

[文章编号] 1674-8115(2011)06-0744-04

· 论著 ·

p16 基因克隆及其对结肠癌细胞 SW480 生长的抑制作用

孟庆凯，张菁茹，王辉

(辽宁省肿瘤医院肠外科，沈阳 110042)

[摘要] 目的 探讨 p16 基因对结肠癌细胞生长的抑制作用。方法 采用亚克隆技术将 p16 基因克隆入真核表达载体 pEGFP-N3 中, Lipofectamine 法将 p16 基因转染入结肠癌细胞株 SW480。采用 MTT 法检测未转染细胞(SW480 组)、转染空质粒细胞(SW480-GFP 组)和转染 p16 细胞(SW480-p16 组)培养 24、48 和 72 h 后细胞的增殖率;Real-Time PCR 和 Western blotting 分别检测 3 组细胞的 p16、CDK4、cyclin D1 mRNA 和蛋白的表达情况。结果 p16 基因克隆入真核表达载体,并成功转染结肠癌细胞后,在基因和蛋白质水平均有外源性 p16 基因表达,与 SW480 组比较,相对表达量均有显著增加($P < 0.01$)。MTT 检测结果显示:培养 48 h 和 72 h 后,SW480-p16 组的细胞相对增殖率均显著低于 SW480 组和 SW480-GFP 组($P < 0.01$)。Real-Time PCR 检测结果显示:SW480-p16 组的 p16 mRNA 相对表达量接近 SW480-GFP 组的 2.38 倍,接近 SW480 细胞的 2.59 倍,差异具有统计学意义($P < 0.01$);SW480-p16 组的 cyclin D1 mRNA 相对表达量明显低于 SW480 组和 SW480-GFP 组细胞($P < 0.05$),而 CDK4 mRNA 的相对表达量略低于 SW480 组和 SW480-GFP 组,差异无统计学意义($P > 0.05$)。Western blotting 检测结果显示:与 SW480-GFP 组和 SW480 组比较,SW480-p16 组的 P16 蛋白表达量明显升高;而 CDK4 和 cyclin D1 蛋白表达量明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结论 p16 基因转染入结肠癌细胞,具有抑制癌细胞生长的功能。

[关键词] p16 基因;克隆;结肠癌细胞;D 型细胞周期蛋白;周期蛋白依赖性蛋白激酶 4

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.06.014

[中图分类号] R735.35

[文献标志码] A

Cloning of p16 gene and its role in inhibition of colon cancer SW480 cell growth

MENG Qing-kai, ZHANG Jing-ru, WANG Hui

(Department of Enteric Surgery, Liaoning Cancer Hospital & Institute, Shenyang 110042, China)

[Abstract] Objective To investigate the inhibitory effect of p16 gene on the growth of colon cancer cell line SW480. Methods p16 gene was cloned into eukaryotic express vector pEGFP-N3 using subclone technique, and the recombinant plasmid was transfected into SW480 cells using Lipofectamine method. MTT assay was performed to analyse the proliferation of cells without transfection (SW480 group), cells transfected with blank plasmid (SW480-GFP group) and cells transfected with p16 (SW480-p16 group) after culture for 24, 48 and 72 h. Real-Time PCR and Western blotting were employed to detect the expression of p16, CDK4 and cyclin D1 mRNA and protein respectively. Results Compared with SW480 group and SW480-GFP group, the expression of p16 gene in SW480-p16 group was significantly increased ($P < 0.01$). MTT assay indicated that the cell proliferation in SW480-p16 group was significantly lower than that in SW480 group and SW480-GFP group after culture for 48 h and 72 h ($P < 0.01$). Real-Time PCR analysis revealed the expression of p16 mRNA in SW480-p16 group which was 2.59 times of that in SW480, and 2.38 times in SW480-GFP ($P < 0.01$). The expression of cyclin D1 mRNA in SW480-p16 group was significantly lower than that in SW480 group and SW480-GFP group ($P < 0.05$), and the expression of CDK4 mRNA in SW480-p16 group was slightly lower than that in SW480 group and SW480-GFP group ($P > 0.05$). Western blotting demonstrated that the expression of p16 protein in SW480-p16 group was significantly higher than that in SW480-GFP group and SW480 group ($P < 0.01$), while the expression of CDK4 and cyclin D1 protein in SW480-p16 group was significantly lower than that in SW480-GFP group and SW480 group ($P < 0.01$). Conclusion Colon cancer cells transfected with p16 gene can resume the function of inhibiting tumor growth.

