

[文章编号] 1007-385X(2004)04-0267-05

腺病毒介导 p16 基因的表达及其对肺癌细胞的周期阻滞作用

苏长青¹, 汪 栋², 叶玉坤², 钱其军¹, 吴孟超¹(1. 第二军医大学东方肝胆外科医院病毒与基因治疗研究室, 上海 200438; 2. 南京八一医院全军肿瘤研究中心, 南京 210002)

[摘 要] **目的:** 以增殖缺陷型腺病毒载体介导 p16 基因感染人肺腺癌细胞系, 观察并鉴定该基因在细胞中的表达及其对细胞周期和细胞凋亡的影响。**方法:** 采用 293 细胞内同源重组的方法, 制备重组腺病毒 Ad5-p16, 感染肺腺癌细胞 SPC-A1; 免疫组化方法鉴定 P16 蛋白的表达; 台盼蓝染色计数活细胞数, 绘制细胞生长曲线; 流式细胞术(FCM)分析细胞周期及细胞凋亡的变化。**结果:** 以 MOI = 10 的重组增殖缺陷型腺病毒 Ad5-p16 感染 SPC-A1 细胞 48 h 后, P16 蛋白表达的阳性细胞比率为 71%; 以 MOI = 100 感染 SPC-A1 细胞后第 2 天, 细胞开始出现生长抑制及细胞病变; FCM 分析发现细胞在感染腺病毒后出现细胞周期阻滞和细胞凋亡。**结论:** 以腺病毒为载体介导 p16 基因在 SPC-A1 细胞内表达, 可发挥抑制细胞生长、诱发细胞凋亡的作用。本项基因治疗策略以直接调控细胞周期的抑癌基因为靶向治疗基因, 为肺癌基因治疗提供了可靠的理论依据。

[关键词] 腺病毒; 抑癌基因; 肺癌; 基因治疗

[中图分类号] R734.2 [文献标识码] A

p16 Gene Expression Mediated by Adenovirus and Its Effect on Cell Cycle Arrest

SU Chang-qing¹, WANG Dong², YE Yu-kun², QIAN Qi-jun¹, WU Meng-chao¹(1. Department of Virus & Gene Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200438, China; 2. Cancer Center of PLA, Nanjing 81 Hospital, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the p16 gene expression in lung cancer cell line introduced by adenovirus, and to observe the effect of p16 gene on cell cycle arrest. **Methods:** The replication-deficient adenovirus Ad5-p16 was homologously recombined in 293 cells and used to infect the lung cancer cell line SPC-A1. The expression of P16 protein was identified by immunohistochemistry. Trypan blue staining was used to count the alive cells and to draw a cellular growth curve. The changes of cell cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry (FCM). **Results:** After 48 hours since the SPC-A1 cells were infected by the replication-deficient adenovirus Ad5-p16 at MOI = 10, the positive rate of the cells for P16 expression was 71%. The cellular growth inhibition and cytopathic effects were present when the cells were infected with Ad5-p16 at MOI = 100. The cell cycle arrest and the cell apoptosis were found by FCM. **Conclusion:** The expression of p16 gene in SPC-A1 lung cancer cells induced by the replication-deficient adenovirus may result in the inhibition of cell growth and the introduction of cell apoptosis. The strategy targeted to the tumor suppressor gene that regulates the cell cycle directly, obtained satisfactory results, and provided a reliable theory for lung cancer gene therapy.

