

p53 基因突变对胶质母细胞瘤细胞 Connexin 43 表达影响

李建港, 郇雪洁, 焦倩, 姜宏

(青岛大学国家生理学重点(培育)学科, 山东 青岛 266071)

[摘要] 目的 探究 *p53* 基因突变对胶质母细胞瘤细胞连接蛋白 43(Connexin 43)表达的影响。方法 培养胶质母细胞瘤 U87 细胞(*p53* 野生型)与 U251 细胞(*p53* 突变型),采用 Western blotting 方法分别检测两种细胞中 *p53* 蛋白与 Connexin 43 蛋白的表达水平。结果 胶质母细胞瘤 U251 细胞中 *p53* 基因发生突变,与 U87 细胞相比,*p53* 蛋白表达水平降低($t=2.948, P<0.05$);U251 细胞中 Connexin 43 蛋白的表达水平显著高于 U87 细胞($t=2.771, P<0.05$)。结论 在胶质母细胞瘤细胞中,*p53* 基因突变可能会提高 Connexin 43 蛋白的表达量。

[关键词] 基因, *p53*; 胶质母细胞瘤; 细胞系, 肿瘤; 连接蛋白 43

[中图分类号] R338.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2096-5532(2023)03-0361-03

doi: 10.11712/jms.2096-5532.2023.59.091

[开放科学(资源服务)标识码(OSID)]



[网络出版] <https://link.cnki.net/urlid/37.1517.R.20230802.0901.001>;

2023-08-02 13:07:34

EFFECTS OF *p53* GENE MUTATION ON CONNEXIN 43 EXPRESSION IN GLIOBLASTOMA CELLS LI JIANGANG, HUAN

XUEJIE, JIAO QIAN, JIANG HONG (State Key Disciplines: Physiology (Incubation), Department of Physiology, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effects of *p53* gene mutation on the expression of Connexin 43 in glioblastoma cells. **Methods** In cultured glioblastoma U87 cells (wild-type *p53* gene) and U251 cells (mutant *p53* gene), the expression of *p53* protein and Connexin 43 protein was measured by Western blot. **Results** The *p53* protein level was significantly decreased in U251 cells compared with U87 cells ($t=2.948, P<0.05$). The expression level of Connexin 43 protein in U251 cells was significantly increased than that of U87 cells ($t=2.771, P<0.05$). **Conclusion** The mutation of the *p53* gene may increase the expression of Connexin 43 protein in glioblastoma cells.

[KEY WORDS] genes, *p53*; glioblastoma; cell line, tumor; Connexin 43

弥漫性胶质瘤是最常见的中枢神经系统恶性肿瘤,占中枢神经系统恶性肿瘤的 80%^[1]。世界卫生组织(WHO)根据其组织学和分子特征将它们归类为 I~IV 级^[2]。IV 级胶质母细胞瘤(GBM)最具侵袭性,且中位生存期较差^[3]。*p53* 被认为是一个关键的肿瘤抑制基因,其功能障碍对肿瘤发生具有重要影响^[4]。*p53* 基因发生突变的肿瘤约占人类肿瘤的 50%,一些 *p53* 突变体具有促进肿瘤发生发展的特性^[5]。缝隙连接由连接蛋白组成,连接蛋白是一种跨膜蛋白,可组装成质膜中的通道^[6]。缝隙连接信号负责相当大比例的细胞通讯,通过与相邻细胞形成的缝隙连接,可向邻近细胞递送和交换小分子肽、离子、内源核酸和其他细胞代谢物。因此,缝隙

