

肿瘤坏死因子对不同分化程度胃癌细胞增殖及 $\Delta 133p53$ 表达的影响

张娜¹, 季万胜², 杨炳乾¹, 张红梅², 仲华², 高志星²
(1. 潍坊医学院, 山东 潍坊 261042; 2. 潍坊医学院附属医院, 山东 潍坊 261031)

摘要: [目的] 探讨肿瘤坏死因子(rmhTNF)对低分化人胃癌细胞株 MKN45 和中分化人胃癌细胞株 SGC7901 细胞增殖及对细胞中 p53 异构体 $\Delta 133p53$ 表达的影响。[方法] 不同浓度注射用重组结构人 rmhTNF (0、50IU/ml、100IU/ml、500 IU/ml) 作用于人胃癌细胞株 MKN45 和 SGC7901。采用 CCK8 法检测细胞增殖抑制率; 巢式逆转录多聚酶链反应 (nRT-PCR) 检测 $\Delta 133p53$ 及下游分子 PTEN 在 mRNA 水平的表达情况。Pearson 直线相关分析 $\Delta 133p53$ 与 PTEN mRNA 表达的相关性。[结果] CCK8 法结果显示, rmhTNF 对 MKN45 胃癌细胞株的生长有显著的增殖抑制作用 ($H=15.434, P=0.001$), 实验组细胞 (50IU/ml、100IU/ml、500 IU/ml) 的增殖抑制率分别为 26.2%、33.62%、48.49%。rmhTNF 对 SGC7901 胃癌细胞株的生长无明显增殖抑制作用, 实验组细胞的增殖抑制率分别为 4.02%、4.63% 和 2.68%。nRT-PCR 结果显示, 随 rmhTNF 浓度的增加, MKN45 胃癌细胞株中 $\Delta 133p53$ 在 mRNA 水平的相对表达量减少, PTEN 的相对表达量增加, 差异均有统计学意义 ($H=10.385, P=0.016$)。SGC7901 胃癌细胞株中无 $\Delta 133p53$ 表达, PTEN 的表达不随 rmhTNF 浓度的变化而变化。MKN45 胃癌细胞株中 $\Delta 133p53$ 与 PTEN 的表达呈负相关 ($r=-0.958, P<0.01$)。[结论] rmhTNF 对胃癌细胞的抑制作用与 $\Delta 133p53$ 异构体参与的 TNF-NF- κ B 和 p53-PTEN 信号传导途径的交互作用有关, 提示 $\Delta 133p53$ 异构体可能是胃癌分子诊断和生物学治疗的重要靶分子之一。

关键词: 肿瘤坏死因子; 胃癌; p53 异构体; $\Delta 133p53$; PTEN

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2015)04-0335-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2015.04.A017

The Effect of Tumor Necrosis Factor(rmhTNF) on Proliferation and $\Delta 133p53$ Expressions in Gastric Cancer Cells with Various Grades

ZHANG Na¹, JI Wan-sheng², YANG Bing-qian¹, et al.

(1. Weifang Medical College, Weifang 261042, China; 2. The Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang 261031, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of tumor necrosis factor on proliferation and $\Delta 133p53$ expression in human poorly differentiated gastric carcinoma cell line MKN45 and middle differentiated gastric carcinoma cell line SGC7901. [Methods] The different concentrations of rmhTNF (0, 50 IU/ml, 100 IU/ml, 500 IU/ml) effected on the gastric carcinoma cell lines MKN45 and SGC7901. The growth inhibitory effect of rmhTNF on human gastric carcinoma cell lines was observed by CCK8 assay. The expression of p53 isoform $\Delta 133p53$ and p53 downstream molecule PTEN on the mRNA level was detected by nested reverse transcription polymerase chain reaction (nRT-PCR). The relationship between $\Delta 133p53$ and PTEN mRNA was analyzed by Pearson linear analysis. [Results] In CCK8 assay, it was shown that the MKN45 gastric carcinoma cell line were significantly inhibited by rmhTNF, with significant difference ($H=15.434, P=0.001$); the growth inhibitory effect of experiment cell groups (50IU/ml、100IU/ml、500 IU/ml) was 26.2%、33.62% and 48.49% respectively. The SGC7901 gastric carcinoma cell line was not inhibited by rmhTNF, and the growth inhibitory effect of experiment cell group was 4.02%、4.63% and 2.68% respectively. nRT-PCR results showed that with the rmhTNF concentration increased, the expression of $\Delta 133p53$ were gradually decreased and the expression of PTEN were gradually increased on mRNA levels in the MKN45 gastric carcinoma cell line ($H=10.385, P=0.016$). There was no $\Delta 133p53$ expression in SGC7901 gastric carcinoma cell line and the PTEN's relative expression was no significant change. The $\Delta 133p53$ mRNA expression was negatively related to PTEN mRNA expression in MKN45 gastric carcinoma cell line ($r=-0.958, P<0.01$). [Conclusion] The inhibitory effect of rmhTNF to gastric carcinoma was associated with the cross-talk between TNF-NF- κ B and p53-

