



## TGF $\alpha$ 对胃癌细胞cyclin E和cyclin D1表达的影响

细胞增殖是通过细胞周期不断循环而完成。促使细胞由G<sub>1</sub>期进入S期的cyclins 主要有cyclin D和E。Cyclin D有1~3种,具有组织特异性,在胃肠组织为cyclin D1。肿瘤的发生及恶性增生与细胞周期调控系统紊乱、细胞增殖失控密切相关[1]。研究发现, cyclin E、D基因的扩增或高表达,与肿瘤的进展密切相关[2], [3]。

转化生长因子 $\alpha$ (TGF $\alpha$ )与上皮源性肿瘤尤其是胃肠道肿瘤的发生发展关系密切[4]。我们在此前研究中也发现[5],在胃粘膜肠上皮化生、不典型增生和胃癌中, TGF $\alpha$ 和cyclin E表达均随病变加重而增加,均显著高于在慢性胃炎的表达; TGF $\alpha$ 和cyclin E表达存在显著的正相关。我们在细胞体外实验中发现[6], TGF $\alpha$ 能促进胃癌增殖、DNA合成和细胞周期进程。

本研究旨在探讨TGF $\alpha$ 对胃癌细胞G<sub>1</sub>期cyclin E和D<sub>1</sub>表达的影响,为解释上述现象,为研究TGF $\alpha$ 的促细胞增殖机制及促癌机理提供信息和实验依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要试剂与设备

兔抗人cyclin E、鼠抗人cyclin D1一抗,均为Santa Cruz公司产品。FITC标记的羊抗兔和羊抗鼠二抗,为武汉博士德生物工程公司产品。TGF $\alpha$ 、碘化丙啶(PI)、胰蛋白酶均为Sigma产品。PI染色工作液配制: 100  $\mu$ g/ml PI, 1.0% Triton-X100, 0.9% NaCl, 4  $^{\circ}$ C避光保存。RNase A为华美公司产品。小牛血清为杭州四季青公司产品,无支原体级。RPMI-1640为Gibco公司产品。

#### 1.2 方法

1.2.1 细胞体外培养及G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期同步化处理 胃癌SGC7901细胞用含10%小牛血清RPMI-1640培养液、置5%CO<sub>2</sub>培养箱、37  $^{\circ}$ C常规培养。取生长状态良好的传代。以细胞2.5 $\times$ 10<sup>5</sup>/孔传代至6孔培养板,培养液3 mL/孔,传代24 h后生长状况良好。用无血清RPMI-1640阻断法进行细胞G<sub>1</sub>期同步化:第1~3孔继续常规培养,第4~6孔把常规培养液换为无血清RPMI-1640培养液,继续培养48 h。倒置显微镜观察细胞生长情况,并用FCM检测G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期百分率。

对细胞进行同步化处理,旨在使较多细胞处于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期,以便于观察TGF $\alpha$ 对细胞cyclin E和D<sub>1</sub>表达的影响。

1.2.2 细胞同步化率的检测 细胞经上述处理后,用0.25%胰酶消化后收集; 800 r/min离心5 min,弃培养液,用0.01M PBS洗1次;在旋涡震荡器上震荡,并加入70%预冷的酒精,固定12 h以上; 1000 r/min离心10 min,弃去酒精, PBS洗2次;加1 mg/ml的RNase A 200  $\mu$ l, 37  $^{\circ}$ C水浴30 min; 1000 r/min离心10 min,弃上清,加PI染色液1 ml, 4  $^{\circ}$ C避光染色30 min; 400目尼龙网过滤;用FCM检测每样品5000个细胞;用DNA分析软件分析G<sub>1</sub>期细胞的百分率。

1.2.3 实验分组及处理 以5 $\times$ 10<sup>5</sup>/孔细胞接种于6孔培养板传代,培养液3 ml/孔,共12孔。分为两

组, 每组6孔, 分别用于cyclin E和D<sub>1</sub>表达的检测。传代24 h后, 用无血清RPMI-1640培养液处理48 h, 进行细胞G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期同步化。然后进行如下处理: 1、2号孔无特殊处理, 分别用于染色时的阴性对照和无血清培养下cyclin E和D<sub>1</sub>表达的检测; 3号孔给予2.5%低血清+RPMI-1640培养; 4~6号孔在3号处理基础上, 分别加入10、30、50 μg/L TGF $\alpha$ ; 均作用5 h。

