

# 人肝癌细胞株 QGY-7703 的 p 53 基因及其表达研究\*

王厚义 黄青山 陈翠微 罗祖玉\*\*

谢毅 刘建平

(复旦大学生理学与生物物理学系 200433)(复旦大学遗传工程国家重点实验室 200433)

苏兆众

(Department of Urology Columbia University New York 10032 USA)

肿瘤抑制基因 p 53 是维持细胞生长和抑制肿瘤发生的重要因子, 它的突变几乎同所有种类的人类肿瘤相关<sup>[1]</sup>。在各种癌组织(如肝癌, 乳腺癌, 肺癌等)中, p 53 基因都有较高的突变频率<sup>[2]</sup>。国外曾对 10 余种建株肝癌细胞的 p 53 及 Rb 基因作过系统的研究<sup>[3,4]</sup>, 对国内建株的肝癌细胞尚未有类似的研究报告。人肝癌细胞株 QGY-7703 建株于 1977 年<sup>[5]</sup>, 它的细胞学特性研究表明是恶性程度较高的癌细胞株。本实验室曾将野生型 p 53 基因导入 QGY-7703 细胞中, 发现转化后的细胞绝大部分(95%)不能形成集落<sup>[6]</sup>, 表明外源 p 53 基因能够降低 QGY-7703 细胞的恶性程度。本研究报道 QGY-7703 细胞 p 53 基因及其表达水平, 为 p 53 基因治疗干预实验, p 53 与有抑瘤作用的细小病毒<sup>[7]</sup>的相关性等研究提供背景资料。

## 材料与方 法

### 一、材料

肝癌细胞株 QGY-7703; 对照细胞株: HMEC (正常人乳腺上皮细胞, p 53<sup>+</sup>), Saos-2(骨肉瘤细胞株, p 53<sup>-</sup>), T 47 D(乳腺癌细胞株, p 53<sup>-</sup>), MCF 7(乳腺癌细胞株, p 53<sup>+</sup>), NBK(SV 40 转化的新生儿肾细胞, p 53<sup>+</sup>); HepG 2 和 PLC/PRF/5(均为肝癌细胞株)。DMEM, RPMI 1640, MEM 3 种培养基(均为 GIBCO BRL 公司产品)。小牛血清(杭州四季青生物材料研究所), 谷氨酰胺(政翔化学试剂所), 卡那霉素(上海海普药厂), 庆大霉素(上海第一生化药业公司)。载体质粒 M 13 mp 18/19(华美生物工程公司)。菌种: E. coli TG 1 菌株(本实验室保存)。限制性内切酶: Sma I, EcoR I, Hind III, Klenow 酶(宝灵曼公司)。

T 4 DNA 连接酶, 激酶, 逆转录反应试剂盒, DNA 纯化试剂盒(Promega 公司)。<sup>35</sup>S-Met (NEN, Express <sup>35</sup>S), 抗 p 53 蛋白和抗 actin 蛋白的单克隆抗体(Oncogene Science), 蛋白分子量标记(Amersham 公司), 免疫组织化学试剂盒(华美生物工程公司)。

### 二、方法

1. 细胞培养, 基因组 DNA 及细胞总 RNA 的提取 细胞株 QGY-7703 用 RPMI 1640 培养基培养, NBK 细胞用 MEM 培养基培养, 其余细胞均由 DMEM 培养基培养, 其中含 10% 小牛血清, 1.0% 谷氨酰胺, 50 U/ml 卡那霉素, 20 U/ml 庆大霉素; 37℃, 5% 二氧化碳培养。细胞基因组 DNA 和总 RNA 的提取均按文献<sup>[8,9]</sup>。提取出来的 DNA 和 RNA 经紫外分光光度计测 A<sub>260</sub> 值定量。

2. 17 号染色体短臂等位基因分析 按文献<sup>[3]</sup>合成三条寡聚核苷酸:

H 20: 5'-CGAAGAGTGAAGTGCACAGG-3'

H 21: 5'-CACAGTCTTTATTCTTCAGCG-3'

H 30: 5'-TGTGAGACCCCTCCCTTACAGAA G-CAATGAG-3'

