

网络出版时间: 2015-12-30 14:38 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20151230.1438.022.html>

Mcl-1 siRNA 对 TRAIL 诱导胃癌细胞凋亡的影响

金 玮¹ 吴 萍²

摘要 目的 探讨转染髓样细胞白血病(Mcl-1) siRNA 特异性沉默 Mcl-1 基因对肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TRAIL) 诱导胃癌细胞 HGC-27 凋亡的影响。方法 采用碘化丙啶(PI) 染色法流式细胞术分析 TRAIL 单独作用的细胞凋亡率以及广谱 caspase 抑制剂 z-VAD-fmk 对细胞凋亡的抑制作用; Western blot 法分析 TRAIL 处理前后半胱天冬酶-3(caspase-3) 和聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1(PARP-1) 的活化以及抗凋亡的 Bcl-2、Bcl-X_L 及 Mcl-1 的蛋白表达情况; 采用 Lipofectamine 2000 转染 Mcl-1 siRNA 入 HGC-27 细胞, Western blot 法验证基因沉默效果, 流式细胞术分析转染后细胞凋亡率的变化。结果 HGC-27 细胞对 TRAIL 不敏感, 48 h 的凋亡率仅为 (20.65 ± 3.23)%, z-VAD-fmk 能几乎完全阻止 TRAIL 诱导的凋亡; TRAIL 作用晚期 caspase-3 活化、PARP-1 裂解, Bcl-2、Bcl-X_L 及 Mcl-1 在 TRAIL 处理前后没有明显的变化; Mcl-1 siRNA 转染后能显著降低细胞中 Mcl-1 的蛋白表达水平, 且细胞转染 Mcl-1 siRNA 后再加入 TRAIL 处理, 细胞凋亡率明显增加。结论 Mcl-1 的高表达可能与 HGC-27 细胞对 TRAIL 抵抗有关, Mcl-1 siRNA 沉默 Mcl-1 基因能增加 HGC-27 细胞对 TRAIL 的敏感性。

关键词 胃癌; 细胞凋亡; 小干扰 RNA; Mcl-1

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)01-0047-05

肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) 是肿瘤坏死因子超家族的成员, 具有选择性杀伤肿瘤细胞的特点, 相比一般的化疗药物有其独特的优势。TRAIL 既可以通过死亡受体途径诱导细胞凋亡, 又可以通过线粒体途径使凋亡信号得以放大。Bcl-2 家族是调控线粒体途径的关键分子, 其 25 个成员根据结构及功能不同, 分为促凋亡和抗凋亡蛋白, 两种力量之间的平衡决定了细胞是存活还是死亡。髓样细胞白血病-1(myeloid cell leukemia-1,

Mcl-1) 属于抗凋亡蛋白, 最初在 ML-1 人髓样白血病细胞系的分化中发现^[1]。Mcl-1 在多种肿瘤组织及细胞系中高表达, 通过反义寡核苷酸或 RNA 干扰技术抑制 Mcl-1 的表达可以使肿瘤细胞对化疗药物变敏感^[2-3]。该研究选择对 TRAIL 不敏感的胃癌细胞 HGC-27, 采用 siRNA 技术特异性沉默 Mcl-1 基因, 了解其对 TRAIL 诱导的细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂 未分化的人胃癌细胞 HGC-27(中国科学院上海细胞库); RPMI 1640 培养基及 Opti-MEM 培养基(美国 Gibco 公司); 胎牛血清(美国 Hyclone 公司); 重组人可溶性 TRAIL(美国 Immunex 公司); 碘化丙啶(PI)(美国 Sigma-Aldrich 公司); 广谱的 caspase 抑制剂 z-VAD-fmk(美国 Calbiochem 公司); 人 Mcl-1 siRNA 序列由上海吉玛公司设计并合成; Lipofectamine 2000 Reagent(美国 Invitrogen 公司); 小鼠抗人 Bcl-2、半胱天冬酶-3(cysteine-specific proteinase-3, caspase-3)、聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1(poly[ADP-ribose] polymerase-1, PARP-1) 单克隆抗体和兔抗人 Mcl-1 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司); 兔抗人 Bcl-X_L 多克隆抗体(美国 Cell Signaling 公司); 小鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 及山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HGC-27 细胞用含 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中常规培养。

