

# 外源性 p53 基因增加卵巢癌细胞对顺铂的敏感性

关 婷<sup>1</sup>, 崔满华<sup>2</sup>, 李守柔<sup>2</sup>

**摘要:**目的 探讨外源性 p53 基因转染对人卵巢癌细胞株的化疗敏感性的影响。方法 用脂质体介导的转染技术, 将人野生型 p53 基因的真核表达载体导入不表达 p53 的卵巢癌 SKOV-3 细胞中, 经 G418 筛选, Northern blot 及 Western blot 鉴定后, 观察其对顺铂作用后的 SKOV-3 细胞的集落形成及凋亡的影响。结果 外源性 p53 基因在转染细胞中有效表达, 并增强了顺铂对 SKOV-3 细胞集落形成的抑制作用及促进了顺铂诱导的细胞凋亡。结论 外源性 p53 基因能增加卵巢癌细胞对顺铂的敏感性, 两者联合作用能更大程度地杀灭肿瘤细胞。

**关键词:** p53; 卵巢癌; 顺铂; 化疗敏感性

**中图分类号:** R737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2002)01-0035-02

## Enhanced sensitivity of human ovarian cancer cells to cisplatin by exogenous p53 gene

GUAN Ting, CUI Man-hua, LI Shou-rou

Department of Obstetrics and Gynecology, Guangzhou general Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China

**Abstract:** **Objective** To explore the effects of exogenous p53 gene on chemosensitivity of human ovarian cancer cell line SKOV-3. **Methods** human wild-type p53 gene eukaryotic expression vector was introduced into SKOV-3 cells by lipofectin-mediated gene transfection and the expression of p53 gene in them was detected by Northern blot and Western blot. The effects of cisplatin to the transfected cells was observed by colony formation and apoptosis. **Results** The exogenous p53 gene was expressed effectively in the cells. The expression on p53 gene enhanced the suppression of cisplatin on colony formation and the apoptosis introduced by it. **Conclusion** Exogenous wild-type p53 gene can enhance the sensitivity of human ovarian cancer cells to cisplatin. The combination of p53 gene therapy with chemotherapy may be more effective in cancer treatment.

**Key words:** p53 gene; Ovarian cancer; Cisplatin chemosensitivity

如何提高肿瘤对化疗药的敏感性一直是人们关注的问题。近年研究表明 p53 基因在化疗药诱导的细胞凋亡过程中起着十分重要的作用, 其功能异常与大多数肿瘤对化疗的耐受有关。本实验中我们通过脂质体介导的方法将 p53 基因导入 p53 基因严重异常的卵巢癌细胞中, 观察 p53 基因转染后该细胞对顺铂敏感性的变化。

### 1 材料和方法

1.1 主要试剂 G418(Geneticin)及脂质体(Lipofectin)购于美国 GIBCO 公司, p53 单克隆抗体(DO-1)及辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗购于北京中山生物技术公司。p53 真核表达质粒(pcDNA-p53)已在另一实验中构建成功<sup>[1]</sup>。

1.2 细胞株及培养 人卵巢癌细胞株 SKOV-3 来源于美国 ATCC 中心。该细胞株因 p53 基因严重缺失与重排, 不能转录 p53 mRNA, 无 p53 蛋白表达。细胞培养于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中。抗药性克隆筛选及扩大培养, 集落形成实验均在 5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度及 37°C 培养条件下进行。

1.3 基因转染及转染克隆的筛选 取 5 μg 质粒及 20 μl 脂质体分别用无血清 DMEM 培养液稀释至 100 μl, 然后将二液混合进行转染, 方法按脂质体说明书中的稳定转染方法进行。设未转染的 SKOV-3 细胞为空白对照, 不含 p53 基因的空载体转染为阴性对照。G418 筛选浓度为 500 μg/ml, 维持浓度为 300 μg/ml, 待克隆形成后, 扩大培养。

1.4 外源 p53 基因表达的鉴定 a. Northern blot 检测 p53 mRNA 表达; 用异硫氰酸胍一步法提取细胞总 RNA, 经甲醛变性电泳后, 转膜; 用 <sup>32</sup>P 标记的 p53 cDNA 为探针进行杂交, 放射自显影。b. Western blot 检测 p53 蛋白表达: 按参考文献<sup>[2]</sup>方法提

收稿日期: 2001-06-11; 修回日期: 2001-07-19

基金项目: 吉林省卫生厅科技基金资助项目(981617)

作者单位: 1. 510010 广州军区广州总医院妇产科; 2. 白求恩医科大学第二临床学院妇产科

取蛋白及转膜,用3%牛血清白蛋白封闭,依次与1:1000一抗及二抗反应,DAB显色。

1.5 集落形成测定 六孔板每孔接种500个细胞,每组3个复孔,培养2周后,计数>50个细胞的集落数。顺铂作用组于细胞接种后48h,更换含顺铂的培养液作用24h或48h,之后更换正常培养液。

1.6 流式细胞仪分析 取 $1 \times 10^6$ 指数生长期单细胞悬液,用PBS洗两次,加RNA酶及碘化丙啶400 $\mu$ l(50 $\mu$ g/ml),避光染色30min,用FACScan型流式细胞仪检测。用Lysis软件分析检测结果。

1.7 统计学处理 采用t检验。

## 2 结果

表1 p53基因转染的细胞对化疗药顺铂的敏感性( $\bar{x} \pm s$ )

