

文章编号:1005-6947(2006)10-0752-05

· 基础研究 ·

反义抑制 PTTG 对胆管癌细胞株 QBC939 中 VEGF 表达的影响

陈鹤, 汤恢煊, 冯超, 文言广, 菅志远

(中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南长沙 410078)

摘要:目的 探讨抑制垂体瘤转化基因(PTTG)表达后对血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。方法 将已构建好的反义 PTTG 真核表达载体 pcDNA3.1-PTTGas 按浓度梯度转染至胆管癌细胞株 QBC939 中,培养 48h 后利用 RT-PCR 和 Western Blot 方法检测 PTTG 和 VEGF 表达量的变化,并将两者的变化行直线相关分析。结果 成功转染反义 PTTG 至 QBC939 中;转染后 PTTG 和 VEGF 在 mRNA 水平最大抑制率分别为 40.62% 和 34.14%;在蛋白质水平分别为 55.55% 和 38.46%。在 mRNA 和蛋白质两个层面上均下降,呈线性正关系($r = 0.970, 0.985, P < 0.05$)。结论 反义阻断胆管癌细胞株中的 PTTG 表达能使 VEGF 的表达下降,下降程度呈正相关。

关键词: 血管内皮生长因子; 垂体瘤转化基因; 肿瘤细胞, 培养的; 胆管肿瘤/遗传学

中图分类号: R735.8; Q58

文献标识码: A

The inhibitory expression of VEGF in antisense blocking of PTTG gene on human cholangiocarcinoma cell line QBC939

CHEN Ling, TANG Hui-huan, FEN Chao, WEN Yan-guang, JIAN Zhi-yuan

(Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of expression of pituitary tumor transforming gene (PTTG) on the expression of inhibitory of vascular endothelial growth factor (VEGF). **Methods** The constructed recombinant vector, pcDNA3.1-PTTGas that contained full-length antisense PTTG, was transfected into the cholangiocarcinoma cell line QBC939 in different quantity. After 48h incubation, the variation of expressions of PTTG and VEGF mRNAs and proteins were observed by RT-PCR and Western-blot method. **Results** After successful transfecting the recombinant vector into QBC939, the mRNAs and proteins of PTTG and VEGF were all inhibited. Linear correlation analysis showed positive correlation between descendent extents of PTTG and VEGF ($P < 0.05$). **Conclusions** Antisense blocking PTTG gene can inhibit the expression of VEGF in both mRNA and protein levels, and a positive correlation between descendent extents of PTTG and VEGF was observed.

Key words: VEGF; PYYC; Tumor Cells, Cultured; Bile Duct Neoplasms/gene

CLC number: R735.8; Q58

Document code: A

Pei 等^[1]在 1997 年发现了垂体瘤转化基因 (pituitary tumor transforming gene, PTTG) 后, 学者们陆续发现 PTTG 在绝大多数恶性肿瘤中呈现高表达,

而在正常组织中除睾丸和胸腺外几乎不表达^[2]。提示 PTTG 在人类恶性肿瘤的发生发展中占有重要地位。PTTG 与碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 之间环路效应已经肯定^[3], 但另一参与肿瘤侵袭转移且更为重要的因子 - 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 与 PTTG 的表达关联性尚存在争议。为了探讨 PTTG 与 VEGF 之间表达的关联性, 并探讨分子水平靶向抑制 PTTG 的可能性, 笔者将已构建好的

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 20335020); 湖南省卫生厅科研基金资助项目 (No. B2005011)。

收稿日期: 2005-10-26; **修订日期:** 2006-02-28。

作者简介: 陈鹤, 男, 湖南湘潭人, 中南大学湘雅医院博士研究生, 主要从事胆道肿瘤方面的研究。

通讯作者: 汤恢煊 E-mail: chendoc@126.com。

反义 PTTG 真核表达载体 pcDNA3.1-PTTGas 转染入人胆管癌细胞株 QBC939, 观察反义抑制 PTTG 后 QBC939 中 PTTG 和 VEGF 的基因和蛋白表达量的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和癌细胞株 PTTG 真核表达载体 pcDNA3.1-PTTGas 由华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤生物医学中心陈刚惠赠; pcDNA3.1(+) 空白质粒由中南大学湘雅医院普通外科菅志远惠赠; 大肠杆菌 JM109 由中南大学遗传药理实验室张伟惠赠; 人胆管癌细胞株 QBC939 由中南大学湘雅医院普通外科实验室引进并保存。

