

重组复制缺陷型腺病毒 Ad-p53AIP1 的抗肿瘤效应及其作用机制

姜云波, 陆应麟*, 贾海泉, 徐元基, 陈惠华, 刘刚, 王妍, 杜芝燕 (军事医学科学院基础医学研究所病理生物学研究室, 北京 100850)

[摘要] 目的: 探讨外源性 *p53AIP1* (*p53*-regulated apoptosis-inducing protein 1) 基因抗肿瘤效应及其作用机制, 以评估 *p53AIP1* 基因在肿瘤基因治疗中应用的可行性。方法: 构建携带 *p53AIP1* 基因的重组复制缺陷型腺病毒 Ad-p53AIP1, 感染人肝癌细胞 HepG2, 应用 MTT 比色法、Western blotting、流式细胞术、罗丹明染色以及电镜等观察外源性 *p53AIP1* 基因表达对肿瘤细胞的作用及其相关机制。小鼠皮下接种感染 Ad-p53AIP1 的小鼠乳腺癌 4T1 细胞, 观察 Ad-p53AIP1 对肿瘤细胞体内成瘤性的影响; 建立 4T1 细胞皮下移植瘤小鼠模型, 直接瘤内多点注射重组腺病毒, 观察 Ad-p53AIP1 的抗肿瘤疗效。结果: 感染 Ad-p53AIP1 的 HepG2 细胞能够高效表达 P53AIP1 蛋白。MTT 检测显示 Ad-p53AIP1 对人肝癌细胞 HepG2 的生长抑制率达 50% 以上; 流式细胞术分析证实 *p53AIP1* 使肿瘤细胞周期阻滞于 G₂/M 期; 罗丹明染色、电镜观察以及凋亡相关蛋白 PARP 表达的检测均证实 *p53AIP1* 能诱导肿瘤细胞发生明显凋亡。感染 Ad-p53AIP1 的肿瘤细胞体内成瘤受到非常明显的抑制 ($P < 0.01$), Ad-p53AIP1 瘤体注射对移植瘤生长也有明显的抑制作用 ($P < 0.05$)。Western blotting 以及 RT-PCR 检测证实 Ad-p53AIP1 对 *p53* mRNA 表达无影响, 能下调 *mdm2* 基因的表达; *p53AIP1* 能上调 P53 蛋白的表达、下调 MDM2 蛋白的表达水平, 同时还影响 P21 等细胞周期相关蛋白和凋亡相关蛋白的表达。结论: *p53AIP1* 有明显的体内外抗肿瘤作用, 其作用机制与其反向调控 P53 蛋白、调控多种细胞周期和细胞凋亡相关蛋白、诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡有关, 该基因在肿瘤基因治疗中具有潜在的应用前景。

[关键词] *p53AIP1*; 肝癌细胞; 细胞周期; 细胞凋亡; 抗癌效应; 基因治疗

[中图分类号] R737.5; R730.54 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2008)06-0508-08

Anti-tumor effect of recombinant replication-defective adenovirus Ad-p53AIP1 and its related mechanism

JIANG Yun-bo, LU Ying-lin*, JIA Hai-quan, XU Yuan-ji, CHEN Hui-hua, LIU Gang, WANG Yan, DU Zhi-yan (Department of Pathobiology, Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-tumor effect of exogenous *p53*-regulated apoptosis-inducing protein 1 (*p53AIP1*) and the related mechanism, so as to assess the feasibility of using *p53AIP1* in tumor gene therapy. **Methods:** The recombinant replication-defective adenovirus Ad-p53AIP1 containing *p53AIP1* gene was constructed and transfected into human hepatocellular carcinoma HepG2 cell line. The effects and the relevant mechanisms of exogenous *p53AIP1* gene on cell growth were examined by MTT, Western blotting, flow cytometry, rhodamine staining and electron microscopy. Nude mice were subcutaneously inoculated with Ad-p53AIP1-infected mouse breast cancer cell line 4T1 to observe the effect of Ad-p53AIP1 on tumorigenesis of tumor cells. 4T1 breast cancer xenograft models were established in mice and intratumoral injections of Ad-p53AIP1 were given to observe the anti-tumor effect of Ad-p53AIP1. **Results:** Over-expression of *p53AIP1* protein was confirmed in HepG2 cells infected with Ad-p53AIP1. Cell growth of HepG2 cells which contain wild-type *p53* gene was inhibited by over 50% after infection. Flow cytometry showed transfection with *p53AIP1* gene resulted in cell cycle arrest at G₂/M. Results of PARP protein examination, rhodamine staining and electron microscopic observation demonstrated that *p53AIP1* induced obvious apoptosis in tumor cells. Moreover, the infection with Ad-p53AIP1 significantly inhibited the tumorigenesis of 4T1 cells *in vivo* ($P < 0.01$) and the growth of tumors *in vivo* after

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划(973)资助项目(No. 2002CB513105)。Supported by the Major State Basic Research Development Program of China (No. 2002CB513105)

[作者简介] 姜云波(1977-), 女, 吉林省德惠县人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤生物治疗的基础研究, E-mail: jiangyb912@sina.com

* Corresponding author. E-mail: luyi@nic.bmi.ac.cn

intratumorial injection ($P < 0.05$). Furthermore, Western blotting and RT-PCR confirmed that Ad-p53AIP1 had no influence on p53 mRNA expression and downregulated *mdm2* gene and protein; it also up-regulated P53 protein expression. In addition, Ad-p53AIP1 could regulate cell cycle-related proteins and apoptosis-related proteins such as P21. **Conclusions:** Ad-p53AIP1 possess obvious tumor inhibitory effect *in vitro* and *in vivo*; the mechanism is related to its regulation of P53 protein, cell cycle and apoptosis-related proteins. *p53AIP1* might have a future in tumor gene therapy.

