

rAd-p53 基因对耐化疗药物 MGC-803 胃癌细胞的抑制作用

孙锋, 黄明, 吴雪松, 雒海波, 唐浩然

昆明医科大学第二附属医院胃肠外科一病区, 云南 昆明 650101

摘要: **目的** 探讨 rAd-p53 基因对耐化疗药物 MGC-803 胃癌细胞的抑制作用。**方法** 体外培养经紫杉醇处理的 MGC-803 细胞 (MGC-803/PTX 细胞), 将其分为观察组和耐药对照组: 观察组分别加入 50、100、200、400、800、1600 MOI rAd-p53 注射液, 耐药对照组加入相应体积的培养液 RPMI-1640; 应用 MTT 法检测细胞增殖抑制情况, 应用流式细胞仪检测观察期细胞凋亡率和细胞周期。采用“爬片法”收集细胞, 将其分为 rAd-p53 处理组, 敏感对照组及耐药对照组, rAd-p53 处理组加入 400 MOI rAd-p53 注射液, 敏感对照组及耐药对照组均加入对应量的 RPMI-1640 培养基。3 组分别采用免疫组化法在光学显微镜下观察细胞内多耐药基因表达蛋白 (MDR1-Pgp 蛋白) 染色颗粒, 及免疫印迹法检测 MDR1-Pgp 蛋白表达量 (灰度值)。**结果** MTT 法检测结果显示, rAd-p53 对 MGC-803/PTX 细胞增殖的抑制作用显著, 其抑制率随着时间的增加而逐渐上升; 流式细胞术检测结果显示, 100、200、400 MOI rAd-p53 处理组 MGC-803/PTX 细胞周期被阻滞在 G2/M 期, 且其效果具有剂量依赖性; 不同浓度的 rAd-p53 处理后, MGC-803/PTX 细胞凋亡率显著高于耐药对照组 (P 均 < 0.05) 且具有剂量依赖性。免疫印迹法表明, rAd-p53 处理组 MDR1-Pgp 蛋白质灰度值显著高于敏感对照组, 显著低于耐药对照组 (P 均 < 0.05); 免疫组化法显示 rAd-p53 处理组细胞核蓝染, 可见少量阳性颗粒, 而耐药对照组细胞内见大量深染颗粒, 敏感对照组无阳性颗粒。**结论** rAd-p53 对胃癌 MGC-803/PTX 细胞的抑制效果显著, 因此可降低化疗治疗中的多药耐药性, 为胃癌治疗提供了新的治疗途径。

关键词: rAd-p53 基因; 化疗; 胃癌; MGC-803 细胞; 抑制; 耐药; 细胞凋亡

中图分类号: R 735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2016)01-0024-04

Inhibitory effect of rAd-p53 gene on gastric cancer MGC-803 cells resistant to chemotherapy drugs in vitro

SUN Feng, HUANG Ming, WU Xue-song, LUO Hai-bo, TANG Hao-ran

Department of First Division of Gastrointestinal Surgery, Second affiliated hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650101, China

Corresponding author: TANG Hao-ran, E-mail: zmdxjltklgcmsh@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitory effect of rAd-p53 gene on gastric cancer MGC-803/PTX cells resistant to chemotherapy drugs. **Methods** MGC-803 cells treated by paclitaxel cells (803/PTX cells) were cultured in vitro. The MGC-803/PTX cells were designed as observation group and control group. In observation group, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 MOI rAd-p53 injections were respectively added in culture medium, and the RPMI-1640 culture fluid of corresponding volume was added in culture medium. MTT method was used to detect cell proliferation inhibition rate, and flow cytometry was used to detect cell apoptosis rate and cell cycle. The "climbing slice" method was used to collect cells which were divided into rAd-p53 treatment group (adding 400 MOI rAd-p53 injection), sensitive control group and drug resistance control group (adding corresponding amounts of RPMI-1640 medium). In the three groups, immunohistochemical method was used to observe the staining granules of multidrug-resistance gene-associated Pgp protein (MDR1-Pgp protein) in cells under light microscope, and the immunoblotting test was used to detect the expression level of MDR1-Pgp protein (gray-scale value). **Results** MTT method detection result showed that rAd-p53 had significant inhibition effect on proliferation of MGC-803/PTX cells, and the inhibition rate gradually increased with the increase of effect-time. The flow cytometry detection result showed that in 100, 200, 400 MOI rAd-p53 treatment group, the cell cycle of MGC-803/PTX cells was blocked in G2/

