维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)03-0304-04

吲哚美辛体外干预研究胃癌 Wnt/β-Catenin 信号途径与 Caspase-3 及 Bcl-2 关系

王 颢,魏莎莉,杨 戎,刘孝云

(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 SGC7901 中 β-连环蛋白(β-Catenin)与 Caspase-3 凋亡基因及与 Bcl-2 原癌基因表达的关系,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。方法:(1)MTT 方法检测吲哚美辛抗肿瘤效应;(2)RT-PCR 分别检测人胃癌细胞系 SGC7901 受吲哚美辛干预组和未受干预组中的 β-Catenin 与 Caspase-3 及 Bcl-2mRNA 的表达。结果:吲哚美辛在浓度为 50μmol/L 时作用 24h 对人胃癌 SGC7901 细胞抑制效果不明显,而作用 48、72h 及浓度为 100 和 200μmol/L 时作用 24、48、72h 的凋亡诱导作用明显,且抑制率呈浓度和时间依赖性;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-3 的表达上调。结论:人胃癌细胞系 SGC7901 可能通过 Wnt/β-Catenin 通路激活 Bcl-2 原癌基因蛋白表达促进细胞增殖,同时抑制 Caspase-3 凋亡基因的蛋白表达抑制细胞凋亡,使细胞增殖与凋亡失衡。

【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】2007-09-03

Reaserch of relationship between Wnt/β-Catenin signal path-way in gastric carcinoma and the expression of Caspase-3 and Bcl-2 induced in vitro by indomethici

WANG Hao, et al

(*Department of Genesilogy and Physiology, College of Public Health, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the regulatory mechanism of Wnt/β-Catenin passageway influenced apoptosis of human gastric cancer line SGC-7901 by detecting the expression of β-Catenin mRNA, Caspase-3 mRNA and bcl-2 mRNA. *Methods*: (1) Methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assay was used to measure the anticancer activity of indomethaci. (2)Expression of β-Catenin, Caspase-3 mRNA and bcl-2 mRNA in groups of without induced or induced by indomethaci were detected by RT-PCR. *Results*: Indomethacin of 50μmol/L at 24h couldn't induce apoptosis of gastric cancer cells. Indomethacin of 50μmol/L at 48 and 72h and of 100μmol/L and 200μmol/L at 24, 48 and 72h could induce apoptosis of gastric cancer cells in adose- and time-dependent manner; Compared with groups of without induced by indomethaci, expression of β-Catenin mRNA and bcl-2 mRNA were lower, however, increased expression of Caspase-3 mRNA were found in SGC7901 cells after treatment with indomethaci. *Conclusion*: Apoptosisin inbalance may be caused by activating expression of bcl-2 proto-oncogene protein and inhibiting expression of Caspase-3 protein through Wnt/β-Catenin passageway in human gastric cancer line SGC7901.

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

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,细胞凋亡及其调控基因异常是肿瘤发生的重要机制之一,也是细胞表现出恶性表型的重要原因之一[1]。在胃癌细胞中 Wnt/β-Catenin 途径中 β-连环蛋白的正负性调节是否调控 Caspase-3 凋亡基因及 Bcl-2 原癌基因蛋白的表达,进而调节细胞的增殖与凋亡,目前尚未见报道。本文采用吲哚美辛干预人胃癌细胞系SGC7901 中 β-Catenin 表达,并用逆转录-聚合酶链反应技术

作者介绍:王 颢(1980-),男,硕士,
研究方向:胚泡着床和肿瘤相关机制的研究。
通讯作者:杨 戎,女,副教授,E-mail:yangrong3636@yahoo.com.cn。

维普资讯 http://www.cqvip.com

观察 Caspase-3 及 Bcl-2 凋亡基因蛋白表达水平的变化，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 SGC7901 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

