

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2002.04.02

p53 缺失和突变对人肺癌细胞系恶性表型影响的比较

汪惠 赖百塘 李金照 杨学惠 张春彦 岳文涛 张洪涛 李曦 湛秀萍 王

【摘要】 目的 比较研究外源正义和反义 p53 对所转染细胞系恶性表型的影响。方法 构建正义和反义 p53 cDNA 真核细胞表达载体 pEGFP-p53(RS) 和 pEGFP-p53(AS) 用 Lipofectin 介导转染 801D 细胞。PCR 检测外源 p53 和 neo 基因。荧光显微镜检查转染细胞绿荧光蛋白。免疫组化染色检测突变蛋白表达。比较 pEGFP-p53(AS)-801D 和 pEGFP-p53(RS)-801D 的集落形成试验和裸鼠移植试验。用流式细胞术分析细胞周期。结果 PCR 检测出外源 p53 和 neo 基因存在于细胞, 细胞可见绿色荧光。免疫组化检测示 pEGFP-p53(AS)-801D 突变蛋白呈阴性, 母系为阳性, 表明反义 p53 能封闭突变 p53 蛋白表达。pEGFP-p53(RS)-801D 和 pEGFP-p53(AS)-801D 细胞集落形成率和裸鼠移植成瘤性均降低, pEGFP-p53(RS)-801D 更为明显。pEGFP-p53(AS)-801D 细胞周期阻滞于 G₁ 期。结论 在同一细胞背景下, p53 缺失比 p53 突变对恶性增殖起更重要的作用。外源野生型 p53 在肿瘤细胞中可恢复重建其功能, 外源反义 p53 可封闭突变蛋白表达, 阻止细胞停留于 G₁ 期。

【关键词】 正义 p53 基因 反义 p53 基因 转染细胞 集落形成 裸鼠移植

【中图分类号】 R734.203

Study on the effects of p53 deletion and mutation on malignant phenotype of human lung cancer cell line WANG Hui*, LAI Baitang, LI Jinzhao, YANG Xuehui, ZHANG Chunyan, YUE Wentao, ZHANG Hongtao, LI Xi, ZHAN Xiuping, WANG Yue. * The Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Beijing Tuberculosis & Thoracic Tumor Research Institute, Beijing 101149, P. R. China

【Abstract】 Objective To study the inhibition effects of both extraneous right sense and antisense p53 on malignant phenotype of human lung cancer cell line. **Methods** The named 801D cell line with p53 deletion and mutation at 248 code was selected as a model *in vitro*. The recombinated plasmid pEGFP-p53(RS) and pEGFP-p53(AS) were constructed. The extraneous gene was detected by PCR. The p53 mutation protein was examined by immunohistochemical stain of p53 antibody. The inhibition effect of extraneous p53 on tumor growth *in vitro* were determined by clonogenic survival assay. FCM analysis was carried out in cells. The inhibition effect on malignant growth of extraneous p53 *in vivo* was observed by heteroplastic transplant on nude mouse. **Results** The transfected cell lines, pEGFP-p53(AS)-801D, pEGFP-p53(RS)-801D and pEGFP-801D were established. Presence of extraneous p53 and neo genes in pEGFP-p53(AS)-801D and pEGFP-p53(RS)-801D was proved by PCR and green fluorescence was found out in those cells under the microscope. Mutant protein in pEGFP-p53(AS)-801D was negative by immunohistochemical stain. The malignant growth of these transfected cell lines was inhibited comparing with parents *in vivo* and *in vitro*. Inhibition rate of colony formation was 62.0% for pEGFP-p53(AS)-801D and 80.8% for pEGFP-p53(RS)-801D. The tumorigenicity in nude mice was suppressed. Inhibition effects of extraneous right sense p53 on malignant growth of 801D was more distinct. FCM analysis showed that pEGFP-p53(AS)-801D cells were arrested at G₁ phase. **Conclusion** The transfected cell lines with extraneous right sense and antisense p53 appear that malignant growth can be inhibited *in vivo* and *in vitro*.

