

rmhTNF 对 $\Delta 133p53$ 表达阳性胃癌细胞系 MKN45 的影响

姜琪琪¹, 张娜¹, 郭爱¹, 李伟¹, 张红梅², 季万胜²
(1. 潍坊医学院, 山东 潍坊 261053; 2. 潍坊医学院附属医院, 山东 潍坊 261031)

摘要: [目的] 利用 rmhTNF-MKN45 细胞模型, 观察 p53 异构体 $\Delta 133p53$ 及 p53 下游基因的表达。[方法] 不同浓度 (50, 100, 200, 400, 500 IU/ml) 重组改构人肿瘤坏死因子 (rmhTNF) 作用于 MKN45, 采用 CCK-8 法, 观察其细胞增殖抑制率; 通过巢式逆转录多聚酶链反应 (nRT-PCR 法) 检测 $\Delta 133p53$ 、p53、Gadd45 α 、PTEN、Mdm2、Bax 和 CyclinB1 mRNA 的表达变化。[结果] 随 rmhTNF 作用浓度增加和作用时间 (24, 48, 72h) 延长, MKN45 细胞抑制率明显增加 ($F=35.683, P<0.001$; $F=60.328, P<0.001$)。随 rmhTNF 浓度增加, MKN45 细胞中, p53、Gadd45 α 、PTEN、Bax 基因表达上调, $\Delta 133p53$ 、Mdm2、CyclinB1 基因表达下调。 $\Delta 133p53$ 与 p53、Gadd45 α 、PTEN、Bax 表达呈负相关 ($r=-0.916, -0.894, -0.872, -0.971, P$ 均 <0.01), 与 Mdm2、CyclinB1 表达呈正相关 ($r=0.924, 0.943, P$ 均 <0.01)。[结论] 在肿瘤生长抑制效应中, $\Delta 133p53$ 异构体表现出与野生型 p53 拮抗作用, 其机制可能与调控 Gadd45 α 、PTEN、Mdm2、Bax、CyclinB1 等下游基因表达有关。

关键词: rmhTNF; 胃癌细胞系; $\Delta 133p53$; p53

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2015)06-0524-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2015.06.A018

Effect of rmhTNF on Human Gastric Cancer Cell Lines MKN45 with $\Delta 133p53$ Status

JIANG Qi-qi, ZHANG Na, GUO Ai, et al.
(Weifang Medical College, Weifang 261053, China)

Abstract: [Purpose] To observe the expression and significant of the p53 isoforms $\Delta 133p53$ and p53 downstream molecules by rmhTNF-MKN45 gastric cancer cell line model. [Methods] The different concentrations (50, 100, 200, 400, 500 IU/ml) of recombined and modified human Tumor Necrosis Factor (rmhTNF) were used in gastric carcinoma cell lines MKN45. The growth inhibitory effect of rmhTNF was observed by CCK8 assay. The expression of p53 isoforms $\Delta 133p53$ and p53 downstream molecule Gadd45 α , PTEN, Mdm2, Bax and CyclinB1 on the mRNA level was detected by nested reverse transcription PCR (nRT-PCR). [Results] With the increased concentration of rmhTNF and the role of the extension of time (24, 48, 72h), the cell inhibition rate increase gradually ($F=35.683, P<0.001$; $F=60.328, P<0.001$). In mRNA measurement, down-regulation of $\Delta 133p53$, Mdm2 and CyclinB1, up-regulation of p53, Gadd45 α , PTEN and Bax was significant in MKN45 cells treated by rmhTNF. The expression of $\Delta 133p53$ was negatively related to p53, Gadd45 α , PTEN and Bax ($r=-0.916, -0.894, -0.872, -0.971$; all $P<0.01$), but positively related to Mdm2 and CyclinB1 ($r=0.924, 0.943$; all $P<0.01$). [Conclusion] $\Delta 133p53$ is shown as an anti-p53 factor, which might be related to regulate Gadd45 α , PTEN, Mdm2, Bax and CyclinB1 in the inhibitory effects of rmhTNF to gastric carcinoma.

