

· 论 著 ·

maspin 诱导不同分化的胃癌细胞凋亡及可能的作用机制*

焦 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 maspin 诱导胃癌细胞株 SGC-7901 和 MKN-45 凋亡的作用及可能的作用机制。方法 重组质粒 pCDNA3.1-maspin 分别转染胃癌细胞株 SGC-7901 和 MKN-45, 采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)和蛋白免疫印迹(Western blotting)检测 maspin 基因表达, 末端标记细胞凋亡法(TUNEL)检测细胞凋亡, Western blotting 检测凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 的改变。结果 重组质粒 pCDNA3.1-maspin 导入 SGC-7901 和 MKN-45 细胞株后, maspin 的 mRNA 和蛋白表达均明显增强($P < 0.05$), 两种细胞均出现明显的细胞凋亡, 且两种细胞中的 Bax 蛋白均上调, 而 Bcl-2 蛋白均下调。结论 maspin 基因可能通过上调 Bax 蛋白和下调 Bcl-2 蛋白诱导胃癌细胞凋亡。

关键词: maspin; 胃肿瘤; 细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.20.002

文献标识码: A

文章编号:1671-8348(2013)20-2315-03

Apoptosis and related mechanism induced by maspin in gastric cancer cells*

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 apoptosis and related mechanism induced by maspin in gastric carcinoma cell SGC-7901 and MKN-45. Methods pCDNA3.1-maspin vector was constructed and transfected into SGC-7901 and MKN-45 cells. Maspin gene were detected with RT-PCR and Western blotting, cell apoptosis was tested by TUNEL, Bax and Bcl-2 are detected with Western blotting. Results After transfected with pCDNA3.1-maspin, both RNA and protein of maspin are increased obviously whether in SGC-7901 or in MKN-45 ($P < 0.05$), cell apoptosis is obvious. Bax is up-regulated, and Bcl-2 is down-regulated. Conclusion cells apoptosis induced by maspin may be related to up-regulate Bax and down-regulate Bcl-2.

Key words: maspin; stomach neoplasms; apoptosis

maspin 在健康成人的大多数组织中均有表达,而在多种癌变组织中表达明显下降、甚至不表达,因此目前的研究认为其是一种抑癌基因,具有抑制肿瘤细胞浸润、转移,促进肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤血管生长等功能。为了研究 maspin 基因能否抑制胃癌细胞生长,作者在前期工作中构建了重组质粒 pCDNA3.1-maspin,并将其转染胃癌 SGC-7901 细胞,结果发现 maspin 可显著抑制 SGC-7901 细胞生长、并诱导细胞凋亡^[1]。maspin 对胃癌细胞的抑制作用是否与胃癌细胞的分化程度有关目前尚不清楚,本研究拟用重组质粒 pCDNA3.1-maspin 分别转染中分化胃癌细胞株 SGC-7901 和低分化胃癌细胞株 MKN-45 中,从 mRNA 及蛋白质水平检测 maspin 基因表达的变化,并检测凋亡相关基因 Bax 和 Bcl-2 表达的变化。

1 材料与方

1.1 质粒及细胞株 质粒 pCDNA3.1 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。重组质粒 pCDNA3.1-maspin 由本课题组构建并保存^[1]。胃癌细胞株 SGC-7901 及 MKN-45 由重庆医科大学病理教研室提供。

1.2 主要试剂 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒和连接试剂盒购自 Omega 公司;总 RNA 提取试剂盒、逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)试剂盒和末端标记细胞凋亡法(TUNEL)反应试剂盒购自 Promega 公司;质脂体 2000(lipofectamine 2000)购

自 Invitrogen 公司;maspin 单克隆、Bax 和 Bcl-2 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;maspin 引物和内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物由大连宝生物公司合成。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 胃癌细胞株 SGC-7901 及 MKN-45 接种在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,37℃,5% CO₂ 孵箱中培养,长满后传代。

1.3.2 重组质粒 pCDNA3.1-maspin 转染 SGC-7901 和 MKN-45 细胞 将对数生长期的 SGC-7901 和 MKN-45 细胞分别用胰酶消化、离心、去上清液,沉淀用 RPMI-1640 培养液重悬,调整浓度为 4×10^5 /mL,2 毫升/孔接种于 6 孔培养板中,置 37℃ 培养。细胞生长到占培养瓶底约 80% 时,更换培养液为无抗菌药物含血清的 RPMI-1640,培养过夜,随后分别用质粒 pCDNA3.1 或 pCDNA3.1-maspin 和脂质体的复合物转染至细胞中,继续培养 4~6 h 后换新鲜 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,继续培养 2~4 d 后检测各项指标。

