

# $p15^{INK4B}$ 基因转染对人食管鳞癌细胞 EC109 增殖的抑制作用

张学彦, 刘铁夫, 于 畅, 刘 伟, 崔希威

张学彦, 哈尔滨医科大学附属二院消化科 黑龙江省哈尔滨市 150086  
刘铁夫, 哈尔滨医科大学附属一院消化科 黑龙江省哈尔滨市 150000  
于 畅, 哈尔滨医科大学遗传学教研室 黑龙江省哈尔滨市 150086  
刘伟, 哈尔滨医科大学附属二院分子实验中心 黑龙江省哈尔滨市 150086  
崔希威, 哈尔滨医科大学附属二院计算机中心 黑龙江省哈尔滨市 150086  
张学彦, 男, 1973-11-18 生, 黑龙江省肇东市人, 汉族, 2001 年哈尔滨医科大学硕士, 2003 年哈尔滨医科大学博士生, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤的防治研究。  
黑龙江省卫生厅科研基金资助项目, No. 2004-117  
通讯作者: 张学彦, 150086, 黑龙江省哈尔滨市学府路 246 号, 哈尔滨医科大学附属二院消化科. zyxw@sina.com  
电话: 0451-86605143 传真: 0451-86695879  
收稿日期: 2005-06-30 接受日期: 2005-07-09

## Inhibitory effect of $p15^{INK4B}$ gene transfection on proliferation of human esophageal squamous cell carcinoma cell line EC109

Xue-Yan Zhang, Tie-Fu Liu, Yang Yu, Wei Liu, Xi-Wei Cui

Xue-Yan Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China  
Tie-Fu Liu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150000, Heilongjiang Province, China  
Yang Yu, Department of Genetics, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China  
Wei Liu, Experimental Center of Molecular Biology, the Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China  
Xi-Wei Cui, Center of Computers, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China  
Supported by the Scientific Research Foundation of the Sanitation Office of Heilongjiang Province, No. 2004-117  
Correspondence to: Xue-Yan Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 246 Xuefu Road, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. zyxw@sina.com  
Received: 2005-06-30 Accepted: 2005-07-09

### Abstract

**AIM:** To investigate the effect of  $p15^{INK4B}$  ( $p15$ ) gene transfection on the proliferation of esophageal squamous cell carcinoma cell line EC109.

**METHODS:** The EC109 cells were divided into 3 groups:  $p15$  transfection group, empty plasmid transfection group and non-transfection group. pCDNA3.1(+)- $p15$  and pCDNA3.1(+)-neo plasmid were transfected into EC109 cells using Lipofectamine2000. The expression of exogenous  $p15$  gene and P15 protein were detected by polymerase chain reaction (PCR) and western blot, respectively. The proliferation and apoptosis of the EC109 cells were

examined by MTT, colony formation assay, flow cytometry and transmission electron microscope.

**RESULTS:** After transfection,  $p15$  gene cDNA was expressed in the cells of  $p15$  transfection group, and P15 protein was expressed at a high level. The cell growth was inhibited, and the colony formation was significantly decreased in EC109- $p15$  cells as compared with that in the cells of empty plasmid transfection or non-transfection group ( $20.8 \pm 1.3\%$  vs  $54.3 \pm 3.2\%$ ,  $56.8 \pm 2.3\%$ ,  $P < 0.01$ ). EC109- $p15$  cells arrested at G<sub>1</sub>/S phase, and the population of the cells in G<sub>1</sub> phase was significantly increased as compared with that in the cells of empty plasmid transfection group or Non-transfection group ( $62.45 \pm 7.08\%$  vs  $38.02 \pm 5.83\%$ ,  $34.45 \pm 1.05\%$ ,  $P < 0.01$ ). However, the number of the cells in S phase was significantly decreased ( $21.12 \pm 1.31\%$  vs  $35.50 \pm 2.38\%$ ,  $36.30 \pm 0.69\%$ ,  $P < 0.01$ ), and a Sub G<sub>1</sub> peak (apoptosis peak) appeared. Under electron microscope, typical features of apoptosis were observed in EC109- $p15$  cells.

**CONCLUSION:**  $p15$  gene transfection can not only inhibit the proliferation of EC109 cells, but also induce the apoptosis of the cells *in vitro*.

