

[文章编号] 1007-385X(2008)02-0163-06

· 论 著 ·

14 株肿瘤细胞 P53 基因突变的检测

马家烈, 韦芳, 李惠明, 田毓华, 陈霞芳, 王丰, 黄倩*(上海交通大学医学院附属上海市第一人民医院中心实验室, 上海 200080)

[摘要] 目的: 检测 14 株肿瘤细胞 P53 基因的突变情况。方法: 根据 P53 基因 5~8 外显子之间的内含子序列设计引物, 分别对人肺癌、脑胶质瘤、肝癌、胃癌、前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、脉络膜恶性黑色素瘤、视网膜成细胞瘤等 9 种肿瘤 14 株细胞的 P53 基因 5、6、7、8 的外显子进行 PCR 扩增反应。琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物; DNA 测序, 并与正常的 DNA 序列比较; 抽提肿瘤细胞蛋白进行 Western blotting 检测 P53 蛋白的表达。结果: 14 株肿瘤细胞 P53 基因热变区 5、6、7、8 外显子的扩增产物经电泳鉴定与预期相同。DNA 测序结果表明, 14 株肿瘤细胞中 8 株存在 P53 基因 5~8 外显子的突变, 其中肺癌细胞 H1299、肝癌细胞 Hep3B、肝癌细胞 SMMC7721、脉络膜恶性黑色素瘤细胞 OCM-1 检测到以前未报道过的突变; 突变主要发生在外显子的编码序列, 多数为单个碱基替换导致的错义突变, 也有部分表现为同义突变; 2 株正常细胞未检测到突变。Western blotting 检测显示, 有基因突变的 8 株肿瘤细胞中仅 6 株有 P53 蛋白表达; 所有 P53 基因未突变的肿瘤细胞株和正常细胞株均未检测到 P53 蛋白。结论: 检测的 14 株肿瘤细胞中有 8 株细胞 P53 基因热变区存在突变, 其中 4 株检测到以前未报道过的突变; 2 株正常细胞未发现 P53 基因突变。

[关键词] 肿瘤细胞; P53 基因; 基因突变

[中图分类号] R730.2 **[文献标志码]** A

Detection of P53 gene mutations in 14 tumor cell lines

MA Jia-lie, WEI Fang, LI Hui-ming, TIAN Yu-hua, CHEN Xia-fang, WANG Feng, HUANG Qian*(Central Laboratory, the First People's Hospital of Shanghai, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate P53 gene mutations in 14 tumor cell lines. **Methods:** Primers were designed according to the intron sequences locating between exons 5-8 of P53 gene for amplification of P53 gene exon 5-8 of the 14 tumor cell lines from 9 kinds of human carcinoma, namely, the lung cancer, glioma, hepatocarcinoma, gastric carcinoma, prostate carcinoma, mammary carcinoma, colonic carcinoma, choroidal melanoma, and retinoblastoma. The PCR products were subjected to electrophoresis; DNA sequencing was performed for the amplified product and the results were compared with wild-type P53 gene. Meanwhile, the P53 protein of 14 tumor cell lines was extracted for Western blotting analysis.

Results: The products of exons 5-8 amplified by PCR were identical to that expected. The results of DNA sequencing showed that 8 of 14 tumor cell lines had P53 gene mutation in exons 5-8. Novel mutations were found in 4 tumor cell lines, including human lung cancer cell H1299, hepatocarcinoma cell Hep3B and 7721, and choroidal melanoma cell OCM-1. The mutations mainly existed in the coding areas of the exons; most of them were missense mutations due to single base replacement; some others were silent mutations; and no mutations were found in the 2 normal cell lines. The results of Western blotting showed that only 6 of 8 mutant lines had P53 protein expression, which was not found in the non-mutant lines and the normal cells. **Conclusion:** We have identified 8 lines with mutant P53 genes among the 14 tumor cell lines, novel mutations are found in 4 tumor cell lines and none in the two normal cell lines.

