

T 细胞因子 4 在胃癌细胞增殖凋亡中的作用研究

林明政¹, 沈国栋², 沈干², 徐佳慧², 程民², 徐婷娟², 胡世莲²

摘要 目的 研究 T 细胞因子 4 (TCF4) 在胃癌细胞中的表达以及对胃癌细胞增殖及衰老、凋亡中的作用。方法 培养人胃癌细胞株 MGC803、SGC7901、HSC44-PE、44As3、MKN45、NCI-N87 以及人永生胃黏膜上皮细胞株 GES-1, 使用 Western blot 法比较 TCF4 在各细胞之间的表达差异。选择其中 TCF4 表达高与低的细胞株, 分别通过稳定转染 TCF4 表达质粒及 dominant negative TCF4 (dnTCF4) 的方法上调与下调细胞 TCF4 表达, 采用体外细胞增殖实验及实时无标记细胞检测分析 (RTCA) 等技术检测 TCF4 对胃癌细胞增殖与凋亡的影响。建立胃癌细胞裸鼠移植瘤模型, 观察 TCF4 蛋白对胃癌移植瘤生长的影响。结果 TCF4 在胃癌细胞中的表达高于对照 GES-1 细胞。胃癌细胞株按 TCF4 的表达量从高到低排列依次为 NCI-N87、44As3、HSC44-PE、MGC803、MKN45、SGC7901。TCF4 的表达与胃癌细胞的增殖能力呈正相关性, 而与胃癌细胞的衰老、凋亡呈负相关性。结论 TCF4 在胃癌细胞中呈高表达, 其能促进胃癌细胞的增殖、抑制胃癌细胞的衰老及凋亡。

关键词 胃癌; TCF4; 增殖; 凋亡

中图分类号 R 730.2; R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)08-1092-05

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 其发生率和死亡率分别位居第二位和第三位^[1-2]。Wnt 信号通路是调控动物胚胎发育、细胞生长增殖的重要信号通路。既往研究^[3-4]显示, Wnt 信号通路的异常激活与肠癌等多种肿瘤的发生密切相关, 但其在胃癌发生、发展中的作用仍不清楚。T 细胞因子 4 (T cell factor 4, TCF4) 是 TCF 家族的一员, 其基因是 TCF7L2 (transcription factor 7-like 2), 是 Wnt 信号通路中重要的信号分子^[5-6]。该研究以 TCF4 为研究

对象, 探索其在胃癌细胞中的表达以及在增殖与衰老、凋亡中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 人永生胃黏膜上皮细胞株 GES-1、人胃腺癌细胞株 MGC803、SGC7901、MKN45 购自中科院上海细胞生物研究所; 人胃腺癌细胞 NCI-N87 购自中国医学科学院北京肿瘤细胞研究所; 人胃癌细胞株 44As3 及 HSC44-PE 由日本名古屋大学武井佳史教授赠送。

1.1.2 质粒及菌株 pspax2、pMD2G 质粒、DH-5 α 感受态 *E. coli* 由中国科技大学钟永军博士赠送; 表达 EF1 α -dnhTcf4/SV40-PuroR 质粒的 EdTP 菌种购自美国 Addgene 公司; TCF4 全长序列表达质粒购自美国 Origene 公司。

1.1.3 实验动物 裸鼠 (BALB/c-nu) 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, SPF 级, 22 只, 雌性, 6~8 周龄, 饲养于安徽医科大学附属省立医院 SPF 级动物房中。

1.1.4 主要试剂 RPMI 1640 培养基、胎牛血清 (FBS) 购自美国 HyClone 公司; 胰酶消化液、RIPA 裂解液、5 \times 蛋白上样缓冲液、细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒购自上海碧云天公司; 蛋白酶抑制剂、蛋白磷酸酶抑制剂购自瑞士 Roche 公司; DMEM 培养基、BCA 试剂盒、化学发光显影液购自美国 Thermo 公司; β -actin、TCF4 兔抗人单克隆抗体、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗兔 IgG 购自美国 Cell Signaling Technology 公司; Axyprep 质粒 DNA 小量试剂盒购自美国 Axygen 公司; 转染试剂 LipofectamineTM 2000 购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 以上细胞解冻复苏后, 培养于含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱内培养。