**Key Words:**  $p15^{INK4B}$ ; Gene transfection; Esophageal squamous cell carcinoma cell

Zhang XY, Liu TF, Yu Y, Liu W, Cui XW. Inhibitory effect of  $p15^{INK4B}$  gene transfection on proliferation of human esophageal squamous cell carcinoma cell line EC109. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005; 13(16):1945-1950

### 摘要

**目的:** 探讨  $p15^{INK4B}$  ( $p15$ ) 基因转染对食管鳞癌细胞系 EC109 细胞增殖的影响。

**方法:** 根据转染质粒的不同和是否进行质粒转染分为 3 组:  $p15$  转染组, 空载体转染组, 未转染组。应用 PCR 检测外源性  $p15$  基因, Western blot 方法检测转染细胞的 P15 蛋白变化; 流式细胞仪分析细胞周期变化, 应用 MTT、集落形成实验、流式细胞仪和透射电镜检测转染外源  $p15$  基因对 EC109 细胞增殖和凋亡的影响。

**结果:**  $p15$  转染细胞存在外源  $p15$  基因, 并有 P15 蛋白高表达; EC109- $p15$  细胞生长速度低于对照细胞

EC109-空载体组和未转染组, 集落形成率显著低于对照细胞EC109-空载体组和未转染组( $20.8 \pm 1.3\%$  vs  $54.3 \pm 3.2\%$ ,  $56.8 \pm 2.3\%$ ,  $P < 0.01$ ); 流式细胞仪观察到P15蛋白高表达使EC109细胞发生G<sub>1</sub>/S阻滞, G<sub>1</sub>期细胞比例显著高于空载体组和未转染组( $62.4 \pm 7.1\%$  vs  $38.0 \pm 5.8\%$ ,  $34.4 \pm 1.0\%$ ,  $P < 0.01$ ), S期比例显著低于空载体组和未转染组( $21.1 \pm 1.3\%$  vs  $35.5 \pm 2.4\%$ ,  $36.3 \pm 0.7\%$ ,  $P < 0.01$ ), 并出现亚G<sub>1</sub>峰(凋亡峰). 透射电镜亦发现p15转染组发生细胞凋亡.

**结论:** p15基因转染可以抑制人食管鳞癌细胞系EC109细胞增殖并能诱导其发生细胞凋亡.

**关键词:** p15<sup>INK4B</sup>; 基因转染; 食管鳞癌

张学彦, 刘铁夫, 于咏, 刘伟, 崔希威. p15<sup>INK4B</sup>基因转染对人食管鳞癌细胞EC109增殖的抑制作用. 世界华人消化杂志 2005;13(16):1945-1950  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1945.asp>

## 0 引言

p15是近年来发现的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclin-dependent kinase inhibitors, CKI)家族中的一个新成员. 已经证实p15失活与食管癌发病有关, 他影响CKI级联反应和DNA错配修复过程<sup>[1]</sup>. p15是食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)发生过程中经常失活的靶基因. 为探讨恢复p15表达是否有抑制人食管鳞癌细胞增殖的作用, 我们采用脂质体介导的基因转染技术, 将p15转染到人食管鳞癌细胞系EC109中, 以研究其对食管鳞癌细胞生长的影响.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 真核表达质粒pCMV5-p15由北京师范大学生命科学学院-教育部细胞增殖与调控重点实验室柳惠图教授惠赠. pCDNA3.1(+)空载体质粒由哈尔滨医科大学附属二院检验科任蕾硕士惠赠. EC109细胞株购自中国科学院上海细胞所. Trizol试剂盒是Gibco公司产品, Taq酶为上海生工公司产品, 逆转录试剂盒、限制性内切酶、转染级质粒中提试剂盒是Promega公司产品. p15小鼠抗人mAb是Neo Markers公司产品, 辣根酶标山羊抗小鼠IgG为北京中杉金桥公司产品. actin beta(ACTB)抗体和Western Blotting发光试剂是Santa Cruz公司产品. 脂质体Lipofectamine2000购于Invitrogen公司. T4连接酶是MBI公司产品. 凝胶回收试剂盒是上海博亚公司产品. 引物由上海生工公司和捷倍思公司合成. 上海博亚公司进行质粒测序. 人食管癌EC109细胞系在37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>饱和湿度条件下, 用含100 mL/L胎牛血清的DMEM高糖培养基培养传代, 取对数生长期细胞进行相关实验. 因为pCMV5

无真核筛选标志, 故将之克隆到有真核筛选标志新霉素抗性基因(neo)的pCDNA3.1(+)上. 设计特异PCR引物序列如下: 上游: 5' -AGCAAGCTTATGCGCGAGGAGAACA-3', 下游: 5' -AGAGTCTAGATCAGTCCCCCGTGGC-3'. 用高保真Taq酶对pCMV-p15进行PCR扩增, PCR产物经琼脂糖凝胶电泳, 凝胶回收试剂盒回收. 对此PCR产物和pCDNA3.1(+)空载体进行Hind III, Xba I双酶切, 琼脂糖凝胶电泳, 回收酶切产物, 使用T4 DNA连接酶连接p15目的片段和pCDNA3.1(+)载体. 将连接产物转化感受态大肠杆菌DH5α, 挑取单克隆, PCR鉴定后用pCDNA3.1(+)载体的测序引物T7测序.

