

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01322

## 反式二羟环氧苯并芘诱导人支气管上皮细胞 p53 表达分析

Anti-Benzo(a)pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide induced expression of p53 in human bronchial epithelial cells

张丽娟, 李 觉

同济大学医学院预防医学教研室, 上海 200092

[关键词] 苯并(a)芘; 反式二羟环氧苯并芘; 人支气管上皮细胞; p53

[中图分类号] R 734.1 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2009)11-1322-03

多环芳烃化合物 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 是全球性有机污染物, 在各种环境介质如空气、水、土壤、沉积物等中都广泛存在。PAHs 中有相当一部分是致癌物, 其中以苯并[a]芘 (benzo[a]pyrene, B[a]P) 的致癌性最强。B[a]P 可引起实验动物肺癌、皮肤癌等多种癌症。B[a]P 本身无致癌活性, 必须在体内活化代谢后, 生成终致癌物如反式二羟环氧苯并芘 (anti-benzo[a]pyrene *trans*-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide, anti-BPDE) 等才具有致癌活性。anti-BPDE-DNA 加合物的生成被认为是 B[a]P 致癌过程的关键<sup>[1-2]</sup>。该代谢产物不可逆地引起细胞内生物大分子的损伤 (如 DNA, 蛋白和脂质)<sup>[3]</sup>, 产生致突变和致癌作用。但是对于 anti-BPDE 介导的致癌机制研究还不是很明确。为了更好地理解 anti-BPDE 作用后的分子行为, 在一定的细胞类型中证实基因和蛋白的表达不同已经成为当今的研究兴趣所在。p53 是一个重要的肺癌变相关基因, 超过一半的癌症患者发生了 p53 抑癌基因的突变, 这表明正常的 P53 蛋白在防御癌症的过程中起着至关重要的作用。而大约 95% 致癌的 P53 蛋白突变发生在与 DNA 结合的核心区域, 主要分布于 Exon 5~Exon 8 之间<sup>[4]</sup>。科学家们发现该区域对研究它的抗癌活性起着关键的作用。黄勇等<sup>[5]</sup>研究表明 anti-BPDE 诱发 p53 基因 Exon8 发生 G→T 点突变。

本实验用分子生物学方法研究 B[a]P 代谢产物 anti-BPDE 在体外诱导人支气管上皮细胞 16HBE 恶性转化过程中 p53 基因 Exon5~Exon8 外显子改变以及 P53 蛋白的表达改变, 以进一步探讨 B[a]P 诱导细胞恶性转化的机制。

### 1 材料和方法

1.1 细胞培养 人支气管上皮细胞 16HBE (human bronchial epithelial cells, 16HBE), 由苯并[a]芘活性代谢产物 anti-BPDE 恶性转化的 16HBE 细胞 (16HBE-C) 均由广州医学院赠送, 恶性转化的 16HBE 细胞可以在裸鼠身上成瘤。细胞培养于 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度为 37℃ 的二氧化碳孵箱中。

细胞培养于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 待细胞达到 85% 融合时, 用含有 0.25% 胰蛋白酶/0.02% EDTA 的 PBS 消化, 按 1:3 的比例进行传代。

1.2 16HBE 细胞和 16HBE 恶性转化细胞生长曲线的绘制 16HBE 细胞和 16HBE 恶性转化细胞分别以  $3.5 \times 10^4$  / ml 的密度接种于 24 孔板内, 每孔 1 ml, 每隔 12 h 用锥虫蓝染色法计数细胞, 连续 132 h, 每次计数 3 个孔, 计算平均值, 每隔 1 d 换液 1 次, 绘制细胞生长曲线, 计算两株细胞的群体倍增时间。

1.3 p53 基因测序分析 在收集细胞前 36~48 h 接种细胞, 在每个 25 cm<sup>2</sup> 的培养瓶中分别接种  $5 \times 10^5$  个 16HBE 和 16HBE 恶性转化细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化单层培养细胞, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养液配成单个细胞悬液, 分别取  $1 \times 10^6$  个细胞。试剂盒法提取 DNA 然后进行 PCR 扩增 (PCR 试剂盒均购自 Gibco 公司), 引物设计参照 Frebourg 等<sup>[6]</sup> 的研究, PCR 条件为: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min, 33 个循环, 然后 72℃ 10 min; 通过 DNA 测序仪进行检测。

