

p53 基因真核表达质粒 PLJM1-p53-GFP 构建及其应用

朱伟东¹, 辛 婧², 周苏明², 沈 捷², 杜新丽², 张日华², 刘 云^{2*}

(¹东南大学附属中大医院泌尿外科, 江苏 南京 210009; ²南京医科大学第一附属医院老年科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 构建小鼠 p53 基因真核表达质粒 PLJM1-p53-GFP, 研究其对前列腺癌细胞株 PC3 侵袭、增殖能力的影响。方法: 从小鼠 3T3-L1 细胞提取总 RNA, 经 RT-PCR 获得 cDNA, 扩增 p53 基因, 经酶切纯化后的产物与双酶切后的 PLJM1-NRG1-GFP 慢病毒载体连接, 得到 PLJM1-p53-GFP 慢病毒载体并转化感受态细菌 DH5 α , 通过 PCR 筛选阳性克隆, 抽提质粒并测序鉴定。将 PLJM1-p53-GFP 质粒瞬时转染到 PC3 细胞中, 提取 RNA, 定量 PCR 鉴定 p53 高表达水平, 采用细胞侵袭实验观察高表达 p53 的前列腺癌细胞株 PC3 的侵袭能力, 采用流式细胞及划痕试验研究 p53 对前列腺癌细胞株 PC3 增殖活性的影响。结果: 测序证实, 目的基因 p53 插入完全正确且无任何突变; 高表达 p53 的 PC3 细胞的侵袭能力、增殖能力明显下降。结论: 成功构建小鼠 p53 基因真核表达质粒 PLJM1-p53-GFP, 为深入研究肿瘤等相关疾病提供了有效的工具。

[关键词] p53 基因; 慢病毒载体; 构建; 应用

[中图分类号] Q781

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)12-1656-05

Construction and application of mouse PLJM1-p53-GFP plasmid

ZHU Wei-dong¹, XIN Jing², ZHOU Su-ming², SHEN Jie², DU Xin-li², ZHANG Ri-hua², LIU Yun^{2*}

(¹Department of Urology, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009; ²Department of Gerontology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To construct PLJM1-p53-GFP plasmid of mouse p53 gene and study the role of p53 in the prostate cancer cells PC3. **Methods:** The open reading frame (ORF) of mouse p53 gene was amplified from mouse 3T3-L1 cells by RT-PCR, and inserted into the PLJM1-NRG1-GFP vector. The recombinant plasmid was transformed into DH5 α competent E. coli. The positive clones were screened by PCR and the inserts were confirmed by DNA sequencing. The PLJM1-p53-GFP plasmid was transfected into the prostate cancer cells PC3. QPCR was used to detect the efficiency of the transfection. The invasive activity and proliferation of PC3 cells were measured after transfecting the PLJM1-p53-GFP plasmid. **Results:** DNA sequencing demonstrated that the recombinant plasmid PLJM1-p53-GFP was constructed successfully. The invasive activity and proliferation of PC3 cells were obviously decreased after transfection of the PLJM1-p53-GFP plasmid. **Conclusion:** The plasmid of PLJM1-p53-GFP of mouse p53 gene was successfully constructed. It can be used in the functional research for cancer.

[Key words] p53 gene; Lentiviral vector; construction; application

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(12): 1656-1660]

p53 基因是与肿瘤关系最密切的肿瘤抑制基因, 60% 以上的肿瘤存在 p53 基因的异常 (包括点突变、等位基因缺失、重排、插入、基因融合等)。p53 基因与肿瘤的发生、发展以及临床疗效均有密切关

系^[1-2]。近年来, 随着分子生物学的不断发展, 对于疾病的病因、发生、发展的研究已深入到分子水平。因此, 基因治疗已经成为继手术、放疗、化疗、生物治疗后的又一有希望的治疗肿瘤的措施。利用 p53 基因治疗肿瘤已成为研究的热点^[3-4]。因此, 如何将目的基因导入机体细胞或肿瘤细胞, 并获得安全有效的表达是这一研究的重点^[5]。为此本研究采用慢病毒载体技术构建了真核表达质粒 PLJM1-p53-GFP, 并将该质粒转染前列腺癌细胞株 PC3, 研究 p53 对 PC3 细胞侵袭、增殖能力的影响。

[基金项目] 江苏省科技支撑项目 (BE2011802); 上海市糖尿病重点实验室开放课题资助 (SHKLD-KF-1105); 南京医科大学第一附属医院创新团队工程; 江苏省“六大人才高峰”项目 (2009027)

