

rmhTNF- α 对胃癌细胞系 MKN45 的生物学效应及其机制研究

崔 璨¹, 葛振宇², 魏菁琳¹, 张 丽², 王春芽², 张红梅², 季万胜²

(1. 潍坊医学院, 山东 潍坊 260153; 2. 潍坊医学院附属医院, 山东 潍坊 261031)

摘要: [目的] 研究 rmhTNF 对胃癌细胞系 MKN45 的生物学效应及其机制。 [方法] 采用不同浓度 (50, 100, 200IU/ml) 重组改构人肿瘤坏死因子 (rmhTNF) 处理胃癌细胞 MKN45, 增殖/毒性检测试剂盒 (CCK-8) 观察其细胞增殖抑制率; 实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 法检测 MKN45 细胞 p53 异构体 $\Delta 133p53$ 、STAT1 及 STAT3 mRNA 的表达变化。 [结果] CCK-8 结果显示, 随 rmhTNF 作用浓度增高 (50, 100, 200IU/ml), MKN45 细胞抑制率分别为 17.133%, 24.800% 和 31.733%, 差异有统计学意义 ($F=16.246, P<0.01$)。 RT-PCR 结果显示, 随 rmhTNF 浓度增高, MKN45 细胞 STAT1 mRNA 表达上升 ($F=164.290, P<0.001$), STAT3、 $\Delta 133p53$ mRNA 表达下降 ($F=29.921, F=24.243; P$ 均 <0.001)。 Pearson 相关性分析结果显示, $\Delta 133p53$ 与 STAT1 表达呈负相关 ($r=-0.951, P<0.01$), 与 STAT3 表达呈正相关 ($r=0.840, P<0.01$)。 [结论] MKN45 细胞中, $\Delta 133p53$ 是 STAT1、STAT3 调控肿瘤细胞的共同靶基因, STAT1、STAT3- $\Delta 133p53$ -p53 通路可能是 rmhTNF 抑制胃癌细胞 MKN45 的机制。

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

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2018)02-0086-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.02.B002

Biological Effects and Mechanisms of rmhTNF-alpha on Gastric Cancer Cell Line MKN45

CUI Can¹, GE Zhen-yu², WEI Jing-lin¹, et al.

(1. Weifang Medical College, Weifang 261053, China; 2. Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang 261031, China)

Abstract: [Objective] To investigate the biological effects and mechanisms of rmhTNF on gastric cancer cell line MKN45. [Methods] The different concentrations (50, 100, 200IU/ml) of recombinant and modified human tumor necrosis factor (rmhTNF) were used in gastric carcinoma cell line MKN45. The growth inhibition rate of rmhTNF was observed by CCK8 assay. The mRNA expressions of p53 is forms $\Delta 133p53$, STAT1, and STAT3 on MKN45 gastric cancer cells were detected by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). [Results] CCK-8 assay showed that as rmhTNF concentrations (50, 100, 200IU/ml) increased, the inhibitory rates of MKN45 cells increased accordingly (17.133%, 24.800%, and 31.733%, respectively), and that the difference was statistically significant ($F=16.246, P<0.01$). RT-PCR showed that as rmhTNF concentrations increased, the expression of STAT1 mRNA in MKN45 cells also increased ($F=164.290, P<0.01$) while the expression of STAT3, $\Delta 133p53$ mRNA decreased ($F=29.921, F=24.243, all P<0.01$). Pearson correlation analysis showed that the expression of $\Delta 133p53$ was negatively correlated with that of STAT1 and positively correlated with that of STAT3 ($r=-0.951, r=0.840, all P<0.01$). [Conclusion] In MKN45, $\Delta 133p53$ is the common target gene of both STAT1 and STAT3 in regulating tumor cells, and STAT1, STAT3- $\Delta 133p53$ -p53 pathway may be the mechanism of rmhTNF inhibiting gastric cancer cell line MKN45.

