

网络出版时间: 2019-9-19 10:04 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190917.1059.008.html>

初步探究 hsa_circ_0008797 对胃癌细胞顺铂耐药性的影响

刘文博, 高敏, 刘婉婷, 顾康生

摘要 目的 探究环状 RNA (circRNA) hsa_circ_0008797 在胃癌顺铂耐药细胞及敏感细胞中的表达差异性; 并通过敲低和调高 hsa_circ_0008797 在细胞中的表达, 检测胃癌细胞顺铂耐药性的变化。方法 提取胃癌顺铂敏感细胞株 AGS、BGC-823、SGC7901 及胃癌顺铂耐药细胞株 SGC7901/DDP 中的 RNA, 采用实时荧光半定量 PCR (RT-PCR) 检测各胃癌细胞株中 hsa_circ_0008797 的相对表达量。通过 shRNA 干扰 SGC7901 细胞中 hsa_circ_0008797 的表达, 同时对 SGC7901/DDP 细胞中 hsa_circ_0008797 进行过表达; 采用 CCK-8 法、流式细胞技术检测各细胞的顺铂耐药性变化。结果 hsa_circ_0008797 在胃癌顺铂敏感细胞株 AGS、BGC-823、SGC7901 中的表达量相对较高, 而在胃癌顺铂耐药细胞株 SGC7901/DDP 中的表达量相对较低 ($P < 0.05$)。过表达 hsa_circ_0008797 后, 胃癌细胞 SGC7901/DDP 对顺铂的耐药性下降 ($P < 0.05$); 敲低 hsa_circ_0008797 的表达后, 胃癌细胞 SGC7901 对顺铂的耐药性增加 ($P < 0.05$)。结论 hsa_circ_0008797 可逆转胃癌细胞对顺铂的耐药性, 可能在胃癌顺铂耐药性产生过程中发挥着一定作用。

关键词 胃癌; circRNA; 顺铂; 化疗耐药

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)11-1702-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.11.008

胃癌在我国发病率、死亡率都很高^[1]。胃癌早期无特异性症状, 大部分患者一经确诊已经处于胃癌的中晚期, 失去根治性手术的机会。而不能手术的晚期胃癌患者目前主要的治疗方式是以铂类药物为基础联合氟尿嘧啶药物为主的化疗。但是胃癌铂类耐药性的产生成为提高患者治疗质量的一大难题。大量的研究^[2]表明, 环状 RNA (circRNA) 能够调节多种细胞生理和病理过程, circRNA 在体内异常表达常与多种疾病相关, 此外还与胰腺癌、乳腺癌

等肿瘤的耐药性有关。circRNA 在胃癌中的作用也逐渐被学者们发现, circRNA 可以作为胃癌早期诊断、预后分析的标志物^[3], 但是 circRNA 与胃癌细胞耐药性间的关系及机制依旧未知。为此本课题组通过 CCK-8 法及流式细胞术探讨了 circRNA hsa_circ_0008797 与胃癌细胞耐药性之间关系, 为进一步探究 circRNA 作用胃癌细胞耐药性产生的机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人胃癌细胞株 AGS、BGC-823、SGC7901 及其顺铂耐药细胞株 SGC7901/DDP 均购于中国科学院上海细胞库; shRNA 质粒和过表达质粒购于上海吉马制药公司; 胎牛血清购于浙江天杭生物(四季青)公司; 细胞培养基 RPMI-1640 购于美国 HyClone 公司; 细胞 RNA 提取试剂 TRIzol、转染用脂质体 2000 (lipo2000)、Opti-mem 培养基购于美国 Invitrogen 公司; 逆转录酶试剂盒、SYBR 荧光定量 PCR 试剂盒购于日本 TaKaRa 公司; 细胞毒性活力检测 CCK-8 试剂盒购于上海碧云天公司; Annexin V-FITC 双染细胞凋亡试剂盒购于贝博生物科技公司; 实时荧光半定量 PCR (RT-PCR) 产物的测序由上海生工生物工程公司完成。

