

Mcl-1 抑制剂 UMI-77 诱导胃癌细胞 MGC-803 凋亡的机制研究

朱雪萍, 吴萍, 张林杰

摘要 目的 探讨髓样细胞白血病-1 (Mcl-1) 分子选择性抑制剂 UMI-77 诱导胃癌细胞 MGC-803 凋亡的机制。方法 采用 Annexin V/PI 染色流式细胞术观察不同浓度 UMI-77 作用后 MGC-803 细胞凋亡率; JC-1 染色流式细胞术分析线粒体膜电位的改变; Western blot 法检测 UMI-77 作用后半胱天冬氨酸蛋白酶 9 (Caspase-9)、半胱天冬氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3) 和聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (PARP) 的活化情况以及 B 淋巴细胞瘤 2 (Bcl-2)、Bcl-2 蛋白 1 亚型 1 (Bcl-X_L) 和 Mcl-1 蛋白的表达情况; 转染 Mcl-1 siRNA 特异性沉默 Mcl-1 基因, Western blot 验证基因沉默效果, Annexin V/PI 染色流式细胞术检测转染对 UMI-77 诱导的细胞凋亡的影响。结果 UMI-77 能诱导胃癌细胞 MGC-803 发生凋亡, 随着药物浓度升高, 细胞凋亡率逐渐增加; UMI-77 作用后, 线粒体膜电位下降; Caspase-9、Caspase-3 和 PARP 在 UMI-77 处理 24 h 显著活化 ($P < 0.05$); Bcl-2、Bcl-X_L 在 UMI-77 作用前后的蛋白表达水平没有明显改变, 而 Mcl-1 在 12 h 起即明显下调 ($P < 0.05$); 与阴性对照比较, 转染 Mcl-1 siRNA 后 MGC-803 细胞中 Mcl-1 蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.05$), 且转染后再用 UMI-77 处理, 细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$)。结论

UMI-77 可通过内源性凋亡途径诱导胃癌细胞 MGC-803 发生凋亡, 下调 Mcl-1 表达会阻止 UMI-77 诱导的凋亡。

关键词 胃癌; UMI-77; Mcl-1; 小分子抑制剂; 细胞凋亡

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)04-0506-06

胃癌是严重危害人类健康的恶性肿瘤, 化疗是主要的治疗方式, 而化疗药物通常是通过诱导细胞凋亡来发挥效应的。凋亡途径一般分为由细胞膜上的死亡受体介导的外源性途径和由线粒体启动的内源性途径, 其中 B 淋巴细胞瘤 2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2) 家族蛋白是调控内源性途径的关键, 包括促凋亡的蛋白 Bax、Bak、Bad、Bid 和 Bim 等以及抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-2 蛋白 1 亚型 1 (Bcl-2-like protein 1 isoform 1, Bcl-X_L)、髓样细胞白血病-1 (myeloid cell leukemia-1, Mcl-1) 和 Bcl-w 等, 促凋亡和抗凋亡蛋

白之间的平衡决定了细胞对凋亡刺激的反应^[1]。近些年来, 人们从抗凋亡的 Bcl-2、Bcl-X_L、Mcl-1 入手, 合成了许多小分子抑制剂, 如 ABT-737^[2]、ABT-199 等, 其单独使用或与化疗药物联合时具有很好的抗肿瘤效果。UMI-77 是 2014 年 Abulwerdi et al^[3] 运用高通量筛选以及结构生物学方法鉴定出的一种小分子抑制剂, 能选择性地结合 Mcl-1, 阻止 Mcl-1/Bax 及 Mcl-1/Bak 的异二聚化, 从而拮抗 Mcl-1 的功能, 发挥抑制细胞生长及诱导凋亡作用。该研究将 UMI-77 应用于胃癌细胞, 了解其诱导胃癌细胞凋亡的机制, 为其进入临床提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 人胃癌细胞株 MGC-803 购自中国科学院上海细胞库; UMI-77 购自美国 Selleck 公司; RPMI 1640 培养基和 Opti-MEM 低血清培养基购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自美国 Hyclone 公司; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、FACSVerse 流式细胞仪购自美国 BD 公司; 线粒体膜电位检测试剂盒购自北京泛博生物化学有限公司; 兔抗人 Bcl-X_L 单克隆抗体及半胱天冬氨酸蛋白酶 9 (cysteiny l aspartate specific proteinase 9, Caspase-9) 多克隆抗体购自美国 Cell Signaling 公司; 小鼠抗人半胱天冬氨酸蛋白酶 3 (cysteiny l aspartate specific proteinase 3, Caspase-3)、聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (poly ADP-ribose polymerase, PARP) 及 Bcl-2 单克隆抗体、兔抗人 Mcl-1 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 及山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; Lipofectamine 2000 Reagent 购自美国 Invitrogen 公司; 人 Mcl-1 siRNA 序列由上海吉玛公司设计并合成。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 MGC-803 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 5% CO₂、37 °C、饱和湿度条件下常规培养。