M phase with dose-dependent manner, and cell apoptosis rate significantly higher than that in drug resistance control group (all $P < 0.05$) with dose-dependent manner also. The immunoblotting test detection result showed that the gray-scale value of MDR1-Pgp protein in rAd-p53 treatment group was significantly higher than that in sensitive control group and significantly lower than that in drug resistance control group (all $P < 0.05$). The immunohistochemical method detection result shows that the cell nucleus presented blue dye and a small quantity of positive particles can be seen in rAd-p53 treatment group, while a large number of deep dye particles in cells can be seen in drug resistance control group, and no positive cell was seen in sensitive control group. **Conclusion** The rAd-p53 gene has significant inhibitory effect on gastric cancer MGC-803/PTX cells, therefore it can decrease the multidrug-resistance in chemotherapy of gastric cancer and provide a new way for the treatment of gastric cancer.

Key words: rAd-p53 gene; Chemotherapy; Gastric cancer; MGC-803 cells; Inhibition; Drug-resistance; Cell apoptosis

胃癌具有较高的发病率,其治疗方法通常采用综合性治疗,如手术、化疗及生物治疗等,尤其是晚期,一般以化疗为主要治疗方法^[1],但多药耐药性常影响治疗,使化疗效果不明显^[2]。其中发生肿瘤转移的重要原因是细胞呈失控性生长,因此利用外源性基因来抑制细胞异常生长为治疗胃癌提供了一种可能的治疗途径^[3]。rAd-p53 基因能够在调节细胞生长周期过程中对细胞的异常生长进行抑制^[4]。有报道认为,rAd-p53 基因对肿瘤细胞有抑制作用^[5],本文研究 rAd-p53 基因对耐化疗药物胃癌 MGC-803 细胞的抑制作用,以期探讨治疗胃癌的新途径。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 仪器材料 倒置显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司);CO₂ 培养箱(上海三腾仪器有限公司);酶联免疫检测仪(DG5033 型,南京华东电子集团医疗装备有限公司);流式细胞仪(XTG-1600,苏州赛景生物科技有限公司)。

1.1.2 试剂 rAd-p53 注射液(规格:VP/ml 生产批号:S20090013;深圳赛百诺基因技术公司提供),二甲基亚砜(DMSO)(天津永大化学试剂公司),紫杉醇(PTX)注射液(哈药集团公司,规格:60 mg/支;生产批号:09122432),培养基(RPMI-1640,北京华美生物技术公司),胎牛血清(杭州四季清公司);胰蛋白酶(美国 Ptomega 公司),MTT(北京华美生物工程有限公司),兔抗人多耐药基因 MDR1 表达蛋白 Pgp 多克隆抗体(北京博奥森生物技术公司)。

1.1.3 细胞 人体胃癌细胞 MGC-803 细胞株,中国医学科学院肿瘤细胞库提供。

1.2 胃癌耐药细胞株 MGC-803/PTX 细胞培养 把胃癌 MGC-803 细胞接种在 RPMI-1640 培养瓶中,静置在 CO₂ 培养箱内,二氧化碳量为 5%,温度 37 ℃,饱和湿度环境中培养。观察细胞贴壁生长,隔日传代 1 次,至对数生长。起初将终浓度 1 ng/ml PTX 加入

培养基中进行 24 h 处理,用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次,依次加大 PTX 处理浓度,达到 80 ng/ml PTX 处理后,5 个月左右完成 MGC-803/PTX 细胞培养。倒置显微镜下观察其诱导前后细胞状态的变化。