以 H 20 和 H 21 为引物, 基因组 DNA 为模板进行 PCR(Polymerase Chain Reaction)扩增反应<sup>[10]</sup>, PCR 产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 转移至尼龙膜, 用 T 4 DNA 多聚核苷酸激酶和 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] dATP 标记探针(H 30)进行杂交, 放射自显影。

3. PCR-SSCP 分析 用于做 PCR-SSCP(Single Strand Conformation Polymorphism)的引物由陈永泉博士提供(Clontech 公司合成), 操作参照文献<sup>[11]</sup>, 具体如下: 用 200 ng 基因组 DNA 为反应模板, 用 PCR 仪(Perkin Elmer 公司)对外显子 4-9 片段分别进行扩增, PCR 产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电

\* 本工作得到国家自然科学基金资助。

\*\* 联系人。

泳检测,取每管产物的十分之一,沸水变性,冰浴。样品经8%聚丙烯酰胺凝胶电泳,0.2%硝酸银溶液染色以显示单链条带。

4. cDNA 片段的克隆/序列分析 为克隆 p 53 cDNA 片段,我们按 Genbank 库中 p 53 基因序列设计了两条引物

P 1: 5'-GGTCGACTGACACGCTTCCCTGGA-TTGG-3'

P 2: 5'-GGATCCTGCTTCTGACGCACACCT-ATTG-3'

另按文献<sup>[12]</sup>合成了引物 P 3 和 P 4

P 3: 5'-CATCCAAATACTCCACACGC-3'

P 4: 5'-CCTCCTCAGCATCTTATCCG-3'

所有引物合成均由美国 ABI 381 A DNA 合成仪完成。

取 8 μg 细胞总 RNA 进行逆转录反应,操作过程按试剂盒说明书。取十分之一逆转录产物为模板, P 1 和 P 2 为引物进行第一轮 PCR 扩增反应。以第一轮 PCR 产物为模板, P 1 和 P 3, P 2 和 P 4 分别配对作为引物进行第二轮扩增反应,其产物经激酶磷酸化, Klenow 酶补平末端,用 T 4 DNA 连接酶连接到 SmaI 酶切的 M 13 mp 18 载体当中,转化大肠杆菌 TG 1,筛选阳性克隆。提取阳性克隆的 RFDNA (M 13 重组噬菌体复制型 DNA), EcoR I 和 Hind III 双酶切下目的片段,连接到同样双酶切的 M 13 mp 19 载体中,得到同一片段的反向克隆。上述基因克隆操作参照文献<sup>[13]</sup>。从含 p 53 cDNA 片段的克隆中提取重组 M 13 噬菌体单链 DNA,用美国 ABI 373 A 自动测序仪进行序列测定。

5. Northern blot 分析 Northern blot 操作参考文献<sup>[14]</sup>。具体如下:取 10 μg 细胞总 RNA 用已二醛/二甲亚砷变性后,经 1.0% 琼脂糖电泳,转移至尼龙膜。然后,用 <sup>32</sup>P 标记的 p 53 和 GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, RNA 上样量参照)的 cDNA 探针杂交,洗膜,放射自显影。

6. 免疫组织化学分析 细胞接种于无菌载玻片至基本长满,冷丙酮固定,以含 10% 小牛血清的磷酸盐缓冲液封闭。用 1:50 稀释的抗 p 53 蛋白的抗体 (Pab 1801, Pab 421 或 Pab 240) 于 37°C 温育 60 分钟,然后加 1:50 稀释的生物素化第二抗体 (兔抗鼠) 于 37°C 温育 30 分钟,加 1:50 稀释的亲合素-辣根过氧化物酶,37°C 温育 30 分钟,最后,以 DAB 溶液染色,苏木精溶液复染色,封片,拍照。

7. 免疫沉淀分析 免疫沉淀操作参照文献<sup>[15]</sup>。细胞在直径 10 cm 的培养皿中生长至 80% 满,换用不含甲硫氨酸的培养基于 37°C 饥饿 1 小时,然后细胞在含 <sup>35</sup>S-Met (NEN; Express <sup>35</sup>S) 的培养基中培养 4 小时,低温裂解细胞。裂解物经离心去除杂物,加抗 p 53 蛋白或抗 actin 蛋白的单克隆抗体 (Oncogene Science) 混和,4°C,置 24 小时,加 50 μl 蛋白 G-agarose (Oncogene Science),于 4°C 滚动培养 1 小时。蛋白 G 结合物颗粒经洗脱杂物后加入 30 μl SDS 凝胶电泳上样缓冲液,于 87°C 温育 3 分钟。样品在 40 V 电压下,10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳过夜,电泳时用 Amersham 公司的 Rainbow 蛋白分子量标准。电泳完毕,凝胶经固定,水洗,干燥,放射自显影。

