文章编号:1000-5404(2010)09-0943-04

论著

pEGFP-N1-TGF-β1 重组质粒对结肠癌细胞增殖、细胞周期及侵袭性的影响

于 宏,姜 政,王丕龙 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院消化内科)

[摘要] **目的** 探讨在体外转化生长因子β1(TGF-β1)的真核表达载体对结肠癌细胞增殖、细胞周期及侵袭性的影响。**方法** 将构建的重组质粒 pEGFP-N1-TGF-β1 转染入结肠癌细胞系 SW480 中,应用荧光显微镜、RT-PCR 和 Western blot 检测 TGF-β1 基因的表达情况;MTT 法检测细胞生长情况;流式细胞仪分析 SW480 细胞周期变化;Transwell 侵袭实验验证 TGF-β1 对细胞侵袭能力的影响。**结果** 转染重组质粒 pEGFP-N1-TGF-β1 后,通过荧光显微镜观察到绿色荧光的表达,RT-PCR 和 Western blot 检测到 TGF-β1 基因的转录及蛋白表达增强($P<0.05$);细胞周期分析显示 TGF-β1 使细胞停留在 G_1期,S 期细胞明显减少($P<0.05$),且 SW480 细胞的增殖受到明显抑制;Transwell 侵袭实验显示:SW480 细胞的侵袭能力明显增强($P<0.01$)。**结论** TGF-β1 能抑制 SW480 细胞的增殖,使细胞停留在 G_1期,但同时能增强其侵袭能力。其作用可能与免疫抑制/逃逸、增加血管生成以及增加肿瘤细胞与细胞外基质的相互作用有关。

[关键词] 转化生长因子-β1;SW480 细胞;结肠癌;侵袭
[中图法分类号] R394.3; R73-354; R735.35 **[文献标志码]** A

Effect of transforming growth factor-β1 on cell cycle, proliferation and invasive capacity of human colon cancer cells

Yu Hong, Jiang Zheng, Wang Pilong (Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of transforming growth factor-β1 (TGF-β1) on cell cycle, cell proliferation, and invasive capacity of human colon cancer cells of the line SW480, for its role in colon carcinogenesis and development, as well as its application in gene therapy for colon cancer with RNA interference. **Methods** The recombinant expressing plasmids pEGFP-N1-TGF-β1 was constructed and transfected into SW480 cells by Lipofectamine 2000. The expression of TGF-β1 mRNA and protein in the transfected SW480 cells were detected by fluorescent microscopy, RT-PCR and Western blot analysis respectively. The cell proliferation of SW480 cells was tested by MTT assay, the cell cycle was analyzed by flow cytometry, and the invasion ability of SW480 cells were investigated by Transwell-matrigel invasion chambers. **Results** After transfected into SW480 cells, both the mRNA and protein levels of TGF-β1 were effectively increased ($P<0.05$). Compared with the control group, the ability of cell proliferation transfected with pEGFP-N1-TGF-β1 was decreased significantly ($P<0.05$), the inhibitory rates were increased from 60% to 80%, the cells cycle were arrested at G_0/G_1 stage, and the invasive ability were evidently increased ($P<0.01$). **Conclusion** TGF-β1 inhibits the cell proliferation and arrests cell cycle, but increases cell invasion ability *in vitro*. Its effects may be related to immunosuppression/escape, increased angiogenesis and reinforcement interaction of tumor cells with extracellular matrix.

[Key words] transforming growth factor-β1; SW480 cells; colon cancer; invasion

Corresponding author: Jiang Zheng, E-mail: jiangz1753@163.com

转化生长因子β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)是一种具有多种生物学功能的细胞因子,是许多细胞的有效生长抑制因子,其信号转导通路中任何组分发生突变都将使细胞具有选择性生长优势,导致肿瘤的发生与发展。近年研究发现,在许多肿瘤患者血清和组织中 TGF-β1 水平明显升高,尤其是晚期肿瘤患者,因此有学者认为 TGF-β1 与恶性肿瘤的侵袭与转移有关[1,2]。在对大肠肿瘤患者的研究中发现,TGF-β1 表达升高,较对照组复发风险增大,高 18 倍多[3],可见 TGF-β1 在大肠肿瘤进展、转移中起到至关重要的作用。本研究采用基因转染技术将重组质粒 pEGFP-N1-TGF-β1 转入结肠癌细胞株 SW480 中,观察 TGF-β1 基因的表达对结肠癌细胞生长、侵袭力的影响,为进一步探讨结肠癌的基因治疗奠定基础。

