

过表达 Mxi1 对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖和凋亡的影响

胡圳圳, 蒋秀琴, 许金金, 郭文文, 郑大同*

(南京医科大学第二附属医院临床分子基因检测中心, 江苏 南京 210003)

[摘要] 目的: 构建含有 Max 结合蛋白 1(Mxi1) 基因的重组慢病毒载体, 并探讨过表达 Mxi1 基因对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖和凋亡的影响。方法: 利用 DNA 重组技术将 Mxi1 基因克隆至慢病毒载体, 经酶切和测序鉴定后, 将重组质粒与慢病毒辅助包装元件质粒共转染 293T 细胞, 获得含 Mxi1 基因的重组慢病毒。重组慢病毒感染人胃癌 SGC-7901 细胞, 荧光显微镜下观察感染效率, 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 Mxi1、cyclinB1 和 caspase-8 的基因表达, 免疫印迹法(Western blot)检测 Mxi1 蛋白的表达。CCK-8 比色法和流式细胞术分别检测 Mxi1 基因对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖和凋亡的影响。结果: 成功构建含 Mxi1 基因的慢病毒表达载体, RT-PCR 和 Western blot 检测到 Mxi1 基因和蛋白的表达。RT-PCR 结果显示, 过表达 Mxi1 的 SGC-7901 细胞与空白对照细胞及过表达空病毒对照细胞相比, 细胞内 cyclinB1 的 mRNA 表达水平明显降低, 而 caspase-8 的 mRNA 表达水平显著升高。CCK-8 实验和流式细胞术检测结果显示, 过表达 Mxi1 的 SGC-7901 细胞与空白对照细胞及过表达空病毒对照细胞相比, 细胞增殖活性明显降低, 细胞凋亡率显著升高。结论: 成功构建 Mxi1 慢病毒载体且有效转染 SGC-7901 细胞, 过表达 Mxi1 可以抑制胃癌细胞增殖并促进其凋亡。

[关键词] Max 结合蛋白 1; 人胃癌 SGC-7901 细胞; 增殖; 凋亡; 慢病毒载体

[中图分类号] R735.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)04-423-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20170408

Effects of overexpression of Mxi1 on cell proliferation and apoptosis of human gastric cancer SGC-7901 cells

Hu Zhenzhen, Jiang Xiuqin, Xu Jinjin, Guo Wenwen, Zheng Datong*

(Clinical Gene Testing Center, Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210003, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a lentiviral vector containing Mxi1 gene and observe the effect of Mxi1 on proliferation and apoptosis of SGC-7901 cells. **Methods:** The Mxi1 gene was cloned into lentiviral expression vector by recombining DNA technology. The recombinant plasmid was identified by restriction enzyme digestion and gene sequencing, and then cotransfected 293T cells with the auxiliary packaging components plasmids to obtain recombinant lentivirus containing Mxi1 gene. SGC-7901 cells were infected with the recombinant lentivirus, and the infection efficiency was observed under fluorescence microscope. Expressions of Mxi1, cyclinB1 and caspase-8 gene were identified by RT-PCR and expression of Mxi1 protein was identified by Western blot. The proliferation and apoptosis of SGC-7901 cells were examined by CCK-8 and flow cytometry, respectively. **Results:** The Mxi1 gene was successfully cloned to lentiviral, expressions of Mxi1 gene and protein were confirmed by RT-PCR and Western blot. Mxi1-overexpressed SGC-7901 cells expressed less cyclinB1 and more caspase-8 compared to blank control cells and empty vector-overexpressed cells confirmed by RT-PCR. CCK-8 and flow cytometry experimental results showed that the proliferation ability of Mxi1-overexpressed SGC-7901 cells was deteriorated significantly compared to blank control cells and empty vector-overexpressed cells, and the apoptosis rate of Mxi1-overexpressed cells was higher than that of blank control cells and empty vector-overexpressed cells. **Conclusion:** The Mxi1 recombinant lentiviral vector had been successfully constructed and effectively transfected SGC-7901 cells. Mxi1 could inhibit the proliferation and promote the apoptosis of SGC-7901 cells.