## 结 果

### 1. 17 号染色体短臂等位基因分析

在 17 号染色体短臂 p 53 基因位点附近有一紧密连锁的 VNTR 区域 (variable number of tandem repeats), 重复序列为 75 bp, 拷贝数从 1—11 呈长度多态性,人群中该位点杂合性占 86%<sup>[10]</sup>, H 20, H 21 为其侧翼的部分序列, H 30 为重复序列中的部分序列。以 H 20 和 H 21 为引物,基因组 DNA 为模板扩增该 VNTR 区域,然后用 H 30 为探针进行杂交鉴定,可以判断该区域是否为杂合性缺失。从图 1 可以看出, QGY-7703 细胞同 PLC/PRF/5 一样, 出现单一杂交条带, HepG 2 细胞出现两条杂交条带。



图 1 QGY-7703 细胞 17 号染色体短臂等位基因分析

HepG 2 细胞显示两条带, QGY-7703 和 PLC/PRF/5 显示单一条带。

### 2. QGY-7703 细胞 p 53 基因组 DNA 突变热点区的分析

在 p 53 基因异常的大多数人类肿瘤中, p 53 基因的突变点大都集中在外显子 5—8<sup>[2]</sup>。

利用 PCR-SSCP 技术,对 QGY-7703 细胞 p 53 的外显子 4,5,6,7,8,9 分别进行扩增,根据聚

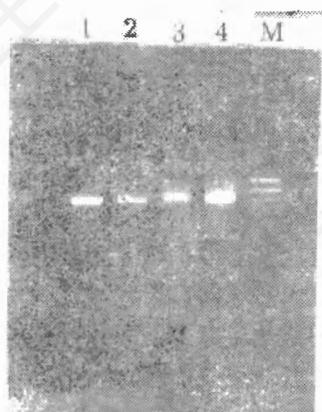


图 2 QGY-7703 细胞 p 53 cDNA 的 PCR 产物泳道 1, 2: 680 bp 片段, 泳道 3, 4: 740 bp 片段。M: DNA 分子量标准。

丙烯酰胺凝胶上单链条带的位置分析,在 4, 5, 6, 7, 8, 9 六个外显子的基因组 DNA 上未发现异常条带(图略);此外,对外显子 6 和 7 的 PCR 样品进行序列分析,未曾发现点突变。

### 3. QGY-7703 细胞 p 53 基因 cDNA 序列分析

利用逆转录 PCR 方法,从 QGY-7703 细胞的总 RNA 逆转录 PCR 产物中克隆到 p 53 基因的两个片段(740 bp, 680 bp)(图 2),这两个片段包含了编码蛋白的全序列,两个片段有 55 bp 重叠。将两个片段克隆到 M 13 mp 18/19 载体中,提取含目的片段的 M 13 单链 DNA 进行序列分析,部分测序结果见图 3,序列分析表明,克隆的 p 53 基因 cDNA 序列中未发现突变。