[**Key words**] p53-regulated apoptosis-inducing protein 1 (*p53AIP1*) gene; liver neoplasms; cell cycle; cell apoptosis; anti tumor; gene therapy

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(6): 508-515]

p53AIP1 (p53-regulated apoptosis-inducing protein 1) 基因是近年来新发现的 p53 基因下游的促凋亡靶基因, 其能够抑制肿瘤生长, 促进肿瘤细胞的凋亡。p53AIP1 基因促凋亡作用可能强于 p53 本身, 并对 p53 抗性 (p53 +/+) 的肿瘤细胞有促凋亡作用。已有研究^[1] 证明, p53AIP1 基因在一般组织中都不表达, 如将外源性的 p53AIP1 基因在肿瘤细胞中高效表达, 有助于促进肿瘤细胞的凋亡。本研究以含有野生型 p53 的肿瘤细胞为研究对象, 将 p53AIP1 基因通过复制缺陷型腺病毒载体介导, 观察 p53AIP1 基因对肿瘤细胞的作用及其作用机制, 以探讨 p53AIP1 在肿瘤基因治疗中应用的可行性。

1 材料与方法

1.1 细胞、动物和主要试剂

人肝癌细胞系 HepG2、人宫颈癌细胞系 Hela (含野生型 p53)、人胚肾细胞系 HEK293, BALB/c 品系小鼠来源的乳腺癌细胞系 4T1, 均为本室保存。将其在含 10% 胎牛血清的 H-DMEM 培养液中, 于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。携带 p53AIP1 基因全长 cDNA 序列的腺病毒穿梭质粒 pDC316-p53AIP1 由泛基诺基因技术有限公司构建合成, 腺病毒骨架质粒 pBHGloxΔE1, 3Cre 购买于本元正阳基因技术有限公司。阴性对照病毒 Ad-null 由本元正阳基因技术有限公司惠赠。病毒 DNA 小量抽提试剂盒购于上海生工生物工程技术有限公司, 反转录合成试剂盒购自晶美生物技术有限公司。抗 P53AIP1 蛋白的羊多克隆抗体、抗 β-actin 蛋白的鼠单克隆抗体、抗 P21 蛋白的兔多克隆抗体、抗 P53 蛋白的鼠单克隆抗体、抗 MDM2 蛋白的鼠单克隆抗体均购自 Santa Cruz 公司, 抗 Cleaved-PARP 蛋白的鼠单克隆抗体购自 Cell Signaling 公司, 抗 CDK4 蛋白的鼠单克隆抗体购自 Fremont CA 公司。罗丹明购自 SIGMA 公司。BALB/c 小鼠 [实验动物合格证号 SCXK-(军)2007-004] 购自本院动物中心, SPF 清洁级动物实验室饲养。

1.2 重组腺病毒的制备及鉴定

设计并合成引物: p53AIP1 基因上游 5' ATG GGA TCT TCC TCT GAG GCG A 3'; 下游 5' TCA CTG CAA CCT CAA CGG TGC T 3'。参考 AdMax adenoviral vector system 说明书, 培养 HEK293 细胞至对数生长期, 将重组腺病毒穿梭载体质粒 pDC316-p53AIP1 和骨架载体质粒 pBHGloxΔE1, 3Cre 通过 Lipofectamine 2000 (invitrogen) 共转染 HEK293 细胞。转染后 12 d 出现病毒空斑, 挑取空斑, 提取腺病毒 DNA, 用上述引物进行 PCR 鉴定, 扩增阳性者, 命名为 Ad-p53AIP1。挑选的阳性克隆放大培养, 按参考文献 [2] 进行病毒滴度的测定。

1.3 RT-PCR 检测 Ad-p53AIP1 感染后 HepG2 细胞中相关基因的表达

收集正常培养和经 Ad-p53AIP1 (MOI 为 100) 感染 6、12、24 h 后的 HepG2 细胞, 提取细胞总 RNA, 按照反转录合成试剂盒合成 cDNA, 以此为模板进行 p53AIP1、p53、mdm2 等基因的扩增。p53 基因上游 5' AGC ACT GTC CAA CAA CAC CA 3'; 下游 5' TCC ATG TCA GTC TGA GTC AG 3'。mdm2 基因上游 5' CCC TGG TTA GAC CAA AGC CAT 3'; 下游 5' GGC ACG CCA AAC AAA TCT CC 3'。反应条件为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s; 53 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 30 s, 31 个循环, 末次循环后于 72 °C 延伸 10 min。

1.4 Western blotting 检测 Ad-p53AIP1 感染 HepG2 细胞 P53AIP1 蛋白的表达

用 Ad-p53AIP1 和 Ad-null (MOI 均为 100) 分别感染 HepG2 细胞, 24 h 后换液, 48 h 收集细胞。用 Ad-p53AIP1 (MOI 为 100) 感染 HepG2 细胞, 分别于 6、12、24 h 收集细胞。提取细胞总蛋白, 定量后进行 SDS-PAGE 电泳及 Western blotting 分析。

1.5 MTT 法检测 Ad-p53AIP1 感染对 HepG2 细胞增殖的影响

将 HepG2 细胞按每孔 2 000 个接种于 96 孔培养板, 次日分别用重组腺病毒 Ad-p53AIP1 和

Ad-null感染 (MOI 为 100),4 h 后换液。MTT 法测定感染后第 1~5 天的光密度(D_{492})值,绘制细胞生长曲线。

1.6 流式细胞术检测 Ad-p53AIP1 感染对 HepG2 细胞周期的影响

收集正常培养和经 Ad-p53AIP1 (MOI 为 100) 感染 6、12、24 h 后的 HepG2 细胞,参照文献[3]固定细胞,PI 染色后用流式细胞仪检测。