[Key words] adenovirus; tumor suppressor gene; lung cancer; gene therapy

* 作为一种重要的肿瘤抑制基因, p16 在肺癌特别是非小细胞肺癌组织中存在高频失活, 并且与肺癌的发生发展、侵袭转移密切相关, 其失活的机制主要有缺失、甲基化、点突变等^[1-2]。此外, 由于该基因属小型基因, 其 cDNA 只有 444 bp, 易于操作; 其编码的蛋白可选择性作用于 CDK4, 特异性强, 能直接调控细胞增殖周期^[3]。因此, p16 基因是肿瘤基因治疗的理想对象,

可以模仿其作用原理设计出直接调控细胞周期的基因治疗途径^[4-5]。我们以腺病毒介导 p16 基因感染人肺

[基金项目] 国家十五科技攻关计划课题(No. 2001BA703B11)

[作者简介] 苏长青(1964 -), 男, 博士, 副教授, 主要从事分子生物学和肿瘤基因治疗的研究

[通讯作者] 苏长青, E-mail: changqing@sino-gene.cn

腺癌细胞系,观察并鉴定该基因在体外的表达,以及对细胞周期和细胞凋亡的影响,为肺癌基因治疗提供可靠性的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养

人胚肾细胞系 HEK293 (Microbix Biosystem), 已被复制缺陷型 5 型腺病毒(Ad5)E1 基因转化。细胞在 DMEM 培养基、10% 胎牛血清、37℃ 5% CO₂ 条件下培养。人肺腺癌细胞系 SPC-A1, 经 PCR 扩增证实存在 p16 基因缺失, 免疫组化证实 P16 蛋白阴性表达, 由全军肿瘤研究中心分子生物学实验室冻存。细胞在 RPMI-1640 培养基、10% 胎牛血清、37℃ 5% CO₂ 条件下培养。

1.2 携带 p16 基因的增殖缺陷型腺病毒的重组与制备

含 p16 完整 cDNA 序列的表达质粒 pAdCMV-p16 由本室构建。将其 p16 cDNA 表达盒的酶切片段插入腺病毒载体质粒 pCA13 的多克隆位点区。培养 293 细胞, 至对数生长期。将重组腺病毒载体质粒 pCA13-p16 和 5 型腺病毒包装质粒 pBHGE3(Microbix Biosystem)通过 Effectene Transfection Reagent(QIAGEN)共转染 293 细胞。共转染后 11 d 出现病毒空斑, 经过 3 次病毒空斑纯化, 得到重组增殖缺陷型腺病毒, 命名为 Ad5-p16。应用 QIAamp DNA Blood Mini Kit(QIAGEN)提取腺病毒 DNA, 病毒滴度测定采用 Qbiogene 公司的 TCID50 法。同样方法制备携带报告基因 LacZ 的重组腺病毒 Ad5-LacZ。

1.3 重组腺病毒介导 p16 基因在 SPC-A1 细胞中表达的鉴定

1 × 10¹¹ /L 细胞接种于 96 孔板, 100 μl/孔, 培养 24 h 后, 弃培养液。按 MOI = 10 加入重组腺病毒 Ad5-p16。2 h 后, 吸去病毒液, 加入培养液继续培养, 作为实验组。每日定时观察计数细胞。对照组设置包括 SPC-A1 细胞不加病毒的空白对照组, 以及加对照腺病毒 Ad5-LacZ 的病毒对照组。感染后 48 h 收集实验组和对照组细胞, 涂片, 90% 酒精固定, 进行 P16 蛋白的 SP 法免疫组化, NBT/BCIP 显色, 显微镜下计数阳性细胞比率。

1.4 细胞生长曲线分析

5 × 10¹¹ /L 细胞接种 6 孔板, 100 μl/孔, 24 h 后按 MOI = 100 感染重组腺病毒 Ad5-p16, 继续培养。以感染 Ad5-LacZ 的 SPC-A1 细胞为病毒对照组, 未感染任何病毒的 SPC-A1 细胞为空白对照组, 与实验组同步培养。每日定时消化收集实验组和对照组细胞, 0.5% 台盼蓝染色, 显微镜下计数活细胞数。每组于每个时间

点分别设 3 个平行组, 绘制细胞生长曲线。

1.5 流式细胞术(FCM)分析

每日定时收集感染重组腺病毒后的培养细胞和对照组细胞, 70% 酒精固定 3 h, PBS 洗 2 次。加 RNase (终浓度 50 μg/ml) 37℃ 消化 30 min, 碘化丙啶(PI, 终浓度 50 μg/ml) 4℃ 避光染色 30 min, 上流式细胞仪检测。细胞周期分析采用 Cell Quest Plot 分析软件, 为美国 Becton-Dickinson 公司产品。