连接的异常表达可以改变细胞的新陈代谢,影响肿瘤的发生和进展^[7]。连接蛋白 43(Connexin 43)是目前发现细胞膜上表达最丰富的连接蛋白^[8]。它能调节包括增殖在内的多种细胞功能活动^[9],其表达异常会引起癌症等多种病理变化^[10]。有研究表明,Connexin 43 可以促进胶质母细胞瘤的侵袭^[11]。但胶质母细胞瘤中 *p53* 突变和 Connexin 43 的调节关系目前尚不明确。本实验选用 *p53* 野生型的 U87 细胞^[12]和 *p53* 突变型的 U251 细胞^[13],检测 Connexin 43 的表达,旨在探讨 *p53* 基因突变对胶质母细胞瘤细胞 Connexin 43 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用细胞为人胶质母细胞瘤 U87 细胞与 U251 细胞,均为贴壁生长的细胞,其中 U87 细胞为 *p53* 野生型细胞,而 U251 细胞则为 *p53* 突变型细胞。高糖 DMEM 细胞培养液购于以色列 Biolo-

[收稿日期] 2022-11-06; **[修订日期]** 2023-06-10

[基金项目] 山东省自然科学基金重大基础研究项目(ZR2019-ZD31);山东省自然科学基金面上项目(ZR2020MC072)

[第一作者] 李建港(1997-),男,硕士研究生。

[通信作者] 姜宏(1973-),女,博士,教授,博士生导师。E-mail: hongjiang@qdu.edu.cn。焦倩(1985-),女,博士,副教授,硕士生导师。E-mail: jiaoqian@qdu.edu.cn。

gical Industries 公司,胎牛血清购于北京全式金生物技术有限公司,青链霉素合剂购于北京索莱宝公司,p53 抗体、Connexin 43 抗体和 GAPDH 抗体均购于美国 CST 公司,羊抗兔 IgG-HRP 购于上海爱必信生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将 U87 与 U251 细胞分别接种于含体积分数 0.01 青链霉素合剂和体积分数 0.10 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液中,置于 37℃、含体积分数 0.05 CO₂ 的培养箱中培养,待细胞融合度达 80%~90%时,用胰酶消化 2~3 min,加入等量的完全培养液终止消化,收集到 15 mL 的离心管中,以 1 000 r/min 离心 5 min 后丢弃上清液,加入新的完全培养液,用吸管轻轻吹打 50~80 次后充分悬浮细胞,转移到新的培养瓶中进行培养。

1.2.2 Western blotting 检测 p53 和 Connexin 43 蛋白的表达 将 U87 细胞和 U251 细胞悬液按照每孔 1×10⁸/L 的密度分别接种于 6 孔板中,待细胞融合度达到 80%左右时将 6 孔板从培养箱中取出,每孔加入 100 μL 裂解液在冰上裂解 30 min 后提取两种细胞的蛋白。加入 5×Loading Buffer,在水中煮沸 10 min 变性后进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。每个凝胶孔的蛋白上样量为 20 μg,用 90 V 的稳定电压进行电泳,用 300 mA 的稳定电流转膜 90 min,根据所需目的蛋白的分子量对 PVDF 膜进行剪裁,然后以 10 g/L 的脱脂奶粉封闭 90 min,分别加入 p53 抗体(1:1 000)、Connexin 43 抗体(1:1 000)以及 GAPDH 抗体(1:10 000)4℃孵育过夜。用 TBST 溶液漂洗 3 次(每次 10 min)之后加入二抗(1:10 000)室温孵育 60 min,再用 TBST 溶液漂洗 3 次。用 ECL 化学发光液进行显影并拍照。使用 Image J 软件分析 p53、Connexin 43 和 GAPDH 条带的灰度值,目的蛋白的表达水平以 p53、Connexin 43 与 GAPDH 的比值表示。

1.3 统计学方法

利用 GraphPad Prism 软件对数据进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用两独立样本 *t* 检验,*P*<0.05 认为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 两种细胞中 p53 蛋白表达的比较

Western blotting 结果显示,U87 和 U251 细胞

中 p53 蛋白的相对表达水平分别为 1.280±0.227 和 0.570±0.080(*n*=6)。与 U87 细胞相比较,U251 细胞中 p53 蛋白的表达水平明显降低,差异具有统计学意义(*t*=2.948,*P*<0.05)。见图 1。

