

原发性及转移性胰腺癌细胞中 TGF β 1 和 TGF β R1 的表达

陈坚 钟良^Δ 邱冬妮 孙大裕

(复旦大学附属华山医院消化科 上海 200040)

【摘要】 目的 分别对具有原发癌特性的 BxPC-3 及转移癌特性的 AsPC-1 胰腺癌细胞株中 TGF β 1 及其 I 型受体 TGF β R1 mRNA 及蛋白的表达情况进行研究。方法 采用实时荧光定量 RT-PCR 及 Western blot 方法检测 AsPC-1 和 BxPC-3 胰腺癌细胞中 TGF β 1 和 TGF β R1 mRNA 及蛋白的表达。结果 BxPC-3 中 TGF β 1 和 TGF β R1 的 mRNA 和蛋白均呈低表达,AsPC-1 中 TGF β 1 和 TGF β R1 的 mRNA 和蛋白呈高表达,两者相比较有显著统计学差异($P < 0.05$)。结论 TGF β 1 和 TGF β R1 的高表达可能与胰腺癌的远处转移密切相关。

【关键词】 胰腺癌; 转化生长因子 β 1; 受体

【中图分类号】 R 735.3⁺4 **【文献标志码】** A

Expressions of TGF β 1 and TGF β R1 in primary and metastatic pancreatic cancer cell lines

CHEN Jian, ZHONG Liang^Δ, QIU Dong-ni, SUN Da-yu

(Department of Gastroenterology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

【Abstract】 **Objective** To compare the different expressions of transforming growth factor beta1(TGF β 1) and its type one receptor(TGF β R1) between primary pancreatic cancer cell line AsPC-1 and metastatic pancreatic cancer cell line BxPC-3. **Methods** The mRNA expressions of TGF β 1 and TGF β R1 in AsPC-1 and BxPC-3 pancreatic cancer cell lines were quantatitived by real-time RT-PCR. The protein levels of TGF β 1 and TGF β R1 in these two cell lines were measured by Western blot assay. **Results** Compared with the primary pancreatic cancer cell AsPC-1, the mRNA and protein expressions of TGF β 1 and TGF β R1 were much higher in BxPC-3 pancreatic cancer cells($P < 0.05$). **Conclusions** Upregulations of TGF β 1 and TGF β R1 might be a pivotal incidence in the procedure of malignant progressing and metastasis in pancreatic cancer cells.

【Key words】 pancreatic carcinoma; transforming growth factor beta; receptor

转化生长因子 β (transforming growth factor beta, TGF β)超家族介导的信号通路是调控肿瘤发生、发展、转移的重要通路。已知 TGF β 对早期胰腺肿瘤有生长抑制作用,但对晚期胰腺肿瘤反而有促浸润转移作用^[1-4]。目前国内外学者报道 TGF β 1 及其 I 型受体 TGF β R1 在不同临床分期的胰腺癌中的表达不尽相同,且机制尚未完全阐明。本文采用实时荧光定量 RT-PCR 及 Western blot 法对具有原发癌特性的 BxPC-3 胰腺癌细胞和转移癌特性的 AsPC-1 胰腺癌细胞中 TGF β 1 及 TGF β R1 的

mRNA 及蛋白表达水平作比较研究,以期探讨两者与胰腺癌远处转移的相关性。

材料和方 法

主要仪器 恒温细胞培养箱(NAPCO, series 5400 CO₂ incubator)、超净台、倒置相差显微镜(OLYMPUS)、液氮罐、-80℃深低温冰箱(HARRIS)、高速分散器(上海金达生化仪器厂)、冷冻离心机(Eppendorf 公司)、PCR 仪(MJ Research

^ΔCorresponding author E-mail:zhongniping@163.com

公司)、分析天平等。

主要试剂 RPMI 1640 培养液(Gibco 公司)添加青霉素 100 U/mL、链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 10%小牛血清;胰蛋白酶(上海华美公司);低压高容缓冲盐 HEPES(Sigma 公司);Trizol 试剂(Gibco BRL 公司);反转录酶 M-MLV、dNTP(Promega 公司);Anti-Transforming Growth Factor-b1(Mouse), Anti-Transforming Growth Factor-b soluble Receptor I(Mouse)及 Anti-mouse IgG HRP Conjugate(1 mg/mL, w402B, 18434101, Merck-Calbiochem 公司)。

