文章编号:1000-5404(2006)08-0785-03

论著

# 野生型 INK4a 基因转染对肺腺癌 A549 细胞放疗敏感性的调控

陈忠华　（南京军区福州总院肿瘤科,福州 350025）

**提　要: 目的**　研究野生型 INK4a 基因转染对人肺腺癌 A549 细胞放疗敏感性的调控。**方法**　利用阳离子脂质体介导的基因转染技术,将含有人全长野生型 INK4a cDNA 的真核表达重组质粒 pcDNA3.1-p16 导入该基因位点缺失的人肺腺癌 A549 细胞系中,确定其编码蛋白 p16 稳定表达;在设立空白组和空质粒转染组的情况下,检测分析放射线对 A549 细胞的克隆形成率和杀伤效率的影响。**结果**　转染 INK4a 基因后的细胞与未转染及空质粒转染的细胞相比:肿瘤细胞 S 期和 $G_2$/M 期的比例下降,$G_0/G_1$ 期的比例增加,生长减慢,凋亡指数增加,放射线处理后克隆形成率减少,50% 抑制剂量($ID_{50}$)略有降低。**结论**　INK4a 基因转染增强了肺腺癌 A549 细胞对放射线的敏感性,为将来肺癌患者基因治疗提供了一定的实验依据。

**关键词**: 非小细胞肺癌;INK4a 基因;转染;放疗敏感性;细胞周期
**中图法分类号**: R73-36;R734.2;R730.55　　**文献标识码**: A

# Effects of wild-type INK4a gene on radiosensitivity of lung adenocarcinoma cell line A549

CHEN Zhong-hua (Department of Oncology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command Area, Fuzhou 350025, China)

**Abstract**: **Objective**　To assess the effects of transfection of plasmid pcDNA3.1-p16 containing the wild-type(wt) INK4a gene on the radiotherapy sensitivity of human lung adenocarcinoma cell line A549. **Methods**　Using cationic liposome, the recombinant eukaryotic expression vectors pcDNA3.1-p16 were introduced into A549 cell line and named as A549-p16, in which the gene site INK4a was lost. By RT-PCR, immunocytochemistry and Western blotting after G418 selection, A549 cells stably expressing p16 were obtained. The parental cell and negative control cell with plasmid pcDNA3-LacZ were used as controls. The colony formation rate and 50% inhibition dose($ID_{50}$) were measured and analyzed after radiation. **Results**　As compared with the parental cell and negative control cell, re-expression of p16 in A549 induced the cell arrest at $G_0/G_1$. The growth rate and the colony formation rate decreased and the $ID_{50}$ decreased slightly in A549-p16. **Conclusion**　The exogenous introduction of wtINK4a gene into lung adenocarcinoma cells A549 increased the radiosensitivity.

**Key words**: non-small lung carcinoma; INK4a gene; transfection; radiotherapy sensitivity; cell cycle

蛋白质 p16 是 1994 年以后发现的肿瘤抑制因子,由人类染色体 9p21 上基因位点 INK4a 所编码,并在细胞周期调控通路"p16-CDK4 - cyclin D - Rb - E2F"中发挥着重要的作用,是近年来研究的热点。本研究试图通过脂质体转染,恢复蛋白质 p16 在基因位点 INK4a 缺失的非小细胞肺癌细胞系 A549 中的表达,研究对该细胞生物学行为的影响以及对细胞放疗敏感性的调控规律。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料

1.1.1　细胞系　　人肺腺癌细胞系 A549 由中科院上海生物细胞研究所提供。

1.1.2　质粒　　真核表达重组质粒 pcDNA3-p16 由美国 Frank Furnari 教授馈赠,空白对照质粒 pcDNA3-LacZ 由我室保存。

1.1.3　药物及试剂　　G418(geneticin)及阳离子脂质体(DOPAT)购于 ROCHE 公司,p16 单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗均购自武汉博士德生物技术公司,四氮甲基唑蓝(MMT)为 Sigma 产品,二甲基亚砜(DMSO)为 GBICO 产品。

