

文章编号:1005-6947(2008)02-0134-06

· 基础研究 ·

Oct-4 在不同侵袭转移能力的人胆管癌细胞系中的表达

王敏¹, 秦仁义¹, 肖娟², 陈敏¹, 胡均¹, 杜志勇¹, 刘文松¹

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 1. 胆胰外科 2. 妇产科, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 探讨干细胞因子 Oct-4 在不同侵袭转移能力的人胆管癌 QBC939 亚克隆细胞系中的表达。方法 运用体外侵袭实验筛选出 1 个高侵袭转移潜力和 1 个低侵袭转移潜力的细胞亚系, 并对两者的生物学特性进行比较、分析和鉴定。运用 RT-PCR, Western-blot 的方法检测干细胞因子 Oct-4 在两个亚克隆细胞系的差异表达。结果 分离得到高和低转移能力的人胆管癌 QBC939 亚克隆细胞系 QBC-H 和 QBC-L, 体外侵袭指数分别为 263 ± 5.9 和 154 ± 6.6 ($P < 0.05$)。干细胞因子 Oct-4 mRNA 和蛋白在 QBC-H 的表达均高于 QBC-L, 两者差异有显著性 ($P < 0.05$)。结论 干细胞因子 Oct-4 的表达强度与胆管癌 QBC939 的侵袭转移能力密切相关; 它可能是调控胆管癌侵袭转移能力的重要基因。 [中国普通外科杂志, 2008, 17(2):134-139]

关键词: 胆管肿瘤; Oct-4; 肿瘤浸润; 肿瘤转移; 细胞亚系

中图分类号: R 735.8

文献标识码: A

Expression of Oct-4 in human cholangiocarcinoma cell lines with different metastatic capacities

WANG Min¹, QIN Renyi¹, XIAO Juan², HU Jun¹, DU Zhiyong¹, CEN Min¹, LIU Wenshong¹

(1. Department of Surgery 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of stem cell factor Oct-4 in human cholangiocarcinoma QBC939 subclone cell lines with different metastatic capacities. **Methods** The screening and use of one subclone cell line with high metastasis capacity and one subclone cell line with low metastasis capacity was performed by the in vitro invasive assay. Then, the biologic characters of the two subclone cell lines were compared, analyzed and identified. The expression of the stem cell factor Oct-4 in the two selected subclone cell lines was determined by RT-PCR and Western-blot assays. **Results** Two subclones of QBC939 with different metastatic capacities, and named QBC-H and QBC-L were isolated, and their invasion indexes were 263 ± 5.9 and 154 ± 6.6 , respectively ($P < 0.05$). The expression of mRNA and protein of Oct-4 was stronger in QBC-H than in QBC-L. **Conclusions** There is a close relationship between the expression strength of the stem cell factor Oct-4 and the metastatic capacity of Oct-4. The stem cell factor may play an important role in regulation of the metastatic capacity of cholangiocarcinoma.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(2):134-139]

Key words: Bile Duct Neoplasms; Oct-4; Neoplasms Invasiveness; Neoplasms Metastasis; Subclone Cell Line

CLC number: R 735.8

Document code: A

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30471693)。

收稿日期: 2007-04-25; 修订日期: 2007-12-05。

作者简介: 王敏, 男, 华中科技大学同济医学院附属同济医院博士研究生, 主要从事胆管癌侵袭转移机制的相关方面的研究。

通讯作者: 秦仁义 E-mail: ryqin@tjh.tjmu.edu.cn

肿瘤组织含有许多表型差异的细胞亚群,它们在生物学特征上表现异质现象。不同侵袭转移潜能的亚克隆细胞系来源于相同的亲本,两者的差异集中体现在侵袭转移表型上,是肿瘤侵袭转移研究最理想的材料。Oct-4(也称 Oct-3)是一个和胚胎发育全能/多能性相关的转录因子,在细胞的全能/多能性及未分化状态的调控维持中发挥重要作用。近期研究显示干细胞因子 Oct-4 在部分肿瘤的发生和侵袭转移中也发挥重要作用^[1]。本实验通过体外侵袭实验获得高低不同侵袭转移潜能的亚克隆细胞系,并检测 Oct-4 在 2 个亚克隆系的表达,旨在探讨 Oct-4 与胆管癌侵袭转移特性的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株及实验动物 人胆管癌 QBC939 由本院胆胰外科研究所保存(第三军医大学王曙光教授惠赠)。BALB/C-nu/nu 裸鼠由本院动物实验中心提供,鼠龄 4~5 周,体重 20~25 g,雌雄兼用,实验和饲养均在无病原条件下(SPF, specific-pathogen free)的超净层流架中进行,用灭菌处理的水和饲料供动物自由饮用。

