

gC1qR 基因致胃癌细胞凋亡的作用及其机制研究

侯进军¹, 杨洋¹, 朱成海², 高玲娟³

1. 南京市栖霞区妇幼保健院检验科, 江苏 南京 210028; 2. 南京市栖霞区妇幼保健院内科, 江苏 南京 210028;
3. 南京市妇幼保健院检验科, 江苏 南京 210004

摘要: **目的** 观察球状 C1q 受体(gC1qR)对胃癌细胞凋亡的影响及其可能的机制。**方法** 收集 2017 年 1 月至 2018 年 6 月就诊的 12 例胃癌患者的胃癌组织及其对应的癌旁组织,其中年龄(78.0 ± 6.5)岁的老年胃癌组 6 例,年龄(48.3 ± 3.6)岁的非老年胃癌组 6 例;另选由杭州赫贝生物技术提供的胃癌细胞株 MKN-28(人胃癌高分化腺癌细胞株)。对患者的胃癌组织和癌旁组织,采用 Real-time PCR 方法检测其幽门螺杆菌(Hp)DNA 表达水平;免疫印迹法(Western blot)检测 gC1qR 蛋白的表达;免疫组化方法检测 gC1qR 蛋白的表达及定位情况。通过构建 gC1qR 基因载体转染胃癌细胞株 MKN-28,采用流式细胞技术检测 gC1qR 过表达载体组、空载体组和空白对照组细胞凋亡情况。**结果** 胃癌组织 Hp 感染率显著高于癌旁正常组织(75.0% vs 33.3%, $P=0.010$)。非老年胃癌组织和老年胃癌组织 gC1qR 蛋白的相对表达量均明显低于癌旁正常组织(0.37 ± 0.03 vs 0.74 ± 0.05, $P<0.01$; 0.22 ± 0.02 vs 0.76 ± 0.04, $P<0.01$);且老年胃癌组显著低于非老年胃癌组($P<0.01$)。gC1qR 过表达载体组细胞凋亡率 40.6%,空载体组 8.7%,空白对照组 6.2%,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** gC1qR 基因具有显著诱导胃癌细胞凋亡的作用,其有望成为胃癌诊断、治疗及预后的判断新靶标。

关键词: 胃癌; 球状 C1q 受体; 凋亡; 幽门螺杆菌

中图分类号: R 735.2 文献标识码: B 文章编号: 1674-8182(2019)10-1408-04

Effect of gC1qR gene on apoptosis of gastric cancer cells and its mechanism

HOU Jin-jun*, YANG Yang, ZHU Cheng-hai, Gao Ling-juan

*Department of Clinical Laboratory, Maternal and Child Health Hospital of Qixia District, Nanjing, Jiangsu 210028, China

Corresponding author: ZHU Cheng-hai, E-mail: zhuchenghai6688@163.com

Abstract: Objective To observe the effect of globular C1q receptor (gC1qR) on apoptosis of gastric cancer cells and its possible mechanism. **Methods** The gastric cancer tissues and their corresponding adjacent tissues of 12 patients with gastric cancer treated from January 2017 to June 2018 were collected. Among them, elderly group aged (78.0 ± 6.5) years, non-elderly group aged (48.3 ± 3.6) years, each group with 6 cases. The gastric cancer cell line MKN-28 (human gastric cancer highly differentiated adenocarcinoma cell line) provided by Hangzhou Hebei Biotechnology was also selected. PCR method was used to detect helicobacter pylori (Hp) DNA level; Western blot analysis was applied to detect the expression of gC1qR protein; immunohistochemical method was used to detect the protein expression and its localization of gC1qR in gastric tissues and paracancerous tissues. The gC1qR gene vector was constructed and transfected into gastric cancer cell line MKN-28; flow cytometry was used to detect the cells apoptosis in gC1qR overexpression vector group, blank vector group and blank control group. **Results** The Hp infection rate of gastric cancer tissues was significantly higher than that of adjacent normal tissues (75.0% vs 33.3%, $P=0.010$). The relative expression of gC1qR protein in non-elderly gastric cancer tissues and elderly gastric cancer tissues was significantly lower than that in adjacent normal tissues (0.37 ± 0.03 vs 0.74 ± 0.05, $P<0.01$; 0.22 ± 0.02 vs 0.76 ± 0.04, $P<0.01$), respectively; and the relative expression of gC1qR protein in elderly group was significantly lower than that in non-elderly group ($P<0.01$). The apoptosis rate of gC1qR overexpression vector group was 40.6%, empty vector group was 8.7%, blank control group was 6.2%, the difference was statistically significant ($P<0.01$). **Conclusion** The gC1qR gene can significantly induce apoptosis of gastric cancer cells, and it is expected to be a new target for the diagnosis, treatment and prognosis of gastric cancer.

