

· 论 著 ·

# 全反式视黄酸及干扰素对胃癌细胞系 MKN45 中 p16、p21、c-myc 基因表达的影响\*

李善清<sup>1</sup>, 唐万兵<sup>1</sup>, 孙 鹏<sup>1</sup>, 许瑞环<sup>2</sup>, 张洪德<sup>2</sup>, 尹学念<sup>2</sup>

(1. 广东省深圳市龙岗区人民医院检验科 518172; 2. 广东省深圳市龙岗中心医院检验科 518116)

**摘要:**目的 探讨全反式视黄酸(ATRA)及干扰素(IFN)对胃癌 MKN45 细胞的影响。方法 将 ATRA 及 IFN 同时加入胃癌细胞系 MKN45 培养体系中, MTT 法测定细胞生长状况, Northern Blot 和免疫组化测定 p16、p21 及 c-myc 表达情况。结果 IFN、ATRA 联合用药可有效抑制 MKN45 细胞生长, 细胞 p16 和 p21 表达水平升高, c-myc 表达水平下降。视黄酸受体 RAR $\alpha$  在 MKN45 细胞中呈低水平表达, 经 ATRA 和 IFN 诱导后表达水平升高。结论 ATRA、IFN 联合用药可调节 p16 和 p21 表达水平, 抑制胃癌 MKN45 细胞生长, 可能与 RAR $\alpha$  高水平表达有关。

**关键词:** 干扰素类; 基因, p16; 基因, myc; 基因表达; 视黄酸; 胃癌细胞系

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.02.007

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)02-0159-02

## The Effect of Retinoic Acid and Interferon on p16, p21, c-myc Gene Expression in Cell Line of Gastric Carcinoma MKN45

Li Shanqing<sup>1</sup>, Tang Wanbing<sup>1</sup>, Sun Peng<sup>1</sup>, Xu Ruihuan<sup>2</sup>, Zhang Hongde<sup>2</sup>, Yin Xuenian<sup>2</sup>

(1. The People's Hospital of Longgang, Shenzhen 518172, China;

2. The center hospital of Longgang, Shenzhen 518116, China)

**Abstract: Objective** To explore the influence of all-trans-retinoic acid and interferon on Gastric Carcinoma MKN45 cells. **Methods** Retinoic acid and interferon were added into the Cell Line of Gastric Carcinoma MKN45 at the same time, after cell culture, MTT were performed to determinate the cell growth conditions and detect the expression of p16, p21 and c-myc by Northern blot and immunohistochemical methods. **Results** Interferon (IFN) coordination of all-trans retinoic acid (ATRA) could effectively inhibit the growth of MKN45 cells, cancer cells by the combination therapy induced the expression of p16 and p21 genes to raise the level, c-myc gene expression decreased. RAR $\alpha$  retinoic acid receptor gene in MKN45 cells showed low expression of IFN induced by ATRA and the expression level of increase. **Conclusion** ATRA combined IFN-induced p16 and p21 can regulate gene expression, inhibit the growth of gastric cancer MKN45 cells, which may be related to a high level of expression of cell RAR $\alpha$  gene.

**Key words:** interferon; genes, p16; genes, myc; gene expression; retinoic acid; cell line of gastric carcinoma

全反式视黄酸(ATRA)可活化某些抑癌基因, 抑制肿瘤细胞, 如胃癌 MGc80-3 和 BGC-823 细胞等生长和分化, 但对恶性程度较高的胃癌 MKN45 细胞生长抑制作用较弱<sup>[1]</sup>。干扰素(IFN)可直接抑制肿瘤细胞增殖, 促进分化, 增加 MHC 和肿瘤坏死因子表达, 活化杀伤淋巴细胞, 但单独用药对胃癌 MKN45 细胞抑制作用欠佳。本研究对 ATRA、IFN 联合作用对胃癌 MKN45 细胞进行分析, 探讨联合用药对细胞的作用机制, 结果报道如下。

### 1 材料与方 法

**1.1 主要材料** 胃癌细胞系 MKN45 细胞(中科院上海细胞库), MEM 培养基(Invitrogen 公司), 胎牛血清(Gibco 公司), MTT、ATRA 和 IFN(Sigma 公司), DMSO(Amresco 公司), LSAB 试剂盒(Dako 公司), p16、p21 和 c-myc(MAIXIN. Bio 公司), DNA 探针(CHEMICON 公司)。

