基础研究 文章编号：0253-3626(2009)06-0687-03

抑癌基因 maspin 在肝癌细胞株 MHCC-97 中对 VEGF 的生物学作用

阎 雄

（重庆医科大学附属第一医院普外科，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨抑癌基因 maspin 在肝癌细胞株 MHCC-97 中对血管内皮生长因子（Vascular endothelial growth factor，VEGF）的生物学作用及意义。方法：构建 maspin/pEFIRES-N 表达质粒，重组质粒转染后，采用 RT-PCR 及 Western Blot 方法分别从 mRNA 和蛋白水平检测肝癌细胞株 MHCC-97 中 maspin 和 VEGF 转染前后的表达。结果：成功构建 maspin/pEFIRES-N 重组质粒，并稳定转染到肝癌细胞株 MHCC-97 中，显示转染 maspin 基因后在肝癌细胞株 MHCC-97 中 maspin 的 mRNA 和蛋白表达明显增强，而 VEGF 的 mRNA 和蛋白表达明显减弱（$P<0.05$）。结论：在肝癌细胞株 MHCC-97 中，maspin 基因的过表达会降低 VEGF 的 mRNA 及蛋白表达，从而可能抑制新生血管形成，阻止肿瘤细胞的增生和转移。

【关键词】Maspin；血管内皮生长因子；肝癌细胞株 MHCC-97

【中国图书分类法分类号】R735.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-28

Biological effect of maspin gene on VEGF in hepatocarcinoma cell MHCC-97

YAN Xiong

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

【Abstract】*Objective*: To explore the biological effect of maspin on VEGF (vascular endothelial growth factor, VEGF) in hepatocarcinoma cell MHCC-97 and discuss its significance. *Methods*: Maspin/pEFIRES-N expressing plasmid was constructed. The changes of maspin and VEGF in the levels of mRNA and protein in hepatocarcinoma cell MHCC-97 before and after the transfection and recombination were detected by RT-PCR and Western blotting. *Results*:The maspin/pEFIRES-N plasmid was constructed successfully, and was stably transferred into MHCC-97 cell. The expressions of maspin mRNA and protein increased in hepatocarcinoma cell MHCC-97 after the transfection of maspin/pEFIRES-N plasmid, while the expressions of VEGF mRNA and protein decreased, as compared with those after the transfection of pEFIRES-N plasmid ($P<0.05$). *Conclusion*: In hepatocarcinoma cell MHCC-97, maspin overexpression decreases the expressions of VEGF, which inhibits neovascularization, blocks the hyperplasia and metastasis of tumour cells.

【Key words】Maspin; VEGF; Hepatocarcinoma cell MHCC-97

作为抑癌基因的 maspin 是 serpin 家族的成员之一[1]，具有阻止肿瘤细胞浸润、转移，促进肿瘤细胞凋亡，抑制肿瘤血管生长等抑癌的功能[2]。为了进一步研究 maspin 基因抑癌的分子生物学机制，我们成功构建 maspin/pEFIRES-N 表达质粒，将其稳定地转染到肝癌细胞株 MHCC-97 中进行表达，从 mRNA 及蛋白水平检测转染前后 maspin 和血管内皮生长因子（Vascular endothelial growth factor，VEGF）的表达变化，以期阐明 maspin 基因对肿瘤生长、浸润和转移的作用及机制。

作者介绍：阎 雄（1964- ），男，讲师，博士，研究方向：肝胆疾病。

1 材料和方法

1.1 材料

人肝癌细胞株 MHCC-97 由重庆医科大学临床学院消化内科张霞教授惠赠；正常肝细胞株 LO_2 购于上海细胞生物研究所。空载体质粒 pEFIRES-N 由美国得克萨斯州休斯敦 Baylor 医学院 Zhang Ming 博士惠赠。大肠杆菌株 JM109 由重庆医科大学检验系惠赠。培养基 DMEM、胎牛血清（Hyclone 公司）；RNA、质粒抽提试剂盒（上海华舜公司）；M-MLV 逆转录酶（美国 Promega 公司）；限制性内切酶、Surpercoiled DNA Ladder Marker、T4 连接试剂盒、胶回收试剂盒、EX Taq DNA（日本 Takara 公司）；Lipofectamine 2000 转染试剂盒（美国 Invitrogen 公司）；兔抗人 maspin（Santa Cruz 公司），兔抗人 VEGF（Boster 公司）。