1.4 免疫细胞化学检测 P53 蛋白在两株细胞中的表达量 将盖玻片灭菌后放入 24 孔培养板内。将细胞悬液以  $1 \times 10^4$  个接种在玻片上, 每孔 1 ml。细胞贴壁后用 4℃ 预冷的丙酮进行固定, 0.1% Triton 100 进行打孔 10 min, 10% FBS 进行封闭 1 h, 抗 P53 抗体孵育过夜, 根据 SABC 免疫组化试剂盒说明书完成操作步骤。光学显微镜下观测染色变化。

1.5 免疫印迹 在每个培养瓶中分别接种  $5 \times 10^5$  个 16HBE 细胞和 16HBE 恶性转化细胞; 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下培养细胞至对数生长期; 提取细胞蛋白, 取适量蛋白与 5×SDS 上样缓冲液及 100 mmol/L DTT 煮沸 5 min, 取等量蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离; 将蛋白经湿式电转法转移至硝酸纤维素膜 (300 mA, 恒流 2 h), 将硝酸纤维素膜置于适量封闭液中, 4℃, 过夜, 将硝酸纤维素膜用 TBS-T 清洗 3 次, 10 min/次; 根据蛋白分子量标记剪取硝酸纤维素膜上所需的部分, 在杂交袋中加适量滴度的一抗, 即抗

[收稿日期] 2009-04-25

[接受日期] 2009-08-25

[基金项目] 上海市卫生局资助课题 (08GWQ062); 同济大学“青年优秀人才培养行动计划” (2007kj066), Supported by Shanghai Municipal Health Bureau (08GWQ062) and Young Talents Training Program of Tongji University (2007kj066).

[作者简介] 张丽娟, 博士, E-mail: zhangxiaoyi@tongji.edu.cn

P53 抗体(Santa Cruz), 1 : 250 稀释, 4℃, 杂交过夜,  $\beta$ -actin 作为内参照; 硝酸纤维素膜用 TBS-T 液漂洗 3 次, 10 min/次, 在杂交袋中加入适量滴度的二抗(中杉金桥生物技术公司), 室温轻摇 1 h; TBS-T 漂洗 3 次, 10 min/次, 采用免疫印迹 ECL 化学发光法, 暗室曝光显影。

1.6 二维凝胶电泳及免疫印迹 测定对数生长期 16HBE 细胞蛋白、对数生长期 16HBE 恶性转化细胞蛋白浓度, 取 7 cm pH 3~10 的 IPG 胶条, 200  $\mu$ g 上样进行等电聚焦。等电聚焦后进行 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色。PDQuest 软件进行匹配分析。同时将 16HBE 恶性转化细胞蛋白 2DE 的平行胶进行硝酸纤维素膜转膜, 分别用  $\beta$ -actin、P53 抗体进行杂交, ECL 发光显色。

## 2 结果

2.1 16HBE 细胞和 16HBE 恶性转化细胞的生长特性 为了解 16HBE 细胞和 16HBE 恶性转化细胞的体外细胞增殖情况, 阐明 2 株细胞的生长速度是否有不同, 并确定 2 株细胞的倍增时间, 我们对这 2 株细胞的生长速度分别进行了检测, 采用锥虫蓝染色计数法, 每隔 12 h 进行活细胞计数 1 次, 绘制这 2 株细胞的生长曲线(图 1)。在整个观测时间内对比 2 株细胞的增殖情况, 可以看出, 16HBE-C 恶性转化细胞生长速度要快于 16HBE 细胞。2 株细胞的群体倍增时间计算根据依据 Patterson 公式  $t_D = t \times \lg 2 / (\lg n_t - \lg n_0)$  计算<sup>[7]</sup> ( $t_D$ : 细胞倍增时间;  $t$ : 培养时间;  $n_0$ : 接种时的细胞数;  $n_t$ : 培养一定时间后的细胞数)。结果表明, 16HBE 恶性转化细胞的倍增时间为 26.77 h, 而 16HBE 的倍增时间为 30.70 h。