### 1.2 方法

**1.2.1 RT-PCR检测EC109细胞p15mRNA表达** 用Trizol试剂盒提取细胞总RNA. 逆转录cDNA第一链合成: 反应体系20 μL, 含随机引物0.5 μg, 逆转录酶200 U, RNA 1.0 μg, dNTP 0.5 mmol/L, RNasin 20U, 37℃ 60 min, 95℃ 5 min. PCR反应: 反应体系25 μL, 含Mg<sup>2+</sup> 2.5 mmol/L, dNTP 0.5 mmol/L, cDNA 2 μL, TaqDNA合成酶2 U, 上下游引物各0.4 μmol/L, p15引物(退火58℃, 产物753 bp): 上游5' -CCAGAAGCAATCCAGGCGCG-3', 下游: 5' -CGTTGGCAGCCTTCATCG-3'. β-actin引物(退火57℃, 产物301 bp): 上游5' -TCCTCCTGAGCGCAAGTAC-3', 下游5' -GTCACCTTCACCGTTCCAG-3'. 反应35个循环. 产物经12 g/L琼脂糖凝胶电泳, 照相. 以表达p15的HeLa细胞为阳性对照.

**1.2.2 基因转染** 根据转染质粒的不同和是否进行质粒转染分为3组, 每组3个样本. p15转染组: 采用Lipofectamine2000脂质体介导转染, 将pCDNA3.1(+) -p15真核表达质粒导入EC109细胞; 空载体转染组: 用pCDNA3.1(+) -neo空载体以上述相同方法转染, 作为阴性对照; 未转染组: 不进行转染的同期培养的EC109细胞, 作为空白对照. 转染方法按照Lipofectamine2000说明书进行. 采用6孔板转染细胞, 每孔用2 mL无抗生素生长培养基含 $5 \times 10^5$ 个细胞制板, 每孔用5 μg DNA, 15 μL Lipofectamine2000. 转染48 h后加入G418终浓度为400 mg/L的选择培养基. 每2-4 d更换培养基, 4 wk后挑选阳性克隆扩大培养. 转染细胞外源p15基因检测: (1) PCR检测外源p15基因. 常规酚/氯仿法提取细胞总DNA为模板, 设计针对转染质粒p15基因引物, 序列如下: 上游: 5' -ATGCGCGAGGAGAACAAGG-3', 下游: 5' -TAGATCAGTCCCCGTGGC-3'. 进行PCR(退火59℃). (2) Western blot检测外源P15蛋白. 提取细胞总蛋白, 用Bradford法定量. 5%积层胶、120 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 进行一抗、酶标二抗孵育和显色, 并照相. 以表达P15蛋白的HeLa细胞为阳性对照.

1.2.3 转染细胞生长特性 (1)取对数生长期细胞按 $3 \times 10^6$ /L 接种 96 孔板, 每孔加入 MTT 溶液 (5 g/L) 20  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 温育 4 h, 每孔加入二甲基亚砜 180  $\mu$ L, 振荡 10 min, 选 490 nm 波长, 在酶标仪上测定吸光度值, 每隔 24 h 测定 1 次, 连续测定 7 d, 绘制细胞生长曲线, 计算生长抑制率. 生长抑制率 = (对照组 A 值 - 实验组 A 值) / 对照组 A 值  $\times$  100%. (2)取各组细胞按 4 000 个细胞 / 孔接种于含 3 g/L 软琼脂的 DMEM 培养基中, 每种细胞 3 个孔. 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下培养, 2 wk 后在低倍镜下计数克隆数. 集落形成率 = 细胞集落数 / 接种细胞数  $\times$  100%. (3)取各组细胞, 每组  $1 \times 10^6$  个细胞, 用磷酸缓冲液 (PBS) 洗 2 次, 加入 700 mL/L 冷乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定 24 h, PBS 洗 2 次, 用 RNA 酶 (50 mg/L) 于 37 $^{\circ}$ C 处理 30 min, 加碘化丙啶 (100 mg/L) 染色, 避光 30 min, 进行流式细胞仪测定. (4)取各组细胞, 每组  $1 \times 10^6$  个细胞, 用 PBS 洗 2 次, 1 500 r/min 离心 10 min, 加入 30 g/L 戊二醛固定 1 wk, 按常规制备电镜标本, 送透射电镜检测.

