

Beclin1在CO₂气腹促进人卵巢癌细胞SKOV3增殖转移中的作用

黄金智¹, 谢贤聪¹, 张玲莉¹, 谭晓瑜², 张颖^{1*} (1. 广东医科大学附属第一医院妇产科, 广东湛江 524001; 2. 广东医科大学, 广东湛江 524023)

摘要: **目的** 在细胞水平探讨Beclin1在CO₂气腹促进人卵巢癌细胞SKOV3增殖转移过程中的作用。**方法** 采用脂质体介导的瞬时转染法转染, 分成Beclin1过表达组、对应的GV362空质粒组、Beclin1干扰表达组、对应的pGPH1空质粒组、单纯脂质体组(空白对照组), CO₂压力相同, 作用相同时间。采用qRT-PCR(定量反转录聚合酶链反应)和Western blot检测各组细胞中Beclin1的mRNA表达情况, 采用超氧化物歧化酶法(WST-1)检测各组细胞的增殖情况, 采用Transwell实验检测各组细胞的迁移能力。**结果** Beclin1过表达组的卵巢癌SKOV3细胞增殖率明显升高, 干扰质粒组细胞增殖率明显降低($P<0.05$)。Beclin1过表达组穿透进入下室的SKOV3细胞明显增多, 而Beclin1干扰表达质粒组则明显减少($P<0.05$)。**结论** Beclin1在CO₂气腹中能促进人卵巢癌细胞株SKOV3的增殖与迁移。

关键词: 卵巢癌; Beclin1; 二氧化碳气腹; 增殖转移; SKOV3

中图分类号: R 737

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2020)01-0020-04

Role of Beclin1 in enhancing the proliferation and metastasis of human ovarian cancer cell line SKOV3 in the course of carbon dioxide pneumoperitoneum

HUANG Jin-zhi¹, XIE Xian-cong¹, ZHANG Ling-li¹, TAN Xiao-yu², ZHANG Ying^{1*} (Department of Gynaecology and Obstetrics, the Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China; 2. Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of Beclin1 in enhancing the proliferation and metastasis of human ovarian cancer cell line SKOV3 in the course of carbon dioxide pneumoperitoneum. **Methods** Liposome-mediated transient transfection was used, and there were Beclin1 Overexpression Group, corresponding GV362 Empty Plasmid Group, Beclin1 Interference Expression Group, corresponding pGPH1 Empty Plasmid Group and Simple Liposome Group (control group) divided with the same CO₂ pressure and action time. qRT-PCR and Western blot were used to detect the mRNA expression of Beclin1 in the cells in each group. WST-1 was used to detect the proliferation of the cells in each group. Transwell assay was used to detect the cell migration ability in each group. **Results** The Beclin1 Overexpression Group had the proliferation rate of SKOV3 significantly increased and had the Beclin1 Interference Expression Group had the proliferation rate significantly decreased ($P<0.05$). The Beclin1 Overexpression Group had the number of SKOV3 cells penetrating into the lower chamber significantly increased while the Beclin1 Interference Expression Group had such number significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Beclin1 can enhance the proliferation and migration ability of ovarian cancer SKOV3 cells in CO₂ pneumoperitoneum.

Key words: ovarian cancer; Beclin1; carbon dioxide pneumoperitoneum; proliferation and metastasis; SKOV3

目前腹腔镜技术在外科手术中运用越来越广泛。因腹腔镜术常需建立CO₂气腹通道, 而气腹可能造成腹部膨胀, 导致腹压上升, 某些恶性肿瘤经腹腔镜术后, 由于高压力的CO₂气腹有可能引发恶

性肿瘤的种植转移^[1-2]。为研究Beclin1表达增高在CO₂气腹中是否能够促进卵巢癌细胞株SKOV3的增殖、迁移, 分析其是否存在伴随CO₂气腹时间延长而提升肿瘤细胞转移的风险, 本课题以卵巢癌细胞株SKOV3为研究对象, 模拟CO₂气腹环境, 探索促进卵巢癌细胞增殖转移能力的分子机制, 为腹腔镜临床应用安全性的评估提供依据。

1 材料和方法

基金项目: 广东省科技计划资助项目(No.2008B030301019)

