

重组人p53腺病毒注射液对肾母细胞瘤细胞增殖、凋亡及自噬的影响^Δ

仲智勇*, 时保军, 周辉, 王文博(河北医科大学第二医院小儿外科, 石家庄 050017)

中图分类号 R361⁺.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)07-0889-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.07.07

摘要 目的:研究重组人p53腺病毒注射液对肾母细胞瘤细胞增殖、凋亡及自噬的影响。方法:将肾母细胞瘤细胞分别与高、中、低浓度(1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 VP/mL)的重组人p53腺病毒注射液共同孵育20 h,以不加注射液的细胞为空白对照。检测细胞增殖、周期、凋亡及相关基因p21、Bax蛋白表达,检测细胞中自噬相关基因LC-3、Atg7、Atg12表达和自噬体数量。结果:高、中、低浓度重组人p53腺病毒注射液对肾母细胞瘤细胞的增殖抑制率分别为 $(42.86 \pm 3.18)\%$ 、 $(33.64 \pm 7.25)\%$ 、 $(16.26 \pm 9.07)\%$,细胞凋亡率分别为 $(53.85 \pm 9.36)\%$ 、 $(37.35 \pm 9.64)\%$ 、 $(23.64 \pm 10.65)\%$ 。与空白对照比较,高、中、低浓度药物作用下G₀/G₁期细胞均增加,其中高、中浓度药物效果较明显($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);高浓度下细胞中p21、Bax蛋白和LC-3、Atg7、Atg12基因表达增强,自噬体数量增加($P < 0.01$);中浓度下细胞中Bax蛋白表达增强($P < 0.05$),其余指标无明显变化($P > 0.05$)。结论:重组人p53腺病毒注射液可抑制肾母细胞瘤细胞增殖,诱导细胞凋亡和自噬。

关键词 肾母细胞瘤;重组人p53腺病毒注射液;细胞周期;增殖;凋亡;自噬

Effects of rAd-p53 Injection on the Proliferation, Apoptosis and Autophagy of Nephroblastoma Cells

ZHONG Zhiyong, SHI Baojun, ZHOU Hui, WANG Wenbo (Dept. of Pediatric Surgery, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of rAd-p53 injection on the proliferation, apoptosis and autophagy of nephroblastoma cells. METHODS: Nephroblastoma cells were respectively cultured 20 h with high, medium, low concentration (1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 VP/mL) of Recombinant human rAd-p53 injection, cells with no injection were the blank control. Cell proliferation, cycle, apoptosis and related gene p21, Bax protein expressions were detected, and autophagy gene LC-3, Atg7, Atg12 expressions and number of autophagosomes were also detected. RESULTS: The proliferation inhibition rates of high, medium, low concentration of Recombinant human rAd-p53 injection to nephroblastoma cells were $(42.86 \pm 3.18)\%$, $(33.64 \pm 7.25)\%$, $(16.26 \pm 9.07)\%$; apoptotic rates were $(53.85 \pm 9.36)\%$, $(37.35 \pm 9.64)\%$, $(23.64 \pm 10.65)\%$, respectively. Compared with blank control, cells at period G₀/G₁ were increased under high, medium, low concentration Recombinant human rAd-p53 injection, effects were relatively obvious under high, medium concentration ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); p21, Bax protein and LC-3, Atg7, Atg12 gene expressions were enhanced under high concentration, the number of autophagosomes was increased ($P < 0.01$); Bax protein expression was enhanced under medium concentration ($P < 0.05$), the other indicators had no obvious changed ($P > 0.05$). CONCLUSIONS: Recombinant human rAd-p53 injection can inhibit the cell proliferation of nephroblastoma, and induce its apoptosis and autophagy.

