

高低转移肺腺癌细胞系 Anip973 和 AGZY83 - a 中 P21 过表达的研究

王柏秋, 闫承慧, 吴焱, 黄承滨, 傅松滨, 李璞

(哈尔滨医科大学医学遗传学教研室, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:为探讨肿瘤抑制基因对肺腺癌细胞生长的抑制作用, 利用 FuGene 转染方法将 *P21* 基因的表达质粒转入一对分别具高、低转移能力的肺腺癌细胞系 Anip973 和 AGZY83 - a 中。对 p21 蛋白过表达的细胞系进行了细胞生长曲线, 克隆形成率, 原位末端标记分析和流式细胞仪分析。p21 蛋白过表达的一对细胞系细胞生长曲线斜率降低, 克隆形成能力下降并出现明显的 G₁ 期阻滞, 但未检测到凋亡信号。结果表明 *P21* 基因的过表达通过 G₁ 期阻滞抑制这一对肺腺癌细胞的生长, *P21* 基因可以作为肺腺癌基因治疗的候选基因。

关键词: *P21* 基因; 基因治疗; 肺腺癌

中图分类号: Q253.R730.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2000)05-0277-04

Overexpression of Tumor Suppressor Gene *P21* in a Pair of Lung Adenocarcinoma Cell Lines, Anip973 and AGZY83 - a, with Different Metastasis Potential

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

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

Abstract In order to investigate the suppression effect of tumor suppressor genes in lung adenocarcinoma, we transfected *P21* expression vector into a pair of lung adenocarcinoma cell lines with different metastasis potential: Anip973 (high metastasis potential) and AGZY83 - a (low metastasis potential). The suppression effects of p21 were evaluated by cell growth curve, cloning efficiency assay, flow cytometric analysis and Tunel technique. We found that increased expression of p21 in both cell lines was associated with significant lengthening of G₁ phase, decreased proliferation potential and decreased cloning efficiency. No apoptosis was found in the cell lines with overexpressed *P21* gene. The results showed that increased expression of *P21* gene suppressed the lung adenocarcinoma cells by G₁ arrest and *P21* gene proved a candidate gene in lung adenocarcinoma gene therapy.

Key words: *P21* gene; gene therapy; lung adenocarcinoma

随着分子生物学技术的不断完善及各个相关领域研究的不断深入, 基因治疗正在从初级阶段过渡到一个既有效又确保安全的时期。在治疗对象的选择上, 恶性肿瘤患者由于来源广, 用于治疗的基因多, 动物模型容易制作等原因而成为首选对象。近年来恶性肿瘤基因治疗的迅速发展使其成为肿瘤治疗领域最有希望的热点。目前, 有关肿瘤的基因治疗方案主要包括细胞因子导入疗法、“自杀”基因疗

法、肿瘤抑制基因疗法、耐药基因疗法等。

正常细胞含有调节细胞生长、抑制肿瘤形成的基因, 这就是肿瘤抑制基因。将正常的肿瘤抑制基因导入肿瘤细胞, 代替和补偿缺陷的基因以抑制肿瘤的生长或逆转其表型的这种替代疗法, 已成为从根本上攻克肿瘤的关键环节。目前, 比较常见并已尝试用于基因治疗的肿瘤抑制基因有编码 p53、p16、Rb、p21、p27 等的基因。我们选择 *P21* 基因进行

收稿日期: 2000-01-10; 修回日期: 2000-03-20

基金项目: 本课题受黑龙江省自然科学基金(Q98-9)及黑龙江省科学技术计划攻关项目资助(G99C20-6-1)

作者简介: 王柏秋(1971-), 女, 博士学位, 医学遗传学专业。Email: fusb@ems.hrbmu.edu.cn

了 AGZY83-a 和 Anip973 中肿瘤抑制基因替代疗法的初步研究。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 肺腺癌细胞系 AGZY83-a 和 Anip973 是一对来源相同但转移能力不同的人肺腺癌细胞系, Anip973 是由低转移母系 AGZY83-a 经在裸鼠腹腔内连续传代后获得的高转移亚系, 由哈尔滨医科大学病理教研室王吾如教授惠赠。