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

胃癌是常见的消化道恶性肿瘤之一。Wei 等^[1]

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, 副主任医师, 副教授, 博士; 潍坊医学院附属医院
消化内科, 山东省潍坊市奎文区虞河路 465 号 (261031);
E-mail: jiwsh@wfmc.edu.cn

收稿日期: 2017-08-08; **修回日期:** 2017-09-03

的研究发现, 幽门螺旋杆菌所致的慢性胃炎发展成为胃癌的过程中, p53 异构体 $\Delta 133p53$ 发挥关键的作用。P53 异构体的发现无疑为胃癌的研究提供了新的方向, 其中 $\Delta 133p53$ 是本研究的重点。

信号传导和转录激活因子(STATs)家族能快速将胞外信号传递到细胞核内,触发靶基因的表达,调控肿瘤细胞的增殖和凋亡活动。其中 STAT1 和 STAT3 在肿瘤细胞中是作用相反的两个因子,STAT1 是肿瘤抑制因子,在肿瘤细胞中发挥促凋亡,抑增殖的作用^[2]。而 STAT3 是炎症相关性肿瘤的促进因子^[3]。这两种因子的表达影响着肿瘤细胞的发展进程。

本研究中,我们用不同浓度 rmhTNF- α 刺激表达 Δ 133p53 的胃癌细胞 MKN45,探讨 rmhTNF- α 对胃癌细胞的作用效果及对 STAT1、STAT3、 Δ 133p53 表达的影响,以期分析 Δ 133p53 在胃癌细胞生长抑制过程中发挥的作用。

1 材料与方 法

1.1 主要材料及试剂

人胃癌细胞 MKN-45 由第四军医大学馈赠,RPMI-1640 培养基购于 Hyclone 公司,胎牛血清购于浙江天杭生物科技股份有限公司;rmhTNF- α 购于上海唯科生物制药有限公司产品(批号 20161202);CCK-8 购于上海翊圣生物科技有限公司产品(货号 40203ES60),TRIZOL 购于康为世纪生物科技有限公司(货号 CW0580S),Real-time qPCR 试剂盒购于日本东洋纺 toyobo,PCR 引物合成(上海生工)。

1.2 细胞培养

将胃癌细胞 MKN45 培养于 RPMI-1640 完全培养基(含 10%的胎牛血清)中,置于 5%CO₂、37℃ 的饱和湿度培养箱中,每 2d 更换培养液,用 0.25%胰蛋白酶消化传代培养,每 5d 传代 1 次,取处于对数生长期的细胞用于实验。

1.3 CCK-8 法测 MKN45 增殖抑制率

将密度为 4×10⁴/ml 的 MKN45 细胞悬液接种于 96 孔板,每孔 100 μ l,每组 3 个复孔。置于培箱中培养 24h 后加药处理,设置空白组(不含细胞药物的培养基),对照组(不含药物的培养基),实验组:① rmhTNF- α 50IU/ml; ② rmhTNF- α 100IU/ml; ③ rmhTNF- α 200IU/ml。再置于培养箱中培养 24h 后吸出培养基,加入 10 μ l CCK-8 试剂和 90 μ l 细胞培养液。放入培养箱 3h 后,酶标仪(波长 450nm)测吸光度,公式计算两种细胞抑制率(IC)=[1-(实验组-

空白组)/(对照组-空白组)]×100%。

1.4 RT-PCR 法检测 mRNA 的表达

取对数生长期的细胞以 4×10⁴~5×10⁴/ml 的密度接种于 6 孔板中,每孔 2ml。设置空白组、对照组和实验组。对照组:不含药物的培养基,空白组:不含细胞和药物的培养基,实验组:① rmhTNF- α 50IU/ml; ② rmhTNF- α 100IU/ml; ③ rmhTNF- α 200IU/ml。培养 24h 后按 TRIZOL 试剂盒说明提取总 RNA,用逆转录试剂盒合成 cDNA,以 β -actin 作为内参,反应体系为 20 μ l (Table 1),反应条件为:95℃ 预变性 1min,95℃ 变性 15s,60℃ 退火 15s;72℃ 延伸 45s,共 40 个循环。用实时荧光定量 PCR 仪 (ABI PRISM 公司)对 MKN45 细胞 Δ 133p53、STAT1 及 STAT3 的 PCR 产物进行实时定量分析,检测 Ct 值,根据 Δ Ct=目的 Ct-内参 Ct, $\Delta\Delta$ Ct=实验组 Δ Ct-对照组 Δ Ct,用公式 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 计算基因的相对表达量。校正结果以对照组 0 IU/ml 为 1,将其余各组基因表达量与之比较。