四甲基偶氮唑盐(MTT)、吲哚美辛、二甲基亚砜(DMSO)均购自美国 sigma 公司；新生牛血清和 RPMI1640 均购自美国 Gibco 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、100U/ml 青霉素和 100U/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 2～3d 用 0.25%胰蛋白酶消化传代 1 次。

1.4 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 50、100、200μmol/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 72h。试验终止前 4h，每孔加入 MTT 液 20μl(5mg/ml)，继续培养 4h 后去除每孔溶液，加入 DMSO150μl/ 孔，振荡 10min 后用自动酶标仪在 490nm 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。

1.5 RT-PCR 方法

1.5.1 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 瓶加入终浓度 200μmol/L 吲哚美辛的培养液(吲哚美辛干预组)，培养 24h 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。

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

1.5.3 RT-PCR 两步法　逆转录：取总 RNA 4μl、20pmol/μl Oligo(dT)1μl，70℃反应 10min 后冰上冷却 10min。然后冰上依次加样：dNTP 混合物(dATP、dUTP、dCTP、dGTP 各 10mmol/L)4μl、10×RT buffer 2μl、RNA 酶抑制剂(50U/μl)0.5μl、RT007 AMV 逆转录酶(10U/μl)0.5μl、RNase free water 8μl，总体反应体积 20μl，42℃反应 60min，99℃反应 5min，所得 cDNA 作 PCR。

PCR：反应体系为 cDNA4μl，10×PCR buffer 5μl、dNTP 混合物(dATP、dUTP、dCTP、dGTP 各 10mmol/l)1μl，上游引物(20pmol/μl)1μl、下游引物(20pmol/μl)1μl、Taq 酶(5U/μl)0.5μl、ddH_2O 37.5μl，总体反应体积 50μl。β-Catenin 扩增条件为：①94℃2min；②94℃30s，58℃30s，72℃1min，36 个循环；③72℃10min。Caspase-3 扩增条件为：①94℃2min；②94℃30s，54℃30s。72℃1min，36 个循环；③72℃10min。Bcl-2 扩增条件为：①94℃2min；②94℃ 30s，54℃30s，72℃1min，36 个循环；③72℃10min。

1.5.4 电泳及结果分析　产物各取 10μl 加 2μl 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-3 和 Bcl-2 相对表达强度(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。

2 结　果

2.1 吲哚美辛对 SGC7901 细胞增殖的影响

根据不同浓度的吲哚美辛对 SGC7901 胃癌细胞生长的抑制率(图 1)，可看出吲哚美辛在浓度为

表 1　引物序列

引物名称		序列	产物长度
β-Catenin	上游引物	5'-CCAGACTTTGGGTCGTGATTTCC-3'	477bp
	下游引物	5'-TATTGATCCGATGGCACCTCCTC-3'	
Caspase-3	上游引物	5'-CGGAAGGAGGACGTGGAGATG-3'	392bp
	下游引物	5'-GTGCCGTTGGCGTGGAAGT-3'	
Bcl-2	上游引物	5'-GATGGCAAATGACCAGCAGA-3'	348bp
	下游引物	5'-TGGCAGGATAGCAGCACAGG-3'	
H-GDPDH	上游引物	5'-TGGACCTGACCTGCCGTCTA-3'	149bp
	下游引物	5'-GCAGTGGGTGTCGCTGTTGA-3'	

维普资讯 http://www.cqvip.com

50μmol/L 时作用 24h 对人胃癌 SGC7901 细胞抑制效果不明显(抑制率 6.5%),而浓度为 50μmol/L 时作用 48、72h 和浓度为 100 及 200μmol/L 时作用 24、48、72h 对胃癌细胞的凋亡诱导作用明显。由此我们推测吲哚美辛以时间、浓度依赖性方式抑制胃癌 SGC7901 细胞生长,其抑制率呈浓度和时间依赖性。

