DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.09.013
第24卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 9
2002年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2002

文章编号:1000-5404(2002)09-1029-02

论著

p16基因转染对肺癌细胞SPC-A1的抑制作用

李 羲,邱小华,蒋建红,齐协飞,范希光,饶纬华 (江西医学院第二附属医院呼吸内科,南昌 330006)

提 要:目的 探讨抑癌基因p16对肺癌细胞SPC-A1的抑制作用。方法 以Escort脂质体介导p16基因转染肺癌SPC-A1细胞,MTS法测定OD值,计算细胞生长抑制率,描绘p16基因转染后SPC-A1细胞增殖曲线。结果 p16基因转染对SPC-A1细胞具有明显抑制作用($P<0.05$),细胞抑制率为23.18%,细胞增殖曲线较SPC-A1细胞明显降低。紫杉醇对SPC-A1细胞亦有明显抑制作用,抑制率为对37.12%。结论 p16基因转染对肺癌SPC-A1细胞具有明显抑制作用。

关键词:p16基因;转染;肺癌;SPC-A1细胞
中图法分类号:R394.2;R734.2 文献标识码:A

Suppressive effects of p16 on growth of lung cancer cell line SPC-A1

LI Xi, QIU Xiao-hua, JIANG Jian-hong, QI Xie-fei, FAN Xi-guang, RAO Wei-hua (Department of Respiratory Diseases, Second Affiliated Hospital to Jiangxi Medical College, Nanchang 330006, China)

Abstract: **Objective** To investigate the suppressive effects of p16 gene on the growth of lung cancer cell line SPC-A1. **Methods** Escort liposome mediated p16 gene was transfected into lung cancer cells SPC-A1. MTS was used to detect the optical value of the transfected cells and the growth curve of these cells was obtained. **Results** OD value in p16 gene transfected cells was significantly lower than that of control group. The suppression rate of lung cancer cell line SPC-A1 with p16 transfection was 23.18%. The growth curve of this group was significantly lowered than that of control group. Taxol suppressed the growth of SPC-A1 cells with a suppressive rate of 37.12%. **Conclusion** The growth of lung cancer cell line SPC-A1 can be significantly suppressed by p16 gene transfection.

Key words: p16 gene; transfection; lung cancer; SPC-A1 cell line

肺癌的发生与发展是一个多基因参与、多步骤形成的过程,在这种过程中,癌基因的激活和/或抑癌基因失活起了关键性的作用。近十年来,基因治疗肺癌已逐渐成为国际上研究的热点。p16基因是1994年新发现的抑癌基因,研究显示,p16能阻止细胞生长于G1-S期,在头颈部肿瘤植瘤模型中,能显著地抑制肿瘤的生长[1]。本文初步研究p16基因对肺癌SPC-A1细胞的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

p16质粒:由美国华盛顿大学分子遗传研究所吴瑛博士惠赠;Escort脂质体:购自中国科学院上海生物化学研究所。MTS:购自华美生物工程公司上海分公司。紫杉醇:美国Puerto Rigo百时美施贵宝公司产品。

1.2 细胞系与细胞培养

人肺腺癌细胞系SPC-A1,购自中国科学院上海细胞生物研究所,细胞呈贴壁生长,细胞加入50 ml培养瓶,加入RPMI1640培养液(含10%小牛血清,青霉素、链霉素各100 U/ml)6 ml,置37 ℃,5%CO_2培养箱培养,每3 d更换培养液,细胞长满时,以0.25%胰酶消化传代。

1.3 实验分组与基因转染

实验分为以下4组(每组均设5孔):1组:SPC-A1细胞对照组。2组:p16质粒对照组。3组:p16基因转染组。4组:抗肿瘤药物紫杉醇对照组。实验方法:四组细胞均接种于96孔细胞培养板,每孔1×10^4细胞,RPMI1640培养基200 μl,置37 ℃、5%CO_2培养箱培养48 h,然后分别给予不同的处理因素。1组不加处理因素,仅用RPMI1640培养基200 μl培养SPC-A1细胞。2组加p16质粒2 μg。3组参照樊武舫等[2]介绍的方法进行P16基因转染,具体步骤为弃培养基,无血清DMEM培养基洗3遍,加Escort脂质体-p16基因转染复合液30 μl(含p16基因2 μg),转染12 h,弃转染液,加RPMI1640培养基200 μl。置37 ℃、5%CO_2培养箱培养48 h。4组仅加2.5 μg/ml的紫杉醇。

