划攻关和青年科学基金资助项目(Q98-9)及黑龙江省科学技术计划攻关项目(G99C20-6-1)资助

作者简介: 闫承慧(1973-), 女, 硕士研究生, 医学遗传学专业。E-mail: fusb@ems.hrbnu.edu.cn

瘤的基因治疗研究的深入开展,应用基因转移技术将外源性野生型 *P53* 基因和 *P16* 基因转移到人类恶性肿瘤细胞系中,使它们的蛋白恢复表达或过表达,从而抑制其肿瘤生物学特性,已经成为肿瘤基因治疗的一个新策略。

1 材料与方 法

1.1 材 料

高低转移肺腺癌细胞系 Anip973、AGZY83-a 由哈尔滨医科大学病理教研室王吾如教授惠赠;经 *P16* 基因转染并稳定表达该蛋白的高、低转移肺腺癌细胞系 Anip973、AGZY83-a;腺病毒野生型 *P53* 基因载体 pAdCMV-*P53*(Ad-*P53*)和腺病毒空白对照载体 pAdCMV-*lacZ*(Ad-*lacZ*)由哈尔滨医科大学微生物教研室凌虹教授惠赠。

1.2 实验方法

1.2.1 重组腺病毒感染 当肺腺癌高、低转移细胞系 Anip973、AGZY83-a 和 Anip973 *P16*、AGZY83-a *P16* 生长到 50% 相互接触时弃掉培养液, PBS 洗 3 次,加入 100 MOI 稀释的腺病毒液(Ad-*P53*、Ad-*lacZ*) 37℃ CO₂ 培养箱中吸附 2 小时,并每隔 15 分钟摇晃一次,然后用 PBS 洗 3 遍,加入含 2% FBS 的 1640 培养液继续培养。

1.2.2 重组腺病毒感染效率检测 将不同 MOI 的 Ad-*lacZ* 分别感染 Anip973、AGZY83-a 及 Anip973 *P16*、AGZY83-a *P16* 48 小时后弃去培养液, PBS 洗 1 次,用 2% 福尔马林 + 0.2% 戊二醛 4℃ 固定 2 小时,加入 X-gal 染液, 37℃ 温箱中作用 6 小时至过夜,显微镜下观察细胞蓝染情况。

1.2.3 细胞计数和生长曲线 在 24 孔平底板中每孔加入 3×10^4 个 Anip973、AGZY83-a、Anip973 *P16*、AGZY83-a *P16* 细胞,第二天用 100 MOI Ad-*P53* 进行感染,每个滴度做 2 个复孔,对照组加入等量 Ad-*lacZ*,于 1、3、5、7 天取每种细胞各两个复孔,台盼蓝染色计数活细胞数,绘制生长曲线。

1.2.4 MTT 检测细胞生长抑制率 在 96 孔平底板中每孔加入 2×10^4 个 AGZY83-a、Anip973、AGZY83-a *P16*、Anip973 *P16* 细胞,每个滴度做两个复孔,第二天用 100 MOI Ad-*P53*、Ad-*lacZ* 进行感染,3 天后弃去培养液,加入浓度为 5mg/ml 的 MTT 液 20 μ l, 37℃ 作用 4 小时,弃掉 MTT,每孔加入 DMSO 150 μ l, 10 分钟后用酶标仪比色测定 OD 值,计算细胞的生长抑制

率。

1.2.5 Western-blot 检测 *P53* 蛋白表达 收集病毒感染的 Anip973、AGZY83-a、Anip973 *P16*、AGZY83-a *P16* 细胞沉淀,紫外分光光度计定量,加入 5 倍体积的 1 \times SDS-PAGE 凝胶上样缓冲液,加热煮沸 10 分钟, 12 000 转/分 离心 10 分钟。取上清至新的 Eppendorf 管中,灌制 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳板,将蛋白质样品加热煮沸 3 分钟,每孔加样 50 μ g,电泳。硝酸纤维膜转移,封闭后,用羊抗人 *P53* 多克隆抗体为一抗,以 HRP 标记兔抗羊 Ig-G 为二抗进行杂交,采用 ECL Western blot system plus + 试剂盒进行检测。

