基础研究 文章编号:0253-3626(2010)11-1646-04

pshRNA-MDRla 联合 TRAIL 基因对胃癌细胞株 SGC7901/VCR 作用及其作用机制的实验研究

袁 媛[1],周 洲[1],周 静[1],姜 政[1],黄爱龙[2],王丕龙[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院消化科,重庆 400016;2. 重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨 pshRNA-MDRla 联合 pBUD-TRAIL,在体外对胃癌细胞 SGC7901/VCR 增殖和凋亡的作用及机制,为肿瘤的基因治疗奠定基础。方法:以人胃癌 SGC7901/VCR 细胞株为研究对象,将 pshRNA-MDRla 与 pBUD-TRAIL 共同转染胃癌 SGC7901/VCR 细胞并在 VCR 中培养,同时与 pshRNA-MDRla 组、pBUD-TRAIL 组、SGC7901/VCR 和空质粒组相比较,以MTT 法检测细胞增殖抑制率、以 FCM 检测细胞凋亡率以及 TUNEL 法检测细胞凋亡等,观察联合应用组对肿瘤细胞增殖的抑制作用。结果:MTT 法显示:对照组(pBUD-TRAIL、pshRNA-MDRla、空质粒和 SGC7901/VCR 组)胃癌细胞的生长抑制率分别为 45%、30%、10%和 10%,联合实验组抑制率为 70%;FCM 检测显示:对照组胃癌细胞的凋亡率分别为 25.96%、10.27%、5.96%和4.25%,联合实验组凋亡率为 41.23%;与对照组相比,联合实验组抑制率和凋亡率都具有显著性差异;TUNEL 检测结果显示:联合组与其他对照组相比较,细胞核明显棕黄色深染,且阳性染色细胞数目明显增多,表明 pBUD-TRAIL 与 pshRNA-MDRla 联合作用,凋亡细胞明显增加。结论:pshRNA-MDRla 联合 pBUD-TRAIL 可显著抑制肿瘤细胞的增殖和促进肿瘤细胞的凋亡,推测与 pshRNA-MDRla 阻止 TRAIL 外排有关,从而增强 TRAIL 促进肿瘤细胞凋亡的作用,两者具有协同作用。

【关键词】pshRNA-MDRla;肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体;增殖;凋亡

【中国图书分类法分类号】R735.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-31

Experimental study on the effects of pshRNA-MDRla combined with pBUD-TRAIL in inducing SGC7901/VCR cell apoptosis and proliferation and their mechanism

YUAN Yuan, et al

(*Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of pshRNA-MDRla combined with TRAIL in treating gastric cancer cell lines SGC7901/VCR and understand their mechanism, in order to lay experimental and theoretical foundation for clinical application of gene tumor therapy. *Methods*: SGC7901/VCR cells transfected with pBUD-TRAIL and pshRNA-MDRla simultaneously were cultivated with 1mg/L concentration of VCR, and compared with SGC7901/VCR cell transfected with pshRNA-MDRla, pBUD-TRAIL, pBUD groups and SGC7901/VCR group, respectively. The inhibition of cell proliferation was examined by methylthiazolyl tetrazolium (MTT) method, and cell apoptosis was detected by TUNEL method and flow cytometry using PI staining analysis. *Results*: The inhibition rates in pshRNA-MDRla, pBUD-TRAIL, pBUD and SGC7901/VCR groups were respectively 45%, 30%, 10%, and 10% by MTT. The apoptosis rates in pshRNA-MDRla, pBUD-TRAIL, pBUD and SGC7901/VCR groups were respectively 25.96%, 10.27%, 5.96%, and 4.25% by FCM. Compared with control group, the inhibition rate of the proliferation and apoptosis rate of SGC7901/VCR cells in pshRNA-MDRla combinated with TRAIL group was higher(70%, 41.23% respectively); Karyopycnosis, nuclear chromosomal condensation and segmentation were observed by TUNEL. pshRNA-MDRla combinated with TRAIL group could significantly induce the apoptosis of tumor. *Conclusion*: pshRNA-MDRla combined with TRAIL could inhibit the proliferation and induce apoptosis of SGC7901/VCR cells, which could be related with the interfering effects of pshRNA-MDRla by prohibiting TRAIL excretion, so as to intensify the effect of TRAIL in promoting tumor cell apoptosis and have a synergistic action with TRAIL.

