

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00136

抑制 Vav3 基因表达对胃癌细胞凋亡抑制蛋白及肿瘤多药耐药性的影响

檀碧波, 李 勇*, 范立侨, 赵 群, 王 冬, 刘 羽

河北医科大学第四医院外三科, 石家庄 050011

[摘要] **目的** 探讨 Vav3 基因在胃癌多药耐药性(MDR)中的作用及可能机制。**方法** 采用荧光定量反转录聚合酶链(QRT-PCR)及蛋白印迹技术检测 Vav3 在胃癌、癌旁组织及人胃癌细胞株 SGC7901、胃上皮细胞 GES-1 中的表达;合成针对 Vav3 的 siRNA,并转染 SGC7901;MTT 法检测氟尿嘧啶(5-FU)、奥沙利铂(L-OHP)对转染前后胃癌细胞的抑制率;荧光定量 RT-PCR 和蛋白质印迹法检测转染前后凋亡抑制蛋白家族成员 xIAP、Survivin、Livin 表达,并检测 Caspase-3、Caspase-8 表达及活性。**结果** Vav3 在胃癌组织及细胞株的表达高于癌旁组织及胃上皮细胞株($P<0.05$);Vav3-siRNA 转染 SGC7901 后 Vav3 表达明显受到抑制($P<0.01$);Vav3-siRNA 转染 SGC7901 48 h 后 5-FU、L-OHP 对肿瘤细胞的抑制作用均明显增强($P<0.05$);转染后 SGC7901 中 xIAP、Survivin 的表达均较转染前降低($P<0.05$),Livin 表达在转染前后无明显变化;转染后 Caspase-3、Caspase-8 表达及活性升高($P<0.05$)。**结论** Vav3 可通过调控胃癌细胞凋亡抑制途径参与胃癌多药耐药,抑制 Vav3 表达可能有助于逆转胃癌细胞的化疗耐药。

[关键词] 胃肿瘤;Vav3;多药抗药性;化疗敏感性;凋亡抑制蛋白质类

[中图分类号] R 735.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)02-0136-06

Effect of Vav3 gene inhibition on inhibitor of apoptosis proteins and multidrug resistance in gastric cancer cells

TAN Bi-bo, LI Yong*, FAN Li-qiao, ZHAO Qun, WANG Dong, LIU Yu

The Third Department of Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China

[Abstract] **Objective** To explore the role of Vav3 gene in multidrug resistance (MDR) of gastric cancer and the related mechanism. **Methods** QRT-PCR was used to examine the expressions of Vav3 gene in gastric cancer tissues, tumor-adjacent tissues, human gastric cancer cell line SGC7901, and gastric epithelial cell line GES-1. Then Vav3-siRNA was synthesized and transfected into SGC7901 cells. MTT assay was then used to determine the inhibition rates of tumor cells exposed to chemotherapeutic agents (5-FU, L-OHP) before and after Vav3-siRNA transfection. Real-time RT-PCR and Western blotting analysis were used to observe the expressions of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs): xIAP, Survivin, and Livin; meanwhile, the expression and activity of Caspase-3 and Caspase-8 were also determined. **Results** Vav3 was over-expressed in gastric cancer tissues and gastric cell line compared with those in tumor-adjacent tissues and gastric epithelial cell line GES-1 ($P<0.05$). Expression of Vav3 was significantly inhibited by Vav3-siRNA ($P<0.01$). Inhibition rates of tumor cells exposed to 5-FU and L-OHP were significantly increased 48 h after Vav3-siRNA transfection ($P<0.05$). The expressions of xIAP and Survivin were significantly decreased in cancer cells after Vav3-siRNA transfection (both $P<0.05$), and no notable change was found for Livin expression; also the expression and activity of Caspase-3 and Caspase-8 protein were significantly increased after Vav3-siRNA transfection in SGC7901 cells (all $P<0.05$). **Conclusion** Vav3 can participate in MDR of gastric cancer by

[收稿日期] 2014-06-24 **[接受日期]** 2014-08-15

[基金项目] 国家自然科学基金(81072033, 81372580),河北省自然科学基金(C2010000619),河北省普通高校强势特色学科资助项目(冀教高[2005]52),河北省科技支撑项目(14277779D),河北省卫生厅重大医学科研课题(zd2013040)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81072033,81372580), Natural Science Foundation of Hebei Province (C2010000619), Foundation for Major Subjects of Higher Institutions of Hebei Province (Jijiaogao[2005]52), Science and Technology Supporting Project of Hebei Province (14277779D), and Key Medical Project of Health Department of Hebei Province (zd2013040)。

[作者简介] 檀碧波, 博士, 副教授. E-mail: tanbibo_2011@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0311-86095438, E-mail: li_yong_hbth@126.com

regulating apoptotic pathways, and inhibition of Vav3 can help reverse MDR of gastric cancer cells by regulating some IAPs.

