

# 重组腺病毒 p53 影响口腔黏膜异常增生细胞生长的分子机制

张松涛<sup>1</sup>, 张媛媛<sup>2</sup>, 张 壮<sup>3</sup>, 李小玉<sup>3</sup>, 李龙江<sup>3</sup>

(1.河南省肿瘤医院,河南 郑州 450008;2.郑州大学口腔医院,河南 郑州 450052;

3.四川大学口腔疾病研究国家重点实验室,四川 成都 610041)

**摘要:** [目的] 探讨重组腺病毒 p53 (rAd-p53) 影响口腔黏膜异常增生细胞 (POE-9n) 生长、诱导凋亡的分子机制。 [方法] 利用 RT-PCR 及 Western blot 技术检测 rAd-p53 转染 POE-9n 细胞后 p53、p21<sup>CIPWAF</sup> 及 bcl-2 mRNA 和蛋白的表达变化。 [结果] POE-9n 细胞经 rAd-p53 转染后, p53、p21<sup>CIPWAF</sup> 和 bcl-2 mRNA 和蛋白水平的表达均出现明显变化。转染 24h 后, p53、p21<sup>CIPWAF</sup> mRNA 及蛋白表达显著增高 ( $P < 0.01$ ), 而 bcl-2 则在转染 72h 后表达明显降低 ( $P < 0.01$ )。 [结论] rAd-p53 转染 POE-9n 细胞后, 外源性 p53 的导入使 p21<sup>CIPWAF</sup> 激活, 并抑制 bcl-2 的表达, 从而诱导细胞凋亡。

**关键词:** 腺病毒; 癌前病变; 基因治疗; p53; p21<sup>CIPWAF</sup>; bcl-2

**中图分类号:** R73-36 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2013)03-0229-03

## The Molecular Mechanism of Recombinant Adenovirus-p53 on the Growth of Oral Dysplastic Keratinocyte POE-9n

ZHANG Song-tao<sup>1</sup>, ZHANG Yuan-yuan<sup>2</sup>, ZHANG Zhuang<sup>3</sup>, et al.

(1. Henan Province Tumor Hospital, Zhengzhou 450008, China; 2. College of Stomatology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 3. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** [Purpose] To observe the molecular mechanism of recombinant adenovirus-p53 on the growth of POE-9n cells. [Methods] RT-PCR and Western blot were performed to evaluate the p53, p21<sup>CIPWAF</sup> and bcl-2 both in mRNA and protein level. [Results] The changes of p53, p21<sup>CIPWAF</sup> and bcl-2 expression levels were detected by RT-PCR and Western blot. After rAd-p53 infection for 24h, the expressions of p53 and p21<sup>CIPWAF</sup> increased both in mRNA and protein level ( $P < 0.01$ ), but the expression of bcl-2 decreased after infection for 72h ( $P < 0.01$ ). [Conclusion] rAd-p53 can strongly induce apoptosis in POE-9n cells by up-regulating p21<sup>CIPWAF</sup> and down-regulating bcl-2.

**Key words:** adenovirus; pre-cancer lesion; gene therapy; p53; p21<sup>CIPWAF</sup>; bcl-2

伴有上皮异常增生的口腔白斑 (oral leukoplakia, OLK) 是公认最常见的导致口腔鳞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 的癌前病变<sup>[1]</sup>, 且与 OSCC 有着相似的发病机制。研究证实, 在 OSCC 发展的各个阶段, 均可有不同程度的 p53 表达异常, 而伴有 p53 表达异常的 OLK 也更容易发生恶性转化<sup>[2]</sup>。近年来, 利用重组腺病毒 p53 制剂 (recombinant adenovirus-p53, rAd-p53) 的基因治疗已成为近年来肿瘤治疗研究的热点<sup>[3]</sup>。本课题组的前期研究已经证

实 rAd-p53 能成功转染至口腔黏膜异常增生细胞 (POE-9n), 并明显抑制细胞的增殖, 调节细胞周期, 诱导细胞产生凋亡<sup>[4,5]</sup>。为了进一步探究 rAd-p53 影响 POE-9n 细胞生长的分子机制, 本研究检测了 p53 通路的关键分子 (p21<sup>CIPWAF</sup>、bcl-2) 表达情况, 为 OLK 的 p53 基因治疗提供理论基础和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试验器材和试剂