**1.2 细胞培养和处理** (1)用含 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养液培养 MKN45 细胞。收集并计数对数增殖期细胞, 调整细胞浓度至  $1 \times 10^5$  个/毫升。(2)分组处理细胞后, 置 CO<sub>2</sub> 培养箱, 37 °C 培养 24 h, 分组及处理方法见表 1。

**1.3 细胞生长情况检测(MTT 法)** 将处理后的细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板, 设空白组、ATRA 组、(ATRA+IFN) 组, 每组 10 个平行孔, 每孔接种 100  $\mu$ L 细胞悬液; CO<sub>2</sub> 培养箱, 37 °C 培养 24 h 后弃去原培养液; 空白组加入新鲜培养液,

ATRA 组与 (ATRA+IFN) 组各加入相应新鲜培养液, 每孔 100  $\mu$ L; 继续培养 48 h 后, 镜下观察细胞形态; 每孔加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20  $\mu$ L, 继续培养 4 h 后弃去孔内液体, 加入 150  $\mu$ L DMSO, 振荡 10 min 后, 570、630 nm 波长下测定吸光度并计算相对增殖率(RGR)。

表 1 药物诱导方法(mL)

成分	空白组	ATRA 组	(ATRA+IFN)组
细胞悬液( $1 \times 10^5$ 个/毫升)	1.0	1.0	1.0
RPMI-1640 培养液	9.0	8.0	8.0
ATRA( $10^{-6}$ mol/L)	0.0	1.0	0.5
IFN( $10^{-6}$ mol/L)	0.0	0.0	0.5

**1.4 Northern Blot 检测** (1)制胶(5 cm $\times$ 14 cm)。(2)RNA 样品的制备: 收集细胞, 抽提 RNA 后于 RNA 样品中加入 3 倍体积上样液和溴化乙锭(终浓度为 10  $\mu$ g/mL), 混匀, 65 °C 空气浴 15 min; 1 000 g 离心 5 min, 冰浴 5 min。(3)电泳: ①在 5 V/cm 条件下下电泳, 每隔 30 min 暂停电泳, 取出胶, 混匀两极电泳液后继续电泳。当溴酚蓝接近边缘时终止电泳。②紫外灯下观察并测量 18S RNA、28S RNA、溴酚蓝至点样孔距离。(4)转膜。(5)制备探针: 在离心管中按下序加入 10 $\times$  Buffer 2.5  $\mu$ L、dNTP Mixture 2.5  $\mu$ L、111 TBq/mmol[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP 5

\* 基金项目: 广东省深圳市科技计划项目(编号: 2005278)。

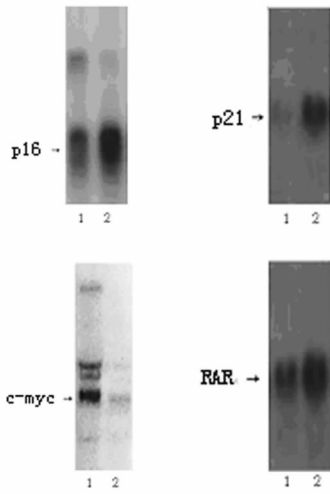
$\mu\text{L}$ 、Exo-free Klenow Fragment 1  $\mu\text{L}$  混匀, 37  $^{\circ}\text{C}$  放置 30 min, 4 000 g 离心 30 s, 收集溶液。(6) 探针纯化及比活性测定: ① 向已标记 DNA 样品加入 25  $\mu\text{L}$  STE, 取出 0.5  $\mu\text{L}$  点样于 DE8-paper, 其余上样于层析柱上。② 1 600 g 离心 4 min 收集 DNA, 取 0.5  $\mu\text{L}$  纯化探针点样于 DE8-paper。(7) 预杂交, 探针变性, 杂交, 洗膜, 曝光。

**1.5 p16、p21、c-myc 免疫组化检测** (1) 标本处理, 抗原修复。(2) 以羊血清工作液 37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 30 min; 滴加一抗, 4  $^{\circ}\text{C}$  放置过夜; PBS 洗 3 次 (5 分钟/次); 滴加二抗, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h。PBS 洗 3 次 (5 分钟/次); DAB 显色, 根据显微镜下观察的结果终止显色; 普通水洗 5 min, 苏木精复染 1 min; 普通水洗 5 min, 盐酸酒精分化, 返蓝; 脱水透明, 封片。(3) 普通光学镜观察结果: 有棕黄色者为阳性, 着色深表示反应强, 反之表示反应弱。

