

· 论 著 ·

抑癌基因 maspin 在胃癌细胞株 SGC-7901 中的表达及意义*

譙 敏¹, 牛司强², 王丕龙¹

(重庆医科大学附属第一医院:1. 消化内科;2. 检验科 400016)

摘要:目的 探讨抑癌基因 maspin 在胃癌细胞株 SGC-7901 生长和凋亡过程中的生物学作用。方法 构建重组质粒 pCDNA3.1-maspin, 转染胃癌细胞株 SGC-7901, 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫细胞化学检测 maspin 基因表达, MTT 法检测细胞增殖, 原位末端标记法(TUNEL)检测细胞凋亡。结果 重组质粒 pCDNA3.1-maspin 导入 SGC-7901 细胞株后, maspin 的 mRNA 和蛋白表达明显增强($P < 0.05$), 胃癌细胞株 SGC-7901 增殖受到抑制, 并出现明显的细胞凋亡。结论 maspin 基因可以抑制胃癌 SGC-7901 细胞增殖, 并诱导细胞凋亡。

关键词:胃肿瘤; 细胞增殖; 细胞凋亡; maspin

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.06.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)06-0604-03

Expression and significance of maspin gene in gastric cancer cells SGC-7901*

Qiao Min¹, Niu Siqiang², Wang Pilong¹

(1. Department of Digestive Disease; 2. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the biological effect of maspin gene on growth and apoptosis of gastric carcinoma cell SGC-7901 in vitro. **Methods** pCDNA3.1-maspin vector was constructed and transfected into SGC-7901 cells. Maspin gene expression was detected with RT-PCR and cell immunochemistry. Cells growth rate was detected with MTT, and cell apoptosis was tested by TUNEL. **Results** After transfected with pCDNA3.1-maspin, both RNA and protein levels of maspin increased obviously ($P < 0.05$). The proliferation of gastric cancer cells SGC-7901 was suppressed obviously, and cell apoptosis is obvious. **Conclusion** Maspin gene can suppress the proliferation of gastric carcinoma cells and induce cell apoptosis.

Key words: stomach neoplasms; cell proliferation; apoptosis; maspin

抑癌基因 maspin 是丝氨酸蛋白酶抑制剂 (serpin) 家族的成员之一, 其在健康成人的大多数组织中均有表达, 而在恶变的组织中表达明显下降, 甚至不表达。目前的研究认为其可抑制不同类型的肿瘤细胞增殖、转移, 促进肿瘤细胞凋亡, 抑制肿瘤血管生长等。为了研究 maspin 基因对胃癌细胞的抑制作用, 本研究构建 maspin 基因的表达质粒 pCDNA3.1-maspin, 并将其稳定转染胃癌细胞株 SGC-7901, 从 mRNA 及蛋白水平检测 maspin 的表达变化, 并检测胃癌细胞的增殖和凋亡。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒 pCDNA3.1 质粒由重庆医科大学感染性疾病分子生物学重点实验室黄爱龙教授惠赠。

1.1.2 细胞株和组织 胃癌细胞株 SGC-7901 由重庆医科大学病理教研室提供。原发性肝癌癌旁组织由重庆医科大学附属第一医院普外科孔令泉副教授提供。

1.1.3 主要试剂 限制性内切酶 Xho I 及 EcoR I 购于 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒和连接试剂盒购于 Omega 公司; 总 RNA 提取试剂、逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 试剂盒和原位末端标记法 (TUNEL) 反应试剂盒购于 Promega 公司; 转染试剂 lipofectamine 2000 购于 Invitrogen 公

司; maspin 单克隆抗体购于 Santa Cruz 公司; maspin 引物和内参磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 引物由大连宝生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 胃癌 SGC-7901 细胞株接种在含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液, 37 °C, 5% CO₂ 孵箱中培养, 长满后传代。

