

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.20.006

文章编号: 1005-8982(2017)20-0026-08

IEX-1 蛋白在胃癌中的表达及其意义*

毛山山,程小珍,崔荣花,元建华,王美清

(中南大学湘雅医学院附属海口医院 肿瘤化疗科,海南 海口 570208)

摘要:目的 揭示即刻早期反应 X-1(IEX-1)蛋白在胃癌组织及细胞系中的表达,探讨其对人胃癌细胞凋亡和增殖的影响。**方法** 采用免疫组织化学法检测 100 例胃镜活检标本中 IEX-1 蛋白的表达,用实时荧光定量聚合酶链反应和 Western blot 检测人正常胃黏膜细胞 GES-1 和胃癌细胞 MKN28 中 IEX-1 基因和蛋白的表达,同时转染 IEX-1 的过表达质粒 pcDNA3-FLAG-IEX-1 和干扰质粒 pLL3.7-si-IEX-1,分别采用流式细胞术及四甲基偶氮唑盐比色法检测 IEX-1 对细胞周期、凋亡及增殖的影响。**结果** 胃癌组织中 IEX-1 蛋白表达水平高于正常胃组织和慢性胃炎组织 ($P < 0.05$),且随着病情进展,IEX-1 表达水平有逐渐升高的趋势。相对于人正常胃黏膜细胞 GES-1,胃癌细胞 MKN28 中 IEX-1 基因和蛋白表达更高 ($P < 0.05$)。与对照组相比,IEX-1 蛋白表达增高后 S 期细胞比例升高,G₂ 期细胞比例降低,细胞增殖率升高,凋亡减少 ($P < 0.05$),而干扰 IEX-1 蛋白表达后,G₁ 期细胞升高,G₂ 期细胞比例下降,细胞增殖率下降,细胞凋亡增加 ($P < 0.05$)。**结论** IEX-1 蛋白在胃癌组织中呈高表达,在人胃癌细胞中上调 IEX-1 蛋白能促进细胞增殖,发挥抗凋亡能力,干扰 IEX-1 蛋白表达能阻滞细胞周期进程,并诱导凋亡。

关键词: 胃癌;即刻早期反应 X-1;增殖;凋亡

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

Expression of IEX-1 protein in gastric carcinoma and its effect on apoptosis and proliferation of human gastric cancer cells*

Shan-shan Mao, Xiao-zhen Cheng, Rong-hua Cui, Jiang-hua Yuan, Mei-qing Wang

(Department of Oncology, Haikou Hospital Affiliated to Xiangya Medical College of Central South University, Haikou, Hainan 570208, China)

Abstract: Objective To reveal the expression of IEX-1 protein in gastric cancer tissues and cell lines, and investigate the effect of IEX-1 on the proliferation and apoptosis of human gastric cancer cells. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect IEX-1 protein expression in 100 samples of gastric mucosal biopsy. IEX-1 gene and protein expressions were detected by fluorescence qRT-PCR and Western Blot respectively in normal gastric mucosa GES-1 cells and gastric cancer MKN28 cells. pcDNA3-FLAG-IEX-1 plasmid and pLL3.7-si-IEX-1 plasmid were transfected into MKN28 cells respectively, and then cell cycle, apoptosis and proliferation were detected by flow cytometry and MTT assay. **Results** The expression of IEX-1 protein in the gastric cancer tissues was higher than that in the normal gastric tissues and the chronic gastritis tissues ($P < 0.05$), and the expression level of IEX-1 was gradually increased with the progress of the disease. The expressions of IEX-1 gene and protein in the gastric cancer MKN28 cells were higher than those in the normal gastric mucosal GES-1 cells ($P < 0.05$). Compared with the control group, the increased expression of IEX-1 protein could increase the proportion of the cells in S phase, decrease the proportion of the cells in G₂ phase, increase the rate of cell proliferation, and decrease apoptosis ($P < 0.05$). After the expression of IEX-1 protein was interfered, the percentage of G₁ phase cells increased, that of G₂ phase cells decreased, the rate of cell proliferation decreased, apoptosis increased ($P < 0.05$). **Conclusions** IEX-1 protein is highly expressed in gastric cancer tissues. Up-regulation of IEX-1 protein expression can promote the proliferation of

收稿日期:2017-03-20

* 基金项目:2013 年海南省海口市重点科技计划项目(No:2013-70)

human gastric cancer cells and play an anti-apoptotic role. Interfering with the expression of IEX-1 protein could block cell cycle progression and induce apoptosis.

