

转染 P⁵³ 基因对胶质瘤细胞株 SHG44 裸鼠致瘤性的作用研究

王占祥 章翔 张志文 步星耀 刘飞 陈义军 杨帆

摘要 目的:探讨转染野生型 P⁵³(wt-P⁵³)和突变型 P⁵³(mt-P⁵³)基因,对人胶质瘤细胞株 SHG44 裸鼠致瘤性的影响及意义。方法:采用质脂体介导法,分别将 wt-P⁵³ 和 mt-P⁵³ 基因导入人胶质瘤细胞株 SHG44,体内外检测转导细胞的生长状况和裸鼠致瘤性。结果:转染 mt-P⁵³ 基因的细胞株,G418 筛选细胞集落数、软琼脂平皿细胞集落数以及裸鼠瘤组织重量和体积,均显著高于对照组($P < 0.01$);而转染 wt-P⁵³ 基因的细胞株均显著低于对照组($P < 0.01$),表明导入 wt-P⁵³ 基因的细胞株,瘤细胞生长速度明显低于对照细胞株和导入 mt-P⁵³ 基因的细胞株,即导入 mt-P⁵³ 基因的细胞株瘤细胞生长速度最快,而导入 wt-P⁵³ 基因的细胞株瘤细胞生长速度最慢。结论:wt-P⁵³ 基因能有效地抑制人胶质瘤细胞生长;mt-P⁵³ 基因则可以明显地促进瘤细胞生长。

关键词 抑癌基因;P⁵³;胶质瘤;裸鼠致瘤性

P⁵³ 基因的发现经历了肿瘤抗原,癌基因和抑癌基因三个阶段,直至发现了 P⁵³ 蛋白有野生型和突变型之分才确认它是一种肿瘤抑制基因^[1]。野生型 P⁵³ 基因(wt-P⁵³)不具有转化细胞活性,相反却可以抑制肿瘤细胞的生长,只有在 wt-P⁵³ 发生突变或缺失后产生的突变型 P⁵³ 基因(mt-P⁵³)才具有转化活性,产生致癌作用^[2,3]。Baker 等曾将 wt-P⁵³ 导入大肠癌细胞株,结果发现 wt-P⁵³ 可以抑制肿瘤细胞对裸鼠的致瘤作用^[4]。脑胶质瘤细胞有较高的 P⁵³ 突变或缺失率,但有关 P⁵³ 基因对胶质瘤细胞株作用的报道却很少,本文分别将 wt-P⁵³ 和 mt-P⁵³ 导入 SHG44 脑胶质细胞株,并对转染细胞的生长状况和裸鼠致瘤作用进行了比较。

1 材料和方法

1.1 材料

SHG44 细胞株,苏州医学院脑研所提供;wt-P⁵³ 和 mt-P⁵³ 基因质粒,由本校病理教研室杨帆博士惠赠;RP-MI1640 为 Gibco 公司产品;G418, polybrene 为 Sigma 公司产品;抗 P⁵³ 蛋白单抗 Do-7,美国 DAKO 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

用 RPMI-1640 培养液(含 10% 小牛血清),37℃、5%

CO₂ 孵箱内培养。

1.2.2 基因转染及筛选

将 2×10^5 对数生长期细胞接种于 35mm 直径培养皿中,24h 后待细胞长至皿底 60% 时,将 A 液(100μl 无血清培养液中含 2μl 待转染质粒)与 B 液(100μl 无血清培养液中含 10μl 脂质体)混合,室温下孵育 20min,以无血清培养液洗涤细胞,加入质脂体复合物,再加入 0.8ml 无血清培养液培养 5h,加入 1ml 20% 小牛血清继续培养 8h,然后用新鲜完全培养液培养 72h。应用 0.25% 胰酶消化细胞,接种于选择性培养液(含 G418 500μg/ml)中培养 14 天,以亲本细胞做对照。

1.2.3 软琼脂生长试验

将 1×10^6 个细胞与 5ml 0.35% 琼脂混合,均匀铺在琼脂平皿上,37℃、5% CO₂ 培养 3 周,观察细胞集落形成状况。

1.2.4 间接免疫荧光试验

细胞涂片,室温干燥后丙酮固定,将 P⁵³ 单抗与抗原片反应、洗涤后与羊抗鼠 IgG 荧光标记抗体反应,荧光显微镜下观察记录。

1.2.5 裸鼠致瘤试验

5 周龄雌性 Balb/C-nu/nu 裸鼠,随机分组,于臀部皮下接种 0.2ml 细胞悬液(约含 2×10^6 个转基因细胞),以未导入 P⁵³ 基因的 SHG44 细胞作对照。在接种后 7、14、21、28、35 天观察肿瘤的生长状况。