[Key words] stomach neoplasms; Vav3; multiple drug resistance; chemosensitivity; inhibitor of apoptosis proteins
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(2): 136-141]

胃癌综合治疗效果差的重要原因之一是胃癌细胞具有较强的多药耐药性(multidrug resistance, MDR)^[1-2]。研究发现凋亡抑制途径在胃癌 MDR 中发挥重要作用^[3-4];胃癌化疗常用的铂类及氟尿嘧啶类药物的 MDR 形成与凋亡相关蛋白有关^[5-6],但具体调控机制尚不明确。Vav3 基因属于 Dbl (diffuse B lymphoma) 癌基因家族成员之一,在肿瘤的发展、转移等过程中扮演重要角色^[7],Vav3 可通过调节 *Bcl-2*、*Bax*、*Bad*、*Bak* 等凋亡相关基因而参与肿瘤细胞凋亡过程,抑制 Vav3 表达可增强紫杉醇诱导肿瘤细胞凋亡的能力^[8-9],但 Vav3 能否通过调控凋亡相关蛋白表达影响胃癌 MDR 目前尚不清楚。本研究采用 RNA 干扰技术抑制胃癌细胞株 Vav3 的表达,检测胃癌细胞对化疗药的敏感性及凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)、凋亡核心半胱氨酸蛋白酶(Caspases)家族 Caspase-3、Caspase-8 表达变化,探讨 Vav3 能否通过凋亡抑制途径参与胃癌 MDR。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及药物 MTT(美国 Sigma 公司); RPMI 1640 培养液、胰蛋白酶(Gibco 公司);荧光定量 RT-PCR 试剂盒(美国 Promega 公司);Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒(Invitrogen 公司);兔抗人 Vav3、xIAP、Survivin、Livin、Caspase-3、Caspase-8 及 β -actin 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);相关 PCR 引物、小干扰 RNA 由上海生工生物工程有限公司合成。氟尿嘧啶(5-FU,天津金耀制药公司);奥沙利铂(L-OHP,江苏恒瑞医药公司)。胃腺癌细胞株 SGC7901、胃上皮细胞株 GES-1 购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。细胞置于含 10% 新生牛血清及双抗的 RPMI 1640 培养液中培养,2~3 d 传代 1 次。实验时将处于对数生长期的细胞经消化分散后计数,制成细胞悬液备用。

1.2 临床样本来源 2013 年 1 月至 2013 年 8 月于我科手术切除经病理确诊的胃腺癌 25 例,其中男 18

例,女 7 例,年龄(61.6±10.3)岁,患者术前均未接受放化疗。每例均取癌及癌旁组织(距癌组织边缘 >2 cm,病理证实无癌细胞)各 1 块(约 1.0 cm×0.5 cm×0.5 cm),-80℃ 保存。所有患者均知情同意并签署知情同意书。本研究获河北医科大学第四医院医学伦理委员会审批通过并备案。

1.3 Vav3-siRNA 合成及转染 Vav3 特异性小干扰 RNA 序列参考文献^[10]设计,序列 5'-CCC AGU UUC UCU GUU UGA AGA ACA U-3',无关对照 siRNA(non-specific control siRNA, NS-siRNA)序列 5'-CCC UUC UCU GUU UGU AAA GAG ACA U-3'。采用脂质体介导法,使用 Lipofectamine™ 2000 试剂盒,按照说明书将 Vav3-siRNA 或 NS-siRNA 转染 SGC7901 细胞株,转染 48 h 进行后续实验。