**统计学处理** 数据以 mean  $\pm$  SD 表示, 应用 SPSS-11.0 统计软件, 采用单因素方差分析, 多个均数之间两两比较 *q* 检验.

## 2 结果

2.1 *p15* 真核表达质粒的亚克隆 亚克隆得到 pCDNA3.1 (+)-*p15* 重组质粒, PCR 鉴定得到 421 目的片段 (图 1), 证明已将目的基因克隆入 pCDNA3.1 (+). 双向测序鉴定证明 pCDNA3.1 (+) 中插入片段与人 *p15*mRNA (cDNA clone MGC:23110 IMAGE:4871014) 编码序列 100% 同源, 无碱基序列突变 (图 2).

```

TTAACTTAAGCTTATGCGCGAGGAGAACAAGGGCATGCCAGTGGGGGCGGCAGCGAT
GAGGGTCTGGCCAGCGCCGCGGCGGGGACTAGTGGAGAAGGTGCGACAGCTCCTG
GAAGCCGGCGCGGATCCCAACGGAGTCAACCGTTTCGGGAGGCGCGGATCCAGGTC
ATGATGATGGGCAGCGCCCGGTGGCGGAGCTGCTGCTGCTCCACGGCGCGGAGCCC
AACTGCGCAGACCCTGCCACTCTCACCCGACCGGTGCATGATGCTGCCCGGGAGGGCT
TCCTGGACACGCTGGTGGTGTGACCCGGGCCGGGGCGCGGCTGGACGTGCGCGATG
CCTGGGGTCTGCTGCCCGTGGACTTGGCCGAGGAGCGGGGCCACCGCGACGTTGCAG
GGTACCTGCGCACAGCCACGGGGGACTGATCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATC
AGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTT
CCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGCTCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCA
TCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCA
AGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG
CTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAG
CGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCCG

```

图 2 pCDNA3.1(+)-*p15* 重组质粒测序结果.

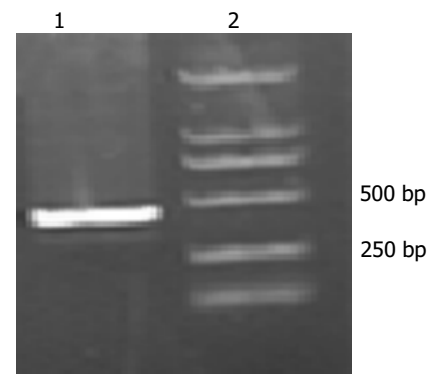


图 1 pCDNA3.1(+)-*p15* 重组质粒 PCR 鉴定. 1: *p15* 重组质粒; 2: Marker DL2000.

2.2 EC109 细胞 *p15* 表达检测 RT-PCR 发现 EC109 细胞 *p15* 基因 mRNA 无表达, 而阳性对照 Hela 细胞有 *p15*mRNA 表达, 证明 EC109 细胞 *p15* 表达缺失, 可用于转染 (图 3).

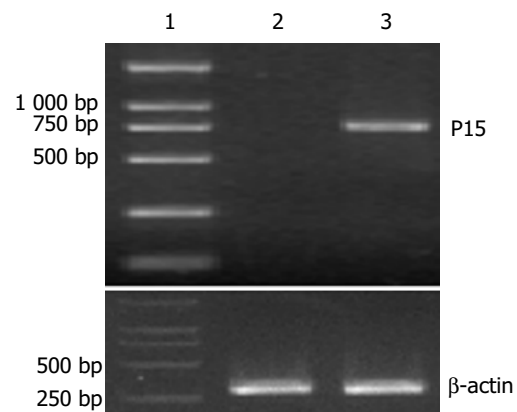


图 3 EC109 细胞 *p15*mRNA 表达情况. 1: Marker DL2000; 2: EC109 细胞; 3: 阳性对照 Hela 细胞.

图 2 pCDNA3.1(+)-*p15* 重组质粒测序结果.

2.3 转染细胞外源性 p15 基因检测 (1)外源性 p15 基因检测. 在 p15 转染细胞中以目的基因检测引物 PCR 扩增得到 421 bp 片段, 空载体转染和未转染组无目的片段, 可证明 p15 已成功转染入受体癌细胞(图 4). (2)外源性 P15 蛋白检测. Western blot 证实 p15 转染组的 EC109 细胞和阳性对照 HeLa 中有 M. 15 000 目的条带, 空载体转染和未转染组无目的条带, 可证明转染的 pCDNA3. 1 (+)-p15 质粒后, P15 蛋白在 EC109 细胞中高表达(图 5).