2.2 两种细胞中 Connexin 43 蛋白表达的比较

Western blotting 检测结果显示,U87 细胞和 U251 细胞中 Connexin 43 蛋白的相对表达水平分别为 0.370±0.096 和 0.820±0.131(*n*=6)。与 U87 细胞相比较,U251 细胞中 Connexin 43 蛋白的表达水平明显升高,差异具有统计学意义(*t*=2.771,*P*<0.05)。见图 2。

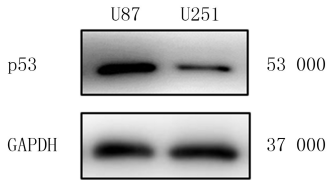


图 1 Western blotting 检测两种细胞内 p53 蛋白的表达

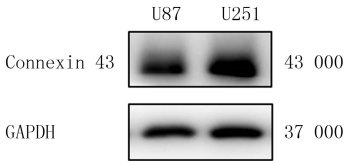


图 2 Western blotting 检测两种细胞内 Connexin 43 蛋白的表达

3 讨 论

胶质母细胞瘤是目前最常见和最具侵袭性的成人脑肿瘤,容易复发而且预后较差,5 年生存率仅为 5%^[14],主要原因是由于肿瘤的广泛浸润、细胞异质性以及放化疗抗性^[15-17]。p53 是如今研究最广泛的肿瘤抑制因子之一,它能调节各种细胞过程,包括细胞的侵袭与增殖^[18]。在正常情况下,p53 的活性维持在基础水平,但这种活性可能会在不同的应激条件下增加,例如不同类型的 DNA 损伤和致癌性损伤^[19]。所以 p53 通路的失调被认为是肿瘤发生中的关键事件,在大多数的人类癌症中,p53 出现下调或突变^[5]。

有研究表明,在人类前列腺癌细胞中,Connexin 43 蛋白的表达随着肿瘤细胞恶性程度的增加而升高,其在肿瘤内的分布发生变化,并与细胞侵袭之间存在相关性^[20]。但也有研究发现,在胰腺导管腺癌细胞中,p53 突变体可以通过促进 Connexin 43 蛋白的降解来增强细胞的迁移侵袭能力^[21]。而在胶质母细胞瘤细胞中,Connexin 43 的表达增加可以增强细胞的侵袭能力,敲除 U87 细胞中的 Connexin

43 则会显著降低细胞的侵袭能力^[22]。因此,胶质母细胞瘤细胞中依赖于 Connexin 43 的细胞通讯,可能是促进胶质母细胞瘤侵袭的一个重要因素。本实验结果显示,与 U87 细胞相比,U251 细胞中 Connexin 43 蛋白的表达显著升高,表明 *p53* 基因的突变可能会导致胶质母细胞瘤细胞中 Connexin 43 蛋白的表达升高。有研究显示,U251 细胞在体内比 U87 细胞具有更强的侵袭性和浸润性^[23],该特性是否与 Connexin 43 表达上调有关有待进一步研究。本研究后续将探讨 *p53* 突变调控 Connexin 43 的机制及与胶质瘤发展的关系,以期为目标治疗胶质母细胞瘤提供实验数据。

[参考文献]