[Key words] p16 gene; clone; colon cancer cells; cyclin D1; cyclin dependent kinase 4

p16 基因是细胞周期中的基本基因,直接参与细胞周期的调控,调节细胞增殖和分裂。有文献^[1]报

道,p16 基因的缺失和突变会引起细胞的恶性增殖,导致恶性肿瘤的发生,在多种肿瘤中存在 p16 基因

[基金项目] 辽宁省自然科学基金(20092071) (Natural Science Foundation of Liaoning Province, 20092071)。

[作者简介] 孟庆凯(1971—),男,副主任医师,博士;电子信箱: mqq1971@126.com。

的缺失和突变。研究^[2-4]发现:p16 基因与食管癌、肺癌和乳腺癌等的发生、发展有关;而与结直肠肿瘤关系的报道不多。有报道^[5]显示,p16 基因在结肠癌的阳性表达率很低,一般低于正常大肠黏膜和腺瘤。本研究通过在体外克隆导入外源性 p16 基因,通过脂质体介导转染到结肠癌细胞系 SW480 中,通过筛选获得稳定表达外源性 p16 基因的结肠癌细胞株,MTT 法检测细胞增殖活性,Real-Time PCR 和 Western blotting 法检测 p16 基因、细胞周期依赖性激酶 4 (cyclin dependent kinase 4, CDK4)、D 型细胞周期蛋白 (cyclin D1) mRNA 和蛋白的表达情况,初步探讨引入外源性 p16 基因在结肠癌预后和转移过程中发挥治疗作用的可能。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

结肠癌细胞系 SW480、*E. coli* DH5 α 和克隆质粒 pBS-p16 均为本实验室冻存。pEGFP-N3 质粒载体 (Clontech, 美国); T4 DNA 连接酶 (Promega, 美国); 脂质体 LipofectamineTM 2000 (Invitrogen, 美国); G418 试剂 (Sigma, 美国); RNAsprep pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒和 Real-Time PCR 检测试剂 (Tiagen, 中国); RPMI-1640 培养基、胎牛血清、胰酶和双抗 (Gibco, 美国); MTT 试剂盒 (碧云天生物技术研究所); Western blotting 检测抗体 (Abcam, 英国); 其他试剂均为国产, 分析纯。

1.2 细胞培养

将结肠癌细胞系 SW480 置于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基中,并在 37 ℃、含 5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养。

1.3 构建 p16 基因真核表达载体

载体 pEGFP-N3 和 pBS-p16 进行 EcoR I 和 Xba I 双酶切,电泳,切胶回收 p16 基因目的片段和 pEGFP-N3 质粒,并纯化产物,在 0.2 mL 反应管中加入 pEGFP-N3 质粒 50 ng、纯化的酶切产物 10 ng、T4 连接酶 1 μ L、10 × 连接缓冲液 1 μ L, 补超纯水至总体积为 10 μ L, 16 ℃ 下过夜连接, 获得的 10 μ L 溶液即为连接产物。将连接产物转化到 DH5 α , 筛选阳性克隆, 筛选出含重组子的转化菌落, 提取质粒 DNA 酶切鉴定, 确定得到 pEGFP-p16 重组表达质粒。

1.4 pEGFP-p16 重组质粒转染结肠癌细胞 SW480

将结肠癌细胞 SW480 在 6 孔板培养皿中培养至融合状态,吸弃培养液,并用 500 μ L 无血清和无

抗生素的 RPMI-1640 洗涤 1 次;吸弃培养液,按照转染试剂盒说明书加入脂质体-DNA 复合液,在无血清的 RPMI-1640 培养基中继续培养 5 h;吸弃培养液,用含 20% 血清的 RPMI-1640 培养基 500 μ L 洗涤 2 次;加入含 20% 血清的 RPMI-1640 培养基 1 000 μ L, 培养 16 h。用 G418 进行抗性克隆的筛选,G418 剂量从 200 μ g/mL 开始,每 3 d 递增 200 μ g/mL, 2 周内上升到 800 μ g/mL, 维持此浓度, 获得稳定转染的细胞。

1.5 MTT 法检测转染后细胞增殖活性的变化

分别将未转染细胞 (SW480 组)、转染空质粒细胞 (SW480-GFP 组) 和转染 p16 细胞 (SW480-p16 组) 接种于 96 孔培养板, 细胞密度为 5×10^3 /孔, 培养 0 (对照)、24、48 和 72 h 后, 每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μ L, 置 5% CO₂ 培养箱中孵育 4 h, 吸去上清, 加入 200 μ L DMSO 溶解细胞内形成的结晶, 采用酶标仪测定吸光度值 D (490 nm), 计算细胞的相对增殖率。实验设置空白孔, 每个样本 5 个平行孔, 细胞相对增殖率 = $(D_{\text{样本}} - D_{\text{空白}})/(D_{\text{对照}} - D_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

