

## 实验研究

重组野生型 p53 基因转染人骨肉瘤细胞株体外实验<sup>①</sup>朱全胜<sup>1</sup> 丘钜世<sup>1</sup> 赵国强<sup>1</sup> 王娅兰<sup>2</sup> 梁惠珍<sup>1</sup> 张萌<sup>1</sup>

(1 中山医科大学病理学教研室; 广州, 510089 2 重庆医科大学病理学教研室)

**摘要** 目的: 将外源性野生型 p53 基因导入人骨肉瘤细胞株, 研究野生型 p53 蛋白在诱导瘤细胞凋亡中的作用。方法: 用 DNA 转染技术将 7 重组野生型 p53 基因 PM 47 质粒导入人骨肉瘤细胞株 HOS-8603 中, 用 PCR 技术监测外源性 p53 基因在瘤细胞中存在的稳定性; 用免疫组化方法检测在地塞米松的诱导下瘤细胞中 p53 的表达情况; 用相差显微镜去观察凋亡瘤细胞的形态特点; 用细胞凋亡原位检测技术标记并统计凋亡的瘤细胞数。结果: 成功地将重组野生型 p53 基因 PM 47 质粒导入人骨肉瘤细胞株 HOS-8603 中, 在 gpt 选择培养基中培养两周后, 分离生长出阳性细胞克隆; 经 PCR 证实外源性 p53 基因在瘤细胞内稳定存在并可随瘤细胞分裂而传给子代; 当向培养液中加入  $1 \mu\text{mol/L}$  地塞米松(Dex)后, 8 h 即可用免疫组化方法检测到 p53 蛋白的表达并可观察到瘤细胞出现凋亡的一系列形态学改变, 转染后的瘤细胞凋亡率高达 90%。结论: 当人骨肉瘤细胞株中重组野生型 p53 基因诱导过表达时, 瘤细胞呈现凋亡, 本实验为骨肉瘤的基因治疗提供了理论依据。

主题词 蛋白质 p53; 骨肉瘤; 基因转移; 凋亡

中图分类号 R 738.1

## THE IN VITRO STUDY OF HUMAN OSTEOSARCOMA CELL LINE TRANSFECTED BY RECOMBINANT WILD-TYPE p53 PLASMID

Zhu Quansheng Qiu Jushi Zhao Guoqiang Wang Yalan Liang Huizhen Zhang Meng

(1 Department of Pathology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089  
2 Department of Pathology, Chongqing University of medical sciences)

**Abstract Objective:** Exogenous wild-type p53 gene was transfected into human osteosarcoma cell line to investigate the roles of p53 protein in inducing apoptosis. **Methods:** DNA transfection techniques were used to introduce recombinant wild-type p53 plasmid, PM 47, into human osteosarcoma cell line HOS-8603. PCR was used to monitor the stability of PM 47 in the tumor cells. Under the induction of  $1 \mu\text{mol/L}$  dexamethasone, immunohistochemical method was used to detect the overexpression of exogenous wild-type p53 protein. Morphologic features of apoptotic tumor cells were observed under phase contrast microscope. The apoptotic tumor cells were labelled in situ and counted. **Results:** Exogenous wild-type p53 gene was transfected into human osteosarcoma cell line successfully. After shifting to selective medium for 2 weeks, individual gpt<sup>+</sup> cell colonies were isolated. Exogenous wild-type p53 gene was verified in the osteosarcoma cell line and could be transmitted to daughter cells through polymerase chain reaction amplifying the sixth exon of p53 gene. The overexpression of p53 protein in transfected tumor cells was detected by immunohistochemical method under the induction of dexamethasone for 8 hours and a series of morphological features of apoptosis were observed. Apoptotic rates in transfected tumor cells approximately accounted for 90 percent. **Conclusion:** After inducing overexpression of exogenous wild-type p53 gene in transfected osteosarcoma cell line, the tumor cells demonstrated apoptosis. This provided experimental clues for gene therapy of patients with osteosarcoma.

