基础研究 文章编号:0253-3626(2010)12-1814-02

Artemin 对体外胰腺癌细胞增殖与侵袭影响的实验研究

古 赛,黄妙兴

(重庆医科大学附属第一医院消化内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 Artemin 对胰腺癌细胞增殖与侵袭的影响。方法:以 0、10、100 ng/ml Artemin 处理胰腺癌 PDAC 细胞株 24、48、72 h 后,MTT 法检测其对 PDAC细胞的生长抑制作用。应用 Transwell 小室进行人工重组基底膜(Matrigel)侵袭实验,观察胰腺癌对 PDAC 细胞侵袭的影响。结果:MTT 实验结果表明,Artemin 对 PDAC-1 细胞增殖有一定抑制作用,但随时间延长和药物浓度加大其抑制效应增强不显著。Artemin 处理后 PDAC-1 细胞侵袭能力增加。结论:Artemin 对胰腺癌的增殖影响不明显,但能增加癌细胞的侵袭性。

【关键词】Artemin;胰腺癌;增殖;侵袭

【中国图书分类法分类号】R735.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-06-02

Experimental study of Artemin on proliferation and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma cell line

GU Sai, et al

(*Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of Artemin on the proliferation and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cell line. *Methods*: PANC cells were treated with 0, 10, 100 ng/ml Artemin for 24, 48, and 72 h, respectively. Proliferation of cells were measured with MTT assay. Invasion of cells were evaluated with Transwell chamber. *Results*: After being treated with Artemin, the proliferation of PANC cells was slightly inhibited, but not in a time and dose-dependent manner. The invasion of PANC cells was increased. *Conclusion*: Artemin may not associated with proliferation in PDAC, but increased cancer cell invasion.

【Key words】Artemin; Pancreatic ductal adenocarcinoma; Proliferation; Invasion

胰腺癌是预后极差恶性肿瘤,确诊时大多数患者因有局部进展期疾病和(或)远处转移而不能行根治性切除[1]。转移是胰腺癌的独立预后指标,而且与术后腹膜后肿瘤复发有密切的关系,有文献报道,胰腺癌神经浸润率达 64%~100%[2]。肿瘤侵犯至胰周神经是胰腺癌导致腹痛和肿瘤扩散的病理特征[3]。然而,胰腺内神经的变化和癌细胞沿胰周神经转移的机制尚不明确。

近年来研究表明,某些特异性分子和神经组织周围微环境在肿瘤的嗜神经性生长上可能发挥重要作用。神经营养因子和胶质细胞源性神经营养因子(Glial cell linederived neurotrophic factor, GDNF)蛋白家族参与了胰腺癌中神经肿瘤间的相互作用和肿瘤的发生[4]。Artemin 属于 GDNF 家族成员(GDNF, Neurturin, Persephin 和 Artemin)。体外试验表明[5]Artemin 能增强神经元的生存、增殖和再生,以及增加神经元的密度和交感神经元轴突的生长。但 Artemin 是否直接影响胰腺癌细胞的神经营养活性还不十分清楚。本研究探讨 Artemin 对胰腺癌细胞的增殖和侵袭力的影响。

作者介绍:古 赛(1967-),女,副教授,博士,研究方向:肿瘤及脂肪性肝病。

1 材料与方法

1.1 材料

PDAC-1 细胞(人胰腺癌细胞株)购于中国科学院上海细胞库;PRMI1640 培养基、胰蛋白酶和 D-Hanks 液为 Gibco 公司产品;Matrigel 侵袭室购自美国 Costar 公司(孔径 8 μm)。小牛血清购自杭州四季青生物公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)液和二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司;SABC 试剂盒和 DAB 显色盒均购自福州迈新生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 PDAC-1 细胞生长在含 10%胎牛血清的 RMPI1640 培养基中,内加 100 U/ml 的青霉素和 100 μg/ml链霉素,置于 5%CO_2饱和湿度、37℃培养箱内培养。当细胞长满瓶底 80%并贴壁后,用 0.25%胰酶消化,倒置显微镜下见细胞间隙增大、胞质回缩时终止消化,然后分瓶再培养;待进入对数生长期(细胞贴壁、胞浆延展)约为传代后 24 h 时,弃去原培养液,用 D-Hank 液冲洗后用于实验。