[Key words] tumor cell; P53 gene; mutation

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(2):163-168]

P53 基因是在 1979 年由 Crawford 等^[1]从猿病毒 40 (similar virus 40, SV40) 转化细胞中发现的一种相对分子质量为 53 000 蛋白质的编码基因。之后, Eliyahu^[2]报道它能促进 RAS 基因对鼠成纤维细胞的转化; 接着 Crawford 等^[3]发现 P53 蛋白在肿瘤

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 39770242)。Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 39770242)

[作者简介] 马家烈(1979-), 男, 黑龙江省哈尔滨市人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤基因治疗方面的研究

* Corresponding author. E-mail: Qhuang2007@gmail.com

细胞中高水平表达,因此,曾被归为癌基因。直至1989年 Finlay 等^[4]发现野生型 *P53* 基因常常通过突变或缺失导致 *P53* 蛋白功能异常诱导肿瘤发生,其作用方式与抑癌基因 *RB* 相似,从此确定野生型 *P53* 基因为抑癌基因。*P53* 基因活性的关键部位在 5~8 外显子所分布的 II-V 区内^[5],有报道^[6]人类肿瘤中大约 50% 有 *P53* 基因突变,而 90% 的 *P53* 基因突变发生在此区。由于 *P53* 基因在大多数的肿瘤中存在突变,许多新的治疗方法和策略都以 *P53* 基因作为靶点。因此,研究不同肿瘤细胞 *P53* 基因突变或 *P53* 基因状态对于探索新的肿瘤基因治疗方法,以及观察肿瘤对治疗载体的反应和治疗效果等均十分有意义。因此,本实验对 14 株不同类型的肿瘤细胞及 2 株正常细胞的 *P53* 基因突变及表达状态进行了检测分析,为进一步利用这些细胞株研究不同肿瘤条件复制型病毒载体及治疗效果奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 肿瘤细胞株与主要试剂

受检 14 株肿瘤细胞由本实验室长期保存,分别是人肺癌细胞 H1299、NCIH446 和 NCIH460,人脑胶质瘤细胞 U251-MG 和 U87-MG,人肝癌细胞 Hep3B、BEL-7402 和 SMMC7721,人胃癌细胞 SGC-7901,人前列腺癌细胞 PC-3,人乳腺癌细胞 MCF-7,人结肠癌细胞 LoVo,人脉络膜恶性黑色素瘤细胞 OCM-1,成人视网膜成细胞瘤细胞 RB;正常细胞株 2 株,分别

是人胚肺成纤维细胞 HLF 和人脐静脉内皮细胞 ECV304。细胞按标准方法培养。各种细胞基因组 DNA 应用宝生物工程(大连)有限公司试剂盒抽提[货号 DV811A(TakaRa Biotechnology Co, Ltd)]。DNA 测序仪器为 ABI 3700 型。蛋白质 Marker 购自捷瑞生物工程(上海)有限公司,*P53* 单克隆抗体购自 Cell Biology 公司,二抗(抗兔)购自 R&D 公司,内参抗体购自康诚生物公司。引物由上海基康生物公司合成,DNA Marker DL2000 购自宝生物工程(大连)有限公司,PCR 产物纯化试剂盒购自上海华舜生物工程公司(Watson Biotechnologies, Inc)。

1.2 *P53* 的聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)扩增

根据 *P53* 基因突变热点区即 5~8 外显子之间的内含子序列,运用在线软件 Primer3(http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)设计引物,分别扩增 5~6、7 和 8 外显子,所扩增的 5~6 外显子为 578 bp,7 外显子为 210 bp,8 外显子为 229 bp(表 1)。PCR 反应体积为 50 μ l,其中包括 10 \times PCR 缓冲液 5 μ l、2 mmol/L dNTP 1 μ l、Taq DNA 聚合酶 0.5 μ l、肿瘤 DNA 100 ng、正义及反义引物(20 pmol/L)各 1 μ l,扩增条件:94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、56~62 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 链延伸 1 min,共 30 个周期。PCR 产物纯化参照厂家推荐方法进行。取纯化 PCR 产物 10 μ l 于 0.9% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察,用 Bio Imaging System 拍照。

