

• 论著 •

## 野生型 *P53*、*P16* 基因联合抑制人胃癌 细胞 HGC27 生长的实验研究

张红宇<sup>1</sup>, 孙 强<sup>2</sup>, 王亚东<sup>3</sup>, 张维祥<sup>3</sup>, 杨卫军<sup>3</sup>, 张锦瑜<sup>3</sup>

(1. 深圳市疾病预防控制中心, 广东 深圳 518020; 2. 瓦房店市中心医院, 辽宁 瓦房店 116300;  
3. 大连铁路医院 辽宁 大连 116001)

**【摘要】**背景与目的: 探讨逆转录病毒介导的野生型 *P53*、*P16* 基因协同抑制人胃癌细胞生长的作用。材料与方法: 用脂质体转染法将携有野生型 *P53* 基因、*P16* 基因的逆转录病毒载体 pLNCX, 转染人未分化胃癌细胞系 HGC27, 对转染后细胞进行生长曲线、MTT 生长抑制率、Southern 杂交、流式细胞术分析, 观察其生物学特性变化。结果: 野生型 *P53*、*P16* 蛋白的过表达对胃癌细胞系均呈现出生长抑制作用; 野生型 *P53* 基因与 *P16* 基因联合导入 HGC27 细胞, 对细胞生长抑制、促使凋亡效果高于单种基因转染。结论: 野生型 *P53*、*P16* 基因联合治疗效果高于利用个别基因的治疗效果。

**【关键词】**胃肿瘤; 基因; *P53*; *P16*; 基因治疗

中图分类号: Q753

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2004)06-0344-03

### Study on the Growth Inhibition of Human Gastric Carcinoma Cell HGC27 by Combination of Wild-Type *P53*, *P16* Genes

ZHANG Hong-yu<sup>1</sup>, SUN Qiang<sup>2</sup>, WANG Ya-dong<sup>3</sup>, *et al*

(1. Shenzhen Center for Disease Prevention and Control, Shenzhen 518020, China; 2. Center Hospital of Wafangdian, Wafangdian 116300, China; 3. Department of General Surgery, Dalian Railway Hospital, Dalian 116001, China)

**【ABSTRACT】**BACKGROUND & AIM: To investigate the suppression effect on human gastric carcinoma cell HGC27 by combination of wild-type *P53*, *P16* genes mediated by retrovirus vector. **MATERIAL AND METHODS:** Human gastric carcinoma cell line HGC27 was transfected via two retrovirus vectors pLNCX containing wild-type *P53*, *P16* genes by lipofectamine. By using cell growth curve, MTT growth inhibition rate, Southern blot and flow cytometry assay, the clones obtained were detected and observed for the changes of their biologic characteristics. **RESULTS:** Overexpression of wild-type *P53* and *P16* gene inhibited the growth of human gastric carcinoma cell line. The HGC27 cell growth inhibition and apoptosis caused by combination transfection of wild-type *P53* and *P16* gene were higher than those caused by single gene transfection. **CONCLUSION:** The therapeutic effect of *P53* and *P16* gene combination therapy is significantly higher than that of single gene therapy.

**【KEY WORDS】**gastric neoplasm; *P53*; *P16*; gene therapy

肿瘤的发生、发展是一个复杂的过程, 涉及到多种癌基因的激活、抑癌基因的失活以及各种生长因子的作用。目前肿瘤基因治疗的效果并不理想, 单一基因治疗只能作用于肿瘤发生、发展过程中的某一

个环节, 只有相关的基因共同作用才能使肿瘤得以抑制。本实验探讨逆转录病毒介导的野生型 *P53*、*P16* 基因的协同作用, 对人胃癌细胞 HGC27 的抑制效果。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 人未分化胃癌细胞系 HGC 27 购自中科院上海细胞所; 逆转录病毒载体 pLNCX, 携带野生型 P53 基因、P16 基因的逆转录病毒载体由本室构建并保存; RNA 提取试剂盒为 GIBCO 产品; Lipofectamine 购自 Invitrogen 公司; Genecitin 为 GIBCO 公司产品; 限制性内切酶 Hind III、Cla I、DNA 连接试剂盒购自宝生物工程(大连)公司, PCR 引物合成及 DNA 测序由宝生物工程(大连)公司完成。

### 1.2 方法

**1.2.1 野生型 P53-P16 基因逆转录病毒载体构建** 自正常人外周血细胞中提取出总 RNA, 反转录为 cDNA, 用引物 5'-ccaagcttatggagccttcggctgac-3' 和 5'-ccatcgatcaatcgggatgtctgag-3' 扩增出 P16 基因 cDNA, 参考文献 [1] 方法构建野生型 P53-P16 基因载体, 并测序证明。

**1.2.2 细胞转染** 采用脂质体转染法, 分别将野生型 P53 基因载体、P16 基因载体、P53-P16 基因载体和空载体转入未分化胃癌细胞系 HGC27, 转染后 36 h 加入 G418(200  $\mu$ g/ml) 筛选, 抗性细胞继续培养扩增。