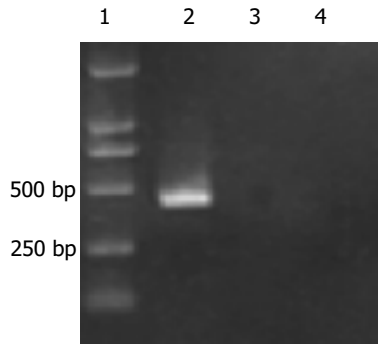


图 4 转染细胞外源性 p15 基因检测. 1: Marker DL2000; 2: p15 转染组; 3: 空载体转染组; 4: 未转染组.

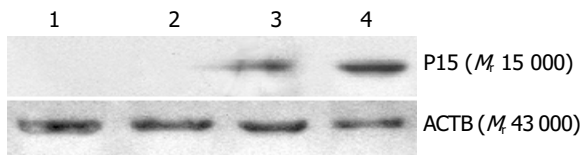


图 5 转染细胞 P15 蛋白检测. 1: 未转染组; 2: 空载体转染组; 3: 阳性对照 HeLa; 4: p15 转染组.

2.4 生长特征 通过比较 3 种细胞的生长曲线, 可以看出空载体转染组和未转染组细胞的生长曲线较为接近, 而 p15 转染组细胞的生长曲线则位于前二者的下方, 说明 neo 转染后其增殖特性未受影响, 细胞在转染 p15 基因后其增殖特性受到抑制. 2 d 增殖开始被抑制, 生长抑制率为 19. 5%, 随时间延长抑制率逐渐升高, 至 7 d 生长抑制率达 50. 4%. p15 转染组细胞的软琼脂集落形成能力与对照组细胞相比显著降低 ( $20. 8 \pm 1. 3\%$  vs  $54. 3 \pm 3. 2\%$ ,  $56. 8 \pm 2. 3\%$ ,  $q = 24. 50, 26. 32, P < 0. 01$ ). 与亲本细胞比较, P15 蛋白高表达使 EC109 细胞发生 G<sub>1</sub>/S 阻滞, G<sub>1</sub> 期细胞比例显著高于空载体组和未转染组 ( $62. 4 \pm 7. 1\%$  vs  $38. 0 \pm 5. 8\%$ ,  $34. 4 \pm 1. 0\%$ ,  $q = 7. 94, 9. 10, P < 0. 01$ ), S 期比例显著低于空载体组和未转染组 ( $21. 1 \pm 1. 3\%$  vs  $35. 5 \pm 2. 4\%$ ,  $36. 3 \pm 0. 7\%$ ,  $q = 15. 39, 16. 24, P < 0. 01$ ), 并出现亚 G<sub>1</sub> 峰(凋亡峰)(图 6).

2.5 透射电镜 空载体转染细胞生长状态较好, 未见凋亡形态学改变, 核浆比例大, 圆形核仁多, 细胞

表面绒毛密集排列, 双层核膜结构清晰, 胞质内有丰富的游离核蛋白体. p15 转染可见部分细胞发生凋亡, 细胞体积变小, 表面绒毛消失, 核固缩, 染色质形成高密度斑块. 细胞内有大量脂滴出现, 胞质内出现大量脂肪滴颗粒, 双层核膜结构清晰, 部分线粒体出现髓样变, 游离核糖体减少(图 7A-B).

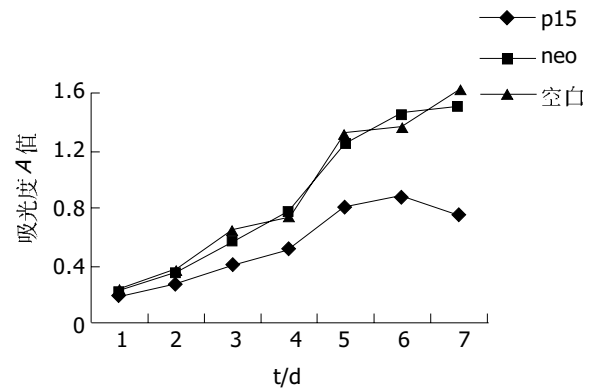


图 6 p15 转染 EC109 细胞生长曲线.