1.3 检测指标

1.3.1 MTT 法检测抑制细胞增殖状况 MGC-803/PTX 细胞成对数生长后经 0.25% 胰酶消化,而后进行 3 min 离心,去除上清将其混在含有胎牛血清 RPMI-1640 培养液中,将细胞数量调整至 10⁵ 个/ml,用 96 孔培养板,加进 MGC-803/PTX 培养细胞,加量为 100 μl/孔,过夜培养后除去培养液,将其分作观察组和耐药对照组,观察组分别加进 50, 100, 200, 400, 800, 1600 MOI rAd-p53, 转染 50 MOI 应加进 0.05 ml rAd-p53 注射液, 100 MOI 应加进 0.1 ml rAd-p53 注射液,依次类推增加;耐药性对照组加进相应体积的培养液 RPMI-1640。两组各有 3 个复孔,每孔体积均为 200 μl,均在 5% 二氧化碳培养箱内 37 ℃ 温度环境中静置培养,培养时间分别是 1 d、2 d 和 3 d,终止培养 4 h 前,均向孔内加 10 μl 浓度为 5 ng/ml PTX 的 MTT 来孵育,直至终止培养。培养终止后进行离心,除去上清,孔内均加进 149 μl DMSO,低速振荡摇床将其混匀。运用酶联免疫检测仪器检测每孔的吸光(OD)值,所用波长为 570 nm,重复测量 5 次取其平均值,算出细胞增殖抑制率。其公式是:(1 - 观察组 OD 值/耐药对照组 OD 值) × 100% = 细胞增殖抑制率,运用拟合回归方程算出 rAd-p53 对 MGC-803/PTX 细胞增殖抑制半数的有效抑制浓度(IC₅₀),且制作抑制曲线图。

1.3.2 流式细胞仪检测细胞凋亡及细胞周期情况^[6] 去除对数生长期中的 MGC-803/PTX 培养液,均加进 100, 200, 400 MOI rAd-p53 进行处理,历时 72 h,将其作为观察组;另置加进 RPMI-1640 培养基处理的为对照组,处理时长同为 72 h。细胞消化收集使用 0.25% 胰酶,制作为单细胞悬液,加 PBS 溶液后进行离心、洗涤,放入冷乙醇,4 ℃ 环境中过夜,而后

再加 PBS 溶液行离心、洗涤,此后放入 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 RNA 水解酶,37 $^{\circ}\text{C}$ 环境中孵育 0.5 h,再加碘化丙啶,室温内避光反应 0.5 h,使用流式细胞仪器检测,分析计算出细胞凋亡率和周期百分比。

1.3.3 免疫组化法检测 MDR1-Pgp 蛋白 利用“爬片法”收集细胞,试验分作 rAd-p53 处理组、敏感对照组和耐药对照组,rAd-p53 处理组加 400 MOI rAd-p53;耐药对照组和敏感对照组均加对应量 RPMI-1640 培养基处理,3 d 后取出爬片,37 $^{\circ}\text{C}$ 环境中孵育 0.5 h 后冲洗 3 次,再行分化、封片,光学显微镜下观察其色泽,棕色表示阳性颗粒。

1.3.4 免疫印迹法检测 MDR1-Pgp 蛋白表达 获取 MDR1-Pgp 蛋白样品:分别分为 rAd-p53 处理组、敏感对照组和耐药对照组 3 组,并培养收集细胞,3 组样品中均加入细胞裂解液 100 μl ,超声波环境中匀浆 1 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 环境中静置 0.5 h,而后离心 10 min 取其上清。蛋白经过电泳、转移后获得待测膜条以进行免疫印迹。然后再行染色、脱色和冲洗,风干后保存以备比对。观察其免疫反应灰度值,并分析,灰度值越高表明其表达越强。

1.4 统计学方法 所有数据均使用 SPSS 16.0 统计学软件进行处理分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,行 t 检验,计数资料用百分数表示,采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞增殖抑制率 通过计算细胞增殖抑制率可知,rAd-p53 对 MGC-803/PTX 细胞增殖的抑制作用显著,其抑制率随着时间的增加而逐渐上升,24 h、48 h 和 72 h 的 IC50 分别是 1 887.95、995.66 和 645.16 MOI。具体抑制状况见图 1。

2.2 细胞凋亡率和细胞周期 100、200、400 MOI rAd-p53 组对 MGC-803/PTX 细胞发挥 3 d 作用后,细胞周期在 G2/M 期被阻滞且效果更为显著,与耐药对照组比较差异具有统计学意义(P 均 < 0.05),其在 S、G0/G1 期与耐药对照组的比较差异不具有统计学意义(P 均 > 0.05);经过不同浓度的 rAd-p53 处理后的 MGC-803/PTX 细胞凋亡率显著高于耐药对照组(P 均 < 0.05),且具有浓度依赖性。见表 1。

