CTGF 在胃癌中的表达及其促进血管生成的机制

胡昇庠,王崇高 (南京市第一医院浦口分院普通外科,江苏 南京 211800)

[摘 要] **目的** 研究 CTGF 在人胃癌标本中表达情况及其促进血管生成的机制。**方法** 应用 Real Time PCR 和免疫组织化学染色检测胃癌标本中 CTGF mRNA,VEGF mRNA 及其在组织中蛋白表达情况;应用 pcDNA3.1 质粒上调 AGS 细胞中 CTGF 的表达,并用 Real Time PCR 和 Western blot 检测 VEGF mRNA 水平和蛋白水平表达变化;AGS 稳定株细胞接种于裸鼠,成瘤后肿瘤组织切片,免疫组化染色。**结果** 与正常组织相比,胃癌组织中 CTGF mRNA,VEGF mRNA 表达水平均显著增加,免疫组化亦显示 CTGF、VEGF 在胃癌的标本中显色比正常对照组织强。统计显示两者 mRNA 水平及免疫组化表达有相关性($P<0.05$)。转染 pcDNA3.1 CTGF 质粒后,AGS 细胞中 CTGF 蛋白的表达上调,Real Time PCR 及 Western blot 检测显示过表达 CTGF 后,VEGF 表达上调。与对照细胞相比,过表达 CTGF 的 AGS 的肿瘤形成和生成速度明显加快($P<0.05$)。免疫组化染色显示 VEGF 的染色明显强于对照组。**结论** 在胃癌中 CTGF,VEGF 表达明显增加,CTGF 可能通过上调 VEGF 表达促进肿瘤血管生成。

[关键词] CTGF;VEGF;血管生成;胃癌

[中图分类号] R735.2 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2011)06-0612-04

Expressions of connective tissue growth factor in gastric cancer and its mechanism of angiogenesis

HU Sheng-xiang, WANG Chong-gao (Department of General Surgery, Pukou Branch of 1st Hospital of Nanjing, Nanjing Jiangsu 211800, China)

Abstract: Objective To observe the expressions of connective tissue growth factor (CTGF) in the samples of gastric cancer (GC) and its mechanism of angiogenesis. **Methods** The expressions of CTGF mRNA, vascular endothelial growth factor mRNA (VEGF mRNA) were detected by Real-Time PCR and immunohistochemistry in 22 pairs of GC samples. pcDNA3.1 plasmid was used to overexpress CTGF in AGS, meanwhile Real-Time PCR and Western blot were employed to detect the changes in VEGF expressions. Nude mice were inoculated against AGS cell lines and sections were made after tumor formed. The angiogenesis was determined by immunohistochemistry. **Results** The expressions of CTGF mRNA and VEGF mRNA in GC were significantly increased compared with the controls. CTGF and VEGF positive rates in cancerous tissues were much higher than those in normal tissues. Statistical analysis showed that there were correlations between the expressions and mRNA levels of CTGF and VEGF ($P<0.05$). CTGF expressions were efficiently enhanced after transfecting pcDNA3.1 CTGF practicles. The results of Real Time PCR and Western Blot suggested that the expressions of VEGF were increased in CTGF-transfected stable cell AGS. The tumors were developed with shorter latency as well as larger size in AGS/CTGF cells compared with those in control group ($P<0.05$). VEGF positive staining in tumors formed from AGS/CTGF cells was more intense than those formed form control cells. **Conclusion** The expressions of CTGF and VEGF were up-regulated in gastric carcinoma. CTGF can promote the angiogenesis through up-regulation of VEGF.

