论著

文章编号:1000-5404(2011)09-0920-04

纤维粘连蛋白EDA片段调控结肠癌SW480细胞的增殖、凋亡

耿培亮,欧娟娟,萨日娜,何金霞,谢赣丰,刘 平,梁后杰 (400038 重庆,第三军医大学西南医院肿瘤科)

【摘要】 **目的** 研究纤维粘连蛋白EDA片段对结肠癌SW480细胞增殖、凋亡的影响。**方法** 慢病毒感染结肠癌SW480细胞干扰纤维粘连蛋白EDA片段表达,建立纤维粘连蛋白EDA片段低表达的SW480细胞。利用MTT检测干扰前后细胞增殖的变化,并采用流式细胞术检测干扰前后细胞凋亡的变化。同时使用Western blot分别检测干扰前后凋亡相关蛋白Bax和Bcl-2的表达变化。**结果** 慢病毒感染结肠癌SW480细胞后,纤维粘连蛋白EDA片段持续低表达。MTT法结果显示,干扰纤维粘连蛋白EDA片段24、48、72、96 h后细胞生长速度明显降低。转染组与未转染组及空载体组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。流式细胞术显示未转染组、空载体组及转染组的细胞凋亡率分别为(3.09±1.13)%、(3.71±0.42)%、(47.76±1.51)%,差异有统计学意义($P<0.05$)。Western blot的结果显示干扰纤维粘连蛋白EDA片段后促凋亡因子Bax表达上调,同时,凋亡抑制因子Bcl-2表达降低。**结论** 纤维粘连蛋白EDA片段对结肠癌SW480细胞具有促增殖、抗凋亡作用。

【关键词】 纤维粘连蛋白;RNAi;结肠癌;增殖;凋亡

【中图法分类号】 R394.3;R735.35;R730.23 【文献标志码】 A

Fibronectin EDA domain regulates proliferation and apoptosis of colorectal cancer SW480 cells

Geng Peiliang, Ou Juanjuan, Sa Rina, He Jinxia, Xie Ganfeng, Liu Ping, Liang Houjie (Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To determine the effect of fibronectin extra type Ⅲ domain A (EDA-FN) on the proliferation and apoptosis of human colorectal cell line SW480. **Methods** The expression of EDA-FN in SW480 cells was silenced by lentiviral infection. Expression of EDA-FN was examined by Western blot analysis. MTT assay was used to analyze cell viability after infection. Cell apoptosis was analyzed by flow cytometry. The expression of Bax and Bcl-2 were examined by Western blot analysis. **Results** As compared with the blank control cells (without lentiviral infection) and negative control cells (empty vector infection), the infection of lentiviral inhibited the expression of EDA-FN in SW480 cells. The proliferative capacity of cells was decreased in 24, 48, 72 and 96 h after lentiviral infection, and all were significantly lower than blank control group and negative control group ($P<0.05$). The apoptotic rate of SW480 cells after lentiviral infection was (47.76±1.51)%, significantly higher than those of blank control group and negative control group [(3.09±1.13)% and (3.71±0.42)% respectively, $P<0.05$]. Western blot analysis showed that the expression of Bax was increased, while that of Bcl-2 was decreased. **Conclusion** EDA-FN induces the proliferation and inhibits the apoptosis of human colorectal cacer SW480 cells. The inhibitor of EDA-FN may be a new target in the treatment of the malignant tumors.

【**Key words**】 fibronectin; RNAi; colorectal cancer; proliferation; apoptosis

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30973430). Corresponding author: Liang Houjie, E-mail: lianghoujie@sina.com

结直肠癌是常见的恶性肿瘤,其发病率高居各种肿瘤的第3位[1]。在我国,随着饮食习惯的改变,其发病率呈上升趋势,已成为威胁度最大、发病率上升最快的癌症之一。肿瘤间质成分及其分泌的生长因子等构成的肿瘤微环境在肿瘤的恶性进展中发挥重要作用[2]。纤维粘连蛋白(fibronectin,FN)是一种广泛分布于细胞外基质的糖蛋白,在细胞黏附和细胞迁移中发挥重要作用。纤维粘连蛋白的剪切区的表达有明显的组织及器官特异性,其中EDA剪切区在肿瘤组织中

