

· 论 著 ·

依维莫司联合顺铂对人胃癌 SGC7901 细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 表达的影响

刘莹¹, 朱祖安², 崔涛¹, 孔庆亮¹, 刘磊¹, 张瑞瑞¹

(1. 徐州医学院病理学教研室, 江苏徐州 221004; 2. 徐州医学院附属医院消化内科, 江苏徐州 221002)

摘要:目的 探讨依维莫司(RAD001)联合顺铂对人胃癌 SGC7901 细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 表达的影响。方法 体外培养 SGC7901 细胞,将其分为对照组,顺铂组(顺铂 2.50 mg/L),RAD001 低浓度组(RAD001 5.00 nmol/L)、RAD001 中浓度组(RAD001 10.00 nmol/L)、RAD001 高浓度组(RAD001 20.00 nmol/L)及联合组(顺铂 1.25 mg/L+RAD001 5.00 nmol/L),采用流式细胞术检测 SGC7901 细胞的凋亡率,采用免疫细胞化学、Western blot 检测 SGC7901 细胞 Bcl-2 和 Bax 的表达情况。结果 RAD001、顺铂作用 SGC7901 细胞 48 h 后,对照组,顺铂组,RAD001 低、中、高浓度组及联合组的细胞凋亡率分别为(8.04±0.48)%、(18.94±0.75)%、(10.47±1.05)%、(13.93±2.45)%、(17.20±0.65)%及(23.18±1.05)%。除 RAD001 低浓度组细胞凋亡率与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),其他各组细胞凋亡率均较对照组显著增加($P<0.05$)。与对照组比较,顺铂组、RAD001 组及联合组 SGC7901 细胞 Bcl-2 蛋白表达下降,而 Bax 蛋白表达增加,Bcl-2/Bax 比值降低($P<0.05$),联合组改变最明显。结论 RAD001 联合顺铂可通过上调 Bax 和下调 Bcl-2 蛋白的表达诱导 SGC7901 细胞凋亡。

关键词:细胞凋亡;基因;bcl-2;基因;bax;顺铂;依维莫司

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.02.006

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)02-0138-05

Effects of everolimus combined with cisplatin on apoptosis and Bcl-2, Bax expression of human gastric cancer SGC7901 cells

Liu Ying¹, Zhu Zu'an², Cui Tao¹, Kong Qingyan¹, Liu Lei¹, Zhang Ruirui¹

(1. Department of Pathology, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221004, China; 2. Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

Abstract: Objective To investigate everolimus(RAD001) combined with cisplatin on apoptosis and Bcl-2, Bax expression of human gastric cancer SGC7901 cells. **Methods** SGC7901 cells were cultured *in vitro* and divided into control group, cisplatin group (cisplatin 2.50 mg/L), RAD001 low concentration group(RAD001 5.00 nmol/L), RAD001 medium concentration group(RAD001 10.00 nmol/L), RAD001 high concentration group(RAD001 20.00 nmol/L) and combination group (cisplatin 1.25 mg/L+RAD001 5.00 nmol/L). Flow cytometry was employed to detect apoptotic rate of SGC7901 cells and immunocytochemistry and Western blot were conducted to measure Bcl-2, Bax expression of SGC7901 cells. **Results** After 48 h treatment, apoptotic rates of SGC7901 cells in control group, cisplatin group, RAD001 low concentration group, RAD001 medium concentration group, RAD001 high concentration group and combination group were (8.04±0.48)%, (18.94±0.75)%, (10.47±1.05)%, (13.93±2.45)%, (17.20±0.65)% and (23.18±1.05)%. Except RAD001 low concentration group showing no statistically significant difference when compared to control group, the apoptotic rates in the other groups were obviously increased($P<0.05$). Compared with control group, SGC7901 cells in cisplatin group, RAD001 groups and combination group showed decreasing Bcl-2 and increasing Bax protein expression, and lower Bcl-2/Bax ratio($P<0.05$). Changes in combination group were the most obvious. **Conclusion** RAD001 combined with cisplatin can induce apoptosis in SGC7901 cells via up-regulating Bax and down-regulating Bcl-2 protein expression.

