

高表达 p73 基因对肺腺癌细胞 VEGF、bFGF 表达抑制作用的研究

元 东¹, 范士志², 何 勇²

Overexpression p73 Gene Inhibit VEGF, bFGF Expression in Lung Adenocarcinoma Cell

YUAN Dong¹, FAN Shi-zhi², HE Yong²

1. Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command, Wuhan 430070, China; 2. Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University

Abstract: **Objective** To study the effect of overexpression p73 gene on VEGF, bFGF expression in lung adenocarcinoma cell. **Methods** p73 gene was transferred into A549 cell and H1299 cell by liposome and the positive cell clones were chosen by G418. The VEGF and bFGF mRNA expression were detected by RT-PCR, protein expression were detected by western blot. **Results** The VEGF, bFGF mRNA and protein expression in A549 cell and H1299 cell were decreased after transferred p73 gene ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression p73 gene can inhibit the VEGF and bFGF expression in lung adenocarcinoma, so it can inhibit the angiogenesis in lung adenocarcinoma.

Key words: Lung adenocarcinoma; p73 gene; VEGF; bFGF

摘 要: **目的** 观察高表达的 p73 基因对肺腺癌细胞中 VEGF、bFGF mRNA 和蛋白表达水平的影响。 **方法** 将 p73 基因以脂质体法转染 A549 细胞、H1299 细胞, G418 筛选阳性细胞克隆, 采用 RT-PCR 半定量法检测转染前后 VEGF、bFGF mRNA 的表达水平, Western blot 半定量法检测蛋白表达水平。 **结果** 转染 p73 基因后, A549 细胞、H1299 细胞中 VEGF、bFGF mRNA 和蛋白表达水平均下降, 较未转染 p73 基因的细胞有显著性差异 ($P < 0.05$)。 **结论** 高表达的 p73 基因能够降低肺腺癌细胞中 VEGF、bFGF mRNA 和蛋白表达水平, 提示 p73 基因可能抑制人类肺腺癌的血管生成。

关键词: 肺腺癌; p73 基因; 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 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2005)02-0082-03

0 引言

p73 基因是近年来发现的 p53 基因家族的新成员, 其编码的 p73 蛋白与 p53 蛋白有着类似的结构, 并且也可以抑制细胞生长, 诱导细胞凋亡^[1]。在人类非小细胞肺癌中, p73 基因表达明显高于癌旁组织^[2], 并且很少有突变。我们用脂质体法将 p73 基因转染入 A549、H1299 两种肺腺癌细胞, 应用 RT-PCR 法和 Western blot 法检测转染前后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 和蛋白的表达水平变化, 以探讨高表达的 p73 基因对人类肺腺癌血管生成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株与质粒 A549 细胞、H1299 细胞均为人肺腺癌细胞系, p73、p73 质粒均以 pcDNA3 为载体构建而成, 均由本科室何勇博士惠赠。

1.1.2 PCR 引物 VEGF 上游引物: 5'-CCTT-GCTGCTCTACCTCC-3', 下游引物: 5'-AAT-GCTTTCTCCGCTCT-3', PCR 产物片段为 421bp。 bFGF 上游引物: 5'-AAGAGCACCCG TCACAT-CAA-3', 下游引物: 5'-TCGTTTCA GTG CCA-CATACC-3', PCR 产物片段为 225bp。 -actin 上游引物: 5'-CGGGAAA TCGTGC GTGAC-3', 下游引物: 5'-GGAA GGAA GCTGGG AAGA GTG-3', PCR 产物片段为 184bp。以上引物由上海申友公司合成。

1.1.3 试剂 RPMF1640 培养基、DMEM 培养基购自 Sigma 公司, 脂质体 DOTAP (liposomal) 和 G418 购自 Roche 公司, AMV-R Tase、Taq 酶、Oligo (dT) 15、dNTP 购自 Promega 公司, 兔抗人 VEGF、bFGF 单克隆抗体购自北京中山公司, RIPA 蛋白提取试剂盒购自上海申能博彩公司。