Keywords: connective tissue growth factor; vascular endothelial growth factor; agiogenesis; gastric cancer

结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)又被称做 CTGF/CNN2,是 CNN 家族成员之一[1]。CTGF 是一个分泌性生长因子,可以和细胞表面的整合素结合[2],也可以作为血管生成因子与基质金属蛋白酶共同起作用[3]。实体肿瘤生长及转移需要血管生成,当肿瘤结节生长到 1 ~ 2 mm^3 以后,肿瘤必须有新生血管生成供给营养才能继续增殖和转移。肿瘤细胞可分泌多种血管生成因子诱导血管生成,其中以血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)的作用最为突出[4-6]。本研究应用 pcDNA3.1CTGF 过表达载体,转染人胃腺癌细胞 AGS 细胞,增加细胞 CTGF 的表达,观察其对肿瘤的 VEGF 表达及血管生成的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞及试剂

人胃腺癌细胞株 AGS 由中国科学院上海分院细胞生物学研究所引进。Lipofectamin,TRIzol,pcDNA 3.1 质粒来自 Invitrogen。限制性内切酶,快速连接试剂 Solution I 购自大连宝生生物公司。无内毒素质粒大提试剂盒(离心柱型)购自天根生化科技有限公司。DNA 快速纯化/回收试剂盒购自北京鼎国昌盛

[作者简介] 胡昇庠(1965 -),男,江苏省南京市人,副主任医师,本科,主要从事微创外科和胃肠肿瘤手术治疗方面的研究。E-mail:wangchonggao007@sina.com

[收稿日期] 2011-06-13 [修回日期] 2011-07-20

生物技术有限责任公司。CTGF,VEGF 单克隆抗体购自 Santa Cruz,逆转录试剂盒购自 Promega。免疫组化试剂盒购自上海基因科技有限公司。

1.2 细胞培养与细胞稳定株构建

胃腺癌细胞系 AGS 使用含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基,在 37 ℃、5% CO_2 的细胞培养箱中培养。构建 AGS 的稳定细胞株时,使用 Lipofectamin 转染试剂将 CTGF 的表达载体及对照载体转染 AGS,根据试剂说明书进行操作,然后用 600 μg/μl的 G418 进行筛选 2 周左右,Western blot 进行鉴定。

1.3 总 RNA 提取及 Real Time PCR

细胞及组织中的总 RNA 采用 TRIzol 试剂按相关使用说明进行提取,应用核酸定量分析仪测定总 RNA 的浓度及纯度,经 1% 琼脂糖凝胶电泳后用于 RT-PCR 及 Real Time PCR。取 2 μg 总的 RNA,根据 M-MLV 逆转录试剂盒说明书操作。在 25 μl 体系中逆转成 cDNA。使用 PTC-200 进行如下 PCR 反应:95 ℃ 4 min;接下去 35 个循环(95 ℃ 30 s,58 ℃ 45 s,72 ℃ 2 min);最后 72 ℃ 5 min。CTGF、VEGF Real Time 使用的序列分别如下:CTGF 正向引物 5'-CGACTGGAAGACACGTTTGG-3',CTGF 反向引物 5'-AGGCTTGGAGATTTTGGGAG-3'。VEGF 正向引物 5'--3',反向引物 5'--3'。以 β-actin 做为内参,其序列如下:β-actin 正向引物 5'-GATCATTGCTCCTCCTGAGC-3',β-actin 反向引物 5'-ACTCCTGCTTGCTGATCCAC-3'。使用 LightCycler-DNA Master SYBR Green I mix(Roche Applied Science)进行扩增反应。所有反应均一式 3 份,在 iCycler iQ system(Bio-Red)上进行。每对引物的扩增产物均进行溶解曲线及 DNA 凝胶电泳分析。引物均由上海生物工程公司合成。