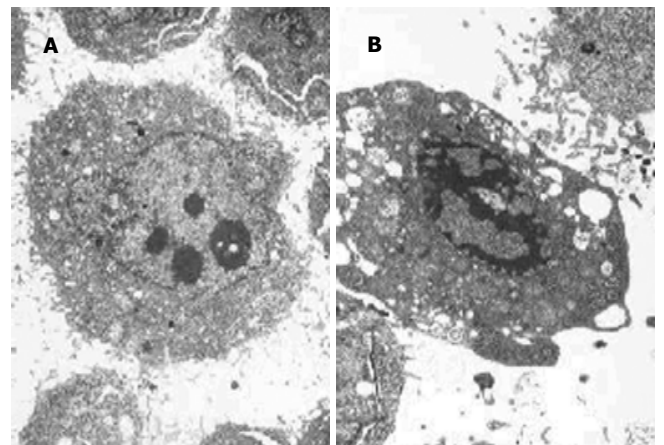


图 7 p15 转染 EC109 细胞超微结构. A: 空载体转染细胞(TEM × 4 000); B: p15 转染细胞(TEM × 8 000).

### 3 讨论

食管癌是最常见的消化系统恶性肿瘤之一<sup>[1-4]</sup>, 我国是世界上食管癌发病率和死亡率高的国家. 鳞癌是最常见的组织学类型<sup>[5]</sup>, 占 90% 以上. 基因治疗是当今攻克癌症的主要研究方向, 探讨食管鳞癌新的基因治疗方法具有重要意义. p15 是近年来发现的一类 CKI 分子, 定位于 9 号染色体 9p21 区, 这一位点是易发生缺失、突变和甲基化, 从而导致恶性肿瘤发生. p15 被认为是除了 p53, Rb 之外的 CKI 类重要抑癌基因<sup>[6]</sup>. p15 的抑癌机制与细胞周期调控密切相关, 能特异地通过直接作用于 cyclinD1/CDK4 复合物中的 cyclinD1, 从而影响 CDK4 激酶的活性, 并导致 pRb 磷酸化水平下降, 使细胞被阻滞在 G<sub>1</sub> 期, 负调细胞周期过程. 癌基因 c-myc 的产物 Myc 与 Max 结合形成一个转录因子,

具有促进细胞转化, 诱导肿瘤发生的作用, P15 高表达能引起 c-Myc 蛋白表达水平下降. P15 高表达同时可引起 *c-fos* 基因的蛋白表达水平的下降. *c-fos* 也是一个重要的原癌基因, 参与形成转录因子 AP-1. AP-1 能激活生长类蛋白基因的转录, 对细胞周期起正调作用<sup>[7]</sup>. 上述机制可能是引起细胞增殖抑制的原因.

p15 失活是引发 ESCC 的重要因素, p15 失活在恶变中所起的重要作用可能与其引起 cyclin-Rb 通路失控和控制细胞增殖的作用丧失直接相关. 此外, 他是细胞外刺激源细胞周期控制途径的中介者. p15 失活可能使细胞对胞外信号不敏感而导致癌的发生<sup>[8-9]</sup>. p15 似乎是 TGF- $\beta$  诱导产生细胞生长阻滞的关键<sup>[10]</sup>. TGF- $\beta$  对上皮细胞有生长抑制作用, 从 TGF- $\beta$  受体到 Smads 再到 p15, 是一条肿瘤抑制通路. 在很多肿瘤中 p15 基因缺失, 这样就丧失了 TGF- $\beta$  诱导的 CDK 抑制因子的抑制作用. Hitomi *et al*<sup>[11]</sup> 认为 p15 是组蛋白去乙酰基 (histone deacetylase, HDAC) 抑制物的重要分子靶点, 而 HDAC 抑制物能将人肿瘤细胞阻滞于 G<sub>1</sub> 期, 并能激活细胞周期依赖激酶抑制物 p21<sup>WAF1</sup>. p15 基因在食管癌中有高频率的纯合缺失<sup>[12]</sup>, 在 ESCC 细胞系中, 55% 显示 p16, p15 和 / 或 9p21 相邻位点有纯合性缺失<sup>[13]</sup>. Tanaka *et al*<sup>[14]</sup> 报道其检测的 30 个细胞系中有 16 个 (53%) 有 p15 纯合缺失, 而没有发现点突变. Xing *et al*<sup>[15]</sup> 发现其检测 ESCC 样本的 50% 发生了 p15 基因改变, 这表明 p15 是 ESCC 发生过程中经常失活的靶基因, p15 纯合缺失是 p15 失活的主要机制, 少数为甲基化.

p15 基因转染于黑色素瘤细胞、肝癌、胆管癌、神经胶质瘤及骨肉瘤细胞均有生长抑制作用<sup>[6-7, 16-21]</sup>. 陈会松 *et al*<sup>[12]</sup> 认为 p15 基因有可能成为癌症基因治疗的新目的基因. 有关 p15 转染对食管鳞癌乃至其他鳞癌细胞增殖是否有抑制作用尚无研究报道. 为证实 p15 基因对人食管鳞癌细胞的抑制作用, 我们将 p15 转染到人食管鳞癌细胞系 EC109 细胞中, 以研究其对食管鳞癌细胞生长的影响.