收稿日期: 2014-07-22; 修回日期: 2014-09-22

通讯作者: 季万胜, E-mail: jiwsh@wfmc.edu.cn

PTEN pathway, in which $\Delta 133p53$ isoform plays a pivotal role. The result indicated that the $\Delta 133p53$ isoform might be an important target molecular for the molecular diagnosis and biological therapy of gastric carcinoma.

Key words: tumor necrosis factor; gastric carcinoma; p53 isoforms; $\Delta 133p53$; PTEN

胃癌是发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一^[1,2], 迄今为止尚未发现可用于分子诊断和生物学治疗的靶标。p53是最早发现的抑癌基因, 约半数胃癌患者存在该基因的突变。然而, 这些突变缺乏特异性, 对临床工作的指导价值有限。最近发现的 p53 异构体带来新的希望, 已经确认的异构体包括 p53、p53 β 、p53 γ 、 $\Delta 133p53$ 、 $\Delta 133p53\beta$ 、 $\Delta 133p53\gamma$ 、 $\Delta 40 p53$ 、 $\Delta 40 p53\beta$ 、 $\Delta 40 p53\gamma$ 、 $\Delta 160 p53$ 、 $\Delta 160 p53\beta$ 、 $\Delta 160 p53\gamma$ 等 12 种异构体, 并证实它们具有调节 p53 功能的作用^[3,4], 其中 $\Delta 133p53$ 在研究中证实与慢性炎症, 特别是与慢性炎症向肿瘤方向演化有关, 主要是通过调节慢性炎症基因 NF- κ B 通路^[5]。TNF- α 可以激活 NF- κ B 并诱导 PTEN 的表达^[6,7]。我们前期工作发现胃癌组织中 $\Delta 133p53$ 可以通过调节 p53 的活性, 并以 p53 为中介, 影响 PTEN-MDM2-p53 网络环路中的 PTEN 蛋白的表达, 胃癌患者表达 p53 呈现不同的状态, 异构体的改变可能也是胃癌发生的重要机制^[8,9]。本研究通过观察注射用重组结构人肿瘤坏死因子 (rmhTNF) 对 $\Delta 133p53$ 异构体不同表达状态的两株胃癌细胞的作用, 初步探讨 $\Delta 133p53$ 作用机制, 为可能的生物学治疗和分子诊断提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人胃癌细胞株 MKN45 和 SGC7901 由第四军医大学馈赠, 胎牛血清为杭州四季青生物工程公司产品; Hyclone 改良型 RPMI-1640 培养基为济南凯晨生物技术有限公司产品; 注射用重组结构人肿瘤坏死因子, 为上海唯科生物制药有限公司产品, 批号 20130401; CCK8 为上海翊圣生物科技有限公司产品; Trizol 试剂、M-MULV 第一链 cDNA 合成试剂盒、PCR 引物为上海生工生物技术有限公司产品; PCR 扩增试剂盒为大连宝生物产品。

