

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.29.003
文章编号: 1005-8982 (2017) 29-0011-05

Bcl-2 基因沉默对胃腺癌 SGC-7901 细胞 5-Fu 敏感性的影响 *

丁哲宇, 杜锋, 王继红, 甘晟, 寸英丽

(云南省肿瘤医院 腹部外科, 云南 昆明 650000)

摘要: 目的 探讨 B 淋巴细胞瘤-2 (*Bcl-2*) 基因沉默增强胃腺癌 SGC-7901 细胞对 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 敏感性的价值。**方法** 设立人胃腺癌 SGC-7901 细胞研究组和对照组, 采用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测两组人胃腺癌 SGC-7901 细胞中 *Bcl-2* mRNA 的表达。研究组采用脂质体法转染化学合成的 *Bcl-2* siRNA 序列至人胃腺癌 SGC-7901 细胞, 对照组不进行干预。比较转染前后两组 *Bcl-2* mRNA 的表达水平。两组均添加不同浓度 5-FU, 采用 Annexin V 标记和流式细胞仪检测 48 h 后两组不同浓度 5-FU 细胞株的增殖抑制率和凋亡率。**结果** 两组转染前 *Bcl-2* mRNA 相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与转染前比较, 研究组转染后的 *Bcl-2* mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 研究组转染后的 *Bcl-2* mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 研究组培养 48 h 的细胞增殖抑制率和凋亡率较高 ($P < 0.05$)。**结论** *Bcl-2* 基因沉默可增强胃腺癌 SGC-7901 细胞对 5-FU 的敏感性, 抑制癌细胞的增殖, 并促进癌细胞的凋亡。*Bcl-2* 基因沉默可能是改善胃腺癌 5-FU 疗效的有效方法。

关键词: B 淋巴细胞瘤-2; 基因沉默; 增强; 胃腺癌; SGC-7901 细胞; 5-氟尿嘧啶; 敏感性

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

Impact of *BCL2* gene silencing on 5-Fu sensitivity in gastric adenocarcinoma SGC-7901 cells*

Zhe-yu Ding, Feng Du, Ji-hong Wang, Sheng Gan, Ying-li Cun

(Department of Abdominal Surgery, Yunnan Cancer Hospital, Kunming, Yunnan 650000, China)

Abstract: Objective To explore the value of B cell lymphoma 2 (*BCL2*) gene silencing in enhancing 5-fluorouracil (5-FU) sensitivity in gastric adenocarcinoma SGC-7901 cells. **Methods** Human gastric adenocarcinoma SGC-7901 cells were set up as research group and control group. In the research group, chemically-synthesized *BCL2* siRNA sequence was transfected into gastric adenocarcinoma SGC-7901 cells by liposome method; while the control group had no relative intervention. RT-PCR was applied in detection of *BCL2* mRNA expression in gastric adenocarcinoma SGC-7901 cells of the two groups before and after transfection. Both groups were added with different concentrations of 5-FU and tagged with Annexin V; 48 h after adding 5-FU flow cytometry was applied to detect cell proliferation inhibition rate and apoptosis rate. **Results** Before transfection the relative expression of *BCL2* mRNA had no statistical difference between the two groups ($P > 0.05$). The relative expression of *BCL2* mRNA in the research group decreased after transfection compared to that before transfection and that in the control group ($P < 0.05$). After cell culture for 48 h, the proliferation inhibition and apoptosis rates of the research group were

收稿日期: 2016-10-15

* 基金项目: 昆医联合专项 (No: 2010CD179)

[通信作者] 寸英丽, E-mail: cunying@medmail.com.cn

higher than those of the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** *BCL2* gene silencing can enhance 5-FU sensitivity in gastric adenocarcinoma SGC-7901 cells, inhibit cancer cell proliferation and promote cancer cell apoptosis; therefore, *BCL2* gene silencing may be an effective way to enhance the effect of 5-FU therapy for gastric adenocarcinoma.