**1.6 统计学处理** 采用  $\chi^2$  检验及确切概率分析。

**2 结 果**

**2.1 细胞生长情况检测** MTT 测试结果显示 ATRA 组 RGR 为 80.82%, (ATRA+IFN) 组为 57.53%, 两者比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。



注: “1” 表示药物处理前, “2” 表示药物处理后。

图 1 Northern Blot 检测 p16、p21、c-myc 和 RAR $\alpha$  表达水平

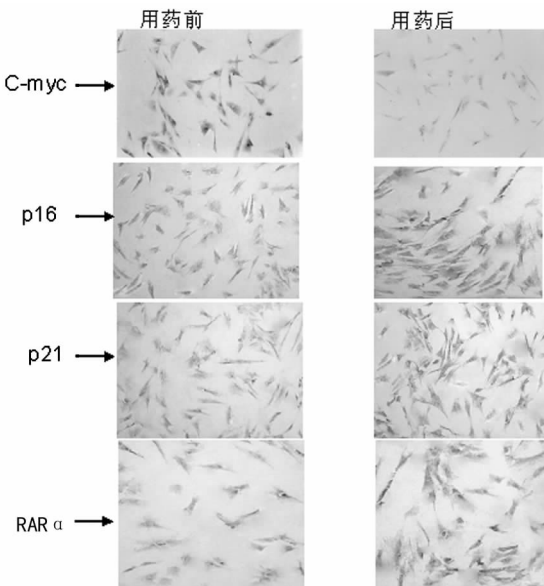


图 2 全反式视黄酸及干扰素诱导后蛋白表达情况

**2.2 Northern Blot 检测** 胃癌 MKN45 细胞中 c-myc 表达水平较高, p16 有一定程度的表达, p21 和 RAR $\alpha$  表达较低, 经药物联合诱导后, c-myc 表达水平下降, p16、p21 和 RAR $\alpha$  表达水平提高 (见图 1)。

**2.3 p16、p21、c-myc 免疫组化检测** 阳性染色主要位于细胞核, 呈清晰棕色, 阳性程度各异; 药物联合诱导后可见 p16 和 p21 阳性细胞增多, 可见体积大、细胞核圆且大、核浆比例也较大的细胞 (见图 2)。

**3 讨 论**

本研究显示 ATRA 可抑制胃癌 MKN45 细胞增殖, 但其 RGR 高于药物联合诱导组, 表明 MKN45 细胞对联合用药更敏感。肿瘤的发生与原癌基因活化和 (或) 抑癌基因失活或丢失有关, ATRA 可通过抑制或诱导失活某些癌基因, 或诱导活化某些抑癌基因抑制癌细胞生长、诱导癌细胞分化。在胃癌 MKN45 细胞中原癌基因 c-myc 基因有表达, 药物诱导后在癌细胞中表达水平下降<sup>[2]</sup>。p16 和 p21 是抑癌基因, MKN45 细胞中基本不表达 p21 基因, p16 基因在癌细胞中有一定水平表达, 经联合用药诱导后, 两种基因的表达水平均有所提高, 这表明 ATRA 联合 IFN 可以调控胃癌 MKN45 细胞中 p16、p21 和 c-myc 基因的表达。

抑癌基因 p16 位于染色体 9p21 区, 在多种癌细胞中有缺陷, 与癌的发生关系密切, 因此又称为多种肿瘤抑制物 I (multiple tumor suppressor I, MTS 1) 基因<sup>[3]</sup>。p16 的抑癌作用在于它抑制了在细胞从 G<sub>1</sub> → S 期的转变过程中起关键作用的 CDK4 的功能, 如果 p16 基因缺失或突变, 可导致细胞过度增殖, 使在 G<sub>1</sub> 期末充分发育的细胞提前进入 S 期, 导致肿瘤的发生。在本试验 p16 免疫组化结果中, 胃癌 MKN45 细胞一部分呈阳性反应。有研究表明在某些癌变中, 组化阳性的肿瘤细胞其 p16 含量与非肿瘤细胞类似, 在部分良性和恶性肿瘤中都观察到了 p16 蛋白表达增高的现象, 且结合临床病理资料分析发现 p16 免疫组化阳性的病例临床表现较差, 其高表达可能与不良预后有关。p16 这一抑癌基因在部分恶性肿瘤细胞中的过度表达, 在以前就曾被发现<sup>[5]</sup>。因此有研究认为, p16 基因的缺失或是过表达与肿瘤细胞的类型有关, 即在不同的肿瘤中 p16 的改变可能有所不同, 即使在同种肿瘤的不同亚型, p16 的改变也可能有所不同。p16 基因在不同类型肿瘤中可能发生不同形式的改变, 既可以是基因缺失、突变、甲基化等造成的失活, 也可以是基因的异常过度表达<sup>[6-7]</sup>。本试验中, 胃癌 MKN45 细胞 p16 基因表达水平虽然没有明显下降, 但在药物诱导后, p16 和 p21 表达水平均得到提高, 这说明 p16 和 p21 有可能在 MKN45 细胞中都是具有重要意义的抑癌基因。

