

p53 缺失协同 *K-ras*^{G12D} 激活对细胞成瘤性的影响

王作云¹ 孙艺华² 叶小磊² 李立² 季红斌² 刘新垣^{1,2} 王毅刚^{1*}¹ 浙江理工大学生命科学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018;² 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 为研究 *p53* 缺失和 *K-ras* 突变在肺癌发生中的作用, 建立了 *p53* 条件性敲除, *K-ras*^{G12D} 条件性激活 (*p53*^{loxp/loxp}, *Lox-Stop-Lox-K-ras*^{G12D}) 的基因嵌合小鼠, 获得条件性基因嵌合小鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryonic fibroblasts, MEFs)。体外研究发现, 内源性 *p53* 缺失协同 *K-ras*^{G12D} 的突变激活可促进 MEFs 的分裂、增殖和转化; 体内研究证实, 该协同突变激活可快速诱发肺部肿瘤的产生, 组织病理学分析表明该肺癌类型为腺癌。上述研究工作为进一步认识 *p53* 和 *K-ras* 在肺癌发生发展中的作用打下了基础。

关键词 *p53*; *K-ras*; 细胞转化; 细胞成瘤性; 肺腺癌

据世界卫生组织最新统计, 肺癌已经成为全球癌症的第一杀手, 而在我国由于吸烟人群的持续上升以及空气污染, 肺癌正成为我国发病率和致死率最高的癌症。肺癌的发生往往与多种原癌基因和抑癌基因的突变有关, 其中原癌基因 *K-ras* 和抑癌基因 *p53* 与肺癌的发生、发展有着密切的关系^[1]。临床数据统计表明, 约 20% 肺癌患者伴有 *K-ras* 的突变; 50% 的肺癌存在着 *p53* 基因突变, 在小细胞肺癌中 *p53* 基因突变甚至高达 90%^[1-3]。另有研究显示, *K-ras* 突变需协同其他抑癌基因失活或原癌基因激活才可导致细胞的异常增殖^[4]。由于 *p53* 在肺癌中的高突变率, 因此阐明 *p53* 与 *K-ras* 在肺癌中的相互作用将有助于肺癌的诊断、治疗和预后评估^[5]。小鼠肺癌模型是研究人类肺癌非常好的手段, 但是目前国内还没有很好的小鼠肺癌模型可供研究, 因此构建人类肺癌动物模型是需要迫切解决的问题^[6]。本研究建立内源性可被 CRE 重组酶诱导的 *p53*^{loxp/loxp}、*Lox-Stop-Lox-K-ras*^{G12D} 条件性基因嵌合小鼠肺癌模型, 为肺癌研究提供了一个良好的模型^[7, 8]。在这一系统基础上, 通过体外培养该转基因小鼠的胚胎成纤维细胞 (mouse embryonic fibroblasts, MEFs), 研究 *p53* 缺失协同 *K-ras*^{G12D} 的突变激活对 MEFs 生长、转化等能力的影响; 同时通过小鼠肺脏组织特异性基因敲除实验, 进一步研究 *p53* 基因和 *K-ras* 基因在肺癌发生过程中的重要作用。

1 材料与方法

1.1 动物来源

Lox-Stop-Lox-K-ras^{G12D} 小鼠来源于美国哈佛医学院 Tyler Jacks 实验室, *p53*^{loxp/loxp} 小鼠来源于美国哈佛医学院 Ronald A. DePinho 实验室, *p53*^{loxp/loxp}、*Lox-Stop-Lox-K-ras*^{G12D} 条件性基因嵌合小鼠由两者杂交获得, 为 129/FVB 杂交品系。

1.2 条件性基因嵌合小鼠及 MEFs 基因型的鉴定

剪取长约 5 mm 的 10 天龄小鼠尾巴或收取 (3~5) × 10⁵ 个 MEFs 细胞, 采用 Puregene DNA Purification Kit (Gentra, 美国) 抽提 DNA, 操作方法按照试剂盒说明书进行。对抽提的基因组 DNA 进行 PCR 反应。反应所需 Taq 聚合酶购自 TaKaRa 公司, 所用引物如下, 由 Invitrogen 公司合成。

p53^{loxp} 上游引物序列: 5'-CACAAAACAGGTTA-AACCCAG-3', *p53*^{loxp} 下游引物序列: 5'-AGCACATA-GGAGGCAGAGAC-3'; *K-ras*^{G12D} 上游引物序列: 5'-CTAGCCACCATGGCTTGAGT-3', *K-ras*^{G12D} 下游引物序列: 5'-TCCGAATTCAG TGACTACAGATG-3'。