1.1.2 主要试剂 培养基 RPMI1640(Gibico 公司),胎牛血清(杭州四季青),胰酶(Trypsin, Sigma 公司),Transwell 小室(Coster 公司),Matrigel 胶(BD 公司),Oct-4 抗体(Abcam 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞株的培养 细胞复苏后用 RPMI1640 培养液培养,内含 10% 胎牛血清、青霉素 50 U/mL、链霉素 50 μg/mL,2 d 换液 1 次;37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。细胞达到 90% 融合时以 0.25% 胰酶消化、传代。所用细胞均为对数生长期细胞。

1.2.2 细胞的单克隆分离 采用有限稀释法,用条件培养基[含 20% 胎牛血清(FBS),余条件同母细胞系的培养]。调节细胞密度至 5~8 个/mL,加入 96 孔板中(0.1 mL/孔)。12 h 内镜下观察并记录单克隆孔;37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 3~4 周。期间不断观察标记,确保其单克隆来源。待细胞增殖到孔底面积的 1/2 以上时,将细胞转移至 24 孔培养板中逐渐扩大培养。

1.2.3 细胞体外侵袭实验 采用 Transwell 小室方法检测分离所得的亚克隆细胞系的侵袭能力。Transwell 小室为杯状结构,底部滤膜为直径

6.5 mm,孔径 8 μm 的聚碳酸酯微孔滤膜。滤膜上均匀地涂抹 RPMI 1640 培养基 1:8 稀释的 Matrigel 胶 50 μg/小室。制备好的小室置超净台上,室温下紫外线照射过夜干燥备用;使用前加入少量无血清培养基培养箱中水化 2 h。下室加入 3T3 细胞条件培养液 500 μL(用无血清培养基培养对数生长期 NIH3T3 细胞 24 h,收集培养液过滤、-20℃ 保存备用)。上室加入各亚克隆细胞,用含 0.5% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基调整细胞浓度至 2.5×10^5 个/mL,每孔加入细胞悬液 200 μL。37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 72 h 后取出 Transwell 小室,用磷酸盐缓冲液(PBS)淋洗,棉签擦去滤膜上层未迁移的细胞。95% 乙醇溶液固定,Harris 苏木素染色 10 min。在倒置显微镜下(×200)计数微孔膜下层的细胞;每个样本中间和周边共计数 5 个视野。每个亚克隆细胞系重复实验 4 次,取其平均值。

1.2.4 生长曲线测定 取体外侵袭实验筛选所得的不同侵袭能力的 2 个亚克隆细胞系,制备细胞悬液。细胞计数后接种于 24 孔板中(2×10^4 个/孔);分别接种 21 个孔,37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。每天随机取 3 孔细胞消化计数,取其平均值。连续计数 7 d,绘制细胞生长曲线。实验重复 3 次。

1.2.5 平板克隆形成实验 取上述 2 个亚克隆细胞系制备单细胞悬液。细胞计数后接种于 6 cm 细胞培养皿中(1×10^3 个/孔),分别接种于 6 个复孔;37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 10 d;常规换液维持细胞生长。第 10 天去除培养基,PBS 清洗,中性甲醛固定 15 min,苏木素染色 10 min;镜下计数 >50 个细胞的克隆数。

1.2.6 裸鼠皮下成瘤实验 取上述不同侵袭能力的 2 个亚克隆细胞系,用无血清条件培养基配制细胞悬液,计数调整细胞密度至 5×10^6 个/mL。裸鼠左右两后肢腋背部皮下接种 0.2 mL(含 10^6 个细胞);筛选的 2 个克隆分别接种 4 只裸鼠。观察裸鼠的生活状况及局部肿瘤生长情况;6 周时测量接种瘤块的大小,取平均值。按公式 $V = a \times b \times c/2$ 计算肿瘤的体积。