1.2.2 Western blot 法检测 提取正常生长的 GES-1、MGC803、SGC7901、NCI-N87、44As3、MKN45 及

2016-04-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81071808); 安徽省自然科学基金 (编号: 1408085MH167); 安徽省科技计划项目 (编号: 1301042094)

作者单位: ¹ 安徽医科大学附属省立医院老年病科, 老年医学研究所, 合肥 230001

² 肿瘤免疫与营养治疗安徽省重点实验室, 合肥 230001

作者简介: 林明政, 男, 硕士研究生;

胡世莲, 女, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: hushilian@126.com

HSC44-PE 细胞总蛋白,BCA 法测定各组蛋白浓度并用 PBS 调平,加入蛋白上样缓冲液煮沸 5 min,经 SDS-PAGE 电泳分离后半干转至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶室温条件下封闭 1 h。一抗以兔抗人 β -actin 为内参,兔抗人 TCF4 为目的蛋白,4 °C 孵育过夜。以 HRP 标记的羊抗兔 IgG 作为二抗,使用化学发光凝胶成像系统成像检测各组细胞 TCF4 的差异表达。

1.2.3 质粒的扩增及提取 将待扩增的 pspax2、pMD2G 质粒分别转入 DH-5 α 感受态 *E. coli* 中,按照质粒使用说明使用含有适量 Ampicillin 的 LB 固体培养基筛选菌株,在 LB 固体培养基中挑取单克隆菌落接种到 LB 液体培养基中,置于气浴摇床中 37 °C、200 r/min 摇菌 12 ~ 18 h。质粒的提取步骤如下:取 10 ml 转入质粒的菌液加入离心管中,10 000 r/min 离心 1 min,弃上清液;加入 500 μ l Buffer S1 重悬细菌,再加入 500 μ l Buffer S2,温和并充分地上下翻转 4 ~ 6 次,使菌体充分裂解,室温放置 5 min,直至溶液变得透亮黏稠;加入 700 μ l Buffer S3,上下翻转 6 ~ 8 次见形成白色絮状沉淀,10 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液加入到制备管中并将制备管置于收集管中,10 000 r/min 离心 1 min,弃滤液;将制备管放回收集管中,加入 500 μ l Buffer W1,10 000 r/min 离心 1 min,弃滤液;将制备管放回收集管中,加入 700 μ l Buffer W2,10 000 r/min 离心 1 min,弃滤液,重复上一步骤 1 次;将制备管放回收集管中,10 000 r/min 离心 1 min,取出制备管置于超净台中室温干燥 30 min 后,移入新的 1.5 ml EP 管中,加入 60 ~ 80 μ l Eluent 或去离子水,室温静置 1 min,10 000 r/min 离心 1 min 收集扩增的质粒;分光光度计测定质粒浓度。

1.2.4 慢病毒包装及感染 包装慢病毒前 1 d,在 3.5 cm 培养皿中接种适量密度的 293T 细胞,每个样品需要 1×10^6 个 293T 细胞。包装步骤如下:取 1.5 ml 灭菌 EP 管,加入 2 μ g EdTP、3 μ g pspax2、1 μ g pPD2G 质粒以及 250 μ l 的无血清培养基,轻柔混匀,室温孵育 5 min;取 1.5 ml 灭菌 EP 管,取 9 μ l 脂质体 LP2000 溶于 250 μ l 无血清培养基中,轻柔混匀,室温孵育 5 min;将 DNA 溶液和脂质体溶液轻柔混匀,室温孵育 20 min;用胰酶消化并记数 293T 细胞并用含血清的培养基重悬细胞;在 6 孔板中每孔加入 1 ml 含血清的生长培养基,再加入 DNA-脂质体复合物;将 1 ml 重悬的 293T 细胞(1×10^6 个细胞/ml)加入到平板中,37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱

中孵育过夜;移除含有 DNA-脂质体复合物的培养基,代之以 DMEM 培养基;转染后 48 ~ 72 h 取上清液 3 000 r/min 离心 20 min,取上清液即为病毒悬液。感染 24 h 前,分别在 3.5 cm 培养皿中接种适量密度的 44As3、NCI-N87 细胞(约 2×10^5 /ml),待细胞生长面积达 50% ~ 80% 时即可用于慢病毒感染。取 2 ml 新鲜培养基替换原培养基,加入适量的慢病毒悬液,置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h;更换新鲜培养基继续培养 48 ~ 72 h 后,加入 puromycin 进行筛选获得 knock-down TCF4 的 44As3/dnTCF4、N87/dnTCF4 细胞。

1.2.5 质粒转染 转染 24 h 前,在 3.5 cm 培养皿中接种适量密度的 SGC7901 细胞(约 2×10^5 /ml),待细胞生长面积达 50% ~ 80% 时即可用于转染。配制溶液 1:240 μ l 无血清培养基 + 10 μ l LP2000,室温孵育 5 min;溶液 2:250 μ l 无血清培养基 + 2 μ g TCF4 表达质粒,室温孵育 5 min;将溶液 1 与溶液 2 混合,室温下放置 20 min;将 6 孔板中的细胞用无血清培养基冲洗细胞 2 遍后,加入 2 ml 无血清培养基;将溶液 1 与溶液 2 的混合液逐滴加入孔中,摇动培养板,轻轻混匀;置于在 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中保温 4 ~ 6 h;更换含有血清的全培养基,置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h,按照 1 : 10 接种到新的培养皿中继续培养,根据质粒使用说明书加入适量 puromycin 进行筛选获得 knock-in TCF4 的 SGC/TCF4 细胞。

1.2.6 细胞增殖实验 取对数期生长的 SGC7901、SGC/TCF4、NCI-N87 以及 N87/dnTCF4 细胞株,PBS 清洗 2 遍,胰酶消化,细胞计数,按每个 3.5 cm 培养皿接种 10^5 个细胞,重复 3 次,分别在 24、48、72 h 时观察细胞生长状态并消化、计数,比较 SGC/TCF4 与对照 SGC7901 细胞,NCI-N87 与对照 N87/dnTCF4 细胞的增殖能力。

1.2.7 实时无标记细胞检测技术(RTCA) RTCA 是基于微电子传感技术,通过实时监测阻抗的变化来进行细胞增殖、转移、耐药等实时细胞分析^[7]。在配套的 E16 孔板中每孔接种 2×10^4 个细胞,观察、比较 SGC7901 与 SGC/TCF4 以及 NCI-N87 与 N87/dnTCF4 的增殖情况。

1.2.8 细胞衰老检测 取对数期生长的 SGC7901、SGC/TCF4、NCI-N87 以及 N87/dnTCF4 细胞株,PBS 清洗 2 遍,胰酶消化,细胞计数,按每个 3.5 cm 培养皿接种 5×10^3 个细胞,48 h 后参考文献^[8]使用细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒染色,选择 3 个不同

视野统计阳性细胞。

1.2.9 裸鼠成瘤实验 裸鼠经适应性饲养 1 周后进行试验。取预先培养呈对数期生长的胃癌细胞消化 1 000 r/min 离心, PBS 重悬使细胞密度达到 1×10^7 /ml, 裸鼠背部皮下接种 0.1 ml, 每种胃癌细胞接种 6 只裸鼠, 待细胞成瘤后用游标卡尺每周测量 2 次肿瘤体积, 比较上调 TCF4 表达的 SGC/TCF4 与对照组 SGC7901、下调 TCF4 表达的 44As3/dnTCF4 与对照组 44As3 的肿瘤生长情况。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析, 多组样本均数的比较采用单因素方差分析, 方差齐者采用 LSD-*t* 检验, 方差不齐者采用 Games-Howell 检验。

2 结果

2.1 TCF4 在胃癌细胞中表达 TCF4 在胃癌细胞中的表达要高于对照 GES-1 细胞, 胃癌细胞按 TCF4 表达量从高到低表达排列依次为 NCI-N87、44As3、HSC44-PE、MGC803、MKN45、SGC7901(图 1A)。