[Key words] Max interacting protein 1; SGC-7901 cell; proliferation; apoptosis; lentiviral vector

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(04): 423-427]

[基金项目] 国家自然科学基金(81301822); 南京医科大学科技发展基金(2012NJMU088)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: dtzheng@gmail.com

原癌基因 c-Myc 在多种肿瘤的发生、发展过程中起着重要作用,它主要通过与其伴侣蛋白 Max 结合调控肿瘤生长相关基因的转录表达^[1-2]。Max 结合蛋白 1(Max interacting protein 1, Mxi1),属于 Max 二聚化蛋白(Max dimerization protein, Mad)家族成员,调控 c-Myc 功能,它通过与 c-Myc 竞争结合 Max 抑制 c-Myc 的转录促进作用^[3-4]。此外,它还可以直接抑制 c-Myc 转录^[4]。已有研究表明,过表达 Mxi1 能有效逆转前列腺癌细胞生长特性^[5]。上调胶质母细胞瘤 Mxi1 表达不仅抑制肿瘤细胞增殖还伴随细胞分化现象^[6-8]。Mxi1 基因敲除鼠细胞增殖失控,肿瘤形成明显增强^[9]。这些发现均强烈提示 Mxi1 具有抑制肿瘤生长的作用,是肿瘤生长抑制因子。虽然如此,但目前有关 Mxi1 在胃癌组织表达与临床病理意义,以及其在胃癌发生发展中的作用,国内外尚无明确报道。本研究旨在通过构建 Mxi1 慢病毒载体,感染人胃癌 SGC-7901 细胞,并进一步观察 Mxi1 对 SGC-7901 细胞增殖和凋亡的影响,为 Mxi1 用于胃癌治疗的研究和临床应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

人胃癌细胞株 SGC-7901 由本中心保存。RPMI1640 培养基、胰蛋白酶(Gibco 公司,美国);胎牛血清(Sincell 公司,美国);GV218 载体和相关辅助包装元件质粒(上海吉凯基因化学技术有限公司);PCR 试剂盒(Roche 公司,瑞士),胶回收试剂盒和质粒纯化试剂盒(Macherey-Nagel 公司,德国);限制性核酸内切酶(NEB 公司,美国);CCK-8 检测试剂盒(Sigma 公司,美国);TRIzol/T4 连接酶和 ECL 发光试剂盒(Invitrogen 公司,美国);GFP 抗体(Santa Cruz 公司,美国);Annexin V Apoptosis Detection Kit APC (eBioscience 公司,美国);PCR 引物由上海 Invitrogen 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

SGC-7901 细胞用含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基,在 37℃、5%CO₂ 的恒温培养箱中常规培养,当细胞融合度达到 80%~90%时进行传代培养。

1.2.2 质粒的构建和鉴定

根据 GenBank 中 Mxi1 基因 mRNA 全长序列(NM_005962) 设计如下引物,上游引物:5'-GAG-GATCCCCGGGTACCGGTCCACCATGGAGCGGG-TGAAGATG-3';下游引物:5'-TCACCATGGTGGC-

GACCGGTGAAGTGAATGAAAGTTTG-3'。扩增长度为 730 bp。用上述引物进行 PCR 扩增,具体反应条件如下:95℃ 预变性 2 min,95℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 60 s,共进行 30 个循环,最后 72℃ 延伸 6 min。PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离,用胶回收试剂盒回收目的基因片段。将目的基因片段和载体分别用 Age I /Age I 进行酶切,酶切产物用 T4 连接酶于 16℃ 连接过夜。连接产物转化 DH5α 感受态细胞。PCR 法挑选出阳性转化子交由上海吉凯基因化学技术有限公司测序验证。

