DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.09.021
第25卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 9
2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)09-0795-04

Smad4对人胰腺癌细胞HS766T生长抑制的研究

袁晟光[1],冯燮林[2],田 聆[3],魏于全[3],张肇达[2] ([1]第三军医大学附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院,重庆 400038;四川大学附属华西医院:[2]普通外科;[3]肿瘤生物治疗中心;成都 610041)

提 要:目的 探讨Smad4基因在人胰腺癌细胞中的肿瘤抑制作用。方法 应用分子克隆技术构建Smad4真核表达载体,然后用脂质体法将其导入到Smad4同源缺失的人胰腺癌细胞HS766T中,经G418筛选获得可稳定表达Smad4的人胰腺癌细胞克隆,用细胞计数和噻唑蓝(MTT)法观察细胞生长速度及增值率,流式细胞仪(FCM)检测Smad4表达、细胞凋亡及细胞周期情况。结果 获得了Smad4真核表达质粒pcDNA3.1-Smad4。Smad4导入人胰腺癌HS766T细胞后,肿瘤细胞增值能力明显受到抑制、生长速率显著下降,并出现细胞周期G_1期阻滞。结论 Smad4基因具有抑制胰腺癌细胞增殖的作用,可作为胰腺癌基因治疗的靶基因。

关键词:Smad4基因;胰腺癌;基因治疗
中图法分类号:R735.9;R394.2;R459.9 文献标识码:A

Inhibitive effect of Smad4 gene on the growth of human pancreatic adenocarcinoma cell line HS766T

YUAN Sheng-guang, FENG Xie-lin, TIAN Ling, WEI Yu-quan, ZHANG Zhao-da (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the inhibitory effect of Smad4 gene on the growth of human pancreatic adenocarcinoma cell line (HS766T) cells. Methods Smad4 cDNA was cloned into the pcDNA3.1 vector to construct a recombinant expression vector plasmid pcDNA3.1-Smad4, which was then transfected by liposome method into HS766T cells with homozygous deletion of Smad4. After G418 selection, Smad4 gene expression, cell cycle and cell apoptosis were assessed by flow cytometry, and the cell growth rate by cell count and MTT analysis. Results The Smad4 gene recombinant expression vector was constructed. After transfection with pcDNA3.1-Smad4, the proliferation of cultured HS766T pancreatic adenocarcinoma cells was suppressed with the suppression rate higher than 40% on the fourth day. The same results were found by MTT assay. The cells of G_1 phase increased obviously while the cell number of S phase decreased, although no obvious increase of apoptosic cell number was observed. Wild-type Smad4 gene attributed to the increase of G_1 phase cells and the decrease of S phase cells in HS766T cells and could inhibit the growth of HS766T cells. Conclusion Wild-type Smad4 gene can inhibit the proliferation of human pancreatic adenocarcinoma cells and can be used as one of the target genes of pancreatic adenocarcinoma gene therapy.

Key words: Smad4 gene; pancreatic adenocarcinoma; gene therapy

Smad4基因是一个新型抑癌基因,它是转化生长因子β(TGF-β)信号传导系统的核心成员,在多种肿瘤中都存在该基因的缺失或突变,在胰腺癌细胞中,Smad4基因的缺失或突变高达50%左右[1~3]。为了探讨Smad4基因对胰腺癌的影响,我们将野生型Smad4基因导入有同源缺失的人胰腺癌细胞系HS766T中,观察该基因的肿瘤抑制功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 酶及主要试剂 限制性内切核酸酶,TS4DNA连接酶,Taq酶等均购自Bochringer Mannheim公司。G418购自Calbiochem-Novabiochem公司。Smad4扩增引物(P1:5′-CGCCATGGACAATATGTCTATTACG-3′和P2:5′-GCTCTAGACCTCAGTCTAAAGGTTGTGG-3′)由GIBICO BRL公司合成。