1.7 罗丹明染色法检测 Ad-p53AIP1 感染对 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响

收集正常培养和经 Ad-p53AIP1 (MOI 为 100) 感染 24、48、72 h 后的 HepG2 细胞,重悬于罗丹明溶液(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)中,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光放置 30 min,利用流式细胞仪观察分析。

1.8 电镜观察 Ad-p53AIP1 感染后 HepG2 细胞超微结构的变化

收集正常培养和分别经 Ad-p53AIP1 和 Ad-null (MOI 为 100) 感染 96 h 后的 HepG2 细胞,放入 2.5% 戊二醛缓冲液中固定 4 h,再用 1% 锇酸作用 2 h,梯度酒精脱水、浸透、包埋、超薄切片、切片染色,透射电镜观察,拍片,记录。

1.9 Ad-p53AIP1 抑瘤实验和对荷瘤动物的治疗

健康 BALB/c 小鼠 42 只,雌性,18~22 g。用 Ad-p53AIP1 和 Ad-null (MOI 均为 100) 分别体外感染 4T1 细胞,培养 24 h 后收集细胞,调整细胞密度为 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 。取 21 只 BALB/c 小鼠随机分为 3 组,每组 7 只,分别于小鼠右侧颈背部皮下接种感染 Ad-p53AIP1 病毒、未感染病毒的 4T1 细胞以及感染 Ad-null 病毒的 4T1 细胞(1×10^6 个/只)。

另取对数生长期的 4T1 细胞,用 PBS 调整细胞密度至 $1 \times 10^7/\text{ml}$,取 100 μl 细胞悬液注射于剩余 21 只 BALB/c 小鼠的右侧颈背部皮下,每日定时观察记录;当肿瘤结节直径为 4~5 mm 时,随机分成 3 组,每组 7 只;注射 PBS 为空白对照组;注射 Ad-null 为病毒对照组;注射 Ad-p53AIP1 为病毒治疗组,对小鼠进行瘤内多点注射治疗,注射剂量为每只 2×10^8 PFU,每 7 d 重复治疗 1 次,共治疗 3 次。定时测量瘤体生长情况,游标卡尺测量小鼠瘤体最长径(a)和与之垂直的短径(b),根据公式 $(a \times b^2)/2$ 计算瘤体体积。计算各组的抑瘤率:抑瘤率(%) = (对照组平均瘤体体积 - 实验组平均瘤体体积) / 对照组平均瘤体体积 $\times 100\%$ 。

1.10 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用 SAS8.0 统计学软件,进行两因素方差分析和成组 t 检验。

2 结果

2.1 重组腺病毒的制备及鉴定

pDC316-p53AIP1 和 pBHGlox Δ E1,3Cre 共转染 HEK293 细胞后,约 12 d 包装出病毒。挑取单斑,放大后进行 PCR 鉴定,选取可扩增出大小约为 375 bp 的 p53AIP1 片段的病毒上清放大培养(图 1),测定病毒滴度为 5.5×10^8 PFU/ml。



图 1 重组腺病毒 Ad-p53AIP1 的 PCR 扩增 p53AIP1 基因

Fig.1 p53AIP1 gene PCR identification of recombinant adenovirus Ad-p53AIP1

M: DNA marker DL 2000; 1-9: Clone 1-9 recombinant adenovirus Ad-p53AIP1

2.2 Ad-p53AIP1 感染对 HepG2 细胞 P53AIP1 蛋白表达的影响

未感染病毒和感染 Ad-null 的 HepG2 细胞均未见 P53AIP1 蛋白条带,而感染 Ad-p53AIP1 48 h 后的 HepG2 细胞可检测出有较高水平的 P53AIP1 蛋白(图 2),说明 HepG2 细胞内导入外源性 p53AIP1 有高水平的蛋白表达。

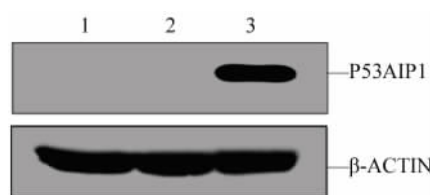


图 2 Ad-p53AIP1 感染后 HepG2 细胞 P53AIP1 蛋白的表达

Fig.2 Effect of Ad-p53AIP1 on P53AIP1 protein expression in HepG2 cells

1: Control; 2: P53AIP1 expression level after infected with Ad-null; 3: P53AIP1 expression level after infection with Ad-p53AIP1

2.3 Ad-p53AIP1 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用

与正常对照组相比,Ad-null 对 HepG2 细胞的生长几乎不受影响,而在感染 Ad-p53AIP1 后,HepG2 细胞生长受到明显抑制,第 5 天细胞大部分发生皱缩、死亡,生长抑制率达(51.2 \pm 9.6)% 以上,Ad-p53AIP1 与对照组 Ad-null 相比,差异具有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$,图 3)。

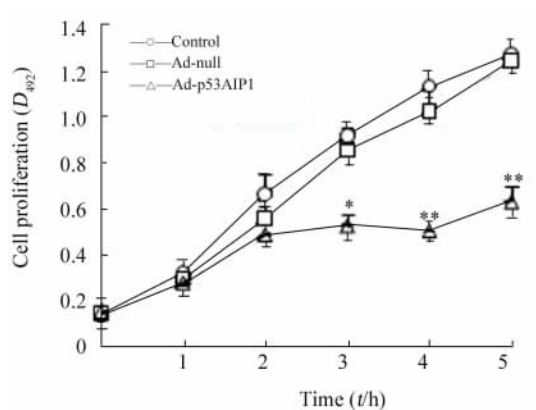


图3 Ad-p53AIP1 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用

Fig. 3 Anti-proliferation effect of Ad-p53AIP1 on HepG2 cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control or Ad-null cells