1.4 免疫组化染色及 Western blot 分析

采用 Envision 两步法进行免疫组化染色。胃腺细胞癌标本及正常对照组织中性福尔马林固定,石蜡包埋,5 μm 连续切片,按试剂盒说明操作。细胞长至 80% 融合时收集细胞,PBS 清洗 2 次,然后用 RIPA Buffer 冰上裂解 15 min,10 000 g 4 ℃ 离心细胞裂解液 20 min,Bradford 法测定蛋白浓度。等量的蛋白样本中加入 6 × SDS 聚丙烯酰氨凝胶电泳样品缓冲液,煮沸 5 min 待变性后进行 Western blot 检测。10 只 6 周龄的裸鼠,我们将 5×10^6 的 AGS/CTGF1 细胞和对应的对照细胞 AGS/C 分别接种于同 1 只裸鼠皮下两侧胁腹部,每周测量肿瘤大小,绘制肿瘤生长曲线。6 周后处死,称重肿瘤重量,肿瘤组织中性福尔马林固定,石蜡包埋,5 μm 连续切片,VEGF 染色。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 16.0 统计分析软件进行统计学处理。采用 t 检验及 χ^2 检验进行各组间比较。检验水准 $\alpha = 0.05$。

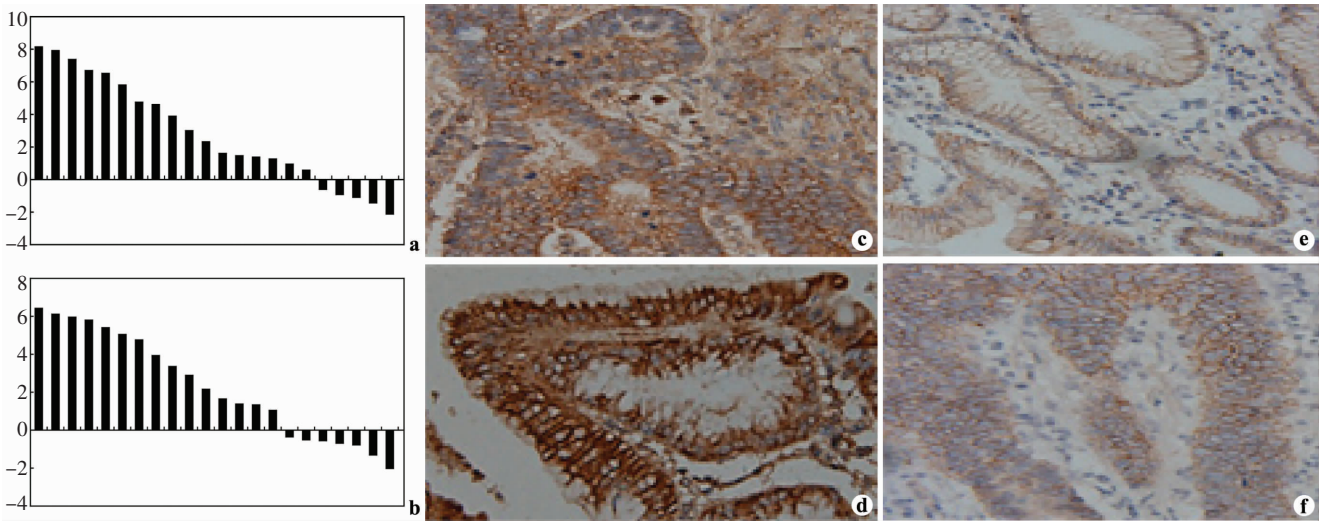
2 结果

2.1 胃癌标本中 CTGF,VEGF 的表达

与配对的正常组织相比,22 对胃腺细胞癌的标本中 CTGF mRNA(17/22)和 VEGF mRNA(15/22)表达上调(图 1a、b),差异具有统计学意义($P < 0.05$),且两者的表达具有相关性($P < 0.05$),见表 1。在配对的正常组织中,CTGF 及 VEGF 的染色阳性率很低(图 1c、e),但是在肿瘤组织中,其呈强阳性表达(图 1d、f),两者在肿瘤组织中的染色阳性率具有相关性($P < 0.05$),见表 2。

表 1 胃癌中 CTGF mRNA、VEGF mRNA 表达相关性分析($n = 22$)

		CTGF mRNA		合计
		上调	下调	
VEGF mRNA	上调	14	1	15
	下调	3	4	7
合计		17	5	22



a:胃腺细胞癌 CTGF mRNA 水平,大于 0 为上调,小于 0 为下调;b:胃腺细胞癌 VEGF mRNA 水平,大于 0 为上调,小于 0 为下调;c:正常组织 CTGF 染色;d:肿瘤组织 CTGF 染色;e:正常组织 VEGF 染色;f:肿瘤组织 VEGF 染色