1.1.2 Smad4基因、载体和受体菌 人pTA-Smad4 cDNA质

作者简介:袁晟光(1970-),男,四川省宣汉县人,博士,主治医师,主要从事肝胆胰疾病方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68754655

收稿日期:2002-03-03;修回日期:2002-10-04

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

粒和真核表达载体 pcDNA3.1由由四川大学附属华西医院肿瘤生物治疗中心提供。受体菌为大肠杆菌 DH5a。

1.1.3 人胰腺癌细胞系 HS766T 来自美国 ATCC(American type culture collection)。

1.2 方法

1.2.1 质粒的提纯、鉴定和细菌转化 按文献[3]的方法进行。

1.2.2 pcDNA3.1-Smad4 重组质粒的构建 pTA-Smad4 cDNA 质粒和真核表达载体 pcDNA3.1 载体经 *Eco*RI 酶切、电泳后，分别回收 1.6 kb 的全长 SMAD4 cDNA 片断和 5.4 kb 的 pcDNA3.1 载体片段，脱磷酸化后平端连接。将连接产物转化 DH5a 大肠杆菌，氨苄西林培养板筛选出 Smad4 基因阳性克隆后。最后用 *Bgl*Ⅱ、*Pst*Ⅰ 酶切鉴定得到 pcDNA3.1-Smad4 重组质粒。

1.2.3 SMAD4 基因转染 HS766T 细胞及筛选 采用 LIPOFECTAMINE 法将含 Smad4 基因的重组质粒 pcDNA3.1-Smad4 导入 HS766T 细胞中，同时将空载体 pcDNA3.1 也转染 HS766T 细胞作为阴性对照组。转染 72 h 后，将细胞 1∶10 移至含 G418 (300 μg/ml)的 RPI640 培养基中。每 3～5 d 更换培养液，经 2 周时间得到 G418 抗性克隆。

1.2.4 流式细胞仪检测目的基因表达 收获 1×10^6 个细胞，PBS 洗涤细胞 2 次(1 500 r/min，3 min)，加入 0.1% 皂角素 0.5 ml 重悬细胞，室温孵育打孔 15 min，2 000 r/min 离心 3 min，弃上清液，PBS 重悬洗涤 3 次，加入兔抗人 SMAD4 抗体-溶液(1∶50，PBS 稀释)100 μl，4 ℃孵育过夜，PBS 洗涤 2 次后加入荧光素标记的鼠抗兔抗体(1∶50，PBS 稀释)50 μl，4 ℃孵育 5 h，PBS 洗涤 2 次后用 1 ml PBS 重悬细胞，上机检测。

1.2.5 MTT 法测 SMAD4 对肿瘤的抑制率[4] 取对数生长期细胞制备成 5×10^3/ml 悬液，96 孔板培养 48 h，加 40 μl MTT(2 mg/ml)，37 ℃温育 4 h，去上清，加二甲亚砜 100 μl，在 BIO-RAD 酶标仪 570 nm 处测 *A* 值，并计算抑制率。

1.2.6 细胞生长曲线测定 指数生长期细胞以每孔 2×10^5 细胞密度接种于 6 孔培养板，每组 3 个复孔，培养 24 h 后收获并计数细胞，连续 4 d，每组每天收获 3 孔分别计算，最后取平均值。未测量细胞每日半量更换培养液继续培养。

1.2.7 细胞凋亡和细胞周期动力学分析[5] 取 1×10^6 个对数生长期细胞，PBS 洗涤后 75% 乙醇固定，4 ℃保存备用，检测前用 PBS 洗涤 3 次，去除固定液，加入 200 μl RNase(1 g/L)，37 ℃水浴 30 min，再加入 800 μl PI 染色液(100 mg/L，1.0% Triton X-100，9 g/L NaCl)混匀，4 ℃避光作用 30 min 后用流式细胞仪检测。