细胞株	时间(h)	0 $\mu$ g/ml	0.5 $\mu$ g/ml	1 $\mu$ g/ml	3 $\mu$ g/ml
SKOV-3	24	111.7 $\pm$ 6.7	65.0 $\pm$ 4.4	34.0 $\pm$ 2.0	10.0 $\pm$ 1.0
	48		56.0 $\pm$ 2.0	23.3 $\pm$ 2.1	2.0 $\pm$ 1.0
SKOV-3-vect	24	102.3 $\pm$ 6.8	60.3 $\pm$ 4.0	26.3 $\pm$ 3.2	8.3 $\pm$ 1.5
	48		50.3 $\pm$ 1.5	17.7 $\pm$ 1.5	1.7 $\pm$ 0.6
SKOV-3-p53	24	63.0 $\pm$ 4.6*	15.0 $\pm$ 3.0*	6.7 $\pm$ 0.6*	0
	48		10.0 $\pm$ 1.0*	4.0 $\pm$ 1.0*	0

n=3 \* P<0.01

由表1可见,经不同浓度顺铂作用后,转染p53基因的细胞的集落形成数比两对照细胞明显减少(P<0.01)。将不同浓度顺铂作用后的SKOV-3、SKOV-3-vect及SKOV-3-p53的集落形成数与未加顺铂的其自身对照组相比,用0.5 $\mu$ g/ml顺铂作用24h,其集落形成数分别下降41.8%、41.1%及76.2%;作用48h,其集落形成数分别下降49.9%、50.8%及84.1%。用1 $\mu$ g/ml顺铂作用24h,其集落形成数分别下降69.9%、74.3%及89.5%;作用48h,其集落形成数分别下降79.1%、82.7%及93.7%。可见转染p53基因的卵巢癌细胞经顺铂作用后,其集落形成数明显下降,说明其对化疗药顺铂的敏感性增加。

2.3 外源性p53基因增加顺铂诱导的细胞凋亡 对1 $\mu$ g/ml顺铂作用24h及48h的SKOV-3-vect及SKOV-3-p53的流式分析结果,外源性p53基因增加了顺铂诱导的细胞凋亡,见表2。

表2 p53基因对顺铂诱导的细胞凋亡的影响

细胞株	凋亡率(%)	
	24h	48h
SKOV-3-vect	8.19 $\pm$ 0.93	15.38 $\pm$ 1.12
SKOV-3-p53	21.42 $\pm$ 0.58*	40.10 $\pm$ 0.41*

n=3 \* P<0.01

## 3 讨论

化疗药治疗肿瘤的机理之一被认为是通过p53依赖途径而诱导细胞凋亡来实现对肿瘤细胞的杀伤<sup>[1]</sup>。

2.1 转染克隆的筛选及鉴定 未转染质粒的SKOV-3细胞经G418筛选8d后全部死亡。维持筛选2周后转染空载体(pcDNA3)及携带p53片段载体(pcDNA-p53)的细胞获得抗性克隆,分别命名为SKOV-3-vect及SKOV-3-p53。Northern blot显示SKOV-3-p53有p53mRNA表达,而SKOV-3-vect则无。Western blot显示只有转染p53基因的细胞有p53蛋白表达(图略)。

2.2 外源性p53基因增加SKOV-3细胞对顺铂的敏感性 用不同浓度顺铂作用24h或48h后,三种细胞的集落形成情况,见表1。

化疗药使肿瘤细胞的DNA受损伤,损伤的DNA启动p53基因,使细胞进入G1期生长抑制并诱导损伤严重的细胞进入凋亡状态<sup>[4]</sup>。若p53基因失活或缺失,则该凋亡途径不能进行,使细胞对化疗药不敏感。实验研究表明,p53基因失活或缺失可使肿瘤细胞出现耐药性<sup>[5,6]</sup>。本实验结果显示,外源性p53基因的表达使卵巢癌细胞对化疗药顺铂的敏感性增加,两者联合作用后,使卵巢癌细胞的集落形成能力明显降低;外源性p53基因促进了顺铂诱导的细胞凋亡。提示将p53基因治疗与化疗联合应用,能更大程度地杀灭肿瘤细胞。

### 参考文献:

- [1] 关婷,崔清华,李守柔,等.卵巢癌的p53基因治疗实验研究—人野生型p53基因真核细胞表达质粒的构建[J].白求恩医科大学学报,2000,26:354-355.
- [2] 卢圣栋.现代分子生物学实验技术[M].北京:高等教育出版社,1993.403-406.
- [3] Weller M. Predicting response to cancer chemotherapy: the role of p53[J]. Cell Tissue Res,1998,292:435-445.
- [4] Agarwal ML, Taylor WR, Chernov MV, et al. The p53 network[J]. J Biol Chem,1998,273:1-4.
- [5] Righetti SC, Della Tone G, Pilotti S, et al. A comparative study of p53 gene mutations protein accumulation and response to cisplatin-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma[J]. Cancer Res,1996,56:689-693.
- [6] Buttitta F, Marchetti A, Gadduci A, et al. p53 alterations are predictive of chemoresistance and aggressiveness in ovarian carcinomas: a molecular and immunohistochemical study[J]. Br J Cancer,1997,75:230-235.

(刘红武校对)