Key words: apoptosis; genes;bcl-2; genes;bax; cisplatin; everolimus

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路的过度活化与肿瘤的发生、发展密切相关^[1-2]。顺铂是当前消化道肿瘤联合化疗中常用的药物之一,但其药理作用的发挥往往需要很高剂量,从而导致较为严重的胃肠道不良反应。因此,联合用药成为减少顺铂不良反应的有效手段。依维莫司(everolimus, RAD001)是 mTOR 特异性抑制剂雷帕霉素的衍生剂, Fingar 等^[3]将 RAD001 作用于成人 T 细胞白血病(adult T-cell leukemia, ATL)和人 T 淋巴细胞白血病病毒-1(human T-cell leukemia virus type 1, HTLV-1)白血

病的 T 细胞后发现其能阻滞细胞周期,诱导细胞凋亡。Chiang 等^[4]研究发现 RAD001 联合吉西他滨及紫杉醇治疗非霍奇金淋巴瘤对肿瘤细胞凋亡有协同作用。Hayun 等^[5]研究显示,雷帕霉素和姜黄素通过降低 Bcl-2, 升高 Bax, 从而提高半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cysteiny aspartate specific protease, Caspase)-9、Caspase-3 和 Caspase-7 的活性,诱发慢性 B 细胞性白血病细胞的凋亡。本实验通过体外培养人胃癌 SGC7901 细胞,并予 RAD001 及顺铂处理,检测细胞凋亡及细胞中 Bcl-2、Bax 蛋白表达的改变,探讨 Bcl-2/Bax 在 RAD001 联合顺铂促 SGC7901

细胞凋亡中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 人胃癌 SGC7901 细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所;RPMI 1640 培养基、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司;RAD001 购自美国 Sigma 公司,用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)配成 1 mmol/L 贮备液,实验时用 RPMI 1640 稀释为实验所需浓度;顺铂购自江苏豪森药业股份有限公司;鼠抗人 Bcl-2(sc-130308)、Bax(sc-6236)单克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司;链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase,SP)免疫细胞化学试剂盒及二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine,DAB)显色剂均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Annexin V-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)细胞凋亡检测试剂盒(KGA107)购于南京凯基生物科技发展有限公司;其他试剂均为分析纯级。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SGC7901 细胞在 37 ℃,5%CO₂ 培养箱中培养,培养基含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素,用 0.5%的胰蛋白酶消化传代,取对数生长期、细胞活力大于 99%的细胞用于实验研究。

1.2.2 细胞凋亡的流式细胞仪检测 消化对数生长期 SGC7901 细胞,制成密度为 1.0×10⁵/mL 的细胞悬液,置于 6 孔板内,每孔 5 mL。24 h 细胞附壁后移去上清液,无血清培养 12 h 后,加入药物干预,将细胞分为对照组,顺铂组(2.50 mg/L 干预),RAD001 低、中、高浓度组(浓度分别为 5.00、10.00、20.00 nmol/L)及联合组(顺铂 1.25 mg/L + RAD001 5.00 nmol/L 干预),每组 3 个平行样本。48 h 后收集细胞,采用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒进行染色,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.3 细胞 Bcl-2、Bax 蛋白的 SP 免疫细胞化学法检测 消化对数生长期 SGC7901 细胞,制成密度为 1.0×10⁵/mL 的细

胞悬液,置于放入圆形盖玻片的 6 孔板内,每孔 5 mL,细胞分组同 1.2.2 部分,24 h 后按分组加药干预,每组 3 个平行样本。继续培养 48 h,取出盖玻片,用中性甲醛溶液固定,采用 SP 免疫细胞化学法检测细胞中 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达,Bcl-2 和 Bax 蛋白主要表达于细胞质,阳性染色为深浅不一的黄棕色颗粒。每组随机观察 10 个高倍视野,计数阳性细胞数占视野总细胞数的百分比。