1.1.2 主要试剂 RNA 抽提试剂 trizol 为 Gibco BRL 公司产品, 限制性内切酶 EcoR I 及 Xho I 购自北京华美生物有限公司; lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司; 山羊抗人 PTTG 多抗、山羊抗人 VEGF 多抗、山羊抗人 β -tubulin 单抗、鼠抗山羊二抗均购自 Santa Cruz 公司; 逆转录多聚酶链反应 (RT-PCR) 试剂盒购自 TaKaRa 公司; EZNA 快速滤过式质粒抽提试剂盒购自 Sigma 公司; RPMI-1640 细胞培养液购自 Hyclone 公司; 新生牛血清购自 Gibco 公司; 免疫印迹 (Western Blot) 所用试剂购自北京华美生物有限公司。

1.1.3 主要仪器 双垂直电泳槽 DY CZ-24D、转移电泳槽 DY CZ-40D 及电泳仪 DYY-11 均购自北京市六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 质粒的扩增和抽提 将 pcDNA3.1-PTTGas 和 pcDNA3.1(+) 空白质粒以氯化钙法转化至感受态大肠杆菌 JM109 中, 置于含氨苄青霉素的琼脂糖中挑出阳性克隆, 于培养液中 37℃ 摇菌过夜, 按照试剂盒的说明书步骤抽提质粒。

1.2.2 转染和鉴定 pcDNA3.1-PTTGas 和 pcDNA3.1(+) 的真核转染按照脂质体 2000 说明书稍加改变进行, 具体步骤: 6 孔板中每孔中植入 4×10^5 细胞, 每孔加 2 mL 无血清 RPMI-1640。细胞长至 75% ~ 80% 满时, 其中 1 孔不行处理作空白对照, 1 孔中加入 8 μ g pcDNA3.1(+) 和 16 μ L 脂质体 2000, 其余孔按 2, 4, 6, 8 μ g 的浓度梯度加入 pcDNA3.1-PTTGas, 所有 DNA (μ g): 脂质体 2000 (μ L)

约为 1: 2。6h 后换含血清培养基。48h 后细胞铺壁至 95% ~ 100% 时以 trizol 抽提 RNA, 或将细胞消化离心后加入裂解液抽提蛋白。

1.2.3 RT-PCR 检测转染后 PTTG 和 VEGF mRNA 的表达 采用 Trizol 提取细胞总 RNA, 经琼脂糖电泳鉴定纯度良好后, 按 RT-PCR 试剂盒的说明书完成逆转录。PCR 反应引物 PTTG: 上游 5'-GCGGCCT-CAGATGAATGCG-3', 下游 5'-GCCTTTCTGGTAGCTT-TAGGTAA-3', 片断长度为 195bp。VEGF: 上游 5'-AAATGCTTTCTCCGCTCT-3', 下游 5'-GGGCAGAATCAT-CACGAA-3', 片断长度为 310bp。 β -actin: 上游 5'-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA-3', 下游 5'-TCTA-GACGGCAGGTCAGGTCCACC-3', 片断长度为 609bp。PTTG 和 VEGF 均与 β -actin 同管在 20 μ L 反应体积中扩增, 反应条件前者为 95℃ 3min, 95℃ 30s, 52℃ 30s, 72℃ 1min, 30 个循环, 72℃ 10min, 后者为 95℃ 3min, 95℃ 30s, 56℃ 30s, 72℃ 1min, 30 个循环, 72℃ 10min。反应完毕后经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳并照相, 软件分析光密度。