1.2 细胞培养

细胞培养于 RPMI-1640 培养基 (含体积分数 10% 的胎牛血清、100U/ml 青链霉素) 中, 置于 5%

CO₂, 37℃ 饱和湿度的湿度培养箱内。用 0.25% 胰蛋白酶消化传代培养, 2~3d 传代 1 次, 取处于对数生长期细胞用于实验。

1.3 CCK8 法测定胃癌细胞增殖抑制率

取对数生长期的细胞以每孔 5×10^4 /ml 的细胞密度接种到洁净的 96 孔板中, 100 μ l/孔。培养 24h 后加药, 设置对照组及实验组, 对照组 rmhTNF 浓度为 0, 实验组 rmhTNF 浓度为 50IU/ml、100IU/ml、500IU/ml, 每组设 5 个复孔, 边缘孔加入无菌的 PBS。在 37℃、5% 的 CO₂ 培养箱中孵育 24h 后向每孔加入 10 μ l CCK8 溶液。将 96 孔板在培养箱内孵育 1h 后用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度 A 值, 计算抑制率 = $(1 - \text{药物组 } A_{450} / \text{对照组 } A_{450}) \times 100\%$ 。

1.4 人胃癌细胞系中 $\Delta 133p53$ 、PTEN mRNA 表达水平检测

取对数生长期的细胞, 加入 0、50IU/ml、100IU/ml、500IU/ml 的 rmhTNF, 培养 24h 后收集细胞, 按 Trizol 试剂盒说明, 提取细胞总 RNA, 紫外分光光度仪测纯度和浓度。按逆转录试剂盒说明, 逆转录合成 cDNA, 以 β -肌动蛋白 (β -actin) 作为内参照, 进行 PT-PCR 扩增。PCR 仪中反应条件为: 94℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 30s, 54~58℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 35 个循环; 72℃ 延伸 7min。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 恒压 100V, 电泳 20min, 紫外投射仪下观察结果并拍照。引物序列及片段长度见 Table 1。

1.5 统计学处理

应用 SPSS17.0 软件, 各组实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间的差异比较用秩和检验, 两变量间相关性采用 Pearson 直线相关分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 rmhTNF 对胃癌细胞增殖的影响

不同浓度的 rmhTNF (0、50IU/ml、100IU/ml、500IU/ml) 作用于两胃癌细胞株 24h 后, 细胞增殖情况见 Table 2、Figure 1, 可见随 rmhTNF 浓度的增加, 其

对 MKN45 胃癌细胞株的生长有显著的增殖抑制作用,差异具有统计学意义 ($H=15.434, P=0.001$); 实验组细胞的增殖抑制率分别为 26.2%, 33.62% 和 48.49%。随 rmhTNF 浓度的增加,其对 SGC7901 胃癌细胞株的生长无明显增殖抑制作用 ($H=0.291, P=0.962$); 实验组细胞的增殖抑制率分别为 4.02%, 4.63% 和 2.68%。

2.2 nRT-PCR 结果

不同浓度的 rmhTN (0, 50IU/ml, 100IU/ml, 500 IU/ml) 作用于两胃癌细胞株 24h 后, $\Delta 133p53$ 、PTEN 在 mRNA 水平上的表达情况见 Table 3, 4, Figure 2, 3。MKN45 细胞株中 $\Delta 133p53$ 的表达随 rmhTNF 浓度的增加呈下降趋势, PTEN 的表达随 rmhTNF 浓度的增加呈上升趋势, 差异均有统计学意义 ($H=10.385, P=0.016$)。SGC7901 胃癌细胞株中无 $\Delta 133p53$ 表达, PTEN 的表达不随 rmhTNF 浓度的变化而变化 ($H=1.119, P=0.772$)。

2.3 MKN45 细胞中 $\Delta 133p53$ 、PTEN mRNA 表达的相关性

在 MKN45 胃癌细胞株中 $\Delta 133p53$ 与 PTEN mRNA 的表达呈负相关 ($r=-0.958, P<0.01$)。见 Table 4。

3 讨论

$p53$ 抑癌基因的功能失活在胃癌的发生发展过程中起重要作用, $p53$ 异构体的发现为胃癌发生机制的研究提供了新方向。 $p53$ 剪接异构体能够在人类正常组织和多种不同类型的肿瘤中表达, 并且具有组织特异性, 异构体的这些差异性表达可能与很多肿瘤的发生、发展密切相关^[10-14]。近年来有关 $p53$ 剪接异构体和人类肿瘤关系的研究不断增多, 但是关于各个异构体的生物学功能、

