



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04.010
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04.010
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(4):511-516.

· 基础研究 ·

抑癌基因 WTX 对胃癌 SGC-7901 细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响

杨蔚^{1,2}, 张毅³, 钟玲⁴, 李思齐³, 杨金伟², 陈嘉勇³

(1. 昆明医科大学, 云南昆明 650500; 云南省第一人民医院 2. 普外二科 4. 急诊 ICU, 云南昆明 650032; 3. 昆明医科大学第二附属医院 急诊科, 云南昆明 650101)

摘要

目的: 探讨 WTX 基因对人胃癌 SGC-7901 细胞生物学行为的影响。

方法: 将 WTX 重组质粒或空载体质粒用 Attractene 法转染 SGC-7901 细胞, 以无处理 SGC-7901 细胞为空白对照, 检测不同时间 eGFP 标记的转染效率; RT-PCR 法检测 WTX mRNA 水平; CCK-8 法测定细胞增殖情况; 流式细胞技术检测转染效率、凋亡及细胞周期的变化。

结果: 转染 WTX 基因 48 h 后, eGFP 表达最强, 转染效率达 $(33.10 \pm 4.16) \%$; 与空白对照组和空载体组比较, WTX 转染组 WTX mRNA 表达明显升高; 细胞增殖能力明显降低, S 期细胞明显增多, 而 G₁ 期和 G₂/M 期细胞减少 (均 $P < 0.05$)。各组细胞均未见明显的细胞凋亡。

结论: WTX 可通过诱导 S 期阻滞抑制胃癌细胞 SGC-7901 生长, 但不影响细胞凋亡。

关键词

胃肿瘤; 基因, 肾母细胞瘤; 细胞周期
中图分类号: R735.2

Influence of tumor suppressor WTX gene on proliferation, apoptosis and cell cycle of human gastric cancer SGC-7901 cells

YANG Wei^{1,2}, ZHANG Yi³, ZHONG Ling⁴, LI Siqi³, YANG Jinwei², CHEN Jiayong³

(1. Kunming Medical University, Kunming 650500, China; 2. Department of General Surgery II 4. Department of Emergency ICU, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032 China; 3. Department of Emergency Medicine, the Second Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming 650101)

Abstract

Objective: To investigate the influence of WTX gene on biological behaviors of human gastric cancer SGC-7901 cells.

Methods: The recombinant plasmids bearing WTX gene or empty plasmid vectors were transfected into SGC-7901 cells by using Attractene reagent, and the untreated SGC-7901 cells were used as blank control. The EGFP-tagged transfection efficiency at different transfection times was determined, the WTX mRNA expression was measured by RT-PCR method, the cell proliferation was detected by CCK-8 assay, and the apoptosis and cell cycle were analyzed by flow cytometry.

Results: The strongest expression of eGFP presented at 48 h after WTX gene transfection, when the transfection efficiency reached $(33.10 \pm 4.16) \%$. In SGC-7901 cells of WTX transfection group compared with either blank

基金项目: 云南省卫生科技计划资助项目 (2012NS046); 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2010CD165); 云南省应用基础研究重点资助项目 (2011FA029); 云南省应用基础研究面上资助项目 (2013FZ295)。

收稿日期: 2014-10-22; **修订日期:** 2015-03-17。

作者简介: 杨蔚, 昆明医科大学博士研究生 / 云南省第一人民医院主治医师, 主要从事胃肠道肿瘤方面的研究。

通信作者: 陈嘉勇, Email: littlemark800306@yahoo.com.cn

control group or empty vector group, the WTX mRNA expression was increased significantly, proliferative ability was decreased significantly, and the number of S-phase cells was increased while the number of G₁- and G₂/M-phase cells was decreased significantly (all $P < 0.05$). There was no significant apoptosis in any of the groups of cells.

Conclusion: WTX gene can inhibit proliferation through inducing S-phase arrest in SGC-7901 cells, but has no influence on cell apoptosis.