**Subject headings** protein p53; osteosarcoma; gene transfer; apoptosisp53 基因是一种抑癌基因<sup>①</sup>, 在目前所研究过 的人类恶性肿瘤中, 几乎都存在不同程度的 p53 基

因的缺失、突变或异常表达<sup>[2,3]</sup>, 突变的 p53 可促进细胞的恶性转化<sup>[4]</sup>。p53 基因抑制肿瘤的发生、促进肿瘤消退的机制尚未完全搞清, 但它参与细胞周期的调节(G<sub>1</sub>arrest)和诱导细胞凋亡却引起人们的兴趣, 预计在未来肿瘤基因治疗领域中将发挥巨大的作用<sup>[5]</sup>。我们试图将重组野生型 p53 基因导入体外培养的人骨肉瘤细胞株中, 并希望在地塞米松(dexamethasone Dex)诱导下, p53 蛋白能够在瘤细胞内表达, 为进一步研究野生型 p53 基因抑制瘤细胞生长和诱导瘤细胞凋亡的机制乃至骨肉瘤的基因治疗提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 PM 47 质粒转化大肠杆菌

1.1.1 PM 47 质粒 DNA 的来源 PM 47 质粒由我教研室旅美学者刘子君教授馈赠, 全长 9.4 kb, 含有 1802 bp 长的野生型 p53 基因 cDNA 片段、Dex 诱导启动的 MMTV (mouse mammary tumor virus) 启动子、氨苄青霉素抗性基因和生化选择标志 *E. coli* gpt (xanthineguanine phosphoribosyltransferase) 基因, 它是由野生型 p53 基因的全 cDNA 的 *Xba* I 酶切片段重组到 pMSG 质粒(7626 bp) 的 *Nhe*I 酶切缺口处构建而成。

#### 1.1.2 PM 47 质粒 DNA 转化大肠杆菌 HB101

按 Hanahan<sup>[6]</sup> 等的方法进行, 转化后取一环接种在含 100 ng/L 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上。

1.1.3 PM 47 质粒的扩增和酶切分析 采用 Birnboim<sup>[7]</sup> 的方法提取 PM 47 质粒 DNA, 各取 2 μg 分别用 *Hind* III 和 *Bam* H I 酶切, 1% 琼脂糖凝胶中电泳, EB 染色, 紫外检测仪观察拍照。

1.1.4 PM 47 质粒 DNA 的纯化 自装 1 Sephadex G50 层析柱, 高 300 mm, 直径 8 mm, 将 500 μL 样本上柱, 用 0.1 mol/L TE 溶液(pH 7.4) 洗脱, 用 1.5 mL 离心管收集洗脱液, 前 3 管丢弃, 再收集 20 管, 紫外线分光光度计测浓度, 作图, 电泳检测, 收集合并含闭环 PM 47 质粒 DNA 的管, 沉淀灭菌备用。

### 1.2 PM 47 质粒 DNA 转染人骨肉瘤细胞株

1.2.1 受体细胞 人骨肉瘤细胞株 HOS-8603 从上海第二军医大学病理学教研室引进, 于含 20% 小牛血清的 RPMI 1640 的培养液中, 5% 的 CO<sub>2</sub>, 37 °C 贴壁培养。

#### 1.2.2 PM 47 质粒 DNA 转染人骨肉瘤细胞株

按 DOTAP DNA 转染试剂盒(购自德国 Boehringer Mannheim)说明书操作, 即用 5 μg PM 47 DNA 转染大约 10<sup>6</sup> 个 HOS-8603 细胞, 以 PBR322 质粒 DNA 作阴性对照, 未加试剂作空白对照, 6 h 后换选择培养基(每毫升培养液含 15 μg 次黄嘌呤, 10 μg 胸腺嘧啶, 250 μg 黄嘌呤, 25 μg mycophenolic acid, 2 μg 氨基嘌呤, 购自 Sigma), 3 d 换 1 次选择培养基, 2 周后挑选生长出的阳性细胞克隆。

