

文章编号:1005-6947(2005)11-0804-05

· 胰腺癌专题研究 ·

# 生长抑素受体基因对胰腺癌细胞侵袭转移影响的研究

冯延平, 高军, 黄涛, 常青, 秦仁义

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

**摘要:**目的 探讨腺病毒介导的生长抑素受体2(SSTR2)基因对胰腺癌 BXPC-3 细胞浸润、转移的抑制作用及其机制。方法 利用腺病毒载体 Adv-GFP-SSTR2 将人类 SSTR2 全长 cDNA 转染导入胰腺癌细胞株 BXPC-3, 用 RT-PCR 及 Western-blot 检测 SSTR2 在 mRNA 水平及蛋白水平上的表达。利用 Transwell 小室测定转染 SSTR2 前、后及转染空载体后细胞的穿膜侵袭运动能力; RT-PCR 检测转染 SSTR2 前后及转染空载体细胞的 MMP-2 和 TIMP-2 的表达。结果 Adv-GFP-SSTR2 腺病毒转染胰腺癌 BXPC-3 后, 可以稳定表达 SSTR2; 细胞计数示转染后胰腺癌细胞穿透基底膜的数量较转染前明显减少 ( $P < 0.01$ ), 细胞侵袭力明显减弱; MMP-2 转染后较转染前表达明显上调 ( $P < 0.01$ )、TIMP-2 表达明显下调 ( $P < 0.01$ ), MMP-2/TIMP-2 比例下降。结论 转染 SSTR2 可明显抑制胰腺癌细胞的侵袭转移, 其可能的机制是通过改变 MMP-2/TIMP-2 的比例而抑制肿瘤细胞对细胞外基质的降解。

**关键词:** 胰腺肿瘤/病理学; 肿瘤浸润; 受体, 生长抑素

中图分类号: R735.9; R392.11

文献标识码: A

## Anti-migratory and anti-invasive effect of somatostatin receptor type2 gene in human pancreatic carcinoma cell

FENG Yan-ping, GAO Jun, HUANG Tao, CHANG Qin, QIN Ren-yi

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

**Abstract: Objective** To investigate the anti-migratory and anti-invasive effect of somatostatin receptor type 2 (SSTR2) gene transfection mediated by adenovirus in human pancreatic carcinoma cell and the mechanisms involved in this effect. **Methods** The full length human SSTR2 cDNA was introduced into pancreatic cancer cell line BXPC-3 by adenovirus-mediated transfection, and stable expression of RNA and protein of SSTR2 were detected by RT-PCR and Western-blot. The Matrigel coated Transwell was used to detect the migratory and invasive ability of SSTR2-expressing cells, Adv-GFP control cells and mock control cells. Furthermore, the expressions of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) were detected by RT-PCR method in these cells. **Results** The stable expression of SSTR2 was detected in BXPC-3 cells transfected by Adv-GFP-SSTR2. A dramatic decrease of BXPC-3 expressing SSTR2 cell migrated through a Matrigel-coated filter was observed, as compared with Adv-GFP control cells and mock control cells ( $P < 0.01$ ). Moreover, expressions of MMP-2 mRNA were significantly increased in the SSTR2-expressing cells and conversely the expressions of TIMP-2 mRNA were significantly reduced in the SSTR2-expressing cells compared with the Adv-GFP control and mock control ( $P < 0.01$ ). **Conclusions**

The expression of reintroduced human SSTR2 gene in BXPC-3 cell by Adv-GFP-SSTR2 exerts markedly anti-migratory and anti-invasive effect on pancreatic cancer cells, and the mechanisms involved in this effect may be by alteration of the MMP-2/TIMP-2 ratio and thus suppress the degradation of extracellular matrix by cancer cells.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30271473)。