- [1] OSTROM Q T, GITTLEMAN H, FULOP J, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008—2012[J]. *Neuro-oncology*, 2015,17(Suppl 4):iv1-iv62.
- [2] LOUIS D N, PERRY A, REIFENBERGER G, et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary[J]. *Acta Neuropathologica*, 2016,131(6):803-820.
- [3] BLEEKER F E, MOLENAAR R J, LEENSTRA S. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma[J]. *Journal of Neuro-Oncology*, 2012,108(1):11-27.
- [4] ASCHAUER L, MULLER P A J. Novel targets and interaction partners of mutant p53 Gain-Of-Function[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2016,44(2):460-466.
- [5] MULLER P A J, VOUSDEN K H. p53 mutations in cancer[J]. *Nature Cell Biology*, 2013,15(1):2-8.
- [6] HERVÉ J C, BOURMEYSTER N, SARROUILHE D, et al. Gap junctional complexes: from partners to functions[J]. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2007,94(1-2):29-65.
- [7] POYET C, BUSER L, ROUDNICKY F, et al. Connexin 43 expression predicts poor progression-free survival in patients with non-muscle invasive urothelial bladder cancer[J]. *Journal of Clinical Pathology*, 2015,68(10):819-824.
- [8] GOODENOUGH D A, PAUL D L. Gap junctions[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2009,1(1):a002576.
- [9] POINTIS G, GILLERON J, CARETTE D, et al. Physiological and physiopathological aspects of connexins and communicating gap junctions in spermatogenesis [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2010,365(1546):1607-1620.
- [10] ISMAIL R, RASHID R, ANDRABI K, et al. Pathological implications of Cx43 down-regulation in human colon cancer[J].

Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2014,15(7):2987-2991.

- [11] LIN J H C, TAKANO T, COTRINA M L, et al. Connexin 43 enhances the adhesivity and mediates the invasion of malignant glioma cells[J]. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2002,22(11):4302-4311.
- [12] LEE S W, KIM H K, LEE N H, et al. The synergistic effect of combination temozolomide and chloroquine treatment is dependent on autophagy formation and p53 status in glioma cells [J]. *Cancer Letters*, 2015,360(2):195-204.
- [13] BRÁZDOVÁ M, QUANTE, TÖGEL L, et al. Modulation of gene expression in U251 glioblastoma cells by binding of mutant p53 R273H to intronic and intergenic sequences[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009,37(5):1486-1500.
- [14] BATASH R, ASNA N, SCHAFFER P, et al. Glioblastoma multiforme, diagnosis and treatment; recent literature review [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2017,24(27):3002-3009.
- [15] DE GOOIJER M C, GUILLÉN NAVARRO M, BERNARDS R, et al. An experimenter's guide to glioblastoma invasion pathways[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2018,24(9):763-780.
- [16] WICK W, KESSLER T. New glioblastoma heterogeneity atlas— a shared resource [J]. *Nature Reviews Neurology*, 2018,14(8):453-454.
- [17] KIM Y, KIM K H, LEE J, et al. Wnt activation is implicated in glioblastoma radioresistance[J]. *Laboratory Investigation*, 2012,92(3):466-473.
- [18] WAWRYK-GAWDA E, CHYLIŃSKA-WRZOS P, LIS-SO-CHOCKA M, et al. P53 protein in proliferation, repair and apoptosis of cells[J]. *Protoplasma*, 2014,251(3):525-533.
- [19] LOWE S W. Activation of p53 by oncogenes[J]. *Endocrine-Related Cancer*, 1999,6(1):45-48.
- [20] ZHANG A, HITOMI M, BAR-SHAIN N, et al. Connexin 43 expression is associated with increased malignancy in prostate cancer cell lines and functions to promote migration[J]. *Oncotarget*, 2015,6(13):11640-11651.
- [21] MUKHERJEE S, MADDALENA M, LÜ Y Q, et al. Cross-talk between mutant p53 and p62/SQSTM1 augments cancer cell migration by promoting the degradation of cell adhesion proteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022,119(17):e2119644119.
- [22] MCCUTCHEON S, SPRAY D C. Glioblastoma-astrocyte connexin 43 gap junctions promote tumor invasion[J]. *Molecular Cancer Research: MCR*, 2022,20(2):319-331.
- [23] SCHULZ J A, RODGERS L T, KRYSCIO R J, et al. Characterization and comparison of human glioblastoma models[J]. *BMC Cancer*, 2022,22(1):844.

(本文编辑 马伟平)