1.6 统计学处理

台盼蓝染色的活细胞计数采用 *t* 检验; P16 蛋白表达的阳性率和流式细胞术分析数据采用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 重组增殖缺陷型腺病毒的制备

腺病毒载体 pCA13-p16, 携带 p16 cDNA、CMV 启动子和 SV40 polyA 序列的表达单元, 和腺病毒右臂质粒在 293 细胞内进行同源重组后, 产生重组增殖缺陷型腺病毒 Ad5-p16。经过在 293 细胞中扩增和 CsCl 超速离心纯化, 获得高度浓缩的病毒液。经测定, Ad5-p16 病毒滴度达 6.67 × 10⁹ pfu/ml, Ad5-LacZ 滴度为 6.67 × 10¹⁰ pfu/ml。

2.2 Ad5-p16 在人肺癌细胞中的表达

SPC-A1 细胞按 MOI = 10 感染重组腺病毒 Ad5-p16, 培养 48 h 后, 癌细胞出现病理改变, 核染色质浓缩, 边集, 可见凋亡小体的产生。免疫组化检测, P16 蛋白的阳性细胞比率为 71% (图 1)。而未感染腺病毒和感染 Ad5-LacZ 的对照组细胞, 均未见 P16 蛋白的表达, 差异显著 (*P* < 0.05)。

图 1 SPC-A1 细胞感染 Ad5-p16 后 P16 蛋白阳性表达见于癌细胞的胞浆和胞核(× 300)

Fig.1 P16 protein expressed in cytoplasm and nucleus of SPC-A1 cancer cells after infected with the replication-deficient adenovirus Ad5-p16(× 300)

2.3 Ad5-p16 对细胞生长的抑制作用

以 MOI = 100 感染 Ad5-p16 或 Ad5-LacZ 的细胞与未感染病毒的空白对照组细胞同步培养,每日定时观察细胞生长状况。与 2 组对照细胞相比,实验组细胞在感染 Ad5-p16 后第 2 天即开始出现生长抑制现象,细胞数量减少,细胞变圆,胞膜突起或内陷,聚集成团,最终脱落浮起而死亡。通过每日定时收集细胞、台盼蓝染色、计数活细胞的方法,绘制细胞生长曲线(图 2),可见腺病毒介导 P16 蛋白在 SPC-A1 细胞内的表达,明显抑制细胞的生长 ($P < 0.01$)。感染 Ad5-LacZ 的细胞生长曲线基本与未感染病毒的空白对照组接近。

2.4 Ad5-p16 对细胞周期的阻滞作用

对实验组、病毒对照组和空白对照组细胞的细胞周期进行 FCM 分析,发现实验组细胞在感染 Ad5-p16 重组腺病毒后,第 1 天即出现细胞周期的 G1 期阻滞,在第 2,3 天 G1 期阻滞最为明显,同时标志细胞凋亡的“亚 G1 峰”开始升高。第 4,5 天,细胞周期阻滞趋于

缓和,但“亚 G1 峰”则达到高峰。而同期培养的两组对照细胞在第 1~5 天均未出现明显的细胞周期阻滞和细胞凋亡的现象(表 1)。

图 2 Ad5-p16 介导的 P16 表达对 SPC-A1 细胞的抑制情况
Fig. 2 The inhibition status mediated by Pd5-p16-induced P16 on SPC-A1 cells

表 1 Ad5-p16 对 SPC-A1 细胞周期的阻滞和细胞凋亡的诱导作用
Tab. 1 Cell cycle arrest and cell apoptosis induction by Ad5-p16 on SPC-A1 cells