1.2.4 细胞 Bcl-2、Bax 蛋白的 Western blot 检测 待细胞铺满瓶底约 90%后,移去上清液,实验分组同 1.2.2,按分组加入药物,最终体积 5 mL,每组 3 个平行样本。药物作用 48 h 后收集细胞,加入蛋白裂解液,提取蛋白后进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE),半干转至硝酸纤维素膜上,加入鼠抗人 Bcl-2、Bax 单克隆抗体,4 ℃冰箱过夜孵育后,洗涤加入第二抗体,室温孵育 2 h,洗涤后用显色液显色,以 β-actin 为内参。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *q* 检验。检验标准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RAD001、顺铂对 SGC7901 细胞凋亡率的影响 RAD001 单独或联合顺铂作用 SGC7901 细胞 48 h 后,对照组,顺铂组,RAD001 低、中、高浓度组及联合组的细胞凋亡率分别为(8.04±0.48)%、(18.94±0.75)%、(10.47±1.05)%、(13.93±2.45)%、(17.20±0.65)%及(23.18±1.05)%。除 RAD001 低浓度组细胞凋亡率与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)外,其他各组细胞凋亡率均较对照组显著增加($P<0.05$);随着 RAD001 浓度的增加,细胞凋亡率逐渐增加,结果显示细胞凋亡率存在 RAD001 浓度依赖性($P<0.05$);联合组分别与 RAD001 中浓度组、顺铂组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1。

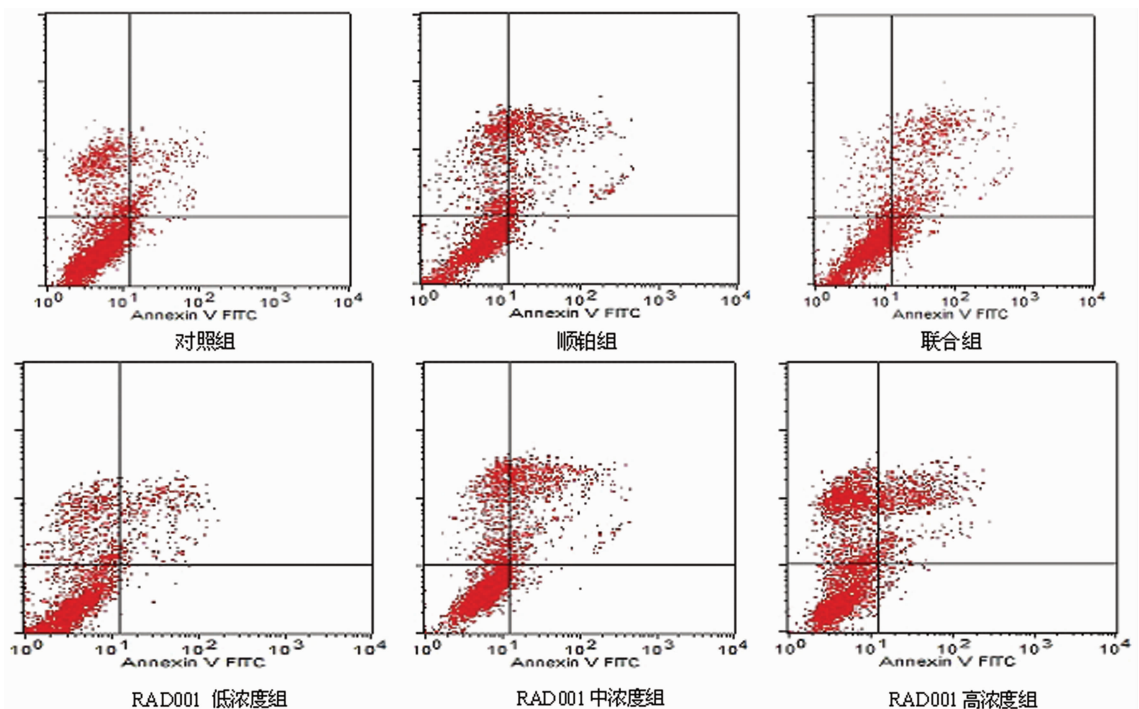


图 1 RAD001、顺铂对 SGC7901 细胞凋亡影响的流式细胞分析(48 h)

