基础研究 文章编号:0253-3626(2011)01-0061-03

重组腺病毒载体介导结缔组织生长因子对人胰腺癌细胞系的抑制作用

朱晓梅,张明满,康 权
(重庆医科大学附属儿童医院肝胆外科,重庆 400014)

【摘 要】目的:研究结缔组织生长因子(Connective tissue growth factor,CTGF)对人胰腺癌细胞(Pancreatic cancer cell-1,PANC-1)生长的影响。方法:采用重组腺病毒介导 CTGF(Recombinant adenorirus mecliated CTGF,rAd-CTGF)感染 PANC-1,通过 MTT 法检测 CTGF 高表达状态下 PANC-1 的增殖能力改变,同时通过细胞迁移实验和肿瘤细胞集落形成实验观察 PANC-1 运动能力和集落形成能力的改变。结果:MTT 实验表明 rAd-CTGF 在人 PANC-1 中高表达具有明显的生长抑制作用,肿瘤细胞迁移实验和集落形成实验表明 rAd-CTGF 在人 PANC-1 中高表达能抑制其迁移能力和集落形成能力。结论:结缔组织生长因子高表达具有抑制 PANC-1 的作用。

【关键词】结缔组织生长因子;胰腺癌;增殖;重组腺病毒载体
【中国图书分类法分类号】R735.9 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-08-18

Inhibition of human pancreatic cancer cell after Adenovirus-mediated connective tissue growth factor (CTGF) over-expression

ZHU Xiao-mei, et al
(*Department of Hepatobiliary Surgery, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the impact of connective tissue growth factor (CTGF) on proliferation and migration of human pancreatic cancer PANC-1. *Methods*: Ability of proliferation and migration were tested after recombinant adenovirus mediated CTGF over-expression by MTT assay, and locomotory capacity and colony-forming capacity were observed by transwell assay and tumor cell colony formation assay in human pancreatic cancer cells PANC-1. *Results*: High expression of CTGF suppressed the proliferation of human pancreatic cancer cells by MTT assay. The ability of migration and colony forming were suppressed as well when CTGF over expressed by transwell assay and tumor cell colony formation assay. *Conclusion*: Over expression of connective tissue growth factor (CTGF) might inhibit the proliferation and migration of human pancreatic cancer cell.

【Key words】connective tissue growth factor; pancreatic cancer; proliferation; recombinant adenovirus vector

胰腺癌预后差,传统治疗效果不理想。5 年生存率 <4%,在明确诊断后中位生存期 <8 个月。而且胰腺癌在早期即发生淋巴结转移,淋巴结转移的胰腺癌患者平均 5 年生存率只有 7.8%[1]。因此,深入研究胰腺癌的发病机制对探索更为有效的预防诊断和治疗方法具有重要意义。胰腺癌的发生发展是一个多因素的复杂过程,是多基因异常改变的结果。在此过程中癌基因激活、抑癌基因失活以及细胞因子的表达异常和信号转导途径异常是胰腺癌发生发展的重要原因。转化生长因子 -β1 (Transforming growth factor-β1,TGF-β1)和结缔组织生长因子(Connective tissue growth factor,CTGF)均在胰腺癌组织中过量表达,对细胞的生长增殖具有重要的调控作用,并可以介导肿瘤与基质的交互作用,与肿瘤的严重程度和疾病的恶化紧密联系[2]。但关于 TGF-β1 在胰腺癌发生过程中的作用一直存在争议,CTGF 为 TGF-β1 激活的下游靶基因,在胰腺癌发生过程中的具体作用也不明确。本文利用重组腺病毒介导的 CTGF(Recombinant adenorirus mecliated CTGF,rAd-CTGF)感染人胰腺癌细胞(Pancreatic cancer cell,PANC-1),观察其在体外对细胞增殖及凋亡的影响,为进一步阐明 CTGF 在胰腺癌发病中的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞及重组腺病毒载体、HEK293 细胞株、PANC-1、含 CTGF 重组腺病毒载体由重庆医科大学附属儿童

作者介绍:朱晓梅(1984-),女,硕士,研究方向:肿瘤分子生物学。
通信作者:康 权,男,副研究员,Email:kq1028@yahoo.com。

医院儿研所基因调控实验室保存。

1.1.2 主要试剂 DMEM 干粉(Sigma 公司),FBS(Hyclone 公司),EDTA-胰蛋白酶(Amresco 公司),特级胎牛血清(Gibco 公司),MTT、结晶紫(Sigama 公司)。