Key words: Stomach Neoplasms; Genes, Wilms Tumor; Cell Cycle

CLC number: R735.2

胃癌是我国常见恶性肿瘤, 发病率居于第2位, 病死率居第3位^[1]。WTX (Wilms' tumor gene on the X-chromosome) 是2007年首次在Wilms瘤中发现的位于X染色体的肿瘤抑制基因^[2]。有研究^[3-4]发现, 胃癌组织中WTX基因mRNA表达和蛋白水平都明显低于癌旁组织和正常组织, 提示WTX基因在胃癌的发生发展过程中可能有重要作用。本实验探讨WTX基因对胃癌细胞SGC-7901增殖、凋亡和细胞周期的影响, 为研究WTX在胃癌中的作用提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂及设备

人胃癌细胞SGC7901由云南省肿瘤研究所周永春博士惠赠。携带WTX基因的质粒PLV.Ex3d.null-EF1A>WTX>IRES/eGFP和空载体质粒由本课题组保存。RPMI 1640培养液 (No:C11875500BT, GIBCO)。胎牛血清FBS (No:10099-141, GBICO)。Attractene Transfection Reagent (NO: 301005, QIAGEN), Annexin V-PE凋亡检测试剂盒 (No:559763, BD Pharmingen), 细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒 (No: C1052, 碧云天), 总RNA抽提试剂盒 (No: K0731, Thermo), 反转录试剂盒 (No: K1622, Thermo)。细胞增殖与毒性检测试剂盒CCK-8 (No:C008-3, 七海生物)。流式细胞仪 (FACSCalibur Flow Cytometer, BD), 酶标仪 (680, BIO-RAD)、PCR仪 (iCycler Thermal Cycler, BIO-RAD) 和凝胶图像分析系统 (Biosens SC710, BIOTOP), 荧光倒置显微镜 (Ti-S, Nikon)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组转染 培养于含10%胎牛血清 (FBS) 的RPMI 1640培养液中, 加入双抗, 置于37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中, 3~4 d传代1次。

转染前选择对数生长期细胞接种于6孔板中, 每孔约 2×10^5 个细胞。接种后培养12 h, 待细胞贴壁后开始分组转染。随机分为3组: 对照组、空载体组和WTX转染组。采用高效转染试剂 Attractene Transfection Reagent 进行WTX质粒转染, 按试剂说明书步骤操作。

1.2.2 形态学观察 荧光显微镜下观察100倍和200倍下明场细胞形态和绿色荧光eGFP表达, 转染效率以流式细胞术检测绿色荧光表达为标准。

1.2.3 RT-PCR检测WTX mRNA的表达 分别收集各组细胞, 用新鲜配置的裂解液 (600 μL Lysis Buffer+12 μL β-巯基乙醇) 裂解细胞, 提取总RNA, 反转生成cDNA。WTX正义链: 5'-GAC AAT AAC CGG GCT AGG AAC-3', 反义链: 3'-GCC ATC GTG GGT CTT GCT CTT G-5', 退火温度58.7℃, 产物长度426 bp; GAPDH正义链: 5'-CAA GGT CAT CCA TGA CAA CTT TG-3', 反义链: 5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA G-5', 退火温度57℃, 产物长度496 bp。PCR扩增条件: 95℃ 4 min, 95℃ 30 s, 58.7℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30个循环, 72℃延伸10 min。RT-PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统拍照, 分析灰度值。实验重复3次。

1.2.4 流式细胞术 Annexin V/PI 染色法检测细胞凋亡 用PI和红色荧光标记的Annexin V-PE分组染色和检测转染后的绿色eGFP。0.25%胰酶消化, 制成单细胞悬液后计数, 分为未染色、Annexin V-PE和PI组, 约 3×10^5 个细胞。离心, 2 000 r/min 3 min, 弃上清。用1 mL 1×Binding Buffer重悬细胞, 再次离心, 2 000 r/min 3 min, 弃上清。分别加入5 μL Annexin V-PE和10 μL PI, 混匀后避光染色10 min。1 mL 1×Binding Buffer重悬细胞, 再次离心, 2 000 r/min 3 min, 弃上清。重悬于400 μL的1×Binding Buffer中, 制成单细胞悬液, 立即上机检测。实验重复3次。