表 1 *P53* 基因 PCR 引物序列、片段大小及扩增条件

Tab. 1 PCR primers used for amplification of *P53* gene Exon5-8, fragment length and annealing temperature

Exon	Direction	Primer sequence	Fragment size (bp)	Annealing temperature($t/^{\circ}$ C)
5~6	F	5'GGGTTGCAGGAGGTGCTT3'	578	56
	R	5'TAAGCAGCAGGAGAAAGC3'		
7	F	5'GCCACAGGTCTCCCAAGGC 3'	210	60
	R	5'GATGGTAGTAGTATGGAAGAA3'		
8	F	5'AGGGTGGTTGGGAGTAGATG3'	229	62
	R	5'GAGGCAAGGAAAGGTGATAAAA3'		

F: Forward primer; R: Reverse primer

1.3 *P53* 基因的 DNA 序列分析

纯化 PCR 产物正反两个方向的测序由 ABI 3700 型测序仪完成,将测序结果与 NCBI/Blaster 上的标准序列进行比对,分析突变及突变所在位点。

1.4 肿瘤细胞 *P53* 蛋白的 Western blotting 检测

肿瘤细胞胰蛋白酶消化,离心收集,然后加细胞裂解液 A 充分裂解,4 $^{\circ}$ C、15 000 \times g 离心 10 min,收集上清。经蛋白定量后,10% SDA-PAGE 电泳分

离,转膜。5% 脱脂奶粉 4 ℃ 封闭过夜,一抗(稀释 1:500)、二抗孵育,ECL 系统显影。

2 结果

2.1 14 株肿瘤细胞及 2 株正常细胞 P53 基因 PCR 扩增结果

14 株肿瘤细胞株经 PCR 扩增后电泳结果显示,产物大小与预期相同,Exon5 ~ 6 的扩增片段为 500 ~ 600 bp, Exon7,8 的扩增片段为 200 ~ 300 bp,以上扩增产物没有非特异条带(图 1)。

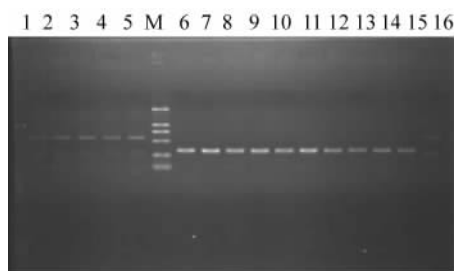


图 1 16 株细胞 P53 基因的 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR products of P53 gene from 16 cell lines

1: Lung cancer cell H1299; 2: Lung cancer cell NCIH446; 3: Lung cancer cell NCIH460; 4: Glioma cell U251-MG; 5: Glioma cell U87-MG; 6: Hepatocarcinoma cell Hep3B; 7: Hepatocarcinoma cell BEL-7402; 8: Hepatocarcinoma cell SMMC7721; 9: Gastric carcinoma cell SGC-7901; 10: Prostate carcinoma cell PC-3; 11: Mammary carcinoma cell MCF-7; 12: Colonic carcinoma cell LoVo; 13: Choroidal melanoma cell OCM-1; 14: Retinoblastoma cell RB; 15: Human lung fibre cell HLF; 16: Endocytovena umbilicalis ECV304; M: Marker DL2000

2.2 肿瘤细胞 P53 基因的突变情况

P53 正向测序图谱编号为 1 ~ 12, 反向测序图谱编号为 13 ~ 24(图 2)。测序分析表明,14 株肿瘤细胞中 8 株存在 P53 基因 5 ~ 8 外显子的突变,分别是:肺癌细胞 H1299、肝癌细胞 Hep3B、脑胶质瘤细胞 U251-MG、胃癌细胞 SGC-7901、乳腺癌细胞 MCF-7、脉络膜恶性黑色素瘤细胞 OCM-1、肝癌细胞 SMMC 7721、前列腺癌细胞 PC-3; 其中的 3 个细胞株存在 2 ~ 3 个不同位点的突变,如:肺癌细胞 H1299(Exon5,7,8)、肝癌细胞 Hep3B(Exon6,7)、脉络膜恶性黑色素瘤细胞 OCM-1(Exon5,8)。其中新发现的突变:(1) 以往文献报道肺癌细胞 H1299 在 5 ~ 8 外显子缺失^[7],本次未发现此缺失;(2) 以前报道 Hep3B、SMMC 7721 4 号外显子 72 位密码子发生 C→G 纯合子点突变,其编码氨基酸由 Pro 变成 Arg^[8]。现发现 Hep3B 在 6 号外显子 198 位密码子

