

文章编号:1005-6947(2007)03-0218-05

· 肝癌专题研究 ·

奥曲肽抑制转化生长因子 α 诱导肝癌细胞增殖的实验研究

刘文斌¹, 李建生², 陈炯², 查晓光¹, 李煜¹, 夏群¹, 方征东¹

(安徽省立医院 1. 干部外科 2. 普通外科, 安徽 合肥 230001)

摘要:目的 探讨奥曲肽对转化生长因子 α (TGF- α) 诱导肝癌细胞增殖的抑制作用及其机制。方法 用免疫组化法观察奥曲肽对 TGF- α 诱导肝癌细胞增殖的影响,用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测奥曲肽对肝癌细胞 TGF- α 分泌和表皮生长因子受体 (EGFR) 表达的影响,用 Western-blot 法、免疫组化法检测奥曲肽对细胞外信号调节蛋白激酶 (ERK) 的影响。结果 奥曲肽明显抑制细胞核内 TGF- α 诱导的增殖细胞核抗原 (PCNA) 表达,使肝癌细胞 TGF- α mRNA 指数较对照组降低 ($P < 0.05$),对 TGF- α 诱导的 EGFRmRNA 指数的增加具有明显抑制作用。Western-blot 显示,奥曲肽明显抑制 TGF- α 诱导的 ERK 蛋白表达;免疫组化显示,TGF- α 作用后,胞核染色明显加深,奥曲肽与 TGF- α 同时作用后胞核染色明显减弱。结论 奥曲肽可能通过抑制肝癌细胞分泌 TGF- α ,抑制 EGFR 表达和阻断 EGFR 信号传导,从而抑制 TGF- α 诱导的肝癌细胞增殖。

[中国普通外科杂志,2007,16(3):218-222]

关键词: 肝肿瘤; 奥曲肽/治疗应用; 转化生长因子 α ; 信号传导

中图分类号:R730.2; R977.1

文献标识码:A

Experimental study of the inhibitory effect of octreotide on transforming growth factor-alpha-induced proliferation of human hepatocellular carcinoma cells

LIU Wen-bin¹, LI Jian-sheng², CHENG Jiong², ZHA Xiao-guang¹, LI Yu¹, XIA Qun¹, FAN Zheng-dong¹

(1. Department of Cadre Surgery 2. Department of General Surgery, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of octreotide on transforming growth factor-alpha (TGF- α)-induced cell proliferation of human hepatocellular carcinoma cells and its possible mechanism.

Methods The effect of octreotide on TGF- α -induced cell proliferation of the liver cancer cells (LCC) was evaluated by immunohistochemistry method. The effect of octreotide on TGF- α secretion and epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in the cells was determined by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). The effect of octreotide on extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) expression in the cells was measured by Western-blot and immunohistochemistry method. **Results** The TGF- α -induced expressions of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in nucleus were obviously increased by TGF- α . TGF- α mRNA index of hepatocellular carcinoma cells was decreased by octreotide. Octreotide inhibited significantly the expressions of EGFR mRNA induced by TGF- α . Octreotide inhibited significantly the expressions of ERK protein induced by TGF- α . There was intense staining in the nucleus of the cells by TGF- α and weak staining in the nucleus of the cells treated simultaneously by octreotide and TGF- α .

Conclusions Octreotide can inhibit the secretion of TGF- α , the expression of EGFR, and the signal transduction of EGFR of LCC, and consequently exerts an inhibitory effect on TGF- α -induced hepatocellular carcinoma cells proliferation.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(3): 218-222]

收稿日期:2006-03-21; 修订日期:2006-11-01。

作者简介:刘文斌,男,安徽安庆人,安徽省立医院主治医师,主要从事肝胆外科基础和临床方面的研究。

通讯作者:李建生 E-mail:ljsheng56@126.com。

Key words: Liver Neoplasms; Octreotide/ther use; Transforming Growth Factor- α ; Singal Transduction

CLC number: R730.2; R977.1

Document code: A

生长抑素抗肿瘤作用的研究一直受到重视,但其确切机制至今仍未完全明了。转化生长因子 α (transforming growth factor- α , TGF- α) 主要由肿瘤组织或细胞产生,与肿瘤的发生、进展和转移有密切关系。外源性 TGF- α 能明显诱导人肝癌细胞株 SMMC-7721 的增殖^[1]。本实验以体外培养的 SMMC-7721 为对象,研究生长抑素类似物奥曲肽对 TGF- α 诱导的 SMMC-7721 增殖的抑制作用,并从 TGF- α 分泌、TGF- α 受体表达和 TGF- α 受体后信号传导通路等方面探讨奥曲肽发挥抗肿瘤作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

