

· 短篇论著 ·

野生型 p53 基因可以增强胶质瘤细胞对替莫唑胺的敏感性研究

梁武 陈治军 罗勇 王凡

【摘要】 目的 评价野生型 p53 基因过表达的胶质瘤细胞对替莫唑胺和 X 射线敏感性的研究。方法 利用脂质体转染试剂将 pcDNA3.1(+)p53 质粒转染入胶质瘤细胞中,检测转染效率后,给予替莫唑胺和 X 射线处理,并检测凋亡。结果 野生型 p53 蛋白可以明显增加胶质瘤细胞对射线及替莫唑胺的凋亡率,且相对于 X 射线而言,p53 蛋白更能促进替莫唑胺对胶质瘤细胞的凋亡作用($P < 0.01$)。结论 替莫唑胺可能通过 p53 介导的凋亡通路调控了胶质瘤细胞的凋亡。

【关键词】 基因;p53; 神经胶质瘤; X 线; 替莫唑胺

大脑胶质瘤是中枢系统最为常见的原发性肿瘤,由于其本身的生长特性,使得手术治疗存在极大的局限性,所以寻找有效的治疗方法已经成为目前胶质瘤热点研究之一。p53 基因被认为与胶质瘤的发生有着密切联系,约 60% 胶质瘤细胞的 p53 基因存在突变^[1],所以激活体内 p53 基因,抑制肿瘤细胞生长以及还原 p53 基因功能,诱导肿瘤细胞凋亡成为胶质瘤基因靶向治疗的核心方向。本研究通过转染方法,评估了野生型 p53 基因对胶质瘤细胞接受射线和化疗药物后凋亡的影响,现将报道如下。

一、材料和方法

1. 实验材料:p53 野生型胶质瘤 C6 细胞株购自中国科学院上海细胞库;真核表达质粒 pcDNA3.1(+)p53 获赠于加州大学 JY Wang 教授。脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 购自美国 invitrogen 公司(目录号:11668-027)、凋亡试剂盒 Apoptosis Assay 购自美国 invitrogen 公司(目录号:V13242);单克隆 p53 一抗购于美国 Santa Cruz 公司,二抗及 DAB 显色剂购于北京中杉金桥公司。

2. 细胞培养及转染:细胞于高糖 DMEM(Hyclone 公司)+10% FBS(Hyclone 公司)的完全培养基中 37℃ 培养至 80% 融合。胰酶消化并接种于 24 孔板,次日细胞达到 70% 融合后采用转染试剂将目的质粒转染入各自细胞中,5 h 后更换完全培养基并在 48 h 收集细胞,提取核蛋白。

3. Western blot 法检测细胞蛋白表达:待细胞再次融合至 80%,胰酶消化后收集细胞,提取核蛋白,总蛋白浓度使用标准白蛋白溶液定量(Promega 公司)。随后进行 Western blot 法检测 p53 的表达。使用 p53 蛋白与内参 β -actin 蛋白的灰度比值来反应 p53 蛋白的相对表达水平,实验重复 6 次,取平均值。

4. 肿瘤细胞接受放化疗处理:为了排除处理方法对细胞凋亡的影响,以及明确 p53 基因对放化疗治疗的影响,我们将细胞分为六组,即未转染化疗组、未转染放疗组、空质粒化疗组、空质粒放疗组、p53 过表达化疗组、p53 过表达放疗组。其中放疗组给予 X 射线单次照射,照射剂量 6 Gy,剂量率 283.14 cGy/min,照射野 25 cm × 25 cm,源距 80 cm,照射后 72 h 收集细胞。化疗组使用含有 100 μ mol/L 替莫唑胺的完全培养基培养 72 h 后收集。

5. Annexin-V/PI 法检测细胞凋亡:收集待测细胞、离心;冷 PBS 冲洗 2 次;1000 r/min(离心半径 135 mm)离心 5 min,并用 100 μ l 1 × annexin-binding buffer 重悬细胞,且计数,细胞密度为 1×10^6 个/ml;将已用 annexin-binding 缓冲液悬浮的细胞中加入 5 μ l annexin V-FITC 溶液和 100 μ g/ml PI 工作液 1 μ l;室温孵育 15 min;孵化后加入 1 × annexin-binding buffer 400 μ l,轻轻摇晃后放置于冰上;流式细胞仪检测。