Table 1 The sequence and length of primer

Primer	Sequence (5'-3')	Length (bp)
$\Delta 133p53$		
1 st		-
Upstream	CTGAGGTGTAGACGCCAACTCTCTCTAG	
Downstream	AATGTCAGTCTGAGTCAGGCCCTTCTGTC	
2 nd		750
Upstream	GCTAGTGGGTTGCAGGAGGTGCTTACAC	
Downstream	CTCACGCCACGGATCTGA	
PTEN		
Upstream	AGTTCCTCAGCCGTTACCT	436
Downstream	GGATCAGAGTCAGTGGTGTCTAG	
β -actin		
Upstream	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA	539
Downstream	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC	

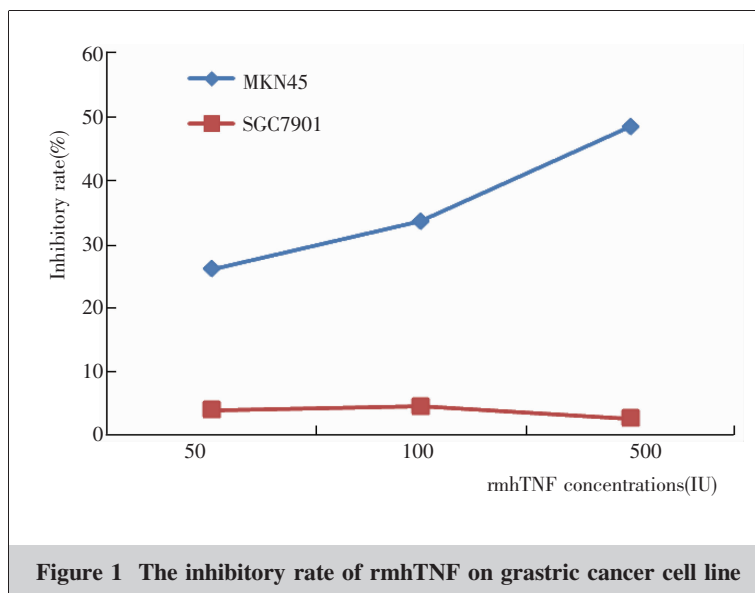


Figure 1 The inhibitory rate of rmhTNF on gastric cancer cell line

Table 2 Effect of rmhTNF on proliferation of MKN45 and SGC7901 cells

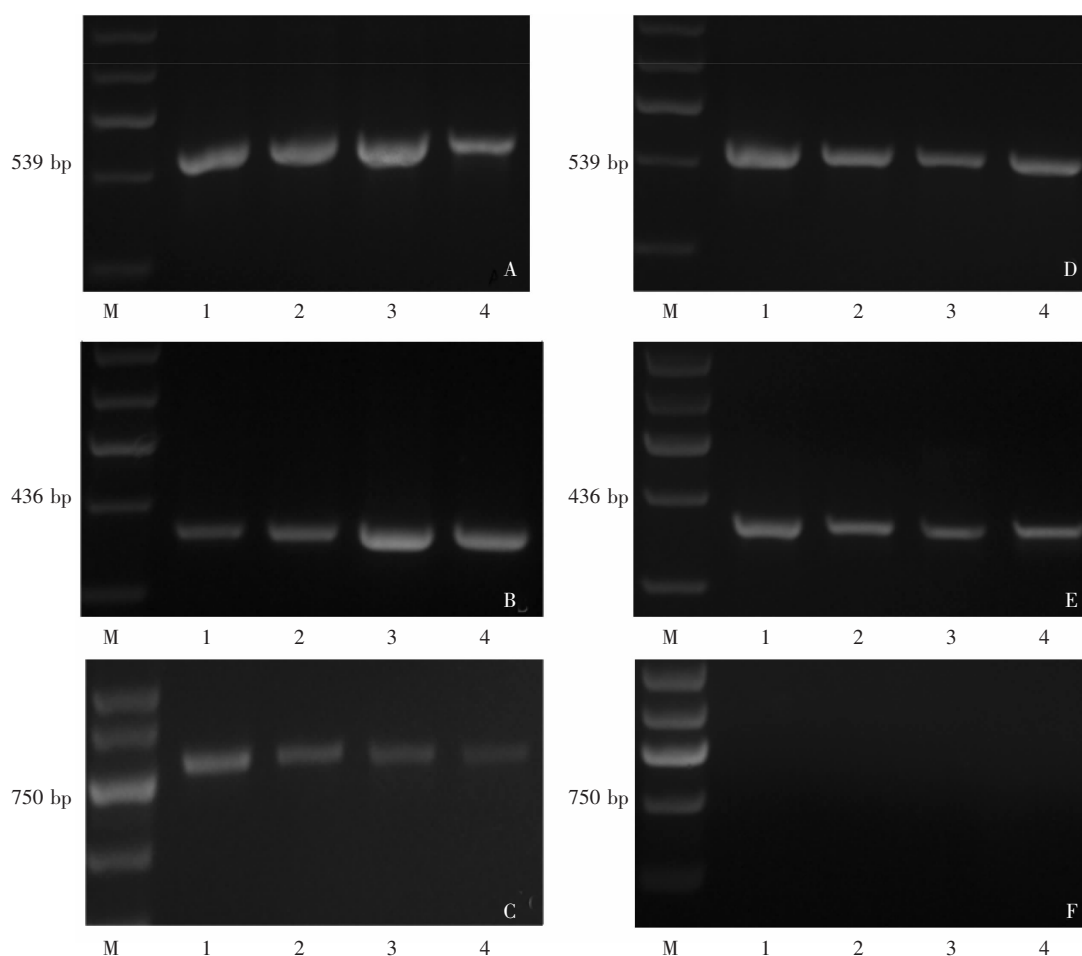
Cell line	0	50IU	100IU	500IU	H	P
MKN45	0.827±0.053	0.611±0.049	0.549±0.091	0.426±0.085	15.434	0.001
SGC7901	0.971±0.163	0.932±0.176	0.926±0.146	0.945±0.105	0.291	0.962