1.2 方法

1.2.1 maspin/pEFIRES-N 表达载体的构建

1.2.1.1 maspin 基因的获取 maspin 上游引物 5'-GGGGAATTCATGGATGCCCTGCAACTA-3'，下游引物 5'-GGGGTCTAGATGCCACTTAAGGAGAA-3'。收集培养的 LO_2 细胞 2×10^6 个，按试剂盒说明提取总 RNA，用 M-MLV 逆转录酶和 maspin 下游引物合成第 1 链 cDNA，94℃ 5 min 灭活逆转录酶；用 EX *Taq* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增，反应体系 50 μl，内含 cDNA 4.0 μl，5.0 μl 10×buffer，上下游各引物 300 nmol/L，5 mmol/L $MgCl_2$，200 μmol/L dNTP，*Taq* 酶 41.675nkat。按下述条件进行循环：94℃ 60 s，62 ℃ 60 s，72 ℃ 45 s，35 个循环；以水作为阴性对照。扩增产物 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳 30 min（80 V），EB（0.5 mg/L）染色，用 BIO-RAD 图像分析仪观察并扫描制片，胶回收目的基因。

1.2.1.2 maspin/pEFIRES-N 表达载体的构建 质粒 pEFIRES-N 用 *Hind* Ⅲ、*Xba* Ⅰ双酶切，胶回收，T4 连接酶连接，连接产物转化感受态大肠杆菌 JM109，在氨苄青霉素抗生素平板上筛选生长过夜；挑取阳性质粒，并大量制备重组质粒。重组质粒经双酶切鉴定，再由上海生工公司测序鉴定。

1.2.2 重组质粒转染与稳定筛选 质粒转染与 G418 筛选：采用 Lipofectamine ™2000 脂质体转染法。转染前 1 d，MHCC-97 细胞换取无抗生素培养液后调整细胞浓度为 2×10^8 个 /L，以 2 ml/ 孔接种于 6 孔培养板中培养。待细胞增至 90%~95%时，将质粒 - 脂质体复合物转染至细胞中（质粒:脂质体 =1:3），37℃，50 ml/L CO_2，在无血清、无抗生素的培养液培养 16~18 h 后换 G418 选择培养液（400 mg/L）继续培养。2 周后可见长出筛选克隆，使用克隆环分离单个克隆于 24 孔板中，加入 G418 选择培养液（300 mg/L）继续培养。24 孔板中培养物长满后，转接到大的培养皿中培养。

1.2.3 筛选克隆的 PCR 扩增鉴定 收集经稳定筛选的肝癌细胞 MHCC-97 2×10^6 个，按说明书提取总 RNA，逆转录反应按 maspin 基因的获取方法进行。PCR 扩增采用 50 μl 反应体系，内含 cDNA 4 μl，5 μl 10×buffer，相关引物 200 nmol/L（上游引物为 pEFIRES-N 质粒上一段寡核苷酸序列 5'-TGCAATTGTTGTTGTTAACT-3'，下游引物 5'-GGGGAATICATGGATGCC CTGCAACTA-3'，扩增产物 410 bp），5 mmol/L $MgCl_2$，200 μmol/L dNTP，*Taq* 酶 41.675nkat。按下述条件进行循环：94℃ 60 s，60 ℃ 30 s，72℃ 30 s，35 个循环。

1.2.4 RT-PCR 检测 maspin 和 VEGF 在转录水平的表达 分别收集转染 maspin/pEFIRES-N 质粒组和 pEFIRES-N 质粒组的肝癌细胞 MHCC-97 2×10^6 个，接种于 6 孔板转染，72 h 后，按试剂盒说明抽提总 RNA，逆转录反应按 maspin 基因的获取方法进行。PCR 反应体积 50 μl，内含 5 μl 10×buffer，5 mmol/L $MgCl_2$，200 μmol/L dNTP，300 nmol/L 引物，83.35nkat *Taq* 酶和 4 μl RT 产物。maspin 反应条件：95℃ 5 min，94℃ 60 s，56 ℃ 60 s，72℃ 90 s，30 个循环，72℃延伸 10 min。VEGF 反应条件：94℃ 60 s，60 ℃ 45 s，72℃ 60 s，35 个循环。各引物及扩增长度见表 1。

表 1 Maspin 和 VEGF 引物序列和扩增长度

基因		引物序列	扩增长度（bp）
maspin	上游	5'-CTTGCCTGTTCCTTTTCCAC-3'	874
	下游	5'-TGGAGATTTGACCTTGGCA-3'	
VEGF	上游	5'-AGGGCAGAATCATCACGAAG-3'	401
	下游	5'-GGGAACGCTCCAGGACTTAT-3'	