【Key words】 Sense p53 Antisense p53 Transfection Colony formation Transplantation

作者单位: 101149 北京市结核病胸部肿瘤研究所细胞分子生物学实验室 (汪惠、赖百塘、杨学惠、张春彦、岳文涛、张洪涛、李曦、湛秀萍、王); 中科院生物物理所 (李金照)

野生型 p53 具有调节细胞增殖周期和诱导细胞程序性死亡等抑癌功能^[1]。肺癌中 p53 基因异常发生率较高^[2,3]。异常状态为基因缺失、突变或两者兼有的改

变,尤以 p53 突变为多见。p53 基因突变不仅丧失抑癌功能,而且其突变蛋白可能是肿瘤特殊转录蛋白或肿瘤抗原,具有致癌作用^[4]。研究 p53 异常状态对肿瘤细胞恶性表型影响的报告较多,我们利用有 p53 缺失和突变的人肺癌细胞系 801D 作为模型,将构建的 p53 cDNA 正向和反向联结的表达质粒分别转染 801D 细胞,建立了仅有 p53 缺失和仅有 p53 突变的两个细胞系,比较了在同一细胞背景下,不同 p53 异常状态对细胞恶性生长的影响,对于认识 p53 的基因异常状态与细胞恶性表型的相关性有着重要意义,为以 p53 为靶点的肿瘤治疗提供思路和依据。

1 材料和方法

1.1 人肺巨细胞癌系 801D

801D 为人肺巨细胞癌系,该细胞第 7 外显子 248 位氨基酸密码有杂合性基因缺失和存在碱基由 CCG→CTT 颠换,有突变蛋白产生^[5]。按常规方法培养和传代。

1.2 构建含正向和反向联结 p53 cDNA 表达载体

含 1.8 kb p53 cDNA 质粒 PC53-SN(美国 Fox Cancer Center 提供)经 BamHI 消化,获 1.8 kb p53 cDNA,联结于 4.7 kb 的 pEGFP。为了证明 p53 cDNA 正向和反向联结于质粒,用内切酶 HindIII 与 AlwNI 双酶切质粒 pEGFP 和重组质粒 pEGFP-p53,经电泳酶切图分析确定 p53 正向和反向联结。

1.3 Lipofectin 介导质粒转染细胞和建立转染细胞系

每皿接种 1.2×10^5 的 801D 细胞,次日细胞达 50%~80% 融合,按 Lipofectin 转染细胞常规方法进行,各取 1 mg/L pEGFP-p53(AS)以及 pEGFP-p53(RS)DNA 和空载 pEGFP 质粒,分别加入 98 μ l 无血清培养基,各取 2 μ l Lipofectin 加入于 98 μ l 无血清培养基,室温 45 min。将 Lipofectin 稀释液分别与上述含 pEGFP 和 pEGFP-p53(AS),pEGFP-p53(RS)DNA 混合,室温 15 min 后,分别加入 800 μ l 无血清培养基,将其加入到上述经洗涤的 801D 细胞上,置 CO₂ 暖箱 2 h 后,更换为含血清培养基。48 h 后,每皿培养细胞加入 800 μ g G418 筛选,将形成的细胞集落接种单个细胞于 96 孔板进行克隆。克隆生长后,检查细胞 GFP 表达和外源 p53 基因存在和表达,建立 pEGFP-801D、pEGFP-p53(AS)-801D 和 pEGFP-p53(RS)-801D 细胞系。

1.4 外源基因检测

1.4.1 绿荧光蛋白检测

pEGFP 上有绿色荧光蛋白基因(GFP),可监测上游插入的 p53 基因表达。将检测细胞接种于小玻片上进行常规培养,转染 48 h 后取出小片,用 Niko 荧光倒置显微镜,激发光为 488 μ m,发

射光最高波长为 507 μ m 的滤光片进行检查。转染细胞系 pEGFP-801D 和 pEGFP-p53(AS)-801D、pEGFP-p53(RS)-801D 用同样方法检查。

1.4.2 外源 p53、neo 基因检测

用 PCR 检测母系及转染细胞系 pEGFP-801D、pEGFP-p53(AS)-801D、pEGFP-p53(RS)-801D。p53 引物及 neo 基因引物见文献^[5],p53 引物可扩增人源 p53 cDNA 含 1318~1765 基因区域的 461 bp 基因片段。用以上引物分别扩增转染细胞系和母系细胞 DNA,行聚丙烯酰胺凝胶电泳检测外源基因。

1.5 免疫组织化学染色

p53 突变蛋白的单克隆抗体(Ab-2 oncogene science)行免疫组化染色。收集母系及转染细胞系 pEGFP-p53(RS)-801D 和 pEGFP-p53(AS)-801D 细胞悬液,制片,镜检 p53 突变蛋白表达,阳性细胞浆、核呈深黄色。