1.2.2 流式细胞术检测细胞凋亡 将 HGC-27 细胞接种于 24 孔板中, 每孔 1 × 10⁵ 个细胞, 次日细胞融合达 80% 以上, 给予不同处理, 每组设 3 个复孔。处理结束后分别收集上清液至流式管中, 1 200 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 孔中贴壁细胞加 750 μl PI 溶液(含 50 mg/L PI、0.1% 枸橼酸钠及 0.1% Triton X-100) 于 37 °C 避光作用 10 ~ 20 min, 待孔内细胞完全消化后也收集至对应的流式管中, 混匀, 置

2015-10-20 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: ¹安徽医科大学附属巢湖医院耳鼻喉科, 巢湖 238000

²安徽医科大学免疫学教研室, 合肥 230032

作者简介: 金 玮, 男, 医师;

吴 萍, 女, 讲师, 责任作者, E-mail: wuping@ahmu.edu.cn

于 4 °C 避光染色过夜,次日上流式细胞仪(BD FACSVerse)检测细胞凋亡,FCS Express 4 软件分析亚二倍体峰(sub-G1)所占的百分率即为细胞凋亡率。

1.2.3 Western blot 法检测蛋白表达 分别收集不同处理的细胞,加入 100 μl RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min,然后 4 °C、14 000 r/min 离心 30 min,上清液即总蛋白;采用 BCA 法进行蛋白定量,每个样品取 20 μg 进行 SDS-PAGE;将分离开的蛋白从凝胶转移至硝酸纤维素膜上,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,分别加入不同的一抗(caspase-3、PARP-1、Bcl-2、Bcl-X_L或 Mcl-1 抗体),以 GAPDH 为内参 4 °C 孵育过夜;次日用 TBST 洗 3 次,每次 10 min,再加入不同的二抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 或山羊抗兔 IgG)室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次,每次 10 min;最后用 ECL 法显色,天能全自动凝胶成像系统采集图像。

1.2.4 siRNA 转染 Mcl-1 siRNA 正义链:5'-GUGCCUUUGUGGCUAAACA-3',反义链:5'-UGUUUAGCCACAAAGGCAC-3'。实验分为未转染组(对照组)、转染阴性对照(NC siRNA 组)和转染 Mcl-1 siRNA 组,每组设 3 个复孔。转染在 6 孔板及 24 孔板中进行,转染前 1 d 接种细胞,使得转染时细胞融合达 30%。转染前 1 h 将孔中培养基更换为无血清的 Opti-MEM 培养基(6 孔板每孔 800 μl,24 孔板每孔 400 μl)。6 孔板转染分别用 100 μl Opti-MEM 稀释 100 pmol siRNA 和 5 μl Lipofectamine 2000 Reagent,二者混合后室温放置 20 min,最后将 200 μl 复合物滴入细胞中,4 h 后换液,48 h 后提取细胞总蛋白,采用 Western blot 法判断基因沉默效果。24 孔板转染则分别用 50 μl Opti-MEM 稀释 20 pmol siRNA 和 1 μl Lipofectamine 2000 Reagent,二者混合后室温放置 20 min,最后将 100 μl 复合物滴入细胞中,4 h 后换液,待细胞生长至约 80% 融合时,加入 200 μg/L TRAIL 继续处理 48 h,流式细胞术检测细胞凋亡率。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 z-VAD-fmk 能抑制 TRAIL 诱导的 HGC-27 细胞凋亡 流式细胞术检测结果显示,HGC-27 细胞对 TRAIL 不敏感,200 μg/L TRAIL 处理 48 h 的细胞凋亡率仅为 (20.65 ± 3.23)%。z-VAD-fmk 对

