DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.07.010
584 第26卷第7期 2004年4月 第三军医大学学报 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Vol. 26, No. 7 Apr. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)07-0584-03

# 胃癌细胞NF-κB和survivin的表达对TRAIL抗瘤作用的影响

杨柳芹,房殿春 (第三军医大学西南医院全军消化内科中心,重庆 400038)

提 要:目的 探讨胃癌细胞NF-κB和survivin的表达对TRAIL抗瘤作用的影响。方法 应用细胞培养和流式细胞仪检测的方法,观察胃癌细胞SGC-7901、MKN28、AGS、MKN45经TRAIL作用后细胞凋亡率,Western blot方法分析四种胃癌细胞中NF-κB和survivin的表达。结果 TRAIL300 ng/ml作用于胃癌细胞24 h后,胃癌细胞MKN28、MKN45、AGS和SGC-7901的凋亡率分别为36.05%、20.27%、16.50%和11.80%。Western blot结果显示SGC-7901细胞NF-κB、survivin的表达均高于MKN28细胞的表达。结论 TRAIL具有选择性诱导肿瘤细胞凋亡的特性,肿瘤细胞对TRAIL的耐药现象,可能与凋亡抑制因子survivin和NF-κB的表达有关。

关键词:胃癌细胞;TRAIL;细胞凋亡;NF-κB;survivin
中图法分类号:R392.11;R73-36;R735.2 文献标识码:A

# Effects of expressions of NF-κB and survivin on anti-tumor activity of TRAIL in gastric carcinoma cells

YANG Liu-qin, FANG Dian-chun (Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: Objective To investigate the effects of expressions of NF-κB and survivin on the anti-tumor activity of TRAIL in gastric carcinoma cells. Methods Gastric carcinoma cells were cultured in RPMI-1640. The apoptotic rates of gastric carcinoma cells SGC-7901, MKN28, AGS, and MKN45 after treatment with TRAIL were analyzed by flow cytometry. The expressions of NF-κB and survivin in the 4 gastric carcinoma cells were determined by Western blotting. Results At 24 h after gastric carcinoma cells exposed to TRAIL at the dose of 300 ng/mL, the apoptosis percentages were 36.05% for MKN28, 20.27% for MKN45, 16.50% for AGS, and 11.80% for SGC-7901. Western blotting showed that expressions of NF-κB and survivin were lower in MKN28 than those in MKN45, AGS and SGC-7901. Conclusion The anti-tumor sensitivity of TRAIL to gastric carcinoma cells is related to the expressions of NF-κB and survivin.

**Key words**: gastric cancer; TRAIL; apoptosis; NF-κB; survivin

肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL)是肿瘤坏死因子家族的成员之一,与FasL具有高度同源性,又名Apo2L[1,2]。TRAIL能诱导大多数肿瘤细胞发生凋亡而对正常细胞无细胞毒性[3,4]。研究表明不同肿瘤,甚至同种肿瘤的不同类型,对TRAIL的敏感性有显著的不同[5]。关于胃癌细胞株对TRAIL的反应是否存在着不同,尚少见到相关报道。NF-κB是一种重要的核转录因子,参与炎症、免疫、细胞增殖和凋亡等多种生理和病理过程。研究表明,NF-κB在肿瘤的抗凋亡机制中起关键性作用,抑制肿瘤细胞NF-κB的活性将引起肿瘤细胞凋亡,从而抑制肿瘤细胞的生长[6,7]。Survivin是凋亡抑制蛋白家族中的新成员,是迄今发现的最强的凋亡抑制因子。细胞凋亡的抑制与恶性肿瘤的发生发展以及化疗不敏感有密切关系,因此研究胃癌细胞对TRAIL敏感性与NF-κB和survivin表达的关系,对揭示胃癌细胞对TRAIL的耐药机制可能有重要作用。为此本研究观察了4种胃癌细胞对TRAIL敏感性,并分析了胃癌细胞对TRAIL的不同敏感性与NF-κB和survivin表达的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

胃癌细胞株SGC-7901为本实验室保存,MKN28、MKN45、

基金项目:全军"十五"科研基金资助项目(01MA172)
Supported by the "Tenth Five-year Plan" for Sci & Tech Research of PLA (NO. 01MA172)