**收稿日期:**2005-07-21; **修订日期:**2005-10-18。

**作者简介:**冯延平(1964-),男,山东济宁人,华中科技大学同济医学院附属同济医院主治医师,博士研究生,主要从事肝胆胰肿瘤方面的研究。

**通讯作者:**秦仁义 电话:027-83663814; E-mail:ryqin@tjh.tmu.edu.cn。

**Key words:** Pancreatic Neoplasms/pathol; Neoplasms Invastiveness; Receptor, Somatostatin

**CLC number:** R735.9; R392.11

**Document code:** A

胰腺癌是一种恶性程度高,易转移,预后极差的消化道肿瘤,发病率逐年增高,其病死率占恶性肿瘤第4~5位<sup>[1]</sup>。由于本病的早期诊断非常困难,当明确诊断时,85%的肿瘤已发生局部扩散和远处转移,仅10%的患者能手术切除<sup>[2]</sup>。故对其发病、侵袭转移机制的研究已引起高度重视。研究表明<sup>[3,4]</sup>,生长抑素受体2(SSTR2)与胰腺癌的恶性程度有关。笔者等<sup>[5,6]</sup>的前期实验表明SSTR2在胰腺癌细胞中的表达能诱导肿瘤凋亡、抑制肿瘤新生血管形成,明显抑制胰腺肿瘤的生长。其是否具有抗肿瘤转移及侵袭作用尚无直接证据。本实验旨在进一步探索SSTR2是否具有抗胰腺肿瘤细胞侵袭、转移的作用及其可能的机制,观察SSTR2是否通过作用于MMP-2(matrix metalloproteinase-2)和TIMP-2(tissue inhibitor of metalloproteinase-2)影响肿瘤细胞的侵袭及转移。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

高转移人胰腺癌细胞株BXPC-3(无SSTR2表达)购于上海生化所;人胚肾293细胞购于ATCC公司;携带SSTR2的腺病毒载体Adv-GFP-SSTR2及携带绿色荧光蛋白的腺病毒Adv-GFP由本实验室合成;DMEM、胎牛血清0.25%胰蛋白酶购于美国GIBCO公司;Transwell细胞培养小室购于Costor公司;Matrigel胶购于B. D公司;SSTR2的单克隆抗体购于Santa Cruz公司;Trizol试剂,oligo(dt),dNTP,MLLV逆转录酶和Tag DNA多聚酶购于美国Primega公司;ECL发光试剂盒购于Pierce公司。引物序列均由大连宝生物公司合成。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 BXPC-3及293细胞接种于含10%胎牛血清、DMEM培养液中,在37℃,95%湿度及5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养,每48h胰酶消化传代1次,取对数期的细胞用于实验。

1.2.2 Adv-GFP-SSTR2及Adv-GFP的扩增、纯化及滴度测定 取重组腺病毒上清500μL,加至

80%融合的293细胞中,37℃,5%CO<sub>2</sub>孵箱中培养。镜下观察到95%~98%细胞出现病变效应、荧光显微镜下看到满视野绿色荧光后,收集细胞,反复冻融3次;离心,收集上清,氯化铯梯度离心纯化病毒;用50%组织培养感染剂量法(TCID<sub>50</sub>)测定病毒滴度。

1.2.3 实验分组及病毒的感染 实验分为实验组(感染Adv-GFP-SSTR2)、阴性对照组(感染Adv-GFP)及空白对照组(未感染)。每组设6复孔。吸除各组细胞的培养液,用0.1mol/LPBS清洗2次后按MOI=1:20加入Adv-GFP-SSTR2或Adv-GFP,对照组加入0.1mol/LPBS。感染1h后,吸除各组细胞的上清液,PBS清洗2次,加入含血清的DMEM,继续培养。

1.2.4 逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)检测各组SSTR2,MMP-2和TIMP-2的mRNA表达 用Trizol试剂抽提总RNA,步骤按说明手册进行。用逆转录酶和oligo(dt)按37℃60min,95℃5min条件进行cDNA的合成。SSTR2 mRNA的检测:取1μL逆转录产物进行PCR扩增,反应条件为:95℃变性5min,95℃45s,56℃45s,72℃45s,32个循环,72℃延伸1min。反应体系以β-actin做为内参照,PCR产物用含溴化乙定的15%琼脂糖凝胶分析。SSTR2引物序列:上游引物5'-CCC CAG CCC TTA AAG GCA TGT-3';下游引物5'-GGT CTC CAT TGA GGA GGG TCC-3(234bp);β-actin上游引物5'-GTG CGT GAC ATT AAG GAG-3',下游引物5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT-3'(520bp)。

MMP-2 RNA的检测:取1μL逆转录产物进行PCR扩增,反应条件为95℃变性5min,95℃45s,55℃45s,72℃45s,33个循环,72℃延伸1min。反应体系以β-actin做为内参照,PCR产物用含溴化乙定的15%琼脂糖凝胶分析。MMP-2引物序列:上游引物5'-GCG GAT CCA GCG CCC AGA GAG ACAC-3';下游引物5'-TTA AGC TTC CAC TCC GGG CAG GAT T-3'(473bp),β-actin上游引物5'-CCT TCC TGG GCA TGG AGT CCT G-3',下游引物5'-