细胞几乎无毒性,而用 z-VAD-fmk 提前 1 h 预处理,再加入 TRAIL 继续作用 48 h 时,细胞凋亡几乎被完全阻止,凋亡率仅为 (6.97 ± 2.12)% (图 1),与单用 TRAIL 组比较,差异有统计学意义 (*t* = 5.012, *P* < 0.05),说明 TRAIL 诱导 HGC-27 细胞发生的是 caspase 依赖性的细胞凋亡。

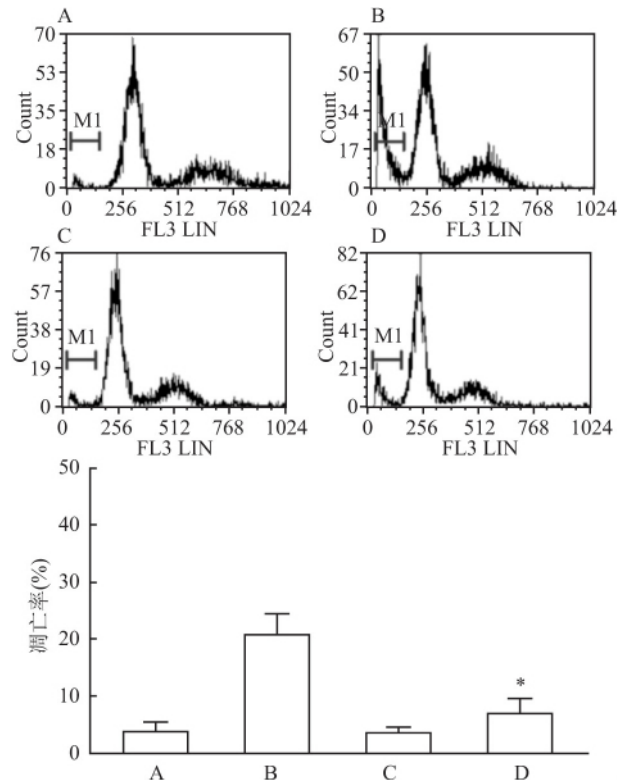


图 1 z-VAD-fmk 能阻止 TRAIL 诱导的 HGC-27 细胞凋亡

A: 对照组; B: TRAIL(200 μg/L) 处理 48 h; C: z-VAD-fmk(20 μmol/L) 处理 48 h; D: z-VAD-fmk(20 μmol/L) 先处理 1 h,再加入 TRAIL(200 μg/L) 继续处理 48 h;与 TRAIL(200 μg/L) 处理 48 h 比较: * *P* < 0.05

2.2 TRAIL 处理前后的 caspase 活化及抗凋亡蛋白的表达情况 caspase-3 位于凋亡通路的末端,其激活可以切割多种细胞核蛋白及细胞骨架蛋白,引起凋亡的各种改变,其中最主要的底物是 PARP-1。在 TRAIL 作用晚期 cleaved-caspase-3 和 cleaved-PARP-1 才出现,说明 caspase 活化很有限;而抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-X_L 和 Mcl-1 在 TRAIL 作用前后都没有明显的改变(图 2)。

2.3 转染 Mcl-1 siRNA 能有效地降低细胞内 Mcl-1 蛋白的表达水平 采用 Lipofectamine 2000 将 Mcl-1 siRNA 转染进 HGC-27 细胞,Western blot 法从蛋白水平验证转染效果,结果显示,与对照组及 NC siRNA 组比较,Mcl-1 siRNA 组几乎检测不到细胞中