1.2.2 Annexin V/PI 染色流式细胞术检测细胞凋亡 将对数生长期的细胞按每孔 1 × 10⁵ 个接种于 24 孔板中, 次日细胞融合达 80% 以上, 分别用 0、

2016-01-18 接收

基金项目: 安徽高校省级自然科学基金项目 (编号: KJ2014A113)

作者单位: 安徽医科大学免疫学教研室, 合肥 230032

作者简介: 朱雪萍, 女, 硕士研究生;

张林杰, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: zlj33@ahmu.edu.cn

2.5、5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ UMI-77 处理,每组设 3 个复孔,24 h 后分别收集各孔中细胞于流式管中,加 300 μl $1 \times$ Binding Buffer 重悬,然后加入 5 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI,充分混匀,避光作用 20 min,流式细胞仪检测细胞凋亡情况,采用 FlowJo 7.6 软件分析结果。

1.2.3 JC-1 染色流式细胞术检测线粒体膜电位
按 1.2.2 中接种细胞,分别用 0、15、20 $\mu\text{mol/L}$ UMI-77 处理,每组设 3 个复孔,24 h 后分别收集各孔细胞,用 0.5 ml RPMI 1640 完全培养液重悬细胞,再加入 0.5 ml JC-1 染色工作液,颠倒混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光作用 20 min,于每管加入 300 μl JC-1 染色缓冲液($1 \times$),立即上流式细胞仪检测线粒体膜电位变化,以线粒体膜电位阻断剂 CCCP (50 $\mu\text{mol/L}$) 处理 10 min 的细胞为阳性对照,FlowJo 7.6 软件分析结果。

1.2.4 Western blot 法检测蛋白表达情况 分别收集各孔(未转染、转染 NC siRNA、转染 Mcl-1 siRNA)以及 UMI-77 (15 $\mu\text{mol/L}$) 处理 0、6、12、24 h 细胞。加适量 RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、14 000 r/min 离心 30 min 后取上清液,获得细胞总蛋白。用 BCA 法进行蛋白定量,然后加入等体积的 $2 \times$ 上样缓冲液,煮沸 3 min 使蛋白变性。各蛋白样品取 20 μg 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,随后转移至硝酸纤维素膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2 h,然后加入各自的一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,次日用 TBST 洗 3 次,每次 10 min。再加入相应二抗,室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次,每次 10 min。用 ECL 试剂盒显色,天能全自动凝胶成像系统照相并分析结果。

1.2.5 siRNA 转染 Mcl-1 siRNA 上游引物:5'-

GUGCCUUUGUGGCUAAACA-3', 下游引物:3'-UGUUUAGCCACAAAGGCAC-5'。将细胞分别接种于 6 孔板和 24 孔板中(6 孔板每孔 2×10^5 个细胞,24 孔板每孔 1×10^5 个细胞),次日细胞融合达 30% ~ 50% 即进行转染,分未转染、转染 NC siRNA、转染 Mcl-1 siRNA,每组设 3 个复孔。转染前 1 h 将各孔中液体更换为无血清 Opti-MEM 培养基,然后分别用 Opti-MEM 将适量 siRNA 与 Lipofectamine 2000 稀释,静置 20 min 后混合,将 siRNA/Lipofectamine 2000 混合物滴入相应孔中,置于培养箱中继续培养,约 4 ~ 6 h 后更换为 RPMI 1640 培养基。6 孔板细胞在转染 48 h 后提取细胞总蛋白,Western blot 法检测转染效率。24 孔板中细胞在未转染以及转染 Mcl-1 siRNA 基础上待细胞融合达 80% ~ 90% 后再加入 UMI-77 (15 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h, Annexin V/PI 染色流式细胞术检测细胞凋亡率。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 UMI-77 对 MGC-803 细胞凋亡的影响 AnnexinV-FITC/PI 染色流式细胞术结果显示,0、2.5、5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ 的 UMI-77 作用 MGC-803 细胞 24 h 的凋亡率分别为 $(2.12 \pm 3.103)\%$ 、 $(6.28 \pm 2.679)\%$ 、 $(17.96 \pm 3.977)\%$ 、 $(43.11 \pm 5.133)\%$ 、 $(50.97 \pm 4.819)\%$ 、 $(77.38 \pm 6.574)\%$,随着药物浓度的升高,细胞凋亡逐渐增加($F = 464.036, P < 0.05$),呈剂量依赖性。见图 1。

