

• 基础研究 •

硫氧还蛋白 1 对胃癌细胞系 BCG823 生长的影响^{*}石岩岩 丁士刚^{**} 鲁凤民^① 张 婷^① 张 静 刘琳娜 王 晔

(北京大学第三医院消化科, 北京 100191)

【摘要】 目的 探讨硫氧还蛋白 1 (thioredoxin-1, Trx1) 对胃癌细胞系细胞周期及增殖速度的影响。 **方法** 对 BCG823、AGS、MNK45、NUGC3、PHM82 五种胃癌细胞系的质粒转染效率进行测定, 选择出转染效率高的细胞系; 并用实时 PCR (RT-PCR) 测定胃癌细胞系中 Trx1 的表达水平, 选择出表达较低的细胞系。将所构建的 Trx1 真核重组表达载体 pcDNA3.1myc-His-Trx1 转染入上述实验筛选出的胃癌细胞系, 使细胞中 Trx1 过表达, 用流式细胞仪检测过表达 Trx1 的胃癌细胞进入 S 期的比例。 **结果** BCG823、AGS 两种细胞系的转染效率高, 满足实验需要。BCG823 的 Trx1 表达较 AGS 低 [BCG823 细胞系的 ΔCT (Trx-GAPDH) = 1.43, AGS 细胞系的 ΔCT (Trx-GAPDH) = 1.10, ΔCT 值与表达量成反比], 选择 BCG823 作为实验对象。转染 pcDNA3.1myc-His-Trx1 的细胞 Trx1 表达升高 (与内参蛋白的比值为 0.45 ± 0.02 和 0.26 ± 0.03 , $n=3$, $t=9.127$, $P=0.000$), 进入 S 期的细胞比例升高 (转染带有 Trx1 质粒的细胞进入 S 期的比例为 28.54%, 而转染了空载体者进入 S 期的比例为 22.24%, $\chi^2=104.759$, $P=0.000$)。 **结论** Trx1 表达水平上调可以促进胃癌细胞进入 S 期。

【关键词】 硫氧还蛋白 1; 重组载体; 细胞周期; BCG823

中图分类号: R329.2⁺6

文献标识: A

文章编号: 1009-6604(2011)11-1030-04

Effects of Human Thioredoxin-1 on the Growth of Gastric Cancer Cell BCG823 Shi Yanyan^{*}, Ding Shigang^{*}, Lu Fengmin, et al. ^{*} Department of Gastroenterology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

【Abstract】 Objective To study the effects of human thioredoxin-1 (Trx1) on the cell cycle and proliferation of gastric cancer cells. **Methods** Transfection efficiency of five gastric cancer cell line, BCG823, AGS, MNK45, NUGC3, and PHM82 was analyzed to choose the one with highest efficiency for our experiment. At the same time, the expression of Trx1 in the gastric cancer cell lines was measured by real-time PCR, so that to select the cell lines with lowest expression rate, which could avoid the interference from the endogenous Trx1 to the transfected Trx1, and to ensure the obvious effects of transfection. Then, the pcDNA3.1myc-His-Trx1 recombinant vector was transfected into the cell line selected to make the Trx1 enhanced. The percentage of the cells in S phase was detected by flow cytometry. **Results** The transfection efficiency of BCG823 and AGS was high enough. The Trx1 expression in BCG823 was lower than AGS [ΔCT (Trx-GAPDH) of BCG823 = 1.43, ΔCT (Trx-GAPDH) of AGS = 1.10, and ΔCT is reverse to the level of Trx expression], so BCG823 was selected. The expression of Trx1 was up-regulated by transfecting with pcDNA3.1myc-His-Trx1 (the ratios to the referent protein are relatively 0.45 ± 0.02 and 0.26 ± 0.03 , $n=3$, $t=9.127$, $P=0.000$). The percentage of the cells in S phase was significantly increased (after interfecting by the plasmid with Trx1, the rate of cells coming into S phase was 28.54%, compared with the rate of the cells interfecting by the plasmid without Trx1, which was 22.24%, $\chi^2=104.759$, $P=0.000$). **Conclusions** The up-regulation of Trx1 can promote the entry of BCG823 cells into S phase.