**1.2.3 Southern 杂交** 参照 Sambrook 等 [2] 的方法, 提取胃癌 HGC27 细胞基因组 DNA, 经 EcoRI 酶切后转移至至尼龙膜上, 以 Neo 为探针进行杂交。

**1.2.4 细胞生长曲线** 在 24 孔板中向每孔加入  $1 \times 10^4$  个 HGC27, HGC-pLNCX, HGC-pLNCX-p53, HGC-pLNCX-p16, HGC-pLNCX-p53-p16 细胞, 每隔 24 h 台盼蓝染色计数 3 孔内活细胞数, 连续 7 d, 绘制生长曲线。

**1.2.5 MTT 法检测细胞生长抑制率** 分别在 96 孔板中每孔加入  $2 \times 10^4$  个 HGC27, HGC-pLNCX, HGC-pLNCX-p53, HGC-pLNCX-p16, HGC-pLNCX-p53-p16 细胞, 第 3 d 加入浓度为 5 mg/ml 的 MTT 液 20  $\mu$ l, 37  $^{\circ}$ C 作用 4 h, 弃 MTT 液, 每孔加入盐酸异丙醇 200  $\mu$ l, 然后用酶标仪测定 OD 值。

**1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡** 收集  $1 \times 10^6$  细胞, 70% 乙醇固定, 加 1 ml PI 染液置暗处染色 30 min, 细网过滤, 于流式细胞仪上进行检测。

## 2 结 果

**2.1 Southern 杂交** 证实外源基因片段已整合到未分化胃癌 HGC27 细胞基因组。

**2.2 HGC27 细胞生长曲线** 图 1 可见单独转染 P53、P16 基因及联合转染 P53、P16 基因的细胞生长变慢, 倍增时间延长。

**2.3 MTT 生长抑制率** P53、P16 基因联合转染能抑制细胞生长 (69.8%); 其对细胞生长抑制作用高于单独转染 P53、P16 基因 (43.9%; 48.6%;  $P < 0.01$ )。见图 2。

**2.4 细胞凋亡的检测流式细胞仪检测** 分别转染 HGC-pLNCX, HGC-pLNCX-p53, HGC-pLNCX-p16, HGC-pLNCX-p53-p16 的细胞, 结果表明, 后 3 种方式的转染均能引起 HGC27 细胞出现不同程度的凋亡峰。与单独转染 P53、P16 基因所引起的凋亡峰相比, 联合转染 P53、P16 基因所引起的凋亡峰更为明显。表明 P53、P16 基因诱导 HGC27 细胞凋亡时互为协同作用。(图 3)