我们发现 EC109 细胞在转染 p15 基因而产生 P15 蛋白高表达后, 其增殖特性明显受到抑制. 在接种第 2 d 增殖开始被抑制, 随时间延长抑制率逐渐升高, 至第 7 d 与对照组比较生长抑制率达 50.4%. 细胞的软琼脂集落形成能力与对照组细胞相比显著降低. 流式细胞仪检测发现有明显的 G<sub>1</sub>/S, G<sub>2</sub>/M 期阻滞, 出现凋亡特征性的亚 G<sub>1</sub> 峰, 透射电镜亦发现细胞凋亡发生. 关于 p15 转染引起细胞凋亡报道较少, 仅覃扬 *et al* 报道在肝癌细胞转染发现诱导细胞凋亡发生, 机制尚不清楚. 推测原因可能是细胞凋亡多发生于细胞周

期阻滞的细胞群体, 处于 G<sub>1</sub> (或 G<sub>2</sub>) 期阻滞的细胞对细胞凋亡信号敏感性升高. 本研究提示 p15 转染对食管鳞癌有明显的生长抑制作用并能诱导细胞凋亡, 这为食管鳞癌的基因治疗提供了一种新途径, p15 转染的优点是其片段长度小, 克隆和转染操作比较方便, 是具有应用前景的基因治疗的很好的靶基因.

#### 4 参考文献

- 1 胡忠良, 文继舫, 郑晖, 傅春燕. 食管癌组织 TGF $\beta$  表达的意义. 世界华人消化杂志 2004;12:1766-1768
- 2 周海波, 颜云, 李国庆, 丰文宽, 辛桂霞. 食管癌组织中 DPC4 基因的失活. 世界华人消化杂志 2002;10:102-103
- 3 周勇安, 谷仲平, 王线妮, 马群凤. 共聚焦定量分析 WAF1-S 基因表达对人食管癌细胞系 EC109 生长的作用. 世界华人消化杂志 2002;10:628-632
- 4 王立东, 陈虹, 郭丽梅. 肿瘤抑制基因 p53-Rb 系统变化与食管癌变关系研究及展望. 世界华人消化杂志 2001;9:367-371
- 5 Metzger R, Schneider PM, Warnecke-Eberz U, Brabender J, Holscher AH. Molecular biology of esophageal cancer. *Onkologie* 2004;27:200-206
- 6 童迎凯, 刘军, 柳惠图. CKIp15<sup>INK4B</sup> 高表达对人黑色素瘤细胞 cyclinD1 和 c-myc 表达的影响及生长特性的改变. 中国生物化学与分子生物学报 2000;16:514-519
- 7 张弘, 柳惠图, 刁法武. P15<sup>INK4B/MIS2</sup> 对人肝癌细胞增殖的影响及其机理的初步分析. 科学通报 2000;45:521-525
- 8 Xing EP, Nie Y, Song Y, Yang GY, Cai YC, Wang LD, Yang CS. Mechanisms of inactivation of p14ARF, p15INK4b, and p16INK4a genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999;5:2704-2713
- 9 Hannon CJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF- $\beta$ -induced cell cycle arrest. *Nature* 1994;371:257-261
- 10 Feng XH, Lin X, Derynck R. Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15 (Ink4B) transcription in response to TGF- $\beta$ . *EMBO J* 2000;19:5178-5193
- 11 Hitomi T, Matsuzaki Y, Yokota T, Takaoka Y, Sakai T. p15 (INK4b) in HDAC inhibitor-induced growth arrest. *FEBS Lett* 2003;554:347-350
- 12 陈会松, 黄华. P15 与消化系统肿瘤关系的研究进展. 昆明医学院学报 2003;2:115-118
- 13 李洁, 刘芝华. 食管癌中的等位基因缺失. 世界华人消化杂志 2003;11:1777-1781
- 14 Tanaka H, Shimada Y, Imamura M, Shibagaki I, Ishizaki K. Multiple types of aberrations in the p16 (INK4a) and the p15 (INK4b) genes in 30 esophageal squamous-cell-carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 1997;70:437-442
- 15 Xing EP, Nie Y, Wang LD, Yang GY, Yang CS. Aberrant methylation of p16INK4a and deletion of p15INK4b are frequent events in human esophageal cancer in Linxian, China. *Carcinogenesis* 1999;20:77-84
- 16 覃扬, 刘建余, 李波, 彭文珍, 傅明德, 孙芝琳, 孙泽芳. p16INK4A 和 p15INK4B 对人肝癌细胞增殖和凋亡影响的研究. 中华医学遗传学杂志 2004;21:132-137
- 17 傅赞, 赵翰林, 王岩宁, 德伟, 武正炎. P15、p16 对人胆管癌细胞增殖影响的实验研究. 中华普通外科杂志 2003;18:153-155
- 18 Fuxe J, Akusjarvi G, Goike HM, Roos G, Collins VP, Pettersson RF. Adenovirus-mediated overexpression of p15<sup>INK4B</sup> inhibits human glioma cell growth, induces replicative senescence, and inhibits telomerase activity similarly to p16 INK4A. *Cell Growth Differ* 2000;11:373-384
- 19 Simon M, Koster G, Ludwig M, Mahlberg R, Rho S, Watzka M, Schramm J. Alternative splicing of the p15 cdk inhibitor in glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol (Berl)* 2001;102:167-174
- 20 Fuxe J, Akusjarvi G, Goike HM, Roos G, Collins VP, Pettersson RF. Adenovirus-mediated overexpression of p15INK4B inhibits human glioma cell growth, induces replicative