表 1 细胞凋亡和周期状况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞凋亡率	细胞周期		
		S	G0/G1	G2/M
耐药对照组	0.41 \pm 0.03	8.41 \pm 1.37	38.26 \pm 2.56	18.48 \pm 1.88
100 MOI rAd-p53 组	2.50 \pm 0.17*	8.82 \pm 0.83	41.57 \pm 1.58	26.44 \pm 0.96*
200 MOI rAd-p53 组	5.26 \pm 0.36* Δ	8.26 \pm 1.20	42.23 \pm 2.80	31.56 \pm 1.86* Δ
400 MOI rAd-p53 组	12.46 \pm 1.20* Δ #	9.44 \pm 0.41	39.52 \pm 2.47	39.23 \pm 1.41* Δ #

注:与耐药对照组比较,* $P < 0.05$;与 100 MOI rAd-p53 组比较, $\Delta P < 0.01$;与 200 MOI rAd-p53 组比较,# $P < 0.05$ 。

表 2 各组细胞蛋白质表达状况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	MDR1-Pgp 灰度值
rAd-p53 处理组	45.26 \pm 2.97
耐药对照组	158.56 \pm 9.47
敏感对照组	31.83 \pm 1.85
t_1 值	27.963
P_1 值	0.000
t_2 值	32.172
P_2 值	0.000
t_3 值	9.402
P_3 值	0.000

注: t_1 、 P_1 为 rAd-p53 处理组和耐药对照组比较; t_2 、 P_2 为耐药对照组和敏感对照组比较; t_3 、 P_3 为 rAd-p53 处理组与敏感对照组比较。

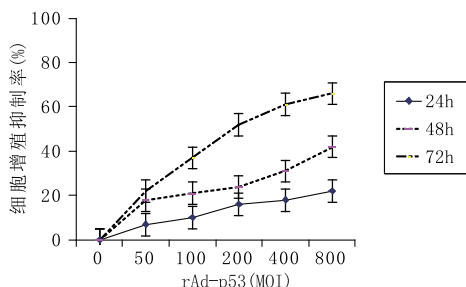


图 1 rAd-p53 对 MGC-803/PTX 细胞增殖的抑制作用

2.3 免疫印迹法检测 MDR1-Pgp 蛋白质表达结果 rAd-p53 处理组中细胞 MDR1-Pgp 灰度值显著高于敏感对照组($P < 0.01$),但显著低于耐药对照组($P < 0.01$)。见表 2。

2.4 免疫组织 MDR1-Pgp 蛋白检测结果 光学显微镜下观察各组 MDR1-Pgp 蛋白颜色,耐药对照组各细胞大小均匀,细胞内存在大量弥散阳性颗粒,深染、棕色细胞核;敏感对照组各细胞大小均匀,细胞核蓝染,半透明细胞质,无阳性颗粒;rAd-p53 处理组细胞细胞核蓝染,可见少量阳性颗粒。

3 讨论

随着人们生活方式的改变,胃癌的发病率逐渐上升,严重威胁着人们的生命健康。有研究证实,在胃癌早期中,治疗后患者生存期超过五年的可达 80% 以上,中期为 65.9%,胃癌后期的生存率一般很低^[7-8]。对胃癌的治疗通常采用综合治疗方法,一般是使用手术、放化疗、生物疗法等。在化疗治疗中,肿

瘤细胞对化疗药物多产生多药耐药(multi drug resistance, MDR)性和毒副作用,严重影响着化疗治疗的效果,肿瘤的耐药性已成为治疗癌症的重大难题^[9]。