Key words: rmhTNF; gastric cancer cell lines; $\Delta 133p53$; p53

p53 是最早发现的抑癌基因, 该基因失活与多数肿瘤发生有关。最近研究在乳腺癌、结肠癌、肾癌、卵

巢癌等肿瘤已发现 12 种 p53 选择性剪切异构体^[1,2], 并与 p53 基因失活具有重要联系。初步研究结果证实, $\Delta 133p53$ 与野生型 p53 具有拮抗作用^[3,4], $\Delta 133p53$ 表达与肿瘤发生密切相关。本研究以表达 $\Delta 133p53$ 胃癌细胞系 MKN45 为研究对象, 以 rmhT-

收稿日期: 2014-10-07; 修回日期: 2014-11-25
基金项目: 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金 (BS2010SW034)
通讯作者: 季万胜, E-mail: jiwsh@wfmc.edu.cn

NF- MKN45 为研究模型,分析 $\Delta 133p53$ 在胃癌细胞生长抑制过程中的表达变化, 及其与野生型 $p53$ 和下游分子 Gadd45 α 、PTEN、MDM2、Bax 和 CyclinB1 表达关系,旨在探讨 $\Delta 133p53$ 在胃癌生长抑制过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人胃癌细胞系 MKN45 由第四军医大学馈赠, Hyclone 胎牛血清、Hyclone 改良型 RPMI-1640 培养基为赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司产品;rmhTNF 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(批号 105215);Trizol 试剂、M-MULV 第一链 cDNA 合成试剂盒、PCR 引物为上海生工公司产品;PCR 扩增试剂为大连宝生物公司产品。

1.2 胃癌细胞培养

将 MKN45 培养于 RPMI-640 培养基(含 100ml/L 胎牛血清、100U/ml 青链霉素混合液)中,置于 37℃、5%CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养,用 0.25%胰蛋白酶消化,取对数生长期细胞用于实验。

1.3 CCK-8 测定不同浓度 rmhTNF 对 MKN45 增殖抑制率

将 MKN45 细胞消化成单细胞悬液,以每孔 100 μ l,5 $\times 10^4$ /ml 的密度接种于 96 孔板中,在培养箱中孵育 24h 后加药。设置空白组、对照组和实验组,rmhTNF 的浓度分别为 0、50 IU/ml、100 IU/ml、200 IU/ml、400 IU/ml、500IU/ml,每孔设五个复孔,培育 24、48 和 72h,各孔弃去培养基,加入 CCK-8 试剂和培养基混合液(1:10 比例),继续孵育 60min,用酶标仪(波长 450nm)测各孔吸光度,计算抑制率(%)=[1-(实验组-空白组)/(对照组-空白组)] $\times 100\%$ 。

1.4 $\Delta 133p53$ 、 $p53$ 、Gadd45 α 、PTEN、Mdm2、Bax 和 CyclinB1 mRNA 表达的 nRT-PCR 检测

取对数生长期细胞,均匀接种于六孔板中,分别加入 0、50 IU/ml、100 IU/ml 浓度的 rmhTNF,培养 24h 后收集细胞。用 Trizol 试剂提总 RNA,紫外分光

光度仪检测 mRNA 浓度和纯度,M-MULV 第一链 cDNA 合成试剂盒逆转录,Premix Taq PCR 扩增。BIO-RAD MyCyder PCR 仪中反应条件为 94℃预变性 5min,1 个循环;94℃变性 30s,56~58℃退火 30s,72℃延伸 30s,40 个循环;72℃延伸 10min,1 个循环,反应体系为 25 μ l(引物序列见 Table 1)。PCR 产物各 5 μ l 在 2%琼脂糖凝胶上电泳 100V、20min,溴乙锭(EB)染色。BioSpectrum AC 凝胶成像分析系统观察 nRT-PCR 结果。

1.5 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件,各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间差异采用单因素方差分析,然后两两比较采用 LSD- t 检验,两变量间相关性采用 Person 直线相关分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

Table 1 Primer sequences and base pairs

Primer	Primer sequence(5' -3')	Base pairs (bp)
$\Delta 133p53$		
First:	F:CTGAGGTGTAGACGCCAACTCTCTCTAG	750
	R:TGTCAGTCTGAGTCAGGCCCTTCTGTC	
Second:	F:GCTAGTGGGTTCAGGAGGTGCTTACGC	690
	R:CTCACGCCCACGGATCTGA	
$p53$	F:GGTCTCCTCCACCGCTTCTTGTC	197
	R:GGCCTCATCTTGGGCCTGTGT	
Gadd45 α	F:CGAAAGGATGGATAAGGTG	436
	R:GGATCAGGGTGAAGTGA	
PTEN	F:AGTCCCTCAGCCGTTACCT	237
	R:GGATCAGAGTCAGTGGTGTGAC	
Mdm2	F:CGCGGGAGTTCAGGGTAAAG	365
	R:AGCTGGAGACAAGTCAGGACTTAAC	
Bax	F:ACCAAGAAGCTGAGCGAGTGTG	118
	R:ACAAAGATGGTCACGGTCTGCC	
CyclinB1	F:CTGAAGGTGATGGAGGTAT	539
	R:GGATTCCGTGCTAGACTT	
β -actin	F:GTGGGGCGCCCCAGGCACCA	
	R:CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC	