1.4 MTT 法检测胃癌细胞体外药敏性 接种 10⁴ 个胃癌细胞 200 μ L/孔至 96 孔板,生长至 50% 融合后,按照使用说明书,将 Lipofectamine™ 2000 与 Vav3-siRNA 或对照 NS-siRNA 制备的转染复合物每孔 200 μ L 按分组分别加入各孔,每组各设 6 个复孔。6 h 后更换含牛血清和双抗的 RPMI 1640 培养液 200 μ L。另设加入生理盐水的空白对照组。于 24 h 后每孔分别加入 5-FU(25 μ g/mL)、L-OHP(8 μ g/mL)。继续培养 8 h,每孔 MTT 20 μ L,培养 4 h,倒去培养液,加入二甲亚砜(DMSO)150 μ L,酶标仪波长 490 nm 处检测光密度(D)值。抑制率(IR)=(1-给药孔平均 D 值/对照孔平均 D 值)×100%。

1.5 荧光定量 PCR 检测各目的基因 mRNA 表达 一步法提取组织或细胞总 RNA,以 1.5% 琼脂糖凝胶(含 EB)电泳鉴定 RNA 完整性,紫外分光光度法测定 RNA 的纯度及含量。取 2 μ g RNA 用于反转录合成 cDNA。按试剂盒说明建立 40 μ L PCR 反应体系。以 GAPDH 作为内参照基因。PCR 反应参数如下:95℃ 5 min,然后 94℃ 变性 30 s,58℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,进行 40 个循环,每个循环的延伸阶段收集荧光信号。Vav 3 (81 bp)引物:F 为 5'-TGT GTG CCC AAA CCA GTA G-3',R 为 5'-

AAG TTC GGT CTC TGC TTG C-3'; xIAP (292 bp) 引物:F 为 5'-CCG TGC GGT GCT TTA GTT GT-3', R 为 5'-TTC CTC GGG TAT ATG GTG TCT GAT-3'; Survivin (185 bp)引物:F 为 5'-GCC AGA TTT GAA TCG CGG GA-3', R 为 5'-GCA GTG GAT GAA GCC AGC CT-3'; Livin (312 bp) 引物:F 为 5'-TCC ACA GTG TGC AGG AGA CT-3', R 为 5'-ACG GCA CAA AGA CGA TGG AC-3'; Caspase-3 (148 bp) 引物:F 为 5'-AGA GCT GGA CTG CGG TAT TGA G-3', R 为 5'-GAA CCA TGA CCC GTC CCT TG-3'; Caspase-8 (163 bp)引物:F 为 5'-GAT GAG GCA GAC TTT CTG CT-3', R 为 5'-CAT AGT TCA CGC CAG TCA GGA T-3'; GAPDH (138 bp) 引物:F 为 5'-GAC CCC TTC ATT GAC CTC AAC-3', R 为 5'-CGC TCC TGG AAG ATG GTG AT-3'。PCR 产物扩增结束后进入结果分析界面,计算各基因 mRNA 表达的相对数值(RQ 值)。

1.6 蛋白质印迹法检测各目的蛋白表达 收取每组 10^7 个对数生长期的肿瘤细胞,分别加入细胞裂解液 100 μ L,冰浴 20 min。4 $^{\circ}$ C、 $7\ 104\times g$ 离心 10 min,收集上清,Bradford 法测定蛋白浓度。每组取

40 μ g 蛋白样品,10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转移至 PVDF 膜。5%脱脂奶粉室温封闭 90 min,分别加入 400 倍稀释的一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜。加入二抗,漂洗后暗室曝光,常规显影、定影。用 BioRad 图像分析系统分析,以蛋白条带的平均 D 值表示蛋白表达的相对强度。

1.7 分光光度法检测细胞 Caspase-3 和 Caspase-8 活性 收集细胞,用 50 μ L 冷裂解液裂解 20 min,12 500 $\times g$ 离心 10 min,转移上清并测定蛋白浓度。按照分光光度法检测试剂盒说明书的要求进行操作。酶标仪于波长 405 nm 处测出各孔 D 值。用单位蛋白中所含的 Caspase 酶活力单位表示 Caspase 活化程度。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件,计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,检验水准 (α)为 0.05。

2 结果

2.1 胃癌组织及细胞株 Vav3 蛋白的表达 结果显示,胃癌组织 Vav3 蛋白表达高于癌旁组织 ($P < 0.05$,图 1A);胃癌细胞 Vav3 蛋白表达高于胃上皮细胞株 ($P < 0.05$,图 1B)。