SMMC-7721 购于中国科学院细胞库;奥曲肽购自瑞士诺华公司;TGF- α 购自 Pepro tech 公司;鼠抗人细胞增殖核抗原(PCNA)单克隆抗体购自 Dako 公司;兔抗人细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated protein kinase, ERK) 1 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;S P 染色试剂盒购自北京中山生物技术公司;TGF- α , 表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)及 β -actin 引物由上海生物工程公司合成;逆转录试剂盒购自 Promega 公司;ECL Western blot (免疫印迹)检测试剂盒为 Amersham 公司产品。

1.2 细胞培养

SMMC-7721 培养于 RPMI1640 培养液,内含 15% 新生牛血清、青霉素(100U/mL)和链霉素(100 μ g/mL),于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 及饱和湿度条件下常规培养。取对数生长期细胞用于实验。

1.3 PCNA 免疫组织化学(免疫组化)检测

将细胞传代于 24 孔板内的盖玻片上。将细胞分为 3 组,24h 后分别加入无血清培养液(对照组)、含 5 μ g/L TGF- α 的无血清培养液(T 组)和含 5 μ g/L TGF- α 加 1 μ g/mL 奥曲肽的无血清培养液(T+O 组)。48h 后取出玻片,磷酸盐缓冲液(PBS)简单冲洗,纯丙酮固定 10min。参考 SP 试剂盒说明染色。由全自动图像分析仪检测阳性细胞的平均吸光度,作为 PCNA 的相对含量。

1.4 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 TGF- α mRNA 的表达

收集细胞,加入 TRIzol 提取总 RNA,利用 AMV 逆转录系统合成 cDNA。TGF- α 上游引物序列为 5'-ATGGTCCCCTCGGCTGGACA-3'(35-54),下游引物序列为 5'-CTGCAGTTCCATGGAAGCA-3'(197-216),扩增碱基片段为 182bp。 β -actin 上游引物序列为 5'-TCGACAACGGCTCCGGCA-3'(70-87),下游引物序列为 5'-CGTACATGGCTGGGGTGT-3'(424-441),扩增碱基片段为 372bp。50 μ L 的 PCR 反应体系中加入:dNTP(10mmol/L) 1 μ L, MgCl₂(25mmol/L) 3 μ L, 10 \times 缓冲液 5 μ L, cDNA 2 μ L, TGF- α 引物各 0.5 μ L, β -actin 引物各 0.5 μ L, DEPC 水 36.8 μ L, TaqDNA 酶 0.2 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 变性 40s, 58 $^{\circ}$ C 退火 60s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s; 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。取 PCR 产物电泳并拍照。紫外数字成像系统对阳性条带进行密度扫描,计算 TGF- α mRNA 指数(RI)。RI = TGF- α mRNA RT-PCR 产物扫描值/ β -actin mRNA RT-PCR 产物扫描值。

1.5 RT-PCR 检测 EGFR mRNA 的表达

分组同 PCNA 免疫组化检测。细胞收集、RNA 提取及合成 cDNA 均同前 PCR 检测。EGFR 上游引物序列为 5'-CGCTGCTGGCTGCGCTCTG-3'(224-242);下游引物序列为 5'-AGCCACCTCCTGGATGGTC-3'(426-444),扩增碱基片段为 221bp。采用前 PCR 检测同一内参照。PCR 反应体系除 dNTP 0.5 μ L, DEPC 水 37.2 μ L, TaqDNA 酶 0.3 μ L 外,余同前 PCR。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s; 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。电泳、拍照、计算等同前 PCR。

1.6 Western blot 检测 ERK 的表达

实验分组同 PCNA 免疫组化检测。配制 SDS-PAGE 系统溶液、分离胶和浓缩胶并灌胶。吸取细胞悬液和等量 2 \times 上样缓冲液在沸水中加热 5min,使蛋白变性;向加样槽中加入 15 μ L 样品蛋白或预染蛋白质 Marker 进行电泳。安装转移装置,350mA 4 $^{\circ}$ C 半干式电转移 1h;将硝酸纤维素膜

