

高表达p21增加5-Fu对胃癌细胞的杀伤作用及机制

王维民, 邓建良, 顾贤成, 汤月华, 张国强, 周炎

王维民, 邓建良, 顾贤成, 汤月华, 张国强, 周炎, 江苏大学附属宜兴医院肿瘤科 江苏省宜兴市 214200

王维民, 主治医师, 主要从事肿瘤化疗及分子靶向治疗的研究. 江苏省恶性肿瘤生物标志物与防治重点实验室开放课题基金资助项目, No. 11ZLKF09

无锡市科技局医疗与公众健康技术研发基金资助项目, No. CSE31N1333

作者贡献分布: 主要数据分析和文章起草由王维民完成; 基础实验、整理实验数据由王维民、邓建良、顾贤成、汤月华及张国强完成; 课题设计、文章修改和审阅由周炎完成.

通讯作者: 周炎, 主任医师, 214200, 江苏省宜兴市宜城街道通贞观路75号, 江苏大学附属宜兴医院肿瘤科.

staff260@yxph.com

电话: 0510-87330801

收稿日期: 2014-07-21 修回日期: 2014-08-14

接受日期: 2014-09-17 在线出版日期: 2014-11-08

High expression of p21 increases killing effect of 5-Fu on gastric cancer cells

Wei-Min Wang, Jian-Liang Deng, Xian-Cheng Gu, Yue-Hua Tang, Guo-Qiang Zhang, Yan Zhou

Wei-Min Wang, Jian-Liang Deng, Xian-Cheng Gu, Yue-Hua Tang, Guo-Qiang Zhang, Yan Zhou, Department of Oncology, Yixing Hospital Affiliated to Jiangsu University, Yixing 214200, Jiangsu Province, China

Supported by: Open Fund of Key Laboratory of Malignant Tumor Biomarkers and Malignant Tumor Prevention and Treatment of Jiangsu Province, No. 11ZLKF09; the Medical and Public Health Technology Fund of Wuxi Municipal Science and Technology Bureau, No. CSE31N1333

Correspondence to: Yan Zhou, Chief Physician, Department of Oncology, Yixing Hospital Affiliated to Jiangsu University, 75 Tongzhenguan Road, Yicheng Street, Yixing 214200, Jiangsu Province, China. staff260@yxph.com

Received: 2014-07-21 Revised: 2014-08-14

Accepted: 2014-09-17 Published online: 2014-11-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of p21 expression on the sensitivity of gastric cancer cells to 5-fluorouracil (5-Fu) and the possible mechanisms involved.

METHODS: A p21 expression plasmid was transfected into two gastric cancer cell lines, BGC803 and SGC7901, using liposomes, and Western blot was used to detect the expression of p21. After transfection, the CCK8 colorimet-

ric method was used to detect the proliferation of the two gastric cancer cell lines treated with 5-Fu. Flow cytometry was used to test the change of the cell cycle.

RESULTS: After transfection, p21 expression was significantly up-regulated in the SGC7901 and BGC803 cells compared with control cells ($P < 0.05$). The cells with p21 overexpression were highly sensitive to 5-Fu ($P < 0.05$). Cell cycle analysis showed that the cells with p21 overexpression had a significantly increased G_0/G_1 population ($P < 0.01$). Western blot assay showed down-regulation of expression of CDK2 and Cyclin E ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Overexpression of p21 protein increases the sensitivity of gastric cancer cells to 5-Fu, possibly *via* mechanisms associated with inducing G_0/G_1 arrest and down-regulation of CDK2 and Cyclin E expression.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Gastric cancer; p21; 5-fluorouracil; CDK2; Cyclin E

Wang WM, Deng JL, Gu XC, Tang YH, Zhang GQ, Zhou Y. High expression of p21 increases killing effect of 5-Fu on gastric cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(31): 4785-4789 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/4785.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i31.4785>

摘要

目的: p21是一种重要的细胞周期负性调控因子, 目前其在胃癌化疗中的作用上不清楚. 本课题主要观察p21蛋白转染胃癌细胞后, 研究其对5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)作用于胃癌细胞的敏感性影响及其可能的作用机制.