2 结果

2.1 rmhTNF 对 MKN45 增殖的影响

不同浓度 rmhTNF (50、100、200、400、500 IU/ml)作用于 MKN45 细胞 24h 后,细胞抑制率,分别为 23.180% $\pm$ 10.172%,37.219% $\pm$ 5.350%,48.665% $\pm$ 4.502%,59.830% $\pm$ 6.949%和 70.388% $\pm$ 6.322%,提示 rmhTNF 对 MKN45 抑制率随浓度增加而增加 ($F=$

35.683, $P < 0.001$)。

rmhTNF (50 IU/ml) 作用于 MKN45 细胞 24、48、72h 后, 细胞抑制率分别为 $23.180\% \pm 10.172\%$, $57.082\% \pm 4.045\%$, $68.196\% \pm 4.108\%$, 可见 rmhTNF 对 MKN45 细胞抑制率随时间增加而增加 ($F = 60.328, P < 0.001$)。

2.2 不同浓度 rmhTNF 对 $\Delta 133p53$ 、p53、Gadd45 α 、PTEN、Mdm2、Bax 和 CyclinB1 mRNA 的影响

rmhTNF (0、50、100 IU/ml) 作用于 MKN45 细胞 24h 后, nRT-PCR 结果显示 MKN 45 细胞 $\Delta 133p53$ 、Mdm2、CyclinB1 mRNA 的表达量随浓度增加而降低 ($P < 0.05$), p53、Gadd45 α 、PTEN、Bax mRNA 的表达量随浓度增加而增加 ($P < 0.05$), 见 Table 2, Figure 1。

2.3 MKN45 细胞中 $\Delta 133p53$ 与 p53、Gadd45 α 、PTEN、Mdm2、Bax、CyclinB1 mRNA 表达相关性

MKN45 细胞中随 rmhTNF 作用浓度增加, $\Delta 133p53$ 、Mdm2、CyclinB1 相对表达量呈递减趋势, p53、Gadd45 α 、PTEN、Bax 相对表达量呈增长趋势。Pearson 直线相关分析结果显示, MKN45 细胞 $\Delta 133p53$ 表达水平与 p53、Gadd45 α 、PTEN、Bax 表达水平呈负相关 ($r = -0.916, P < 0.01$; $r = -0.894, P < 0.01$; $r = -0.872, P < 0.01$; $r = -0.971, P < 0.01$), 与 Mdm2、CyclinB1 表达水平呈正相关 ($r = 0.924, P < 0.01$; $r = 0.943, P < 0.01$), 见 Figure 2。