2.2 TCF4 促进胃癌细胞增殖 通过质粒转染等手段, 建立 knock-in TCF4 的 SGC/TCF4 及 knock-down TCF4 的 N87/dnTCF4 细胞系, Western blot 法证实 TCF4 在 SGC/TCF4 表达升高、在 N87/dn TCF4 表达降低(图 1B、1C)。细胞增殖实验结果显示 TCF4 调高组细胞 SGC/TCF4 相较于 SGC7901 细胞, 其增殖能力明显提高(图 2A), 而 TCF4 调低组细胞 N87/dnTCF4 相较于 NCI-N87 细胞, 其增殖能力明显降低(图 2B); 这一结果也在 RTCA 实验中得到进一步证实(图 2C、2D)。

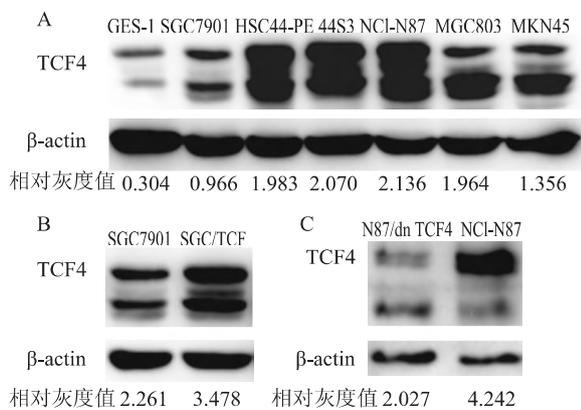


图 1 TCF4 在胃癌细胞中表达

A: TCF4 在胃黏膜上皮细胞及胃癌细胞中的差异表达; B: TCF4 在 SGC/TCF4 中表达高于 SGC7901; C: TCF4 在 N87/dnTCF4 中表达低于 NCI-N87

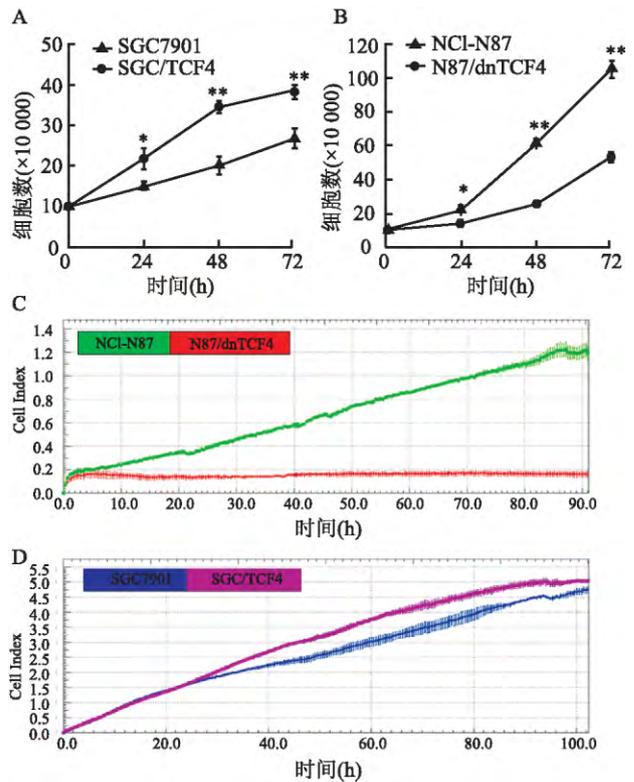


图 2 TCF4 促进细胞增殖

A: 细胞计数法比较 SGC7901 与 SGC/TCF4 的增殖能力; 与 SGC7901 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; B: 细胞计数法比较 NCI-N87 与 N87/dnTCF4 的增殖能力; 与 N87/dnTCF4 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; C: RTCA 法比较 NCI-N87 与 N87/dnTCF4 的增殖能力; D: RTCA 法比较 SGC7901 与 SGC/TCF4 的增殖能力