### 1.3 重组野生型 p53 基因第 6 外显子的 PCR 扩增

根据 p53 基因第 6 外显子两端碱基序列设计 1 对引物(本室王连唐副教授提供), 其序列为: 5'-GATTGCTCTTAGGTCTGGCC-3', 5'-GCAAAC CAGACCTCAGGCGG-3', 常规抽提 PM 47 质粒 DNA、骨肉瘤细胞株 HOS-8603 DNA 和转染后的骨肉瘤细胞 HOS-8603-P DNA, 并同时进行 p53 基因第 6 外显子 PCR 扩增, 产物在聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 银染观察结果。

### 1.4 重组野生型 p53 基因的诱导表达及凋亡细胞原位检测

在转染前后的骨肉瘤细胞生长的高峰期, 向培养液中加入 Dex (Sigma), 终浓度 1 μmol/L, 8 h 后用免疫组化方法检测瘤细胞中 p53 蛋白的表达; 第 8、16、24、48 h 时, 用相差显微镜观察转染前后的瘤细胞形态学; 对凋亡的瘤细胞进行原位标记检测 (TUNEL 试剂盒, 购自德国 Boehringer Mannheim), 每个样本随机选择 10 个区域, 每区统计 100 个细胞中凋亡细胞数, 计算平均值, 用 *t* 检验分析, 并用电镜对凋亡细胞做进一步观察。

## 2 结果

### 2.1 PM 47 质粒对大肠杆菌 HB101 的转化

将 PM 47 质粒转化后的大肠杆菌 HB101 接种到含氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, 12 h 可观察到阳性生长菌落, 而未用 PM 47 转化的大肠杆菌不能长出菌落来。PM 47 质粒经 *Hind* III 切割后出现 1 条 5.2 kb 的片段和 1 条 4.2 kb 的片段, 经 *Bam*H I 切割后出现 1 条 7.2 kb 的片段和 1 条 2.2 kb 的片段, 与 PM 47 的物理图谱一致, 证实转化大肠杆菌成功。

### 2.2 PM 47 质粒 DNA 的纯化

粗提取的 PM 47 质粒 DNA 经 Sephadex G-

50 柱层析后,收集液经紫外分光光度计测定浓度作图(图略),得到3个峰,经电泳检测,第1个峰为闭合环状的质粒DNA,第2个峰为开环质粒DNA和少量大肠杆菌染色体DNA,第3个峰为RNA。收集合并第1峰的析出液,沉淀灭菌备用。

2.3 PM 47 质粒 DNA 转染人骨肉瘤细胞株

用 PM 47 质粒 DNA 转染人骨肉瘤细胞株,转染2周后有一些细胞克隆存活下来,(见图1)挑选存活下来的阳性瘤细胞克隆,命名为 HOS-8603-P,换常规培养液培养。转染 PBR 322 质粒 DNA 和未转染的骨肉瘤细胞株在选择培养基中大约1周后全部死亡。

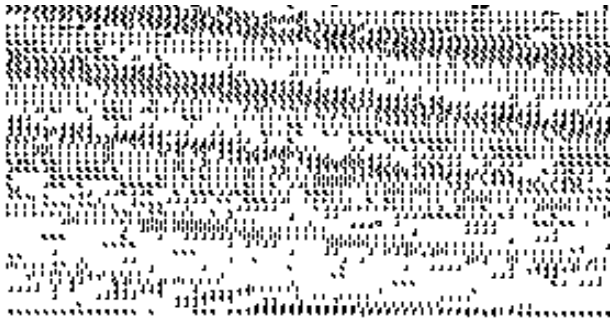


图1 在选择培养基中生长的阳性瘤细胞克隆 相差×40  
Fig. 1 Tumor cell Colonies growing in selective medium contrast microscope×40