1.2.2 MTT 法测定细胞增殖 取对数生长期的 PDAC-1 细胞,调整细胞浓度为 5×10^4 个/ml,取 3 块 96 孔培养板每孔接

种细胞悬液 200 μl,设未加 Artemin 组、Artemin 组(设 10 ng/ml 和 100 ng/ml 2 个浓度:于细胞 80%处于融合状态后加药),每组设 5 个平行孔,置 37℃、体积分数 5%CO_2 饱和湿度孵箱内培养。分别培养 24、48 h 和 72 h 后,每孔加入 5 g/L 的 MTT 20 μl 继续培养 4 h,每孔加 200 μl DMSO 震荡 10 min,用酶标仪测定波长 570 nm 的吸光值(A)。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.3 Matrigel 体外细胞侵袭实验 生长旺盛的 PDAC-1 细胞以 0.25%胰酶消化、培养液洗涤终止消化后,然后加无血清 RPMI1640 液继续培养 24 h 后收集上清液,离心(2 000 r/min 5 min)。将 Matrigel 按 40 μl/孔均匀的铺在 Transwell chamber 膜上,按每室 0.3 ml 接种于 Matrigel 侵袭腔上层,其下层仅加培养液 0.8 ml;于 37℃、5%CO_2 培养箱培养 24 h,使细胞贴壁。吸弃上层培养液,加入含不同浓度 Artemin 0.3 ml,每一浓度设 3 复室,以等量无药培养液为对照,37℃、5%CO_2 培养箱继续培养 24 h。取出 Transwell chamber,用棉签头檫掉 Matrigel,PBS 液洗 3 次,95%乙醇固定, 收集全部过膜细胞,离心,台盼蓝染色,结果判定:400 倍光镜下,计数每膜 5 个随机不同视野的穿膜细胞数。取均值,每组平行设 3 个小室。同样实验重复 3 次。

1.3 统计分析

全部数据用 SPSS11.5 软件包进行统计处理。计量资料各组采用单因素方差分析及基于方差分析的多重比较方法(SNK 法)分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Artemin 对 PDAC-1 细胞增殖能力的影响

MTT 实验结果表明,Artemin 对 PDAC-1 细胞增殖有一定抑制作用,但随时间延长和药物浓度加大其抑制效应增强不显著(见表 1,图 1)。

2.2 Artemin 对 PDAC-1 细胞侵袭力的影响

侵袭实验中 Artemin 处理后 PDAC-1 细胞侵袭穿过 Matrigel 成胶 Transwell chamber 重组人工基底膜的侵袭细胞数增加,与对照组侵袭细胞数比较,差异有统计学意义($P<0.05$)(见表 2,图 2)。

表 1 Artemin 对胰腺癌 PDAC-1 细胞增殖的抑制率

	24 h	48 h	72 h
空白组	100%	100%	100%
Artemin 组(10 ng/ml)	97%	95%	94%
Artemin 组(100 ng/ml)	95%	93%	90%