Keywords: B cell lymphoma 2; gene silencing; enhance; gastric adenocarcinoma; SGC-7901 cell; 5-fluorouracil; sensitivity

胃癌发病率和病死率较高, 预后差, 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 是其常用药物^[1-3]。然而化疗药物作用有限, 常出现化疗耐药^[4]。从基因水平上逆转化疗抵抗性可取得良好的效果^[5]。而 B 淋巴细胞瘤-2 (B lymphocyte tumor-2, *Bcl-2*) 基因亦是与胃癌密切相关的因子^[6]。因此, 本研究分析 *Bcl-2* 基因沉默对胃腺癌 SGC-7901 细胞的增殖抑制情况和细胞凋亡的影响, 旨在为 *Bcl-2* 基因沉默改善胃癌 5-FU 化疗敏感性提供依据, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃腺癌 SGC-7901 细胞由上海细胞研究所提供。恒温箱 (江苏佳美仪器有限公司), 流式细胞仪 (德国 Partec 公司), 离心管、玻璃瓶、吸管、试管等购自广东东普医疗科技有限公司, RPMI 1640 培养基和胎牛血清 (武汉博士德生物工程有限公司), RNA 提取试剂盒 (德国 Qiagen 公司), cDNA 合成试剂盒 (美国 Promega 公司), 实时定量 PCR 试剂盒和 SYBR Premix EX Taq (日本 TaKaRa 公司), 5-Fu (浙江海正药业公司), MTT (美国 Amersco 公司), 二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) (美国 Amersco 公司), 脂质体转染液 Lipofectamine™ (美国 Invitrogen 公司), 细胞培养箱、细胞培养板购自美国 SHELLAB 公司, 华东电子酶标仪 DG5033A (南京华东电子管厂), *Bcl-2* 多克隆抗体 (武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组 设立人胃腺癌 SGC-7901 细胞研究组和对照组, 每组 3 个培养皿, 分别标记研究组 50 μ g/ml、研究组 100 μ g/ml、研究组 200 μ g/ml、对照组 50 μ g/ml、对照组 100 μ g/ml 及对照组 200 μ g/ml。

1.2.2 细胞培养 培养皿含 10% 新鲜胎牛血清和 RPMI 1640 培养液, 在 37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 饱和

湿度环境的细胞培养箱中培养 24 h。

1.2.3 逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) RT-PCR 检测两组人胃腺癌 SGC-7901 细胞中 *Bcl-2* mRNA 的表达, 收集细胞, 弃上清液后提取总 RNA, 通过 cDNA 试剂盒逆转录合成 cDNA, 其中 *Bcl-2* siRNA 正向引物: 5'-GUACAUCCAUAUAAGCUGdTdT-3', 反向引物: 5'-TdTdCAUGUAGGUAUAUUCGAC-3'。以该 cDNA 为模版扩增 *Bcl-2*, 采用两步法, 95℃ 预变性 15 s, 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 30 s, 共 45 个循环, 采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算 *Bcl-2* mRNA 相对表达量。

1.2.4 合成序列 选用广州 RIBIBIO 公司化学合成的 *Bcl-2* siRNA 序列, *Bcl-2* siRNA 靶序列为 5'-GTACATCCATTATAAGCTG-3'。

1.2.5 *Bcl-2* 基因转染 研究组细胞抽出原细胞液, 添加 RPMI 1640 培养液 80 μ l 和脂质体转染液 Lipofectamine™ 24 μ l, 加入 30 μ l 化学合成的 *Bcl-2* siRNA, 轻轻混匀。采用脂质体法转染化学合成的 *Bcl-2* siRNA 序列至研究组人胃腺癌 SGC-7901 细胞, 培养 48 h。对照组不进行干预, 以 RPMI 1640 培养液 80 μ l 和脂质体转染液 Lipofectamine™ 24 μ l 同期进行培养 48 h。