发生 A→C 纯合子点突变,其编码氨基酸由 Glu 变成 Gln; 在 7 号外显子 18 位密码子发生 C→A 杂合子点突变。SMMC7721 在 7 号外显子 238 位密码子发生 C 的插入,导致阅读框架移位;(3) OCM-1 5 外显子以往未发现突变^[9],现发现 5 号外显子 138 位密码子发生 G→A 的纯合子点突变。2 株正常细胞株未发现突变。

P53 基因突变特点如下:(1) 主要发生在外显子的编码序列;(2) 多数为单个碱基替换造成的错义突变,导致所编码氨基酸改变,例如 U251-MG 254 位密码子 A 至 G 的改变,导致原编码的苏氨酸变为丙氨酸。也有个别的插入突变,如 SMMC 7721 238 位密码子处一个碱基 C 的插入,导致其下游读码框改变,提前出现终止密码;(3) 少数表现为同义突变,例如 H1299 第 244 位密码子、Hep3B 第 230 位密码子中 C 到 A 的改变,两者均未改变所编码的氨基酸(表 2)。

2.3 14 株肿瘤细胞及正常细胞中 P53 蛋白的表达

检测结果表明,仅 6 株肿瘤细胞株检测到了在 51 000 与 75 000 出现单一条带,分别是肺癌细胞 H1299、肝癌细胞 Hep3B、脑胶质瘤细胞 U251-MG、胃癌细胞 SGC-7901、乳腺癌细胞 MCF-7、脉络膜恶性黑色素瘤细胞 OCM-1,以上均为 P53 基因突变株; 另有 2 株细胞株 PC-3 和 SMMC 7721 虽有 P53 基因突变,但未检测到 P53 蛋白。其他 P53 基因无突变的肿瘤细胞株和正常细胞株均未检测到 P53 蛋白(图 3)。

3 讨论

基因突变作为生物变异的一个重要来源在生物界中普遍存在^[10],大多数基因突变对生物体是有害的,如肝癌、肺癌等恶性肿瘤的发生、发展都与 P53 基因的突变有关^[11]。基因突变是指由于 DNA 碱基对的置换、增添或缺失而引起的基因结构的变化,亦称点突变。根据基因结构的改变方式,基因突变可分为碱基置换突变和移码突变 2 种类型。在本实验中发现的 H1299 132 位密码子 G→C、Hep3B 的 198 位 A→C、U251-MG 的 254 位 A→G、SGC-7901 283 位 C→G、MCF-7 197 位 G→C、OCM-1 138 位 G→A 和 268 位 A→C、PC-3 的 235 位 C→A 等突变属置换突变; 本实验同时也发现存在移码突变,如 SMMC 7721 235 位的 41 bp 处插入碱基 C,导致 DNA 的阅读框架(读码框)发生改变,使得插入部位之后的所有都跟着发生变化,结果产生一种异常的多肽链。此外,根据遗传信息的改变方式,基因突变又可以分

