

TGF- β 1 shRNA 对涎腺人黏液表皮样癌裸鼠颌下腺移植瘤的抑瘤作用及 Ki-67、VEGF 蛋白表达的影响

王静¹, 陈健², 马铭¹, 赵媛¹, 吴军正³

Inhibitory Effect of TGF- β 1 shRNA on Human Salivary Gland Mucoepidermoid Carcinoma in Nude Mice Submandibular Gland and Effect of Ki-67 and VEGF Expression

WANG Jing¹, CHEN Jian², MA Min¹, ZHAO Yuan¹, WU Jun-zheng³

1. School of Stomatology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. Department of General Surgery, The First Affiliate Hospital of Lanzhou University; 3. College of Stomatology, Fourth Military Medical University

Abstract: Objective To study inhibitory effect of TGF- β 1 shRNA on human salivary gland mucoepidermoid carcinoma in nude mice submandibular gland and the effect of Ki-67 and VEGF expression.

Methods Nude mice submandibular gland were transplanted with Ms cells, Ms cells stably transfected with empty vectors. Ms cells stably transfected with TGF- β 1 shRNA, respectively. The tumor volume and weight were measured and observed by growth curve. Immunohistochemistry and immunofluorescence were used to detect the level of Ki-67 and VEGF.

Results Compared with Ms cells and Ms transfected with empty vectors, Ms cells stably transfected with TGF- β 1 shRNA showed slow growth in tumor volume and weight ($P < 0.01$), as well as down-regulated the expressions of Ki-67 and VEGF.

Conclusion TGF- β 1 shRNA could inhibit the tumor growth of Ms cells, the mechanism of which might be related with down-regulation of Ki-67 and VEGF.

Key words: TGF- β 1 shRNA; Mucoepidermoid carcinoma; Ki-67; VEGF

摘要:目的 研究 TGF- β 1 shRNA 对人涎腺黏液表皮样癌(Ms)细胞裸鼠颌下腺原位移植瘤成瘤能力以及对 Ki-67 和 VEGF 蛋白表达的影响。**方法** 将 Ms 细胞、稳定转染空载体的 Ms 细胞、稳定转染 TGF- β 1 shRNA 的 Ms 细胞分别接种至裸鼠颌下腺,观察各组细胞在裸鼠体内的成瘤率,测量肿瘤体积、瘤质量并绘制肿瘤生长曲线;免疫荧光法和免疫组织化学法检测肿瘤组织中 Ki-67 和 VEGF 蛋白的表达。**结果** 与未转染组、转染空载体组相比,转染 TGF- β 1 shRNA 组裸鼠颌下腺原位移植瘤生长缓慢,瘤体体积和瘤质量显著降低($P < 0.01$),瘤细胞中 Ki-67 和 VEGF 蛋白表达明显降低。**结论** TGF- β 1 shRNA 能显著抑制 Ms 细胞在体内的生长能力,其机制可能与下调细胞内 Ki-67 和 VEGF 水平有关。

关键词: TGF- β 1 shRNA; 黏液表皮样癌; Ki-67; VEGF

中图分类号: R782.4; R739.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2010)07-0735-04

0 引言

转化生长因子 β 1 (transforming growth factor beta, TGF- β 1) 是一种多功能的细胞生长因子,能调节多种细胞的增殖和分化,与恶性肿瘤的生物学

行为和预后密切相关^[1-2]。涎腺黏液表皮样癌是口腔颌面部常见恶性肿瘤之一,危害着人类健康、威胁人类生命。本研究利用 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术,以脂质体介导人工合成的短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 转入涎腺黏液表皮样癌细胞,应用 TGF- β 1 shRNA 抑制裸鼠体内涎腺黏液表皮样癌 TGF- β 1 的表达,观察其对裸鼠体内成瘤能力以及对 Ki-67 和 VEGF 蛋白表达的影响,以期为涎腺黏液表皮样癌的治疗探索一条新的途径。

收稿日期:2008-11-17;修回日期:2008-12-30

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371551);兰州大学医学基金资助项目(LZUYX200707);兰州大学中央高校基本科研费自由探索资助项目(面上项目)(lzujbky-2009-96)