实验材料 人胰腺癌细胞株 AsPC-1 和 BxPC-3 均由中国科学院上海生物细胞研究所提供。AsPC-1 培养自晚期胰头癌患者的腹水中,表现转移瘤的特性;BxPC-3 培养自人中分化胰腺癌细胞,具有原发瘤的特性。

荧光定量 RT-PCR 检测 TGF β 1 和 TGF β R1 mRNAs 的表达

总 RNA 提取 用 Trizol 一步法分别提取 AsPC-1 和 BxPC-3 细胞的总 RNA。

逆转录反应(RT) 逆转录反应严格按照 Applied Biosystems 公司试剂盒说明书进行。采用 PrimerSelect 软件设计 PCR 引物。

TGF β 1 引物:上游引物:5'-TGCGGCAGCTGTACATTGACTTCC-3';下游引物:5'-GAGGCGCCCGGGTTATGCTGGTT-3';目的片段 169 bp;退火温度 60.5 $^{\circ}\text{C}$ 。

TGF β R1 引物:上游引物:5'-GTGGTTCCGTGAGGCAGAGATTTA-3';下游引物:5'-TCGCCGTGGACAGAGCAAGTTTTA-3';目的片段 209 bp;退火温度 54.1 $^{\circ}\text{C}$ 。

β -actin 引物:上游引物:5'-GGG GGC ACG AAG GCT CAT CAT T-3';下游引物:5'-GCT GGC CGG GAC CTG ACT GAC TAC-3';目的片段 1 kb;退火温度 50 $^{\circ}\text{C}$ ~65 $^{\circ}\text{C}$ 。

荧光定量 PCR 反应体系 ① ddH₂O 20.35 μL ; ② 10 \times 缓冲液(自制)2.5 μL ; ③ dNTP(10 mmol/L) 0.25 μL ; ④ actin 上游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 0.2 μL ; ⑤ actin 下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 0.2 μL ; ⑥ TGF β 1 (TGF β R1)上游引物(20 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 0.2 μL ; ⑦ TGF β 1 (TGF β R1)下游引物(20 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 0.2 μL ; ⑧ Taq 酶(自制)0.1 μL ; ⑨ 绿色荧光蛋白; ⑩ 混匀,分装成 24 μL 体系/管,每管取 1 μL 加入模板。

PCR 程序 ① 94 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; ② 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; ③ 59 $^{\circ}\text{C}$ (TGF β 1), 54 $^{\circ}\text{C}$ (TGF β R1), 30 s; ④ 72 $^{\circ}\text{C}$, 20 s; ⑤ 重复 2~4 步骤 39 个循环; ⑥ 从 65 $^{\circ}\text{C}$ 到

94 $^{\circ}\text{C}$, 每升温 1 $^{\circ}\text{C}$ 读取 1 次溶解曲线,保持 10 s。

Western blot 法检测 AsPC-1 和 BxPC-3 中 TGF β 1 和 TGF β R1 蛋白的表达

步骤 (1) SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE); (2)电泳:与电泳仪连好后上样,80 V 跑过积层胶后用 120 V 跑完分离胶; (3)电泳完毕后,用转膜液浸泡滤纸与硝酸纤维膜,按照滤纸、硝酸纤维膜、凝胶、滤纸的顺序叠放于电转膜仪上,赶气泡后,用 16mA 电流电转移 2 h; (4)将转好的膜用少量丽春红染色检查转膜是否完全; (5)若转得好,则把膜泡在 5%溶解脱脂奶粉(用 PBST 溶解)中,在摇床上缓缓摇动,封闭 1~1.5 h 左右,或 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜; (6)用 PBST 洗膜 3 次,每次 15 min; (7)用含 2%BSA 的 PBST 以 1:250 稀释一抗,摇床中缓缓摇动 2 h,或 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜; (8)一抗孵育完毕后,洗膜 3 次,每次 15 min;用含 10%BSA 的 PBST 以 1:50 稀释二抗; (9)摇床中缓缓摇动 1 h; (10)二抗孵育完毕后,用 PBST 洗膜 3 次,每次 30 min; (11) 1 mL Solution B(Santa Cruz 公司), 3 μL H₂O₂, 最后加入 1 mL Solution A(Santa Cruz 公司),孵育膜 1 min,将液体吸干后,入暗室压片、显影; (12)图像使用 Total Lab1 D-3 软件灰度扫描,计算目的基因(TGF β 1 及 TGF β R1)与内参 β -Actin 的比值。计算公式:目的片段值 = 目的片断吸光值(D) \times 100/Actin 吸光值