[通信作者] 姜 政,E-mail: jiangz1753@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

重组质粒 pEGFP-N1-TGF-β1 由本人构建,SW480 细胞由重庆医科大学生命科学研究院保存,胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,逆转录酶 M-ML、RNase Inhibitor 和 DL 2000 等购自 TaKaRa 公司,Trizol 和 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司,2×PCR mastermix 为北京天根公司产品,兔抗 TGF-β1 抗体和 BCA 蛋白检测试剂盒购自碧云天生物技术研究所,Transwell 小室购自美国 Coming Costar 公司,Matrigel 基质购自美国 BD Biosciences 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养 用含有 10% 胎牛血清的 1640 培养 SW480 细胞,置于 37 ℃、5% CO_2 孵箱中,待细胞长到 80% ~ 90% 时,再用 0.25% 的胰酶消化,1 000 r/min 离心 5 min 进行传代,每 2 ~ 3 天传代 1 次,直至传至第 3 代,再用于转染。

1.2.2 绿色荧光检测 TGF-β1 的表达情况 将重组质粒 pEGFP-N1-TGF-β1 以脂质体介导的方法转染 SW480 细胞,并以 pEGFP-N1 和灭菌 ddH_2O 为对照。转染前 1 d,将传至第 3 代的 SW480 细胞用无抗生素的含 10% 胎牛血清的 1640 培养基接种至 6 孔板上,每孔接种约 5×10^5 细胞,置 37 ℃、5% CO_2 培养箱培养 24 h,使细胞达 70% ~ 80% 汇片,采用阳性脂质体介导的转染法进行转染。将 2 μg 重组质粒稀释至 1 ml 无血清的 1640 培养基中,在漩涡混合器上振荡 1 s,然后加入脂质体悬液,再次漩涡混匀,在室温下温育 5 ~ 10 min,使 DNA 与脂质体结合,吸取 SW480 细胞中培养液,并用无血清的培养液轻轻洗涤 3 次,在单层细胞上轻轻加入 DNA 与脂质体混合物,并使其均匀分布在细胞上,置 37 ℃、5% CO_2 培养箱培养 5 h,而后在每孔中加入 1 ml 20% 胎牛血清的 1640 培养基,在 37 ℃、5% CO_2 培养箱继续培养 24 h,24 h 后在荧光显微镜下观察荧光蛋白的表达情况。

1.2.3 RT-PCR 检测 TGF-β1 mRNA 的表达 将 pEGFP-N1-TGF-β1 组、pEGFP-N1 组和空白对照组细胞分别种植于 6 孔板内进行培养,48 h 后用 Trizol 提取各组细胞总 RNA,然后将其逆转录成 cDNA,所得 cDNA 用特异引物扩增内参和目的条带。反应条件:95 ℃预变性 5 min,95 ℃ 1 min,60 ℃ 1 min,72 ℃ 1.5 min,30 个循环,最后 72 ℃充分延伸 5 min,所获 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,再利用 Quantity One 软件分析条带的光密度值。其中目的基因 TGF-β1 扩增长度为 1 173 bp,上游引物 P1:5′-CCAAGCTTATGCCGCCCTCCGGGC-3′,下游引物 P2:5′-GCGTCGACCAGCTGCACTTGCAGGAG-3′;内参 GAPDH 上游引物 P1:5′-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAA-3′,下游引物 P2:5′-TTCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT-3′,扩增长度为 250 bp,均由上海生工合成。

1.2.4 Western blot 检测 TGF-β1 蛋白的表达 按 1.2.3 方法分组进行转染,培养 48 h 后弃去培养液,分别用 PBS 洗涤 3 次后,各加入裂解液 300 μl 和 PMSF 3 μl 提取蛋白,BCA 蛋白检测试剂盒蛋白定量,再分别加入 5×SDS 上样缓冲液,沸水煮 5 min,离心后取上清液上样进行聚丙烯凝胶电泳(SDS-PAGE),然后电转将蛋白条带转移到硝酸纤维素膜上,脱脂奶粉封闭 2 h,37 ℃一抗兔抗 TGF-β1 孵育 2 h,二抗再孵育 1 h,洗膜后用化学发光试剂显色。

