基础研究 文章编号:0253-3626(2009)06-0690-04

胃癌细胞株 SGC-7901 的 Wnt/β-Catenin 信号途径与 Caspase-8、Caspase-3 及 Bcl-2 的关系

凌 康[1],王 颢[2]

(1.重庆医科大学附属第一医院普外科;2.重庆医科大学公共卫生学院生殖生理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究人胃癌细胞系 SGC-7901 中 β-Catenin 与原癌基因 Bcl-2 及凋亡基因 Caspase-8、Caspase-3 表达的关系,初步探索 Wnt/β-Catenin 通路在肿瘤发生过程中作用机制。方法:(1)采用 RT-PCR 法分别检测人胃癌细胞系 SGC-7901 受吲哚美辛干预组和未受干预组中的 β-Catenin、Bcl-2、Caspase-8 及 Caspase-3mRNA 的表达;(2)采用 MTT 法检测吲哚美辛抗癌效应。结果:(1)吲哚美辛干预组较未受干预组表现为伴随 β-Catenin 表达水平降低,Bcl-2 表达下调,而 Caspase-8 及 Caspase-3mRNA 表达上调。(2)吲哚美辛对人胃癌细胞系 SGC-7901 抑制率呈浓度和时间依赖性。结论:胃癌的发生、发展可能是 Wnt/β-Catenin 通路功能亢进,进一步激活原癌基因 Bcl-2,并抑制凋亡基因 Caspase-8、Caspase-3,导致细胞增殖与凋亡失衡的结果。

【关键词】胃癌;细胞凋亡;Wnt/β-Catenin 通路

【中国图书分类法分类号】R735.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-04-25

Relationship between Wnt/β-Catenin signal pathway in gastric carcinoma cell line SGC-7901 and the expression of Caspase-8, Caspase-3 and Bcl-2

LING Kang, et al

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

【Abstract】*Objective*: To study the regulatory mechanism of Wnt/β-Catenin passthway-influenced apoptosis of human gastric cancer line SGC-7901 by detecting the expression of β-Catenin mRNA, Bcl-2mRNA, Caspase-8mRNA and Caspase-3mRNA. *Methods*: (1) Expressions of β-Catenin, Bcl-2, Caspase-8 and Caspase-3mRNAs in groups with or without indomethacin induction were detected by RT-PCR. (2) Methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assay was used to measure the anticancer activity of indomethacin. *Results*: (1)As compared with groups without indomethacin induction, expression of β-Catenin mRNA and Bcl-2 mRNA were lower, however, increased expression of Caspase-8 and Caspase-3mRNA were found in SGC-7901 cells after treatment with indomethacin. (2) Indomethacin of 50 μmol/L at 24 h couldn't induce apoptosis of gastric cancer cells. Indomethacin of 50 μmol/L at 48 and 72 h and of 100 μmol/L and 200 μmol/L at 24、48 and 72 h could induce apoptosis of gastric cancer cells in a dose- and time-dependent manner. *Conclusion*: Gastric cancer cells may be caused by apoptosis inbalance through Wnt/β-Catenin passthway, which activates expression of proto-oncogene Bcl-2 and inhibites expressions of Caspase-8 and Caspase-3.

【Key words】Gastric cancer; Apoptosis; Wnt/β-Catenin passthway

作者介绍:凌 康(1962-),男,主治医师,
研究方向:消化道肿瘤。

因此,本实验表明,在肝癌细胞株 MHCC-97 中,maspin 基因的过表达可下调 VEGF 基因的表达,可能阻止肿瘤血管的生成而达到抑制肿瘤增生和转移的目的,为基因治疗肝癌提供理论依据。

参 考 文 献

[1] Zou Z, Anisowicz A, Hendrix M J, et al. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epthelial cells[J]. Science, 1994, 263(5146): 526-529.

[2] Bailey C M, Khallkhali-Ellis Z, Seftor E A, et al. Biological functions of maspin [J]. J Cell Physiol, 2006, 209(3): 617-624.

[3] Yanoopoulos G D, Dais S, Gale N W, et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel fortion[J]. Nature, 2000, 407(3): 242-248.