统计学分析 应用 Stata 7.0 统计分析软件,检测数据以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间均数的比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

两种胰腺癌细胞中 TGF β 1 和 TGF β R1 mRNAs 的表达 荧光实时定量 RT-PCR 法检测两种胰腺癌细胞中 TGF β 1 和 TGF β R1 mRNA 的表达,每个样本重复 3 次,取平均值,结果显示:AsPC-1 及 BxPC-3 中检测到的 TGF β 1 的平均循环数阈值(Ct)分别为 15.6 和 20.8 个循环;AsPC-1 及 BxPC-3 中检测到的 TGF β R1 的平均循环数阈值(Ct)分别为 11.2 和 25.5 个循环,再通过 Ct-总 RNA 量标准曲线可以得到 TGF β 1 及 TGF β R1 的定量结果(表 1 及图 1A、B)。显示 BxPC-3 中 TGF β 1 和 TGF β R1 均呈低表达;相反,AsPC-1 中 TGF β 1 和 TGF β R1 的 mRNA 呈高表达,差异有统计学意义($P < 0.01$)。溶解曲线分析显示:3 种扩增产物峰形锐利,产物单一,TGF β 1、TGF β R1 及 β -actin 的 T_m 值分别是 90 $^{\circ}\text{C}$ 、75 $^{\circ}\text{C}$ 、90 $^{\circ}\text{C}$ 。

表 1 两种胰腺癌细胞中 TGFβ1 和 TGFβR1 的定量 RT-PCR 结果

Tab 1 Quantitative RT-PCR results of TGFβ1 and TGFβR1 mRNAs in two pancreatic cancer cell lines

	Actin		TGFβ1		TGFβR1	
	Ct	Ct	Quantitative value	Ct	Quantitative value	
AsPC-1	14.9	15.6	0.92 ± 0.06	11.2	15.49 ± 1.03	
BxPC-3	16.2	20.8	0.07 ± 0.00 ⁽¹⁾	25.5	0.10 ± 0.01 ⁽¹⁾	

⁽¹⁾ vs AsPC-1, P < 0.01

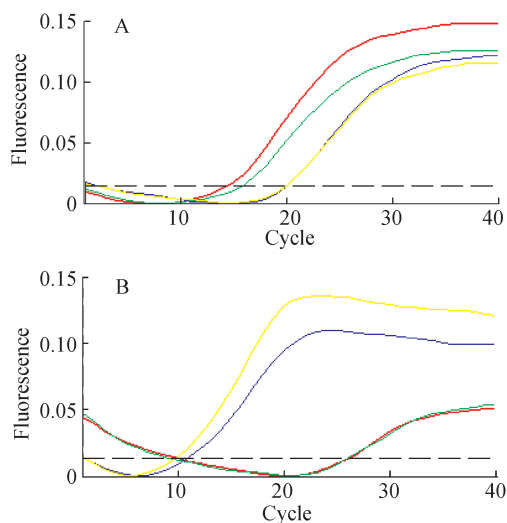


图 1 TGFβ1(A)和 TGFβR1(B)的 PCR 循环曲线

Fig 1 The amplification curve of real-time PCR of TGFβ1(A) and TGFβR1(B)

A: Green and red lines: AsPC-1; Yellow and blue lines: BxPC-3;
B: Green and red lines: BxPC-3; Yellow and blue lines: AsPC-1

胰腺癌细胞中 TGFβ1 和 TGFβR1 的蛋白表达 Western blot 图象灰度扫描后计算目的基因 (TGFβ1 及 TGFβR1) 与内参 β-actin 的比值, 每个样本重复 3 次, 取平均值, 结果显示: BxPC-3 中 TGFβ1 和 TGFβR1 蛋白呈低表达, 分别为 0.11 ± 0.01、1.30 ± 0.12; 而 AsPC-1 中 TGFβ1 和 TGFβR1 的蛋白呈高表达, 分别为 0.79 ± 0.07、6.54 ± 0.60; 两组间差异显著 (P < 0.01) (图 2-4)。