收稿日期: 2004-02-10; 修回日期: 2004-04-29
作者单位: 1. 430070 广州军区武汉总医院心胸外科; 2. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所心胸外科

1.2 方法

1.2.1 基因转染 用脂质体法将 pcDNA3、p73、p73 质粒转染 A549 细胞、H1299 细胞, G418 终浓度 800μg/ml 筛选阳性细胞克隆。A549 细胞以 RPMI1640 培养, H1299 细胞以 DMEM 培养, 培养至 1 × 10⁷ 后, 准备提取总 RNA 和蛋白。

1.2.2 RT-PCR 法检测 VEGF、bFGF mRNA 表达

按 Tripure 试剂盒说明提取细胞总 RNA, 紫外分光光度计定量, RNA (g/L) = A260 × 40 × 稀释倍数 / 1000。AMV-RNase 和 Oligo (dT) 15 引物将总 RNA 反转录成 cDNA。取 5μl 反转录 cDNA 作 PCR 扩增, 反应体系为 25μl, 含 10 × PCR buffer 2μl, KCL 10mmol/L, MgSO₄ 2mmol/L, dNTP 各 200μmol/L, TaqDNA 聚合酶 0.5U, 上下游引物各 0.3μmol/L。按以下参数在 PCR 扩增仪 (Perkin Elmer 公司 9600 型) 上进行。VEGF 反应条件: 94 变性 70s, 60 退火 60s, 72 延伸 90s, 经 33 个循环周期后, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳。bFGF 反应条件: 94 变性 60s, 60 退火 65s, 72 延伸 115s, 经 35 个循环周期后, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳。-actin 反应条件: 94 变性 65s, 60 退火 70s, 72 延伸 110s, 经 30 个循环周期后, 1% 琼脂糖凝胶电泳。以 Gel-PRO 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 -actin 为内参对照, 计算目的条带和 -actin IOD 比值即标准化积分光密度值 (normalized integrated intensity, NII)^[3], 以 NII% 为单位, 代表 VEGF 和 bFGF mRNA 表达水平。

1.2.3 Western-blot 检测 VEGF、bFGF 蛋白 按照 RIPA 蛋白提取试剂盒的步骤提取细胞总蛋白, 采用 Bradford 法测定总蛋白浓度。取总蛋白 40μg 行 SDS-PAGE, 电泳结束后电转印 17h 至 PVDF 膜, 膜封闭液 (1% BSA、0.02mol/L) 内封闭室温 1h, 4 过夜, PBS 洗膜 5min × 4, 加入兔抗人 VEGF、bFGF 单克隆抗体 (1:350), 37 孵育 1h, PBS 洗膜 5min × 4, 再加入羊抗兔 IgG (1:2000), 37 孵育 1h, PBS 洗膜 5min × 4, 化学发光试剂与 PVDF 膜共同孵育 1min, 将 PVDF 膜与 X 光片共同放暗盒曝光 4min, 显影 3min, 定影 10min。以 Gel-PRO ANALYZER 凝胶定量分析软件分析 Western-blot 检测结果, 得出各条带的灰度值, 以平均灰度值代表 VEGF 和 bFGF 蛋白表达水平。

1.3 统计学处理

数据结果以均数 ± 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 VEGF 和 bFGF RT-PCR 结果

结果见图 1、2。VEGF 和 bFGF mRNA 在 A549 细胞及 H1299 细胞中均呈阳性表达, 转染了 pcDNA3 后 VEGF 和 bFGF mRNA 表达水平与转染前无显著性差异 ($P > 0.05$), 而转染了 p73、p73 后均能使 A549 细胞及 H1299 细胞中 VEGF 和 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 ($P < 0.05$), 见表 1、2。