1.2.2 重组质粒 pCDNA3.1-maspin 的构建 maspin 的上、下游引物分别为 5'-TAC GAA TTC ATG GAT GCC CTG CAA CTA GCA AAT-3' 和 5'-TCG CTC GAG TTA AGG AGA ACA GAA TTT GCC AAA G-3'。采用手术切除的原发性肝癌癌旁组织, 按照 Trizol 试剂的方法提取总 RNA, 总 RNA 用 M-MLV 逆转录酶和 maspin 下游引物合成第一链 cDNA, 反应条件如下: 30 °C 10 min, 94 °C 5 min, 5 °C 5 min。用 Ex Taq DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, 反应体系内含 cDNA 4 μL, 10×缓冲液 5 μL, 上、下游引物各 1 μL, MgCl₂ 24 μL, 脱氧核苷酸 (dNTPs) 4 μL, Taq 酶 0.25 μL, 加灭菌蒸馏水至 50 μL。按下述条件进行循环: 94 °C 40 s, 57 °C 30 s, 72 °C 70 s, 共 30 个循环, 以纯水作阴性对照。扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 30 min, EB 染色, Bio-Rad 图像仪观察并扫描制片, 胶回收目的基因。重组质粒酶切鉴定, 再测序分析。

1.2.3 pCDNA3.1-maspin 转染 SGC-7901 细胞 按 lipofectamineTM 2000 说明书进行转染。将贴壁生长的 SGC-7901 细胞用胰酶消化、离心、然后去上清,沉淀用 RPMI-1640 培养液重悬,调整浓度为 4×10^5 /mL,2 mL/孔细胞接种于 6 孔培养板中,37 °C 培养。待细胞生长到占培养瓶底约 80% 左右时,培养液换为不含抗菌药物但仍含血清的 RPMI-1640,培养过夜。次日分别用空质粒 pCDNA3.1、重组质粒 pCDNA3.1-maspin 和脂质的复合物转染 SGC-7901 细胞,在无血清及抗菌药物的培养液中培养 4~6 h 后换新鲜的含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液,继续培养 2~4 d,然后检测各项指标。

1.2.4 RT-PCR 检测 maspin 基因的 mRNA 按照 Qiagen 公司的 RT-PCR 一步法试剂盒进行操作。反应条件为:94 °C 40 s,57 °C 30 s,72 °C 70 s,共 30 个循环。以 GAPDH 作为内参,以 pCDNA3.1 转染组作为阴性对照。合成的 GAPDH 上游引物为:5'-CCA TGG AGA AGG CTG GGG-3',下游引物为:5'-GGT CCA CCA CTG ACA CTG G-3',产物长度 421 bp; maspin 产物长度为 821 bp。扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳 30 min,EB 染色,BIO-RAD 图像分析仪观察并扫描,记录结果。

1.2.5 免疫化学检测 maspin 蛋白表达 SGC-7901 细胞爬片,72 h 后收获细胞,95% 乙醇固定后,按 maspin 抗体说明书操作。DAB 显色,二甲苯透明,封片,照相。Image Proc Plus 3.0 软件进行分析。

1.2.6 MTT 法检测细胞增殖 将 SGC-7901 细胞以 5×10^4 /mL 接种于 96 孔板,每孔 200 μ L,于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 24 h 后加上处理因素,每组设立 4 个重复孔,并设空白对照组。继续培养 1~4 d,然后在每孔中加入 MTT 20 μ L,37 °C 继续孵育 4 h 后弃培养液上清,随后每孔加入二甲基亚砜 100 μ L,振荡使蓝色沉淀溶解。用酶标仪测 490 nm 波长处的吸光度(A),计算细胞增殖抑制率(IR)及中效浓度,并在倒置显微镜下观察细胞形态。抑制率 = (1 - 试验孔 A / 对照组 A) \times 100%。