【Key Words】 Thioredoxin-1; Recombinant vector; Cell cycle; BCG823

硫氧还蛋白 (thioredoxin, Trx) 是一种广泛分布于各种生物体的小分子多功能蛋白质, 人和哺乳动物 Trx 主要分为 Trx1 和 Trx2, 其中 Trx1 位于细胞质及细胞核, Trx2 位于线粒体, 属于线粒体特异性蛋白^[1]。Trx1 的第 32 至 35 氨基酸位点为 Cys-Gly-Pro-Cys 氧化还原活性区域, 通过这一活性区域, 可

逆性地催化氧化还原反应, 具有清除自由基、抗氧化的作用^[2], 并具有抗细胞凋亡的作用^[3]。

在细胞间期的 S 期, DNA 进行复制, 而 dNTP 是 DNA 复制的原料。体内实验表明, 没有 Trx 存在, 细胞不能为 S 期 DNA 的高效合成提供充分的 dNTP, 而 Trx1 能够为 DNA 前体合成过程中所需要的核苷

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30770980)

^{**} 通讯作者, E-mail: dingshigang222@163.com

^① (北京大学医学部病原生物学系, 北京 100191)

酸还原酶提供电子^[4]。但是 Trx1 能否影响细胞周期,目前的研究结果不一致,Trx1 对胃癌细胞的作用亦不清楚。本文对 Trx1 与胃癌细胞生长增殖的关系进行研究,探讨 Trx1 在胃癌中的作用,旨在为胃癌的临床诊治提供新的靶点,为优化诊疗方案、开展生物治疗或微创治疗来改善胃癌患者的预后和减轻病人痛苦奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

五种胃癌细胞系 BCG823、AGS、MNK45、NUGC3、PHM82 由北京大学医学部鲁凤民教授实验室提供。胎牛血清(FBS)购自 GIBCO(美国),RPMI-1640 培养基购自 Hyclone(美国),Trizol Reagent 购自 Invitrogen(美国),逆转录试剂盒购自 Fermentas(立陶宛),DL2000 marker 购自北京康润诚业生物科技有限公司,NeoFectin 转染试剂盒购自 NEB(美国),细胞裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司,羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺脂(CFSE)染料购自北京友谊中联生物科技有限公司,真核重组表达载体 pcDNA3.1myc-His-Trx1 由本课题组制备^[5]。

1.2 方法

1.2.1 胃癌细胞系的培养 胃癌细胞系 BCG823、AGS、MNK45、NUGC3、PHM82 分别培养于含 10% 灭活 FBS 的 RPMI-1640 培养液中,在 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养。每 3 天当细胞达到 90% 融合度时用消化液(0.25% 胰酶和 0.01% EDTA)消化,按 1:3 传代。

1.2.2 胃癌细胞系筛选 首先测定细胞转染效率。将细胞铺六孔板,约 1.0×10^5 /ml,在细胞生长至 80% 左右融合度时,按照 NeoFectin 转染说明书,用 eGFP 质粒转染细胞,用流式细胞仪测定细胞的转染效率,筛选转染效率在 60% 以上的细胞系。

用实时 PCR(RT-PCR)选择 Trx1 表达低的细胞。分别培养上述步骤中筛选出的高转染效率胃癌细胞系(BCG823、AGS),用 Trizol 法提取细胞系总 RNA,用 RevertAid 第一链 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA。以此为模板进行 RT-PCR,检测 2 株胃癌细胞系的 Trx1 表达水平。Trx1 引物和内参基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的引物序列来自于文献^[6],其中 Trx1 引物序列为 F: 5' - AGCAGATCGAGAGCAAGACT - 3', R: 5' - CACTCTGAAGCAACATCCTG - 3';内参基因 GAPDH 的引物序列为 F: 5' - GAAGGTGAAGGTCTGGAGTC - 3', R: 5' - CATGGGTGGAATCATATTGGAA - 3'。并由上海生工公司合成。RT-PCR 用 25 μl 的体系:

SYBR Green RT-PCR Master Mix(Toyobo) 12.5 μl,上、下游引物各 1 μl(10 μmol/L),cDNA 1 μl,DEPC 水补至 25 μl。反应参数:95 ℃ 预变性 10 min,95 ℃ 变性 30 s,57 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,35 个循环;熔解曲线 50 ℃ 1 s,95 ℃ 持续,每摄氏度取 15 个点;40 ℃ 降温,得出各个胃癌细胞系 Trx1 的相对表达量,比较 BCG823、AGS 胃癌细胞系 Trx1 的表达水平。所有实验重复 3 次。

1.2.3 BCG823 细胞转染 将细胞铺六孔板,约 1.0×10^5 /ml,按照 NeoFectin 转染说明书将真核重组表达载体 pcDNA3.1myc-His-Trx1 转染 BCG823 细胞,用 G418 300 ng/μl 筛选稳定转染细胞。