2.4 Ad-p53AIP1 感染对 HepG2 细胞周期的影响

流式细胞计数分析可见,感染 Ad-p53AIP1 后的

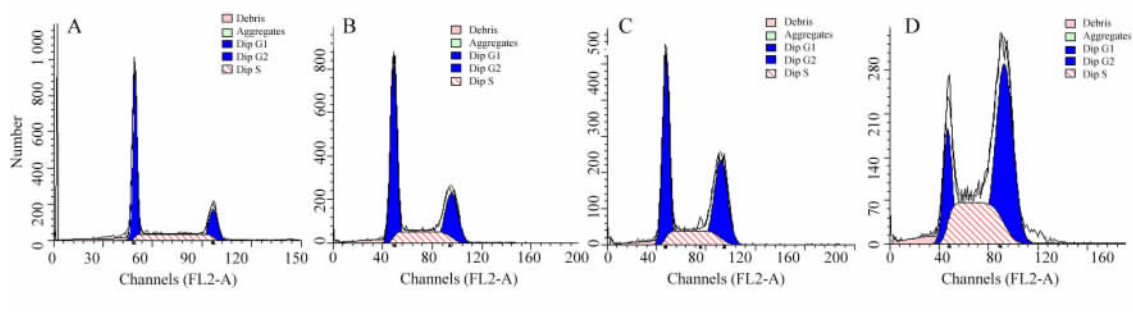


图4 流式细胞术分析 p53AIP1 对 HepG2 细胞周期的影响

Fig. 4 Effect of p53AIP1 on cell cycle of HepG2 cells by flow cytometry

A: Control; B: HepG2 cells infected with Ad-p53AIP1 for 6 h; C: HepG2 cells infected with Ad-p53AIP1 for 12 h; D: HepG2 cells infected with Ad-p53AIP1 for 24 h

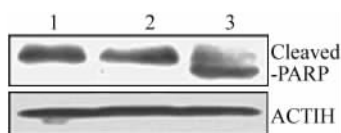


图5 Western blotting 检测 Ad- p53AIP1 感染后 HepG2 细胞中 PARP 的剪切

Fig. 5 PARP cleaving in HepG2 cells infected with Ad-p53AIP1 as measured by Western blotting

1: Control; 2: HepG2 cells infected with Ad-null; 3: HepG2 cells infected with Ad-p53AIP1

2.6 Ad-p53AIP1 对 HepG2 细胞线粒体膜电位影响

罗丹明 123 染色可见, Ad-p53AIP1 处理后的 HepG2 细胞随着作用时间的延长, 荧光强度逐渐降低(图 7), 仅相当于对照组的 42.7% (相似的结果见于 HeLa 细胞中)。以上结果表明, p53AIP1 能够

HepG2 细胞周期被明显阻滞于 G₂/M 期, 随着 Ad-p53AIP1 作用时间的延长, G₂/M 期细胞百分比由 27.34% 增加至 51.81% (图 4)。结果表明, p53AIP1 对 HepG2 细胞有 G₂/M 期细胞周期阻滞的作用。相似的结果见于 HeLa 细胞中(结果未列出)。

2.5 Ad-p53AIP1 感染对 HepG2 细胞凋亡的影响

Western blotting 检测显示, 在 Ad-p53AIP1 感染 48 h 后的 HepG2 细胞中, 凋亡相关蛋白 PARP 出现了明显的剪切片段。而正常对照和感染 Ad-null 的细胞没有出现 PARP 蛋白的剪切(图 5)。相似的结果见于 HeLa 细胞中。

透射电镜下观察细胞的超微结构可见, 感染 Ad-p53AIP1 96 h 后的 HepG2 细胞核染色质浓缩、边集于核膜, 呈块状或半月状; 细胞核碎裂, 胞质浓缩; 细胞膜完整, 膜表面的微绒毛消失, 出现典型的凋亡小体(图 6)。

明显促进肿瘤细胞发生凋亡, 并能影响线粒体跨膜电位的变化。

2.7 Ad-p53AIP1 对鼠乳腺癌 4T1 细胞成瘤的抑制作用

感染 Ad-null 和未感染病毒组的 4T1 细胞在接种第 3 天已能触摸到有瘤体长出, 第 9 天时瘤体体积达到 $(6.2 \pm 0.9) \text{ mm}^3$, 第 30 天时, 体积已经有 $(16.6 \pm 3.1) \text{ mm}^3$ 之大。而感染 Ad-p53AIP1 组的小鼠瘤体生长十分缓慢, 在接种细胞第 21 天才观察到部分小鼠有瘤体长出。Ad-p53AIP1 对小鼠乳腺癌 4T1 细胞的成瘤具有非常明显的抑制作用, 生长抑制率达到 $(93.51 \pm 20.1)\%$, 与对照组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 而对照病毒 Ad-null 对 4T1 细胞的体内成瘤性几乎没有抑制作用, 与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 8)。

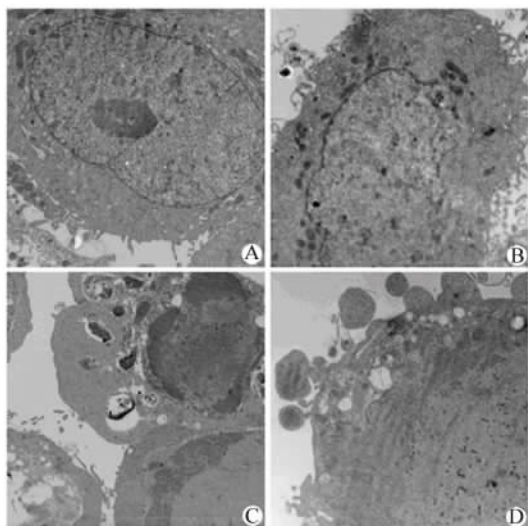


图 6 透射电镜观察 Ad-p53AIP1 作用后 HepG2 细胞的超微结构变化(×6 000)