ATRA 的作用主要由其受体 RARs 和 RXRs 介导, 在不同类型细胞中, 介导 ATRA 作用的受体也不同, 在胃癌 MKN45 细胞中, RAR $\alpha$  可能介导了 ATRA 对抑癌基因的调控, 但 ATRA 并不能单独诱导 MKN45 细胞中 RAR $\alpha$  的表达, 联合 IFN 共同作用后, 可诱导胃癌细胞中 RAR $\alpha$  基因的高水平表达<sup>[4]</sup>。因此 RAR $\alpha$  可能介导 ATRA 对 p16、p21 和 c-myc 等基因的调控, 有研究认为, 在 RAR 表达时, 可以与 RXR 形成二聚体而结合到 ATRA 应答元件上, 以此来调控基因的转录和表达。如果 RAR 表达水平低或者不表达, 就不能与 RXR 形成二聚体<sup>[8]</sup>, 因此 ATRA 对肿瘤细胞的抑制作用与 RAR $\alpha$  基因表达水平高低关系密切<sup>[9]</sup>。本试验通过对干扰素协同 ATRA 诱导胃癌 MKN45 细胞中基因表达水平的研究, 为进一步深入研究两者的协同作用机制打下了基础, (下转第 162 页)

### 3 讨 论

AB 在本院的临床分离率逐年递增, 主要分布科室是 ICU, 其次是肿瘤科和胸外科。导致该现象的原因可能包括: ICU 患者使用广谱抗菌剂的比例高于其他科室, 接受呼吸机、气管切开、导尿管等侵入性操作者较多; AB 对湿热紫外线及化学消毒剂有较强抵抗力; 抵抗力弱或有创伤的患者被医务人员或医疗器械所携带细菌感染的可能性更大<sup>[3]</sup>。

本院 2007~2009 年所分离 AB 菌株对 14 种抗菌剂耐药率均呈逐年上升趋势; 对头孢哌酮/舒巴坦的耐药率最低; 对亚胺培南、哌拉西林/他唑巴坦的耐药率较低; 对复方新诺明的耐药率最高。超过 30% AB 为多药耐药 AB (multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*, MDR-AB), 即对头孢菌素类、碳青霉烯类、β-内酰胺类、喹诺酮类和氨基糖苷类抗菌剂中两类以上耐药; 而泛耐药 (pan-drug resistance, PDR) AB 除对多粘菌素 B 及替加环素敏感外, 对上述种类抗菌剂均耐药<sup>[4]</sup>。216 株 AB 中, 4.16% (9/216) 对 14 种受试抗菌剂全部耐药, 均来自 ICU, 与 Chang 等<sup>[5]</sup>的研究结果相符; 9 株 PDR-AB 所对应 9 例患者均符合 AB 致呼吸机相关性肺炎的诊断。

AB 对头孢哌酮/舒巴坦耐药率最低, 可能是由于舒巴坦不仅能抑制多种 β-内酰胺酶, 并可直接作用于青霉素结合蛋白。AB 对 β-内酰胺类抗菌剂耐药率较高, 其耐药机制包括产生 β-内酰胺酶、改变青霉素结合蛋白、降低外膜蛋白通透性及激活外排泵<sup>[6-8]</sup>; 因此除亚胺培南、头孢哌酮/舒巴坦等含有酶抑制剂的三代头孢类抗菌剂外, 其余 β-内酰胺类抗菌剂已不能作为经验用药<sup>[9]</sup>。目前可用于治疗 MDR-AB 感染的抗菌剂仅包括多粘菌素、舒巴坦复合抗菌剂和替加环素<sup>[10]</sup>, 需根据患者实际情况制定合理的抗菌剂联用方案。AB 通过质粒、转座子和整合子等可移动基因元件整合外源性耐药基因, 获得外源性耐药的能力较强<sup>[11]</sup>。因此有必要对 MDR-AB 进行基因分型, 追踪传染源, 查证传播途径并监测 AB 耐药性的变化。