PCR 反应体系如下: 17.25 μl ddH₂O; 2.5 μl 10×PCR 缓冲液/Mg²⁺; 2 μl 2.5 mmol/L dNTP; 1 μl 10 mmol/L 上游引物; 1 μl 10 mmol/L 下游引物; 1 μl 小鼠基因组 DNA; 0.25 μl 1 000 U Taq 酶, 反应总体积为 25 μl。

p53 的 PCR 反应条件: 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 32 个循环, 最后 72 °C 延伸

收稿日期: 2008-11-15 接受日期: 2009-02-12

国家自然科学基金(No.30800093)、浙江省科技厅(No.2007C33027)和浙江理工大学基金(No.0616033) 资助项目

* 通讯作者。Tel: 0571-86843186, Fax: 0571-86843185, E-mail: ygwang@sibs.ac.cn

6 min。野生型小鼠 *p53* 条带大小为 288 bp, 杂合子小鼠 *p53^{loxp/+}* 条带大小分别为 288 bp 和 370 bp, 纯合子小鼠 *p53^{loxp/loxp}* 条带大小为 370 bp。 *K-ras^{G12D}* 反应条件: 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 32 个循环, 最后 72 °C 延伸 6 min。 *K-ras^{G12D}* 小鼠 PCR 条带大小为 350 bp。采用正常野生型小鼠尾以及已知杂合子和纯合子小鼠尾 DNA 作为对照。扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳观察, 电泳的 marker 为 Invitrogen 公司 100 bp marker。

1.3 条件性基因嵌合小鼠 MEFs 的获取及培养

将基因型为 *p53^{loxp/loxp}*、*Lox-Stop-Lox-K-ras^{G12D}* 的雌、雄小鼠在 8 周左右进行交配, 次日检查雌鼠阴栓, 见阴栓的雌小鼠于 13 天后脱颈椎处死。将处死的小鼠整体放入 75% 酒精浸泡 3~5 min 进行消毒, 剪开腹部上皮, 换手术剪和镊子, 剪开腹膜, 将胚胎连胎盘取出置灭菌的玻璃皿中, 在超净台中将胎盘剪开, 取出胚胎。去除头部及腹内脏器(尽量去除干净, 包括血液), 剩余胚胎组织用 1×PBS 清洗两遍, 去除的头部和内脏可用来做基因鉴定。将洗过的胚胎背部组织切碎, 之后加 2 ml 0.25% 胰蛋白酶 (Invitrogen 公司) 37 °C 消化, 随时在镜下观察, 直至组织碎片消化为单细胞^[9]。然后用 DMEM+10% FBS 培养液中和, 1 000 r/m 离心 5 min, 再加入培养液混匀后转到培养皿中进行培养, 隔天观察, 当密度适合时进行传代, 细胞稳定后取(3~5)×10⁵ 个 MEFs 进行基因型鉴定。

1.4 生物学功能分析

1.4.1 Adeno-CRE 病毒诱导条件性基因嵌合小鼠 MEFs 基因突变 通过基因型鉴定选取基因型为 *p53^{loxp/loxp}*、*Lox-Stop-Lox-K-ras^{G12D}* 的小鼠胚胎 MEFs 进行扩大培养。将扩大培养的细胞进行病毒处理, 即以 1×10⁶ cfu 的 Adeno-CRE 病毒对(5~6)×10⁵ 个细胞进行感染。取(3~5)×10⁵ 个感染前和感染后细胞做基因型鉴定; 收取(3~5)×10⁶ 个感染前和感染后细胞做 Western 印迹, 具体实验操作见抗体 upstate 的 Anti-Ras (clone 9A11.2-mouse) 附带的说明书。

1.4.2 生长曲线分析 取第 3 代小鼠胚胎 MEFs 在病毒感染 48 h 后经 0.25% 胰蛋白酶消化, 以每孔 6×10⁵ 个的密度接种于 6 孔板中, 同时以没有感染的 MEFs 做对照, 每孔加入 2 ml 培养液培养, 同一细胞做 3 个复孔, 每隔 2 天进行 1:3 传代并计数连续培养, 该实验重复两次, 绘制生长曲线。