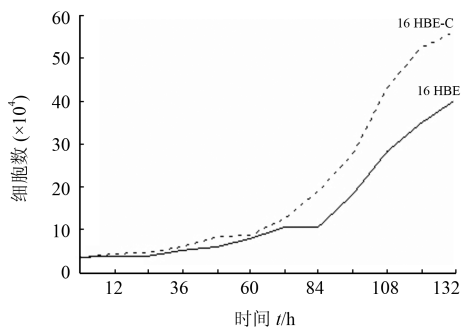


图 1 16HBE 和 16HBE-C 细胞增殖情况

2.2 16HBE 细胞和 16HBE 恶性转化细胞的 p53 基因序列测定 为了解 p53 基因在 16HBE 恶性转化细胞中是否发生突变, 旨在找出其编码的氨基酸是否发生变化, 我们对 16HBE 和 16HBE 恶性转化细胞的 p53 基因组进行了序列的测定。本次研究在 2 株细胞中均未检测到 p53 基因突变。

2.3 P53 蛋白在 16HBE 恶性转化细胞中表达水平升高 P53 的单克隆抗体来源于鼠, 可以特异性地与 P53 相结合, 用于检测 P53, 在细胞和蛋白水平均无非特异性染色。由图 2 可见, P53 在 16HBE 恶性转化细胞中表达要高于 16HBE 细胞(选择每个样品中 10 个非重叠视野, 计算每个视野中的阳性细胞与总细胞数的百分比, 取平均数)。

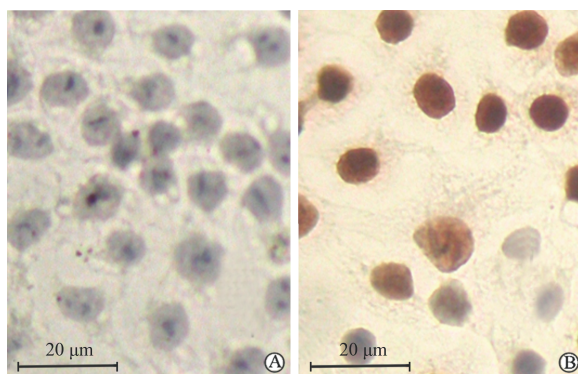


图 2 16HBE 和 16HBE-C 细胞的免疫细胞化学染色

2.4 免疫印迹提示 P53 蛋白在恶性转化细胞中表达增高 我们用免疫印迹的方法, 以  $\beta$ -actin 为内参直接检测了 P53 蛋白的表达, P53 蛋白在恶性转化细胞中表达要高于 16HBE 细胞(图 3)。

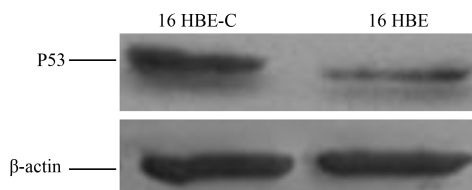


图 3 16HBE 和 16HBE-C 细胞中 P53 蛋白水平的检测

2.5 二维凝胶电泳 P53 在恶性转化细胞的蛋白质表达水平表达增高 对数生长期 16HBE 和 16HBE 恶性转化细胞蛋白进行二维凝胶电泳的研究。用 7 cm pH 3~10 胶条进行等电聚焦和 SDS-PAGE 进行 2DE-PAGE, 上样量为 200  $\mu$ g 蛋白, 考马斯亮蓝进行染色, 染色后的凝胶用 Gel Doc2000 进行扫描, 用 BIO-RAD 提供的 PDQuest 7.01 分析软件对图谱进行分析。在 16HBE 细胞中可以检测到 313 个蛋白点, 而在 16HBE 恶性转化细胞中可以检测出 333 个蛋白点, 匹配率为 86%。另将 2 块平行样的 16HBE 和 16HBE 恶性转化细胞的 2D 胶进行转膜, ECL 发光法进行检测, 以  $\beta$ -actin 作为定量内参照, 结果提示 P53 蛋白在 16HBE 恶性转化细胞中表达增高, 等电点约在 6.5~7.2 左右, 相对分子质量约为 53 000(图 4)。