Keywords: gastric cancer; IEX-1; proliferation; apoptosis

胃癌是来自于胃黏膜上皮的恶性肿瘤,在全部恶性肿瘤中排第 3 位,是消化道最常见的恶性肿瘤,可见胃癌是威胁人类健康的常见病。人类即刻早期反应基因 X-1(immediate early response gene X-1, IEX-1)位于人染色体 6p21.3,全长 1.2 kb,表达含 156 个氨基酸残基的蛋白,分子量约为 18 kD^[1-2]。IEX-1 表达有组织差异性,被证实是一种凋亡相关调节蛋白,在不同细胞和组织中能够正性或负性调控凋亡相关过程,参与很多肿瘤分子生物学过程^[3-5]。但目前关于其在胃癌研究中的报道较少,在胃癌中的功能尚不清楚。本研究拟通过检测 IEX-1 蛋白在胃癌组织中的表达水平,并分析其对胃癌细胞凋亡和增殖的影响,探讨其在胃癌进程中的作用,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 主要试剂和仪器 达尔伯克必需基本培养基(dulbecco's minimum essential medium, DMEM)购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自法国 Biowest 公司,兔抗人 IEX-1 多克隆抗体购自美国 Sigma 公司,鼠抗人 Tunbulin 单克隆抗体购自加拿大 Fermentas 公司, Lipo™ 2000 转染试剂、逆转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒及限制性内切酶均购自日本 TaKaRa 公司, pcDNA3-flag 质粒、pLL3.7 质粒、T4 连接酶、DNA 抽提试剂盒、凝胶回收试剂盒、即用二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB)显色剂、四甲基偶氮唑盐比色法[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT] 试剂及碘化丙啶试剂均购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,培养箱和超净工作台购自美国 Thermo Forma 公司, ABI PRISM 7700 qRT-PCR 仪购自美国 ABI 公司,水平式琼脂糖凝胶电泳仪、垂直式电泳仪及湿式电转移均购自美国 Bio-Rad 公司, ACEA Novo Cyte™ 流式细胞仪购自杭州艾森生物有限公司,凝胶成像系统购自美国 Gene 公司,光学显微镜购自日本 Nikon 公司。所有引物委托北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成。

1.1.2 组织标本和细胞 为研究正常胃组织→慢性胃炎→胃癌过程中 IEX-1 蛋白的表达变化,在中南

大学湘雅医学院附属海口医院 2014 年 1 月 -2015 年 12 月胃镜活检患者中收集 10 例正常胃组织、40 例慢性胃炎组织及 50 例胃癌组织标本。所有患者签署标本研究知情同意书。人正常胃黏膜细胞 GES-1 购自上海拜力生物科技有限公司,胃癌细胞 MKN28 购自国家实验细胞资源共享平台。

1.2 方 法

1.2.1 免疫组织化学法 采用二步法检测正常胃组织、慢性胃炎组织及胃癌组织中 IEX-1 蛋白的表达。4 μm 切片 56℃ 过夜。次日常规脱蜡和去内源性过氧化物酶,加入三羟基甲胺-盐酸缓冲盐溶液(Tris-HCl buffer saline, TBS)进行抗原修复。擦去组织周围 TBS,置切片于湿盒内,滴加正常绵羊血清(1:20),70 μl/片,37℃、20 min。吸去切片上部分血清,滴加工作浓度兔抗人 IEX-1 多克隆抗体(1:200),70 μl/片,37℃、1 h 后,4℃ 放置过夜。阴性对照用 TBS 代替一抗。次日滴加相对应工作浓度二抗,70 μl/片,37℃、1 h,滴加 DAB 显色。开始出现背景时,用蒸馏水终止显色。苏木素复染后立即流水冲洗。将切片于 56℃ 烤箱内烤干,中性树胶封片,光镜下观察。染色程度由 2 位病理医生在不知临床资料的情况下独立评价。400 倍光镜下观察 8 个任一视野,得到染色强度和阳性细胞百分率。IEX-1 染色评分由染色强度(0~3 级:0 级为阴性,1 级为弱阳性,2 级为中等阳性,3 级为强阳性)和阳性细胞百分率(0~4 级:0 级为 0%,1 级为 1%~25%,2 级为 26%~50%,3 级为 51%~75%,4 级为 76%~100%)的乘积得到,分为不同等级(0、1、2、3、4、6、8、9 和 12)。0 级为阴性表达,1、2 和 3 级为弱阳性表达,4 和 6 级为中度阳性表达,8、9 和 12 级为强阳性表达。

1.2.2 细胞培养 液氮冻存细胞拿出后迅速放于 37℃ 水浴中溶解,使用 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清,1% 抗生素)37℃、5% 二氧化碳 CO₂、95% 空气饱和湿度培养箱中培养。复苏次日更换新鲜培养基。细胞密度 >80% 时需使用胰酶消化传代。传代比例 1:6~1:4。

1.2.3 Western blot 检测 在细胞样品中加入预冷的裂解液,超声破碎后 4℃、13 000 r/min 离心 10 min;

轻轻吸取上清,转移至新的离心管中置于冰上待用。使用 BCA 蛋白定量试剂盒通过标准曲线计算出样品的蛋白浓度。取等量蛋白样品(30 μg),加入上样缓冲液,97 $^{\circ}\text{C}$ 加热 6 min 变性,室温冷却离心后上样。十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳结束后,采用电转仪将蛋白从分离胶转移至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。转膜完成后,将 PVDF 膜封闭后加入一抗(1:1 000,用封闭液稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜。加入适当比例稀释的二抗,室温孵育 1 h,将电化学发光试剂盒的 A 液和 B 液等体积混合后均匀滴在 PVDF 膜上,放入暗盒中显影。使用 Quantity One 软件进行光密度分析。