Groups	G1/G0(%)	S(%)	G2/M(%)	Apoptosis(%)
Experiment *				
1 d	59.86	40.10	0.04	3.40
2 d	68.50	30.00	1.50	5.76
3 d	69.67	29.43	0.90	8.51
4 d	66.11	33.16	0.73	12.03
5 d	59.91	39.20	0.89	14.42
Virus control				
1 d	45.01	54.76	0.23	0.71
2 d	44.62	54.38	1.00	1.22
3 d	43.80	55.41	0.79	1.35
4 d	44.34	54.68	0.98	1.02
5 d	42.67	56.31	1.02	1.54
Blank control				
1 d	41.01	58.24	0.75	1.12
2 d	42.03	56.08	1.89	0.98
3 d	41.99	56.58	1.43	1.27
4 d	42.27	55.72	2.01	0.93
5 d	41.87	58.01	0.12	1.07

* Compared respectively by X^2 test with the corresponding values in control groups synchronously ($P < 0.05$)

3 讨论

腺病毒作为目的基因转移的载体,具有安全、宿主

细胞广泛、感染靶细胞效率高、制备和转导方便等优点,而且由于腺病毒感染细胞时其 DNA 不整合到宿主细胞染色体中,没有潜在的致癌危险,所以腺病毒载体

已被广泛应用于基因转移和基因治疗的研究中^[6]。腺病毒载体的构建一般采用同源重组的方法,即先把目的基因装入一个带有腺病毒基因组同源序列的表达载体中,再将表达载体转染已被增殖缺陷型腺病毒感染了的 293 细胞,在辅助细胞中通过表达载体与腺病毒基因组的同源序列间发生的同源重组,目的基因被转移到腺病毒基因组中,形成一个在 E1 缺失区插入目的基因的重组腺病毒,并在 293 细胞中复制,包装成病毒颗粒。我们所制备的重组腺病毒 Ad5-p16,即采用重组腺病毒载体 pCA13-p16 与腺病毒包装质粒 DNA 进行同源重组而产生。经过纯化,所得重组腺病毒滴度达 6.67×10^9 pfu/ml,结果证明了同源重组的效果十分理想。

人肺腺癌细胞系 SPC-A1,经采用 p16 基因第 2 外显子引物,对其基因组 DNA 进行 PCR 扩增,证明该细胞系存在 p16 基因缺失。培养细胞涂片进行免疫组化分析,也证明该细胞系 P16 蛋白阴性表达。通过同源重组获得的重组腺病毒 Ad5-p16,含人类 p16 基因完整的 cDNA 序列,并受 CMV 强势启动子的控制。野生型 p16 基因是细胞周期的重要调节基因,其高频失活涉及人体多种肿瘤及其细胞系。国内外有人分别以穿梭质粒、逆转录病毒等为载体,通过各种手段介导 p16 基因在肿瘤细胞系中表达,成功地阻滞了细胞周期的进程。为了进一步探讨 p16 基因与肺癌发生发展的关系,以及该基因的抗肿瘤特性和机理,我们以腺病毒为载体,将 p16 基因 cDNA 导入 SPC-A1 细胞内,检测发现 SPC-A1 获得外源 P16 蛋白的表达。在感染后 48 h,SPC-A1 细胞表达 P16 蛋白的阳性细胞比率分别为 71%。结果显示,重组腺病毒 Ad5-p16 不但能够保证目的基因进入绝大部分靶细胞,具有高效感染的优势,而且具有介导 p16 基因在细胞内高效表达的特点,从而发挥调控细胞增殖的作用。

在 SPC-A1 细胞以 MOI = 100 的感染强度被 Ad5-p16 重组腺病毒感染并获得 P16 蛋白的表达后,出现细胞生长受抑制的现象。细胞生长抑制出现于第 2 天,表现为活细胞数量减少,细胞出现明显病变效应等,而同期培养的感染了对照腺病毒 Ad5-LacZ 的细胞和未感染病毒的空白对照组细胞,始终生长良好。因此可以肯定,SPC-A1 细胞生长抑制现象是由 p16 基因引起。从细胞生长曲线上看,有目的基因表达的实验组细胞,其生长完全被抑制,而空白对照组细胞的数量随培养时间的延长有明显的增加。不应忽视的是,感染 Ad5-LacZ 的病毒对照组细胞,其细胞生长曲线要低于空白对照组,这可能是细胞在感染病