### 1.2　方法

1.2.1　细胞培养　　人肺腺癌细胞株(A549)常规培养于 RPMI1640 完全培养液中(含 10% 胎牛血清,青霉素 100 μg/ml,链霉素 100 μg/ml),经 0.25% 胰蛋白酶溶液消化传代,抗药性克隆筛选、扩大培养、细胞生长曲线测定、MTT 实验、集落形成实验均在 37 ℃饱和湿度含 5% $CO_2$ 的培养箱中进行。

1.2.2　阳离子脂质体介导的转染方法　　即 6 孔板中每孔接种 $1\times10^5$ 个 A549 细胞,培养 24 h。备 A、B 两个 Eppendorf 管,A 管加入质粒 pcDNA3.1-p16 3 μg 后稀释至 25 μl,B 管加入脂质体 15 μl,用含血清的 RPMI1640 培养液稀释至 50 μl 混匀,室温(15 ~ 25 ℃)放置 15 min;将 A、B 两液混合并加入 2.5 ml 完全培养基轻轻混匀,室温放置 15 min;将待转染细胞用 PBS 液

作者简介:陈忠华(1970 - ),男,福建省长乐市人,主治医师,讲师,主要从事恶性肿瘤的放射治疗方面的研究。电话:(0591)22859444

收稿日期:2005-04-25;修回日期:2005-09-10

洗3次，然后加入上述混合液，静置培养6 h，然后换用新鲜的完全培养基继续培养48 h；再用含500 μg/ml G418的选择培养基，每2～3天更换1次培养液，待未转染质粒的A549细胞完全死亡后将G418降至300 μg/ml的维持浓度；扩增培养后利用96孔板作单克隆培养，再次扩增培养后利用免疫组化及RT-PCR筛选表达p16的细胞作为阳性克隆。空白对照质粒pcDNA3-LacZ的转染方法同上。

1.2.3 质粒及转染的鉴定 质粒得到后由上海博奥公司完成插入片段的测序，结果与基因库比对，转染筛选后应用RT-PCR检测p16基因mRNA的表达，免疫组化和Western blotting检测p16蛋白的表达。

1.2.4 生长曲线的绘制 在24孔平底板中每孔接种$2\times10^3$个细胞，从第2天起每天取3个孔进行细胞记数，至第7天，根据每天的平均数绘制成生长曲线。

1.2.5 流式细胞仪(FCM)检测 培养所得细胞消化后计数，使细胞在$1\times10^6$个左右，用PBS洗涤细胞2次，70%乙醇固定24 h，经FCM检测，观察细胞增殖周期分布和凋亡指数。

1.2.6 转染前后细胞克隆形成实验 分别将单细胞悬液接种于6孔板中，每孔接种50、100、200个细胞，每组3个复孔，然后在室温下给予6 Gy的X线照射，照射条件：采用180 kV-X线，焦皮距100 cm，照射面积10 cm×15 cm，剂量率162 cGy/min；培养2周至集落形成后，用1∶3醋酸甲醇固定，瑞氏染液染色，镜下计数>50个细胞的集落数。

1.2.7 MTT法检测转染前后细胞对放射线的敏感性 分别取未转染、转染及空白质粒转染的对数生长期细胞接种于96孔培养板内，每孔加入细胞约$1\times10^3$，24 h后分别给予0、2、4、6、8、10 Gy的剂量照射(照射条件同上)，继续培养24 h后，每孔加入质量浓度为1 mg/ml的MTT液50 μl，继续培养4 h，小心去掉上清液，每孔加入DMSO 150 μl显色，震荡后用酶标仪在490 nm处测吸收光度值，采用数据拟合计算放射线作用后各细胞的50%抑制剂量($ID_{50}$)。以上实验每种细胞每个浓度设置3个平行样本，每组实验重复2～3次。