## 3 讨论

支气管肺癌对人类的危害众所周知, 正成为我国威胁最严重的恶性肿瘤及我国居民的主要死亡原因。肺癌也是一种基因遗传病, 其发生的根本原因在于细胞基因组 DNA 的损伤, 导致细胞癌基因的激活或过度表达, 抑癌基因(tumor suppressor gene, TSG)的丢失或其产物的失活, 或两者兼而有之, 引起细胞无限制生长而形成恶性肿瘤。在肺癌中, 激活的癌基因组为 myc 和 ras 癌基因家族, 抗癌基因为 Rb 和 p53 基因<sup>[8]</sup>。TSG 对防止细胞癌变有着重要作用, Minna 等<sup>[9]</sup>从分子病理学角度出发, 提出了肺癌的演变是一系

列分子变异的模式,其中 p53 基因突变是肺癌发生的重要关键基因之一,深入研究 p53 基因突变对于了解肺癌的发生发展具有重要的意义。

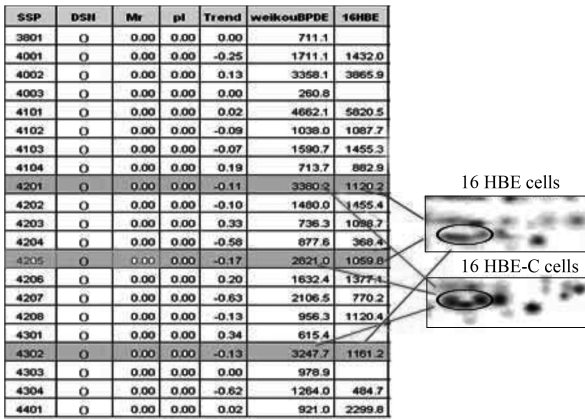


图4 二维凝胶电泳检测 16HBE 和 16HBE-C 细胞中 P53 蛋白的水平

p53 定位于人类 17p13.1 染色体上,全长约 16~20 kb,由 11 个外显子和 10 个内含子组成,其编码蛋白由 393 个氨基酸组成,相对分子质量 53 000,是与核 DNA 结合的磷蛋白。p53 基因的一级结构已基本清楚,含有 3 个结构区:一个酸性的氨基末端区、碱性 C 末端区和一个中部区。其中部区能直接与 DNA 结合,绝大多数肿瘤中检测到的 p53 点突变即发生在该区域中。p53 基因具有转录因子的特性,参与细胞内众多的生理和病理过程。p53 的不同功能取决于与 p53 作用的细胞或病毒蛋白。p53 生理功能主要有 2 种:一是抑制细胞分裂,让其停留在细胞周期的 G<sub>1</sub> 期;另一种是使细胞凋亡。在人类肿瘤发生过程中,p53 基因监控功能的丧失是目前最常检测到的变化之一。在大约 200 多种不同的恶性肿瘤中,有 60% 以上的肿瘤带有 p53 基因突变,大约 50% 的肺癌存在着 p53 基因的突变。Takahashi 等<sup>[10]</sup> 研究发现,肺癌中 p53 遗传异常包括纯合子缺失及伴随点突变所致 mRNA 大小的改变,这些突变位于 p53 基因的阅读框上,并在高度保守区改变了 p53 蛋白的氨基酸顺序(G→T),p53 基因的突变集中于密码子 132~285 之间,因此 p53 基因突变是肺癌中发生频率最高的遗传改变,p53 失活对肺癌的产生起重要作用。研究认为 95%~98% 的 p53 基因位于 5、6、7、8 四个外显子的相对保守区域内<sup>[11]</sup>。