1.2.7 肝门移植瘤模型 待裸鼠皮下接种的肿瘤生长到 6 周时,在无菌条件下,将肿瘤完全剥离,去除表面的结缔组织,完全暴露肿瘤实质。用 20 号套管针穿刺肿瘤块,套取肿瘤组织备用。另取裸鼠腹部消毒,0.25% 戊巴比妥钠 0.25 mL 腹腔注射,于剑突下沿腹白线开腹,暴露肝脏,显露

肝门。将准备好的穿刺有胆管癌组织的套管针沿肝门穿刺,进入3 mm左右,将套管内肿瘤组织打入肝门部。用棉签压迫止血,依次关腹,结束手术。QBC-H和QBC-L分别种5只裸鼠。

1.2.8 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 Oct-4 的表达 Trizol 试剂自对数生长期的 QBC-H 和 QBC-L 细胞中分别提取总 RNA。逆转录反应合成 cDNA。取 1 μ L (0.1 mg/L) 产物进行 PCR 扩增。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 59 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。上游引物为 5' GACAACAATGAGAACCTTCAGGAGA3'; 下游引物为 5' TTCTGGCGCCGGTTCAGAACCA3', 扩增产物为 218 bp。反应体系以 GAPDH 作为内参。上游引物为 5' GCCAAAAGGGTCATCATCTCTG3'; 下游引物为 5' CATGCCAGTGAGCTTCCCGT3'; 扩增产物为 347 bp。引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.9 Western 印迹法检测 Oct-4 蛋白的表达 收获对数生长期的 QBC-H 和 QBC-L 细胞,离心沉淀后加入裂解液。裂解液含 50 mmol/Tris-HCl (pH8.0), 150 mmol/L NaCl, 0.02% NaN₃ 和

0.1% NP-40。取 20 μ g 蛋白质,行变性聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳,将蛋白转移至硝酸纤维素膜,5% 脱脂奶粉封闭。加入 Oct-4 一抗(1:500),4 $^{\circ}$ C 过夜;洗膜 3 次后加羊抗兔免疫球蛋白 G (IgG),室温孵育 1 h。采用 ECL 试剂盒显影,测定条带光密度值。

1.3 统计学处理

数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。SPSS11.5 软件进行 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

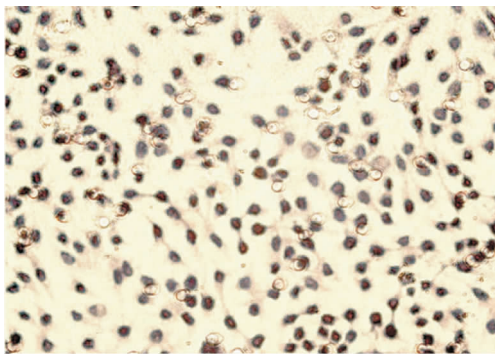
2 结果

2.1 细胞的克隆化分离

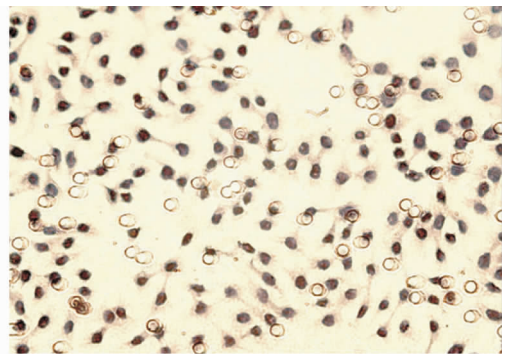
分离获得 16 株人胆管癌 QBC939 细胞亚系。

2.2 细胞体外侵袭能力

测定 16 株亚克隆细胞系的体外侵袭能力,获得 1 株体外侵袭转移潜能最强和 1 株体外侵袭转移潜能最弱的细胞亚系,分别命名为 QBC-H 和 QBC-L。QBC-H 和 QBC-L 的体外侵袭转移指数为 263 ± 5.9 和 154 ± 6.6 。*t* 检验显示,QBC-H 的侵袭转移指数与 QBC-L 相比差异具有显著性 ($P < 0.05$) (图 1)。



QBC-H



QBC-L

图 1 Transwell 体外侵袭试验图 ($\times 200$)