senescence, and inhibits telomerase activity similarly to p16INK4A. *Cell Growth Differ* 2000;11:373-384

21 Agiostratidou G, Derventzi A, Gonos ES. Over-expression of

CDKIs p15INK4b, p16INK4a and p21CIP1/WAF1 genes mediate growth arrest in human osteosarcoma cell lines. *In Vivo* 2001;15:443-446

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 第一届北京国际消化疾病高峰论坛

**本刊讯** 第一届北京国际消化病高峰论坛定于2005-11-04/06在北京世纪金源大酒店举行, 本届论坛由中国医学论坛报社主办, 内容包括胃食管反流病、Barrett食管和食管癌、胃癌和幽门螺杆菌、结直肠癌筛查、炎性肠病、慢性胰腺炎和胰腺癌、NASH/脂肪肝和病毒性肝炎等重要专题。

本届论坛很荣幸地邀请到 M. Brian Fennerty, J. Thomas LaMont, Meinhard Classen, David A. Johnson, David Lieberman, David J. Bjorkman, Manfred Stolte, Stuart Sherman 和 Atif Zaman 等欧美消化领域的知名专家, 以及萧树东、钱家鸣、斯崇文、欧阳钦、郑树、柯美云、王贵奇、周丽雅、罗金燕、贾继东等国内知名专家。他们将从临床研究和实践的角度总结2005年胃肠病学和肝病学的最新进展和发展动态, 并将根据自己掌握的关键性的第一手资料, 对上述疾病发病机制、诊断和治疗中的热点问题精彩演讲。希望通过参会的国内外高层专家们之间的深入探讨, 提高我国消化系统疾病的诊治水平。

为了加强国内外学术交流的深度和效果, 本届论坛语言采用中文和英文, 并配有同声传译系统。论坛热忱邀请全国医院消化中心的负责人和学术带头人、中青年专家参加本届论坛, 共同为东西方在消化疾病领域的高层学术交流与合作写下新的篇章。

### 1 主要议题

本届论坛的主要议题包括: (1) 胃食管反流病(GERD): 中国和美国的经验; (2) Barrett食管和食管癌: 东西方的异同; (3) 胃癌和幽门螺杆菌: 东西方的看法是否相同? (4) 慢性胰腺炎和胰腺癌; (5) 病毒性肝炎治疗新进展; (6) 炎性肠病(IBD): 中国的现状; (7) IBD的病理生理及临床治疗2005年新进展; (8) 结直肠癌筛查: 全球范围是否面临同样的问题? (9) 非酒精性脂肪性肝炎(NASH)/脂肪肝和肝硬化。

### 2 壁报征文

论坛将为参会者提供以壁报方式展示最新研究成果的机会。壁报摘要要求在800字以内, 需描述研究目的、方法、结果和结论。评审费为500元, 届时将评选优秀壁报5名, 获奖者将免注册费。申请截止日期为9月15日, 10月1日前通知作者壁报摘要录用情况。

### 3 大会秘书处

大会设有秘书处, 联系人为黄向东, 张莉, 詹宁育, 北京市鼓楼西大街41号, 中国医学论坛报社, 邮编100009, 电话: 010-64002844, 传真: 010-64064469, Email: communications@gisummit.com.

本论坛欢迎全国医院消化中心的负责人和学术带头人、中青年专家参加, 详细注册及相关费用信息请咨询大会秘书处。