【基金项目】 国家自然科学基金(30973430)

【通信作者】 梁后杰,E-mail:lianghoujie@sina.com

呈现特异性高表达[3]。研究表明,纤维粘连蛋白 EDA 片段(EDA-FN)在肿瘤组织中表达明显,而在正常组织中并未检测到 EDA-FN 的表达,而其表达的增加与细胞的黏附和肿瘤转移明显相关[4]。

我们前期的研究显示,EDA-FN 在 8 种结肠癌细胞中的表达差异明显,其中在 SW480 细胞中表达明显增高[5]。目前,针对 EDA-FN 对结肠癌细胞的增殖和凋亡的影响仍少见相关报道。本研究将在前期工作的基础上,研究 EDA-FN 对结肠癌细胞增殖和凋亡的影响,为 EDA-FN 作为结肠癌治疗的靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人 SW480 细胞为我科实验室冻存。所有细胞均用 DMEM 高糖培养液培养,其中含 10% 胎牛血清,各 100 U/ml 的青霉素和链霉素,用 0.25% 胰酶消化传代。取对数生长期的细胞用于各项实验。

1.2 药物和主要试剂

DMEM 细胞培养液和优级胎牛血清为 Gibco 公司产品;胰蛋白酶、二甲基亚砜等购自上海碧云天生物技术有限公司;二甲基四氮唑蓝液(MTT)试剂、Annexin V-PE 凋亡检测试剂盒购自碧云天生物技术研究所;EDA-FN 单抗、Bcl-2 单抗购自 Cell Signaling Technology 公司;Bax 单抗、内参 β-actin 抗体和二抗购自 Santa Cruz Biotechnology 公司。

1.3 干扰纤维粘连蛋白 EDA 片段

根据 shRNA 设计原则及 GenBank 中人 EDA-FN 的基因序列,使用 Oligo 6.71 引物设计软件设计克隆引物,并筛选出有效序列。以含无义 shRNA 序列的慢病毒作为对照,设计互补的单链 DNA,由上海吉凯基因技术有限公司合成。正义链 5′-ACCGCCAGCAGGATCTCTTGAATAGATCATCTTCTCTCCGCGTG-3′;反义链 5′-AATCTTCAAATAAAAATTCAAGACGGAAGATC-TAAGCAGCGGAGCGATA-3′。转染 48 h 后收获含病毒的上清液,离心,分装病毒上清液。SW480 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培基于 37 ℃,5% CO_2 的培养箱中培养。取对数生长的细胞,以 1×10^5/孔接种于 6 孔板内,培养 12 h 后,换成新鲜 DMEM 培养基,转染 SW480 细胞。8 h 后更换新鲜培养基。激光共聚焦显微镜下观察 EDA-FN 干扰的 SW480 细胞,并用 Western blot 检测其干扰效果。

1.4 MTT 法检测转染前后细胞活力

取对数生长期的细胞,将细胞分组为未转染组、空载体组和转染组,调整细胞浓度后取 100 μl,以每孔含细胞数 1×10^5 接种于 96 孔培养板中,37 ℃孵育 24 h 后,每组设 3 个复孔,继续孵育 72 h。每孔加 20 μl MTT (5 g/L),培养 4 h 后小心吸去培养液,每孔加入 20 μl DMSO。用 Model 550 型酶标仪在 490 nm 下测光密度值[D(490)],计算细胞的生长抑制率。

生长抑制率 = [1 − 实验组 D(490) 值/对照组 D(490) 值] ×100%。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡率

实验分组同 1.4,分别孵育 72 h,离心收集细胞 1×10^5,PBS 冲洗,加入 195 μl Annexin V-PE 结合液,重悬细胞,加入 5 μl Annexin V-PE 混匀,室温避光孵育 10 min,加入 2 000 μl Annexin V-PE 结合液,冰浴避光,使用流式细胞仪按 Annexin V-PE 细胞凋亡检测试剂盒说明书检测细胞凋亡率。