1.3 统计学处理

采用 χ^2 和 *t* 检验。

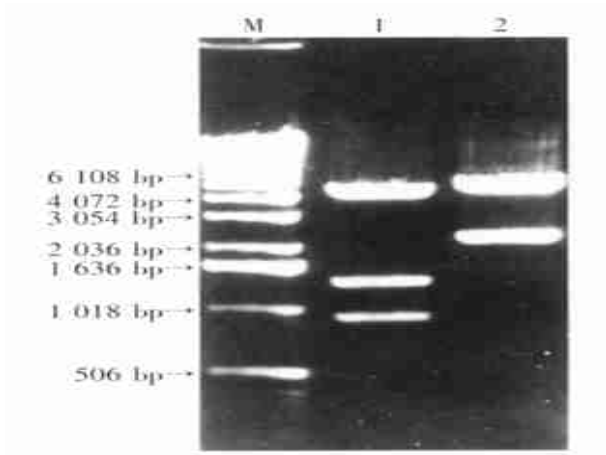
2 结果

2.1 SMAD4 基因的重组真核表达质粒的构建

将 SMAD4cDNA 克隆到真核表达载体 pcDNA3.1 的 *Eco*RI 位点，获得 SMAD4 基因重组质粒 pcDNA3.1-SMAD4。该质粒可被 *Bgl*Ⅱ 切为 2.2 kb 和 4.9 kb 两条带，被 *Pst*Ⅰ 切为 4.55 kb、1.35 kb、0.9 kb 及 0.3 kb 4 条带，见图 1。

2.2 Smad4 基因转染细胞抗 G418 阳性克隆的筛选及蛋白表达

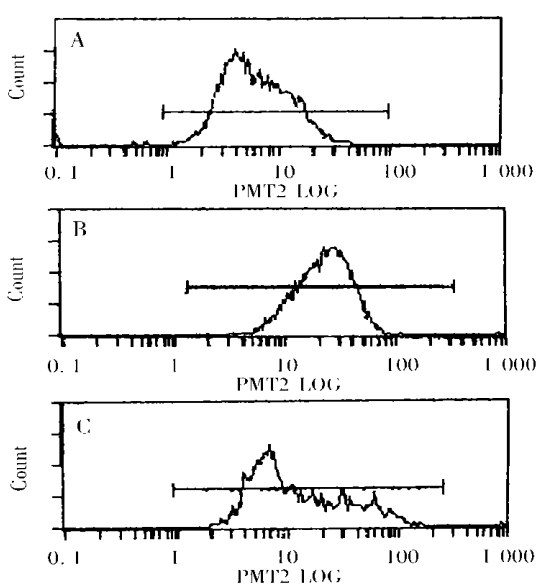
经 2 周筛选得到 G418 阳性克隆，转染 Smad4 基因的 HS766T 细胞克隆命名为 HS766T-Smad4，转染空质粒的细胞克隆命名为 HS766T-*neo*。FMC 检测显示 HS766T-Smad4 细胞有 Smad4 表达，见图 2。



M: λDNA / *Eco*RⅠ ＋ *Hind* Ⅲ Marker; 1: Plasmid / *Pst*Ⅰ; 2: Plasmid / *Bgl*Ⅱ

图 1 pcDNA3.1-Smad4 质粒酶切鉴定

Fig 1 Restriction endonuclease digestive identification of recombinant pcDNA3.1-Smad4



A: HS766T cell; B: HS766T-smad4 cell; C: HS766T-*neo* cell

图 2 Smad4 表达检测

Fig 2 Dectection of protein expression Smad4 by FCM

2.3 MTT 法测定细胞增值能力

MTT 测定结果显示，HS766T-Smad4 细胞的增值能力明显低于 HS766T 及 HS766T-*neo* 细胞，细胞抑制率为 48.68%，与对照

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

相比差异有显著性($P<0.05$), 见表 1。

2.4　Smad4 对细胞生长速度的影响

我们比较了 HS766T-Smad4、HS766T 及 HS766T-*neo* 细胞的生长情况, 结果发现 HS766T-Smad4 细胞生长速度较对照明显减慢, 到第 4 天抑制率达 40%, 见表 2。