2.3 生长曲线

通过体外侵袭实验筛选获得的 QBC-H 和 QBC-L 细胞系的体外增殖情况显示。QBC-H 较 QBC-L 生长旺盛,倍增时间更短,生长平台期出现更晚,细胞数目也明显的多于后者(图 2)。

2.4 平板克隆形成实验

QBC-H 和 QBC-L 的平板克隆形成率为 $27.3\% \pm 1.3\%$ 和 $20.2\% \pm 1.4\%$ 。前者高于后者,差异具有显著性 ($P < 0.05$) (图 3)。

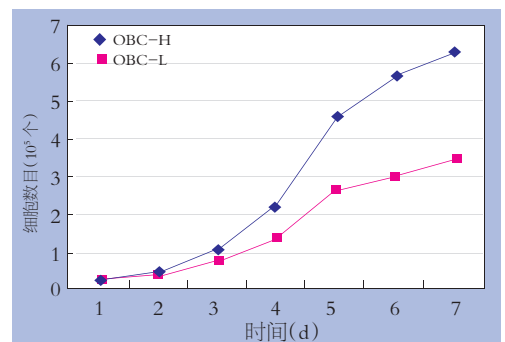


图 2 生长曲线

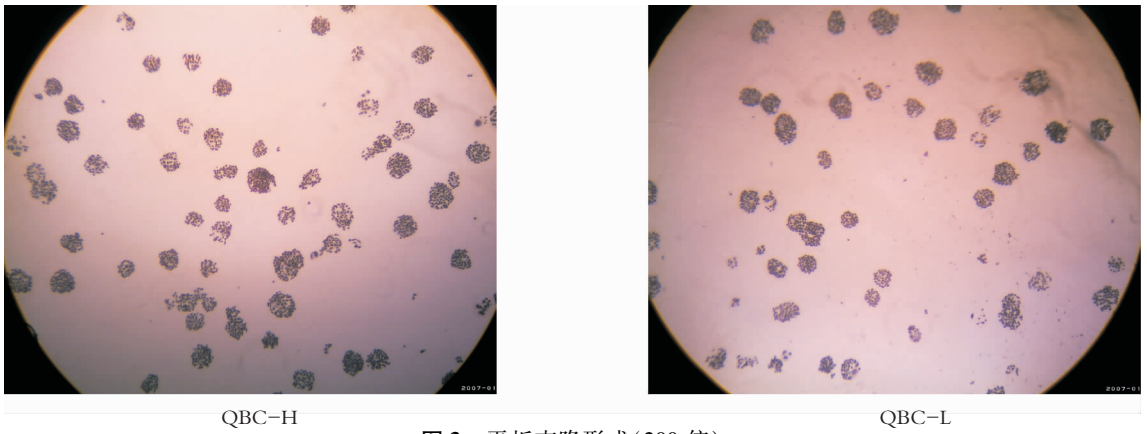


图3 平板克隆形成(200倍)

2.5 裸鼠皮下肿瘤体积及成瘤率

裸鼠皮下接种细胞后6周时测定肿瘤块的大小, QBC-H 和 QBC-L 的平均值分别为(238 ± 31) mm³ 和 (43 ± 14) mm³。6周时处死裸鼠,解剖发现两个亚克隆系均未见远处转移灶。两种细胞的裸鼠皮下成瘤率均为 100 % (图 4)。

2.6 肝门移植瘤动物模型及侵袭转移情况

移植 QBC-H 和 QBC-L 的裸鼠均出现黄疸, QBC-H 出现的平均时间为 3 ~ 4 周, QBC-L 为 4 ~ 5 周。6周时前者较后者恶液质更为严重,表

现为消瘦更明显、进水食量更少、活动量小、黄疸颜色更深。解剖裸鼠,显示两组肝门部均有肿瘤生长;QBC-H 组和 QBC-L 组的肿瘤平均直径大小为(1.67 ± 0.31) cm 和(0.96 ± 0.28) cm。两者均向周围组织浸润,主要向肝实质内生长,但 QBC-H 组的转移范围明显更为广泛,均侵袭胆囊、肝脏血管;而 QBC-L 组的侵袭范围主要局限在肝门部,未见侵袭胆囊,仅 1 例侵袭血管。QBC-H 组和 QBC-L 组在胰腺、肺脏、胃肠、脾脏和肾脏均未见转移(图 5)。