Fig. 6 Ultrastructural changes of HepG2 cells infected with Ad-p53AIP1 by transmission electron microscope(×6 000)

A: Control; B: HepG2 cells infected with Ad-null;
C, D: HepG2 cells infected with Ad-p53AIP1

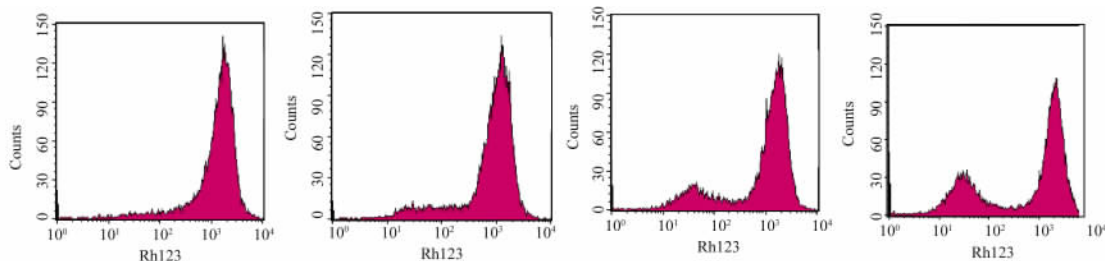


图 7 罗丹明染色观察 p53AIP1 对 HepG2 细胞线粒体膜电位变化

Fig. 7 Rhodamine staining for observation on mitochondrial $\Delta\psi_m$ in HepG2 cells infected with Ad-p53AIP1

A: Control; B: HepG2 cells infected with Ad-p53AIP1 for 24 h; C: HepG2 cells infected with Ad-p53AIP1 for 48 h;
D: HepG2 cells infected with Ad-p53AIP1 for 72 h

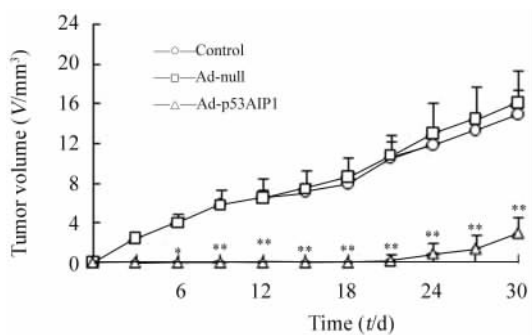


图 8 Ad-p53AIP1 对小鼠乳腺癌 4T1 细胞成瘤的抑制作用

Fig. 8 Inhibition of tumorigenesis by Ad-p53AIP1 against mouse breast cancer 4T1 cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control or Ad-null cells

2.8 Ad-p53AIP1 对乳腺癌细胞小鼠移植瘤的治疗作用

以总量 2×10^8 PFU 的重组腺病毒 Ad-p53AIP1 直接移植瘤体内多点注射, 定时测量瘤体生长情况。结果发现, Ad-p53AIP1 组对 4T1 移植瘤的抑制作用比较明显, 与对照组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 而对照病毒 Ad-null 组对移植瘤生长几乎没有抑制作用, 与 PBS 对照组相比差异无显著性意义 ($P > 0.05$, 图 9)。

2.9 Ad-p53AIP1 感染对 HepG2 细胞 p53 等相关基因表达的影响

Ad-p53AIP1 感染 HepG2 细胞后, p53AIP1 基因有明显表达, p53 基因在 RNA 水平的表达与未感染病毒的细胞组相比, 没有任何变化; 但 mdm2 基因的表达有明显下降的趋势, 在作用 24 h 后, 表达量最低(图 10)。结果提示, 重组腺病毒能介导外源性 p53AIP1 在 HepG2 细胞中有效表达, 而且 p53AIP1 不影响 p53 基因在 RNA 水平的表达, 但能下调 mdm2 基因在转录水平的表达。

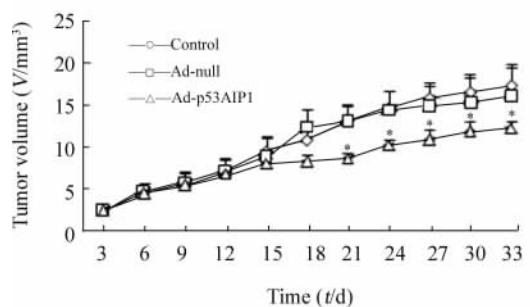


图 9 Ad-p53AIP1 治疗 4T1 细胞移植瘤的效果

Fig. 9 Anti-tumor efficacy of Ad-p53AIP1 on 4T1 xenografts

* $P < 0.05$ vs control or Ad-null cells

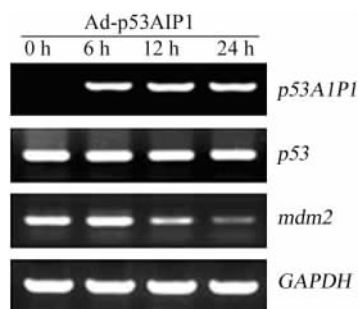


图 10 Ad-p53AIP1 对 HepG2 细胞 p53 相关基因表达的影响

Fig. 10 p53AIP1-related genes expression in HepG2 cells infected with Ad-p53AIP1

2.10 Ad-p53AIP1 感染对肿瘤细胞中 P53 等相关蛋白表达水平的调控

Western blotting 检测显示, Ad-p53AIP1 感染 HepG2 细胞 6 h 后, P53 蛋白的表达水平有所增加, 并且随着作用时间的延长, 上调表达的程度明显增强。同时, MDM2 蛋白的表达水平逐渐降低, CDK4 蛋白的表达水平也有下降的趋势, Bax 蛋白在病毒感染 12 h 后的表达量出现上调的趋势, Bcl-2 表达水平有轻微程度的下降(图 11)。表明 Ad-p53AIP1 能够反向作用于其上游调控基因 P53 蛋白的上调表达, 并能下调 MDM2 蛋白的表达水平。