表 **1**　细胞增值 **MTT** 检测结果

Tab 1　The result of cell proliferation by MTT

Cell line	A_{570} Value($\bar{x}\pm s$)	Inhibition rate(%)
HS766T	0.647±0.045	0.00
HS76-Smad4	0.430±0.052 *	48.68 *
HS766T-*neo*	0.617±0.003	4.64

*: $P<0.05$ *vs* HS766T, HS766T-*neo*

表 **2**　细胞计数结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　The result of cell count($\bar{x}\pm s$)

Cell line	Time(d)			
	1	2	3	4
HS766T(×10^4)	29.33±082	51.33±4.73	90.01±7.21	210.55±6.49
HS766T-*neo*(×10^4)	29.07±1.74	49.73±3.21	87.31±6.73	209.34±7.37
HS766T-Smad4(×10^4)	22.67±2.08	29.00±1.00	54.00±2.00 *	139.63±5.18 *

*: $P<0.01$ *vs* HS766T, HS766T-*neo*

2.5　细胞凋亡及细胞周期分析

FCM 检测显示三组细胞均无明显的细胞凋亡, 但 HS76-Smad4 组的 G_1 期细胞比例明显增加, 而 S 期细胞比例明显下降, 与 HS766T 及 HS766T-*neo* 相比差异有显著性($P<0.05$), 见表 3。

表 **3**　**Smad4** 对 **HS766T** 细胞周期的影响(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3　The effects of Smad4 on cell cycle of HS766T cells(%, $\bar{x}\pm s$)

Cell line	G_1	S	G_2/M
HS766T	57.72±1.94	31.25±1.63	11.03±0.76
HS766T-*neo*	58.04±1.74	27.63±1.48	14.31±1.03
HS766T-Smad4	68.21±2.17 *	21.19±1.58 *	10.61±0.73

*: $P<0.05$ *vs* HS766T, HS766T-*neo*

3　讨论

Smad4/DPC4 基因是近年来发现的又一抑癌基因, 位于人 18 号染色体长臂上, 编码一种 552 个氨基酸的蛋白[1]。Smad4 蛋白被认为是 TGF-β 信号传导系统中的关键介质。TGF-β 超家族成员与细胞膜上的受体结合, 激活胞内的 Smad2 和 Smad3, 激活的 Smads 蛋白与 Smad4 形成复合物, 然后转移入细胞核内, 发挥转录激活因子的作用[1]。TGF-β 超家族成员具有调节细胞增殖、分化, 抑制多种细胞增生等多种功能。Smad4 基因的缺失或突变将使细胞对 TGF-β 超家族成员无应答, 从而导致细胞异常增生甚至恶变[2]。由于 Smad4 基因在各种肿瘤如胰腺癌、结直肠癌、胆管癌及乳腺癌等中存在缺失或突变, 人们开始研究其肿瘤基因治疗方面的意义。Dai 等[6] 将野生型 Smad4 基因导入该基因缺失的乳腺癌细胞中, 结果发现该细胞恢复了对 TGF-β 类似物 4-OHT 的反应, 出现 G_1 期细胞停滞和细胞凋亡。Grau 等[4] 发现 TGF-β1 不能刺激缺失 Smad4 基因的胰腺癌细胞表达 $p21^{waf1}$, 也不能抑制缺失该基因的细胞的生长, $p21^{waf1}$ 具有抑制细胞周期素/细胞周期素依赖性激酶的底物磷酸化作用, 从而导致 G_1 期阻滞, 因此认为 TGF-β1 引起的细胞生长抑制可能是通过 Smad4 基因激活 $p21^{waf1}$ 来实现的。最近 Hunt 等[7] 发现转入 Smad4 可以直接诱导 $p21^{waf1}$ 蛋白的表达, 导致乳腺癌细胞生长受到抑制, 认为这可能是由于 Smad4 绕过 TGF-β 受体活化而直接进入细胞核发挥 TGF-β 信号通路的转录活化功能。本实验发现将野生型 Smad4 基因导入 Smad4 同源缺失的人胰腺癌细胞株 HS766T 后可引起细胞增殖能力明显降低, FMC 分析发现 G_1 期细胞的明显增加, 同时 S 期细胞明显减少, 出现 G_1 期阻滞现象, 同时细胞的生长速度明显减慢, 其抑制率可达 40%左右。其可能的原因是培养细胞的培养基中存在少量 TGF-β, 而 HS766T 细胞有较高水平的 TGF-βⅠ、Ⅱ和Ⅲ型受体表达[8], 野生型 Smad4 的引入使 TGF-β 信号传导途径得以恢复; 另外野生型 Smad4 还能诱导 $p21^{waf1}$ 蛋白的产生而抑制细胞生长[7]。Atfi 等[9] 报道在培养基中加入 TGF-β1 的情况下转入野生型 Smad4 可引起肿瘤细胞发生凋亡, 但本实验发现在未加入额外的 TGF-β 超家族成员的情况下, Smad4 并不能引起细胞凋亡, 提示 Smad4 的功能与 TGF-β 信号强弱及信号通路的其他成员有关, 具体机制仍需进一步研究。总之, 本实验进一步证实 Smad4 具有调节细胞增殖以及抑制细胞生长的功能, 可以作为胰腺癌基因治疗的靶基因。