1.2 细胞培养 四种胃癌细胞培养用 10% 的胎牛血清、1% 青霉素-链霉素(双抗)添加到细胞培养基 RPMI-1640 制成的完全细胞培养基, 细胞常规培养在 5% CO₂ 37 °C 的培养箱中。每天观察细胞生长状态, 常规 2~3 d 更换培养基 1 次。待细胞汇合度达 90% 左右时进行细胞传代。SGC7901/DDP 细胞还需培养在含 800 ng/ml 顺铂的培养基中, 以维持细胞顺铂耐药性。

1.3 细胞的转染 挑选处于对数生长期的细胞, 将其均匀接种到 6 孔板中, 用不含双抗的完全细胞培养基培养, 待细胞生长汇合度至 60%~70% 时准备转染。将含有 shRNA 质粒 (4 μg) 或者过表达质粒 (3 μg) 的载体分别加入到含有 250 μl Opti-mem 培养基的 EP 管中, 轻混匀。另取 1 个无菌 EP 管加入 250 μl Opti-mem 培养基, 再加入 8 μl lipo2000, 轻混

2019-06-24 接收

基金项目: 安徽省对外科技合作计划项目(编号: 1604b0602027); 安徽省自然科学基金(编号: 1808085MH306)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科, 合肥 230022

作者简介: 刘文博, 男, 硕士研究生;

顾康生, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: 13805692145@163.com

匀,室温孵育 5 min。将上述两管溶液混合均匀,室温静置 20 min。更换 6 孔板中细胞培养基,每孔加入 1.5 ml 无双抗的完全培养基。逐滴将混合溶液加入到 6 孔板中,边加边轻晃摇匀培养基。常规培养 24 h 后于荧光显微镜下观察细胞的转染情况,如细胞转染效率较高则更换新鲜培养基进行下一步实验。shRNA 序列:上游 5'-CCACUCAAGAUGUAUG-GUCTT-3',下游 5'-GACCAUACAUCUUGAGUGGTT-3'。

1.4 细胞 RNA 的提取 挑选生长良好、对数生长期的细胞,将培养基吸尽,用冷 PBS 清洗 2 次,弃去废液。加入适量的 TRIzol 试剂(6 孔板中加 200 μ l, 10 cm 大皿加 1 ml)吹打液体至澄清,静置 5 min。每 1 ml 裂解液中加入 200 μ l 氯仿,立即手摇剧烈震荡 15 s,静置 5 min。4 $^{\circ}$ C、11 240 r/min 离心 15 min,收集上清液至无酶 EP 管中。加入等量异丙醇,轻晃摇匀,静置,上述条件离心 10 min。弃上清液,加入 1 ml 75% 乙醇溶液,震荡,使沉淀悬浮。4 $^{\circ}$ C、8 880 r/min 离心 5 min,重复上述操作 1 次。空气中干燥 5~10 min,加入 DEPC 水,60 $^{\circ}$ C 放置 10 min。采用紫外分光光度计 Nanodrop1000 检测 RNA 浓度及纯度,并稀释定量。整个操作应该在无酶环境下进行,实验所用耗材及试剂均为无酶。

1.5 RT-PCR 根据逆转录试剂盒说明书,采用随机引物法分别将从细胞中提取的 RNA 逆转录成 cDNA。按照 RT-PCR 说明书依次将 Premix Ex Taq 10 μ l、上游引物 0.8 μ l、下游引物 0.8 μ l、ROX Reference Dye 0.4 μ l、cDNA 2 μ l、无酶水 6 μ l 加入到无酶的八联管中,配成 20 μ l 的扩增体系。上机检测,扩增条件为:预变性 95 $^{\circ}$ C、30 s,1 个循环;定量分析 95 $^{\circ}$ C、5 s,60 $^{\circ}$ C、31 s,40 个循环;溶解曲线 95 $^{\circ}$ C、15 s,60 $^{\circ}$ C、1 min,95 $^{\circ}$ C、15 s,1 个循环。以 GAPDH 为内参,GAPDH 上游引物序列:5'-GGC-CTCCAAGGAGTAAGACC-3',下游引物序列:5'-AGGGGAGATTCTAGTGTGCTG-3'。hsa_circ_0008797 的上游引物序列:5'-GGCCTCCAAGGAGTAAGACC-3',下游引物序列:5'-AGGGGAGATTCTAGTGTGCTG-3'。每次实验每个样本设置两个复孔,实验重复 3 次。

