

· 基础研究 ·

pEGFPN1-dnEGFR 对胃癌细胞的放疗增敏作用*

秦宇, 王子卫, 杨宁波, 查郎, 朱代亮

(重庆医科大学附属第一医院胃肠外科 400016)

摘要:目的 探讨人表皮生长因子(EGFR)显性负性突变体真核表达载体(pEGFPN1-dnEGFR)对胃癌细胞放疗敏感性的影响。方法 用 pEGFPN1-dnEGFR 转染人胃癌细胞株 SGC-7901 和 NCI-N87 并联合放疗,将两种胃癌细胞分别分为 3 组,即未处理组、pEGFP-N1 空载体质粒转染组(空质粒组)、pEGFPN1-dnEGFR 质粒转染组(目的质粒组),用 MTT 法测定对两种胃癌细胞增殖效应的影响,RT-PCR 检测细胞中 Bax、Cyclin D1 的 mRNA 表达情况,Western blot 检测细胞中 Bax、Cyclin D1 蛋白表达情况。结果 两种胃癌细胞目的质粒转染组的抑制率较空质粒组和未处理组显著提高($P < 0.05$)。RT-PCR 显示两种胃癌细胞目的质粒组 Bax mRNA 相对表达强度较空质粒组和未处理组升高;目的质粒组 Cyclin D1 mRNA 相对表达强度较空质粒组和未处理组降低($P < 0.05$)。Western blot 显示两种胃癌细胞目的质粒组 Bax 蛋白表达相对强度较空质粒组和未处理组明显升高;目的质粒组 Cyclin D1 蛋白表达相对表达强度分别较空质粒组和未处理组降低($P < 0.05$)。结论 pEGFPN1-dnEGFR 能够提高胃癌细胞对放疗的敏感性。

关键词: pEGFPN1-dnEGFR; 放射疗法; 胃肿瘤; Cyclin D1; Bax

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.31.016

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)31-3280-03

The sensitivity effects of pEGFPN1-dnEGFR to radiotherapy in gastric carcinoma cells*

Qin Yu, Wang Ziwei, Yang Ningbo, Zha Lang, Zhu Dailiang

(Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of

Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the radio sensitivity effects on gastric cancer cells by pEGFPN1. **Methods** The gastric cancer cells were divided into 3 groups, including untreated group, pEGFP-N1 non-plasmid-mediated group, pEGFPN1-dnEGFR plasmid transfection group(objective plasmid group). The proliferation of human gastric carcinoma cells, SGC-7901 and NCI-N87, which were transfected pEGFPN1-dnEGFR and conducted radiation treatment, was determined by MTT assay. The mRNA expressions of Bax and Cyclin D1 were detected by reverse transcription PCR(RT-PCR). Protein expressions of Bax and Cyclin D1 in cells were detected by Western blot. **Results** The value of inhibition(VI) of objective plasmid groups reduced significantly compared with the other groups($P < 0.05$). RT-PCR results showed that Bax mRNA relative expression in objective plasmid groups increased compared with the other groups, and Cyclin D1 mRNA relative expression in objective plasmid groups reduced compared with the other groups($P < 0.05$). Western blot results showed that Bax protein relative expression in objective plasmid groups increased compared with the other groups, and Cyclin D1 protein relative expression in objective plasmid groups reduced compared with the other groups($P < 0.05$). **Conclusion** pEGFPN1-dnEGFR could improve radiotherapy sensitivity of gastric carcinoma cells.