1.2.6 *Bcl-2* mRNA 的表达 再次行 RT-PCR 检测, 比较转染前后两组 *Bcl-2* mRNA 的表达, 方法同 1.2.3。

1.2.7 细胞增长抑制率的检测 取对数生长期细胞, 以 5 \times 10⁵ 个细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 根据取样培养皿标记相应培养板, 在两组对应标记的培养板中添加 50、100 和 200 μ g/ml 5-FU, 两组另设空白对照组, 培养 48 h 后加入 1 mg/ml MTT 1 ml。继续培养 4 h 后, 加入 0.1 ml DMSO 溶液, 37℃ 孵育 30 min, 在华东电子酶标仪 DG5033A 上自动读数, 获取波长 570 nm 处的光密度 (optical density, OD) 值, 以空白对照组为标准, 计算各组细胞增长抑制率。细胞增长抑制率 = (5-FU 孔 OD 值 - 空白孔 OD 值) / 空白孔

OD 值。

1.2.8 细胞凋亡率的检测 取对数生长期细胞, 以 5×10^5 个细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 根据取样培养皿标记相应培养板, 在两组对应标记的培养板中分别添加 50、100 和 200 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU。培养 48 h 后用 0.25% 胰蛋白酶处理 2 min, 800 r/min 离心 5 min, 收集细胞, PBS 液洗涤 2 次, 加入 10 mg/ml RNase 溶液 150 μl , 培养 30 min 后碘化丙啶 50 ml 染色, 300 目尼龙网过滤后行 Annexin V 标记, 采用流式细胞仪检测细胞周期和凋亡情况。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 *t* 检验或析因设计的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组转染前后 *Bcl-2* mRNA 相对表达量比较

研究组转染前 *Bcl-2* mRNA 相对表达量为与对照组比较, 经两独立样本 *t* 检验, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。研究组转染后 *Bcl-2* mRNA 相对表达量与对照组比较, 经两独立样本 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 研究组低于对照组。见表 1。

表 1 两组转染前后 *Bcl-2* mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	转染前	转染后
研究组	0.872 \pm 0.106	0.113 \pm 0.103
对照组	0.887 \pm 0.105	0.886 \pm 0.108
<i>t</i> 值	0.985	50.749
<i>P</i> 值	0.828	0.000

2.2 两组细胞增殖抑制率及凋亡率比较

研究组 48 h 不同浓度 5-FU 细胞的增殖抑制率和凋亡率比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 11.927$ 和 6.433 , $P = 0.000$ 和 0.016)。对照组 48 h 不同浓度 5-FU 细胞的增殖抑制率和凋亡率比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 12.866$ 和 8.029 , 均 $P = 0.000$)。两组 50、100 和 200 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU 均可取得较好的胃腺癌 SGC-7901 细胞抑制效果, 50

和 100 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU 的抑制效果差异较大, 而 100 和 200 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU 的抑制效果差异不明显, 达 100 $\mu\text{g/ml}$ 后增加 5-FU 浓度对其细胞抑制效果影响不大。见表 2 和图 1 ~ 3。

表 2 两组细胞增殖抑制率及凋亡率比较 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	增殖抑制率	凋亡率
研究组		
50 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU	16.35 \pm 4.55 ¹⁾	48.55 \pm 9.44 ¹⁾
100 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU	25.78 \pm 6.72 ¹⁾²⁾	57.65 \pm 12.18 ¹⁾²⁾
200 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU	26.65 \pm 6.83 ¹⁾²⁾	59.43 \pm 13.65 ¹⁾²⁾
对照组		
50 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU	8.26 \pm 2.26	29.36 \pm 5.44
100 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU	13.22 \pm 4.21 ³⁾	36.36 \pm 7.63 ³⁾
200 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU	15.13 \pm 4.45 ³⁾	37.52 \pm 7.82 ³⁾

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与研究组 50 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU 比较, $P < 0.05$; 3) 与对照组 50 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU 比较, $P < 0.05$