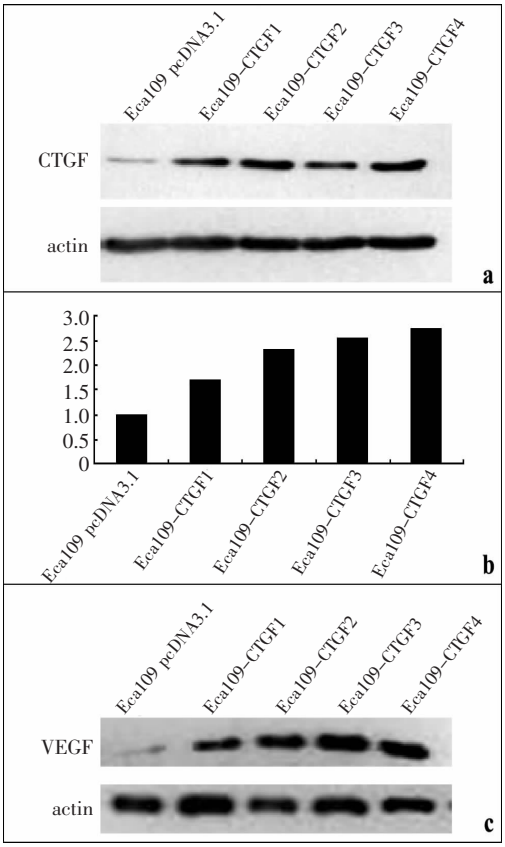
图 1 CTGF、VEGF 在胃癌中的表达

表 2 胃癌中免疫组化 CTGF、VEGF 染色阳性率相关性分析

		CTGF		合计
		+	-	
VEGF	+	12	2	14
	-	2	6	8
合计		14	8	22

2.2 过表达 CTGF 中 VEGF 的表达

在 CTGF 过表达的 AGS 稳定株中，CTGF(AGS/CTGF1 ~4)蛋白水平明显高于对照组细胞(AGS/C)，见图 2a。提取各组细胞的 RNA 逆转录后，Real Time PCR 检测 VEGF mRNA 水平，发现各组稳定株细胞的 VEGF mRNA 表达水平均高于对照组(图 2b)。提取各组细胞的蛋白后 Western blot 检测 VEGF 蛋白的表达水平发现各组的 VEGF 蛋白表达水平与 mRNA 表达水平一致(图 2c)。