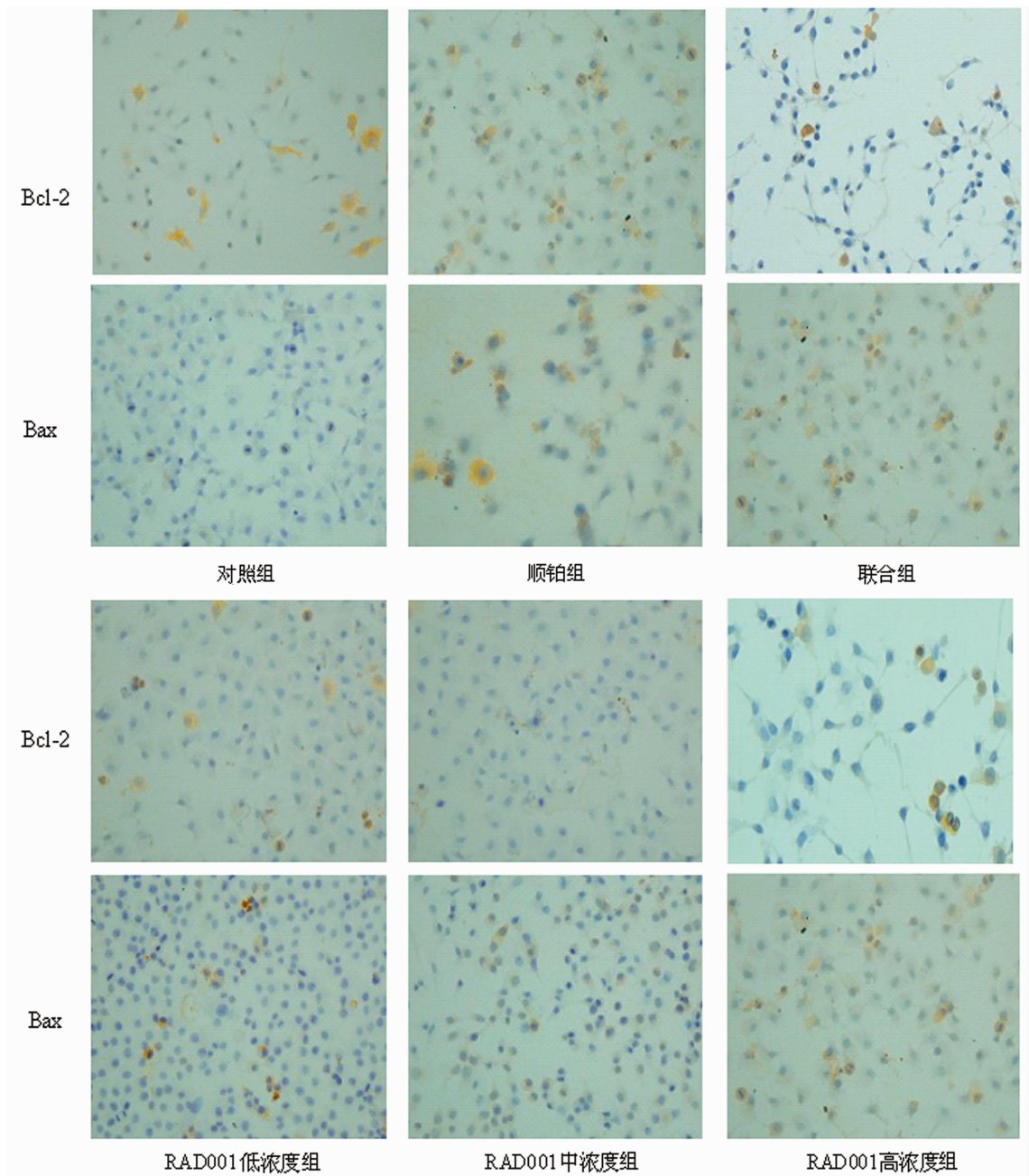


图 2 RAD001、顺铂对 SGC7901 细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 (SP×400)