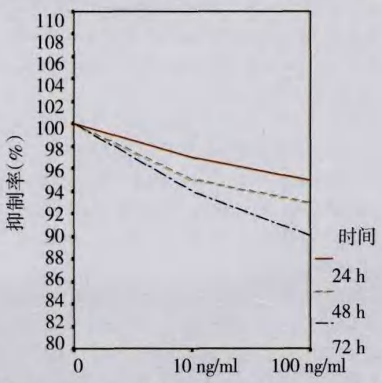


图 1 Artemin 对胰腺癌 PDAC-1 细胞生长的作用

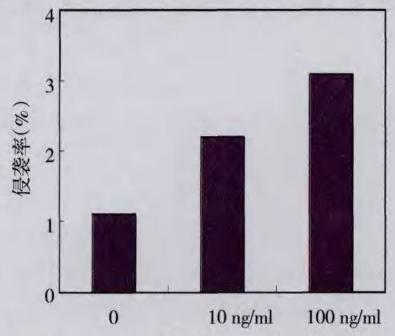


图 2 Artemin 对 PDAC-1 细胞侵袭力的影响

表 2 Artemin 对 PDAC-1 细胞侵袭力的影响

Artemin 浓度	n	侵袭细胞数
0	9	1.1 ± 0.3
10 ng/ml	9	2.2 ± 0.4*
100 ng/ml	9	3.1 ± 0.6*△

* 与 0 ng/ml 组比较,$t=6.60$,*$P<0.05$;△ 与 10 ng/ml 组比较,$t=3.74$,△$P<0.05$

3 讨 论

神经营养因子家族(GDNF 基因,Neurturin,Persephin 和 Artemin)及其受体 GFR1-4/RET 由于能够促进各种神经细胞的生存,包括外周自主、感觉和多巴胺能神经元,目前已经被应用治疗神经退行性疾病[6]。另一方面,RET 受体的突变可导致一些疾病,如甲状腺乳头状癌,多发性内分泌腺瘤和先天性巨结肠[7]。尽管很少报告认为 GDNF 基因配体能控制癌细胞入侵和增殖,它们在恶性肿瘤发生的确切机制知之甚少。胰腺癌是一个很好的分析神经及肿瘤相互作用的模型,因为癌的神经侵袭性,最终导致局部复发[8]。

Artemin 能对多种神经元的存活和分化起作用。应用 Western blotting 技术和免疫组织化学方法对胎儿及成人组织进行检测,结果表明 Artemin 能促进成人海马神经元的存活,并对维持其功能起作用[9]。在体外培养中,经 Artemin 处理的颈动脉体血管球细胞的数量增多,胞体增长,这说明 Artemin 对颈动脉体的功能起作用, 并有可能通过颈动脉体转运提高其神经定向分布[10]。Artemin 对培养的大鼠侧中脑 GABA 能神经元和血清素激活神经元也具有显著作用[11]。

朱栋良等[12]报道 Artemin 在胰腺癌组织中的表达高于癌旁组织,并认为其在胰腺癌神经浸润转移过程中起着重要作用。但 Artemin 是否直接影响胰腺癌细胞的神经营养活性还不十分清楚。Artemin 及其受体 GFR3/RET 在胰腺癌细胞系的大量表达,这些数据表明 Artemin 可能参与控制癌细胞的行为,尽管这些癌细胞不是神经来源的。Andres 等[5]和 Baloh 等[13,14]显示 Artemin 诱导了神经母细胞瘤细胞增殖。然而,这种效果在胰腺癌细胞株中并未观察到。这种差异可能是由于不同性质的细胞(神经细胞与上皮细胞),或由于细胞受体系

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)12-1816-04

eNOS G894T 基因多态性与胃癌发生发展关系的研究

陈淑勤[1],洪斌斌[2],林贤东[2],朱进伟[2],唐 阳[2],林建银[2]

(1. 福建医科大学基础医学院病理学系肿瘤研究室,福州 350004;2. 福建医科大学教育部消化道恶性肿瘤教育部重点实验室分子医学研究中心,福州 350004)

【摘 要】目的:探讨内皮型一氧化氮合酶(Endothelial NOS,eNOS)基因多态性与胃癌发生发展的关系。方法:采用 PCR-RFLP 技术,检测福建地区汉族 324 例胃癌患者(病例组)和 200 例健康对照者(对照组)eNOS 基因 G894T 多态性。结果:(1)在病例组和对照组中,eNOS G894T SNP 基因型频率 G/G 分别为 76.5%(248/324)和 73.0%(146/200),G/T+T/T 分别为 23.5%(76/324)和 27.0%(54/200),等位基因频率 G 分别为 88.0%(570/648)和 86.3%(345/400),T 分别为 12.0%(78/648)和 13.7%(55/400)。eNOS G894T SNP 基因型和等位基因频率在病例组与对照组的分布差异无统计学意义(均 $P>0.05$);弥漫型胃癌和肠型胃癌分别与对照组比较,任一基因型或等位基因亦未增加患癌风险(均 $P>0.05$)。(2)eNOS G894T 基因型频率分布与胃癌的临床病理特征无明显关系(均 $P>0.05$)。结论:福建地区汉族人群 eNOS 基因 G894T 多态性与胃癌的发生和发展无关。