KEYWORDS Nephroblastoma; rAd-p53 injection; Cell cycle; Proliferation; Apoptosis; Autophagy

肾母细胞瘤是儿童常见的恶性肿瘤性疾病之一,发病率在小儿肿瘤中高居第5位,手术切除并予以辅助化疗是其主要治疗手段^[1]。但对于病理分型为间变型等的肾母细胞瘤预后不良型的治疗,受到目前临床治疗手段的限制,疗效一直不稳定^[2]。

重组人p53腺病毒(rAd-p53)注射液是以现代生物医学工程技术为基础,通过生物重组而制备的一类具有代表性的病毒颗粒注射液。有研究表明,rAd-p53注射液可以通过调节细胞凋亡过程对多种肿瘤起到治疗

作用^[3-4]。近年研究发现,自噬与细胞的凋亡有着密切的联系,二者可以相互调控。本文主要研究rAd-p53注射液对肾母细胞瘤细胞增殖、凋亡及自噬的影响。

1 材料

1.1 仪器

CKX41倒置显微镜(日本Olympus公司);DM0412低速离心机(美国赛洛捷公司,离心半径:4 cm);LSM 880激光共聚焦显微镜(德国Zeiss公司);JEM-1400透射电镜(日本JEM公司);Tanon 5500化学发光仪(上海天能科技有限公司);Multiskan MK3酶标仪、ABI7500荧光定量聚合酶链式反应(Q-PCR)仪(美国Thermo公司);FACSCanto II流式细胞仪(美国BD公司)。

Δ 基金项目:河北省2013年医学科学研究计划基金项目(No.20130151)

* 副教授,硕士。研究方向:儿童肿瘤。电话:0311-66002267。E-mail:zhongzy2005@163.com

1.2 药品与试剂

rAd-p53注射液(深圳市赛百诺基因技术有限公司,批号:20151003,规格:1×10¹² VP/支);RPMI 1640培养液及胎牛血清(FBS)(美国Gibco公司);胰蛋白酶(美国Sigma公司);CCK-8试剂盒(日本同仁公司);细胞周期、细胞凋亡试剂盒(四正柏生物技术有限公司);兔p21(细胞周期相关基因)、Bax(凋亡相关基因)、LC-3(自噬相关基因)抗体及山羊抗兔二抗(美国Abcam公司);增强化学发光(ECL)液(德国Milipore公司);LC-3荧光标记试剂盒(美国Ebioscience公司);所有化学试剂均为国产分析纯。

1.3 细胞

肾母细胞瘤细胞由中国科学院细胞所提供。

2 方法

2.1 给药浓度的选择

以预试验结果为依据,本试验的Ad-p53高、中、低浓度分别设定为1×10⁹、1×10⁸、1×10⁷ VP/mL,rAd-p53注射液用含有10%FBS的RPMI 1640培养液进行稀释;以含有10%FBS的RPMI 1640培养液为空白对照。

2.2 肾母细胞瘤的培养

肾母细胞瘤细胞从液氮中取出后,迅速置于37℃水浴中,摇晃解冻,1 000 r/min离心3 min,去上清,转移细胞至培养瓶中,于37℃、5%CO₂条件下培养。待细胞生长至密布瓶底约80%以上,加入500 μL胰酶消化细胞,加入新培养液终止消化,1 000 r/min离心3 min,重悬细胞至合适浓度后进行下一步试验操作。

2.3 rAd-p53注射液对肾母细胞瘤细胞增殖的影响

取传一代后的肾母细胞瘤细胞,取1×10⁴个细胞接种于96孔板中,培养至对数生长期,加入适量rAd-p53注射液使其终浓度分别为1×10⁹、1×10⁸、1×10⁷ VP/mL(高、中、低浓度组),每个浓度设6个复孔。于37℃、5%CO₂条件下培养20 h后,按照CCK-8试剂盒检测并计算细胞增殖抑制率,同时以含有10%FBS的RPMI 1640培养液培养为空白对照组。

2.4 rAd-p53注射液对肾母细胞瘤细胞周期和凋亡的影响

取传一代后的肾母细胞瘤细胞,取1×10⁵个细胞接种于96孔板中,加入适量rAd-p53注射液使其终浓度分别为1×10⁹、1×10⁸、1×10⁷ VP/mL(rAd-p53高、中、低浓度组),每个浓度设6个复孔。培养20 h后,制备成细胞悬液,按照试剂盒要求加入碘化丙啶(PI)及异硫氰酸荧光素(FITC),采用流式细胞仪检测细胞周期和凋亡情况,计算凋亡率,同时以含有10%FBS的RPMI 1640培养液培养为空白对照组。