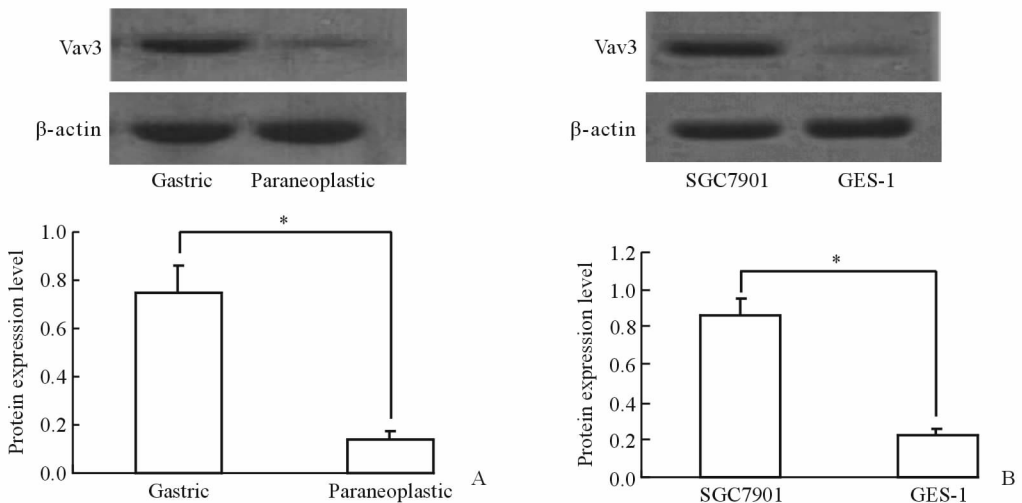


图 1 胃癌组织(A)及胃癌细胞株(B)Vav3 蛋白的表达

Fig 1 Expression of Vav3 protein in gastric cancer tissues (A) and gastric cancer cell lines (B)

* $P < 0.05$. $n=8$ (A), $n=3$ (B), $\bar{x}\pm s$

2.2 Vav3-siRNA 转染 SGC7901 细胞对 Vav3 表达的影响 结果(图 2)表明:Vav3-siRNA 转染 SGC7901 细胞 48 h 后,细胞 Vav3 表达受到明显抑

制,Vav3-siRNA 在 80 nmol/L 时对 Vav3 抑制率达 90%左右 ($P < 0.05$)。

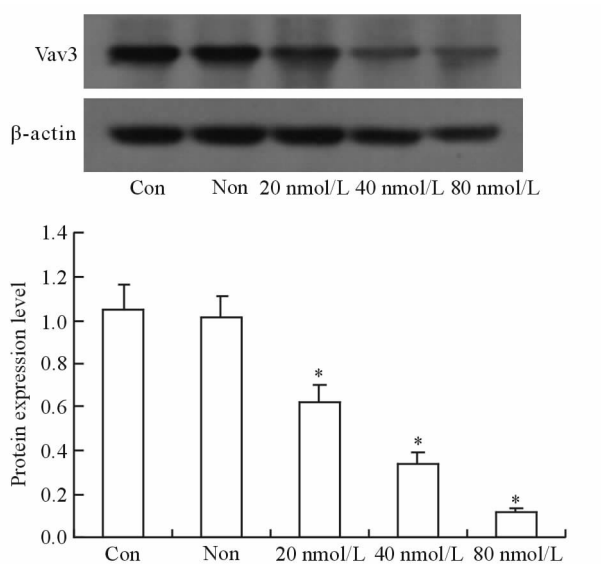


图 2 *Vav3*-siRNA 转染后 SGC7901 细胞株中 *Vav3* 的表达

Fig 2 Expression of *Vav3* in SGC7901 cells before and 48 h after *Vav3*-siRNA transfection

Con: Blank control group; Non: Negative control group.

* $P < 0.05$ vs negative control group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.3 MTT 体外药敏实验结果 结果显示, 5-FU、L-OHP 对空白对照组细胞抑制率分别为 $(40.22 \pm 4.24)\%$ 、 $(37.58 \pm 4.48)\%$; 阴性对照组(转染 NS-siRNA 组)分别为 $(43.64 \pm 5.88)\%$ 、 $(39.86 \pm 4.79)\%$ 。转染 *Vav3*-siRNA 组 2 种药物对肿瘤细胞的抑制率分别为 $(80.06 \pm 11.60)\%$ 和 $(73.34 \pm 8.90)\%$, 与对照组比较药物对转染组细胞的抑制率明显增高 ($P < 0.01$)。

