

· 论 著 ·

BEAS-2B 细胞恶变过程中 p53 的表达及意义

朱进国[#]

(广西柳州市柳铁中心医院心胸血管外科 545000)

摘要:目的 探讨人支气管上皮细胞(BEAS-2B 细胞)恶性转化过程中生物学特性变化及 p53 动态表达的意义。方法 以 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的烟草特有亚硝胺 4-(N-亚硝基甲基)-1-(3-吡定基)-1-丁酮(NNK)处理 BEAS-2B 细胞 24 h 后,细胞在体外连续传代培养,在此过程中观测细胞生物学特性,以免疫组化法检测 p53 表达的动态变化。结果 第 5 代细胞显示抗血清生长,细胞在裸鼠体内不成瘤;第 15 代细胞在半固体琼脂中克隆形成率(0.32%)为对照细胞(0.023%)的 13.9 倍,细胞在裸鼠体内不成瘤。细胞超微结构显示转化细胞特征;第 25 代细胞在裸鼠体内成瘤,组织学证实为鳞癌(I~II 级)。细胞超微结构显示具有明显的肿瘤细胞特征,对照组各代 BEAS-2B 细胞 p53 表达均为阴性。各代 BEAS-2B_{NNK} 细胞均有不同程度的表达,随着传代次数增加表达呈明显上升趋势,各代间差异有统计学意义($P < 0.001$)。结论 浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 NNK 可成功诱发 BEAS-2B 细胞恶性转化,BEAS-2B 细胞生物学特性改变是一个多步骤、多阶段的发展过程,p53 蛋白在 BEAS-2B 细胞转化成癌细胞以前已有较明显表达,可能有助于吸烟高危人群罹患肺癌的预警及普查。

关键词: p53; 人支气管上皮细胞; 恶性转化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.17.014

中图分类号:R734.1;R730.231

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)17-2275-03

Significance of p53 expression in BEAS-2B cells during malignant transformation

ZHU Jin-Guo[#]

(Department of Cardiothoracic Vascular Surgery, Liuzhou Municipal Liutie Central Hospital, Guangxi 545000, China)

Abstract: **Objective** To study the change of biological characteristics and significance of p53 expression of BEAS-2B cells during malignant transformation. **Methods** BEAS-2B cells treated with NNK at the concentration of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h were subcultured continuously in vitro and their biological characteristics and ultrastructure were observed. The change p53 expression of BEAS-2B cells were detected by immunohistochemical method. **Results** The serum resistance was significantly increased in the 5th passage BEAS-2B_{NNK} cells and could not grow into tumor in nude mice. The plating efficiency of the 15th passage BEAS-2B_{NNK} cells in soft agar (0.32%) increased 13.9 fold compared with that of control cells (0.023%). The cells had the biological characteristic of transformation cells but could not grow into tumor in nude mice. The 25th passage could grow into tumor in nude mice. The tumor was squamous cell carcinoma in morphology confirmed by histopathological examination. The ultrastructure showed that BEAS-2B_{NNK} cells were transformed into cancer cells. p53 protein expression of BEAS-2B cells was negative, but positive in the different passage BEAS-2B_{NNK} cells. With the passage of BEAS-2B_{NNK} cells increasing gradually, p53 protein expression rised more and more obviously ($P < 0.001$). **Conclusion** The model of malignant transformation of BEAS-2B cells induced by NNK (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) can be created successfully. During the period, the change of biological characteristic and ultrastructure indicated that the malignant transformation of BEAS-2B_{NNK} cell is a multiple-step course. The characteristic of p53 being expressed before BEAS-2B_{NNK} cells changed into cancer cells is beneficial to early-warning and mass screening of lung cancer in high-risk smoking population.

