

[文章编号] 1000-4718(2007)10-2039-03

人突变 p27 基因对大肠癌细胞生物学行为的影响*

陈 珺¹, 徐少勇¹, 邓长生², 王家宁¹, 黄云章¹(¹ 郧阳医学院附属人民医院消化内科, 湖北 十堰 442000; ² 武汉大学中南医院消化内科, 湖北 武汉 430071)

[摘要] 目的: 观察人突变 p27 基因(p27mt)对人大肠癌细胞生长的影响, 探讨 p27mt 基因在大肠癌基因治疗中的作用及可能机制。方法: 以携带突变 p27 基因复制缺陷型腺病毒(Ad-p27mt)为载体, 转染大肠癌细胞 SW480; Western blotting 方法检测 p27mt 蛋白的表达; 细胞计数法检测 p27mt 对 SW480 细胞生长的抑制作用; 用流式细胞仪检测细胞周期; 用 DNA 片段分析法检测细胞凋亡。结果: Ad-p27mt 转染 SW480 细胞后, p27 在细胞中出现了蛋白高表达; 77.96% 的细胞阻滞于 G₀/G₁ 期, 而 Ad-LacZ 组及空白对照组分别为 27.57% 和 25.29%; 生长曲线显示 Ad-p27mt 对细胞生长有明显的抑制作用; DNA 片段分析示 p27mt 基因可诱导细胞的凋亡。结论: p27mt 对细胞周期有明显的阻滞作用, 主要阻滞于 G₀/G₁ 期; p27mt 基因对细胞的生长抑制机制与诱导细胞凋亡和细胞周期的阻滞有关。

[关键词] 结直肠肿瘤; 基因, p27mt; 细胞凋亡; 细胞周期

[中图分类号] R735.3 [文献标识码] A

Influence of human mutant p27 gene on the biological behaviors of colorectal cancer cells

CHEN Jun¹, XU Shao-yong¹, DENG Chang-sheng², WANG Jia-ning¹, HUANG Yun-zhang¹(¹ Department of Gastroenterology, People's Hospital, Yunyang Medical College, Shiyan 442000, China; ² Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China. E-mail: sycj@sycatv.net)

[ABSTRACT] **AIM:** To observe the influence of human mutant p27 gene (p27mt) on the growth and so as to investigate the function and mechanism of p27mt in gene therapy for colorectal cancer. **METHODS:** Colorectal cancer cell line SW480 was infected with recombinant replication defective adenovirus Ad-p27mt, and expression of p27mt protein was detected by Western blotting. The inhibitory effect of p27mt on SW480 and cell cycle were determined by flow cytometry, and DNA fragment was analyzed to identify the occurrence of apoptosis. **RESULTS:** After transfected with Ad-p27mt, p27 protein was highly expressed in SW480 cells. 77.96% colorectal cancer cells were blocked in phase G₀/G₁, while in Ad-LacZ group and blank control group, 27.57% and 25.29% cells were blocked in the same phase, respectively. Growth curve showed Ad-p27mt had an obviously inhibitory effect on the growth of SW480 cells. DNA fragment assay demonstrated that p27mt was able to induce the apoptosis of colorectal cancer cells. **CONCLUSION:** p27mt has an obvious blocking effect on colorectal cancer cell cycle, and most cells are blocked in phase G₀/G₁. This blockage is related with the growth inhibition and apoptosis induced by p27mt.

