

网络出版时间: 2017-6-16 11:46:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170616.1146.005.html>

全反式维甲酸对人胃腺癌细胞株 SGC-7901 凋亡的影响

魏翔¹, 陈绍龙¹, 贾宁¹, 周青¹, 李静静², 张素梅¹, 汪渊¹

摘要 目的 研究全反式维甲酸(ATRA)对胃腺癌细胞系 SGC-7901 凋亡的影响,并初步探讨其可能的分子机制。方法 ATRA 处理 SGC-7901 细胞, Hoechst 染色检测 ATRA 对 SGC-7901 细胞凋亡的影响, Western blot 法检测 ATRA 对凋亡相关蛋白表达情况的影响。结果 ATRA 可诱导 SGC-7901 细胞的凋亡,且下调凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达,对促凋亡蛋白 Bax 的表达和酶原形式的 Caspase-3 的表达没有影响。结论 ATRA 促进 SGC-7901 细胞的凋亡,其分子机制可能是下调 Bcl-2 的表达,使 Bcl-2/Bax 的值降低进而促进细胞凋亡。

关键词 全反式维甲酸; 胃癌; SGC-7901; 凋亡

中图分类号 R 453.3; R 977.3; R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)08-1119-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.08.005

胃癌的死亡率在我国恶性肿瘤中居首位,严重影响人们的身体健康,具有地域性的差异,且胃癌早期难以发现,晚期难以治疗,术后 5 年生存率并不乐观^[1-2]。现如今临床治疗肿瘤的方法除了手术治疗外,化疗也是治疗肿瘤的一种重要方式。全反式维甲酸(all-transretinoic acid, ATRA)近年来被广泛用于临床治疗肿瘤,如急性早幼粒细胞性白血病等^[3],但其具体作用机制尚不清楚。该研究旨在初步探讨药物 ATRA 对胃癌的影响及其可能的分子机制,用药物 ATRA 处理胃癌细胞 SGC-7901,检测药物处理后细胞生物学行为改变,并检测 Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白的表达来探讨其潜在的分子机制,为 ATRA 应用于临床治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 胃腺癌细胞株 SGC-7901 购自美国 ATCC 公司,于含 10% 胎牛血清、1% 双抗(链霉素、

2017-04-06 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81201907); 高校省级优秀青年人才基金项目(编号: 2012SQRL067); 安徽医科大学博士研究生科研基金(编号: XJ201229)

作者单位: ¹ 安徽医科大学分子生物学实验室、生物化学与分子生物学教研室、安徽省省部共建教育部重要遗传病基因资源利用重点实验室,合肥 230032

² 安徽公安职业学院,合肥 230031

作者简介: 魏翔,女,硕士研究生;

张素梅,女,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: 379236778@qq.com

FasL-specific microRNA in blocking immune escape of tongue squamous cell carcinoma

Wu Yan^{1,2}, Xu Yanxue^{1,2}, Han Tongtong^{1,2}, et al

(¹ Stomatologic College of Anhui Medical University, Hefei 230032; ² The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Key Laboratory of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of miR-590 on the expression of FasL in SCC-3 cells. **Methods** The synthetic miR-590 mimics or miR-590 inhibitor was transfected into SCC-3 cells. The mRNA and protein expression of FasL mRNA and protein in SCC-3 were detected by RT-PCR and Western blot respectively. The transfected SCC-3 cells were treated with Cisplatin(DDP) 5 mg/L and the cell growth curves were drawn at different time points by MTT assay, and the effect of miR-590 was verified from the negative side by the inhibitor of miR-590 against FasL. **Results** MiR-590 decreased the expression of FasL on SCC-3 cells at mRNA and protein levels; Resistance to DDP was decreased in SCC-3 cells after miR-590 transfection. **Conclusion** MiR-590 can effectively inhibit the expression of FasL in SCC-3 cells and decrease the resistance of SCC-3 to DDP, which may reduce the apoptosis-inducing and killing effect of immunocompetent cells, blocking tumor immune escape, providing a new target for the treatment of tongue squamous cell carcinoma.