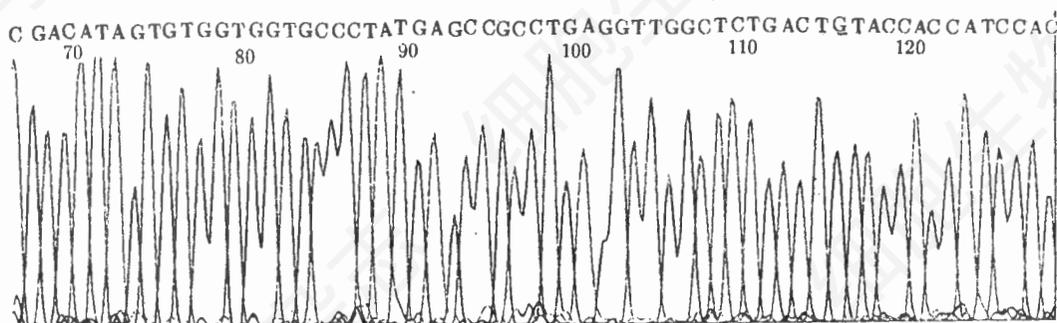


图 3 部分 cDNA 序列分析结果

### 4. QGY-7703 细胞 p 53 基因 mRNA 表达水平的分析

在几种对照细胞中,HMEC(正常大乳腺上皮细胞)及 MCF 7(乳腺癌细胞株) p 53 mRNA 表达水平正常,其余癌细胞株均存在 p 53 基因表达异常。从 Northern blot 分析结果(图 4)可以看出,肝癌细胞株 QGY-7703 同 T 47 D 细胞株一样,其 p 53 mRNA 表达水平比 HMEC 及 MCF 7 的 p 53 mRNA 表达水平要低很多,而 Saos 2 细胞已无法用 Northern blot 方法检测到其 p 53 mRNA。

### 5. QCY-7703 细胞 p 53 蛋白的研究

细胞 NBK 为 SV 40 病毒大 T 抗原基因转

化的新生儿肾细胞,其 p 53 基因正常,但 p 53 蛋白由于同大 T 抗原结合而致半衰期增长,细胞中 p 53 蛋白含量较高。经免疫组织化学染色,NBK 细胞核呈棕色(阳性),QGY-7703 细胞核呈蓝紫色(阴性),表明 QGY-7703 细胞中 p 53 蛋白含量可能极低以致用该技术无法检测出来;此外,Western blot 也得到同样的结果。随后,用 HMEC, MCF 7, Saos 2, T 47 D 等细胞为 p 53 阳性及阴性对照进行免疫沉淀分析,结果表明(图 5),QGY-7703 细胞同 T 47 D, Saos 2 细胞一样,p 53 蛋白含量极微,正常细胞 HMEC 和癌细胞 MCF 7 p 53 蛋白表达较高,这同 Northern blot 分析结果基本一

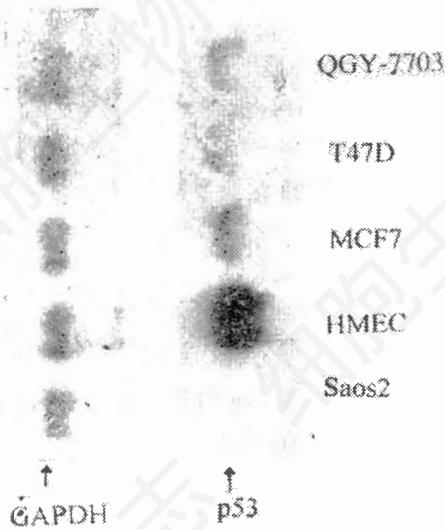


图4 QGY-7703细胞p53 mRNA表达的Northern blot分析

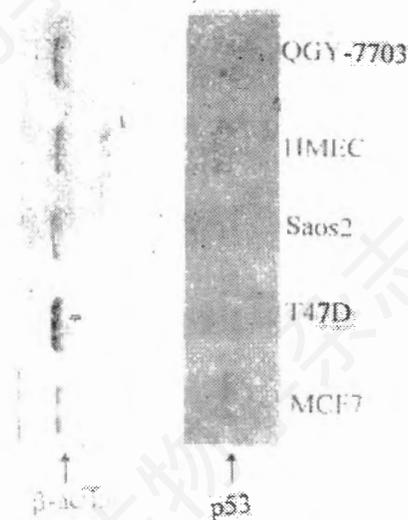


图5 QGY-7703细胞p53蛋白免疫沉淀分析

致

## 讨 论

p53基因是目前所知人类肿瘤当中突变频率最高的肿瘤抑制基因<sup>[1]</sup>,很多研究资料表明,它在细胞内的功能涉及到细胞的增殖,细胞分化和细胞程序性死亡<sup>[10]</sup>。p53基因突变的细胞往往表现为增殖失控,分化及程序性死亡受