1.2.6 统计学分析

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院神经外科(王占祥、章翔、步星耀、张志文、刘飞、陈义军);第四军医大学基础部病理学教研室(杨帆)

数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, *t* 检验进行显著性分析。

2 结果

2.1 DNA 转染与筛选

分别将 wt-P⁵³ 及 mt-P⁵³ 质粒导入 SHG44 细胞, 并用 G418 筛选, 未转导的 SHG44 细胞作对照。10 天后, 对照组细胞死亡, 转染细胞集落数见表 1。导入 mt-P⁵³ 基因的细胞集落数约是导入 wt-P⁵³ 基因的两倍。

表 1 G418 筛选后细胞集落数

细胞	集落数
SHG44	0
SHG44-wt-P ⁵³	32
SHG44-mt-P ⁵³	63

2.2 软琼脂细胞生长状况

将转染细胞转至软琼脂平皿生长, 4 周后观察细胞集落数, 结果见表 2, 转染 wt-P⁵³ 基因的细胞集落出现时间较转染 mt-P⁵³ 基因的细胞要晚, 且两组集落数有显著差异 ($P < 0.01$)。

表 2 软琼脂平皿生长细胞集落数

细胞	集落数
SHG44	60
SHG44-wt-P ⁵³	28
SHG44-mt-P ⁵³	75

2.3 间接免疫荧光反应

转染细胞免疫荧光强度明显高于对照细胞, 表明转染细胞内 P⁵³ 蛋白的表达量显著高于对照细胞。

2.4 裸鼠致瘤性

裸鼠接种细胞 1 周后, 对照组及导入 mt-P⁵³ 基因的细胞组开始出现瘤组织, 而导入 wt-P⁵³ 基因的细胞组则在 3 周后开始出现瘤组织。3 个细胞株生长速度存在明显差异, 见图 1。

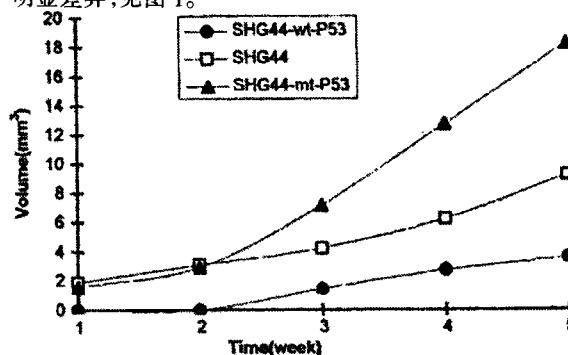


图 1 裸鼠瘤组织生长速度比较

2 周内对照组瘤组织生长速度略高于导入 mt-P⁵³ 细胞组, 但随后对照组瘤组织生长速度明显地低于导入 mt-P⁵³ 细胞组 ($P < 0.01$)。导入 wt-P⁵³ 细胞组较其余两

细胞组生长速度明显减慢 ($P < 0.01$)。第五周时瘤组织的体积与重量见表 3, 相互间存在显著差异 ($P < 0.01$)。

表 3 裸鼠瘤组织重量和体积比较

	SHG44	SHG44-wt-P ⁵³	SHG44-mt-P ⁵³
瘤体积 (mm ³)	9.20 ± 2.86	3.58 ± 3.73 *	18.21 ± 3.42 *
瘤重量 (g)	0.49 ± 0.04	0.13 ± 0.03 *	1.27 ± 0.05 *

* $P < 0.01$ 与对照组比较

3 讨论

P⁵³ 蛋白是细胞内的一个核蛋白, 它在非转化细胞内表达很低, 但在肿瘤细胞或转化细胞内却常常高表达。因此, P⁵³ 蛋白的过量表达常被认为与细胞转化有关。另外, 有证据表明 P⁵³ 与 ras 基因可转化原代的啮齿类细胞, 并使其出现恶性表现^[5]。而最近的研究表明, wt-P⁵³ 并不具有转化活性, 它的转化潜能是通过发生突变或缺失后产生的, Finloy 等人将 wt-P⁵³ 导入大鼠成纤维细胞后, 不仅可抑制 ras 基因的转化作用, 而且可抑制 ras 和 mt-P⁵³ 对细胞的共转化作用, 因此, 目前明确地证实了 wt-P⁵³ 是一种抑癌基因, 可以抑制某些细胞的转化, 只有在 wt-P⁵³ 突变产生 mt-P⁵³ 时, 才能促进细胞的转化。

