

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2004.05.04

• 基础研究 •

高表达 p73 基因抑制肺腺癌细胞 VEGF、bFGF mRNA 表达

元东 范士志 何勇

【摘要】 目的 观察高表达的 p73 基因对肺腺癌细胞生长曲线以及血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF) mRNA 表达水平的影响,探讨高表达 p73 基因在肺腺癌血管生成中的作用。方法 将 p73 α 、p73 β 以脂质体法转染 A549 细胞、H1299 细胞,采用细胞计数法绘制转染前后两种细胞生长曲线,RT-PCR 法半定量分析转染前后两种细胞中 VEGF、bFGF mRNA 的表达水平的变化。结果 转染 p73 基因后,A549 细胞、H1299 细胞生长受到抑制,VEGF、bFGF mRNA 表达水平下降,较未转染 p73 基因的细胞有显著性差异($P < 0.05$),其中 p73 β 对 VEGF mRNA 表达的抑制作用更为显著($P < 0.01$)。结论 高表达的 p73 基因能够抑制肺腺癌细胞生长,降低肺腺癌细胞中 VEGF、bFGF mRNA 表达水平,提示高表达的 p73 基因可能参与调控人肺腺癌 VEGF 和 bFGF 基因表达,从而起到一个抑癌基因的作用。

【关键词】 肺腺癌 p73 基因 反转录多聚酶链反应 血管内皮生长因子 碱性成纤维细胞生长因子

【中图分类号】 R734.2

Overexpression of p73 gene inhibits VEGF and bFGF mRNA expression in lung adenocarcinoma cell YUAN Dong, FAN Shizhi, HE Yong. Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, P. R. China

Corresponding author: FAN Shizhi

【Abstract】 Objective To study the effect of overexpression of p73 gene on cell growth curve and vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) mRNA expression in lung adenocarcinoma cell, and to explore its effect on angiogenesis in lung adenocarcinoma. **Methods** p73 α and p73 β were transferred into A549 cell and H1299 cell by liposome, the positive cell clones were chosen by G418. The cell growth curves were drawn by cell counting. The expressions of VEGF and bFGF mRNA were detected by RT-PCR. **Results** Overexpression of p73 gene could inhibit the growth of A549 cell and H1299 cell. VEGF and bFGF mRNA expressions in A549 cell and H1299 cell were decreased after transfer of p73 gene ($P < 0.05$), VEGF mRNA was decreased more obviously after transfer of p73 β ($P < 0.01$). **Conclusion** Overexpression of p73 gene can inhibit the growth of lung adenocarcinoma cell, decrease VEGF and bFGF mRNA expression. The results suggest that overexpression of p73 gene might be involved in the regulation of VEGF and bFGF gene expression in lung adenocarcinoma and act as an antioncogene.

【Key words】 Lung adenocarcinoma p73 gene RT-PCR VEGF bFGF

p73 基因是近年来发现的 p53 基因家族的新成员,其编码的蛋白与 p53 蛋白有着类似的结构,并且也可以与 p53 的特殊结合位点相结合,激活其目的基因,导致细胞凋亡^[1]。与 p53 不同的是,p73 基因在人类肿瘤很少突变,且有多种变异体,现已发现的有 p73 α 、p73 β 、p73 γ 、p73 δ 、p73 ϵ 、p73 ϕ 六种。在人类非小细胞肺癌中,p73 基因表达明显高于其癌旁组织^[2],但是其

对肺癌血管生成有何作用目前还未见报道。本研究用脂质体法将 p73 基因转染入 A549 细胞、H1299 细胞,造成 p73 基因高表达,了解其对细胞生长曲线的作用,同时应用反转录多聚酶链反应技术(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)检测转染前后以上两种细胞中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF) mRNA 的表达水平变化,探讨高表达 p73 基因对人肺腺癌血管生成的影响。

作者单位: 400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所胸心外科(通讯作者: 范士志)