用丽春红染液染色 10min 左右,蛋白条带出现后用去离子水漂洗,5% 封闭液 4℃ 过夜, PBST 洗涤;1:100 的 ERK1 孵育 1h, PBST 洗涤;加二抗工作液孵育 1h,再以 PBST 洗涤;加入 DAB 显色,拍照并进行计算机图像分析。

1.7 免疫组化检测 ERK 的表达

实验分组及方法同 PCNA 免疫组化检测,一抗使用的是 1:100 的 ERK1。

1.8 统计学处理

结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。应用 SPSS10.0 统计软件进行 t 检验及方差分析。



图1 免疫组化检测 PCNA 的表达 (SP×200) A:对照组 B:T组 C:T+O组

2.2 奥曲肽对 TGF- α 表达的影响

PCR 实验至少重复 3 次,所取数据为重复 3 次结果的平均值。结果显示,对照组和奥曲肽组的 TGF- α mRNA 指数分别为 0.452 ± 0.012 和 0.368 ± 0.043 ;两组有显著性差异 ($P < 0.05$) (图 2)。

2.3 奥曲肽对 EGFR 表达的影响

PCR 结果显示,对照组、T 组和 T+O 组的 EGFR mRNA 指数分别为 0.498 ± 0.031 , 0.599 ± 0.124 和 0.505 ± 0.087 ;T 组与对照组及 T+O 组相比,有显著性差异 ($P < 0.05$);而对照

2 结果

2.1 PCNA 免疫组化检测

PCNA 定位于细胞核,阳性染色呈棕黄色。对照组,T 组,T+O 组的吸光度分别为 0.564 ± 0.082 , 0.602 ± 0.050 和 0.558 ± 0.093 。T 组细胞的胞核被染成深棕黄色,较对照组明显加深;所测吸光度较对照组明显增高 ($P < 0.05$)。而 T+O 组细胞的胞核染色明显减弱,所测吸光度较 T 组明显减低 ($P < 0.01$) (图 1)。

组与 T+O 组比较,差异无显著性 ($P > 0.05$) (图 3)。

2.4 ERK Western blot 检测

各组细胞均出现两条条带。位于上面的条带为 ERK2,分子质量 42kD;下面的条带为 ERK1,分子质量 44kD。TGF- α 作用于肝癌细胞 48h 后,ERK 表达明显增加;图像分析系统显示较对照组增加 1.3 倍。奥曲肽与 TGF- α 同时作用于细胞时(T+O 组),ERK 表达较 TGF- α 单独作用时明显减少;图像分析显示较 T 组减少了 38% (图 4)。

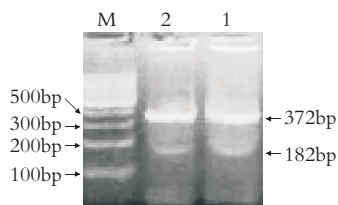


图2 奥曲肽对 TGF- α mRNA 表达的影响 M: marker; 1: 对照组; 2: 奥曲肽组

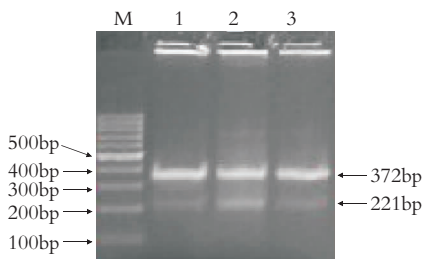


图3 奥曲肽与 TGF- α 对 EGFR mRNA 表达的影响 M: DNA marker; 1: 对照组; 2: T 组; 3: T+O 组

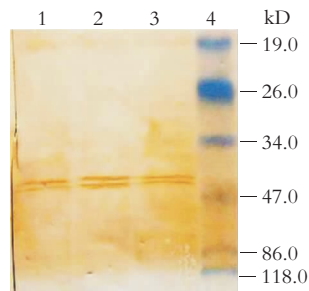


图4 Western blot 检测奥曲肽与 TGF- α 对 ERK 蛋白表达的影响 1:对照组; 2:T 组; 3:T+O 组; 4:蛋白质 marker

2.5 ERK 免疫组化检测

ERK 在胞质和胞核内均呈棕黄色染色。T 组胞核染色明显加深,细胞染色以胞核为主;