口腔黏膜异常增生的角化细胞株 POE-9n 购自美

收稿日期: 2012-12-05; 修回日期: 2013-01-15

通讯作者: 李龙江, E-mail: zhst143@126.com

国哈佛大学医学研究所,由重度异常增生型OLK 损伤细胞建系,为 p53 表达缺失型细胞株。rAd-p53 注射液(深圳赛百诺公司产品),规格为每支  $1 \times 10^{12}$  vp,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存;检测主要仪器(试剂)包括:Trizol(Life Technology)、PCR 反应仪(T Personal Biometall)、凝胶扫描及图像分析系统(Bio-rad)、蛋白垂直电泳仪(Bio-rad)。

### 1.2 RT-PCR 检测

用 Trizol 分别提取正常培养的 POE-9n 细胞(空白对照组)和经 rAd-p53 转染后 24h 及 72h 的 POE-9n 细胞的总 RNA,cDNA 合成采用 Oligd T 引物法,以  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)作为内参对照。PCR 引物由上海生工公司合成(Table 1)。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,然后在凝胶成像仪上记录目的条带的灰度值并分析结果。

Table 1 Primer sequence of wt-p53, p21<sup>CIP/WAF</sup>, bcl-2 and  $\beta$ -actin

Gene	Amplified fragment length	Primer sequence
p53	620bp	Upstream:5'-TACTCCCCTGCCCTCAACAAGA-3' Downstream:5'-CTTAGCACCTGAAGGGTGAATATTC-3'
p21 <sup>CIP/WAF</sup>	495bp	Upstream:5'-TTAGGGCTTCCTCTTGGAGAAGAT-3' Downstream:5'-ATGTCAGAACC GGCTGGGGATGTC-3'
bcl-2	318bp	Upstream:5'-CGACGACTTCTCCCGCCGCTACCGC-3' Downstream:5'-CCGCATGCTGGGGCCGTACAGTTCC-3'
$\beta$ -actin	548bp	Upstream:5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' Downstream:5'-CTCCTTAATGTACGCACGATTC-3'

### 1.3 Western blot 检测

将 rAd-p53 按 MOI=100 转染 POE-9n 细胞,收集 24h 及 72h 的悬浮及贴壁细胞,使用 RIPA 裂解液裂解细胞,提取总蛋白,用 Western blot 的方法分别检测 rAd-p53 转染后 p53、p21<sup>CIP/WAF</sup> 及 bcl-2 蛋白的表达,以正常培养的 POE-9n 细胞作为空白对照,以  $\beta$ -actin 作为内参对照。

### 1.4 统计学处理

实验数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,所得数据均采用 SPSS13.0 软件包进行统计分析。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

在本研究中,分别通过半定量 RT-PCR 方法和 Western blot 检测了 rAd-p53 转染 POE-9n 细胞后不同时间 p53、p21<sup>CIP/WAF</sup> 及 bcl-2 mRNA 及蛋白的表达

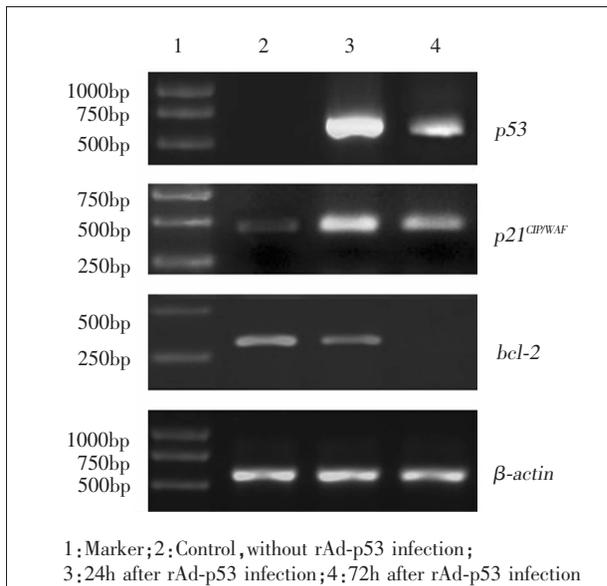
变化(Figure 1、Figure 2)。结果显示,mRNA 及蛋白二者结果基本一致。在转染前的对照组 p53 mRNA 及蛋白均无表达,而在 rAd-p53 转染 24h 后 p53 mRNA 及蛋白表达迅速增加 ( $3.17\pm 0.69, 2.09\pm 0.81$ ), 72h 后 p53 mRNA 表达降低 ( $1.29\pm 0.25$ ), 而 p53 蛋白持续增高 ( $5.08\pm 1.01$ )。与 p53 相似,p21<sup>CIP/WAF</sup> mRNA 在 rAd-p53 转染 24h、72h 后表达增高 ( $1.54\pm 0.71, 0.88\pm 0.24$ ),与对照组 ( $0.14\pm 0.62$ ) 比较差异均有统计学意义 ( $P<0.01$ );相应的 p21<sup>CIP/WAF</sup> 蛋白在 rAd-p53 转染 24h、72h 后表达明显升高 ( $3.75\pm 2.31, 1.32\pm 0.51$ ),与对照组 ( $0.81\pm 0.39$ ) 比较差异均有统计学意义 ( $P<0.01$ )。而 bcl-2 mRNA 则在 rAd-p53 转染 24h、72h 后表达下调 ( $0.21\pm 0.52, 0.01\pm 0.36$ ),与对照组 ( $0.48\pm 0.49$ ) 比较差异均有统计学意义 ( $P<0.01$ );bcl-2 蛋白在 rAd-p53 转染 24h、72h 后表达也明显下降 ( $0.72\pm 0.60, 0.24\pm 0.18$ ),与对照组 ( $1.92\pm 1.10$ ) 比较差异均有统计学意义 ( $P<0.01$ )。