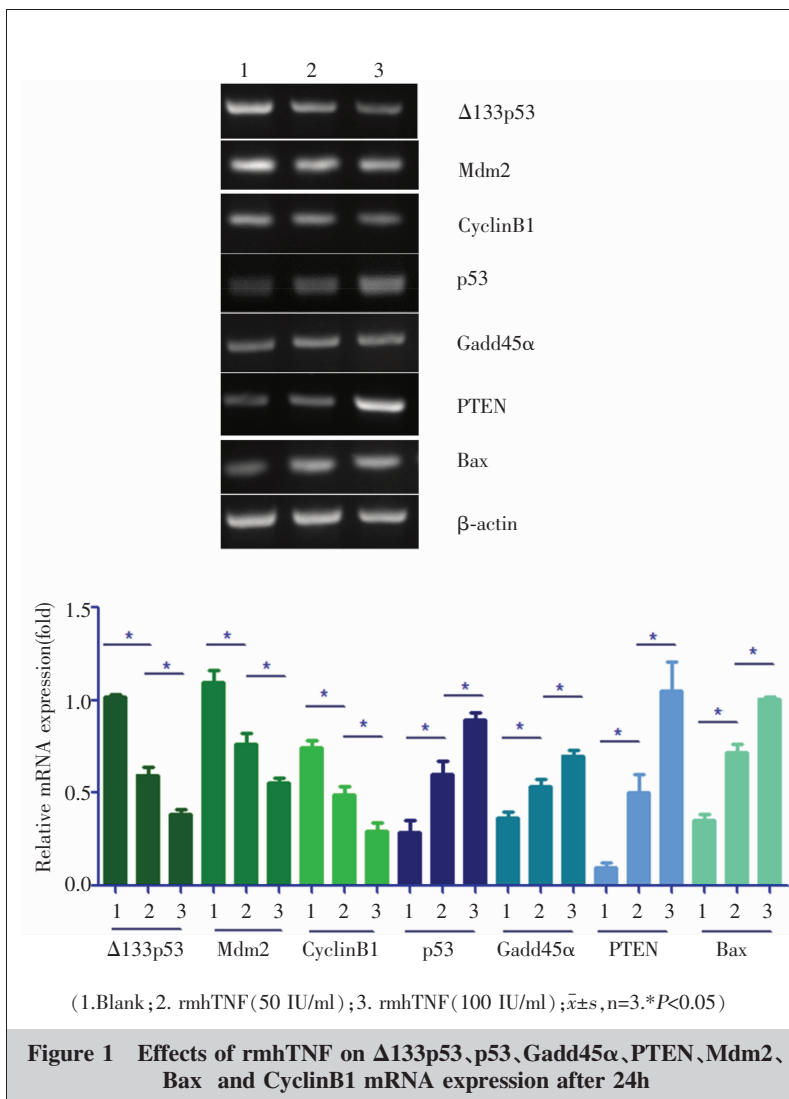
3 讨论

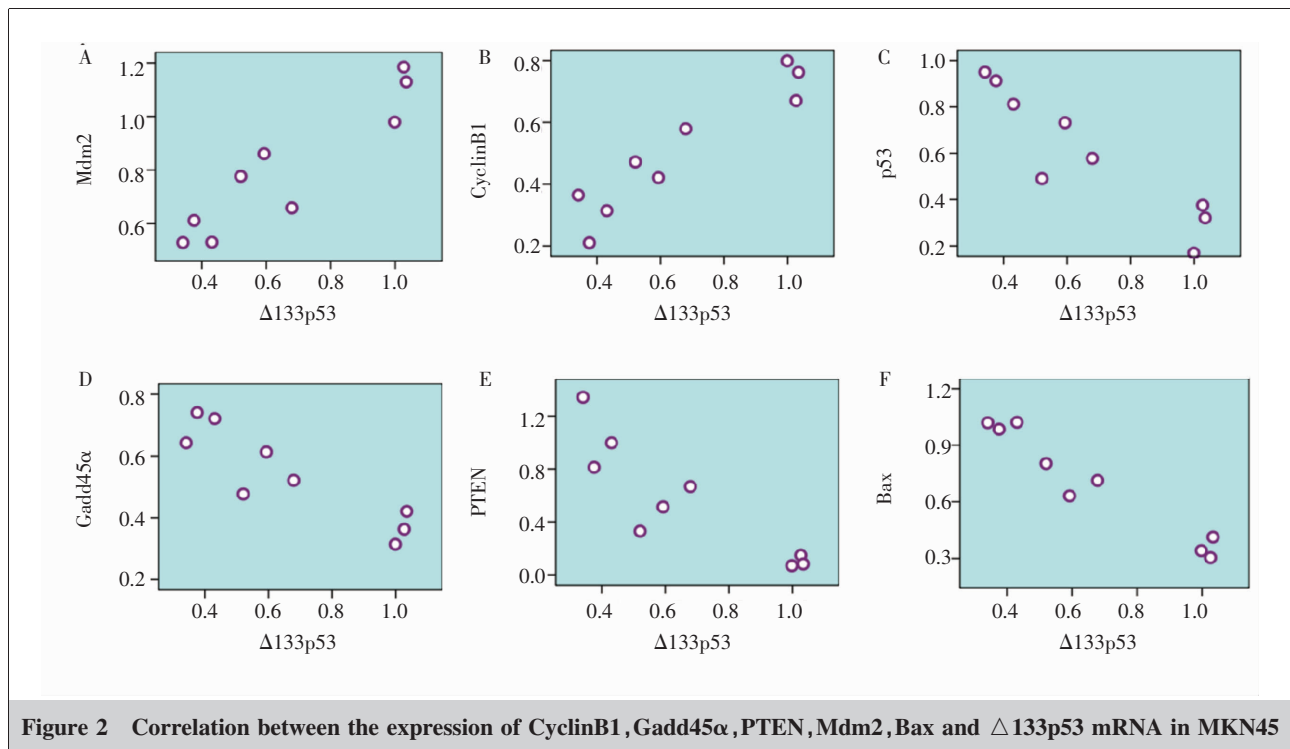
胃癌的发生是多种因素共同作用的结果, p53 功能失活在胃癌的发生、发展过程中起重要作用。p53 基因突变已有研究^[5,6], 但其作用机理尚未完全阐明, p53 异构体的发现为胃癌发生机制的研究提供了新方向。