Key words FasL; miR-590; squamous cell carcinoma of tongue

青霉素)的高糖 DMEM 培养基进行常规培养,培养条件为 5% CO₂、37 °C、饱和湿度。

1.2 主要试剂 ATRA、DMSO 购自美国 Sigma 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;DMEM 购自美国 Gibco 公司;细胞凋亡 Hoechst 染色试剂盒购自上海 Beyotime Biotechnology 公司;ECL 发光显色试剂盒购自美国 Thermo Scientific 公司;BCA 蛋白质定量试剂盒购自 Pierce 美国公司;兔抗人单克隆抗体 Caspase-3、兔抗人多克隆抗体 Bax、鼠抗人单克隆抗体 Bcl-2 购自美国 MILLIPORE 公司;小鼠抗人单克隆抗体 β -actin 购自美国 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠、羊抗兔二抗均购自北京中杉金桥生物公司。

1.3 Hoechst 33258 染色检测 ATRA 对 SGC-7901 细胞凋亡的影响 取盖玻片彻底清洗后 60 °C 烘干,浸泡于浓硫酸-重铬酸钾洗液中过夜,小心取出,自来水洗涤 10 遍后,再用蒸馏水洗涤 5 遍,高压蒸汽灭菌后,放入 70% 酒精中浸泡过夜,在紫外灯下照射 30 min 以上,用镊子将浸泡的盖玻片取出在酒精灯上点燃,待酒精燃烧完水分冷却后放入 12 孔板中。取出处于对数生长期的 SGC-7901 细胞,用 PBS 洗 3 遍,待胰酶消化细胞形态变圆后,用血清终止消化并将细胞吹打成单个细胞悬液,调整细胞密度种于板中,设置细胞对照组、DMSO 溶剂对照组、ATRA 加药组。次日,吸去板中原培养液,并在每组加入相应的 DMSO、10 μ mol/L ATRA。每天更换新鲜培养液,2 d 后取出生长于盖玻片上的 SGC-7901 细胞固定及 Hoechst 33258 染色。具体步骤如下:吸尽 12 孔板中的培养液,用 PBS 洗 3 遍,每遍 3 min,向每孔中加入 0.2 ml 固定液,室温固定 20 min;吸出固定液,用 PBS 洗 3 遍,每次 3 min,吸尽 12 孔板内的液体,每孔加入 0.3 ml Hoechst 33258 染色液,室温避光染色 5 min,用 PBS 洗 3 遍,每次 5 min;取洁净的载玻片,滴加 15 μ l 抗荧光淬灭封片液于载玻片上,将长有细胞的盖玻片吸干水分反向盖在滴有抗荧光

淬灭封片液的载玻片上,尽量避免气泡,在盖玻片两端滴加指甲油固定盖玻片。于倒置荧光显微镜激发波波长 360 nm,发射波波长 450 nm 拍摄,凋亡细胞为细胞核致密浓染,或碎块状致密浓染者。

1.4 Western blot 检测蛋白表达 SGC-7901 细胞分为 3 组,细胞对照组、DMSO 溶剂对照组、ATRA 加药组。用 PBS 洗 3 遍,每瓶加入蛋白裂解液(Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1% Triton, 0.1% SDS, 5 mg/ml Leupeptin, 1 mmol/L PMSF) 300 μ l, 水平放置于冰上 30 min。用细胞刮刮下每瓶的细胞,用移液枪把液体吸到标记好的 1.5 ml EP 管中。于 -80 °C、4 °C 反复冻融 3 次后在 4 °C 高速冷冻离心机离心 30 min(14 000 r/min) 吸取上清液。用 BCA 蛋白定量试剂盒计算出所有蛋白样品的浓度,将所有的蛋白样品浓度调整为同一浓度后加入蛋白上样缓冲液,充分混匀,于沸水中煮沸 6 min, -80 °C 保存。每组取等量的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,将蛋白转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后,用含 0.05% Tween-20 的 TBS 洗膜 3 遍,分别加入 Bax、Bcl-2、Caspase-3、 β -actin 抗体 4 °C 孵育过夜。然后再用含 0.05% Tween-20 的 TBS 洗膜 3 遍后加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 2 h。然后用 TBS 洗膜, ECL 发光试剂盒显影。用软件 Quantity One 测定各条带的灰度值,以 β -actin 为参照,计算 Bax、Bcl-2、Caspase-3 的相对灰度值。以上实验重复 3 次。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,所有结果用表示。采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ATRA 对细胞凋亡的影响 Hoechst 33258 染色结果显示相对于细胞对照组, ATRA 加药组凋亡细胞比例明显增加,而 DMSO 溶剂对照组差异无统计学意义。见图 1。