1.4.3 细胞周期分析 取第 4 代及同代感染过 Adeno-CRE 病毒的转基因嵌合小鼠 MEFs 以每孔

4×10⁵ 个的密度接种于 6 孔板中, 48 h 后用 0.25% 胰蛋白酶消化制备单细胞悬液, 70% 乙醇 -20 °C 固定过夜, 1×PBS 冲洗后, 1 mg/ml RNA 酶 37 °C 消化, 1×PBS 重悬并加入碘化丙啶(propidium iodide, PI)室温避光染色 30 min, 流式细胞仪(FACs, Beckman Coulter)在 488 nm 激发波长下, 测定细胞荧光强度, 使用 FlowJo 软件对该细胞周期 DNA 含量进行分析, 确定细胞周期分布。

1.4.4 克隆与集落形成 分别配制 2% 和 0.8% 琼脂糖溶液, 混匀后高压灭菌, 置 50 °C 水浴; 配制 2×DMEM (2× 抗生素, 20% FBS)。按照 1:1 比例混合 2% 琼脂糖与 2×DMEM, 加入 6 孔板中, 室温下凝固。同时消化细胞, 制备单细胞悬液并计数。取 5×10⁴ 个细胞混入 0.8% 琼脂糖中 (体积比 1:1), 定量加入 6 孔板中, 制成双层软琼脂培养基^[10]。滴加 3~5 滴 1×DMEM, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 每隔 3~4 天进行补液, 培养 14 天, 观察细胞克隆形成情况。

1.5 Adeno-CRE 病毒诱导条件性基因嵌合小鼠产生肺部肿瘤

6 只 6 周龄 *p53^{loxp/loxp}*、*Lox-Stop-Lox-K-ras^{G12D}* 条件性基因嵌合小鼠, 对其中 3 只小鼠通过滴鼻法吸入 2×10⁶ cfu Adeno-CRE 病毒至肺, 诱发肺部肿瘤产生。病毒感染 18 周后处死小鼠, 解剖后发现肺部有肿瘤产生, 切下肿瘤进行石蜡包埋、切片及 HE 染色, Nikon 显微镜下观察。

2 结果

2.1 条件性基因嵌合小鼠及 MEFs 基因型的鉴定

抽提条件性基因嵌合小鼠的基因组 DNA, 利用 *p53^{loxp/loxp}* 及 *K-ras^{G12D}* 引物进行 PCR 扩增, 经琼脂糖凝胶电泳检测。结果发现用于研究肺癌动物模型的 4 只小鼠基因型均为 *p53^{loxp/loxp}*、*Lox-Stop-Lox-K-ras^{G12D}* (图 1A 和图 1B 的 1~4 号泳道)。用同样的方法鉴定取得的 MEFs 基因型, 经筛选获得一株基因型为 *p53^{loxp/loxp}*、*Lox-Stop-Lox-K-ras^{G12D}* 的 MEFs (图 1A 和图 1B 的 5 号泳道)。

2.2 条件性基因嵌合小鼠及其 MEFs 经 Adeno-CRE 处理后基因型及蛋白质水平鉴定

Adeno-CRE 腺病毒进入细胞能够表达 CRE 重组酶, CRE 重组酶可识别细胞 *p53* 基因的 LoxP 位点, 将 *p53^{loxp/loxp}* 剪切成为 *p53^{loxp/-}* 或者 *p53^{-/-}*, 使 *p53* 部分或完全失活; 同时将 *Lox-Stop-Lox-K-ras^{G12D}* 基因剪切成