1 材料与方 法

1.1 材料 ①细胞系及培养材料 A549 细胞、H1299 细胞均为人肺腺癌细胞系,由本科室何勇博士惠赠。RPMI1640 培养基、DMEM 培养基、小牛血清购自 Hyclone 公司,胰蛋白酶购自 Sigma 公司。②p73 α 、p73 β 质粒均以 pcDNA3 为载体构建而成,其中在 p73 基因上游有 HA-tag 序列,由本科室何勇博士惠赠。③脂质体 DOTAP 和 G418 购自 Roche 公司,HA-tag 抗体购自 Clontech 公司。④AMV-RTase、Taq 酶、Oligo (dT) 15 购自 Promega 公司。⑤VEGF 上游引物: 5'-CCTTGCTGCTCTACCTCG-3'; 下游引物: 5'-AATGCTTTCTCCGCTCT-3', PCR 产物片段为 421 bp。bFGF 上游引物: 5'-AAGAGCGACCTCAATCAA-3'; 下游引物: 5'-TCGTTTCAGTGCCACATACG-3', PCR 产物片段为 225 bp; β actin 上游引物: 5'-CGGGAAATCGTCCGTGAG-3'; 下游引物: 5'-GGAAGGAAGGCTGGAAGAGTG-3', PCR 产物片段为 184 bp。以上引物由上海申友公司合成。

1.2 方法 ①A549 细胞以 RPMI 1640 培养, H1299 细胞以 DMEM 培养, 培养至 1×10^7 后, 0.25% 胰酶消化, PBS 洗涤细胞, 准备提取 RNA。②用脂质体法将 pcDNA3、p73 α 、p73 β 质粒转染 A549 细胞、H1299 细胞, G418 终浓度 800 mg/L 筛选阳性细胞克隆, Western blot 检测红细胞凝集素抗原 (hemagglutinin antigen, HA) 以验证转染成功。③将对数生长期的 A549 细胞和 H1299 细胞, 以及转染了 p73 α 、p73 β 基因的以上两种细胞, 以 1×10^5 接种于 25 ml 培养瓶中, 接种后于 24、48、72、96、120 h 分别计算每瓶细胞数, 每次数 5 瓶, 取平均值绘制细胞生长曲线。④提取细胞中的总 RNA, 按 Tripure 分离试剂盒说明操作, 并用紫外分光光度计定量, 吸光度 A_{260}/A_{280} 比值均在 1.8 以上, 行 1% 琼脂糖甲醛变性凝胶电泳, 可见有 18S、28S 两条清晰的 RNA 电泳条带, $RNA(g/L) = A_{260} \times 40 \times \text{稀释倍数} / 1000$ 。用 AMV-RTase 和 Oligo(dT) 15 引物将总 RNA 反转录成 cDNA。取 5 μ l 反转录 cDNA 作 PCR 扩增, 反应体系为 20 μ l, 含 $10 \times$ PCR buffer 2 μ l, KCl 10 mmol/l, MgSO₄ 2 mmol/L, dNTP 各 200 μ mol/L, TaqDNA 聚合酶 0.5 U, 上下游引物各 0.3 μ mol/L。按以下参数在 PCR 扩增仪 (Perkir Elmer 公司 9600 型) 上进行。VEGF 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 70 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 经 33 个循环周期后, 产物经 1% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 mg/L 溴化乙锭) 电泳, 紫外灯下观察结果 照相 以 PCR marker 为标准, 在 421 bp

位置出现条带为 VEGF 表达阳性。bFGF 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 60 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 65 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 115 s, 经 35 个循环周期后, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在 225 bp 位置出现条带为 bFGF 表达阳性。 β -actin 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 65 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 70 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 110 s, 经 35 个循环周期后, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在 184 bp 位置出现条带为 β -actin 表达阳性。⑤RT-PCR 产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 以 GelPRO ANALYZER 凝胶定量分析软件分析凝胶电泳结果, 得出各条带的积分光密度 (integral optical density, IOD), 以同时扩增的 β -actin 为内参照, 计算 VEGF mRNA/ β -actin mRNA 和 bFGF mRNA/ β -actin mRNA 的 IOD 比值即标准化积分光密度值 (normalized integrated intensity, NII), 以 NII% 为单位, 代表 VEGF mRNA 和 bFGF mRNA 表达水平。将 5 次 RT-PCR 结果的均数进行比较。

1.3 统计学处理 数据以结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 t 检验, SPSS10.0 统计学软件进行分析。