1.6 Western blot 检测 SW480 细胞转染前后 Bax 和 Bcl-2 的变化

实验分组同 1.4,将各处理组细胞裂解提取各组总蛋白。取 50 μg 样品蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,水浴电转移后室温封闭 1 h,将 Bcl-2 和 Bax 抗体按 1∶1 000 稀释,4 ℃孵化过夜。充分洗膜 3 次,与二抗在室温孵化 1 h。显影、定影后观察结果。

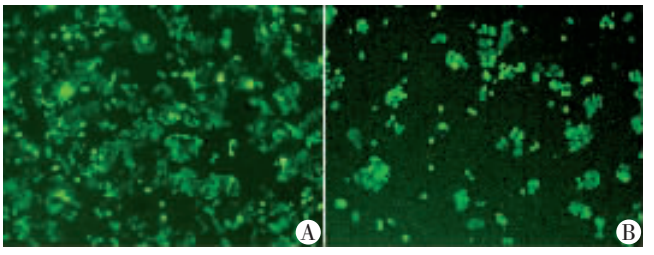
1.7 统计学分析

每组实验重复 3 次,数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析。2 组间均数比较采用独立样本 t 检验,3 组比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 结肠癌 SW480 细胞转染后细胞状态

激光共聚焦显微镜下观察 EDA-FN 干扰的 SW480 细胞,结果显示干扰后细胞中绿色荧光蛋白表达明显(图 1)。

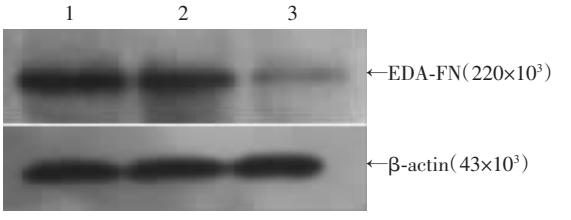


A:SW480 细胞转染空载体后绿色荧光蛋白表达;B:SW480 细胞干扰 EDA-FN 后绿色荧光蛋白表达

图 1 激光共聚焦观察慢病毒成功干扰结肠癌 SW480 细胞 (×100)

2.2 Western blot 检测干扰效果

对转染前后的细胞进行 Western blot 实验,结果显示相对于未转染组和空载体组,转染组细胞 EDA-FN 的表达被明显抑制(图 2)。

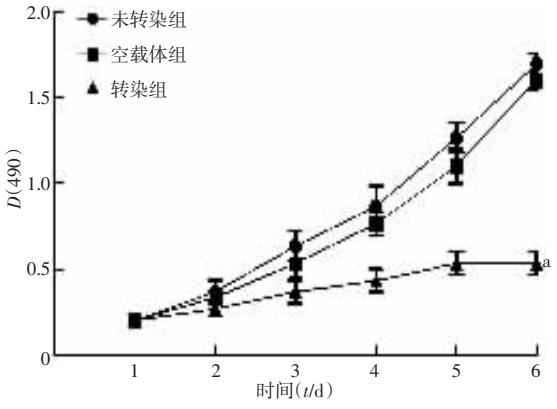


1:未转染组;2:空载体组;3:转染组

图 2 Western blot 检测转染前后 EDA-FN 的表达

2.3 结肠癌 SW480 细胞转染前后细胞活力

对不同实验组进行 MTT 检测细胞活力,结果显示转染组与未转染组、空载体组相比,结肠癌 SW480 细胞的生长明显受到抑制,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 3)。



a：$P<0.05$，与未转染组、空载体组比较

图3 MTT法检测转染前后结肠癌SW480细胞的活力

2.4 结肠癌SW480细胞转染前后细胞凋亡

流式细胞术显示SW480细胞的EDA-FN干扰后细胞的早期凋亡增加到(28.82±2.12)%($P<0.05$)；晚期凋亡增加到(47.76±1.51)%($P<0.05$)。转染空载体时，对SW480细胞的凋亡无明显影响($P>0.05$，表1)。

