

文章编号:1005-6947(2005)08-0595-04

· 实验研究 ·

# 神经生长因子对人胆管癌细胞增殖作用的影响

郭伟, 邹声泉

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 普通外科, 湖北 武汉 430030)

**摘要:**目的 探讨神经生长因子(NGF)对人胆管癌细胞株 QBC939 增殖能力的影响。方法 构建  $\beta$ -NGF 的真核表达载体 pcDNA3.0-NGF, 经酶切鉴定后, 采用脂质体 lipofectamine 转染人胆管癌细胞株 QBC939。Western Blot 检测蛋白的表达情况。MTT 法检测转染前后细胞的增殖情况。结果 成功构建  $\beta$ -NGF 的真核表达载体 pcDNA3.0-NGF。转染 QBC939 细胞后, 能稳定表达  $\beta$ -NGF 蛋白, 且表达强度随转染质粒浓度的增加而增强, 与对照组相比, 差异有显著性 ( $P < 0.0001$ )。MTT 检测转染后的细胞增殖能力增强, 与空白对照组和转染空质粒组相比, 差异有显著性 ( $P < 0.01$ ), 且表现出量效依赖关系。结论 NGF 具有促进胆管癌细胞株 QBC939 增殖的作用。

**关键词:**胆管肿瘤; 细胞增殖; 肿瘤细胞, 培养的; 神经生长因子

中图分类号: R322.4

文献标识码: A

## The effect of nerve growth factor on the proliferation of human cholangiocarcinoma cells

GUO Wei, ZOU Sheng-quan

(Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of nerve growth factor (NGF) on the proliferative ability of human cholangiocarcinoma cell strain QBC939. **Methods** After construction of a full-length human  $\beta$ -NGF expression vector, human cholangiocarcinoma cell QBC939 was transfected with pcDNA3.0-NGF. Western blot assays were used to detect the expression of  $\beta$ -NGF. Subsequently, in vitro proliferation before and after transfection of cells was analyzed by MTT assays. **Results** Western blot assay indicated that  $\beta$ -NGF could be stably expressed by transfected QBC939 cells, and compared with controls, the differences were significant ( $P < 0.0001$ ). MTT assays showed stable transfection of  $\beta$ -NGF in QBC939 cells resulted in enhanced dose-dependent proliferation of cancer cells, and the differences were significant ( $P < 0.01$ ). **Conclusions**

NGF may enhance the proliferation of cholangiocarcinoma cells.

**Key words:** Bile Duct Neoplasms; Cell Proliferation; Tumor Cells, Cultured; Nerve Growth Factor

**CLC number:** R322.4

**Document code:** A

胆管癌是一种恶性程度高、诊治困难、预后不良的胆道系统恶性肿瘤。目前认为,根治性手术切除是胆管癌惟一有效的治疗手段。尽管近年来诊

治技术有了较快发展,其5年存活率仍然只有5%左右<sup>[1]</sup>。沿神经间隙浸润和转移是胆管癌的重要生物学特性之一,也是胆管癌难以根治和容易复发的重要原因。在此过程中,多种细胞因子发挥作用,神经生长因子(nerve growth factor, NGF)即是其中的重要一员<sup>[2]</sup>。近来研究发现,NGF参与多种肿瘤的发生发展,但其具体作用则因肿瘤类型而异。比如对神经母细胞瘤,NGF有抑制增殖、促进分化的作用<sup>[3]</sup>,而在乳腺癌和胰腺癌则表现为促增殖作

**基金项目:**国家“863”高技术研究发展计划(2002AA214061)。

**收稿日期:**2005-03-16; **修订日期:**2005-05-27。

**作者简介:**郭伟(1977-),男,河北石家庄人,华中科技大学同济医学院附属同济医院博士研究生,主要从事胆道恶性肿瘤方面的研究。

**通讯作者:**邹声泉 电话:027-83662398; E-mail: sqzou@tjh.tjmu.edu.cn。

用<sup>[4,5]</sup>。为研究 NGF 在人胆管癌细胞中的作用,笔者将  $\beta$ -NGF 的真核表达载体转染人胆管癌细胞 QBC939,比较转染前后细胞增殖情况的变化。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞培养

人胆管癌细胞株 QBC939(第三军医大学王曙光教授惠赠),于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养,常规传代。RPMI 1640 培养基含 10% 胎牛血清,并加入青霉素(100 U/mL)、链霉素(100 mg/L)。