2 结果

2.1 转染 p73 基因前后肺腺癌细胞生长情况 转染 p73 基因前后细胞生长曲线见图 1。培养 7 天后细胞计数表明高表达 p73 α 能够抑制 A549 细胞、H1299 细胞增殖, 与对照组比较差异显著 ($t = 2.96, P = 0.041$; $t = 3.82, P = 0.035$)。高表达 p73 β 的作用与 p73 α 相似, 但是它对以上两种细胞增殖的抑制作用更为显著 ($t = 4.91, P = 0.023$; $t = 4.37, P = 0.021$)。

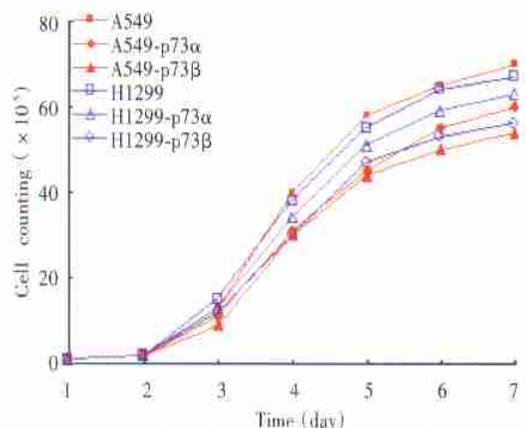


图 1 转染 p73 基因后 A549 细胞、H1299 细胞生长曲线

Fig 1 The cell growth curve of A549 and H1299 after transfer of p73 gene

2.2 VEGF RT-PCR 扩增结果 图 2 结果表明 VEGF mRNA 在 A549 细胞及 H1299 细胞中均呈阳性表达, 但表 1 数据表明转染了 pcDNA3 空载体后肺腺癌细胞 VEGF mRNA 表达水平与转染前无显著性差异 ($P > 0.05$)。转染了 p73 α 后均能使 A549 细胞及

H1299 细胞中 VEGF mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$), p73 β 对 VEGF mRNA 表达的抑制作用更为明显, 与未转染 p73 基因的细胞相比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。

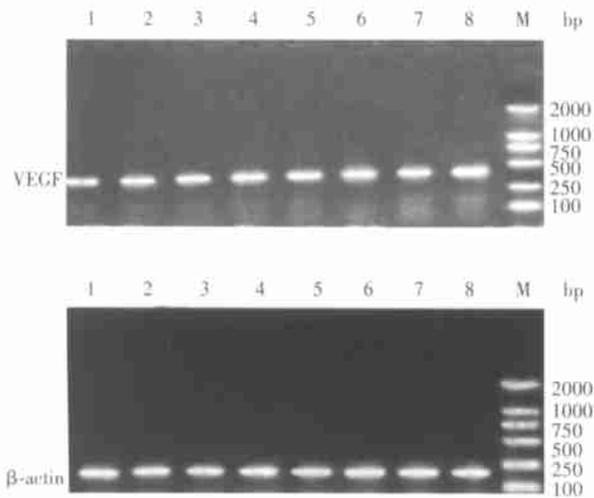


图 2 VEGF 和 β -actin 的 RT-PCR 结果

Fig 2 RT-PCR result of VEGF and β -actin expression

1: A549; 2: A549 pcDNA3; 3: A549 p73 α ; 4: A549 p73 β ; 5: H1299; 6: H1299 pcDNA3; 7: H1299 p73 α ; 8: H1299 p73 β ; M: Marker

表 1 转染 p73 基因前后 A549 细胞、H1299 细胞中 VEGF mRNA 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of VEGF mRNA expression after transfer of different kinds of plasmid ($\bar{x} \pm s$)

Cell	Control	pcDNA3	p73 α	p73 β
A549	37 \pm 11	34 \pm 13	28 \pm 11 Δ	24 \pm 9 \square
H1299	29 \pm 9	28 \pm 10	23 \pm 6 $\Delta\Delta$	19 \pm 7 $\square\square$

Note: Δ : $t = 2.541, P = 0.043$; $\Delta\Delta$: $t = 3.644, P = 0.037$; \square : $t = 5.793, P = 0.003$; $\square\square$: $t = 7.159, P = 0.001$

2.3 bFGF RT-PCR 扩增结果 图 3 结果表明 bFGF mRNA 在 A549 细胞及 H1299 细胞中均呈阳性表达, 但表 2 数据表明转染了 pcDNA3 空载体后肺腺癌细胞 bFGF mRNA 表达水平与转染前无显著性差异 ($P > 0.05$), 转染了 p73 α 、p73 β 后 A549 细胞及 H1299 细胞中 bFGF mRNA 表达水平降低, 与未转染 p73 基因的细胞相比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。