1.2.4 蛋白质印迹(western blot)检测细胞内 Trx1 水平 用胰酶消化细胞,离心收集细胞,按细胞裂解说明书加入细胞裂解液,60 ℃ 水浴 10 min,取上清,用紫外分光光度计测定蛋白浓度,按 50 μg/泳道进行 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)(80 V,1 h),将蛋白电转移至聚亚乙烯双氧化物膜(PVDF)上。用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加一抗(Trx1 鼠抗人抗体 1:2000,β-tubulin 兔抗人抗体 1:300),4 ℃ 孵育过夜,磷酸盐吐温缓冲液(PBST)洗膜 3 次,加辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,室温孵育 1 h, PBST 洗膜 3 次,发光剂作用 3 min,曝光,照片用 Odyssey 3.0 软件进行条带灰度分析。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期 稳定转染细胞及空白对照细胞(转染空载体)同时铺板,8 天后用胰酶消化收集细胞悬液,离心弃上清,用 pH 7.2 的磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次;离心弃上清,用 PBS 将细胞悬起,用 PBS 洗 2 次;离心弃上清,加无水乙醇,使乙醇终浓度达 70%,吹匀,-20 ℃ 固定 30 min。离心弃上清,用 PBS 洗 2 次,用含有 10 μl 10 mg/ml RNase、50 μl 500 μg/ml PI 的 PBS 200 μl 将细胞悬起,37 ℃ 孵育 30 min。PBS 洗一次,离心后用 200 μl PBS 将细胞悬起后进行流式细胞仪检测。

1.2.6 统计学处理 用 SPSS13.0 对数据进行统计学分析,用卡方检验对进入 S 期细胞的数量进行分析,用成组 t 检验对蛋白电泳条带的灰度值进行对比分析。

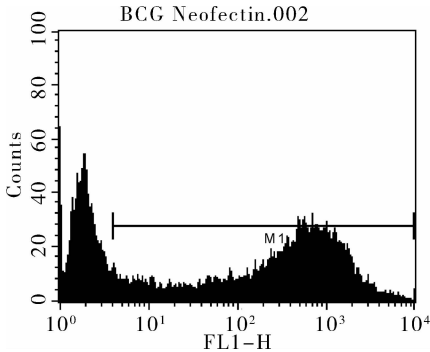
2 结果

2.1 胃癌细胞系的筛选

本实验中所用到的五种胃癌细胞系,经转染 eGFP 质粒,测定细胞的转染效率,转染效率在 60% 以上的细胞系有 BCG823 和 AGS(BCG823 转染效率见图 1,转染效率为 67.64%,AGS 转染效率与之相似,为 60.04%,另外三种细胞系 MNK45、NUGC3、PHM82 的转染效率分别为 47.69%、4.69%、

30.41%)。再用 RT-PCR 对这两种细胞中 Trx1 的表达量进行分析,用目的基因 Trx1 与内参基因 GAPDH 之间的循环阈值(cycle threshold, CT)之差(Δ CT)表示,结果显示 BCG823 细胞系的 Δ CT

(Trx - GAPDH) = 1.43, AGS 细胞系的 Δ CT(Trx - GAPDH) = 1.10, 由于 Δ CT 值与表达量成反比, BCG823 Trx1 的表达量较低,因而选择 BCG823 作为进一步实验的对象。



File:BCG Neofectin.002 Acquisition Date:11-Jun-10
Total Events:10000

Marker	Left, Right	Events	%Total
All	1,9910	10000	100.00
M1	4,9910	6764	67.64

图1 细胞转染效率测定 (BCG823)

2.2 蛋白质印迹检测转染重组载体后细胞内 Trx1 水平

转染空载体的细胞和转染重组表达载体 pcDNA3.1myc-His-Trx1 的细胞常规培养传代,生长至融合度 80% 左右时进行细胞消化、裂解和蛋白质印迹检测。与转染空载体的 BCG823 相比较,转染重组表达载体的细胞中 Trx1 的表达水平增高(转染重组表达载体的细胞中 Trx1 的曝光条带灰度与内参蛋白的比值为 0.45 ± 0.02 , 转染空载体的 BCG823 细胞中 Trx1 的曝光条带灰度与内参蛋白的比值为 $0.26 \pm 0.03, n = 3, t = 9.127, P = 0.000$), 蛋白质印迹结果如图 2 所示。