阻等。近年来已经从蛋白质晶体学的角度搞清了p53蛋白同DNA的结合位点<sup>[17]</sup>,从而清晰地阐明了p53基因功能的分子机理。随着研究的深入,已经越来越有理由相信p53基因是癌变机理中一个极其重要的分子。几年来,本实验室在探讨抑制肝癌途径过程中,曾将野生型p53基因导入人肝癌细胞株QGY-7703中,发现导入外源基因的细胞大部分(95%)体外培养不能形成集落,而个别形成集落的细胞的恶性程度大为降低,如软琼脂中集落形成率比原细胞要低一半以上,在裸鼠体内成瘤能力为原细胞的五分之一<sup>[6]</sup>等。为进一步利用肝癌细胞株QGY-7703为实验材料进行p53基因与有抑癌作用的细小病毒H-1的协同效应,p53基因治疗干预(Intervention)试验等方面的研究,搞清楚该细胞p53基因的背景是极为重要的。

本论文首先对17号染色体进行等位基因分析,其中HepG2, PLC/PRF/5两种细胞的结果同国外报道一致<sup>[8]</sup>。因为17号染色体短臂上的VNTR位点具有高度长度多态性,QGY-7703细胞只出现一条杂交条带表明该位点同PLC/PRF/5细胞的对应位点一样,存在杂合性缺失,从而与之紧密连锁的p53基因也可能存在同样缺失。利用PCR-SSCP技术对QGY-7703细胞p53基因组上突变热点区的4,5,6,7,8,9各外显子进行检测,均未发现有点突变,除PCR-SSCP外,还对外显子6和7的DNA序列进行过序列分析,对外显子7上突变热点位点(氨基酸248,249位)进行过酶切分析,得到的结果与PCR-SSCP的相同,也未发现点突变。曾有文献报道<sup>[12]</sup>,在肝癌组织中发现了p53基因剪接突变现象,为验证QGY-7703细胞中是否也存在此种突变,利用逆转录PCR方法,克隆了细胞p53基因cDNA的两个片段,这两个片段包含了p53基因的蛋白编码序列,序列分析表明cDNA当中没有出现移码,缺失,插入以及碱基改变等剪接错误造成的突变。因此,我们认为QGY-

7703 细胞的 p 53 基因结构未发生突变。

在基因表达方面, Northern blot 分析结果表明, QGY-7703 细胞 p 53 mRNA 表达水平很低; 而在对 p 53 蛋白分析中, 曾使用三种分析技术: 即免疫组织化学方法, Western blot 方法, 免疫沉淀方法。其中前两种方法均未在 QGY-7703 细胞中检测到 p 53 蛋白(图 6)(注, NBK 细胞能够用 Western blot 检测到 p 53 蛋白表达); 免疫沉淀结果表明, QGY-7703 细胞中 p 53 蛋白含量极微(这同 Northern blot 结果对应)。p 53 基因的低水平表达可能与两种因素有关, 一是细胞中存在等位基因缺失, 二是细胞内 p 53 基因表达调控系统产生突变, 从而使它表达受阻, 这些都需要进一步实验证实。

一个基因在细胞内要维持正常的功能不仅要求基因产物在结构上是正常的, 而且要求其表达水平也是正常的。QGY-7703 细胞野生型 p 53 基因的低水平表达可能正是导致该细胞恶性程度较高的原因之一。我们已经观察到外源 p 53 基因在 QGY-7703 细胞中所引起的细胞特性的改变, 表明该细胞可能是进行 p 53 基因表达失控或基因治疗研究的一个很好的实验模型。

### 摘 要

本文利用等位基因分析, PCR-SSCP, RT-PCR/序列分析, Northern 印迹, 免疫组织化学, Western 印迹, 免疫沉淀等方法对人肝癌细胞株 QGY-7703 的 p 53 基因背景进行了研究, 发现 17 号染色体短臂可能存在等位基因缺失, 在 p 53 基因的编码序列上没有发现任何突变, 但发现其 mRNA 和蛋白表达水平很低, 表明在 QGY-7703 细胞中 p 53 基因