[4] Zhang W, Zhang M. Tissue microarray analysis of maspin expression and its reverse correlation with mutant p53 in various tumors [J]. Int J Oncol, 2002, 20(6): 1145-1150.

[5] 梁启廉,陈小东,王三明,VEGF 和抑癌基因 maspin 在肾癌组织中的表达及意义[J].第三军医大学学报,2007,29(14):1416-1418.

[6] Cho J H, Kim H S, Park C S, 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.

(责任编辑:冉明会)

胃癌是我国常见肿瘤之一，在胃癌发生和演变的多步骤转化过程中细胞凋亡调节系统发生紊乱，是细胞表现出恶性表型的重要原因之一[1]。原癌基因和 Caspase 蛋白酶家族（天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶家族）参与多种因素诱导的生理及病理性细胞凋亡过程，与肿瘤细胞凋亡关系密切[2]。Wnt/β-Catenin 信号转导途径参与细胞行为的调控，其中 β-Catenin（β-连环蛋白）是此信号途径的关键信号分子。

目前关于 Wnt/β-Catenin 途径中 β-连环蛋白的负性调节是否调控凋亡基因 Caspase-8、Caspase-3 及原癌基因 Bcl-2 的表达，进而调节细胞的增殖与调亡，尚未见报道。本文采用吲哚美辛干预人胃癌细胞系 SGC-7901 中 β-Catenin 表达，并用逆转录-聚合酶链反应技术观察 Caspase-8、Caspase-3及 Bcl-2 表达水平的变化，初步探索肿瘤发生过程中 Wnt/β-Catenin 通路对细胞凋亡的调节机制。

1 材料和方法

1.1 实验对象

人胃癌细胞 SGC-7901 由重庆医科大学病理生理教研室馈赠。

1.2 主要试剂和仪器

新生牛血清和 RPMI-1640 培养基均购自美国 Gibco 公司；四甲基偶氮唑盐（MTT）、吲哚美辛、二甲基亚砜均购自美国 Sigma 公司。RT-PCR 试剂盒购自 invitrogen 公司。

1.3 细胞培养

胃癌细胞 SGC7901 培养于含 10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的 RPMI1640 培养液中，培养条件为 37 ℃、5%CO_2、饱和湿度、每隔 2~3 d 用 0.25% 胰酶消化传代 1 次。

1.4 RT-PCR

1.4.1 总 RNA 提取 取对数生长期的人 SGC7901 胃癌细胞 8 瓶，待细胞贴壁达到 80% 时，倒去原培养液，分别于 4 瓶中加新鲜的培养液（未受干预组），另外 4 瓶加含 200 μmol/L 吲哚美辛的培养液（吲哚美辛干预组），培养 24 h 后收集细胞。细胞总 RNA 提取按照总 RNA 快速抽提试剂说明书进行。

1.4.2 引物序列 β-Catenin、Caspase-3、Caspase-8、Bcl-2 及 H-GDPDH 引物序列由重庆升博公司设计并合成，序列见表 1 所示。

1.4.3 RT-PCR

1.4.3.1 逆转录 取总 RNA 4 μl、20 pmol/μl Oligo(dT)1 μl，70℃反应 10 min 后冰上冷却 10 min。然后冰上依次加样：dNTP 混合物（dATP、dUTP、dCTP、dGTP 各 10 mmol/L）4 μl、10×RT buffer 2 μl、RNA 酶抑制剂（50 U/μl）0.5 μl、RT007 AMV 逆转录酶（10 U/μl）0.5 μl、RNase free water 8 μl，总体反应体积 20 μl，42℃反应 60 min，99℃反应 5 min，所得 cDNA 作 PCR。

1.4.3.2 PCR 反应体系为 cDNA4 μl，10×PCR buffer 5 μl、dNTP 混合物（dATP、dUTP、dCTP、dGTP 各 10 mmol/L）1 μl，上游引物（20 pmol/μl）1μl、下游引物（20pmol/μl）1 μl、Taq 酶（5 u/μl）0.5 μl、ddH_2O 37.5 μl，总反应体积 50 μl。Caspase-8 及 β-Catenin 扩增条均为：① 94℃×2 min；② 94℃×30 s，58℃×30 s，72℃×1 min，36 个循环；③72℃×10 min。Caspase-3 及 Bcl-2 扩增条件均为：① 94℃×2 min；② 94℃×30 s，54℃×30 s，72℃×1 min，36 个循环；③72℃10 min。