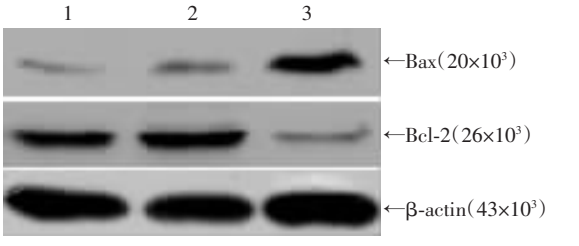
表1 流式细胞术检测转染前后SW480细胞凋亡的变化[$n=5$，($\bar{x}\pm s$)%]

组别	早期凋亡	晚期凋亡
未转染组	5.07±0.23	3.09±1.13
空载体组	4.83±1.24	3.71±0.42
转染组	28.82±2.12[a]	47.76±1.51[a]

a：$P<0.05$，与未转染组比较

2.5 Western blot检测SW480细胞转染前后Bax和Bcl-2的变化

Western blot检测凋亡相关蛋白显示，与未转染组、空载体组相比，EDA-FN转染组的Bcl-2蛋白表达下调，Bax蛋白表达上调，差异有统计学意义($P<0.05$，图4)。



1：未转染组；2：空载体组；3：转染组

图4 Western blot检测转染前后凋亡相关蛋白表达的变化

3 讨论

研究发现，细胞外基质参与调节细胞增殖、分化、迁移、黏附以及死亡等多种细胞功能[6]。纤维粘连蛋白高表达在多种肿瘤细胞表面，与肿瘤的进展和预后密切有关[3]。纤维粘连蛋白在恶性程度高、转移性强的结肠癌中的表达明显增加。尤为引人注目的是，结肠癌细胞黏附于纤维粘连蛋白提高了肿瘤的侵袭性和对化疗药物的耐受性[7]。大多数正常组织的细胞外基质中并不表达EDA-FN，但在增生旺盛的多种恶性肿瘤组织中EDA-FN出现特异性地表达上调，并与肿瘤的生长、转移和脉管生成关系密切[8-9]。我们通过体外实验观察干扰EDA-FN后结肠癌SW480细胞的增殖情况的变化，MTT实验表明干扰EDA-FN后结肠癌SW480细胞细胞存活率明显降低。本结果提示EDA-FN具有促进结肠癌SW480增殖的能力。

细胞凋亡是多细胞有机体为调控机体发育，维护内环境稳定而由基因控制的细胞主动死亡过程[10]。它和细胞增殖都是生命的基本现象，是维持人体正常生理过程和功能活动的基本措施。细胞凋亡和细胞增殖相关的研究对阐明抗肿瘤机制、寻找药物作用靶点至关重要。Bcl-2家族蛋白在凋亡过程中起着重要的作用。Bcl-2是Bcl-2家族中最具代表性的抑制凋亡蛋白，其生理功能主要是抑制细胞凋亡，延长细胞寿命[11]。Bax也是Bcl-2家族的主要成员，其主要作用是拮抗Bcl-2，加速细胞凋亡。细胞凋亡是一个精密的调节过程，Bcl-2和Bax以同源或异源二聚体形式调控细胞凋亡[12]。当Bax高表达时，形成同源二聚体Bax/Bax诱导凋亡；当Bcl-2高表达时，形成更稳定的异源二聚体Bcl-2/Bax，从而抑制Bax的促凋亡作用。本研究结果显示，干扰EDA-FN后Bcl-2蛋白表达减少，Bax蛋白表达增加，提示可能是通过改变Bcl-2/Bax比值介导凋亡的。如果凋亡是SW480细胞的一个不可避免的环节，就有可能通过抑制细胞增殖或者促进细胞凋亡，以提高肿瘤的治疗疗效，减缓病情的发展。