GGA GCA ATG ATC TTG ATC TTC-3' (205 bp)。

TIMP-2 RNA 的检测:取 1  $\mu$ L 逆转录产物进行 PCR 扩增,反应条件为 95  $^{\circ}$ C 变性 5 min, 95  $^{\circ}$ C 45 s, 58  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 45 s, 33 个循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min。TIMP-2 引物序列:上游引物 5'-TGC AGC TGC TCC CCG GTG CAC-3', 下游引物 5'-TTA TGG GTC CTC GAT GTC GAG-3' (581 bp);  $\beta$ -actin 引物序列同上。

1.2.5 Western 印迹法检测 SSTR2 蛋白的表达  
约  $1 \times 10^7$  各组胰腺癌细胞于 0.5 ml 细胞裂解液中, 10 000 r/min, 4  $^{\circ}$ C 离心 10 min, 收集上清, -20  $^{\circ}$ C 冻存。配制 75% 的分离胶和 5% 的浓缩胶, 样品与 2  $\times$  上样缓冲液等体积混合, 煮沸 3 min, 选用蛋白质标记物参照。电泳后用去离子水及转移缓冲液洗涤凝胶和硝酸纤维素膜, 采用电转移法转膜。电转移完毕后, 蒸馏水洗膜, 室温干燥 10 ~ 30 min。5% 脱脂奶粉 - TBS 0.1% - Tween20 封闭过夜。封闭液 1:200 稀释 SSTR2 一抗, 按每平方厘米膜加 0.1 mL 一抗溶液, 室温下振荡 1 ~ 2 h。按每平方厘米膜加 0.1 mL 二抗溶液, 振荡 1 h。ECL 试剂盒内的溶液 1, 2 等体积混合后, 滴于膜上, 室温孵育 5 min, X 线胶片曝光 30 ~ 45 s, 测定条带光密度值。

1.2.6 细胞侵袭力测定 采用改良的 Transwell 侵袭小室方法检测转染前后胰腺癌细胞侵袭能力<sup>[3]</sup>。

Transwell 小室滤膜上均匀涂 1:8 DMEM 稀释的人工基质 Matrigel (B. D 公司) 约 50  $\mu$ g/小室。制备好的小室用紫外线照射 2 h 杀菌, 使用前加入少量无血清的培养基水化。小室下室加入 0.5 mL 含 1% 胎牛血清的 DMEM, 上室加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 25  $\mu$ L 并接种细胞, 调整细胞浓度为  $1.5 \times 10^5$  /ml, 每组 3 个复孔。37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养 48 h, 取出 Transwell 小室, PBS 淋洗, 用棉签擦去微孔膜上层的细胞, 95% 酒精固定, 0.5% 亚甲蓝染色。在倒置显微镜下计数移至微孔膜下层的细胞, 每个样本计数 10 个视野。

### 1.3 统计分析

所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示; 采用 SPSS11.5 软件进行 *t* 检验。P < 0.05 认为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 转染前后胰腺癌 BXPC-3 SSTR2 的 mRNA 及蛋白的表达

RT-PCR 结果:实验组在 234 bp 出现目的条带, 阴性对照组及空白对照组不显示 (图 1)。Western-Blot 结果, 实验组在 41 kD 出现 SSTR2 特异性蛋白目的条带, 阴性对照组及空白对照组不显示特异性蛋白目的条带 (图 2)。说明 SSTR2 基因成功转移到 BXPC-3。

M: DL2000; 1: 实验组; 2: 阴性对照组; 3: 空白对照组

图 1 Adv-GFP-SSTR2 感染 BXPC-3 后 SSTR2 mRNA 的表达。

1: 实验组; 2: 阴性对照组; 3: 空白对照组

图 2 Adv-GFP-SSTR2 感染 BXPC-3 后蛋白的表达

### 2.2 SSTR2 对 MMP-2 及 TIMP-2 mRNA 表达的影响

实验组 MMP-2 mRNA 的表达较阴性对照组及空

白对照组为高 (图 3, 附表); 实验组 TIMP-2 mRNA 的表达较阴性对照组及空白对照组为低 (图 4, 附表)。

M: DL2000; 1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: 实验组

图 3 MMP-2 在 mRNA 水平的表达

M: DL2000; 1: 实验组; 2: 阴性对照组; 3: 空白对照组

图 4 TIMP-2 在 mRNA 水平的表达

附表 SSTR2 基因转染对 MMP-2 mRNA, TIMP-2 mRNA 表达的影响及对胰腺癌细胞 BXPC-3 侵袭力的影响

分组	OD 值(MMP-2)	OD 值(TIMP-2)	侵袭细胞数
实验	0.367 ± 0.016 <sup>(1), (2)</sup>	0.671 ± 0.012 <sup>(1), (2)</sup>	143.50 ± 13.72 <sup>(1), (2)</sup>
阴性对照	0.778 ± 0.031	0.464 ± 0.013	209.50 ± 12.28
空白对照	0.758 ± 0.014	0.463 ± 0.011	217.17 ± 4.26