*通讯作者, E-mail: liuyun@njmu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 材料

DEPC (焦碳酸二乙酯), TRIzol Reagent, Lipofectamine™ 2000 Reagent Polybenre 等试剂 (Invitrogen 公司, 美国)。PrimeScript™ RT reagent Kit, Expand™ Template PCR System, Agarose Gel DNA Fragment Purification Kit, *EcoR* I 及 *Nhe* I 内切酶, T4 DNA Ligase (TaKaRa 公司, 日本)。Ultra-Sep Gel Extraction Kit (Omega 公司, 美国)。Plasmid Mini/MiDi Kit (Qiagen 公司, 德国)。细胞侵袭实验 24 孔板 (Corning Costar 公司, 美国)。

3T3-L1 前体脂肪细胞及前列腺癌细胞株 PC3 购自上海细胞生物研究所。DH5 α 菌、PLJM1-NRGI-GFP 载体由南京医科大学分子遗传研究室李建民教授馈赠。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

根据 GenBank 登录号 NM_011640.3 mRNA 序列设计引物, 由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。上游引物: 5'-GGGGCTAGCGCCACCATGACTGCCATGGAGGAG-3', 下游引物: 5'-GGGGAA-TTCGTCTGAGTCAGGCCCTTTC-3', PCR 产物约为 1 200 bp。上游引物引入 *Nhe* I 酶切位点, 下游引物引入 *EcoR* I 酶切位点。

1.2.2 小鼠 3T3-L1 细胞总 RNA 的抽提

采用 PolyATtract_Series9600™ mRNA Isolation System 试剂盒提取小鼠 3T3-L1 细胞总 RNA, 取 2 μ l 经 1% 琼脂糖凝胶电泳观察总 RNA 的完整性, 并用紫外分光光度计测定 260 nm、280 nm 波长的光密度值检测总 RNA 的纯度, 保存于 -70°C 待用。

1.2.3 RT-PCR 扩增目的基因

按 PrimeScript™ RT reagent Kit 反应体系逆转录 2 μ g mRNA, 37°C 15 min, 85°C 30 s。以上述的小鼠 cDNA 为模板扩增特异片段。PCR 反应条件为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环; 72°C 10 min, 4°C 2 min。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测获取小鼠 p53 基因全长开放阅读框 ORF。

1.2.4 PCR 纯化产物的限制性酶切

以上述小鼠 3T3-L1 细胞 cDNA 为模板, PCR 扩增 p53 全长 ORF, DNA fragment 纯化试剂盒纯化 (TAKARA)。纯化产物经 *Nhe* I 和 *EcoR* I 双酶切。酶切体系: 总体积 40 μ l, PCR 纯化片段 25 μ l, *Nhe* I 2 μ l, *EcoR* I 2 μ l, 10 \times M buffer 4 μ l, 灭菌水 7 μ l。反

应条件: 37°C 水浴 1 h。酶切产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。切胶后用 Gel Extraction 试剂盒 (OMEGA) 纯化。

1.2.5 真核表达质粒 PLJM1-p53-GFP 制备

纯化产物与经过 *Nhe* I/*EcoR* I 双酶切后线性化的 PLJM1-NRGI-GFP 载体片段连接。反应体系: 2 \times ligation buffer 5 μ l, 酶切纯化产物 2 μ l, 载体片段 1 μ l, T4 连接酶 (1 U/ μ l) 1 μ l, 灭菌水补足总体积 10 μ l。混匀反应液, 22°C 孵育 3 h, 对连接产物进行转化 DH5 α 感受态细菌, 涂于含有氨苄青霉素的 LB 琼脂平板中, 37°C 过夜培养。待克隆长出后挑选单克隆落入培养瓶中与 Amp 抗性 LB 培养基混合, 37°C 250 r/min 生长过夜。次日以菌液为模板作 PCR 后行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。阳性克隆保种并抽提质粒送华大公司测序。

1.2.6 序列分析

应用 NCBI 网站提供的 BLAST 分析软件, 对测序结果进行序列比对, 鉴定 PLJM1-p53-GFP *Nhe* I - *EcoR* I 位点区间的插入片段 p53 表达序列的准确性和可靠性。

1.2.7 质粒转染及效果验证

PC3 细胞培养在无血清培养液中, 以脂质体 Lipofectamine™ 2000 瞬时转染 PLJM1-p53-GFP 质粒到 PC3 细胞中, 提取 RNA, 定量 PCR 鉴定 p53RNA 表达水平, 同时亲本细胞和转染空载体的 PC3 细胞作为对照。实验重复 3 次。