2.4 *Vav3*-siRNA 转染对 SGC7901 细胞中 xIAP、Survivin、Livin 表达的影响 与对照组相比, *Vav3*-siRNA 转染后 SGC7901 细胞 *xIAP*、*Survivin* mRNA 表达强度均降低 ($P < 0.05$), 而 *Livin* mRNA 表达则无明显变化(图 3A)。蛋白质印迹检测结果与荧光定量 PCR 结果一致(图 3B)。

2.5 *Vav3*-siRNA 转染对 SGC7901 细胞中 Caspase-3、Caspase-8 表达及活性的影响 结果(图 4、表 1)显示: 与对照组相比, *Vav3*-siRNA 转染后 SGC7901 细胞 Caspase-3、Caspase-8 表达及活性均明显升高 ($P < 0.05$)。

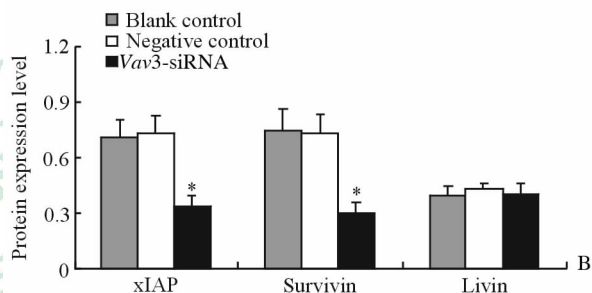
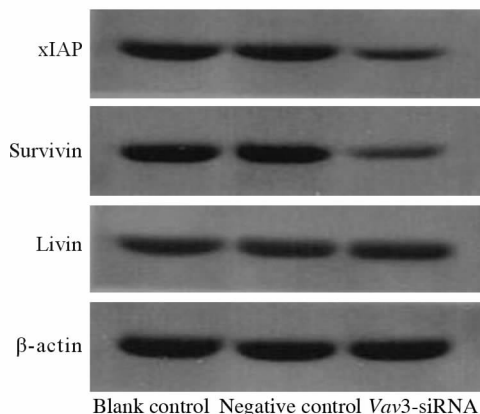
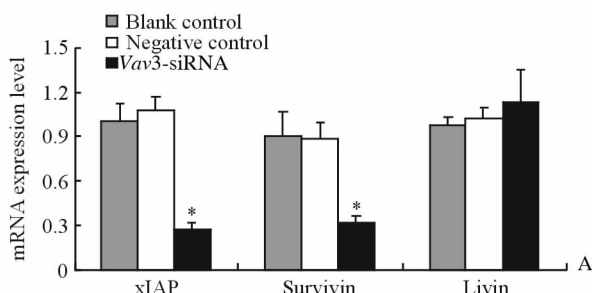


图 3 *Vav3*-siRNA 作用后 SGC7901 中 xIAP、Survivin、Livin mRNA (A) 和蛋白 (B) 的表达

Fig 3 Expression of xIAP, Survivin, Livin mRNA (A) and protein (B) in SGC7901 cells after *Vav3*-siRNA transfection

* $P < 0.05$ vs negative control group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

表 1 *Vav3*-siRNA 作用后 SGC7901 细胞 Caspase-3、Caspase-8 活性的变化

Tab 1 Activity of Caspase-3 and Caspase-8 in SGC7901 cells after *Vav3*-siRNA transfection

Group	$n = 6, \bar{x} \pm s$	
	Caspase-3	Caspase-8
Blank control	21.63 ± 3.04	1.64 ± 0.26
Negative control	22.52 ± 2.81	1.56 ± 0.27
<i>Vav3</i> -siRNA	49.83 ± 6.86*	4.26 ± 0.67*