6. 统计处理:用 SPSS 11.5 统计软件处理,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 转染后蛋白检测:Western blot 法成功的检测了胶质瘤细胞内 p53 蛋白的表达,同时使用 pcDNA3.1(+)空质粒、未转染组作为对照(图 1)。用 p53 蛋白与内参 β -actin 蛋白的灰度比值来反映 p53 蛋白的相对表达水平。与空白对照组 A 组、空质粒组 B 组相比,C 组的 p53 蛋白表达量最高($P < 0.01$),说明 pcDNA3.1(+)p53 质粒转染成功(图 2)。

2. Annexin-V/PI 法检测凋亡:实验结果显示,射线照射和替莫唑胺均可以引起体外培养的胶质瘤细胞发生凋亡(图 3)。p53 过表达组胶质瘤细胞与未转染组相比,过表达组在接受射线及替莫唑胺治疗后的凋亡率明显增加($P < 0.01$);而在 p53 过

表达胶质瘤细胞组中,替莫唑胺组的凋亡率明显高于射线照射组的凋亡率($P < 0.01$)(表1)。

表1 各组胶质瘤细胞凋亡率($\%$, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	未转染	空质粒	pcDNA3.1(+)p53
放疗组	17.80 \pm 2.23	18.13 \pm 0.91	26.71 \pm 1.04 ^{ab}
化疗组	24.07 \pm 2.34	22.6 \pm 1.75	40.01 \pm 0.62 ^{abc}

注:与同组未转染比较,^a $P < 0.01$;与同组空质粒比较,^b $P < 0.01$;与放疗组比较,^c $P < 0.01$

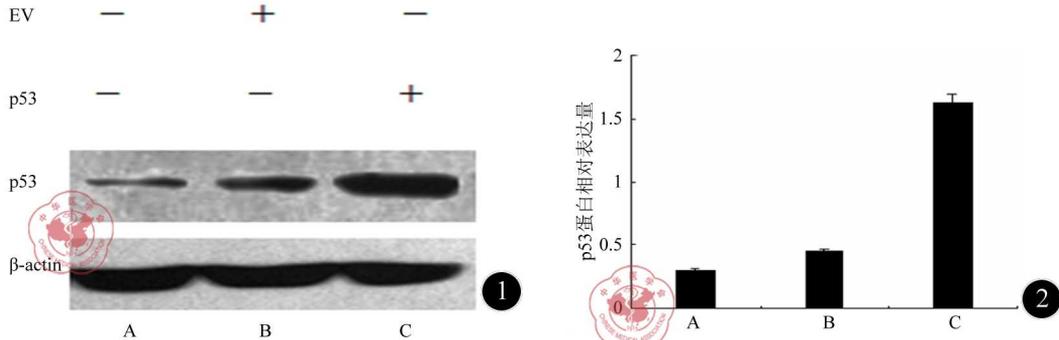


图1 Western blot法分析检测胶质瘤细胞细胞内的p53蛋白表达变化。A组为未转染组, B组为空质粒(EV)转染组, C组为pcDNA3.1(+) p53质粒转染组 图2 p53蛋白与 β -actin蛋白比后的相比表达值条状图, 误差棒提示各组平均值的标准误($n=6$)。A组为未转染组, B组为空质粒(EV)转染组, C组为pcDNA3.1(+) p53质粒转染组

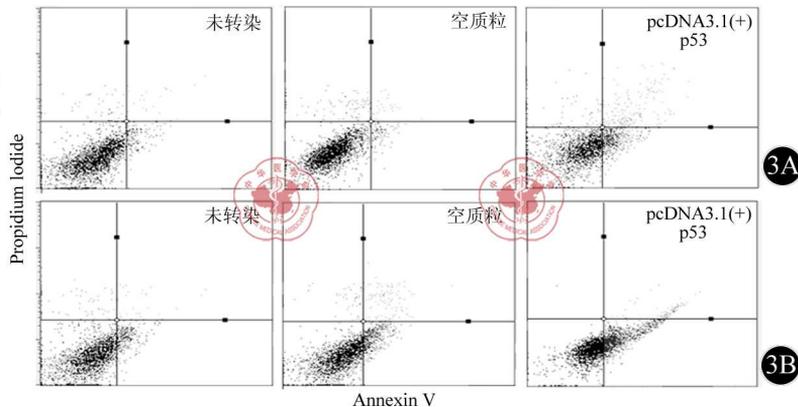


图3 Annexin-V/PI法检测不同治疗方法后胶质瘤的凋亡率。3A 为放疗引起的不同各组胶质瘤细胞的凋亡; 3B 为替莫唑胺引起的不同各组胶质瘤细胞的凋亡

三、讨论

在我们的研究中观察到,野生型 p53 蛋白可以明显提高射线和化疗药物替莫唑胺对胶质瘤细胞的杀伤作用,加大凋亡率;而且,替莫唑胺在野生型 p53 过表达的前提下对胶质瘤细胞的杀伤作用要明显强于射线。这提示的替莫唑胺对胶质瘤的药理作用可能通过了 p53 通路的调控。