1.4.3.3 电泳及结果分析 产物各取 10 μl 加 2 μl 6×loading buffer 经 2% 琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察，片段大小与 Marker 比较确认特异性产物。然后在凝胶成像仪上照像并进行密度扫描分析，β-Catenin、Caspase-8 和 Bcl-2 相对

表 1 引物序列

引物名称	序列	产物长度(bp)	
β-Catenin	FP	5'-CCAGACTTTGGGTCGTGATTTCC-3'	477
	RP	5'-TATTGATCCGATGCCACCTCCTC-3'	
Caspase-3	FP	5'-CGGAAGGAGGACGTGGAGATG-3'	392
	RP	5'-GTGCCGTTGGCGTGGAAGT-3'	
Caspase-8	FP	5-AGCAAAGGGGAGGAGTTGTG-3	279
	RP	5-TACTGTGCAGTCATCGTGGG-3	
Bcl-2	FP	5'-GATGGCAAATGACCAGCAGA-3'	348
	RP	5'-TGGCAGGATAGCAGCACAGG-3'	
H-GDPDH	FP	5'-TGGACCTGACCTGCCGTCTA-3'	149
	RP	5'-GCAGTGGGTGTCGCTGTTGA-3'	

表 2 RT-PCR 检测未受干预组与吲哚美辛干预组中各指标表达结果

相对表达值	β-Catenin	Caspase-3	Caspase-8	Bcl-2
未受干预组	0.112±0.040	0.146±0.014	0.124±0.072	0.232±0.059
吲哚美辛干预组	0.071±0.025	0.257±0.076	0.210±0.029	0.124±0.072

表达强度（相对表达量）以公式进行计算：目的基因相对表达强度＝（目的基因灰度值－空白区域灰度值）/（H-GDPDH 灰度值－空白区域灰度值），各灰度值取随机取 10 次的均值。数据用均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示；应用配对 t 检验和 F 检验进行分析。

1.5 MTT 法检测吲哚美辛的抗癌活性

取对数生长期的 SGC7901 细胞，调整细胞浓度为 5×10^4 个/ml，接种于 96 孔板，每孔 0.1ml（5 000 个细胞），用 37℃、5 %CO_2孵箱孵育过夜，待细胞贴壁后，分别加入终浓度为 50、100、200 μmol/L 的吲哚美辛。以上每组各设 6 个复孔，置于培养箱中分别培养 24、48 和 72 h。试验终止前 4 h，每孔加入 MTT 液 20 μl（5 mg/ml），继续培养 4 h 后去除每孔溶液，加入 DMSO 150 μl/孔，振荡 10 min 后用自动酶标仪在 490 nm 波长处测定每孔的 OD 值，求其平均值。对照组细胞抑制率计为 0，实验组按下列公式计算细胞抑制率：细胞抑制率＝（对照组－实验组）/对照组×100%，以时间为横轴，抑制率为纵轴绘制生长曲线。

2 结 果

2.1 RT-PCR 产物定性与半定量分析

2.1.1 RNA 样品的鉴定 用紫外分光光度计测定 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.8~2.0 之间，说明 RNA 有较高纯度，浓度为 0.5~1.0 μg/μl。1%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳结果显示总 RNA 较完整。