* $P < 0.05$ vs negative control group and blank control group

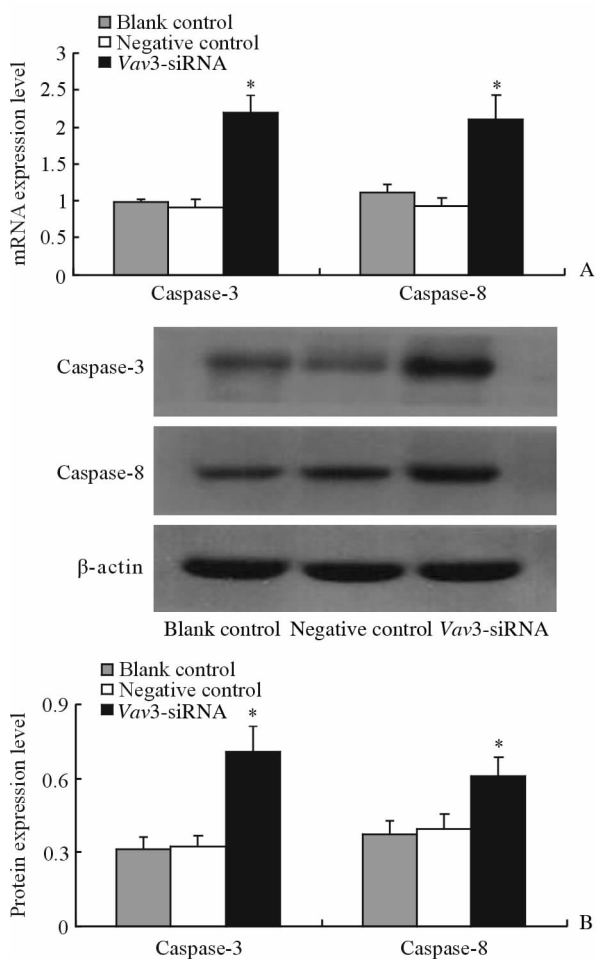


图4 Vav3-siRNA作用后SGC7901细胞Caspase-3、Caspase-8的基因(A)及蛋白(B)表达

Fig 4 Expression of Caspase-3 and Caspase-8 mRNA (A) and protein (B) in SGC7901 cells after Vav3-siRNA transfection

* $P < 0.05$ vs negative control group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

近年来已发现多种途径及基因参与胃癌MDR中,但具体机制尚不完全明确。目前研究最多的是经典MDR途径^[11-12],但该途径中的MDR1、MRP1等基因的相关化疗药物多为植物碱类及抗生素类。而胃癌常用的化疗药物多为氟尿嘧啶类及铂类药物,胃癌细胞对此类药物的MDR形成与凋亡抑制途径关系更为密切^[5-6]。凋亡抑制蛋白(IAPs)家族是参与肿瘤凋亡抵抗的重要成员,与肿瘤细胞凋亡耐受的形成密切相关,但有关对IAPs上游调控则研究很少。故本研究以具有广泛基因调控功能的Vav3基因为研究对象,对该基因与IAPs及胃癌MDR的关系进行了探讨。

本研究中的Vav3对多种基因、多条信号转导

通路都有调控作用,参与膀胱癌、淋巴瘤、乳腺癌等多种恶性肿瘤的发生进展^[10-13-14],但Vav3对IAPs的调控作用研究很少。故本研究探讨了Vav3与胃癌MDR的关系及对IAPs成员的调节作用。结果发现胃癌组织及细胞株SGC7901的Vav3表达明显增强,提示Vav3与胃癌有关。进一步采用RNA干扰技术有效抑制了胃癌细胞株SGC7901中Vav3表达,结果发现Vav3被抑制后肿瘤细胞化疗药敏感性明显增强,说明Vav3可能具有逆转胃癌细胞MDR的特性。本研究还从分子水平对Vav3影响的凋亡抑制蛋白家族成员xIAP、Survivin、Livin^[15]进行了检测,结果发现Vav3受抑制时具有导致肿瘤细胞凋亡抑制形成的基因xIAP、Survivin表达水平下调;而Livin表达变化不明显。Caspase-3、Caspase-8作为细胞凋亡的核心基因,受IAPs调控,可直接促进细胞凋亡^[16-17]。本研究发现,Vav3受到抑制后,Caspase-3、Caspase-8的表达及活性均明显上升。