收稿日期: 2019-10-14; **修订日期:** 2020-01-08

作者简介: 黄金智(1975-), 男, 在读博士, 副主任医师

通信作者: 张颖(1966-), 女, 博士, 主任医师, E-mail: 1983063872@qq.com

1.1 实验材料与试剂

1.1.1 实验仪器 模块化培养室和流量计购自比卢普斯罗森堡公司; CO₂气罐和减压阀购自湛江氧气厂。

1.1.2 实验试剂 人卵巢癌细胞株SKOV3购自上海典藏细胞库; 过表达质粒、空质粒、干扰表达质粒及阴性对照质粒购于上海吉玛公司; Beclin1和GAPDH引物由上海生工生物技术有限公司合成; 兔抗人Beclin1多克隆抗体、抗兔单克隆抗体、兔抗人GAPDH单克隆抗体购自美国Abcam公司; Lipofectamine 2000转染试剂购自Invitrogen公司; Transwell小室购自康宁公司; WST-1试剂盒购自碧云天公司; 无内毒素质粒大提试剂盒购自天根公司。

1.2 方法

1.2.1 人工模拟CO₂气腹的建立 采用模块化孵育箱及其CO₂气罐模拟CO₂气腹环境, 进气压力恒定, 对SKOV3细胞株作用3 h。CO₂作用期间将模块化孵育箱置于细胞培养箱中, 尽量与临床腹腔镜环境接近, 建立人卵巢癌SKOV3细胞株CO₂气腹模型。

1.2.2 实验分组 采用脂质体介导的瞬时转染法, 分为Beclin1过表达组、对应的GV362空质粒组、Beclin1干扰表达组、对应的pGPH1空质粒组、单纯脂质体组(空白对照组), 处理时CO₂压力相同, 作用时间相同。

1.2.3 qRT-PCR实验 5组细胞分别提取细胞总RNA, 测定RNA浓度和纯度, 进行实时荧光定量。

1.2.4 Western blot实验 5组细胞分别提取总蛋白, BCA(Bicinchoninic acid)法测定蛋白浓度, 制备上样蛋白, 免疫印迹以观察各组蛋白的表达情况。

1.2.5 超氧化物歧化酶法(WST-1)检测细胞增殖 细胞铺板, 建立模拟气腹环境, 按照试剂盒说明书配置WST-1溶液。除上述5组, 另设立空白孔(即无细胞孔, 孔内加入同量的培养基), 将各处理组置于细胞培养箱内培养24 h后, 经CO₂气腹模型处理3 h, 继续于细胞培养箱培养24 h, 然后每孔加入10 μL WST-1溶液, 在细胞培养箱内继续培养2 h, 用酶标仪检测492 nm处的吸光度, 分析细胞增殖情况。

1.2.6 Transwell细胞迁移实验 细胞铺板, 建立模拟气腹环境, 5组细胞置于细胞培养箱内培养, 转染质粒, 步骤同上。造模后, 消化细胞, 在Transwell小室的上室接种1×10⁵个细胞, 下室内加入500 μL含有2%胎牛血清的RPMI1640培养液, 培养2 h, 建立CO₂气腹, 然后进行固定、染色, 显微镜高倍镜下观察细胞迁移情况并计数, 对比各组迁移细胞数的

差异。

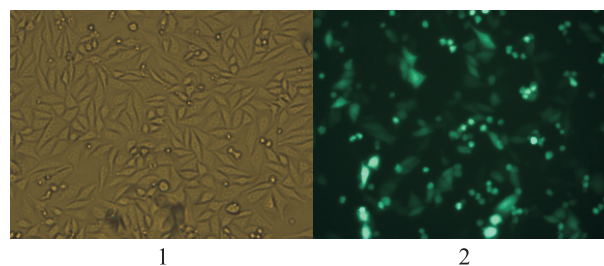
1.3 统计学处理

采用GraphPad Prism 5进行数据分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多个样本之间的比较, 满足方差齐性的条件下采用单因素方差分析及LSD检验, 不满足方差齐性的条件下采用单因素方差分析及Dunnett T 3检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染效果

转染24 h后观察荧光表达, 随机5个高倍镜荧光表达如图1, 转染效率为40%~50%, 转染成功。



1.普通光镜图; 2.荧光表达图

图1 转染24 h后荧光表达(×400)

2.2 Beclin1的mRNA表达情况

RT-PCR检测Beclin1的mRNA表达情况, 由图2可知: 与脂质体空白对照组和空质粒(转染各自的空载体质粒GV362和pGPH1)组相比, 转染Beclin1过表达质粒组的Beclin1 mRNA表达明显增高, 而转染Beclin1干扰表达质粒组的Beclin1 mRNA表达则明显受到抑制, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。空白对照组与空质粒组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