近年来，越来越多的研究者开始聚焦肿瘤细胞和肿瘤微环境的相互作用对恶性肿瘤的影响[13]。纤维粘连蛋白作为一种细胞外基质在肿瘤的恶性进展中具有重要作用[14]。本研究显示，通过抑制结肠癌细胞中的EDA-FN可以达到对结肠癌SW480细胞的抗增殖和促凋亡作用，以EDA-FN为靶点可以抑制肿瘤细胞的恶性进展。相信随着研究的逐渐深入，EDA-FN有望成为抗肿瘤治疗的潜在靶点，有望为临床治疗肿瘤提供新的策略和方案。

参考文献：

[1] Weitz J, Koch M, Debus J, *et al*. Colorectal cancer[J]. Lancet, 2005, 365(9454): 153-165.

[2] Allen M, Louise-Jones J. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer[J]. J Pathol, 2011, 223(2): 162-176.

[3] Warawdekar U M, Zingde S M, Iyer K S, *et al*. Elevated levels and fragmented nature of cellular fibronectin in the plasma of gastrointestinal and head and neck cancer patients[J]. Clin Chim Acta, 2006, 372(1/2): 83-93.

[4] Shimao Y, Nabeshima K, Inoue T, *et al*. Role of fibroblasts in HGF/SF-induced cohort migration of human colorectal carcinoma cells: fibro-

blasts stimulate migration associated with increased fibronectin production *via* upregulated TGF-beta1 [J]. Int J Cancer, 1999, 82(3): 449-458.
[5] Ou J J, Wu F, Liang H J. Colorectal tumor derived fibronectin alternatively spliced EDA domain exserts lymphangiogenic effect on human lymphatic endothelial cells[J]. Cancer Biol Ther, 2010, 9(3): 186-191.
[6] Rybak J N, Roesli C, Kaspar M, *et al*. The extra-domain A of fibronectin is a vascular marker of solid tumors and metastases[J]. Cancer Res, 2007, 67(22): 10948-10957.
[7] A J, Qian S, Wang G, *et al*. Chronic myeloid leukemia patients sensitive and resistant to imatinib treatment show different metabolic responses[J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13186.
[8] Han S, Khuri F R, Roman J. Fibronectin stimulates non-small cell lung carcinoma cell growth through activation of Akt/mammalian target of rapamycin/S6 kinase and inactivation of LKB1/AMP-activated protein kinase signal pathways[J]. Cancer Res, 2006, 66(1): 315-323.
[9] Liu H, Chen B, Zardi L, *et al*. Soluble fibronectin promotes migration of oral squamous-cell carcinoma cells[J]. Int J Cancer, 1998, 78(2): 261-267.
[10] Han S W, Roman J. Fibronectin induces cell proliferation and inhibits apoptosis in human bronchial epithelial cells: pro-oncogenic effects mediated by PI3-kinase and NF-kappa B[J]. Oncogene, 2006, 25(31): 4341-4349.
[11] 刘启亮，宋耀明，刘超. Neuregulin-1β对阿霉素致心衰大鼠心肌细胞凋亡及bax、bcl-2蛋白表达的干预效应[J]. 第三军医大学学报，2009，31(24)：2448-2451.
[12] 罗春山，田晓滨，汪雷，等. 汉防己甲素对大鼠急性脊髓损伤后bcl-2和bax表达的影响[J]. 第三军医大学学报，2010，32(12)：1321-1324.
[13] Scarpino S, Stoppacciaro A, Pellegrini C, *et al*. Expression of EDA/EDB isoforms of fibronectin in papillary carcinoma of the thyroid[J]. J Pathol, 1999, 188(2): 163-167.
[14] Villa A, Trachsel E, Kaspar M, *et al*. A high-affinity human monoclonal antibody specific to the alternatively spliced EDA domain of fibronectin efficiently targets tumor neo-vasculature *in vivo*[J]. Int J Cancer, 2008, 122(11): 2405-2413.