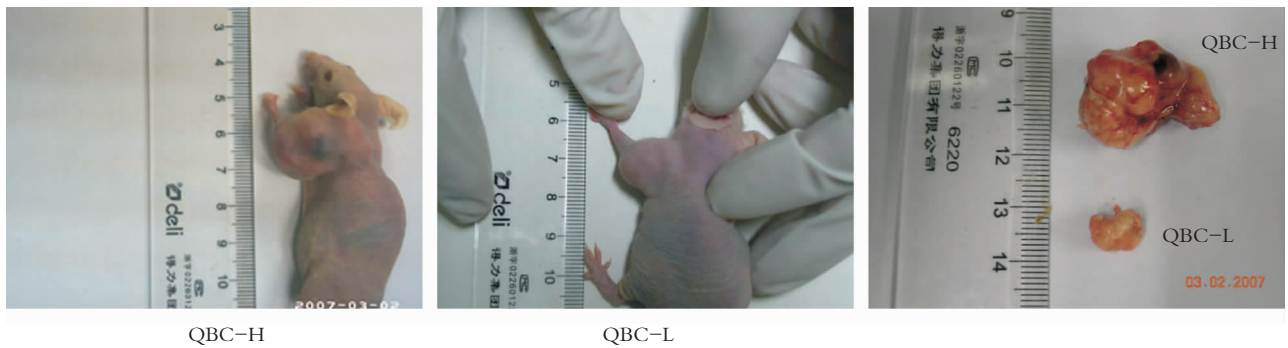


图4 裸鼠皮下成瘤

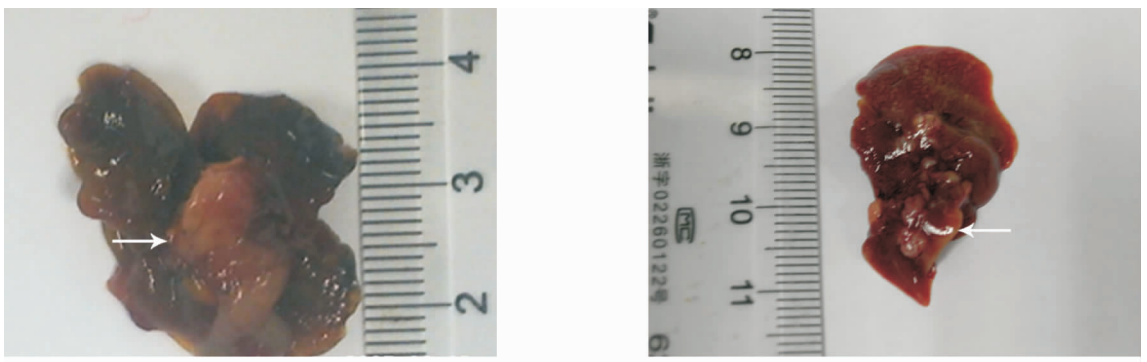


图5 裸鼠肝门移植瘤实验(箭头指为肿瘤)

2.7 Oct-4 mRNA 的表达

以 Oct-4 条带的吸光度积分值和 GAPDH 内参条带的比值表示 Oct-4 的相对表达量。据 HPIAS-1000 及统计学分析, Oct-4 在 QBC-H 组和 QBC-L 组中的相对表达量为 0.786 ± 0.025 ; 0.458 ± 0.046 , 两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Oct-4 在 QBC-H 组中的表达明显高于 QBC-L 组 (图 6)。

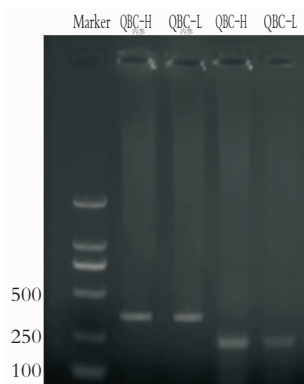


图 6 Oct-4 的 PCR 电泳图

2.8 Oct-4 蛋白的表达

以 Oct-4 蛋白条带的吸光度积分值和 β -actin 内参条带的比值表示 Oct-4 蛋白的相对表达量。据 HPIAS-1000 及统计学分析, Oct-4 蛋白在 QBC-H 组和 QBC-L 组中的相对表达量为 0.802 ± 0.038 和 0.462 ± 0.031 , 两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Oct-4 蛋白在 QBC-H 组中的表达明显高于 QBC-L 组中的表达 (图 7)。