1.6 CCK-8 实验 将处于对数生长期生长状态良好的 SGC7901 和 SGC7901/DDP 细胞分别接种于 96 孔板内,每孔接种细胞数约 5×10^4 个。培养过夜,按上述步骤进行转染细胞,shRNA 转染 SGC7901 细胞,过表达质粒转染 SGC7901/DDP 细胞。待细胞

转染 48 h 后,吸尽孔内培养基,分别在各孔中加入 100 μ l 且含有下列顺铂浓度的培养基。SGC7901 细胞各组顺铂浓度:0、0.125、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 μ g/ml;SGC7901/DDP 细胞各组顺铂浓度:0、0.625、1.25、2.5、5.0、10.0、20.0 μ g/ml;常规培养 48 h 后,吸尽各孔中培养基,再用 PBS 洗涤细胞 1 次。依次在各孔加入 100 μ l 新鲜培养基后,再加入 10 μ l CCK-8 试剂,混匀,培养箱中培养 1 h。最后将 96 孔板放置在酶标仪上,于 490 nm 处检测各孔细胞的 OD 值。每个实验重复 3 次以上,每次设置 4 个复孔。

1.7 细胞凋亡实验 分别将处于对数生长期的 SGC7901 和 SGC7901/DDP 细胞接种到 6 孔板中,培养至细胞汇合度为 60%~70%,分别对细胞进行转染。将转染后的细胞置于 CO₂ 培养箱中培养 48 h。分别将 SGC7901 细胞或 SGC7901/DDP 细胞培养在含顺铂浓度为 0.2 μ g/ml 或 2 μ g/ml 的不含双抗的完全培养基中。培养 24 h 后,用不含 EDTA 的胰蛋白酶将细胞消化下来,冷 PBS 洗涤细胞 2 次,400 μ l AnnexinV 结合液重悬细胞。加入 5 μ l AnnexinV-FITC 染色液,混匀,4 $^{\circ}$ C 避光 15 min。加入 10 μ l PI 染色液,混匀,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 5 min,上机检测。

1.8 统计学处理 使用 SPSS 19.0 软件分析所有实验数据,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 GraphPad Prism 7.0 对实验数据进行图形处理。仅比较两组数据时使用 *t* 检验,多组间数据比较使用 ANOVA 检验。*P* < 0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hsa_circ_0008797 在胃癌细胞株中的表达量

通过 RT-PCR 检测分析顺铂耐药细胞株 SGC7901/DDP 与 SGC7901 的表达量,结果显示:与亲本细胞株 SGC7901 比较,SGC7901/DDP 中 hsa_circ_0008797 表达量明显较低,差异有统计学意义(*t* = 11.93, *P* < 0.01);随后检测其他顺铂敏感胃癌细胞株 AGS、BGC-823 中 hsa_circ_0008797 的表达量,结果显示:与顺铂耐药细胞株 SGC7901/DDP 比较,hsa_circ_0008797 在 AGS、BGC-823 细胞中的表达量较高,差异有统计学意义(*t* = 50.51, *P* < 0.001; *t* = 9.596, *P* < 0.05)。见图 1。

2.2 hsa_circ_0008797 的鉴定 通过 circbase 数据库(<http://www.circbase.org/>)获得 hsa_circ_0008797 的碱基序列并确定该 circRNA 拼接位点

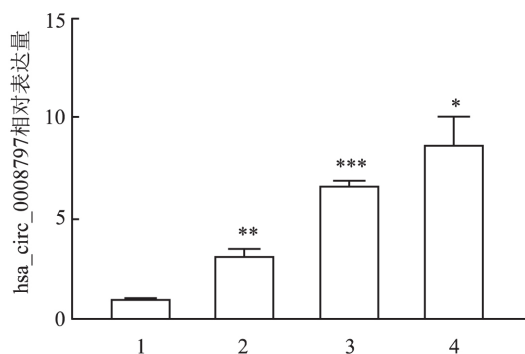


图1 hsa_circ_0008797在胃癌细胞株中的相对表达量

1: SGC7901/DDP; 2: SGC7901; 3: BGC823; 4: AGS; 与SGC7901/DDP细胞组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