1.2.5 CCK-8 法绘制细胞生长曲线 将对数生长期细胞消化计数后接种到 96 孔板, 设空白对照组、空载体组和 WTX 转染组, 各设 3 个复孔。每孔约 5×10^3 个细胞, 培养 12 h 贴壁后用高效转染试剂 Attractene 进行转染, 合计每孔 200 μ L。共 8 块 96 孔板, 编为 0~7 号, 对应转染当天和转染后 1~7 d。转染当天取 0 号板, 每孔加入 20 μ L CCK-8, 37 $^{\circ}$ C 培养 2 h 后用酶标仪测定 450 nm 波长吸光度 (OD)。以后每天分别顺序测量 1~7 号板 (第 4 天换液)。以培养时间为横坐标, OD 值为纵坐标, 绘制各组细胞的生长曲线。

1.2.6 流式细胞术 PI 染色法检测细胞周期 离心收集细胞, 弃上清, 用预冷 PBS 洗细胞 2 次。加入预冷 70% 乙醇, 4 $^{\circ}$ C 固定过夜。离心收集细胞, 以 1 mL 的 PBS 洗细胞 1 次, 加入 500 μ L PBS 含 50 μ g/mL 溴化乙锭 (PI), 100 μ g/mL RNase A, 0.2% Triton X-100, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。2 000 r /min 离心 5 min, 用 500 μ L PBS 重悬细胞。流式细胞仪检测, 计数 2×10^4 个细胞, 结果用细胞周期拟和

软件 ModFit 分析。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

实验所得数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。多组间比较采用方差分析或秩和检验, 进一步两两比较采用 q 检验或秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SGC7901 转染后 WTX 表达情况

2.1.1 荧光显微镜观察 SGC7901 细胞贴壁生长良好, 形态正常 (图 1A)。空白对照组没有荧光显示 (图 1B), 空载体组和 WTX 转染组有明显荧光表达, 且空载体组的荧光表达明显多于 WTX 转染组 (图 1C-D) (表 1); 各组转染效率以流式细胞检测 eGFP 表达率为标准; 空载体组和 WTX 转染组均是在 48 h 是表达 eGFP 最强 ($P < 0.05$) (表 1), 故后继检测均选择转染后 48 h 细胞。不同时间点流式细胞术检测 eGFP 表达率见表 1。