1.4 细胞增殖曲线

分别在p16基因转染后的第24、48、72 h测定细胞增殖率,描绘增殖曲线,并与未转染p16基因的SPC-A1细胞对照。

1.5 细胞增长抑制率测定

采用MTS法,每孔加入MTS/PMS液20 μl。置37 ℃、5%CO_2培养箱培养1 h。应用酶标仪,在492 nm波长测光吸收(OD)值。根据公式计算细胞生长抑制率。

$$细胞生长抑制率=\frac{对照组\ OD\ 值-实验组\ OD\ 值}{对照组\ OD\ 值}\times100\%$$

1.5 统计学处理

采用医学统计软件中的方差分析方法进行分析。

2 结果

2.1 OD值测定结果

各组OD值测定结果,见表1。

基金项目:江西省科委资助课题(E000601)
作者简介:李 羲(1955-),男,江西省宜春市人,博士,副主任医师、副教授,主要从事肺癌发病机制及综合治疗方面的研究,发表论文32篇。
电话:(0791)63000507
收稿日期:2001-08-10;修回日期:2002-04-11

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

表 1 OD 值测定结果

Tab 1 OD values of every group

Group	OD value					$\bar{x}$	s
1	0.681	0.951	0.870	0.822	0.948	0.854	0.11
2	0.880	0.858	0.949	0.817	0.829	0.867	0.052
3	0.751	0.602	0.623	0.674	0.629	0.656	0.059 *
4	0.526	0.556	0.551	0.511	0.541	0.537	0.019 *

*: $P<0.05$ *vs* Group 1 and Group 2

通过方差分析法检验表明, 1 组与 2 组比较无显著性差异($P>0.05$), 3、4 组与 1、2 组比较有显著性差异($P<0.05$), 3、4 组组间比较亦有显著性差异($P<0.05$), 见表 1, 提示 p16 基因转染对 SPC-A1 细胞具有明显抑制作用。应用上述公式计算细胞生长抑制率, 3 组为 23.18%, 4 组为对 37.12%。