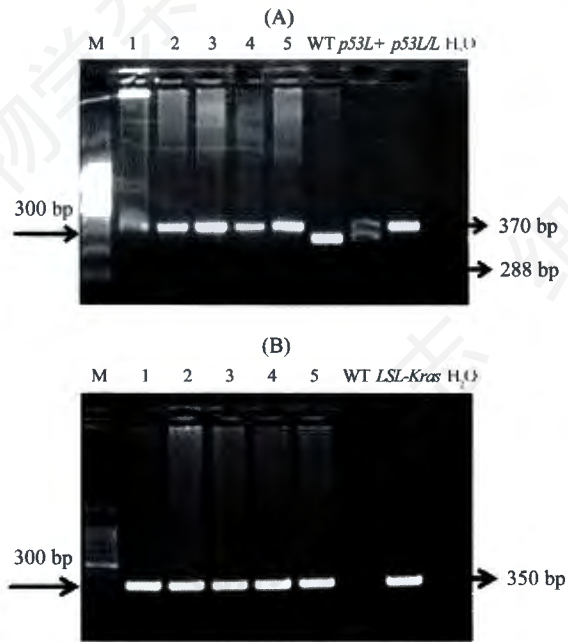


Fig.1; The result of genotyping

A: PCR product of *p53*^{loxp} in mouse tail samples (1-4) and MEFs (5);
B: PCR product of *K-ras*^{G12D} in mouse tail samples (1-4) and MEFs (5).

K-ras^{G12D} 表达组成性激活的 *K-ras*^{G12D} 突变体^[7]。Adeno-CRE处理后, 条件性基因嵌合小鼠肺部肿瘤组织的 *p53* 部分失活, *K-ras*^{G12D} 表达被激活(图 2A 和图 2B 的 1~3 号泳道); Adeno-CRE 处理后, 条件性基因嵌合小鼠 MEFs 的 *p53* 完全失活, *K-ras*^{G12D} 表达被激活(图 2A 和图 2B 的 4 号泳道)。*p53*^{loxp/loxp}、*Lox-Stop-Lox-K-ras*^{G12D} MEFs 在 Adeno-CRE 处理后, 利用 Western 印迹检测发现其 Ras 蛋白表达水平确有显著意义的提高。

2.3 *p53* 缺失协同 *K-ras*^{G12D} 激活可促进 MEFs 分裂和增殖

细胞异常增殖是肿瘤发生的重要一步。生长曲

线分析发现, Adeno-CRE 感染后转基因小鼠 *p53*^{loxp/loxp}、*Lox-Stop-Lox-K-ras*^{G12D} MEFs 的增殖速度明显快于没有被感染的 MEFs, 也明显快于仅 *p53* 缺失的 MEFs (图 3A)。进一步细胞流式实验发现对照组分裂期 MEFs 细胞占 19%, Adeno-CRE 处理过的 *p53*^{loxp/loxp} 四倍体 MEFs 细胞可达到 26%, 而经 Adeno-CRE 处理过的 *p53*^{loxp/loxp}、*Lox-Stop-Lox-K-ras*^{G12D} 四倍体 MEFs 细胞可达到 34%, 与对照组相比, 其四倍体细胞增加了近一倍, 与单独的 *p53* 缺失相比, 也提高近 10% (图 3B)。结果表明, *p53* 缺失协同 *K-ras*^{G12D} 激活可能通过增强细胞分裂来促进细胞增殖, 即 *p53* 缺失协同 *K-ras*^{G12D} 激活在细胞的异常增殖过程中具有重要的作用^[11~13]。

2.4 *p53* 缺失协同 *K-ras*^{G12D} 激活可促进 MEFs 转化

单细胞克隆成集落能力和非锚定依赖性生长能力是肿瘤更进一步的发生发展特征。克隆与集落形成实验表明, Adeno-CRE 感染后的 *p53*^{loxp/loxp}、*Lox-Stop-Lox-K-ras*^{G12D} MEFs 可以在软琼脂中增殖并长成克隆团(图 4A g、图 4A h、图 4A i), 而对照组 MEFs 不能形成可见的克隆团(图 4A a、图 4A b、图 4A c), 单独的 *p53*^{loxp/loxp} 在感染 Adeno-CRE 后可以形成克隆, 但是数目较少, 且克隆也较小(图 4A d、图 4A e、图 4A f)。对可见的克隆数量进行统计分析, 结果显示 *p53* 缺失协同 *K-ras*^{G12D} 激活在促进小鼠 MEFs 转化上具有显著性意义(图 4B)。

2.5 *p53* 缺失协同 *K-ras*^{G12D} 激活可诱发肺部腺癌产生

Adeno-CRE 感染 18 周的 3 只小鼠经处死、解剖后, 其肺部均见多个淡黄色半透明的小结节, 直径约为 2~3 mm。将该小结节经石蜡切片并 HE 染色, 镜下观察发现该组织呈腺腔样结构, 细胞呈圆形及梭形, 细胞质丰富, 核大呈圆形, 核仁明显, 核分裂象多