3 讨论

肺癌是一种对人类健康和生命威胁极大的恶性肿瘤, 其发生与多种因素有关, 大量的遗传学和分子生物学研究表明 p53 基因与肺癌的发生密切相关, 在非小细胞肺癌中其突变率为 47.8%, 小细胞肺癌中为 80%

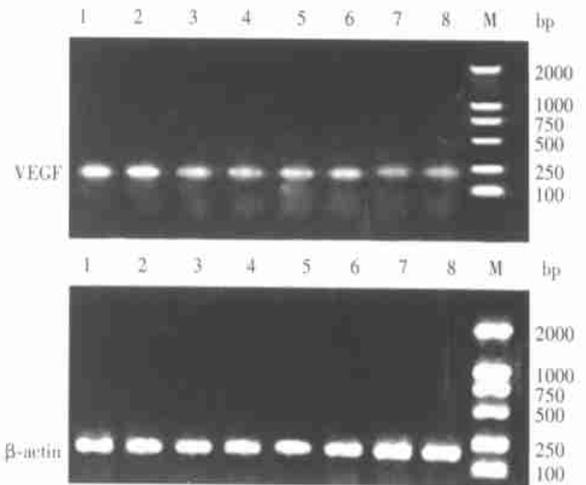


图 3 bFGF 和 β -actin 的 RT-PCR 结果

Fig 3 RT-PCR result of bFGF and β -actin expression

1: A549; 2: A549 pcDNA3; 3: A549 p73 α ; 4: A549 p73 β ; 5: H1299; 6: H1299 pcDNA3; 7: H1299 p73 α ; 8: H1299 p73 β ; M: Marker

表 2 转染 p73 基因前后 A549 细胞、H1299 细胞中 bFGF mRNA 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Comparison of bFGF mRNA expression after transferring of different kinds of plasmid ($\bar{x} \pm s$)

Cell	Control	pcDNA3	p73 α	p73 β
A549	34 \pm 10	36 \pm 9	26 \pm 10 Δ	25 \pm 14 \square
H1299	31 \pm 7	30 \pm 12	22 \pm 6 $\Delta\Delta$	23 \pm 8 $\square\square$

Note: Δ : $t = 3.914, P = 0.029$; $\Delta\Delta$: $t = 2.392, P = 0.047$; \square : $t = 3.534, P = 0.001$; $\square\square$: $t = 2.489, P = 0.044$

左右。p73 基因是 p53 基因家族的新成员, 其蛋白序列与 p53 蛋白高度同源, 已经有研究表明 p73 基因也能抑制细胞生长^[1], 并且可以通过转录激活 p21^{waf1} 等诱导细胞凋亡^[3]。p73 基因位于人类 1 号染色体 1p36.33 区域, 该区域在多种人类肿瘤中易发生缺失^[4], 因此 p73 基因曾被推测为一个抑癌基因。目前的研究表明, p73 基因在神经母细胞瘤、结肠直肠癌、前列腺癌及其他一些肿瘤中呈低水平的表达, 而在另外一些肿瘤中如恶性黑素瘤、肺癌、膀胱癌、肝癌中表达明显增高。p73 基因在非小细胞肺癌中表达明显增高, 而且很少突变^[2], 这些都提示 p73 和 p53 在非小细胞肺癌中发挥的作用不同。p53 基因的突变或缺失可能导致肺癌的发生^[7], 而 p73 基因的高表达是肺癌发生后出现的现象, 且被推测是对 p53 基因功能的一种代偿, 这种代偿作用对肺腺癌的血管生成会起到何种作用尚未见报道。