2.3 TCF4 抑制胃癌细胞衰老与凋亡 细胞培养过程显示, 相较于 NCI-N87 细胞, N87/dnTCF4 细胞出现更多的凋亡细胞; 而在 SGC7901 与 SGC/TCF4 对照中, SGC/TCF4 细胞出现更多的多伪足状细胞, 提示其有更高的活力及迁移能力(图 3)。为了证实 TCF4 是否能抑制胃癌细胞的衰老和凋亡, 选用细胞衰老 β-半乳糖苷酶染色试剂盒进行染色, 结果提示 N87/dnTCF4 细胞染色阳性率明显高于 NCI-N87 细胞, SGC/TCF4 细胞染色阳性率明显低于 SGC7901 细胞($P < 0.05$) (图 4)。

2.4 TCF4 促进胃癌裸鼠移植瘤生长 按照实验方法 1.2.9 建立裸鼠移植瘤模型, 10 d 后结果显示所有接种点均成瘤, 生长 14 d 肿瘤体积测量结果显示 SGC/TCF4 细胞移植瘤体积显著大于对照 SGC7901 移植瘤, 而 44As3/dnTCF4 移植瘤体积显著小于 44As3 移植瘤(图 5), 从而证明 TCF4 能促进胃癌细胞裸鼠移植瘤的生长。

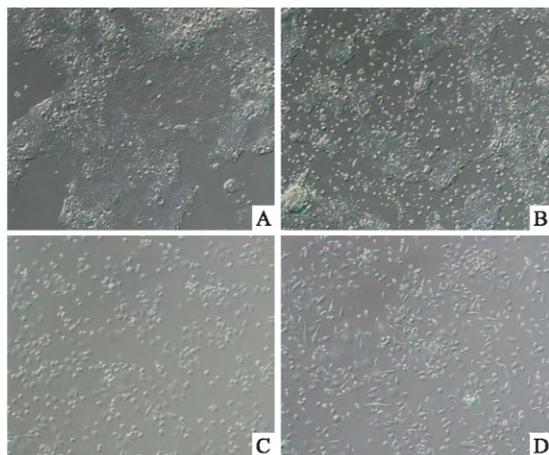


图3 胃癌细胞在含20%FBS的培养基中培养10 d后细胞形态学改变 ×100

A: 胃癌 NCI-N87 细胞; B: TCF4 knock-down N87/dnTCF4 细胞; C: 胃癌 SGC7901 细胞; D: TCF4 knock-in SGC/TCF4 细胞

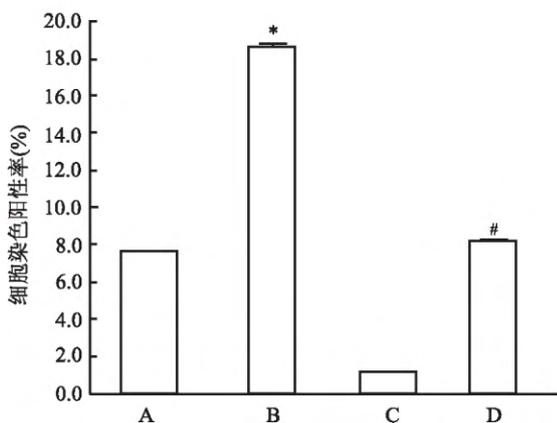
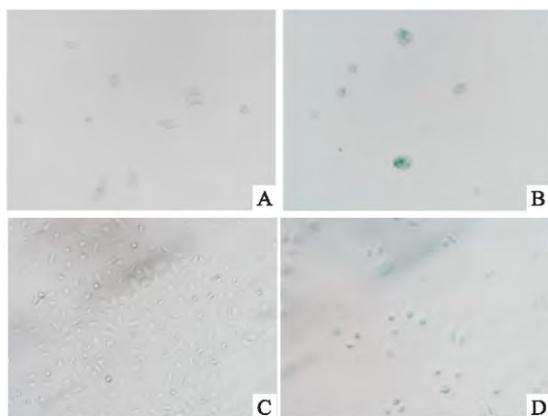