### 1.2 表达载体 pcDNA3.0-NGF 的构建

1.2.1 逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR) Trizol 试剂自正常人脑组织中提取总 RNA。用逆转录酶和 oligo(dT)按 37℃ 60 min,95℃ 5 min 条件进行 cDNA 的合成。取 1  $\mu$ L(0.1 mg/L)逆转录产物进行 PCR 扩增,反应条件为:95℃ 变性 5 min,95℃ 60 s,49℃ 60 s,72℃ 90 s,32 个循环,72℃ 延伸 5 min。上游引物为 5'-AAT CCC AAG CTT ACT GAG GTC CAT AGC GTA-3';下游引物为 5'-CTA GTC TAG AGC AGG TCA GGC TCT TCT C-3',扩增产物为 771 bp。反应体系以  $\beta$ -actin 作为内参照,上游引物 5'-GGG ACC TGA CTG ACT ACC TC-3';下游引物 5'-ACT CGT CAT ACT CCT GCT TGC TG-3',扩增产物为 546 bp。引物均由上海赛百盛公司合成。

1.2.2 酶切与连接 限制性内切酶 Hind III, Xba I, Taq DNA 聚合酶及 T<sub>4</sub> DNA 连接酶等均购自大连宝生物公司,酶切反应参照说明书进行。琼脂糖凝胶电泳后产物回收按照凝胶提取试剂盒(Omega 公司)说明进行。 $\beta$ -NGF cDNA 与 pcDNA 3.0 重组的反应体系为: $\beta$ -NGF cDNA 10  $\mu$ L, pcDNA 3.0 酶切后产物 3  $\mu$ L, 10  $\times$  缓冲液 2.5  $\mu$ L, T<sub>4</sub> DNA ligase 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu$ L, 总体积 25  $\mu$ L, 16℃ 水浴 12 ~ 16 h。将重组质粒 pcDNA 3.0-NGF 转化 E. coli DH5 $\alpha$ , 扩大培养后,提取 pcDNA 3.0-NGF。限制性酶切图谱分析。

### 1.3 转染 QBC939 细胞

取对数生长期细胞以 5  $\times$  10<sup>4</sup>/mL 的浓度接种于 96 孔培养板,培养 24 h 后,以无血清培养基冲洗 1 次。转染步骤参照脂质体 lipofectamine(Gibco 公司)说明书进行。分空白对照组、转染空载体组和转染组(加入质粒浓度分别为 16  $\mu$ g/mL, 32  $\mu$ g/mL, 64  $\mu$ g/mL 和 128  $\mu$ g/mL)。以含 800  $\mu$ g/mL

G418(Sigma 公司)的完全培养基培养,筛选阳性细胞克隆。

### 1.4 Western 印迹法检测 $\beta$ -NGF 蛋白的表达

收获筛选后的阳性细胞克隆,离心沉淀后加入裂解液,含 50 mmol/L Tris-HCl(pH8.0),150 mmol/L NaCl,0.02% NaN<sub>3</sub>,0.1% SDS,100  $\mu$ g/mL PMSF,1  $\mu$ g/mL Aprotinin 及 1% NP-40。取 20  $\mu$ g 蛋白质,行变性聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳,将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉封闭。加  $\beta$ -NGF 一抗(1:1 000),4℃ 过夜;洗膜 3 次后加羊抗兔 IgG,室温孵育 1 h。采用 ECL 试剂盒显影,测定条带光密度值。

### 1.5 噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞生长

以每孔 5  $\times$  10<sup>4</sup>/mL 的细胞浓度接种于 96 孔培养板,加入噻唑蓝(Sigma 公司),终浓度为 1 mg/mL。在酶联免疫检测仪上测定 540 nm 处各孔吸光度(A 值),实验重复 4 次。

### 1.6 统计学处理

结果以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。应用 SPSS11.5 软件进行统计分析。

## 2 结 果

### 2.1 获得 $\beta$ -NGF cDNA

RT-PCR 后获得单一目的条带,大小约为 771 kb(图 1)。

图 1 RT-PCR 产物

### 2.2 重组质粒的限制性酶切图谱分析

首先将 pcDNA3.0-NGF 在琼脂糖凝胶中电泳初筛,可见比原始质粒大的为重组的质粒。将其用 Hind III 和 Xba I 进行酶切,产物经琼脂糖凝胶电泳后,可见质粒被切为 2 个片段,分别为 5.4 kb 和 755 bp(图 2)。