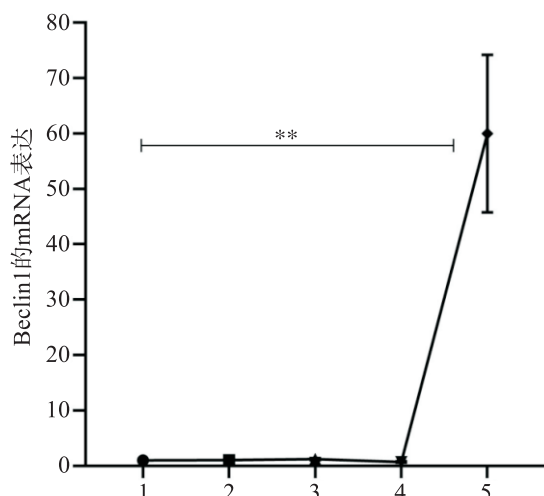
2.3 Beclin1蛋白表达情况

Western blot检测Beclin1的表达情况, 由图3、4可知, Beclin1过表达组与脂质体空白对照组和GV362空质粒组比较, Beclin1蛋白表达明显增高; Beclin1干扰表达组与脂质体空白对照组和pGPH1空质粒组比较, Beclin1蛋白表达明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。空白对照组与空质粒组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 WST-1细胞增殖结果

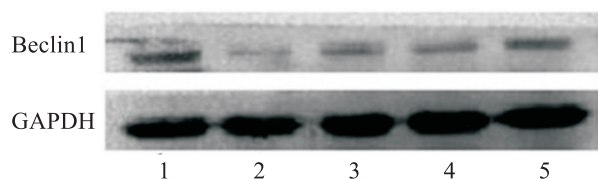
WST-1细胞增殖结果如图5所示, Beclin1过表达组与脂质体空白对照组和GV362空质粒组比较, 细胞增殖率明显增高; Beclin1干扰表达组与脂质体空白对照组和pGPH1空质粒组比较, 细胞增殖率则明显降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。空白对照组

与空质粒组差异无统计学意义($P>0.05$)。



1: 空白对照组; 2: pGPH1空质粒组; 3: GV362空质粒组; 4: Beclin1干扰表达组; 5: Beclin1过表达组; **表示Beclin1过表达组和Beclin1干扰表达组分别与空白对照组及空质粒组比较: $P<0.05$

图2 各种细胞Beclin1 mRNA的表达情况



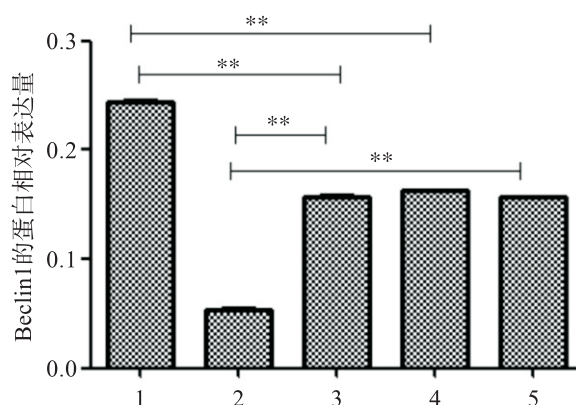
1: Beclin1过表达组; 2: Beclin1干扰表达组; 3: 空白对照组; 4: GV362空质粒组; 5: pGPH1空质粒组

图3 Beclin1的蛋白表达情况

2.5 Tanswell细胞迁移

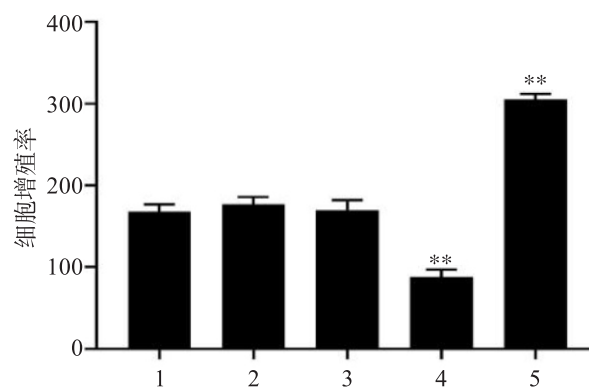
Tanswell小室迁移结果如图6、7所示, Beclin1过表达组与脂质体空白对照组和GV362空质粒组比较, 迁移入下室的细胞明显增多; Beclin1干扰表达组与脂质体空白对照组和pGPH1空质粒组比较, 迁移入下室的细胞明显减少, 差异均有统计学意义($P<$