1.2.7 TUNEL 检测细胞凋亡 取对数生长期的 SGC-7901 细胞 4×10^5 /mL 接种于 6 孔板,10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养过夜,质粒 pCDNA3.1 和 pCDNA3.1-maspin 分别转染细胞后 72 h,弃上清,95% 乙醇固定,3% H₂O₂ 封闭,每孔加 50 μ L 反应混合液,37 °C 孵育 60 min,然后每孔加 50 mL 山羊标记的辣根过氧化物酶,DAB 显色。

1.3 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 χ^2 检验和 *t* 检验进行统计学分析。

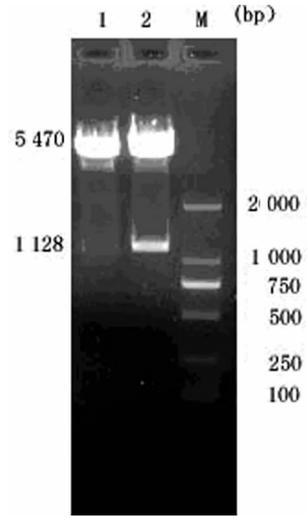
2 结果

2.1 质粒鉴定 重组质粒 pCDNA3.1-maspin 经 Xho I 及 EcoR I 双酶切,同时做 pCDNA3.1 质粒双酶切对照。1% 琼脂糖电泳,pCDNA3.1-maspin 经双酶切后呈两条带,分别为 5.5 kb 的载体片段和 1 128 bp 的小片段;而 pCDNA3.1 经双酶切后则为 5.5 kb 的载体片段和 30 bp 的目的片段。测序结果均正确。见图 1。

2.2 RT-PCR 检测结果 以琼脂糖电泳条带的亮度来判断 maspin mRNA 水平高低。实验结果显示,与转染 pCDNA3.1 组细胞相比较,转染 pCDNA3.1-maspin 组细胞中 maspin 的

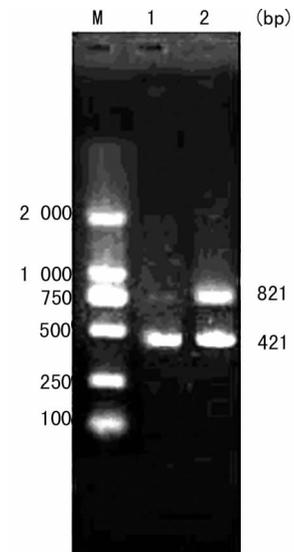
mRNA 水平上调 80.5% ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 免疫细胞化学检测结果 转染 pCDNA3.1 组 SGC-7901 细胞,细胞质着色少而浅。而转染 pCDNA3.1-maspin 组 SGC-7901 细胞可见细胞质黄染,内有较多棕黄色颗粒,说明 maspin 成功转染进入 SGC-7901 细胞中并获得较强表达。见图 3。



1: pCDNA3.1/Xho I + EcoR I; 2: pCDNA3.1-maspin/Xho I + EcoR I; M: 标记。

图 1 重组质粒的酶切鉴定



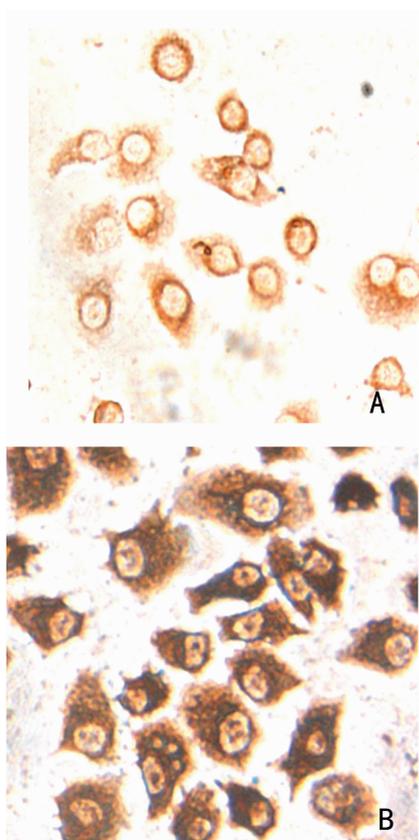
M: 标记; 1: pCDNA3.1 转染组; 2: pCDNA3.1-maspin 转染组。

