

## · 基础研究 ·

CO<sub>2</sub> 对宫颈癌细胞 caveolin-1 基因表达的影响及意义\*林 飞<sup>1</sup>, 潘灵辉<sup>1</sup>, 徐韡<sup>2</sup>, 张姍妮<sup>2</sup>

(1. 广西医科大学附属肿瘤医院麻醉科, 南宁 530021; 2. 广西医科大学, 南宁 530021)

**摘要:**目的 探讨 CO<sub>2</sub> 人工气腹对宫颈癌 Hela 细胞 caveolin-1(CAV-1) 基因表达的影响及意义。方法 宫颈癌 Hela 细胞用压力为 8、16 mm Hg 的 CO<sub>2</sub> 作用 4 h, 适时-荧光定量-PCR 分别检测 CO<sub>2</sub> 未处理组及 CO<sub>2</sub> 处理后 1、3、5 d 组 caveolin-1 基因 mRNA 的表达量。结果 CO<sub>2</sub> 处理后宫颈癌细胞中 caveolin-1 mRNA 明显降低, 且 caveolin-1 基因的表达随 CO<sub>2</sub> 处理后时间的延长而降低。不同压力组间比较差异无统计学意义。结论 CO<sub>2</sub> 人工气腹能抑制宫颈癌 Hela 细胞 caveolin-1 基因的表达, 其可能是 CO<sub>2</sub> 气腹增强宫颈癌 Hela 细胞增殖能力的原因之一。

**关键词:**二氧化碳; 宫颈肿瘤; caveolin-1 基因

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.02.021

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)02-0155-03

The effect and significance of CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum on the expression of caveolin-1 gene of cervical cancer cells\*Lin Fei<sup>1</sup>, Pan Linghui<sup>1</sup>, Xu Weiwei<sup>2</sup>, Zhang Shanni<sup>2</sup>

(1. Department of Anesthesiology, the Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 2. Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of CO<sub>2</sub> on the expression of caveolin-1(CAV-1) gene of cervical cancer cells, and analyze the role of CO<sub>2</sub> in the growth and metastasis of the cell. **Methods** The cervical cancer Hela cells were exposed to CO<sub>2</sub> environment of 8 and 16 mm Hg pressure for 4 hours, then the cells were grouped with 1 day after treated, 3 day after treated, 5 day after treated and the untreated group. The real-time PCR was used to detect the expression of CAV-1 mRNA of hela cells in different groups. **Results** The expression of CAV-1 of Hela cells in the study groups was lower than that in the control group. In the study groups the expression of CAV-1 of Hela cells significantly reduced with the time extended after treated by CO<sub>2</sub>. Comparison of different pressure groups were not statistically significant. **Conclusion** CO<sub>2</sub> environment can inhibit the expression of caveolin-1 gene of cervical cancer cells, which may be one of the reasons of enhanced proliferation ability of cervical cancer cells after CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum.

**Key words:** carbon dioxide; uterine cervical neoplasms; caveolin-1 gene

近年来,腹腔镜在临床诊治中的应用已日益广泛,同时 CO<sub>2</sub> 气腹在恶性肿瘤治疗中面临着一些新的问题,如切口肿瘤细胞的局部种植与肿瘤腹腔内转移、播散等。本课题组的前期研究通过动物实验得出,CO<sub>2</sub> 人工气腹较开腹手术更易促进腹腔肿瘤播散和种植转移<sup>[1]</sup>,通过体外细胞实验得出,CO<sub>2</sub> 对宫颈癌细胞的生长、增殖能力起先抑制后促进的作用;对宫颈癌细胞的浸润、转移能力是抑制的<sup>[2]</sup>。为继续研究其可能的作用机制,作者利用基因芯片分析发现,CO<sub>2</sub> 作用宫颈癌 Hela 细胞后显示出基因的差异表达,且以基因下调为主,其中, caveolin-1(CAV-1) 表达下调显著。caveolin-1 基因是微囊蛋白的重要结构蛋白,是一种转移相关基因,与恶性肿瘤的发生、发展、浸润、转移密切相关。已经有报道 CAV-1 属于宫颈癌的抑制基因<sup>[3]</sup>,作者推测是否由于 CAV-1 基因下调表达而加快 Hela 细胞的增殖作用? 是否 CAV-1 基因的下调表达有促进癌细胞分化、增生、迁移和浸润的作用? 本实验通过体外模拟 CO<sub>2</sub> 人工气腹,检测宫颈癌细胞 caveolin-1 基因的表达,探讨 CO<sub>2</sub> 人工气腹较开腹手术更易促进腹腔肿瘤播散和种植、转移的可能原因和机制。