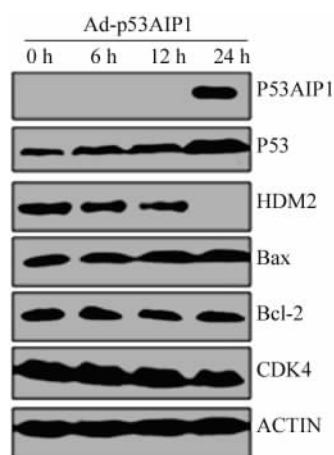


图 11 Western blotting 检测 Ad-p53AIP1 感染后 HepG2 细胞 P53 等相关蛋白的表达

Fig. 11 p53AIP1-related protein expression in HepG2 cells infected with Ad-p53AIP1 by Western blotting

Ad-p53AIP1 感染 HeLa 细胞 6 h 后, P21 蛋白的表达水平开始增加(图 12)。提示 Ad-p53AIP1 可以调控 P21 蛋白水平的表达, 从而可调控细胞周期的进程, 使细胞发生细胞周期阻滞作用。

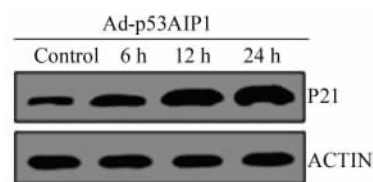


图 12 Western blotting 检测 Ad-p53AIP1 感染后 HeLa 细胞 P21 蛋白的表达

Fig. 12 P21 expression in HeLa cells infected with Ad-p53AIP1 by Western blotting

3 讨论

肿瘤基因治疗是将目的基因用基因转移技术导入靶细胞, 使其表达此基因而获得特定的功能, 继而执行或介导对肿瘤的杀伤和抑制作用, 达到治疗目的。目前, 有代表性的药物是深圳赛百诺基因技术有限公司生产的今又生(重组人 p53 腺病毒注射液)^[4], 其作为世界上第一个获得正式批准的基因治疗药物, 的确为一些肿瘤患者带来了希望。然而, p53 抑癌基因对肿瘤细胞并非有广谱的杀伤和抑制效应, 因此, 寻找对肿瘤细胞杀伤和抑制效应更为有效的目的基因已成为肿瘤基因治疗的研究热点之一。

p53AIP1 基因是近年来新发现的 p53 下游促凋亡靶基因, 其定位于人类染色体 11q24.3, 全长 8.2 kb, 含有 5 个外显子, 在第一内含子中存在有 p53 结合序列。p53AIP1 通过选择性剪接的方式而有 3 个不同的转录本 α 、 β 、 γ , 最终编码的蛋白质分别含有 124、86、108 个氨基酸^[1]。p53AIP1 基因的表达受野生型 p53 基因的调控诱导, 在 p53 依赖性的凋亡调控通路中起重要作用。当细胞受到严重损伤时, P53 蛋白的 Ser46 发生磷酸化, Ser46 磷酸化后的 P53 激活 p53AIP1 基因的转录, 转录和翻译后的 P53AIP1 导致线粒体膜电化学梯度降低, 细胞色素 c 释放到胞质中, 进而启动线粒体凋亡程序^[5]。研究报道指出, P53 蛋白 Ser46 的磷酸化对 p53AIP1 的表达是至关重要的, p53AIP1 可能是一个关键的促凋亡基因^[1]。p53AIP1 作为促凋亡基因, 能够抑制肿瘤的生长, 促进肿瘤细胞的凋亡^[5]。Koji 等^[6]采用复制缺陷型腺病毒介导 p53AIP1 (Ad-p53AIP1) 感染肿瘤细胞, 证实 p53AIP1 的单独表达可以直接抑制肿瘤的生长, 促进肿瘤细胞的凋亡, 并且其对 p53 抗性(p53 +/+)的肿瘤细胞也起到促凋亡作用。对于 p53 抗性(p53 +/+)的肿瘤细胞, 如 LS174T 和 A549 细胞系, 对 Ad-p53 的作用很不敏感, 但其受到

Ad-p53AIP1 感染之后, 细胞发生明显的凋亡, 生长受到抑制。Wang 等^[7]报道, 截短端的 p53AIP1 突变体不能抑制 HeLa 和 COS-7 细胞的生长, 并且含有功能缺失的 p53AIP1 的突变体与散发性前列腺癌的发生有相关性。最近 Sawaya 等^[8]发现, 在幽门螺杆菌感染的胃癌和慢性胃炎患者的胃黏膜中 p53AIP1 mRNA 表达水平有明显不同, 胃癌患者胃黏膜中 p53AIP1 mRNA 的表达量显著低于慢性胃炎患者。因此, 对于有幽门螺杆菌感染的患者, p53AIP1 表达水平不足可能对其胃癌的发生起到一定的作用。Yamashita SI 等^[9]认为, p53AIP1 的表达可以被作为非小细胞型肺癌预后诊断的一个指标, 在 70 例非小细胞型肺癌患者中, p53AIP1 基因的表达水平在淋巴结转移阳性组明显低于阴性组, p53AIP1 低表达组的整体生存率明显低于 p53AIP1 高表达组。