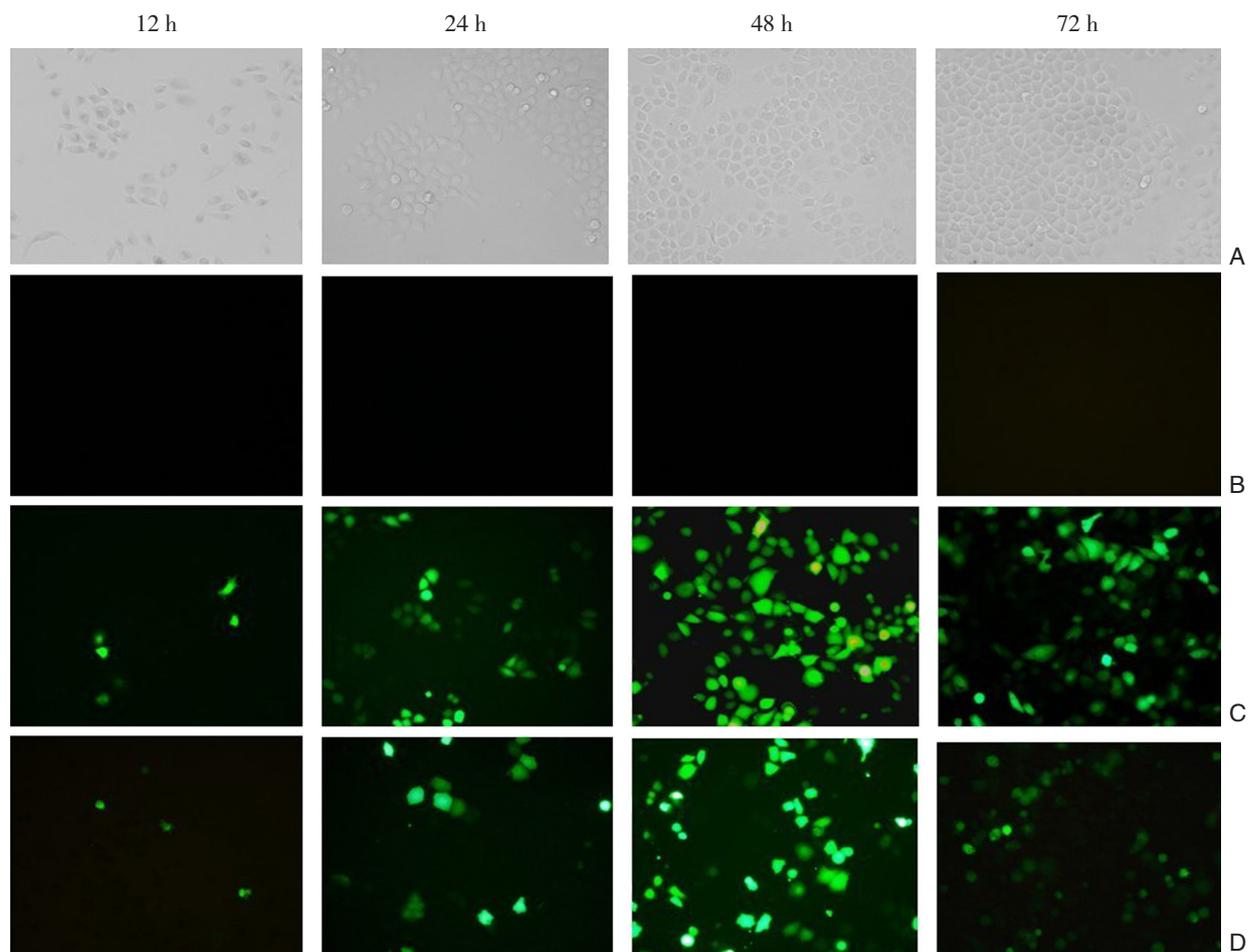


图 1 镜下各组细胞形态及荧光表达 ($\times 200$) A: 光镜下细胞形态; B: 空白对照组; C: 空载体组; D: WTX 转染组
Figure 1 Morphology and fluorescence expression of the cells under microscope ($\times 200$) A: Under-microscope shape of the cells; B: Blank control group; C: Empty vector transfection group; D: WTX transfection group

表 1 不同时间点 eGFP 表达率 (% , $\bar{x} \pm s$)

Table 1 The eGFP expression rate at different time points (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	12 h	24 h	48 h	72 h
空载体组	8.47 ± 1.58	35.38 ± 3.55	63.80 ± 6.21	45.31 ± 3.74
WTX 转染组	4.70 ± 1.70	13.93 ± 2.41	33.10 ± 4.16	21.91 ± 2.39

注: 每组各时间点差异均有统计学意义

Note: The difference between each time point in either group has statistical significance

2.1.2 琼脂糖凝胶电泳结果 阴性对照没有任何条带出现, 阳性对照各组 GAPDH 产物为 496 bp, 条带位置正确, 亮度一致。WTX 转染组产物为 426 bp, 条带位置正确, 空白对照组和空载体组都有淡条带出现, 而转染 WTX 质粒后条带亮度明显增加 (图 2)。各组间灰度比值差异有统计学意义 ($F=378.073, P<0.05$), WTX 转染组明显大于空白对照组与空载体组 (均 $P<0.05$) (表 2)。