Table 3 The expression of $\Delta 133p53$ 、PTEN mRNA in MKN45 cells

Index	0	50IU	100IU	500IU	H	P
$\Delta 133p53$	0.654±0.035	0.461±0.043	0.290±0.019	0.230±0.040	10.385	0.016
PTEN	0.301±0.029	0.465±0.045	0.817±0.044	0.979±0.045	10.385	0.016

Table 4 The expression of $\Delta 133p53$ 、PTEN mRNA in SGC7901 cells

Index	0	50IU	100IU	500IU	H	P
$\Delta 133p53$	0	0	0	0	-	-
PTEN	0.733±0.014	0.728±0.022	0.724±0.011	0.721±0.006	1.119	0.772



(A, DL: β -actin; B, E: PTEN, C, F: $\Delta 133p53$. A~C: MKN45 cell line; D~F: SGC7901 cell line; M: DNA marker; 1~4: the different concentrations of rmhTNF is 0, 50, 100, 500 IU.)

Figure 2 The expression of β -actin, PTEN and $\Delta 133p53$ mRNA in MKN45 and SGC7901 cells

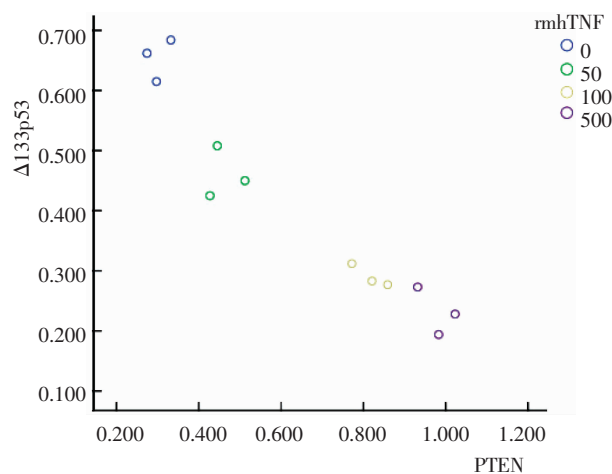


Figure 4 The relationship of $\Delta 133p53$ and PTEN mRNA expression in MKN45 cell line

异构体之间的联系以及他们与野生型 $p53$ 之间的作用机制目前尚不完全清楚。 $\Delta 133p53$ 的产生是通过对 $p53$ 基因内含子 4 上的内部启动子的选择性剪接导致氨基末端截短而表达的蛋白,其剪接发生在 133 位密码子上^[14,15]。研究显示,由于 $\Delta 133p53$ 缺乏氨基末端,对全长 $p53$ 基因有显性负调节作用,抑制 $p53$ 依赖的凋亡和 G_1 期细胞周期停滞但不抑制 $p53$ 依赖的 G_2 期细胞周期停滞^[16]。Bourdon 等^[14]研究显示,联合转染 $p53$ 和 $p53\beta$ 能轻度增强 $p53$ 介导的凋亡,而联合转染 $p53$ 和 $\Delta 133p53$ 能强烈抑制 $p53$ 介导的凋亡,并呈剂量依赖性,这表明 $p53$ 异构体能调节 $p53$ 的活性。研究显示,在人类正常成纤维细胞中, $p53\beta$ 的诱导和 $\Delta 133p53$ 的减少与复制细胞的衰老有关^[17]。最近有研究表明,