Key words: p53; BEAS-2B; malignant transformation

肺癌是威胁人类健康最严重的疾病之一,肺癌的发生 80%~90% 与吸烟有关。在目前已明确的 50 多种致癌物中,烟草特有亚硝胺 4-(N-亚硝基甲基)-1-(3-吡定基)-1-丁酮(NNK)含量最多、致癌力最强,是一种有代表性的烟草特异性致癌物。有研究表明 p53 基因突变为肺癌发生的早期事件,p53 在肺癌中的表达可作为诊断肺癌的一个指标得到许多学者的支持,可能有助于吸烟高危人群罹患肺癌的预警及普查。因此本研究以 NNK 诱发人支气管上皮细胞(BEAS-2B 细胞),建立体外细胞恶性转化模型,观测 p53 在此过程中的动态变化。并探索其在肺癌发生、发展过程中的作用及意义。

1 材料与方

1.1 细胞株及实验动物 BEAS-2B 细胞系来自美国 ATCC (American Type culture collection),美国专利号:U. S. Pat.

4885238。本实验所用的 BEAS-2B 细胞由军事医学科学院二所四室朱茂祥教授馈赠;BALB/C-nu/nu 裸鼠 6 只(雄性,6 周龄,体质量 20~27 g),购自成都实验动物中心;p53 免疫组化试剂盒购自北京中山公司。

1.2 细胞培养及转化处理 BEAS-2B 细胞用 LHC-8 无血清培养液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、95% 湿度条件下培养,细胞大致按 $1.0 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 密度接种。处于指数生长期的 BEAS-2B 细胞在含有 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NNK 的完全培养液中连续培养 24 h 后,换以完全 LHC-8 培养液继续培养作为实验组细胞(BEAS-2B_{NNK})。并以相应 BEAS-2B 平行细胞传代培养作为对照组细胞(BEAS-2B)。

1.3 细胞血清抗性实验 收获第 5 代的指数生长期的 BEAS-2B_{NNK} 细胞和 BEAS-2B 细胞,逐级稀释至 500 个细胞/皿接种

[#] 广东中山医科大学在读博士生。

于 6 cm 培养皿中, 每组 6 皿, 其中 3 皿用含 10% 胎牛血清的 LHC-8 完全培养液培养, 8 d 后中止培养。PBS 洗 3 次, 甲醛固定 30 min, Giemsa 染色, 显微镜下计数细胞集落数 (大于 16 个细胞为一个集落)。按公式: 接种率 = 细胞集落数 / 接种细胞数 × 100% 来计算接种效率。

1.4 细胞锚着独立性生长实验 用 LHC-8 培养液配制 0.7% 琼脂糖 (高压灭菌) 后加入 6 cm 培养皿中, 铺制底层, 待冷却凝固后备用。收获第 15 代 BEAS-2B_{NNK} 细胞和 BEAS-2B 细胞与 0.7% 琼脂糖 1:1 混匀, 并加到制备好的底层凝胶上 (细胞浓度为 2 000 个细胞/皿), 待上层琼脂糖凝固后, 每皿加入 2 mL LHC-8 培养液。于 37 °C、5% CO₂、95% 湿度条件下培养, 每 3 天换液 1 次, 3 周后镜下计数多于 50 个细胞的克隆数。按公式: 克隆形成率 = 克隆数 / 接种细胞数 × 1 000% 来计算接种效率。

1.5 裸鼠成瘤实验 收获第 25 代 BEAS-2B_{NNK} 细胞和 BEAS-2B 细胞, 以 LHC-8 培养液离心洗涤 2 次, 计数活细胞, 调整细胞数, 将细胞悬浮于 PBS 液中备用。6 只裸鼠随机分为 2 组, 每组 3 只。用带 6 号针头的注射器分别在裸鼠左、右腹侧皮下各接种 2 个点。按 1 × 10⁷ 个细胞/点, 观察裸鼠的成瘤性, 并对生长的肿块进行常规病理组织学检查。

1.6 细胞超微结构观察 收集并切取第 5、15、25 代 BEAS-2B 和 BEAS-2B_{NNK} 细胞, 经 4% 戊二醛及 1% 四氧化锇 (磷酸盐配制) 作预固定和后固定 (pH 7.2~7.4) 各 2 h, 乙醇及丙酮逐级脱水, 采用环氧树脂 618[#] 包埋, 用 Reichert-Jtmg 超薄切片机作 0.5 mm 厚半薄切片, 经 1% 甲苯胺蓝-天青 II 染色以后在光镜下定位, 制备超薄切片, 用醋酸双氧铀及枸橼酸铅染色, 应用 H-600 透射电镜观察。