1.2.8 p53 对 PC3 细胞浸润能力的影响

为进一步研究 p53 基因的功効, 采用细胞浸润实验观察 p53 基因对 PC3 细胞浸润能力的影响。分别接种转染 PLJM1-p53-GFP 质粒、空载体的 PC3 细胞及 PC3 亲本细胞 (1 \times 10⁵ 细胞/孔) 到侵袭小室, 用含有血清的培养基培养 48 h, HE 染色并拍照记录侵袭到小室底侧的细胞, 同时计数侵袭到小室底侧的细胞数目 (取 6 个视野计数, 取平均数进行统计学分析)。实验重复 3 次。

1.2.9 p53 对 PC3 细胞增殖能力的影响

为进一步研究 p53 基因对前列腺癌细胞 PC3 的作用, 分别采用划痕试验及流式细胞实验观察 p53 基因对 PC3 细胞周期及其增殖能力的影响。划痕实验: 分别接种转染 PLJM1-p53-GFP 质粒、空载体的 PC3 细胞及 PC3 亲本细胞到 3 cm 小皿中, 待细胞长到 90%, 用黄色枪头从中间划痕, 继续培养 72 h, 观察中间划痕是否长满细胞, 拍照记录。流式细胞术: 分别接种转染 PLJM1-p53-GFP 质粒、空载

体的PC3细胞及PC3亲本细胞到6 cm小皿中,待贴壁后,改用5%BSA DMEM培养液培养过夜,而后改用完全培养液培养24 h,收集细胞用于流式检测细胞周期。实验重复3次。

1.3 统计学方法

采用SPSS11.0软件进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 获得p53基因开放阅读框ORF片段及PCR纯化酶切产物

以小鼠3T3-L1细胞cDNA为模板,p53-F/R为引物扩增p53基因全长开放阅读框ORF,目的片段与鉴定结果相符(1 200 bp,图1)。

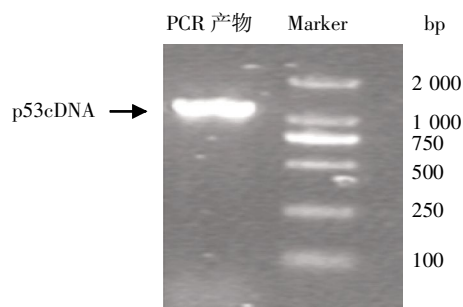


图1 小鼠p53基因ORF片段扩增

Figure 1 ORF fragment of mouse p53 gene was amplified

2.2 真核表达质粒PLJM1-p53-GFP鉴定结果

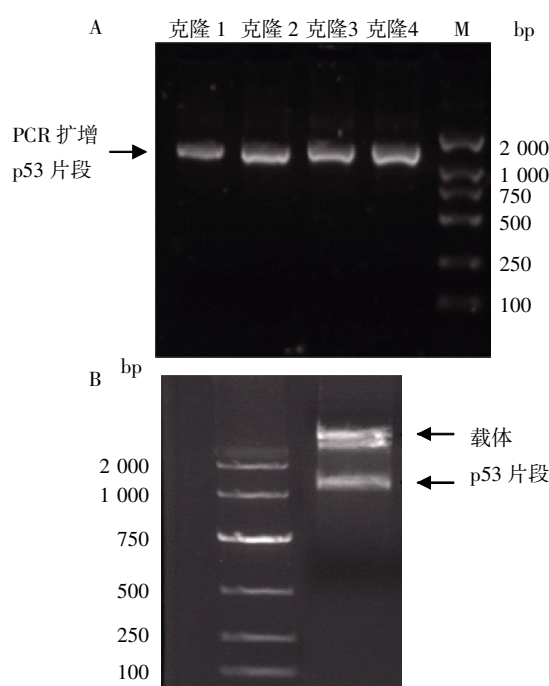
p53基因PCR酶切纯化产物与双酶切后的PLJM1-NRG1-GFP慢病毒载体连接得到PLJM1-p53-GFP慢病毒载体,连接产物转化感受态细菌DH5 α ,挑选4个单克隆摇菌,以菌液为模板,p53-F/R为引物,扩增PCR鉴定结果与预期相符(图2A);对以构建好质粒行Nhe I、EcoR I双酶切后行琼脂糖凝胶电泳,鉴定结果与目的片段大小相符(图2B)。对鉴定阳性的克隆抽提质粒并送华大公司测序,测序引物CMV-F/R,波峰图分析显示测序结果正确。