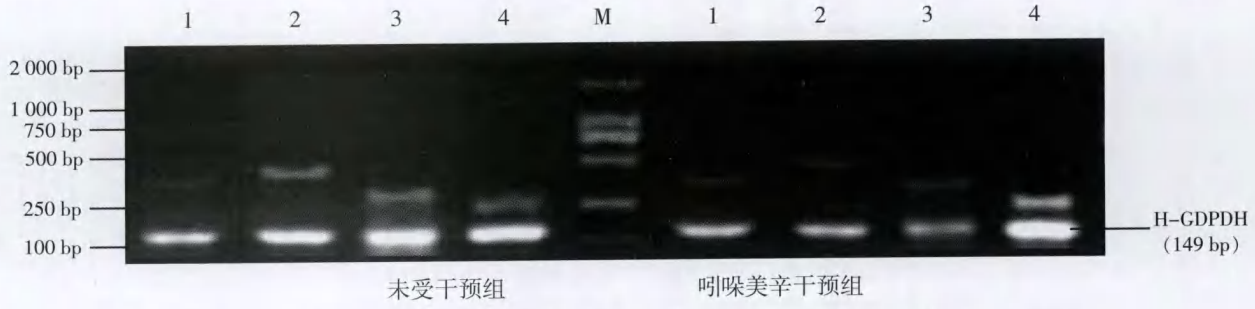
2.1.2 RT-PCR 结果分析 β-Catenin、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-8 与 H-GDPDH mRNA 的 RT-PCR 产物与理论长度相一致（见图 1）。从实验结果（见表 2、图 1）可见：吲哚美辛干预组较未受干预组呈现出伴随 β-Catenin 表达水平降低（$P<0.05$），Bcl-2 表达下调（$P<0.05$），而 Caspase-3 及 Caspase-8 表达上调（$P<0.05$）的趋势。

2.2 吲哚美辛对 SGC-7901 细胞增殖的影响

根据不同浓度的吲哚美辛对 SGC-7901 胃癌细胞生长的抑制率（图 2），可看出吲哚美辛在浓度为 50 μmol/L 时作用 24 h 对人胃癌 SGC-7901 细胞抑制效果不佳（抑制率 6.5%）。而作用 48、72 h 及浓度为 100 和 200 μmol/L 时作用 24、48、72 h 的凋亡诱导作用明显。由此我们推则吲哚美辛以时间、浓度依赖性方式抑制胃癌 SGC-7901 细胞生长，其抑制率呈浓度和时间依赖性。

3 讨 论

Wnt/β-Catenin 信号通路的 Wnt 信号通过一系列酶促瀑布反应，最终抑制 β-连环蛋白的降解，调控许多基因的转录、表达，参与细胞行为，粘附及细胞极性的调控，在调节细胞生长、分化及胚胎发育过程中起着重要作用。β-连环蛋白（β-Catenin）是 Wnt/β-Catenin 信号通路的关键枢纽分子。在正常非增殖状态的细胞中大部分 β-Catenin 都连接在细胞膜的 E-cadherin 分子上。在细胞质中的 β-Catenin 与 APC、Axin、GSK-3β、酪蛋白激酶 1α 形成破坏复合体，复合体中的 CKIα 可使 β-Catenin 的丝氨酸（Ser）45 残基磷酸化，有助于 β-Catenin 的磷酸化，磷酸化后的 β-Catenin 被泛素-蛋白酶体泛素化和降解。在某些肿瘤细胞中发现存在着异常的 Wnt 信号，当 Wnt 蛋白与细胞膜上卷曲蛋白和辅助性受体低密度脂蛋白相关受体（Low density lipoprotein receptor-related protein，LRP）5/6 结合后，引起 Axin 不稳定，导致破坏复合体解聚；引起 DVL 磷酸化而抑制 GSK-3β（glycogen synthase kinase 3β）的活性；导致细胞质内 β-Catenin 不被 GSK-3β 磷酸化，使其不能被泛素蛋白酶体系降解而积聚，积聚到一定量后进入细胞核，与 T 细胞转录因子形成复合物激