图4 衰老细胞β-半乳糖苷酶染色 ×200

A: NCI-N87; B: N87/dnTCF4; C: SGC/TCF4; D: SGC-7901; 与 NCI-N87 比较: * $P < 0.05$; 与 SGC/TCF4 比较: # $P < 0.05$

3 讨论

胃癌是严重危害人类身心健康的恶性肿瘤,然而由于其早期临床症状表现不明显,且缺乏特异有效的生物标志物,目前仅有少数患者能得到早期诊

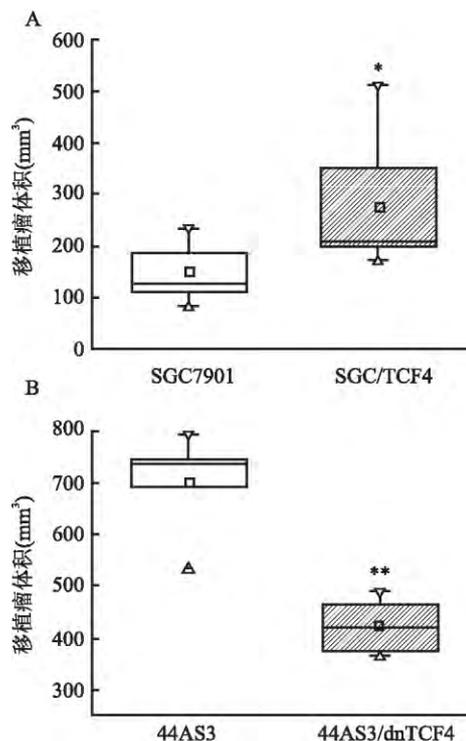


图5 胃癌细胞裸鼠移植瘤14 d生长情况

A: 胃癌裸鼠移植瘤体积 SGC/TCF4 > SGC7901; 与 SGC7901 比较: * $P < 0.05$; B: 44As3 > 44As3/dnTCF4; 与 44As3 比较: ** $P < 0.01$

断及治疗^[9-10]。因此,深入研究胃癌的发生、发展机制,对胃癌的早期诊断及治疗具有重要意义。Wnt 信号通路是一条在进化上高度保守的信号通路,其活性受多种蛋白调节,而其中 TCF4 蛋白是 Wnt 信号通路的关键调节因素之一,表现为当 Wnt 蛋白与细胞膜表面的 Frizzled 家族跨膜蛋白(FZ)受体以及低密度脂蛋白受体相关蛋白结合时,可引起 β-catenin 在细胞质内大量聚集并进入细胞核,入核的 β-catenin 与 TCF4 结合形成 β-catenin-TCF4 复合物,激活 Wnt 信号通路下游诸如原癌基因 c-Myc、细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)等在内的一系列靶基因^[3,5-6]。既往的研究已经证实 Wnt 信号通路的异常激活与肠癌等多种肿瘤的发生密切相关,而这其中 TCF4 的异常表达在这一过程中发挥着重要作用,Chen et al^[11]报道 TCF4 能直接与 LIN28B 基因的内含子结合并促进 LIN28B 基因的表达,增强人乳腺癌、肺癌细胞的干细胞潜能,促进人乳腺癌、肺癌的生长与转移;研究^[12]表明分化诱导因子-1 能通过降低 TCF4 表达抑制人乳腺癌与宫颈癌裸鼠移植瘤的生长。

本实验以 Wnt 信号通路的关键蛋白 TCF4 为研

研究对象 结果显示 TCF4 在胃癌细胞中的表达量明显高于胃黏膜上皮细胞,这与课题组在临床标本中的检测结果一致。选取 TCF4 表达最高 NCI-N87、44As3 细胞及表达最低的 SGC7901 细胞,通过慢病毒包装及质粒转染手段分别获得 TCF4 调高组细胞 SGC/TCF4 及调低组细胞 N87/dnTCF4、44As3/dnTCF4,体外细胞增殖实验及 RTCA 实验结果显示 SGC/TCF4 细胞增殖能力明显高于 SGC7901 细胞, N87/dnTCF4 细胞增殖能力明显低于 N87 细胞,差异有统计学意义;镜下形态学观察及细胞衰老染色显示 N87/dnTCF4 细胞染色阳性率高于 NCI-N87 细胞, SGC/TCF4 细胞染色阳性率明显低于 SGC7901 细胞;之后通过建立裸鼠荷瘤模型,观察比较胃癌细胞在体内生长情况,14 d 结果显示 SGC/TCF4 组肿瘤体积明显大于 SGC7901 组,44As3/dnTCF4 组肿瘤体积明显小于 44As3 组。