### 1.3 统计学处理

所测数据以百分数及$\bar{x}\pm s$表示，使用统计软件SPSS 11.0进行$\chi^2$检验，组间差异采用$t$检验。

## 2 结果

### 2.1 A549细胞系INK4a基因转录及表达情况检测

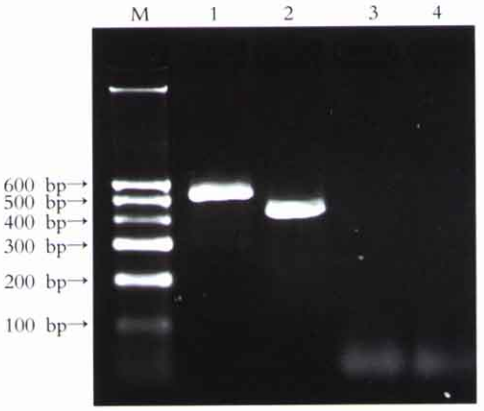
提取A549细胞总RNA后，利用p16基因特异引物进行RT-PCR扩增，结果无扩增产物；Western blot检测蛋白质表达为阴性。

### 2.2 转染克隆的筛选及鉴定

未转染质粒的癌细胞经G418筛选14 d后全部死亡，将获得G418抗性的转染组细胞作扩增培养，获得稳定表达p16蛋白的细胞，命名为A549-p16，空白对照质粒pcDNA3-LacZ转染组命名为A549-vector；RT-PCR检测显示只有A549-p16细胞扩增出长度为451 bp的DNA片段，免疫细胞化学及Western blotting检测p16蛋白在A549-p16中表达均为阳性；而上述指标在A549-vector及A549中检测均为阴性，见图1、2。

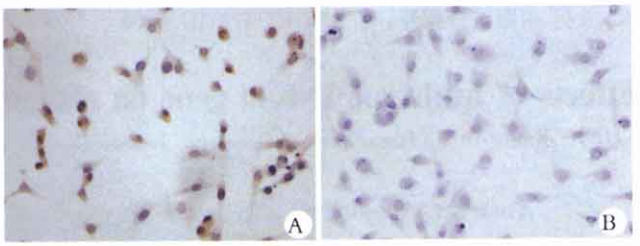
### 2.3 INK4a基因对A549细胞生长速度的影响

转染人野生型INK4a基因的细胞生长速度与空质粒转染细胞或亲本细胞相比，其生长速度减慢，而后二者生长曲线相似。




M：标准；1：内参；2：A549-p16；3：A549-vector；4：A549

**图1 RT-PC检测INK4a基因转染前后p16基因mRNA表达**




A：A549-p16细胞中p16阳性表达；B：A549-vector或A549细胞中p16阴性表达

**图2 免疫组化方法检测转染前后蛋白质p16表达** (S-P×200)

### 2.4 INK4a基因转染后细胞FCM分析结果

A549-p16细胞S期比例下降，$G_0/G_1$期比例增加(表1)，与A549-vector及A549对比，差异显著，表明INK4a基因的转染使A549细胞发生了$G_0/G_1$期阻滞；此外，A549-p16细胞凋亡指数也较A549-vector及A549明显增高，为7.4%，而后二者分别为2.9%和3.0%，差异显著($P<0.01$)。

**表1 转染INK4a基因前后细胞周期分析[$(x\pm s)$%]**

| 细胞 | $G_0/G_1$期 | S期 | $G_2$～M期 |
|---|---|---|---|
| A549-p16 | 60.3±2.5 | 22.9±1.5 | 18.5±1.3 |
| A549-vector | 50.4±2.8[a] | 39.7±2.2 | 9.6±1.0 |
| A549 | 52.7±2.6[b] | 39.4±2.0 | 8.1±0.7 |

a：$P=0.001$，b：$P=0.003$，与A549-p16比较

### 2.5 转染细胞经射线处理后克隆形成率

经过6 Gy放射线处理后，A549、A549-vector及A549-p16细胞每孔集落形成百分数分别为14.3%、13.5%及8.7%，和未转染INK4a基因的细胞相比，A549-p16细胞集落形成能力有明显降低，相互比较有显著统计学差异($P$值分别为0.027和0.035)，而前二者比较无显著统计学差异($P>0.05$)。