毒后获得病毒蛋白或 β -gal 的表达所表现出的毒性反应。这种病毒相关的细胞毒性作用(Virus-related cytotoxicity)会随着病毒感染强度即 MOI 值的升高而变得明显起来。

通过 FCM 分析 SPC-A1 的细胞周期,结果发现,获得目的基因 p16 表达的细胞,其细胞生长出现了 G1 期阻滞,即细胞周期中 G1 期细胞比例明显增加,而 S 期细胞比例下降。细胞周期的阻滞在细胞感染重组腺病毒后第 1 天即出现,而以第 3 天最为明显。p16 基因编码的 P16 蛋白,是通过与 CyclinD1 竞争结合 CDK4,从而抑制 CDK4 的激酶活性,阻止细胞由 G1 期向 S 期过渡^[7-8]。我们的实验结果符合 p16 基因这一作用机理。细胞周期尤其是 G1 期的调控是细胞整合内外各种信号最精细复杂的时相,其间存在着重要的 G1→S 调控点。细胞在 G1 期对复杂的细胞内外信号进行整合和传递,决定细胞是否进入 S 期。G1→S 调控点可以决定细胞是增殖还是进入静止期,或是发生细胞凋亡。因此,G1 期的阻滞可能会改变许多基因调控路径以及信号传导途径,使细胞向以凋亡为优势的方向发展。在 FCM 分析中,我们发现 SPC-A1 细胞在获得 p16 基因表达以后,细胞凋亡率明显提高,而病毒对照组和空白对照组仅保持极低水平的自然凋亡率。这是因为,细胞周期 G1 期不仅与细胞增殖有关,与细胞凋亡也有密切关系。由 p16 基因表达所产生的 SPC-A1 细胞 G1 期阻滞,会引起细胞增殖正向调控基因转录的抑制,同时伴随着细胞凋亡相关基因的表达上调以及凋亡信息传导途径的开放。Sandig 等^[9]认为,P16 在细胞中的表达,可能通过非磷酸化 Rb 蛋白的增加造成 Rb 基因转录的负反馈,导致细胞内 Rb 水平的降低,而 Rb 蛋白在细胞内有可能起到保护细胞不发生凋亡的作用,因而 Rb 水平的降低最终导致细胞对凋亡诱导因子敏感性的增加,细胞发生凋亡。有关细胞 G1 期阻滞所引发的细胞增殖正向调控基因 CyclinD1 转录的抑制、凋亡抑制基因 bcl-2 表达下调、凋亡促进基因 bax 表达上调,已见有文献报道。SPC-A1 细胞凋亡的发生是随着感染重组腺病毒后培养时间的延长而逐步增加,这与 SPC-A1 细胞中 P16 蛋白的表达时相不一致。P16 蛋白的表达在感染后第 1 天即达到高峰,其后表达水平有所下降,而细胞凋亡的发生明显存在着滞后效应。仔细分析 SPC-A1 细胞的生长状态和细胞周期,也可以看出细胞生长抑制和细胞周期阻滞存在一定程度的滞后效应。由此可以看出,目的基因的表达是引起细胞周期阻滞和细胞凋亡的原因,而细胞周期阻滞和细胞凋亡是目的基因表达的

结果,后者的发生牵涉到一系列调控基因的改变和调控信号的传导,因此现象发生较迟便不难理解。

[参考文献]

- [1] 苏长青,叶玉坤,汪 栋,等. 肺癌组织 CDKN2/p16 基因点突变的分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2002, 19(1): 37-40.
- [2] Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, *et al.* Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine[J]. J Natl Cancer Inst, 2003, 95(5): 399-409.
- [3] Santos LL, Amaro T, Pereira SA, *et al.* Expression of cell-cycle regulatory proteins and their prognostic value in superficial low-grade urothelial cell carcinoma of the bladder[J]. Eur J Surg Oncol, 2003, 29(1): 74-80.
- [4] Yarbrough WG. The ARF-p16 gene locus in carcinogenesis and therapy of head and neck squamous cell carcinoma[J]. Laryngoscope, 2002, 112(12): 2114-2128.
- [5] Tamm I, Schumacher A, Karawajew L, *et al.* Adenovirus-media-

ted gene transfer of P16INK4/CDKN2 into bax-negative colon cancer cells induces apoptosis and tumor regression *in vivo*[J]. Cancer Gene Ther, 2002, 9(8): 641-650.