作者简介:杨柳芹(1975-),女,河南省漯河市人,硕士,医师,主要从事胃癌分子机制方面的研究。电话:(023)68753325

收稿日期:2003-03-10;修回日期:2003-12-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

AGS 细胞株由西安第四军医大学西京医院消化内科研究所惠赠, NC 膜购自 Santa Cruz 生物技术公司, 鼠抗人 NF-κB(p65)单克隆抗体购自北京中山公司, 鼠抗人 survivin 单克隆抗体购自 Santa cruz 生物技术公司, ECL 化学发光试剂盒购自北京鼎国生物技术中心, HRP-兔抗鼠 IgG 购自北京中山公司, TRAIL 蛋白由本实验室制备[8]。

### 1.2　方法

1.2.1　细胞培养　　胃癌细胞株 SGC-7901、MKN28、MKN45、AGS 的培养全部采用 RPMI1640 培养基+10%灭活小牛血清, 其中加入青霉素、链霉素终浓度 100 U/ml, 细胞传代采用 0.25%胰酶+0.02%EDTA, 每 3~5 d 传代 1 次。

1.2.2　细胞标本的制备　　取对数生长期细胞, 其中 SGC-7901 细胞 5 瓶、MKN28 细胞 5 瓶, MKN45 细胞 5 瓶, AGS5 瓶(均为 100 ml 细胞培养瓶), 分别加入 TRAIL 终浓度为 50、100、200、300 ng/ml, 同时设置对照组加入等体积的 RPMI1640 培养基, 细胞培养箱中 37 ℃、5%$CO_2$、饱和湿度条件下静置培养 24 h。

1.2.3　细胞凋亡检测　　采用流式细胞光度术。消化收集全部细胞, PBS 洗涤 2 次, 0.1 ml PBS 悬浮细胞沉淀, 并转移入 1.0 ml 预冷的 70%乙醇中固定 24 h, PI 染色, 上机检测。

1.2.4　NF-κB 和 survivin 的检测　　采用 Western blot 方法。细胞中蛋白的提取采用溶菌酶法破裂细胞, 蛋白浓度的检测采用 Lowry 方法。用 PBS 调整蛋白浓度一致, 将蛋白样品与中分子量蛋白 Marker 于 100 ℃加热 3 min, 使蛋白变性, 蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离后, 用湿式转移法 100 V、2 h 转移至硝酸纤维素膜上, 膜用丽春红 S 染色, 确定蛋白已转移成功, 5%脱脂奶粉-PBS-T 溶液封闭 1 h, PBS-T 溶液洗涤 15 min×3 次, 与鼠抗人 NF-κB 和 survivin 单克隆抗体(1∶1 000)溶液共同孵育 1 h, PBS-T 溶液洗涤 15 min×3 次, 然后再与兔抗鼠 IgG(1∶1 000)溶液共同孵育 1 h, 洗膜 3 次, 将膜与化学发光试剂孵育 5 min, 暗室中曝光至医用 X 线胶片上, 洗片观察。

### 1.3　统计学分析

采用 SPSS 统计软件对数据进行 $\chi^2$ 检验。

## 2　结果

### 2.1　TRAIL 对胃癌细胞的凋亡诱导作用

TRAIL 对胃癌细胞均有一定程度的凋亡诱导作用, 且这种作用呈剂量依赖性。TRAIL 对胃癌细胞的凋亡诱导作用见图 1。由图 1 可见 AGS、MKN28、MKN45 和 SGC-7901 四种胃癌细胞对 TRAIL 的敏感性不尽相同, 其中以 MKN28 细胞最为敏感, 经 300 ng/ml TRAIL 作用 24 h 后, 共有 36.05%的细胞发生凋亡。MKN45 细胞的敏感性次之, 同样条件下细胞凋亡率为 20.27%。AGS 细胞的敏感性再次之, 同样条件下细胞凋亡率为 16.50%。SGC-7901 细胞对 TRAIL 最不敏感, 经 300 ng/ml TRAIL 作用 24 h 后, 仅能诱导 11.80%细胞发生凋亡, 提示 SGC-7901 对 TRAIL 有耐受现象。统计学结果显示, MKN28 细胞的凋亡率显著高于其他 3 种细胞($P<0.05$), 而其他细胞间则无统计学差别($P>0.05$)。