Key words: Gastric cancer; Globular C1q receptor; Apoptosis; Helicobacter pylori

Fund program: Nanjing Medical Science and Technology Development Project in 2016 (YKK16292)

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,世界卫生组织国际癌症研究机构最新统计显示,2018 年全球范围内将有大约 1 810 万癌症新发病例和 960 万癌症死亡病例,其中胃癌在新发病例中排名第五,死亡率位列第三,而在中国,胃癌发生率和死亡率都居于第二位^[1]。球状 C1q 受体(gC1qR)作为 C1q 的一种模式识别受体分子,是一种线粒体膜蛋白,可介导众多生物反应,如干扰细胞正常的生长周期、诱导细胞的形态异常以及启动细胞内部的凋亡程序。大量研究表明,gC1qR 在多种肿瘤细胞中异常表达且参与肿瘤的生长、增殖、分化等生理病理过程^[2]。但目前 gC1qR 在胃癌发生发展中的作用尚无明确阐述,因此本研究旨在探讨 gC1qR 在胃癌中的表达及其生物学意义。

1 对象与方法

1.1 研究对象 研究对象包括胃癌患者的组织标本及外购的胃癌细胞株。(1)选择 2017 年 1 月至 2018 年 6 月在南京市栖霞区妇幼保健院(原南京市迈皋桥医院)就诊的胃癌患者,男 6 例,女 6 例;年龄 43 ~ 89 岁,分别收集胃镜活检胃窦部癌组织和癌旁组织标本,所有纳入患者均经活检病理学明确诊断为胃癌,且治疗前均未接受过任何放疗、化疗和其他抗肿瘤等治疗。根据年龄将受试者分为两组:老年胃癌组 6 例,年龄(78.0 ± 6.5)岁,其对应癌旁组织 6 例;非老年胃癌组 6 例,年龄(48.3 ± 3.6)岁,其对应癌旁组织 6 例,标本取材后均放置于 -79 °C 冻存备用。(2)胃癌细胞株 MKN-28(人胃癌高分化腺癌细胞株)由杭州赫贝生物技术有限公司提供。

1.2 方法 对胃癌患者的胃癌组织和癌旁组织,通过 ABI PRISM 7300 序列检测仪器对幽门螺杆菌(Hp)DNA 的水平进行实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)方法的检测;Western blot 检测 gC1qR 蛋白的表达(试剂由 Cell Signaling Technology 提供);免疫组织化学方法检测 gC1qR 蛋白的表达及定位情况。对胃癌细胞株 MKN-28,采用 Beckman Coulter Epics XL 流式细胞仪检测其凋亡情况。

1.3 胃癌细胞培养 将胃癌细胞株 MKN-28 接种于含有 15% 胎牛血清,非必需氨基酸 10 ml/L, pH 7.2 的完全培养液中,取 4 ml 完全营养液加入至 50 ml 培养瓶中,置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中,每 1 ~ 2 天换液 1 次。