2.2 凋亡检测

各组细胞无论是 Annexin V-PE 通道还是 PI 通道, 均无凋亡细胞群出现 (未染色细胞和染色细胞 Q2 象限无明显差别) (图 3)。

2.3 细胞增殖情况

转染后 4~7 d, 空白对照组和空载体组细胞生长曲线明显高于 WTX 转染组, 且与 WTX 转染组相比 OD 值差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$) (图 4)。

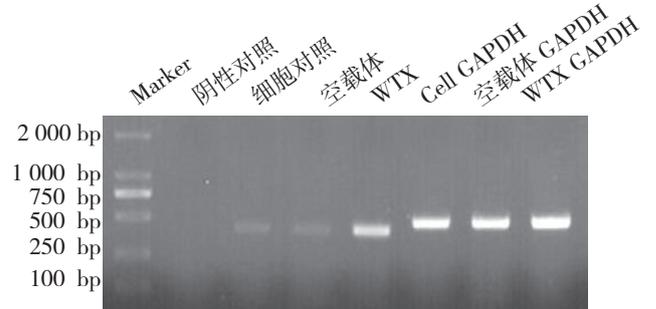


图 2 1% 琼脂糖凝胶电泳结果

Figure 2 Results of the 1% agarose gel electrophoresis

表 2 各组条带灰度比值 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The ratio of gray scale of each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	WTX/GAPDH
空白对照组	0.364 ± 0.027 ¹⁾
空载体组	0.359 ± 0.028 ¹⁾
WTX 转染组	0.778 ± 0.004