## 3 讨论

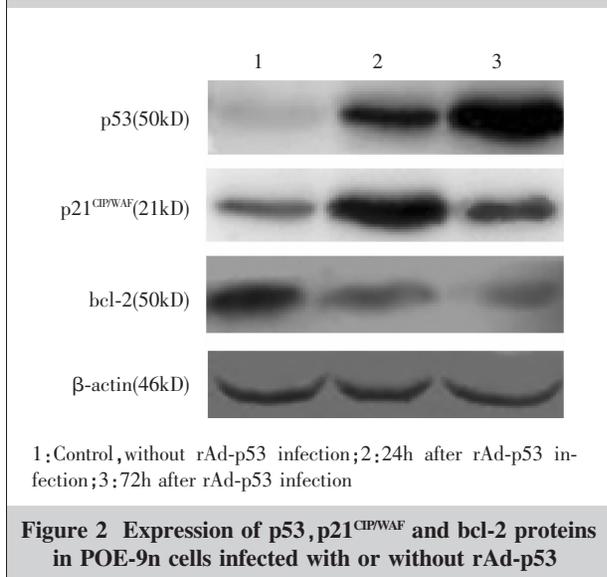
p53 是目前研究最为广泛和系统的抑癌基因之一。自从该基因在 1979 年被首次报道以来,人们对其结构和功能展开了广泛的研究。研究发现,p53 基因参与了 DNA 损伤修复、细胞周期调控、细胞凋亡及抑制血管生成等过程。其介导的信号转导通路非常复杂,参与其调控的基因已超过 160 种,这些基因形成复杂的网络进而调节细胞的生命活动<sup>[6]</sup>。在课题组前期研究证实 rAd-p53 能抑制 POE-9n 细胞增殖、调节细胞周期、诱导细胞产生凋亡的基础上,本研究进一步检测了 p53 通路的关键分子(p21<sup>CIP/WAF</sup>、bcl-2)表达情况,从而初步探讨了 rAd-p53 对 POE-9n 细胞发生作用的相关分子生物学机制。

p21<sup>CIP/WAF</sup> 基因是近年来被发现的哺乳动物中第一个细胞周期蛋白依赖激酶抑制因子。它几乎能和所有的细胞周期素—周期素依赖激酶复合物结合,引起细胞周期停滞于 G<sub>1</sub> 期<sup>[7]</sup>。作为 p53 基因最主要的调节细胞周期下游分子,p21<sup>CIP/WAF</sup> 基因上游 2.4Kb 处有野生型 p53 基因的结合位点,p53 可以在转录水平上调 p21<sup>CIP/WAF</sup> 的表达,而突变型 p53 无此功

能上调 p21<sup>CIP/WAF</sup> 的表达,而突变型 p53 无此功能。



**Figure 1 Expression of *p53*, *p21<sup>CIPWAF</sup>* and *bcl-2* mRNA in POE-9n cells infected with or without rAd-p53**



