

塞替派诱发人支气管上皮恶性转化成瘤细胞的基因突变

周 喆*, 袁素波, 廖明阳

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 目的 旨在了解转化细胞在成瘤过程中的 *p15*, *p16*, *p53* 和 *K-ras* 基因编码序列突变情况。方法 运用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 技术和 DNA 测序技术。结果 转化各阶段细胞 *p15* 和 *K-ras* 基因编码序列为野生型。在转化进程中, 各转化细胞均携带与细胞永生化的有关的 *p53* 第 47 密码子 CCG→TCG(脯氨酸→丝氨酸)转换, 在此基础上无新的错义突变发生。*p16* 基因在 BEAS-2B 细胞和 BEAS-STE 细胞中均为野生型, 在 BEAS-TTb 细胞中第 4 密码子发生 TCG→TAG(丝氨酸→终止密码子)碱基转换, 结果为无义突变, 第 19, 52 密码子分别发生 GAG→AAG(谷氨酸→赖氨酸)转换, GCG→ACG(丙氨酸→苏氨酸)转换的错义突变。BEAS-TTc 细胞中第 19 密码子发生 GAG→AAG(谷氨酸→赖氨酸)转换的错义突变, 而没有可检测的 BEAS-TTa 细胞的 mRNA 存在。结论 *p16* 基因的突变或表达缺失与恶性转化细胞的成瘤过程相关。

关键词: 塞替派; 上皮细胞, 支气管, 人; 基因, *p15*; 基因, *p16*; 基因, *p53*; 基因, *K-ras*; 细胞转化, 肿瘤; 突变

中图分类号: R994

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2003)06-0462-04

化学物诱导的癌变过程是一种涉及基因改变的多步骤过程, 其包括多种癌基因的激活和抑癌基因的失活, 并需一定次数的积累。人源上皮细胞的恶性转化和转化细胞的异体动物成瘤模型可以方便的用来研究理化因素诱发的癌变过程。塞替派

(thiotepa)是临床应用的一线抗癌药物, 流行病学调查已经证实塞替派可以引起多种二次肿瘤, 为探讨塞替派引起人类癌变的细胞分子机制本室已进行了塞替派诱发永生化人支气管上皮细胞 (immortalized human bronchial epithelial cell transformed by thiotepa, BEAS-TE) 的基因突变情况作了报道^[1,2]。本研究对 BEAS-TT 的裸小鼠接种成瘤细胞的细胞系 (tumorigenic human bronchial epithelial cell transformed by thiotepa, BEAS-TT) 进行了突变检测旨在了解转化细胞在成瘤过程中的重要肿瘤相关基因改变, 探讨塞替派的诱癌机制。

1 材料和方法

1.1 试剂

总 RNA 提取试剂盒 (Promega), 逆转录反应试剂盒 (Promega), TaKaRa Ex Taq (大连 TaKaRa 生物公司), 100 bp DNA 分子量梯度标记物 (Promega), BEAS-2B 细胞第 22 代 (美国 American Type Cell Collection) 及 BEAS-TE 的琼脂糖克隆扩增细胞 (BEAS-TE cells selected from agarose, BEAS-STE) 第 6 代、BEAS-TT(a, b, c) 第 25, 24 和 24 代 (本室构建)^[3,4]。

1.2 总 RNA 的抽提及逆转录反应

按试剂盒说明进行, 同时产物进行紫外定量测定。产物 -20℃ 保存。

1.3 引物的设计及 PCR 反应

引物序列: 所用引物由软件 DNAMAN 4.0 设计。引物处于基因不同的外显子上以避免残存微量基因组 DNA 对扩增的影响。因 *p53* 基因编码序列约有 1.1 kb, *p53* 基因编码序列分段扩增。所有引物均由上海 Bioasian 公司合成。PCR 扩增所用引物序列及反应条件如下:

1.3.1 *p53* 基因编码序列的扩增*p53* A1A 5'GGAATTCCACGACGGTGACACG3'*p53* A2B 5'CGAAAAGTGTCTTCTGTCATCC3'

PCR 反应条件: 94℃ 预变性 4 min, 94℃ 变性 45

收稿日期: 2002-12-06 接受日期: 2003-05-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30271559)

作者简介: 周 喆 (1976-), 男, 江西省萍乡市人, 在读博士研究生, 主要研究方向是生物芯片和中药药理学。

* 联系作者 E-mail: zhouzhe76@yahoo.com.cn Tel: (010)66931422

s, 62℃退火 60 s, 72℃延伸 60 s 32 循环, 最后 72℃ 7 min, 产物 686 bp。

p53 BIA 5'TCTGTCCCTTCCCAGAAAACC3'

p53 B2B 5'TTGGGCAGTGTCTCGCTTAGTGCTCC3'

PCR 反应条件: 94℃预变性 4 min, 94℃变性 45 s, 64℃退火 60 s, 72℃延伸 60 s 32 循环, 最后 72℃ 7 min, 产物 644 bp。

C1A 5'TAGTGTGGTGGTGCCTATGAGCCG3'

C2B 5'GGAATTCAAAATGGCAGGGGAGGG3'

PCR 反应条件: 94℃预变性 4 min, 94℃变性 45 s, 69℃退火及延伸 90 s, 32 循环, 最后 72℃ 7 min, 产物 613 bp。

1.3.2 *p16* 基因编码序列的扩增

p16 引物

p16-15 5'AGAGGGGGAGAGCAGGCAG3'

p16-14 5'CCTGTAGGACCTTCGGTGAC3'

PCR 反应条件: 94℃预变性 4 min, 94℃变性 45 s, 60℃退火 60 s, 72℃延伸 60 s 32 循环, 最后 72℃ 7 min, 产物 580 bp。

1.3.3 *p15* 基因编码序列的扩增

p15 引物

p5271 5'TAAGTTTACGGCCAACGGTG3'

p5821 5'CTTCATCGAATTAGGTGGGTG3'

PCR 反应条件: 94℃预变性 4 min, 94℃变性 45 s, 60℃退火 60 s, 72℃延伸 60 s 32 循环, 最后 72℃ 7 min, 产物 550 bp。

1.3.4 *K-ras* 基因编码序列的扩增

K-ras 引物

ras94 5'GCCATTTTCGGACTGGGAG 3'

ras646 5'CACCCTGTCTTGTCTTTGCTG 3'

1.4 PCR 产物的序列分析

将细胞的 *p53*, *p15*, *p16* 和 *K-ras* 基因编码序列的 PCR 产物利用设计的引物经纯化后直接进行测序。测序工作由上海 Bioasian 生物技术公司完成。

2 结果

2.1 *p53*, *p15*, *p16* 和 *K-ras* 基因的 PCR 扩增

取 BEAS-2B, BEAS-STE 和 3 种 BEAS-TT 细胞的 RNA 经逆转录后, 取逆转录产物 cDNA 为模板, 分别扩增 *p53*, *p15*, *p16* 和 *K-ras* 基因的全部编码序列。扩增产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳证实为设计目标产物, 如图 1。

2.2 *p53*, *p15*, *p16* 和 *K-ras* 基因的测序结果

BEAS-2B, BEAS-STE 和 3 种 BEAS-TT 细胞的 *p53* 和 *K-ras* 基因 cDNA 扩增产物经测序, 结果表明 *K-ras* 基因在 5 株细胞中没有发生突变为野生型。五株细胞的 *p53* 基因均在第 47 位密码子上有 CCG→TCG(脯氨酸→色氨酸)转换而发生错义突变, 在 BEAS-TTb 细胞的 *p53* 基因 356 密码子上发生了 GGG→GGT 转换的同义突变。测序结果见表 1。