方法: 采用脂质体转染技术改变人胃癌细胞BGC823、SGC7901中p21蛋白变化, 应用免疫印迹鉴定p21蛋白表达; CCK8比色法检测p21蛋白转染后BGC823、SGC7901细胞株对5-Fu

背景资料
胃癌是我国最常见的消化系统肿瘤, 随着胃癌分子生物学研究的不断深入, 胃癌的个体化治疗日益成为临床治疗及基础研究的重点. p21是细胞周期负性调控基因, 本研究旨在改变p21蛋白变化, 以研究其对5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)作用于胃癌细胞的敏感性影响及其可能的作用机制.

同行评议者
王小众, 教授, 福建医科大学附属协和医院消化内科

研发前沿
研究p21表达变化对5-Fu作用胃癌细胞的敏感性影响,并初步阐明其相关的作用机制。

敏感性的变化;采用流式细胞术分析细胞周期分布。

结果:将p21质粒转染胃癌细胞后,细胞中p21蛋白表达量明显增高,与空载对照组比较具有统计学意义($P<0.05$)。p21高表达的胃癌细胞株对5-Fu敏感性明显增强,与空载对照组、阴性对照组比较,均具有统计学意义($P<0.01$)。p21高表达的细胞株处于 G_0/G_1 期比例明显增加,而 S_2/M 期细胞比例明显减少;计算出细胞增殖指数(proliferation index, PI),与空载对照组、阴性对照组比较,均具有统计学意义($P<0.01$)。同时p21下游的周期蛋白依赖性激酶蛋白CDK2、Cyclin E均明显降低,与空载对照组、阴性对照组比较,均具有统计学意义($P<0.01$)。

结论:p21蛋白能增加胃癌细胞株对5-Fu的敏感性,其作用可能是通过使细胞周期发生 G_0/G_1 期阻滞及下调CDK2、Cyclin E的表达来实现的。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词:胃癌;p21;5-氟尿嘧啶;CDK2;Cyclin E

核心提示:p21基因是Cip家族中的一员,是细胞周期负性调控基因,可被野生型p53蛋白诱导表达而使细胞周期停滞于 G_1 期。本研究即采用脂质体转染技术改变p21蛋白变化,以研究其对5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)作用于胃癌细胞的敏感性影响及其可能的作用机制。

王维民, 邓建良, 顾贤成, 汤月华, 张国强, 周炎. 高表达p21增加5-Fu对胃癌细胞的杀伤作用及机制. 世界华人消化杂志 2014; 22(31): 4785-4789 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/4785.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i31.4785>

0 引言

胃癌是我国最常见的消化系肿瘤,占恶性肿瘤死亡率的第1位^[1]。针对胃癌治疗方面,手术切除、辅助化疗,新辅助化疗及胃癌的分子靶向治疗等仍是各方关注的热点。由于个体差异的存在,随着胃癌分子生物学研究的不断深入,胃癌的个体化治疗日益成为临床治疗及基础研究的重点^[2,3]。p21基因是Cip家族中的一员^[4],他是位于p53基因下游的细胞周期素依赖性激酶抑制因子^[5]。p21是细胞周期负性调控基因,可被野生型p53蛋白诱导表达而使细胞周期停滞于 G_1

期^[6-8]。本研究即采用脂质体转染技术改变p21蛋白变化,以研究其对5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)作用于胃癌细胞的敏感性影响及其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞系BGC823、SGC7901购自上海中科院细胞生物研究所。上述细胞株均于培养皿中贴壁生长,用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的RPMI-1640培养基,置37.0 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养。所有实验均在细胞处于对数生长期进行。胎牛血清、1640培养基、胰酶购自Gibco公司; Lipofectamine 2000购自life公司; p21质粒由南京医科大学周建伟教授馈赠; p21单抗购自Epitomics公司; 二抗、碘化丙啶(propidium iodide, PI)染料、RIPA裂解液均购自碧云天公司; 5-Fu购自上海旭东海普制药有限公司。