参考文献

- [1] Torre L A , Bray F , Siegel R L , et al. Global cancer statistics , 2012 [J]. *CA Cancer J Clin* , 2015 , 65(2) : 87 - 108.
- [2] 陈万青,张思维,曾红梅,等. 中国 2010 年恶性肿瘤发病与死亡[J]. *中国肿瘤* 2014 23(1) : 1 - 10.
- [3] Klaus A , Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer [J]. *Nat Rev Cancer* , 2008 , 8(5) : 387 - 98.
- [4] Mao J , Fan S , Ma W , et al. Roles of Wnt/ β -catenin signaling in

- the gastric cancer stem cells proliferation and salinomycin treatment [J]. *Cell Death Dis* 2014 5: e1039.
- [5] MacDonald B T , Tamai K , He X , et al. Wnt/ β -Catenin signaling: components, mechanisms and diseases [J]. *Dev Cell* , 2009 , 17(1) : 9 - 26.
- [6] Daniels D L , Weis W I. Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation [J]. *Nat Struct Mol Biol* , 2005 , 12(4) : 364 - 71.
- [7] Kho D , MacDonald C , Johnson R , et al. Application of xCELLigence RTCA biosensor technology for revealing the profile and window of drug responsiveness in real time [J]. *Biosensors (Basel)* , 2015 5(2) : 199 - 222.
- [8] He Q , Gao Q , Ge S , et al. Axitinib alone or in combination with chemotherapeutic drugs exerts potent antitumor activity against human gastric cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Cancer Res Clin Oncol* 2014 , 140(9) : 1575 - 83.
- [9] Society A C. Global cancer facts and figures , 2nd edition [R]. Atlanta: American Cancer Society , 2011.
- [10] Foo M , Crosby T , Rackley T , et al. Role of (chemo)-radiotherapy in resectable gastric cancer [J]. *Clin Oncol* , 2014 , 26(9) : 541 - 50.
- [11] Chen C , Cao F , Bai L , et al. IKK β enforces a LIN28B TCF7L2 positive feedback loop that promotes cancer cell stemness and metastasis [J]. *Cancer Res* 2015 , 75(8) : 1725 - 35.
- [12] Takahashi-Yanaga F , Yoshihara T , Jingushi K , et al. DIF-1 inhibits tumor growth *in vivo* reducing phosphorylation of GSK-3 β and expressions of cyclin D1 and TCF7L2 in cancer model mice [J]. *Biochem Pharmacol* 2014 89(3) : 340 - 8.

Effects of T cell factor 4 (TCF4) on the proliferation and apoptosis in gastric cancer cells

Lin Mingzheng¹ , Shen Guodong² , Shen Gan² , et al

(¹ Dept of Geriatrics , Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University ,

² Anhui Provincial Key Laboratory of Tumor Immunotherapy and Nutrition Therapy Hefei 230001)

Abstract Objective To research the expression of T cell factor 4 (TCF4) and the function of proliferation , senescence and apoptosis in gastric cancer cells. **Methods** Human gastric cancer cell lines MGC803 , SGC7901 , HSC44-PE , 44As3 , MKN45 , NCI-N87 and immortalized human gastric epithelial cell line GES-1 were cultured and the differential expressions of TCF4 among them were detected by Western blot analysis , then TCF4 expression and dominant negative TCF4 plasmid were transfected into the lowest and highest one respectively. The influence of TCF4 *in vitro* cells was tested by cell proliferation assay and RTCA. Meanwhile , the model of nude mice bearing tumor was established to detect the effect *in vivo*. **Results** The expression of TCF4 in gastric cancer cells was higher than the control GES-1 , the highest one was NCI-N87 , followed by 44As3 , HSC44-PE , MGC803 , MKN45 and SGC7901. TCF4 was positively correlated with proliferation , and negatively associated with senescence , apoptosis in gastric cancer cells. **Conclusion** TCF4 is overexpressed in gastric cancer cells. It could promote the proliferation , inhibit the senescence and apoptosis of gastric cancer cells.

Key words gastric cancer; TCF4; proliferation; apoptosis