鉴于 p53AIP1 基因在促肿瘤细胞凋亡作用的优势, 以及在正常组织中都不表达的特点^[1], 本实验以 5 型腺病毒为载体, 构建了重组腺病毒 Ad-p53AIP1, 以求使 p53AIP1 在肿瘤细胞中高效表达, 验证其对肿瘤细胞的作用, 进一步研究 p53AIP1 的作用机制。研究结果显示, p53 野生型(p53 +/+)的 HepG2 细胞和 HeLa 细胞感染 Ad-p53AIP1 后, 细胞生长受到明显抑制, 并且能检测到 P53AIP1 蛋白高水平表达。通过罗丹明 123 染色、透射电镜观察以及 Western blotting 检测等进一步证实 HepG2 和 HeLa 细胞发生明显的凋亡。通过流式细胞术分析, 发现 HepG2 和 HeLa 细胞在感染 Ad-p53AIP1 后, 发生了明显的 G₂/M 期阻滞。同时 Western blotting 检测到 P21 蛋白表达的上调以及 CDK4 蛋白表达的下降。提示 p53AIP1 对肿瘤细胞的生长抑制可能是通过影响细胞周期的进程和直接促凋亡双重作用导致的结果。p53AIP1 对细胞周期的影响作用在国内文献中未见有相关报道。此外, 体内试验也证实, p53AIP1 对小鼠乳腺癌细胞 4T1 成瘤性具有十分显著的抑制作用, 同时对 4T1 细胞的荷瘤小鼠具有一定的治疗作用。

p53AIP1 是一个促凋亡基因, 其可以被多种因素如野生型 p53^[1]和多种刺激因子诱导表达^[10-14], 在介导凋亡调控的通路中起到重要的作用。但本研究结果中发现, p53AIP1 能够上调其上游调控 p53 在蛋白水平的表达, 同时下调 MDM2 蛋白的表达量; 并且随着 Ad-p53AIP1 感染作用时间的延长, p53 在 mRNA 水平的表达一直没有变化, 而 mdm2 的 RNA 表达水平逐渐降低。推测 p53AIP1 诱导 P53

蛋白表达的作用机制, 由于 p53 在 mRNA 表达水平没有改变, 因此可认为, 被 p53AIP1 下调表达的 MDM2 蛋白作为 p53 特异性的 E3 泛素连接酶^[15-17], 解除了其对 P53 蛋白的降解和抑制功能, 导致 P53 蛋白水平的表达上调。而 mdm2 在 RNA 水平表达的下降, 可能是 p53AIP1 作为一种转录抑制因子直接影响了 mdm2 转录水平的表达, 或是 p53AIP1 通过影响其他因子的转录或翻译水平的表达间接影响 mdm2 和 p53 表达水平。这些可能性都有待于进一步研究证实。

对于 p53AIP1 能够调控细胞周期以及凋亡相关蛋白的表达变化, 是否是通过上调表达的 P53 蛋白, 进而影响 Bax^[18]、Bcl-2、P21 以及 CDK4^[19-20] 蛋白的表达水平而起作用的, 还是另有其他的作用途径, 还有待于进一步深入研究。

综上所述, p53AIP1 对 p53 野生型的肿瘤细胞具有细胞周期阻滞和促凋亡的作用。同时, p53AIP1 作为 p53 调控的下游促凋亡靶基因, 有反向调控 P53 蛋白上调表达的作用。外源性的野生型 p53 基因可以诱导肿瘤细胞 p53AIP1 基因的表达, 反之, 外源性的 p53AIP1 基因可以诱导肿瘤细胞 p53 基因在蛋白水平的上调表达, 两者在肿瘤细胞中形成一种相互诱导表达的作用模式, 以调节肿瘤的细胞周期进程并促进肿瘤细胞的凋亡(图 13)。这两种基因相互诱导表达的作用模式不仅能够解释抑制动物肿瘤体内生长的机制, 也为其应用于肿瘤的临床治疗提供理论基础, 该模式有可能成为一种治疗肿瘤的新策略。

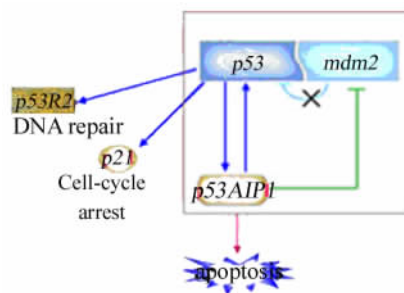


图 13 外源性 p53AIP1 基因调控 p53 基因表达的模式图
Fig. 13 Action pattern diagram of exogenous p53AIP1 regulating expression of p53 gene

[参 考 文 献]

[1] Oda K, Arakawa H, Tanaka T, et al. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53 [J]. Cell, 2000, 102(6): 849-862.