1.7 BEAS-2B_{NNK} 和 BEAS-2B 细胞 p53 蛋白表达免疫组化法检测 以免疫组化法检测 p53 蛋白表达, 按说明书步骤操作。光镜观察, 在光镜下 (×400) 计数, 各代随机观测和计算 10 个高倍视野的阳性标记细胞率, 取平均值。结果判断: 以细胞核呈棕黄色或胞浆同时呈棕黄色的细胞为阳性, 单纯胞浆着色而无细胞核着色或胞核胞浆均无着色的细胞为阴性。

1.8 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, *t* 检验分析组间差异。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 BEAS-2B 及 BEAS-2B_{NNK} 细胞对血清促分化作用的抗性反应 第 5 代 BEAS-2B 细胞在无血清的培养液中生长良好, 而在含血清的培养液中生长受到明显抑制。第 5 代 BEAS-2B_{NNK} 细胞在含血清的培养液中生长良好, 其接种效率显著高于相应的 BEAS-2B 细胞, 两者比较差异有统计学意义 (*P* < 0.001), 表明细胞生物学特性已发生变化, 细胞增殖能力增强, 对环境的选择性和依赖性降低, 见表 1。

2.2 BEAS-2B 及 BEAS-2B_{NNK} 锚着独立性生长能力 15 代时 BEAS-2B 细胞几乎不能在半固体琼脂中生长, 而 BEAS-2B_{NNK} 细胞生长良好, 克隆形成率比 BEAS-2B 高 13.9 倍, 两组间比较, 差异有统计学意义 (*P* < 0.001), 表明 15 代 BEAS-2B_{NNK} 细胞锚着独立性生长能力明显增强, 已具有转化细胞的特性, 见表 2。

2.3 裸鼠成瘤性 第 25 代 BEAS-2B_{NNK} 细胞和 BEAS-2B 细胞接种裸鼠, 7 周后, 接种 BEAS-2B_{NNK} 的一只裸鼠观察到皮下结节; 11 周时皮下结节约 0.3 cm × 0.4 cm; 15 周时皮下结节约 0.5 cm × 0.7 cm; 20 周时皮下结节约 1.0 cm × 1.2 cm。在 20 周时取肿块组织病理学检查, 可见癌组织呈巢状排列, 癌细

胞呈多边形, 核呈椭圆形, 核大深染, 可见少量角化珠, 病理诊断为鳞形细胞癌 (I ~ II 级) (封 2 图 1)。BEAS-2B 组裸鼠一直未见结节形成。

表 1 第 5 代细胞对血清促分化的抗性反应

组别	细胞	培养液中含 10% 血清	接种效率 (%)
1	BEAS-2B	-	14.33 ± 1.33*
2	BEAS-2B	+	1.83 ± 0.49 [#]
3	BEAS-2B _{NNK}	-	9.20 ± 1.90
4	BEAS-2B _{NNK}	+	12.40 ± 1.20

* 与 2 组比较, *P* < 0.001; [#] 与 4 组比较, *P* < 0.001; +: 表示加血清; -: 表示未加血清。

表 2 第 15 代细胞在半固体琼脂中克隆形成率

组别	皿数	克隆形成率 (%)
BEAS-2B 细胞	5	0.023 ± 0.010 37
BEAS-2B _{NNK} 细胞	5	0.320 ± 0.049 87*

*: 与 BEAS-2B 细胞比较, *P* < 0.001。

2.4 各代细胞的超微结构变化 BEAS-2B 各代细胞形态无明显变化。BEAS-2B 与 BEAS-2B_{NNK} 细胞在第 5 代时细胞及胞核形态、细胞器形成及数量亦无显著差别; 第 15 代 BEAS-2B_{NNK} 细胞与 BEAS-2B 细胞相比, BEAS-2B_{NNK} 细胞具转化细胞特征, 表现为细胞出现肿胀, 并逐渐变形, 出现核畸形, 核仁明显增大、边集, 细胞器肿胀、数量明显增多, 功能活跃; 第 25 代 BEAS-2B 细胞及胞核明显畸变, 出现明显的核碎裂及多个核仁, 具明显的癌细胞特征, 见图 2、3。

