

# 抑癌基因 p27<sup>Kip1</sup> 对肝癌细胞增生及 DNA 合成的影响

安家泽, 董宏林, 窦科峰

安家泽, 窦科峰, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科  
陕西省西安市 710032  
董宏林, 山西医科大学第二医院肝胆外科 山西省太原市 030001  
项目负责人: 安家泽, 710032, 陕西省西安市长乐西路17号, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科. anchen@fmmu.edu.cn  
电话: 029-83375259  
收稿日期: 2004-12-10 接受日期: 2005-01-08

## 摘要

**目的:** 探讨抑癌基因 p27<sup>Kip1</sup> 对肝癌细胞的抑制作用。

**方法:** 利用脂质体介导法将真核表达载体 pcDNA3.1/Myc-His(+)-p27<sup>Kip1</sup> 基因导入肝癌细胞株 HHCC 细胞中, 经 G418 筛选获得稳定表达的细胞克隆, 用 MTT、<sup>3</sup>H-TdR 掺入法和克隆形成实验观察抑癌基因 p27<sup>Kip1</sup> 对肝癌细胞增生及 DNA 合成的影响, 电子显微镜技术探讨过表达的 p27<sup>Kip1</sup> 抑制肝癌细胞生长的可能机制。

**结果:** 抑癌基因 p27<sup>Kip1</sup> 对肝癌细胞增生及 DNA 合成均有明显抑制作用, 抑制率达 56% ( $P < 0.01$  vs 转染空载体组), 电镜结果显示肝癌细胞发生凋亡。

**结论:** 抑癌基因 p27<sup>Kip1</sup> 可能通过诱导肝癌细胞凋亡抑制肝癌细胞生长。

安家泽, 董宏林, 窦科峰. 抑癌基因 p27<sup>Kip1</sup> 对肝癌细胞增生及 DNA 合成的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(4):548-550  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/548.asp>

## 0 引言

p27<sup>Kip1</sup> 是在转化生长因子 (TGF- $\beta$ ) 处理的生长抑制细胞及接触生长抑制的细胞株中, 发现的一种相对分子质量 ( $M_r$ ) 为 27 000 的耐热细胞周期抑制蛋白<sup>[1]</sup>. p27<sup>Kip1</sup> 作为一种调控细胞周期的枢纽蛋白, 可以多种方式调节肿瘤细胞的增生或凋亡. 近年研究发现, p27<sup>Kip1</sup> 基因及其产物对于细胞的生长有着极其重要的调控作用, 是一种潜在的抑癌基因, 因此他的抗癌机制成为生物医学领域重要的研究课题. 我们研究采用体外细胞培养法, 结合细胞转染、MTT、<sup>3</sup>H-TdR 掺入法和克隆形成实验、电子显微镜等研究 p27<sup>Kip1</sup> 对肝癌细胞株 HHCC 细胞增生的抑制作用及其可能的机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人肝癌细胞 HHCC 为第四军医大学病理教研室张传山博士惠赠. 插有正向 p27<sup>Kip1</sup> cDNA 的 pcDNA3.1/Myc-His(+)-p27<sup>Kip1</sup> 真核表达载体、pcDNA3.1/Myc-His(+)-C 空载体、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由本教研室保存. LipofectAM

INE-2000 转染试剂盒和 G418, 为美国 Gibco 公司产品. 带 myc 标签抗体、辣根过氧化物酶标记的二抗为北京中山公司产品. <sup>3</sup>H-TdR 购于中国原子能研究院

## 1.2 方法

**1.2.1 基因转染和细胞克隆筛选** 用脂质体将 pcDNA3.1/Myc-His(+)-p27<sup>Kip1</sup> 转染 HHCC 细胞, 并设转染空载体和不转染的 HHCC 细胞做对照. 48 h 后换用含 G418 (600 mg/L) 的 RPMI1640 培养液继续培养. 约 14 d 左右未转染的细胞对照全部死亡, 待转染的细胞大多数死亡时, 收集 G418 抗性的细胞克隆, 扩大培养。

**1.2.2 Western blot 检测 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白** 配制 6% 的浓缩胶和 12% 的分离胶, 按 Bio-Rad 公司蛋白电泳系统的说明书进行 SDS-PAGE. 电泳后再电转印于硝酸纤维素膜上, 加一抗于 37℃ 孵育 30 min, 缓冲液冲洗; 再加辣根过氧化物酶标记的二抗于 37℃ 孵育 30 min, 以化学发光法显色拍照。