表 1 免疫细胞化学检测 RAD001、顺铂对 SGC7901 细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	阳性率 (%)		Bcl-2/Bax
	Bax	Bcl-2	
对照组	21.90±0.70	76.03±2.36	3.47±0.01
顺铂组	35.87±1.59*	64.40±1.31*	1.48±0.46*
RAD001 低浓度组	33.73±1.14*	56.10±0.27*	1.91±0.85*
RAD001 中浓度组	39.73±1.33*	53.37±1.43*	1.41±0.53*
RAD001 高浓度组	51.43±1.50*	45.33±1.97*	0.81±0.49*
联合组	50.43±0.71*#	41.47±1.32*#	0.90±0.37*

*: $P < 0.05$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, 与顺铂组、RAD001 中浓度组比较。

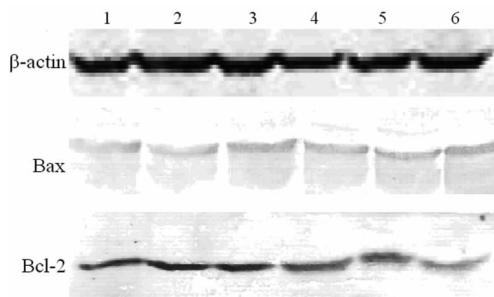
表 2 Western blot 检测 RAD001、顺铂对 SGC7901 细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Bax	Bcl-2
对照组	0.35±0.01	1.32±0.07
顺铂组	0.59±0.02*	0.68±0.01*
RAD001 低浓度组	0.47±0.01*	0.84±0.03*
RAD001 中浓度组	0.58±0.02*	0.74±0.01*
RAD001 高浓度组	0.67±0.01*	0.64±0.03*
联合组	0.68±0.03*	0.61±0.03*

*: $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.2 RAD001、顺铂对 SGC7901 细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 免疫细胞化学检测显示, SGC7901 细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白主要表达于细胞质, 阳性染色为棕黄色颗粒, 见图 2。作用

48 h 后,与对照组比较,RAD001 组、顺铂组及联合组 SGC7901 细胞 Bcl-2 蛋白表达下降,而 Bax 蛋白表达增加,Bcl-2/Bax 比值降低($P < 0.05$),见表 1;联合组分别与 RAD001 中浓度组、顺铂组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Western blot 检测显示,与对照组比较,RAD001 单独或联合顺铂作用 48 h 后,SGC7901 细胞 Bcl-2 蛋白表达下降,Bax 蛋白表达增加($P < 0.05$),其中以联合组改变最明显,见图 3、表 2。



1:对照组;2:顺铂组;3:RAD001 低浓度组;4:RAD001 中浓度组;5:RAD001 高浓度组;6:联合组。

图 3 Western blot 检测 RAD001、顺铂对 SGC7901 细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

3 讨论

mTOR 是一种进化十分保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,其主要控制与细胞生长和增殖密切相关蛋白质的合成^[6],目前发现 mTOR 与恶性肿瘤生长、增殖、分化、凋亡等密切相关^[7-8]。雷帕霉素可与细胞内受体 FK506 结合蛋白 12 (FK506-binding protein, FKBP12) 结合形成 FKBP-雷帕霉素复合物,再与 mTOR 的 FRB 激酶结构域相结合,从而抑制 mTOR 的激酶活性^[9]。过去对于 RAD001 的研究国内局限于其作为免疫抑制剂在移植方面的应用,近年在肿瘤方面的研究不断增多^[10-12]。

研究表明,mTOR 在胃癌的发生、发展中呈现过表达^[13-14],mTOR 阳性患者较 mTOR 阴性患者预后差^[15-16]。本实验中利用 mTOR 特异性抑制剂 RAD001 干预胃癌 SGC7901 细胞,流式细胞仪检测细胞凋亡结果发现,高浓度 RAD001 可以促进 SGC7901 细胞凋亡;联合用药作用更为显著。这些结果进一步证实 mTOR 在胃癌的发生、发展过程中发挥了重要作用。