1.2.4 qRT-PCR 在样品中加入 1 ml Trizol,剧烈震荡混匀,室温放置 5 min 后加入 200 μl 氯仿剧烈震荡,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 5 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min,将约 600 μl 上清液转移至新的无核糖核酸酶(Ribonuclease, RNase)1.5 ml 离心管中。加入等体积氯仿,剧烈震荡,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 2 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液至新的无 RNase 1.5 ml 离心管中。按等体积加入异丙醇,上下颠倒充分混匀后于-20 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀用 75%预冷乙醇洗涤后,离心弃上清,充分干燥后加入适量焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水溶解 RNA 并测定浓度。为防止 DNA 对逆转录的影响,要用脱氧核糖核酸酶消化提取的 RNA 中的 DNA,其消化程序和反应液的量按说明书操作。按照逆转录试剂盒说明书操作将 RNA 逆转录为互补脱氧核糖核酸(complementary deoxyribonucleic acid, cDNA),即可作为 qRT-PCR 的反应模板。从美国国立生物技术信息中心获得 IEX-1 mRNA 的全长序列,利用 Primer Blast 设计引物序列。IEX-1 正向引物:5'-CGGTCCTGAGATCTTCACCT-3',反向引物:5'-TGGTGAGCAGCAGAAAGAGA-3'; GAPDH 正向引物:5'-ACATGTTCCAATATGCTTCC-3',反向引物:5'-TGGACTCCACCACGTACTCAG-3'。配置标准的 PCR 体系,以 GAPDH 作为内参进行相对定量,每组设 3 个复孔,于 qRT-PCR 仪上设置所需的反应条件,反应结束后读取数据。

1.2.5 构建 pcDNA3-FLAG-IEX-1 和 pLL3.7-si-IEX-1 真核表达载体 以 MKN28 cDNA 为模板,从 NCBI 获得 IEX-1 mRNA 的全长序列。Not I :5'-ATAAGAATGCGGCCGCATGTGTCACCTCTCGCAGCTGCCACC-3'; EcoR I :3'-CCGGAATTCGCGAAGGCG

GCCGG GTGTTGCTGGAGG-5'。配置标准的 PCR 体系,在 PCR 仪上设置所需的反应条件,将 PCR 产物与 pcDNA3-flag 质粒使用 Not I 和 EcoR I 双酶切。将上述酶切产物跑 1%琼脂糖凝胶,切胶回收,使用 T₄ Ligase 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。连接产物转化 DH5 α ,涂布氨苄平板。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。挑取平板上长出菌落,质粒小提后送上海美吉生物医药科技有限公司测序。pLL3.7-si-IEX-1 真核表达载体的构建方法相同,使用载体为 pLL3.7,双酶切位点为 Hpa I 和 Xho I。干扰序列为 250~270 kb,正向引物:5'-AAAAGGCTTCTCTTTCTGCTG-3',反向引物:5'-CAGCAGAAAGAGAAGCCTTTT-3'。

1.2.6 细胞转染实验 转染前 1 d 传代 MKN28 细胞,转染时细胞密度需达 80%~90%。严格按照 LipoTM 2000 转染试剂的说明书进行操作。每个培养皿(直径 6 cm)细胞使用质粒量 4 μg 。分别转染对照质粒 pcDNA3-flag、pLL3.7、过表达质粒 pcDNA3-flag-IEX-1 及干扰质粒 pLL3.7-si-IEX-1。在转染后 48 h 检测 IEX-1 的蛋白表达水平,验证转染效率。

1.2.7 流式细胞术 将转染上述质粒 48 h 后的 MKN28 细胞进行流式细胞术检测,每个样品收集细胞 5×10^6 个,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗细胞 2 次,2 000 r/min 离心 2 min,弃上清液。70%预冷乙醇固定过夜,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用,染色前用 PBS 洗去固定液,弃上清液。每管中加 RNase A,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,PI 染色混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光 30 min,上流式细胞仪检测细胞周期。实验重复 3 次。

1.2.8 MTT 法 MTT 法检测转染上述质粒 48 h 后的 MKN28 细胞。转染后的细胞用培养液配成单细胞悬液,以 3 000 个细胞/孔接种到 96 孔板,体积 200 μl /孔。每组均设置 3 个复孔,培养 48 h 后加 MTT 溶液(5 mg/ml)20 μl /孔。492 nm 处检测吸光度值。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 *t* 检验或方差分析,两两比较用 LSD-*t* 检验。等级资料以频数表示,用 Kruskal-Wallis *H* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常胃组织、慢性胃炎及胃癌组织中 IEX-1 的表达

IEX-1 蛋白在各类组织中均有阳性表达(100/

100)(见附表)。正常胃黏膜上皮细胞的胞质中 IEX-1 表达丰富(见图 1A、B);慢性胃炎组织中,肠上皮化生细胞胞质有中等量的 IEX-1 表达(见图 1C、D);而在胃癌组织中,IEX-1 有强阳性表达(见图 1E、F)。经 Kruskal-Wallis *H* 检验,差异有统计学意义($H=38.609, P=0.000$),相对于正常胃组织和慢性胃炎组织,胃癌组织中 IEX-1 蛋白表达的阳性程度更高。