Table 1 Primer sequence of gene

Gene	Primer sequences
β -actin	Forward 5'-GATGAGATTGGCATGGCTTT-3' Reverse 5'-GTCACCTTCACCGTTCCAGT-3'
STAT1	Forward 5'-TGGGCTCAGCTTTCAGAAAGT-3' Reverse 5'-CTGGCGTTAGGACCAAGAAG-3'
STAT3	Forward 5'-GGCCATCTTGAGCACTAAGC-3' Reverse 5'-CGGACTGGATCTGGGTCTTA-3'
Δ 133p53	Forward 5'-ACTCTGTCTCCTTCCTCTTCTACAG-3' Reverse 5'-GTGTGGAATCAACCCACAGCT-3'

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,组间差异采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 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- α 对 MKN45 细胞增殖的影响

CCK-8 结果显示,不同浓度 rmhTNF- α (50、100、200 IU/ml)处理 MKN45 细胞 24h 后,细胞增殖抑制率分别为 17.133% \pm 2.458%,24.800% \pm 4.258%,31.733% \pm 2.318%,rmhTNF- α 对 MKN45 细胞抑制率随浓度增高而增高,呈剂量依赖性 ($F=16.246$, $P<0.01$)。

2.2 rmhTNF-α 对胃癌细胞 MKN45 中 Δ133p53, STAT1 及 STAT3 mRNA 表达的影响

将对照组 0 IU/ml rmhTNF-α Δ133p53, STAT1 及 STAT3 mRNA 的相对表达量设为 1, 通过内参基因 β-actin 的校正, rmhTNF-α 处理的 MKN45 细胞 Δ133p53 mRNA 的相对表达含量随浓度增高而降低 ($P<0.001$); STAT1 mRNA 表达量随 rmhTNF-α 处理浓度增高而明显上升 ($P<0.001$); STAT3 mRNA 表达量明显下降 ($P<0.001$) (Table 2, Figure 1)。

2.3 MKN45 细胞中 Δ133p53 与 STAT1, STAT3 mRNA 表达相关性

Pearson 直线相关分析结果显示, MKN-45 细胞中 Δ133p53 与 STAT1 mRNA 的表达呈负相关 ($r=-0.951, P<0.01$), Δ133p53 与 STAT3 mRNA 的表

达呈正相关($r=0.840, P<0.01$) (Figure 2)。

3 讨论

P53 是与人类肿瘤相关性最高的抑癌基因, p53 基因突变是肿瘤发生的常见原因, p53 基因错义突变使其失去对下游基因的转录调控作用, 不能及时修复受损基因, 失去了卫护基因完整性和稳定性的功能, 导致肿瘤的发生^[4]。P53 异构体的发现是胃癌机制研究的新方向。Wei 等^[1]的研究发现, p53 异构

Table 2 Effects of rmhTNF on the mRNA expression of Δ133p53, STAT1 and STAT3 in gastric cancer cell MKN45 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Gene	0U/ml	50U/ml	100U/ml	200U/ml	F	P
Δ133p53	1	0.842±0.083	0.683±0.090	0.500±0.089	24.243	<0.001
STAT1	1	1.584±0.096	2.319±0.088	3.122±0.212	164.290	<0.001
STAT3	1	1.163±0.084	0.814±0.092	0.560±0.107	29.921	<0.001