1. Caspase-3；2. β-Catenin；3. Bcl-2；4.Caspase-8；M. DL2000Marker

图 1 未受干预组和吲哚美辛干预组 β-Catenin、Caspase-3、Caspase-8、Bcl-2 及 H-GDPDH RT-PCR 产物电泳凝胶成像图

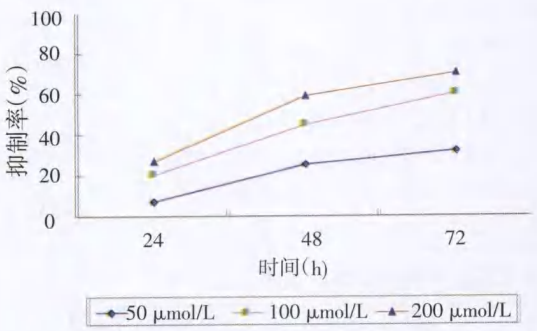


图 2 不同浓度的吲哚美辛对 SGC-7901 胃癌细胞生长的抑制率的比较

活下游基因的转录[3,4],导致细胞增殖加快和凋亡抵抗。研究中发现 β-Catenin 在卵巢恶性上皮肿瘤及交界性上皮肿瘤中异常表达率均明显高于其在卵巢良性上皮性肿瘤中的表达，其异常表达可能激活原癌基因 C-myc,cyclinD1 的表达[5]。

我们采用 MTT 研究发现,50 μmol/L 吲哚美辛与胃癌细胞作用 48h 可诱导胃癌细胞的凋亡,在 100 μmol/L 和 200 μmol/L 时作用 24h 即可诱导胃癌细胞的凋亡。且其诱导胃癌细胞凋亡具有浓度和时间依赖性。同时 RT-PCR 技术研究显示吲哚美辛干预组较未受干预组 β-Catenin mRNA 表达水平降低($P<0.05$),这些与在结肠癌、胰腺癌中的研究结果相似[3,4]。所以我们推测吲哚美辛可能通过减少 β-Catenin 的表达,使 β-Catenin 从细胞质和细胞核转位到细胞膜,干扰 β-Catenin/TCF 复合物的形成;而抑制 β-Catenin/TCF4 转录活性及下游基因 Survivin 的表达,阻断 Wnt/β-Catenin 信号通路[6,7]。

凋亡基因 Caspase-3、Caspase-8 和 Bcl-2 目前被认为在细胞增殖和凋亡调控的重要基因,参与多种因素诱导的生理及病理性细胞凋亡过程。Bcl-2 能阻止细胞凋亡的发生,延长细胞生存,因此称它为细胞长寿基因[8]。其表达可增加细胞对多种促凋亡因素的抗性,从而使肿瘤发生发展,增加肿瘤的播散侵袭能力。近年来有研究表明 Bcl-2 基因蛋白能够够降低凋亡诱导因子活性,对凋亡有抑制作用[9]。

Caspase 是一类促凋亡蛋白,其作用主要是促进细胞凋亡。它接受凋亡信号,最终刺激 Caspase-3 经蛋白水解作用激活成活化形式。Caspase-8 是 Caspase 家族中最关键的成分,为凋亡起始组一员。它是 Caspase 家族中真正导致哺乳动物细胞凋亡的主要酶蛋白分子,属于天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶,是家族中导致细胞凋亡的主要效应因子[10],被合成后通常以非活化的酶原形式存在于细胞中,都具有长原结构域,借此与细胞膜上的死亡受体(或细胞内促凋亡蛋白)和接头分子构成的 caspase 激活复合物相结合。凋亡开始最具特征的路径之一就是细胞死亡信号蛋白与死亡受体相结合,并同时与 caspase 的原结构域结合,结果使 caspase 起始分子发生聚集,并通过分子间的切割而活化,活化后的 caspase 接着切割并活化下游的 caspase 分子。Caspase-3 是它被合成后通常以非活化的酶原形式存在于细胞中,为凋亡效应组一员,它是具有短前结构域(short-prodomain)的效应分子,作为上游 caspase 的底物,经活化后作用于胞内多种蛋白质和酶类,产生多种凋亡信号最终使许多与细胞结构、细胞周期及 DNA 修复等相关蛋白或激酶失活,促使细胞凋亡[11,12]。如 Caspase-3 通过破坏细胞核纤层,直接导致细胞结构的破坏。所以抑制 caspase-3 的活性或拮抗其功能可能使细胞凋亡受抑[13]。此外,caspase 分子之间也可以相互作用,如 caspase-8 能激活 caspase-3 酶原,使之成为活化的 caspase-3,而 caspase-3 又能反过来作用于 caspase-8 酶原,从而产生一个正反馈,使 caspase 级联反应放大。细胞的最终凋亡就在于各种途径综合作用的结果[13,14]。