2.2 人胃正常黏膜细胞和胃癌细胞中 IEX-1 基因和蛋白表达水平

为进一步验证免疫组织化学结果,本实验选择人正常胃黏膜细胞 GES-1 和胃癌细胞 MKN28 进行 qRT-PCR 和 Western blot 检测。IEX-1 基因和蛋白表达水平比较,经 *t* 检验,差异有统计学意义($t=13.019$ 和 $6.120, P=0.006$ 和 0.026),胃癌细胞 MKN28 中 IEX-1 基因和蛋白表达水平高于人正常胃黏膜

附表 不同组织中 IEX-1 蛋白表达程度的比较 例(%)

组别	阴性	弱阳性	中度阳性	强阳性
正常胃组织($n=10$)	0(0.0)	6(6.0)	4(4.0)	0(0.0)
慢性胃炎($n=40$)	0(0.0)	12(30.0)	26(62.0)	2(5.0)
胃癌组织($n=50$)	0(0.0)	2(4.0)	14(28.0)	34(68.0)

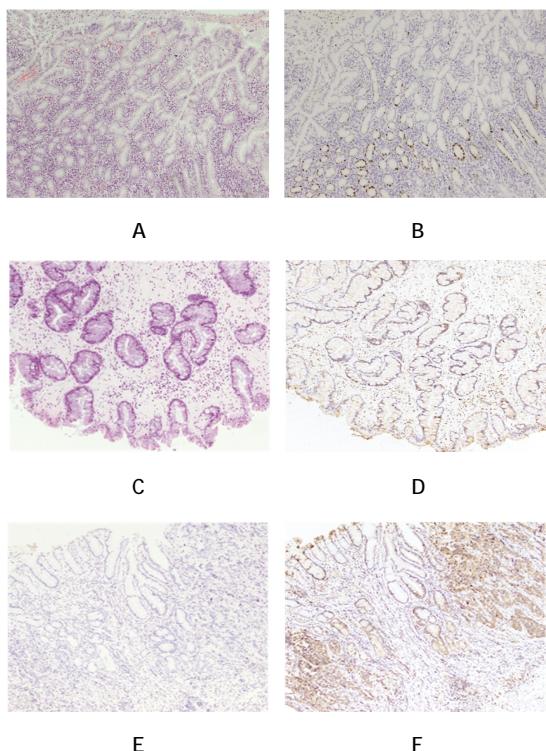


图 1 IEX-1 蛋白在正常胃组织、慢性胃炎及胃癌组织中的表达 (×10)

图 1 IEX-1 蛋白在正常胃组织、慢性胃炎及胃癌组织中的表达 (×10)

细胞 GES-1。见图 2、3。

2.3 pcDNA3-FLAG-IEX-1 和 pLL3.7-si-IEX-1 真核表达载体的构建和鉴定

为下一步了解 IEX-1 蛋白在胃癌进展中的意义,本实验构建 IEX-1 的过表达质粒 pcDNA3-FLAG-IEX-1 和干扰质粒 pLL3.7-si-IEX-1。将 *Not* I 和 *Eco*R I 双酶切连接好的 pcDNA3-FLAG-IEX-1 质粒,经 1%琼脂糖电泳后,紫外线下可见在靠近 500 bp 处有 1 条带,与 IEX-1 mRNA 的长度相符(见图 4)。将双酶切鉴定正确的过表达质粒 pcDNA3-FLAG-IEX-1 和提取好的干扰质粒 pLL3.7-si-IEX-1 送上海美吉生物医药科技有限公司测序,应用 Chromas 软件读取测序结果,使用 NCBI BLAST 验证测序结果正确,说明 pcDNA3-FLAG-IEX-1 和 pLL3.7-si-IEX-1 真核表达载体构建成功。