图 2 RT-PCR 检测 maspin 的 mRNA 水平

2.4 MTT 实验检测细胞增殖 纯水转染 SGC-7901 细胞后 72 h 细胞生长抑制率为 0.17 ± 0.03 ,空质粒 pCDNA3.1 转染 SGC-7901 细胞后 72 h 细胞生长抑制率为 0.22 ± 0.02 ,两者差异无统计学意义 ($P > 0.05$);重组质粒 pCDNA3.1-maspin 转染 SGC-7901 细胞后 72 h 细胞生长抑制率为 0.79 ± 0.06 ,与前两组的差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。

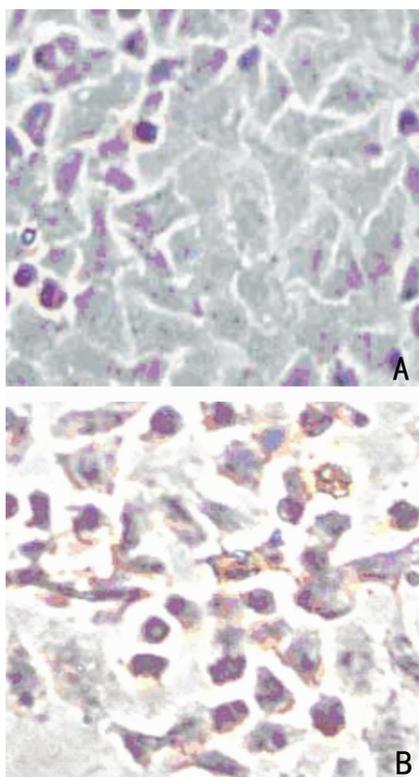
2.5 TUNEL 检测 SGC-7901 细胞的凋亡 MTT 实验检测细胞增殖转染 pCDNA3.1 组 SGC-7901 细胞贴壁良好,形态较完整,部分细胞胞核内有着色现象,胞质着色浅。而转染 pCDNA3.1-maspin 质粒组则出现大量的凋亡细胞,细胞核内呈棕红色染色,核浓缩,胞浆有片状着色,可见部分细胞脱落,说明

pCDNA3.1-maspin 能引起明显的细胞凋亡。见图 4。



A: pCDNA3.1 转染组; B: pCDNA3.1-maspin 转染组。

图 3 免疫细胞化学检测 maspin 蛋白表达 ($\times 40$)



A: pCDNA3.1 转染组; B: pCDNA3.1-maspin 转染组。

图 4 TUNEL 检测细胞凋亡 ($\times 40$)

3 讨 论

胃癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一,其发病率高,恶

性程度高。临床上手术切除及辅助性放疗、化疗的应用并没有带来满意的生存率^[1]。基因治疗是近年来兴起的一种肿瘤治疗的新方法,其中通过基因工程手段促使抑癌基因在癌细胞中的再表达,进而抑制肿瘤细胞生长,是目前公认有效的一种基因治疗方法^[2-3]。

maspin 基因是在人的正常乳腺上皮细胞上发现的 serpins。1994 年,有研究者首先报道 maspin 再表达可明显抑制乳腺癌细胞株 MDA-MB-435 在体内、外的生长、浸润和转移^[4-5]。Abraham 等^[6]的研究证明,maspin 的再表达在逆病毒转染的鼠前列腺肿瘤细胞中能特异性地促进细胞对纤维结合素的结合。目前的研究发现 maspin 基因在大多数健康人组织中均有表达;一旦正常组织恶变,maspin 基因表达则减弱或不表达^[6-10]。生物学研究表明 maspin 的再表达会抑制肿瘤生长,可能与增强细胞对凋亡刺激因子的敏感性有关;maspin 基因的再表达可抑制肿瘤浸润、血管生成和肿瘤转移,其发生可能与 maspin 介导的抑制细胞周围蛋白酶解有关^[11-13]。