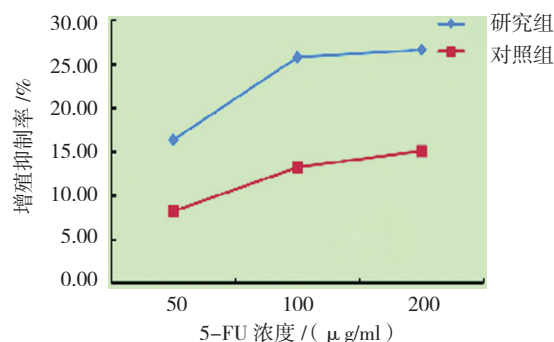


图 1 两组细胞增殖抑制率比较

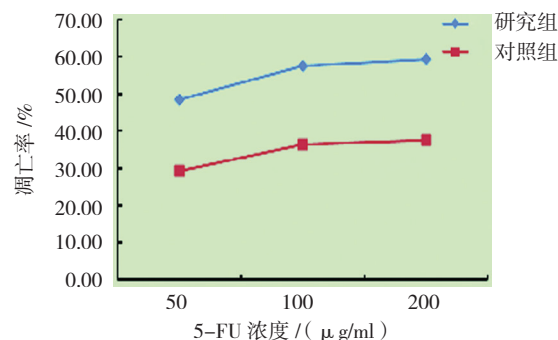
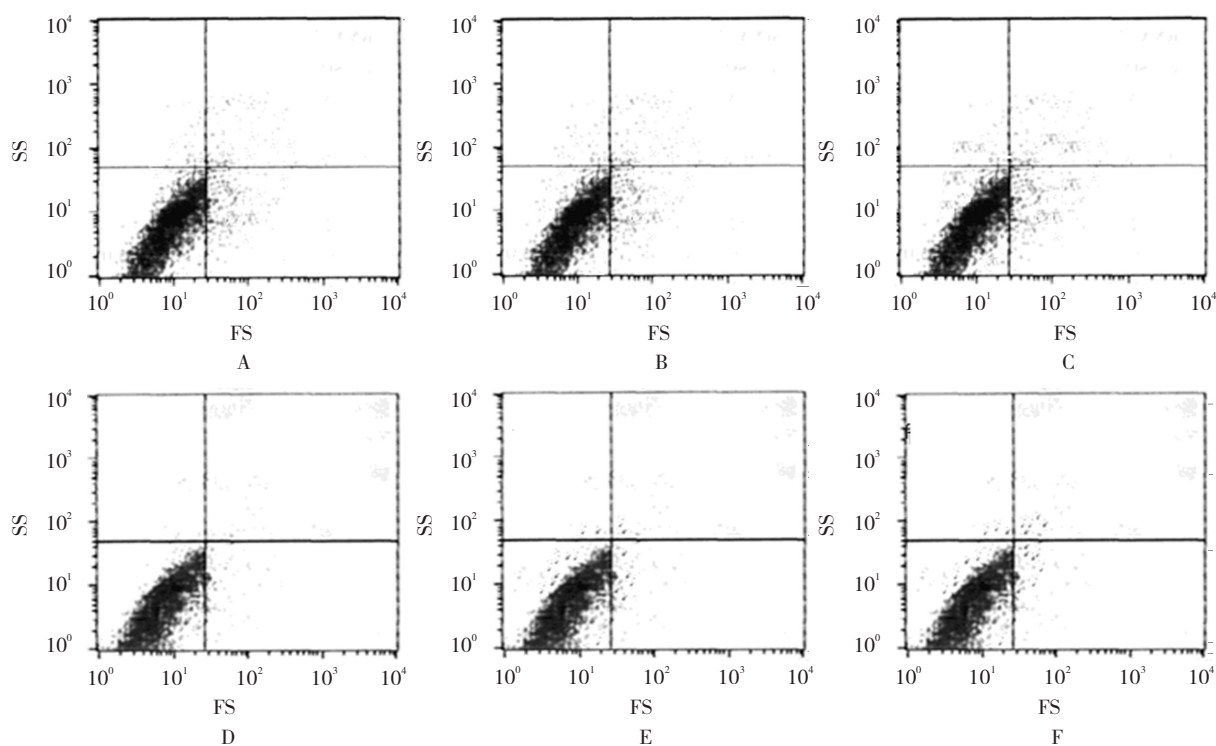


图 2 两组细胞凋亡率比较



A: 研究组 50 $\mu\text{g/ml}$ 5-Fu; B: 研究组 100 $\mu\text{g/ml}$ 5-Fu; C: 研究组 200 $\mu\text{g/ml}$ 5-Fu; D: 对照组 50 $\mu\text{g/ml}$ 5-Fu; E: 对照组 100 $\mu\text{g/ml}$ 5-Fu; F: 对照组 200 $\mu\text{g/ml}$ 5-Fu