作者单位:1. 730000 兰州大学口腔医学院;2. 兰州大学第一医院;3. 第四军医大学口腔医院

作者简介:王静(1971-),女,博士,副教授,主要从事肿瘤生物治疗学研究

1 材料与方 法

1.1 细胞与动物

人涎腺黏液表皮样癌脊髓转移株(Ms)由第四军医大学口腔生物教研室建立,Balb/c nu/nu 裸鼠,18~22 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司。

1.2 试剂与仪器

TGF-β1 兔抗人多克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品;Ki-67 单克隆抗体,VEGF 单克隆抗体,SP 免疫组织化学试剂盒和 DAB 显色试剂盒购自北京中山生物技术有限公司;羊抗鼠,羊抗兔 IgG-FITC 购自武汉博士德生物技术公司。

1.3 质粒转染与细胞培养

细胞培养在含 10% 胎牛血清的 DMEM(美国 Gibco 公司)培养液中,在 37℃,5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养。实验分为三组:(1)对照组:未转染组;(2)空载体组:转染空载体 pWH1;(3)实验组(TGF-β1 shRNA 组):转染 pWH1-TGF-β1。质粒的构建和鉴定及稳定转染见文献^[3-4]。

1.4 裸鼠颌下腺模型的建立及观察

Balb/c nu/nu 裸鼠在无特定病原体(SPF)条件下饲养。取对数生长期三组细胞,制备单细胞悬液,无血清培养液离心洗涤 2 次后调整细胞密度为 1 × 10⁷/ml。无菌条件下给裸鼠颌下腺接种肿瘤细胞,每只接种细胞为 2 × 10⁶/0.2ml,每组 5 只,密切观察裸鼠颌下腺肿瘤生长情况,实验期间自第 6 天起每隔 3 天用游标卡尺测量肿瘤的最长径(a)和最短径(b),计算其体积(V = ab²/2),取各组肿瘤体积的平均值,绘制肿瘤生长曲线。于接种后 21 天处死全部裸鼠,剥离肿瘤结节,天平称瘤质量,计算抑瘤率。抑瘤率 = (对照组瘤质量 - 实验组瘤质量) / 对照组瘤质量 × 100%。将切取的新鲜肿瘤结节固定于 10% 中性福尔马林溶液中,常规石蜡包埋、切片、HE 染色,光学显微镜下观察肿瘤组织的病理形态。

1.5 裸鼠颌下腺原位瘤 TGF-β1 蛋白的检测

取制备好的裸鼠颌下腺原位瘤组织切片,常规脱蜡至水,3% H₂O₂ 孵育 10 min,PBS 洗涤,正常山羊血清封闭 15 min,加入 TGF-β1 多克隆抗体,4℃ 孵育过夜,加入第二抗体生物素化山羊抗兔 IgG 20 min,PBS 洗涤,再加入辣根过氧化物酶标记链霉素卵白素 20 min,PBS 洗涤后 DAB 室温暗处显色,镜下控制反应时间,流水冲洗终止反应。苏木精对比染色,自来水冲洗,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。光学显微镜观察,照相记录。空白对照:PBS 代替一抗;替代对照:正常兔血清代替一抗;阳性对照:已知阳性片;阴性对照:已知阴性片。

1.6 免疫组织化学检测人黏液表皮样癌细胞及裸鼠颌下腺原位瘤组织中 Ki-67 和 VEGF 表达

常规制备细胞爬片及组织切片,组织切片染色步骤及对照设置同 1.5。细胞爬片进行免疫荧光染色,第二抗体为 FITC(标记异硫氰酸荧光素)标记的 IgG,缓冲甘油封片,荧光显微镜观察。

1.7 结果判定标准

免疫荧光染色 Ki-67 阳性反应为细胞核呈绿色荧光;TGF-β1 和 VEGF 阳性信号为细胞质内绿色荧光;免疫组织化学 Ki-67 阳性反应为细胞核呈棕黄色着色;TGF-β1 和 VEGF 阳性信号为细胞质内棕黄色着色。