2.5 rAd-p53注射液对肾母细胞瘤细胞中p21、Bax蛋白表达的影响

同“2.4”项下方法分组、培养细胞20 h后,胰蛋白酶消化细胞,冰浴超声(200 W,10 s/次,共3次)破解细胞,提取总蛋白。总蛋白上样量为30 μg,使用7.5%聚丙烯酰胺凝胶电泳,80 V电泳30 min至平行后,使用120 V电泳90 min,200 mA恒流转膜90 min,5%脱脂奶粉封闭1 h,加入兔p21、Bax抗体(稀释比例为1:500),4℃孵育过夜;第2天洗膜后,加入山羊抗兔二抗(稀释比例为1:1 000),室温孵育2 h,洗膜,ECL曝光,记录数据。采用Image J软件分析条带光密度,以目标蛋白与内参β-肌动蛋白(β-actin)比值评价目标蛋白的相对表达量。

2.6 rAd-p53注射液对肾母细胞瘤细胞自噬的影响

2.6.1 自噬相关基因LC-3表达 取传一代后的肾母细胞瘤细胞,取1×10⁴个细胞接种于激光共聚焦专用皿中,加入适量的rAd-p53注射液使其终浓度分别为1×10⁹、1×10⁸、1×10⁷ VP/mL(高、中、低浓度组),每个浓度设3个复孔。培养20 h后,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞后使用4%多聚甲醛固定细胞,3%牛血清白蛋白(BSA)封闭非特异性抗原,加入10 μg/mL兔LC-3抗体孵育细胞24 h。清洗后使用FITC荧光标记二抗孵育2 h,激光共聚焦显微镜拍照记录数据,每孔拍摄3个视野,同时以含有10%FBS的RPMI 1640培养液培养为空白对照组。

2.6.2 自噬相关基因Atg7、Atg12表达 同“2.4”项下方法分组、培养细胞20 h后,吸去培养液,加入Trizol裂解细胞提取总RNA,按照Takara试剂盒说明书反转录为mRNA,并采用Q-PCR法检测Atg7、Atg12基因的表达情况,每个浓度设6个复孔。扩增条件:95℃、15 min;94℃、15 s,40个循环;62℃、60 s。引物序列:Atg7上游引物为5'-GAGGAGACCGTCTGAGCAAC-3',下游引物为5'-TGACACAGGAAGGTGCAA-3',扩增长度为131 bp;Atg12上游引物为5'-AAACGTGAGCCAA-GGGATT-3',下游引物为5'-AAACGTGAGCCAAGG-GATT-3',扩增长度为132 bp;内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)上游引物为5'-TGAAGGTCGGAGTCAACG-GATTTGGT-3',下游引物为5'-AAATGAGCCCCAGC-CTTCTCCATG-3',扩增长度为325 bp。数据使用2^{-ΔΔC_t}法分析,ΔΔC_t=ΔC_t给药组-ΔC_t空白对照组,ΔC_t=C_t目标产物-C_t内参。

2.6.3 自噬体数量 同“2.4”项下方法分组、培养细胞20 h后,胰蛋白酶消化细胞,2.5%中性戊二醛固定4 h,用PBS漂洗6次,加1%锇酸固定2 h,乙醇梯度脱水并使用树脂渗透,包埋,切片(厚度为50~70 nm),铀铅双染色后,透射电镜观察自噬体数量的变化。

2.7 统计学方法

采用SPSS 21.0软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐者使用LSD法对数据进行分析,方差不齐者使用Dunnett's T3方法进行分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞增殖抑制率

高、中、低浓度 rAd-p53 注射液对肾母细胞瘤细胞的增殖抑制率分别为 $(42.86 \pm 3.18)\%$ 、 $(33.64 \pm 7.25)\%$ 、 $(16.26 \pm 9.07)\%$ 。与空白对照组比较, rAd-p53 中、高浓度组细胞的增殖抑制率明显升高 ($P < 0.01$); rAd-p53 高、中、低浓度组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3.2 细胞周期和凋亡率