1.2.3 慢病毒的包装

按照 Lipofectamine2000 操作说明将重组质粒和辅助包装质粒共转染 293T 细胞,转染 8 h 后更换含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基。培养 48 h 后收集细胞上清,4℃ 4 000 g 离心 15 min,去除细胞和碎片,用 0.45 μm 的滤器过滤。病毒上清加入滤膜插件中,再次离心取上清得重组慢病毒后分装成小管保存于-80℃。空载体慢病毒液按照同样方法制备。

1.2.4 重组慢病毒感染 SGC-7901 细胞

转染前 1 d,将 SGC-7901 细胞按照 2×10⁵ 个/孔接种至 6 孔板中,培养箱中培养过夜。按照 MOI=10 预先稀释好重组慢病毒和空载体慢病毒,PBS 洗 2 遍细胞后将预先混好的慢病毒液加入各细胞培养孔中,同时设定空白 SGC-7901 细胞作为对照,细胞放置培养箱中继续培养 12 h 后换新鲜培养基继续培养。传代 3 次于荧光显微镜下观察增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的表达并拍照。

1.2.5 RT-PCR 检测目标分子 mRNA 表达

TRIzol 法提取 3 组细胞总 RNA,取 1 μg 总 RNA 在 20 μL 反应体系中逆转录生成 cDNA。引物序列见表 1,扩增反应条件为:95℃ 预变性 2 min,95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 60 s,共进行 28 个循环,最后 72℃ 延伸 6 min。PCR 产物以 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-PCR

名称	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
Mxi1	F:ATGGAGCGGGTGAAGATGATCAAC R:TGAAGTGAATGAAAGTTTGACACTGG	684
GAPDH	F:GGCCAAGTCATCCATGACAAC R:GGCAGTTTTTCTAGACGGCAG	280
cyclinB1	F:AGGCGAAGATCAACATGGC R:GCACATCCAGATGTTTCCATG	361
caspase-8	F:AGCAAAGGGGAGGAGTTGTG R:TACTGTGCAGTCATCGTGGG	279

1.2.6 Western blot 检测目标分子蛋白表达

分别收集 3 组细胞, 蛋白提取及 Western blot 检测参照文献^[10-11]方法进行。抗 GFP 的一抗 1:1 000 稀释, 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜后加入二抗室温孵育 2 h, TBST 洗 3 次后, 用 ECL 试剂盒显影特异蛋白条带。

1.2.7 CCK-8 比色法检测细胞增殖能力

取对数生长期的 3 组细胞制成单细胞悬液, 分别以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔培养板中继续培养。每组设 5 个复孔。分别于 0、24、48、72、96 h 用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖情况, 酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度值。实验重复 3 次, 取平均值以吸光度值为纵坐标, 以时间为横坐标绘制细胞生长曲线。

1.2.8 流式细胞术检测细胞凋亡

离心、收集各组细胞, 弃上清, 用预冷 PBS 洗 2 遍, 弃上清。用 200 μ L 1 \times buffer 悬浮细胞, 加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI, 混匀后室温避光放置 15 min, 上机检测。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 检测数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 经方差齐性检验后, 计量数据间的比较采用 one-way ANOVA 分析, 两组数据之间的统计学差异采用双尾 *t* 检验计算 *P* 值。 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

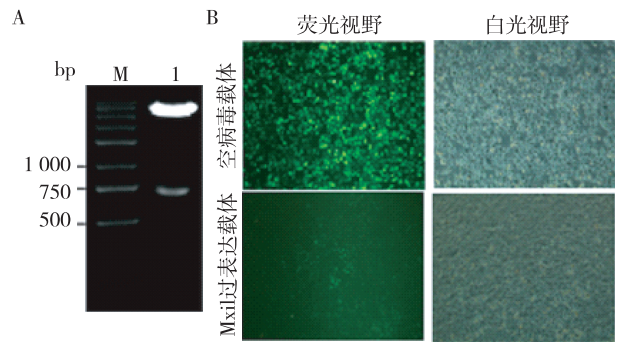
2 结果

2.1 重组慢病毒质粒的构建、鉴定及细胞感染

重组慢病毒质粒经酶切和琼脂糖凝胶电泳鉴定正确后(图 1A), 送至上海吉凯公司进行基因测序, 结果与 GenBank 中的 Mxi1 序列比对, 完全一致, 提示重组质粒构建成功。将重组慢病毒以最适 MOI (MOI=10) 感染 SGC-7901 细胞后 72 h, 细胞融合率约 100%, 传代 3 次, 在荧光显微镜下可看到绿色荧光(图 1B)。