(Splice Junction) 两端的碱基序列。序列检测发现 hsa_circ_0008797 来源于 GSK3B 外显子 7-10 反向剪切拼接形成的环状 RNA。随后通过对 RT-PCR 的产物进行 Sanger 测序, 确定 Splice Junction 的存在, 证明该 circRNA 确实以环状结构存在, 而非线性结构。见图 2。

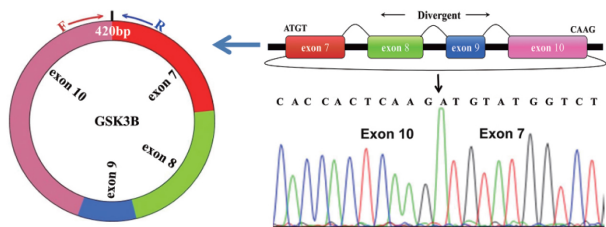


图2 hsa_circ_0008797的结构示意图及鉴定

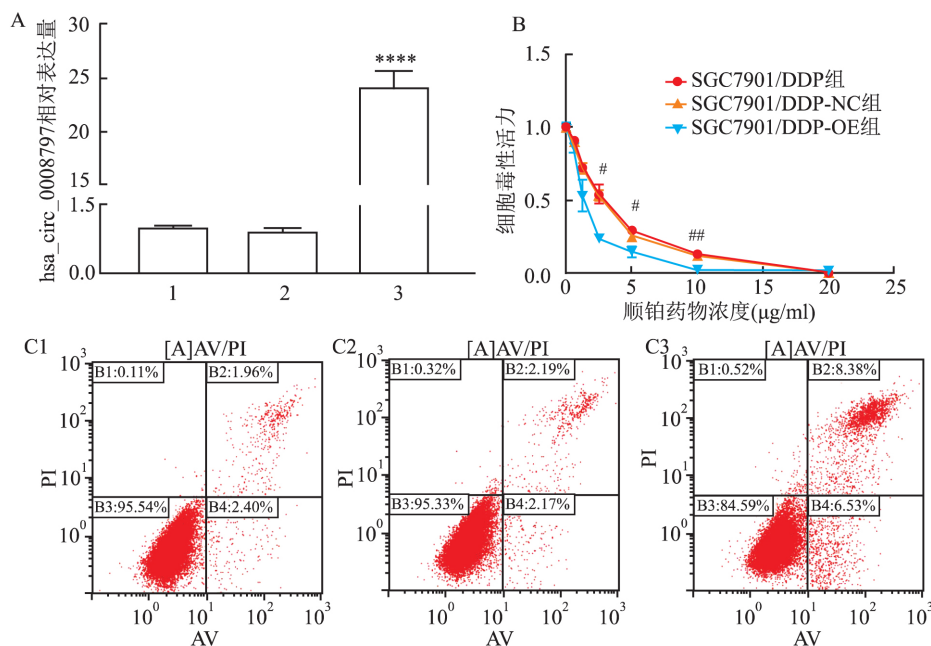


图3 过表达 hsa_circ_0008797 逆转 SGC7901/DDP 细胞的顺铂耐药性

A: RT-PCR 分析转染后 hsa_circ_0008797 的表达水平; B: CCK-8 法测定转染后的 SGC7901/DDP 细胞毒性活力; C: 过表达质粒转染 SGC7901/DDP 细胞的凋亡率测定; 1: SGC7901/DDP 组; 2: SGC7901/DDP-NC 组; 3: SGC7901/DDP-OE 组; 与 SGC7901/DDP 组比较: **** $P < 0.0001$; 与 SGC7901/DDP 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.3 SGC7901/DDP 细胞中 hsa_circ_0008797 过表达对细胞顺铂耐药性的影响 将构建的 circRNA 过表达质粒载体转染到 SGC7901/DDP 细胞中。通过 RT-PCR 检测分析 circRNA 质粒转染细胞组 (SGC7901/DDP-OE)、转染无义组 (SGC7901/DDP-NC) 以及对照组 (未被转染的 SGC7901/DDP 细胞) 中的 hsa_circ_0008797 的表达水平, 验证转染是否成功且质粒能否在 SGC7901/DDP 细胞过表达该 circRNA。结果显示, 与 SGC7901/DDP 组和 SGC7901/DDP-NC 组比较, SGC7901/DDP-OE 组细胞 hsa_circ_0008797 的表达水平显著增加, 差异有统计学意义 ($F = 711.6$, $P < 0.0001$) (图 3A)。随后分别以不同浓度的顺铂作用上述三组细胞, 通过 CCK-8 法检测细胞的毒性活力变化。实验结果显示: 当顺铂浓度为 2.5、5.0、10 $\mu\text{g/ml}$, 胃癌细胞对顺铂的耐药性降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (图 3B)。通过流式细胞术检测 hsa_circ_0008797 的表达水平对 SGC7901/DDP 细胞凋亡产生的影响。结果显示: SGC7901/DDP-OE 组 (15.23 ± 1.6)% 与 SGC7901/DDP 组 (5.32 ± 0.86)% 和 SGC7901/DDP-NC 组 (5.64 ± 1.0)% 比较, 细胞的凋亡率明显增加, 差异有统计学意义 ($F = 67.67$, $P < 0.0001$) (图 3C)。根据上述结果可见, 上调 hsa_circ_0008797 的表达量可逆转胃癌细胞对顺铂药物的耐药性。