参考文献:

[1] Duff E K, Clarke A R. Smad4(SMAD4)-a potent tumour suppressor[J]. Br J Cancer, 1998, 78(12): 1615－1619.

[2] Massague J. TGFβ signaling: receptors, transducers, and mad proteins[J]. Cell, 1996, 85(7): 947－950.

[3] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. 233－292, 657－658.

[4] Grau A M, Zhang L, Wang W, *et al*. Induction of $p21^{waf1}$ expression and growth inhibition by transforming growth factor β involve the tumor suppressor gene SMAD4 by human pancreatic adenocarcinoma cells[J]. Cancer Res, 1997, 57(18): 3929－3934.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[5] 姜 泊, 张亚历, 周殿元. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 1996. 123-124.
[6] Dai J L, Bansal R K, Kern S E. G_1 cell cycle arrest and apoptosis induction by nuclear Smad4/Dpc4: phenotypes reversed by a tumorigenic mutation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(4): 1427-1432.
[7] Hunt K, Fleming J, Abramian A, *et al*. Overexpression of the tumor suppressor gene Smad4/DPC4 induces $p21^{waf1}$ expression and growth inhibition in human carcinoma cells[J]. Cancer Res, 1998, 58(24): 5656-5661.
[8] Baldwin R L, Friess H, Yokoyama M, *et al*. Attenuated ALK5 receptor expression in human pancreatic cancer: correlation with resistance to growth inhibition[J]. Int J Cancer, 1996, 67(2): 283-288.
[9] Atif A, Buisine M, Mazars A, *et al*. Induction of apoptosis by DPC4, a transcriptional factor regulated by transforming growth factor-β through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) signaling pathway[J]. J Biol Chem, 1997, 272(40): 24731-24734

(编辑 薛国文)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2003)09-0798-02

气压弹道碎石术治疗输尿管结石78例报告

A report of 78 cases with ureteral calculi with Wolf Ureteroscope and pneumatic Lithotripter

张艮甫, 王平贤, 范明齐, 叶 岗, 黄赤兵, 杨清浩, 肖 亚 (第三军医大学附属新桥医院泌尿外科, 重庆 400037)

2000年8月至2001年12月, 我院在Wolf输尿管镜下应用气压弹道碎石术对78例(80次)输尿管结石病人进行原位碎石, 疗效满意、并发症少, 现报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

本组78例患者。男43例, 女35例。年龄17~71岁, 平均年龄42.5岁。全部为输尿管结石患者。碎石部位: 左侧36例, 右侧42例。其中上段11例, 中段29例, 下段38例。结石横径7~13 mm, 长径8~25 mm。输尿管结石病史<1个月者13例、>1个月者21例、>3个月者19例、>6个月者7例、>12个月者18例。本组病人中有23例为曾1次或多次行体外震波碎石(Extracorporeal shock-wave lithotomy, ESWL)治疗, 结石未粉碎或因碎石后2月后仍不能排除大块碎石的病例。