1.8 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件包,对资料进行 t 检验。

2 结果

2.1 TGF-β1 shRNA 对 Ms 细胞在裸鼠颌下腺内所致肿瘤生长的影响

本实验 15 只裸鼠成瘤率为 100%。对照组与空载体组肿瘤结节生长比较迅速,实验组肿瘤结节生长缓慢。实验结束时,实验组肿瘤结节比对照组和空载体组肿瘤结节体积小、湿重小(P < 0.01)。对照组为(1.05 ± 0.13)g,空载体组为(1.02 ± 0.12)g,实验组为(0.43 ± 0.07)g,实验组抑瘤率为 59.0%。肿瘤生长曲线见图 1。

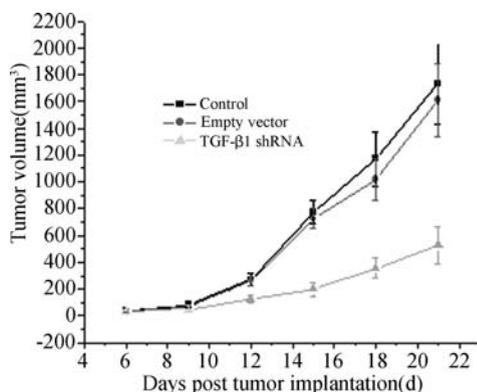


图 1 裸鼠颌下腺肿瘤模型生长曲线

Figure 1 Tumor growth curve of the transplanted nude mice

2.2 裸鼠颌下腺原位瘤组织学观察

组织病理学切片 HE 染色显示,对照组和空载体组细胞数量多,核分裂相较多,瘤体内血供丰富;实验组细胞数量少,排列比较松散,核分裂相少见。

2.3 裸鼠颌下腺原位瘤 TGF-β1 蛋白的检测结果

免疫组织化学结果显示,对照组和空载体组 TGF-β1 呈强阳性表达,阳性信号定位于细胞质;实

验组 TGF- β 1 表达较弱。阴性对照,空白对照及替代对照均未显示阳性信号,阳性对照显示阳性。

2.4 TGF- β 1 shRNA 对人黏液表皮样癌细胞 Ki-67 和 VEGF 蛋白表达的影响

FITC 在 495 nm 处激发,在 525 nm 处呈绿色荧光,主要用于免疫细胞化学,冰冻切片的间接荧光法和流式细胞仪检测,在石蜡切片的敏感度低于免疫酶法。免疫荧光结果显示,实验组细胞 Ki-67 和 VEGF 荧光强度均较空载体组弱,见图 2、3。阴性对照,空白对照及替代对照均未显示阳性信号,阳性对照显示阳性。

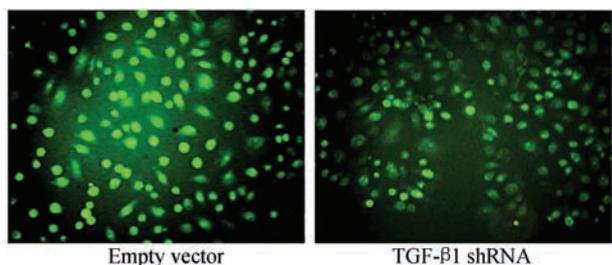


图 2 培养细胞 Ki-67 的蛋白表达($\times 400$)

Figure 2 Ki-67 protein expression on Ms cells($\times 400$)

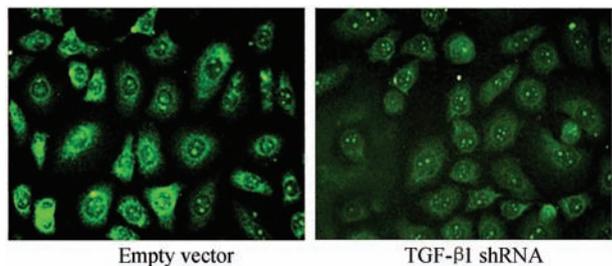


图 3 培养细胞 VEGF 的蛋白表达($\times 400$)

Figure 3 VEGF protein expression on Ms cells($\times 400$)