2.2 细胞增殖曲线

细胞增殖曲线见图 1。提示 p16 基因转染后 48 h 对 SPC-A1 细胞出现抑制作用, 72 h 更为明显。

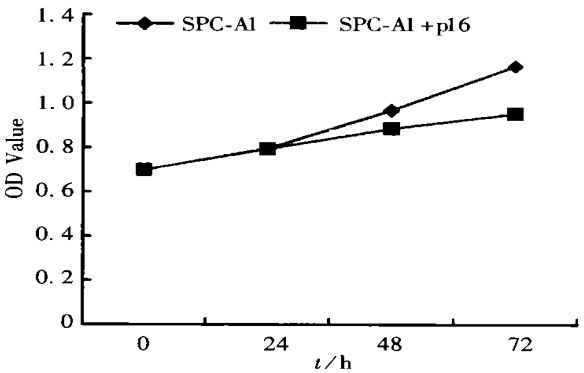


图 1 p16 基因对 SPC-A1 细胞的抑制作用

Fig 1 The supression effects of p16 gren on the grouth of SPC-A1 cells

3 讨论

肺癌与其他肿瘤相似, 其发生发展是由于癌基因激活和/或抑癌基因失活, 多基因、多步骤形成的。应用抑癌基因治疗是当今肺癌基因治疗研究的热点。p16 基因是 1994 年新发现的抑癌基因, 由于在多种肿瘤中发现有 p16 基因的缺失或突变, 因而又称为多肿瘤抑制基因(Multiple tumor suppressor 1, MTS1)并认为是一个颇具前途的抑制基因。研究显示, 在肺癌、肝癌及其他一些肿瘤中, 存在较高频率的 p16 基因异常, 因此, 可以选择 P16 基因作为这些肿瘤基因治疗的靶基因。并且, p16 基因片段小, 仅为 p53 基因的 1/4, 作为基因治疗的靶基因易于操作。因此, 本研究主要以 p16 基因作为靶基因, 探讨它对肺癌细胞的抑制作用。结果显示, 应用 Escort 脂质体介导 p16 基因转染 SPC-A1 细胞, 48 h 后细胞 OD 值较对照组明显降低, 细胞生长抑制率为 23.18%, 提示 p16 基因转染后, 在短时间内即能对肺癌细胞产生抑制作用。尽管应用本实验所用的方法进行 p16 基因转染对 SPC-A1 细胞的抑制作用较 2.5 μg/ml 的紫杉醇弱, 但转入基因在细胞内表达可对肿瘤细胞产生持续抑制作用。

有关 p16 基因转染对肿瘤细胞抑制作用的强度, 文献报告结果不一, Jin 等观察到 p16 基因转染对肺癌细胞抑制率高达 90%[3], 而 Schrump 等报告对食管腺癌细胞无明显抑制作用[4], 本结果显示, p16 基因转染对肺癌 SPC-A1 细胞具有明显抑制作用。因此认为, 转染率是影响抑癌基因对肿瘤细胞抑制作用的重要因素。有研究显示, p53 基因能增强肺癌细胞对顺铂的敏感性, 最近的研究又发现 p53 基因对多药抗药蛋白具有调节作用[5]。然而, p16 基因对抗肿瘤药物是否具有增敏作用, 值得进一步探讨。根据本文结果, 我们认为, p16 基因转染后, 在短时间内即能对肺癌细胞产生抑制作用。

(致谢: 承蒙美国华盛顿大学分子遗传研究所吴瑛博士惠赠表达型 P16 质粒, 谨此致谢!)

参考文献:

[1] 朱明华. 抑癌基因[A]. 见: 曾益新, 主编. 肿瘤学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 56—79.

[2] 樊武舫, 于晓波. 脂质体介导的转染法[A]. 见李永明, 赵玉琪, 主编. 实用分子生物学方法手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 91—93.

[3] Jin X, Nguyen D, Zhang W, *et al*. Cell cycle arrest and inhibition of tumor cell proliferation by the p16INK4 gene mediated by an adenovirus vector [J]. Cancer Res, 1995, 55(15): 3 250—3 253.

[4] Schrump D S, Chen G A, Consuli U, *et al*, Inhibition of esophageal cancer proliferation by adenovirus mediated delivery of p16INK[J]. Cancer gene ther, 1996, 3(6): 357—364.

[5] Sullivan G F. Regulation of expression of the multidrug resistance protein MRP1by P53 in human prostate cancer cells[J]. J Clin Invest, 2000, 105 (9): 1 261—1 267.

(编辑 薛国文)

《生物技术通讯》征稿, 征订启事

《生物技术通讯》是军事医学科学院生物工程研究所主办的关于生物技术的专业性学术刊物(国内统一刊号 CN11-4226/Q, 国际标准刊号 ISSN 1009-0002), 是国家科技部中国科技论文统计与分析源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊。本刊主要报道生物技术(生物工程)及所有相关学科领域的最新科研成果与进展。主要栏目有: 研究报告、技术方法、研究简报、专论、综述、论坛、讲座、经验交流等。欢迎订阅、欢迎供稿、欢迎刊登广告。

《生物技术通讯》为大 16 开本双月刊, 80 页高档轻涂纸印制, 每期定价 10 元。国内外公开发行, 国内邮发代号: 82-196, 国外发行代号 BM1433。编辑部办理邮购业务。

地址: 北京丰台东大街 20 号 邮编: 100071

电话: (010)66948856 传真: (010)63895646 E-mail: biolett@bj163.com, swtx@chinajournal.net.cn

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