Mcl-1 的蛋白(图3),说明基因沉默效果很好。

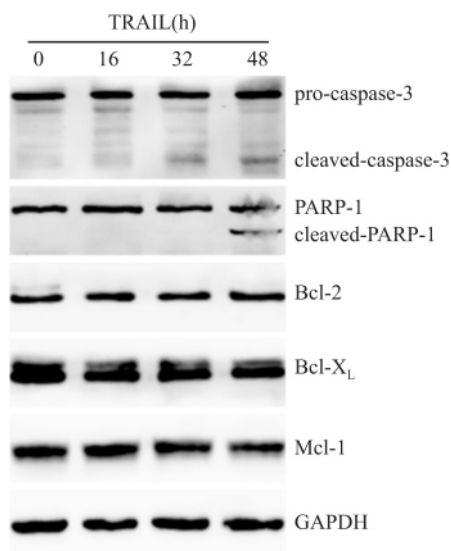


图2 caspase-3、PARP-1、Bcl-2、Bcl-X_L、Mcl-1 在 TRAIL 处理前后的表达

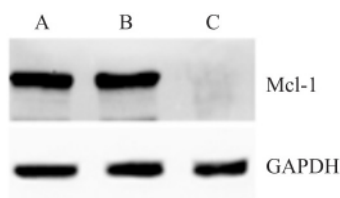


图3 Mcl-1 siRNA 敲除效果

A: 对照组; B: NC siRNA 组; C: Mcl-1 siRNA 组

2.4 转染 Mcl-1 siRNA 能增加 HGC-27 细胞对 TRAIL 的敏感性 在 24 孔板中转染后,待细胞生长至约 80% 融合,加入 TRAIL 继续处理,流式细胞术检测显示转染 Mcl-1 siRNA 可以明显增加细胞凋亡率,48 h 的凋亡率为 $(54.78 \pm 7.56)\%$,与 NC siRNA 组 $(20.65 \pm 3.95)\%$ 比较,差异有统计学意义 ($t=6.927, P<0.05$)。

3 讨论

胃癌是世界范围内常见的恶性肿瘤,尽管近年来手术治疗和化疗取得了很大的进展,患者的预后依然很差。TRAIL 的优势在于其能选择性杀伤肿瘤细胞,而不损伤正常细胞,因而被寄托了很大的希望,但是仍有许多肿瘤细胞对之不敏感,成为其应用于临床的重大障碍。在 TRAIL 诱导的细胞凋亡通路中,死亡受体途径和线粒体途径存在相互交叉,因而这两条途径中的任何一个环节都可能使得细胞对 TRAIL 发生抵抗,如细胞膜表面诱骗受体 TRAIL-R3 和 TRAIL-R4 的表达、cFLIP 表达水平的升高、凋亡

抑制蛋白家族的高表达或者抗凋亡的 Bcl-2 家族蛋白的高表达等。早期研究^[4]显示许多细胞是因为高表达 Bcl-2 和 Bcl-X_L 才导致其对 TRAIL 抵抗,而近几年 Mcl-1 的抗凋亡作用越来越引起人们的注意。

Mcl-1 的结构与 Bcl-2、Bcl-X_L、Bcl-w 等有很大的同源性,但也有其自身的特点。Mcl-1 的羧基端有一个疏水的跨膜结构域和胞质区的 BH2、BH1 和 BH3 结构域,其氨基端比其他抗凋亡蛋白更长,且含有两个 PEST(脯氨酸 P/谷氨酸 E/丝氨酸 S/苏氨酸 T) 基序,这可能是其半衰期短的原因,且这样的结构也是 Mcl-1 更新、定位、磷酸化的结构基础^[5]。Mcl-1 主要定位在线粒体外膜上,阻止细胞色素 c 从线粒体释放入胞质。Mcl-1 还能以很高的亲和力与 Bim、Bid 及 Puma 结合,但是其对 Noxa 和 Bak 的选择性更高。Mcl-1 可以通过分离 Bak,阻止 Bak 寡聚化,达到促生存的目的^[6]。