我们采用 RT-PCR 技术研究发现,未受干预组 SGC-7901 原癌基因 Bcl-2 的 mRNA 表达水平较高。而吲哚美辛诱导 SGC-7901 细胞凋亡过程中,伴随 β-Catenin 的 mRNA 表达水平降低($P<0.05$),Bcl-2 的 mRNA 表达下调($P<0.05$),而 Caspase-3、Caspase-8 的 mRNA 表达上调($P<0.05$)。由此我们推测胃癌中 Wnt/β-Catenin 通路对细胞凋亡的可能调节机制:异常的 Wnt 信号通过激活 Wnt/β-Catenin 通路中 β-Catenin 的表达及功能，使原癌基因 Bcl-2 的转录上调，同时下调凋亡诱导因子作用,抑制 caspase-8 进而抑制其下游 Caspase-3 的活性,使凋亡比例失衡,诱导细胞增生并抑制其凋亡,导致癌症的发生、发展。

Wnt/β-Catenin 信号通路在人类癌症的发生发展中起重要作用。目前抗肿瘤药物仅在某一个水平阻断 Wnt/β-Catenin 信号通路,疗效有限。开展肿瘤发生过程中 Wnt/β-Catenin 通路对细胞凋亡的调节机制的研究为今后开发更多选择性强、高效低毒的靶向药物提供了理论依据。

参 考 文 献

[1] Li H,Liu N,Guo L,et al.Frequent expression of soluble Fas and Fas ligand in Chinese stomach cancer and its preneoplastic lesion[J]. Int J MolMed,2000,5(5):473-476.

[2] Robertson C S,Crocker S J,Nicholson D W,et al.Neuroprotetion by the inhibition of apoptosis[J].Brain Pathol,2000,10(2):283-292.

[3] Ding X Z,Tong W G,Adrian T E,et al.Blockade of cyclooxygenase-2 inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells[J].Anticancer Res,2000,20: 2625-2631.

[4] Kapitanovic S,Cacev T,Arnica M,et al.Effect of indomethacin on E-eadherin and hera-catenin expression in HT-29 colon cancer cells[J]. Exp Mol Pathol,2006,80(1):91-96.

[5] 林 晓,李 昱,张 雄,等.*Beta-Catenin*,APC 蛋白,*C-myc* 及 *Cyclin D1* 在卵巢上皮肿瘤中的表达及意义[J].重庆医科大学学报,2006,31(1):50-54.

[6] Kapitanovic S,Cacev T,Arnica M,et al.Effect of indomethacin on E-eadherin and hera-catenin expression in HT-29 colon cancer cells[J]. Exp Mol Pathol,2006,80(1):91-96.

[7] 朱红霞,张 果,王益华,等.非甾体类抗炎药通过 β-Catenin/TCF4-survivin 通路诱导结肠癌细胞凋亡[J]. 癌症,2004,23(7):737-741.

[8] Konturek P C,Konturek S J,Sulekova Z,et al.Expression of hepatocyte growth factor,transforming growth factor alpha,apoptosis related proteins bax and bcl-2,and gastrin in human gastric cancer[J]. Aliment Pharm acol Ther,2001,15(5):989-999.

[9] Packham G,Cleveland J.C-myc and apoptosis[J]. Biochem Biophys Acta,1995,1242(7):11-28.

[10] Enari M,Sakahira H,Yokoyama H,et al.A caspase-activated DNase that degrades Dnase during apoptosis and its inhibitor ICAD[J].Nature 1998,391(6662):43-50.

[11] Li Y H,Wang C,Meng K,et al.Influence of survivin and caspase-3 on cell apoptosis and prognosis in gastric carcinoma[J].World J Gastroenterol,2004,10:1984-1988.

[12] Wolf B B,Sehuler M,Echeverri F,et al.Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragment factor45/inhibitor of caspase activated DNase actlvation[J].Biol Chem,1999,274(43):30651-30656.

[13] Nakagawa T,Zhu H,Mrishima N,et al.Caspase-l2 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta[J]. Nature,2000,403(6765):98-103.

[14] *Srinivasula S M,Saleh A,Hegde R,et al.A conserved XIAP-interaction motif* in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis[J]. Nature,2001,409(6824):112-116.

(责任编辑:冉明会)