1.2.6 原位末端标记法检测凋亡 将 AGZY83-a、Anip973、AGZY83-a *P16*、Anip973 *P16* 细胞培养于玻片上,第二天用 100 MOI 重组腺病毒感染,于感染后第三天取出玻片,4% 多聚甲醛固定 30 分钟,采用细胞凋亡试剂盒检测凋亡信号。

2 实验结果

2.1 重组腺病毒滴定结果检测

重组腺病毒经繁殖、扩增后,用 CsCl₂ 密度梯度离心法纯化,可见病毒在 1.35mg/ml CsCl₂ 界面上出现一蓝白色条带。用快速的 CPE 法测得 pAd-*P53* 滴度为 5.0×10^8 pfu/ml, pAd-*LacZ* 病毒滴度为 3.3×10^8 pfu/ml。

2.2 重组腺病毒转染效率检测

将 Ad-*lacZ* 分别用 50、100、200 MOI 感染培养的 Anip973、AGZY83-a 两个高低转移肺腺癌细胞系,48 小时后固定细胞,行 X-gal 染色,观察细胞蓝染情况。结果显示,当病毒感染量为 100 MOI 时,有 100% 的细胞被感染。

2.3 转基因细胞相差显微镜下形态观察

用倒置相差显微镜观察重组腺病毒感染后各细胞的形态变化。可见 Ad-*lacZ* 感染的 AGZY83-a 细胞呈椭圆形,Anip973 细胞呈梭形排列生长;Ad-*P53* 感染的 Anip973 细胞于 24 小时后出现细胞融合、变大,并于 48 小时后细胞内出现空泡,大约 72 小时后开始出现脱落、死亡,6 天后细胞全部脱落死亡。Ad-*P53* 感染的 AGZY83-a 细胞于感染后 72 小时后开始出现细胞融合,于感染第 5 天出现脱落、死亡,7 ~ 10 天后细胞全部脱落死亡。

2.4 外源性 *P53* 基因的表达检测

重组腺病毒感染 Anip973、AGZY83-a 两个高低转移肺腺癌细胞系及 Anip973 P16、AGZY83-a P16 后, 分别于第 1、3、5、7 天提取细胞总蛋白, 以 p53 特异性多克隆抗体为第一抗体, 以免抗羊 Ig-G 为第二抗体, 进行 Western blot 印迹转移, 检测 p53 蛋白的表达情况。结果表明 细胞感染后出现特异杂交带, 第 5 天达高峰, 第 7 天开始下降(见图 1)。

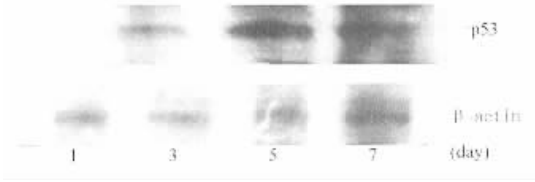


图 1 p53 蛋白在 Anip973 细胞中表达的 Western blot 结果
Fig.1 Expression of p53 protein in cell line Anip973

2.5 外源性 p53 蛋白的表达对细胞系增殖的影响

用 100MOI 的 Ad-lacZ 和 Ad-P53 感染 Anip973、AGZY83-a 和 Anip973 P16、AGZY83-a P16 第 1、3、

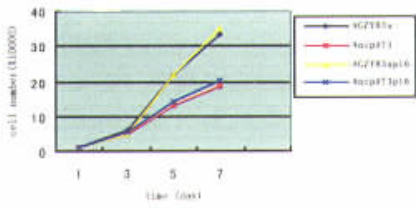


图 2 P53 感染细胞系生长曲线

Fig.2 The cell growth curve of Ad-p53 infected in cell lines

5、6、7 天后分别进行细胞计数并绘制细胞生长曲线(见图 2, 图 3)。

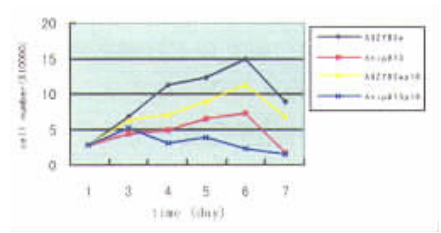


图 3 空白载体感染细胞生长曲线

Fig.3 The cell growth curve of Ad-lacZ infected in cell lines

用 100MOI 的 Ad-lacZ 和 Ad-P53 感染 AGZY83-a、Anip973 和 AGZY83-a P16、Anip973 P16 感染后第 3 天用 MTT 法进行细胞染色, 检测 OD490 值, 计算相对生长抑制率(见图 4)。