1.6 细胞集落试验

行集落试验检测细胞增殖能力,每个平皿分别接种 500 个 801D、pEGFP-801D、pEGFP-p53(AS)-801D 或 pEGFP-p53(RS)-801D 细胞,每种细胞种 3 个平皿,CO₂ 暖箱培养 1 周后,Giemsa 染色,于镜下计数集落,每个集落为 50 个细胞以上,计算每种细胞集落平均数,计算形成率和抑制率。形成率 = 平均集落数/500 × 100%。抑制率 = (对照组集落形成率 - 试验组集落形成率)/对照组集落形成率。

1.7 裸鼠移植试验

将对数期生长的 801D、pEGFP-p53(RS)-801D 和 pEGFP-p53(AS)-801D 细胞制备成细胞悬液,每组接种 2 只,每只裸鼠于后腿两侧分别接种 1×10^7 /ml 细胞悬液,观察并记录移植瘤生长情况及体积,于接种后两个月解剖肿瘤,称重送病理诊断。将各组肿瘤组织作印片,于荧光镜下检查细胞有无荧光表达。

1.8 统计学处理

采用 *t* 检验和 χ^2 检验。

2 结果

2.1 p53 正向和反向联结 pEGFP 表达质粒的构建

用内切酶 HindIII 与 AlwNI 双酶切质粒 pEGFP-p53(AS),pEGFP-p53(RS),电泳酶切图证明 p53 基因正向或反向联结质粒。由于 p53 基因 5'端 300 多 bp 处有 AlwNI 酶切位点,pEGFP 载体也有一个 AlwNI 酶切位点,p53 5'端方向有 HindIII 酶切点,因此用 HindIII 与 AlwNI 双酶切,p53 正向插入应得到包括有 300 bp 在内的 3 个片段,反向插入则无 300 bp 的小片段出现。

2.2 转染细胞系的建立

经 Lipofectin 分别介导 pEGFP 和 pEGFP-p53(AS),pEGFP-p53(RS)到 801D 细胞,经 G418 筛选,获耐受集落。经单细胞克隆建立了

转染细胞系 pEGFP-p53(AS)-801D、pEGFP-p53(RS)-801D 和 pEGFP-801D ,用荧光显微镜检查证明转染细胞胞浆有绿色荧光产生(图 1),而母系 801D 无荧光产生,证明转染细胞中有 GFP 表达。经 PCR 检测转染细胞 DNA 外源基因、p53 cDNA 和 neo 基因,结果显示母系 801D 细胞无 461 bp p53 基因片段和 190 bp neo 基因片段,pEGFP-801D 仅有 190 bp 片段的 neo 基因,pEGFP-p53(AS)-801D 和 pEGFP-p53(RS)-801D 有 461 bp p53 基因片段,证明外源基因存在于转染细胞。检测 42 代细胞仍有外源基因稳定存在(图 2)。用抗 p53 突变蛋白单克隆抗体免疫组化染色,801D、pEGFP-801D 和 pEGFP-p53(RS)-801D 核和胞浆呈深黄色,有突变蛋白产生(图 3);pEGFP-p53(AS)-801D 免疫组化染色呈阴性,证明外源 antisense p53 cDNA 在转染细胞中稳定存在,封闭了 p53 mRNA 表达,阻止突变蛋白产生(图 4)。

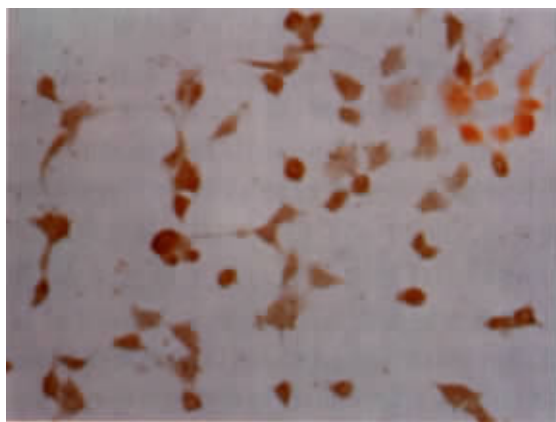


图 3 801D 细胞中 p53 突变蛋白阳性染色(6×20)

Fig 3 Positive expression of mutant p53 protein in the 801D cell(6×20)