1.4 Real-time PCR 方法检测 Hp DNA 水平 将胃黏膜活检组织裂解于 100 μl 裂解缓冲液中,加入蛋

白酶 K 1 μl,充分震荡 3 min;将混悬液置于 55 °C, 1 h 后,煮沸 10 min,以 10 000 rpm 离心 15 min,留取上清液。吸去核酸提取液 4 μl,加入 PCR 反应液 46 μl,充分混匀,10 000 rpm 离心 15 s,以如下条件进行反应,37 °C 3 min,94 °C 4 min;94 °C 25 s,55 °C 30 s,72 °C 40 s 进行扩增,40 次循环,最后室温放置 15 s。采用荧光 487 nm 激发波长,525 nm 检测波长进行监测,数值 < 1 × 10² copies/ml 的样本定义为 Hp 阴性标本,反之为阳性标本。

1.5 Western blot 法检测 取活检的胃癌组织及对应癌旁组织剪碎后加入细胞裂解液均匀裂解,4 °C 振荡或冰上震荡裂解 30 min(于摇床上)。4 °C 以 10 000 ~ 12 000 rpm 离心 10 min。取上清液定量,备用。每泳道上样量为 3.84 μg,进行电泳。目的蛋白被适当分离后,将转膜后的 PVDF 膜放入含 3% 的脱脂奶粉 TBS 中封闭 2 h,用洗涤液洗膜 3 次,每次 5 min。加入 3% 脱脂奶粉稀释一抗,P53,gC1qR 和 GAPDH 按照 1:1 000 稀释 4 °C,16 h。用洗涤液洗膜 3 次,每次 10 min。加入辣根过氧化物酶(HRP)结合的二抗(购自贝斯特生物技术),按照 1:5 000 放置室温 2 h。用洗涤液洗膜 3 次,每次 10 min。ECL 显色:A 液和 B 液按 1:1 混合,加到膜上。化学发光仪显影拍照,以 Bio-Rad 凝胶成像分析仪,对印迹条带进行灰度扫描,采用以下公式计算:目的蛋白/内参蛋白。

1.6 质粒构建 在 gC1qR 引物序列中分别加入 Xho I 和 BamH I 酶切位点,设计针对 gC1qR cDNA,其上游序列为:Primer-F(5'-AAT CAC ACG GTA GAC ACT GAA ATG CC-3'),下游序列为:Primer-R(5'-CAT CAT CCC ATC TAA AAT GTC CCC TG-3')。酶切体系按如下进行,0.1 μg pcDNA3.1 质粒载体,0.2 μg gC1qR cDNA 模板,加无菌水至 7.5 μl,45 °C 加温 6 min,冷却至 0 °C。加入 0.1 μl T4DNA 连接酶(10 U/μl),100 ng pcDNA3.1 载体,加入无菌水至 10 μl,RM 反应 2.5 h,分别构建重组质粒,命名为 pcDNA3.1-gC1qR,以上质粒构建成功后,-20 °C 保存备用。通过 gC1qR 表达质粒的构建,获得稳定转染 gC1qR 表达质粒或表达沉默质粒的胃癌细胞株 MKN-28,将培养的胃癌细胞分为三组,分别为 gC1qR 过表达载体组、空载体组和空白对照组。

1.7 胃癌细胞凋亡检测 收集胃癌细胞株 MKN-28 并将其制备成细胞悬液,调整细胞数为 5 × 10⁶/ml。500 ~ 1 000 r/min 离心 5 min,弃去培养液。用预冷、4 °C 无菌的 PBS 充分洗涤细胞两次,用 250 μl 结合

缓冲液重新悬浮细胞。取 100 μl 的细胞悬液于 5 ml 流式管中,加入 5 μl Annexin V-异硫氰酸荧光素 (FITC) 和 10 μl 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的碘化丙啶 (PI) 溶液,混合后室温下避光孵育 10 min。孵育后加入 400 μl 结合缓冲液,立即上流式细胞仪分析(实验须在 1 h 内完成)。早期和晚期凋亡细胞分别分布在 Q1-LR 和 Q1-UR 区,坏死细胞位于 Q1-UL 区。本研究中凋亡细胞数为 Q1-LR 区和 Q1-UR 区之和,以百分数表示。