### 2.6 INK4a基因转染对A549细胞放疗敏感性的影响

A549-p16、A549-vector及A549细胞在不同剂量放射线作用后，对数据进行曲线拟合，各细胞的$ID_{50}$值分别为2.62 Gy、2.98 Gy和3.01 Gy。

## 3 讨论

肺癌已经成为目前世界上发病率和死亡率最高的

恶性肿瘤，国内据上海市最新调查，2003 年男性肺癌发生率占整个癌症发病率的 23.81%，占第一位，女性也以 12.86% 居第二位[1]。放射治疗仍然是目前治疗肺癌尤其是晚期肺癌最重要的方法之一。但是，由于肺癌（尤其是腺癌）细胞所具有的对放射线的内在抗性以及获得性抗性，常常导致治疗效果不佳甚至无效，严重影响了肺癌的放疗治疗效果。最近基因治疗的蓬勃发展给这一领域的研究提供了新的方向。

近来研究表明，肿瘤细胞放疗敏感性与某些抑癌基因的功能状态之间的关系十分密切：Xu 等[2]在体外研究对非小细胞肺癌进行相似的研究后发现抑癌基因 p53 转染可以增强细胞对传统放化疗的敏感性；同样，Weber[3]和 Abdulkarim 等[4]研究 p53 基因表达情况与放疗敏感性之间的关系后发现 p53 蛋白较高表达与肿瘤细胞对放疗的敏感性是成正比的；高楠等[5]也将抑癌基因 p14ARF 转染到癌细胞研究其对肺癌放射敏感性的影响，发现 p14ARF 基因功能恢复可提高人肺癌细胞的放射敏感性，并能抑制其放射后加速再群体化，两次放射可促进 p14ARF 诱导的低再群体化肺癌细胞凋亡。

研究表明，肺癌细胞中蛋白质 p16 的表达缺失率较高，其原因包括基因位点的突变、缺失以及异常的甲基化等[6-10]。同时近来有研究表明将 p16 基因转染到某些肿瘤细胞也可以增强该细胞的放射线的敏感性，罗京伟等[11]将 p16 基因转染到人鼻咽癌细胞中发现可以增加凋亡细胞数量，同时可以提高细胞对放射线的敏感性。付艳军等[12]利用外源性 p16 基因转染与放疗联合治疗喉鳞癌，发现具有相加和协同效应。同时国外多个研究也证实了这一结论[13-15]。

目前，对于抑癌基因转染可以提高细胞对放疗的敏感性的解释，主要来源于以下几点：①转染导致肿瘤细胞的周期阻滞，出现肿瘤细胞同步化，而这与放射敏感性有着十分密切的关系，尤其是 $G_0/G_1$ 期阻滞，目前绝大多数研究结果表明 $G_0/G_1$ 期阻滞的程度与细胞放射敏感性呈正相关，但也有相反的报道，其机制尚未明了；②转染的抑癌基因本身具有诱导细胞凋亡的能力，放射线损伤细胞 DNA 后，在该基因的诱导作用下发生凋亡；③基因转染后会直接诱导细胞发生凋亡，而在放射生物学中，凋亡被认为是一种重要的放射敏感性指标，细胞对射线的敏感性与对凋亡的反应程度一致。