注: 1) 与 WTX 转染组比较, $P<0.05$

Note: 1) $P<0.05$ vs. WTX transfection group

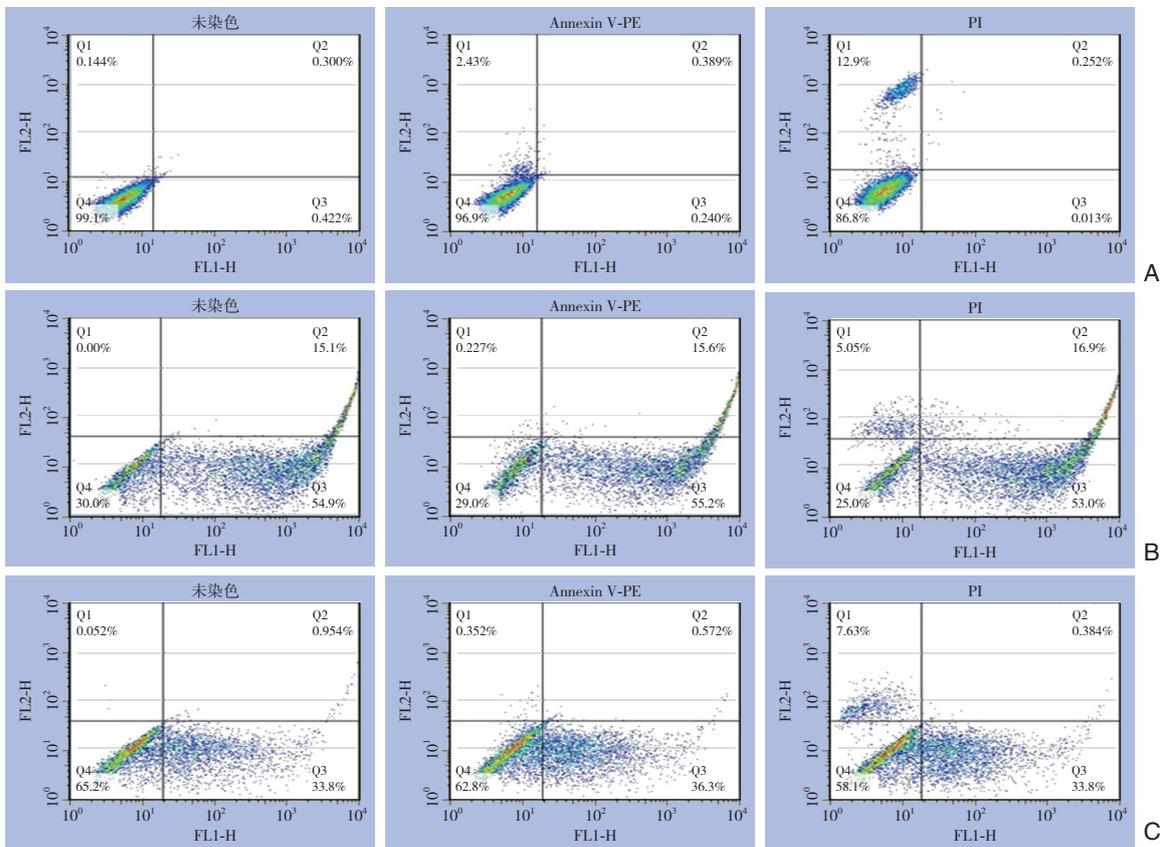


图 3 流式细胞凋亡检测

A: 空白对照组; B: 空载体组; C: WTX 转染组

Figure 3 Cell apoptosis detected by flow cytometry group

A: Blank control group; B: Empty vector transfection group; C: WTX transfection

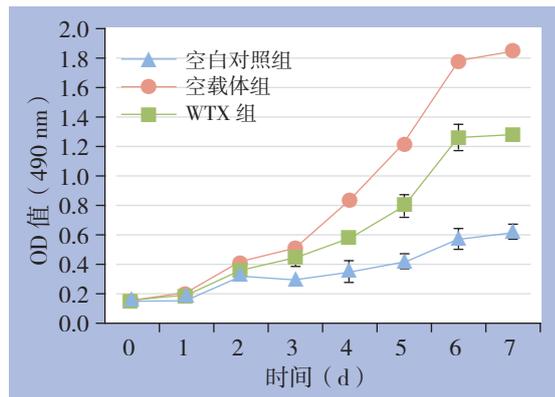


图4 各组细胞的生长曲线

Table 4 Growth curves of each group of cells

2.4 细胞周期分析

细胞周期分析结果显示, WTX过表达后, G₁期和G₂/M期细胞减少, S期细胞明显增多(均P<0.05), 细胞周期阻滞在S期(表3)。

表3 细胞周期各分期百分比(% , $\bar{x} \pm s$)Table 3 Percentage of each cell cycle phase (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	G ₁ 期	G ₂ /M期	S期
空白对照组	58.47 ± 1.18 ¹⁾	13.75 ± 0.82 ¹⁾	27.78 ± 0.60 ¹⁾
空载体组	56.58 ± 1.17 ¹⁾	14.49 ± 0.69 ¹⁾	28.93 ± 0.92 ¹⁾
WTX 转染组	51.64 ± 1.31	4.24 ± 0.55	44.11 ± 1.17

注: 1) 与 WTX 转染组比较, P<0.05

Note: 1) P<0.05 vs. WTX transfection group

3 讨论

人WTX基因位于Xq11.1, 全长7.5 kb, 编码一个由1 135个氨基酸组成的蛋白质。其特殊的X染色体定位使WTX不再遵循“二次打击”理论, 而是“一次打击”即可导致基因的突变或失活。研究^[5]发现WTX的失活与越来越多的肿瘤有相关性。WTX与Wnt/ β -catenin通路关系密切, 可与APC (adenomatous polyposis coli) 蛋白等结合参与降解 β -catenin而抑制Wnt/ β -catenin通路, 因此具有抑癌基因的作用^[6-7]。另外, WTX高表达还可以抑制肿瘤血管生成^[8]。

研究发现, Wnt/ β -catenin通路在胃癌发生发展中呈异常活化状态^[9-11], 可能在胃癌的发生发展中有重要作用^[12-13]。WTX在Wilms瘤中的突变约占总数的1/3左右^[14], 而对WTX基因在Wilms瘤以外的其他肿瘤中突变情况和作用的研究较少。有研究^[15]报道, WTX蛋白在正常胃黏膜上皮内高表