## 1 材料与与方法

**1.1 主要材料与试剂** 将宫颈癌 Hela 细胞(广西肿瘤防治研究所提供)培养于含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中。一步法 RNA 抽提试剂盒 Trizol(Invitrogen 公司)、逆转录试剂

盒(MBI Fermentas 公司)、Taq 酶、dNTP、限制性内切酶 EcoR1、BamH1、T4 DNA 连接酶(Takara 公司)、无内毒素质粒小提试剂盒(Promega 公司)、胶回收试剂盒(Biospin 公司)等。

**1.2 实验模型制备** 自制一有机玻璃容器,用 CO<sub>2</sub> 减压阀控制进气流量和速度;CO<sub>2</sub> 测压装置随时监测和控制 CO<sub>2</sub> 压力。实验前玻璃容器用 75% 乙醇和紫外线照射消毒灭菌,通过真空泵将容器内抽成真空状态,将细胞培养板放入容器中,密封容器,灌入 CO<sub>2</sub> 至实验所需的压力,开始计时并维持一定的时间。实验结束后取出细胞培养板放于 CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养。

**1.3 实验分组** 将 Hela 细胞于 37 °C 细胞孵箱内培养 24 h 后,置于 CO<sub>2</sub> 压力箱内,分别在纯 CO<sub>2</sub> 8、16 mm Hg 压力下培养 4 h<sup>[2]</sup>。这期间作为对照组的细胞始终置于细胞培养孵箱中培养。用适时-荧光定量-PCR 检测 CO<sub>2</sub> 未处理组、CO<sub>2</sub> 处理后 1、3、5 d 组的 Hela 细胞中 caveolin-1 mRNA 的表达量。

**1.4 检测指标及方法** 用 Trizol 提取各组细胞总 RNA,根据逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录成 cDNA。引物由上海生物工程有限公司合成。caveolin-1 引物:上游 5'-CAG AAC CAG AAG GGA CAC AC-3',下游 5'-GAG AAT GGC GAA GTA AAT GC-3'; GAPDH 引物:上游 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT-3',下游 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'。适时-荧光定量-PCR 反应条件:95 °C 5 min, 95 °C 30

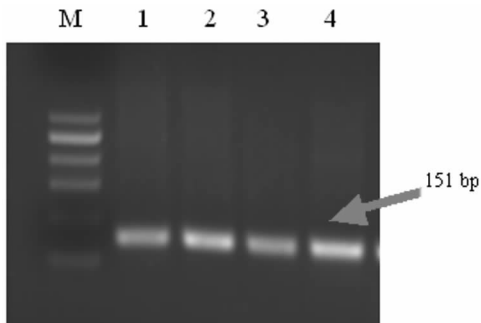
\* 基金项目:广西壮族自治区科学技术自然科学基金资助项目(桂科基 0575088)。

s, 58 °C 30 s, 72 °C 45 s, 72 °C 10 min, 39 个循环, 由随机附带软件计算 CT 值与拷贝数。

**1.5 统计学处理** 应用 SPSS12.0 统计软件, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间均数比较采用成组 *t* 检验或单因素方差分析, 并进行相关性检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

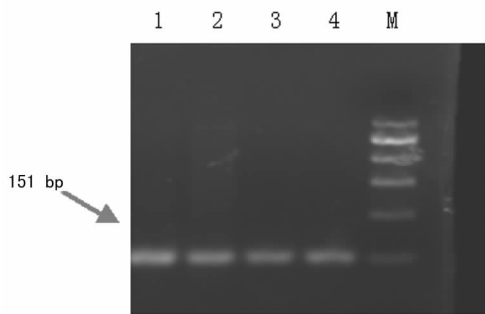
## 2 结 果

**2.1 经 CO<sub>2</sub> 作用后各组 CAV-1 的表达情况** CO<sub>2</sub> 通气处理细胞后, 抽提组织总 RNA, 使用逆转录试剂盒制备 cDNA 第一链, 以总 cDNA 为模板扩增 CAV-1 基因, 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 目的 CAV-1 基因扩增长度为 151 bp, 符合扩增片段大小, 切取目标条带, 进行纯化、回收。纯化的 CAV-1 扩增片段与 PTG-19T 载体质粒混合, 通过 T-A 连接构建重组质粒。对重组质粒进行 PCR 鉴定, 扩增片段长度符合目的基因大小(图 1、2)