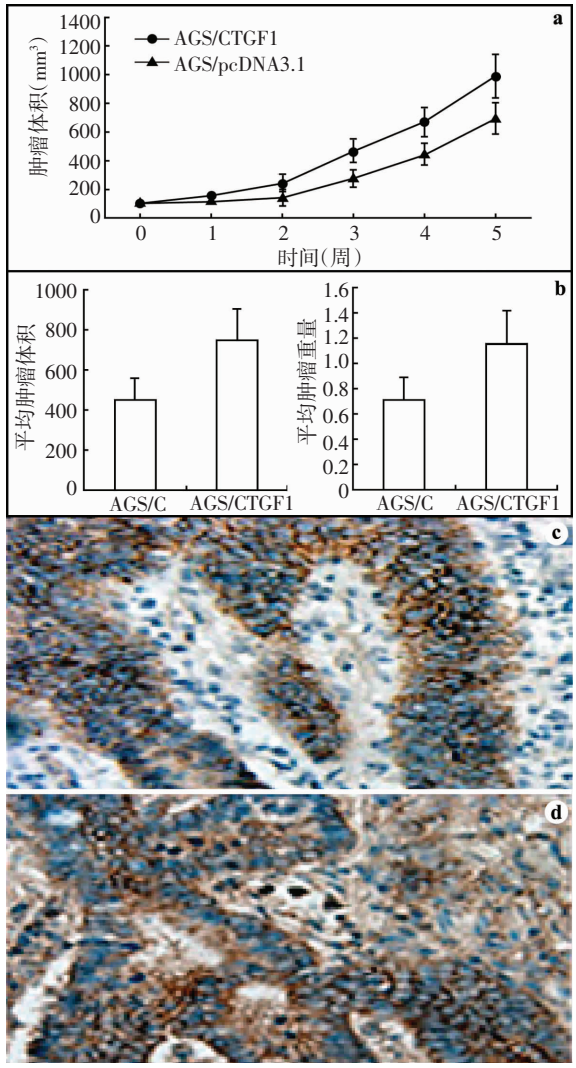


a:各组稳定株细胞的 CTGF(AGS/CTGF1 ~4)蛋白水平；b:各组稳定株细胞的 VEGF mRNA 表达水平；c:各组稳定株细胞的 VEGF 蛋白表达水平

图 2 CTGF 稳定株中 VEGF 的表达增加

2.3 AGS 细胞体内的血管生成

肿瘤生长曲线显示，AGS/CTGF1 组肿瘤形成和生长速度明显快于对照组。取下肿瘤后的免疫组化显示，AGS/CTGF1 组肿瘤组织中的 VEGF 染色明显强于对照组(图 3)。



a:肿瘤生长曲线；b:肿瘤平均体积和重量；c:AGS/pcDNA3.1 组的 VEGF 染色；d:AGS/CTGF1 组肿瘤组织中的 VEGF 染色

图 3 CTGF 增加了活体中肿瘤生长

3 讨论

血管生成在损伤、骨折修复、关节炎、心脑血管缺血及几乎每个类型的肿瘤中都有发生[7]。这个过程由促进血管生成因素及抑制因素来调节，但在许多疾病中容易失衡，尤其是肿瘤[8-9]，因此深入研究参与血管生成的细胞事件及其分子机制对于恶性肿瘤的治疗具有十分重要的意义。CTGF 是一个强有力的促血管生成因子[10-12]。rCTGF 也可以诱导血管内皮细胞的管腔形成，在鸡的 CAM 中应用 rCTGF 可以诱导明显的血管生成反应[10]。

本研究中我们首先探讨了 VEGF、CTGF 在肿瘤的表达情况。Real Time PCR 显示与正常对照组织相比，CTGF mRNA、VEGF mRNA 在胃癌表标本中高表达。免疫组化亦显示其在肿瘤组织的染色阳性率明显高于

正常对照组织。统计学分析两者在肿瘤标本中的 mRNA 水平及蛋白水平上表达具有相关性。有研究显示 CTGF 可以促进肿瘤的新生血管形成,提示 CTGF 可能促进 VEGF 的表达[13]。有研究显示缺氧可以通过增加 CTGF mRNA 的稳定性,激活某些基因的转录,增加 VEGF 的表达[14-15]。我们构建 AGS/CTGF 的稳定细胞株后,提取细胞 mRNA 及蛋白,进行 Real Time PCR 和 Western blot 检测,结果显示,随着 CTGF 的表达增加,VEGF mRNA 及蛋白水平也相应的增加,两者之间的表达呈剂量依赖关系,进一步证实了 CTGF 可以促进 VEGF 的表达。为了研究增加的 VEGF 是否具有生物学效应,我们检测了肿瘤生长的改变,在和对照组细胞注射至裸鼠后,AGS/CTGF 细胞的成瘤能力及生长速度明显加快,提示其有丰富的血供。肿瘤组织病理切片免疫组化表明 AGS/CTGF 细胞形成的肿瘤中,其血管的 VEGF 染色明显增加,进一步证实了 CTGF 可能通过上调 VEGF 表达促进肿瘤血管生成。由于血管新生在肿瘤生长、发展及转移中的重要作用,可以通过降低 VEGF 表达抑制 CTGF 的表达,从而减少肿瘤血管生长、部分抑制肿瘤生长,这可能是一个新的潜在治疗靶点。

[参考文献]

[1] Bork P. The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor[J]. FEBS Lett, 1993, 327(2): 125 – 130.