（收稿：2010-11-29 修回：2011-01-17）
（编辑 张 维）

文章编号：1000-5404(2011)09-0923-01

个案与短篇

真性球麻痹性吞咽困难1例

杨 凯[1,2]，马艳平[2]，岳寿伟[2]，陈少宗[3]，卜彦青[3]（250014 济南，山东中医药大学针灸推拿学院[1]；250012 济南，山东大学齐鲁医院康复科[2]；250014 济南，山东省中医药研究院[3]）

【关键词】 脑梗死；真性球麻痹；吞咽困难
【中图法分类号】 R246.6 【文献标志码】 B

真性球麻痹性吞咽困难临床罕见，治愈更少见[1]。我科收治1例真性球麻痹性吞咽困难患者，采用药物静滴、吞咽训练、球囊扩张、针刺等方法综合治疗，疗效较好，现报告如下。

1 临床资料

患者，男性，52岁，2011年1月3日突然出现头晕头痛，2 d后症状加重，伴呕吐、吞咽困难及左侧肢体活动无力。颅脑MRI+MRA示：脑内多发急性梗死；脑动脉硬化；左侧小脑半球及延髓梗死灶并少量渗血。对症治疗30余天后肢体功能较前改善，吞咽功能无变化。为恢复吞咽功能2月9日入住我科。康复评定：神志清楚。双眼水平方向眼球震颤。左眼睑下垂，左侧鼻唇沟变浅，左侧口角略低。Brunnstrom评定：左上肢Ⅴ级，左手Ⅴ级，左下肢Ⅴ级。左手轮替试验、指鼻试验及跟膝胫试验欠稳准，速度较健侧稍慢。腱反射活跃。双侧病理征未引出。左侧肢体深浅感觉及复合觉略减退。改良的Barthel指数量表评分50分，中度功能缺陷。吞咽功能评定：患者食欲好，有咳嗽。经胃管进食，不能经口进任何食物包括唾液。3次/d，500 ml/次，额外补充水果等营养。吞咽相关器官运动检查：撅嘴龇牙范围减小，龇牙明显右偏，唇力度降低。伸舌至唇外约1 cm，上下左右摆舌不充分，砸唇弹舌协调性差，鼓腮左侧漏气。软腭上抬不充分，有连带运动，咀嚼力量稍有减小。吞咽器官运动的灵活性、准确性、控制性下降，呕吐反射右侧弱阳性、左侧阴性。吞咽反射消失。饮水试验不能进行，喉头上抬不明显。伴有构音障碍，最长呼气时间为12 s。诊断：①脑梗死；②高血压病(3级，极高危)；③真性球麻痹。

药物治疗：胞磷胆碱钠注射液0.5 g、奥扎格雷钠80 mg、复方丹参酮磺酸钠注射液40 mg静脉滴注。吞咽训练：①口腔冰刺激；②口腔器官的协调训练；③舌骨肌力训练；④软腭功能训练；⑤咽喉肌群训练；⑥门德尔松手法；⑦颈部按摩；⑧有效咳嗽训练；⑨反复吞咽冰水训练；⑩吞咽技巧训练。每次30 min，每日2次。环咽肌球囊扩张术：使用8号双腔导尿管经右侧鼻孔插入患者咽喉部，导尿管进入约15 cm，向球囊中反复多次注入生理盐水及温水以扩张局部痉挛肌肉。每周2次。传统针刺疗法：在石学敏醒脑开窍针法基础上加廉泉、风府、风池、完骨、天柱。廉泉针向舌根方向，进1~1.5寸；风府针向口或下颌方向，进1~1.5寸；风池、完骨、天柱针向喉结，进1.5~2.0寸。每次30 min，每日1次。肢体康复训练：以Bobath方法为主，配合Rood法、运动再学习法进行肢体功能训练。每次40 min，每日2次。

治疗3周后吞咽功能明显改善。拔出胃管，经口进普食，3次/d，400~500 ml/次，无呛咳，约30 min/次。上下左右摆舌

（下转939页）

【通信作者】 杨 凯，E-mail：ykamyp@sina.com