1.8 免疫组化染色 将活检的胃癌组织及癌旁组织标本经 4% 多聚甲醛室温下固定 10 min,梯度甲醇脱水,4 μm 石蜡切片常规脱蜡至水化,根据试剂要求微波抗原修复后,依次加入 3% 过氧化氢和正常非免疫动物血清封闭,温育 15 min;滴加一抗 50 μl ,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;PBS 冲洗,加二抗(美国 Santa Cruz 公司)37 $^{\circ}\text{C}$,1 h,DAB 显色并适时终止,苏木素复染 2 min,盐酸甲醇分化后脱水,透明,中性树胶封片,最后镜下观察。以细胞质内有棕褐色颗粒判定为阳性染色结果。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件处理数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布及方差齐性者,作两因素方差分析及两两比较的 LSD-*t* 检验;计数资料以频数(%)表示,组间比较作确切概率法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

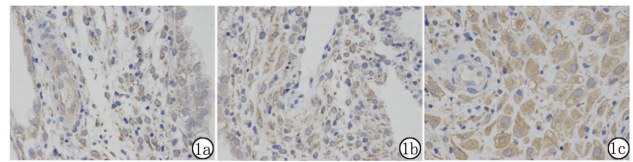
2.1 Hp 感染率的检测 实验结果显示,胃癌组织 Hp 阳性 9 例(老年组 5 例,非老年组 4 例);癌旁正常组织 Hp 阳性 4 例,胃癌组织 Hp 感染率显著高于癌旁正常组织(75.0% vs 33.3%, $P = 0.010$)。

2.2 gC1qR 蛋白的表达 Western blot 结果显示,非老年胃癌组织 gC1qR 蛋白的相对表达量明显低于其对应的癌旁正常组织(0.37 ± 0.03 vs 0.74 ± 0.05 , $P < 0.01$);老年胃癌组织 gC1qR 蛋白的相对表达量明显低于其对应的癌旁正常组织(0.22 ± 0.02 vs 0.76 ± 0.04 , $P < 0.01$);且老年胃癌组显著低于非老年胃癌组($P < 0.01$)。

2.3 gC1qR 蛋白定位 免疫组化结果显示,gC1qR 蛋白主要定位于细胞质,呈明显棕黄色颗粒;与癌旁正常组织比较,gC1qR 蛋白在老年及非老年胃癌组患者组织中的阳性细胞数量及染色强度均明显下降,与 Western blot 结果呈现高度一致性。见图 1。

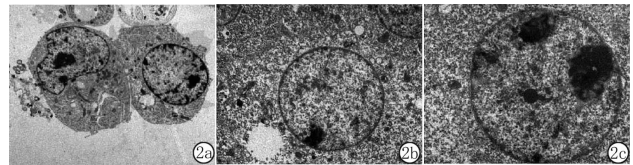
2.4 胃癌细胞株 MKN-28 的凋亡检测 本研究构建了 gC1qR 基因载体,转染胃癌细胞株 MKN-28,结果发现,gC1qR 过表达载体组胃癌细胞凋亡数量明显增多,细胞出现空泡、肿胀、染色质凝集等显著细胞凋亡特征,细胞凋亡率为 40.6%;空载体组细胞凋亡率

8.7%;空白对照组细胞凋亡率为 6.2%。gC1qR 过表达载体组细胞凋亡率明显高于空载体组和空白对照组($P < 0.01$)。见图 2。



注:1a:老年胃癌组织;1b:非老年胃癌组织;1c:癌旁正常组织。

图 1 gC1qR 蛋白在三种组织中表达的免疫组化结果($\times 400$)