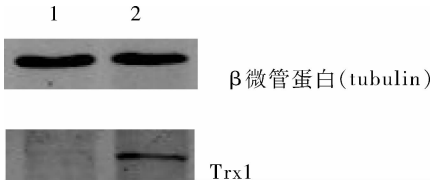


图2 蛋白质印迹检测质粒转染后细胞内 Trx1 表达升高 (1 - 转染空载体后;2 - 转染 pcDNA3.1myc-His-Trx1 后)

2.3 细胞周期及细胞增殖速度的变化

用流式细胞仪检测细胞周期的结果表明,转染了带有 Trx1 的质粒后,细胞进入 S 期的比例为 28.54%,转染空载体的细胞进入 S 期的比例为 22.24% (细胞计数均为 1 万个,对进入 S 期的细胞数用卡方检验进行分析, $\chi^2 = 104.759, P = 0.000$) (图 3)。

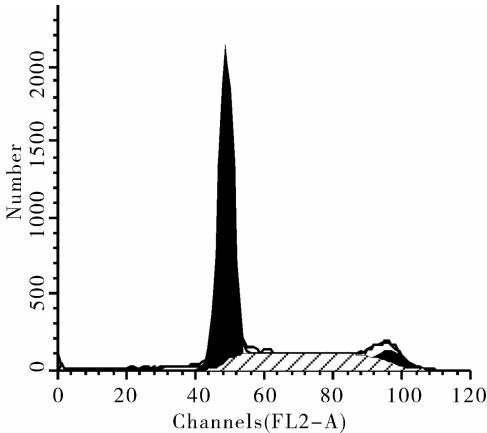
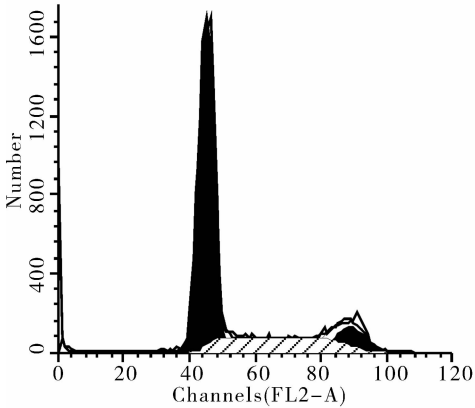


图3 流式细胞仪检测质粒转染后进入 S 期细胞的数量 [左图为转染空载体的细胞,进入 S 期的细胞百分数 (total S-phase): 22.24%;右图为转染 pcDNA3.1myc-His-Trx1 的细胞,total S-phase: 28.54%。细胞计数均为 1 万个]

3. 讨论

Trx1 广泛存在于各种生物体内,人体内的 Trx1

是一个含有 104 个氨基酸的小分子蛋白质。研究表明,Trx1 在多种肿瘤组织中明显高表达,包括胃癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌等,一些研究结果表明其表

达量还与肿瘤的组织学类型有关,并显示它可以促进肿瘤细胞的增殖,抑制细胞的凋亡^[7-9]。

人 Trx1 蛋白分子的氧化还原作用的活性位点是 Cys - Gly - Pro - Cys。在人体内的很多蛋白中均含有 C - X - X - C 结构,两端的 C 均为 Cys 亚基,Cys 亚基被认为在氧化还原作用信号通路中起重要作用,单个 Cys 亚基或邻近两个 Cys 亚基的存在使氧化还原双向反应得以顺利进行,并且认为 Cys 亚基在蛋白合成的过程中不可缺少。Cys 亚基是保证细胞周期顺利完成,抑制细胞凋亡的过程中的一个重要的控制位点^[10]。如果人 Trx1 蛋白分子的 Cys - Gly - Pro - Cys 位点中的 Cys 亚基发生突变,Trx1 就会失去对细胞的活性作用,不能促进细胞增殖和抑制细胞凋亡^[11]。Trx1 通过巯基供氢还原其他含二硫键的蛋白而发挥直接作用^[12],通过调节信号通路中的转录因子活性来实现其促进细胞增殖的作用:Trx1 促使转录因子与 DNA 结合,促进 DNA 前体的合成,并且抑制肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)及凋亡信号调节激酶 1(ASK-1)的活性而抑制下游凋亡信号^[13]。

有研究显示,用 RNA 干扰的方法将 Trx1 沉默以后,细胞周期停留在 G1 期。并且细胞内细胞周期蛋白(cyclin D1)的表达水平下降,cyclin D1 启动子的活性被抑制。同时,ERK1/2 的磷酸化水平及其核内定位减少^[14]。这些结果提示 Trx1 通过 ERK1/2 - cyclin D1 途径起到调节细胞周期的作用。