1.2.5 Western Blot 检测 maspin 和 VEGF 蛋白表达 分别收集转染 maspin/pEFIRES-N 质粒组和 pEFIRES-N 质粒组的肝癌细胞 MHCC-97 2×10^6 个，提取核蛋白定量，通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样本，将蛋白样本转移至 PVDF 膜上，蛋白封闭液 37℃封闭 PVDF 膜 1 h，PBST 洗涤，加一抗（1:300）37℃孵育 4 h，PBST 振荡洗涤 2 次，加二抗（1:200）37℃孵育 20 min，PBST 洗涤 4 次，5 min/ 次，DAB 室温显色，显影，记录结果。

统计学处理：由 Quantity-One version3 分析软件计算条带 A 值。实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，用统计软件 SPSS12.0.1 行 t 检验，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 成功构建 maspin/pEFIRES-N 重组质粒

重组质粒 maspin/pEFIRES-N 经 *EcoR* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切后得到 5 640 bp 的载体片段和 2 584 bp 的 maspin 基因片断；pEFIRES-N 质粒经双酶切后仅得到 5 640 bp 的载体（图 1）。证明 maspin 基因已被插入到 pEFIRES-N 质粒中。

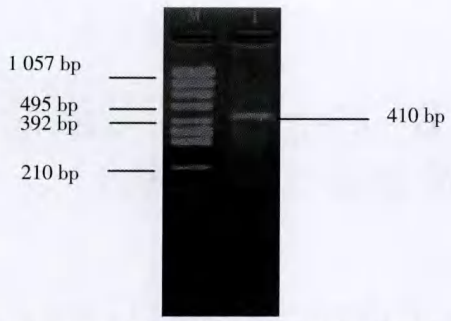
2.2 稳定筛选克隆的 PCR 扩增鉴定

对已稳定转染 maspin/pEFIRES-N 的肝癌细胞 MHCC-97，通过 PCR 扩增，可得到 410 bp 的扩增产物（图 2），说明转染质



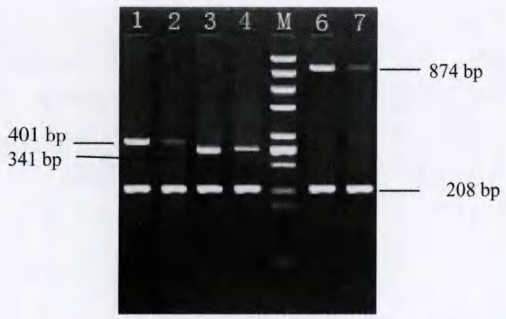
1.maspin/pEFIRES-N 经 *EcoR* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切；2.pEFIRES-N 质粒经 *EcoR* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切；M.maker

图 1 maspin/pEFIRES-N 重组质粒的酶切鉴定



M. maker; 1. PCR 扩增得到 410bp 的扩增产物

图 2　稳定筛选克隆的 PCR 扩增鉴定



1. 转染 pEFIRES-N 后 uPA 表达；2. 转染 maspin/pEFIRS-N 后 uPA 表达；3. 转染 pEFIRES-N 后 VEGF 表达；4. 转染 maspin/pEFIRES-N 后 VEGF 表达；M. maker; 6. 转染 maspin/pEFIRES-N 后 maspin 表达；7. 转染 pEFIRES-N 后 maspin 表达

图 3　稳定筛选的肝癌细胞 MHCC-97 中 maspin 和 VEGF mRNA 水平表达

表 2　maspin 和 VEGF 的 mRNA 平均 A 值比较($\bar{x}\pm s$)

转染	maspin	VEGF
pEFIRES-N 组	0.38 ± 0.07	0.74 ± 0.23
maspin/pEFIRES-N 组	1.46 ± 0.32	0.44 ± 0.17

$P<0.05$

粒 DNA 已整合到 MHCC-97 细胞染色质上，稳定筛选建株成功。

2.3　maspin 和 VEGF 在 mRNA 水平的表达

半定量 RT-PCR 结果以琼脂糖凝胶电泳条带的亮度和 A 值来判断 maspin 和 VEGF 的 mRNA 表达高低，凝胶电泳条带越亮，A 值越大，提示其 mRNA 表达越高。实验结果（图 3）显示，稳定转染 maspin/pEFIRES-N 的肝癌细胞 MHCC-97 中 maspin 和 VEGF 的 mRNA 电泳条带与转染 pEFIRES-N 组中相比，稳定转染 maspin/pEFIRES-N 组中 maspin 的 mRNA 表达明显增强，而 VEGF 的 mRNA 表达减弱；两组中的 maspin mRNA 和 VEGF mRNA 的平均 A 值（表 2），差异有统计学意义（$P<0.05$）。结果提示，过表达 maspin 可抑制 VEGF 基因的表达。