**1.2.3 转染细胞的克隆化** 将 G418 抗性的克隆消化并用培养液吹散, 准确计数后, 系列稀释至每 mL 含有 10 个细胞, 加入到 96 孔培养板中 (100  $\mu$ L/孔), 6 d 后, 观察并计数单克隆细胞孔, 取单克隆孔细胞用 Western blot 检测 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白表达. 连续多次克隆化, 直至所有的单克隆孔都出现 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白染色阳性。

**1.2.4 MTT 试验** 取生长状态良好的对数生长期细胞, 常规消化、计数及测定细胞活力, 用含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 调整细胞浓度为  $3 \times 10^7$ /L, 按 200  $\mu$ L/孔接种于 96 孔板, 于 37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中培养, 每 3 d 换液 1 次, 分别设置组 I: 空白对照; 组 II: 转 pcDNA3.1/Myc-His(+)-C 空载体; 组 III: 转 pcDNA3.1/Myc-His(+)-p27<sup>Kip1</sup> 真核表达载体; 每组设置 24 个复孔, 每天检测 1 次, 每次 3 个复孔, 连续测量 8 d, 每孔测量前 4 h 加 MTT 20  $\mu$ L/孔 (5 g/L), 继续培养后弃去培养基, 加二甲亚砜 100  $\mu$ L/孔, 微型震荡器震荡 15 min, 在 490 nm 波长下用酶联免疫仪测定  $A_{490nm}$  值。

**1.2.5 <sup>3</sup>H-TdR 掺入实验** 取对数生长期的肝癌细胞, 用含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 调整细胞浓度为  $2.5 \times 10^7$ /L, 按 200  $\mu$ L/孔接种于 96 孔板, 于 37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 60 h, 每孔加入 18.5 kBq (20  $\mu$ L) <sup>3</sup>H-TdR, 分别设置组 I: 空白对照; 组 II: 转 pcDNA3.1/Myc-His(+)-C 空载体; 组 III: 转 pcDNA3.1/Myc-His(+)-p27<sup>Kip1</sup> 真核表达载体; 每组设置 3 个复孔, 继续培养 12 h 吸去培养基, 胰酶消化细胞, 用 ZT-III 型多孔细胞样品收集器收集细胞于 999 型纤维膜上, 红外线烤干加闪烁液, 于 Beckman LS-6500 液闪计数仪上计数。

**1.2.6 软琼脂克隆形成实验** 将p27<sup>Kip1</sup> 转染组、空载体转染组和未转染组细胞以每组 600 个细胞接种于 60 mm 含底层 5 g/L 琼脂糖和顶层 3 g/L 琼脂糖的软琼脂中;37℃ 培养箱中培养 14 d;倒置显微镜下观察克隆形成情况. 计算克隆形成率.

$$\text{软琼脂克隆形成率} = \frac{\text{克隆数}}{\text{接种细胞数}} \times 100\%$$

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组克隆数} - \text{实验组克隆数}}{\text{对照组克隆数}} \times 100\%$$

**1.2.7 电子显微镜方法检测凋亡** 常规方法将p27<sup>Kip1</sup> 转染组、空载体转染组和未转染组细胞制成电镜标本, 用透射电镜观察.

**统计学处理** 采用第四军医大学统计学教研室开发的 SPLM 医用统计软件包进行方差分析.

## 2 结果

**2.1 HHCC 细胞的 G-418 筛选** 未转染的 HHCC 细胞在含 G-418 的培养液中 8 d 内全部离壁死亡, 转染 pcDNA3.1/MyC-His(+)-p27<sup>Kip1</sup> 组 14 d 时细胞绝大部分死亡, 但可见散在生长的 G-418 抗性细胞克隆. Western blot 结果显示转染 pcDNA3.1/MyC-His(+)-p27<sup>Kip1</sup> 的 HHCC 细胞在分子量质为 27.0 ku 附近有 1 条明显的阳性带, 而转染 pcDNA3.1/MyC-His(+)-C 空载体和未转染的 HHCC 细胞未见阳性条带 (图 1).

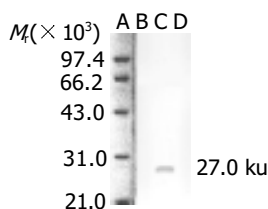


图1 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白表达的 Western blot 检测. A: Protein marker; B: HHCC cells; C: HHCC cells transfected by pcDNA3.1/MyC-His(+)-p27<sup>Kip1</sup>; D: Non-transfected cells.

**2.2 MTT 实验结果** pcDNA3.1-p27 明显抑制 HHCC 增生 ( $P < 0.01$  vs pcDNA3.1), 而 pcDNA3.1 与空白对照组 (blank control) 相比无差异 ( $P > 0.05$ ) (图 2).