与空白对照组比较, rAd-p53 高、中浓度组 G₀/G₁ 期细胞明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), rAd-p53 高、中、低浓度组细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组细胞周期变化和凋亡率测定结果见表 1。

表 1 各组细胞周期变化和凋亡率测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Changes of cell cycle and determination results of apoptosis rate in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	G ₀ /G ₁ , %	S, %	G ₂ /M, %	凋亡率, %
空白对照组	61.66 ± 3.84	23.75 ± 1.85	14.09 ± 1.01	5.27 ± 1.64
rAd-p53 高浓度组	81.74 ± 4.76**	9.54 ± 0.97**	8.12 ± 1.89*	53.85 ± 9.36**
rAd-p53 中浓度组	73.46 ± 5.73*	14.75 ± 2.87*	11.39 ± 5.25	37.35 ± 9.64**
rAd-p53 低浓度组	66.32 ± 6.86	22.85 ± 4.86	10.13 ± 3.15	23.64 ± 10.65*

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.3 p21、Bax 蛋白表达

与空白对照组比较, rAd-p53 高浓度组细胞中 p21 和 Bax 蛋白表达增强 ($P < 0.01$), rAd-p53 中浓度组细胞中 Bax 蛋白表达增强 ($P < 0.05$), 其余差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组细胞中 p21、Bax 蛋白表达的电泳图见图 1, 测定结果见表 2。

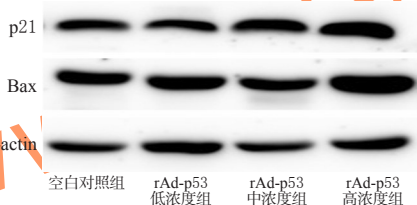


图 1 各组细胞中 p21、Bax 蛋白表达的电泳图

Fig 1 Electrophoresis graphs of p21, Bax protein expressions of cells in each group

表 2 各组细胞中 p21、Bax 蛋白表达测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Determination results of p21, Bax protein expressions of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	p21/β-actin	Bax/β-actin
空白对照组	1.021 ± 0.009	0.998 ± 0.001
rAd-p53 高浓度组	1.365 ± 0.042**	1.455 ± 0.107**
rAd-p53 中浓度组	1.127 ± 0.153	1.267 ± 0.054*
rAd-p53 低浓度组	0.995 ± 0.264	1.065 ± 0.647

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.4 自噬情况

3.4.1 LC-3 基因表达 与空白对照组比较, rAd-p53 高浓度组细胞中 LC-3 荧光增多, rAd-p53 中、低浓度组细

胞中 LC-3 荧光无明显变化。各组细胞中 LC-3 基因表达荧光图见图 2。

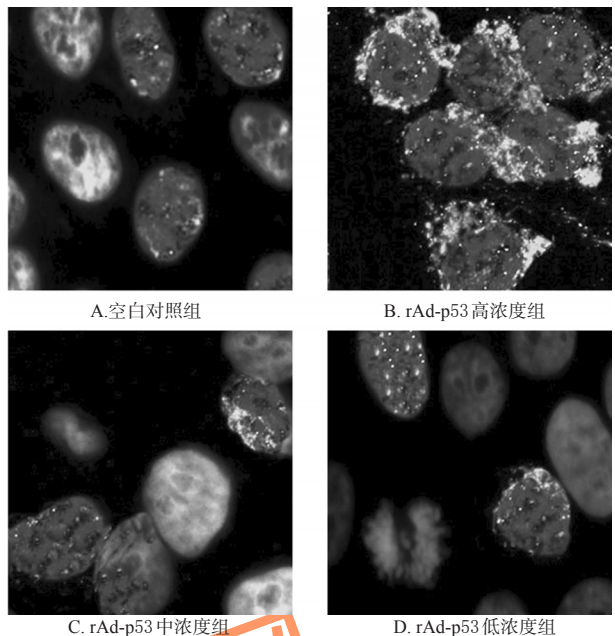


图 2 各组细胞中 LC-3 基因表达荧光图 (FITC, ×400)
Fig 2 Fluorescence graphs of LC-3 gene expression of cells in each group (FITC, ×400)