2.4　maspin 和 VEGF 蛋白水平的表达

稳定转染 maspin/pEFIRES-N 的肝癌细胞 MHCC-97 中 maspin 蛋白表达较 pEFIRES-N 转染组明显增强，而 VEGF 的蛋白表达较 pEFIRES-N 转染组明显减弱（图 4）。将各目的条带与内参 actin 的 A 值比较后，与 pEFIRES-N 转染组相比，maspin/pEFIRES-N 转染组中 maspin 蛋白表达平均上升了 59.2%，而 VEGF 的蛋白表达平均下降了 50.9%，其差异具有统计学意义（$P<0.05$）。maspin 和 VEGF 的蛋白表达结果与其各自的 mRNA 表达结果一致。

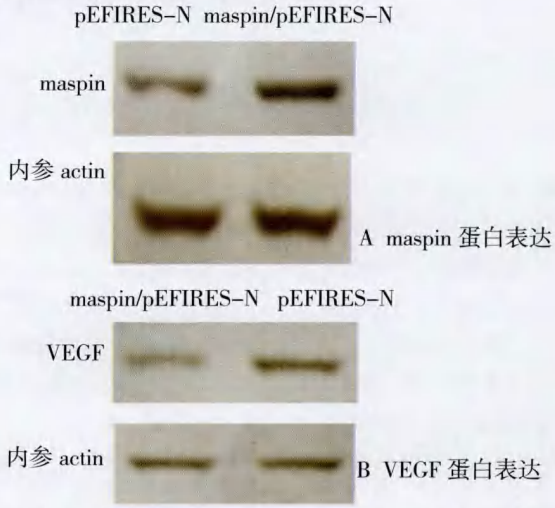


图 4 肝癌细胞 MHCC-97 中 maspin 和 VEGF 的蛋白水平表达

3　讨　论

原发性肝癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一，其发病率、复发率和死亡率有增加的趋势，肝癌的浸润和转移常常是治疗失败以及影响患者生命的重要原因。肝癌的浸润、转移受到许多特殊基因（癌基因和抑癌基因）的调控，是一个多基因、多阶段的复杂过程，而且这些机制仍未阐明。

新生血管的形成在实体肿瘤的发生、发展和转移中起重要的作用，因此诱导血管的生成的能力是恶性肿瘤能生长、浸润与转移的前提之一。研究证实肿瘤细胞本身能分泌和产生类血管生成因子，如 FGF、PD-ECGF、TGF-α、TNF-α、VEGF 等。其中 VEGF 可能是参与肿瘤新生血管形成的最重要因子之一。VEGF 是通过其定位于细胞表面的受体 Flt-1 和 KDR，影响血管内皮细胞的生长或血管的重塑。VEGF 与 Flt-1 结合后能促使血管内皮细胞的的形成和调节血管通透性，与 KDR 结合后能促进血管内皮细胞的增殖及成熟[3]。Zhang 等的研究表明maspin 蛋白能直接作用于 FGF 和 VEGF，阻断细胞的有丝分裂和管道的形成，抑制培养的血管内皮细胞向基质移行，从而抑制血管的生长，影响肿瘤的发生和发展[4,5]。同时 Cho 等还发现 maspin 蛋白能直接与胞外基质的Ⅰ型和Ⅳ型胶原蛋白结合，增加肿瘤细胞的粘附性，降低其移动的能力；抑制 VEGF 的功能，阻止血管的生成[6]。我们在 mRNA 和蛋白水平上比较了肝癌细胞株 MHCC-97 经 maspin/pEFIRES-N 表达质粒和 pEFIRES-N 空载质粒处理前后 maspin 与 VEGF 的变化。发现在肝癌细胞株 MHCC-97 中，maspin 基因的过表达将会降低 VEGF 在 mRNA 和蛋白水平的表达，两者相比，$P<0.05$，差异有统计学意义。

基础研究 文章编号:0253-3626(2009)06-0690-04

胃癌细胞株 SGC-7901 的 Wnt/β-Catenin 信号途径与 Caspase-8、Caspase-3 及 Bcl-2 的关系

凌 康[1],王 颢[2]