注:2a:gC1qR 过表达载体组;2b:空载体组;2c:空白对照组。

图 2 胃癌细胞株 MKN-28 电镜下形态($\times 3700$)

3 讨论

胃癌发生发展的确切致病因素目前尚不清楚,可归结为多种因素导致多基因突变累积和相互作用的结果^[3];正常情况下,胃部黏膜细胞增殖和凋亡在体内处于相对动态平衡,保持着体内相对恒定的细胞群体数量,当细胞增殖过度或失控以及细胞凋亡的抑制打破这一平衡,可造成异常细胞的堆积,也增加 DNA 复制错误以及各种致癌因子诱导 DNA 基因突变的几率,从而导致胃部肿瘤的发生发展^[4]。林秋雄等^[5]研究发现,胃黏膜癌变过程中,正常胃黏膜、萎缩性胃炎、肠上皮化生等前三个阶段增殖指数与凋亡指数同步上升,不典型增生期到胃癌阶段增殖指数继续上升,而凋亡指数则呈现逐步下降的现象,这种变化也被称之为“细胞选择性增殖”现象,从而进一步表明,细胞增殖与细胞凋亡之间的平衡失调是导致胃癌发生的重要因素之一。

近几年研究显示,老年人因非甾体抗炎药使用增加、消化功能减弱、萎缩性胃炎发病率增高等因素增加,其 Hp 易感染率显著高于年轻人,由 Hp 感染造成对老年人危害尤为显著;胃上皮细胞凋亡的增加是 Hp 感染的标志,感染的上皮细胞可能是胃癌发生的重要因素。Hp 菌株的共同特点是特异性毒力基因的表达,从而增加诱发胃腺癌的风险^[6]。在长时间的 Hp 感染过程中,细胞凋亡的增强更为持久地促进上皮细胞的增殖,是级联致癌事件发生的关键过程^[7-8],有研究发现 Hp I 型菌株(CagA+, VacA+)感染可引起正常胃黏膜上皮细胞的凋亡和快速增殖,干扰细胞增殖周期,导致胃黏膜上皮细胞增殖与凋亡

动力学改变,从而引起肿瘤的发生^[9-10]。本研究通过对 Hp 感染率的检测实验,可以看出胃癌组织 Hp 的感染率明显高于癌旁正常组织,提示 Hp 感染与胃癌的发生具有紧密相关性。

众多癌基因、原癌基因和抑癌基因参与细胞凋亡过程的调控,癌基因的过度表达或抑癌基因的缺失或失活最终将导致肿瘤的发生。胃上皮细胞中 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(Bcl-2)、Bax、p53 等基因通过 Caspase-3、Fas/FasL、Bcl-2/Bax 等途径调控细胞的增殖与凋亡,从而可能影响胃癌的发生发展^[11-12]。gC1qR 作为线粒体内的糖蛋白,具有多向性调节作用,主要参与蛋白质的加工翻译、细胞周期的进程、细胞的增殖、衰老与凋亡等生理活动^[13-14],可异常表达于多种肿瘤组织中并参与它们的生长增殖及分化。王伟等^[15]报道,过表达的 gC1qR 基因可明显促进卵巢癌细胞的凋亡同时降低卵巢癌细胞的增殖活性和迁移率。gC1qR 在肿瘤细胞凋亡中的作用也成为近几年的研究热点。有研究表明,gC1qR 基因可以通过 P53 依赖的线粒体依赖性途径,促使宫颈癌细胞内的活性氧浓度、P53 蛋白表达水平的增加,进而诱导宫颈癌细胞的凋亡^[16-17]。本研究结果显示,gC1qR 蛋白在胃癌组织中的表达显著低于癌旁正常组织,尤其老年癌症组的降低更明显。对胃癌细胞凋亡的检测可发现转染 gC1qR 基因载体的胃癌细胞其凋亡率显著增高。基于此,本研究推测胃癌的发生可能与 gC1qR 基因的缺失和 Hp 感染等密切相关,其作用机制较为复杂,有待进一步研究。