Key words: pEGFPN1-dnEGFR; radiotherapy; stomach neoplasms; Cyclin D1; Bax

胃癌发病率在男性恶性肿瘤中仅次于肺癌占第 2 位,我国胃癌发病率在居恶性肿瘤的第 1 位^[1]。近年来虽然外科手术、放疗、化疗取得长足进步,然而进展期胃癌的 5 生存率却不到 20%^[2]。胃癌的免疫治疗及基因治疗等也伴随着分子生物学和基因工程技术的提高而逐渐成为新型的治疗方法^[3]。国外报道表皮生长因子(EGFR)与胃癌的病理临床分期、浸润层次、淋巴转移及预后密切相关^[3-5]。以往一直认为胃癌大多为腺癌,对放射线不敏感,故对胃癌很少用放疗。随着放疗设备的更新及放疗技术的改进,开展术前、术中、术后放疗能够提高疗效,放疗对胃癌有了新的应用前景。为此本文研究人 EGFR 显性负性突变体真核表达载体(pEGFPN1-dnEGFR)对胃癌细胞放疗敏感性的影响,寻求提高胃癌放疗敏感性的新方法,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 人胃癌细胞株 SGC-7901 和 NCI-N87 购自中国科学院,质粒 pEGFP-N1 购自美国 Clontech 公司,质粒 pEGFPN1-dnEGFR 前期试验已构建成功。胎牛血清(FBS)购自杭州四季青公司,MTT、DMSO 购自 Sigma 公司。RNAiso Plus、PrimeScript RT、Premix Taq 购自 TaKaRa 公司;Bax 抗体及 Cyclin D1 抗体购自碧云天公司。配胶试剂盒、蛋白定量试剂盒、ECL 发光试剂盒购自碧云天, PVDF 膜(Millipore, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞用含 10%FBS 的 RPMI 1640 培养基于 37℃, 5%CO₂ 恒温孵箱中培养,选用对数生长期细胞进行试验。将 SGC-7901、NCI-87 两种胃癌细胞分别分为 3 组:未处理组、pEGFP-N1 空载体质粒转染组(空质粒组)、pEGFPN1-

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30972872)。

dnEGFR 质粒转染组(目的质粒组)。

1.2.2 放疗方法 采用⁶⁰Co 放疗机(GWGP-80, 中国), 6 MV 的 X 射线, 在源皮距为 100 cm、射野 20 cm×20 cm 下对指数生长期的稳定细胞株室温下分别采用 2、4、6、8、10 Gy 剂量照射, 并设立未照射组。

1.2.3 MTT 法检测抑制率 将各组细胞(1×10⁵/mL)接种于 96 孔培养板内, 每孔 100 μL。每组设 3 个平行孔。在 CO₂ 孵箱中培养 72 h 后每孔加入 MTT 溶液 20 μL, 继续孵育 4 h, 弃上清液加入二甲基亚砷, 每孔 100 μL, 在微量震荡仪上轻微震荡至结晶物充分溶解。酶标仪检测 570 nm 处各孔吸光度(A 值), 抑制率=(1-实验组 A570/对照组 A570)×100%。

1.2.4 RT-PCR 检测 Bax, Cyclin D1 基因表达 引物序列设计如下。Bax 基因上游: 5'-GCA AAC TGG TGC TCA AGG C-3', 下游: 5'-AGA AAC ACC GCC CTC ACG-3', 产物大小 189 bp; Cyclin D1 基因上游: 5'-GGA TGC TGG AGG TCT GCG AGG AAC-3', 下游: 5'-GAG AGG AAG CGT GTG AGG CGG TAG-3', 产物大小 514 bp; β-action 基因上游: 5'-GCA AAC TGG TGC TC-3', 下游: 5'-GAT CCA CAT CTG GAA-3', 产物大小 500 bp。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min, 进入循环 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。取 5 μL 产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳。Quantity One 软件分析图片, 以各产物与 β-action 丰度的比值作为表达水平的参数。实验重复 3 次。

1.2.5 Western blot 检测 Bax, Cyclin D1 蛋白表达 收集细胞, 提取总蛋白, 加适量上样缓冲液, 煮沸变性, 配制浓缩胶和 4%~12% 的分离胶(内参 7-actin 为 5% 浓缩胶和 8% 分离胶), 电泳 60 V 30 min, 160 V 140 min(内参 60 V 30 min, 160 V 90 min)。电泳结束后, 22 V 100 min(内参 15 V, 15 min)恒压半干转膜, 封闭 2 h, 以鼠抗人 MMP-2 单抗、鼠抗人 caspase-3 抗体和鼠抗人 Cyclin D1 抗体作为一抗(1:100 稀释), 4 °C 反应过夜, PBST 洗膜 4 次, 每次 20 min。再加入兔抗鼠二抗(1:1000 稀释), 37 °C 孵育 90 min, 洗膜同前。采用 Pierce 化学发光试剂盒进行显色。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间均数比较采用 *t* 检验, 计数资料比较采用配对 χ^2 检验, 以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT 法检测 X 射线照射对各组细胞的抑制影响 相同剂量 X 射线照射下, 目的质粒组细胞对 X 射线敏感性均显著高于空质粒组和未处理组(*P*<0.05), 空质粒组和未处理组之间比较差异无统计学意义(*P*>0.05)。见表 2、3。