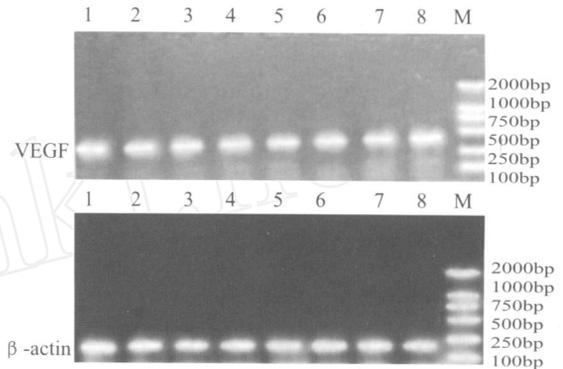


图 1 VEGF 和 -actin 的 RT-PCR 结果

1:A549 2:A549-pcDNA3 3:A549-p73 4:A549-p73 5:H1299 6:H1299-pcDNA3 7:H1299-p73 8:H1299-p73 M:Marker

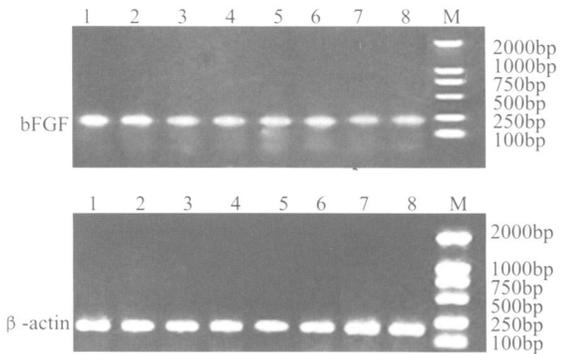


图 2 bFGF 和 -actin 的 RT-PCR 结果

1:A549 2:A549-pcDNA3 3:A549-p73 4:A549-p73 5:H1299 6:H1299-pcDNA3 7:H1299-p73 8:H1299-p73 M:Marker

表 1 转染 p73 基因前后 A549 细胞、H1299 细胞中 VEGF mRNA 表达水平 (NII%, $\bar{x} \pm s$) (n=5)

Cell	control	pcDNA3	p73	p73
A54	937 ± 11	34 ± 13	28 ± 11 *	24 ± 9 *
H1299	29 ± 9	28 ± 10	23 ± 6 *	19 ± 7 *

* $P < 0.05$

表 2 转染 p73 基因前后 A549 细胞、H1299 细胞中 bFGF mRNA 表达水平 (NII%, $\bar{x} \pm s$) (n=5)

Cell	control	pcDNA3	p73	p73
A549	34 ± 10	36 ± 9	26 ± 10 *	25 ± 14 *
H1299	31 ± 7	30 ± 12	22 ± 6 *	23 ± 8 *

* $P < 0.05$

2.2 VEGF 和 bFGF 蛋白 Western-blot 结果

Western-blot 结果见图 3。转染 pcDNA3 后 A549 细胞及 H1299 细胞中 VEGF 和 bFGF 蛋白表达水平与转染前无显著性差异 ($P > 0.05$), 而转染了 p73、p73 后均能使 VEGF 和 bFGF 蛋白表达水平降低, 与未转染 p73 基因的细胞相比较有显著性差异 ($P < 0.05$), 见表 3、4。

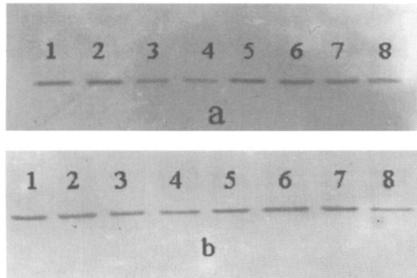


图 3 VEGF 和 bFGF Western-blot 结果

a: VEGF b: bFGF 1: A549 2: A549-pcDNA3 3: A549-p73 4: A549-p73 5: H1299 6: H1299-pcDNA3 7: H1299-p73 8: H1299-p73

表 3 转染 p73 基因前后 A549 细胞、H1299 细胞中 VEGF 蛋白表达水平 (平均灰度值, $\bar{x} \pm s$) (n=5)

分组	对照	pcDNA3	p73	p73
A549	294 ±61	263 ±79	176 ±113*	221 ±92*
H1299	351 ±87	370 ±92	264 ±66*	240 ±78*