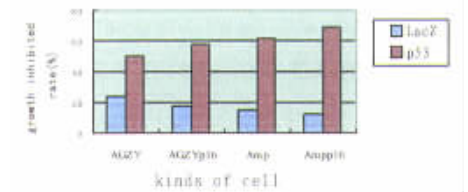


图 4 细胞生长抑制率曲线

Fig.4 Cell growth rate curve of inhibitingrate

2.6 P53 致凋亡的检测

Wt-P53 基因感染 Anip973、AGZY83-a 及 Anip973 P16、AGZY83-a P16 细胞后, 均出现明显的凋亡信号(见图 5)。

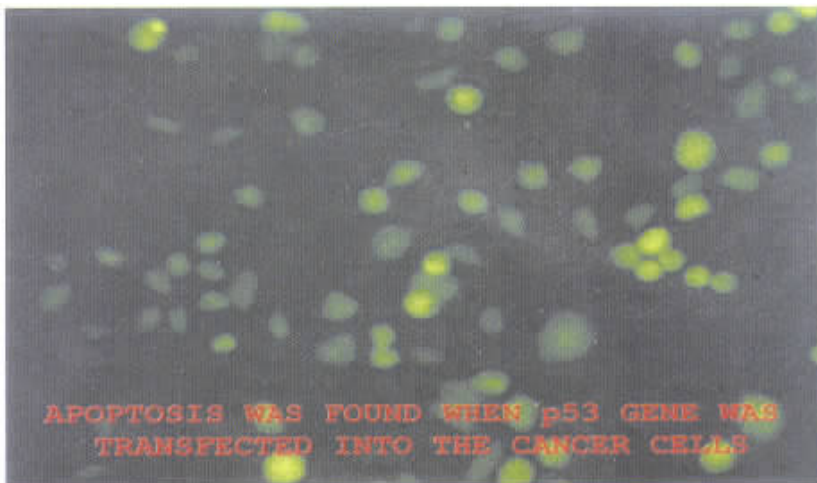


图 5 P53 诱导细胞凋亡

Fig.5 P53 gene induce cell apophosis

3 讨论

野生型 *P53* 基因作为一种细胞转录调控元件,对细胞的生长、分裂、凋亡起着严格的调控作用。由于 *P53* 基因在细胞周期调节和细胞生长过程中起着举足轻重的作用,很多肿瘤又都伴有 *P53* 基因功能的丧失^[1],恢复和重建肿瘤细胞中野生型 *P53* 基因的功能已经成为基因治疗的一个研究热点。Gottorf^[2]将 *P53*、*P16*、*P21* 这三种基因分别导入前列腺癌细胞并发现 *P53* 基因对细胞的抑制表现为裂解细胞而 *P16*、*P21* 对细胞的抑制作用处于一种较温和的“稳态”。我们采用 Ad-*lacZ* 感染体外培养的各细胞系,进行了体外转染效率测定,证明了重组腺病毒载体对细胞系具有较高的转染效率,同时采用 Western 印迹转移检测到在 Ad-*P53* 感染的细胞中有大量外源性 p53 蛋白表达,并且这些蛋白表达具有明显的时间依赖性。这些结果说明,腺病毒载体能高效地将其携带的目的基因 *P53* 转移到各细胞系中,并转录成 *P53* mRNA,翻译成 p53 蛋白,有效地发挥对上述肿瘤细胞的抑制作用。我们采用细胞计数和 MTT 法研究腺病毒介导的 *P53* 基因对细胞生长的影响,两种检测结果一致证明野生型 *P53* 基因对上述细胞均有明显抑制作用,并最终导致细胞死亡,这种抑制作用在各细胞间差异显著。高转移细胞系 Anip973 的生长抑制效率明显高于低转移细胞系 AGZY83-a 而 AGZY83-a *P16*、Anip973 *P16* 的生长抑制效率明显高于 AGZY83-a、Anip973。