1.3.3 RT-PCR 检测 maspin 的 mRNA 水平 以 GAPDH 作为内参,以质粒 pCDNA3.1 转染作为阴性对照。反应条件为:94℃ 40 s,57℃ 30 s,72℃ 70 s,共 30 个循环。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。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳 30 min, EB 染色, BIO-RAD 图像分析仪上观察并扫描制片, 记录结果。

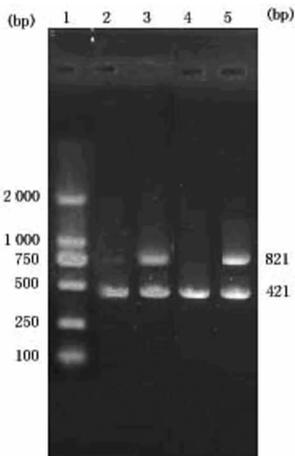
1.3.4 蛋白免疫印迹(Western blotting)检测 maspin、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达 以 β -actin 蛋白作为内参。分别收集质粒 pCDNA3.1 和 pCDNA3.1-maspin 转染 48 h 的 SGC-7901 和 MKN-45 细胞, 沉淀用硝酸盐缓冲液(PBS)洗 2 遍, 细菌裂解液处理, 上样 10 μ L, 90 V 电泳约 60 min, 120 V 电泳约 2 h。凝胶 4 $^{\circ}$ C、25 V 电转过夜。取出硝酸纤维素膜(NC 膜), 加 1:500 稀释的 maspin、Bax 和 Bcl-2 一抗溶液, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 加 1:1000 的辣根过氧化物酶标记稀释二抗溶液, 37 $^{\circ}$ C、轻轻振荡 2 h 后弃反应液, DAB 染色, BIO-RAD 图像分析仪上观察并扫描制片, 记录结果。采用软件 Image Proc Plus3.0 (IPP3.0) 进行分析。

1.3.5 TUNEL 反应检测细胞凋亡 取对数生长期的 SGC-7901 和 MKN-45 细胞 4×10^5 接种于 6 孔板, 含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养过夜, 质粒 pCDNA3.1 和 pCDNA3.1-maspin 分别转染细胞。72 h 后弃上清, 95% 乙醇固定, 3% H_2O_2 封闭, 0.1% Triton-100, 每孔加 50 μ L 反应混合液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min, 每孔加 50 mL 山羊标记的辣根过氧化物酶(Peroxidase, POD), 最后用 DAB 显色。

1.4 统计学处理 采用 SPSS3.0, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 χ^2 检验和 t 检验进行统计学分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测结果 转染 pCDNA3.1-maspin 的 SGC-7901 细胞比转染 pCDNA3.1 的 SGC-7901 细胞其 maspin mRNA 上调 80.5% ($P < 0.05$); 转染 pCDNA3.1-maspin 的 MKN-45 细胞比转染 pCDNA3.1 的 MKN-45 细胞其 maspin mRNA 水平上调 91.3% ($P < 0.05$), 见图 1。

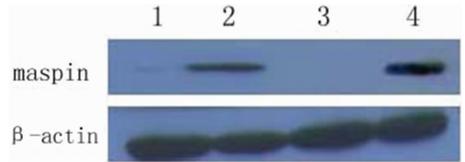


1: 分子标记; 2: pCDNA3.1 转染 SGC-7901 细胞; 3: pCDNA3.1-maspin 转染 SGC-7901 细胞; 4: pCDNA3.1 转染 MKN-45 细胞; 5: pCDNA3.1-maspin 转染 MKN-45 细胞。

图 1 RT-PCR 检测 maspin 在各组细胞中的 mRNA 水平

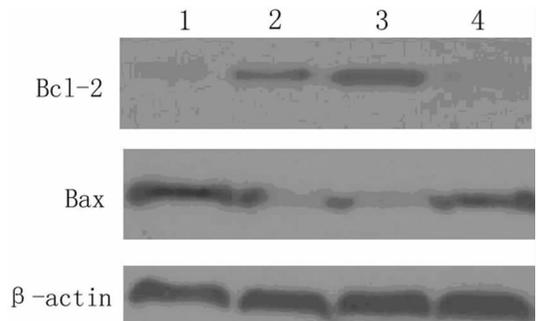
2.2 Western blotting 检测结果 与转染 pCDNA3.1 质粒相比较, 转染 pCDNA3.1-maspin 质粒的 SGC-7901 细胞 maspin 蛋白表达上调 91.6%, Bax 蛋白上调 80.4%, Bcl-2 蛋白下调 55.2%; 与转染 pCDNA3.1 质粒相比较, 转染 pCDNA3.1-maspin 质粒的 MKN-45 细胞 maspin 蛋白表达上调 72.4%,