【Key words】pshRNA-MDRla; TRAIL; Proliferation; Apoptosis

作者介绍:袁 媛(1985-),女,硕士,

研究方向:消化系统肿瘤研究。

通讯作者:姜 政,男,主任医师,教授,E-mail:jiangz1753@163.com。

肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand,TRAIL)是近年来发现的 TNF 超家族新成员,其生物学特点为选择性细胞毒作用,对正常细胞的生长没有影响,从而认为在正常机体中起免疫监视作用[1]。然而最近研究发现,越来越多的肿瘤细胞系和肿瘤对重组可溶型 TRAIL 产生了抵抗性,其原因可能与肿瘤细胞在放化疗过程中产生多药耐药等因素有关。而肿瘤多药耐药基因(Multidrug resistance,MDR)过度表达是导致肿瘤细胞产生耐药的重要机制,同时也是造成化疗中断、治疗失败的主要因素之一[2~6]。因此本文同时选择 TRAIL 基因和 MDR 基因来探讨其在恶性肿瘤中的作用将具有重要的临床意义。

在前面的实验中,成功构建了重组载体 pshRNA-MDRla 和 pBUD-TRAIL,本文将同时转入胃癌多药耐药细胞株SGC 7901/VCR 中,探讨联合转染组与单独转染组对肿瘤细胞增殖与凋亡的作用,从而为晚期肿瘤的治疗奠定理论与实验基础。

1 材料和方法

1.1 一般材料

pshRNA-MDR1a 是 MDR1 基因的 siRNA,由本实验构建;重组质粒 pBUD-TRAIL 由李彦硕士提供(TRAIL 基因位于 *Xho* Ⅰ 和 *Bgl* Ⅱ 酶切位点之间)。胃癌多药耐药细胞株 SGC7901/VCR 由第四军医大学樊代明院士惠赠,SGC7901/VCR 是胃癌细胞 SGC7901 经递增浓度的长春新碱(Vincristine,VCR)诱导形成的、具有典型的 P-gp 高表达的耐药细胞株;MTT、DMSO 购自 Sigma 公司;1640 培养液为 Gibco 产品;小牛血清为杭州四季青公司产品;Roche 试剂盒为中杉公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及分组 SGC7901/VCR 细胞常规培养于含 10%的胎牛血清,100 μ/ml 青霉素、100 μ/ml 链青霉素,1 mg/L VCR 的 RPMI1640 培养液中,培养条件为 37℃,CO_2 饱和度为 5%,定期观察细胞生长情况,每 2~3 d 用 0.1%的胰酶消化,进行传代培养。实验分为 5 组。第 1 组为 SGC7901/VCR 组:不转染质粒;第 2 组为空质粒组:转染 pGenesil 质粒;第 3 组为 pshRNA-MDRla 组:转染 pshRNA-MDRla;第 4 组为 pBUD-TRAIL 组:转染 pBUD-TRAIL;第 5 组为联合转染组:联合转染 pshRNA-MDRla 和 pBUD-TRAIL。

1.2.2 MTT 检测肿瘤细胞生长 收集对数生长期肿瘤细胞,调整细胞浓度为 1×10^5 个/L,以 1×10^4 个/孔(每孔 100 μl)接种于 96 孔板中,调零组只加入等体积培养液。随机分为 5 组和调零组(加入等体积培养液)。每组设 5 个平行孔,37℃,5%CO_2 条件下分别培养,待细胞生长占培养孔孔底 80%~90%时进行转染(按脂质体转染说明书进行操作)。转染后培养 24、48 h 和 72 h,弃掉各孔培养基,每孔加入 0.5%MTT 溶液 200 μl,37℃孵育 4 h;小心吸去上清液,每孔加入 150 μl DMSO 溶解样品, 震荡混匀。用酶联免疫检测仪测定各孔 570 nm 吸光度值,取 5 孔吸光度值的均数,以时间(T)为横坐标,光吸收值(OD)为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.2.3 流式细胞术(Flow cytometry,FCM)检测细胞周期和凋亡 方法同前,转染后培养 48 h,收集各组细胞和对照组(加入等体积培养液)细胞,PBS 洗涤 2 次,70%冷乙醇固定过夜,PBS 离心洗涤 2 次,加入 10 μl RNA 酶(50 μg/ml),37℃温浴 30 min 后,PI 染液冰浴作用 30 min,用流式细胞仪分析细胞凋亡。