1.1.3 实验器材 超净工作台(北京市新技术应用研究所),CO_2 培养箱(Forma scientific 美国),倒置相差显微镜(Nicon日本),低温高速离心机(Eppendorf 德国),其余器材由 Hcyclone 公司购买。

1.2 方法

1.2.1 PANC-1 的体外培养 将 PANC-1 接种在含 10%胎牛血清,100 μg/ml 青霉素,100 μg/ml-链霉素的 DMEM-高糖培养基中,置于 37℃含 5%CO_2 的孵箱中培养传代,传代时用 0.02%EDTA 及 0.05%胰酶顺次消化。

1.2.2 HEK293 细胞培养 HEK293 细胞用 DMEM 完全培养基(含 10%FBS)培养。加液前培养基在 37℃水浴中预热,用 1 mmol/L HCl 调定培养基 pH 值为 7.0~7.2。细胞在 37℃、含 5%CO_2 的孵箱中培养。传代时,用 0.02% EDTA 及 0.05%胰酶顺次消化。冻存液以 90%灭活小牛血清加 10% DMSO 配制。

1.2.3 rAd-CTGF 的扩增 HEK293 系细胞在培养瓶中贴壁生长至占满 60%~80%,换液,加入 0.05 ml 病毒溶液。继续培养 36~48 h。当 HEK293 细胞出现细胞致病变效应而开始脱落时,将病变细胞连同培养基一道收集到 50 ml 离心管中。离心后冻融各 3 次,以使 HEK293 细胞碎裂并释放腺病毒。2 000 r/min,离心 5 min 后弃去细胞残渣,收集上清即得到腺病毒转染液。在 -80℃低温冰箱中保存。

1.2.4 病毒滴度检测 采用微量全细胞病变法检测病毒滴度。取 24 孔板一块,每孔加 HEK293 细胞 1×10^4 个。待测病毒用 DMEM 完全培养液稀释为 1×10^{-1}~1×10^{-6} 个至等稀释度。每一浓度设 3 复孔,每孔每一浓度取病毒溶液 100 μl,同时设不含腺病毒的培养液对照。在 37℃,5%CO_2,孵箱中继续培养 36~48 h。镜检观察细胞致病变效应现象,按公式计算出病毒滴度:病毒滴度(pfu/ml)= 每孔细胞数 × 病毒稀释倍数 × 10/加入病毒溶液量(ml)。

1.2.5 四氮唑蓝 (MTT) 法鉴定细胞增殖状态 将 PANC-1 细胞按 5 000 个/孔接种于 24 孔细胞培养板,待 24 h 生长至 50%融合时吸弃培养基,然后将细胞分实验组对照组(每组设 5 个复孔),实验组分别加入 rAd-CTGF 10 μl,对照组加入含 GFP 荧光片段重组腺病毒 rAd-GFP,继续培养,分别 24、48、72、96 h 后用酶联免疫检测分析仪测定 570 nm 处测定吸光度值,以只加胰腺癌细胞培养 24 h 的对照孔调零绘制生长曲线图。

1.2.6 平板克隆形成实验 取对数生长期的细胞,胰酶消化稀释后按照、10^5 个细胞接种于 6 cm 培养皿中,24 h 细胞长至 50%融合时吸弃一部分培养基将 rAd-CTGF 20 μl 加入其中,实验设对照组分别加入 rAd-GFP,孵育 48 h 感染率达 40%,消化收集细胞,再在从中取 5 000 个细胞种于 6 cm 培养皿内,换新鲜培基继续培养 2.5 周,取出培养皿,弃去培养液,结晶紫染色 30 min 后在显微镜下观察细胞,照相。

1.2.7 细胞迁移实验 取对数生长期的细胞,消化后接种于 6 cm 培养皿中,设实验组和对照组分别感染 rAd-CTGF、rAd-GFP 48 h,感染率达 50%,再用胰酶消化,用 BSA 的无血清培养基重悬。调整细胞密度至 5×10^5 个/ml,取细胞悬液 100 μl 加入 Transwell 小室上室内,24 孔板下室一般加入 500 μl 含 2.5%FBS 的培养基作为趋化因子于孵箱中培养 24 h,棉签擦去上室上面的非侵袭细胞,移去 Transwells、倒置、风干,用结晶紫染色 30 min,直径上取 4 个视野,照相,计数。醋酸脱色并取出小室,24 孔板于酶标仪上 570 nm 测 OD 值,间接反应跨膜迁移后的细胞数。

1.3 统计学处理

数据以均数 ± 标准差表示,用 SPSS 17.0 统计软件分析。2 组间比较用 t 检验,$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