2.5 TGF- β 1 shRNA 对 Ms 细胞在裸鼠颌下腺内所致肿瘤中 Ki-67 和 VEGF 蛋白表达的影响

裸鼠颌下腺原位瘤的免疫组织化学结果显示,空载体组 Ki-67 和 VEGF 阳性细胞多,呈棕黄色着色;实验组阳性细胞少,着色浅,见图 4、5。阴性对照,空白对照及替代对照均未显示阳性信号,阳性对照显示阳性。

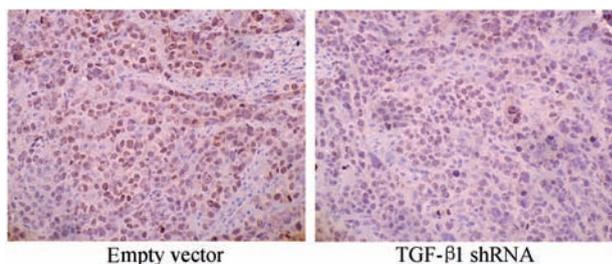


图 4 裸鼠颌下腺原位瘤 Ki-67 免疫组织化学染色(DAB $\times 200$)

Figure 4 VEGF expression on nude mice submandibular gland transplanted tumor (DAB $\times 200$)

3 讨论

TGF- β 1 基因定位于染色体 19q3,属 TGF- β 超家族成员,是一种具有多种生物活性的多肽类生长因子,参与机体许多生理、病理过程,如胚胎发育、细胞的增殖、发育及分化等。TGF- β 1 与细胞周期调控有密切关系,对细胞的增殖起到促进或抑制的作用。在正常情况下以及肿瘤发生早期,TGF- β 1 抑制细胞生长周期从 G₁ 期进入到 S 期,从而抑制细胞的生长,诱导细胞分化或凋亡,充当抑癌因子;特定情况下,特别是肿瘤晚期,肿瘤细胞逃逸这种负调控,并且高表达 TGF- β 1,通过自分泌和旁分泌作用促进肿瘤细胞侵袭、转移,促进血管生成,调节胞外基质,抑制机体免疫监视功能,导致细胞恶性增殖^[5-6]。TGF- β 1 在多种肿瘤组织中过度表达,特别是在恶性上皮性肿瘤中,通过直接或间接作用参与肿瘤细胞的恶性转化、肿瘤血管和细胞外基质形成,尤其是作为机体抗肿瘤免疫反应的重要抑制因子,与肿瘤发生、发展和不良预后有密切关系。我们在前期的研究中发现低分化高转移涎腺黏液表皮样癌中 TGF- β 1 呈高表达^[7]。RNAi 为真核细胞的基因沉默提供了一种强有力的手段,是最新的基因阻断技术,用来有目的地关闭特定基因的表达,利用 RNAi 技术特异地抑制癌基因或突变基因的过度表达,使这些基因保持沉默状态,有望达到抗肿瘤作用。该技术已被应用于基因表达调控、基因功能和基因治疗的研究。裸小鼠是英国在 1962 年非近交系小鼠中偶然发现的个别无毛小鼠。两年后,Flanagan 证实是不同与一般无毛小鼠的突变种,取名为 nude mice。该小鼠先天无胸腺,其 T 淋巴细胞功能缺陷,细胞免疫力低下,是由于一个隐性突变基因所致。裸小鼠的发现为肿瘤学等方面的研究提供了难得的模型材料,目前裸小鼠已成为医学研究领域不可缺少的实验动物之一。本研究应用 RNAi 技术将 TGF- β 1 shRNA 转入涎腺黏液表皮样癌细胞后,进行裸鼠原位移植瘤的观察,发现转染 TGF- β 1 shRNA 组 TGF- β 1 蛋白的表达弱,裸鼠体内颌下腺原位移植瘤发生延迟,肿瘤生长比较缓慢,体积小,湿重小,抑瘤率为 59.0%;组织切片 HE 染色显示 TGF- β 1 shRNA 组细胞数量少,细胞排列比较松散,较多的细胞出现变性坏死,核分裂相少见。表明采用 RNAi 技术,将 TGF- β 1 shRNA 转入高转移性涎腺黏液表皮样癌 Ms 细胞,能抑制 TGF- β 1 的表达,抑制 Ms 细胞在裸鼠体内生长,逆转了 Ms 细胞的恶性表型,这与一些学者的研究结果一致^[8]。