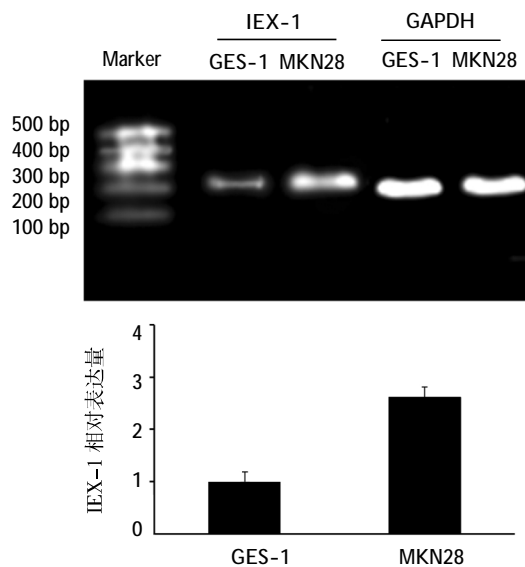


图 2 人胃正常黏膜细胞 GES-1 和胃癌细胞 MKN28 中 IEX-1 基因表达水平

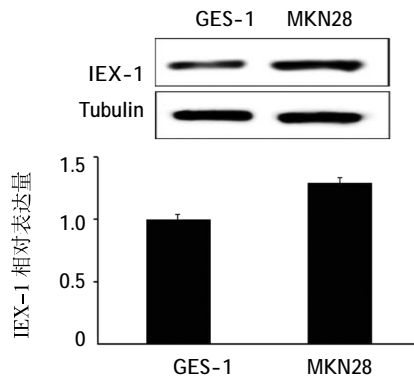


图 3 人胃正常黏膜细胞 GES-1 和胃癌细胞 MKN28 中 IEX-1 蛋白表达水平

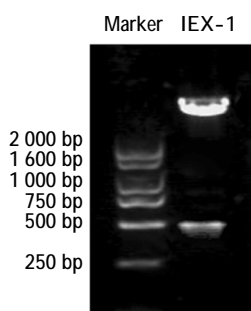


图 4 pcDNA3-FLAG-IEX-1 真核表达载体
双酶切鉴定结果

2.4 过表达质粒 pcDNA3-FLAG-IEX-1 和干扰质粒 pLL3.7-si-IEX-1 转染胃癌细胞 MKN28 后 IEX-1 基因和蛋白表达水平的变化

为验证过表达质粒 pcDNA3-FLAG-IEX-1 和干扰质粒 pLL3.7-si-IEX-1 在 MKN28 中的效果,将 2 种质粒转染胃癌细胞 MKN28 48 h 后,经 qRT-PCR 和 Western blot 检测 IEX-1 基因和蛋白的表达。3 组 IEX-1 基因表达水平比较,经方差分析,差异有统计学意义($F=3\ 438.589, P=0.000$),过表达组转染 48 h 后 IEX-1 基因表达水平升高,而干扰组 IEX-1 基因表达水平降低(见图 5)。过表达组与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);干扰组与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。3 组 IEX-1 蛋白表达水平比较,经方差分析,差异有统计学意义($F=311.85, P=0.000$)。过表达组转染 48 h 后 IEX-1 蛋白表达水平升高,而干扰组 IEX-1 蛋白表达水平降低(见图 6)。过表达组与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);干扰组与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。过表达组 IEX-1 基因和蛋白表达水平均高于对照组,而干扰组 IEX-1 基因和蛋白表达水平均低于对照组,说明重组质粒过表达和干扰效果显著。

2.5 过表达质粒 pcDNA3-FLAG-IEX-1 和干扰质粒 pLL3.7-si-IEX-1 转染后对胃癌细胞 MKN28 细胞周期的影响

质粒转染 48 h 后,流式细胞术检测各组细胞周期的变化。过表达组各期细胞比例比较,经方差分析,差异有统计学意义($F=78.537, P=0.000$),过表达组细胞合成期(synthesis phase, S)细胞比例升高,第二间隙期(gap phase 2, G_2)细胞比例降低。过表达组 S 期与对照组 S 期比较,差异有统计学意义($P<0.05$);过表达组 G_2 期与过表达对照组 G_2 期比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。第一间隙期(gap phase 1,