作者前期研究发现 RAD001 可通过下调 Survivin 蛋白表达而促进 SGC7901 细胞的凋亡,从而抑制胃癌 SGC7901 细胞的增殖^[17]。从凋亡发生的机制来看,Survivin 和 Bcl-2 分别通过不同通路行使不同的抗凋亡功能。在凋亡过程中有多种蛋白参与调控,除 Survivin 外,Bcl-2 蛋白家族是人们研究最多的一类凋亡蛋白。Bcl-2 家族成员分为两大类:促凋亡类,如 Bid、Bax、Bak 等;抑凋亡类,如 Bcl-2、Bcl-x1 等,这 2 类蛋白可通过形成异二聚体发挥相互拮抗或放大作用^[18-19]。因此,Bcl-2/Bax 的比值是决定细胞凋亡与否的主要因素。从作用机制而言,Bcl-2 不仅可能通过抑制细胞色素 C 从线粒体的释放而调控线粒体渗透性转换孔的开启,从而抑制 Caspase-3 的活化,还可能参与抑制 Caspase-3 的合成^[20-21]。

为了进一步探讨 RAD001 的促细胞凋亡机制,本实验中采用 SP 免疫细胞化学及 Western blot 方法检测细胞 Bcl-2 和

Bax 蛋白的表达。结果显示 RAD001 单独及联合顺铂可诱导 SGC7901 细胞凋亡,联合作用强于单独用药。RAD001 单独作用 SGC7901 细胞可下调 Bcl-2,上调 Bax 蛋白表达,Bcl-2/Bax 比值下降;RAD001 联合顺铂作用后这种作用增强。因此,作者认为 RAD001 联合顺铂可通过上调 Bax 和下调 Bcl-2 蛋白的表达,诱导 SGC7901 细胞凋亡。但本实验仅为体外实验,下一步作者将会应用 RAD001 联合顺铂作用于裸鼠异种移植性胃癌模型,进行哺乳动物的体内实验,以揭示 RAD001 在胃癌治疗上的潜在应用价值,为其今后临床应用提供实验依据。

参考文献:

- [1] Lang SA, Gaumann A, Koehl GE, et al. Mammalian target of rapamycin is activated in human gastric cancer and serves as a target for therapy in an experimental model [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(8):1803-1810.
- [2] Lang SA, Gaumann A, Koehl GE, et al. Mammalian target of rapamycin is activated in human gastric cancer and serves as a target for therapy in an experimental model [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(8):1803-1810.
- [3] Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression [J]. *Oncogene*, 2004, 23(18):3151-3171.
- [4] Chiang CT, Yeh PY, Gao M, et al. Combinations of mTORC1 inhibitor RAD001 with gemcitabine and paclitaxel for treating non-Hodgkin lymphoma [J]. *Cancer Lett*, 2010, 298(2):195-203.
- [5] Hayun R, Okun E, Berrebi A, et al. Rapamycin and curcumin induce apoptosis in primary resting B chronic lymphocytic leukemia cells [J]. *Leuk Lymphoma*, 2009, 50(4):625-632.
- [6] Latres E, Amini AR, Amini AA, et al. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(4):2737-2744.
- [7] Philp AJ, Campbell IG, Leet C, et al. The phosphatidylinositol 3'-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(20):7426-7429.
- [8] Mabuchi S, Altomare DA, Cheung M, et al. RAD001 inhibits human ovarian cancer cell proliferation, enhances cisplatin-induced apoptosis, and prolongs survival in an ovarian cancer model [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(14):4261-4270.
- [9] Jacinto E, Hall MN. Tor signalling in bugs, brain and brawn [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(2):117-126.
- [10] Xu B, Wu Y, Shen L, et al. Two-dose-level confirmatory study of the pharmacokinetics and tolerability of everolimus in Chinese patients with advanced solid tumors [J]. *J*

Hematol Oncol, 2011, 4:3.