注: 1) 与阴性对照组相比较  $P < 0.05$ , 2) 与空白对照组相比较  $P < 0.05$

### 2.3 SSTR2 基因的转染对 BXPC-3 侵袭力的影响

显微镜下细胞计数显示, 实验组胰腺癌细胞穿过基底膜的侵袭细胞较阴性对照组及空白对照组数量减少 ( $P < 0.05$ ), 阴性对照组与对照组之间无统计学差异 (附表)。说明实验组 BXPC-3 细胞比对照组 BXPC-3 细胞侵袭力明显下降。

## 3 讨论

侵袭、转移行为是胰腺癌等恶性肿瘤最本质的特性, 防治肿瘤的侵袭、转移是降低肿瘤病死率的重要途径。有研究<sup>[7]</sup>证明, SSTR2 在正常胰腺细胞中高表达, 但在大多数胰腺肿瘤发生过程中表达减少甚至缺失。这是生长抑素类似物治疗胰腺肿瘤效果不佳的重要原因之一。本课题前期研究显示 SSTR2 基因在胰腺癌细胞株 PC-3 中的稳定转染和表达, 可明显抑制肿瘤新生血管的形成、增加肿瘤细胞的凋亡, 从而抑制肿瘤细胞生长。有学者<sup>[2, 8]</sup>报告, SSTR2 基因转染到缺失 SSTR2 的胰腺癌细胞株中, 能活化或产生内源性生长抑素 (SS), SS 能再激活 SSTR2, 形成活化 SSTR2 的负性自分泌回路。Pola<sup>[9]</sup>等研究发现, 生长抑素对富含 SSTR2 的神

母细胞瘤细胞的浸润、转移有明显的抑制作用。而 SSTR2 是否具有抗肿瘤转移作用尚无直接证据。恶性肿瘤细胞侵袭时, 首先通过膜表面受体与基底膜成分黏附, 然后释放和激活多种蛋白酶降解基底膜, 继之定向运动穿越基底膜, 浸润到周缘组织, 并进一步降解血管内皮下基底膜进入循环。肿瘤细胞的运动能力是使其肿瘤细胞发生浸润和远处转移极为重要的因素, 基底膜和细胞外基质的降解是肿瘤侵袭转移的基础。花瞻等<sup>[10]</sup>研究发现 MMP-2 的表达与胰腺癌的分期及淋巴结转移有关。大量研究证实, MMP-2 是降解 ECM 最重要的酶, TIMP 是 MMP 活性的调节因子。因此, MMP 在肿瘤浸润中所起的作用取决于 MMP 与 TIMP 间的比例关系。Miyake 等<sup>[11]</sup>研究发现, MMP-2/TIMP-2 的不平衡是肿瘤侵袭转移的关键; Reichenberger 等<sup>[12]</sup>对肺癌的研究也得到相同结果; Fan 等<sup>[13]</sup>发现 MMP-2/TIMP-2 升高与胆囊癌的发生、浸润转移及预后差密切相关; Xu 等<sup>[14]</sup>对膀胱癌研究的实验结果与其类似。

在基因治疗的载体系统方面, 笔者选择了腺病毒载体系统。腺病毒载体因其具有无插入性突变、安全性高、感染能力强、蛋白表达量大等优点, 目前已成为基因治疗领域常用的载体之一<sup>[15]</sup>。本组实验成功实现了 SSTR2 基因在 BXPC-3 细胞株中的稳定转染和表达, 结果显示可以明显抑制肿瘤细胞的侵袭、转移; SSTR2 基因在胰腺癌细胞株 BXPC-3 的高表达可在 RNA 水平上使 MMP-2 表达升高而使 TIMP-2 表达降低, 从而使 MMP-2/TIMP-2 比例增高。这可能是 SSTR2 基因抑制肿瘤转移的机制之一。