2.2 RT-PCR 检测 X 射线照射后各组细胞 Bax mRNA 和 Cyclin D1 mRNA 相对含量 经 X 射线照射后目的质粒组的 Bax mRNA 表达明显升高, 而 Cyclin D1 mRNA 表达则明显降低(*P*<0.05)。空质粒组和未处理组差异无统计学意义(*P*>0.05)(图 1、2)。照射后各组细胞的基因相对表达强度, 见表 4。

2.3 Western blot 检测 X 射线照射后各组细胞 Bax 蛋白和 Cyclin D1 蛋白表达水平 经 X 射线照射后目的质粒组的 Bax 蛋白表达明显升高, Cyclin D1 蛋白表达则明显降低。X 射线

照射后空质粒组和未处理组差异无统计学意义(*P*>0.05)(图 3、4)。X 射线照射后各组细胞的蛋白表达相对强度, 见表 5。

表 2 SGC-7901 细胞经 X 射线照射处理后的抑制率($\bar{x} \pm s, \%$)

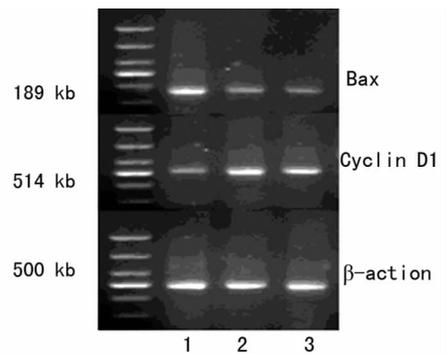
X 射线照射剂量(Gy)	未处理组	空质粒组	目的质粒组
2	9.54±4.23	11.31±4.54	20.51±3.78*
4	17.43±3.43	20.12±3.15	34.44±2.65*
6	25.33±1.41	27.31±2.83	46.31±1.89*
8	36.57±3.65	35.42±4.57	68.43±3.14*
10	47.21±2.68	46.13±2.18	89.81±3.75*

* : *P*<0.05, 与未处理组和空质粒组比较。

表 3 NCI-N87 细胞经 X 射线照射处理后的抑制率($\bar{x} \pm s, \%$)

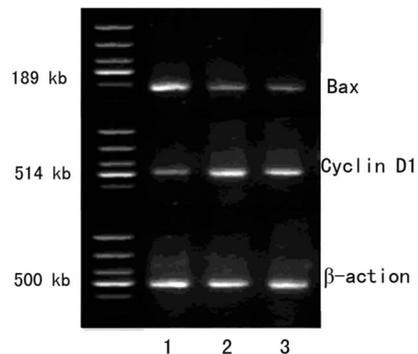
X 射线照射剂量(Gy)	未处理组	空质粒组	目的质粒组
2	13.54±2.25	10.31±2.45	21.32±3.38*
4	21.43±3.75	22.12±3.53	36.44±2.48*
6	28.33±4.68	30.31±2.87	48.31±4.38*
8	39.57±2.38	28.42±4.54	76.43±1.85*
10	50.21±4.67	47.13±3.17	86.81±4.16*