为探讨 *P53* 基因过表达抑制 AGZY83-a、Anip973 及 AGZY83-a *P16*、Anip973 *P16* 细胞增殖的机制,我们运用原位末端标记等技术分析,证明野生型 *P53* 基因所致细胞死亡为一种特殊的死亡方式——凋亡。提示野生型 *P53* 基因是通过诱导凋亡来发挥对上述转染细胞的抑制作用的。

转移是癌症病人死亡的主要原因。恶性肿瘤转移过程中的每个阶段,都受多种基因及其产物表达的瞬时或持续变化的调控。其中转移细胞亚群的基因变化,即转移相关基因的激活或过度表达,以及转移相关基因的失活或表达不足,都是引起恶性肿瘤

转移的关键因素^[3]。

目前的研究认为, *ras* 和 *myc* 基因家族和突变性 *P53* 基因的异常表达与肿瘤的转移有一定相关性。Hwang 等将野生型 *P53* 基因导入胰腺癌细胞系,发现 p53 蛋白表达后胰腺癌细胞系生长缓慢,出现凋亡,并伴有 p21 蛋白表达水平的提高,在出现腹膜转移的动物模型中导入 *P53* 基因明显抑制原发性肿瘤和转移瘤的生长。我们的结果提示 *P53* 基因对高转移胰腺癌细胞的生长抑制作用更为明显。Craig C 等^[4]研究发现腺病毒介导的 p16 感染,其细胞周期阻滞与内源性 p16 或/和 Rb 蛋白的表达水平有关。而 Rb 蛋白同时又是 *P53* 基因介导的细胞周期捕获的下游调控基因之一。*P53* 基因与 *P16* 基因在细胞周期调控中存在着潜在的关系。Sandig BV^[5]等也发现腺病毒介导的 *P53* 基因与 *P16* 基因联合感染体外培养细胞系可以诱导凋亡,单纯 *P53* 基因感染却未能诱导细胞凋亡,同时动物实验也证实这两种基因的联合治疗可以引起肿瘤的快速消退。本研究发现在 p53 蛋白大量表达的 AGZY83-a、Anip973、AGZY83-a *P16* 和 Anip973 *P16* 细胞中,AGZY83-a *P16* 和 Anip973 *P16* 的生长抑制率高于 AGZY83-a 和 Anip973,这说明 *P16* 和 *P53* 这两种抑癌基因的联合感染对胰腺癌细胞系的抑制作用更加显著,提示 *P16* 和 *P53* 的联合转染是对胰腺癌进行基因治疗的有效手段。

参考文献 (References):

- [1] Chen Y J, Shih L S, Chen Y M, et al. Quantitative analysis of CDKN2, *P53* and retinoblastoma mRNA in human gastric carcinoma [J]. Int J Oncol, 1998, 13(2): 249 ~ 54.
- [2] Gotoh A. Cytotoxic effect of recombinant adenovirus *P53* and cell cycle regulator genes in human prostate cancers [J]. J Urol, 1997, 158(2): 636 ~ 641.
- [3] 陆应麟. Metastatic phenotype suppression of mouse lung adenocarcinoma cells transfected with human genomic DNA [J]. Clinical & Experiment Metastasis, 1996, 14(annual): 90.
- [4] Craig C, Kim M, Ohri E, et al. Effects of adenovirus-mediated *P16* INK4A expression [J]. Oncogene, 1998, 16(2): 265 ~ 272.
- [5] Sandig BV, Brand K, Herwig S, et al. *P16* and *P53* genes transferred with the help of adenovires to induce apoptotic tumor cell death [J]. Ugeskr Laeger, 1997, 159(46): 6825 ~ 6830.