近年来, 有关 p53 异构体和人类肿瘤关系的研究不断增多, 发现 $\Delta 133p53$ 、 $\Delta 40p53$ 异构体促肿瘤生长, p53 β 、p53 γ 抑制肿瘤生长^[7,8]。 $\Delta 133p53$ 是第 4 内含子的内部启动子的选择性剪接, 导致 p53 蛋白氨基末端截短^[9]。本课题组前期研究中, 张红梅等^[10]发现, $\Delta 133p53$ mRNA 的表达率在正常癌旁组织→

Table 2 Effects of rmhTNF on $\Delta 133p53$, p53, Gadd45 α , PTEN, Mdm2, Bax and CyclinB1 mRNA expression ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Index	0	50IU/ml	100IU/ml	F	P
$\Delta 133p53$	1.019 ± 0.019	0.598 ± 0.079	0.383 ± 0.045	108.785	<0.001
Mdm2	1.097 ± 0.106	0.766 ± 0.101	0.557 ± 0.047	28.038	0.001
CyclinB1	0.744 ± 0.066	0.491 ± 0.081	0.296 ± 0.079	26.505	0.001
p53	0.289 ± 0.107	0.600 ± 0.122	0.892 ± 0.072	25.963	0.001
Gadd45 α	0.366 ± 0.054	0.537 ± 0.069	0.702 ± 0.052	24.347	0.001
PTEN	0.100 ± 0.042	0.503 ± 0.169	1.050 ± 0.269	19.951	0.002
Bax	0.353 ± 0.055	0.716 ± 0.086	1.008 ± 0.021	89.241	<0.001





浅表性胃炎→慢性胃炎→胃腺癌中逐步上升,具有显著性差异,提示胃癌的发生过程伴随着异构体的动态变化。Wei等^[11]研究结果证明,Δ133p53在幽门螺杆菌感染相关胃炎→胃癌过程中起诱导因子作用。这些结果提示,研究Δ133p53异构体的功能和生物学效应,对于理解胃癌的发生发展具有重要的价值。

本实验结果显示,rmhTNF对MKN45胃癌细胞系的抑制率与Δ133p53 mRNA的表达率相反,且随细胞抑制率增加Δ133p53表达率升高。既往研究发现,Δ133p53与野生型p53具有拮抗作用,通过抑制p53的功能,而抑制细胞凋亡^[8]。Sabour等^[12]研究表明,p53可激活并上调Gadd45基因,Gadd45通过与Cdc2形成复合物,导致Cdc2/CyclinB1复合物解离,从而细胞周期G₂/M期阻滞,同时下调CyclinB1基因。研究证实,胃癌中突变型p53的表达较胃炎组织明显升高,而PTEN下降,提示突变型p53蛋白升高可能阻碍PTEN蛋白的表达。Bax基因是一种促凋亡基因,Marcel等^[13]通过荧光素酶实验研究表明,共转染Δ133p53和FLp53异构体之后,作用于Bax启动子可抑制p53的转录表达。以上研究表明,p53基因的生物学功能与Gadd45α、CyclinB1、PTEN、Mdm2、Bax表达密切相关。本研究结果发现,

Δ133p53表达水平与p53、Gadd45α、PTEN、Bax表达水平呈负相关,与Mdm2、CyclinB1表达水平呈正相关,进一步验证了Δ133p53对野生型p53的调控作用,这种调控体现在对下游分子Gadd45α、PTEN、Mdm2、Bax、CyclinB1的选择性启动,提示rmhTNF对MKN45胃癌细胞系的抑制可能与该机制有关。由此可见,Δ133p53可能是rmhTNF治疗胃癌生物学效应的关键靶点,为胃癌诊断、治疗、以及预后研究提供依据。