测序结果表明, BEAS-2B, BEAS-STE, BEAS-

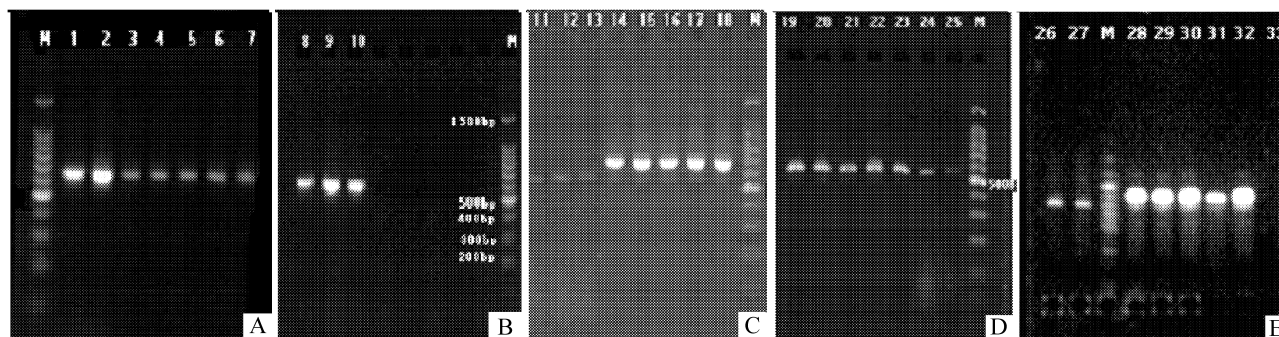


Fig 1. Electrophoresis of PCR product on a 1.8% agarose. BEAS-TT: tumorigenic human bronchial epithelial cell transformed by thiotepa. BEAS-STE: BEAS-TE cells selected from agarose. Lanes 1, 2, 8, 9, 10: *p53* gene PCR product C(613 bp); lanes 3, 4, 5, 6, 7: *p53* gene PCR product B(644 bp) of cell BEAS-2B, BEAS-STE, BEAS-TTa, BEAS-TTb, BEAS-TTc; lanes 11, 12, 13, 24, 25: *p15* gene PCR product(550 bp); lanes 14, 15, 16, 17, 18: *p53* gene PCR product A(686 bp); lanes 19, 20, 21, 22, 23: *K-ras* gene PCR product(552 bp) of cell BEAS-2B, BEAS-STE, BEAS-TTa, BEAS-TTb, BEAS-TTc; lanes 28, 29, 30, 32, 33: *p16* gene PCR product (580 bp) of BEAS-2B, BEAS-STE, BEAS-TTc, BEAS-TTb, BEAS-TTa; lane 31: *p53b* gene PCR product (613 bp) of BEAS-TTa; lane M: marker.

Tab 1. The sequencing result of *p53* and *p16* gene cDNA coding region of BEAS-2B, BEAS-STE, BEAS-TTa, BEAS-TTb and BEAS-TTc

Cell	Passage	Sequencing result of <i>p53</i> gene	Sequencing result of <i>p16</i> gene
BEAS-2B	22	47 Codon CCG→TCG	Wild type
BEAS-STE	6	47 Codon CCG→TCG	Wild type
BEAS-TTa	25	47 Codon CCG→TCG	No detected expression
BEAS-TTb	24	47 Codon CCG→TCG	Codon 4 TCG→TAG
		356 Codon GGG→GGT	Codon 19 GAG→AAG
		Synonymous mutation	Codon 52 GCG→ACG
BEAS-TTc	24	47 Codon CCG→TGG	Codon 52 GCG→ACG