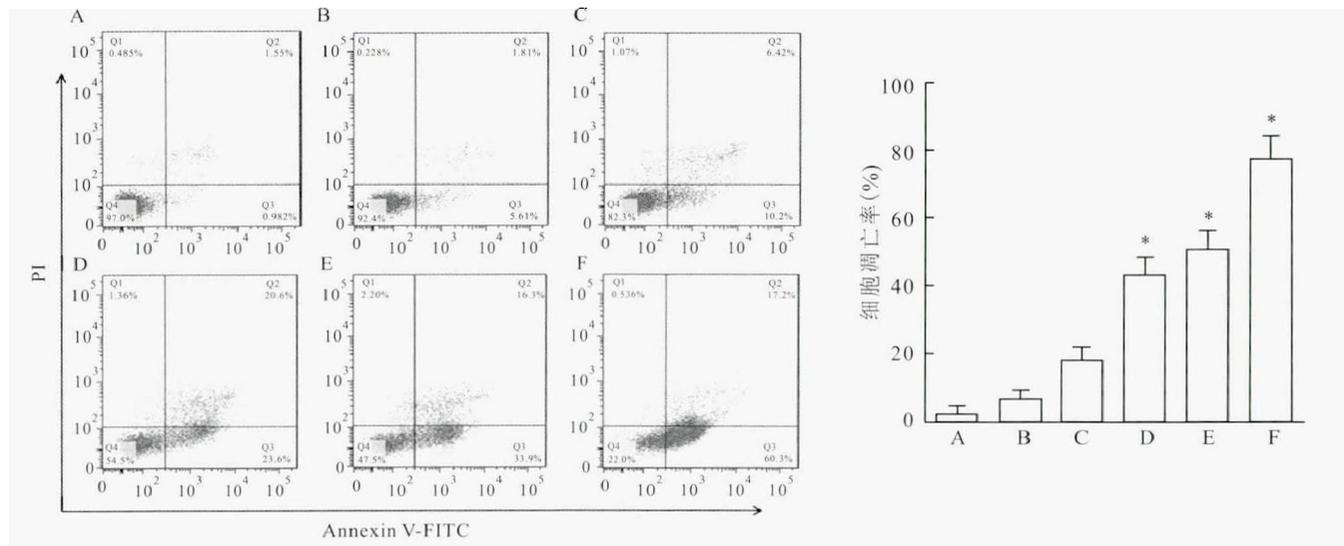


图 1 不同浓度 UMI-77 处理 MGC-803 细胞 24 h 的凋亡率

A:0 $\mu\text{mol/L}$; B:2.5 $\mu\text{mol/L}$; C:5 $\mu\text{mol/L}$; D:10 $\mu\text{mol/L}$; E:15 $\mu\text{mol/L}$; F:20 $\mu\text{mol/L}$; 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较: * $P < 0.05$