图2 重组质粒的限制性酶切图谱分析

### 2.3 $\beta$ -NGF 蛋白在胆管癌细胞中的表达

结果显示,蛋白质分子质量标准指示为 25 kD,符合  $\beta$ -NGF 的分子质量。转染后细胞  $\beta$ -NGF 的表达明显高于空白对照组和转染空质粒组,差异有显著性 ( $P < 0.0001$ )。表达量随转染质粒浓度的增加而增加(表 1,图 3)。

表 1  $\beta$ -NGF 蛋白在胆管癌细胞中的表达( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

分组	OD 值	<i>t</i>	<i>P</i>
空白对照组	204.592 ± 3.953 <sup>†</sup>		
转染空质粒组	207.192 ± 5.873	0.8001	0.4541
$\beta$ -NGF 转染组			
16 $\mu$ g/mL	262.930 ± 5.517	17.1918	<0.0001
32 $\mu$ g/mL	298.567 ± 7.787	21.5221	<0.0001
64 $\mu$ g/mL	340.652 ± 7.433	32.3248	<0.0001
128 $\mu$ g/mL	391.675 ± 8.341	40.5375	<0.0001

注: <sup>†</sup> 分别与其余 5 组比较

A:空白对照组; B:转染空质粒组; C:16  $\mu$ g/mL; D:32  $\mu$ g/mL; E:64  $\mu$ g/mL; F:128  $\mu$ g/mL

图3  $\beta$ -NGF 蛋白在胆管癌细胞中的表达

### 2.4 $\beta$ -NGF 对细胞增殖的影响

MTT 检测结果见表 2。筛选阳性克隆后,细胞的生长率随转染浓度的升高而逐渐升高,与对照组比较差异具有显著性 ( $P < 0.01$ ),且呈量效依赖关系(图 4)。

表 2  $\beta$ -NGF 对胆管癌细胞增殖的影响( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

分组	OD 值	<i>t</i>	<i>P</i>
空白对照组	0.383 ± 0.016 <sup>†</sup>		
转染空质粒组	0.379 ± 0.017	0.3610	0.7304
$\beta$ -NGF 转染组			
16 $\mu$ g/mL	0.426 ± 0.020	3.3291	0.0158
32 $\mu$ g/mL	0.459 ± 0.017	6.3601	0.0007
64 $\mu$ g/mL	0.510 ± 0.014	11.9045	<0.0001
128 $\mu$ g/mL	0.541 ± 0.011	15.8896	<0.0001

注: <sup>†</sup> 分别与其余 5 组比较

图4  $\beta$ -NGF 蛋白表达与胆管癌细胞增殖的关系

## 3 讨论

胆管癌起病隐匿,易于向临近的重要解剖结构侵犯和转移。因此在获得临床诊断时,患者往往丧失了最佳的手术时机<sup>[6]</sup>。胆管癌细胞的转移方式除了淋巴管、血行转移以外,还可以沿神经鞘膜下的间隙,发生神经浸润和转移。这也是胆管癌难以根治、易于复发的重要原因之一。有研究<sup>[7]</sup>证实,14% 具有神经浸润的肿瘤出现局部复发,而无神经浸润者无复发。大量研究<sup>[2]</sup>表明,多种细胞因子参与该过程,NGF 是其中较为重要的一员。

NGF 是最早发现的神经营养因子家族成员,是该家族的典型代表。NGF 最早分离自雄性小鼠的颌下腺。已知它含有  $\alpha, \beta, \gamma$  3 个亚基。其中  $\alpha$  和  $\gamma$  亚基的作用是维持  $\beta$  亚基的稳定性,调节其生物活性。因此  $\beta$ -NGF 是神经生长因子的活性亚单位,发挥全部生物学效应。NGF 有两种细胞表面膜受体,一个是 TrkA 受体,与 NGF 结合后可激活 RAS/MAPK 信号转导通路,促进神经元的生长与分化;另一个是 p75 NTR 受体,属肿瘤坏死因子受体家族,与 NGF 结合后可激活 NF- $\kappa$ B 信号通路。