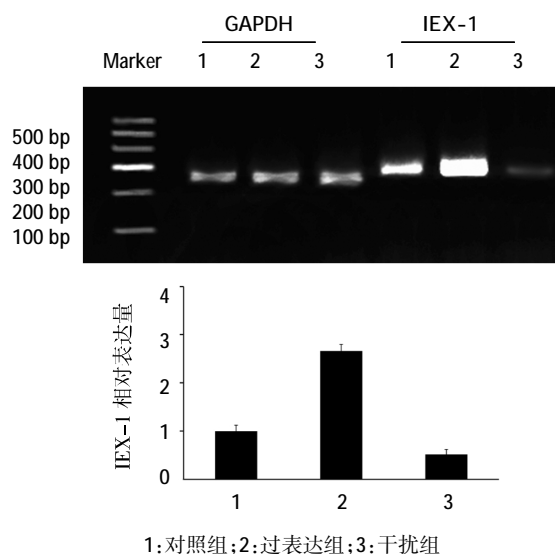


图 5 过表达质粒 pcDNA3-FLAG-IEX-1 和干扰质粒 pLL3.7-si-IEX-1 转染胃癌细胞 MKN28 后 IEX-1 基因表达水平

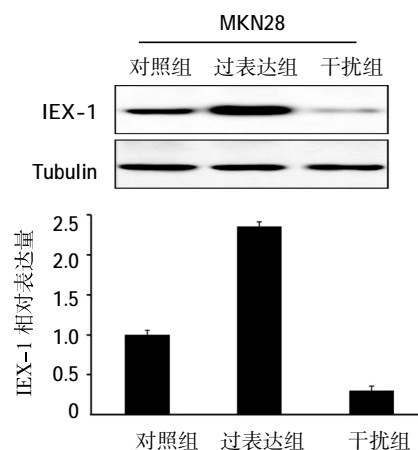


图 6 过表达质粒 pcDNA3-FLAG-IEX-1 和干扰质粒 pLL3.7-si-IEX-1 转染胃癌细胞 MKN28 后 IEX-1 蛋白表达水平

G_1)和 G_2/G_1 期细胞比例变化不大,经方差分析,差异无统计学意义($F=0.237, P=0.572$)。过表达 IEX-1 后, MKN28 细胞增殖更加旺盛。干扰组各期细胞比例比较,经方差分析,差异有统计学意义($F=88.324, P=0.000$),干扰组 G_1 期细胞比例升高, G_2 期细胞比例下降。干扰组 G_1 期与干扰对照组 G_1 期比较,差异有统计学意义($P<0.05$),干扰组 G_2 期与干扰对照组 G_2 期比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。干扰组、干扰对照组各期细胞比例比较,经方差分析,差异有统计学意义($F=54.779, P=0.000$),干扰组 S 期和 G_2/G_1 期细胞比例有所下降。干扰组 S 期与干扰对照组 S 期比较,差异无统计学意义($P>0.05$),干扰组 G_2/G_1 期与干扰对照组 G_2/G_1 期比较,差异无统计学意义($P>0.05$),

说明干扰 IEX-1 蛋白表达后, MKN28 细胞增殖活动受抑制, 使细胞滞留于 G₁ 期。见图 7。

2.6 过表达质粒 pcDNA3-FLAG-IEX-1 和干扰质粒 pLL3.7-si-IEX-1 转染后对胃癌细胞 MKN28 凋亡的影响

质粒转染 48 h 后, 流式细胞术检测各组细胞凋亡变化。各组凋亡率比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=107.892, P=0.000$)。过表达组与过表达对照组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 干扰组与干扰对照组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 说明过表达组凋亡水平低于过表达对照组, 而干扰组

凋亡水平高于干扰对照组。见图 8。

2.7 过表达质粒 pcDNA3-FLAG-IEX-1 和干扰质粒 pLL3.7-si-IEX-1 转染后对胃癌细胞 MKN28 增殖的影响

质粒转染 48 h 后, MTT 法检测各组细胞增殖变化情况, 各组增殖率比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=88.643, P=0.000$)。过表达组与过表达对照组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 干扰组与干扰对照组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 说明过表达组细胞增殖率高于过表达对照组, 而干扰组细胞增殖率低于对照组。见图 9。

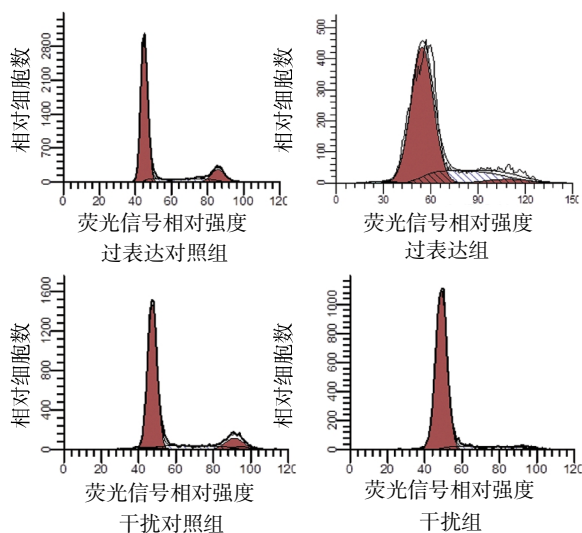
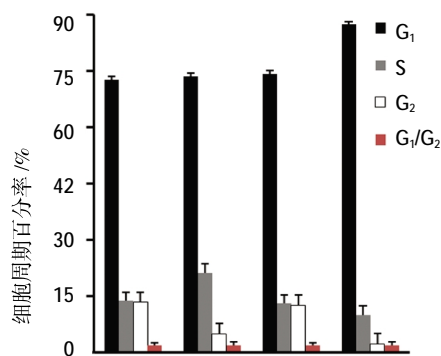
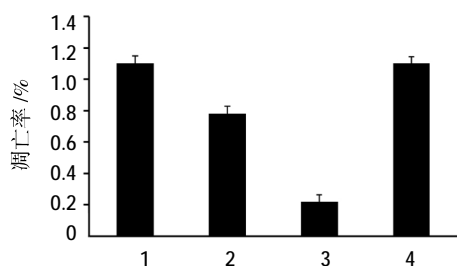


图 7 过表达质粒 pcDNA3-FLAG-IEX-1 和干扰质粒 pLL3.7-si-IEX-1 转染后对胃癌细胞 MKN28 细胞周期的影响

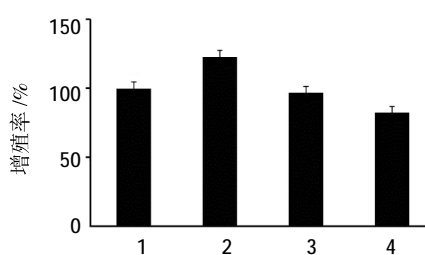


1: 过表达对照组; 2: 过表达组; 3: 干扰对照组; 4: 干扰组



1: 过表达对照组; 2: 过表达组; 3: 干扰对照组; 4: 干扰组

图 8 过表达质粒 pcDNA3-FLAG-IEX-1 和干扰质粒 pLL3.7-si-IEX-1 转染后对胃癌细胞 MKN28 凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)