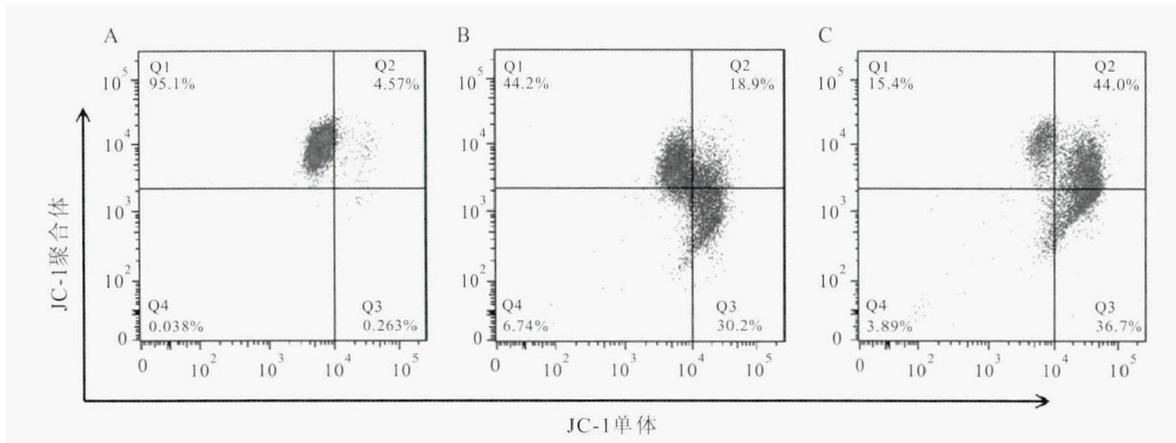


图2 UMI-77对MGC-803细胞线粒体膜电位的影响
A:0 μmol/L; B:15 μmol/L; C:20 μmol/L

2.2 UMI-77对MGC-803细胞线粒体膜电位的影响 JC-1染色流式细胞术检测结果显示,正常情况下JC-1聚集在线粒体基质中形成聚合物,而0、15、20 μmol/L的UMI-77处理后,细胞逐渐向右下方移动,即聚集在线粒体的JC-1聚合物减少,而单体形式的JC-1增加,线粒体膜通透性增加,线粒体膜电位降低。见图2。

2.3 UMI-77对MGC-803细胞Caspase-9、Caspase-3、PARP表达的影响 Western blot法检测UMI-77(15 μmol/L)处理后Caspase-9、Caspase-3、PARP活化情况,无活性的前体形式的Caspase-9、Caspase-3和PARP在UMI-77处理6、12 h未发生明显改变,而在处理24 h显著下降($F = 139.446, 71.385, 130.880, P < 0.05$),被裂解的有活性的cleaved-Caspase-9、cleaved-Caspase-3和cleaved-PARP也出现,说明UMI-77激活了Caspase依赖性的内源性凋亡途径。见图3。

2.4 UMI-77对MGC-803细胞Bcl-2、Bcl-X_L和Mcl-1表达的影响 Western blot法检测UMI-77(15 μmol/L)处理前后抗凋亡蛋白Bcl-2、Bcl-X_L和Mcl-1的表达情况,Bcl-2和Bcl-X_L在凋亡过程中并没有明显的改变,而Mcl-1则在UMI-77处理后12 h显著降低($F = 1244.0, P < 0.05$),说明Mcl-1的下调可能参与了UMI-77诱导的凋亡过程。见图4。

2.5 UMI-77对沉默Mcl-1的MGC-803细胞凋亡的影响 利用化学合成的针对Mcl-1基因的siRNA转染MGC-803细胞,Western blot法检测基因沉默效果,与未转染和转染NC siRNA比较,转染Mcl-1 siRNA能明显降低细胞中Mcl-1蛋白的表达水平,基因沉默效果好($F = 850.571, P < 0.05$)。Annexin

V/PI染色流式细胞术检测基因沉默对UMI-77(15 μmol/L)诱导凋亡的影响。细胞转染Mcl-1 siRNA后再加UMI-77处理24 h的凋亡率为(21.38 ± 4.907)%,与UMI-77处理未转染细胞24 h比较,差异有统计学意义($F = 274.062, P < 0.05$)。见图5、6。