TTa, BEAS-TTb 和 BEAS-TTc 5 株细胞中 *p15* 基因均未发生突变。*p16* 基因测序表明 BEAS-2B 和 BEAS-STE 细胞的编码序列为野生型,在 BEAS-TTb 细胞中第 4 密码子发生 TCG→TAG(丝氨酸→终止密码子)碱基转换结果为无义突变,第 19, 52 密码子分别发生 GAG→AAG(谷氨酸→赖氨酸)转换, GCG→ACG(ALA→苏氨酸)转换的错义突变。BEAS-TTc 细胞中第 19 密码子发生 GAG→AAG(谷氨酸→赖氨酸)转换发生错义突变,在同等条件下可扩增表达较低的 *p53* 基因产物却无法扩增出 BEAS-TTa 细胞的 *p16* 基因产物,说明在 BEAS-TTa 细胞中无可检测的 *p16* 基因 mRNA 表达图(1E)。

3 讨论

癌基因尤其是抑癌基因是多种致癌原攻击的重要靶点。国内外对理化因素诱导细胞转化的分子水平改变的研究已有较多报道,其中包括本室戴向国等^[5]对环磷酸胺诱导的叙利亚地鼠胚胎细胞的 *p53*, *H-ras* 和 *K-ras* 基因的突变和 *c-myc* 基因的表达水平改变研究;葛世丽等^[6]对 α 粒子诱发 BEP2D 恶性转化细胞的 *p53* 基因突变特点和细胞基因表达研究。Hei 等对石棉诱发的 BEP2D 恶性转化和成瘤细胞的 *ras* 基因进行了突变研究,还利用 cDNA 表达芯片对其进行基因表达差异研究^[7,8]。利用本室已建立的人支气管上皮细胞转化模型对药物诱导的人支气管上皮恶性转化细胞进行分子水平改变研究,按细胞的不同转化阶段,观察了 *K-ras*, *p53*, *p15* 和 *p16* 基因的突变情况。*ras* 癌基因产物是信号转导的中间分子,在多种恶性肿瘤中都发现 *ras* 基因的高频率突变,而活化的 *ras* 基因也能引起正常细胞的转化表型。在本试验中未观察到 *K-ras* 基因的突变,可能说明塞替派的细胞转化和转化细胞

的成瘤过程没有涉及 *K-ras* 基因的突变激活,而是通过其他途径诱导细胞发生恶性转化。

p53 是各种癌症中较易发生突变的基因,肺癌中 *p53* 基因突变十分常见。*p53* 基因缺失、突变已被证明是许多肿瘤发生的始因之一。据 Lehman 等^[9]报道 BEAS-2B 在 *p53* 基因 47 密码子有基因突变存在并认为该位点突变与上皮细胞的永生化和在本试验中观察到转化细胞及转化细胞均携带 BEAS-2B 细胞 *p53* 基因 47 密码子的本底突变,但没有新的错义突变发生,说明 *p53* 基因 47 密码子的突变在细胞的永生化和恶性转化过程中均发挥重要作用。细胞由永生化和恶性转化之间的跨越尚需其他因素的参与。

p15 基因(MTS2)与 *p16* 基因(MTS1)均定位于 9p21,在细胞周期的调控中起着关键性的作用^[10]。目前较为公认的 *p15*, *p16* 基因的失活机制是纯合性缺失、突变和高甲基化。本研究结果表明,在转化进程中,BEAS-2B 细胞和 BEAS-STE 细胞 *p16* 基因全部编码序列未观察到基因突变,而在 3 种肿瘤细胞中,BEAS-TTa 没有可检测的 mRNA 表达,BEAS-TTc 和 BEAS-TTb 各有不同位点和数量的错义突变存在,说明 *p16* 基因因突变而失活或表达缺失与塞替派诱导人支气管上皮细胞恶性演进相关。

综合上述结果,本研究认为在与永生化和有关的 *p53* 基因第 47 密码子的突变基础上的 *p16* 基因的错义突变或表达缺失与转化细胞进一步获得致瘤性相关,此过程是否涉及其他癌基因和抑癌基因的异常改变尚需进一步研究。

4 参考文献:

- [1] Yuan SB, Wang ZQ, Ye CQ, Liao MY, Xia Y, Yang MY. Gene mutation in the oncogenic transformation process of im-