综上所述,Vav3可能通过调节凋亡抑制途径部分成员表达而抑制Caspases表达活性,最终参与胃癌MDR调节。Vav3作为候选基因有可能在胃癌MDR逆转的研究中发挥重要作用,但确切调节机制仍有待深入研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Zhu C Y, Lv Y P, Yan D F, Gao F L. Knockdown of MDR1 increases the sensitivity to adriamycin in drug resistant gastric cancer cells[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14: 6757-6760.
- [2] Yan L H, Wang X T, Yang J, Kong F B, Lian C, Wei W Y, et al. Reversal of multidrug resistance in gastric cancer cells by E2F-1 downregulation *in vitro* and *in vivo*[J]. J Cell Biochem, 2014, 115: 34-41.
- [3] Xie X, Tang B, Zhou J, Gao Q, Zhang P. Inhibition of the PI3K/Akt pathway increases the chemosensitivity of gastric cancer to vincristine[J]. Oncol Rep, 2013, 30: 773-782.
- [4] 檀碧波, 李勇, 范立侨, 赵群, 刘羽, 赵雪峰. 胃癌凋亡相关蛋白Survivin、B淋巴细胞/白血病-2、bax表达与肿瘤细胞体外化疗药敏感性的关系[J]. 中华实验外

- 科杂志,2012,29:1315-1317.
- [5] Li Y, Tan B B, Zhao Q, Fan L Q, Liu Y, Hao Y J, et al. Tumor chemosensitivity is correlated with expression of multidrug resistance associated factors in variously differentiated gastric carcinoma tissues[J]. *Hepatogastroenterology*, 2013, 60:213-216.
- [6] Gazzaniga P, Gradilone A, Petracca A, Nicolazzo C, Raimondi C, Iacovelli R, et al. Molecular markers in circulating tumour cells from metastatic colorectal cancer patients[J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14:2073-2077.
- [7] Fernandez-Salguero P M. A remarkable new target gene for the dioxin receptor: the Vav3 proto-oncogene links AhR to adhesion and migration[J]. *Cell Adh Migr*, 2010, 4:172-175.
- [8] Chang K H, Sanchez-Aguilera A, Shen S, Sengupta A, Madhu M N, Ficker A M, et al. Vav3 collaborates with p190-BCR-ABL in lymphoid progenitor leukemogenesis, proliferation, and survival[J]. *Blood*, 2012, 120:800-811.
- [9] Nomura T, Yamasaki M, Hirai K, Inoue T, Sato R, Matsuura K, et al. Targeting the Vav3 oncogene enhances docetaxel-induced apoptosis through the inhibition of androgen receptor phosphorylation in LNCaP prostate cancer cells under chronic hypoxia[J]. *Mol Cancer*, 2013, 12:27.
- [10] Lee K, Liu Y, Mo J Q, Zhang J, Dong Z, Lu S. Vav3 oncogene activates estrogen receptor and its overexpression may be involved in human breast cancer[J]. *BMC Cancer*, 2008, 8:158.
- [11] Kang J, Zhao G, Lin T, Tang S, Xu G, Hu S, et al. A peptide derived from phage display library exhibits anti-tumor activity by targeting GRP78 in gastric cancer multidrug resistance cells[J]. *Cancer Lett*, 2013, 339:247-259.
- [12] Wang Y, Liu L, Liu X, Zhang H, Liu J, Feng B, et al. Shugoshin1 enhances multidrug resistance of gastric cancer cells by regulating *MRP1*, *Bcl-2*, and *Bax* genes[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34:2205-2214.
- [13] Liu Y, Wu X, Dong Z, Lu S. The molecular mechanism of Vav3 oncogene on upregulation of androgen receptor activity in prostate cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2010, 36:623-633.
- [14] Travert M, Huang Y, de Leval L, Martin-Garcia N, Delfau-Larue M H, Berger F, et al. Molecular features of hepatosplenic T-cell lymphoma unravels potential novel therapeutic targets[J]. *Blood*, 2012, 119:5795-5806.
- [15] Chen X, Wang T, Yang D, Wang J, Li X, He Z, et al. Expression of the IAP protein family acts cooperatively to predict prognosis in human bladder cancer patients[J]. *Oncol Lett*, 2013, 5:1278-1284.
- [16] Wittkopf N, Günther C, Martini E, He G, Amann K, He Y W, et al. Cellular FLICE-like inhibitory protein secures intestinal epithelial cell survival and immune homeostasis by regulating caspase-8[J]. *Gastroenterology*, 2013, 145:1369-1379.
- [17] Sikdar S, Mukherjee A, Ghosh S, Khuda-Bukhsh A R. Condurango glycoside-rich components stimulate DNA damage-induced cell cycle arrest and ROS-mediated caspase-3 dependent apoptosis through inhibition of cell-proliferation in lung cancer, *in vitro* and *in vivo* [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2013, 37:300-314.

[本文编辑] 贾泽军