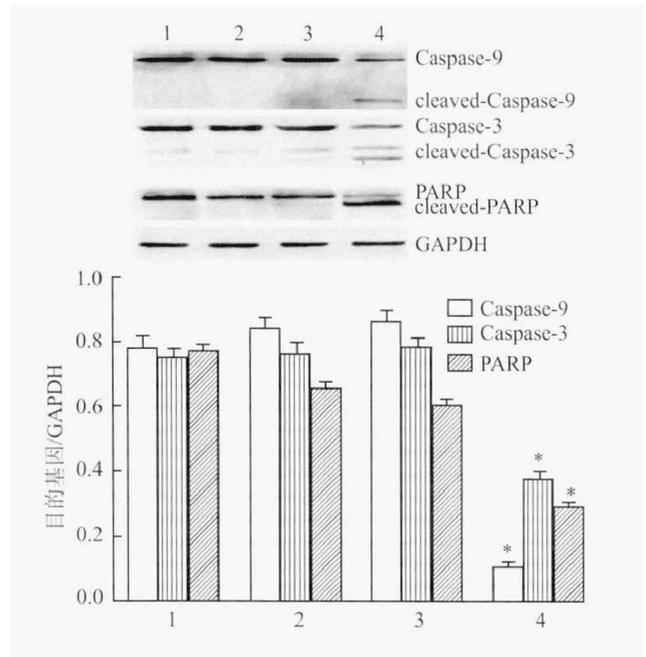


图3 UMI-77处理细胞不同时间后Caspase-3、Caspase-9以及PARP的表达情况
1:0 h;2:6 h;3:12 h;4:24 h;与0 h比较;* $P < 0.05$

3 讨论

Mcl-1是1993年发现的Bcl-2家族抗凋亡分子,半衰期非常短,在多种肿瘤组织中高表达⁴⁻⁵,在胃癌组织中的表达水平也显著高于癌旁组织,与

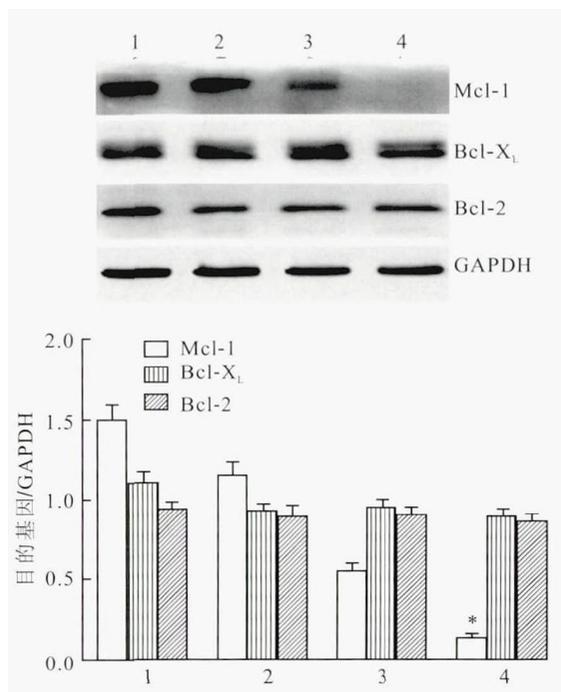


图4 抗凋亡的 Bcl-2 家族蛋白在 UMI-77 处理细胞不同时间后蛋白的表达情况
1:0 h;2:6 h;3:12 h;4:24 h;与 0 h 比较: * $P < 0.05$

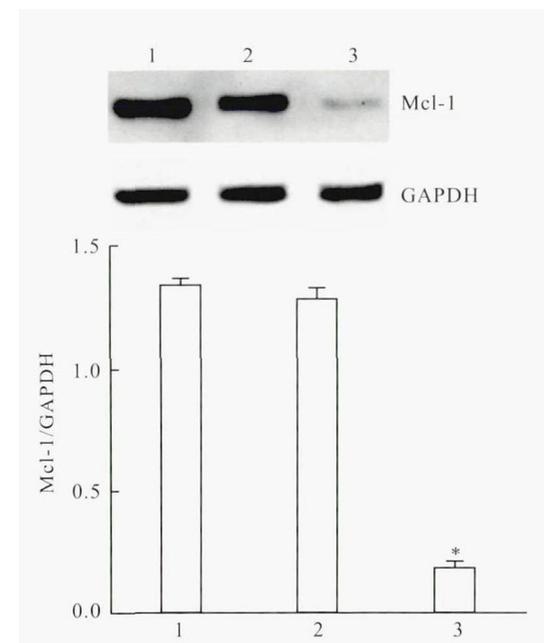


图5 Western blot 法检测转染 Mcl-1 siRNA 的基因沉默效果
1:未转染;2:转染 NC siRNA;3:转染 Mcl-1 siRNA;与未转染比较: * $P < 0.05$

胃癌细胞的生物学功能密切相关^[6-7],而且抑制 Mcl-1 表达能有效诱导肿瘤细胞凋亡^[8]。Mcl-1 在结构和功能上与 Bcl-2、Bcl-X_l 等抗凋亡成员相似,但在凋亡细胞中的表达水平存在差异,如在多种肿

