

表皮生长因子受体反义寡聚核苷酸抑制人结肠癌细胞的增殖

曲 娟, 陈 杰

■背景资料

肿瘤细胞的无休止生长与癌细胞能分泌生长因子及其受体所构成的不断刺激自身增殖的自分泌环有关。研究表明, 人结肠癌细胞系存在生长因子自分泌环, 这些癌细胞自泌的生长因子作用于自身的EGFR, 不断的刺激自身增殖, 他可能是结肠癌细胞自主无休止生长的原因之一。用抗EGFR的mAb可以阻断EGFR与配体的结合, 抑制肿瘤生长。

曲娟, 北华大学医学院生理学教研室 吉林省吉林市 132013
陈杰, 北京协和医院病理科 北京市 100074
通讯作者: 曲娟, 132013, 吉林省吉林市华山路3999号, 北华大学医学院生理学教研室. quxian6167@yahoo.com.cn
电话: 0432-4608410
收稿日期: 2006-09-25 接受日期: 2006-10-14

Inhibitory effects of epidermal growth factor receptor antisense oligonucleotide on the proliferation of human colonic cancer cells

Xian Qu, Jie Chen

Xian Qu, Department of Physiology, Medical College of Beihua University, Jilin 132013, Jilin Province, China
Jie Chen, Department of Pathology, Beijing Union Hospital, Beijing 100074, China
Correspondence to: Xian Qu, Department of Physiology, Medical College of Beihua University, 3999 Huashan Road, Jilin 132013, Jilin Province, China. quxian6167@yahoo.com.cn
Received: 2006-09-25 Accepted: 2006-10-14

Abstract

AIM: To construct a stable cell line through transfecting reverse transcription virus carrier with antisense epidermal growth factor receptor (AS-EGFR) into human colonic cancer cell line (LST174) and investigate its biological behavior.

METHODS: Reverse transcription virus carrier with AS-EGFR was transfected into human colonic cancer cell line LST174 by lipid mediating method. The cellular growth and transformation of malignant phenotype were detected by cellular counting, growth curve, MTT assay and rate of clone formation on soft agar.

RESULTS: The cells after stable transfection exfoliated easily with rough cell membrane and scattered piece-like growth. The growth of LST174/AS-EGFR cells was significantly as compared with that of the controls (optical density: 0.322 ± 0.014 vs 0.422 ± 0.033 , $P < 0.05$). MTT assay showed that the inhibitory rate in

LST174/AS-EGFR cells was lowered by 23.7% ($P < 0.05$). In the experiment of colony formation on soft agar, LST174/AS-EGFR cells almost lost their abilities to form colony unlike the piled-up growth in the control cells.

CONCLUSION: AS-EGFR-induced blockage of endogenous EGFR self-secreted factor expression can not only inhibit the proliferation of colonic cancer cells, but also suppress the malignant transformation of phenotypes.

Key Words: Epidermal growth factor receptor; Antisense oligonucleotide; Human colonic cancer cell line; Cell proliferation

Qu X, Chen J. Inhibitory effects of epidermal growth factor receptor antisense oligonucleotide on the proliferation of human colonic cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(35):3414-3416

摘要

目的: 建立稳定表达反义表皮生长因子受体(EGFR)的人结肠癌细胞系, 研究细胞的生物学行为。

方法: 应用脂质体介导法将重组克隆携带反义EGFR的逆转录病毒载体转染人结肠癌细胞系LST174, 利用细胞计数、生长曲线、MTT法及软琼脂集落形成率测定细胞生长、增殖及恶性表型的转化。

结果: 转染稳定后的细胞易脱落, 细胞膜毛糙, 细胞生长呈小片状, 不密集。细胞继续培养后, LST174/AS-EGFR组细胞生长受到抑制, 生长曲线较LST174组速度减慢, 差别显著(A 值: 0.322 ± 0.014 vs 0.422 ± 0.033 , $P < 0.05$); 细胞生长抑制率为23.7%, LST174/AS-EGFR组细胞几乎失去了集落形成能力, 且少、松散, 而对照组呈叠落堆积生长。