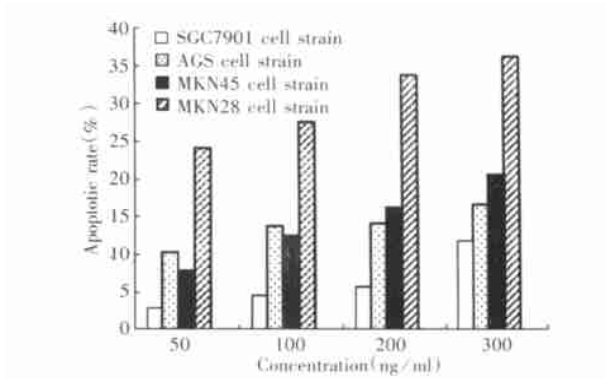



图 1　胃癌细胞株用不同剂量 **TRAIL** 作用 **24 h** 后细胞凋亡率

**Fig 1　Apoptosis of gastric carcinoma cells induced by TRAIL**

### 2.2　胃癌细胞 NF-κB 的表达

胃癌细胞 MKN28、SGC-7901、AGS、MKN45 细胞 NF-κB(P65)的表达见图 2。由图 2 可见, MKN28 细胞中 NF-κB 的表达低于 SGC-7901 细胞, MKN45、AGS 细胞中 NF-κB 的表达无明显差异。




图 2　胃癌细胞 **NF-κB** 的表达

**Fig 2　Expression of NF-κB in different gastric carcinoma cells**

### 2.3　胃癌细胞 survivin 的表达

用药前采用 Western blot 方法检测了 4 种细胞 survivin 的表达, 结果见图 3。由图 3 可见, MKN28 细胞中 survivin 的表达低于 SGC-7901 细胞, MKN45、AGS 细胞中 survivin 的表达介于两者之间, 其中 MKN45 细胞中 survivin 的表达低于 AGS 细胞。

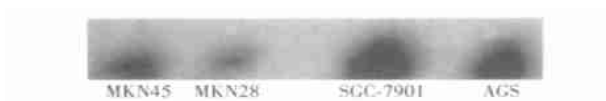



图 3　胃癌细胞 **survivin** 的表达

**Fig 3　Expression of survivin in different gastric carcinoma cells**

## 3　讨论

TRAIL 是近年来发现的新的凋亡诱导分子。因其可选择性的诱导肿瘤细胞、转化细胞、病毒感染细胞发生凋亡, 而对正常细胞无明显细胞毒性而引起人们的极大兴趣。本研究观察了 TRAIL 对 4 种胃癌细胞株 SGC-7901、AGS、MKN28 和 MKN45 的抗瘤作用, 发现 TRAIL对各种胃癌细胞均有一定程度的凋亡诱导作

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

用,且这种作用呈剂量依赖性。但4种细胞对TRAIL的反应有较大差异,其中MKN28最为敏感,在TRAIL300 ng/ml作用24 h情况下,有36.05%细胞发生凋亡,AGS、MKN45细胞对TRAIL的反应介于两者之间,在同样条件下细胞的凋亡率分别为20.27%和16.50%。以SGC-7901细胞对TRAIL最不敏感,仅诱导11.80%的细胞发生凋亡。以上结果提示不同类型胃癌细胞对TRAIL的敏感性不尽相同,其原因值得进一步研究。

细胞凋亡是基因调控下的细胞自杀行为。细胞凋亡过程受凋亡促进因子p53和Fas等,凋亡抑制因子Bcl-2、IAP和survivin等的共同调节。Survivin可直接作用于caspase,主要抑制caspase 3和caspase 7活性,阻断细胞的凋亡过程。此外survivin还可通过p21间接抑制caspase,其机制是survivin与细胞周期调控因子CDK4/p16(INK4a)复合体相互作用,使p21从CDK4的复合体中释放出来,p21进一步与线粒体caspase 3结合,抑制其活性,阻止细胞凋亡[9,10]。本研究表明,这4种胃癌细胞对TRAIL反应的差异性与细胞中survivin表达有关,即较高水平表达survivin的SGC-7901细胞对TRAIL耐受,而低水平表达survivin的MKN28细胞对TRAIL的反应比较敏感。结果提示检测胃癌细胞survivin的表达有助于判断胃癌细胞对TRAIL的敏感性,抑制胃癌survivin表达有助于提高胃癌细胞对TRAIL的敏感性[11]。