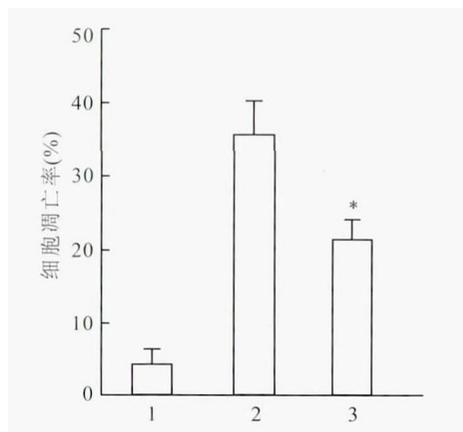


图6 UMI-77 对沉默 Mcl-1 的 MGC-803 细胞凋亡的影响
1:未转染;2:未转染 + UMI-77 15 μmol/L;3:Mcl-1 siRNA + UMI-77 15 μmol/L;与未转染 + UMI-77 15 μmol/L 比较: * $P < 0.05$

瘤细胞中伴随凋亡的加重,Mcl-1 表达下调^[8-10];采用 RNA 干扰技术下调 Mcl-1 基因表达后可致使肿瘤细胞凋亡增加^[9-10]。这些研究表明 Mcl-1 在肿瘤细胞凋亡调控中起重要作用,提示 Mcl-1 可能是肿瘤治疗的一个重要靶点。

近年来,针对抗凋亡蛋白的抑制剂不断涌现,其中最重要的是 BH3 类似物,都是一些类似 BH3-only 蛋白的小分子,如 ABT-263^[11]、AT-101^[12]、ABT-737 等,通过结合到 Bcl-2 家族抗凋亡(促生存)成员上发挥抑制作用。这些小分子抑制剂对细胞的渗透性好,相对于传统的细胞毒性药物更容易被细胞吸收^[13],在抑制蛋白作用的同时发挥抗肿瘤作用。目前研究的最为清楚的是 ABT-737,其以高亲和力和与 Bcl-2、Bcl-X_l 和 Bcl-w 结合,抑制这些蛋白的功能,并释放 Bax 和 Bak,通过内源性途径激发细胞凋亡^[2]。ABT-737 在多种肿瘤中单用或者与其他化疗药物联用时有非常好的效果。但是,高表达 Mcl-1 的细胞却对 ABT-737 抵抗^[14],如果能下调、去稳定或者灭活 Mcl-1 则可以增加该细胞对 ABT-737 的敏感性,提示 Mcl-1 可能是一个较 Bcl-2、Bcl-X_l 更为重要的作用靶点。UMI-77 除了有上述小分子抑制的特点以外,更表现出对 Mcl-1 的高选择性和高亲和性,而且 UMI-77 作用于胰腺癌可以抑制细胞增殖诱导细胞凋亡,其抑制作用与 Mcl-1 高表达有关^[3]。

本实验采用不同浓度 UMI-77 处理 MGC-803 细胞显示细胞对 UMI-77 较为敏感,浓度在 10 μmol/L 以上时 24 h 内有一半以上的细胞死亡,且大多数死亡的细胞表现为 Annexin V (+)/PI(-),即凋亡细

胞的特征性改变。在该凋亡过程中亦检测出线粒体膜电位降低,说明线粒体可能参与其中。此外 Caspase-9、Caspase-3 活化和 PARP 裂解,也表明 UMI-77 诱导的是 Caspase 依赖性的内源性凋亡。本实验显示 Bcl-2 家族抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-X_L 在 UMI-77 处理前后并没有发生改变,而 Mcl-1 则在药物处理 12 h 起即显著下调,这说明 Mcl-1 在 UMI-77 诱导的细胞凋亡中起重要作用。为进一步证实 Mcl-1 在 UMI-77 诱导细胞凋亡中的作用,采用 Mcl-1 siRNA 转染方法沉默 Mcl-1 基因,在转染后给予 UMI-77 处理,细胞凋亡率降低,进一步说明 Mcl-1 在 UMI-77 诱导 MGC-803 细胞凋亡中起重要作用, Mcl-1 基因沉默后 UMI-77 没有可结合作用的靶点而丧失了其诱导凋亡的功能。