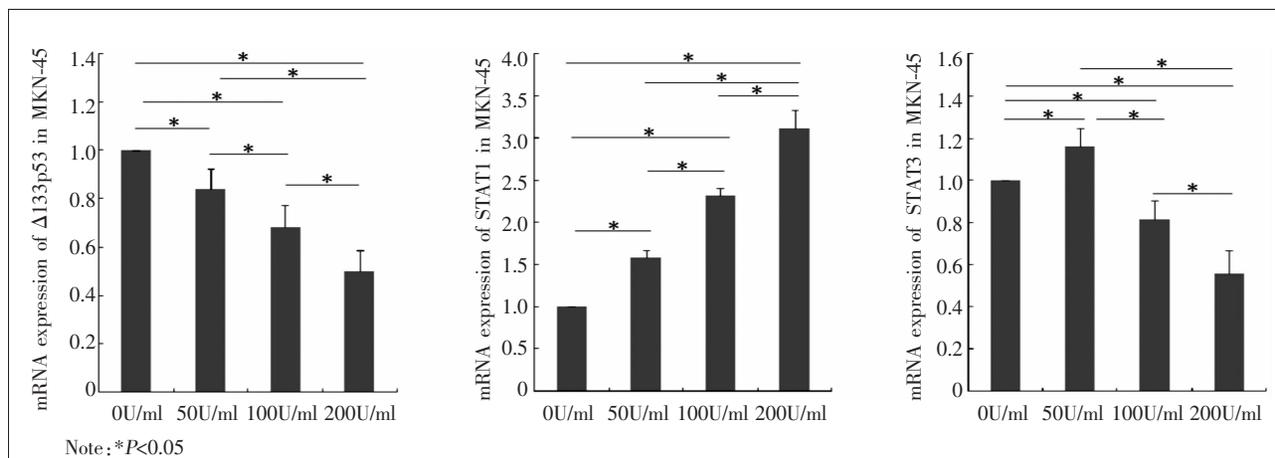


Figure 1 The expression of Δ133p53, STAT1 and STAT3 mRNA in MKN-45

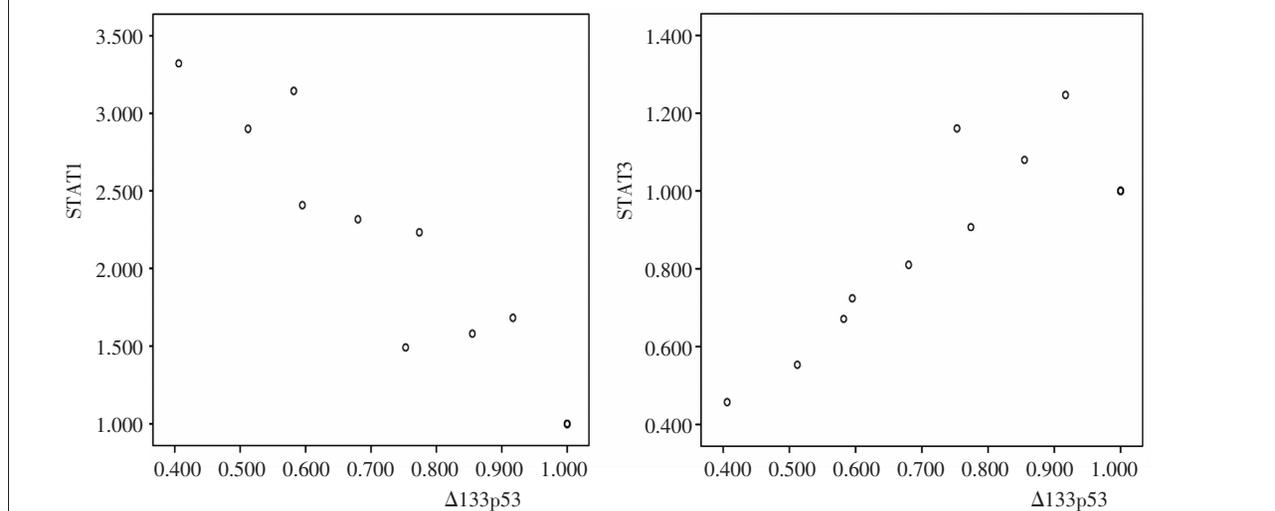


Figure 2 Correlation between the expression of Δ133p53 with STAT1 and STAT3 mRNA in MKN-45

体 $\Delta 133p53$ 是炎症相关性胃癌的关键因子。本课题组前期研究^[5]发现在由浅表性胃炎到萎缩性胃炎发展成为胃癌过程中, $\Delta 133p53$ mRNA 的表达量递增,并由此猜测 $\Delta 133p53$ 未来可发展成为新型胃癌标志物,为胃癌的诊断和治疗提供新的依据。

信号传导和转录激活因子 (STATs) 家族包括 STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B 和 STAT6 七个成员,其中转录因子 STAT1 和 STAT3 在肿瘤细胞中发挥相反的作用,STAT3 被认为是一种癌基因而促进肿瘤细胞的增殖活动,STAT1 主要发挥抗增殖和促凋亡的作用^[2]。STAT3 有调节细胞生长、凋亡和炎症基因的转录的功能,并有助于慢性炎症性疾病和恶性肿瘤的发展^[6],持续的 STAT3 激活是肿瘤发生的启动子。Kathiria 等^[7]的研究表明,STAT3 是溃疡性结肠炎向结肠癌发展的关键因子。Ernst 等^[8]研究也表明,STAT3 的活化促进肿瘤细胞的生长,抑制免疫细胞的抗肿瘤作用,持续的 STAT3 信号促进炎症相关性胃肠道肿瘤的生长和增殖。在乳腺癌中可以见到 STAT3 的持续激活^[9],STAT3 的激活可促进增殖基因的表达,促进肿瘤的发展。STAT3 活化是前列腺癌细胞存活和增殖的主要驱动力^[10]。在近一半的非小细胞肺癌病例中,STAT3 的持续磷酸化已被证实^[11]。