1: 过表达对照组; 2: 过表达组; 3: 干扰对照组; 4: 干扰组

图 9 过表达质粒 pcDNA3-FLAG-IEX-1 和干扰质粒 pLL3.7-si-IEX-1 转染后对胃癌细胞 MKN28 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

胃癌是全球最常见的恶性肿瘤之一, 更是引起恶性肿瘤患者死亡的第 2 大原因。我国是胃癌的高发区, 其发病率和死亡率高居前列^[6-7]。多年来胃癌治疗后的 5 年生存率一直 <24%^[8]。尽管目前有很多关

于胃癌发生、发展过程中的知识被了解和发现, 但是能够对患者更有效的胃癌基因治疗的靶向分子仍在寻找中。

IEX-1 首次发现于人类 X 射线照射引起的肿瘤细胞中^[1-2], 其表达有组织差异性, 在皮肤、呼吸道、

胃肠道、泌尿生殖系统的上皮细胞,以及多组织或器官的血管内皮细胞中广泛表达,在胰腺和乳腺中高表达;在肝、肺、淋巴结、胎盘中表达较弱;而在胸腺、睾丸、卵巢、心肌、骨骼肌、脾脏中未检测到^[9-10]。同样在不同的癌组织中,其表达也有差异。仅有 38.3%的卵巢癌表达 IEX-1^[11],胰腺癌中 IEX-1 则有 53%的阳性表达率^[12],并通过 ERK 磷酸化途径促进胰腺细胞的恶性转化^[13];在乳腺癌组织和乳腺癌细胞株中 IEX-1 表达大幅度下调^[14];同样直肠癌组织中 IEX-1 的表达比癌旁正常组织降低^[15],而在骨肉瘤组织中 IEX-1 则呈高阳性表达^[16]。目前,鲜有关于成人正常胃组织和胃癌组织中 IEX-1 蛋白表达的报道,且存在相互矛盾的情况。

多项研究表明,IEX-1 是一种凋亡相关调节蛋白^[17-19]。其可正性或负性调节细胞凋亡功能^[20]。IEX-1 在 293 细胞中通过抑制核转录因子- κ B (nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B) 抑制剂 I κ B α 的降解,下调基础水平和诱导水平 NF- κ B 的活性,从而对抗 NF- κ B 的抗凋亡作用^[21]。胃泌素 17 对表达野生型 CCK2 受体结肠癌细胞的促凋亡作用也是通过 IEX-1 介导,依赖 NF- κ B 抗凋亡途径而产生^[22]。转染 IEX-1 基因的人皮肤角质形成细胞,相对于未转染细胞,细胞培养液中 Caspase-3 的活性增加^[23]。而更早期的报道则显示,IEX-1 能够抵抗 TNF- α 诱导的细胞凋亡作用^[24]。目前关于 IEX-1 调节胃癌细胞生物学行为的研究,尚无定论。

本研究发现,正常胃组织中有 IEX-1 蛋白的表达,与 FELDMANN 等^[9]报道一致,但胃癌组织的 IEX-1 蛋白表达水平要高于正常胃组织和慢性胃炎组织,为进一步验证免疫组织化学结果,本实验用 qRT-PCR 和 Western blot 检测人正常胃黏膜细胞 GES-1 和胃癌细胞 MKN28 中 IEX-1 基因和蛋白表达水平,结果同样显示其在胃癌细胞中呈现更高表达状态。另外,本研究结果还发现,正常胃组织发展到慢性胃炎,再至胃癌的疾病进展过程中,IEX-1 的表达水平有逐渐升高的趋势,揭示 IEX-1 蛋白的升高可能是胃癌发生、发展过程中潜在机制之一。为探究 IEX-1 在胃癌进程中所起的作用,考虑其为凋亡相关调节蛋白,本实验通过外源性导入过表达质粒 pcDNA3-FLAG-IEX-1 和干扰质粒 pLL3.7-si-IEX-1,使用流式细胞术检测 IEX-1 蛋白对胃癌细胞 MKN28 细胞周期和凋亡的影响,结果证实上调 IEX-1 蛋白表达能使 S 期细胞比例升高,G₂ 期细胞

比例降低,细胞凋亡减少,说明过表达 IEX-1 蛋白后,MKN28 细胞增殖更加旺盛。而将 IEX-1 蛋白表达干扰后,胃癌细胞发生 G₁ 期阻滞,增殖受抑制并且诱导细胞凋亡。MTT 法则进一步验证 IEX-1 蛋白促进胃癌细胞增殖的作用,说明 IEX-1 在调控胃癌细胞的凋亡和增殖发生转换过程中发挥重要作用。

综上所述,IEX-1 蛋白在胃癌组织中呈高表达水平状态,在人胃癌细胞中上调 IEX-1 蛋白表达能够促进细胞增殖,发挥抗凋亡能力,干扰 IEX-1 蛋白表达能够阻滞细胞周期进程并诱导凋亡。因此,IEX-1 蛋白在胃癌进程中发挥癌蛋白的作用。下一步笔者将就 IEX-1 在胃癌中相关的分子机制及下游信号通路进行研究,为 IEX-1 作为胃癌基因治疗的靶向分子提供科学理论依据。