**Figure 2 Expression of *p53*, *p21<sup>CIPWAF</sup>* and *bcl-2* proteins in POE-9n cells infected with or without rAd-p53**

能<sup>[8]</sup>。在本研究中,POE-9n 细胞为 *p53* 基因缺失细胞,*p21<sup>CIPWAF</sup>* 处于未激活状态,因此其基础 mRNA 很低。而当 rAd-p53 将外源性 *p53* 转入 POE-9n 细胞后,*p21<sup>CIPWAF</sup>* 被激活,其在 mRNA 水平和蛋白水平的表达均显著提高,并与 *p53* 的表达呈现出一致性。提示外源性的 *p53* 通过激活 *p21<sup>CIPWAF</sup>*, 上调后者的表达,进而调节细胞周期。

在 *p53* 依赖型的细胞凋亡网络中主要包括内源性通路和外源性通路。在外源性通路中,*p53* 可以诱导肿瘤坏死因子受体家族中的死亡受体形成死亡诱导信号复合体,进而导致 caspase 家族的级联活化,

从而诱导凋亡的发生<sup>[9]</sup>。在内源性凋亡通路中,*p53* 基因可以通过激活 *bcl-2* 家族中的 *Bax*、*BH3*、*bid* 等促凋亡分子或抑制 *bcl-2*、*bcl-xl*、*survivin* 等抗凋亡分子对细胞凋亡过程进行严密的控制。本研究选取对抗凋亡分子 *bcl-2* 的检测来初步探讨 rAd-p53 诱导 POE-9n 细胞凋亡的分子机制。本研究发现,正常的 POE-9n 细胞中存在 *bcl-2* 较高水平的表达(mRNA、蛋白),而在 rAd-p53 转染 72h 后的 POE-9n 细胞中表达显著降低,提示外源性的 *p53* 抑制了 *bcl-2* 的表达,从而诱导了凋亡的发生。

由于在 *p53* 的调节网络中存在众多反馈环、转录后修饰、蛋白间的相互作用以及组织差异等原因,rAd-p53 作用复杂分子机制仅仅依靠检测几个效应分子的表达变化是远远不够的。以本研究为依托,进一步利用基因芯片或蛋白组学等高信息通量的技术对 rAd-p53 转染前后细胞内各种分子变化进行广泛深入的研究,才能全面了解其确切的作用机制。

## 参考文献:

- [1] Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics[J]. Crit Rev Oral Biol Med, 2003, 14(1): 47-62.
- [2] Vora HH, Trivedi TI, Shukla SN, et al. p53 expression in leukoplakia and carcinoma of the tongue[J]. Int J Biol Markers, 2006, 21(2):74-80.
- [3] Chang EH, Pirollo KF, Bouker KB, et al. p53 gene therapy: a key to modulating resistance to anticancer therapies?[J]. Mol Med Today, 2000, 6(9):358-364.
- [4] Xu B, Zhang ST, Li LJ, et al. An experimental study on recombinant adenovirus p53 in oral dysplastic epithelial cells[J]. West China Journal of Stomatology, 2009, 27(2): 122-125.[徐波,张松涛,李龙江,等.重组腺病毒 p53 转染口腔黏膜异常增生细胞的实验研究[J].华西口腔医学杂志,2009,27(2):122-125.]
- [5] Zhang ST, Zhang YY, Zhang Z, et al. Effect of recombinant adenovirus-p53 influence on the growth of oral dysplastic keratinocyte POE-9n[J]. Chinese Journal of Practical Medicine, 2012, 39(19):7-10.[张松涛,张媛媛,张壮,等.重组腺病毒 p53 对口腔黏膜异常增生细胞生长的影响[J].中国实用医刊,2012,39(19):7-10.]
- [6] Nemunaitis J, Swisher SG, Timmons T, et al. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in sequence with cisplatin to tumors of patients with non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2000, 18(3): 609-622.
- [7] Mitrea DM, Yoon MK, Ou L, et al. Disorder-function relationships for the cell cycle regulatory proteins p21 and p27[J]. Biol Chem, 2012, 393(4):259-274.
- [8] Jafarnejad SM, Li G. Regulation of p53 by ING family members in suppression of tumor initiation and progression[J]. Cancer Metastasis Rev, 2012, 31(1-2):55-73.
- [9] Reinhardt HC, Schumacher B. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer[J]. Trends Genet, 2012, 28(3):128-136.