1.2 方法

1.2.1 p21蛋白转染:转染前24 h将处于对数生长期的细胞重新接种于六孔板中,长满底面积60%-80%时进行转染。将p21质粒4 μ L溶于无抗生素无血清的培养液0.1 mL中,混匀;将Lipofectamine 2000 8 μ L溶于无抗生素无血清的培养液0.1 mL中,混匀;室温孵育5 min。然后将上述两种溶液混合,旋起混匀,室温孵育20 min。再加入细胞培养液中,孵育36 h后,收集细胞。

1.2.2 CCK8比色法:取对数生长期细胞,0.25%胰酶消化,调细胞浓度为每孔 5×10^3 个,接种于96孔平底培养板。实验共分4组:p21高表达组、高表达质粒空载组、p21低表达组、低表达质粒空载组,每组设6个复孔。于每孔中加入5-Fu 200 mg/L,每组分24、36、48和60 h 4个时间段,吸取培养基,然后各孔加入CCK8 10 μ L和培养基100 μ L,温箱孵育2 h,酶标仪检测各孔的吸光度(A)值(450 nm)。计算生长抑制率。细胞生长抑制率(%) = (1-实验组A值/对照组A值) \times 100%。每组设6个平行样,实验重复3次。

1.2.3 PI单染法检测细胞周期:离心收集细胞,弃上清,用预冷PBS洗细胞2次。加入预冷700 mL/L乙醇,于4 $^{\circ}$ C固定过夜。收集细胞,以1 mL的PBS洗细胞1次,加入500 μ L PBS含50 μ g/mL PI, 100 μ g/mL RNase A, 0.2% Triton X-100, 4 $^{\circ}$ C避光孵育30 min。以标准程序用流式细胞仪检测,一般计数1-2万个细胞,结果用细胞周期拟和软件

相关报道
大量研究数据表明p21是一种重要的细胞周期调控蛋白。他参与细胞的生长、分化、衰老及死亡过程,同时又与肿瘤发生密切相关,在细胞的生理、病理过程中发挥着重要的作用。

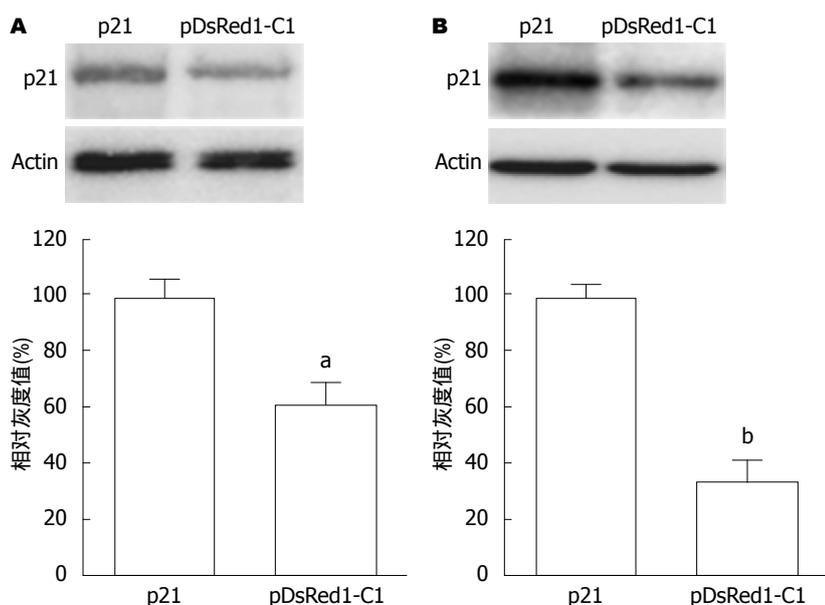


图1 转染p21质粒后, BGC823、SGC7901胃癌细胞中p21蛋白出现明显变化。A: BGC823细胞中p21表达量转染前后的灰度值比较; B: SGC7901细胞中p21表达量转染前后的灰度值比较。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs p21。