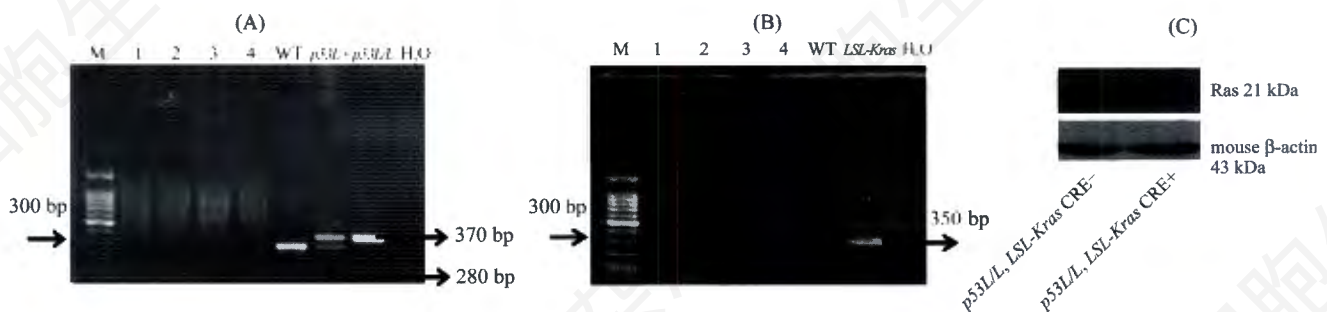


Fig.2 The result of genotyping after Adeno-CRE treatment

A: PCR product of *p53*^{loxp} in lung tumor samples (1-3) and MEFs (4); B: PCR product of *K-ras*^{loxp} in lung tumor samples (1-3) and MEFs (4);
C: Western blot analysis for Ras expression in *p53*^{loxp/loxp}、*Lox-Stop-Lox-K-ras*^{G12D} cell line with or without Adeno-CRE.

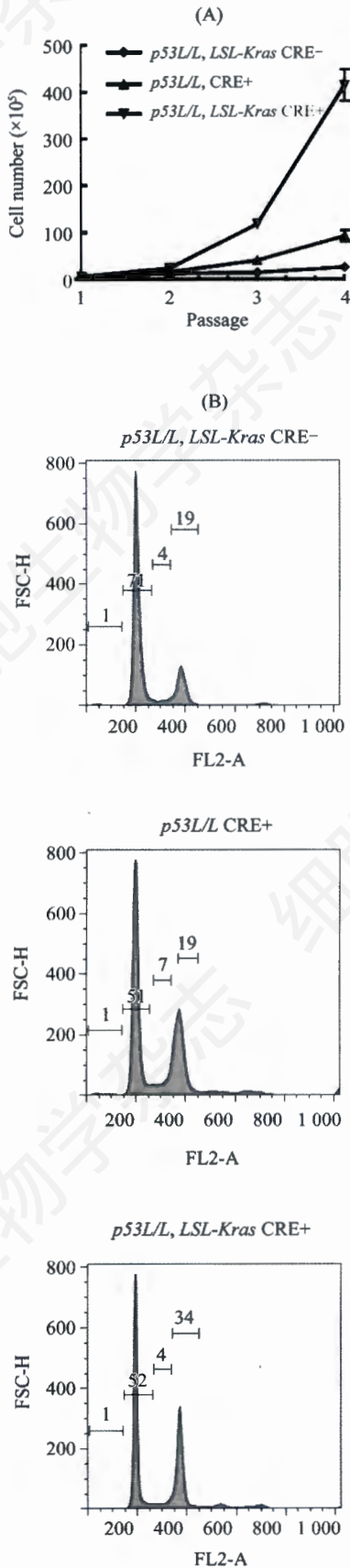


Fig.3 Cell proliferation and cell division analysis

A: growth curve; B: cell cycle detected by FACS.