T+O 组的胞核染色明显减弱,胞质染色相对于胞核减弱不明显(图5)。



图5 免疫组化检测奥曲肽与 TGF- α 对 ERK 蛋白表达的影响(S-P法 $\times 200$) A:对照组;B:T组;C:T+O组

3 讨论

目前的研究表明,生长抑素可通过以下作用抑制肿瘤:(1)直接作用,即生长抑素与肿瘤细胞上生长抑素受体结合,通过生长阻滞、诱导凋亡或抗迁移与侵袭等而发挥直接抗肿瘤作用^[2]。(2)间接作用,包括抑制肿瘤血管生成并减少其血供,抑制多种促肿瘤生长的细胞因子、生长因子或激素,如胰岛素样生长因子 I、胃泌素、血管内皮生长因子、表皮生长因子(EGF)等的分泌,也可拮抗 EGF、血小板源性生长因子、胰岛素等的促肿瘤生长作用^[3-5]。但对于生长抑素抑制细胞外因子或激素诱导癌细胞增殖的作用也有不同的报道。Robertson 等^[6]研究表明,生长抑素类似物 RC-160 能抑制人胰腺癌细胞系 MiaPaCa2 的生长,却不能抑制 EGF 刺激的 MiaPaCa2 生长。

TGF- α 属于表皮生长因子家族,与 EGF 在结构上有 40% 的同源性。现已证实,头颈、乳腺、肝胆、胃肠等处癌症都与 TGF- α 的不正常表达有关^[7]。国外文献综述提及生长抑素类似物可抑制 TGF- α 诱导的某些肿瘤细胞增殖^[8]。奥曲肽对 TGF- α 诱导肝癌细胞株 SMMC-7721 增殖是否具有抑制作用,是否能通过 TGF- α 而发挥间接抗肿瘤作用,目前尚不清楚。

PCNA 是 DNA 合成所必需的蛋白,DNA 合成又是细胞增殖的必要条件。因此 PCNA 被视为能较可靠地反映细胞群体增殖活性的客观指标^[9]。本研究结果显示,TGF- α 作用下的肝癌细胞,其核内 PCNA 表达明显增强;而奥曲肽与 TGF- α 同

时作用于细胞后,其核内 PCNA 表达明显减弱。表明奥曲肽能抑制 TGF- α 诱导的肝癌细胞增殖。

本研究的 RT-PCR 结果显示,奥曲肽使肝癌细胞 TGF- α mRNA 指数明显降低,表明奥曲肽能抑制肝癌细胞 TGF- α 分泌。EGFR 是介导 TGF- α 发挥生物学功能的膜受体,其与 TGF- α 结合后,通过一系列级联反应将信息传到细胞核内。本实验显示,TGF- α 作用于肝癌细胞 48h 后,EGFR mRNA 指数增高,而奥曲肽可明显抑制其增高。说明奥曲肽能显著抑制 EGFR 的表达。

EGFR 激活后可激活众多的下游信号传导通路,其中丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)传导途径倍受关注。ERK 通路是目前研究得最多,也是最重要的一条 MAPK 通路。ERK 通常位于胞浆和胞核,一旦被激活便迅速移位到胞核。Western blot 显示 TGF- α 作用后 ERK 表达明显增加。进一步的免疫组化证实,TGF- α 作用后,胞核染色明显加深,细胞染色以胞核为主。奥曲肽与 TGF- α 同时作用于细胞后,Western blot 显示 ERK 表达明显减少,免疫组化显示胞核染色明显减弱,胞质相对于胞核减弱不明显。这表明奥曲肽能抑制肝癌细胞中 ERK 表达,并阻止 ERK 由胞质进入胞核。

因此,笔者认为奥曲肽可能通过抑制人肝癌细胞株 SMMC-7721 分泌 TGF- α ,抑制 EGFR 表达和阻断 EGFR 信号传导,从而抑制 TGF- α 诱导的肝癌细胞增殖。这将为临床应用奥曲肽治疗恶性肿瘤提供理论依据。

参考文献:

- [1] 王效民, 汤钊猷, 薛琼, 等. 转化生长因子 α 及其受体促进肝癌细胞生长[J]. 中国肿瘤临床, 1995, 22(3): 153-156.
- [2] Pola S, Cattaneo MG, Vicentini LM. 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.
- [3] Burghardt B, Barabas K, Marcsek Z, et al. Inhibitory effect of a long-acting somatostatin analogue on EGF-stimulated cell proliferation in Capan-2 cells[J]. J Physiol Paris, 2000, 94(1): 57-62.
- [4] Amann J, Kaven C, Spraul CW, et al. Effect of octreotide combined with growth factors on proliferation of RPE cells in vitro[J]. Ophthalmologe, 2000, 97(11): 737-741.
- [5] 刘正人, 吴高松, 杜志勇, 等. 奥曲肽对胰腺癌细胞转染 SST2 后的作用[J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(6): 424-427.
- [6] Robertson JF, Watson SA, Hardcastle JD. Effect of gastrointestinal hormones and synthetic analogues on the growth of pancreatic cancer[J]. Int J Cancer, 1995, 63(1): 69-75.
- [7] 陈小东, 梁启廉, 揭育丽, 等. 大肠癌患者血清转化生长因子- α 水平及临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2002, 11(4): 233-235.
- [8] Manni A. Somatostatin and growth hormone regulation in cancer[J]. Biotherapy, 1992, 4(1): 31-36.
- [9] Bozlu M, Orhan D, Baltaci S, et al. The prognostic value of proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and nucleolar organizer region in transitional cell carcinoma of the bladder[J]. Int Urol Nephrol, 2002, 33(1): 59-66.

文章编号:1005-6947(2007)03-0222-01

· 病案报告 ·

Poland 综合征合并乳癌 1 例

蒋会勇, 张雪峰, 宗修锐

(沈阳军区总医院 普通外科, 辽宁 沈阳 110015)

关键词: Poland 综合征; 乳腺肿瘤; 病例报告

中图分类号: R737.9 文献标识码: D

患者 女, 50 岁。1 个月前无意中
发现左乳有一肿物, 约花生米大小,
自觉局部有时轻度刺痛, 疼痛无
规律及周期性, 可自行好转, 无乳
头溢液, 当时未在意, 未予诊治。
1 个月来肿物有所增大入院, 体查:
双乳对称, 乳头无畸形, 皮肤色泽
正常。左乳腺外下象限可扪及一
1.5cm × 1.0cm 肿物, 质韧, 边界不
清, 移动度良好, 无明显触痛, 腋
窝未触及肿大的淋巴结。诊断: 左
乳肿物。行手术治疗, 术中冷冻切
片报告: 乳腺浸润性导管癌, 行乳
癌根治手术, 术中游离乳腺时见腺
体下方为肋骨

及肋间肌, 未见胸大、小肌, 锁
骨下及腋静脉浅面直接被皮肤及
皮下脂肪覆盖。切除全部左侧乳
腺和锁骨下及腋窝内的淋巴结及
脂肪组织后结束手术。术后病理
结果: 左乳腺浸润性导管癌, 未
见淋巴结转移(0/16)。术后患者
恢复平稳, 定期行 CMF 方案化疗。

讨论 Poland 综合征是一种胸
廓的先天性解剖学异常, 发生率为
1:25 000, 75% 发生在右侧, 男女
比例是 3:1。1841 年由当时医学生
Alfred Poland 首先报道, Poland
描述的病例为胸大、小肌的缺如
伴并指。1962 年 Clarkson 命名
此种畸形为 Poland 综合征。本病
的发生机制尚不明确, 可能与胎
儿局部暂时缺氧或胚胎早期锁
骨下动脉供血不足, 并造成对应
器官发育缺如或形成不全。可
伴有: 同侧

手、上臂、前臂发育不良, 指骨
短缩、并指畸形; 乳房、乳头发
育不良或缺失; 胸廓畸形, 同侧
肋骨、肋软骨、锁骨畸形或部分
缺损。

Poland 综合征胸壁畸形多不影
响患侧胸、肩和上肢的运动, 追
问病史该患者除平时左上肢力量
较右侧稍弱外, 无其它异常表现。
本例术前未能确诊, 术中发现胸
肌缺如后才得以确诊, 其原因与
该病临床罕见, 多数临床医生对
此缺乏认识, 且患者自幼体型较
肥胖, 胸部畸形不明显, 以及查
体不细致有关。因腋静脉前无胸
大、小肌, 术中易致损伤, 如术
前发现胸廓畸形并术中加以注
意可以避免损伤。有研究表明
Poland 综合征患者合并白血
病行放射治疗有一定风险, 因此
对于乳癌患者的治疗也应先用
手术及化疗的方法, 尽量避免放
射治疗。

收稿日期: 2006-12-26。

作者简介: 蒋会勇, 男, 吉林通化人,
沈阳军区总医院主治医师, 主要从事
消化道肿瘤方面的研究。

通讯作者: 蒋会勇 E-mail: huiyongjsy
@yahoo.com.cn。