1.2.4 TUNEL 法检测细胞凋亡 收集对数生长期肿瘤细胞,接种于放有盖玻片的 24 孔板中(3×10^4 个/孔),转染后培养 48 h 后吸弃培养液,37℃PBS 洗 3 次,吸干净孔内液体,加新鲜配制的 4%多聚甲醛,室温固定 60 min。PBS 洗 3 次,吸干净孔内液体,再加 3%过氧化氢-甲醇室温作用 10 min,PBS 洗 3 次,把培养孔板放在冰上,加 0.1% Triton X-100,冰浴 5 min,用 PBS 洗 3 次,加 TUNEL 反应液,DAB 显色,光镜观察结果并照相。

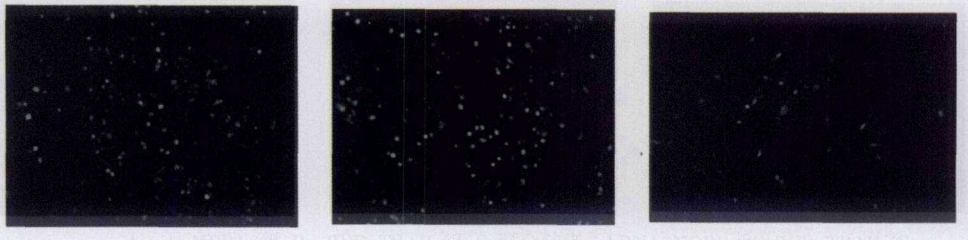
2 结 果

2.1 重组质粒转染后耐药细胞株生长情况

pshRNA-MDRla、pBUD-TRAIL 以及 2 种重组质粒共同转染胃癌多药耐药细胞 SGC7901/VCR 后,在荧光显微镜下均可见到绿色荧光蛋白的表达,胃癌细胞贴壁,随着培养时间的延长,细胞内荧光逐渐增多增强,在 48 h 时达高峰。与单独转染相比,未见明显差异(图 1)。

2.2 MTT 检测重组质粒对耐药细胞株增殖的影响

细胞转染质粒后对细胞的生长有一定影响,SGC7901/VCR 组与空质粒组生长良好,死亡细胞较少,而 pshRNA-MDRla,pBUD-TRAIL 组与联合转染组细胞生长明显减慢,且可见联合转染组细胞生长最慢,生长曲线表明:联合转染组较单独转染组对肿瘤细胞生长的抑制作用更强,肿瘤细胞



A. psh-MDR1a 组; B. pBUD-TRAIL 组; C. 联合转染 pshRNA-MDRla 和 pBUD-TRAIL 组

图 1 质粒转染 48 h 后 SGC7901/VCR 细胞荧光照片(200×)

增殖显著受到抑制；随着培养时间的延长，抑制生长与增殖的作用更加明显。受抑程度依次是：联合转染组 >pBUD-TRAIL 组 >pshRNA-MDRla 组 > 空质粒 >SGC7901/VCR 组（图 2）。