M: Marker; 1~4 分别为对照组、CO<sub>2</sub> 作用后 1、3、5 d 组 CAV-1 基因扩增产物。

图 1 8 mm Hg 压力 CO<sub>2</sub> 作用 4 h 后 CAV-1 重组质粒扩增后 PCR 鉴定结果



M: Marker; 1~4 分别为对照组、CO<sub>2</sub> 作用后 1、3、5 d 组 CAV-1 基因扩增产物。

图 2 16 mm Hg 压力 CO<sub>2</sub> 作用 4 h 后 CAV-1 重组质粒扩增后 PCR 鉴定结果

**2.2 适时-荧光定量-PCR 的特异性** 适时-荧光定量-PCR 的溶解曲线显示, 采用荧光染料进行各浓度质粒 CAV-1 基因适时-荧光定量检测, 出现单一的溶解峰, 特异性佳(封 3 图 3、4)。通过 CAV-1 基因初始拷贝数与实时荧光定量检测的 CT 值建立的标准曲线相关系数是 0.976, 可以作为检测目的基因的良好标准品(封 3 图 4)。

**2.3 样本中 CAV-1 基因适时-荧光定量-PCR 检测结果** CO<sub>2</sub> 处理细胞后, 扩增出目的 CAV-1 基因 cDNA 片段, 荧光量的增长曲线符合标准的“S”形荧光扩增曲线(封 3 图 5), 软件自动算出 CAV-1 基因初始 cDNA(相当于 mRNA)的拷贝数。根据目的基因与内参基因的比值, 得出处理前、后细胞中 CAV-1 基因相对表达量(表 1)。由此可见, 宫颈癌 HeLa 细胞

被 CO<sub>2</sub> 作用后, CAV-1 基因的表达明显降低, 且 caveolin-1 基因的表达随 CO<sub>2</sub> 处理后时间的延长而降低。不同压力组间比较差异无统计学意义。

表 1 CO<sub>2</sub> 处理前、后细胞中 CAV-1 基因的表 达量比较( $\bar{x} \pm s$ )

压力(mm Hg)	CAV-1 基因的表达量			
	0 d(对照组)	1 d	3 d	5 d
16(4 h)	1.0±0.0	0.84±0.14 <sup>#</sup>	0.52±0.08 <sup>#</sup>	0.16±0.06 <sup>#</sup>
8(4 h)	1.0±0.0	0.87±0.16 <sup>#</sup>	0.49±0.13 <sup>#</sup>	0.18±0.03 <sup>#</sup>

<sup>#</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

## 3 讨 论

20 世纪 90 年代初 CO<sub>2</sub> 气腹开始被应用于腹腔镜下各种恶性肿瘤的手术, 其在妇科恶性肿瘤中的应用也越来越广泛, 有关 CO<sub>2</sub> 气腹促进恶性肿瘤细胞种植、转移的报道也越来越受到人们的关注。本课题组对此问题展开研究, 在前期研究中通过动物实验得出, 与开腹组相比, CO<sub>2</sub> 气腹组腹腔生长的肿瘤质量明显增加, 气腹组肝、肠管的种植、播散的转移瘤数量显著大于开腹组, 气腹组腹壁切口转移瘤更大、更多, 腹腔种植和播散更严重, 提示 CO<sub>2</sub> 人工气腹有促进腹腔肿瘤播散和种植作用<sup>[1]</sup>。国内外学者也有相关的研究报道, 如 Canis 等<sup>[3]</sup>运用非免疫缺陷鼠的肿瘤模型对 CO<sub>2</sub> 人工气腹的研究, 发现腹腔肿瘤播散在气腹组更严重; Ishida 等<sup>[4]</sup>建立 BALB/C 雄性裸鼠皮下接种  $2 \times 10^6$  结肠癌细胞模型, 也发现 CO<sub>2</sub> 人工气腹有促进肿瘤肝转移作用。

