DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.23.017
第25卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 23
2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

文章编号:1000-5404(2003)23-2103-03

论著

肿瘤细胞中 $ASPP_2$ mRNA 的表达及意义

张 云[1],刘泽军[1],李 维[1],杨丽华[1],顾寿智[2],卢 欣[3] ([1]第三军医大学附属西南医院检验科,重庆 400038;[2]Seirei Christopher College, Japan;[3]Ludwig Institute for Cancer Research, Imperial College School of Medicine, UK)

提 要:目的 建立 p53 凋亡刺激蛋白基因($ASPP_2$) mRNA 表达水平的 RT-PCR 测定方法;并应用该方法测定 $ASPP_2$mRNA 在正常人血液单核细胞与人淋巴瘤细胞株 jurkat 及成纤维细胞和结肠癌细胞株 HT-29 的表达水平。方法 应用单核细胞分离液分离正常人血液单核细胞,用 DMEM 培养液培养细胞株 jurkat、成纤维细胞和结肠癌细胞株 HT-29,所得细胞用 Tripure 分离试剂提取总 RNA。最后用 RT-PCR 检测 $ASPP_2$mRNA 的表达水平。结果 $ASPP_2$ mRNA 在正常人血液单核细胞中的表达水平比人淋巴瘤细胞株 jurkat 的表达水平高,而正常人成纤维细胞中 $ASPP_2$ 的表达水平比结肠癌细胞株 HT-29 低。结论 $ASPP_2$ 的 mRAN 表达量是在 p53 野生型的肿瘤细胞中降低而不是在 p53 突变型的肿瘤细胞中,说明 $ASPP_2$ 调节着 p53 的肿瘤抑制功能。

关键词:ASPP;mRNA;RT-PCR
中图法分类号:R394.3;R73-354 文献标识码:A

$ASSP_2$ mRNA expression in tumor cells and its significance

ZHANG Yun, LIU Ze-jun, LI Wei, YANG Li-hua, GU Shou-zhi, LU Xin (Department of Medical Laboratory, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a reverse transcription-PCR (RT-PCR) assay to measure the expression levels of apoptosis stimulating protein of p53 (ASPP2) mRNA in normal blood monocytes, Jurkat cell line, fibroblasts, colon cancer HT-29 cell line. Methods Monocytes in normal blood were isolated using monocyte isolation reagent. Jurkat cells, fibroblasts and HT-29 cell line were cultured using DMEM culture medium. Total RNA was extracted from the harvested cells using Tripure TM isolation reagent. ASPP2 mRNA expression level was determined by RT-PCR. Results ASPP2 mRNA expression level was higher in normal blood monocytes than that in Jurkat cell line but lower in human fibroblasts than that in HT-29 cell line. Conclusion The mRNA expression of ASPP2 is down-regulated in human tumor cell expressing wild-type p53 but not mutant p53, suggesting that ASPP2 can regulate the tumor suppression of p53.

Key words: ASPP; mRNA; RT-PCR

p53 凋亡刺激蛋白(Apoptosis stimulation protein of p53, ASPP)[1] 家族是最近新发现的一个蛋白家族,成员包括 $ASPP_1$、$ASPP_2$、iASPP[2] (Inhibitory member of the ASPP family)等。2001 年卢欣等[3] 发现了 ASPP 这一蛋白家族,该家族的共同特点是:都有 SH3 结构域、大量的锚蛋白、丰富的谷氨基结构域。在肿瘤的发生、发展中与 p53 共同作用,促进 p53 的细胞凋亡功能。p53 抑制肿瘤功能的最重要方面是其可诱导凋亡,而它诱导凋亡的机制目前仍不清楚。目前,尚未发现有白血病细胞株和结肠癌细胞株的 $ASPP_2$ 表达的研究报道,因此我们建立了非竞争 RT-PCR 法检测正常人淋巴细胞和急性 T 淋巴细胞白血病细胞株(Jurkat)及成纤维细胞和结肠癌细胞株(HT-29)的 $ASPP_2$ 的表达,并探讨 $ASPP_2$ 基因表达水平与 p53 促细胞凋亡的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞培养 Jurkat 细胞株及成纤维细胞和 HT-29 细胞