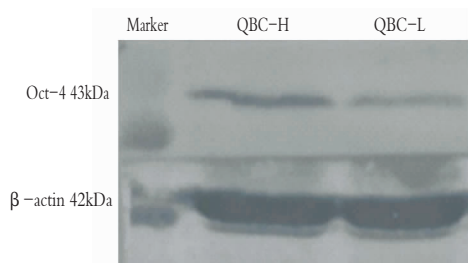


图 7 Oct-4 蛋白的 Western-blot 电泳图

3 讨论

根据肿瘤异质性理论, 在恶性肿瘤细胞群中并非所有细胞都具有侵袭转移特性^[2]。侵袭转移单克隆细胞亚系起源于单个细胞, 其异质性可减低到最低; 这可为各种比较实验提供最好的研究对象^[3]。近年来, 许多实验提示它们是由来源于

同一母系的不同侵袭转移能力的单克隆细胞株完成的, 如转移相关基因 nm23 便是从不同转移能力的 B16 黑色素细胞瘤单克隆细胞株中发现的^[4]。本实验通过克隆化培养的方法获得 16 个亚克隆细胞株, 通过体外侵袭实验筛选获得高低不同侵袭转移特性人胆管癌 QBC939 亚克隆细胞系, 并对其生物学特性进行比较鉴定。

Oct-4 属于 POU 转录因子家族的一员, 是一个和胚胎发育全能/多能性相关的转录因子, 在细胞的全能/多能性及未分化状态的调控维持中发挥重要作用^[5]。在体外, Oct-4 仅在未分化的胚胎干细胞中表达, 当这些细胞被诱导向体细胞分化时, Oct-4 的表达下降^[6]。研究显示, Oct-4 可能通过正调控维持细胞全能/多能性状态所需基因的转录, 或可能负调控与体细胞分化有关基因的转录以协调细胞的分化。Oct-4 表达的上调和下调直接影响着干细胞向不同的方向分化^[7]。

干细胞及肿瘤干细胞理论认为, 肿瘤来源于干细胞, 并且肿瘤细胞中存在一个维持肿瘤生长的亚群, 即肿瘤干细胞^[8]。早期研究显示, Oct-4 和生殖系统肿瘤的发生有重要的联系, Oct-4 表达的异常升高可增加干细胞转变为恶性肿瘤潜能; 抑制生殖系统的恶性肿瘤的 Oct-4 表达可以抑制恶性肿瘤的发生发展^[1]。近期研究显示, Oct-4 在生殖系统以外的胰腺癌等多种肿瘤中也高表达, 且其表达的强度和肿瘤的恶性程度成正比。故推测干细胞中 Oct-4 调控失常, 导致部分肿瘤的发生, 其表达强度影响了下游产物的表达决定了肿瘤的生物学特性^[9]。本实验运用体外侵袭实验, 筛选出对人工基底膜穿透和迁移能力高低不同的 2 个亚克隆胆管癌细胞系, 并对 2 个亚克隆细胞系的生物学特性进行了鉴定。Oct-4 表达在高侵袭转移的亚克隆细胞系中明显高于低侵袭转移的亚克隆细胞系。实验表明, Oct-4 的表达和胆管癌的侵袭转移能力密切相关, 因此 Oct-4 可能成为抑制胆管癌侵袭转移的新的靶点。并且 Oct-4 和胆管癌恶性程度相关, 其也可能是肿瘤干细胞的特异性分选标记物; Oct-4 用于胆管癌干细胞的筛选也是今后研究的重要方向。

参考文献:

- [1] Trosko JE. From adult stem cells to cancer stem cells: Oct-4 Gene, cell-cell communication, and hormones during tumor promotion [J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1089(1): 36-58.
- [2] Fidler I J, Kripke ML. Metastasis results from preexisting va-