* : *P*<0.05, 与未处理组和空质粒组比较。



1: 目的质粒组; 2: 空质粒组; 3: 未处理组。

图 1 pEGFPN1-dnEGFR 对胃癌细胞株 SGC-7901 中 Bax 和 Cyclin D1 mRNA 表达的影响



1: 目的质粒组; 2: 空质粒组; 3: 未处理组。

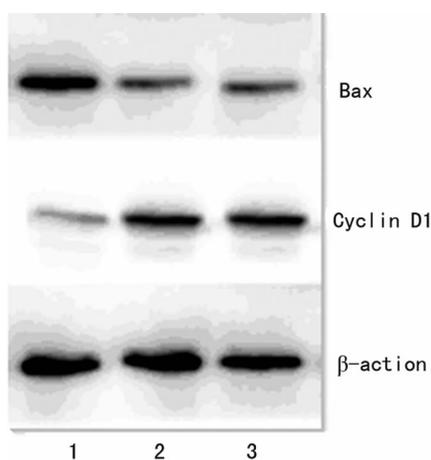
图 2 pEGFPN1-dnEGFR 对胃癌细胞株 NCI-N87 中 Bax 和 Cyclin D1 mRNA 表达的影响

表 4 两种胃癌细胞各组基因表达相对强度比较($\bar{x} \pm s$)

基因	SGC-7901			NCI-N87		
	未处理组	空质粒组	目的质粒组	未处理组	空质粒组	目的质粒组
Bax	0.41±0.05	0.34±0.09	1.21±0.15*	0.39±0.02	0.48±0.05	1.15±0.09*
Cyclin D1	1.08±0.11	1.11±0.11	0.24±0.04*	1.04±0.13	0.98±0.18	0.41±0.07*

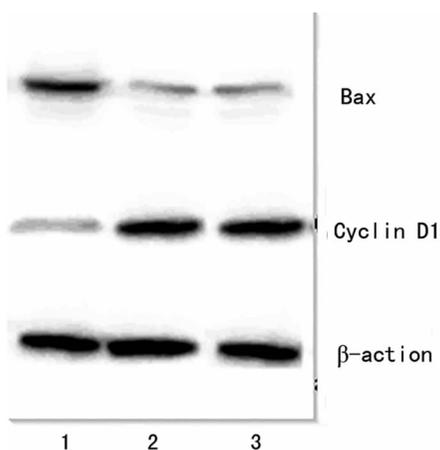
* : $P < 0.05$,与未处理组和空质粒组比较。表 5 两种胃癌细胞各组蛋白表达相对强度比较($\bar{x} \pm s$)

蛋白	SGC-7901			NCI-N87		
	未处理组	空质粒组	目的质粒组	未处理组	空质粒组	目的质粒组
Bax	0.32±0.13	0.26±0.06	0.95±0.09*	0.32±0.09	0.24±0.06	0.95±0.21*
Cyclin D1	0.56±0.21	0.61±0.09	0.24±0.07*	0.98±0.24	0.89±0.21	0.28±0.15*

* : $P < 0.05$,与未处理和空质粒组比较。

1: 目的质粒组; 2: 空质粒组; 3: 未处理组。

图 3 pEGFPN1-dnEGFR 对胃癌细胞株 SGC-7901 中 Bax 和 Cyclin D1 蛋白表达的影响



1: 目的质粒组; 2: 空质粒组; 3: 未处理组。

图 4 pEGFPN1-dnEGFR 对胃癌细胞株 NCI-N87 中 Bax 和 Cyclin D1 蛋白表达的影响

3 讨 论

EGFR 在胃癌组织中的表达率为 40%~65%, EGFR 信号转导通道参与细胞分裂、侵袭、血管形成等过程^[6]。Lieto 等^[7]和 Gennaro 等^[8]发现 EGFR 高表达促使胃癌细胞增殖、凋亡抑制,并与胃癌病理和临床分期相关。Cunningham 等^[9]研究

发现 EGFR 表达阴性的患者比阳性患者的肿瘤相关死亡相对危险明显降低。目前,EGFR 的生物阻滞剂作为胃癌的治疗药物正逐渐应用于临床^[10-11]。显性负性策略是指通过基因工程技术获得特定受体的显性负性突变体,从而产生负性调节效应^[12]。dnEGFR 能够诱导胃癌细胞凋亡,使胃癌细胞侵袭能力降低,对胃癌细胞恶性表型具有部分逆转作用^[13-14]。