基金项目:国家自然科学基金对外交流与合作项目(30313268);日本 Seirei Christopher College 日中合作研究基金(2003);回国人员启动基金(2001)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30313268), the Foundation for Sino-Japanese Cooperation by Seirei Christopher College (2003), and the Starting Funds for Personnel Returning from Overseas (2001)
作者简介:张 云(1976-),男,云南省曲靖市人,硕士研究生,医师,主要从事基因表达及 DNA 甲基化方面的研究。电话:(023)68753687
通信作者:刘泽军,E-mail:a65424208@online.cq.cn
收稿日期:2003-06-25;修回日期:2003-10-24

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

株在加有 100 U 青霉素, 100 U 链霉素, 10% 小牛血清的高糖 DMEM 培养基, 5% CO_2 条件下 37 ℃培养。

1.1.2 引物设计及合成 $ASPP_2$、β-actin 基因引物由 primer premier 5.0 软件合成, 引物序列如下:

$ASPP_2$ 基因(391 bp)

Sense primer: 5′-TATCTAATCCTTACCGAAACC-3′

Antisense primer: 5′-AACTAATACTCGGACTCCC-3′

β-actin 基因(540 bp)

Sense primer: 5′-GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA-3′

Antisense primer: 5′-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC-3′

1.1.3 主要试剂和仪器 PCR Markers 购自上海复华生物医学工程有限公司; 扩增仪为 Hybazd Omn-E27-1; RT-PCR 试剂盒购自宝生物生物试剂公司; Vilber Lourmat 型凝胶成像仪购自 Bio-Pkofil 公司(法国)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞分离与 RNA 提取 正常人的单核细胞从血站得到的新鲜血中用单个核细胞分离液分离得到, 将得到的单核细胞和培养所得的细胞株稀释后在显微镜下计数, 取 10^6 个细胞提取 RNA, 总 RNA 提取用 Tripure 分离试剂提取, 所有操作步骤按说明书进行, 最后用吸光度 A_{260}/A_{280}定量。

1.2.2 逆转录反应 反应体系 20 μl, 总 RNA5 μg, 其它成分按试剂盒操作说明书进行。反应温度 30 ℃预热 5 min, 48 ℃逆转录反应 70 min。

1.2.3 PCR反应 反应体系 50 μl, $ASPP_2$ 基因扩增时取逆转录产物 5 μl, β-actin 基因取逆转录产物 2 μl。寡核苷酸引物各 25 pmol, 10× PCR buffer 5 μl, 2.0 mmol/L $MgCl_2$, 200 μmol/L dNTPs, Taq DNA 聚合酶(上海申友公司)5 U。反应条件: $ASPP_2$ 基因 95 ℃变性 3 min; 94 ℃变性 45 s, 56 ℃退火 45 s, 72 ℃延伸 60 s, 共 35 个循环; 72 ℃延伸 8 s。β-actin 基因的反应条件同上。

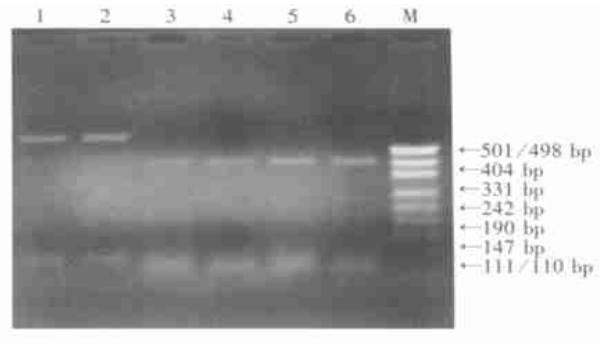
1.2.4 PCR 产物分析 取 $ASPP_2$ 基因和 β-actin 基因的扩增产物各 10 μl, 用 EB(溴乙锭)染色, 在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳(100 V, 45 min)。用 Vilber Lourmat 凝胶成像仪照相, 并在紫外检测仪上切下目的片段, 做胶回收实验并送申友生物试剂公司测序(胶回收实验步骤按试剂盒操作说明书进行)。

1.2.5 凝胶图像分析 将电泳的琼脂糖凝胶用 Vilber Lourmat 型凝胶成像仪拍照, 并用 Gel-Pro 3.1 凝胶图像扫描分析软件进行密度扫描, 然后对 $ASPP_2$ 基因表达量与β-actin 表达量的比值进行比较, 从而计算 $ASPP_2$ 在各细胞株的表达量。