在本研究中,作者首先成功构建了 maspin 基因的重组表达质粒 pCDNA3.1-maspin,将其转染胃癌细胞株 SGC-7901,并在 mRNA 和蛋白水平检测到 maspin 基因表达明显增强,说明 maspin 基因在 SGC-7901 细胞中获得了再表达;同时 MTT 实验及 TUNEL 反应发现 SGC-7901 细胞增殖受到抑制,并出现明显的细胞凋亡。通过这些实验结果,作者证实了 maspin 基因可能通过抑制胃癌细胞株 SGC-7901 的增殖、诱导细胞凋亡达到抑癌作用^[14-15],为进一步研究 maspin 基因的抑癌机制以及利用 maspin 基因进行基因治疗提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] Chan AD, Wong BC, Lam SK. Gastric cancer: past, present and future[J]. Can Gastroenterol J, 2001, 15(7): 469-474.
- [2] Shi HY, Zhang W, Liang R, et al. Modeling human breast cancer metastasis in mice, maspin as a paradigm[J]. Histol Histopathol, 2003, 18(1): 201-206.
- [3] Casado E, Comez-Navarro J, Yamamoto M, et al. Strategies to accomplish targeted expression of transgenes in ovarian cancer for molecular therapeutic applications[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(8): 2496-2504.
- [4] Zou Z, Anisowicz A, Hendix MJC, et al. Maspin, a serine with tumor suppressing activity in human mammary epithelial cells[J]. Science, 1994, 263(10): 526-529.
- [5] Zou Z, Cao C, Nagaich AK, et al. p53 regulates the expression on of the tumor suppressor gene Maspin[J]. J Biol Chem, 2000, 275(9): 6051-6054.
- [6] Abraham S, Zhang W, Greenberg N, et al. Maspin functions as tumor suppressor by increasing cell adhesion to extracellular matrix in prostate tumor cells[J]. J Urol, 2003, 169(3): 1157-1161.
- [7] Shao LJ, Shi HY, Ayala G, et al. Sufficiency of the maspin tumor suppressor gene leads to hyperplastic lesions in prostate [J]. Cancer Res, 2008, 68(13): 5143-5150. (下转第 615 页)

Hcy 血症关系不大。进一步深入探讨 SAH 致 AS 的机制,从而采取积极有效的措施,将对早期发现 CKD 患者心血管并发症,降低其发生风险有极大的意义。

参考文献:

- [1] Slee AD. Exploring metabolic dysfunction in chronic kidney disease[J]. *Nutr Metab*, 2012, 9(1): 36-40.
- [2] Nagashima M, Hagiwara N, Koyanagi R, et al. Chronic kidney disease and long-term outcomes of myocardial infarction[J]. *Int J Cardiol*, 2012, 55(1): 352-355.
- [3] Williams ES, Shah SH, Piccini JP, et al. Predictors of mortality in patients with chronic kidney disease and an implantable defibrillator: an EPGEN substudy[J]. *Eurpace*, 2011, 13(12): 1717-1722.
- [4] Liu C, Wang Q, Guo HP, et al. Plasma S-adenosylhomocysteine is a better biomarker of atherosclerosis than homocysteine in apolipoprotein E-deficient mice fed high dietary methionine[J]. *J Nutr*, 2008, 138(2): 311-315.
- [5] Wagner C, Koury MJ. S-Adenosylhomocysteine—a better indicator of vascular disease than homocysteine[J]. *Am J Clin Nutr*, 2007, 86(6): 1581-1585.
- [6] Becker A, Smulders YM, Teerlink T, et al. S-adenosylhomocysteine and the ratio of S-adenosylmethionine to S-adenosylhomocysteine are not related to folate, cobalamin and vitamin B6 concentrations [J]. *Eur J Clin Invest*, 2003, 33(1): 17-25.
- [7] Troen AM, Lutgens E, Smith DE, et al. The atherogenic effect of excess methionine intake[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(25): 15089-15094.
- [8] Kerins DM, Koury MJ, Capdevila A, et al. Plasma S-ade-

nosylhomocysteine is a more sensitive indicator of cardiovascular disease than plasma homocysteine[J]. *Am J Clin Nutr*, 2001, 74(6): 723-729.