含 CTGF 的重组腺病毒载体在 HEK293 细胞系内进行扩增。病毒感染 HEK293 细胞 36~48 h 后,细胞出现细胞致病变效应现象:细胞肿胀、变圆、脱落聚集成团等典型病变特征,收获细胞,反复冻融法裂解细胞,获取病毒。采用微量全细胞病变法检测病毒滴度。按 10^4 个/孔 293 细胞接种腺病毒 36~48 h,观察到在 10^{-1}、10^{-2} 稀释度的样本 HEK293 细胞 100%感染病毒,即出现完全细胞致病变效应现象:90%细胞变圆,10%细胞浮起。按公式计算扩增所得腺病毒滴度约为 5×10^7 pfu/ml,见图 1。

2.1 CTGF 对 PANC-1 细胞增殖的影响

向 24 孔板中处于对数生长期的 PANC-1 细胞中分别加入 rAd-CTGF10 μl 培养,对照组加入 rAd-GFP 作用后,24、48、72、96 h 用 MTT 法检测对 PANC-1 细胞增殖的影响,对照调零孔为 5 000 个/孔细胞接种于 24 孔板内培养 24 h,以 OD 值为纵坐标,感染后时间点为横坐标并绘制生长曲线,MTT 结果如下:调零孔的值 0.771 ± 0.014,感染 rAd-CTGF 和 rAd-GFP 后 24、48、72、96 h,OD 值分别为:1.045 5 ± 0.092 3、1.227 6 ± 0.093 1;2.169 8 ± 0.102、2.677 4 ± 0.072 4;3.042 6 ± 0.082 9、3.927 5 ± 0.101 7;3.138 8 ± 0.074 9、4.139 1 ± 0.088 5。差异有统计学意义,$P<0.05$。表明感染 rAd-CTGF 的胰腺癌细胞比对照组感染 rAd-GFP 的生长曲线明显受到抑制,见图2。

2.2 平板集落形成实验

运用平板集落形成实验观察细胞感染 rAd-CTGF 后集落形成情况,分别设 rAd-GFP 为实验对照组,经 rAd-CTGF 作用后的 PANC-1 细胞集落数明显少于对照组,见图 3。

2.3 细胞迁移实验

细胞迁移实验结果表明,与对照组细胞相比,感染 rAd-CTGF 后 PANC-1 细胞迁移能明显减弱,见图 4。24 孔板中加入 500 μl,33%醋酸,将小室置于其中,浸膜,振荡 10 min,充分溶解。取出小室,24 孔板于酶标仪上 570 nm 测 OD 值,间接反应跨膜迁移后的细胞数,酶标仪测得 OD 值分别为:rAd-CTGF 0.286 2 ± 0.015 8;rAd-GFP 0.587 5 ± 0.066 4,差异有统计学意义,$P<0.05$。