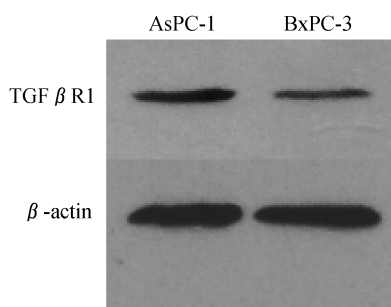


图 2 两种胰腺癌细胞中 TGFβ1 的蛋白表达

Fig 2 The TGFβ1 protein expression in AsPC-1 and BxPC-3 pancreatic cancer cell lines by Western blot

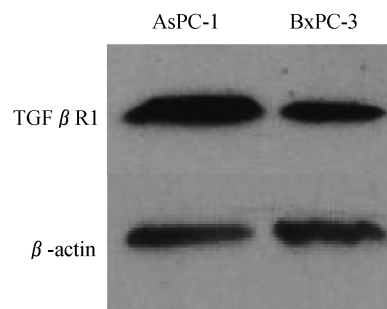


图 3 两种胰腺癌细胞中 TGFβR1 的蛋白表达

Fig 3 The TGFβR1 protein expression in AsPC-1 and BxPC-3 pancreatic cancer cell lines by Western blot

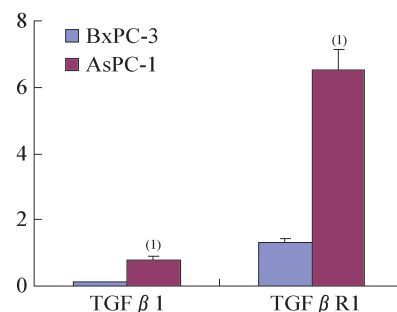


图 4 AsPC-1 及 BxPC-3 细胞中 TGFβ1 及 TGFβR1 的蛋白表达

Fig 4 TGFβ1 and TGFβR1 protein levels in AsPC-1 and BxPC-3 pancreatic cancer cell lines

⁽¹⁾ BxPC-3 vs AsPC-1, P < 0.01

讨 论

荧光定量 RT-PCR 及 Western blot 法检测结果显示: 具有原发癌特性的 BxPC-3 细胞与具有转移癌特性的 AsPC-1 胰腺癌细胞中 TGFβ1 和 TGFβR1 的表达情况有明显不同。BxPC-3 中 TGFβ1 和 TGFβR1 的 mRNA 及蛋白均呈低表达, 而 AsPC-1 中 TGFβ1 和 TGFβR1 的 mRNA 及蛋白均呈高表达。

国内外多项研究显示: 许多肿瘤组织具有 TGFβ1 的高表达。在胰腺肿瘤的不同阶段, TGFβ1 可表现为两种截然相反的作用: 在肿瘤早期阶段, TGFβ1 通过生长周期的阻断而抑制肿瘤生长^[5]。但在肿瘤进展过程中, 肿瘤细胞可逃逸 TGFβ1 的抑增殖机制而出现选择性优势生长^[6,7]。在胰腺癌晚期, TGFβ1 对肿瘤具有促浸润转移作用, 机制与其刺激血管新生、促进细胞外基质合成等因素有关^[8-10]。最新的研究发现 TGFβ1 长期诱导的胰腺癌细胞可发生上皮间质变 (EMT) 而增加其侵袭性^[11]。本课题组的研究已发现 TGFβ1 与胰腺癌患者年龄、性别、肿瘤组织分化、临床分型均无相关性,

但与肿瘤转移情况或 TNM 分期相关,伴转移的癌组织中 TGF β 1 阳性率明显高于无转移者^[1]。

近年来有关 TGF β 受体的研究也日益引起重视。许多人类肿瘤中具有 TGF β 受体的改变,但研究结论却不尽相同。本课题组曾报道^[1]:TGF β R1 在正常胰腺及癌旁组织中均有较高的阳性表达率,而在慢性胰腺炎中则有减弱的趋势,在胰腺肿瘤组织的表达则明显下调。提示 TGF β R1 表达降低可能是胰腺肿瘤逃逸 TGF β 1 的负性生长调控的机制之一。但由于肿瘤的多样性及复杂性,也有学者报道^[7,12,13]TGF β R1、R2 在胰腺癌中呈过表达。本次研究结果即发现具有转移癌特性的 AsPC-1 胰腺癌细胞株中 TGF β R1 明显呈高表达;另有学者报道^[15]TGF β R1 过度表达者其生存率较 TGF β R1 低表达者明显缩短。这表明 TGF β R1 过表达可能系胰腺癌恶性演进的重要指标。