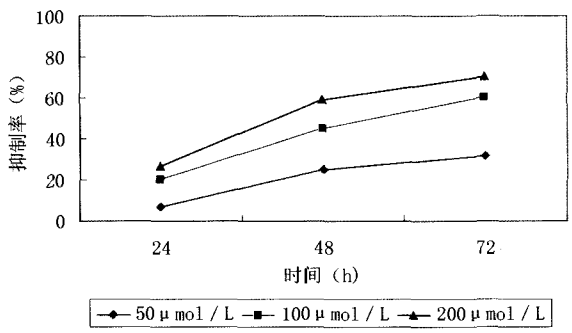


图 1 不同浓度的吲哚美辛对 SGC7901 胃癌细胞生长的抑制率的比较

2.2 RT-PCR 产物定性与半定量分析

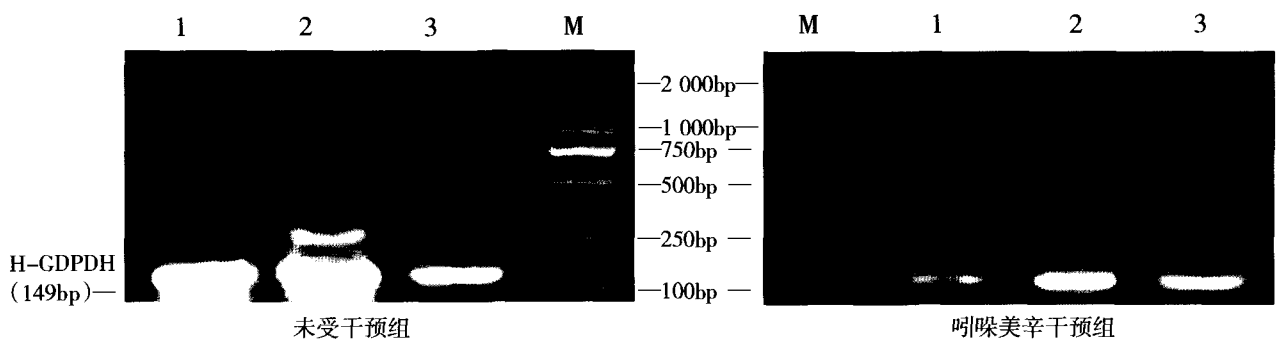
β-Catenin、Caspase-3、Bcl-2 与 β-action mRNA 的 RT-PCR 产物与理论长度相一致(图 2)。未受干预组 β-Catenin、Caspase-3、Bcl-2 的相对表达值分别为 0.112±0.040、0.257±0.076 和 0.124±0.072。吲哚美辛干预组 β-Catenin、Caspase-3、Bcl-2 的相对表达值分别为 0.071±0.025、0.146±0.014 和 0.232±0.059。从实验结果可见:吲哚美辛干预组较未受干预组呈现出伴随 β-Catenin 表达水平降低($P<0.05$),Bcl-2 表达下调($P<0.05$),而 Caspase-3 的表达上调($P<0.05$)的趋势。

3 讨 论

目前已知凋亡基因 Caspase-3 以及原癌基因 Bcl-2 是细胞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[2]。研究 Wnt 信号转导途径发现,其中 Wnt/β-Catenin 途径中,β-Catenin 是此信号途径的关键信号分子。Wnt 信号通过一系列酶促瀑布反应,最终抑制 β-Catenin 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。

Wnt 信号通路在调节细胞生长、分化及胚胎发育过程中起重要作用。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缺乏 Wnt 信号,大部分 β-Catenin 都连接在由细胞膜向胞内伸出的 E-cadherin 分子上,调节细胞间粘附。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,复合体中的酪蛋白激酶 1α 可使 β-Catenin 的丝氨酸(Ser)45 残基磷酸化,后者有助于 GSK-3β 对 β-Catenin 的 Ser33/37、苏氨酸(Thr)41 残基磷酸化,磷酸化后的 β-Catenin 被泛素-蛋白酶体泛素化和降解。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,cyclin D1 的表达[3]。在某些肿瘤细胞的细胞中存在着异常的 Wnt 信号,当 Wnt 蛋白与细胞膜上卷曲蛋白和辅助性受体 LRP5/6 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 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活下游基因的转录[4,5],导致细胞增殖加快和凋亡抵抗。