图 3 两组不同浓度 5-Fu 细胞凋亡情况

3 讨论

近年来随着生活方式的改变, 各类消化系统恶性肿瘤的发生不断增加。胃癌是临床常见消化系统恶性肿瘤, 其发病率高。然而由于早期症状不明显, 无特异性症状, 早期诊断困难, 多数患者出现症状确诊时已为晚期, 错过手术治疗的最佳时机, 常需选取其他姑息治疗方法^[7-8]。化疗是胃癌手术外的首选治疗方法, 而 5-FU 是其常用化疗药物, 其在胃癌治疗中的效果已得到多个临床研究的认可^[9-10]。然而胃癌化疗的特异性差, 不良反应较多, 且容易发生化疗药物的耐药^[11]。从开发新药的角度改善胃癌化疗效果, 已无法满足临床需求。寻找新的途径改善胃癌 5-FU 化疗效果, 是目前临床急需解决的难题。

近年来关于癌症的研究中, 基因学占据重要地位。有临床研究致力于通过基因沉默等措施, 增强癌症化疗药物的敏感性, 并取得一定的效果^[12]。廉超等^[13]研究发现, E2F 转录因子沉默有助于提高人胃癌 SGC-7901 细胞对顺铂的敏感性, 可能作为胃癌药物治疗的靶点之一。BOYER 等^[14]研究发现, siRNA 转染影响胰腺癌和肺癌的化疗耐药相关基因, 有助于改

善其化疗效果。*Bcl-2* 基因是细胞凋亡控制的关键基因, 可保护细胞免受凋亡的基因, 亦是与胃癌密切相关的基因^[15]。倪志超等^[16]采用 RNA 干扰沉默 *Bcl-2* 基因, 观察其对黑素瘤细胞生长抑制的效果, 研究结果显示, *Bcl-2* mRNA 可显著降低人黑素瘤 M14 细胞株 *Bcl-2* 蛋白表达, 有效抑制癌细胞的生长。因此, *Bcl-2* 基因靶向沉默亦可能对其 5-FU 化疗敏感性有影响。然而, 目前关于 *Bcl-2* 基因沉默增强胃腺癌 SGC-7901 细胞对 5-FU 敏感性的研究较少。

本研究采用化学合成的 *Bcl-2* siRNA 序列, 转染至胃腺癌 SGC-7901 细胞。结果发现, *Bcl-2* siRNA 序列转染至胃腺癌 SGC-7901 细胞后, *Bcl-2* mRNA 相对表达量降低, *Bcl-2* siRNA 序列转染至胃腺癌 SGC-7901 细胞可达 *Bcl-2* 基因沉默效果。分别对 *Bcl-2* 基因沉默和未对 *Bcl-2* 基因进行沉默处理的胃腺癌 SGC-7901 细胞加入 50、100 和 200 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU, 培养 48 h 后检测其细胞增殖抑制和细胞凋亡情况。本研究表明, 50、100 和 200 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU 均可取得较好的胃腺癌 SGC-7901 细胞抑制效果, 50 和 100 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU 的抑制效果差异较大; 在一定浓度范围内增大

5-FU 用量有助于改善疗效, 而 100 和 200 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU 的抑制效果差异不明显, 达 100 $\mu\text{g/ml}$ 后增加 5-FU 浓度对其细胞抑制效果影响不大; 且经 *Bcl-2* 基因进行沉默处理的胃腺癌 SGC-7901 细胞的增殖抑制率及凋亡率更高, 经 *Bcl-2* 基因沉默可能成为改善胃癌 5-FU 化疗效果的措施之一, 且 *Bcl-2* 基因可能作为胃癌基因治疗的靶基因之一。

综上所述, *Bcl-2* siRNA 序列可有效沉默 *Bcl-2*, 而 *Bcl-2* 基因沉默可抑制癌细胞的增殖, 并促进癌细胞的凋亡, 增强胃腺癌 SGC-7901 细胞对 5-FU 的敏感性。*Bcl-2* 基因沉默可能是改善胃腺癌 5-FU 疗效的有效方法。