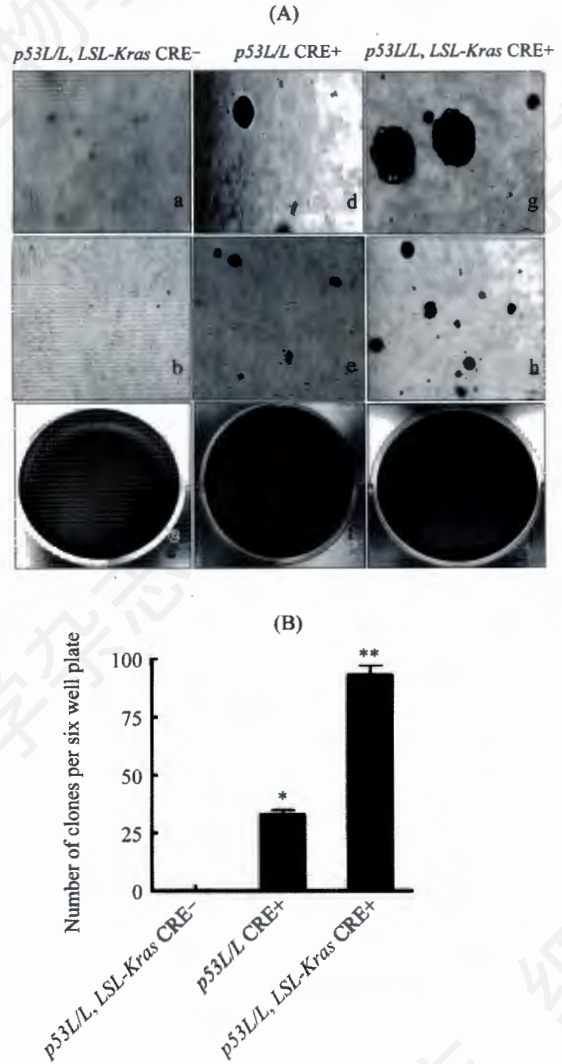


Fig.4 Soft agar assay

A: anchorage-independent growth in MEFs (a, d, g: 100 \times ; b, e, h: 40 \times); B: clone number analysis. * $P < 0.005$, ** $P < 0.001$.

见, 鉴定为腺癌(图 5B); 同批作为对照的小鼠肺部组织没有发现任何异常(图 5A)。体内组织病理学分析表明 *p53* 缺失协同 *K-ras*^{G12D} 激活突变可诱发肺部腺癌产生。

3 讨论

肺癌的发病机制非常复杂, 涉及很多因素, 包括多种环境因素和遗传因素的改变。遗传因素中各类相关基因并非各自独立地发生作用, 而是相互配合、相互调控, 构成错综复杂的网络, 可以说肺癌的发生是累积性基因损伤在转化表型方面达到一定程度的表现^[4,14,15]。而以往的研究往往只关注某一个基因对肺癌产生的影响, 忽略了生物体内细胞增殖、分

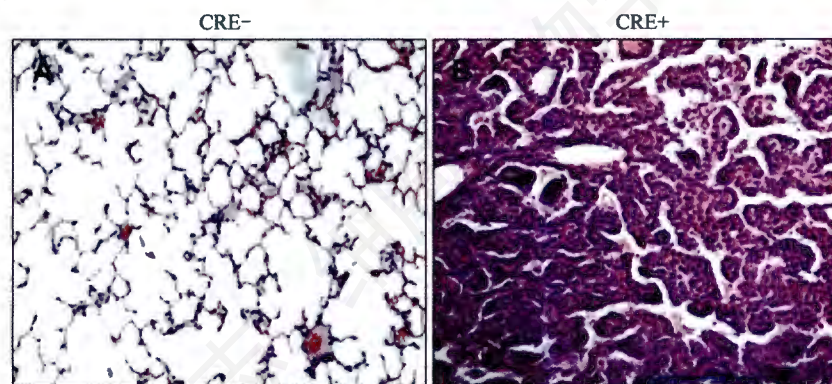


Fig.5; The result of HE (200×)

A: HE staining of lung in *p53*^{loxP/loxP}, *Lox-Stop-Lox-K-ras*^{G12D} mice without Adeno-CRE treatment; B: HE staining of lung in the *p53*^{loxP/loxP}, *Lox-Stop-Lox-K-ras*^{G12D} mice after 18 weeks of Adeno-CRE treatment.