1.2.5 MTT 检测细胞生长情况 取对数生长期 SW480 细胞,接种于 96 孔板,每孔细胞数约 5×10^3,待细胞融合率达到 70% ~80% 时,分别用脂质体转染。实验设 3 组:pEGFP-N1-TGF-β1 组、pEGFP-N1 组、空白对照组,每组 5 孔,然后分别于 12、24、36、48、60、72 h 在每孔中各加入 5 mg/ml MTT 液 20 μl,培养 4 h,弃上清,再加入 DMSO 200 μl,充分振荡 10 min。分别检测转染后各个时间点 490 nm 波长处的光密度值[$D(490)$],并重复 3 次。最后绘制细胞增殖曲线。

1.2.6 流式细胞仪分析 SW480 细胞周期变化 pEGFP-N1-TGF-β1 组、pEGFP-N1 组、空白对照组转染 SW480 细胞 48 h 后,用冰 PBS 洗涤 2 次后,再用胰酶消化收集细胞,用 PBS 悬浮离心后,70% 冰乙醇固定过夜。PBS 洗涤细胞后,加 PI 至终浓度为 50 mg/L(含 RNase 100 mg/L),闭光室温放置 30 min,用流式细胞仪检测,各组细胞重复 2 次,将结果进行统计分析。

1.2.7 Transwell 侵袭实验 将直径 8 μm 的 Transwell 小室放入 24 孔中,人工基底膜 Matrigel 用无血清的 1640 按 1∶5 稀释,然后加入小室内,紫外灯照过夜。次日将 pEGFP-N1-TGF-β1 组、pEGFP-N1 组转染 48 h 的 SW480 细胞及空白对照组用胰酶制成单细胞悬液,各组再取 400 μl 细胞悬液(约 2×10^5)加入上室,朝下室方向加入 600 μl 小鼠成纤维细胞 NIH3T3 细胞上清液,各处理组设 3 个复孔。置于 37 ℃、5% CO_2 孵箱中 24 h 后,取出小室擦去小室内细胞,PBS 洗净,再用 75% 乙醇固定 40 min,PBS 洗涤 3 遍,苏木精染色,然后切下模中性树脂封片。于 400 倍显微镜下随机取上、下、左、右、中心共 5 个视野计数穿膜细胞数,取各视野的平均数表示肿瘤细胞的侵袭能力。

1.3 统计学处理

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件行 t 检验。

2 结果

2.1 重组质粒在 SW480 细胞中的表达情况

脂质体转染法转染 48 h 后用倒置荧光显微镜观察绿色荧光蛋白报告基因检测转染效率,发现重组质粒 pEGFP-N1-TGF-β1 有较高的转染效率(60% ~ 70%),提示 TGF-β1 基因在 SW480 细胞中成功表达(图 1)。

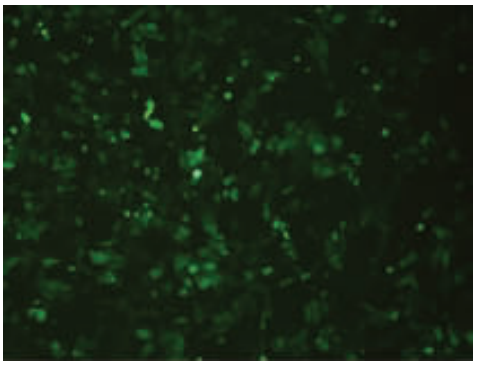
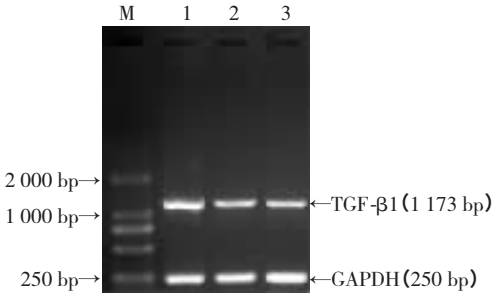


图 1 倒置荧光显微镜观察重组质粒 pEGFP-N1-TGF-β1 在 SW480 细胞中的表达 (×100)