## 参考文献:

- [1] Benali N, Cordelier P, Calise D, *et al.* Inhibition of growth and metastatic progression of pancreatic carcinoma in hamster after somatostatin receptor subtype 2 (sst2) gene expression and administration of cytotoxic somatostatin analog AN-238 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(16):9180-9185.
- [2] Richter A, Niedergethmann M, Sturm JW, *et al.* Long-term results of partial pancreatico-duodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreatic head: 25-year experience [J]. World J Surg. 2003, 27(3):324-329.
- [3] Delesque N, Buscail L, Esteve JP, *et al.* sst2 somatostatin receptor expression reverses tumorigenicity of human pancreatic cancer cells [J]. Cancer Res, 1997, 57(5):956-962.
- [4] Buscail L, Saint-Lauren Nt, Chastre E, *et al.* Loss of sst2 somatostatin receptor gene expression in human pancreatic and colorectal cancer [J]. Cancer Res, 1996, 56(8):1823-1827.
- [5] Kumar M, Liu ZR, Thapa L, *et al.* Anti-angiogenic effects of somatostatin receptor subtype 2 on human pancreatic cancer xenografts [J]. Carcinogenesis, 2004, 25(11):2075-2081.
- [6] Manoj K, Liu ZR, Tian R, *et al.* Mechanisms of inhibition of growth of human pancreatic carcinoma implanted in nude mice by somatostatin receptor subtype 2 [J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2004, 84(9):760-765.
- [7] Delesque N, Buscail L, Esteve JP, *et al.* sst2 somatostatin receptor expression reverses tumorigenicity of human pancreatic cancer cells [J]. Cancer Res, 1997, 57(5):956-962.
- [8] Vernejoul F, Faure P, Benali N, *et al.* Antitumor effect of in vivo somatostatin receptor subtype 2 gene transfer in primary and metastatic pancreatic cancer models [J]. Cancer Res, 2002, 62(21):6124-31.
- [9] Pola S, Cattaneo MG, Vicentini LM, *et al.* Anti-migratory and anti-invasive effect of somatostatin in human neuroblastoma cells: involvement of Rac and MAP kinase activity [J]. J Biol Chem, 2003, 278(42):40601-40606.
- [10] 花瞻, 孙百顺, 张远春, 等. Her2/ neu 和 MMP-2 在胰腺癌中的表达及其意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(1):57-59.
- [11] Miyake H, Hara I, Gohji K, *et al.* Relative expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in mouse renal cell carcinoma cells regulates their metastatic potential [J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(10):2824-2829.
- [12] Reichenberger F, Eickelberg O, Wyser C, *et al.* Distinct endobronchial expression of matrix-metalloproteinases (MMP) and their endogenous inhibitors in lung cancer [J]. Swiss Med Wkly, 2001, 131(19-20):273-279.
- [13] Fan YZ, Zhang JT, Yang HC, *et al.* Expression of MMP-2, TIMP-2 protein and the ratio of MMP-2/TIMP-2 in gallbladder carcinoma and their significance [J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(6):1138-1143.
- [14] Xu K, Hou S, Du Z. Prognostic value of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in bladder carcinoma [J]. Chin Med J (Eng), 2002, 115(5):743-745.
- [15] St George JA. Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors (Review) [J]. Gene Ther, 2003, 10(14):1135-1141.

## 欢迎投稿, 欢迎订阅 2006 年《中华肝胆外科杂志》

在历经 10 年学习、探索、磨练的积累下,《中华肝胆外科杂志》秉持办刊宗旨,本着交流学术、服务临床的方针,坚持创新求精、诚信为本、质量第一的态度,在众多老专家的指导、广大作者、读者的支持下,2006 年《中华肝胆外科杂志》将以新的力度和再创作的努力去攀登又一个 10 年的新台阶。

“大视野”栏目将由老专家们为相关专题勾画出发展的现状和趋势;“述评”栏将更具总结性,导向性;“热点聚焦”栏是百花齐放的园地,从各个侧面探索共同关心的热点、难点;“学术思考”是百家争鸣的视角,提出问题,论证理论和临床实践中的真实;“一线集萃”是反映各地临床一线的经验 and 体会的共同的园地;病例(个案)报告将以“读者来信”的方式在刊物上交流;“综述”则以约稿、组稿的方式追求高水平的概括。《中华肝胆外科杂志》将以新的精神面貌与全国专业同道共同繁荣这一专业学术园地。

欢迎来稿,欢迎订阅,欢迎出主意、提建议,更欢迎批评指导!让我们彼此成为真诚的良师、益友。联系和收稿单位:《中华肝胆外科杂志》编辑部 地址:100853 北京市复兴路 28 号 电话:66936223 电传:68177009 E-mail:zhgdwkwz@vip.163.com