综上所述,gC1qR 基因在胃癌细胞凋亡中发挥重要作用,在该过程中 gC1qR 基因可能通过引发线粒体功能障碍,诱导胃癌细胞凋亡。gC1qR 很有可能成为胃部肿瘤诊断、治疗及预后的新靶标之一,因此进一步研究 gC1qR 与胃癌发生发展的相关机制具有更为实际的临床应用价值。

参考文献

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68 (6):394-424.

[2] Ghebrehiwet B, Ji Y, Tumma N, et al. The receptor for the globular heads of C1q, gC1qR, is a potential therapeutic target in breast cancer [J]. *Molecular Immunology*, 2015, 67 (1):140-141.

[3] Song Z, Wu Y, Yang J, et al. Progress in the treatment of advanced gastric cancer [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39 (7):1010428317714626.

[4] 葛建荣. 细胞凋亡与胃癌的发生发展 [J]. *临床消化病杂志*, 2003, 15 (5):236-238.

[5] 林秋雄, 骆新兰, 林华欢, 等. 胃癌的发生与胃上皮细胞增殖和凋亡的相关性 [J]. *实用医学杂志*, 2001, 17 (12):1164-1165.

[6] Gobert AP, Wilson KT. Human and helicobacter pylori interactions determine the outcome of gastric diseases [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, 400:27-52.

[7] Bimczok D, Smythies LE, Waites KB, et al. Helicobacter pylori infection inhibits phagocyte clearance of apoptotic gastric epithelial cells [J]. *J Immunol*, 2013, 190 (12):6626-6634.

[8] Bae SE, Jung HY, Kang JN, et al. Effect of Helicobacter pylori eradication on metachronous recurrence after endoscopic resection of gastric neoplasm [J]. *Am J Gastroenterol*, 2014, 109 (1):60-67.

[9] Meine GC, Rota C, Dietz J, et al. Relationship between cagA positive Helicobacter pylori infection and risk of gastric cancer: a case control study in Porto Alegre, RS, Brazil [J]. *Arq Gastroenterol*, 2011, 48 (1):41-45.

[10] 温晋锋, 陈春晓, 陈韶华. 幽门螺杆菌对胃上皮细胞及胃癌细胞增殖凋亡的影响 [J]. *临床内科杂志*, 2015, 32 (1):29-32.

[11] 李宇. 细胞凋亡与胃癌发生研究进展 [J]. *重庆医科大学学报*, 2001, 26 (2):220-222.

[12] Buti L, Spooner E, Van der Veen AG, Helicobacter pylori cytotoxin-associated gene A (CagA) subverts the apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP2) tumor suppressor pathway of the host. [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108 (22):9238-9243.

[13] Paasonen L, Sharma S, Braun G B, et al. New p32/gC1qR ligands for targeted tumor drug delivery [J]. *Chembiochem*, 2016, 17 (7):570-575.

[14] Berman JP, Farkouh M, Sethi S, et al. gC1qR: a novel biomarker associated with risk of cardiovascular events [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 61 (10):E193.

[15] 王伟, 纪捷, 程雪, 等. 卵巢癌中 gC1qR 的表达及其凋亡机制 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2017, 33 (11):1213-1218.

[16] 赵伟, 高玲娟, 钟天鹰. 球状 C1q 受体在宫颈癌中的表达及其生物学意义 [J]. *医学研究生学报*, 2016, 29 (3):257-261.

[17] Chen ZL, Gu PQ, Liu KS, et al. The globular heads of the C1q receptor regulate apoptosis in human cervical squamous carcinoma cells via a p53-dependent pathway [J]. *J Transl Med*, 2012, 10:255.

收稿日期:2019-03-01 修回日期:2019-03-20 编辑:石嘉莹