CO<sub>2</sub> 人工气腹较开腹手术更易促进腹腔肿瘤播散和种植转移的观点已逐渐形成共识, 但其作用机制尚未阐明。本课题组分析其作用机制除了 CO<sub>2</sub> 的理化作用因素外, 还可能与 CO<sub>2</sub> 作用后宫颈癌细胞的分子生物学改变有关系, 为阐明其可能的作用机制, 本课题组通过体外细胞实验得出, 在体外, CO<sub>2</sub> 对宫颈癌细胞的生长、增殖能力起先抑制后促进的作用; 对宫颈癌细胞的浸润、转移能力是抑制的<sup>[2]</sup>。作者利用基因芯片分析发现, CO<sub>2</sub> 作用宫颈癌 HeLa 细胞后显示基因差异表达, 且以基因下调为主, 其中, Caveolin-1(CAV-1)表达下调显著。caveolin-1 基因是微囊蛋白的重要结构蛋白, 是一种转移相关基因, 与恶性肿瘤的发生、发展、浸润、转移密切相关, 已经有报道 CAV-1 属于宫颈癌的抑制基因<sup>[5-6]</sup>, 它是细胞膜上的一种支架蛋白, 参与调控并浓缩特异脂质以及修饰信号传导分子等<sup>[7]</sup>。caveolin-1 通过磷酸化和(或)去磷酸化等途径与信号分子相互作用, 调控肿瘤细胞的增殖、凋亡、黏附及运动<sup>[8-9]</sup>。有研究表明, 在许多肿瘤中 caveolin-1 的表达是下调的, 表现为一种抑癌基因, Sloan 等<sup>[10]</sup>发现高表达 caveolin-1 的乳腺癌细胞表现为侵袭 Matrigel 的能力降低。Burgermeister 等<sup>[11]</sup>通过 RT-PCR 发现 caveolin-1 在胃癌和健康胃组织里均表达, 然而健康胃组织的 caveolin-1 mRNA 水平比胃癌组织表达量明显增高。在卵巢癌细胞<sup>[12]</sup>和结肠癌<sup>[13]</sup>的几个细胞系中 caveolin-1 在 RNA 和蛋白水平均下调, 充当肿瘤抑制基因。caveolin-1 在肺癌、宫颈癌、卵巢癌中均表达降低<sup>[14-15]</sup>。

本实验结果显示, 体外模拟腹腔镜 CO<sub>2</sub> 气腹环境下宫颈癌 HeLa 细胞 caveolin-1 mRNA 表达明显受到抑制, 且 caveolin-1 基因的表达随 CO<sub>2</sub> 处理后时间的延长而降低。与作者前期进行的基因芯片的结果一致。因此, 作者推断 CO<sub>2</sub> 作用后宫颈癌 HeLa 细胞 caveolin-1 基因表达量的降低, 可能是 CO<sub>2</sub> 作用后宫颈癌 HeLa 细胞的增殖能力增强的原因之一, 也是临