2.4 敲低 SGC7901 细胞中的 hsa_circ_0008797 对细胞顺铂敏感性的影响 基于上述实验结果,通过 shRNA 将 SGC7901 细胞中 hsa_circ_0008797 的表达量敲低,RT-PCR 分析 shRNA 转染后的 SGC7901 细胞(SGC7901-KD)、转染无义组(SGC7901-NC)及对照组(未转染的 SGC7901 细胞)中 hsa_circ_0008797 的表达水平。结果显示:SGC7901-KD 组 hsa_circ_0008797 的表达量明显低于 SGC7901 组和 SGC7901-NC 组,差异有统计学意义($F = 24.95$, $P < 0.001$) (图 4A)。同样,CCK-8 实验检测不同浓度顺铂作用 SGC7901 细胞后细胞的毒性活力的变化。结果显示:当顺铂浓度为 0.25、0.5、1.0 $\mu\text{g/ml}$ 时,敲低 hsa_circ_0008797 的表达可增加细胞对顺铂的耐药性,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$) (图 4B)。流式细胞术测定细胞凋亡率发现,敲低该 circRNA 在细胞中的表达后($5.33 \pm 0.57\%$),与 SGC7901 组($12.09 \pm 1.47\%$)和 SGC7901-NC 组($11.49 \pm 1.10\%$)比较,细胞的凋亡率下降,差异有统计学意义($F = 34.25$, $P < 0.001$) (图 4C)。综上所述,敲低胃癌细胞中 hsa_circ_0008797 的表达可一定程度上增加胃癌细胞对顺铂的耐药性。

3 讨论

circRNA 是一类广泛存在细胞内且生物功能多样的内源性 RNA,它们主要是通过反向剪接拼接形成环状的非编码 RNA,没有 5'端和 3'端的多腺苷酸化尾巴^[4]。过去的观点认为,circRNA 是基因剪切时错配形成的产物或者由 mRNA 转录形成的副产物^[5]。随着生物信息技术和全基因组测序技术的发展,越来越多 circRNA 逐渐被学者们发现,它在细胞中的功能也逐渐被研究和了解。circRNA 具有丰富的生物学功能,它不仅调节细胞周期还可以促进细胞的自我增殖^[6]。此外还有学者发现 circRNA 可以作为 miRNA 的海绵,靶向 mRNA 从而促进细胞自噬,由此可见 circRNA 还可能参与调控细胞的凋亡^[7]。circRNA 还具有翻译蛋白的功能,Zhang et al^[8]报道 circRNA circ-PINT 可以翻译一种新的功能性多肽 PINT87aa,以抑制各种致癌基因的转录时的延伸。circRNAs 的异常表达在调节肿瘤细胞生长发育过程中起到重要作用,但它是一把双刃剑,既可以发挥癌基因的作用,又可以担当抑癌基因的角色,与肿瘤的侵袭性、远处转移以及肿瘤患者的预后有很大的关联性^[9]。与胃癌相关的 circRNA 也有报