0.05)。空白对照组与空质粒组差异无统计学意义($P>0.05$)。



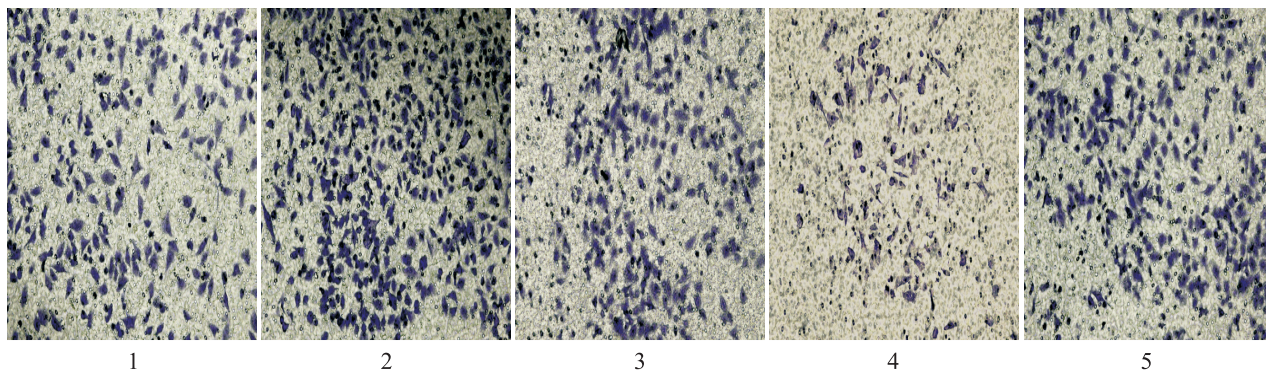
1: Beclin1过表达组; 2: Beclin1干扰表达组; 3: 空白对照组; 4: GV362空质粒组; 5: pGPH1空质粒组; **表示Beclin1过表达组和Beclin1干扰表达组分别与空白对照组及空质粒组比较: $P<0.05$

图4 各组Beclin1蛋白相对表达量的比较



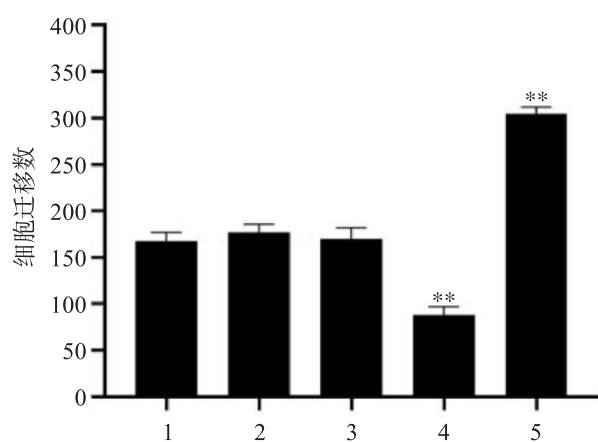
1. 空白对照组; 2. GV362空质粒组; 3. pGPH1空质粒组; 4. Beclin1干扰表达组; 5. Beclin1过表达组; **表示Beclin1过表达组和Beclin1干扰表达组分别与空白对照组及空质粒组比较: $P<0.05$

图5 各组细胞增殖率的比较



1: 空白对照组; 2: Beclin1过表达组; 3: GV362空质粒; 4: Beclin1干扰表达组; 5: pGPH1空质粒

图6 各组细胞结晶紫染色在高倍显微镜下的结果($\times 200$)



1.空白对照组; 2.GV362空质粒组; 3.pGPH1空质粒组;
4.Beclin1干扰表达组; 5.Beclin1过表达组; **表示Beclin1过表达组和Beclin1干扰表达组分别与空白对照组及空质粒组比较; $P < 0.05$