表2 肿瘤细胞 P53 基因 DNA 序列突变情况

Tab.2 Mutations of P53 gene in tumor cells

Cell line	Exon	Codon	DNA mutation	Protein mutation	Sequencing fig. No.	New finding
H1299	5	132	G→C (homozygote)	Lys →Asn	1 ,13	
	7	44	C→A(homozygote)	Gly→Gly	2 ,14	Yes
	8	67	G→A(homozygote)	Thr→Thr	3 ,15	
Hep3B	6	198	A→C(homozygote)	Glu→Gln	4 ,16	Yes
	7	230	C→A(homozygote)	Thr→Thr	5 ,17	
U251-MG	7	254	A→G(homozygote)	Ile→Ala	6 ,18	No
SGC-7901	8	283	C→G(homozygote)	Arg→Asp	7 ,19	No
MCF-7	6	197	G→C(homozygote)	Val→Asp	8 ,20	No
OCM-1	8	138	A→C(heterozygote)	Asn→Asp	9 ,21	Yes
	5	268	G→A(homozygote)	Ala→Thr	10 ,22	
SMMC7721	7	238	41 bp inserting C	Reading frame *	11 ,23	Yes
PC-3	7	235	C→A(homozygote)	Asn→Lys	12 ,24	No

* Reading frame was replaced and the emergence of the ending codon was accelerated



图2 肿瘤细胞 P53 基因 DNA 测序图谱

Fig.2 Sequencing results of P53 gene of tumor cell lines

Forward sequence (1-12) ; Reverse sequence (13-24)

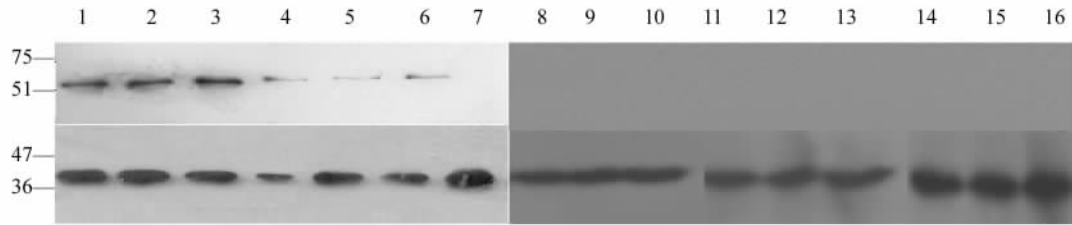


图3 Western blotting 检测 14 株肿瘤细胞中 P53 蛋白的表达

Fig. 3 Expression of P53 protein in 14 tumor cell lines by Western blotting

1: Lung cancer cell H1299; 2: Hepatocarcinoma cell Hep3B; 3: Glioma cell U251-MG; 4: Gastric carcinoma cell SGC-7901; 5: Mammary carcinoma cell MCF-7; 6: Choroidal melanoma cell OCM-1; 7: Prostate carcinoma cell PC-3; 8: Lung cancer cell NCIH446; 9: Human lung fibre cell HLF; 10: Endocytovena umbilicalis cell ECV304; 11: Colonic carcinoma cell LoVo; 12: Retinoblastoma cell RB; 13: Hepatocarcinoma cell SMMC7721; 14: Lung cancer cell NCIH460; 15: Glioma cell U87-MG; 16: Hepatoblastoma cell BEL-7402

为同义突变、错义突变和无义突变 3 种类型。同义突变指 DNA 碱基对的改变并不改变它所编码蛋白质的氨基酸序列,如实验中 H1299 44 位(Gly→Gly)、67 位(Thr→Thr)、Hep3B 230 位(Thr→Thr); 错义突变指由于一对或几对碱基对的改变而使编码某一氨基酸的变为另一种氨基酸的,如 H1299 132 位、Hep3B 的 198 位、U251-MG 的 254 位、SGC-7901 283 位、MCF-7 197 位、OCM-1 138 位与 268 位、PC-3 的 235 位的改变;本实验同时也发现存在无义突变,例如 SMMC-7721 的 235 位中碱基 C 的插入导致阅读框架移位,提前出现终止。后两种突变都会使相应编码的氨基酸发生改变,进而导致临床上出现新的耐药突变细胞株,新的突变体对已有放、化疗药物失去敏感性。

