

葡萄糖神经酰胺合成酶基因在人胃癌细胞SGC-7901及SGC-7901/VCR的表达和意义

张艳, 刘宗文, 贾丹辉, 乐晓萍, 张钦宪

■背景资料

胃癌是威胁人类生命的严重疾病, 是消化系统最常见的恶性肿瘤, 其发病机制十分复杂, 病因目前尚未阐明。葡萄糖神经酰胺合成酶(GCS)是神经酰胺代谢的关键酶, 近年来研究发现, 他参与了肿瘤细胞的增殖、分化和耐药。其活性增高被认为是引起肿瘤获得性多药耐药产生的原因之一。

■研发前沿

GCS在癌细胞的表达和意义愈来愈被人们重视, 现已有报道GCS在很多肿瘤细胞中都呈高表达趋势, 抑制GCS可显著提高肿瘤对于化疗的敏感性, 以此为热点的研究将为肿瘤耐药的逆转治疗提供新的方向。

张艳, 贾丹辉, 郑州大学基础医学院药理学教研室 河南省郑州市 450052

刘宗文, 河南省肿瘤病理重点实验室 河南省郑州市 450052
乐晓萍, 张钦宪, 郑州大学基础医学院组织胚胎学教研室 河南省郑州市 450052

通讯作者: 张钦宪, 450052, 郑州市大学路40号, 郑州大学基础医学院组织胚胎学教研室, qxz53@zzu.edu.cn

电话: 0371-66658153 传真: 0371-66658153

收稿日期: 2006-12-20 接受日期: 2007-01-10

Expression of glucosylceramide synthase gene and its significance in human gastric carcinoma SGC-7901 and SGC-7901/VCR cells

Yan Zhang, Zong-Wen Liu, Dan-Hui Jia, Xiao-Ping Le, Qin-Xian Zhang

Yan Zhang, Dan-Hui Jia, Department of Pharmacology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, He'nan Province, China

Zong-Wen Liu, He'nan Key Laboratory for Tumor Pathology, Zhengzhou 450052, He'nan Province, China

Xiao-Ping Le, Qin-Xian Zhang, Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, He'nan Province, China

Correspondence to: Dr. Qin-Xian Zhang, Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, He'nan Province, China. qxz53@zzu.edu.cn

Received: 2006-12-20 Accepted: 2007-01-10

Abstract

AIM: To investigate the expression of glucosylceramide synthase (GCS) gene and its significance in human gastric carcinoma SGC-7901 and SGC-7901/VCR cells.

METHODS: Human gastric carcinoma SGC-7901/VCR and SGC-7901 cells were cultured *in vitro*, and the total RNA was extracted by TRIzol method. MTT was adopted to evaluate the drug resistance of SGC-7901/VCR cells. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of GCS mRNA, and Western blotting and immu-

nocytochemistry were performed to measure the expression of GCS protein.

RESULTS: The half inhibitory concentrations (IC_{50}) for SGC-7901 and SGC-7901/VCR were 1.40 ± 0.06 and 86.20 ± 0.50 mg/L, respectively, and the drug-resistant index of SGC-7901/VCR cells was 61 times as high as that of SGC-7901 cells. GCS mRNA was expressed in both SGC-7901/VCR and SGC-7901 cells, and there was significant difference between them (GCS index: 3.9 vs 0.5 , $P < 0.05$). Moreover, GCS protein expression was significantly different between SGC-7901/VCR and SGC-7901 cells (65% vs 18% , $P < 0.05$).

CONCLUSION: GCS gene expresses in human gastric cancer cells and it plays an important role in the carcinogenesis and development of gastric carcinoma. The high expression of GCS is closely related with the multidrug resistance of tumors.