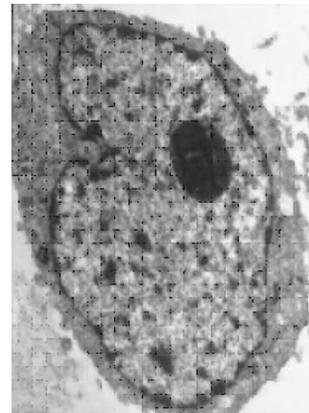


图 2 第 25 代 BEAS-2B 细胞超微结构 (×10 000)

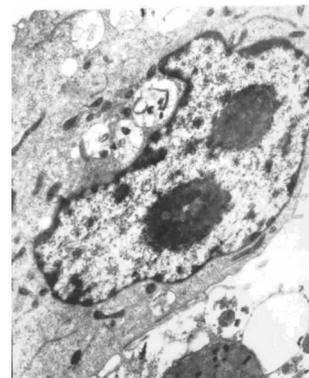


图 3 第 25 代 BEAS-2B_{NNK} 细胞超微结构 (×10 000)

2.5 各代细胞 p53 蛋白表达 (封 2 图 4、5) 各代 BEAS-2B 细胞 p53 蛋白表达为阴性。BEAS-2B_{NNK} 细胞的 p53 蛋白阳性表达随着传代数增加 p53 蛋白表达呈明显上升趋势。在第 2 ~

10 代 p53 表达迅速上升,在第 15、20 代时相对平缓,在 25 代时达到高峰(图 6)。5 代、15 代间差异有统计学意义($P < 0.001$);20 代、25 代间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

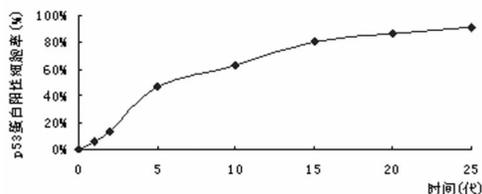


图 6 各代 BEAS-2B_{NNK} 细胞 p53 蛋白表达情况

3 讨论

吸烟与人类肺癌的关系密切相关。NNK 是 7 种烟草特有性亚硝胺中最具代表性的一种。大量的实验研究表明,它能诱发多种动物肿瘤形成和人类细胞恶性转化, BEAS-2B 细胞是 NNK 代谢活化的主要场所,又是肺癌发生的主要来源^[1-2]。

在烟草致癌物等各种环境致癌因素作用下, BEAS-2B 细胞增殖/鳞状分化过程的控制异常被认为是肺癌发生过程中的重要步骤。NNK 致癌的机制主要有:(1) NNK 使体内产生氧自由基,使细胞内遗传物质氧化损伤;(2) NNK 的代谢产物与细胞中大分子物质相互作用形成加合物,产生基因突变或缺失;(3) NNK 可抑制人体的免疫系统,使转化细胞逃脱免疫监视,发展为肿瘤^[3-5]。

众多资料表明 p53 基因突变为肺癌发生的早期事件, Lilo-glou 等^[6]研究 46 例非小细胞肺癌发现 p53 基因突变与肿瘤分期无关,同时他们应用选择性紫外线辐射分离法(selective ultraviolet radiation fractionation, SURF)对支气管肺癌 p53 突变的解剖分布进行了研究,发现 p53 基因突变是同质和均匀分布的,故认为肿瘤的扩张是由一个癌细胞发展而来的,亦表明 p53 基因突变是肺癌发生的早期事件。Mitsudomi 等^[7]应用聚合酶链反应-单链构象多态技术(PCR-SSCP),对纤支镜取材支气管组织进行 p53 基因分析,提出用纤支镜结合基因诊断是肺癌早期诊断的一个发展方向。Bennet 等^[8]应用免疫组化的方法对 34 例癌前浸润的肺组织进行 p53 蛋白表达研究,同时与病理形态学进行对照得出以下结论:(1) 正常肺组织 p53 蛋白表达为 0,早期变异组织有微量表达;(2) 约有 30% 以上肺早期的癌前浸润病变-轻度不典型增生病变中有高表达的 p53 蛋白;(3) 随不典型程度的增加, p53 蛋白的积累频率也有所增加。致癌前病变后期, p53 蛋白过量表达 2/3 以上^[9-10]。Rabbitts^[11]应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态技术(PCR-RFLP)法检测,发现支气管癌前浸润损害中有 p53 等位基因丢失和 p53 突变。Sozzi 等^[12]综合细胞遗传学、分子生物学、免疫学及免疫组化法研究了一组肺组织的不典型增生(癌边缘组织),发现上述病变有 17P 染色体缺失、p53 基因突变和 p53 蛋白过量表达。这些资料表明 p53 蛋白表达是肺癌发生的早期事件。本研究在肺癌的发生、发展中,从分子生物学的角度出发,对 BEAS-2B_{NNK} 细胞各代 p53 蛋白进行检测,其第 1 代即有阳性表达(6%),并随转化代数的增加而增高。其中在细胞生物学特性发生变化时表达率达 47.3%;细胞锚着独立性生长能力明显增强时表达率进一步增强达 80.3%;裸鼠成瘤时表达率达 91.6%。表明 p53 蛋白在细胞恶性转化的早期阶段即开始表达,其表达率随恶性转化的程度增加而呈现逐渐增强的趋势。这与上述资料报道的结论是一致的。本研究 p53 蛋白在 BEAS-2B_{NNK} 第 1 代即有少量表达;在生物学特性发生变化