2 结果

2.1 $ASPP_2$ 基因的 RT-PCR 扩增结果

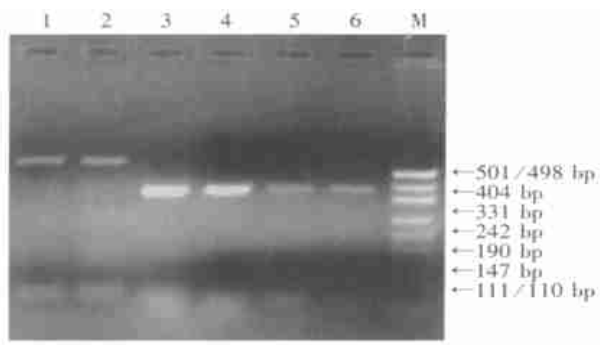
在正常人单核细胞和淋巴瘤细胞株均有 $ASPP_2$ 基因的 mRNA 表达, 正常人单核细胞中 $ASPP_2$ 基因的 mRNA 表达量比 Jurkat 细胞株的 $ASPP_2$ 基因的 mRNA 表达量高, 见图 1。正常人成纤维细胞和 HT-29 细胞株也均有 $ASPP_2$ 基因的 mRNA 表达, 但正常人成纤维细胞 $ASPP_2$ 基因的 mRNA 表达量比 HT-29 细胞株 $ASPP_2$ 基因的 mRNA 表达量低, 见图 2。



1, 2: β-actin; 3, 4: ht-29 cell line; 5, 6: normal fibroblasts; M: Marker

图 1 单核细胞和 Jurkat 细胞株 $ASPP_2$ 基因的 mRNA 表达

Fig 1 mRNA expression of $ASPP_2$ gene in monocytes and Jurkat cell line



1, 2: β-actin; 3, 4: Jurkat cell line; 5, 6: normal monocytes; M: Marker

图 2 成纤维细胞和 HT-29 $ASPP_2$ 细胞株基因的 mRNA 表达

Fig 2 mRNA expression of $ASPP_2$ gene in fibroblasts and HT-29 cell line

2.2 胶回收及测序结果

胶回收结果: 目的基因 $ASPP_2$ 的 cDNA 回收浓度为 271 μg/μl, A_{260}/A_{280}为 1.9257。

测序结果:

5′-CGAAAGAAACTGTCTAACGCACCAAGGCCTCTAAAGAAACGTAGTTCTATTACAGAGCCAGAGGGTCCTAATGGGCCAAATATTCAGAAGCTTTTATATCAGAGGACCACCATAGCGGCCATGGAGACCATCTCTGTCCCATCATACCCATCCAAGTCAGCTTCTGTGACTGCCAGCTCAGAAAGCCCAGTAGAAATCCAGAATCCATATTTACATGTGGAGCCCGAAAAGGAGGTGGTCTCTCTGGTTCCTGAATCATTGTCCCCAGAGGATGTGGGGAATGCC-3′

该测序结果所得的 285 个碱基与 $ASPP_2$ 基因序列 2 419 至 2 703 的 285 个碱基完全相同, 在 PCR 扩增的目的片段内。

2.3 图像扫描分析结果

用 Gel-Pro 3.1 凝胶图像扫描分析软件分别分析图 1 和图 2 中的各条的 IOD 值, 并计算各种细胞的 IOD 值与 β-actin IOD 值的比值。初步结果为图 1 中单核细胞 $ASPP_2$ 的平均值比β-actin 平均值为 8795/9887= 0.89, Jurkat 细胞 $ASPP_2$ 的平均值比β-actin 平均值为 5677/9887= 0.57, 图 2 中成纤维细胞 $ASPP_2$ 的平均值比β-actin 平均值为 9361/11528= 0.81, HT-29 细胞 $ASPP_2$ 的平均

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

值比β-actin 平均值为 30647/11528=2.66。

3　讨论

自 p53 作为重要的抑癌基因之一被报道以来, 人们发现许多人正常组织的癌变都与 p53 的突变有关, 如肺癌病人的 p53 变异率为 70%, 结肠癌为 60%, 乳腺癌为 30%, 白血病为 5%等。p53 抑制肿瘤功能的最重要的方面是其可诱导细胞凋亡。目前对 p53 诱导细胞凋亡的机制有很多种学说, 但都不能对野生型 p53 发生肿瘤的机制有很好的解释, 而 ASPP 蛋白家族的发现有助于解决这一难题。