Key Words: Human gastric carcinoma cell; Glucosylceramide synthase; Gene expression; Multidrug resistance

Zhang Y, Liu ZW, Jia DH, Le XP, Zhang QX. Expression of glucosylceramide synthase gene and its significance in human gastric carcinoma SGC-7901 and SGC-7901/VCR cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(9):1008-1011

摘要

目的: 研究葡萄糖神经酰胺合成酶(glucosylceramide synthase, GCS)基因在人胃癌细胞SGC-7901和SGC-7901/VCR的表达并探讨其对人胃癌发生、发展的意义。

方法: 体外培养人亲本敏感胃癌细胞SGC-7901和人耐长春新碱胃癌细胞SGC-7901/VCR。采用MTT法检测半数细胞抑制浓度(IC_{50})和SGC-7901/VCR耐药倍数; RT-PCR法检测SGC-7901和SGC-7901/VCR两种细胞GCS mRNA的表达, 免疫组化法测定GCS蛋白表达水平。

结果: SGC-7901和SGC-7901/VCR的 IC_{50} 分别为 1.40 ± 0.06 和 86.20 ± 0.50 mg/L. SGC-7901/VCR细胞耐药指数是亲本细胞SGC-7901的61倍, SGC-7901和SGC-7901/VCR两种细胞均有GCS mRNA表达, 且SGC-7901/VCR细胞GCS mRNA表达水平(GCS指数为3.9)较SGC-7901细胞(GCS指数为0.5)有显著升高($P < 0.05$), 耐药细胞GCS蛋白表达阳性率(65%)显著高于亲本细胞(18%)($P < 0.05$).

结论: GCS基因在人胃癌耐药细胞和亲本敏感细胞均有表达, 耐药细胞GCS mRNA及蛋白均高表达. GCS可能参与了胃癌的发生过程, 且与肿瘤多药耐药有密切关系.

关键词: 人胃癌细胞; 葡萄糖神经酰胺合成酶; 基因表达; 多药耐药

张艳, 刘宗文, 贾丹辉, 乐晓萍, 张钦宪. 葡萄糖神经酰胺合成酶基因在人胃癌细胞SGC-7901及SGC-7901/VCR的表达和意义. 世界华人消化杂志 2007;15(9):1008-1011
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1008.asp>

0 引言

葡萄糖神经酰胺合成酶(glucosylceramide synthase, GCS)是调控神经酰胺代谢的关键酶之一, 其活性水平与肿瘤细胞多药耐药有密切关系. 有研究报道GCS在人卵巢癌细胞、人口腔表皮癌细胞^[1-2]、人黑色素瘤细胞^[3]、人乳腺癌细胞^[4]及人胆囊癌^[5]中均有表达. 目前为止, 未见有关GCS基因在人胃癌细胞中表达的报道. 我们采取体外培养人耐长春新碱(vincristine, VCR)胃癌细胞和人敏感胃癌细胞, 应用RT-PCR、免疫细胞化学技术对人胃癌细胞中GCS基因表达及意义进行了探讨和研究.

1 材料和方法

1.1 材料 人耐VCR胃癌细胞株SGC-7901/VCR由第四军医大学西京医院消化病研究所樊代明教授惠赠, 本室传代培养; 人亲本敏感胃癌细胞株SGC-7901由郑州大学基础医学院组织胚胎学教研室保存. RPMI-1640培养基为Gibco公司产品, TRIzol为Invitrogen公司产品, AMV第一链cDNA合成试剂盒及PCR扩增试剂盒为上海生工生物工程技术有限公司产品, VCR为广州白云山明兴制药有限公司产品, 四甲基偶氮唑盐(MTT)为Sigma公司产品, GCS抗体由美国Mayo Clinic Center的David Marks教授惠赠.

1.2 方法 SGC-7901用含100 mL/L灭活胎牛血清

的1640培养液, 置37℃ 50 mL/L CO₂的恒温孵箱中培养, 胰酶、EDTA混合液消化, 2-3 d传代一次, 维持细胞处于对数生长期. SGC-7901/VCR在培养液中加VCR 1 mg/L, 培养条件同上.