Mcl-1 基因在人类肿瘤中是高度扩增的基因之一^[7],在肿瘤发生中具有重要的作用。Mcl-1 在多种肿瘤中高表达^[8,9],这可能是肿瘤细胞用来逃逸细胞死亡或者对化疗药物抵抗的机制^[10]。目前已知去泛素酶 USP9X 能结合到 Mcl-1 上,去除容易被蛋白酶体降解的赖氨酸 48-连接的多聚泛素链,从而稳定 Mcl-1 的结构^[11],促进肿瘤细胞的存活。Mcl-1 蛋白在胃癌组织中的表达明显高于正常胃黏膜组织,并且与胃癌的 T 分期、临床分期、转移、血管浸润以及 5 年生存率密切相关,同样在胃癌细胞株中的表达水平明显高于正常胃黏膜细胞^[12]。本研究中,HGC-27 细胞对 TRAIL 不敏感,48 h 的凋亡率低于 30%。细胞内抗凋亡的 Bcl-2、Bcl-X_L 和 Mcl-1 都呈高表达,且 TRAIL 处理之后没有明显改变,这可能是导致 HGC-27 细胞对 TRAIL 抵抗的原因。

研究^[13-14]显示下调 Mcl-1 可以增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,目前下调 Mcl-1 的药物主要有细胞周期蛋白依赖的激酶抑制剂和去泛素酶抑制剂。而反义寡核苷酸(ASO)和 RNA 干扰(RNAi)是体外实验中常用的下调 Mcl-1 基因表达的方法。RNAi 能把双链 siRNA 引入细胞,通过特异性降解相同序列的 mRNA,从而阻断相应基因表达。和 ASO 相比,其能抵御核酸酶降解,但 siRNA 有瞬时性,在体内停留的时间较短。本研究用脂质体法将 Mcl-1 特异性 siRNA 转入 HGC-27 细胞,48 h 后在蛋白水平检测基因沉默效果,Mcl-1 蛋白表达明显降低,siRNA 序列有效。随即观察转染后对细胞凋亡

的影响,结果 Mcl-1 siRNA 能显著增加 TRAIL 诱导的 HGC-27 细胞凋亡率,这进一步说明了 Mcl-1 在细胞内的高表达是导致细胞对 TRAIL 耐受的因素。

综上所述,本研究采用 RNA 干扰技术特异性沉默 Mcl-1 基因,从而下调胃癌细胞 HGC-27 内 Mcl-1 的表达,且下调 Mcl-1 后 HGC-27 细胞对 TRAIL 的敏感性增强。目前通过高通量筛选的办法鉴定出多种 Mcl-1 的小分子抑制剂,其中选择性抑制剂 UMI-77 可以通过与 Mcl-1 分子的 BH3 结合沟结合在前列腺癌细胞系及小鼠异种移植模型中发挥抗肿瘤作用^[15]。Mcl-1 目前作为肿瘤治疗的新靶点受到了肿瘤研究领域的关注,通过各种办法抑制 Mcl-1 可能帮助克服肿瘤细胞化疗药物的抵抗。