化、凋亡等生命过程受抑癌基因与原癌基因两种正、负调控及其协同作用。

p53 基因是人们非常熟悉的一个抑癌基因, 大约 50% 的人类癌症与它有关, 在肝癌、乳腺癌、膀胱癌、胃癌、食道癌、肺癌等均检测到 *p53* 基因的突变^[3,16-18]。有研究还发现 *p53* 参与细胞对 DNA 损伤的应答, 比如介导人胚肺成纤维细胞停滞在 G₁-S 期^[17,18]。*K-ras* 是 *Ras* 基因家族重要成员, 其突变与肺癌关系非常密切, 常常发生于 12、13 和 61 位密码子处, 其中以第 12 位密码子处突变率最高^[19]。临床数据统计发现, 大部分肺癌病人既有 *p53* 基因的突变, 又有 *K-ras* 基因突变。此外有实验发现, *K-ras* 突变需协同其他抑癌基因失活或原癌基因激活才可导致细胞的异常增殖, 单独的 *K-ras* 激活则会加速成纤维细胞的衰老和凋亡, 有研究报道单独的 *p53* 缺失可造成小鼠肿瘤的易感性, 因此推测肺癌的发生可能需要 *p53* 失活和 *K-ras* 激活二者的协同作用^[20-22]。

为研究 *p53* 和 *K-ras* 两者之间的协同作用, 我们构建 *p53*^{loxP/loxP}、*Lox-Stop-Lox-K-ras*^{G12D} 条件性基因嵌合小鼠模型。通过体外培养条件性基因嵌合小鼠 MEFs, 发现内源性 *p53* 缺失协同 *K-ras*^{G12D} 基因激活可促进 MEFs 的分裂、增殖, 而细胞异常增殖是肿瘤发生早期的重要一步; 进一步研究发现, *p53* 缺失协同 *K-ras*^{G12D} 基因激活可使 MEFs 获得单细胞克隆成集落能力和非锚定依赖性生长能力, 而具备这两种能力是肿瘤细胞恶化的又一表现; 小鼠体内进一步的实验证实, *p53* 缺失协同 *K-ras*^{G12D} 突变激活可诱发肺部腺癌的产生, 表明 *p53* 基因和 *K-ras* 基因二者的协同对动物的成瘤性具有重要作用。上述研究工作, 将在很大程度上提高人们对 *p53* 基因和 *K-ras* 基因在肺癌

发生发展中的认识, 为以后的研究提供了一个好的动物模型, 对深入研究肺癌的发生发展机制打下了基础。

参考文献(References)

- [1] Le Calvez F, Mukeria A, Hunt JD, et al. TP53 and KRAS mutation load and types in lung cancers in relation to tobacco smoke: distinct patterns in never, former, and current smokers, *Cancer Res*, 2005, 65(12): 5076-5083
- [2] DeMarini DM, Landi S, Tian D, et al. Lung tumor KRAS and TP53 mutations in nonsmokers reflect exposure to PAH-rich coal combustion emissions, *Cancer Res*, 2001, 61(18): 6679-6681
- [3] Tanizaki Y, Jin L, Scheithauer BW, et al. P53 gene mutations in pituitary carcinomas, *Endocr Pathol*, 2007, 18(4): 217-222
- [4] Tuveson DA, Shaw AT, Willis NA, et al. Endogenous oncogenic *K-ras*^{G12D} stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects, *Cancer Cell*, 2004, 5(4): 375-387
- [5] Tsumura H, Yoshida T, Saito H, et al. Cooperation of oncogenic *K-ras* and *p53* deficiency in pleomorphic rhabdomyosarcoma development in adult mice, *Oncogene*, 2006, 25(59): 7673-7679
- [6] Konishi H, Karakas B, Abukhdeir AM, et al. Knock-in of mutant *K-ras* in nontumorigenic human epithelial cells as a new model for studying *K-ras* mediated transformation, *Cancer Res*, 2007, 67(18): 8460-8467
- [7] Seidler B, Schmidt A, Mayr U, et al. A Cre-loxP-based mouse model for conditional somatic gene expression and knock-down *in vivo* by using avian retroviral vectors, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(29): 10137-10142
- [8] Kojima K, Vickers SM, Adsay NV, et al. Inactivation of *Smad4* accelerates *Kras*^{G12D}-mediated pancreatic neoplasia, *Cancer Res*, 2007, 67(17): 8121-8130
- [9] Vemuri MC, Schimmel T, Colls P, et al. Derivation of human embryonic stem cells in xeno-free conditions, *Methods Mol Biol*, 2007, 407: 1-10
- [10] Vasseur S, Hoffmeister A, Garcia S, et al. *p8* is critical for tumour development induced by *ras*^{V12} mutated protein and E1A