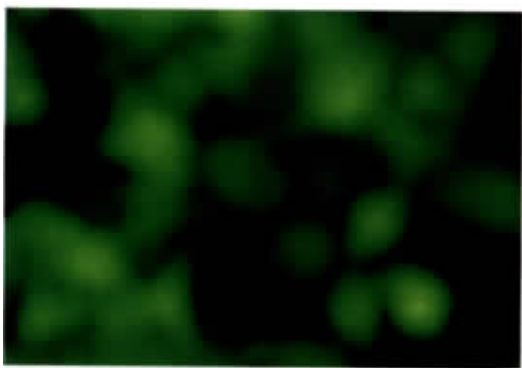


图 1 绿色荧光蛋白在转染细胞系中表达(6×20)

Fig 1 Green fluorescence protein was observed in the cytoplasm of transferring cell line by the fluorescent microscopy(6×20)



图 4 pEGFP-p53(AS)-801D 中 p53 蛋白阴性染色(6×10)

Fig 4 Negative expression of mutant p53 protein in the pEGFP-p53(AS)-801D cell line(6×10)

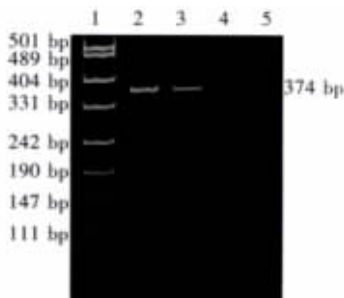


图 2 检测母系细胞和转染细胞中外源 p53 基因的表达

Fig 2 Detection of p53 gene in the parent and transferring cell line

1: Marker; 2: pEGFP-p53(RS)-801D; 3: pEGFP-p53(AS)-801D; 4: pEGFP-801D; 5: 801D

2.3 细胞集落形成率 801D 平均生长集落数为 292 (283302)个,集落形成率为 58.4%;pEGFP-801D 集落数为 354(346~362)个,形成率为 70.8%;pEGFP-p53(AS)-801D 集落数为 111(105~115)个,形成率为 22.2%;pEGFP-p53(RS)-801D 集落数为 56(45~66)个,形成率为 11.2%。与 801D 比较,pEGFP-p53(AS)-801D 和 pEGFP-p53(RS)-801D 的集落形成率均明显降低($P < 0.01$);pEGFP-p53(RS)-801D 的集落形成率亦明显低于 pEGFP-p53(AS)-801D($P < 0.01$)。与 801D 比较,pEGFP-p53(AS)-801D 集落形成抑制率为 62.0%。pEGFP-p53(RS)-801D 集落形成抑制率为 80.8%。研究结果显示,外源正义和反义 p53 基因均可降低 801D

细胞集落形成,可抑制细胞恶性增殖。

2.4 裸鼠移植试验 接种 801D 群体细胞,每只裸鼠均生长肿瘤,瘤重平均 2.1 g。pEGFP-p53(RS)-801D 细胞接种的 4 个移植瘤,仅 1 个部位生长肿瘤,瘤重 0.1 g。pEGFP-p53(AS)-801D 细胞接种的 4 个部位均生长肿瘤,平均瘤重 0.85 g(图 5)。检查肿瘤组织细胞荧光,pEGFP-p53(RS)-801D 肿瘤细胞和 pEGFP-p53(AS)-801D 肿瘤细胞均可见绿色荧光(图 6),801D 肿瘤细胞无荧光。结果显示,pEGFP-p53(RS)-801D 和 pEGFP-p53(AS)-801D 肿瘤原性均有降低,但 pEGFP-p53(RS)-801D 细胞受到更明显的抑制。

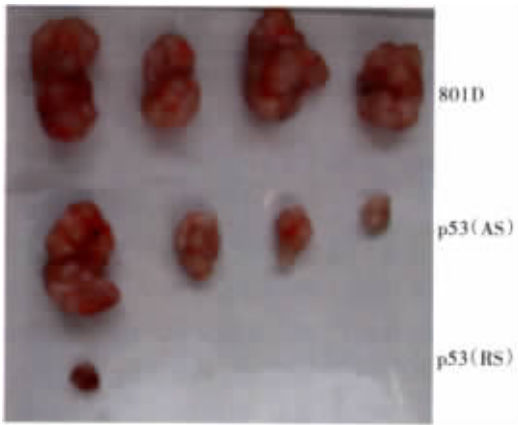


图 5 外源性 p53 基因转染细胞系及母系裸鼠移植瘤结果

Fig 5 The heteroplastic transplants of extraneous p53 transferring cell and 801D cell on nude mouse