- [11] Lim T, Lee J, Lee DJ, et al. Phase I trial of capecitabine plus everolimus (RAD001) in patients with previously treated metastatic gastric cancer [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011, 68(1):255-262.
- [12] Lee KH, Hur HS, Im SA, et al. RAD001 shows activity against gastric cancer cells and overcomes 5-FU resistance by downregulating thymidylate synthase [J]. *Cancer Lett*, 2010, 299(1):22-28.
- [13] Murayama T, Inokuchi M, Takagi Y, et al. Relation between outcomes and localisation of p-mTOR expression in gastric cancer [J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(5):782-788.
- [14] 徐大志, 夏良平, 林桐榆, 等. 磷酸化的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白在胃癌组织中的表达 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2009, 30(3):304-307.
- [15] 潘军, 于观贞, 陈颖, 等. mTOR 和 VEGF 在胃癌中的表达及与预后关系的研究 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2008, 13(8):695-699.
- [16] Boehm A, Mayerhofer M, Herndlhofer S, et al. Evaluation of in vivo antineoplastic effects of rapamycin in patients

with chemotherapy-refractory AML [J]. *Eur J Intern Med*, 2009, 20(8):775-778.

- [17] 刘磊, 刘莹, 孔庆究. RAD001 对胃癌 SGC7901 细胞生长的抑制作用及分子机制 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2011, 31(1):31-37.
- [18] Fernández-Luna JL. Apoptosis regulators as targets for cancer therapy [J]. *Clin Transl Oncol*, 2007, 9(9):555-562.
- [19] Topuridze ML, Kipiani VA, Pavliashvili NS, et al. Molecular mechanisms of apoptosis [J]. *Georgian Med News*, 2007(150):38-45.
- [20] Lalier L, Cartron PF, Juin P, et al. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2007, 12(5):887-896.
- [21] Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential [J]. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19(5):488-496.

(收稿日期:2012-08-28 修回日期:2012-11-11)

(上接第 133 页)

- [12] Xu J, Lü B, Xu F, et al. Dynamic down-regulation of Krüppel-like factor 4 in colorectal adenoma-carcinoma sequence [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008, 134(8):891-898.
- [13] Camilli TC, Weeraratna AT. Striking the target in Wnt-y conditions; intervening in Wnt signaling during Cancer progression [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(5):702-711.
- [14] Zhang W, Chen X, Kato Y, et al. Novel cross talk of Kruppel-like factor 4 and beta-catenin regulates normal intestinal homeostasis and tumor repression [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(6):2055-2064.
- [15] Liu Y, Zhang C, Fan J, et al. Comprehensive analysis of clinical significance of stem-cell related factors in renal

cell cancer [J]. *World J Surg Oncol*, 2011, 9:121.

- [16] 黄镇, 王子卫, 张能, 等. KLF4 对胃癌 SGC-7901 细胞株体外生长增殖的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(8):822-825.
- [17] Ghaleb AM, McConnell BB, Nandan MO, et al. Haploinsufficiency of krüppel-like factor 4 promotes adenomatous polyposis coli dependent intestinal tumorigenesis [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(15):7147-7154.
- [18] Yori JL, Johnson E, Zhou G, et al. Kruppel-like factor 4 inhibits epithelial-to-mesenchymal transition through regulation of E-cadherin gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(22):16854-16863.

(收稿日期:2012-08-09 修回日期:2012-12-10)

统计资料类型

统计资料共有三种类型:计量资料、计数资料和等级资料。按变量值性质可将统计资料分为定量资料和定性资料。

定量资料又称计量资料,指通过度量衡的方法,测量每一个观察单位的某项研究指标的量的大小,得到的一系列数据资料,其特点为具有度量衡单位、多为连续性资料、可通过测量得到,如身高、红细胞计数、某一物质在人体内的浓度等有一定单位的资料。

定性资料分为计数资料和等级资料。计数资料为将全体观测单位(受试对象)按某种性质或特征分组,然后分别清点各组观察单位(受试对象)的个数,其特点是没有度量衡单位,多为间断性资料,如某研究根据患者性别将受试对象分为男性组和女性组,男性组有 72 例,女性组有 70 例,即为计数资料。等级资料是介于计量资料和计数资料之间的一种资料,可通过半定量的方法测量,其特点是每一个观察单位(受试对象)没有确切值,各组之间仅有性质上的差别或程度上的不同,如根据某种药物的治疗效果,将患者分为治愈、好转、无效或死亡。