本研究发现,dnEGFR 导入人胃癌细胞 SGC-7901 和 NCI-N87 后,Cyclin D1 的基因和蛋白表达水平降低。因此,本研究认为可能 dnEGFR 与 EGFR 竞争结合上皮生长因子(EGF),EGF 的缺乏使 GSK-3 β 激活使 Cyclin D1-CDK4/6 含量减少,Cyclin D1 表达水平降低。

Li 等^[15]研究显示,Bax 基因能够激活 Caspase 家族启动凋亡程序,裂解蛋白酶基板和释放 Cyt-c,最终导致染色质凝集、细胞核崩解。本研究发现,dnEGFR 目的质粒组 Bax mRNA/蛋白的表达水平高于未经任何处理的野生型细胞,本研究认为可能 dnEGFR 诱导人胃癌凋亡是通过上调 Bax 基因/蛋白的表达水平从而激活 Caspase 家族来实现的,这从另外一个角度进一步证实了凋亡相关基因在 dnEGFR 诱导肿瘤细胞凋亡中扮演角色。

本实验发现 dnEGFR 能够显著提高两种胃癌细胞对 X 射线放疗的敏感性。尽管 dnEGFR 增强放疗的具体机制并不明确,但是本研究在体外初步证实了 dnEGFR 转染两种胃癌细胞后,胃癌细胞对放疗的敏感性显著提高,抑制胃癌生长和诱导凋亡,这为今后针对 dnEGFR 的靶向治疗以及联合放疗的研究提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108.
- [2] Berardi R, Scartozzi M, Romagnoli E, et al. Gastric cancer treatment: a systematic review [J]. Oncol Rep, 2004, 11(4): 911-916.
- [3] Gamboa-Dominguez A, Dominguez-Fonseca C, Quintanilla-Martinez L, et al. Epidermal growth factor receptor expression correlated with poor survival in gastric adenocarcinoma from Mexican patients: a multivariate analysis using a standardized immunohistochemical detection system [J]. Mod Pathol, 2004, 17(5): 579-587. (下转第 3285 页)

(2)在 TST 作用后的 HNE-1 细胞中, G_0/G_1 期细胞百分率增加,导致 HNE-1 细胞阻滞在 G_0/G_1 期,并且呈剂量依赖性,这与 Koo 等^[2]报道 TST 阻滞乳腺癌细胞株于 G_0/G_1 期是相符的。(3)随 TST 浓度的增加,Foxm1 蛋白表达量的表达逐渐减少;TST 对 HNE-1 细胞的增殖抑制作用可能是通过抑制 Foxm1 蛋白表达实现的,这与 Bhat 等^[14]报道相符。

综上所述,TST 对人鼻咽癌 HNE-1 细胞株具有较好的体外增殖抑制作用,其机制可能是通过抑制肿瘤细胞中 Foxm1 转录因子的蛋白表达实现的。本实验可为 Foxm1 基因成为肿瘤治疗的新靶点及其特异性抑制剂 TST 的临床应用提供一定的实验室基础。

参考文献:

- [1] Adamii GR, Ye H. Future roles for Foxm1 inhibitors in cancer treatments[J]. *Future Oncol*,2007,3(1):1-3.
- [2] Koo CY, Muir KW, Lam EW. FOXM1: From cancer initiation to progression and treatment[J]. *Biochim Biophys Acta*,2012,1819(1):28-37.
- [3] Teh MT, Wong ST, Neill GW, et al. Foxm1 is a downstream target of Gli1 in basal cell carcinomas[J]. *Cancer Res*,2002,62(16):4773-4780.
- [4] 沈娜,张潜英,陈鸿雁,等. siRNA 抑制 HPV16E6 基因对鼻咽癌细胞生物学特性的影响[J]. *重庆医学*,2008,37(20):2263-2265.
- [5] 董玉芳,张莉萍. Foxm1 转录活性的调控及其与肿瘤的关系[J]. *国际肿瘤学杂志*,2009,36(10):736-738.
- [6] 林万隆,谷晓媛,倪克樑. 肿瘤分子靶向治疗研究现状[J]. *世界肿瘤杂志*,2008,7(3):187-203.
- [7] Myatt SS, Lam EW. The emerging roles of forkhead box

(Fox) proteins in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*,2007,7(11):847-859.