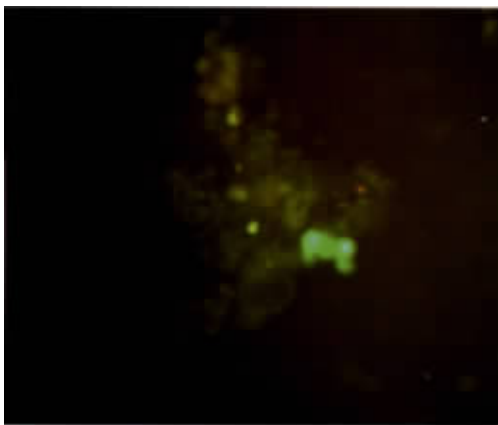


图 6 pEGFP-p53(AS)-801D 移植瘤组织中荧光蛋白表达

Fig 6 Green fluorescence protein expression in tumor tissue of transplant by pEGFP-p53(AS)-801D

2.5 细胞周期分析(表 1) 母系和转染细胞系细胞周期分析,801D 母系和空载 pEGFP-801D 细胞 G₁ 期细胞数均各占细胞总数的 36%,pEGFP-p53(RS)-801D 为 39%,而 pEGFP-p53(AS)-801D 为 55%,并出现大量死亡细胞,说明外源反义 p53 可阻滞 801D 细胞周期,明

显抑制细胞恶性增殖。

表 1 各组细胞 FCM 分析

Tab 1 Flow cytometry analysis of different cell lines

| Cell line | Ratio of cell cycle | | |
|--------------------|---------------------|-----|-----|
| | G1 | G2 | S |
| 801D | 36% | 16% | 48% |
| pEGFP-801D | 36% | 19% | 45% |
| pEGFP-p53(AS)-801D | 55% | 13% | 33% |
| pEGFP-p53(RS)-801D | 39% | 13% | 47% |

3 讨论

本文报告了不同异常状态的 p53 基因对人肺癌细胞系 801D 恶性增殖的影响。801D 细胞有 248 位氨基酸密码等位基因缺失和碱基由 CGG→CTT 颠换,有 p53 突变蛋白表达。该细胞系体内外恶性增殖明显。我们构建了 p53 cDNA 正向和反向联结的质粒,经 Lipofectin 介导转染 801D 细胞,建立了 pEGFP-p53(RS)-801D 和 pEGFP-p53(AS)-801D 两个细胞系。由于 801D 细胞存在 p53 基因 248 位密码缺失和另一等位基因突变,转染外源正义 p53 的细胞系 pEGFP-p53(RS)-801D 可视为仅有 p53 突变的细胞,转染外源反义 p53 的细胞系 pEGFP-p53(AS)-801D 可视为仅有 p53 缺失的细胞。在同一细胞背景下,我们比较了 3 种 p53 异常状态对细胞恶性表型的影响。801D 集落形成率为 58.4%,pEGFP-p53(RS)-801D 为 11.2%,pEGFP-p53(AS)-801D 为 22.2%。裸鼠移植瘤试验中,母系 801D 瘤重 2.1 g,pEGFP-p53(RS)-801D 为 0.1 g,pEGFP-p53(AS)-801D 为 0.85 g。结果显示,p53 缺失和突变均可不同程度抑制人肺癌细胞系体内外恶性增殖和生长。p53 缺失的细胞[pEGFP-p53(AS)-801D]恶性增殖和生长更为明显,说明 p53 功能缺失与细胞恶性增殖和生长极为相关。这是利用外源野生型 p53 基因治疗肿瘤的理论基础。

外源正义 p53 抑制人肺癌细胞系 801D 恶性生长,说明外源正义 p53 可在 801D 细胞重建 p53 抑癌功能。许多作者有类似报告^[6,7]。外源反义 p53 抑制人肺癌细胞系 801D 恶性生长是由于封闭突变蛋白表达,抑制或降低突变 p53 致癌作用的结果。国内作者也有相同报告^[8]。由于肿瘤中 p53 突变发生率很高(是最主要的异常类型),从治疗观点出发以 p53 突变为靶点设计新的药物或基因治疗已成为治疗肿瘤的重要思路。近年研究表明在有 p53 突变的肿瘤细胞中野生型 p53 功能可以得到恢复^[9~11],功能的恢复与突变位点和蛋白构象有关^[9]。本研究细胞周期分析发现,801D 母系和

空载 pEGFP-801D 细胞 G₁ 期细胞数均各占细胞总数的 36% , pEGFP-p53(RS)-801D 占 39% , 而 pEGFP-p53(AS)-801D 为 55% , 并出现大量死亡细胞 , 显示 p53 突变蛋白对 G₁ 期阻滞起负面影响 , 而外源反义 p53 封闭了突变蛋白 , 可使 801D 细胞停滞于 G₁ 期。是否说明野生型 p53 功能也得到部分恢复 , 尚待进一步研究。