1.2.1 SGC-7901/VCR耐药性的检测 采用常规MTT法^[6-7], 自动酶标仪570 nm波长测各孔吸光度值(A), 计算相对抑制率(%) = (平均A_{对照} - 平均A_{加药}) / 平均A_{对照} × 100%, 然后以肿瘤细胞抑制率为纵坐标, 药物浓度的对数为横坐标, 制作半对数图, 计算50%细胞生长抑制所需的药物浓度(IC₅₀)、耐药指数(RI) = IC₅₀(SGC-7901/VCR) / IC₅₀(SGC-7901).

1.2.2 RT-PCR检测GCS mRNA的表达 细胞数量达到 2×10^7 个时, 进行总RNA提取^[8]. 分别收集SGC-7901和SGC-7901/VCR, 加入1 mL TRIzol反复吹打, 室温放置5 min, 加入0.2 mL氯仿, 充分混匀, 室温放置2 min. 12 000 g 4℃离心15 min, 取上清, 加入0.5 mL异丙醇室温放置10 min, 12 000 g 4℃离心10 min, 弃上清, 750 mL/L乙醇洗两次, 弃去乙醇, 倒置于空气中干燥5 min, DEPC水溶解沉淀, 用紫外分光光度计检测260 nm和280 nm波长的吸光度值(A值), 计算 A_{260}/A_{280} 比值(纯度)及RNA含量, 并用琼脂糖凝胶电泳检查RNA的完整性. GCS基因引物根据Primer5.0分析软件自行设计, 上游引物: 5'-CCTTTCCTCTCCCCACCTTCCTCT-3', 下游引物: 5'-GGTTTCAGAAAGAGAGACACCTGGG-3', 扩增片段为302 bp; GAPDH为内参照, 序列为上游: 5'-CGCTGAGTACGTCTGGAGT-3', 下游: 5'-ATGTCATCATATTGGCAGGTT-3', 扩增片段为501 bp. 用提取的总RNA为模板, 以Oligo为引物进行逆转录, 合成单链cDNA. 以cDNA为模板进行PCR扩增, PCR反应体系25 μL: Taq酶1 U, 上下游引物各1.5 μL, 逆转录产物5 μL, dNTP 2 μL. PCR反应条件为94℃预变性5 min, 95℃变性30 s, 60℃退火30 s, 72℃延伸90 s, 30个循环后, 72℃延伸5 min. 取PCR产物5 μL与上样缓冲液混合后进行15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察并照相. 使用Syngene凝胶分析系统软件扫描各条带灰度值, 以GCS指数(GCS灰度值和内参照灰度值的比值)进行GCS mRNA表达水平的半定量分析.

1.2.3 免疫细胞化学检测GCS的表达^[9] 分别将SGC-7901细胞、SGC-7901/VCR细胞接种于6孔板, 6孔板内预先放置盖玻片, 待细胞爬片过夜后, 取出盖玻片, 丙酮固定, SABC法免疫组化染色, DAB显色. 按SABC试剂盒说明操作, 结果判

■相关报道

Weiss、扬泉、孙妍琳、李江涛 *et al* 研究报道了人黑色素瘤细胞、人口腔表皮样癌、人乳腺癌细胞、人胆囊癌中葡萄糖神经酰胺合成酶基因的表达和意义, 为本实验立题参考提供了帮助.

■创新盘点

本实验采取体外培养人耐长春新碱胃癌细胞和人敏感胃癌细胞, 应用RT-PCR、免疫细胞化学技术对人胃癌细胞中GCS基因表达及意义进行了探讨和研究, 国内外尚未见相关报道, 因此具有一定的创新性.