- [8] Carter SL, Eklund AC, Kohane IS, et al. A signature of chromosomal instability inferred From gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers[J]. *Nat Genet*,2006,38(9):1043-1048.
- [9] Yeshida Y, Wang IC, Yoder HM, et al. The Forkhead Box M1 transcription factor contributes to the development and growth of mouse colorectal cancer[J]. *Gastroenterology*,2007,132(4):1420-1431.
- [10] Liu P, Cheng H, Roberts TM, et al. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer[J]. *Nat Rev Drug Discov*,2009,8(8):627-644.
- [11] Penzo M, Massa PE, Olivetto E, et al. Sustained NF-kappaB activation produces a short-term cell proliferation block in conjunction with repressing effectors of cell cycle progression controlled by E2F or Foxm1[J]. *J Cell Physiol*,2009,218(1):215-227.
- [12] Francis RE, Myatt SS, Krol J, et al. Foxm1 is a downstream target and marker of HER2 overexpression in breast cancer[J]. *Int J Oncol*,2009,35(1):57-68.
- [13] Nicolaou KC, Zak M, Rahimipour S, et al. Discovery of a biologically active thiostrepton fragment[J]. *J Am Chem Soc*,2005,127(43):15042-15044.
- [14] Bhat UG, Halasi M, Gartel AL. Foxm1 is a general target for proteasome inhibitors[J]. *PLoS One*,2009,4(8):e6593.

(收稿日期:2012-04-11 修回日期:2012-07-17)

(上接第 3282 页)

- [4] Ito R, Nakayama H, Yoshida K, et al. Expression of Cbl linking with the epidermal growth factor receptor system is associated with tumor progression and poor prognosis of human gastric carcinoma[J]. *Virchows Arch*,2004,444(4):324-331.
- [5] Sako Y, Minoghchi S, Yanagida T. Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells[J]. *Nat Cell Biol*,2000,2(1):168-172.
- [6] 王国栋,李侠,王连聪,等. 胃癌组织 EGFR 和 VEGF 的表达及其意义[J]. *实用肿瘤杂志*,2009,24(1):34-39.
- [7] Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) and epidermal growth factor receptor(EGFR) is an independent prognostic indicator of worse outcome in gastric cancer patients[J]. *Ann Surg Oncol*,2008,15(1):69-79.
- [8] Gennaro G, Lieto E, Michele O, et al. Epidermal growth factor(EGFR) expression is associated with a worse prognosis in gastric cancer patients undergoing curative surgery[J]. *World J Surg*,2007,31(7):1458-1468.
- [9] Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer[J]. *N Engl J Med*,2004,351(4):337-345.

- [10] Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer[J]. *N Engl J Med*,2005,353(2):123-132.
- [11] Ott D, Taraborrelli C, Aguzzi A. Novel dominant negative prion protein mutants identified from a randomized library[J]. *Protein Eng Des Sel*,2008,21(10):623-629.
- [12] Gang L, Ziwei W, Lin Z, et al. Inhibitory effects of cytoplasmic-domain substituted epidermal growth factor on growth, invasion and angiogenesis of human gastric cancer cells[J]. *Mol Med Report*,2010,3(2):287-294.
- [13] Chan JK, Pham H, You XJ, et al. Suppression of ovarian cancer cell tumorigenicity and evasion of cisplatin resistance using a truncated epidermal growth factor receptor in a rat model[J]. *Cancer Res*,2005,65(8):3243-3248.
- [14] Lukas J, Bartkova J, Rohde M, et al. Cyclin D1 is dispensable for G1 control in retinoblastoma gene-deficient cells independently of cdk4 activity[J]. *Mol Cell Biol*,1995,15(5):2600-2611.
- [15] Li X, Marani M, Yu J, et al. Adenovirus-mediated Bax overexpression for the induction of therapeutic apoptosis in prostate cancer[J]. *Cancer Res*,2001,61(1):186-191.

(收稿日期:2012-03-13 修回日期:2012-07-07)