Bax 蛋白上调 70.2%, Bcl-2 蛋白下调 62.2% ($P < 0.05$), 见图 2、3。



1: pCDNA3.1-maspin 转染 MKN-45 细胞; 2: pCDNA3.1 转染 MKN-45 细胞; 3: pCDNA3.1-maspin 转染 SGC-7901 细胞; 4: pCDNA3.1 转染 SGC-7901 细胞。

图 2 Western blotting 检测各组细胞 maspin 蛋白表达



1: pCDNA3.1-maspin 转染 MKN-45 细胞; 2: pCDNA3.1 转染 MKN-45 细胞; 3: pCDNA3.1 转染 SGC-7901 细胞; 4: pCDNA3.1-maspin 转染 SGC-7901 细胞。

图 3 Western blotting 检测各组细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达

2.3 TUNEL 反应检测结果 转染 pCDNA3.1 质粒 SGC-7901 和 MKN-45 细胞大部分贴壁良好, 形态基本完整, 少量胞核内有着色现象, 胞质着色浅。而转染 pCDNA3.1-maspin 质粒的两种细胞中均出现明显的凋亡细胞, 部分细胞核内呈棕红色染色, 核浓缩, 说明 pCDNA3.1-maspin 能促进 GC-7901 和 MKN-45 细胞凋亡。

3 讨论

胃癌是常见的消化系统恶性肿瘤之一, 传统的手术治疗、化疗及放疗等方法并未能有效延长患者生存期。基因治疗是上述治疗方式的一种有效补充, 其中通过基因工程方式使抑癌基因在癌细胞中再表达可特异性地抑制癌细胞生长, 进而达到抗癌目的。maspin 是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂, 最初是在健康人乳腺上皮细胞内发现的。1994 年, Zou 等^[2-3] 首先报道 maspin 稳定转染乳腺癌细胞株 MDA-MB-435 后, 可明显抑制体内、外肿瘤细胞的生长、浸润和转移。Abraham 等^[4] 在发现 maspin 的再表达能促进前列腺癌细胞对纤维结合素的结合, 进而抑制癌细胞生长。此外, 研究发现 maspin 基因在正常的乳腺、前列腺、胎盘、肝、肺、睾丸、胃、大肠, 小肠、舌、胸腺和表皮角化细胞中均有表达^[5-10]; 然而在恶变组织中, maspin 基因表达减弱, 甚至不表达。研究表明 maspin 的再表达会有效抑制多种肿瘤生长^[11-13]。Bcl-2 基因家族是细胞凋亡过程中的主要调控基因之一, 其中 Bcl-2 是目前已发现的最重要的抑制肿瘤细胞凋亡的基因, 其同源基因 Bax 则可拮抗 Bcl-2 的保护效应而使细胞趋于凋亡^[14-16]。因此, 研究胃癌细胞中 maspin 基因再表达对 Bax 和 Bcl-2 的影响有助于明确 maspin 基因的抑癌机制。