■应用要点

本实验采取体外培养人耐长春新碱胃癌细胞和人敏感胃癌细胞,通过MTT法检测耐药倍数,RT-PCR法检测SGC-7901和SGC-7901/VCR两种细胞GCS mRNA的表达,免疫组化法测定GCS蛋白表达水平,发现胃癌细胞特别是耐药细胞SGC-7901/VCR中GCS基因高表达,为胃癌耐药性的进一步研究打下基础,也为临床胃癌耐药的逆转治疗提供了新的思路。

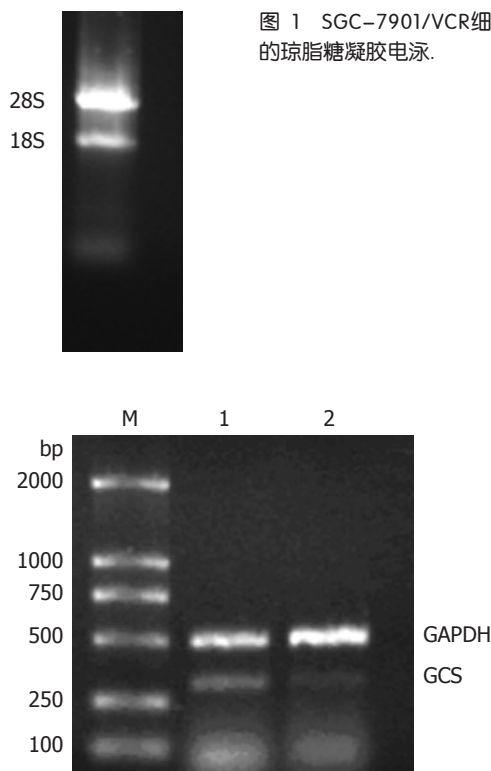


图2 RT-PCR检测GCS mRNA的表达. M: Marker; 1: SGC-7901细胞; 2: SGC-7901/VCR细胞。

定:胞质出现棕黄色染色为阳性着色细胞。随机观察10个高倍镜视野计算细胞阳性率。

统计学处理 数据采用SPSS10.0统计软件做单因素方差分析和成组设计的 t 检验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞耐药性的测定 以药物浓度的对数为横坐标,以细胞生长的抑制率为纵坐标求出SGC-7901, SGC-7901/VCR细胞的 IC_{50} 值分别为 1.40 ± 0.06 mg/L和 86.20 ± 0.50 mg/L, SGC-7901/VCR细胞耐药指数约为61。

2.2 RNA纯度及完整性测定 $RNA A_{260}/A_{280} = 1.9$,琼脂糖凝胶电泳结果(图1)显示28S及18S条带清晰, RNA纯度及完整性符合后续实验要求。

2.3 亲本细胞和耐药细胞GCS mRNA表达 亲本细胞株SGC-7901及耐药株SGC-7901/VCR均表达GCS基因,但SGC-7901/VCR表达强于SGC-7901, SGC-7901/VCR细胞GCS指数为3.9, SGC-7901细胞指数为0.5,二者差异有统计学意义($P < 0.05$, 图2)。