人肺癌细胞系 801D 有 p53 基因 248 密码突变和缺失 , 经外源正义和反义 p53 转染 , 可抑制细胞恶性增殖。p53 基因 248 密码异常是人类最常见的突变热点区 , 因此 , 本研究结果为 p53 基因合并药物治疗提供了依据。在同一细胞背景比较外源正义和反义 p53 对细胞恶性表型的影响 , 具有理论和实际应用的价值。

参 考 文 献

- 1 Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 1997, 88(3):323-331.
- 2 Miller CW, Simon K, Aslo A, et al. p53 mutations in human lung tumors. *Cancer Res*, 1992, 52(7):1695-1698.
- 3 Hussain SP, Harris CC. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res*, 1998, 58(18):4023-4037.
- 4 Dittmer D, Pati S, Zambetti G, et al. Gain of function mutations in p53. *Nat Genet*, 1993, 4(1):42-46.
- 5 汪蕙, 赖百塘, 李金照. 外源 p53 对人肺癌细胞生长的抑制. *中国肺癌杂志*, 1998, 1(1):25-28.
- 6 Fujiwara T, Cai DW, Georges RN, et al. Therapeutic effect of a retroviral wild-type p53 expression vector in an orthotopic lung cancer model. *J Natl Cancer Inst*, 1994, 86(19):1458-1462.
- 7 Takahashi T, Carbone D, Takahashi T, et al. Wild-type but not mutant p53 suppresses the growth of human lung cancer cells bearing multiple genetic lesions. *Cancer Res*, 1992, 52(8):2340-2343.
- 8 曹江, 腾理, 蔡心涵, 等. p53 反义 RNA 对肠癌细胞恶性表型的抑制作用. *中华肿瘤杂志*, 1997, 19(2):123-127.
- 9 Foster BA, Coffey HA, Morin MJ, et al. Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science*(Washington DC), 1999, 286(5449):2507-2510.
- 10 Selivanova G, Ryabchenko L, Jansson E, et al. Reactivation of mutant p53 through interaction of a C-terminal peptide with the core domain. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(5):3395-4402.
- 11 Nikolova PV, Wong KB, DeDecker B, et al. Mechanism of rescue of common p53 cancer mutations by second-site suppressor mutations. *EMBO J*, 2000, 19(3):370-378.
- 12 Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutation of the p53 tumor suppressor: The demons of the guardian of the genome. *Cancer Res*, 2000, 60(24):6788-6793.

(收稿 2001-11-23 修回 2002-05-30)

(本文编辑 李蓓兰)

· 启 事 ·

《中国肿瘤》杂志、《肿瘤学杂志》联合征订启事

《中国肿瘤》杂志系卫生部主管, 全国肿瘤防治研究办公室主办的综合类科技月刊, 大 16 开, 64 页, 邮发代号 32-100。该刊以交流肿瘤防治经验、推广肿瘤科技成果, 促进肿瘤防治事业的发展为宗旨, 是社会各方了解我国肿瘤防治研究工作进展动态的重要途径, 也是肿瘤防治研究理论与实践活动的重要论坛。主要刊载国家癌症控制动态和工作研究报告, 肿瘤学术研究成果及进展等。好稿一个月内刊出。

《肿瘤学杂志》是面向全国的学术类科技双月刊, 大 16 开, 64 页, 邮发代号 32-37。该刊由浙江省肿瘤医院和中国癌症研究基金会、全国肿瘤防治研究办公室共同主办, 将及时反映我国肿瘤学术研究新领域的新技术、新成果和新进展, 以指导科研和临床实践。该刊公平公正, 择优录用稿件, 力求高质量, 好稿快发, 1~2 个月内见刊。

以上两刊均为国内外公开发行, 均已加入“中国期刊网”、“万方数据库”、“中文生物医学期刊文献数据库”, 并专递中国肿瘤网站。

读者可在当地邮局订阅, 漏订者可直接向本刊编辑部订阅。

联系地址: 浙江省杭州市半山桥广济路 38 号浙江省肿瘤医院内

《中国肿瘤》编辑部 《肿瘤学杂志》编辑部

电话: 0571-88147297 0571-88144401-261 传真: 0571-88147297

E-mail: zgzl@mail.hz.zj.cn

中国肺癌杂志
www.lungca.org