创新亮点
我们课题组采用蛋白转染技术, 使细胞内的p21成高表达状态; 然后研究其胃癌细胞对5-Fu化疗药物的敏感性, 同时发现p21下游蛋白CDK2、Cyclin E出现相应变化。

ModFit分析. 计算细胞增殖指数(proliferation index, pI) = $[(S+G_2/M)/(G_1+S+G_2/M)] \times 100\%$ 。

1.2.4 Western blot检测: 收集各实验组细胞, PBS冲洗后加入RIPA裂解液及蛋白酶抑制剂, 离心取上清液, 提取总蛋白。采用二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白浓度。取100 μ g总蛋白, 进行7.5%聚丙烯酰胺凝胶电泳, 60 V稳压电泳30 min, 电泳完将蛋白转至PVDF膜(100 V稳压电转移2 h), 5%脱脂奶粉室温封闭2 h, p21单抗(1:1000稀释), 4 $^{\circ}$ C与PVDF膜共同孵育过夜, TBST洗涤5 min \times 5次; 第二抗体为羊抗小鼠IgG-HRP(1:1000稀释), 37 $^{\circ}$ C孵育1 h。TBST洗涤, 5 min \times 10次。TBST洗涤, 5 min \times 10次, 最后底物显色。以上实验重复3次。

统计学处理 应用STATA10.0软件对数据进行分析。成组设计的 t 检验分析阴性对照组(mock)、空载对照组(pDsRed1-C1)和转染组(pDsRed1-C1-p21)中p21及下游蛋白CDK2、Cyclin E表达量、细胞增殖和细胞周期的差异。在细胞周期中, 数据以mean \pm SD表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 p21蛋白转染后的鉴定 Western blot检测结果显示: 转染p21质粒后, BGC823、SGC7901胃癌细胞中p21蛋白出现明显变化(图1)。

2.2 p21蛋白转染后5-Fu对BGC823、SGC7901胃癌细胞的增殖变化 CCK8比色法检测结果显示:

BGC823、SGC7901胃癌细胞经p21质粒转染后, p21高表达的细胞株对5-Fu敏感性明显增强, 与空载对照组、阴性对照组比较, 均具有统计学意义($P < 0.01$)(图2)。

2.3 p21蛋白转染后5-Fu对BGC823、SGC7901胃癌细胞的细胞周期变化 由表1可知, BGC823、SGC7901胃癌细胞经p21质粒转染后, p21高表达的细胞株处于 G_0/G_1 期比例明显增加, 而 S 、 G_2/M 期细胞比例明显减少; 计算出pI, 与空载对照组、阴性对照组比较, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 p21蛋白转染后5-Fu对BGC823、SGC7901胃癌细胞敏感性增强的作用机制 我们采用Western blot检测结果显示: BGC823、SGC7901胃癌细胞经p21质粒转染后, 再予5-Fu作用, 其下游的蛋白如: 周期蛋白依赖性激酶蛋白CDK2、细胞周期蛋白Cyclin E均明显降低, 与空载对照组、阴性对照组比较, 均具有统计学意义($P < 0.01$)(图3)。

3 讨论

近年来, 虽然早期胃癌发现率有所提高, 积极改进和规范手术方法以及应用综合治疗, 但大多数报道胃癌的5年生存率仍徘徊于20%-30%^[9]。大部分胃癌易在手术后复发, 尤其是淋巴结转移者^[10], 局部复发率高达80%以上, 因此, 胃癌的治疗依然是临床肿瘤学界面临的巨大挑战^[11]。随着人类基因组计划的完成和基因生物研究的迅

应用要点
提高p21蛋白的表达, 能明显提高BGC823、SGC7901胃癌细胞株对5-Fu的敏感性, 其机制可能是通过抑制其下游CDK2、Cyclin E蛋白表达。因此, p21蛋白转染与化疗药物联合应用, 可以为临床上治疗胃癌提供一种有效的治疗手段。

名词解释
 脂质体转染方法: 脂质体作为体内和体外输送载体的工具, 已经研究的十分广泛, 用合成的阳离子脂类包裹DNA, 同样可以通过融合而进入细胞. 使用脂质体将DNA带人不同类型的真核细胞, 与其他方法相比, 有较高的效率和较好的重复性.