【关键词】胃癌;eNOS G894T 基因多态性;疾病遗传易感性

【中国图书分类法分类号】R735.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-06-11

作者介绍:陈淑勤(1972-),女,副教授,博士,研究方向:肿瘤病理学。

通讯作者:林建银,男,教授,E-mail:jylin@mail.fjmu.edu.cn。

基金项目:卫生部科学研究基金(编号:WKJ2008-2-43);福建医科大学重大科研项目基金(编号:09ZD020);福建医科大学教授基金(编号:JS060001)。

统的存在。本研究发现 Artemin 在不影响胰腺癌细胞增殖的情况下却增加其侵袭性。这一发现意味着 Artemin 的嗜神经侵袭导致胰腺癌患者预后极差。随着癌细胞对细胞外基质消化活性的增加,Artemin 可能会促进胰腺内/胰腺外神经的侵袭性。

总之,对 Artemin 在胰腺癌中的深入研究,将有助于明确胰腺癌神经浸润转移的发生机制。同时可能通过对 Artemin 的表达调控或基因转染方法,与其他方法共同干预胰腺癌细胞内环境和宿主微环境,达到抑制胰腺癌浸润转移、改善胰腺癌预后的目的。

参 考 文 献

[1] Jemal A, Murray T, Samuels A, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2003, 53(1): 5-26.

[2] 胡先贵. 胰腺癌的神经侵犯和外科处理[J]. 外科理论和实践, 2005, 10(3): 210-211.

[3] Hirai I, Kimura W, Ozawa K, et al. Perineural invasion in pancreatic cancer [J]. Pancreas, 2002, 24(1): 15-25.

[4] Veit C, Genze F, Menke A, et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase is required for glial cell line-derived neurotrophic factor-induced migration and invasion of pancreatic carcinoma cells [J]. Cancer Res, 2004, 64(15): 5291-5300.

[5] Andres R, Forgie A, Wyatt S, et al. Multiple effects of artemin on sympathetic neurone generation, survival and growth[J]. Development, 2001, 128(19): 3685-3695.

[6] Gill S S, Patel N K, Hotton G R, et al. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease[J]. Nat Med, 2003, 9(5): 589-595.

[7] Takahashi M. The GDNF/RET signaling pathway and human diseases[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2001, 12(4): 361-373.

[8] Okada Y, Eibl G, Duffy J P, et al. Glial cell-derived neurotrophic factor upregulates the expression and activation of matrix metalloproteinase-9 in human pancreatic cancer[J]. Surgery, 2003, 134(2): 293-299.

[9] Quartu M, Serra M P, Manca A, et al. Neurturin, persephin, and artemin in the human pre-and full-term newborn and adult hippocampus and fascia dentata [J]. Brain Res, 2005, 1041(2): 157-166.

[10] Leitner M L, Wang L H, Osborne P A, et al. Expression and function of GDNF family ligands and receptors in the carotid body[J]. Exp Neurol, 2005, 191(s1): 68-79.

[11] Ducray A, Krebs S H, Schaller B, et al. GDNF family ligands display distinct action profiles on cultured GABAergic and serotonergic neurons of rat ventral mesencephalon [J]. Brain Res, 2006, 1069(1): 104-112.

[12] 朱栋良, 罗地来, 罗 刚, 等. Artemin、GFR α 3 在胰腺癌中的表达及其与胰腺癌神经浸润转移的相关性[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(3): 428-431.

[13] Baloh R H, Tansey M G, Johnson E M J, et al. Functional mapping of receptor specificity domains of glial cell line-derived neurotrophic factor(GDNF) family ligands and production of GFRalpha1 RET-specific agonists[J]. J Biol Chem, 2000, 275(5): 3412-3420.

[14] Baloh R H, Tansey M G, Lampe P A, et al. Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex[J]. Neuron, 1998, 21(6): 1291-1302.

(责任编辑:张学颖)