3.4.2 Atg7、Atg12 基因表达 与空白对照组比较, rAd-p53 高浓度组细胞中 Atg7、Atg12 基因表达增强 ($P < 0.01$), 表明细胞自噬的基因启动, 细胞自噬显著性增加; 其余组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组细胞中 Atg7、Atg12 基因表达的测定结果见表 3。

表 3 各组细胞中 Atg7、Atg12 基因表达的测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 3 Determination results of Atg7, Atg12 gene expressions of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Atg7/GAPDH	Atg12/GAPDH
空白对照组	1.001 ± 0.012	1.015 ± 0.008
rAd-p53 高浓度组	1.928 ± 0.173**	2.287 ± 0.211**
rAd-p53 中浓度组	1.264 ± 0.521	1.333 ± 0.624
rAd-p53 低浓度组	1.173 ± 0.324	1.098 ± 0.274

注:与空白对照组比较, ** $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P < 0.01$

3.4.3 自噬体数量 与空白对照组比较, rAd-p53 高浓度组细胞内自噬体数量明显增加, rAd-p53 中、低浓度组细胞内自噬体数量无明显变化, 表明高浓度 rAd-p53 注射液可以促进细胞自噬的发生。各组细胞自噬体的透射电镜图见图 3。

4 讨论

自 1995 年 9 月美国 FDA 批准第一个 p53 基因治疗的临床试验方案, 现临床研究已证实 rAd-p53 制品采用多种给药方式均可以治疗多种恶性肿瘤, 并且安全^[9]。从调查研究中发现, 多数恶性肿瘤有 p53 基因突变, 同时, rAd-p53 注射液对多种不同类型的肿瘤均表现出很

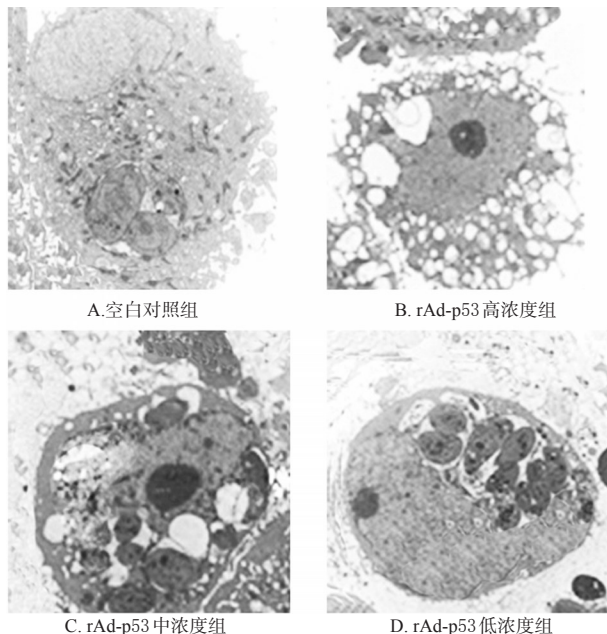


图3 各组细胞中自噬体的透射电镜图($\times 10\ 000$)

Fig 3 Transmission electron microscopys of cell autophagosomes in each group($\times 10\ 000$)

强的抑制作用,临床应用结果都说明其能提高患者的生活质量,未发现严重不良反应,安全性较好。流行病学研究发现,多种肿瘤情况的发生与p53基因的改变有着密切联系^[6-7],有将近60%的人类肿瘤的发生都与其改变有关,通过增强p53基因表达从而起到治疗肿瘤作用是当前药物作用的重要靶点之一^[8]。据目前的研究发现,肾母细胞瘤也存在着p53基因缺失等基因突变的状况^[9]。