2.2 Mxi1 在 SGC-7901 细胞中过表达的鉴定

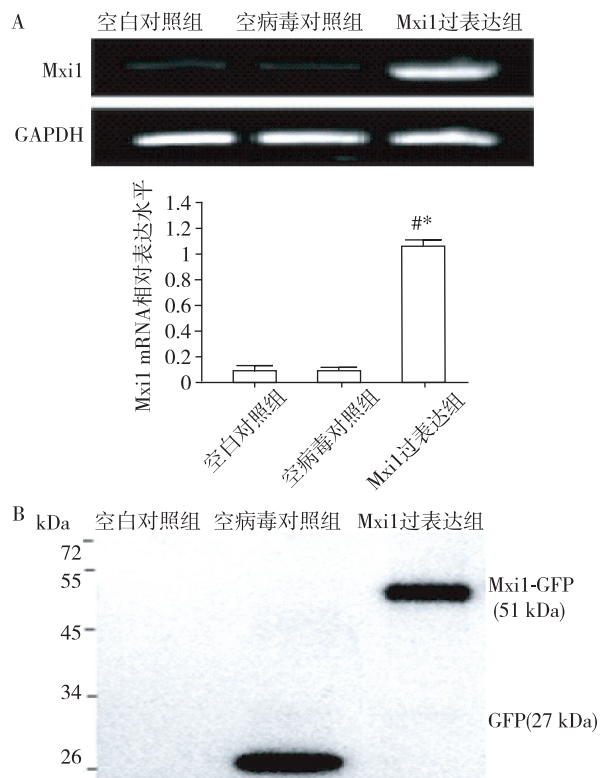
分别提取 3 组细胞的总 RNA 及细胞蛋白。总 RNA 的 RT-PCR 结果显示, Mxi1 过表达组 Mxi1 mRNA 的相对表达值 (1.08 ± 0.07) 较空白对照组 (0.13 ± 0.04) 明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 较空病毒对照组 (0.12 ± 0.01) 也明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 2A)。对收集的 3 组细胞蛋白利用抗 GFP 抗体进行 Western blot 鉴定, 结果如图 2B 所示, 抗 GFP 抗体在空病毒对照组和 Mxi1 过表达组中检测到大小不同的蛋白, 空病毒对照组为



A: 重组质粒双酶切, M: DNA 标准; 1: Mxi1 双酶切结果; B: SGC-7901 细胞转染后荧光显微镜下观察($\times 100$)。

图 1 重组慢病毒质粒的构建、鉴定和细胞感染

Figure 1 Construction and identification of recombinant lentiviral plasmid and cell infection



A: RT-PCR 检测 Mxi1 mRNA 的表达, 与空白对照组比较, $^*P < 0.01$, 与空载体对照组比较, $^*P < 0.01$; B: Western blot 检测 Mxi1 蛋白的表达。

图 2 RT-PCR 和 Western blot 检测 Mxi1 在 SGC-7901 细胞中的表达

Figure 2 RT-PCR and Western blot analysis of the expression of Mxi1 in SGC-7901 cells

GFP 蛋白, 分子量为 27 kDa; Mxi1 过表达组为 Mxi1-GFP 融合蛋白, 分子量为 51 kDa。而在空白对照组中未检测到信号。

2.3 过表达 Mxi1 对 SGC-7901 细胞增殖的影响

利用 CCK-8 试剂盒检测 3 组细胞增殖情况, 在

48 h, Mxi1 过表达组细胞与空白对照组和空病毒对照组细胞相比增殖受到抑制, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 而空白对照组与空病毒对照组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 3A)。RT-PCR 结果显示, Mxi1 过表达组 cyclinB1 mRNA 的相对表达值较空白对照组和空病毒对照组明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 3B)。