在前期研究中, 作者已经成功构建了 maspin 基因的重组

表达质粒 pCDNA3.1-maspin, 本研究中将 pCDNA3.1-maspin 分别转染不同分化的胃癌细胞株, 即中分化胃癌细胞株 SGC-7901 和低分化胃癌细胞株 MKN-45, 在两种细胞株中均检测到 maspin 的 mRNA 和蛋白水平表达增加; TUNEL 反应发现两种细胞均出现明显的凋亡, 凋亡相关基因 Bax 表达明显增强, 而 Bcl-2 表达则显著减弱。以上结果证实了 maspin 基因可以诱导不同分化的胃癌细胞发生凋亡, 这种凋亡作用可能与上调 Bax 表达, 下调 Bcl-2 表达相关; 且 maspin 诱导胃癌细胞凋亡的作用与胃癌细胞的分化程度未见明显相关性, 由此推测 maspin 的抑癌作用具有非特异性。上述结果为研究 maspin 的抑癌机制提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] 譙敏, 牛司强, 王丕龙. 抑癌基因 maspin 在胃癌细胞株 SGC-7901 细胞中的表达及意义[J]. 重庆医学, 2013, 42(6):604-606.
- [2] Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJ, et al. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells[J]. Science, 1994, 263(5146):526-529.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] Kim J, Jang KT, Kim KH, et al. Aberrant maspin expression is involved in early carcinogenesis of gallbladder cancer [J]. Tumour Biol, 2010, 31(5):471-476.
- [6] Nam E, Park C. Maspin suppresses survival of lung cancer cells through modulation of Akt pathway [J]. Cancer Res Treat, 2010, 42(1):42-47.
- [7] Tsuji T, Umekita Y, Ohi Y, et al. Maspin expression is up-regulated during the progression of endometrioid endometrial carcinoma [J]. Histopathology, 2007, 51(6):

871-874.

- [8] Sood AK, Fletcher MS, Gruman LM, et al. The paradoxical expression of maspin in ovarian carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(9):2924-2932.
- [9] Mohsin SK, Zhang M, Clark M, et al. Maspin expression in invasive breast cancer; association with other prognostic factor [J]. J Pathol, 2003, 199(4):432-435.
- [10] 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.
- [11] Liu Z, Shi HY, Nawaz Z, et al. Tamoxifen induces the expression of maspin through estrogen receptor-alpha [J]. Cancer Lett, 2004, 209(1):55-65.
- [12] Jang HL, Nam E, Lee KH, et al. Maspin polymorphism associated with apoptosis susceptibility and in vivo tumorigenesis [J]. Int J Mol Med, 2008, 22(3):333-338.
- [13] Hogdall EV, Christensen L, Hogdall CK, et al. Distribution of p53 expression in tissue from 774 Danish ovarian tumour patients and its prognostic significance in ovarian carcinomas [J]. APMIS, 2008, 116(5):400-409.
- [14] Uren RT, Dewson G, Chen L, et al. Mitochondrial permeabilization relies on BH3 ligands engaging multiple pro-survival bcl-2 relatives, not Bak [J]. J Cell Biol, 2007, 17(7):231-277.
- [15] Antonello A, Romani, Paolo S, et al. The associated expression of maspin and Bax proteins as a potential prognostic factor in intrahepatic Cholangiocarcinoma [J]. BMC Cancer, 2006, 6:255.
- [16] Zhang W, Shi HY, Zhang M. Maspin overexpression modulates tumor cell apoptosis through the regulation of Bcl-2 family proteins [J]. BMC Cancer, 2005, 5:50.

(收稿日期:2013-01-08 修回日期:2013-03-21)

(上接第 2314 页)

- [8] Koretz RL, Lipman TO, Klein S. AGA technical review on parenteral nutrition [J]. Gastroenterology, 2001, 121(4):970-1001.
- [9] Raslan M, Gonzalez MC, Torrinhas RS, et al. Complementarity of Subjective Global Assessment (SGA) and Nutritional Risk Screening 2002 (NRS 2002) for predicting poor clinical outcomes in hospitalized patients [J]. Clin Nutr, 2011, 30(1):49-53.
- [10] Kyle UG, Kossovsky MP, Karsegard VL, et al. Comparison of tools for nutritional assessment and screening at hospital admission: a population study [J]. Clin Nutr, 2006, 25(3):409-417.
- [11] 蒋朱明, 陈伟, 江华, 等. 住院患者营养风险筛查指南 [J]. 中国临床营养杂志, 2007, 15(1):13-15.

- [12] Johansen N, Kondrup J, Plum LM, et al. Effect of nutritional support on clinical outcome in patients at nutritional risk [J]. Clin Nutr, 2004, 23(4):539-550.
- [13] 马冠生, 刘爱玲, 胡小琪, 等. 云南、四川艾滋病感染者及患者的营养知识、态度及需求调查分析 [J]. 中国健康教育, 2003, 19(11):831-833.
- [14] Kondrup J, Allison SP, Elia M, et al. ESPEN guidelines for nutrition screening 2002 [J]. Clin Nutr, 2003, 22(4):415-421.
- [15] Lochs H, Allison SP, Meiere R. Introductory to the ESPEN guidelines on enteral nutrition: terminology, definitions, and general topics [J]. Clin Nutr, 2006, 25(2):180-186.

(收稿日期:2013-01-18 修回日期:2013-04-22)