的低水平表达可能同细胞的恶性程度有关。

**关键词:** 肿瘤抑制基因 p 53 PCR/SSCP RT-PCR/序列分析 Northern 印迹 免疫沉淀

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Culotte E. et al., 1993, *Science*, 262: 1958—1961.
- [ 2 ] Greenblat MS et al., 1994, *Cancer Res.*, 54: 4855—4878.
- [ 3 ] Puisieux A. et al., 1993, *FASEB J.* 7: 1407—1413.
- [ 4 ] Lin Y. et al., 1996, *Ann. Acad. Med. Singapore*, 25: 22—30.
- [ 5 ] 王金兵等, 1981, 中华肿瘤杂志, Vol. 3 (4): 241—244.
- [ 6 ] \*罗祖玉等, 1996, 中国学术期刊文摘(科技快报), Vol. 2(10): 115.
- [ 7 ] Yan S. et al., 1994, *Cell Res.*, 4: 47—56.
- [ 8 ] Hirt B. et al., 1967, *J. MOL. Biol.*, 26: 266—268.
- [ 9 ] Chomczynski P. & N. Sacchi, 1987, *Analytical Biochemistry*, 162:156—159.
- [ 10 ] Horn GT et al., 1989, *Nucleic Acids Res.*, 17: 2140.
- [ 11 ] Upabhyay S. et al., 1995, *Cancer Res.*, 55: 4520—4524.
- [ 12 ] Lei MY et al., 1993, *Cancer Res.*, 53: 1653—1656.
- [ 13 ] J. 萨姆布鲁克等, 1993, 《分子克隆实验指南》, 第二版, 科学出版社.
- [ 14 ] Su ZZ et al., 1991, *Mol. Carcinog.*, 4: 328—337.
- [ 15 ] Jiang H. et al., 1995, *Oncogene*, 11: 2477—2486.
- [ 16 ] Lawrence AD & B. Allan, 1993, *Biochemica & Biophysica Acta*, 1155: 181—205.
- [ 17 ] Cho Y. et al., 1994, *Science*, 265: 346—355.

## STUDY ON THE p 53 GENE IN HUMAN HEPATOMA CELL LINE QGY-7703 AND ITS EXPRESSION

WANG Hou Yi HUANG Qing Shan CHEN Cui Wei LUO Zu Yu et al.  
(Department of Physiology and Biophysics Fudan University Shanghai 200433)

### ABSTRACT

p 53 gene in human hepatoma cell line QGY-7703 was studied with following methods: 17 p alleles analysis, PCR-SSCP, RT-PCR/sequencing, Northern blot, immunohistochemistry, Western blot and immunoprecipitation. There may exist allelic loss in the vicinity of p 53 gene on chromosome 17 p. Whereas no any point mutations were found in the coding region of p 53 gene in the cell, Northern blot and immunoprecipitation experiments showed its expression is quite low, which may be relative with the malignancy of the cell.

**Key words:** Tumor suppressor gene p 53 PCR/SSCP RT-PCR/sequencing Northern blot Immunoprecipitation

## 肾小球系膜细胞株的建立及影响其生长的因素\*

刘静芳 温进坤

(河北医科大学基础医学研究所生化室 石家庄 050017)

肾小球系膜细胞(MC)属于特化的可收缩的平滑肌细胞类,能合成并分泌多种参与肾小球结构与功能调节的蛋白因子<sup>[1]</sup>。已经证明,多种类型的肾小球疾病均与MC异常增殖有关<sup>[2]</sup>。因此确定影响MC增殖的因素及其作用机制有助于阐明多种肾小球疾病的发病机理,并为该疾病的防治提供理论依据。

MC的体外培养是研究其增殖调控的首要步骤。虽然有关MC的培养方法国内外均已报道<sup>[3-5]</sup>,但不同实验室所采用的培养条件差别较大,且均未详尽描述培养过程。本文探讨

了体外培养MC的适宜条件,在成功建立MC株后,观察了多种肽类因子对其增殖的影响,并首次报道胰岛素对多种肽类因子的促MC增殖效应具有协同作用。

### 材料和方法

#### 一、材料

胰岛素系Sigma公司产品,碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和肿瘤坏死因子(TNF $\alpha$ )购于北京邦定生物工程公司,RPMI 1640系GIBCO公司产品。<sup>3</sup>H-

\* 河北省自然科学基金资助项目

本刊1998年定价不变,全年4期共计人民币拾捌元整。请就近向当地邮局办理订阅(邮发代号4—296)。