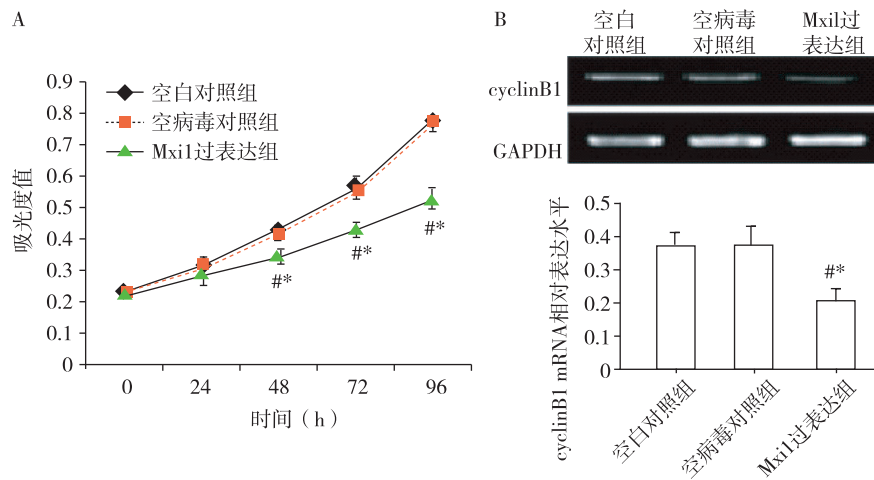
2.4 过表达 Mxi1 对 SGC-7901 细胞凋亡的影响

流式细胞术检测 3 组细胞凋亡情况, 与空白对照组和空病毒对照组相比, Mxi1 过表达组凋亡率明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 而空白对照组与空病毒对照组凋亡率相比, 差异无统计学意义 ($P = 0.87$, 图 4A)。RT-PCR 结果显示, Mxi1 过表达组

caspase-8 mRNA 的相对表达值较空白对照组和空病毒对照组均明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 4B)。

3 讨论

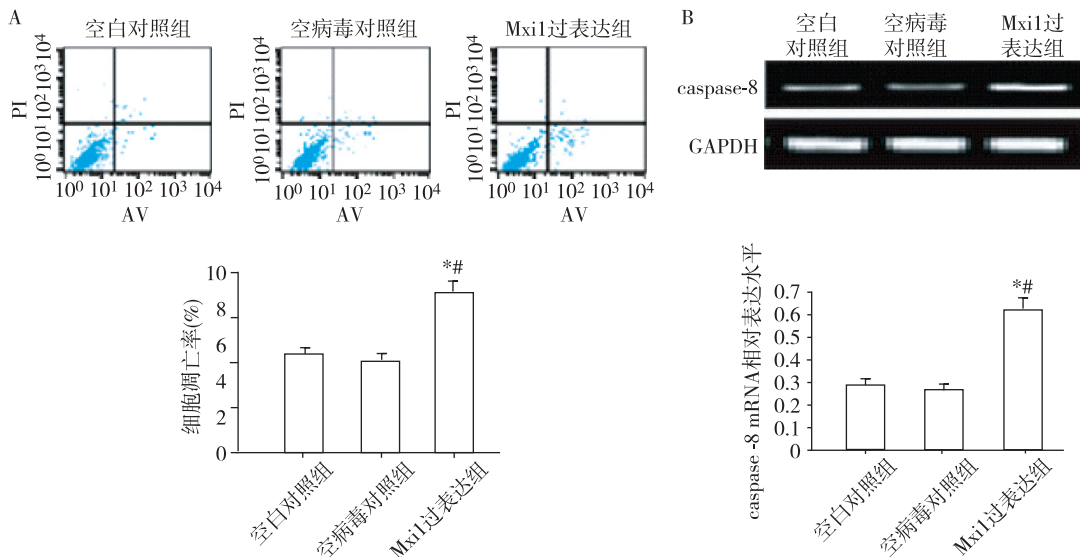
原癌基因 c-Myc 与细胞增殖、抑制分化、控制细胞循环及凋亡有关^[1], 作为转录因子, 它先通过其 C 末端的 b-HLH-ZIP 结构和 Max 聚合形成 Myc/Max 异源二聚体, 然后 Max 与 DNA 的 E-box 区域结合, 使 c-Myc 开始乙酰化组蛋白, 解除染色质固缩, 激活转录及细胞转型^[1]。Mxi1 等 Mad 家族成员参与 c-Myc 调节。它们的 C 末端均有 b-HLH-ZIP 结构域, 能和 c-Myc 竞争结合 Max, 抵消 c-Myc 的促转录作