1.6 Real-Time PCR 检测 p16 基因、CDK4 和 cyclin D1 mRNA 的表达

按照 RNAsprep pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取的试剂盒说明书, 分别提取未转染细胞 (SW480 组)、转染空质粒细胞 (SW480-GFP 组) 和转染 p16 细胞 (SW480-p16 组) 的总 RNA, 进行 Real-Time PCR 检测, 以 β -actin 作为内参。p16 基因的扩增引物序列: 5'-CATCCCCGATTGAAAGAAC-3' (上游), 5'-AATGGA CATTACGGTAGTG-3' (下游); CDK4 基因的扩增引物序列: 5'-AAATCTTGACCTGATTGGG-3' (上游), 5'-CCTTATGTAGATAAGAGTGCTG-3' (下游); cyclin D1 基因的扩增引物序列: 5'-CCCGCACGATTCATTGAAC-3' (上游), 5'-AGGCCGGATGGAAATGAAC-3' (下游)。

1.7 Western blotting 检测 p16 基因、CDK4 和 cyclin D1 蛋白的表达

收集各组细胞 1×10^6 个, 按试剂盒使用说明书提取总蛋白, BCA 法进行蛋白定量后进行 Western blotting 检测, 每个样本上样 20 μ g, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、杂交, 抗体比例 p16 基因为 1:500、CDK4 为 1:1 00, cyclin D1 为 1:800, 显色后扫描拍照, 进行灰度分析。

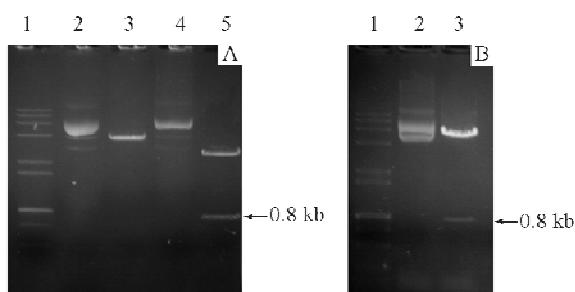
1.8 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件包进行统计分析。数据均为正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 p16 基因真核表达载体构建鉴定

采用酶切连接方法,双酶切 pEGFP 空质粒和 pBS-16 质粒结果如图 1A 所示,获得 0.8 kb 左右的 p16 基因片段,与酶切后的 pEGFP 空质粒连接。转化后提取质粒,进行酶切鉴定,经凝胶电泳检测如图 1B 所示,得到 0.8 kb 左右的产物,片段大小与目的基因相符。脂质体介导法将 pEGFP-p16 重组质粒转染到结肠癌细胞 SW480 中,经 G418 筛选后,获得稳定转染的细胞 SW480-p16,进行后续实验。



A. p16 基因载体构建电泳图; 1. Marker; 2. pEGFP 质粒; 3. pEGFP 质粒双酶切; 4. pBS-16 质粒; 5. pBS-16 质粒双酶切。B. pEGFP-p16 重组质粒酶切鉴定电泳图; 1. Marker; 2. pEGFP-p16 质粒; 3. pEGFP-p16 质粒双酶切。

图 1 p16 基因载体构建

Fig 1 Construction of p16 gene carrier

2.2 培养不同时间后细胞相对增殖率比较

MTT 法检测结果显示:培养 24 h 后,SW480-p16 组细胞的相对增殖率即低于 SW480 组和 SW480-GFP 组,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$);培养 48 h 和 72 h 后,细胞相对增殖率降低更显著,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。SW480 组与 SW480-GFP 组的细胞相对增殖率比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 1)。

表 1 各组间细胞相对增殖率比较 ($\bar{x} \pm s, n=5, \%$)

Tab 1 Comparison of cell proliferation among different groups ($\bar{x} \pm s, n=5, \%$)

组别	24 h	48 h	72 h
SW480 组	1.25 ± 0.135	2.13 ± 0.042	2.28 ± 0.034
SW480-GFP 组	1.21 ± 0.036	2.09 ± 0.130	2.22 ± 0.038
SW480-p16 组	1.15 ± 0.025	$1.74 \pm 0.027^{\oplus}$	$2.03 \pm 0.011^{\oplus}$