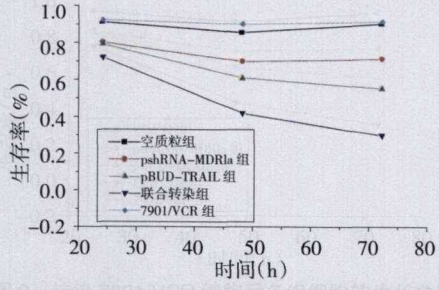


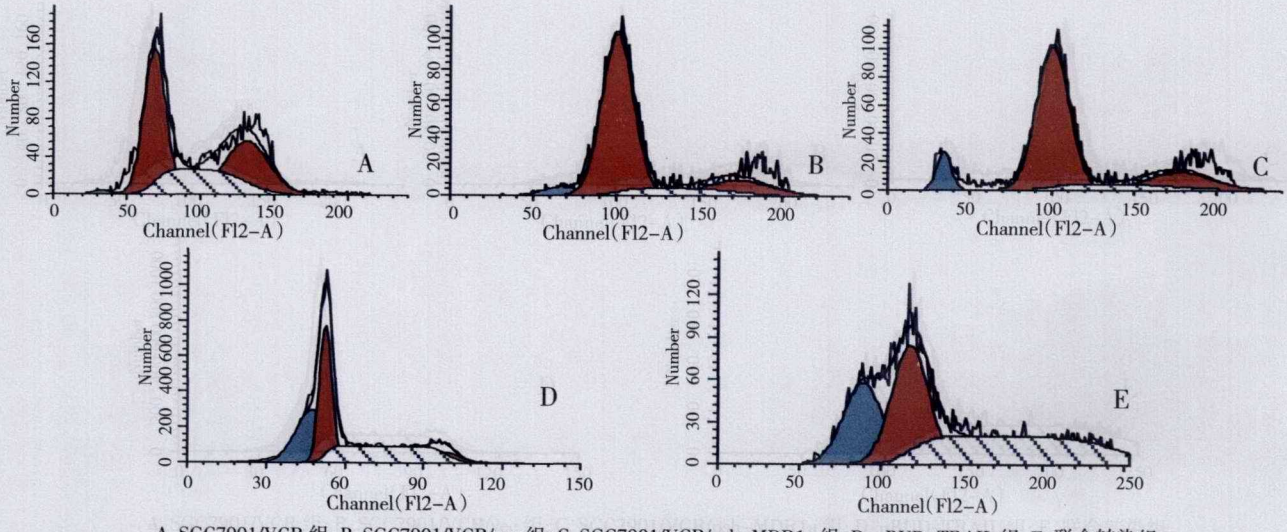
图 2　转染 7901/VCR 细胞后各组细胞的生长曲线

2.3　FCM 检测重组质粒对耐药细胞周期和凋亡的影响

PI 单染法流式细胞仪检测细胞转染后培养 48 h 的细胞周期及细胞凋亡率。从图 3 可以看出，SGC7901/VCR 组与空质粒组细胞周期和细胞凋亡率分别是 S 期 29.37%、30.89%；凋亡 4.25%、5.36%；pshRNA-MDRla 组和 pBUD-TRAIL 组细胞周期和细胞凋亡率分别是 S 期 10.49%、40.99%；凋亡 10.27%，25.96%；联合转染组细胞周期 S 期 45.39%和细胞凋亡率 41.23%。与空质粒组、单独重组质粒转染组相比，可见联合转染组效果最明显，凋亡率最大，与此同时，细胞大多数停止在 S 期，说明联合转染可增强 TRAIL 基因诱导细胞凋亡的作用。

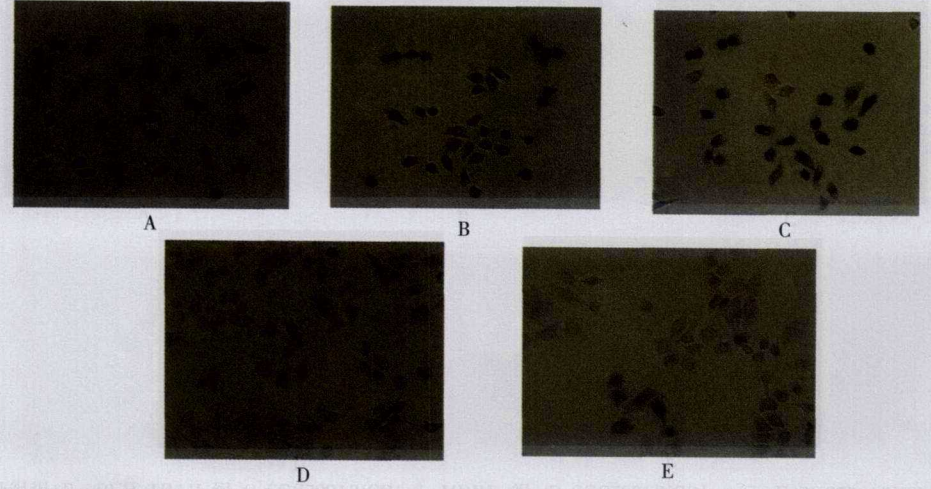
2.4　TUNEL 检测重组质粒对耐药细胞凋亡的影响

经 TUNEL 检测结果显示：SGC7901/VCR 组，空质粒组细胞核染色较淡，染色细胞数目较少或没有，48 h 的凋亡率分别为 4.3%和 6.2%，而 pshRNA-MDRla 组，pBUD-TRAIL 组，联合转染组细胞核明显棕黄色深染，核浓缩，染色质凝聚，靠近核膜，同时细胞质中有散在点片状着色，48 h 的凋亡率分别为 19.7%、21.3%和 35.4%。其中联合转染组阳性染色细胞数目最多，说明联合转染可明显增强 TRAIL 诱导细胞凋亡的作用。pshRNA-MDRla 组，pBUD-TRAIL 组，联合转染组与空质粒组凋亡率的差别具有显著的统计学意义（$P<0.01$）（图 4）。