[2] Lau LF, Lam SC. The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connectio.[J]. Exp Cell Res, 1999, 248(1): 44 – 57.

[3] Kondo S, Kubota S, Shimo T, et al. Connective tissue growth factor increased by hypoxia may initiate angiogenesis in collaboration with matrix metallo-proteinases[J]. Carcinogenesis, 2002, 23(5): 769 – 776.

[4] Xie D, Nakachi K, Wang H, et al. Elevated levels of connective tissue growth factor, WISP-1, and CYR61 in primary breast cancers associated with more advanced features[J]. Cancer Res, 2001, 61(24): 8917 – 8923.

[5] 宋勇罡,王崇高,张明仪,等. 血管内皮生长因子 C 和 D 在胃癌组织和血清中的表达和意义[J]. 中华消化外科杂志, 2008, 7(5): 375 – 377.

[6] Shakunaga T, Ozaki T, Ohara N, et al. Expression of connective tissue growth factor in cartilaginous tumors[J]. Cancer, 2000, 89(7): 1466 – 1473.

[7] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases[J]. Nature, 2000, 407(6801): 249 – 257.

[8] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis[J]. Cell, 1996, 86(3): 353 – 364.

[9] Takigawa M, Enomoto M, Nishida Y, et al. Tumor angiogenesis and polyamines: alpha-difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, inhibits B16 melanoma-induced angiogenesis in ovo and the proliferation of vascular endothelial cells in vitro[J]. Cancer Res, 1990, 50(13): 4131 – 4138.

[10] Shimo T, Nakanishi T, Nishida T, et al. Connective tissue growth factor induces the proliferation, migration, and tube formation of vascular endothelial cells in vitro, and angiogenesis in vivo[J]. J Biochem, 1999, 126(1): 137 – 145.

[11] Shimo T, Nakanishi T, Kimura Y, et al. Inhibition of endogenous expression of connective tissue growth factor by its antisense oligonucleotide and antisense RNA suppresses proliferation and migration of vascular endothelial cells[J]. J Biochem, 1998, 124(1): 130 – 140.

[12] Shimo T, Nakanishi T, Nishida T, et al. Involvement of CTGF, a hypertrophic chondrocyte-specific gene product in tumor angiogenesis[J]. Oncology, 2001, 61(4): 315 – 322.

[13] Shweiki D, Itin A, Soffer D, et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis[J]. Nature, 1992, 359(6398): 843 – 845.

[14] Levy AP, Levy NS, Goldberg MA. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia[J]. J Biol Chem, 1996, 271(5): 2746 – 2753.

[15] Levy AP, Levy NS, Wegner S, et al. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia[J]. J Biol Chem, 1995, 270(22): 13333 – 13340.

(编辑:唐秋姗)

(上接第 611 页)

然后,取负压桶盖加固胶布 1 张,撕去背面纱布,与负压桶盖紧密贴合(图 1c)。

2 优点

麦默通真空辅助乳腺微创旋切系统(The Mammotome System)能够精确、微创、安全的对乳腺病变组织进行完整切除,切口微小,术后无须缝合,美容效果好,成为外科医生及爱美女性的首选,在医院的应用越来越普遍。在其使用过程中,桶盖由于过大的抽吸负压,容易发生破裂。桶盖破裂后遗留下完好的桶体,由此增加了医疗耗材费用,浪费了医疗材料,违背了低碳经济的原则。用本文介绍的加固 Mammotome 真空负压桶盖的方法,不仅取材方便、制作简单,而且大大提高了桶盖使用率及降低了桶体资源浪费。使用后的效果也证明:加固后的负压桶盖,延长了桶盖寿命、降低了医疗耗材费用,同时减少了手术操作中断次数,保证了手术进行的连续性,值得在临床广泛推广与应用。

(编辑:周小林)