综上所述,本实验显示 Mcl-1 的小分子选择性抑制剂 UMI-77 可诱导 MGC-803 细胞发生凋亡,该凋亡是通过线粒体介导的内源性凋亡途径,而且 UMI-77 诱导的细胞凋亡可能部分是通过下调 Mcl-1 表达实现。Mcl-1 蛋白小分子抑制剂具有广泛的研究前景,对其作用机制进行深入研究并设计出高特异性、高亲和力的小分子抑制剂将会为抗肿瘤治疗提供更多选择。

参考文献

- [1] Anilkumar U, Prehn J H. Anti-apoptotic Bcl-2 family proteins in acute neural injury[J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 281-6.
- [2] Kiprianova I, Remy J, Milosch N, et al. Sorafenib sensitizes glioma cells to the BH3 mimetic ABT-737 by targeting Mcl-1 in a STAT3-dependent manner [J]. *Neoplasia*, 2015, 17(7):564-73.
- [3] Abulwerdi F, Liao C, Liu M, et al. A novel small-molecule inhibitor of mcl-1 blocks pancreatic cancer growth *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(3): 565-75.
- [4] Quinn B A, Dash R, Azab B, et al. Targeting Mcl-1 for the therapy of cancer [J]. *Expert OpinInvestig Drugs*, 2011, 20(10): 1397-411.
- [5] Percivalle R M, Opferman J T. Delving deeper: Mcl-1's contributions to normal and cancer biology[J]. *Trends Cell Biol*, 2013, 23(1): 22-9.
- [6] Likui W, Qun L, Wanqing Z, et al. Prognostic role of myeloid cell leukemia-1 protein (Mcl-1) expression in human gastric cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2009, 100(5): 396-400.
- [7] Saito Y, Suzuki H, Imaeda H, et al. The tumor suppressor microRNA-29c is downregulated and restored by celecoxib in human gastric cancer cells [J]. *Int J Cancer Suppl*, 2013, 132(8): 1751-60.
- [8] 吴亚欧, 张林杰, 张旭东, 等. 高表达 Mcl-1 对衣霉素诱导胃腺癌细胞凋亡的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2010, 45(1): 20-3.
- [9] Sieghart W, Losert D, Strommer S, et al. Mcl-1 overexpression in hepatocellular carcinoma: a potential target for antisense therapy [J]. *J Hepatol*, 2006, 44(1): 151-7.
- [10] Guoan X, Hanning W, Kaiyun C, et al. Adenovirus-mediated siRNA targeting Mcl-1 gene increases radiosensitivity of pancreatic carcinoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Surgery*, 2010, 147(4): 553-61.
- [11] Gandhi L, Camidge D R, Ribeiro de Oliveira M, et al. Phase I study of Navitoclax (ABT-263), a novel Bcl-2 family inhibitor, in patients with small-cell lung cancer and other solid tumors [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(7): 909-16.
- [12] Baggstrom M Q, Qi Y, Koczywas M, et al. A phase II study of AT-101 (Gossypol) in chemotherapy-sensitive recurrent extensive-stage small cell lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2011, 6(10): 1757-60.
- [13] Youle R J, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(1): 47-59.
- [14] Zhou H, Chen J, Meagher J L, et al. Design of Bcl-2 and Bcl-X_L inhibitors with subnanomolar binding affinities based upon a new scaffold [J]. *J Med Chem*, 2012, 55(12):4664-82.

Mechanism of apoptosis induced by Mcl-1 inhibitor UMI-77 on gastric cancer MGC-803 cells

Zhu Xueping, Wu Ping, Zhang Linjie

(Dept of Immunology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the mechanism of apoptosis induced by UMI-77, a novel selective inhibitor of Mcl-1, in gastric cancer MGC-803 cells. **Methods** MGC-803 cells were treated with UMI-77 in different concentrations for 24 h, apoptotic rates were determined by Annexin V/PI method using flow cytometry. Mitochondrial membrane potential was determined by JC-1 staining on a flow cytometer. The activation of Caspase-9, Caspase-3 and cleavage of PARP were measured by Western blot analysis. The protein level of Bcl-2, Bcl-X_L and Mcl-1 was monitored by Western blot as well. Chemically synthesized Mcl-1 siRNA was transfected into MGC-803 cells using