参考文献

- [1] Thomas L W, Lam C, Edwards S W. Mcl-1; the molecular regulation of protein function [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(14): 2981-9.
- [2] Choi E S, Jung J Y, Lee J S, et al. Myeloid cell leukemia-1 is a key molecular target for mithramycin A-induced apoptosis in androgen-independent prostate cancer cells and a tumor xenograft animal model [J]. *Cancer Lett*, 2013, 328(1): 65-72.
- [3] Skoda C, Erovic B M, Wachek V, et al. Down-regulation of Mcl-1 with antisense technology alters the effect of various cytotoxic agents used in treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *Oncol Rep*, 2008, 19(6): 1499-503.
- [4] Taniguchi H, Horinaka M, Yoshida T, et al. Targeting the glyoxalase pathway enhances TRAIL efficacy in cancer cells by down-regulating the expression of antiapoptotic molecules [J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(10): 2294-300.
- [5] Belmar J, Fesik S W. Small molecule Mcl-1 inhibitors for the treatment of cancer [J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 145: 76-84.
- [6] Quinn B A, Dash R, Azab B, et al. Targeting Mcl-1 for the therapy of cancer [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2011, 20(10): 1397-411.
- [7] Beroukhi R, Mermel C H, Porter D, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers [J]. *Nature*, 2010, 463(7283): 899-905.
- [8] Wei G, Margolin A A, Haery L, et al. Chemical genomics identifies small-molecule MCL1 repressors and BCL-xL as a predictor of MCL1 dependency [J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(4): 547-62.
- [9] 吴亚欧,张林杰,张旭东,等. 高表达 Mcl-1 对衣霉素诱导胃癌细胞凋亡的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2010, 45(1): 20-3.
- [10] Wertz I E, Kusam S, Lam C, et al. Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7 [J]. *Nature*, 2011, 471(7336): 110-4.
- [11] Schwickart M, Huang X, Lill J R, et al. Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival [J]. *Nature*, 2010, 463(7277): 103-7.
- [12] 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.
- [13] Mitchell C, Yacoub A, Hossein H, et al. Inhibition of MCL-1 in breast cancer cells promotes cell death *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 10(9): 903-17.
- [14] Karami H, Baradaran B, Esfehiani A, et al. Down-regulation of Mcl-1 by small interference RNA induces apoptosis and sensitizes HL-60 leukemia cells to etoposide [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(2): 629-35.
- [15] 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.

Effect of Mcl-1 siRNA on TRAIL-induced apoptosis in gastric cancer cells

Jin Wei¹, Wu Ping²

(¹Dept of Otolaryngology, Chaohu Hospital of Anhui Medical University, Chaohu 238000;

²Dept of Immunology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the effect of Mcl-1 small interference RNA (siRNA) on tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in gastric cancer HGC-27 cells. **Methods** The apoptotic rates of cells treated with TRAIL and pan-caspase inhibitor (*z*-VAD-fmk) alone or combination were measured by propidium iodide (PI) method using flow cytometry. The activation of caspase-3, cleavage of PARP-1, as well as the protein level of anti-apoptotic Bcl-2 proteins Bcl-2, Bcl-X_L and Mcl-1 before and after TRAIL treatment were monitored by Western blot analysis. Transfection of Mcl-1 siRNA was performed using Lipofectamine 2000 reagent. The efficiency of gene silencing was quantified by Western blot and the effect of Mcl-1 siRNA on TRAIL-induced apoptosis was measured using PI method. **Results** HGC-27 cells were resistant to TRAIL-induced apoptosis, and *z*-VAD-fmk pretreatment could block apoptosis nearly completely. Activation of caspase-3 and cleavage of PARP-1

生长分化因子-9下调对小鼠卵巢颗粒细胞增殖能力的影响

马会明 张永芳 王蒙蒙 李昀伽 蒲静 于佳 王燕蓉 裴秀英 徐仙

摘要 目的 探讨生长分化因子-9(GDF9)对小鼠卵巢颗粒细胞增殖能力基因周期蛋白A(cyclin A)、周期蛋白D1(cyclin D1)和周期蛋白依赖性激酶抑制因子27(p27kip1)表达的影响。方法 利用CCK-8检测法检测细胞的增殖能力;使用流式细胞术、Real-time PCR和Western blot法验证GDF9 siRNA的干扰效率;采用Real-time PCR和Western blot法检测细胞增殖cyclin A、cyclin D1和p27kip1 mRNA和蛋白表达情况。结果 GDF9 siRNA显著抑制颗粒细胞增殖活力,其中72 h抑制最明显($P < 0.05$);Real-time PCR和Western blot法检测结果显示GDF9 siRNA显著下调小鼠卵巢颗粒细胞中GDF9 mRNA及蛋白的表达($P < 0.01$);Real-time PCR法检测结果显示细胞cyclin A、cyclin D1 mRNA表达降低,p27kip1 mRNA表达增强;Western blot法结果显示,GDF9 siRNA可促进细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂p27kip1的表达,同时下调G2/M期调控蛋白cyclin A、cyclin D1的表达。结论 靶向抑制小鼠卵巢颗粒细胞中GDF9的表达,下调细胞cyclin A、cyclin D1的表达,上调P27kip1的表达,显著抑制细胞的增殖。