2.3 PLJM1-p53-GFP质粒转染效果验证

分别收集PC3亲本细胞、转染空载体及PLJM1-p53-GFP质粒的PC3细胞,提取RNA,行定量PCR检测p53的表达情况,结果证明转染PLJM1-p53-GFP质粒的细胞明显高表达p53($P < 0.05$,图3)。

2.4 p53基因明显抑制PC3细胞的浸润能力

HE染色提示:与PC3亲本细胞和转染空载体对照组比较,转染PLJM1-p53-GFP质粒的PC3细胞侵袭到小室底侧的较少,细胞数目明显减少($P <$



A: 挑选克隆,PCR验证p53 cDNA连接到载体中;B: 酶切鉴定p53 cDNA连接到载体中。

图2 PLJM1-p53-GFP质粒PCR鉴定结果

Figure 2 PLJM1-p53-GFP was identified by PCR

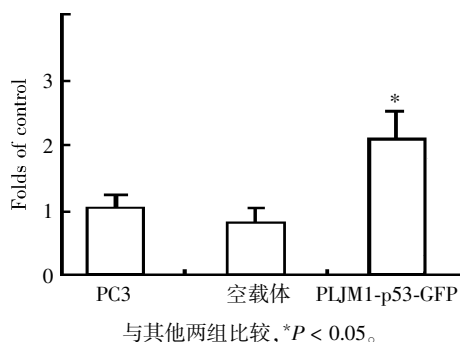


图3 QPCR验证PLJM1-p53-GFP质粒转染效果

Figure 3 QPCR was used to analysis the effect of PLJM1-p53-GFP

0.05,图4);侵袭实验结果显示p53基因可使PC3细胞侵袭能力明显下降。

2.5 p53基因明显抑制PC3细胞的增殖能力

划痕实验结果表明转染PLJM1-p53-GFP质粒的PC3细胞从两侧生长的速度明显低于对照组亲本细胞PC3和空载细胞,结果显示细胞生长72 h后,转染PLJM1-p53-GFP质粒的PC3细胞中间未长满细胞(图5),提示细胞迁移能力降低。

3 讨论

p53基因是癌抑制基因中最受人瞩目的一种,在大肠癌、乳腺癌、肺癌、胃癌、食道癌、肝癌、胰腺

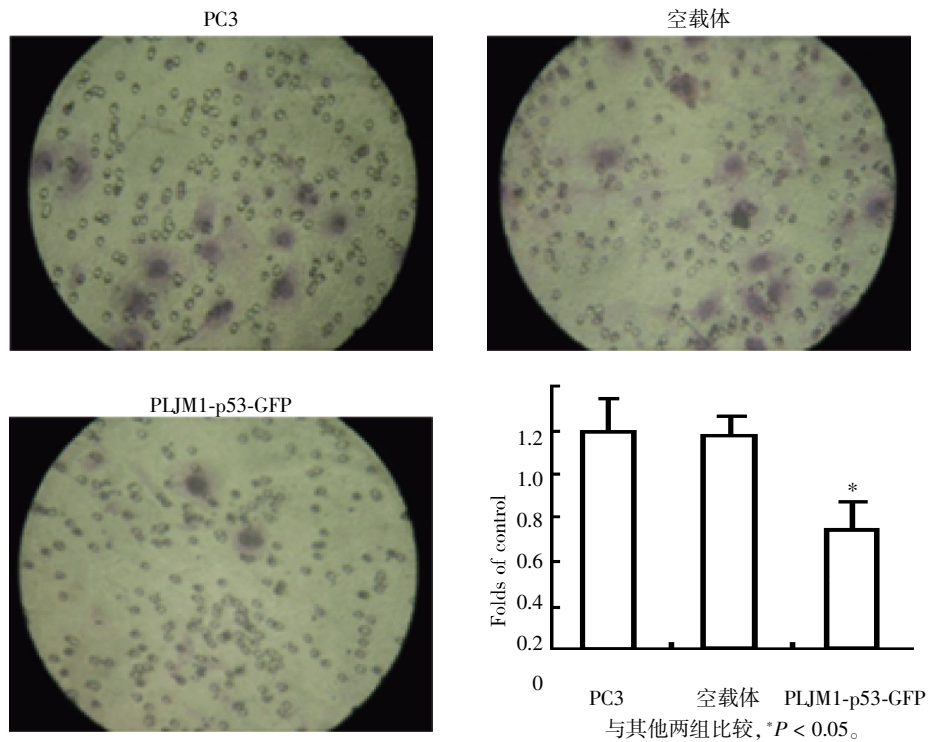


图 4 HE 染色($\times 200$)及细胞计数观察 p53 对 PC3 细胞侵袭到小室底侧的情况

Figure 4 HE staining and cells counting were used to analysis the effect of p53 on the invasive activity of PC3 cells