(1.重庆医科大学附属第一医院普外科;2.重庆医科大学公共卫生学院生殖生理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究人胃癌细胞系 SGC-7901 中 β-Catenin 与原癌基因 Bcl-2 及凋亡基因 Caspase-8、Caspase-3 表达的关系,初步探索 Wnt/β-Catenin 通路在肿瘤发生过程中作用机制。方法:(1)采用 RT-PCR 法分别检测人胃癌细胞系 SGC-7901 受吲哚美辛干预组和未受干预组中的 β-Catenin、Bcl-2、Caspase-8 及 Caspase-3mRNA 的表达;(2)采用 MTT 法检测吲哚美辛抗癌效应。结果:(1)吲哚美辛干预组较未受干预组表现为伴随 β-Catenin 表达水平降低,Bcl-2 表达下调,而 Caspase-8 及 Caspase-3mRNA 表达上调。(2)吲哚美辛对人胃癌细胞系 SGC-7901 抑制率呈浓度和时间依赖性。结论:胃癌的发生、发展可能是 Wnt/β-Catenin 通路功能亢进,进一步激活原癌基因 Bcl-2,并抑制凋亡基因 Caspase-8、Caspase-3,导致细胞增殖与凋亡失衡的结果。

【关键词】胃癌;细胞凋亡;Wnt/β-Catenin 通路

【中国图书分类法分类号】R735.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-04-25

Relationship between Wnt/β-Catenin signal pathway in gastric carcinoma cell line SGC-7901 and the expression of Caspase-8, Caspase-3 and Bcl-2

LING Kang, et al

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

【Abstract】*Objective*: To study the regulatory mechanism of Wnt/β-Catenin passthway-influenced apoptosis of human gastric cancer line SGC-7901 by detecting the expression of β-Catenin mRNA, Bcl-2mRNA, Caspase-8mRNA and Caspase-3mRNA. *Methods*: (1) Expressions of β-Catenin, Bcl-2, Caspase-8 and Caspase-3mRNAs in groups with or without indomethacin induction were detected by RT-PCR. (2) Methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assay was used to measure the anticancer activity of indomethacin. *Results*: (1)As compared with groups without indomethacin induction, expression of β-Catenin mRNA and Bcl-2 mRNA were lower, however, increased expression of Caspase-8 and Caspase-3mRNA were found in SGC-7901 cells after treatment with indomethacin. (2) Indomethacin of 50 μmol/L at 24 h couldn't induce apoptosis of gastric cancer cells. Indomethacin of 50 μmol/L at 48 and 72 h and of 100 μmol/L and 200 μmol/L at 24、48 and 72 h could induce apoptosis of gastric cancer cells in a dose- and time-dependent manner. *Conclusion*: Gastric cancer cells may be caused by apoptosis inbalance through Wnt/β-Catenin passthway, which activates expression of proto-oncogene Bcl-2 and inhibites expressions of Caspase-8 and Caspase-3.

【Key words】Gastric cancer; Apoptosis; Wnt/β-Catenin passthway

作者介绍:凌 康(1962-),男,主治医师,
研究方向:消化道肿瘤。

因此,本实验表明,在肝癌细胞株 MHCC-97 中,maspin 基因的过表达可下调 VEGF 基因的表达,可能阻止肿瘤血管的生成而达到抑制肿瘤增生和转移的目的,为基因治疗肝癌提供理论依据。

参 考 文 献

[1] Zou Z, Anisowicz A, Hendrix M J, et al. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epthelial cells[J]. Science, 1994, 263(5146): 526-529.

[2] Bailey C M, Khallkhali-Ellis Z, Seftor E A, et al. Biological functions of maspin [J]. J Cell Physiol, 2006, 209(3): 617-624.

[3] Yanoopoulos G D, Dais S, Gale N W, et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel fortion[J]. Nature, 2000, 407(3): 242-248.

[4] Zhang W, Zhang M. Tissue microarray analysis of maspin expression and its reverse correlation with mutant p53 in various tumors [J]. Int J Oncol, 2002, 20(6): 1145-1150.

[5] 梁启廉,陈小东,王三明,VEGF 和抑癌基因 maspin 在肾癌组织中的表达及意义[J].第三军医大学学报,2007,29(14):1416-1418.

[6] Cho J H, Kim H S, Park C S, et al. Maspin expression in early oral tongue cancer and its relation to expression of mutant-type p53 and vascular endothelial growth factor[J]. Oral ONcol, 2007, 43(3): 272-277.

(责任编辑:冉明会)