近来的研究显示,NGF 不仅仅维持神经元的分化、生长与存活,还在肿瘤细胞的生长中发挥重要作用。NGF 高表达于胰腺癌细胞,与分布于神经束膜上的高亲和力受体 TrkA 相互作用,使神经与癌细胞相接触,导致 TrkA 介导的周围神经浸润<sup>[7]</sup>。此外,NGF 还能通过旁分泌或自分泌途径刺激胰腺癌细胞生长、增殖<sup>[8]</sup>,通过上调基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 的表达促进细胞的侵袭力<sup>[5]</sup>。目前,抑制 NGF/TrkA 传导通路的方法已经用于某些疾病的实验性治疗。例如:三苯氧胺可以抑制 NGF 诱导的乳腺癌细胞株 MCF-7 的增殖<sup>[9]</sup>;电针疗法和中草药治疗可以下调多囊卵巢大鼠卵巢中 NGF 的表达,从而发挥治疗作用<sup>[10,11]</sup>。

胆管癌与胰腺癌类似,同样具有神经浸润和转移的生物学特性。为探讨 NGF 在胆管癌细胞中的作用,本研究构建了  $\beta$ -NGF 的真核表达载体 pcDNA 3.0-NGF。将后者成功转染至胆管癌细胞株 QBC939 中。经 Western Blot 检测,胆管癌细胞能够稳定表达  $\beta$ -NGF,并且其表达量随转染质粒浓度的提高而逐渐上升,显著高于空白对照组和转染空质粒组。在此基础上,MTT 检测结果显示,转染  $\beta$ -NGF 的胆管癌细胞增殖能力显著高于对照组,且呈量效依赖关系。这一实验结果提示,NGF 具有促进胆管癌细胞增殖的作用。胆管癌细胞分泌的 NGF,一方面促进自身的增殖;另一方面,可能与表达于神经束膜的高亲和力受体 TrkA 结合,为神经细胞轴突的生长提供适宜的微环境和化学趋向性,促进神经细胞轴突向肿瘤方向生长,进而造成癌细胞对神经纤维的浸润,与形成肿瘤沿神经纤维转移有关。

#### 参考文献:

[1] Anderson CD, Pinson CW, Berlin J, *et al.* Diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma [J]. *Oncologist*, 2004, 9 (1): 43 - 57.

[2] 郭伟, 邹声泉. 胆胰肿瘤神经浸润和转移的研究进展 [J]. 国外医学外科学分册. 2002, 29 (3): 158 - 160.

[3] Lucarelli E, Kaplan D, Thiele CJ. Selective regulation of TrkA and TrkB receptors by retinoic acid and interferon-gamma in human neuroblastoma cell lines [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270 (42): 24725 - 24731.

[4] Dolle L, El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, *et al.* Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cell [J]. *Oncogene*, 2003, 22 (36): 5592 - 5601.

[5] Okada Y, Eibl G, Guha S, *et al.* Nerve growth factor stimulates MMP-2 expression and activity and increases invasion by human pancreatic cancer cells [J]. *Clin Expe Meta*, 2004, 21 (4): 285 - 292.

[6] 段永亮, 邹声泉. 肝门部胆管癌诊断进展 [J]. 中国普通外科杂志, 2003, 12 (2): 128 - 131.

[7] Zhu ZW, Friess H, Fabio F, *et al.* Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer [J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17 (8): 2419 - 2428.

[8] Zhu Z, Kleeff J, Kaye H, *et al.* Nerve growth factor and enhancement of proliferation, invasion, and tumorigenicity of pancreatic cancer cells [J]. *Molecular Carcinogenesis*, 2002, 35 (3): 138 - 147.

[9] Chiarenza A, Lazarovici P, Lempereur L, *et al.* Tamoxifen inhibits nerve growth factor induced proliferation of the human breast cancerous cell line MCF-7 [J]. *Cancer Res*, 2001, 61 (7): 3002 - 3008.

[10] Stener-Victorin E, Lundeberg T, Cajander S, *et al.* Steroid-induced polycystic ovaries in rats: effect of electro-acupuncture on concentrations of endothelin-1 and nerve growth factor (NGF), and expression of NGF mRNA in the ovaries, the adrenal glands, and the central nervous system [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003, 1: 33.

[11] Lee JC, Pak SC, Lee SH, *et al.* The effect of herbal medicine on nerve growth factor in estradiol valerate-induced polycystic ovaries in rats [J]. *Am J Chin Med*, 2003, 31 (6): 885 - 895.