本研究以胃癌细胞系为研究对象,由于实验中需要将外源性重组质粒转染入细胞系中,为保证转染实验的成功,必须确保转染效率,故通过筛选胃癌细胞系,选择转染效率高的细胞。同时,为尽量减少内源性 Trx1 对细胞功能的干扰,保证外源性重组 Trx1 质粒转染后的效果明显,选取内源性 Trx1 表达量较低的一株细胞进行实验,最大程度地保证了实验的严谨性;通过选择自然状态下生长的细胞,避免了对细胞进行处理而可能给 Trx1 表达量带来的影响。筛选细胞后,通过将制备的 Trx1 真核表达载体 pcDNA3.1myc-His-Trx1 转染入细胞,使 Trx1 过表达,利用流式细胞技术,测定细胞周期,研究 Trx1 与胃癌细胞系生长的关系,结果表明 Trx1 过表达可以促进胃癌细胞进入 S 期,提示 Trx1 可能是胃癌发生发展的促进因素。

胃癌的发病呈上升趋势,因此提高早期诊断率,对于尽早手术特别是微创治疗改善预后具有重要意义。本研究结果表明 Trx1 对胃癌细胞有增殖促进

作用,因此它是否能在胃癌诊断和生物治疗中发挥作用可能具有较为重要的研究价值。

参考文献

- 1 Kaimul AM, Nakamura H, Masutani H, et al. Thioredoxin and thioredoxin-binding protein-2 in cancer and metabolic syndrome. *Free Radic Biol Med*, 2007, 43: 861 - 868.
- 2 Becana M, Matamoros MA, Udvardi M, et al. Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules. *New Phytol*, 2010, 188: 960 - 976.
- 3 Lillig CH, Holmgren A. Thioredoxin and related molecules-from biology to health and disease. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9: 25 - 47.
- 4 Koc A, Mathews CK, Wheeler LJ, et al. Thioredoxin is required for deoxyribonucleotide pool maintenance during S phase. *J Biol Chem*, 2006, 281: 15058 - 15063.
- 5 石岩岩, 丁士刚, 蒋素贞, 等. 人硫氧还蛋白-1 基因克隆及其重组载体的构建与鉴定. *山东大学学报(医学版)*, 2010, 48: 41 - 45.
- 6 Ceccarelli J, Delfino L, Zappia E, et al. The redox state of the lung cancer microenvironment depends on the levels of thioredoxin expressed by tumor cells and affects tumor progression and response to prooxidants. *Int J Cancer*, 2008, 123: 1770 - 1778.
- 7 Shan W, Zhong W, Zhao R, et al. Thioredoxin 1 as a subcellular biomarker of redox imbalance in human prostate cancer progression. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49: 2078 - 2087.
- 8 Noda N, Ochiai A, Miyazaki K, et al. Detection of thioredoxin in gastric cancer: association with histological type. *Antioxid Redox Signal*, 2000, 2: 519 - 528.
- 9 Lincoln DT, Al-Yatama F, Mohammed FM, et al. Thioredoxin and thioredoxin reductase expression in thyroid cancer depends on tumor aggressiveness. *Anticancer Res*, 2010, 30: 767 - 775.
- 10 Jones DP. Redox sensing: orthogonal control in cell cycle and apoptosis signalling. *J Intern Med*, 2010, 268: 432 - 448.
- 11 Young MG, Thoma RZ, Jennifer MJ, et al. Selective protection of nuclear thioredoxin-1 and glutathione redox systems against oxidation during glucose and glutamine deficiency in human colonic epithelial cells. *Free Radic Biol Med*, 2007, 42: 367 - 370.
- 12 Baker LM, Raudonikienė A, Hoffman PS, et al. Essential thioredoxin-independent peroxiredoxin system from *Helicobacter pylori*: genetic and kinetic characterization. *J Bacteriol*, 2001, 183: 1961 - 1973.
- 13 Yoshioka J, Schreiter ER, Lee RT. Role of thioredoxin in cell growth through interactions with signaling molecules. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8: 2143 - 2151.
- 14 Mochizuki M, Kwon YW, Yodoi J, et al. Thioredoxin regulates cell cycle via the ERK1/2-cyclin D1 pathway. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11: 2957 - 2971.

(收稿日期: 2011 - 07 - 11)

(修回日期: 2011 - 09 - 21)

(责任编辑: 王惠群)