有文献报道,rAd-p53 基因对癌细胞有一定的抑制作用^[10-11]。rAd-p53 基因是人体内的一个重要抑癌基因,它能指导 rAd-p53 蛋白的表达,能够将蛋白阻滞在 G1 期,经过完成基因修复,细胞进入 S 期,一旦基因修复失败,rAd-p53 蛋白则通过基因调节来诱导细胞凋亡,进而抑制肿瘤细胞的生长^[12-14]。本研究中运用流式细胞仪器对凋亡和周期进行检测,结果显示:100、200、400 MOI rAd-p53 对 MGC-803/PTX 细胞发挥作用 3 d 后,细胞周期在 G2/M 期被阻滞且效果显著,rAd-p53 经过剂量处理后 MGC-803/PTX 细胞凋亡率显著高于耐药对照组;对免疫组织 MDR1-Pgp 蛋白及蛋白表达检测中显示 rAd-p53 处理组中细胞 MDR1-Pgp 灰度值显著高于敏感对照组,即细胞蛋白质表达显著上升,rAd-p53 处理组中细胞 MDR1-Pgp 灰度值显著低于耐药对照组;光学显微镜下观察各组 MDR1-Pgp 蛋白颜色,耐药对照组各细胞大小均匀,细胞内存在大量弥散阳性颗粒,深染、棕色细胞核;敏感对照组各细胞大小均匀,细胞核蓝染,半透明细胞质,无阳性颗粒;rAd-p53 处理组细胞细胞核蓝染,可见少量阳性颗粒。在细胞增殖抑制率表现上,rAd-p53 对 MGC-803/PTX 细胞增殖的抑制作用显著,抑制率随着时间的增加而逐渐上升。本研究表明,rAd-p53 对胃癌 MGC-803/PTX 细胞的凋亡率和抑制率显著,降低了化疗治疗中的多药耐药性,为胃癌治疗提供了新的治疗途径。

参考文献

[1] 刘骥,魏雯,贺彬,等.姜黄素联合 MMC 对胃癌 MGC-803 细胞的生长抑制及细胞周期的影响[J].时珍国医国药,2015,12(2):

315-317.

- [2] Qing Y, Li Q, Ren T, et al. Upregulation of PD-L1 and APE1 is associated with tumorigenesis and poor prognosis of gastric cancer[J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9:901-909.
- [3] 李有鹏,孙丽萍,王世钟,等.沙樱桃脂类对人 MGC-803 细胞抑制作用的实验研究[J].中国临床研究,2013,26(2):108-109.
- [4] 戴支凯,黄姣娥,罗伟生,等.丹参酮 II A 抗人胃癌 MGC-803 细胞作用[J].中国药理学杂志,2011,23(19):1491-1495.
- [5] 王亚楠,徐红艳,李向柯,等.鞘氨醇激酶 1 抑制剂联合 5-FU 对胃癌 MGC-803 细胞的作用及其机制[J].西安交通大学学报(医学版),2014,14(3):364-369.
- [6] 韩银淑.染料木素对人胃癌 MGC-803 细胞增殖及 PKA 活性的影响[J].中国现代医生,2014,52(28):1-3,7.
- [7] 董金垚,杜志杰,肖帅帅,等.多种化疗药物对胃癌细胞杀伤效应的研究[J].中国普通外科杂志,2014,23(4):488-493.
- [8] 李宝霞,张鹏,杨雨虹.水飞蓟宾联合 5-FU 抑制胃癌 MGC-803 细胞增殖及机制[J].暨南大学学报(自然科学与医学版),2014,35(2):142-147.
- [9] 孙京,钱海利,王海娟,等.重组人 p53 腺病毒联合温热顺铂不同用药方式下对人结肠癌细胞株的抑制作用[J].中国现代手术学杂志,2014,8(2):81-85.
- [10] 何志坚,钟睿,刘海云.肺结节风注射液联合 5-Fu 对人胃癌细胞 MGC-803 增殖和凋亡的影响[J].实用癌症杂志,2014,26(10):1205-1207.
- [11] 陈光侠,郑丽红,刘世育,等.重组人 p53 腺病毒联合奥沙利铂对胃癌细胞 BGC-823 的生长抑制作用[J].江苏医药,2012,33(5):551-554.
- [12] 马西强,刘庆彤,谢江柳,等.光辉霉素 A 对人胃癌 BGC823 细胞增殖、凋亡、迁移的影响及其机制[J].中国临床研究,2014,27(9):1049-1052.
- [13] 刘磊,韩亮.金雀异黄素对胃癌细胞增殖和细胞周期的影响[J].中华实验外科杂志,2015,32(3):478-480.
- [14] Shiratsu K, Higuchi K, Nakayama J. Loss of gastric gland mucin-specific O-glycan is associated with progression of differentiated-type adenocarcinoma of the stomach[J]. Cancer science, 2014, 105(1): 126-133.

收稿日期:2015-09-04 修回日期:2015-09-20 编辑:周永彬