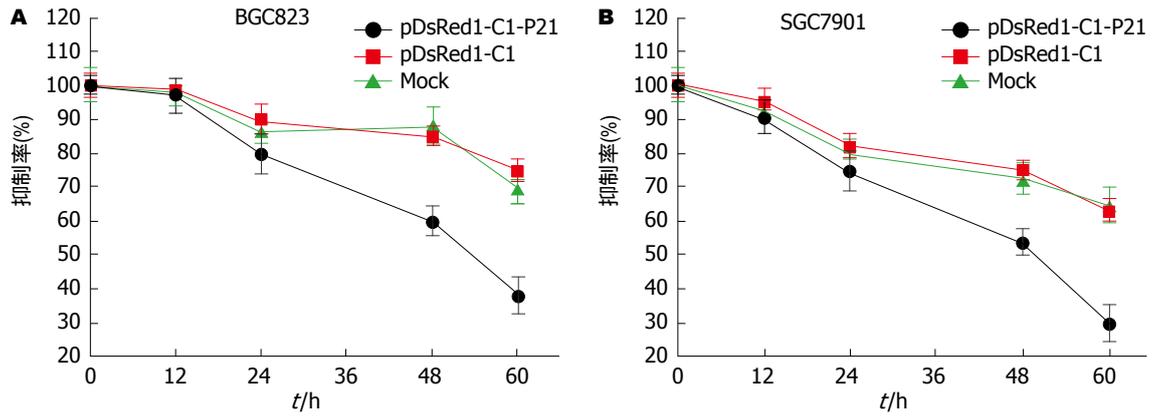


图 2 p21蛋白转染后5-Fu对BGC823、SGC7901胃癌细胞的增殖变化. A: BGC823; B: SGC7901. 5-Fu: 5-氟尿嘧啶.