1.2.4 Western Blot 检测转染后 PTTG 和 VEGF 的蛋白表达 提取转染后 48h 的细胞蛋白, 以 Bradford 法测定蛋白浓度。每孔各取 50 μ g 总蛋白以 Western Blot 检测 PTTG 和 VEGF 的蛋白表达, 以 β -tubulin 为内参照。蛋白经 2h 十二烷基磺酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶 (SDS - PAGE) 电泳后, 转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜, 5% 脱脂奶封闭过夜, 一抗 37℃ 振荡 2h, 二抗 37℃ 振荡 1h, 洗脱 3 次后加入 ECL 发光试剂, 曝光, 冲洗。扫描后经软件分析光吸收度。

1.2.5 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 所有试验均在同一条件下进行 3 次, 结果取均数 \pm 标准差表示。PTTG 与 VEGF 之间的关系采用 Pearson 直线相关分析。P < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒的转化、扩增和酶切鉴定

转化后的 JM109 在含氨苄青霉素的培养基中生长良好, 抽提质粒经分光光度仪测定, (Abs260)/(Abs280) 为 1.9, 表明纯度良好。酶切电泳图谱见片断约 700bp, 证明 pcDNA3.1-PTTGas 结构完整。

2.2 转染前后 PTTG 和 VEGF 的 mRNA 表达

RT-PCR 结果显示,在空白对照组和空白质粒转染组的细胞中,PTTG 和 VEGF 的 mRNA 表达量未见明显变化,而 pcDNA3.1-PTTGas 转染组细胞的 PTTG mRNA 则明显呈梯度下降(图 1),其中 8 μ g 转染组

其相对积分吸光度值下降了 40.62%,VEGF 下降了 34.14%(图 2)。经 Pearson 直线相关分析,PTTG 和 VEGF 的 mRNA 下降程度呈正相关($r = 0.970$, $P = 0.030$)(图 3)。

a: PTTG

b: VEGF

M: 内参照; 1: 空白对照组; 2: 8 μ g/孔转染 pcDNA3.1(+)组; 3~6: 分别为 2, 4, 6, 8 μ g/孔转染 pcDNA3.1-PTTGas 组

图 1 RT-PCR 显示不同转染组间 PTTG 和 VEGF 的 mRNA 表达量的差异

1~4 分组分别为 2, 4, 6, 8 μ g/孔转染 pcDNA3.1-PTTGas 组; DCt 为空白质粒转染组与各 pcDNA3.1-PTTGas 转染组的 mRNA 相对积分吸光度值的差值

图 2 不同转染组中 PTTG 和 VEGF mRNA 相对积分吸光度值的比较

图 3 不同转染组间 PTTG 和 VEGF mRNA 光度值下降程度的比较

2.3 转染前后 PTTG 和 VEGF 的蛋白质表达

Western Blot 结果显示,在空白对照组和空白质粒转染组的细胞中,PTTG 和 VEGF 蛋白表达量未见明显变化。而 pcDNA3.1-PTTGas 转染组的细胞蛋白表达量则明显呈梯度下降(图 4),其中 8 μ g 转染

组的细胞蛋白相对积分吸光度值 PTTG 下降了 55.55%,VEGF 下降了 38.46%(图 5)。经 Pearson 直线相关分析,PTTG 和 VEGF 的蛋白下降程度呈正相关($r = 0.958$, $P = 0.042$)(图 6)。

1: 空白对照组; 2: 8 μ g/孔转染 pcDNA3.1(+)组; 3~6: 分别为 2, 4, 6, 8 μ g/孔转染 pcDNA3.1-PTTGas 组

图 4 Western-blot 显示不同转染组间 PTTG 和 VEGF 蛋白表达量的差异

图 5 不同转染组中 PTTG 和 VEGF 蛋白质相对积分吸光度值的比较

1~4 分组分别为 2, 4, 6, 8 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 转染 pcDNA3.1-PTTGas 组 D_{Gt} 为空白质粒转染组与各 pcDNA3.1-PTTGas 转染组蛋白相对积分吸光度值的差值