A: CCK-8 比色法检测细胞增殖; B: RT-PCR 检测 cyclinB1 mRNA 的表达。与空白对照组比较, * $P < 0.01$, 与空病毒对照组比较, # $P < 0.01$ 。

图 3 Mxi1 过表达对 SGC-7901 细胞增殖的影响

Figure 3 Effect of Mxi1 overexpression on the proliferation of SGC-7901 cells



A: 流式细胞术检测细胞凋亡; B: RT-PCR 检测 caspase-8 mRNA 的表达。与空病毒对照组比较, * $P < 0.01$, 与空白对照组比较, # $P < 0.01$ 。

图 4 Mxi1 过表达对 SGC-7901 细胞凋亡的影响

Figure 4 Effect of Mxi1 overexpression on the apoptosis of SGC-7901 cells

用^[3-4]。Mad 家族蛋白 N 末端有 Sin3 结合域(SID), 当 Mxi1/Max 二聚体附着至 DNA 的 E-box 后, 结合在二聚体上的 Sin3 募集组蛋白去乙酰化酶导致染色体固缩从而抑制转录, 干扰 c-Myc 的促转录作用^[3-4]。已有研究显示上调胶质母细胞瘤的 Mxi1 表达不仅抑制肿瘤细胞增殖还伴随分化表现^[6-8]。此外, Mxi1 载体可有效逆转前列腺癌细胞生长特性^[5]。这些结果提示 Mxi1 可能具有抑制肿瘤生长功能。那么, 上调细胞中 Mxi1 表达是否对胃癌的生长有抑制作用呢? 为此本研究构建了含有 Mxi1 基因的重组慢病毒载体并转染人胃癌 SGC-7901 细胞, 检测上调 SGC-7901 细胞内 Mxi1 表达后对其增殖和凋亡能力的影响。

细胞增殖实验结果显示, 上调 SGC-7901 细胞内 Mxi1 表达后, 细胞与空白对照组和空病毒对照组细胞相比生长缓慢, 表明 Mxi1 表达上调能抑制胃癌细胞的增殖能力。已有研究表明, Mxi1 可通过抑制 cyclinB1 表达使细胞阻滞在 G2/M 期, 从而抑制胶质瘤细胞的增殖^[7]。本研究也证实上调 Mxi1 表达可显著抑制 SGC-7901 细胞中 cyclinB1 mRNA 的表达, 因此推测, 上调 Mxi1 表达可通过抑制 cyclinB1 表达从而抑制胃癌细胞增殖。此外, 另有文献报道抑制小鼠胚胎成纤维细胞内 Mxi1 表达可下调细胞内胰岛素样生长因子结合蛋白-3 的表达, 促进细胞增殖^[9]。这些研究结果表明, 在不同细胞背景下, Mxi1 对细胞增殖调控的最终结果取决于它下游的靶基因及产生作用的效应蛋白质。Mxi1 抑制胃癌细胞增殖的机制仍有待进一步阐明。