p53 基因是细胞生长周期的核心基因,在细胞凋亡过程中起着主要作用;细胞 DNA 损伤出现双链断裂后, ATM/ATR、CHR1/2 陆续激活,随后其激活 p53 基因,完成转录翻译后的 p53 蛋白又激活广泛的目的基因并启动细胞凋亡程序^[2-3];同时 p53 与 c-myc 基因的启动子结合,通过对其的乙酰化作用来抑制其转录^[4],且在细胞质内的 p53 蛋白又可以与 Bcl 基因家族结合,加强凋亡的传递,增强细胞的凋亡^[5-6]。所以,p53 基因及其蛋白功能的稳定性是细胞生长周期正常运行的前提保证。

多种肿瘤的发生被认为与 p53 基因的突变有关。本研究所使用的替莫唑胺有可能在治疗过程中,对 p53 基因未突变的瘤细胞达到了杀灭作用,却选择性的遗留下了 p53 基因突变型的瘤体细胞,最终出现了肿瘤对替莫唑胺一类药物的耐药性。所以,类似的这种肿瘤耐药机制提示我们在肿瘤的治疗过程中,应采取个体化、多元化的治疗。

目前,有文献报道,嘧啶亚硝脲等药物和射线等治疗方式逐渐用于 p53 基因突变或者对替莫唑胺药物耐药的肿瘤的治疗;

所以,射线和嘧啶亚硝脲等药物能杀伤 p53 突变型肿瘤细胞的机制可能在于,此类方式作用后的胶质瘤细胞缺乏了对细胞内损伤 DNA 的修复能力。有研究证实,在对 p53 突变型的胶质瘤细胞基于 X 射线照射后,发现胞内的 DNA 修复基因 XPC 以及 DDB2 的表达量明显小于 p53 野生型的胶质瘤细胞^[7]。也有学者认为,嘧啶亚硝脲、替莫唑胺与 X 射线所引起的胶质瘤细胞凋亡的分子机制不尽相同;替莫唑胺引起的细胞 DNA 损伤启动了野生型 p53 胶质瘤细胞中的外源性凋亡通路,嘧啶亚硝脲引起的细胞 DNA 损伤则启动了突变型 p53 胶质瘤细胞中的内源性凋亡通路机制,而 X 射线可能激活了其他的凋亡通路^[7-8]。

由上述可见,胶质瘤细胞对化疗耐药的机制尽管是多因素的,但是与临床用药单一、基因的种类等密切相关。所以,我们需要及早利用现代分子生物技术做到对胶质瘤患者治疗的个体化、多样化,才能达到胶质瘤低复发率、高生存率的目的。

参 考 文 献

- [1] Filippini G, Falcone C, Boiardi A, et al. Prognostic factors for survival in 676 consecutive patients with newly diagnosed primary glioblastoma. *Neuro Oncol*, 2008, 10:79-87.
- [2] Sun CM, Huang SF, Zeng JM, et al. Per2 inhibits k562 leukemia cell growth in vitro and in vivo through cell cycle arrest and apoptosis induction. *Pathol Oncol Res*, 2010, 16:403-411.
- [3] Riley T, Sontag E, Chen P, et al. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9:402-412.
- [4] Ho J, Ma W, Mao D, et al. p53-Dependent transcriptional repression of c-myc is required for G1 cell cycle arrest. *Mol Cell Biol*, 2005, 25:7423-7431.
- [5] Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2:647-656.
- [6] Liou AKF, Clark RS, Henshall DC, et al. To die or not to die for neurons in ischemia, traumatic brain injury and epilepsy: a review on the stress-activated signaling pathways and apoptotic pathways. *Prog Neurobiol*, 2003, 69:103-142.
- [7] Batista LF, Roos WP, Christmann M, et al. Differential sensitivity of malignant glioma cells to methylating and chloroethylating anticancer drugs: p53 determines the switch by regulating xpc, ddb2, and DNA double-strand breaks. *Cancer Res*, 2007, 67:11886-11895.
- [8] Roos WP, Batista LF, Naumann SC, et al. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene*, 2007, 26:186-197.

(收稿日期:2011-05-17)

(本文编辑:戚红丹)

梁武,陈治军,罗勇,等.野生型 p53 基因可以增强胶质瘤细胞对替莫唑胺的敏感性研究[J/CD].中华临床医师杂志:电子版,2011,5(13):3924-3926.