P⁵³ 基因全部 DNA 序列已经测出, 含有一段高度保守的 DNA 序列^[6], 一旦此序列发生突变, 就可使 wt-P⁵³ 变成为 mt-P⁵³ 而丧失抑瘤活性, 促进细胞转化。

Baker 等人将 wt-P⁵³ 和 mt-P⁵³ 分别导入结肠癌细胞株中, 软琼脂生长结果表明, mt-P⁵³ 的集落形成数要比 wt-P⁵³ 高出 5~10 倍, 裸鼠致瘤实验发现 wt-P⁵³ 不能使裸鼠成瘤^[4]。本研究分别将 wt-P⁵³ 和 mt-P⁵³ 转导入胶质瘤细胞, 经 G418 筛选后, mt-P⁵³ 细胞的集落形成数比 wt-P⁵³ 高约一倍, 软琼脂生长集落数也明显高于 wt-P⁵³ 细胞, 裸鼠致瘤试验表明, mt-P⁵³ 组瘤组织生长明显较未转导组快, 而 wt-P⁵³ 组瘤组织生长明显较未转导组慢, 三者间相差显著 ($P < 0.01$)。结果进一步证明, wt-P⁵³ 是抑癌基因, 可明显抑制胶质瘤细胞生长, 而 mt-P⁵³ 可促进瘤细胞生长。

在许多种肿瘤细胞中, 包括胶质瘤细胞在内, 都发现了 P⁵³ 基因的突变^[7]。本实验证实转染 wt-P⁵³ 可以明显抑制胶质瘤细胞生长, 有望为临床胶质瘤的治疗提供新的途径。

参 考 文 献

- Levine AJ, Momand J, Finlay CA, et al. The P⁵³ tumor suppressor gene. *Nature*, 1991, 350: 351~354
- Hinds P, Cathy F, Arnold J, et al. Mutation is required to activate P⁵³ gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J*

- Viru, 1989, 63:736~739
- 3 Finaly CA, Philip W, Arnold J, et al. The P⁵³ protooncogene can act as a suppressor of transformation. Cell, 1989, 57:1083~1093
- 4 Baker SJ, Sandford M, Eric R, et al. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type P⁵³. Science 1990;912~919
- 5 Rotter V, Haya F, Atieh K, et al. Variation in antigenic determinants of P⁵³ transformation-related protein obtained from various species. J Immunol, 1983, 181:329~333
- 6 Rina Z, Brigitte B, David G, et al. Human P⁵³ cellular tumor antigen: cDNA sequence and expression in COS cells. The EMBO, 1985, 4:1251~1255
- 7 Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, et al. Mutation hotspot in the P⁵³ gene in human hepatocellular carcinomas. Nature, 1991, 350:427~430

Study on the role of P⁵³ gene transfer on human glioma cell growth in nude mice

Wang Zhanxiang, et al

Departement of neurosurgery, Xijing hospital, Xi'an 710032

Objective To explore the significance and role of P⁵³ gene transfer on human glioma cell growth in nude mice. **Method** Wild-type P⁵³ gene (wt-P⁵³) and mutant P⁵³ gene (mt-P⁵³) were transfected into the human glioma cell line SHG44. And the growth of gene-transfected cell lines were observed in vitro and in vivo. **Results** The tumor resulting from the cells transfected with the wt-P⁵³ gene grew more slowly and was smaller than that from control SHG44 cells. In contrast, the tumor from the cells transfected with the mt-P⁵³ gene grew faster than that produced by cells transfected with the wt-P⁵³ gene and that produced by control SHG44 cells. **Conclusion** The wild-type P⁵³ gene could inhibit the glioma cell growth in nude mice and the mutant P⁵³ gene could enhance the glioma cell growth in nude mice.

Key words: Anti-oncogene; P⁵³ gene; Glioma; Tumorigenicity in nude

>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>

中国抗癌报

癌症患者的良师 医务人员的益友

《中国抗癌报》创刊于 1985 年,是中国抗癌协会的机关报,是全国唯一的抗癌周报。她用详尽的事实向社会宣传癌症不等于死亡,向您报道国内外肿瘤防治工作的新进展;向您介绍抗癌、防癌知识;她是获取健康信息的最佳渠道,她更是癌症患者的康复乐园,在这里您看到的是强者的力量与胜者的欢乐。

4开4版,周1出版,单价:0.30元,全年订价:15.60元。公开发行 国内统一刊号:CN42—0090,全国邮发代号:37—59。

地址:湖北省武汉市武昌卓刀泉

电话:(027)87393126

邮编:430079 总编:张明和