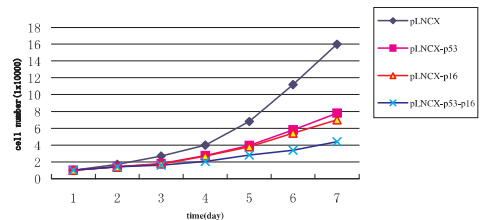


图 1 不同转染细胞生长曲线

Figure 1 Growth curve of different transform cells

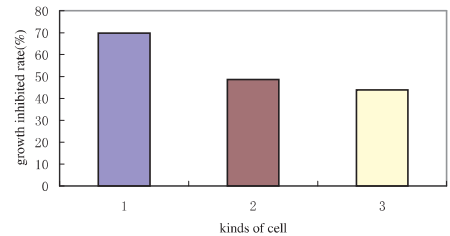


图 2 pLNCX-p16 细胞生长抑制线. 1: 转染 pLNCX-p53-p16; 2: 转染 pLNCX-p53; 3: 转染 pLNCX-p16

Figure 2 Inhibited curve of cells growth

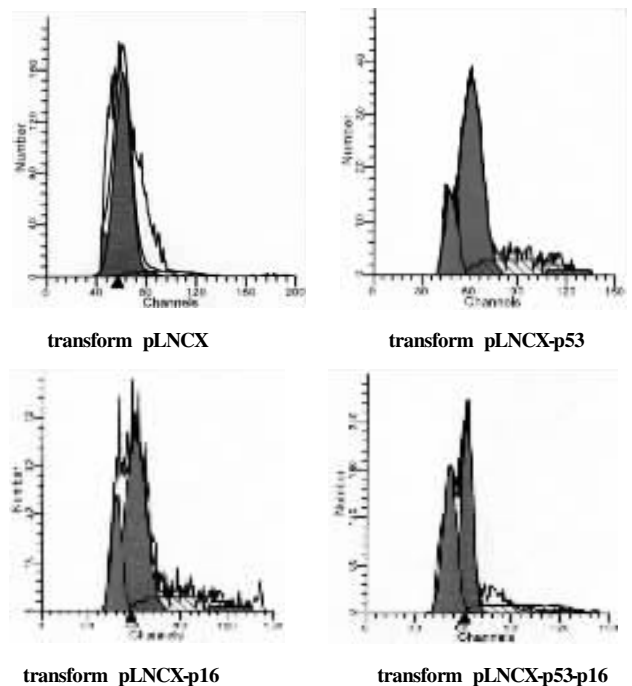


图 3 流式细胞仪检测细胞凋亡

Figure 3 Cell apoptosis

### 3 讨论

胃癌的发生源于多基因异常, 抑癌基因的缺失和(或)突变是导致胃癌发生的重要原因。*P53*、*P16* 基因都是非常重要的抑癌基因。*P53* 蛋白控制与细胞周期相关的基因的表达<sup>[3]</sup>, 在 DNA 受到损伤时, *P53* 蛋白在细胞核内积累, 将细胞周期阻滞于 G<sub>1</sub> 期, 使 DNA 进行修复; 如 DNA 修复失败, 则启动细胞凋亡。*P16* 蛋白作为细胞周期的抑制因子, 通过抑制 cyclin 与 cdk4/cdk6 结合而阻止 Rb 蛋白磷酸化, 进而抑制一些与细胞增殖相关的基因的表达, 最终抑制细胞增殖<sup>[4]</sup>。本实验在细胞水平单独和联合应用野生型抑癌基因 *P53*、*P16*, 观察单独和联合应用 *P53*、*P16* 基因的抑癌作用的大小, 以探索抑癌基因治疗胃癌的可能性和大小。

细胞水平及动物体内的许多研究表明<sup>[1-5]</sup>, 单独运用病毒或非病毒载体的正常的外源抑癌基因 *P53*、*P16* 具有明显的抑制肿瘤的效果, 本实验与文献结果相一致。逆转录病毒载体介导的野生型 *P53*、*P16* 基因, 均可抑制胃癌细胞 HGC27 的生长, 促进细胞凋亡。对 *P53*、*P16* 基因联合共转染与单独转染进行比较, 发现共转染可显著抑制胃癌细胞 HGC 的生长, 并促进凋亡。*P53*、*P16* 基因具有协调增强作用, 此种协同作用的机制可能与两种基因通过不同途径在细胞

周期中共同起负调控作用有关。总之, 通过本实验观察抑癌基因 *P53*、*P16*, 以及 *P53* 与 *P16* 联合对胃癌细胞系的转基因治疗效果, 可能为今后人类胃癌基因治疗提供有意义的实验资料。

### 参考文献:

- [1] Jin X, Nguyen D, Zhang WW, *et al.* Cell cycle arrest and inhibition of tumor cell proliferation by the p16INK4 gene mediated by an adenovirus vector[J]. *Cancer Res*, 1995, 15: 3 250-3 253
- [2] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning, A Laboratory Manual(2nd ed) [M]. Cold Spring Laboratory Press, New York, 1989.
- [3] Nielsen LL, Lipari P, Dell J, *et al.* Adenovirus-mediated p53 gene therapy and paclitaxel have synergistic efficacy in models of human head and neck, ovarian, prostate and breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4: 835-846.
- [4] Schmidt EE, Ichimura K, Reifenger G, *et al.* CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas[J]. *Cancer Res*, 1994, 54: 6 321-6 324.
- [5] Wang TJ, Huang MS, Hong CY, *et al.* Comparisons of tumor suppressor p53, p21, and p16 gene therapy effects on glioblastoma tumorigenicity in situ[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 287: 173-180.

(上接 343 页)

的抗氧化功。

综上所述, 在氧化损伤的防护过程, 是一个复杂的过程, 抗氧化亦是多种类抗氧化剂的联合作用过程, 其中大剂量是关键。

### 参考文献:

- [1] Hai CX. Investigation of Synergistic action of antioxidants and the traditional Chinese medicine[A]. In: National foundation committee CSTA Life Science and Biotechnology [M]. Beijing publishing Co. of CSTA, 1998. 324-327.
- [2] Hai CX, Zhang WQ, Gong SM, *et al.* Effect of antioxidant of vitamin A, vitamin C and vitamin E in microsomal model Department life science in NNSF[A]. In: The first seminar of younger's biologic academic <NNSFC> [M]. Beijing: publishing Co. of Chinese Agriculture, 1993. 149-150.
- [3] Tian SL, Bing WG, FenBiao, *et al.* Transformation of the

content of free radical and lipidl. peroxidation in vivo of rat irradiated by X-ray[J]. *Baiqien medical university*, 1995, 21(3): 252-254.

- [4] Qian PP, Cheng SQ, Guo JS, *et al.* Effect of vitamin C and vitamin E on unenzymic Glycation and peroxidate action in rat with diabetes[J]. *Med Res*, 2000, 29(4): 226-228.
- [5] Sun CP. An Introduction of Free Radical's Biology [M]. Beijing: publishing Co. of Chinese scientific and technological university, 1994. 04.
- [6] Eberlein KB, Fesq H, Abeck D, *et al.* Systemic vitamin C and vitamin E do not prevent photoprovocation test reactions in polymorphous light eruption[J]. *Photodermatol photoimmunol Photomed*, 2000, 16(2): 50-52.
- [7] Umegaki K, Sano M, Suzuki K, *et al.* Increases in 4-hydroxynonenal and hexanal in bone marrow of rats subjected to total body X-ray irradiation: association with antioxidant vitamins[J]. *Bone Marrow Transplant*, 1999, 23(2): 173-179.