2.3 重组野生型 p53 基因第 6 外显子 PCR 检测结果

p53 基因第 6 外显子的 PCR 扩增结果发现,在 PM 47 质粒 DNA 转染后的第 2 代和第 6 代骨肉瘤细胞 DNA 标本中均能扩增出 1 条 136 bp 的 DNA 片段,而未转染的骨肉瘤细胞未能扩增到这一条带(见图2)。

2.4 重组野生型 p53 基因的诱导表达

向培养液中加入 Dex 8 h,用免疫组化法在转染后的瘤细胞检测到 p53 蛋白的过表达,见瘤细胞胞浆和胞核内均出现较强的阳性颗粒(见图3),而未转染的骨肉瘤细胞胞浆和胞核内未见到阳性颗粒。第 8、16、24、48 h,在相差显微镜下观察,见瘤细胞脱壁,胞浆皱缩,核固缩变圆,甚至染色质浓缩聚集于核膜下(见图4)。此时用细胞凋亡原位检测法检测,在荧光显微镜下见高达 90%瘤细胞核内发出绿色荧光(见图5),统计结果见表1。此时用电镜观察进一步证实瘤细胞核出现典型凋亡形态学特征(有关瘤细胞凋亡的一系列改变另文详细报道)。



图2 p53 基因第 6 外显子的 PCR 扩增产物  
Fig. 2 PCR products of exon 6 of p53 gene

A: PGEM-7 zf(+)*Hae* III Marker; B: DNA example of PM 47; C: DNA example of pretransfected osteosarcoma cell line; D: DNA example of 2nd generation of transfected osteosarcoma cell line; E: DNA example of 6th generation of transfected osteosarcoma cell line

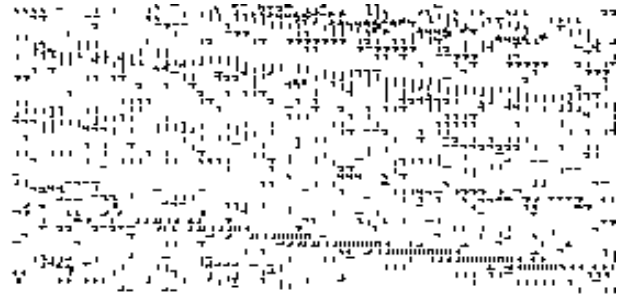


图3 转染后瘤细胞内 p53 蛋白的表达 LSAB×200  
Fig. 3 Expression of p53 protein in transfected tumor cells LSAB×200

表1 凋亡细胞原位检测法检测转染前后瘤细胞凋亡率  
Table 1 Apoptotic rates of pretransfected and transfected tumor cells detected by in situ cell death detection method ( $\bar{x} \pm s$ )

Time (h)	Apoptotic rates of tumor cells(%)	
	HOS-8603	HOS-8603-P
0	2.12±1.43	12.36±2.47
8	2.80±1.32	71.90±7.75
16	7.50±2.12	89.80±2.57
24	5.30±1.89	90.20±2.78
48	6.30±1.49	82.30±5.29

0 h means no Dex added to medium, there are predominant differences between two groups by *t* test,  $P < 0.01$



图4 凋亡的骨肉瘤细胞 相差 $\times 100$

Fig. 4 Apoptotic osteosarcoma cells contrast microscope $\times 100$

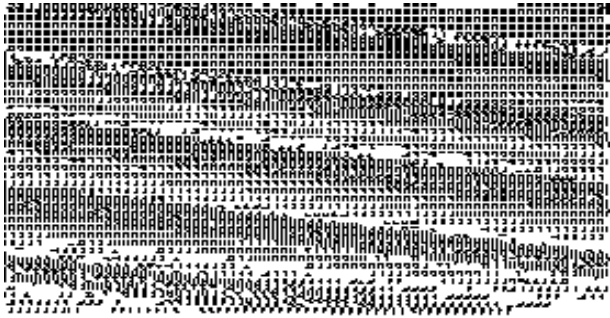


图5 凋亡瘤细胞原位检测 TUNEL $\times 100$

Fig. 5 Apoptotic tumor cells detected by in situ cell death detection method TUNEL $\times 100$