图 6 不同转染组间 PTTG 和 VEGF 蛋白相对积分吸光度值下降程度的比较

3 讨 论

PTTG 是新发现的的原癌基因,其致瘤、促瘤作用主要包括:引起有丝分裂时染色体分离障碍;引起染色体不稳定;转录激活剂激活 c-myc 等癌基因;上调血管生长相关因子的表达;与 p53 基因共同控制细胞凋亡等^[4]。但 PTTG 与胆管癌的发生、发展关系尚不清楚。

新生血管生成是实体肿瘤增殖和转移的重要条件,而生长因子是其重要因素^[5]。VEGF 既是一种内皮生长因子,又是一种血管因子,是肿瘤血管生成中最重要的始动因子之一^[6]。在胆管癌中,VEGF 的表达率和表达量比 bFGF 更高,与预后和转移的关系更密切^[7],有资料统计肝外胆管癌中 VEGF 的阳性表达率为 62.2%~72.7%^[8-9]。据此,笔者选择 VEGF 作为研究对象。目前 PTTG 与 bFGF 之间的自分泌-旁分泌调节环路已基本明确^[3],但 PTTG 与 VEGF 之间的表达关联仍存在争论。Hunter^[10]认为尽管 PTTG 确实存在诱导血管生成的作用,但不一定是通过 VEGF 通路的上调来实现的,两种基因表达不存在关联性;而 McCabe^[11]将 PTTG 转染至垂体细胞中,观察到 PTTG 的表达增强导致了 VEGF 的表达相应上调,两者呈现量化依赖。

本实验在基因和蛋白两个层面上证明:抑制 PTTG 表达可引起 VEGF 的表达下调。这意味着在

胆管癌的新生血管生成过程中,除 PTTG-bFGF 调节环路之外,可能存在一条 PTTG-VEGF 调节通路,或者两条通路都发挥着重要的作用。但 PTTG-VEGF 通路是否和 PTTG-bFGF 通路一样存在环路效应,则尚需进一步实验证明。根据 PTTG-VEGF 通路存在的证据,再结合 VEGF 在胆管癌发展过程中的重要作用,笔者推测:这条通路的活化有可能直接参与胆管癌患者病情的恶化;直接阻断 PTTG 表达后,可通过间接抑制 VEGF 表达,从而抑制肿瘤发展、转移;PTTG-VEGF 通路有可能成为控制胆管癌生长、转移的靶通路。

在本课题前期的预实验中,笔者分析对比了 2 株胆管癌细胞中 PTTG 和 VEGF 的表达量,一株为源于转移灶的 QBC939,另一株为源于原发灶的 RBE。结果显示,恶性程度较高的 QBC939 比恶性程度较低的 RBE 拥有更高的 PTTG 和 VEGF 的表达量。故推测:恶性表型高、侵袭性强的细胞,其 PTTG 和 VEGF 的表达量可能更高。这与 Shibata^[12]在食管癌中的研究结果类似。同时也再次验证了两种基因内部存在表达关联的假设。

本实验结果显示,直接抑制 PTTG 的蛋白翻译导致了 VEGF 在 mRNA 和蛋白质两个层面的表达下降。表明 PTTG 对于 VEGF 表达的影响不是发生在 VEGF 的翻译阶段,而是发生在转录阶段。在 PTTG 蛋白抑制程度达到 55% 左右时,VEGF 蛋白的抑制程度仅为 38%。这表明 PTTG 只是 VEGF 表达量调节的重要相关因素,而非决定因素。鉴于各种基因的相互影响呈现复杂的网络关系,这种非决定性作用可以理解和接受。如前所述,PTTG 在肿瘤发生发展作用十分广泛,调节 VEGF 的表达只是其致癌作用的一个方面。在证明了抑制 PTTG 表达可以下调 VEGF 表达的基础上,笔者将继续研究 PTTG 参与肿瘤发生发展的其他机制,以及观察调节基因表达后肿瘤最终恶性表型的改变。

参考文献:

- [1] Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG) [J]. Mol Endocrinol, 1997, 11 (4): 433 - 441.