- oncogene, *EMBO Rep*, 2002, 3(2): 165-170
- [11] Jiao S, Liu B, Gao A, *et al.* Benzo(a)pyrene-caused increased G₁-S transition requires the activation of c-Jun through p53-dependent PI-3K/Akt/ERK pathway in human embryo lung fibroblasts, *Toxicol Lett*, 2008, 178(3): 167-175
- [12] Hohla F, Schally AV, Kanashiro CA, *et al.* Growth inhibition of non-small-cell by BN/GRP antagonist is linked with suppression of K-Ras, COX-2, and lung carcinoma pAkt, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(47): 18671-18676
- [13] Cann KL, Hicks GG. Absence of an immediate G₁/S checkpoint in primary MEFs following γ -irradiation identifies a novel checkpoint switch, *Cell Cycle*, 2006, 5(16): 1823-1830
- [14] Hwang SJ, Cheng LS, Lozano G, *et al.* Lung cancer risk in germline p53 mutation carriers: association between an inherited cancer predisposition, cigarette smoking, and cancer risk, *Hum Genet*, 2003, 113(3): 238-243
- [15] Bumroongkit K, Rannala B, Traisathit P, *et al.* TP53 gene mutations of lung cancer patients in upper northern Thailand and environmental risk factors, *Cancer Genet Cytogenet*, 2008, 185(1): 20-27
- [16] Slebos RJ, Rodenhuis S. The molecular genetics of human lung cancer, *Eur Respir J*, 1989, 2(5): 461-469
- [17] Jacks T, Remington L, Williams BO, *et al.* Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice, *Curr Biol*, 1994, 4(1): 1-7
- [18] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, *et al.* p53 mutations in human cancers, *Science*, 1991, 253(5015): 49-53
- [19] Magistrelli P, Neri M, Granone P, *et al.* K-ras mutations in circulating DNA from pancreatic and lung cancers: bridging methodology for a common validation of the molecular diagnosis value, *Pancreas*, 2008, 37(1): 101-102
- [20] Garfield D. Can K-ras-mutated atypical adenomatous hyperplasia be another precursor lesion for mucinous bronchioalveolar carcinoma?, *Am J Clin Pathol*, 2008, 129(2): 202-210
- [21] Lawrence A, Michele H, Slagle BL, *et al.* Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors, *Nature*, 1992, 356(6366): 215-221
- [22] Ferbeyre G, de Stanchina E, Lin AW, *et al.* Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence, *Mol Cell Biol*, 2002, 22(10): 3497-3508

The Impact of *K-ras*^{G12D} Activation and *p53* Loss upon Tumorigenesis

Zuo-Yun Wang¹, Yi-Hua Sun², Xiao-Lei Ye², Li Li², Hong-Bin Ji², Xin-Yuan Liu^{1,2}, Yi-Gang Wang^{1*}

¹Xin Yuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

²Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract To study the function of *p53* loss and *K-ras*^{G12D} activation on lung tumorigenesis, we have constructed the hybrid mouse with a conditional knockout *p53* allele and conditional knockin *K-ras*^{G12D} allele, obtained the hybrid mouse embryonic fibroblasts (MEFs). *In vitro* studies have showed that activation of *K-ras*^{G12D} together with *p53* loss in MEFs promoted the increased cell division, proliferation and transformation. *In vivo* studies have demonstrated that simultaneous activation of *K-ras*^{G12D} and *p53* loss induced lung adenocarcinoma formation in mice.

Key words *p53*; *K-ras*; transformation; tumorigenesis; lung adenocarcinoma

Received: November 15, 2008 Accepted: February 12, 2009

The work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30800093), Zhejiang Science & Technology Support Plan (No.2007C33027) and Zhejiang Sci-Tech University Grant (No.0616033)

*Corresponding author. Tel: 86-571-86843186, Fax: 86-571-86843185, E-mail: ygwang@sibs.ac.cn