$\Delta 133p53$ 异构体有促进细胞增殖和引起炎症反应的作用,其中任意一项或两项共同作用可以促进肿瘤的形成发展^[18]。多项研究发现,许多肿瘤组织中 $\Delta 133p53$ 的表达水平增加,表明 $\Delta 133p53$ 对肿瘤的形成和发展具有重要作用^[19,20]。

PTEN 是迄今发现的第一个具有双特异磷酸酶活性的抑癌基因,*PTEN* 蛋白在细胞生长、凋亡、黏附、迁移、浸润等方面具有重要作用,其活性的缺失与人类多种疾病相关,特别是在肿瘤的发生、发展过程中极为常见。目前研究表明,*TNF- α* 诱导 *PTEN* 的表达依靠 *NF- κ B* 的活化,然而 *NF- κ B* 在 *PTEN* 表达中的作用存在争议。已经报道的在人结肠和宫颈癌细胞株中 *NF- κ B* 抑制 *PTEN* 的表达^[5],在人白血病细胞中 *NF- κ B* 促进 *PTEN* 的表达^[7]。这些不一致可能来源于其它基因的调节而导致 *PTEN* 表达的不同。

前期工作我们发现^[8,9], $\Delta 133p53$ 在胃癌、慢性萎缩性胃炎及正常胃黏膜组织中的表达率逐步下降,而 *PTEN* 表达率则逐渐上升,差异有统计学意义,相关分析显示在胃癌组织中 $\Delta 133p53$ 和 *PTEN* 呈负相关, $\Delta 133p53$ 和 *MDM2* 呈正相关,并推测出 $\Delta 133p53$ 可以通过调节 *p53* 的活性,并以 *p53* 为中介,影响 *PTEN*-*MDM2*-*p53* 网络环路中的 *PTEN*、*MDM2* 蛋白的表达,提示 *p53* 异构体 $\Delta 133p53$ 的功能和生物学效应对于理解肿瘤的发生发展及其生物学行为具有重要的价值。

本实验结果显示,*rmhTNF* 对低分化人胃癌细胞株 MKN45 的生长增殖有明显抑制作用,且随 *rmhTNF* 浓度的增加抑制率增加;对中分化胃癌细胞株 SGC7901 的生长增殖无明显抑制作用,提示 *rmhTNF* 对胃癌的治疗可能与癌细胞的分化程度有关,这为指导临床用药提供了理论基础。在 mRNA 水平上,随 *rmhTNF* 浓度的增加,在 MKN45 胃癌细胞株中 $\Delta 133p53$ 的表达量逐渐减少,*PTEN* 的表达量逐渐增加,且 $\Delta 133p53$ 与 *p53* 下游分子 *PTEN* 的表达呈负相关,而 SGC7901 胃癌细胞株不表达 $\Delta 133p53$,其 *PTEN* 的表达量无明显变化,提示 $\Delta 133p53$ 异构体可能促进 *rmhTNF* 诱导 *PTEN* 表达,也提示 *rmhTNF* 对胃癌细胞的抑制作用与 $\Delta 133p53$ 异构体参与的 *TNF*-*NF- κ B* 和 *p53*-*PTEN* 信号传导途径的交互作用有关,推断 $\Delta 133p53$ 异构体可能是胃癌分子诊断和生物学治疗的重要靶分子之一。

参考文献:

- [1] Jemal A, Bray F, Center M, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Chen WQ, Zhang SW, Zeng HM, et al. Report of cancer incidence and mortality in China, 2010 [J]. *China Cancer*, 2014, 23(1): 1-10. [陈万青, 张思维, 曾红梅, 等. 中国 2010 年恶性肿瘤发病与死亡[J]. *中国肿瘤*, 2014, 23(1): 1-10.]
- [3] Khoury MP, Bourdon JC. The isoforms of the *p53* protein [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2(3): a000927.
- [4] Marcel V, Perrier S, Aoubala M, et al. $\Delta 160p53$ is a novel N-terminal *p53* isoform encoded by $\Delta 133p53$ transcript [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(21): 4463-4468.
- [5] Wei J, Noto J, Zaika E, et al. Pathogenic bacterium *Helicobacter pylori* alters the expression profile of *p53* protein isoforms and *p53* response to cellular stresses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(38): E2543-E2550.
- [6] Vasudevan KM, Gurumurthy S, Rangnekar VM. Suppression of *PTEN* expression by *NF- κ B* prevents apoptosis [J]. *Mol Cell Bio*, 2004, 24(3): 1007-1021.
- [7] Lee YR, Yu HN, Noh EM, et al. *TNF- α* upregulates *PTEN* via *NF- κ B* signaling pathways in human leukemic cells [J]. *Exp Mol Med*, 2007, 39(1): 121-127.
- [8] Cao Y, Zhang HM, Jia FF, et al. *p53 β* expression and its biological significance in a human gastric cancer cell line interfered by 5-fluorouracil [J]. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment*, 2012, 2(6): 33-37. [曹玉, 张红梅, 贾飞飞, 等. 5-FU 对人胃癌细胞系 *p53 β* 表达影响生物学意义探讨[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2014, 21(5): 352-355.]
- [9] Jia FF, Ji WS, Cao Y, et al. The expression of *p53 β* and its biological significance induced by cisplatin on human gastric cancer cell line [J]. *Chinese Journal of Digestion and Medical Imageology (Electronic Edition)*, 2012, 2(6): 33-37. [贾飞飞, 季万胜, 曹玉, 等. 顺铂对人胃癌细胞系 *p53 β* 表达的影响及其生物学意义[J]. *中华消化病与影像杂志(电子版)*, 2012, 2(6): 33-37.]
- [10] Wei J, Zaika E, Zaika A. *p53* Family: Role of Protein Isoforms in Human Cancer [J]. *Nucleic Acids*, 2012, 2012: 687359.
- [11] Sun LT, Gou HN, Ma SY. Expressions of the *p53* isoforms in renal cell carcinoma [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2013, 40(17): 3325-3331. [孙连桃, 勾宏娜, 马淑一. *p53* 异构体在肾癌中表达的研究[J]. *现代预防医学*, 2013, 40(17): 3325-3331.]
- [12] Chambers SK, Martinez JD. The significance of *p53* isoform expression in serous ovarian cancer [J]. *Future Oncol*, 2012, 8(6): 683-686.
- [13] Bernard H, Garmy-Susini B, Ainaoui N, et al. The *p53* isoform, $\Delta 133p53\alpha$, stimulates angiogenesis and tumour progression [J]. *Oncogene*, 2013, 32(17): 2150-2160.
- [14] Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, et al. *p53* isoforms can regulate *p53* transcriptional activity [J]. *Genes Dev*, 2005, 19(18): 2122-2137.
- [15] Murray-Zmijewski F, Lane DP, Bourdon JC. *p53/p63/p73* isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress [J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(6): 962-972.
- [16] Aoubala M, Murray-Zmijewski F, Khoury MP, et al. *p53* directly transactivates $\Delta 133p53\alpha$, regulating cell fate outcome in response to DNA damage [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2011, 18(2): 248-258.
- [17] Fujita K, Mondal AM, Horikawa I, et al. *p53* isoforms $\Delta 133p53$ and *p53 β* are endogenous regulators of replicative cellular senescence [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(9): 1135-1142.
- [18] Slatter TL, Hung N, Campbell H, et al. Hyperproliferation, cancer, and inflammation in mice expressing a $\Delta 133p53$ -like isoform [J]. *Blood*, 2011, 117(19): 5166-5177.
- [19] Campbell HG, Slatter TL, Jeffs A, et al. Does $\Delta 133p53$ isoform trigger inflammation and autoimmunity? [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(3): 446-450.
- [20] Hoffstetter G, Berger A, Schuster E, et al. $\Delta 133p53$ is an independent prognostic marker in *p53* mutant advanced serous ovarian cancer [J]. *Br J Cancer*, 2011, 105(10): 1593-1599.