ASPP 蛋白家族是 Samuels[1] 的研究小组在 2001 年发现的, 至今少见国内外有用普通的 RT-PCR 法检测 ASPP 基因 mRNA 表达量的报道。本实验从引物设计开始建立了普通 RT-PCR 法检测 $ASPP_2$ 基因 mRNA 表达量的方法, 从测序结果可知, 该方法对检测 $ASPP_2$ 基因是非常准确的, 且该方法简单、便宜, 易掌握。

ASPP 家族促进 p53 细胞凋亡功能的机制是 ASPP 与 p53 结合形成 ASPP-p53 复合物作用于原凋亡基因启动子, 当 ASPP 有微小的变化则引起 p53 结合 DNA 的能力发生改变, 从而影响 p53 诱导细胞凋亡的能力。细胞根据 p53 蛋白与停滞基因结合或与凋亡基因结合的活力大小做出细胞停滞还是细胞凋亡的决定[4]。在本次实验中, Jurkat 细胞株的 $ASPP_2$ 的 mRNA 的相对表达量比正常人单核细胞的 $ASPP_2$ 的相对表达量低, 而 HT-29 细胞株的 $ASPP_2$ 的 mRNA 的相对表达量比正常人成纤维细胞的 $ASPP_2$ 的相对表达量高。Jurkat 细胞株的 p53 基因座的突变是可遗传突变, 它在 γ-射线作用出现的细胞生长停滞与细胞凋亡同野生型 p53 的细胞相似[5]。HT-29 细胞株 p53 的基因座突变主要是发生在密码子 273 处, 它主要是单个碱基的突变(CGT CAT)[6]。这说明 $ASPP_2$ mRNA 的表达量在不同的细胞株中的表达量不同, 可能与 p53 是否变异及突变是否导致 p53 功能丧失有关。因为 p53 的突变率在白血病中较低, 而在其它的肿瘤中 p53 的突变率较高。本实验结果说明, 肿瘤的发生与发展可能与 $ASPP_2$ 的表达量的改变有关, 提示 $ASPP_2$ 在正常细胞转变为恶性细胞的过程中有重要的作用, 它在体内调节着 p53 的肿瘤抑制功能。

Lossos 等[7] 用荧光定量 RT-PCR 和免疫组化等方法对弥漫性大 B 淋巴细胞瘤(DLBCL)和滤泡性淋巴瘤(FCL)的 $ASPP_2$ 研究。发现 $ASPP_2$ 表达高的患者存活时间长, 而 $ASPP_2$ 表达低的患者存活时间短, 提示 $ASPP_2$ 表达量的高低可能与肿瘤的预后亦有关。

参考文献:

[1] Samuels-Lev Y, O'Connor D J, Bergamaschi D, *et al*. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53[J]. Molecular Cell, 2001, 8(4): 781—794.

[2] Bergamaschi D, Samuels-Lev Y, O'Neil N J, *et al*. iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human[J]. Nat Genet, 2003, 33(2): 162—167.

[3] Slee E A, Lu X. The ASPP family: deciding between life and death after DNA damage[J]. Toxicol Lett, 2003, 139(2-3): 81—87.

[4] Lane D. How cells choose to die[J]. Nature, 2001, 414(6859): 25, 27.

[5] Park W Y, Hwang C I, Im C N, *et al*. Identification of radiation-specific responses from gene expression profile[J]. Oncogene, 2002, 21(55): 8521—8528.

[6] Rodrigues N R, Rowan A, Smith M E, *et al*. p53 mutations in colorectal cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990, 87(19): 7555—7559.

[7] Lossos I S, Natkunam Y, *et al*. Apoptosis stimulating protein of P53 ($ASPP_2$) expression differs in diffuse large B-cell and follicular center lymphoma: correlation with clinical outcome[J]. Leukemia & Lymphoma, 2002, 43(12): 2309—2317.

(编辑　汪勤俭)

参考文献类型及标识

根据 GB 3469 规定, 以单字母方式标识以下各种参考文献类型:

参考文献类型	专著	论文集	报纸文章	期刊文章	学位论文	报告	标准	专利
文献类型标识	M	C	N	J	D	R	S	P

对于专著、论文集中的刊出文献, 其文献类型标识建议采用单字母"A"; 对于其他未说明的文献类型, 建议采用单字母"Z"。

对于数据库(Database)、计算机程序(Computer program)及电子公告(Electronic bulletin board)等电子文献类型的参考文献, 建议以下列双字母作为标识:

电子参考文献类型	数据库	计算机程序	电子公告
电子文献类型标识	DB	CP	EB

本刊编辑部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net