参考文献:

- [1] Milicevic Z, Bajic V, Zivkovic L, et al. Identification of p53 and its isoforms in human breast carcinoma cells [J]. Scientific World Journal, 2014, 1155(10): 1-10.
- [2] Song W, Huo SW, Lü JJ, et al. Expression of p53 isoforms in renal cell carcinoma [J]. Chin Med J (Engl), 2009, 122(8): 921-926.
- [3] Marcel V, Petit I, Murray-Zmijewski F, et al. Diverse p63 and p73 isoforms regulate Δ133p53 expression through modulation of the internal TP53 promoter activity [J]. Cell Death Differ, 2012, 19(5): 816-826.
- [4] Marcel V, Vijayakumar V, Fernández-Cuesta L, et al. p53 regulates the transcription of its Delta133p53 isoform through specific response elements contained within the

- TP53 P2 internal promoter [J]. *Oncogene*, 2010, 29 (18): 2691-2700.
- [5] Mafficini A, Amato E, Fassan M, et al. Reporting tumor molecular heterogeneity in histopathological diagnosis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): 1-10.
- [6] Shimizu T, Marusawa H, Matsumoto Y, et al. Accumulation of somatic mutations in TP53 in gastric epithelium with *Helicobacter pylori* infection [J]. *Gastroenterology*, 2014, 147(2): 407-417.
- [7] Goidschneider D, Horvilleur E, Plassa LF, et al. Expression of C-terminal deleted p53 isoforms in neuroblastoma [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(19): 5603-5612.
- [8] Hofstetter 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.
- [9] 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, 3: 962-972.
- [10] Zhang HM, Zhang XQ, Zhong H, et al. Relevance of p53 isoforms in genesis and progression of gastric cancer [J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2013, 21 (28): 2922-2928. [张红梅, 张小茜, 仲华, 等. p53 异构体与胃癌发生发展的相关性及其机制 [J]. *世界华人消化杂志*, 2013, 21(28): 2922-2928.]
- [11] Chambers SK, Martinez JD. The significance of p53 isoform expression in serous ovarian cancer [J]. *Future Oncol*, 2012, 8(6): 683-686.
- [12] Sabour Alaoui S, Dessirier V, de Araujo E, et al. TWEAK affects keratinocyte G₂/M growth arrest and induces apoptosis through the translocation of the AIF protein to the nucleus [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): 1-12.
- [13] Marcel V, Hainaut P. p53 isoforms- a conspiracy to kidnap p53 tumor suppressor activity? [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(3): 391-406.

《中国肿瘤》编辑部关于启用稿件远程处理系统的通知

本刊已启用稿件远程处理系统,该系统包括作者在线投稿/查询、主编办公、专家审稿、编辑办公等功能,通过网上投稿、网上查稿、网上审稿,实现作者、编辑、审稿专家的一体化在线协作处理,从而构建一个协作化、网络化、角色化的编辑稿件业务处理平台。对于广大作者而言,该系统最大的优点是支持在线投稿,方便作者及时了解稿件处理进程,缩短稿件处理时滞。

使用过程中具体注意事项如下:

(1)第1次使用本系统投稿的作者,必须先注册,才能投稿。注册时各项信息请填写完整。作者自己设定用户名和密码,该用户名密码长期有效。

(2)已注册过的作者,请不要重复注册,否则将导致查询稿件信息不完整。如果遗忘密码,可以致电编辑部查询。

(3)作者投稿请点击“作者登录”,登录后按照提示操作即可。投稿成功后,系统自动发送回执邮件,作者投稿后请随时关注邮箱提示,也可随时点击“作者登录”,获知该稿件的审理情况、处理进展、审稿意见等。

(4)网上投稿成功1周内,请将以下文件邮寄至编辑部:①单位介绍信;②文章若属于基金项目资助,附上基金项目批文的复印件。编辑部收到上述文件后,稿件将进入审稿程序。

稿件远程处理系统启用后,我刊只接受网上投稿,不再接收电子邮件投稿和纸质稿。

《中国肿瘤》网址: <http://www.chinaoncology.cn>

如有任何问题,请与编辑部联系! 联系电话:0571-88122280。