2.4 亲本细胞和耐药细胞GCS蛋白表达 免疫细胞化学的标本上, GCS阳性呈棕黄色颗粒,位于胞质内,在SGC-7901细胞中,大多数阳性颗粒细

图1 SGC-7901/VCR细胞RNA的琼脂糖凝胶电泳。

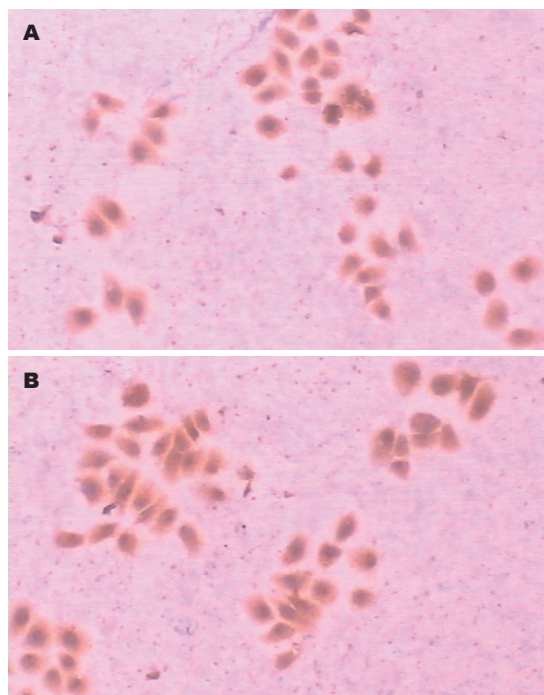


图3 GCS蛋白表达(SABC, ×200). A: SGC-7901细胞; B: SGC-7901/VCR细胞。

小,少数细胞阳性颗粒粗大(图3A), SGC-7901/VCR细胞阳性颗粒粗大,数量多,着色深(图3B)。SGC-7901细胞和SGC-7901/VCR细胞GCS蛋白表达阳性率分别为18%和65%,二者差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

葡萄糖神经酰胺(glucosylceramide, GlcCer)是由葡萄糖神经酰胺合成酶催化尿苷二磷酸葡萄糖(uridine diphosphate glucose, UDP-glucose)上的糖基以 β 型糖苷键与神经酰胺相结合而生成的^[10],他是细胞合成其他鞘糖脂(glycosphingolipids, GSLs)的前体物质, GlcCer与肿瘤细胞的生物学行为密切相关,不仅维持着细胞的正常结构功能,还参与了细胞增殖,分化及肿瘤细胞的发生与发展^[11-12],同时GCS使神经酰胺糖基化为葡萄糖神经酰胺,降低了神经酰胺的促凋亡作用,促进了肿瘤细胞多药耐药的发生^[13],其活性增高被认为是引起肿瘤获得性多药耐药产生的原因之一。GCS在癌细胞的表达和意义愈来愈被人们重视, Senchenkov *et al*^[14]报道,在乳腺癌细胞株MCF-7中转入神经酰胺糖基合成酶基因后,细胞内神经酰胺表达减少,糖基化的神经酰胺表达增多,肿瘤细胞凋亡减少。有报道GCS基因在乳腺癌细胞中表达, GCS对于乳腺癌的发生、发展具有重要作用^[15]。人耐VCR的

■名词解释

1 葡萄糖神经酰胺合成酶(glucosylceramide synthase, GCS):是调控神经酰胺代谢的关键酶之一,其活性水平与肿瘤细胞多药耐药有密切关系。

2 葡萄糖神经酰胺:是由葡萄糖神经酰胺合成酶催化UDP glucose上的糖基以 β 型糖苷键与神经酰胺相结合而生成的,不仅维持着细胞的正常结构功能,还参与了细胞增殖,分化及肿瘤细胞的发生与发展。

HL-60及耐阿霉素的KB细胞GCS表达也较其敏感株有显著增加^[13,16-17]。GCS使神经酰胺糖基化导致其细胞毒性效应减弱,促进了肿瘤耐药的发生,抑制GCS可显著提高肿瘤对于化疗的敏感性。

本实验结果显示,在人敏感胃癌细胞中和耐药胃癌细胞中都有GCS基因的表达,且耐药胃癌细胞中GCS基因表达显著高于亲本敏感胃癌细胞,耐药细胞GCS蛋白表达也显著高于敏感细胞的GCS蛋白表达,提示GCS基因在胃癌细胞中表达,GCS促进胃癌细胞的增殖分化,GCS基因对于胃癌的发生、发展具有重要作用,耐药胃癌细胞中GCS蛋白高表达,表明GCS参与了肿瘤耐药的发生,与肿瘤多药耐药密切相关。GCS基因在人胃癌细胞表达为临床肿瘤治疗提供了新的思路,GCS基因在耐药细胞的表达增加提示降低或封闭GCS的表达可以提高肿瘤的药物敏感性,化疗时合用抑制该靶点的药物,可提高胃癌细胞对药物的敏感性,提高化疗疗效,这为肿瘤耐药的逆转治疗提供了新的方向。