凋亡结果显示, 上调 SGC-7901 细胞内 Mxi1 表达后, 细胞凋亡率显著升高, 表明 Mxi1 表达上调能促进胃癌细胞凋亡。目前有关 Mxi1 调控细胞凋亡的机制研究认为与死亡受体介导的凋亡途径有关。过表达 Mxi1 可激活细胞内 caspase-8 信号通路, 启动神经母细胞瘤的凋亡^[6]。caspase-8 是死亡受体介导的凋亡信号通路中的关键启动子, 同时也是胃癌细胞凋亡过程中重要的调节因子^[12-13]。本研究发现上调 Mxi1 表达可显著上调 SGC-7901 细胞中 caspase-8 mRNA 的表达, 因此推测, 增加 Mxi1 表达可通过上调 caspase-8 表达从而促进胃癌细胞凋亡。细胞主要通过线粒体途径、内质网途径和死亡受体途径发生凋亡。Mxi1 是否通过线粒体通路和内质网通路诱导胃癌细胞凋亡, 仍有待进一步的探讨。

总之, 本研究成功构建了携带 Mxi1 基因的慢病毒表达载体, 发现 Mxi1 表达上调能显著抑制胃癌

细胞的增殖能力, 并促进其凋亡。Mxi1 基因是一种抑癌基因, 进一步研究其在胃癌发生、发展中的作用, 有望为胃癌的预防和治疗提供新线索。

参考文献

- [1] Kress TR, Sabò A, Amati B. MYC: connecting selective transcriptional control to global RNA production[J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(10):593-607
- [2] Ott G. Impact of MYC on malignant behavior[J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2014(1):100-106
- [3] Gallant P. Myc/max/mad in invertebrates: the evolution of the max network[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006, 302()235-253
- [4] Grinberg AV, Hu CD, Kerppola TK. Visualization of Myc/max/mad family dimers and the competition for dimerization in living cells[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(10):4294-4308
- [5] Taj MM, Tawil RJ, Engstrom LD, et al. Mxi1, a Myc antagonist, suppresses proliferation of DU145 human prostate cells[J]. *Prostate*, 2001, 47(3):194-204
- [6] Erichsen DA, Armstrong MB, Wechsler DS. Mxi1 and mxi1-0 antagonize N-myc function and independently mediate apoptosis in neuroblastoma[J]. *Transl Oncol*, 2015, 8(1):65-74
- [7] Manni I, Tunicci P, Cirenei N, et al. Mxi1 inhibits the proliferation of U87 glioma cells through down-regulation of cyclin B1 gene expression[J]. *Br J Cancer*, 2002, 86(3):477-484
- [8] Zhou J, Wang W, Gao Z, et al. MicroRNA-155 promotes glioma cell proliferation via the regulation of MXI1[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12):e83055
- [9] Ko JY, Yoo KH, Lee HW, et al. Mxi1 regulates cell proliferation through insulin-like growth factor binding protein-3[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 415(1):36-41
- [10] 胡圳圳, 李璐, 吴小芸, 等. pEGFP-N1-Mxi1-0 重组质粒的构建与表达[J]. *蚌埠医学院学报*, 2015, 40(3):318-321
- [11] 蒋秀琴, 胡圳圳, 花荣, 等. Max 作用蛋白 1-0 缺失突变体的构建、表达及细胞内定位的研究[J]. *蚌埠医学院学报*, 2015, 40(11):1465-1468
- [12] Yao Y, Li L, Huang X, et al. SERPINA3K induces apoptosis in human colorectal cancer cells via activating the Fas/FasL/caspase-8 signaling pathway[J]. *FEBS J*, 2013, 280(14):3244-3255
- [13] Wang Y, Wang C, Jiang C, et al. Novel mechanism of harmaline on inducing G2/M cell cycle arrest and apoptosis by up-regulating Fas/FasL in SGC-7901 cells[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:18613

[收稿日期] 2016-04-28