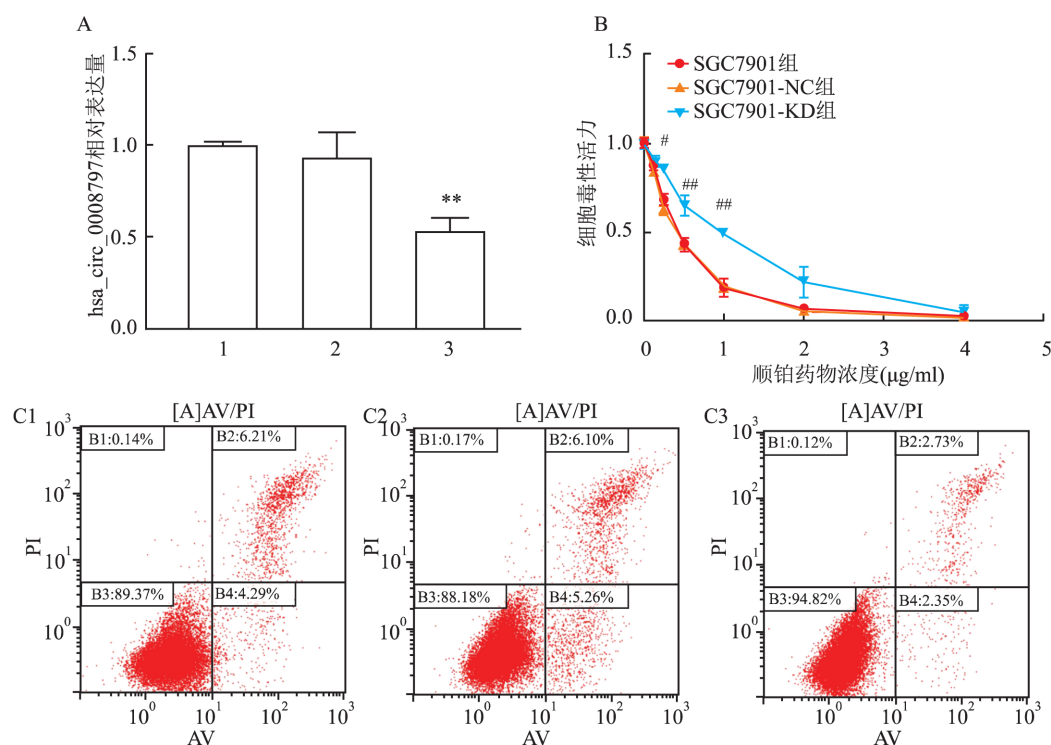


图4 敲低 hsa_circ_0008797 减低 SGC7901 细胞对顺铂的敏感性

A: RT-PCR 分析转染后 hsa_circ_0008797 的表达水平; B: CCK-8 法测定转染后的 SGC7901 细胞毒性活力; C: 过表达质粒转染 SGC7901 细胞的凋亡率测定; 1: SGC7901 组; 2: SGC7901-NC 组; 3: SGC7901-OE 组; 与 SGC7901 组比较: ** $P < 0.01$; 与 SGC7901 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

道, Li et al^[10] 研究证实 hsa_circ_002059 在胃癌组织中下调, 其在手术后患者血浆中表达与手术前相比明显降低。hsa_circ_002059 的低表达与性别、年龄、远处转移和 TNM 分期显著相关, 可作为胃癌诊断的新型标志物。Chen et al^[11] 通过 RNA 测序分析发现 circRNA circ-PVT1 在癌组织中表达上调, circ-PVT1 的高表达提示胃癌患者的无病生存期与总生存期更长。双荧光素酶报告证实, circ-PVT1 可作为 miR-125 家族的海绵间接调节 E2F2 转录因子的表达, 促进细胞集落形成并参与细胞周期调控。