本研究将 p16 基因转染到基因位点缺失的人肺腺癌 A549 细胞系中，和空白对照组和未转染组相比，其生长速度减慢，周期阻滞明显：$G_0/G_1$ 期比例明显增加而 S 期明显减少，凋亡比例也有增加，与目前大多数研究结果相似；在经过放射线处理后，其克隆形成率有明显减少，MTT 实验检测转染细胞对放射线的敏感性，从剂量-存活曲线来看，转染细胞敏感性较对照组细胞相比有明显增加，表明转染 p16 基因后提高了 A549 细胞对放射线的敏感性，这一结果与目前大多数类似的研究结果基本一致。根据上述增敏原因的分析，我们认为，本试验中转染细胞放疗敏感性的增强主要是由于转染后细胞阻滞于 $G_0/G_1$ 期所导致，同时，凋亡比例的增强也产生了重要的协同作用。

综上所述，基因治疗与放射治疗的联合，能在一定程度上提高肿瘤细胞对放射线的敏感性，从而提高放疗效果，有助于克服放射抗性的产生和逆转放射抗性，对于某些以放射治疗为主的恶性肿瘤患者，这无疑是一个好消息，但是，如何进一步增强这种作用以达到更加理想的治疗效果，还需要更深入的研究。

**参考文献：**


[1] 2000 年上海市恶性肿瘤发病率[J]. 肿瘤，2003，23(6)：532.

[2] XU L，PIROLLO K F，CHANG E H. Tumor-targeted p53-gene therapy enhances the efficacy of conventional chemo/radiotherapy[J]. J Control Release，2001，74(1-3)：115-128.

[3] WEBER K J，WENZ F. p53，apoptosis and radiosensitivity--experimental and clinical data[J]. Oncologie，2002，25(2)：136-141.

[4] ABDULKARIM B，SABRI S，DEUTSCH E，*et al*. Antiviral agent Cidofovir restores p53 function and enhances the radiosensitivity in HPV-associated cancers[J]. Oncogene，2002，21(15)：2334-2346.

[5] 高　楠，胡义德，罗建民，等. p14ARF 基因功能性恢复对人肺癌细胞放射敏感性的影响[J]. 中华医学研究，2000，80(10)：776-779.

[6] 郑素歌，徐永健. P16 蛋白在肺癌组织和癌旁组织的表达研究[J]. 中华结核和呼吸杂志，2002，25(2)：124.

[7] 徐锦屏. 抑癌基因 p16 在非小细胞肺癌中的表达及其意义[J]. 河南肿瘤学杂志，2002，15(6)：415-416.

[8] 马　军，段芳龄，陈香宇，等. 原发性肝细胞癌 p16 蛋白的表达[J]. 郑州大学学报：医学版，2002，37(1)：63-65.

[9] KIM D H，KIM J S，JI Y I，*et al*. Hypermethylation of RASSF1A promoter is associated with the age at starting smoking and a poor prognosis in primary non-small cell lung cancer[J]. Cancer Res，2003，63(13)：3743-3746.

[10] MORIYAMA S，NAKASHIMA Y，YANO M，*et al*. Ratio of expression of p16INK4a to p14ARF correlates with the progression of non-small cell lung cancer[J]. Jpn J Cancer Res，2002，93(7)：783-788.

[11] 罗京伟，梁　克，徐国镇，等. p16 基因转染对 CNE-2 细胞放射敏感性的研究[J]. 中华放射肿瘤学杂志，1999，8(4)：229-232.

[12] 付艳军，刘世喜，鲜均明. 外源性 p16 基因与放疗联合治疗喉鳞癌的实验研究[J]. 四川大学学报：医学版，2004，35(2)：209-211.

[13] YAO K C，KOMATA T，KONDO Y，*et al*. Molecular response of human glioblastoma multiforme cells to ionizing radiation：cell cycle arrest，modulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors，and autophagy[J]. J Neurosurg，2003，98(2)：378-384.

[14] FEI P，EL DEIRY W S. P53 and radiation responses[J]. Oncogene，2003，22(37)：5774-5783.

[15] PIEPKORN M. The expression of p16(INK4a)，the product of a tumor suppressor gene for melanoma，is upregulated in human melanocytes by UVB irradiation[J]. J Am Acad Dermatol，2000，42(5 Pt 1)：741-745.


（编辑　薛国文）