1.2.4 免疫荧光染色及FCM检测 细胞经上述处理后, 用胰酶消化收集; 800 r/min离心, PBS洗1次; 4%多聚甲醛固定30 min以上; 用含0.1%Triton X-100的PBS在4 °C下作用5 min; PBS洗1次, 加入20 μl山羊血清, 室温下作用10 min; 吸去多余血清, 1号孔的细胞加PBS 50 μl以代替一抗, 用作阴性对照; 其余加cyclin E或cyclin D<sub>1</sub>一抗(1:50稀释)各 50 μl, 置4 °C冰箱中过夜; 吸去多余一抗, PBS洗1次, 分别加FITC标记的羊抗兔或羊抗鼠二抗(1:64), 于37 °C水浴箱中避光作用30 min; PBS洗1次, 1 ml PBS重悬细胞, 400目尼龙网过滤; FCM检测。

1.2.5 统计学分析 采用SPSS 10.0统计分析软件进行分析。计数资料用 $\chi^2$ 检验, P<0.05认为有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 细胞同步化率

细胞经无血清RPMI-1640培养48 h后, 用倒置显微镜观察, 其生长速度明显减慢。用PI染色、FCM检测, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞的百分率平均由常规培养的54%上升到72%, 同步化效果较好。

### 2.2 TGF $\alpha$ 对胃癌细胞cyclin E表达的影响

细胞经不同处理后, 用免疫荧光染色及FCM检测发现, 仅用低血清培养, cyclin E表达的阳性率为43.18%(与无血清培养阳性率24.46%相比, P<0.001), 加入10、30、50 μg/L TGF $\alpha$ 时, 其阳性率分别为51.53%、63.63%、68.36%(与仅用血清培养相比, P<0.001)。cyclin E的随TGF $\alpha$ 浓度的增加而显著增加。

### 2.3 TGF $\alpha$ 对胃癌细胞cyclin D<sub>1</sub>表达的影响

细胞经不同处理后, 用免疫荧光染色及FCM检测发现, 仅用低血清培养, cyclin D<sub>1</sub>表达的阳性率为52.03%(与无血清培养阳性率45.94%相比, P<0.001), 加入10、30、50 μg/L TGF $\alpha$ 时, 其阳性率分别为54.63%、62.28%、79.55%(与仅用血清培养相比P<0.001)。cyclin D<sub>1</sub>的表达也随TGF $\alpha$ 浓度的增加而显著增加。

由以上检测可知, 与单用低血清比, 加入50 μg/L TGF $\alpha$ 处理, 可使cyclin E和 D<sub>1</sub>的表达分别增加了25.18%和27.52%, 均具有显著的统计学差异(P<0.001)。

## 3 讨论

我们用TGF $\alpha$ 不同浓度作用于胃癌SGC7901细胞, 用免疫荧光染色、FCM检测细胞cyclin E和 D<sub>1</sub>表达变化。该方法具有免疫组化的特异性, 又较免疫组化敏感, 是目前在蛋白水平进行间接定量检测较好的方法。结果发现, 在低血清培养液中加入 TGF $\alpha$ , 使胃癌细胞cyclin E和D<sub>1</sub>的表达显著增加, 并有剂量的增加而增加。结合我们以前的研究[6], 提示TGF $\alpha$ 可促进胃癌细胞cyclin E和D<sub>1</sub>表达, 从而发挥起促DNA合成、加速细胞周期进程的作用。

本研究为探索TGF $\alpha$ 的促胃癌细胞增殖机制, 为通过阻断其作用以寻找肿瘤治疗新方法提供了信息和实验依据。

- [1]Musgrove EA. Cyclins: roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation[J]. Growth Factors, 2006, 24(1): 13-9.
- [2]Tenderenda M. A study on the prognostic value of cyclins D<sub>1</sub> and E expression levels in resectable gastric cancer and on some correlations between cyclins expression, histoclinical parameters and selected protein products of cell-cycle regulatory genes[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2005, 24(3): 405-14.
- [3]Chen CH, Shen J, Lee WJ. Overexpression of cyclin D1 and c-Myc gene products in human primary epithelial ovarian cancer[J]. Int J Gynecol Cancer, 2005, 15(5): 878-83.
- [4]Back W, Rohr G, Bleyl U. Expression of TGF-alpha in neuroendocrine tumors of the distal colon and rectum[J]. APMIS, 2003, 111(10): 931-9.
- [5]梁卫江, 张万岱. 胃癌及其癌前病变中TGF $\alpha$ 和cyclin E表达及两者关联性分析[J]. 癌症, 2004, 23(3): 259-63.
- [6]梁卫江, 肖冰, 赖卓胜, 等. TGF $\alpha$ 对胃癌细胞周期的促进作用[J]. 中华消化杂志, 2000, 20(5): 357-8.

---

[回结果列表](#)