图7 各组细胞迁移数的比较

3 讨论

目前腹腔镜技术已运用于多种普通腹部外科疾病的诊治。但近年来研究发现某些恶性肿瘤经腹腔镜术后, 容易出现穿刺孔或腹腔内转移^[1-2], 其治疗恶性肿瘤中的应用, 医学界出现一些异议。因为腹腔镜术中通常需建立CO₂气腹通道, 而气腹可能造成腹部膨胀, 导致腹压上升。相关研究表明高压CO₂气腹产生的机械性压迫和CO₂吸收所致的不利影响表现在呼吸、循环、消化、神经内分泌和炎症应激等多个方面^[3-6]。其中最令人关注的是高压力的CO₂气腹有可能引发恶性肿瘤的种植转移。CO₂气腹促进肿瘤生长和扩散, 主要反映在CO₂气腹会增加创口肿瘤细胞的沾染机会, 其酸性环境有利于肿瘤细胞的生长, 易引起腹膜、内脏缺血, 影响机体免疫力, 导致肿瘤扩散。CO₂气腹不仅可以影响腹膜及细胞微环境, 甚至对肿瘤细胞基因及相关因子产生影响, 最终引起肿瘤细胞增殖及侵袭能力的改变。

Beclin1是重要的自噬相关基因, 本课题在CO₂处理下, 发现上调Beclin1基因的过表达, SKOV3发生了增殖转移, 而抑制Beclin1基因的表达后, SKOV3细胞的增殖转移明显降低, 这提示CO₂气腹可能通过上调Beclin1基因的表达, 进而诱导自噬的发生, 增强了人卵巢癌细胞株SKOV3的活力以及抵御不良环境的能力, 从而使细胞增殖及迁移能力增强, 促进了卵巢癌的生长和转移。有研究证实, 饥

饿状态下的卵巢癌SKOV3细胞能迅速诱导自噬的发生, 而在使用自噬抑制剂或干扰Beclin1表达后, 卵巢癌细胞的活力降低, 细胞的生长增殖能力被抑制^[7]。Beclin1促进卵巢癌细胞株SKOV3的增殖转移可能是因为CO₂制造的缺氧饥饿环境, 但其发挥作用的具体机制还不明确。

早期部分学者认为CO₂气腹有促进恶性肿瘤增殖的作用。然而近年来, 许多学者的研究却得出了相反的结论, 即CO₂气腹环境对肿瘤细胞的生长增殖有抑制作用。Cai等^[8]在体外研究还发现, 湿润的CO₂可以用来治疗和预防结肠癌腹腔种植。因此, CO₂气腹对肿瘤细胞种植和增殖转移的影响不能一概而论, 还需要不断深入研究。

参考文献:

- [1] SHI Y K, MOU Y P, WANG Y Y, et al. Surgical treatment of port-site metastases after laparoscopic radical resection of gastric cancer[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2019, 99(32): 2497-2500.
- [2] 张利军, 王旺河, 田鹏. 腹腔恒温热灌注联合静脉化疗治疗Ⅱ~Ⅲ期直肠癌术后患者的临床疗效[J]. 实用癌症杂志, 2017, 32(9): 1508-1510, 1514.
- [3] 贺伟忠, 杨义, 郑孝振, 等. 不同呼吸模式对SLIPA喉罩全麻下腹腔镜手术人工二氧化碳气腹期肺功能的影响[J]. 广东医学, 2017, 38(7): 1078-1081.
- [4] 赵歆, 高鸿, 王竹梅, 等. 妇科腹腔镜手术二氧化碳气腹合并体位改变对心脏电生理稳定性的影响[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(9): 1461-1463.
- [5] 赵伟, 赵善峰, 唐思锋, 等. 高浓度氧气置换二氧化碳气腹对腹腔镜术后腹腔厌氧菌感染的影响[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(24): 3788-3791.
- [6] 杨作天, 梁大顺, 廖历兴, 等. 脑电双频指数监测丙泊酚靶控输注对腹腔镜直肠癌根治术老年患者术后认知功能的影响[J]. 广东医科大学学报, 2018, 36(6): 679-682.
- [7] KIHARA A, KABEYA Y, OHSUMI Y, et al. Beclin1-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network[J]. EMBO Rep, 2001, 2(4): 330-335.
- [8] CAI W, DONG F, WANG Z, et al. Heated and humidified CO₂ pneumoperitoneum inhibits tumour cell proliferation, migration and invasion in colon cancer[J]. Int J Hyperthermia, 2014, 30(3): 201-209.