采用 MTT 研究发现,50μmol/L 吲哚美辛与胃



1. β-Catenin; 2. Bcl-2; 3. Caspase-3

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

维普资讯 http://www.cqvip.com

癌细胞作用48h可诱导胃癌细胞的凋亡,在100μmol/L和200μmol/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。所以我们推测吲哚美辛可能通过增加细胞APC和E-cadherin蛋白的表达,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;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]。

细胞增殖和凋亡是受众多基因参与调控的过程。Caspase是一类促凋亡蛋白,其作用主要是促进细胞凋亡。Caspase引起细胞凋亡的途径通常为死亡受体接受死亡信号,最终刺激Caspase-3经蛋白水解作用激活成活化形式。Caspase-3属于天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶,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因子之一[7],它被合成后通常以非活化的酶原形式存在于细胞中,激活的Caspase-3能使许多与细胞结构、细胞周期及DNA修复等相关蛋白或激酶失活,从而使细胞凋亡[8]。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[9]。抗凋亡蛋白Bcl-2是细胞凋亡调控机制中的另一关键性蛋白,具有抑制细胞凋亡的发生,延长细胞生存作用,因此称它为细胞长寿基因[10]。Bcl-2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基因蛋白能够降低凋亡诱导因子活性,对凋亡有抑制作用[11]。

我们采用人为干预并用RT-PCR技术研究发现:在吲哚美辛诱导SGC7901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的mRNA表达上调($P<0.05$)。由此提示正常非增殖状态的细胞凋亡可能是通过Wnt/β-Catenin通路中β-Catenin被泛素-蛋白酶体泛素化和降解。使原癌基因bcl-2的转录受一定程度的抑制或不被激活,则其抑制凋亡诱导因子作用不明显。凋亡诱导因子增强Caspase-3的活性,促使抗凋亡蛋白与促凋亡蛋白的比例构成了凋亡比例,最终启动细胞凋亡的程序,表现为细胞增生抑制以及凋亡发生。

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,下调凋亡诱导因子作用,抑制Caspase-3的活性或拮抗其功能,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。肿瘤发生过程中Wnt/β-Catenin通路对细胞凋亡调节机制的研究为今后开发更多选择性强、高效低毒作用、多靶点的抗癌药物提供了理论依据,为人类战胜癌症提供了新的希望。

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 preneo plastic lesion[J]. Int J MolMed,2000;5(5):473-476.

[2] Robertson CS,Crocker SJ,Nicholson DW,et al.Neuroproteetion by the inhibition of apoptosis[J]. Brain Pathol,2000;10(2):283-292.

[3] 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.

[4] Ding XZ,Tong WG,Adrian TE,et al. Blockade of cyclooxygenase-2 inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells[J]. Anticancer Res,2000;20(2):262.

[5] 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.

[6] 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.

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

[8] Li YH,Wang C,Meng K,et al.Influence of survivin and caspase-3 on cell apoptosis and prognosis in gastric carcino ma.World [J]. Gastroenterol,2004;10(4):1984-1988.

[9] Wolf BB,Schuler M,Echeverri F,et al.caspase-3 is the primary activator of apoptotie DNA fragmentation via DNA fragment factor45/inhibitot of caspase activated DNase actlvation[J]. Bio Chem,1999;274(43):30651-30656.

[10] Konturek PC,Konturek SJ,Sulekova Z,et al. Expression of hepatocyte growth factor,transforming growth factor alp ha,apoptosis related proteins bax and bcl-2,and gastrin in human gastric cancer [J]. Aliment Pharm acol Ther,2001;15(5):989-999.

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

(责任编辑:冉明会)