达, 而在胃癌组织中表达普遍降低。有研究^[3-4, 16]已证实胃癌和结肠癌组织中WTX表达水平较癌旁组织和远癌组织降低。Yoo等^[17-18]检测了141例肿瘤组织, 结果仅在结肠癌组中发现1例存在WTX突变, 认为在胃癌、结肠癌和肝细胞癌中WNT通路的异常并非由WTX突变引起, 可能与其表达缺失有关, 且其转录失活并非由于启动子甲基化所致。陈可绪等^[19]成功构建了包含全部编码区的WTX表达载体pEGFP-WTX, 转染后诱导构建稳定表达WTX和eGFP的胃癌细胞株BGC-823/WTX-EGFP, 但进一步的研究结果尚未见文献报道。

实验结果表明, WTX在体外实验中可以阻滞细胞有丝分裂, 抑制胃癌细胞增殖, 但并没有明显促进肿瘤细胞凋亡, 可能是WTX没有激活Wnt/ β -catenin通路下游的促凋亡基因或处于平衡状态。细胞周期有严格的调控机制, 任何一个环节的失调都可能导致细胞周期的失控^[20]。针对细胞周期调控网络中的各种关键分子来控制肿瘤细胞增殖已成为肿瘤基因治疗新的思路和方法^[21-22]。WTX通过抑制Wnt/ β -catenin通路来调控细胞周期, 将细胞阻滞在S期, 阻止细胞进行DNA复制, 从而阻断了细胞有丝分裂, 抑制细胞增殖。有文献^[23]报道了相似的结果: WTX可以阻滞结肠癌Lovo细胞于G₀/G₁期, 从而抑制其增殖, 而对凋亡无明显影响。因此, WTX可能可以作为胃癌基因治疗的靶点。

综上所述, WTX对胃癌细胞SGC7901有抑制作用, 是通过诱导S期阻滞抑制SGC7901增殖, 而非促进细胞凋亡。

参考文献

- [1] 邹小农, 孙喜斌, 陈万青, 等. 2003-2007年中国胃癌发病与死亡情况分析[J]. 肿瘤, 2012, 32(2):109-114
- [2] Rivera MN, Kim WJ, Wells J, et al. An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor[J]. Science, 2007, 315(5812):642-645.
- [3] 覃创. WTX基因在胃癌组织中转录水平的表达[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2012:27.
- [4] 李肖山. 胃癌组织中WTX基因蛋白水平表达的研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2012:30.
- [5] Akhavanfard S, Vargas SO, Han M, et al. Inactivation of the tumor suppressor WTX in a subset of pediatric tumors[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2014, 53(1):67-77.
- [6] Major MB, Camp ND, Berndt JD, et al. Wilms tumor suppressor