### 3 讨论

本实验采用 PM 47 质粒转化大肠杆菌是因为我们得到的 PM 47 质粒 DNA 的量少, 目的方面是扩增出大量完整 PM 47 质粒 DNA 用于转染人骨肉瘤细胞株, 另一方面也是为了能源源不断的获取 PM 47 质粒 DNA 用于未来的研究。用外源性 DNA 转染哺乳动物细胞尤其是人体细胞转染的阳性率较低, 转染后要有一套合适的筛选措施。有些学者是将目的基因和选择标志基因, 如 pCMV-neo 基因共转染入细胞中, 然后在 G418 选择培养基中筛选阳性克隆, 尽管也获得成功<sup>[8]</sup>, 但因 2 种基因载体彼此分离, 很难排除生长克隆中不存在目的基因的可能性。

Mulligen 等<sup>[9]</sup>设计了一种选择培养基作为哺乳动物细胞外源性基因转染后的筛选工具, 由于哺乳动物细胞在该培养基中核酸的合成受到抑制, 因而不能在该选择培养基中生长。PM 47 质粒除载

有野生型 p53 基因、启动子和抗生素抗性基因外, 还载有生化选择标志 *Eco gpt* (大肠杆菌黄嘌呤磷酸核糖转移酶) 基因。如果哺乳动物细胞中导入了 *Eco gpt* 基因, 就能直接利用选择培养基中的黄嘌呤合成黄嘌呤核苷酸, 进而在 GMP 合成酶的作用下合成鸟嘌呤核苷酸, 从而在选择培养基中存活下来。Mercer 等<sup>[10]</sup>成功地用磷酸钙沉淀法将 PM 47 质粒转染到人神经胶质母细胞瘤细胞株中, 经过 Dex 的诱导, p53 蛋白表达后, 瘤细胞出现典型的凋亡。有关 PM 47 转染人骨肉瘤细胞株的实验, 国内外尚未见报道。

本实验采用 DOTAP 转染试剂盒, 将 PM 47 成功地转染到人骨肉瘤细胞株中去, 转染效率高, 方法简单稳定, 重复性好。实验用的受体细胞是有 p53 基因缺陷的人骨肉瘤细胞株, 外源性 p53 基因导入瘤细胞后, 经 PCR 技术证实, PM 47 质粒随着细胞的分裂而传给子代, 在细胞内较稳定存在。当培养液中加入 Dex 后, 能诱导 p53 蛋白的过表达。在 p53 蛋白的作用下, 骨肉瘤细胞出现一系列凋亡的形态学改变。细胞凋亡时在核酸酶的作用下, 染色质裂解成大约相差 180 bp DNA 阶梯。细胞凋亡原位检测试剂盒中含有末端核苷酸转移酶和荧光素标记的核苷酸, 在前者的作用下, 荧光素标记的核苷酸连接到断裂的 DNA 3' 末端, 但该方法不能区分凋亡与死亡, 故尚需从其他方面对凋亡进行研究。通过该方法的检测发现, 过表达的 p53 蛋白诱导人骨肉瘤细胞凋亡在 16~24 h 达到高峰, 凋亡率可达 90% 左右, 第 48 h 时凋亡率低是由于此时凋亡的瘤细胞脱落影响了结果的统计。我们的实验进一步证实, 野生型 p53 基因在诱导瘤细胞凋亡方面发挥着重要作用。本实验也为临床骨肉瘤的基因治疗提供了体外实验依据。

(本实验采用的 PM 47 质粒由我室旅美学者刘子君教授馈赠, 在此表示衷心的感谢)