- [6] Calbo J, Marotta M, Cascallo M, *et al.* Adenovirus-mediated wt-p16 reintroduction induces cell cycle arrest or apoptosis in pancreatic cancer[J]. Cancer Gene Ther, 2001, 8(10): 740-750.
- [7] Hall M, Peters G. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinase, and CDK inhibitors in human cancer[J]. Adv Cancer Res, 1996, 68: 67-108.
- [8] Lukas J, Aagaard L, Strauss M, *et al.* Oncogenic alterations of p16INK4/CDKN2 and cyclin D1 cooperate to deregulate G1 control[J]. Cancer Res, 1996, 55(21): 4818-4823.
- [9] Sandig V, Brand K, Herwigs S, *et al.* Adenovirally transferred p16INK/CDKN2 and p53 genes cooperate to induce apoptotic tumor cell death[J]. Nat Med, 1997, 3(3): 313-319.

[收稿日期] 2004 - 07 - 15

[修回日期] 2004 - 09 - 10

· 研究简报 ·

[文章编号] 1007-385X(2004)04-0271-01

大肠癌端粒长度变化与端粒酶活性的研究

葛莲英, 刘剑仑, 黎丹戎, 张贵年 (广西医科大学附属肿瘤医院, 南宁 530021)

近年来对端粒、端粒酶的研究证实,端粒酶的激活和端粒的稳定是维持人类肿瘤无限增殖的重要因素。为了探讨大肠癌端粒长度变化与端粒酶活性的关系,我们采用 Southern blot 及端粒重复扩增(TRAP)法对 30 例大肠癌组织及相应的癌旁组织和正常大肠黏膜组织的端粒长度和端粒酶活性进行检测和分析。

结果发现在大肠癌、癌旁组织及正常大肠黏膜组织中,端粒酶活性阳性表达率分别为 88.33%、13.33% 及 3.33%, 大肠癌与癌旁组织和正常黏膜之间端粒酶活性有显著性差异($P < 0.05$)。大肠癌平均端粒长度在 2.2 ~ 10.8 kb 之间,平均 6.90 ± 1.53 kb; 癌旁组织 5.8 ~ 20.5 kb,平均 9.85 ± 0.42 kb; 而正常大肠黏膜为 7.6 ~ 15.2 kb,平均 10.43 ± 0.21 kb。大肠癌平均端粒长度与癌旁组织及正常大肠黏膜比较,有显著性差异($P < 0.05$)。平均端粒长度和端粒酶活性与大肠癌组织分级或临床分期有关,大肠癌平均端粒长度随临床

分期的进展而逐渐缩短, Dukes D 期与 C 期和 B 期比较,有显著性差异($P < 0.05$); 而与肿瘤分化程度无关。大肠癌端粒酶活性有随组织学分级、临床分期而呈逐渐增高趋势,但无统计学差异($P > 0.05$)。

提示,端粒长度改变及端粒酶高表达与大肠癌的发生有密切关系。也可以说,端粒缩短,端粒酶生物学活性改变,可被看成是恶性肿瘤发生及发展的一个重要信号。而且也正是肿瘤细胞中端粒酶的这种持续高表达,才有可能成为恶性肿瘤得以迅速无限增殖、扩展的原因之一。

[关键词] 大肠癌; 端粒酶

[中图分类号] R735.3

[文献标识码] D

[收稿日期] 2004 - 03 - 16

[修回日期] 2004 - 07 - 10

[基金项目] 广西卫生厅资金项目(9954)