- [9] Chen NC, Yang F, Capecchi LM, et al. Regulation of homocysteine metabolism and methylation in human and mouse tissues[J]. *FASEB J*, 2010, 24(8): 2804-2817.
- [10] Loehrer FM, Angst CP, Brunner FP, et al. Evidence for disturbed S-adenosylmethionine: S-adenosylhomocysteine ratio in patients with end-stage renal failure; a cause for disturbed methylation reactions[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 1998, 13(3): 656-661.
- [11] Jabs K, Koury MJ, Dupont WD, et al. Relationship between plasma S-adenosylhomocysteine concentration and glomerular filtration rate in children [J]. *Metabolism*, 2006, 55(2): 252-257.
- [12] Garibotto G, Valli A, Anderstam B, et al. The kidney is the major site of S-adenosylhomocysteine disposal in humans[J]. *Kidney Int*, 2009, 76(3): 293-296.
- [13] Sipkens JA, Hahn NE, Blom HJ, et al. S-Adenosylhomocysteine induces apoptosis and phosphatidylserine exposure in endothelial cells independent of homocysteine[J]. *Atherosclerosis*, 2012, 221(1): 48-54.
- [14] 欧三桃, 柳飞, 刘琦, 等. S-腺苷同型半胱氨酸对大鼠主动脉内皮细胞增殖及凋亡的影响[J]. *基础医学与临床*, 2010, 30(10): 1037-1040.
- [15] Hirsch S, Ronco AM, Pinardi G, et al. Lack of effect of diet-induced hypomethylation on endothelium-dependent relaxation in rats[J]. *Clin Nutr*, 2008, 27(6): 895-899.

(收稿日期: 2012-10-16 修回日期: 2012-12-03)

(上接第 606 页)

- [8] Lonardo F, Li X, Kaplun A, et al. The natural tumor suppressor protein maspin and potential application in non small cell lung cancer[J]. *Curr Pharm Des*, 2010, 16(16): 1877-1880.
- [9] Mohsin SK, Zhang M, Clark GM, et al. Maspin expression in invasive breast cancer: association with other prognostic factors[J]. *J Pathol*, 2003, 199(4): 432-435.
- [10] Marioni G, Giacomelli L, Alessandro E, et al. Nuclear localization of mammary serine protease inhibitor (MASPIN): is its impact on the prognosis in laryngeal carcinoma due to a pro-apoptotic effect[J]. *Am J Otolaryngol*, 2008, 29(3): 156-162.
- [11] Cho JH, Kim HS, Park CS, et al. Maspin expression in early oral tongue cancer and its relation to expression of mutant-type p53 and vascular endothelial growth factor

[J]. *Oral Oncol*, 2007, 43(3): 272-277.

- [12] Liu J, Yin S, Reddy N, et al. Bax mediates the apoptosis-sensitizing effect of maspin[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(5): 1703-1711.
- [13] Terashima M, Maesawa C, Oyama K, et al. Gene expression profiles in human gastric cancer: expression of maspin correlates with lymph node metastasis[J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(6): 1130-1136.
- [14] Zhang W, Shi HY, Zhang M. Maspin overexpression modulates tumor cell apoptosis through the regulation of Bcl-2 family proteins[J]. *BMC Cancer*, 2005, 5(1): 50-55.
- [15] Li Z, Shi HY, Zhang M. Targeted expression of maspin in tumor vasculatures induces endothelial cell apoptosis[J]. *Oncogene*, 2005, 24(20): 2008-2019.

(收稿日期: 2012-09-07 修回日期: 2012-10-19)