1.1.2 *P21* 基因表达载体 pCEP-WAF1 由上海市肿瘤研究所顾健人院士惠赠。

1.2 方 法

1.2.1 *P21* 基因的转染 采用 FuGene™ 6 Reagent (Boehringer Mannheim 公司) 进行。

1.2.2 Western 印迹检测转染效率 收获正常细胞系 (AGZY83-a, Anip973), 转染 *P21* 基因的细胞系 (AGZY83-a*P21*, Anip973*P21*), 提取总蛋白, 蛋白定量后进行 SDS 丙烯酰胺凝胶电泳, 每个泳道加入 50 μ g 总蛋白。转膜后进行 *P21* 基因转染前后的 Western 印迹分析。

1.2.3 生长曲线的绘制 在 24 孔平底板中每孔接种 2×10^4 细胞, 隔天取 3 个孔进行细胞计数, 计数至第 7 天, 每天的平均细胞数绘成生长曲线。

1.2.4 原位细胞凋亡检测 (Tunel) 将肿瘤细胞培养于玻片上, 当细胞生长到融合率达 50%~60% 时, 将玻片取出, 4% 多聚甲醛固定 30min 后, PBS 冲洗, 在渗透液 (0.1% Triton X-100, 0.1% 柠檬酸盐缓冲液配制) 中 4 $^{\circ}$ C 孵育 2min。PBS 冲洗两次, 加 50 μ l Tunel 混合液, 37 $^{\circ}$ C 湿盒内孵育 1h。PBS 冲洗 3 次, 荧光显微镜下观察结果。

1.2.5 流式细胞仪分析 将要分析的细胞换液为 0.1% FBS 的全培养基, 48h 后用 15% FBS 的全培养基激活, 继续培养 48h, 收集肿瘤细胞 1×10^6 个, 800 \times g 离心 10min, 细胞沉淀用 PBS 洗一次, 分散成单细胞悬液, 加入 70% 冷乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定过夜。1000 \times g 离心 5min, 用少量 PBS 重悬细胞, 加入碘化丙啶 (PI), 浓度为 50 μ g/ml, 混匀, 冰上放置 20min 后, 在流式细胞仪上分析细胞周期的分布。

1.2.6 克隆集落形成分析 在六孔板中接种 1000 个细胞, 每个细胞系做 3 个复孔, 每隔 5~6 天更换培养基。培养一段时间后 (AGZY83-a: 9 天; Anip973: 14 天), 培养皿中出现肉眼可见的克隆, 弃去

培养基, PBS 小心浸洗 2 次, 加入甲醇固定 15min。弃去固定液, 加适量姬姆萨染液染色 10~30min, 流水缓慢冲去染色液, 空气干燥。计算克隆率:

$$\text{克隆形成率} = \frac{\text{克隆数}}{\text{接种细胞数}} \times 100\%$$

2 结 果

2.1 转染后细胞系鉴定结果

P21 基因转染前后的 Western 印迹分析结果显示转染后的细胞系中 *P21* 基因与转染前相比呈现较高水平的表达 (图 1)。

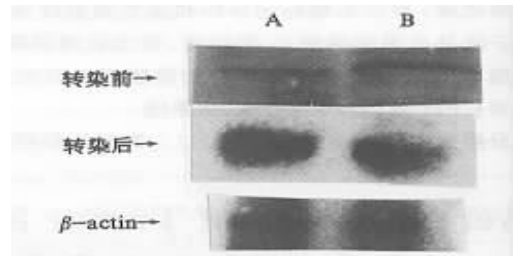


图 1 *P21* 基因转染 AGZY83-a 和 Anip973 的 Western 印迹分析结果

A: AGZY83-a; B: Anip973

2.2 *P21* 基因的过表达对 AGZY83-a 和 Anip973 细胞系生长的影响

对筛选出的 *P21* 基因过表达的细胞系 AGZY83-a *P21* 和 Anip973 *P21* 进行生长曲线分析表明, AGZY83-a *P21* 和 Anip973 *P21* 与转染前细胞系相比, 生长受到抑制 (图 2)。但 AGZY83-a *P21* 和 Anip973 *P21* 之间的生长抑制没有差别。集落形成率的分析结果分别为 AGZY83-a = 58.65%, AGZY83-a *P21* = 32.65%, Anip973 = 49.25%, 以及 Anip973 *P21* = 26.35%。流式细胞仪分析结果 (图 3) 显示 AGZY83-a *P21* 和 Anip973 *P21* 出现明显的 G₁ 期阻滞 (AGZY83-a: 41.45%, Anip973: 48.09%, AGZY83-a *P21*: 67.20%, Anip973 *P21*: 69.89%)。对转染前后的两个细胞系的原位细胞凋亡检测均未检测出凋亡信号。

3 讨 论

P21 基因为细胞周期调节途径中的另外一个重要的中介因子^[1-3], 它与细胞恶性增殖密切相关。首先, *P21* 基因影响肿瘤细胞的转移, Jiang M 等^[4]在对乳癌的研究中发现, 出现转移的病例常常伴有

到 HDF 出现衰老 p21 表达水平下降^[7]。与之相反的是 p16 蛋白表达在 HDF 出现衰老是呈现大幅度的提高并维持高水平表达,这说明 P21 基因可能启动 G₁ 期阻滞而 P16 基因则可以维持这种阻滞。有人将可表达 p21 蛋白的腺病毒载体导入体外培养的胰腺癌细胞系中,这种胰腺癌细胞系本身存在内源性 P21 基因的表达,在导入外源性 P21 基因后该蛋白的过表达可使肿瘤细胞停滞在 G₀/G₁ 期。本文所选择的细胞系 AGZY83-a 和 Anip973 是一对来源相同但转移能力不同的人肺腺癌细胞系,Anip973 是由低转移母系 AGZY83-a 经在裸鼠腹腔内连续传代后获得的高转移亚系。我们通过 RT-PCR、Western 印迹等方法检测出这一对转移能力不同的细胞系具有内源性 p21 蛋白表达,并且二者的表达量无差别。将 P21 表达质粒转入 AGZY83-a 和 Anip973 中使其过量表达后,可明显抑制这一对细胞系的生长,AGZY83-a/P21 和 Anip973/P21 的生长曲线斜率降低,细胞生长速度减慢,克隆形成能力几乎降低了一半。原位末端标记分析未发现凋亡信号的出现。流式细胞仪分析提示 P21 基因转染后的细胞出现显著的 G₁ 期阻滞。可见 p21 蛋白的过表达是通过细胞周期的 G₁ 期阻滞而不是凋亡来抑制肿瘤细胞的生长。虽然在一些转移的肿瘤中 p21 蛋白表达降低,在

这一对转移能力不同的细胞系中 p21 蛋白的过表达对高转移细胞系 Anip973 并没有表现出更显著的抑制效应。这可能是由于这一对细胞系的内源性 p21 蛋白的表达量并没有差别。

参考文献:

- [1] Murakami Y, Sekiya T. Accumulation of genetic alterations and their significance in each primary human cancer and cell line[J]. *Mutat Res*, 1998, 400(1~2): 421~437.
- [2] Ball KL. P21: structure and functions associated with cyclin-CDK binding[J]. *Prog Cell Cycle Res*, 1997; 3: 125~34.
- [3] Schafer KA. The cell cycle: a review[J]. *Vet Pathol*, 1998, 35(6): 461~478.
- [4] Jiang M, Shao ZM, Wu J, et al. P21/waf1/cip1 and mdm-2 expression in breast carcinoma patients as related to prognosis[J]. *Int J Cancer*, 1997, 74(5): 529~534.
- [5] Ogawa M, Maeda K, Onoda N, et al. Immunohistochemical study of P21 expression in gastric carcinoma[J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 1997, 24(2): 292~295.
- [6] Stein JP, Ginsberg DA, Grossfeld GD, et al. Effect of P21/WAF1/CIP1 expression on tumor progression in bladder cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1998, 90(14): 1072~1079.
- [7] Stein GH, Dulic V. Molecular mechanisms for the senescent cell cycle arrest[J]. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 1998, 3(1): 14~18.
- [8] Trotter MJ, Tang L, Tron VA. Overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor P21(WAF1/CIP1) in human cutaneous malignant melanoma[J]. *J Cutan Pathol*, 1997, 24(5): 265~271.

《'2001 遗传学进展》一书征稿启事

为了及时反映国内外遗传学前沿领域的最新进展与动态,并为制定我国遗传学研究战略与计划提供依据,中国遗传会与高等教育出版社合作,今后每年编辑出版一本《遗传学进展》年评。《遗传学进展》编委会设在中国科学院遗传研究所,主编:李振声,副主编:赵寿元,秘书处设在《遗传》编辑部,秘书李绍武。第一年的书名为《'2001 遗传学进展》,其他依此类推。

1. 征文内容

人类与医学遗传、动植物遗传与育种、分子与微生物遗传及基因组、转基因等领域的最新成果与进展的综述性文章,兼顾短评等。

2. 写作格式

参照《遗传》杂志综述稿的写作格式,题目要新颖简洁,正文前附中文摘要和关键词。文题、作者姓名、单位名称译成英文,以利他人以英文形式引用。

参考文献要新,请按文中引用的顺序排列,作者要引全,保留引评文题,引文一般不超过 50 篇。

期刊的著录格式:作者 A,作者 B, ... 引文题目. 刊名 出版年,卷(期) 起~止页数.

专著的著录格式:作者 A,作者 B, ... (译者 A, B). 书名. 出版社地点,出版社名称,出版年,参阅起~止页数.

论文集的著录格式:作者 A,作者 B, ... 引文题目. 主编名. 论文集名. 出版社地点:出版社名称,出版年,起~止页数.

学位论文的著录格式:作者 A,作者 B, ... 引文题目. XX 学位论文. 出版地:出版单位,出版年,起~止页数.

非公开发表的资料及个人通讯不宜作为参考文献引用,但可在

文中出现处用括号注明。

建议适当参引国内遗传学期刊的相关文献,以反映国内的进展及对同行工作的尊重。

每篇综述性征文 6 000~10 000 字,其他 2 000~4 000 字,插图要清晰,能直接用于制版。

注意西文字母的大小写、正斜体、上下角标的用法。不常见的缩略语首次出现时请写出英文全称和中文规范译名。

3. 读者对象

本书适于基础医学、农学、畜牧、林学、细胞学、生物化学、生物技术等专业的科研、教学、开发、管理人员,大专院校生物系师生与中学生物教师阅读。欢迎供稿,欢迎订阅。

4. 投稿及订阅办法

本书《遗传》编辑部负责编辑和零售,《'2001 遗传学进展》将于 2001 年年中出版,每本估价 20 元,可开发票。

本书的征文工作常年进行,为了区别于《遗传》杂志的来稿,请在稿件左上角注明“进展征文”字样,来稿一式 2 份,同时送审,免收审稿费。

征文稿请寄:100101 北京 中国科学院遗传所《遗传》编辑部 李绍武收,电话(传真) 010-64889348。

收稿 3 个月内通知审稿意见,修改后再提供录入软盘(文本文件)。发表后酌付稿酬,并寄样书。

中国遗传学会

2000 年 8 月