- riant cells within a malignant tumor [J]. *Science*, 1977, 197(4306):893-895.
- [3] Kimura K, Nakano T, Park YB, *et al.* Establishment of human osteosarcoma cell lines with high metastatic potential to lungs and their utilities for therapeutic studies on metastatic osteosarcoma [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2002, 19(6):477-485.
- [4] Hart I R. The selection and characterization of an invasive variant of the B16 melanoma. [J]. *Am J Pathol*, 1979, 97(3):587-600.
- [5] Lee J, Kim HK, Rho JY, *et al.* The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(44):33554-33565.
- [6] Hansis C. Totipotency, cell differentiation and reprogramming in humans [J]. *Reprod Biomed Online*, 2006, 13(4):551-557.
- [7] Buitrago W, Roop DR. Oct-4: the almighty POUripotent regulator? [J]. *J Invest Dermatol*. 2007, 127(2):260-262.
- [8] Tu S M, Lin S H, Logothetis C J. Stem-cell origin of metastasis and heterogeneity in solid tumours [J]. *Lancet Oncol*, 2002, 3(8):508-513.
- [9] Iki K, Pour PM. Expression of Oct4, a stem cell marker, in the hamster pancreatic cancer model [J]. *Pancreatology*, 2006, 6(4):406-413.

本刊启用远程稿件处理系统

为了提高办公效率,适应网络时代期刊发展的趋势,《中国普通外科杂志》编辑部将于2008年1月1日起正式启用“网络编辑管理系统”。请作者登陆网站 <http://www.zpwz.net> 按照以下步骤进行在线投稿。

投稿步骤

1. 选择“作者投稿”一栏,进入“作者投稿”的界面。

如果是第一次投稿,需要先注册本系统:点“注册”进入注册流程,按照系统提示进行注册,请注意,“*”选项为用户必填项!注册完毕后,即可进入投稿流程。

2. 点“作者投稿”,用刚才注册的用户名登录系统后,选择左边的“我要投稿”一栏,按照投稿向导的提示进行。

(1) 输入稿件中文文题和英文文题。

(2) 输入作者。若所投稿件为多人撰写,在作者信息下添加该文的合作作者,合作作者可以只添加姓名即可。此处需注意,如该文为n位作者撰写,需在填写完n位作者后,再点一下“继续添加作者”后方可点“下一步”,否则最后一个作者本系统将不会显示。

(3) 第三步“学科类型”、“专业类型”、“创作类型”、“投稿栏目”、“文章分类号/PACS码”可以不选。

如果该文有基金支持,请在“基金类型”下的长条框中输入(包括基金号);如果有多个,请用分号分开。输完以后点“下一步”。

(4) 输入关键词,请按照提示进行。请注意各词之间一定要用分号隔开。然后点击“添加”。再点“下一步”。

(5) 输入中英文摘要后再单击“下一步”

(6) 根据系统提示在相应的栏目中输入你要回避或推荐的专家,也可以不写。单击“下一步”,检查稿件的基本信息,如有需要修改的地方,点击“修改”;再确认无误后,单击“下一步”进入稿件上传步骤。

(7) 我们现在只接受 word 稿件。在“稿件上传操作区”点“浏览”,选中要上传的稿件后,点击右边的“上传稿件”。待弹出一个“稿件上传完毕,请继续下一步”的对话框时,点“确定”,再点“下一步”继续投稿。请注意,这一步可能因您的网速和稿件的大小,所需时间略有不同,请耐心等待,如果长时间仍没有弹出“稿件上传完毕,请继续下一步”的对话框,可重新尝试,确保稿件上传,方可进行下一步。

(8) 核对完您所投稿件的信息后,点“下一步”。如果您对编辑部有什么特别的要求或说明,请在“给编辑部留言”框中留下您的意见,点“立即提交”,系统会提示“***同志:非常感谢您对本刊物的支持!您的来稿《***》我们已经收到,请等待编辑部通知。如果您需要查询,请登录编辑部网站 <http://www.zpwz.net> 或咨询编辑部邮箱:pw4327400@126.com”,此时即完成整个投稿流程。

友情提示

网上投稿后,请邮寄1份纸质稿(题名页与正文页均需用A4纸4号字隔行打印)、单位介绍信(注明材料真实可靠,无一稿多投和无科研机密资料泄密)及60元稿件处理费至本编辑部。

为防作者上传稿件不成功,请作者E-mail致本编辑部,信中请注明投稿时间、文题、作者姓名,并将稿件以附件形式发过来。

编辑部地址:湖南省长沙市湘雅路87号中国普通外科杂志编辑部

E-mail: pw4327400@126.com; jcgssych@126.com。联系电话 0731-4327400。