本研究选用人支气管上皮细胞 16HBE 及由 B[a]P 代谢活化产物 anti-BPDE 诱导的 16HBE 恶性转化细胞作为研究模型,其研究优势在于 16HBE 恶性转化的原因明确,即由 anti-BPDE 所致,这为研究 B[a]P 致癌机制研究提供了一个良好的研究模型。关于 16HBE 细胞和 16HBE 恶性转化细胞的研究已有一些相关报道,纪卫东等<sup>[12]</sup> 研究表明,p53 基因点突变可能是 B[a]P 诱发肺癌的早期分子事件。

本研究结果表明,anti-BPDE 诱导 16HBE 恶性转化过程中未检测到 p53 基因点突变,更没有引起 p53 氨基酸序列的改变。但在蛋白水平,恶性转化细胞中 P53 蛋白表达明显高于 16HBE 细胞,引起蛋白表达增高的原因还有待于进一步证实。虽然 p53 基因没有向突变型转变,而 16HBE 恶性转化细胞增长速度较 16HBE 快,说明 anti-BPDE 诱导 16HBE 恶性转化过程中可能存在其他与细胞增生相关的基因或蛋白表达增高,值得我们深入研究。

【参考文献】

- [1] Topinka J, Milcova A, Libalova H, Novakova Z, Rossner P Jr, Balascek I, et al. Biomarkers of exposure to tobacco smoke and environmental pollutants in mothers and their transplacental transfer to the foetus. Part I: Bulky DNA adducts[J]. Mutat Res, 2009, 669(1-2): 13-19.
- [2] Moolenaar-Wirsiy P J, Wirsiy Y G, Urso P. Presence of CD4<sup>+</sup> SP and DP(gammadelta, alphabeta) T-cells expressing BPDE-DNA adducts in progeny of mouse dams exposed to benzo(alpha)pyrene at mid-gestation[J]. J Immunotoxicol, 2007, 4: 267-277.
- [3] Jiang Y, Fu J, Greenlee A R, Shen Y, Duan H, Chen X. Effect of sciencing of HER2/neu gene in anti-BPDE-transformed cells [J]. Toxicol In Vitro, 2009, 23: 53-59.
- [4] Sarvary E, Nagy P, Benjamin A, Szoke M, Rempert A, Jansen J, et al. Mutation scanning of the p53 tumor suppressor gene in renal and liver transplant patients in Hungary [J]. Transpl Proc, 2005, 37: 969-972.
- [5] 黄勇, 陈家堃, 吴中亮, 吕嘉春, 纪卫东, 蒋义国. 反式二氢二醇环氧苯并芘诱发细胞 p53 基因的变化 [J]. 毒理学杂志, 2005, 19: 99-103.
- [6] Frebourg T, Barbier N, Yan Y X, Garber J E, Dreyfus M, Fraumeni J, et al. Germ-line p53 mutations in 15 families with Li-Fraumeni syndrome [J]. Am J Human Genet, 1995, 56: 608-615.
- [7] 司徒镇强, 吴军政. 细胞培养 [M]. 西安: 世界图书出版公司西安公司, 1996: 136.
- [8] Brambilla E, Gazdar A. Pathogenesis of lung cancer signaling pathways: roadmap for therapies [J]. Eur Respirat J, 2009, 33: 1485-1497.
- [9] Minna J D, Kurie J M, Jacks T. A big step in the study of small cell lung cancer [J]. Cancer Cell, 2003, 4: 163-166.
- [10] Takahashi T, D'Amico D, Chiba I, Buchhagen D L, Minna J D. Identification of intronic point mutations as an alternative mechanism for p53 inactivation in lung cancer [J]. J Clin Invest, 1990, 86: 363-369.
- [11] Hosseini-khalili A, Haines D D, Modirian E, Soroush M, Khat-eri S, Joshi R, et al. Mustard gas exposure and carcinogenesis of lung [J]. Mutat Res, 2009, 678: 1-6.
- [12] 纪卫东, 吴中亮, 陈家堃. 反式-BPDE 诱发人支气管上皮细胞系 P53 基因突变的研究 [J]. 中国职业医学, 2001, 28: 12-13.

【本文编辑】尹茶