[KEY WORDS] Colorectal neoplasms; Genes, p27mt; Apoptosis; Cell cycle

细胞周期调控失常与肿瘤的形成密切相关^[1]。大肠癌的基因治疗探索新途径。p27 主要对细胞周期进行负性调控, 而抑制细胞的增殖和肿瘤形成^[2]。本研究以腺病毒为载体, 构建含人突变 p27 (p27mt) 基因的重组腺病毒, 用以研究 p27mt 基因对大肠癌细胞周期及生长的影响, 旨在为

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 细胞与试剂 Ad-p27mt 及 LacZ 重组腺病毒

[收稿日期] 2006-03-15 [修回日期] 2006-07-05

* [基金项目] 湖北省自然科学基金资助项目 (No. 2003ABA193)

Tel: 0719-8637524; E-mail: sycj@sycatv.net

(Ad-LacZ)均由本科构建^[3]。小鼠抗人 p27kip1 单抗为 Santa Cruz 公司产品,辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 单克隆抗体购自北京中山公司。SW480 细胞购自武汉大学典型物保藏中心。Western blotting 试剂盒为美国 KPL 公司的产品。

2 方法

2.1 SW480 细胞的培养 人大肠癌细胞株 SW480 用含 10% FCS、RPMI-1640 培养基 37℃、5% CO₂ 孵箱内培养。

2.2 p27mt 蛋白的 Western blotting 检测 分别用 Ad-p27mt (MOI 50) 和 Ad-LacZ (MOI 50) 转染 SW480 细胞,48 h 后收集细胞。用 500 μL 的细胞裂解液裂解后,离心取上清,行 Western blotting 检测^[4]。

2.3 细胞周期分析 用 Ad-p27mt (MOI 50) 转染 SW480 细胞 48 h 后,收集细胞调整浓度至 10⁹ cells/L。取 100 μL 细胞悬液,经 PI 染色 15 min 后,在 Coulter Epics XL 流式细胞仪上检测,分析细胞周期。对照组以加 Ad-LacZ (MOI 50) 和不加病毒组。

2.4 绘制生长曲线 收集培养好的 SW480 细胞,用无血清的 RPMI-1640 培养基制成 1 × 10⁷ cells/L 细胞悬液,接种到 24 孔培养板上,24 h 后分别用 Ad-p27mt 和 Ad-LacZ (MOI 50) 转染,4 h 后换为含 10% FCS 的培养基培养。分别于 0、24、48、72、96、120 h 每组取出 3 孔细胞,用细胞计数板计数,计算其均值。绘制生长曲线。

2.5 细胞凋亡的 DNA 片段分析 用 Ad-p27mt (MOI 50) 转染大肠癌细胞 SW480,同时设 Ad-LacZ 组和不加病毒对照组。24 h 后分别收集细胞,再经酚、氯仿抽提。1% 琼脂糖凝胶电泳,在紫外光下观察。

3 统计学处理

用 Student's *t* 检验和方差分析计算组间差异。

结 果

1 p27mt 对细胞周期的影响

SW480 细胞经不同处理 24 h 后,流式细胞仪检测结果见表 1,从中可以看出 Ad-LacZ 组与空白对照组 G₀/G₁ 细胞比例较少,S 期细胞比例较高,表明细胞增殖活跃。而 Ad-p27mt 组,G₀/G₁ 期细胞比例显著增高,S 期比例下降,与正常对照组和 Ad-LacZ 组均有显著差异 (*P* < 0.01),细胞被阻滞于 G₀/G₁ 期。

2 p27mt 基因对 SW480 细胞增殖的影响

Ad-p27mt (MOI 50) 转染 SW480,24、48、72、96h 及 120h 后的细胞数均明显低于 Ad-LacZ 组和不加病毒组(图 1)。

表 1 Ad-p27mt 对 SW480 细胞周期的作用

Tab 1 The influence of Ad-p27mt on cell cycle of SW480 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Group	G ₁ /G ₀	S	G ₂ /M
Blank control	25.29 ± 1.04	41.12 ± 1.19	33.34 ± 1.55
Ad-LacZ	27.57 ± 0.45 *	41.12 ± 0.44 *	31.22 ± 0.92 *
Ad-p27mt	77.96 ± 2.20 **	8.98 ± 0.17 **	13.06 ± 2.35 **

* *P* > 0.05 vs blank control group; ** *P* < 0.01 vs Ad-LacZ group and control group.