- [2] Zhang X, Horwitz GA, Prezant TR, *et al.* Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG) [J]. *Mol Endocrinol*, 1999, 13 (1): 156 - 166.
- [3] McCabe CJ, Khaira JS, Boelaert K, *et al.* Expression of pituitary tumour transforming gene (PTTG) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in human pituitary adenomas: relationships to clinical tumour behaviour [J]. *Clin Endocrinol*, 2003, 58 (2): 141 - 150.
- [4] Bernal JA, Luna R, Espina A, *et al.* Human securin interacts with p53 and modulates p53-mediated transcriptional activity and apoptosis [J]. *Nat Genet*, 2002, 32 (2): 306 - 311.
- [5] Flokman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82 (1): 4 - 6.
- [6] Millauer B, Witzmann-Voos S, Schnurch H, *et al.* High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis [J]. *Cell*, 1993, 72 (6): 835 - 846.
- [7] Ogasawara S, Yano H, Higaki K, *et al.* Expression of angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in human biliary tract carcinoma cell lines [J]. *Hepatol Res*, 2001, 20 (1): 97 - 113.
- [8] 周军, 汤恢煊. 胆管癌微血管计数和 VEGF 及 MMP2 的表达及其意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12 (2): 122 - 124.
- [9] 常实, 汤恢煊, 周军, 等. 肝外胆管癌 nm23-H₁ 和 VEGF 的表达及其临床意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12 (8): 625 - 627.
- [10] Hunter JA, Skelly RH, Aylwin SJ, *et al.* The relationship between pituitary tumour transforming gene (PTTG) expression and in vitro hormone and vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from human pituitary adenomas [J]. *Eur J Endocrinol*, 2003, 148 (2): 203 - 211.
- [11] McCabe CJ, Boelaert K, Tannahill LA, *et al.* Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/Flk-1, and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87 (9): 4238 - 4244.
- [12] Shibata Y, Haruki N, Kuwabara Y, *et al.* Expression of PTTG (pituitary tumor transforming gene) in esophageal cancer [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2002, 32 (7): 233 - 237.

文章编号:1005-6947(2006)10-0756-01

· 病例报告 ·

先天性无胆囊 1 例

胡元明, 商海明

(江西省宜丰县人民医院 外一科, 江西 宜丰 336300)

关键词: 胆囊/畸形; 病例报告

中图分类号: R657.4

文献标识码: D

患者 女, 72 岁。因反复上腹胀伴呕吐, 不能进食 3 个月余入院。在外院经电子胃镜先后诊断为十二指肠球部溃疡并梗阻; 彩超检查示胆囊

6.0 cm × 3.5 cm, 胆囊内未见明显异常。转住我院后经电子胃镜诊断为幽门梗阻, 保守治疗无效后, 行胃大部切除术, 术中见肝脏正常, 胆囊床处及整个右肝脏面无胆囊, 亦未见条索纤维痕迹及明显粘连。结肠肝曲向前上突出, 靠近右肝脏面内侧。诊断: 幽门梗阻; 先天性无胆囊。该患者术前未行 CT 检查, 因病人拒绝, 术后未再行超声等检查。

床上极易漏诊或误诊, 常常需经手术确诊。分析原因: (1) B 超检查误导。由于先天性无胆囊在临床上极为罕见, 检查时医生过分依赖 B 超检查, 容易主观上将位于胆囊部位的空腔性影像误为胆囊。(2) 临床医生未采用 CT 等检查佐证。据统计, 先天性无胆囊占我院同期住院病人数的 0.6/10 万 (1/15.8 万), 占住院胆囊疾病的 0.3‰ (1/2 850)。

收稿日期: 2006-07-11。

作者简介: 胡元明, 男, 江西宜丰人, 江西省宜丰县人民医院副主任医师, 主要从事普通外科临床方面的研究。

通讯作者: 胡元明 E-mail: hu630101@163.com。

讨论 先天性无胆囊极为罕见, 临