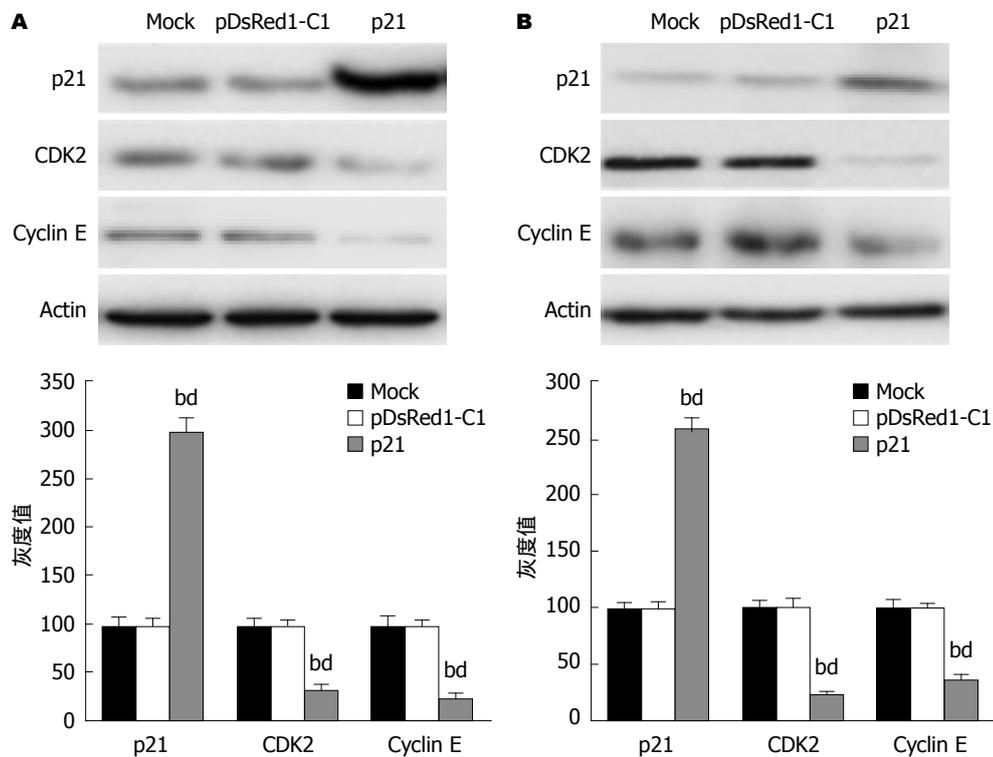


图 3 胃癌细胞经p21质粒转染后, 再予5-Fu作用, 其下游的蛋白变化. A: BGC823细胞中相关蛋白的灰度值比较; B: SGC7901细胞中相关蛋白的灰度值比较. ^b $P < 0.01$ vs mock; ^q $P < 0.01$ vs pDsRed1-C1. 5-Fu: 5-氟尿嘧啶.

速发展, 人类对胃癌发病机制及其相关生物特性将更多了解与把握, 生物芯片等检测工具的推广应用, 为未来定制特异的胃癌个体化方案奠定了坚实的基础^[12].

p21基因是1993年底发现的一种新的抑癌基因, 其机制在于p21能够与Cyclin D/CDK形成复合物使细胞周期停滞在G₁期; 他还可以通过C端与PCNA相互作用, 阻断PCNA活化DNA聚合酶的活性从而抑制DNA的合成, 使细胞周期停滞. 大量研究数据表明p21是一种重要的细胞周期调控蛋白. 他参与细胞的生长、分

化、衰老及死亡过程, 同时又与肿瘤发生密切相关, 在细胞的生理、病理过程中发挥着重要的作用^[13-15].

我们课题组采用蛋白转染技术, 使细胞内的p21成高表达状态. 利用CCK8方法检测p21变化后是否能对5-Fu化疗药物敏感, 结果发现: p21高表达的胃癌细胞株对5-Fu更加敏感; 接着我们又利用流式细胞术(PI单染法)检测细胞周期的变化, 结果发现: p21高表达的胃癌细胞株处于G₁期的百分比较p21低表达组增多, 且具有统计学意义; 最后我们用免疫印迹检测相关机制, 发现

表 1 各组细胞周期的变化

分组	细胞周期			p值
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
BGC823				
pDsRed1 - C1 - p21	70.63 ± 1.24 ^{ac}	18.25 ± 1.79	11.12 ± 0.93	29.37 ± 1.28 ^{ac}
pDsRed1 - C1	46.34 ± 0.77	17.57 ± 1.03	36.09 ± 1.75	53.66 ± 0.99
Mock	48.55 ± 1.67	22.13 ± 2.14	29.32 ± 0.92	51.45 ± 2.03
SGC7901				
pDsRed1 - C1 - p21	71.27 ± 0.64 ^{ac}	22.53 ± 1.67	6.20 ± 1.11	28.73 ± 1.72 ^{ac}
pDsRed1 - C1	42.42 ± 1.53	19.33 ± 1.99	38.25 ± 0.82	57.58 ± 2.34
Mock	44.37 ± 1.01	21.36 ± 0.64	34.27 ± 0.83	55.63 ± 1.52

^aP<0.05 vs pDsRed1 - C1组; ^cP<0.05 vs Mock组. pl: 增殖指数.

p21下游的相关蛋白CDK2、Cyclin E出现明显变化.