* $P < 0.05$

表 4 转染 p73 基因前后 A549 细胞、H1299 细胞中 bFGF 蛋白表达水平 (平均灰度值, $\bar{x} \pm s$) (n=5)

分组	对照	pcDNA3	p73	p73
A549	419 ±104	425 ±79	325 ±113*	306 ±104*
H1299	471 ±97	452 ±82	292 ±86*	317 ±128*

* $P < 0.05$

3 讨论

p53 基因与肺癌的发生、发展关系密切, p73 基因是 p53 家族的新成员, 位于人类 1 号染色体 1p36.33 区域, 该区域含有多个抑癌基因^[4], 其编码的 p73 蛋白与 p53 蛋白结构相似, 都能抑制细胞生长、诱导细胞凋亡^[5], 因此 p73 基因曾被推测为一个抑癌基因。但是目前的研究表明在某些肿瘤中 p73 基因呈低水平的表达, 而在另外一些肿瘤中却发现 p73 基因过度表达^[6]。在肺癌中 p73 基因表达增高, 而且很少突变, 这一点与 p53 基因在非小细胞肺癌中经常突变和缺失不同, 提示两者在非小细胞肺癌中发挥不同作用。p53 基因的突变或缺失可能导致肺癌发生的原因^[7], 而 p73 基因的高表达是肺癌

发生后出现的现象, 可以推测是对 p53 基因功能的一种代偿, 这种代偿会对肺腺癌的血管生成起到何种作用尚不清楚。

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 RT-PCR 和 Western-blot 半定量方法研究转染 p73 基因后肺腺癌细胞中 VEGF、bFGF mRNA 和蛋白表达水平的变化, 结果发现高表达 p73 基因能够下调肺腺癌细胞中 VEGF、bFGF mRNA 和蛋白的表达。VEGF、bFGF 是促进血管生成的重要细胞因子^[8], 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成为目前肿瘤治疗的一个热点^[9], 本课题的研究不仅对 p73 基因功能有了进一步的了解, 从分子生物学水平阐释 p73 基因对肺癌发展的影响, 而且为肺癌的治疗提供一种新的思路和理论依据, 具有非常重要的临床意义。

参考文献:

- [1] Kaghad M, Bonnet H, Yang A, et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers[J]. Cell, 1997, 90(4): 809-819.
- [2] Tokuchi Y, Hashimoto T, Kobayashi Y, et al. The expression of p73 is increased in lung cancer, independent of p53 gene alteration[J]. Br J Cancer, 1999, 80(10): 1623-1629.
- [3] Yan SF, Tritto I, Pinsky D, et al. Induction of interleukin 6 (IL-6) by hypoxia in vascular cells, central role of the binding site for nuclear factor IL-6[J]. J Bio Chem, 1995, 270(19): 11463-11471.
- [4] Dickman S. First p53 relative may be a new tumor suppressor[J]. Science, 1997, 277(5332): 1605-1606.
- [5] Willis AC, Pipes T, Zhu J, et al. p73 can suppress the proliferation of cells that express mutant p53[J]. Oncogene, 2003, 22(35): 5481-5495.
- [6] Pan H, Liao SJ, Lai WY, et al. Overexpression but lack of mutation and methylation of p73 in hepatocellular carcinoma[J]. Acta Oncol, 2002, 41(6): 550-555.
- [7] Fedorov LM, Papadopoulos T, Tyrsin OY, et al. Loss of p53 in craf-induced transgenic lung adenoma leads to tumor acceleration and phenotypic switch[J]. Cancer Res, 2003, 63(9): 2268-2277.
- [8] Lutsenko SV, Kiselev SM, Severin SE. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis[J]. Biochemistry (Moscow), 2003, 68(3): 286-300.
- [9] Dreves J, Laus C, Mendinger M, et al. Antiangiogenesis: current clinical data and future perspectives[J]. Onkologie, 2002, 25(6): 520-527.

[编辑校对: 周永红]