2.2 半定量 RT-PCR 检测

RT-PCR 检测发现 3 个转染组均能够扩增出相应的目的基因带,而 pEGFP-N1-TGF-β1 转染组(1.21 ± 0.11)TGF-β1 mRNA 的表达水平较空质粒转染组(0.66 ± 0.10)和空白对照组(0.67 ± 0.08)明显升高($P<0.05$,图 2),说明 pEGFP-N1-TGF-β1 转染成功,并能在 SW480 细胞中表达。

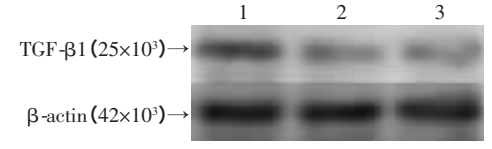


M：DNA 标准(DL 2000)；1：重组质粒转染组；2：空质粒转染组；3：空白对照组

图 2　RT-PCR 检测重组质粒 pEGFP-N1-TGF-β1 在 SW480 细胞中的表达

2.3　Western blot 检测

3 组转染细胞提取蛋白进行 Western blot 检测，经化学发光试剂显色后显示：与空质粒组(0.69 ± 0.12)和空白对照组(0.70 ± 0.03)相比，重组质粒转染组 TGF-β1 蛋白(1.18 ± 0.05)的表达水平明显增高($P<0.05$，图 3)。



1：重组质粒转染组；2：空质粒转染组；3：空白对照组

图 3　Western blot 检测重组质粒 pEGFP-N1-TGF-β1 在 SW480 细胞中的表达

2.4　MTT 法检测转染情况

重组质粒组转染 SW480 细胞后，其增殖能力与空质粒组和空白对照组相比较，细胞生长受到明显抑制，而空质粒组与空白对照组相比，其增殖能力没有明显变化(图 4)。

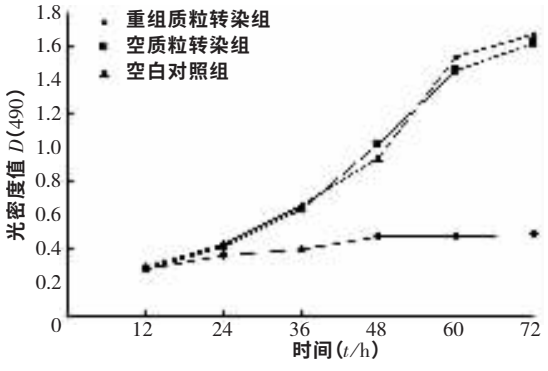


图 4　pEGFP-N1-TGF-β1 质粒转染对 SW480 细胞生长的影响

2.5　流式细胞仪分析

转染 48 h 后，经流式细胞仪分析结果显示：TGF-β1 使 SW480 细胞停留在 G_1 期，S 期细胞明显减少($P<0.05$，表 1)。

表 1　TGF-β1 基因对结肠癌细胞 SW480 周期的影响(%，$\bar{x}\pm s$)

组别	$G_0\sim G_1$	S	$G_2\sim M$
空白对照组	56.62 ± 5.37	36.41 ± 2.68	11.06 ± 1.60
空质粒组	57.26 ± 5.43	36.25 ± 3.04	10.67 ± 1.52
重组质粒组	75.38 ± 7.25[a]	15.84 ± 1.67[a]	8.61 ± 0.95