结核分枝杆菌 PDR 株研究结果提示, 在研究 PDR 株耐药机制的同时, 应关注所感染宿主的情况<sup>[12]</sup>。在本研究中, 9 例 PDR-AB 感染患者均诊断为 AB 致呼吸机相关性肺炎, 可见宿

主对耐药 AB 的选择压力值得深入探讨。

### 参考文献

- [1] 张丽, 张小兵, 张丽华. 747 株非发酵菌临床分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(3): 226-228.
- [2] 安敏飞, 陈国忠, 汪一萍, 等. 鲍氏不动杆菌致呼吸机相关性肺炎的耐药性分析及其 β-内酰胺酶基因研究[J]. 现代实用医学, 2009, 21(7): 775-776.
- [3] 蔡力力, 余晓红, 等. 鲍氏不动杆菌的临床分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(6): 878-879.
- [4] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen[J]. Clin Microbiol Rev, 2008, 21(3): 538-582.
- [5] Chang HL, Tang CH, Hsu YM, et al. Nosocomial outbreak of infection with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a medical center in Taiwan[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2009, 30(1): 34-38.
- [6] 朱建铭, 姜如金, 吴康乐. 老年患者鲍氏不动杆菌分离株耐药性与 AmpC 酶、β-内酰胺酶基因研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(2): 131-134.
- [7] 潘晓龙, 富铮, 周东升, 等. 鲍氏不动杆菌耐药性与 ADC β-内酰胺酶研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(5): 505-508.
- [8] 钱晓毛, 糜祖煌. 鲍氏不动杆菌 β-内酰胺酶基因型研究及 ADC 型 AmpC 酶基因的发现[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(4): 470-473.
- [9] 李隆祥, 张英. 鲍氏不动杆菌致慢性阻塞性肺疾病患者肺部感染临床及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(6): 880-882.
- [10] 俞云松. 多药耐药鲍曼不动杆菌——21 世纪革兰阴性杆菌中的 MRSA[J]. 中华临床感染病杂志, 2009, 2(2): 65-68.
- [11] Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, et al. Comparative genomics of multi-drug resistance in *Acinetobacter baumannii* [J]. PLoS Genet, 2006, 2(1): e7.
- [12] Jassal M, Bishai WR. Extensively drug-resistant tuberculosis [J]. Lancet Infect Dis, 2009, 9(1): 19-30.

(收稿日期: 2010-05-21)

(上接第 160 页)

为寻找新的途径治疗胃癌提供了理论依据。

### 参考文献

- [1] Shun YJ, Shyu RY, Chen HY, et al. In vitro and in vivo growth inhibition of SC-m1 gastric cancer cells by retinoic acid[J]. Oncology, 1996, 53(4): 334-540.
- [2] 吴乔, 曾定, 苏文金, 等. 视黄酸受体转录水平的改变与癌细胞生长的关系[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 1997, 36(5): 787-794.
- [3] Sun HJ, Wu B, Li AD, et al. Deletion and Mutation of p16/mts1 Gene in Human Gastric Cancer of Different Periods[J]. Chin J Basic Clin General Surg, 2002, 9(6): 415-417.
- [4] Sheikh MS, Shao ZM, Li XS, et al. Retinoid-resistant estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells transfected with retinoic acid receptor-acquired sensitivity to growth inhibition by retinoids[J]. J Biol Chem, 1994, 269(34): 21440-21447.
- [5] Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of

cancer stem like cells in the C6 glioma cell line[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(3): 781-786.

- [6] Ding Y, Le XP, Zhang QX. Methylation and mutation analysis of P16 gene in gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(3): 423-426.
- [7] Parry D, Bates S, Mann DJ, et al. Lack of cyclinD-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product[J]. EMBO J, 1995, 14(3): 503-511.
- [8] Zhang XK, Pfahl M. Regulation of retinoid and thyroid hormone action through homodimeric and heterodimeric receptors [J]. Trends Endocrinol Metab, 1993, 4(5): 156-162.
- [9] 张晓峰, 肖华龙, 虞竞峰, 等. 肺癌患者血清 P53 抗体水平的临床诊断价值[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(11): 977-978.

(收稿日期: 2010-07-01)