^① $P < 0.01$ 与 SW480 组和 SW480-GFP 组比较。

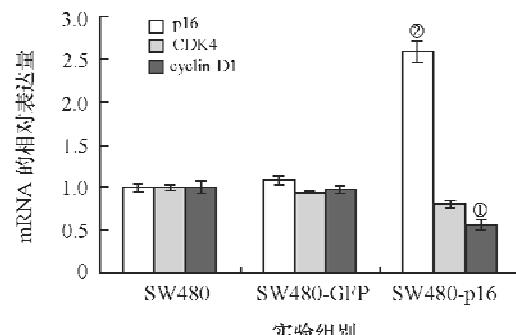
2.3 p16 基因、CDK4 和 cyclin D1 mRNA 的表达

Real-Time PCR 检测结果显示:SW480-p16 组的 p16 mRNA 相对表达量接近 SW480-GFP 组和 SW480 组的 2.59 倍 ($P < 0.01$),但 SW480-GFP 组与 SW480

组的 p16 mRNA 相对表达量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);SW480-p16 组的 cyclin D1 mRNA 相对表达量明显低于 SW480 组和 SW480-GFP 组 ($P < 0.05$);SW480-p16 组的 CDK4 mRNA 的相对表达量略低于 SW480 组和 SW480-GFP 组,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 2)。

2.4 p16 基因、CDK4 和 cyclin D1 蛋白的表达

Western blotting 检测结果显示:与 SW480-GFP 组和 SW480 组比较,SW480-p16 组的 p16 蛋白表达量明显升高;而 CDK4 和 cyclin D1 蛋白表达量明显降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$);但 SW480-GFP 组与 SW480 组的 p16、CDK4、cyclin D1 蛋白表达量比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 3、表 2)。



^① $P < 0.05$, ^② $P < 0.01$ 与 SW480 组和 SW480-GFP 组比较。

图 2 Real-Time PCR 检测 p16 基因、CDK4 和 cyclin D1 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 2 Expression of p16, CDK4 and cyclin D1 mRNA detected by Real-Time PCR ($\bar{x} \pm s, n=3$)

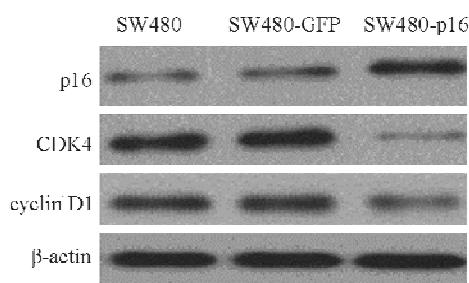


图 3 Western blotting 法检测 p16 基因、CDK4 和 cyclin D1 蛋白的表达

Fig 3 Expression of p16, CDK4 and cyclin D1 protein detected by Western blotting

表 2 各组间 p16 基因、CDK4 和 cyclin D1 蛋白的相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Expression of p16, CDK4 and cyclin D1 protein among different group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	p16	CDK4	cyclin D1
SW480 组	0.31 ± 0.02	1.00 ± 0.03	0.91 ± 0.06
SW480-GFP 组	0.34 ± 0.01	1.11 ± 0.07	0.94 ± 0.05
SW480-p16 组	$0.82 \pm 0.11^{\oplus}$	$0.26 \pm 0.04^{\oplus}$	$0.55 \pm 0.03^{\oplus}$

^① $P < 0.01$ 与 SW480 组和 SW480-GFP 组比较。

3 讨 论

在世界范围内,癌症是威胁人类生命健康的主要疾病之一,癌症的发生涉及多种基因的变化,是基因发生改变积累的结果,因此可以说癌症是一种基因病。与癌症相关的主要基因是癌基因和抑癌基因,其中抑癌基因失活对癌症的发生、发展具有重要作用。抑癌基因可以通过多种途径失活,如发生基因位点突变或缺失、抑癌基因启动子区的异常甲基化和基因重排等。

p16 基因是一种抑癌基因,又称为多肿瘤抑制 (multiple tumor suppressor 1, MTS1) 基因,1994 年由美国冷泉港实验室的 Kamb 等^[1]发现,p16 基因位于人染色体 9P21 区,全长 8.5 kb,编码 154 个氨基酸,其表达产物为一种相对分子质量为 16 000 的蛋白,即 p16 蛋白,定位在细胞核内。p16 蛋白是作用于细胞分裂周期的关键酶之一^[6],主要通过调节 cyclinS-CDK4 和 6-pRb-E2F 通路来实现抑制细胞周期的作用。p16 是 CDK4 的抑制因子,CDK 是细胞周期调控的核心酶,通过对一系列关键底物进行磷酸化作用,调节细胞周期,CDK4 主要与 cyclin D1 结合,调控细胞由 G₁ 期向 S 期转换。Cyclin D1 在细胞周期进程中结合 CDK4 或 CDK6 形成复合物,进而与视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, Rb) 编码蛋白 pRb 结合,使 pRb 发生磷酸化,介导转录因子 E2F 的活化,加速细胞由 G₁ 期向 S 期转换,促进细胞增殖;而当 cyclin D1 表达失控时,则将引起细胞增殖周期失调,导致肿瘤发生。p16 对 CDK4 的作用通过与 cyclin D1 竞争结合这种蛋白进而抑制其活力。研究^[7]结果表明:在癌细胞中表达 p16 基因能抑制 CDK4 的表达,同时抑制癌细胞的增殖和转移。结肠癌组织中存在 p16 基因的表达缺失^[8];而 p16 基因在结肠癌细胞的表达情况是由于其本身的变异、缺失还是表达调控改变造成,这种表达缺失能否通过调控得到逆转,目前相关研究还很少。