本研究通过基因转染的方式 在人类肺腺癌细胞

中诱导 p73 基因的高表达,以细胞计数法检测高表达 p73 基因对 A549 细胞、H1299 细胞生长曲线的影响,以 RT-PCR 半定量方法研究转染 p73 基因后肺腺癌细胞中 VEGF、bFGF mRNA 表达水平的变化,结果发现高表达 p73 基因能够抑制以上两种细胞的生长,下调肺腺癌细胞中 VEGF、bFGF mRNA 的表达。血管生成是实体瘤生长和转移的基础,这些血管为肿瘤提供养料和排泄代谢产物,也为肿瘤细胞转移提供了良好的机会,肿瘤在生长过程中也分泌多种物质来促进新生血管的进一步形成。VEGF 是最重要的促进血管生成细胞因子,可以作用于血管内皮细胞,提高微血管的通透性,诱导内皮细胞表达和分泌多种蛋白酶,促进内皮细胞迁移,还能抑制内皮细胞凋亡。目前已经证明 VEGF 与多种肿瘤的血管生成、肿瘤增长及转移有关^[5]。bFGF 也是促血管生长因子之一,能够刺激内皮细胞合成胶原酶,促进血管生成时对周围基质的侵入,而且与 VEGF 有协同作用^[6]。高表达 p73 基因能够抑制肺腺癌细胞生长,下调 VEGF、bFGF mRNA 的表达,这些作用可能是通过介导肿瘤细胞凋亡来实现,p73 的各种变异体在诱导凋亡方面的能力是不同的,已有研究证实 p73^β 诱导凋亡的作用最强^[7]。此外,p73 基因还能直接抑制肿瘤细胞 VEGF 表达,已有研究表明在某些淋巴瘤和白血病细胞中人工诱导 p73 基因表达,可以通过抑制 VEGF 启动子来抑制这些肿瘤细胞表达 VEGF^[8]。在本实验中也得出相似的结果,高表达的 p73^β 基因使肺腺癌细胞 VEGF mRNA 表达下降更为显著。

从本实验可以推测在人类肺腺癌中高表达的 p73 基因可能起到抑制血管生成的作用。抗肿瘤血管生成

治疗已经成为目前肿瘤治疗的一个热点^[9]。但是,p73 基因调控肺癌血管生成相关基因表达和对肺癌血管生成的影响,及其确切分子机理,均有待进行深入研究,加以阐明。

参 考 文 献

- Willis AC, Pipes T, Zhu J, et al. p73 can suppress the proliferation of cells that express mutant p53. *Oncogene*, 2003, 22(35): 5481-5495.
- Tokuchi Y, Hashimoto T, Kobayashi Y, et al. The expression of p73 is increased in lung cancer, independent of p53 gene alteration. *Br J Cancer*, 1999, 80(10): 1623-1629.
- Uramoto H, Izumi H, Nagatani G, et al. Physical interaction of tumour suppressor p53/p73 with CCAAT-binding transcription factor 2 (CTF2) and differential regulation of human high mobility group 1 (HMGI) gene expression. *Biochem J*, 2003, 371(Pt 2): 301-310.
- Zhu X, Wimmer K, Kuick R, et al. N-myc modulates expression of p73 in neuroblastoma. *Neoplasia*, 2002, 4(5): 432-439.
- Goodsell DS. The molecular perspective: VEGF and angiogenesis. *Stem Cells*, 2003, 21(1): 118-119.
- Cronauer MV, Schulz WA, Seifert HH, et al. Fibroblast growth factors and their receptors in urological cancers: basic research and clinical implications. *Eur Urol*, 2003, 43(3): 309-319.
- Zhu J, Jiang J, Zhou W, et al. The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Res*, 1998, 58(22): 5061-5065.
- Salimath B, Marme D, Finkenzeller G. Expression of the vascular endothelial growth factor gene is inhibited by p73. *Oncogene*, 2000, 19(31): 3470-3476.
- Dreys J, Laus C, Mendinger M, et al. Antiangiogenesis: current clinical data and future perspectives. *Onkologie*, 2002, 25(6): 520-527.

(收稿: 2004-01-08 修回: 2004-04-11)

(本文编辑 张世雯)

• 会议消息 •

Time February 18- 19, 2005
Meeting New Targets in Cancer
 Therapy Conference
Location Nice, France
Organizer Imedex
Contact Coleson Chase
Tel + 1 (770) 751 7332
Fax + 1 (770) 751 7334
Web <http://www.imedex.com/calendars/oncology.htm>

时间 2005 年 2 月 18~ 19 日
会议 癌症治疗新靶向大会
地址 Nice, France(法国)
组织者 Imedex
联系者 Coleson Chase
电话 + 1 (770) 751 7332
传真 + 1 (770) 751 7334
网址 <http://www.imedex.com/calendars/oncology.htm>