床中 CO<sub>2</sub> 人工气腹较开腹手术更易促进腹腔肿瘤播散和种植、转移这一现象的可能机制之一。下一阶段作者将应用免疫组化和 Western blot 技术分析 CO<sub>2</sub> 作用后 CAV-1 基因蛋白水平的变化;还将通过构建真核表达载体使宫颈癌 Hela 细胞 caveolin-1 过表达与低表达,然后通过体外细胞功能试验研究 Hela 细胞的生物学行为的变化,从而了解 CO<sub>2</sub> 作用后 caveolin-1 在宫颈癌 Hela 细胞中所承担的角色。有关 CO<sub>2</sub> 气腹后恶性肿瘤的增殖、侵袭能力增强机制是个复杂的过程,是各个方面、多个基因综合作用的结果,有关 caveolin-1 在腹腔镜 CO<sub>2</sub> 气腹影响宫颈癌细胞生物学变化的关系中所占的比重还有待进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] 林飞,潘灵辉. CO<sub>2</sub> 气腹对裸鼠腹腔宫颈癌细胞生长与转移的影响[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17(1): 14-16.
- [2] 林飞,潘灵辉. 体外模拟 CO<sub>2</sub> 气腹环境对宫颈癌细胞生长与转移的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2010, 37(9): 1013-1016.
- [3] Canis M, Botchorishvili R, Wattiez A, et al. Tumor growth and dissemination after laparotomy and CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum; a rat ovarian cancer model[J]. *Obstet Gynecol*, 1998, 92(1): 104-106.
- [4] Ishida H, Murata N, Idezuki Y. Increased insufflation pressure enhances the development of liver metastasis in a mouse laparoscopy model[J]. *World J Surg*, 2001, 25(12): 1537-1539.
- [5] Supryniewicz FA, Disbrow GL, Krawczyk E, et al. HPV-16E5 oncoprotein upregulates lipid raft components caveolin-1 and ganglioside GM1 at the plasma membrane of cervical cells[J]. *Oncogene*, 2008, 27: 1071-1078.
- [6] Orlichenko L, Weller SG, Cao H, et al. Caveolae mediate growth-factor induced disassembly of adherens junctions to support tumor cell dissociation[J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(19): 4140-4152.
- [7] Liu J, Wang XB, Park DS, et al. Caveolin-1 expression enhances endothelial capillary tubule formation [J]. *Biol Chem*, 2002, 277: 10661-10668.
- [8] Engelman JA, Zhang XL, Lisanti MP. Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers[J]. *FEBS Lett*, 1998, 436(1): 3-10.
- [9] Han F, Gu D, Chen Q, et al. Caveolin-1 acts as a tumor suppressor by down-regulating epidermal growth factor receptor-mitogen-activated protein kinase signaling pathway in pancreatic carcinoma cell lines[J]. *Pancreas*, 2009, 38(7): 766-774.
- [10] Sloan EK, Stanley KL, Anderson RL. Caveolin-1 inhibits breast cancer growth and metastasis[J]. *Oncogene*, 2004, 23: 7893-7897.
- [11] Burgermeister E, Xing XB, Christoph R, et al. Differential expression and function of caveolin-1 in human gastric cancer progression[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(18): 8519-8526.
- [12] Wiechen K, Diatchenko L. Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene [J]. *American Journal of Pathology*, 2001, 159: 1635-1643.
- [13] Bender FC, Reymond MA, Bron C, et al. Caveolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity[J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 5870-5878.
- [14] Williams TM, Lisanti MP. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 288: 494-506.
- [15] Wikman H, Kettunen E, Seppanen JK, et al. Identification of differentially expressed genes in pulmonary adenocarcinoma by using cDNA array[J]. *Oncogene*, 2002, 21: 10-13.

(收稿日期: 2011-07-09 修回日期: 2011-08-22)

(上接第 154 页)

对大鼠胚胎骨骼发育影响的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2003, 11(6): 11-13.

- [5] 李勇, 张天宝. 发育毒理学研究方法和实验技术[M]. 北京: 北京医科大学出版社, 2000: 84-89.
- [6] Neubert D, Hinz N, Bauman I. Attempt upon a quantitative evaluation of the degree of differentiation of or the degree of interference with development in organ culture [J]. In: *G Thiemeed. ole of Pharmacokinetics in Prenatal and Perinatal toxicology*, Stuttgart, 1978: 337-349.
- [7] 吴德生, 董奇勇, 衡正昌, 等. 在致畸研究中小鼠胎鼠发育迟缓的评价指标[J]. 四川医学院学报, 1984, 15(1): 59-63.
- [8] 王心如. 毒理学实验方法与技术[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 70-85.
- [9] 李勇, 王维林, 袁正伟, 等. 丙戊酸诱导胎鼠发生隐性脊椎裂畸形的模型建立[J]. 中国当代儿科杂志, 2004, 6(1): 38-41.
- [10] 钟永盛, 贾艳丽, 陈斌, 等. 先天性马蹄内翻足动物模型胚胎后肢(芽)评分系统的建立[J]. 中华小儿外科杂志, 2006, 30(6): 397-400.
- [11] 万梓鸣, 李明. 先天性马蹄内翻足治疗进展[J]. 重庆医学, 2010, 39(8): 991-993.
- [12] 刘万胜, 黄明辉, 刘力华, 等. 青蛙骨骼染色透明标本的制作及应用[J]. 现代预防医学, 2008, 35(9): 1700-1701.
- [13] 刘万胜, 黄明, 刘力华. 新生儿骨骼染色透明标本的制作方法[J]. 卫生职业教育, 2004, 24(14): 94-95.
- [14] Cortés-delgado N, Pérez-torres J, Hoyos JM. Staining procedure of cartilage and skeleton in adult bats and rodents[J]. *Int J Morphol*, 2009, 27(4): 1163-1167.

(收稿日期: 2011-07-10 修回日期: 2011-08-18)