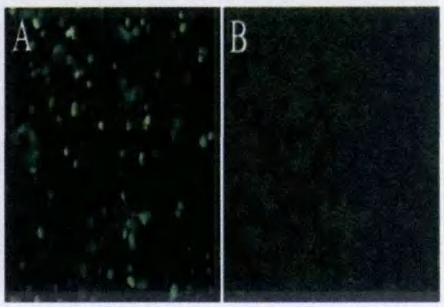


图 1 rAd-CTGF 感染 HEK293 细胞 36~48 h 后出现细胞致病变效应现象（×100）

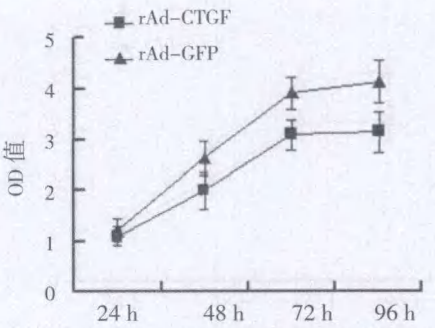


图 2 rAd-CTGF 对 PANC-1 细胞增殖的影响

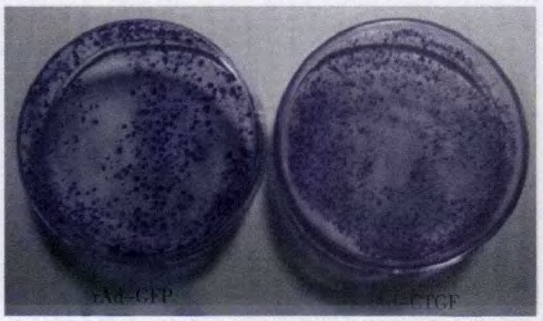
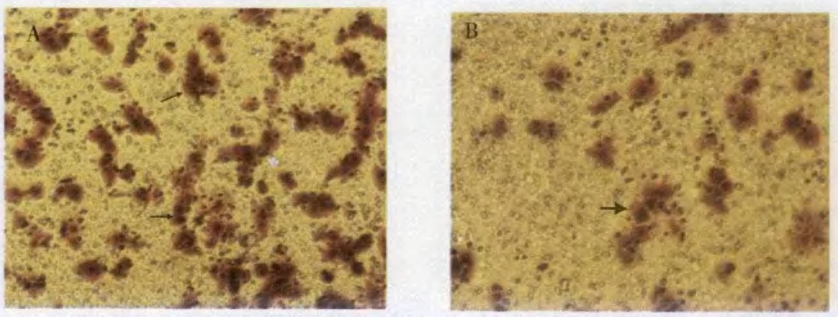


图 3 rAd-CTGF 对 PANC-1 细胞集落形成能力的影响（结晶紫染色）



A. rAd-GFP 感染 PANC-1 后细胞迁移能力结果；B. rAd-CTGF 感染 PANC-1 后细胞迁移能力的结果（箭头所指为跨膜迁移后的 PANC-1）

图 4 rAd-CTGF 对 PANC-1 细胞迁移能力的影响（结晶紫染色×100）

3 讨 论

胰腺癌具有起病隐匿，恶性程度高，预后差、生存率低等特点，临床表现缺乏特征性，故诊断及治疗都极为困难. 虽然胰腺癌发生过程中的基因改变已较清楚，但对这些改变与肿瘤恶性表型相关的分子机制的认识尚很差。人胰腺癌一个特征性表现是过度表达多种生长因子及其受体，如 VEGF、FGF 家族、EGF 家族、TGF-β 超家族等等。促生长因子和生长抑制因子间失平衡，可能与肿瘤恶性表型相关，使肿瘤细胞能躲避程序化死亡，实现生长信号的自我满足，促使新生血管的形成并发生远处转移。目前，生长因子异常表达的分子机制尚未完全明了。

CTGF 是在 1991 年，首先由 Bradham 等在血小板源性生长因子（Platelet derived growthfactor，PDGF）的诱导下，从人脐静脉内皮细胞 cDNA 文库中克隆得到的，属于编码具有细胞因子特性、分泌肽的立早基因（Immediate early gene）[3]近年来研究发现，CTGF 与细胞外基质相互作用，调节多种组织恶性肿瘤的发生发展、血管生成及浸润转移，CTGF 的表达水平与肿瘤的预后及术后复发密切相关；然而在不同的肿瘤组织中，CTGF 的分布及生物学作用不同，CTGF 正向或负向调节肿瘤的发展。CTGF 的生物学功能非常复杂，在不同病变中表现出不同的生物学作用。有的病变中 CTGF 促进组织生长，而有的病变中对组织生长有明显的抑制作用。CTGF 在原发性肝细胞癌的发生发展，血管形成、侵袭及转移中起到重要作用，CTGF 表达高的原发性肝细胞癌具有较高的侵袭转移能力[4]。CTGF 在软骨瘤组织中的表达水平与肿瘤的恶性表型呈负相关具有潜在的治疗作用[5]。CTGF 表达促进乳腺癌等肿瘤发生和发展，而有的研究发现 CTGF 过度表达抑制肿瘤细胞的生长，促进人乳腺癌细胞发生凋亡，其促凋亡作用可能与其下游的 bcl2 蛋白有关[6]。在结肠癌和肺癌[7,8]的研究中发现，低表达 CTGF 的患者预后较差，结肠癌患者易发生淋巴结转移，术后易复发，术后生存期显著低于高表达 CTGF 者。

研究表明 CTGF 在胰腺癌这样的结缔组织丰富的肿瘤发生过程中可能起非常重要的作用[9]，胰腺高分化腺癌和未转移 CTGF 表达阳性率明显高于低分化腺癌和转移者[10]本研究观察胰腺癌细胞生长曲线显示 CTGF 高表达时胰腺癌细

技术与方法 文章编号:0253-3626(2011)01-0064-04

携带 KGF 基因重组腺病毒载体的构建与鉴定

贾庆华,哈小琴,吕同德,刘春杰

(中国人民解放军兰州军区兰州总医院医学实验中心 甘肃省干细胞与基因药物重点实验室,兰州 730050)