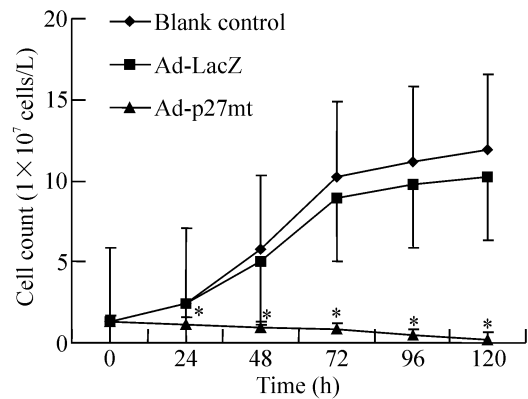


Fig 1 The growth curve of SW480. $\bar{x} \pm s, n=3$. * *P* < 0.01 vs Ad-LacZ group and control group.

图 1 SW480 细胞在不同条件下生长曲线

3 p27mt 基因对 SW480 细胞凋亡的影响

DNA 片段分析显示,Ad-LacZ 组和不加病毒组无凋亡特征的梯带,而 Ad-p27mt 组出现了梯带(图 2)。表明 p27mt 具有诱导 SW480 细胞凋亡的作用。

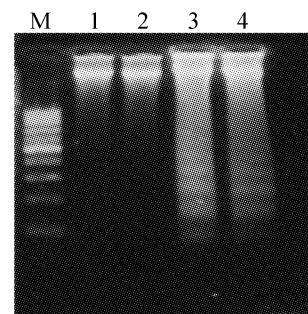


Fig 2 Apoptosis of DNA fragment assay. M: marker; 1: blank control group; 2: Ad-LacZ group; 3, 4: Ad-p27mt group.

图 2 DNA 片段分析细胞的凋亡

讨 论

p27 具有广泛的生物学功能,不仅抑制肿瘤的生

长,促进其凋亡^[5,6],还可调节实体瘤的耐药性^[7],防止炎症对机体的损伤^[8]。p27 最主要功能是抑制细胞增殖^[2]。当 p27 的蛋白表达水平降低时,p27 就会对细胞 G₁/S 期调控点失去监控,含有 DNA 损伤的细胞就会进入 S 期,造成基因的突变,缺失等,进而导致癌变的发生^[9],因而,p27 被认为是一种抑癌基因。

p27 蛋白的降解主要是由泛素介导的 187 位苏氨酸磷酸化引起的^[10]。Kudo 等^[11]发现将 187 位的苏氨酸置换成丙氨酸,p27 蛋白将不被泛素激活,p27 蛋白降解明显降低。Jean 等^[12]将 p27 转染 HeyC₂ 细胞,发现细胞生长明显抑制。并且证明突变 p27 比野生型 p27 抑制作用更强。通过蛋白分析发现 p27 蛋白中 187 - 190 位保留羧基末端(COOH - terminal)是 CDK 的目标磷酸化位点,本实验将野生型 p27 的 187 位苏氨酸和 188 位的脯氨酸分别置换成蛋氨酸和异亮氨酸,产生了突变 p27mt。构建携带 p27mt 的复制缺陷重组腺病毒,用以转染大肠癌细胞株 SW480,研究 p27mt 对大肠癌细胞的生长抑制和促凋亡作用。