关键词 GDF9 siRNA; 细胞增殖; 细胞周期; 卵巢颗粒细胞; 小鼠

中图分类号 R 711.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)01-0051-05

女性卵巢储备功能减退原因可能与颗粒细胞一

2015-09-30 接收

基金项目: 宁夏自然科学基金(编号: NZ11128)

作者单位: 宁夏医科大学生殖力保持教育部重点实验室、宁夏回族自治区生殖与遗传重点实验室、人体解剖与组织胚胎学系,宁夏医科大学总医院生殖医学中心,银川 750004

作者简介: 马会明,男,讲师,博士;

裴秀英,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: peixiuying@163.com;

徐仙,男,主任医师,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: xux36@163.com

系列重要的信号分子和周期蛋白调控有关^[1-2],细胞周期蛋白和细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDK)抑制剂在调控细胞周期转换过程中具有重要作用^[3],其中细胞周期D1(cyclin D1)和细胞周期A(cyclin A)的首要功能主要是促进细胞增殖^[4]。CDK抑制蛋白p27(p27kip1)是一种CDK抑制剂,通过抑制cyclin D/CDK4、cyclinE/CDK2的活性,从而抑制细胞增殖活性^[5-6],使细胞失去分裂能力。在卵母细胞的成熟过程中GDF9作为一个旁分泌因子参与调节卵丘颗粒细胞扩展的过程^[7]。该研究通过GDF9基因沉默对小鼠颗粒细胞中cyclin D1、cyclin A和p27kip1表达的检测,旨在探讨小鼠颗粒细胞细胞周期调控蛋白在细胞增殖分化机制中的作用,为卵母细胞发育机制提供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 逆转录试剂盒和荧光定量PCR(Real-time PCR, RT-PCR)试剂盒均购自日本TaKaRa公司;实时荧光定量PCR(Real-time PCR)试剂盒、TRIzol、DMEM/F12(1:1)、I型胶原酶、胎牛血清均购自美国Life Tech公司;兔来源cyclin A、cyclin D1及p27kip1单克隆抗体购自英国Abcam公司;β-actin兔单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司;羊抗兔二抗及ECL化学发光试剂盒购自中国博士德生物公司;蛋白提取试剂盒购自南京凯基生物试剂公司;重组pcDNA 6.2-GDF9 siRNA(简称GDF9 siRNA)质粒、siRNA转染专用试剂HiPerFect购自美国Qiagen公司;680型酶标仪购自美国Bio-rad仪器公司;FACSCalibur型流式细胞仪购自美国BD公司;普通PCR仪和GelDoc XR System凝胶成像系统

occurred in the late stage of apoptosis. The expression levels of Bcl-2, Bcl-X_L and Mcl-1 were not altered after exposure to TRAIL. Transfection with Mcl-1 siRNA could obviously downregulate the expression level of Mcl-1 in HGC-27 cells and enhanced the sensitivity of cells to TRAIL-induced apoptosis. **Conclusion** Overexpression of Mcl-1 may account for the resistance of HGC-27 cells to TRAIL. Downregulation of Mcl-1 by siRNA can effectively enhance the sensitivity of HGC-27 cells to TRAIL-induced apoptosis.

Key words gastric cancer; apoptosis; siRNA; Mcl-1