a：$P<0.05$，与空白对照组比较

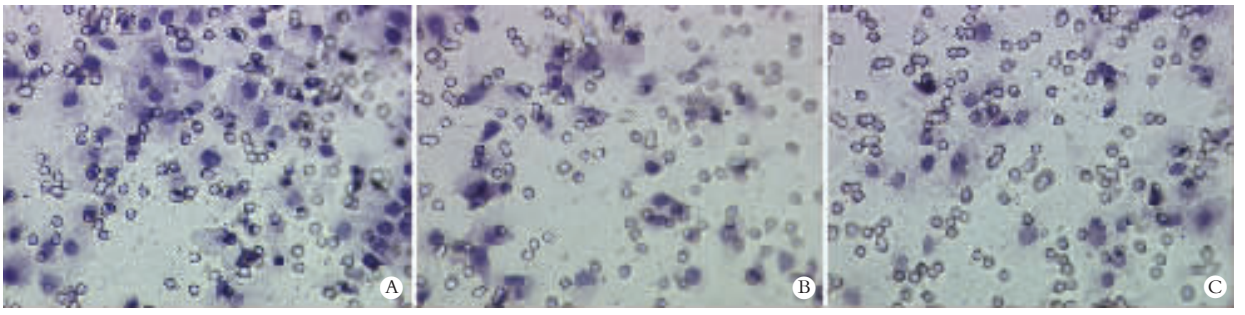
2.6　Transwell 侵袭实验

3 组细胞均能够穿过铺有 Matrigel 的滤膜(图 5)，转染重组质粒组的穿膜细胞数(132 ± 15)高于转染空质粒组(94 ± 16)和空白对照组(87 ± 10)，差异有统计学意义($P<0.01$)，转染空质粒组和空白对照组穿过滤膜的细胞数目差异无统计学意义($P>0.05$)，说明 SW480 细胞侵袭能力明显增强。

3　讨论

TGF-β1 是一类多功能的细胞因子，体内是以特异的潜在无活性的复合体形式存在，必须被激活才能发挥其生物学效应[4]，具有广泛的生物学功能，包括调控细胞生长、抑制肿瘤生长等作用，与人类肿瘤的发生、发展密切相关[5,6]。TGF-β1 对肿瘤的作用不仅具有复杂性，还表现为作用的多样性：TGF-β1 通路在肿瘤发展早期具有抑制肿瘤细胞增殖的作用，能抑制细胞的增生，使细胞停留在 G_1 期，同时诱导细胞凋亡[7,8]；在肿瘤进展的过程中，TGF-β1 可由肿瘤细胞和其周围的基质细胞产生，且其对肿瘤细胞的抑制增殖作用降低或消失从而使肿瘤细胞出现优势生长；在肿瘤生长的晚期阶段，TGF-β1 作为肿瘤的促进因子，通过刺激血管生成、促进细胞播散、抑制免疫细胞[9]及合成细胞外基质[10]等促进肿瘤的生长、浸润、转移及复发[11,12]。

结直肠癌是常见的恶性肿瘤之一，在西方国家其发病率较高。近年来，我国结肠癌发病率迅速上升[13]。与腺瘤组织相比，大肠癌组织中 TGF-β1 表达明显增高，并且与癌的浸润深度、淋巴结转移及临床分



A：重组质粒转染组；B：空质粒转染组；C：空白对照组

图 5　细胞侵袭实验检测各组穿过滤膜的细胞数目　(HE ×400)

期有关,提示 TGF-β1 的表达与大肠癌的进展密切相关。也有研究表明 TGF-β1 水平增高与肿瘤细胞增殖、转移、侵袭力增强呈正相关[8]。但在对 TGF-β1 对结肠癌 SW480 细胞株影响的研究仍存有争议,故本实验采用以 EGFP 为报告基因的表达载体,其绿色荧光蛋白的表达能够清楚的显示转染情况,同时以 RT-PCR 和 Western blot 检测到 TGF-β1 基因的表达,以此方法提高体外培养的结肠癌细胞 SW480 中 TGF-β1 的表达后,再观察结肠癌细胞增殖、周期及侵袭能力的变化,力求能进一步且更全面地研究 TGF-β1 对 SW480 细胞的影响。结果发现 SW480 细胞的增殖受到明显抑制,细胞停留在 G_1 期,S 期细胞明显减少,但其侵袭能力却显著增强,与文献[14]报道一致。TGF-β1 对 SW480 细胞的增殖和侵袭性的不一致作用可能是通过不同的信号路径实现的,这也进一步说明 TGF-β1 对肿瘤细胞作用具有多样性的原因所在。

TGF-β1 通过自分泌及旁分泌的途径对许多生物过程进行调控,包括细胞生长、迁移、分化,胚胎的发生,肿瘤的形成,伤口的愈合以及骨的形成等。在致病的过程中,TGF-β1 可诱导不同的甚至相反的生物学效应,这主要依赖于肿瘤细胞类型和细胞基质,因此 TGF-β1 的作用因各种生物学环境及细胞分化的阶段不同而不同,本研究观察到 TGF-β1 能够明显抑制 SW480 细胞的增殖,使细胞停留在 G_1 期,但同时又促使肿瘤细胞侵袭能力显著增强。其机制可能与下列因素有关:TGF-β1 可通过抑制 c-myc 基因、细胞周期蛋白(Cyclins)、周期循环蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent-kinases, CDKs)和 Rb(Retinoblastoma)蛋白等活性,抑制细胞 G_1 期与 S 期的转化[15],同时激活 Smad、促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)以及 p38/MAPK 信号途径发挥生物学效应[10,16],与此同时 TGF-β1 在体内对肿瘤侵袭的影响主要通过免疫抑制/逃逸[2,9]、增加血管生成、增加肿瘤细胞与细胞外基质的相互作用以及肿瘤所处环境[10]来发挥作用。以 TGF-β1 基因为靶点抗肿瘤的研究有待进一步的探索。