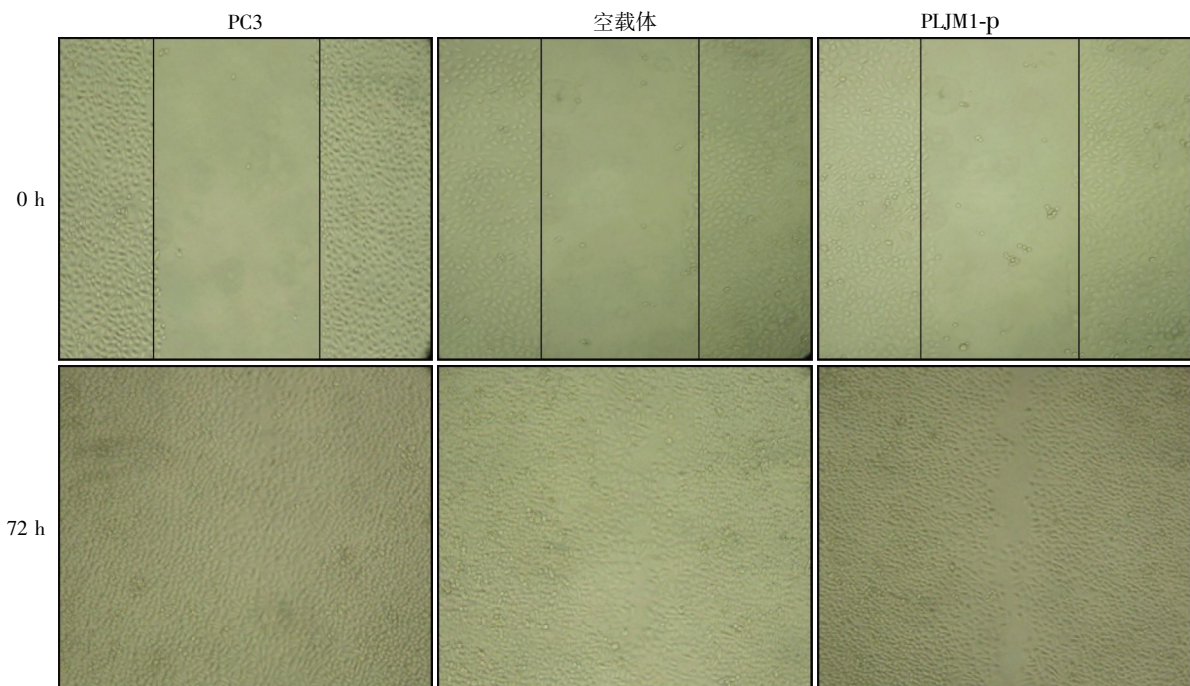


图 5 划痕实验观察 p53 对 PC3 细胞增殖的影响($\times 100$)

Figure 5 Scratch test and Cell flow were used to analysis the effect of p53 on the proliferation of PC3 cells

癌、脑肿瘤等肿瘤中均发现其发生了变异^[6-8]。p53 蛋白实际上是一种转录因子,在细胞处于应激状态时可被诱导表达,从而促进细胞进入细胞周期的停滞阶段,继而凋亡或者衰老。最近的研究又发现了 p53 蛋白的一些新功能,比如调控细胞代谢通路,调

控与胚胎植入过程相关的细胞因子表达等^[9],特别是 p53 蛋白可以诱导细胞老化,这已经成为它发挥抑癌作用的一大主要机制,包括重建 p53 蛋白的活性,利用 p53 基因的突变情况来判断患者的预后,开发新的治疗药物,以及选择合适的治疗方案等。

因此,p53蛋白在人体肿瘤中所具有的重要作用使它成为癌症治疗研究当中大家共同关注的靶点。

本研究采用 RT-PCR 技术将 p53 基因起始密码子与终止密码子之间 cDNA 序列扩增出来(图 1),将其克隆到经过 Nhe I/EcoR I 双酶切后线性化的慢病毒载体 PLJM1-NRGI-GFP 中,并通过 PCR 及测序证实 PLJM1-p53-GFP 载体构建成功(图 2)。