参 考 文 献:

- [1] CHARLES C H, YOON J K, SIMSKE J S, et al. Genomic structure, cDNA sequence and expression of gly96, a growth factor-inducible immediate-early gene encoding a short-lived glycosylated protein[J]. *Oncogene*, 1993, 8(3): 797-801.
- [2] KONDRATYEV A D, CHUNG K N, JUNG M O. Identification and characterization of a radiation-inducible glycosylated human early-response gene[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(7): 1498-1502.
- [3] WU M X, USTYUGOVA I V, HAN L, et al. Immediate early response gene X-1, a potential prognostic biomarker in cancers[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2013, 17(5): 593-606.
- [4] USTYUGOVA I V, ZHI L, ABRAMOWITZ J, et al. IEX-1 deficiency protects against colonic cancer[J]. *Mol Cancer Res*, 2012, 10(6): 760-767.
- [5] ARLT A, SCHAFFER H. Role of the immediate early response 3 (IER3) gene in cellular stress response, inflammation and tumorigenesis[J]. *Eur J Cell Biol*, 2011, 90(6/7): 545-552.
- [6] BRENNER H, ROTHENBACHER D, ARNDT V. Epidemiology of stomach cancer[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 472: 467-477.
- [7] CATALANO V, LABIANCA R, BERETTA G D, et al. Gastric cancer[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2009, 719(2): 127-164.
- [8] FERLAY J, SHIN H R, BRAY F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893-2917.
- [9] FELDMANN K A, PITTELKOW M R, ROCHE P C, et al. Expression of an immediate early gene, IEX-1, in human tissues[J]. *Histochem Cell Biol*, 2001, 115(6): 489-497.
- [10] 张明,朱武,肖涛. 1 种独特的凋亡调节蛋白 IEX-1[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2011(3): 274-277.
- [11] HAN L, GENG L, LIU X, et al. Clinical significance of IEX-1 expression in ovarian carcinoma[J]. *Ultrastruct Pathol*, 2011, 35(6): 260-266.

- [12] SASADA T, AZUMA K, HIRAI T, et al. Prognostic significance of the immediate early response gene X-1 (IEX-1) expression in pancreatic cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15(2): 609-617.
- [13] GARCIA M N, GRASSO D, LOPEZ-MILLAN M B, et al. IER3 supports KRASG12D-dependent pancreatic cancer development by sustaining ERK1/2 phosphorylation[J]. *J Clin Invest*, 2014; 124(11): 4709-4722.
- [14] HU Y, SUN H, DRAKE J, et al. From mice to humans: identification of commonly deregulated genes in mammary cancer via comparative SAGE studies[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(21): 7748-7755.
- [15] NAMBIAR P R, NAKANISHI M, GUPTA R, et al. Genetic signatures of high- and low-risk aberrant crypt foci in a mouse model of sporadic colon cancer[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(18): 6394-6401.
- [16] XIAO T, LI K H, LI G Y, et al. Mechanism of apoptosis of human osteosarcoma MG-63 induced by arsenic trioxide[J]. *Journal of Central South University of Technology*, 2005, 12(suppl 1): 317-321.
- [17] de KEULENAER G W, WANG Y, FENG Y, et al. Identification of IEX-1 as a biomechanically controlled nuclear factor- κ B target gene that inhibits cardiomyocyte hypertrophy[J]. *Circ Res*, 2002, 90(6): 690-696.
- [18] KOBAYASHI T, PITTELKOW M R, WARNER G M, et al. Regulation of a novel immediate early response gene, IEX-1, in keratinocytes by 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 251(3): 868-873.
- [19] ZHANG Y, SCHLOSSMAN S F, EDWARDS R A, et al. Impaired apoptosis, extended duration of immune responses, and a lupus-like autoimmune disease in IEX-1-transgenic mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(2): 878-883.
- [20] 耿莉娜, 张晓雪, 韩丽萍. 即刻早期基因 IEX-1 与肿瘤[J]. *中国肿瘤临床*, 2012(4): 234-236.
- [21] ARLT A, MINKENBERG J, KOCS B, et al. The expression of immediate early gene X-1 (IEX-1) is differentially induced by retinoic acids in NB4 and KG1 cells: possible implication in the distinct phenotype of retinoic acid-responsive and-resistant leukemic cells[J]. *Leukemia*, 2004, 18(10): 1646-1655.
- [22] SEBENS MÜERKÖSTER S, RAUSCH A V, ISBERNER A. The apoptosis-inducing effect of gastrin on colorectal cancer cells relates to an increased IEX-1 expression mediating NF- κ B inhibition[J]. *Oncogene*, 2008, 27(8): 1122-1134.
- [23] SCHILLING D, PITTELKOW M R, KUMAR R, et al. IEX-1, an immediate early gene, increases the rate of apoptosis in keratinocytes[J]. *Oncogene*, 2001, 20(55): 7992-7997.
- [24] WU M X, AO Z, PRASAD K V, et al. IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF- κ B-mediated cell survival [J]. *Science*, 1998, 281(5379): 998-1001.

(童颖丹 编辑)