- WTX negatively regulates WNT/beta-catenin signaling[J]. *Science*, 2007, 316(5827):1043-1046.
- [7] 肖亚飞, 吴更. Amer1/WTX与APC相互作用的新结合位点鉴定[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2014, 30(4):383-389.
- [8] 黄山, 黄帆, 遇呈祥, 等. 老年骨肉瘤患者术后组织中VEGF、WTX和PTEN表达的意义[J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(11):2660-2661.
- [9] 官文华, 杨堃, 赵文君, 等. Wnt3、Wnt3a在胃癌组织中的表达及意义[J]. *世界华人消化杂志*, 2013, 21(7):624-628.
- [10] 陈浩, 许浪. 信号通路对胃癌干细胞及胃癌发生的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(14):2532-2537.
- [11] Oguma K, Oshima H, Oshima M. Inflammation, tumor necrosis factor and Wnt promotion in gastric cancer development[J]. *Future Oncol*, 2010, 6(4):515-526.
- [12] 冯琛, 周雨峡, 许科斌, 等. Wnt/ β -catenin信号通路相关蛋白在胃癌组织中的表达和肿瘤转移的关系[J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(21):4109-4112.
- [13] 董理. Wnt信号通路中心调控分子 β -catenin在胃癌中的表达及其意义[D]. 南昌:南昌大学, 2014:22.
- [14] Ruteshouser EC, Robinson SM, Huff V. Wilms tumor genetics: mutations in WT1, WTX, and CTNBN1 account for only about one-third of tumors[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2008, 47(6):461-470.
- [15] 张庆玲, 丁彦青. 胃癌中抑癌基因WTX表达及其临床意义研究[C]//第九届全国肿瘤转移学术大会暨2011年黑龙江省医学会肿瘤学年会摘要集. 牡丹江: 第九届全国肿瘤转移学术大会, 2011.
- [16] 李思齐, 张毅, 梁道明, 等. 抑癌基因WTX在结肠癌中的表达及其意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2012, 21(10):1217-1221.
- [17] Yoo NJ, Kim S, Lee SH. Mutational analysis of WTX gene in Wnt/ β -catenin pathway in gastric, colorectal, and hepatocellular carcinomas[J]. *Dig Dis Sci*. 2009, 54(5):1011-1014.
- [18] 刘霞, 王启明, 牛会林, 等. 胃癌中新抑癌基因WTX启动子区域甲基化水平的检测[J]. *南方医科大学学报*, 2013, 33(3):318-321.
- [19] 陈可绪, 王啓名, 黄怡哲, 等. 稳定表达新抑癌基因WTX的胃癌BGC-823/WTX-EGFP细胞株的建立[J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31(3):392-396.
- [20] Guardavaccaro D, Corrente G, Covone F, et al. Arrest of G(1)-S progression by the p53-inducible gene PC3 is Rb dependent and relies on the inhibition of cyclin D1 transcription[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(5):1797-1815.
- [21] 李志琴, 章静波. 细胞周期调控与肿瘤[J]. *癌症进展*, 2004, 2(2):146-150.
- [22] 洪健, 唐清连, 徐双兵, 等. 细胞周期调控与肿瘤靶向治疗[C]//2012年中国科协海峡两岸青年科学家学术活动月—第九届海峡两岸细胞生物学学术研讨会论文集. 丽江: 第九届海峡两岸细胞生物学学术研讨会, 2012:44.
- [23] 李思齐. WTX基因在结肠癌中的表达及对结肠癌Lovo细胞株生长的影响[D]. 昆明:昆明医科大学, 2013:117.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 杨蔚, 张毅, 钟玲, 等. 抑癌基因WTX对胃癌SGC-7901细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(4):511-516. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04.010

Cite this article as: YANG W, ZHANG Y, ZHONG L, et al. Influence of tumor suppressor WTX gene on proliferation, apoptosis and cell cycle of human gastric cancer SGC-7901 cells[J]. *Chin J Gen Surg*, 2015, 24(4):511-516. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04.010

欢迎关注我刊姊妹刊《Gland Surgery》

《Gland Surgery》(Gland Surg; pISSN 2227-684X; eISSN 2227-8575; PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/2506>)于2012年5月由《中国普通外科杂志》与AME公司合作创刊,是一本同行评审、开放获取的英文期刊,主要刊登腺体疾病预防、诊断、治疗、预后等方面的文章。由我刊主编吕新生教授与北京301医院普通外科李席如教授共同担任主编;湘雅医院普通外科的李新营,泰国Mahidol University的Visnu Lohsiriwat,澳大利亚University of Melbourne的Warren M Rozen,以及美国Virginia Commonwealth University的Kazuaki Takabe等教授共同担任副主编。《Gland Surgery》拥有一支国际化的编委团队,编委分别来自中国、美国、英国、日本、台湾、泰国、澳大利亚、意大利、加拿大、西班牙、希腊等世界各国。

欢迎业内人士登录《Gland Surgery》网站: <http://www.glandsurgery.org>。

中国普通外科杂志编辑部