作为转染外源基因的慢病毒载体,是指以人类免疫缺陷病毒-1(HIV-1)来源的一种病毒载体,包含了包装、转染、稳定整合所需要的遗传信息,是慢病毒载体系统的主要组成部分。携带有外源基因的慢病毒载体在慢病毒包装质粒、细胞系的辅助下,经过病毒包装成为有感染力的病毒颗粒,通过感染细胞或活体组织,实现外源基因在细胞或活体组织中表达。但是此种载体也存在问题,比如重组病毒的滴度还不够高,构建过程复杂困难等。本研究中采用该技术构建的真核表达载体 PLJM1-p53-GFP 为进一步从分子水平研究 p53 基因的作用机制奠定了基础,同时也为基因诊断和基因治疗提供了实验依据。

为进一步研究 p53 基因功能并观察载体效果,在本研究中将 PLJM1-p53-GFP 质粒转染到人类前列腺癌细胞株 PC3 中,通过 QPCR 验证 PLJM1-p53-GFP 质粒转染效果(图 3),同时采用细胞浸润实验观察 p53 基因对 PC3 细胞浸润作用的影响,结果发现 p53 基因对 PC3 细胞的浸润作用有明显的抑制(图 4),同时通过划痕试验观察 p53 基因对 PC3 细胞增殖能力的影响,结果发现高表达 p53 后,细胞增生速度下降,提示高表达 p53 蛋白抑制细胞生长。这些结果再次验证了 PLJM1-p53-GFP 质粒的成功构建,同时为 p53 基因在肿瘤基因治疗中的应用奠定了基础。最新研究表明,p53 作为脂肪生成的负性调节剂通过阻断细胞周期进而抑制前体脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞、抑制脂肪细胞内脂滴聚集,同时在肥胖相关的肿瘤发生发展中起重要作用^[10]。因此,p53 基因真核表达质粒 PLJM1-p53-GFP 的构建为进一步探讨 p53 基因的功能,尤其是在代谢、生殖、生育、生殖细胞基因组失稳、肿瘤、生物寿命等众多领域里的作用将具有重要的意义。

致谢:感谢南京医科大学细胞生物学系李建民教授的指导。

[参考文献]

- [1] Prabha S, Sharma B, Labhassetwar V. Inhibition of tumor angiogenesis and growth by nanoparticle-mediated p53 gene therapy in mice [J]. *Cancer Gene Ther*, 2012, 19(8): 530-537
- [2] Ryu DS, Lee HS, Lee GS, et al. Effects of the ethylacetate extract of *orostachys japonicus* on induction of apoptosis through the p53-Mediated signaling pathway in human gastric cancer cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(5): 660-665
- [3] Li T, Kon N, Jiang L, et al. Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence [J]. *Cell*, 2012, 149(6): 1269-1283
- [4] Hock AK, Vousden KH. Tumor suppression by p53: fall of the triumvirate? [J]. *Cell*, 2012, 149(6): 1183-1185
- [5] Pagliaro LC, Keyhani A, Williams D, et al. Repeated intravesical instillations of an adenoviral vector in patients with locally advanced bladder cancer: a phase I study of p53 gene therapy [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(12): 2247-2253
- [6] Vanamala J, Reddivari L, Radhakrishnan S, et al. Resveratrol suppresses IGF-1 induced human colon cancer cell proliferation and elevates apoptosis via suppression of IGF-1R/Wnt and activation of p53 signaling pathways [J]. *BMC Cancer*, 2010, 26(10): 238
- [7] Deisenroth C, Itahana Y, Tollini L. p53-Inducible DHRS3 is an endoplasmic reticulum protein associated with lipid droplet accumulation [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(32): 28343-28356
- [8] Zhizhaong Zhang, Guangbo Fu, Zhendong Zhang, et al. p53 codon 72 polymorphism and ovarian cancer risk: a meta-analysis [J]. *Journal of NJMU*, 2008, 28(5): 279-285
- [9] Yuan H, Zhang X, Huang X, et al. NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species mediate FFAs-induced dysfunction and apoptosis of β -cells via JNK, p38 MAPK and p53 pathways [J]. *PLoS One*, 2010, 5(12): e15726
- [10] Nelson LE, Valentine RJ, Cacicedo JM, et al. A novel inverse relationship between metformin-triggered AMPK-SIRT1 signaling and p53 protein abundance in high glucose exposed HepG2 cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012, 303(1): C4-C13

[收稿日期] 2012-03-29