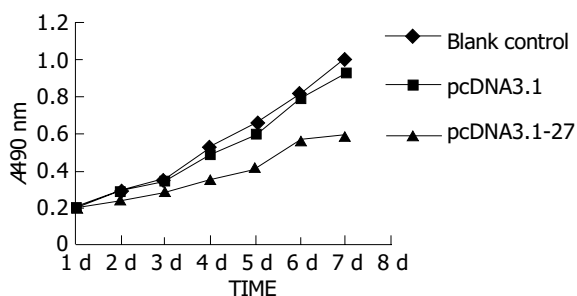


图2 pcDNA3.1-p27 对 HHCC 增生的影响.

**2.3 <sup>3</sup>H-TdR 实验结果** PcDNA3.1-P27 对 DNA 合成 ( $P < 0.01$  vs pcDNA3.1) 有明显抑制作用, Blank control 与 pcDNA3.1 相比无差异 ( $P > 0.01$ ) (图 3).

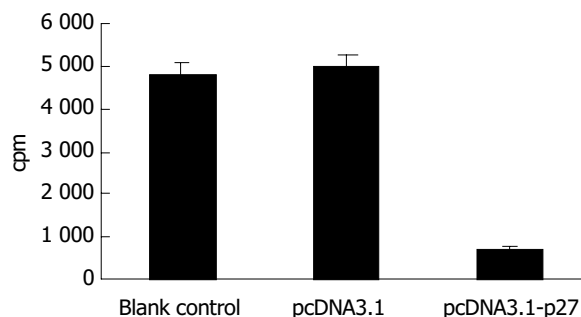


图3 PcDNA3.1-P27 对 HHCC DNA 合成的影响.

**2.4 p27<sup>Kip1</sup> 对 HHCC 细胞增生的影响 (表 1)** 软琼脂克隆形成试验显示, 过表达的 p27<sup>Kip1</sup> 能够抑制 HHCC 细胞的生长. 各实验组与对照组之间相比有显著性差异 ( $P < 0.01$ , 表 1).

表1 过表达的 p27<sup>Kip1</sup> 对 HHCC 细胞的抑制率 (%)

细胞类型	克隆数	克隆形成率 (%)	抑制率 (%)
未转染组	25 ± 3.3	8.33	
转染空载体组	23 ± 2.6	7.67	8.00
转染 p27 <sup>Kip1</sup> 组	11 ± 1.2	3.67 <sup>b</sup>	56.00 <sup>b</sup>

<sup>b</sup>  $P < 0.01$  vs 转染空载体组.

**2.5 p27<sup>Kip1</sup> 对 HHCC 细胞凋亡的影响** 正常的肝癌细胞 (HHCC) 表面可见许多小的绒毛突起, 胞核为椭圆形, 位于细胞中部, 核膜双层结构清晰可见, 胞质内可见到的细胞器为线粒体、内质网和溶酶体等. 转染 p27<sup>Kip1</sup> 基因组的 HHCC 细胞可见部分肝癌细胞体积明显缩小, 胞核固缩, 染色质致密, 并边集于细胞核周边. 细胞膜表面微绒毛消失, 胞质中有空泡形成, 是细胞凋亡的形态学改变 (图 4).

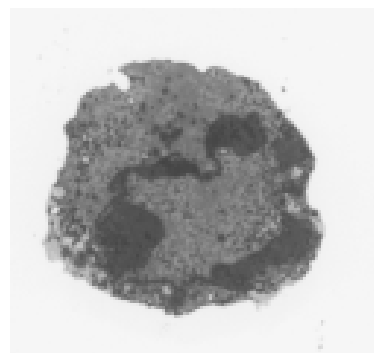


图4 肝癌细胞凋亡的形态学改变.

## 3 讨论

肿瘤的恶性增生是肿瘤细胞的永生化和细胞分裂的失控, 而细胞周期调节蛋白在正常细胞的生长和肿瘤的发生发展

中起着重要的调控作用. p27<sup>Kip1</sup> 作为细胞周期抑制蛋白的成员之一, 对肿瘤细胞的增生有一定的影响<sup>[2]</sup>. 为研究过表达的 p27<sup>Kip1</sup> 对肝癌的抑制作用, 我们采用基因转染的方法建立了过表达 p27<sup>Kip1</sup> 的肝癌细胞模型. 经 Western Blot 检测表明, 最终克隆出来的转染细胞可 100% 表达 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白, 成功地建立了过表达 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白的肝癌细胞株.