### 参 考 文 献

- 1 Philip H S. The role of p53 in cell cycle regulation. *Path Res Pract* 1996, 192(7): 669
- 2 Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, *et al*. p53 mutations in human cancers. *Sciences* 1991, 253(1): 49
- 3 Nigro J M, Baker S J, Presinger A C, *et al*. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature*, 1989, 342(7): 705

- 4 Slingerland J M, Benchimol S. Transforming activity of mutant p53 alleles. *J Cell Physiol*, 1991, 148(2): 391
- 5 Harris C C. Structure and function of p53 tumor suppressor gene: Clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst*, 1996, 88(20): 1442
- 6 Hanahan D. Studies on transformation of E. Coli with plasmids. *J Mol Biol*, 1983, 166(2): 557
- 7 Birnboim H C, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res*, 1979, 7(4): 1513
- 8 郭洪涛, 刘彤华, 高洁. 人胰腺癌中 MDM<sub>2</sub> 癌基因的表达和对野生型 p53 的拮抗作用. *中华病理学杂志*, 1996, 25(4): 232
- 9 Mulligen R C, Berg P. Selection for animal cells that express the Escherichia Coli gene coding for xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(4): 2072
- 10 Mercer W E, Shields M T, Amin M, *et al*. Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(16): 6166

(1997-09-22 收稿 1998-03-26 修回)

## · 简 讯 ·

### 李艳艳进军难治性眼病

——眼科中心第一位博士后出站

日前,以陈家祺、徐锦堂、吴中耀、姚志彬、唐仕波等教授组成的评议专家组通过了眼科中心第一位博士后李艳艳的研究工作报告,李博士已顺利出站。

李艳艳博士朝着进军难治性眼病方向努力,在站2年时间,先后获得国家自然科学基金、国家自然科学基金面上项目青年基金、中国博士后基金、广东省博士后基金资助,在葛坚教授指导下,进行了“眼组织转基因的实验研究”。该项研究使眼科一些难治性眼病的治疗出现了曙光。

李博士研究工作分3部分:第1部分开展了眼组织培养细胞的转基因研究,通过实验观察到体外培养的眼组织细胞能被标记基因转染,因此,如果将某些在眼组织疾病中相关的目的基因,经适合的载体转入相应的靶细胞中,研究靶细胞的生物学特性的变化及合成、分泌蛋白质的改变,将从分子水平揭示该基因的作用及在某些疾病中的作用机理,为从分子水平阻断某些疾病的发生、发展,寻找新的治疗方法提供理论依据。

第2部分,为了探讨外周神经移植治疗视神经病变的可能性及影响因素,李博士开展了“外周神经及转基因细胞移植治疗视神经病变的实验研究”。通过研究揭示了受损的神经在外周神经的环境中能够再生,转神经生长因子的基因治疗能够促进再生的神经存活,为视神经再生的研究提供新的思路,为青光眼等视神经病变提供可能的治疗途径。

第3部分,李博士为了探讨与新生血管形成有关的眼组织疾病的新的治疗方法,开展了“血管内皮细胞生长因子在视网膜新生血管形成中的作用及治疗的实验研究”。通过实验观察表明,在视网膜新生血管形成的过程中,血管内皮细胞生长因子虽然是主要形成新生血管的生长因子,但并不是唯一起作用的细胞因子。提示我们应从多种途径研究与新生血管形成有关的因素或细胞因子,从而阻断其作用,抑制新生血管的形成,降低与眼底新生血管形成有关的,目前世界上第一位致盲原因的眼疾,如新生儿视网膜病变、视网膜静脉阻塞、老年性黄斑变性等的致盲率。

评议专家们认为,李艳艳博士的研究工作很有意义,尤其视神经治疗学方面进行了前沿性探索,为防治难治性眼病提供了新的思路和理论依据,属国内领先水平。

(冯世容)