- mortalized human bronchial epithelial cells induced by cyclophosphamide[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2001, **15**(6):447-452.
- [2] Chen GY, Yuan SB, Ma HZ, Liao MY. Mutation of *p16^{INK4a}* and *p15^{INK4b}* genes of human bronchial epithelial cells malignantly transformed by cyclophosphamide and thiopeta[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2002, **16**(2):133-137.
- [3] Yuan SB, Liao MY, Ye CQ, Wang ZQ. Malignant transformation of immortalized human bronchial epithelial cells induced by thiopeta[J]. *J Health Toxicol* (卫生毒理学杂志), 2001, **15**(4):207-211.
- [4] Zhou Z, Yuan SB, Liao MY, Chen GY, Yuan BL, Yu SZ. Tumorigenicity of immortalized human bronchial epithelial cell transformed by thiopeta or cyclophosphamide[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2002, **16**(3):216-219.
- [5] Dai XG, Wu DC, Wang ZQ, Zhang YP, Yu TJ. Molecular biological characters of malignant transformation of Syrian hamster embryo cell induced by cyclophosphamide [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1998, **12**(3):196-200.
- [6] Ge SL, Lou TZ, Xiang XQ, Chen W, Wu DC. Malignant transformation of BEP2D cell induced by (alpha) particles [J]. *Chin J Cancer* (癌症), 2001, **20**(9):901-905.
- [7] Zhao YL, Piao CQ, Wu LJ, Suzuki M, Hei TK. Differentially expressed genes in asbestos-induced tumorigenic human bronchial epithelial cells; implication for mechanism [J]. *Carcinogenesis*, 2000, **21**(11):2005-2010.
- [8] Piao CQ, Zhao YL, Hei TK. Analysis of *p16* and *p21* (Cip1) expression in tumorigenic human bronchial epithelial cells induced by asbestos[J]. *Oncogene*, 2001, **20**(50):7301-7306.
- [9] Lehman TA, Modali R, Boukamp P, Stanek J, Bennett WP, Welsh JA, *et al.* *p53* mutations in human immortalized epithelial cell lines [J]. *Carcinogenesis*, 1993, **14**(5):833-839.
- [10] Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitigian SV, *et al.* A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types[J]. *Science*, 1994, **264**(5157):436-440.

Gene mutation in the tumorigenic transformation process of immortalized human bronchial epithelial cells induced by thiopeta

ZHOU Zhe, YUAN Su-Bo, LIAO Ming-Yang

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: **AIM** To understand the molecular mechanisms involved in progressive tumorigenesis. **METHODS** Reverse transcription polymerase chain reaction was utilized to generate the total protein coding region cDNA of *p15*, *p16*, *p53* and *K-ras* gene which were sequenced for mutation. **RESULTS** BEAS-2B, BEAS-TE and BEAS-TT cells were used to detect the mutation of *p53*. The result disclosed codon 47 CCG→TCG transversion of all the five cell lines, which is responsible for the immortalization of BEAS-2B cell. There was no other cumulative missense mutation detected at *p53* gene in the BEAS-TT cell lines. Protein coding region of *p15* and *K-ras* gene was all wild type for all the five cell lines. For BEAS-2B and BEAS-TE cell, the cDNA of *p16* gene was a wild type, while a non-sense mu-

tation in the codon 4(TCG→TAG) and missense mutation in the codons 19, 52 (GAG→AAG, GCG→ACG) were demonstrated in the BEAS-TTb cell. For BEAS-TTc, there was one missense mutation in codon 19(GAG→AAG). There was no detectable mRNA of *p16* gene expression in the BEAS-TTa. **CONCLUSION** Mutation of *p16* gene may be mechanistically related to thiopeta induced malignant transformation.

Key words: thiopeta; epithelial cells, bronchial, human; genes, *p15*; genes, *p16*; genes, *p53*; genes, *K-ras*; cell transformation, neoplastic; mutation

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of China(30271559)

(本文编辑 石 涛)