与原发胰腺癌相比,具有转移癌特性的 AsPC-1 中 TGF β 1 和 TGF β R1 均呈高表达;临床研究表明 TGF β 1 和 TGF β R1 的高表达与不良预后直接相关。说明 TGF β 1 和 TGF β R1 的高表达是胰腺癌恶性演进并远处转移过程中的重要事件,其分子机制及临床意义值得进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 钟良,陈坚,徐近,等. 胰腺癌组织中 TGF β 1 及其 I 型受体的表达及意义[J]. 中华消化杂志,2008,28(2):94-97.
- [2] Ottaviano AJ, Sun L, Ananthanarayanan V, et al. Extracellular matrix-mediated membrane-type I matrix metalloproteinase expression in pancreatic ductal cells is regulated by transforming growth factor-beta1 [J]. *Cancer Res*,2006,66(14):7 032-7 340.
- [3] Fukumura Y, Kumasaka T, Mitani K, et al. Expression of transforming growth factor beta1, beta2, and beta3 in chronic, cancer-associated, obstructive pancreatitis[J]. *Arch Pathol Lab Med*,2006,130(3):356-361.
- [4] Nio Y, Omori H, Hashimoto K, et al. Immunohistochemical expression of receptor-tyrosine kinase c-kit protein and TGF-beta1 in invasive ductal carcinoma of the pancreas [J]. *Anticancer Res*,2005,25(5):3 523-3 529.
- [5] 钟良,陈坚,徐近,等. TGF β 1 对胰腺癌细胞 BxPC-3 增殖的影响及机制[J]. 复旦学报:医学版,2008,35(2):181-185.
- [6] Kwak HJ, Park MJ, Cho H, et al. Transforming growth factor-beta1 induces tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression via activation of extracellular signal-regulated kinase and Sp1 in human fibrosarcoma cells[J]. *Mol Cancer Res*,2006,4(3):209-220.
- [7] Freeman JW, DeArmond D, Lake M, et al. Alterations of cell signaling pathways in pancreatic cancer [J]. *Front Biosci*,2004,9:1 889-1 898.
- [8] Li C, Guo B, Bernabeu C, et al. Angiogenesis in breast cancer: the role of transforming growth factor beta and CD 105[R]. *Microsc Res Tech*,2001,52(4):437-439.
- [9] Comijn J, Berx G, Vermaassen P, et al. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion[J]. *Mol Cell*,2001,7(6):1 267-1 278.
- [10] Alcock RA, Dey S, Chendil D, et al. Farnesyltransferase inhibitor (L-744, 832) restores TGF-beta type II receptor expression and enhances radiation sensitivity in K-ras mutant pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2[J]. *Oncogene*,2002,21(51):7 883-7 890.
- [11] 封明轩,骆明德,费哲为,等. TGF β 1 长期诱导胰腺癌细胞发生上皮间质变而增加其侵袭性[J]. 现代肿瘤医学,2007,15(6):766-769.
- [12] 张丽辉,许凤芝,于伟. TGF β II 受体 mRNA 在胰腺癌中的翻译水平[J]. 中国实用内科杂志,1999,19(3):178-180.
- [13] Jonckheere N, Perrais M, Mariette C, et al. A role for human MUC4 mucin gene, the erbB-2 ligand, as a target of TGF-beta in pancreatic carcinogenesis[J]. *Oncogene*,2004,23(34):5 729-5 738.
- [14] Sakorafas GH, Tsiotou AG, Tsiotos GG. Molecular biology of pancreatic cancer; oncogenes, tumour suppressor genes, growth factors, and their receptors from a clinical perspective [R]. *Cancer Treat Rev*,2000,26(1):29-52.

(收稿日期:2008-12-18;编辑:张秀峰)