本研究检测的 14 株肿瘤细胞株中有 4 株细胞(肺癌细胞 H1299,肝癌细胞 Hep3B、7721,脉络膜恶性黑色素瘤细胞 OCM-1)的 P53 基因突变有新的发现。这些发现将有助于更深入了解不同肿瘤细胞 P53 基因突变的新情况、新进展。突变型 P53 蛋白不仅丧失抑癌功能,还获得了某些癌基因的功能,丧失了调控细胞增殖能力,导致细胞恶性转化,以及肿瘤发生、侵袭力增加,使细胞产生抗化疗能力等。目前野生型 P53 基因的恢复或替代疗法已被广泛采用,即通过基因转移的方法将野生型 P53 基因转移到肿瘤细胞内,以恢复或抑制突变型 P53 基因及其蛋白表达,达到基因治疗的目的^[12]。近年新发展起来的融瘤病毒或称条件复制型病毒也以 P53 基因作为靶点^[13],例如腺病毒载体 onyx-015,由于存在 E1B 基因突变,其复制可被正常的 P53 基因抑制,而仅在 P53 基因突变了了的肿瘤细胞中复制,从而可

以选择性地杀伤肿瘤细胞,而对正常细胞无明显损伤。

目前选择理想的治疗载体已成为基因治疗的一大难题,问题主要集中在载体的复制效率上^[14]。在全面认识肿瘤细胞 P53 基因状态的基础上,可以进一步研究如腺病毒载体在 P53 突变型和无突变型肿瘤细胞中的复制效率等,进而提高基因治疗的效率、全面筛选理想的基因治疗载体。P53 基因靶向的治疗将会成为肿瘤辅助治疗一个十分重要的方面之一^[15-17]。因此,研究不同肿瘤细胞 P53 基因突变或 P53 基因状态对于探索新的肿瘤基因治疗方法,以及观察肿瘤对治疗载体的反应和治疗效果均有重要意义。

[参 考 文 献]

- [1] Crawford LV, Pim DC, Lamb P. The cellular protein p53 in human tumor[J]. Mol Biol Med, 1984, 2(4): 261-272.
- [2] Eliyahu D, Raz A, Gruss P, et al. Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells[J]. Nature, 1984, 312(5995): 646-649.
- [3] Crawford LV, Pim DC, Gurney EG, et al. Detection of a common feature in several human tumor cell lines -a 53,000-Dalton protein [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1981, 78(1): 41-45.
- [4] Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation[J]. Cell, 1989, 57(7): 1083-1093.
- [5] Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types[J]. Nature, 1989, 342(6250): 705-708.
- [6] Soussi T, Legros Y, Lubin R, et al. Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review[J]. Int J Cancer, 1994, 57(1): 1-9.
- [7] Phelps RM, Johnson BE, Ihde DC, et al. NCI-Navy Medical

- Oncology Branch cell line data base[J]. J Cell Biochem Suppl, 1996, 24: 32-91.
- [8] Inoue H, Shiraki K, Murata K, *et al.* Adenoviral-mediated transfer of p53 gene enhances TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells[J]. Int J Mol Med, 2004, 14(2): 271-275.
- [9] Hsu YL, Kuo PL, Chiang LC, *et al.* Involvement of p53, nuclear factor kappaB and Fas/Fas ligand in induction of apoptosis and cell cycle arrest by saikosaponin in human hepatoma cell lines [J]. Cancer Lett, 2004, 213(2): 213-221.
- [10] Cheung AK. Identification of the essential and non-essential transcription units for protein synthesis, DNA replication and infectious virus production of porcine circovirus type 1 [J]. Arch Virol, 2004, 149(5): 975-988.
- [11] Allegra E, Puzzo L, Cutrona D, *et al.* p53 overexpression on the resection margins as a marker of local recurrence in glottic T1a carcinoma[J]. Acta Otorhinolaryngol Ital, 2003, 23(6): 454-458.
- [12] Joerger AC, Ang HC, Vepintsev DB, *et al.* Structures of p53 cancer mutants and mechanism of rescue by second-site suppressor mutations[J]. J Biol Chem, 2005, 280(16): 16030-16037.
- [13] Mashima T, Oh-hara T, Sato S, *et al.* p53-defective tumors with a functional apoptosome-mediated pathway: a new therapeutic target [J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(10): 765-777.
- [14] Chan WM, Siu WY, Lau A, *et al.* How many mutant p53 molecules are needed to inactivate a tetramer[J]? Mol Cell Biol, 2004, 24(8): 3536-3551.
- [15] Resnick-Silverman L, Manfredi JJ. Gene-specific mechanisms of p53 transcriptional control and prospects for cancer therapy[J]. J Cell Biochem, 2006, 99(3): 679-689.
- [16] Göhler T, Jäger S, Warnecke G, *et al.* Mutant p53 proteins bind DNA in a DNA structure-selective mode[J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(3): 1087-1100.
- [17] Kim E, Deppert W. The versatile interactions of p53 with DNA: when flexibility serves specificity[J]. Cell Death Differ, 2006, 13(6): 885-889.
- [收稿日期] 2007 - 11 - 08 [修回日期] 2008 - 02 - 23
- [本文编辑] 郁晓路