尽管已经有学者通过实验研究发现, 某些 circRNA 与骨肉瘤^[12]、胰腺癌^[13]、乳腺癌^[14] 的化疗耐药性有关, 但是关于 circRNA 在胃癌耐药中作用的研究还未见报道, circRNA 与胃癌耐药性之间的关系目前还不清楚。本研究结果显示 hsa_circ_0008797 在顺铂敏感细胞株 AGS、BGC-823、SGC7901 的表达量均高于顺铂耐药细胞株 SGC7901/DDP, 表明 hsa_circ_0008797 可能增强胃癌细胞对顺铂的敏感性。通过升高 SGC7901/DDP 细胞中 hsa_circ_0008797 的表达后发现细胞对顺铂的耐药性降低。进一步的实验结果表明, 敲低 SGC7901 细胞中 hsa_circ_0008797 的表达, 细胞对顺铂的耐药性增高。可见 hsa_circ_0008797 的表达量与胃癌细胞的顺铂耐药性成负相关。hsa_circ_0008797 有望成为预测胃癌细胞顺铂疗效的标志物, 以及治疗胃癌顺铂耐药的潜在标志物。由于 circRNA 的调控细胞的机制十分复杂, 后期将探究 hsa_circ_0008797 通过何种信号通路及途径对胃癌细胞的耐药性产生影响, 从而进一步阐明胃癌顺铂耐药产生的生物机制。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in china, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115–32.
- [2] Geng Y, Jiang J, Wu C. Function and clinical significance of circRNAs in solid tumors[J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 98.
- [3] 刘帅臣, 李玉明. 环状 RNA 在胃癌中的研究进展[J]. *医学研究杂志*, 2018, 47(9): 17–9.
- [4] Liu J, Liu T, Wang X, et al. Circles reshaping the RNA world: from waste to treasure[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 58.
- [5] 李培飞, 陈声灿, 邵永富, 等. 环状 RNA 的生物学功能及其在疾病发生中的作用[J]. *生物物理学报*, 2014, 30(1): 15–23.
- [6] Zhu P, Zhu X, Wu J, et al. IL-13 secreted by ILC2s promotes the self-renewal of intestinal stem cells through circular RNA circPan3[J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(2): 183–94.
- [7] Zhou Z B, Niu Y L, Huang G X, et al. Silencing of circRNA. 2837 plays a protective role in sciatic nerve injury by sponging the mir-34 family via regulating neuronal autophagy[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 12: 718–29.
- [8] Zhang M, Zhao K, Xu X, et al. A peptide encoded by circular form of LINC-PINT suppresses oncogenic transcriptional elongation in glioblastoma[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4475.
- [9] Li J, Yang J, Zhou P, et al. Circular RNAs in cancer: novel insights into origins, properties, functions and implications[J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(2): 472–80.
- [10] Li P, Chen S, Chen H, et al. Using circular RNA as a novel type of biomarker in the screening of gastric cancer[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 444: 132–6.
- [11] Chen J, Li Y, Zheng Q, et al. Circular RNA profile identifies circPVT1 as a proliferative factor and prognostic marker in gastric cancer[J]. *Cancer Lett*, 2017, 388: 208–19.
- [12] Kun-Peng Z, Xiao-Long M, Chun-Lin Z. Overexpressed circPVT1, a potential new circular RNA biomarker, contributes to doxorubicin and cisplatin resistance of osteosarcoma cells by regulating ABCB1[J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(3): 321–30.
- [13] Shao F, Huang M, Meng F, et al. Circular RNA signature predicts gemcitabine resistance of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 584.
- [14] Gao D, Zhang X, Liu B, et al. Screening circular RNA related to chemotherapeutic resistance in breast cancer[J]. *Epigenomics*, 2017, 9(9): 1175–88.

Preliminary study on the effect of hsa_circ_0008797 on cisplatin resistance in gastric cancer cells

Liu Wenbo, Gao Min, Liu Wanting, et al

(Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the differential expression of circular RNA hsa_circ_0008797 in cisplatin-resistant and sensitive cells of gastric cancer, and to detect the effect of downregulate and upregulate the expression of circRNA on cisplatin resistance of gastric cancer cells. **Methods** The RNAs, which from gastric cancer cisplatin-sensitive cell lines AGS, BGC-823, SGC7901 and gastric cancer cisplatin-resistant cell line SGC7901/DDP were extracted. The expression level of hsa_circ_0008797 in each gastric cancer cell line was detected by real-time fluo-