p21是由p53调控的下游蛋白,p53-p21-去磷酸化细胞瘤通路也是调控肿瘤基因表达的重要通路之一,该通路的异常表达会导致机体细胞的癌变^[10]。对于正常的细胞而言,该通路的激活会引起细胞的衰老和生长的抑制;而对于癌细胞而言,该通路的激活会诱导癌细胞的凋亡,从而起到治疗肿瘤的作用^[11-12]。Bax是位于线粒体膜上的一类具有调控凋亡功能的蛋白,研究表明,只有当p53基因被激活时,Bax才会发挥促进细胞凋亡的作用^[13]。rAd-p53注射液通过调控p21及Bax两个基因和蛋白的表达,从而起到促进癌细胞凋亡的作用。另外,研究还发现rAd-p53注射液诱导肾母细胞瘤细胞的凋亡,还与诱导细胞自噬的发生有关。研究表明,细胞自噬增加与细胞凋亡发生有着密切的关系^[14]。本研究证实了rAd-p53注射液具有通过增加细胞自噬从而治疗肿瘤的作用,表明通过调节细胞自噬来抗肿瘤可能是p53治疗的新靶标。

本试验证实了rAd-p53注射液具有抑制肾母细胞瘤细胞增殖、抑制癌细胞周期、增强癌细胞凋亡、同时诱导p21和Bax基因表达而增强肿瘤细胞自噬的作用,具有治疗肾母细胞瘤的潜力,这对扩宽rAd-p53注射液的应用

范围有着重要的意义。

参考文献

- [1] 张崔建,李学松,虞巍,等.成人肾母细胞瘤的治疗及其长期随访结果[J].北京大学学报(医学版),2012,44(4):535-538.
- [2] 蒋也平,孙宁,沈颖,等.肾母细胞瘤的化疗和放疗[J].中国实用儿科杂志,2008,23(3):234-236.
- [3] 曹信杰,张颖,李会兰,等.重组人p53腺病毒注射液联合化疗治疗恶性体腔积液的疗效观察[J].中国药房,2005,16(23):1809-1810.
- [4] 张林,王季堃,王莉.重组人p53腺病毒注射液逆转人耐药胃癌MGC-803细胞耐药性的体外试验研究[J].中国药房,2012,23(13):1182-1184.
- [5] Ding HF, Lin YL, McGill G, et al. Essential role for caspase-8 in transcription-independent apoptosis triggered by p53[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(49):38905-38911.
- [6] Sykes SM, Stanek TJ, Frank A, et al. Acetylation of the DNA binding domain regulates transcription-independent apoptosis by p53[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(30):20197-20205.
- [7] Dashzeveg N, Yoshida K. Crosstalk between tumor suppressors p53 and PKCdelta: execution of the intrinsic apoptotic pathways[J]. *Cancer Lett*, 2016, 377(2):158-163.
- [8] Melincovici CS, Mihu CM, Marginean M, et al. The prognostic significance of p53, Bax, Bcl-2 and cyclin E protein overexpression in colon cancer: an immunohistochemical study using the tissue microarray technique[J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2016, 57(1):81-89.
- [9] 岳恺,张成辉,李明. p53和鼠双微体2在肾母细胞瘤中的表达[J].中华实用诊断与治疗杂志,2016,30(2):172-174.
- [10] Vaseva AV, Marchenko ND, Moll UM. The transcription-independent mitochondrial p53 program is a major contributor to nutlin-induced apoptosis in tumor cells[J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(11):1711-1719.
- [11] 司晓宇. p21功能缺失在端粒DNA损伤所致细胞衰老与肿瘤发生中的作用研究[D].昆明:昆明理工大学,2013.
- [12] 张凤艳,张金子,邹树彪,等.胃癌组织中p21、p27、p53和Rb的表达及临床意义[J].临床与实验病理学杂志,2011,27(6):586-589.
- [13] Speidel D. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death[J]. *Trends Cell Biol*, 2010, 20(1):14-24.
- [14] 封晓昆,王贲士,王安娜,等. p53及其凋亡刺激蛋白对结肠癌细胞自噬和凋亡影响机制探讨[J].中华肿瘤防治杂志,2015,22(10):752-757.

(收稿日期:2016-07-21 修回日期:2017-01-04)

(编辑:邹丽娟)