【摘 要】目的:构建携带角化细胞生长因子(Keratinocyte growth factor,KGF)的腺病毒载体并观察其在细胞中的表达。方法:通过 PCR 从 pcDNA3-KGFpIRES2-EGFP-KGF 质粒中扩增出目的片段 KGF,定向克隆至穿梭质粒载体 pShuttle-CMV 中,构建 pShuttle-KGF。经酶切及测序鉴定后,再将 KGF 定向克隆至重组腺病毒骨架载体 pAdxsi,构建携带 KGF 的重组腺病毒载体(pAdxsi-GFP-KGF)。酶切鉴定正确后,转染人胚肾细胞系 HEK293 细胞,进行重组腺病毒的包装、生产及纯化,半数组织感染量法(50% tissue culture infective dose,TCID50)测定重组腺病毒滴度。用重组腺病毒及空病毒 Ad-null(作为阴性对照)转染人肺腺癌细胞 A549,荧光显微镜下观察细胞绿色荧光蛋白的表达,ELISA 鉴定 KGF 的表达。结果:成功构建了携带 KGF 的重组腺病毒,纯化后病毒滴度达 1.6×10^{10} pfu/ml。Ad-KGF 转染 A549 细胞后 24 h 在荧光显微镜下即可观察到绿色荧光蛋白,48 h 表达更强,ELISA 实验证实细胞表达 KGF。结论:成功构建了携带 KGF 的重组腺病毒,为下一步研究 KGF 用于肺纤维化治疗研究奠定了实验基础。

【关键词】角化细胞生长因子;腺病毒;构建;表达

【中国图书分类法分类号】R392 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-08-26

作者介绍:贾庆华(1979-),女,硕士,
研究方向:细胞生物学。

通信作者:哈小琴,女,主任医师,Email:haxq@yahoo.com。

胞生长时明显受到抑制,结果显示 rAd-CTGF 作用胰腺癌细胞后呈时间依赖性抑制其生长。胰腺癌细胞迁移实验和集落形成实验显示感染 rAd-CTGF 后人胰腺癌细胞迁移能力和集落形成能力明显较对照组减弱,CTGF 表达水平与胰腺癌发生、恶性程度、转移及预后密切相关,具体机制有待进一步研究。总之,本研究认为 CTGF 在胰腺癌细胞中的高表达与癌细胞转移和恶性程度呈负相关,CTGF 可能成为一种新的胰腺癌治疗靶向基因,通过提高 CTGF 的生物学活性,从而抑制肿瘤的生长和淋巴结转移。

参 考 文 献

[1] 李 辉,周武元,吕丽红,等. 胰腺癌组织 Syk 和 VEGF-D 蛋白表达及其临床意义的研究[J].中华肿瘤防治杂志,2008,15(15):1166-1168.

[2] 苏 燕,李宏伟,崔培林,等. 转化生长因子-β1 通过促进结缔组织生长因子表达抑制胰腺癌细胞 PANC-1 增殖[J]. 现代生物医学进展,2007,7(12):1761-1764.

[3] Douglass M,Bradham,Atsuyuki I,et al.Connective Tissue Growth Factor:a cyst-eine-rich mitogen secreted by human vascular endoth-elial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF10 [J].J Cell Biol,1991,114(6):1285-1294.

[4] 颜廷启,易继林,杨志芳,等. CTGF 和 VEGF 在肝癌中的表达及相关性研究[J].临床外科杂志,2009,17(6):394-395.

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

[6] Hishikawa K,Oemar B S,Tanner F C,et al.Connective tissue growth factor induces apoptosis in human breast cancer cell line MCF-7[J].J Biol Chem,1999,274(52):37461-37466.

[7] Lin B R,Chang C C,Che T F,et al.Connective tissue growth factor inhibits metastasis and acts as an independent prognostic marker in colorectal cancer[J].Gastroenterology,2005,128(1):9-23.

[8] Chang C C,Shih J Y,Jeng Y M,et al.Connective tissue growth factor and its role in lung adenocarcinoma invasion and metastasis[J].J Natl Cancer Inst,2004,96(5):364-375.

[9] Takuma A,Jason G,Suzanne M,et al.Connective tissue growth factor-specific antibody attenuates tumor growth, metastasis and angiogenesis in an orthotopic mouse model of pancreatic can-cer[J].Mol Cacer Ther,2006,5(5):1108-111.

[10] 杨竹林,黄生福,苗雄鹰,等.胰腺癌组织中 CCN 家族基因和转化生长因子-β1 表达及其临床病理意义[J].中华实验外科杂志,2005,22(10):1276.

(责任编辑:关蕴良)