核转录因子NF-κB是另一种能调控细胞凋亡的细胞因子之一。它通过受体途径调节细胞凋亡。细胞中NF-κB激活后,通过以下方面机制抑制细胞凋亡:①通过调控细胞因子的基因表达而间接抑制自身及其他细胞凋亡;②通过激活bcl-2家族中的抗凋亡基因而抑制凋亡;③在基因及蛋白表达两个水平上调控C-IAP等的表达,从而抑制caspase 8的活化,阻止凋亡的发生[12,13]。体外实验表明,由化疗和放疗激活的NF-κB的转录是诱导肿瘤对化疗产生耐药性的主要机制,而抑制NF-κB的转录则可促进肿瘤细胞发生凋亡。本研究表明,4种胃癌细胞对TRAIL反应的差异性与NF-κB的表达有关,即较高水平表达NF-κB的SGC-7901细胞对TRAIL耐受,而较低水平表达NF-κB的MKN28细胞对TRAIL的反应比较敏感。由此我们认为胃癌细胞对TRAIL的耐药性的产生可能与NF-κB的表达有关,而抑制胃癌细胞NF-κB的表达可能会提高其对TRAIL的敏感性。

以上表明,TRAIL具有选择性诱导肿瘤细胞凋亡的特性,肿瘤细胞对TRAIL的耐药现象,可能与凋亡抑制因子survivin和NF-κB的表达有关,而抑制survivin和NF-κB的活性可能会提高胃癌细胞对TRAIL的敏感性,值得进一步研究。

参考文献:


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

[2] Pitti R M, Marsters S A, Ruppert S, *et al*. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family[J]. J Biol Chem, 1996, 271(22): 12687-12690.

[3] Walczak H, Miller R E, Ariail K, *et al*. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand *in vivo*[J]. Nat Med, 1999, 5(2): 157-163.

[4] Ashkenazi A, Pai R C, Fong S, *et al*. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand[J]. J Clin Invest, 1999, 104(2): 155-162.

[5] Nakamura M, Rieger J, Weller M, *et al*. Apo2L/TRA2L expression in human brain tumors[J]. Acta Neuropathol (Berl), 2000, 99(1): 1-6.

[6] Dalen H, Neuzil J. Alpha-tocopheryl succinate sensitises a T lymphoma cell line to TRAIL-induced apoptosis by suppressing NF-kappaB activation[J]. Br J Cancer, 2003, 88(1): 153-158.

[7] Biswas D K, Martin K J, McAlister C, *et al*. Apoptosis caused by chemotherapeutic inhibition of nuclear factor-kappaB activation[J]. Cancer Res, 2003, 63(2): 290-295.

[8] 李小安, 房殿春, 杨仕明, 等. TRAIL蛋白的表达、纯化和抗肿瘤活性[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(9): 1058-1060.

[9] Suzuki A, Hayashida M, Ito T, *et al*. Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16(INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation[J]. Oncogene, 2000, 19(29): 3225-3234.

[10] Conway E M, Pollefeyt S, Steiner M M, *et al*. Deficiency of survivin in transgenic mice exacerbates Fas-induced apoptosis via mitochondrial pathways[J]. Gastroenterology, 2002, 123(2): 619-631.

[11] Wall N R, O'Connor D S, Plescia J, *et al*. Suppression of survivin phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis[J]. Cancer Res, 2003, 63(1): 230-235.

[12] Wang C Y, Guttridge D C, Mayo M W, *et al*. NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(9): 5923-5929.

[13] Sosic D, Richardson J A, Yu K, *et al*. Twist regulates cytokine gene expression through a negative feedback loop that represses NF-kappaB activity[J]. Cell, 2003, 112(2): 169-180.


(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net