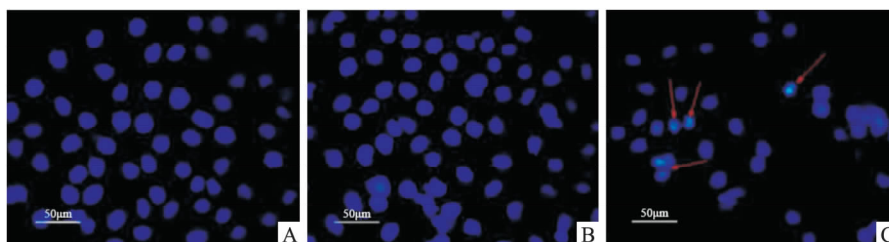


图 1 各组细胞凋亡情况 Hoechst 染色 $\times 200$

A: 细胞对照组; B: DMSO 溶剂对照组; C: ATRA 加药组

2.2 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 Western blot 结果显示 ATRA 加药组 Bcl-2 表达降低、DMSO 溶剂对照组与细胞对照组差异无统计学意义。酶原性 Caspase-3 和 Bax 的表达差异无统计学意义。且从 Bcl-2/Bax 的值显示, ATRA 加药组远低于细胞对照组, DMSO 溶剂对照组与细胞对照组差异无统计学意义。见表 1、图 2。

表 1 Bcl-2、Bax、Caspase-3 在细胞中的表达情况 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

项目	细胞对照组	DMSO 溶剂对照组	ATRA 加药组	F 值	P 值
Bcl-2	0.73 ± 0.02	0.75 ± 0.05	0.48 ± 0.05* #	38.923	0.000
Bax	0.74 ± 0.03	0.78 ± 0.08	0.77 ± 0.05	0.371	0.705
Caspase-3	1.07 ± 0.07	1.11 ± 0.04	1.09 ± 0.04	0.556	0.600
Bcl-2/Bax	0.99 ± 0.07	0.97 ± 0.11	0.62 ± 0.05* #	19.036	0.003

与细胞对照组比较: * $P < 0.05$; 与 DMSO 溶剂对照组比较: # $P < 0.05$

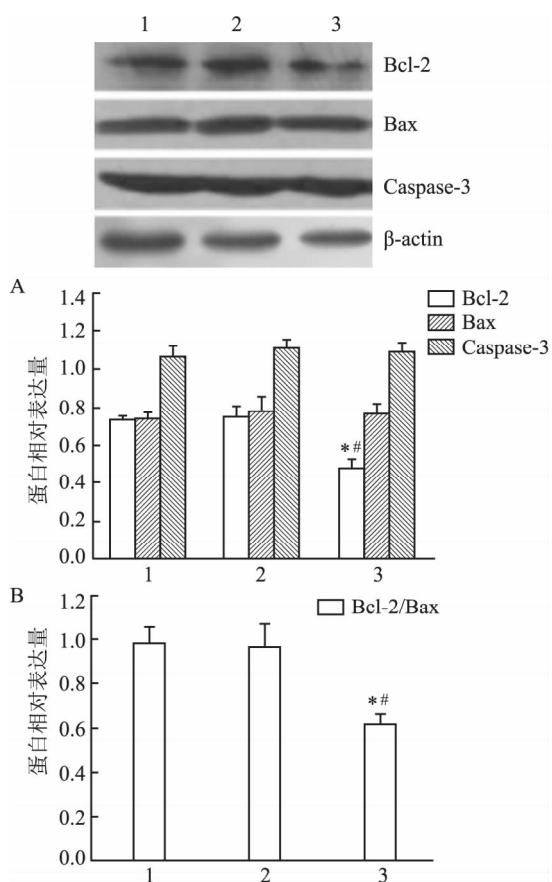


图 2 ATRA 处理后相关凋亡蛋白表达量

1: 细胞对照组; 2: DMSO 溶剂对照组; 3: ATRA 加药组; 与细胞对照组比较: * $P < 0.05$; 与 DMSO 溶剂对照组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