细胞周期素依赖性激酶(CDKs)是细胞周期进展的主要调节因子, 因此也是肿瘤抑制性治疗的重要候选者. CDKs 能够使 Rb 基因及其相关蛋白磷酸化, 反过来又受到细胞周期素(cyclin)的水平、磷酸化和细胞周期素依赖性激酶抑制剂(CKIs)的控制<sup>[3]</sup>. 目前已经发现两大类 CKIs, 一类是 INK4(CDK4 的抑制剂)家族, 成员有 P16, P15, P18 和 P19, 他们是 cyclinD1 与 CDK4 或 CDK6 形成的复合物的抑制剂; 另一类是 P21 家族, 包括 P21, P27 和 P57, 他们是控制 G1/S 转换的 CDK 的抑制剂<sup>[4-5]</sup>.

P27 通过与各种 cyclin-CDK 复合物相互作用, 从而抑制他们的活性, 获得对细胞周期的调控. 生理状态下, P27 主要是通过 cyclinE-CDK2 复合物的相互作用, 从而调节细胞从 G1 后期到 S 期. 目前认为 P27 是 TGF- $\beta$ 、cAMP 及其他细胞外因子诱导细胞生长停滞的主要递质<sup>[7]</sup>. 在正常情况下, p27<sup>Kip1</sup> 在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期时表达增高, 当细胞进入 S 期时则表达下降. 虽然 p27<sup>Kip1</sup> 能广泛抑制各种周期蛋白和周期抑制蛋白(CDK)的活性, 但主要抑制细胞周期蛋白 E-CDK2 和细胞周期蛋白 D-CDK4 等 G<sub>1</sub> 期激酶复合物, 使细胞不能通过 G<sub>1</sub> 期<sup>[6]</sup>. 细胞凋亡多数发生于细胞周期的 G<sub>1</sub> 期、G<sub>1</sub> 晚期或 S 期<sup>[8-9]</sup>, 因此在 G<sub>1</sub> 晚期表达的蛋白如 p27<sup>Kip1</sup> 和 p21<sup>Cip1</sup> 无疑会参与凋亡的进程. 我们以体外培养的人肝癌细胞系为靶细胞, 以抑癌基因 p27<sup>Kip1</sup> 为目的基因, 将构建的 pcDNA3.1/Myc-His(+)-C-p27<sup>Kip1</sup> 真核表达质粒体外转染 HHCC, 用 MTT、<sup>3</sup>H-TdR 和

克隆形成实验观察到抑癌基因 p27<sup>Kip1</sup> 对 HHCC 增生及其 DNA 合成均有明显抑制作用, 抑制率约为 56%. 通过电子显微镜发现过表达的 p27<sup>Kip1</sup> 能够诱导 HHCC 细胞凋亡, 即对细胞凋亡有促进作用, 从而抑制肿瘤细胞的生长. 关于 p27<sup>Kip1</sup> 抑制肝癌细胞生长的机制还有待于进一步的探讨.

#### 4 参考文献

- 1 Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J. Cloning of p27kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994;78:59-66
- 2 Favrot M, Coll JL, Louis N, Negoescu A. Cell death and cancer: Replacement of apoptotic genes and inactivation of death suppressor genes in therapy. *Gene Ther* 1998;5:728-739
- 3 Blagosklonny MV, Pardee AB. The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle* 2002;1:103-110
- 4 Nath N, Wang S, Betts V, Knudsen E, Chellappan S. Apoptotic and mitogenic stimuli inactivate Rb by differential utilization of p38 and cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 2003;22:5986-5994
- 5 Bryja V, Pachernik J, Faldikova L, Krejci P, Pogue R, Nevrliva I, Dvorak P, Hampl A. The role of p27(Kip1) in maintaining the levels of D-type cyclins in vivo. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1691:105-116
- 6 Shimizu T, Takahashi N, Tachibana K, Takeda K. Complex regulation of CDK2 and G1 arrest during neuronal differentiation of human prostatic cancer TSU-Prl cells by staurosporine. *Anticancer Res* 2001;21:893-898
- 7 Kim TY, Kim WI, Smith RE, Kay ED. Role of p27(Kip1) in cAMP- and TGF-beta2-mediated antiproliferation in rabbit corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:3142-3149
- 8 de Koning JP, Soede-Bobok AA, Ward AC, Schelen AM, Antonissen C, van Leeuwen D, Lowenberg B, Touw IP. STAT3-mediated differentiation and survival of myeloid cells in response to granulocyte colony-stimulating factor: role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1). *Oncogene* 2000; 19:3290-3298
- 9 Alisi A, Leoni S, Piacentani A, Conti Devirgiliis L. Retinoic acid modulates the cell-cycle in fetal rat hepatocytes and HepG2 cells by regulating cyclin-cdk activities. *Liver Int* 2003; 23:179-186

编辑 张海宁