本研究将野生型 p16 基因转染至结肠癌细胞株 SW480 中,检测 p16 mRNA 表达的变化及功能,并进一步研究 p16 的调控作用。实验将野生型 p16 基因克隆到真核表达载体 pEGFP 中,经酶切鉴定,获得正确的克隆载体。利用脂质体介导法,将其转染到结肠癌细胞株 SW480 中,MTT 法检测结果显示:SW480-p16 细胞的相对增殖率明显低于未转染细胞 SW480 和转染空质粒细胞 SW480-GFP,表明在将 p16 基因转染到细胞中后,细胞的相对增殖率得到了

抑制,这与罗春华等^[9]的研究结果相似。Real-Time PCR 检测结果表明:转染后 p16 mRNA 的相对表达量增加;Western blotting 检测结果显示:p16 蛋白的相对表达量也显著增加,而 CDK4 和 cyclin D1 的相对表达量减少;这可能是由于 p16 蛋白与 Cyclin 蛋白竞争性结合 CDK4 蛋白的活性位点,抑制了 CDK4 蛋白活性,阻止细胞从 G₁ 期进入 S 期,从而抑制了细胞的增殖,对细胞增殖进行负性调控^[10],同时反馈抑制 CDK4 和 cyclin D1 的表达。

综上所述,细胞周期调控因子 p16 基因的克隆和表达,能够抑制结肠癌细胞的增殖,调控结肠癌细胞中癌症相关蛋白的表达,可能通过抑制 CDK4 的活性,反馈调节 cyclin D1 表达达到控制细胞增殖的作用。

[参考文献]

- [1] Kamb A, Grus NA, Weaver-Feldhaus J, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types [J]. Science, 1994, 264(5157): 436-440.
- [2] Lam AK, Ong K, Giv MJ, et al. p16 expression in colorectal adenocarcinoma: marker of aggressiveness and morphological types [J]. Pathology, 2008, 40(6): 580-585.
- [3] Wang JS, Guo M, Montgomery EA, et al. DNA promoter hypermethylation of p16 and APC predicts neoplastic progression in Barrett's esophagus [J]. Am J Gastroenterol, 2009, 104(1): 2153-2160.
- [4] Blanco D, Vicent S, Fraga MF, et al. Molecular analysis of a multi-step lung cancer model induced by chronic inflammation reveals epigenetic regulation of p16 and activation of the DNA damage response pathway [J]. Neoplasia, 2007, 9(10): 840-852.
- [5] Radpour R, Barekat Z, Haghghi MM, et al. Correlation of telomere length shortening with promoter methylation profile of p16/Rb and p53/p21 pathways in breast cancer [J]. Mod Pathol, 2010, 23(5): 763-772.
- [6] Carmero A, Hudson JD, Price CM, et al. p16INK4A and p19ARF act in overlapping pathways in cellular immortalization [J]. Nat Cell Biol, 2000, 2(3): 148-155.
- [7] Schrage YM, Lam S, Jochemsen AG, et al. Central chondrosarcoma progression is associated with pRb pathway alterations: CDK4 downregulation and p16 overexpression inhibit cell growth *in vitro* [J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(9A): 2843-2852.
- [8] 冯伟勋, 刘坤平, 原伟权. 细胞周期调控因子在结肠癌病变中的表达及临床意义 [J]. 现代消化及介入诊疗, 2003, 4(1): 197-201.
- [9] 罗春华, 朱建思. 稳定表达外源性 p16 基因肝癌 SMMC-7721 细胞株的建立及鉴定 [J]. 南华大学学报: 医学版, 2005, 2(33): 184-187.
- [10] Boultonwood J, Waincoat JS. Gene silencing by DNA methylation in haematological malignancies [J]. Br J Haematol, 2007, 138(1): 3-11.