Tumstatin 转基因巨核细胞 在 NOD/SCID 鼠体内产生抗新生血管作用血小板

任荟蓉¹, 罗以勤¹, 李娟², 周明², 赵亮¹, 姚丽娟¹

摘要 目的 了解 tumstatin 转基因巨核细胞在非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷(NOD/SCID)鼠体内生成血小板情况及其抗新生血管作用。方法 制备的 tumstatin 转基因巨核细胞注入 NOD/SCID 鼠体内,定期取血,通过流式细胞仪分析转基因血小板产生情况;激光共聚焦法检测血小板的 tumstatin 表达;内皮细胞管状结构形成试验检测血小板的抗血管生成作用;血小板聚集试验检测转基因血小板的聚集功能。结果 tumstatin 转基因巨核细胞输注 NOD/SCID 鼠后的第 3 天,外周血可检测到人血小板;血小板表达 tumstatin;这种转基因血小板可显著抑制内皮细胞管状结构形成并保持正常的聚集功能。结论 tumstatin 转基因巨核细胞可在 NOD/SCID 鼠体内产生有抑制血管形成且保持正常聚集功能的小血小板,为进一步抗肿瘤研究奠定基础。

关键词 tumstatin;巨核细胞;血小板;NOD/SCID 鼠

中图分类号 R 7336;R 331.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)04-0511-05

肿瘤放化疗引起患者血小板减少症,在临床上常预防性或治疗性地输注血小板以提高血小板水

平,然而,近些年的研究^[1-2]表明血小板有促进肿瘤新生血管形成作用,进而促进肿瘤的生长和转移,影响患者预后。tumstatin 是近些年发现的一种内源性血管生成抑制因子,其通过功能性受体特异性地诱导血管内皮细胞凋亡、抑制血管内皮细胞增殖,从而抑制肿瘤的生长^[3]。携带 tumstatin 基因的慢病毒转导 CD34⁺ 细胞经体外扩增培养后生成有抗血管生成作用的巨核细胞/血小板^[4],该实验采用这种转基因巨核细胞输注非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷(non-obese diabetic/server combined immune-deficiency, NOD/SCID)小鼠,观察其在体内生成血小板的状况及其相关功能,设想这种血小板有可能改变放化疗过程中输注常规血小板而引起的促进肿瘤血管生长的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 NOD/SCID 鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司;NK 细胞抑制剂 anti-asialo GM1 购自日本和光纯药株式会社;小鼠抗人 CD41-FITC 购自美国 eBioscience 公司;兔抗人 tumstatin 蛋白抗体和羊抗人 VWF 蛋白抗体购自美国 Gibco 公司;FITC 标记的抗兔二抗和 PE 标记的抗羊二抗购自英国 Abcam 公司;人静脉内皮细胞购自上海吉凯公司;tumstatin 转基因巨核细胞由安徽医科大学附属省立医院临床检验中心制备。

2016-01-08 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:11040606M209);安徽省教育厅自然科学基金项目(编号:KJ2011A163)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院¹ 检验科、² 输血科,合肥 230001

作者简介:任荟蓉,女,硕士研究生;

罗以勤,男,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: luoyiqin2003@163.com

Lipofectamine 2000 Reagent. The efficacy of gene silencing was confirmed by Western blot analysis, and apoptotic rates before and after transfection was measured by flow cytometry using Annexin V/PI staining. **Results** UMI-77 was effective in induction of apoptosis in gastric cancer MGC-803 cells, apoptotic rates were increased in a dose-dependent manner. Mitochondrial membrane potential was collapsed after UMI-77 treatment. Activation of Caspase-9, Caspase-3 and cleavage of PARP occurred at 24 h ($P < 0.05$). The expression level of Bcl-2 and Bcl-X_L were not altered after exposure to UMI-77, while Mcl-1 was down-regulated after 12 h ($P < 0.05$). Transfection with Mcl-1 siRNA successfully decreased the expression level of Mcl-1 in MGC-803 cells ($P < 0.05$) and blocked apoptosis induced by UMI-77 ($P < 0.05$). **Conclusion** UMI-77 induces apoptosis through activation of the intrinsic pathway in gastric cancer MGC-803 cells, and knocking down Mcl-1 expression abrogates apoptosis by UMI-77.

Key words gastric cancer; UMI-77; Mcl-1; small molecule inhibitor; apoptosis