Park 等^[13]构建野生型 p27 腺病毒(Ad - p27wt)和突变型 p27 腺病毒(Ad - p27mt),同时转染肺癌细胞,证明了 p27mt 和 p27wt(即本文所说的 p27)对肺癌细胞均表现为抑制作用,均阻滞细胞于 G₀/G₁ 期。本实验将 p27mt 基因导入 SW480 后,通过免疫印迹分析,p27mt 在 SW480 内出现了蛋白的高表达。这种高表达证明 p27mt 蛋白发生了聚集。流式细胞仪检测发现,p27mt 转入 SW480 细胞 24 h 后, G₀/G₁ 期细胞达 77.96%,而空白对照组和 Ad - LacZ 组分别为 25.29% 和 27.57%。说明 p27mt 表达的蛋白能高效阻滞细胞于 G₀/G₁ 期,并且这种阻滞并非由腺病毒载体所引起。推测其机制可能为 p27mt 蛋白直接抑制了 Cyclin - CDK 激酶活性,而该激酶是细胞通过 G₁ - S 点的最关键因素。DNA 片段分析显示 p27mt 能明显诱导细胞凋亡。通过绘制生长曲线发现,p27mt 能显著抑制细胞的生长,其机制与细胞周期的阻滞和诱导细胞凋亡有关。

[参 考 文 献]

[1] 韩际奥,陈其奎,黄志清,等. 阿司匹林对胰腺癌细胞周期的影响及其机制[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(2): 368 - 371.

[2] Nan KJ, Jing Z, Gong L. Expression and altered subcellular localization of the cyclin - dependent kinase inhibitor

p27(Kip1) in hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(10): 1425 - 1430.

- [3] 陈 珺,徐少勇,邓长生,等. 细菌内同源重组高效制备人突变 p27 基因重组腺病毒[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(5): 406 - 409.
- [4] Chen J, Xu SY, Deng CS, et al. Expression of constructed human mutant p27gene recombinant adenovirus in colon cancer cell line SW480[J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2005, 9(2): 240 - 242.
- [5] Kalinichenko VV, Major ML, Wang X, et al. Foxmlb transcription factor is essential for development of hepatocellular carcinomas and is negatively regulated by the p19ARF tumor suppressor[J]. Genes Dev, 2004, 18(7): 830 - 850.
- [6] Fan G, Ma X, Wong PY, et al. p53 dephosphorylation and p21(Cip1/Waf1) translocation correlate with caspase - 3 activation in TGF - beta1 - induced apoptosis of HuH - 7 cells[J]. Apoptosis, 2004, 9(2): 211 - 221.
- [7] Kortylewski M, Komyod W, Kauffmann ME, et al. Interferon - gamma - mediated growth regulation of melanoma cells: involvement of STAT1 - dependent and STA1 - independent signals[J]. J Invest Dermatol, 2004, 122(2): 414 - 422.
- [8] Abraham NG, Kushida T, McClung J, et al. Heme oxygenase - 1 attenuates glucose - mediated cell growth arrest and apoptosis in human microvessel endothelial cells[J]. Circ Res, 2003, 93(6): 507 - 514.
- [9] Oda Y, Takahira T, Kawaguchi K, et al. Altered expression of cell cycle regulators in myxofibrosarcoma, with special emphasis on their prognostic implications[J]. Hum Pathol, 2003, 34(10): 1035 - 1042.
- [10] Takeda A, Osaki M, Adachi K, et al. Role of the phosphatidylinositol 3' - kinase - Akt signal pathway in the proliferation of human pancreatic ductal carcinoma cell lines[J]. Pancreas, 2004, 28(3): 353 - 358.
- [11] Kudo Y, Kitajima S, Sato S, et al. Transfection of p27(Kip1)threonine residue 187 mutant type gene, which is not influenced by ubiquitin - mediated degradation, induces cell cycle arrest in oral squamous cell carcinoma cell[J]. Oncology, 2002, 63(4): 398 - 404.
- [12] Jean A, Hurteau MD, Susan A, et al. Over expression of a stabilized Mutant form of the cyclin - dependent kinase inhibitor p27kip1 inhibits cell growth[J]. Gynecol Oncol, 2002, 86(5): 19 - 23.
- [13] Park KH, Seol JY, Kim TY, et al. An adenovirus expressing mutant p27 showed more potent antitumor effects than adenovirus - p27 wild type[J]. Cancer Res, 2001, 61(16): 6163 - 6169.