从我们实验数据中可以得出: 提高p21蛋白的表达, 能明显提高BGC823、SGC7901胃癌细胞对5-Fu的敏感性, 其机制可能是通过抑制其下游CDK2、Cyclin E蛋白表达. 因此, p21蛋白转染与化疗药物联合应用, 可以为临床上治疗胃癌提供一种有效的治疗手段.

4 参考文献

- 1 季加孚. 我国胃癌防治研究三十年回顾. 中国肿瘤临床 2013; 40: 1345-1351
- 2 张俊, 朱正纲, 林言箴. 胃癌分子靶向治疗进展. 外科理论与实践 2012; 16: 221-223
- 3 季加孚, 季鑫. 胃癌治疗的新进展. 循证医学 2011; 11: 82-86
- 4 Blandino-Rosano M, Alejandro EU, Sathyamurthy A, Scheys JO, Gregg B, Chen AY, Rachdi L, Weiss A, Barker DJ, Gould AP, Elghazi L, Bernal-Mizrachi E. Enhanced beta cell proliferation in mice over-expressing a constitutively active form of Akt and one allele of p21Cip. *Diabetologia* 2012; 55: 1380-1389 [PMID: 22327314]
- 5 Warfel NA, El-Deiry WS. p21WAF1 and tumorigenesis: 20 years after. *Curr Opin Oncol* 2013; 25: 52-58 [PMID: 23159848]
- 6 Liu X, Yu H, Cai H, Wang Y. Expression of CD24, p21, p53, and c-myc in alpha-fetoprotein-producing gastric cancer: Correlation with clinicopathologic

characteristics and survival. *J Surg Oncol* 2014; 109: 859-864 [PMID: 24619835]

- 7 Wang L, Wang G, Yang D, Guo X, Xu Y, Feng B, Kang J. Euphol arrests breast cancer cells at the G1 phase through the modulation of cyclin D1, p21 and p27 expression. *Mol Med Rep* 2013; 8: 1279-1285 [PMID: 23969579]
- 8 Xu H, Wang Z, Jin S, Hao H, Zheng L, Zhou B, Zhang W, Lv H, Yuan Y. Dux4 induces cell cycle arrest at G1 phase through upregulation of p21 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 446: 235-240 [PMID: 24589735]
- 9 张永辉, 朱健, 陈永胜, 丁璐璐, 陈建国. 启东市 2001-2007年胃癌生存率分析. 现代肿瘤医学 2012; 19: 2328-2330
- 10 张彬, 周业江. 胃癌中COX-2的表达及其与胃癌淋巴结转移的关系. 实用医学杂志 2011; 27: 3320-3323
- 11 Cervantes A, Roda D, Tarazona N, Roselló S, Pérez-Fidalgo JA. Current questions for the treatment of advanced gastric cancer. *Cancer Treat Rev* 2013; 39: 60-67 [PMID: 23102520]
- 12 李忠武, 曹登峰. 胃癌病理分型与临床个体化治疗 - 问题与展望. 中国医学前沿杂志(电子版) 2012; 4: 15-20
- 13 Liu J, Shen M, Yue Z, Yang Z, Wang M, Li C, Xin C, Wang Y, Mei Q, Wang Z. Triptolide inhibits colon-rectal cancer cells proliferation by induction of G1 phase arrest through upregulation of p21. *Phyto-medicine* 2012; 19: 756-762 [PMID: 22464014]
- 14 蒋金, 曹友德, 磨娜, 李静, 莫显刚. 姜黄素通过P53/P21/PCNA/eIF4E信号通路抑制A549细胞增殖. 第三军医大学学报 2012; 34: 49-53
- 15 刘彩双, 张志勇, 项薇薇. SIAH2, HIF-1 α 和p21ras与恶性肿瘤关系的研究进展. 临床和实验医学杂志 2014; 13: 150-154

编辑 郭鹏 电编 都珍珠



同行评价
本研究证实p21质粒转染胃癌细胞后可增加胃癌细胞对5-Fu的敏感性, 并对其可能机制进行了探讨, 对胃癌防治具有一定意义.