· 科技动态 ·

β-catenin 的稳定表达促进调节性 T 细胞生存并诱导非条件性 T 细胞凋亡

β-catenin 是 Wnt 信号通路的核心分子,具有介导细胞黏附及信号转导双重活性功能。Wnt 信号通路在调节细胞生长和分化、胚胎发育过程中起重要作用,该通路的持续活化能加快细胞增殖和诱导凋亡抵抗。

已有文献报道 β-catenin 参与促进 T 细胞在胸腺内的发育,但它与 T 细胞各亚群的关系以及如何参与免疫调控少有研究。论文作者应用逆转录病毒转染体系,发现 β-catenin 的稳定表达能促进调节性 T 细胞的生存并诱导非条件性 T 细胞的凋亡。作者构建了表达 GFP 标签和 Ctnnb1 的慢病毒,转染体外纯化并活化的调节性 T 细胞,发现转染了 Ctnnb1 的 Treg 细胞在体外生存可以长达 5 周,光镜下可见细胞形态饱满,具有较高的活力;另外它仍具有 Treg 的特征:表达 Foxp3,本身不增殖但可以抑制效应性 T 细胞的增殖。在对其机制的探讨中发现,转染了 Ctnnb1 的 Treg 细胞通过抑制 c-myc 来促进 Bcl-XL、Bax 的表达,从而维持 Treg 在体外的长期存活。此外,体内研究也证明了这一效应的存在。引入竞争实验,将带有不同标记转染的 Treg 细胞与新鲜分离的 Treg 细胞等量混合回输到 Rag 缺陷小鼠体内,不同时间点观察回输 Treg 的比例,可以看到在外周血、脾脏以及淋巴结中,Ctnnb1⁺ 的 Treg 细胞比例明显高于新鲜分离的 Treg。因此认为,转染了 Ctnnb1 的 Treg 细胞在体内更具有竞争优势。在 CD45RB^{high} 细胞移植 IBD 模型中发现,只要应用少量的转染 Ctnnb1⁺ 的 Treg 细胞就能达到保护 IBD 的作用,这也解决了临床上体外获取大量 Treg 细胞的困难。

另一方面,该研究观察转染了 Ctnnb1 的 CD4⁺CD25⁻ T 细胞增殖能力的变化:无论是 H3 增殖实验或 CFSE 标记实验都显示,转染了 Ctnnb1 之后 CD4⁺CD25⁻ T 细胞的增殖能力明显减弱。并发现,失能相关基因 CBLB、GRAIL 和 ITCH 在转染了 Ctnnb1 的 CD4⁺CD25⁻ T 细胞中表达明显上调。将不同处理的 CD4⁺CD25⁻ T 细胞作为效应性淋巴细胞回输体内,诱导 IBD,发现转染了 Ctnnb1 之后 CD4⁺CD25⁻ T 细胞诱导 IBD 的能力明显减弱。于是该研究认为,转染 Ctnnb1 后可以诱导 CD4⁺CD25⁻ T 细胞的失能。

[张 婷 摘译,刘书逊审阅. Ding Y, Shen S, Lino AC, *et al.* Nat Med, 2008, 14(2): 162-169]