4 参考文献

- 1 Lavie Y, Cao H, Bursten SL, Giuliano AE, Cabot MC. Accumulation of glucosylceramides in multidrug-resistant cancer cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 19530-19536
- 2 Gouaze V, Yu JY, Bleicher RJ, Han TY, Liu YY, Wang H, Gottesman MM, Bitterman A, Giuliano AE, Cabot MC. Overexpression of glucosylceramide synthase and P-glycoprotein in cancer cells selected for resistance to natural product chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 633-639
- 3 Weiss M, Hettner S, Smith P, Ladisch S. Inhibition of melanoma tumor growth by a novel inhibitor of glucosylceramide synthase. *Cancer Res* 2003; 63: 3654-3658
- 4 孙妍琳, 周庚寅, 李锴男, 林晓燕, 高鹏, 郭成浩, 侯丽. 人乳腺癌细胞中葡萄糖神经酰胺合成酶基因的表达和意义. *中国现代普通外科进展* 2005; 8: 141-143
- 5 李江涛, 彭淑牖, 刘颖斌, 王新保, 王海军, 王建伟, 许斌, 李海军, 冯雪冬, 钱浩然, 吴育连, 方河清. 糖基化神经酰胺合成酶及相关基因的表达与人胆囊癌多药耐药. *中华普通外科杂志* 2005; 20: 382-383
- 6 李杰, 刘玉琴. MTT法在肿瘤研究中的改良及应用进展. *中国肿瘤临床* 1998; 25: 312-313
- 7 马荣, 陈曦海, 张岂凡, 唐丽萍. 反义Survivin核酸诱导凋亡及逆转胃癌耐药机制的实验研究. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1139-1145
- 8 J.萨母布鲁克, D.W.拉塞尔. 分子克隆实验指南. 第3版. 北京: 科学出版社, 2003: 522-525
- 9 Wu XX, Kakehi Y, Mizutani Y, Lu J, Terachi T, Ogawa O. Activation of caspase-3 in renal cell carcinoma cells by anthracyclines or 5-fluorouracil. *Int J Oncol* 2001; 19: 19-24
- 10 Bleicher RJ, Cabot MC. Glucosylceramide synthase and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1585: 172-178
- 11 Reynolds CP, Maurer BJ, Kolesnick RN. Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy. *Cancer Lett* 2004; 206: 169-180
- 12 Uchida Y, Murata S, Schmuth M, Behne MJ, Lee JD, Ichikawa S, Elias PM, Hirabayashi Y, Holleran WM. Glucosylceramide synthesis and synthase expression protect against ceramide-induced stress. *J Lipid Res* 2002; 43: 1293-1302
- 13 Shabbits JA, Mayer LD. P-glycoprotein modulates ceramide-mediated sensitivity of human breast cancer cells to tubulin-binding anticancer drugs. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 205-213
- 14 Senchenkov A, Litvak DA, Cabot MC. Targeting ceramide metabolism-a strategy for overcoming drug resistance. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 347-357
- 15 Gouaze V, Liu YY, Prickett CS, Yu JY, Giuliano AE, Cabot MC. Glucosylceramide synthase blockade down-regulates P-glycoprotein and resensitizes multidrug-resistant breast cancer cells to anticancer drugs. *Cancer Res* 2005; 65: 3861-3867
- 16 Uchida Y, Itoh M, Taguchi Y, Yamaoka S, Umehara H, Ichikawa S, Hirabayashi Y, Holleran WM, Okazaki T. Ceramide reduction and transcriptional up-regulation of glucosylceramide synthase through doxorubicin-activated Sp1 in drug-resistant HL-60/ADR cells. *Cancer Res* 2004; 64: 6271-6279
- 17 Litvak DA, Bilchik AJ, Cabot MC. Modulators of ceramide metabolism sensitize colorectal cancer cells to chemotherapy: a novel treatment strategy. *J Gastrointest Surg* 2003; 7: 140-148; discussion 148

■同行评价

本文分析了胃癌细胞GCS基因和蛋白水平的表达,发现胃癌细胞,尤其是耐长春新碱细胞株表达高水平的GCS,提示GCS可能参与了胃癌的发生过程,文章的科学性较高。

电编 张敏 编辑 张焕兰