参 考 文 献:

- [1] 亦磊, 叶星江. 核因子- κB 及 *Bcl-2* 在胃癌组织中的表达及意义 [J]. 广东医学, 2014, 35(11): 1705-1707.
- [2] PASQUINI G, VASILE E, CAPARELLO C, et al. Third-line chemotherapy with irinotecan plus 5-fluorouracil in caucasian metastatic gastric cancer patients[J]. *Oncology*, 2016, 91(6): 311-316.
- [3] MURANAKA T, YUKI S, KOMATSU Y, et al. Efficacy and safety of bolus 5-fluorouracil and L-leucovorin as salvage chemotherapy for oral fluoropyrimidine-resistant unresectable or recurrent gastric cancer: a single center experience[J]. *J Gastric Cancer*, 2016, 16(3): 177-181.
- [4] 李勇, 檀碧波, 范立侨, 等. 胃癌耐药细胞株 SGC7901/阿霉素中 miR-185 的表达及对细胞多药耐药性的影响 [J]. 中国全科医学, 2015, 18(17): 2101-2104.
- [5] 钟竹, 周伟, 吴小翎. 慢病毒介导 STAT3-shRNA 对胃癌细胞化疗敏感性的影响及机制 [J]. 重庆医科大学学报, 2015, 40(20): 261-265.
- [6] 陈俊卯, 刘思洋, 吴景华, 等. 胃癌与癌旁组织中 RACK1、Src 和 *Bcl-2* 蛋白的表达及相关性研究 [J]. 重庆医学, 2016, 45(19): 2645-2647.
- [7] 黎伯培, 陈俊强, 刘金禄, 等. 胃癌耐药细胞株 SGC-7901/5-FU 的建立及其耐药机制的初步探讨 [J]. 消化肿瘤杂志: 电子版, 2012, 4(3): 163-169.
- [8] MAHLBERG R, LORENZEN S, THUSS-PATIENCE P, et al. New perspectives in the treatment of advanced gastric cancer: S-1 as a novel oral 5-FU therapy in combination with cisplatin[J]. *Chemotherapy*, 2016, 62(1): 62-70.
- [9] WANG B, WALSH S J, SAIF M W. Pancytopenia and severe gastrointestinal toxicities associated with 5-fluorouracil in a patient with thymidylate synthase (TYMS) polymorphism[J]. *Cureus*, 2016, 8(9): DOI:org/10.1371/journal.pone e798.
- [10] YAWATA K, OSADA S, TANAHASHI T, et al. The significant role of cyclin D1 in the synergistic growth-inhibitory effect of combined therapy of vandetanib with 5-fluorouracil for gastric cancer[J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(10): 5215-5226.
- [11] 程燕, 哈斯其美格, 覃小珍, 等. 藏药柳茶水提取物对胃癌耐药细胞 BGC823/5-FU 增殖及药物敏感性的影响 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(4): 603-608.
- [12] 廉超, 杨杰, 王晓通, 等. E2F-1 基因沉默对人胃癌耐药细胞株 SGC7901/顺铂多药耐药性的逆转 [J]. 中华肿瘤杂志, 2014, 36(3): 171-176.
- [13] 廉超, 杨杰, 王晓通, 等. E2F-1 基因沉默可增强人胃癌耐药细胞株 SGC-7901/DDP 对顺铂的敏感性 [J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(12): 1727-1732.
- [14] BOYER C I, TEO J, PHILLIPS P, et al. Effective delivery of siRNA into cancer cells and tumors using well-defined biodegradable cationic star polymers[J]. *Mol Pharm*, 2013, 10(6): 2435-2444.
- [15] 任磊, 周业江, 刘春风, 等. *Bcl-2/Bid* 在胃癌的差异性表达与临床意义 [J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(20): 51-54.
- [16] 倪志超, 乌新春, 孙立新, 等. RNA 干扰沉默 *bcl-2* 基因对人黑色素瘤细胞生长抑制研究 [J]. 河北医学, 2009, 15(9): 1012-1015.

(童颖丹 编辑)