STAT3 在多种多样的肿瘤中高频率地被激活,所以其信号通路的研究是十分有必要的。研究显示,STAT3 在体内和体外都与 p53 启动子结合,抑制 p53 基因的转录率,此外,阻断癌细胞中 STAT3 表达可诱导 p53 表达上调,恢复 p53 介导的肿瘤细胞凋亡^[12]。在结直肠癌、前列腺癌中,STAT3 都被证明可以负性调控肿瘤抑制因子 p53,细胞的凋亡活动受到抑制,促进癌细胞的发展^[13,14]。因此,STAT3 抑制 p53 的表达可能在肿瘤的发展中起重要作用。

STAT1 通常促进诱导细胞凋亡的靶基因表达,并且能够抑制 p53 的抑制子 MDM2,与 p53 作为共激活因子^[15]。Chen 等^[16]的研究表明化疗药物可以通过上调 p53 和 STAT1 的表达来抑制结直肠癌的发生和发展。Chen 等^[17]研究表明,STAT1 超表达可以引起 p53 表达增加,肝癌细胞的生长受到抑制。可见,STAT1-p53 通路与肿瘤的活动密切相关。STAT1 和 STAT3 与 p53 在肿瘤中的关系已经较为明确,而有关于 STAT1 和 STAT3 与 p53 异构体的关系研究

较少。本次研究主要探讨 STAT1 和 STAT3 与 p53 异构体 $\Delta 133p53$ 表达的关系。结果显示,rmhTNF- α 能够显著抑制 MKN45 细胞增殖,并且 STAT1 表达上升,STAT3、 $\Delta 133p53$ 表达下降,其上升下降的程度与 rmhTNF- α 的处理浓度呈正相关,与 MKN45 细胞抑制率呈正相关。Pearson 直线相关分析显示, $\Delta 133p53$ 表达与 STAT1 呈负相关,与 STAT3 呈正相关,说明 rmhTNF- α 通过上调 STAT1 表达和下调 STAT3 表达,抑制 $\Delta 133p53$ 表达,达到抑制胃癌细胞增殖的效果,STAT1,STAT3- $\Delta 133p53$ 通路可能将是研究胃癌治疗的新机制。

有研究证实, $\Delta 133p53$ 精细地调控 p53 的表达,以此调控细胞的命运的转归。Aobala 等^[18]通过免疫共沉淀的方法证明 p53 异构体 $\Delta 133p53$ 存在 p53 的作用位点,并可与其结合,选择性地调控其下游基因的表达,决定细胞的命运。Hofstetter 等^[19]研究结果显示, $\Delta 133p53$ 有拮抗 p53、抑制细胞凋亡的功能。本课题组前期研究也证实^[20], $\Delta 133p53$ 通过选择性激活 p53 的下游基因来负性调控 p53 的功能。综上所述,STAT1,STAT3- $\Delta 133p53$ -p53 通路可能将是抑制胃癌细胞的新机制, $\Delta 133p53$ 作为 STAT1、STAT3 共同的靶基因,将是肿瘤治疗的一个有前途的分子靶点,而靶向调控 $\Delta 133p53$ 可能是使 p53 活化的一种新的治疗方法。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Avalie L, Pensa S, Regis G, et al. STAT1 and STAT3 in tumorigenesis: a matter of balance [J]. JAKSTAT, 2012, 1(2): 65-72.
- [3] Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(11): 798-809.
- [4] Donzelli S, Biagioni F, Fausti F, et al. Oncogenomic approaches in exploring gain of function of mutant p53[J]. Curr Genomics, 2008, 9(3): 200-207.
- [5] Ji WS, Zhang N, Zhang HM, et al. Expression of p53 β and $\Delta 133p53$ isoforms in different gastric tissues [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(9): 10468-10474.
- [6] Egwuagu CE. STAT3 in CD4+ T helper cell differentiation