网络出版时间: 2019-9-19 10:04 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190917.1059.009.html>

bpV(pic) 对血管性痴呆模型大鼠行为学及 海马 p-PKB(Ser⁴⁷³) 表达的影响

袁美春 李海霞 张志锋

摘要 目的 探讨钒化合物[双过氧二钾(吡啶-2-羧基)氧代钒酸盐 bpV(pic)]对血管性痴呆(VD) 模型大鼠认知功能和海马神经元凋亡的作用及机制。方法 将 36 只 SD 成年雄鼠分为 4 组: sham 组、sham + bpV(pic) 组、VD 组及 VD + bpV(pic) 组。VD + bpV(pic) 组大鼠造模后, bpV(pic) (1 mg/kg, 10 ml) 连续灌胃 21 d, 用 Morris 水迷宫(MWM) 检测动物认知功能变化, 用 HE 染色检测动物海马组织神经元病理形态学变化, 用 Western blot 检测神经元天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 剪切体(cleaved-caspase-3) 和第 473 位丝氨酸磷酸化蛋白激酶 B [p-PKB(Ser⁴⁷³)] 水平变化。结果

与 VD 模型组比较, VD + bpV(pic) 组动物空间学习记忆功能缺陷改善($P < 0.05$); 海马神经元的形态学损伤减轻; 神经元 cleaved-caspase-3 表达降低($P < 0.05$); 神经元 p-PKB(Ser⁴⁷³) 水平升高($P < 0.05$)。结论 bpV(pic) 可通过激活蛋白激酶 B(PKB) 活性来降低 VD 模型大鼠的空间学习记忆功能缺陷和减少海马神经元凋亡。

关键词 双过氧二钾(吡啶-2-羧基)氧代钒酸盐; 血管性痴呆; 海马神经元; 凋亡; 蛋白激酶 B

中图分类号 R 338.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)11-1707-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.11.009

2019-06-25 接收

基金项目 湖北省教育厅科学研究计划指导性项目(编号: B2018105)

作者单位 湖北医药学院基础医学院生理学教研室, 十堰 442000

作者简介 袁美春 男, 讲师, 博士;

张志锋 男, 讲师, 责任作者, E-mail: iq2277@163.com

血管性痴呆(vascular dementia, VD) 是一种多由脑血管病引发的获得性认知功能障碍疾病。该疾病发病率高, 较难治愈, 社会危害性大, 主要病理学改变为神经元凋亡、坏死脱失等, 尤其是与学习、记忆功能相关的海马神经元受到损伤后会引致认知功能障碍^[1-2]。过氧钒化合物[双过氧二钾(吡啶-2-羧基)氧代钒酸盐, dipotassium bisperoxo(pyridine-2-carboxyl) oxovanadate, bpV(pic)]是一种钒化合物, 同时也是一种常见的人第 10 号染色体缺失性磷酸酶(phosphate and tension homology deleted on chromosome ten, PTEN) 抑制剂^[3], 可通过抑制 PTEN 磷酸酶活性提高蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 的活性^[4-5]。有报道^[6]表明, 通过抑制 PTEN 可发挥一定的神经保护作用。该文将探讨 bpV(pic) 对 VD 模型大鼠在 Morris 水迷宫(morris water maze, MWM) 行为学、神经元病理形态学及神经元细胞内天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 剪切体(cleaved-cysteine-aspartic proteases, cleaved-caspase-3) 和第 473 位丝氨酸磷酸化 PKB [p-PKB(Ser⁴⁷³)] 水平的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 36 只, 体质量为 250 ~ 300 g, 温度为 23 °C ~ 25 °C, 湿度为 60% ~ 80%, 由湖北医药学院动物实验中心提供。

rescent semi-quantitative PCR (RT-PCR) . The expression of hsa_circ_0008797 in SGC7901 cells was silenced by shRNA , and hsa_circ_0008797 was overexpressed in SGC7901/DDP cells. CCK-8 method and flow cytometry were used to detect the changes of cisplatin resistance in each cell line. **Results** The expression of hsa_circ_0008797 was higher in cisplatin-sensitive cell lines AGS , BGC-823 and SGC7901 , but lower in cisplatin-resistant cell line SGC7901/DDP ($P < 0.05$) . After overexpression of hsa_circ_0008797 , the resistance of gastric cancer cells SGC7901/DDP to cisplatin decreased ($P < 0.05$) . After knocking down the expression of hsa_circ_0008797 , the resistance of gastric cancer cell SGC7901 to cisplatin was significantly increased ($P < 0.05$) . **Conclusion** hsa_circ_0008797 can reverse the resistance of gastric cancer cells to cisplatin , which may play a role in the process of cisplatin resistance in gastric cancer.

Key words gastric cancer; circRNA; cisplatin; chemotherapy resistance