A. SGC7901/VCR 组；B. SGC7901/VCR/vec 组；C. SGC7901/VCR/psh-MDR1a 组；D. pBUD-TRAIL 组；E. 联合转染组

图 3　转染 48 h 后流式细胞仪检测 SGC7901/VCR 细胞的凋亡



A. 联合转染组组；B. pBUD-TRAIL 组；C. SGC7901/VCR/psh-MDR1a 组；D. SGC7901/VCR/vec 组；E. SGC7901/VCR

图 4　转染后 48 h TUNEL 检测 7901/VCR 细胞的凋亡（DAB × 400）

3 讨 论

近年来，随着分子医学和肿瘤病因研究的不断深入，肿瘤的基因治疗成为肿瘤治疗的活跃领域，在提高消化系统恶性肿瘤治疗效果、延长生存时间、降低放疗和化疗副作用方面将发挥重要作用[7~10]。

TRAIL 蛋白具有膜结合型和可溶型 2 种形式，二者都能与细胞膜上的特异受体结合，通过胞内信号转导，迅速诱导表达 TRAIL 特异受体的细胞发生凋亡，其抗肿瘤作用为 p53 非依赖型的，同时研究表明，TRAIL 与受体的结合力是受温度控制的，在 4℃时，TRAIL 与其所有受体结合力相似，而在 37℃时，TRAIL 与 DR5 的结合力最高。因此，在机体及细胞最适宜的生存温度 37℃时，DR5 相对于其他受体来讲，以最强的亲和力与 TRAIL 结合并在 TRAIL 诱导的凋亡通路中发挥最大作用。因此 TRAIL 作为一种能选择性杀伤肿瘤细胞的促凋亡基因，将有望成为一种新型有效的抗癌基因应用于临床[11,12]。然而最近的研究发现[13~16]，越来越多的肿瘤细胞系和肿瘤对重组可溶型 TRAIL 产生了抵抗性，研究其原因与肿瘤细胞在放化疗过程中产生多药耐药有关。

MDR 表达产物 P-gp 的过度表达是肿瘤细胞产生多药耐药的重要原因[17]，由 1 280 个氨基酸残基组成的 ATP 依赖泵，可结合并以耗能方式排出药物，降低细胞内药物浓度而产生耐药性[18]。研究表明，P-gp 的量随体外 MDR 细胞系耐药程度的增强而增加。这就是本文选择 TRAIL 基因补充机体 TRAIL 蛋白和沉寂 MDR 基因的原因所在。

本实验将已构建成功的针对 MDR1 基因的短发夹 RNA 干扰质粒 pshRNA-MDR1a 和 pBud-TRAIL，采用脂质体直接转染的方法，将 2 种重组质粒共同转染入多药耐药胃癌细胞 SGC7901/VCR 中，结果表明：联合转染组的细胞核具有明显棕黄色深染，且阳性染色细胞数目明显增多，而对照组细胞核染色较淡，染色细胞数目较少或没有；同时发现肿瘤细胞生长缓慢，凋亡明显增加。其机制可能是 MDR1 基因的短发夹 RNA 干扰质粒 pshRNA-MDR1a 抑制 TRAIL 外排，增加了 TRAIL 在细胞内的浓度，增强了 TRAIL 促进细胞凋亡的作用。这为 RNA 干扰技术应用于临床及多基因联合抗肿瘤治疗奠定了基础，从而达到了实验目的，与文献报道一致[19~22]。

综上所述，pshRNA-MDR1a 不仅单独应用对胃癌 SGC7901/VCR 细胞具有抑制生长的作用，而且与 TRAIL 联合应用可明显增强 TRAIL 抗肿瘤活性，增强抑制肿瘤细胞生长并诱导其凋亡，因此对胃癌的治疗具有潜在的应用前景。

参 考 文 献

[1] Wiley S R, Schooley K, Smolak, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis[J]. Immunity, 1995, 3 (6): 673-682.

[2] 金浩生，周 杰，廖彩仙，等. 壶腹癌多药耐药基因 MDR1 表达与临床病理特征的关系[J].第四军医大学，2006，27(3)：251-282.