- and inflammatory diseases[J]. Cytokine, 2009, 47(3): 149-156.
- [7] Kathiria AS, Neumann WL, Rhee J, et al. Prohibitin attenuates colitis-associated tumorigenesis in mice by modulating p53 and STAT3 apoptotic responses [J]. Cancer Res, 2012, 72(22): 5778-5789.
- [8] Ernst M, Thiem S, Nguyen PM, et al. Epithelial gp130/Stat3 functions; an intestinal signaling node in health and disease[J]. Semin Immunol, 2014, 26(1): 29-37.
- [9] Banerjee K, Resat H. Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: a review [J]. Int J Cancer, 2016, 138(11): 2570-2578.
- [10] Bishop JL, Thaper D, Zoubeidi A. The multifaceted roles of STAT3 signaling in the progression of prostate cancer [J]. Cancers(Basel), 2014, 6(2): 829-859.
- [11] Harada D, Takigawa N, Kiura K. The role of STAT3 in non-small cell lung cancer[J]. Cancers(Basel), 2014, 6(2): 708-722.
- [12] Niu G, Wright KL, Ma Y, et al. Role of Stat3 in Regulating p53 Expression and Function [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(17): 7432-7440.
- [13] Yu H, Yue X, Zhao Y, et al. LIF negatively regulates tumor suppressor p53 through Stat3/ID1/MDM2 in colorectal cancers[J]. Nat Commun, 2014, 5: 5218.
- [14] Stone L. Prostate cancer: on the right path -- Stat3 signalling controls the ARF-Mdm2-p53 tumour-suppressor pathway[J]. Nat Rev Urol, 2015, 12(10): 535.
- [15] Regis G, Pensa S, Boselli D, et al. Ups and downs: the STAT1:STAT3 seesaw of Interferon and gp130 receptor signalling[J]. Semin Cell Dev Biol, 2008, 19(4): 351-359.
- [16] Chen Y, Fang L, Zhang J, et al. Blockage of glyoxalase I inhibits colorectal tumorigenesis and tumor growth via upregulation of STAT1, p53, and Bax and downregulation of c-Myc and Bcl-2[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(3): E570.
- [17] Chen J, Wang H, Wang J, et al. STAT1 inhibits human hepatocellular carcinoma cell growth through induction of p53 and Fbxw7[J]. Cancer Cell Int, 2015, 15: 111.
- [18] 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 Differ, 2011, 18: 248-258.
- [19] 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.
- [20] Jiang QQ, Zhang N, Guo A, et al. Effect of rmhTNF on human gastric cancer cell lines MKN45 with $\Delta 133p53$ status [J]. China Cancer, 2015, 24(6): 524-528. [姜琪琪, 张娜, 郭爱, 等. rmhTNF对 $\Delta 133p53$ 表达阳性胃癌细胞系MKN45的影响[J]. 中国肿瘤, 2015, 24(6): 524-528.]

作者/通讯作者校对文稿须知

作者/通讯作者自校拟发排校样稿,是期刊出版工作中不可缺少的重要环节,也是确保期刊质量的重要手段。特此重申,请作者/通讯作者务必按以下要求进行校对:

1. 首先全面校对全文,对编辑提出的校样稿中需特别注意校对及需补充的内容,必须以改正或解释。

2. 所有需修改和补充的内容,均请用红笔将正确的字符书写清楚(避免使用不规范的汉字);必须改动的字符,直接在校样稿的空白处写出,所增删字数最好相符。

3. 文题、作者、单位名称、邮政编码、通讯作者等信息,务必确认无误。

4. 对正文文字(包括外文字母及大小写)、标点符号、数据、图表、计量单位、参考文献等应认真细致逐一校对;请用规范的通用药品名称(不用商品名)和医学名词,认真核查并使用标准计量单位及药物剂量。

5. 参考文献缺项的部分,应按本刊规定的著录格式进行补充。请作者务必认真核实所引用文献是否正确,并核查正文中角码是否与文后所列参考文献序号对应。

6. 校对完毕请作者/通讯作者签名,并在规定的日期内将校样稿寄回编辑部。如有要求补充的资料,也需一并寄回。

7. 由于出版周期的限制,如作者/通讯作者不能在规定时间内校对寄回,请及时联系本刊编辑部说明原因,否则可能造成该文稿延期出版,或者取消刊发。