(细胞对血清促分化作用的抗性反应阳性),而细胞形态学尚无明显变化时,表达即明显增强;在细胞锚着独立性生长能力明显增强已具有转化细胞的特性(半固体琼脂中的集落形成),细胞形态学变化明显,但仍无明显的癌细胞特征时,其表达进一步增强。这种 p53 蛋白在细胞转化成癌细胞以前已有较明显表达的特点,可能有助于吸烟高危人群罹患肺癌的预警及普查。

参考文献:

- [1] Chilakapati J, Wallace K, Ren H, et al. Genome-wide analysis of BEAS-2B cells exposed to trivalent arsenicals and dimethylthioarsinic acid[J]. *Toxicology*, 2010, 268(1-2): 31.
- [2] Liao WT, Yu HS, Lin P, et al. Arsenite promotes centrosome abnormalities under a p53 compromised status induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butane (NNK)[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 243(1): 55.
- [3] Eom HJ, Choi J. Oxidative stress of silica nanoparticles in human bronchial epithelial cell, Beas-2B[J]. *Toxicol In Vitro*, 2009, 23(7): 1326.
- [4] Huang YC, Li Z, Hyseni X, et al. Identification of gene biomarkers for respiratory syncytial virus infection in a bronchial epithelial cell line[J]. *Genomic Med*, 2008, 2(3-4): 113.
- [5] Lin PP, Yang MH, Liao PC, et al. Proteomic analysis of proteins associated with tt-DDE induced toxicity in BEAS-2B cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 376(3): 519.
- [6] Lilo-glou T, Ross H, Prime W, et al. p53 gene aberrations in non-small cell lung carcinomas from a smoking population[J]. *Br J Cancer*, 1997, 75: 1119.
- [7] Mitsudomi T, Lam S, Shiraksa T, et al. Detection and sequencing of the p53 gene mutations in bronchial biopsy in patients with lung cancer[J]. *Chest*, 1993, 104: 216.
- [8] Bennet WP, CollBy TV, Travis WD, et al. p53 protein accumulates frequently in early Bronchial neoplasia [J]. *Cancer Res*, 1993, 53: 4817.
- [9] Sobti RC, Kaur P, Kaur S, et al. Impact of interaction of polymorphic forms of p53 codon 72 and N-acetylation gene (NAT2) on the risk of lung cancer in the North Indian population[J]. *DNA Cell Biol*, 2009, 28(9): 443.
- [10] Duan W, Gao L, Wu X, et al. Expression of a mutant p53 results in an age-related demographic shift in spontaneous lung tumor formation in transgenic mice[J]. *PLoS One*, 2009, 4(5): e5563.
- [11] Rabbitts PH. Application of PCR-RFLP analysis to allele loss studies in small biopsies of lung tumors and preinvasive lesions of the lung[J]. *Porto*, 1992, 26: 25.
- [12] Sozzi G, Micozzo M, Donghi R, et al. Deletions of 17p and p53 mutations in preneoplastic lesions of the lung[J]. *Cancer Res*, 1992, 52: 6079.