1.2 碎石方法

患者取截石位, 采用腰麻或硬膜外麻醉。在连续注水情况下经尿道向碎石侧输尿管插入Wolf 8/9.8F输尿管硬镜。输尿管镜接近结石时, 从其操作道插入直径0.8~1.6 mm气压弹道碎石子弹体, 手柄固定子弹体, 并与空气压缩泵相连。在子弹体轻触结石后, 启动气压(0.15~0.2 kPa)压缩泵, 用单个脉冲式或连续脉冲式击及结石, 将结石粉碎至3 mm左右。上段结石活动度大, 有时需要用套石篮固定再行碎石。碎石结束后或结石被推回肾盂内后常规放置双"J"管引流, 后者给予ESWL。均根据结石排出情况择期拔除双"J"管。若2周后X线摄片显示结石碎片尚未排出者, 再次行气压弹道碎石。如结石下方因输尿管狭窄、扭曲、组织炎性增生致输尿管镜无法接近结石时, 则终止操作, 并放置一F3或F4输尿管导管引流, 48 h后拔除导管。输尿管穿孔者立即改为开放性手术取石。

2 结果

在78例患者中, 于输尿管镜下清晰地观察到结石被气压弹道碎石子弹体撞击成碎屑者72例, 其中70例在2周内结石碎屑全部排尽。另2例于术后第18天和22天再次行气压弹道碎石, 再次碎石后2周内结石碎屑均全部排尽。有2例在气压弹道碎石过程中结石被推回到肾盂内, 随后给予ESWL, ESWL后2周内结石碎屑亦完全排出。有1例输尿管结石位于膀胱壁内段, 输尿管开口充血、水肿, 输尿管镜无法进入患侧输尿管, 有2例虽X线摄片显示结石位于输尿管上段, 但输尿管镜在向上插入过程中却遇到一"盲端", 输尿管镜无法继续向前推入, 故未能在直视下进行气压弹道碎石, 而分别放置一F3和F4输尿管导管2 d, 以后进行开放性手术取石, 术中见结石下方输尿管狭窄, 前壁上有大量增生的息肉样组织。1例因输尿管穿孔立即进行开放手术取石, 术后恢复良好。

3 讨论

输尿管镜下气压弹道碎石术是近十年来逐渐发展、成熟的一项新的腔内泌尿外科技术, 与液电、超声、激光碎石术相比, 它具有技术、设备简单, 价格低廉, 不产生热效应, 对组织几乎没有损害, 病人术后恢复快, 并发症少等优点。其原理是将压缩气体产生的能量传导给碎石机手术柄内的子弹体, 子弹体脉冲式撞击结石而将结石击碎。冲击前后振幅一般低于2.0 mm, 仅对粘膜产生轻微冲击损伤, 很少产生水肿、出血, 且无远期不良影响。据报道临床效果普遍较好[1]。

Wolf输尿管镜经过不断改进, 现已达到了较完美的程度。窥镜前端较细小, 尖端有一弯头, 镜体向后逐渐变粗, 具有扩张器作用, 视野也清晰宽阔, 操作方便容易[2]。当置镜看清楚输尿管口后, 如技术不熟练, 先插入输尿管导管, 在液压灌注下, 将输尿管镜尖端接触输尿管外口并轻轻下压, 稍旋转输尿管镜, 如遇阻力, 试活动输尿管导管, 导管活动度大证明输尿管镜

(下转801页)

作者简介: 张艮甫(1954-), 男, 江西省樟树市人, 硕士, 教授, 主要从事泌尿外科、肾移植方面的研究, 发表论文25篇。电话: (023)68755000-74617

收稿日期: 2002-03-16; 修回日期: 2002-06-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net