细胞增殖是细胞延续生命存在的形式。细胞增

殖的失控与肿瘤的发生、侵袭和转移密切相关。评价细胞的增殖状态,对研究肿瘤的生物行为具有重要意义。Ki-67 抗原是近年来研究最多、最具有前途的细胞增殖标记,是优于 PCNA、BrdU 等的反应细胞增殖活性的指标。实体肿瘤的生长是血管依赖性的,肿瘤血管生成的开始标志着肿瘤细胞的快速增殖,局部侵袭乃至转移。肿瘤血管生成是受多种血管生成因子调节的,VEGF 是最为重要的一个。VEGF 可由瘤细胞产生并分泌,作用于表达其受体的内皮细胞,从而诱导血管生成,在肿瘤的生长、发展和转移过程中起着重要作用。VEGF 的表达受包括 IGF-I、TGF- β 、bFGF 等多种因素的影响。本研究通过免疫荧光和免疫组织化学方法对转染 TGF- β 1 shRNA 的 Ms 细胞体外及裸鼠颌下腺原位移植瘤体内 Ki-67、VEGF 的蛋白进行检测发现,转染了 TGF- β 1 shRNA 的体外培养的细胞,裸鼠颌下腺原位瘤组织的 Ki-67 和 VEGF 表达均下降,提示 TGF- β 1 和 Ki-67、VEGF 在肿瘤细胞中的表达存在内在关联。也就是说,如果降低肿瘤细胞 TGF- β 1 的表达,也有可能同时降低肿瘤细胞 Ki-67 和 VEGF 表达水平。Ki-67 和 VEGF 与肿瘤的生长密切相关,Ms 细胞中 TGF- β 1 基因被沉默后,癌细胞的增殖能力下降,可能与 Ki-67 和 VEGF 表达的下降有关。本研究为涎腺黏液表皮样癌的基因治疗提供了一定理论和实验依据。然而,TGF- β 1 对肿瘤细胞的调控机

制极为复杂,还要进一步明确 TGF- β 1 参与涎腺黏液表皮样癌发生发展的分子机制。

参考文献:

- [1] Berndt SI, Huang WY, Chatterjee N, et al. Transforming growth factor beta 1 (TGF β 1) gene polymorphisms and risk of advanced colorectal adenoma[J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(9): 1965-1970.
- [2] Coban S, Yüksel O, Koçkar MC, et al. The significance of serum transforming growth factor beta 1 in detecting of gastric and colon cancers[J]. *Hepatogastroenterology*, 2007, 54(77): 1472-1476.
- [3] 王静,吴军正,郭富平,等. TGF- β 1shRNA 真核表达载体的构建[J]. *华西口腔医学杂志*, 2006, 24(2): 113-116.
- [4] 王静,吴军正,魏红宇,等. TGF- β 1 shRNA 对高转移性人涎腺黏液表皮样癌 Ms 细胞增殖的影响[J]. *中国肿瘤临床*, 2007, 34(1): 18-21.
- [5] Iezzi G, Piattelli A, Rubini C, et al. Expression of transforming growth factor beta1 in ameloblastomas[J]. *J Craniofac Surg*, 2008, 19(6): 1618-1621.
- [6] Sulkowska M, Wincewicz A, Sulkowski S, et al. Relations of TGF-beta1 with HIF-1alpha, GLUT-1 and longer survival of colorectal cancer patients[J]. *Pathology*, 2009, 13: 1-7.
- [7] 王静,吴军正,郭富平,等. TGF- β 1 在涎腺黏液表皮样癌高低转移细胞系中的差异表达[J]. *口腔医学*, 2006, 26(2): 87-90.
- [8] Liu Y, Zheng QX, Du JY, et al. Construction of antisense transforming growth factor beta 1 gene and its effect on the proliferation by expression in osteosarcoma cells[J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2003, 23(2): 163-165.

[编辑:杨 卉;校对:黄国玲]