

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 G<sub>1</sub> 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 G<sub>1</sub> 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 G<sub>1</sub> 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<sup>[1]</sup>。肺癌中 p53 基因异常发生率较高<sup>[2,3]</sup>。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<sup>[4]</sup>。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<sup>[5]</sup>。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  $1.2 \times 10^5$  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  $\mu$ l 无血清培养基,各取 2  $\mu$ l Lipofectin 加入于 98  $\mu$ 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  $\mu$ l 无血清培养基,将其加入到上述经洗涤的 801D 细胞上,置 CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ 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  $\mu$ m,发

射光最高波长为 507  $\mu$ 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<sup>[5]</sup>,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,CO<sub>2</sub> 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  $1 \times 10^7$ /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  $\chi^2$  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)。

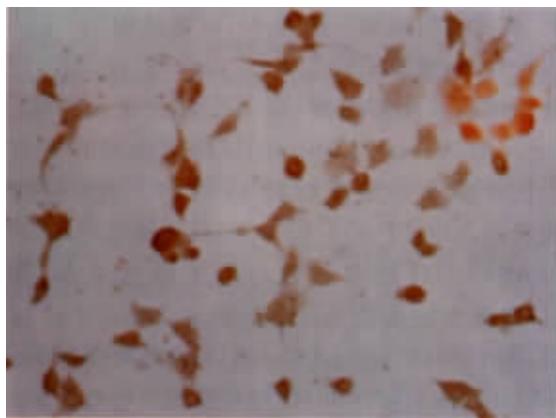


图 3 801D 细胞中 p53 突变蛋白阳性染色(6×20)

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

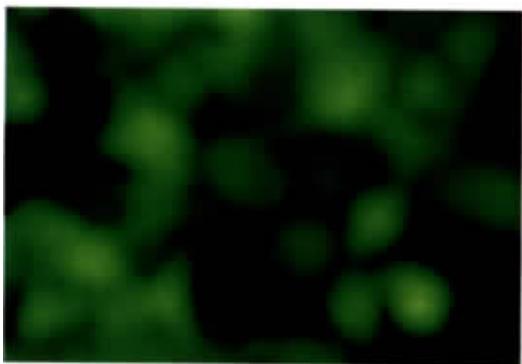


图 1 绿色荧光蛋白在转染细胞系中表达(6×20)

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)

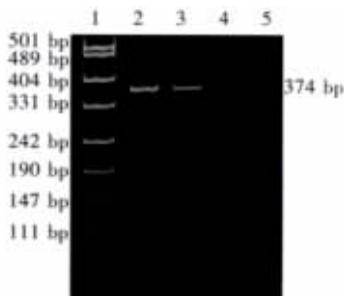


图 2 检测母系细胞和转染细胞中外源 p53 基因的表达

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。

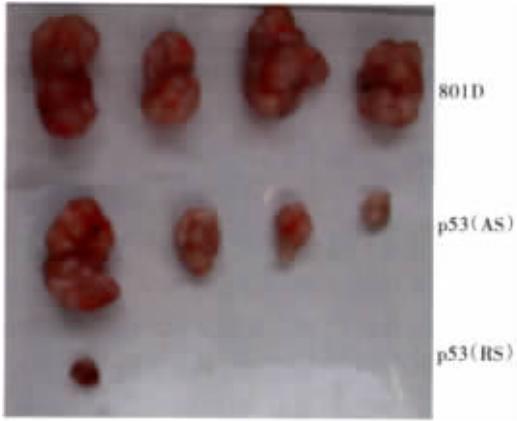


图 5 外源性 p53 基因转染细胞系及母系裸鼠移植瘤结果

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

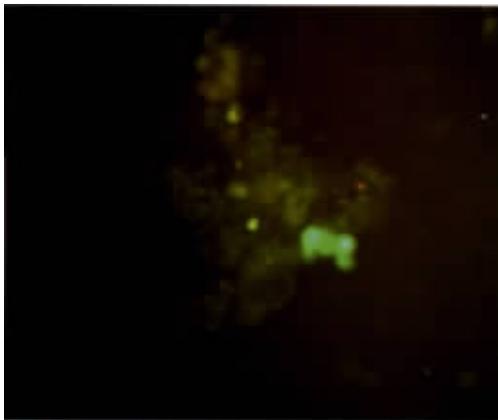


图 6 pEGFP-p53(AS)-801D 移植瘤组织中荧光蛋白表达

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 G<sub>1</sub> 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<sup>[6,7]</sup>。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<sup>[8]</sup>。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<sup>[9~11]</sup>,功能的恢复与突变位点和蛋白构象有关<sup>[9]</sup>。本研究细胞周期分析发现,801D 母系和

空载 pEGFP-801D 细胞 G<sub>1</sub> 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 G<sub>1</sub> 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 G<sub>1</sub> 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 ,1( 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