[3] Shi H, Lu D, Shu Y, et al.Expression of multidrug-resistance-related proteins P-glycoprotein, glutathione-S-transferases, topoisomerase-II and lung resistance protein in primary gastric cardiac adenocarcinoma[J].Cancer Invest, 2008, 26(4): 344-351.

[4] Kamata S, Kishimoto T, Kobayashi S, et al. Expression and localization of ATP binding cassette(ABC) family of drug transporters in gastric hepatoid adenocarcinomas[J]. Histopathology, 2008, 52(6): 747-754.

[5] Zhang D, Fan D. Multidrug resistance in gastric cancer: recent research advances and ongoing therapeutic challenges[J].Expert Rev Anticancer Ther, 2007, 7(10): 1369-1378.

[6] 卢列盛，宋科瑛，王瑞涛，等.乳腺癌原发灶和淋巴结转移灶 MDR1 mRNA 表达及与临床指标的相关性分析[J]. 肿瘤，2009，29(3)：272-276.

[7] 孙 伟，姜 政，向廷秀，等. hAG(K1-3)联合肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体基因真核表达质粒对裸鼠胃癌皮下移植瘤的作用[J]. 中华医学杂志，2009，89(12)：841-845.

[8] 周 炜，姜 政，向廷秀，等.短发夹 RNA 干扰胃癌低氧诱导因子-1α 表达及其临床意义[J].第三军医大学学报，2009，31(2)：152-156

[9] 周 洲，姜 政，周 静，等. shRNA 沉默胃癌耐药细胞 7901/VCR MDR1 基因表达的实验研究[J]. 实用肿瘤杂，2009，24(3)：227-231.

[10] 韩全利，张希东，丁 杰，等. Ss-A/Ro 核蛋白 60 ku 亚单位反义核酸逆转胃癌细胞多药耐药[J]. 世界胃肠病学杂志，2006，14(27)：2668-2673.

[11]李 彦，姜 政，向廷秀，等.可溶性人 TRAIL 诱导胃癌细胞 BCG-823 凋亡的研究[J].第三军医大学学报，2008，30(11)：1066-1071.

[12] 李 彦，姜 政，向廷秀，等.sTRAIL 真核表达载体对人胃癌裸鼠移植瘤的抑制作用[J].第三军医大学学报，2009，31(3)：198-202.

[13] Keane M M, EttenbergSA, Nan M M, et al.Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines[J].Cancer Res, 1999, 59(3): 734-741.

[14] Evdokiou A, Bouralexis S, Atkins G J, et al. Chemotherapeutic agents sensitize osteogenic sarcoma cells, but not normal human bone cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis[J]. Int J Cancer, 2002, 99(4): 491-504.

[15] Hemandez A, Wang Q D, Schwartz S A, et al. Sensitization of human colon cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis[J].J Gastrointest Surg, 2001, 5 (1): 56-65.

[16] Song J J, An J Y, Kwon Y T, et al. Evidence of two modes of development of acquired TRAIL resistance Involvement of Bcl-xL[J].J Biol Chem, 2007, 282 (1): 319-328.

[17] Kimchi-Sarfaty C, Oh J M, Kim I W, et al. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity[J].Science, 2007, 315(5811): 525-528.

[18] Kappelmayer J, Udvardy M, Antal-Szalmas P. Pgp and FLT3: identification and modulation of two proteins that lead to chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia. Curr Med Chem, 2007, 14(5): 519-530.

[19] Chen X P, Wang Q, Guan J, et al. Reversing multidrug resistance by RNA interference through the suppression of MDR1 gene in human hepatoma cells. World J Gastroenterol, 2006, 12(21): 3332-3337.

[20] Shi Z, Liang Y J, Chen Z S, et al. Reversal of MDR1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by vector-based RNA interference in vitro and in vivo[J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(1): 39-47.

[21] Watanabe T, Onuki R, Yamashita S, et al. Construction of a functional transporter analysis system using MDR1 knockdown Caco-2 cells[J].Pharm Res, 2005, 22(8): 1287-1293.

[22] Gan H Z, Zhang G Z, Zhao J S, et al. Reversal of MDR1 gene-dependent multidrug resistance using short hairpin RNA expression vectors[J].Chin Med J (Engl), 2005, 118(11): 893-902.

(责任编辑：张学颖)