胃癌是全球最常见的消化道恶性肿瘤之一, 虽然近年来胃癌发生率有所下降, 但胃癌仍是世界范

围内最常见的癌症死亡原因之一且五年存活率较低^[1-2,4]。通常治疗肿瘤的方法一般为手术切除和药物化疗。ATRA 是维生素 A 的代谢中间产物^[3], 可以诱导肿瘤分化、抑制多种肿瘤细胞增殖^[5], 是临床治疗常用药物。目前, ATRA 已成为治疗急性早幼粒细胞白血病的首选药物^[3], 并广泛应用于实体肿瘤如宫颈癌、甲状腺癌、非小细胞肺癌等的预防和治疗且作用明显^[5]。但是其对于胃癌的治疗作用仍在研究, 但具体机制尚不清楚。

细胞凋亡是由基因控制的细胞自主有序的主动死亡过程^[6]。细胞凋亡的形态特征主要为体积变小, 胞质浓缩, 核染色质固缩于边缘, DNA 降解, 最后形成凋亡小体而被吞噬^[7]。本研究中 Hoechst 33258 染色实验结果显示 ATRA 组相较于细胞组存在大量凋亡小体, 所以得出结论药物 ATRA 诱导胃癌细胞 SGC-7901 凋亡。

当细胞受到内部凋亡刺激因子作用时, 线粒体内、外膜之间的通透性转变孔会不可逆的过度开放, 这时位于线粒体膜间隙的细胞色素 C 等促凋亡活性蛋白释放至胞质内^[8]。在 dATP 存在的条件下, 通过半胱氨酸蛋白酶募集域的作用, 细胞色素 C 与凋亡细胞蛋白酶激活因子和 Caspase-9 酶原结合, 酶原形式的 Caspase-9 活化, 激活下游效应半胱氨酸蛋白酶如 Caspase-2、3、6 等, 进而启动细胞凋亡^[9]。其中 Caspase-3 是凋亡的关键蛋白酶, 一旦 Caspase-3 被激活, 标志着细胞不可逆的进入凋亡进程。正常情况下, 胞质中的 Caspase-3 以无活性的酶原形存在, 细胞凋亡信号的出现可导致 Caspase-3 在多种蛋白水解酶的作用下, 发生裂解而活化进而诱导细胞凋亡。本研究中 Western blot 检测的 Caspase-3 是酶原形式的蛋白, 而酶原形式的 Caspase-3 的表达差异无统计学意义。

线粒体途径中细胞色素 C 进入胞质是这一途径中非常关键的环节, 而此环节主要受 Bcl-2 家族蛋白的调控^[8]。Bcl 是 B 细胞淋巴细胞性白血病原癌基因, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 是 Bcl 家族中最早被发现的一员, 并且与人类淋巴瘤的抗药性相关^[10]。而促凋亡蛋白 Bax 的基因与 Bcl-2 具有同源性, 且促凋亡蛋白 Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 在三维结构上非常相似, 虽然功能完全相反^[11]。Bcl-2 和 Bax 可以形成同源或异源二聚体, 从形成二聚体的浓度不同来决定是抑制细胞凋亡还是促进细胞凋亡。也就是说并不是 Bcl-2 和 Bax 单独发挥作用, 而是两者共同发挥作用。因此有研究^[12]推测 Bcl-2/Bax 的值才是