- [2] 周文泉, 闵志廉, 李 莉, 等. 重组腺病毒 Ad-p16 的扩增及病毒滴度检测[J]. 医学研究生学报, 2001, 14(1): 44-46.
- [3] Ma LL, Sun WJ, Wang Zh, *et al.* Effects of silencing of mutant p53 gene in human lung adenocarcinoma cell line Anip973 [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2006, 25(4):585-592.
- [4] 丁 娅, 张晓实, 彭瑞清, 等. 重组人 p53 腺病毒注射液治疗晚期实体肿瘤的安全性和近期疗效评价[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(9):1025-1029.
- [5] Li P, Nijhawan D, Wang X. Mitochondrial activation of apoptosis [J]. Cell, 2004, 116(2 Suppl): S57-S59.
- [6] Yoshida K, Monden M, Nakamura Y, *et al.* Adenovirus-mediated p53AIP1 gene transfer as a new strategy for treatment of p53-resistant tumors [J]. Cancer Sci, 2004, 95(1): 91-97.
- [7] Wang X, Wang F, Taniguchi K, *et al.* Truncating variants in p53AIP1 disrupting DNA damage-induced apoptosis are associated with prostate cancer risk [J]. Cancer Res, 2006, 66(21): 10302-10307.
- [8] Sawaya M, Yoshimura T, Shimoyama T, *et al.* Difference of p53AIP1 mRNA expression in gastric mucosa between patients with gastric cancer and chronic gastritis infected with *Helicobacter pylori* [J]. J Clin Gastroenterol, 2008, 42(4):351-355.
- [9] Yamashita SI, Masuda Y, Yoshida N, *et al.* p53AIP1 expression can be a prognostic marker in non-small cell lung cancer [J]. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2008, 20(2): 148-151.
- [10] Matsuda K, Yoshida K, Taya Y, *et al.* p53AIP1 regulates the mitochondrial apoptotic pathway [J]. Cancer Res, 2002, 62(10): 2883-2889.
- [11] Wesierska-Gadek J, Gueorguieva M, Horky M. Roscovitine-induced up-regulation of p53AIP1 protein precedes the onset of apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells [J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4(1): 113-124.
- [12] Lunghi P, Costanzo A, Levrero M, *et al.* Treatment with arsenic trioxide (ATO) and MEK1 inhibitor activates the p73-p53AIP1 apoptotic pathway in leukemia cells [J]. Blood, 2004, 104(2): 519-525.
- [13] Yagi S, Oda-Sato E, Uehara I, *et al.* 5-Aza-2'-deoxycytidine restores proapoptotic function of p53 in cancer cells resistant to p53-induced apoptosis [J]. Cancer Invest, 2008, 26(7): 680-688.
- [14] Xie P, Tian C, An L, *et al.* Histone methyltransferase protein SETD2 interacts with p53 and selectively regulates its downstream genes [J]. Cell Signal, 2008, 20(9):1671-1678.
- [15] Bouska A, Lushnikova T, Plaza S, *et al.* Mdm2 promotes genetic instability and transformation independent of p53 [J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(15): 4862-4874.
- [16] Clegg HV, Itahana K, Zhang Y. Unlocking the Mdm2-p53 loop: ubiquitin is the key [J]. Cell Cycle, 2008, 7(3): 287-292.
- [17] Zhang Z, Zhang R. Proteasome activator PA28 gamma regulates p53 by enhancing its MDM2-mediated degradation [J]. EMBO J, 2008, 27(6): 852-864.
- [18] Chen LH, Hsu CY, Weng CF. Involvement of P53 and Bax/Bad triggering apoptosis in thioacetamide-induced hepatic epithelial cells [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(32):5175-5181.
- [19] Yun J, Chae HD, Choi TS, *et al.* Cdk2-dependent phosphorylation of the NF-Y transcription factor and its involvement in the p53-p21 signaling pathway [J]. J Biol Chem, 2003, 278(38):36966-36972.
- [20] Rocha S, Martin AM, Meek DW, *et al.* p53 represses cyclin D1 transcription through down regulation of Bcl-3 and inducing increased association of the p52 NF-kappaB subunit with histone deacetylase 1 [J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(13): 4713-4727.

[收稿日期] 2008 - 09 - 08

[修回日期] 2008 - 10 - 01

[本文编辑] 王 莹

· 科技动态 ·

TGF β 信号通路的阻断导致乳腺癌细胞募集 Gr-1⁺ CD11b⁺ 髓样免疫抑制细胞促进肿瘤的转移

TGF β 信号通路的异常对于肿瘤的发生发展有着密切的关系。在肿瘤发生早期, TGF β 发挥肿瘤抑制因子的作用, TGF β 通路的失活通常会导致肿瘤的发生。然而随着肿瘤的不断发展, TGF β 的作用开始变得复杂化。Gr-1⁺ CD11b⁺ 髓系来源的髓样细胞又称为髓样免疫抑制细胞(MISCs)或髓系来源的抑制细胞(MDSCs)是近年来免疫学研究的热点之一。在小鼠体内它们同时表达巨噬细胞系的髓样细胞表面标识 CD11b 和粒细胞表面标识 Gr-1, 因此得名。目前研究表明, 该群细胞发挥着免疫抑制作用, 对于肿瘤的免疫逃逸起关键作用。

作者课题组在以往的研究中发现, Gr-1⁺ CD11b⁺ 髓样免疫抑制细胞能够浸润到肿瘤周围, 通过高表达 MMP9 并与肿瘤内皮细胞直接接触, 从而促进肿瘤血管生成。然而, 该群细胞是如何募集到肿瘤周围及其对肿瘤生长发挥何种作用仍不是十分清楚。

在人类乳腺癌细胞中, TGF β 受体往往发生突变导致其介导的信号通路明显减弱。本研究发现敲除 *Tgfb2* 基因的乳腺癌细胞和小鼠 4T1 乳腺癌细胞通过高分泌 CXCL5 和 SDF-1 促进 Gr-1⁺ CD11b⁺ 髓样免疫抑制细胞浸润到肿瘤周围; Gr-1⁺ CD11b⁺ 髓样免疫抑制细胞通过高表达 MMPs 促进肿瘤细胞侵袭和转移, 同时高分泌 TGF β 抑制宿主的抗肿瘤免疫应答。因此, 该研究认为, 在肿瘤治疗中, 通过抑制 Gr-1⁺ CD11b⁺ 髓样免疫抑制细胞的产生或阻断其浸润至肿瘤周围, 不仅有利于促进宿主抗肿瘤免疫应答, 还有利于抑制肿瘤的转移, 可达到“一石二鸟”的作用。

[郑媛媛 摘译, 刘秋燕 审阅. Yang L, Huang J, Ren X, *et al.* Cancer Cell, 2008, 13(1): 23-35.]