参考文献:

[1] Amirghofran Z, Jalali S A, Ghaderi A, *et al*. Genetic polymorphism in the transforming growth factor beta1 gene (−509 C/T and −800 G/A) and colorectal cancer[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2009, 190(1): 21−25.

[2] Zhang Y, Liu B, Jin M, *et al*. Genetic polymorphisms of transforming growth factor-beta1 and its receptors and colorectal cancer susceptibility: a population-based case-control study in China[J]. Cancer Lett, 2009, 275(1): 102−108.

[3] Friedman E, Gold L I, Klimstra D, *et al*. High levels of transforming growth factor beta 1 correlate with disease progression in human colon cancer[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1995, 4(5): 549−554.

[4] Hyytiainen M, Penttinen C, Keski-Oja J. Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2004, 41(3): 233−264.

[5] Bommireddy R, Saxena V, Ormsby, *et al*. TGF-beta 1 regulates lymphocyte homeostasis by preventing activation and subsequent apoptosis of peripheral lymphocytes[J]. J Immunol, 2003, 170(9): 4612−4622.

[6] Schmidt-Weber C B, Kunzmann S, Bluser K. TGF-beta-mediated control of allergen-specific T-cell responses[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2002, 2(3): 259−262.

[7] Sulkowska M, Wincewicz A, Sulkowski S, *et al*. Relations of TGF-beta1 with HIF-1 alpha, GLUT-1 and longer survival of colorectal cancer patients[J]. Pathology, 2009, 41(3): 254−260.

[8] Zhou R, Xiong B, Song H, *et al*. Soluble transforming growth factor beta type Ⅱ receptor attenuates TGF-beta1 activity in human colorectal cancer LoVo cells[J]. Oncol Rep, 2008, 20(6): 1449−1456.

[9] Chaput N, Louafi S, Bardier A, *et al*. Identification of $CD8^+CD25^+Foxp3^+$ suppressive T cells in colorectal cancer tissue[J]. Gut, 2009, 58(4): 520−529.

[10] Offenberg H, Brunner N, Mansilla F, *et al*. TIMP-1 expression in human colorectal cancer is associated with TGF-B1, LOXL2, INHBA1, TNF-AIP6 and TIMP-2 transcript profiles[J]. Mol Oncol, 2008, 2(3): 233−240.

[11] 封明轩, 骆明德, 费哲为, 等. TGF-β1 长期诱导胰腺癌细胞发生上皮间质变而增加其侵袭性[J]. 现代肿瘤医学, 2007, 15(6): 766−768.

[12] Zhang P, Di J Z, Zhu Z Z, *et al*. Association of transforming growth factor-beta 1 polymorphisms with genetic susceptibility to TNM stage Ⅰ or Ⅱ gastric cancer[J]. Jpn J Clin Oncol, 2008, 38(12): 861−866.

[13] 赵士彭,赵发,许明月,等. 塞来昔布对人结肠癌裸鼠移植瘤的抑制作用及其机制[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(14): 1338−1341.

[14] Langenskiold M, Holmdahl L, Falk P, *et al*. Increased TGF-beta 1 protein expression in patients with advanced colorectal cancer[J]. J Surg Oncol, 2008, 97(5): 409−415.

[15] Blobe G C, Schiemann W P, Lodish H F. Role of transforming growth factor beta in human disease[J]. N Engl J Med, 2000, 342(18): 1350−1358.

[16] Hsu L J, Schultz L, Hong Q, *et al*. Transforming growth factor beta1 signaling *via* interaction with cell surface Hyal-2 and recruitment of WWOX/WOX1[J]. J Biol Chem, 2009, 284(23): 16049−16059.

(**收稿**:2009-10-31;**修回**:2009-11-22)

(编辑 龙 亮)