细胞启动凋亡的关键。

本研究用药物 ATRA 处理胃癌细胞 SGC-7901, 药物浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$, 另设细胞组、DMSO 溶剂对照组。Hoechst 33258 染色结果从细胞凋亡的生物学行为说明药物 ATRA 促进细胞的凋亡。本研究通过 Western blot 检测相关蛋白表达情况, 初步研究 ATRA 促进细胞凋亡可能的分子机制。Caspase-3、Bax、Bcl-2, 作为经典的凋亡相关蛋白, 是研究的首选。Caspase-3 酶原形式的蛋白表达不会有差异, 只有被活化的 Caspase-3 蛋白表达才会差异有统计学意义。本研究中加药组酶原形式的 Caspase-3 蛋白的表达差异无统计学意义。虽然 Western blot 结果显示 Bax 组间表达差异无统计学意义, 但是 ATRA 加药组 Bcl-2 的表达降低, 导致 ATRA 加药组 Bcl-2/Bax 比值降低, 与细胞对照组和 DMSO 溶剂对照组比较, 差异有统计学意义。说明 Bcl-2 与 Bax 的比值降低启动细胞凋亡。本研究显示药物 ATRA 可以促进胃癌细胞 SGC-7901 的凋亡, 其潜在的分子机制可能与 Bcl-2 和 Bax 凋亡蛋白涉及的线粒体凋亡途径相关。Bcl-2/Bax 的值可以为临床药物治疗的作用提供一个判断标准。而药物 ATRA 促进 SGC-7901 细胞的凋亡是否还与其他凋亡通路相关依然需要进一步的研究。

参考文献

[1] Peleteiro B, Severo M, La Vecchia C, et al. Model-based patterns in stomach cancer mortality worldwide [J]. *Eur J Cancer Prev*,

2014, 23(6): 524-31.

- [2] 李广连, 国滨, 李金芳, 等. 胃癌辅助治疗新进展 [J]. *中国医学创新*, 2014, 11(28): 144-6.
- [3] Siddikuzzaman, Guruvayoorappan C, Berlin Grace V M. All trans retinoic acid and cancer [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2011, 33(2): 241-9.
- [4] Bertuccio P, Chatenoud L, Levi F, et al. Recent patterns in gastric cancer: a global overview [J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(3): 666-73.
- [5] 杨艳艳, 胡安拉, 张素梅, 等. 全反式维甲酸对人胃癌细胞株 BGC-823 迁移的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(7): 867-71.
- [6] 赵彦超, 顾耘. 细胞凋亡通路研究进展 [J]. *现代医学*, 2013, 41(4): 285-8.
- [7] Mazumder S, Plesca D, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 414: 13-21.
- [8] 李敏, 林俊. 细胞凋亡途径及其机制 [J]. *国际妇产科学杂志*, 2014, 41(2): 103-7.
- [9] 岳原亦, 张扬, 张一奇. Caspase 家族与细胞凋亡 [J]. *中国医疗前沿*, 2011, 6(6): 25-6.
- [10] Krishna S, Low I C, Pervaiz S. Regulation of mitochondrial metabolism: yet another facet in the biology of the oncoprotein Bcl-2 [J]. *Biochem J*, 2011, 435(3): 545-51.
- [11] Muñoz-Pinedo C. Signaling pathways that regulate life and cell death: evolution of apoptosis in the context of self-defense [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 738: 124-43.
- [12] Sharifi S, Barar J, Hejazi M S, et al. Doxorubicin changes Bax/Bcl-xL ratio, caspase-8 and 9 in breast cancer cells [J]. *Adv Pharm Bull*, 2015, 5(3): 351-9.

Effect of all-retinoic acid on the apoptosis of human gastric cancer SGC-7901 cells

Wei Xiang, Chen Shaolong, Jia Ning, et al

(Laboratory of Molecular Biology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Gene

Resource Utilization for Genetic Diseases of Ministry of Education and Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Objective To study the effect of all retinoic acid (ATRA) on the apoptosis of human gastric cancer lines SGC-7901 cells, and to investigate the possible mechanism of apoptosis. **Methods** SGC-7901 gastric cancer cells were treated by ATRA. Hoechst staining was used to detect the effect of ATRA on the apoptosis of SGC-7901 cells, and the effect of ATRA on the expression of apoptosis related protein was detected by Western blot. **Results** All trans retinoic acid (ATRA) could induce the apoptosis of SGC-7901 cells and downregulate the expression of Bcl-2, but had no effect on the expression of pro-apoptotic protein Bax and Caspase-3. **Conclusion** ATRA promotes the apoptosis of SGC-7901 cells in gastric cancer cells. The molecular mechanism may be related to reduce the expression of Bcl-2, so that decrease the value of Bcl-2/Bax and then promote cell apoptosis.

Key words all-retinoic acid; gastric carcinoma; SGC-7901; apoptosis