结论: 反义EGFR对内源性EGFR自分泌因子表达的阻断可抑制结肠癌细胞的生长、增殖及恶性表型的转化。

关键词: 表皮生长因子受体; 反义寡聚核苷酸; 结肠癌细胞系; 细胞增殖

曲娴, 陈杰. 表皮生长因子受体反义寡聚核苷酸抑制人结肠癌细胞的增殖. 世界华人消化杂志 2006;14(35):3414-3416
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3414.asp>

0 引言

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)具有酪氨酸蛋白激酶活性, 其介导的信号途径在细胞生长与发生中具有重要作用. 过度表达的EGFR不断将表皮生长因子的刺激导入细胞内, 引起细胞持续分裂增殖, 最终导致肿瘤发生^[1-3]. 为此, 针对EGFR的实验性治疗已为肿瘤治疗提供了新途径^[4-5]. 本研究应用脂质体介导法将重组克隆携带反义EGFR cDNA的逆转录病毒载体转染人结肠癌细胞系, 进而建立稳定表达反义EGFR的人结肠癌细胞系, 观察其对细胞生长的影响及恶性表型的逆转, 为基因治疗奠定科学的物质基础.

1 材料和方法

1.1 材料 结肠癌细胞系LST174由中国协和医科大学黄显明教授惠赠; 逆转录病毒载体(pBabe-puro)由英国皇家癌症研究基金N.Lemoine博士惠赠; 反义EGFR逆转录病毒载体(pBabe-AS-EGFR)由北京协和医科大学病理科博士生曾春旬构建; 脂质体介导转染试剂(lipofectin reagent)盒(Gibco公司产品).

1.2 方法 用lipofectin介导, 将pBabe-AS-EGFR质粒、pBabe质粒分别转染细胞LST174后, 嘌呤霉素(1 mg/L)筛选3 wk, 得到稳定的抗药细胞株LST174/AS-EGFR, LST174/pBabe, 在含嘌呤霉素(0.5 mg/L)培养基中继续培养. 常规细胞计数. 细胞生长曲线测定: 于24孔板上每孔植入 1.5×10^4 个对数生长期细胞, 分3组: LST174/AS-EGFR组、LST174/pBabe组与LST174对照组, 每组设3个平行孔, 每天分别计数3个平行孔, 取平均值, 连续计数9 d. MTT法测定细胞增殖及代谢能力^[6]: 细胞以 5×10^3 孔接种于96孔板, 每组样本设8个平行孔, 加入100 μ L培养基37℃, 50 mL/L CO₂条件下培养48 h, 加入(5 g/L) MTT溶液, 再加入细胞裂解液, 避光过夜, 置酶标仪测A₅₅₀值. 根据公式计算细胞增长率或抑制率. 增长率(+)或抑制率(-) = (转化细胞A值-空载体细胞A值)/空载体细胞A值 $\times 100\%$. 软琼脂集落形成率: 60 mm培养皿底层铺6 g/L琼脂的培

养基, 上层铺3 g/L琼脂的培养基, 50 mL/L CO₂, 37℃培养2 wk, 显微镜下计数集落, 直径大于40 μ m为一个集落.

统计学处理 采用SPSS for Windows 13.0软件进行方差分析, LSD-*t*检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

转染稳定后的细胞易脱落, 细胞膜毛糙, 细胞生长呈小片状, 不密集. 反义EGFR表达检测用EGFR cDNA探针做Southern和Northern Blot, LST174/AS-EGFR细胞EGFR mRNA表达减少, DNA含量增高, 说明质粒的成功转染. 细胞继续培养后, LST174/AS-EGFR组细胞生长受到抑制, 细胞生长速度较对照组减慢(表1). MTT值检测结果: LST174/AS-EGFR组、LST174/pBabe组、LST174组A值分别为 0.322 ± 0.014 , 0.437 ± 0.014 , 0.422 ± 0.033 , LST174/AS-EGFR组与LST174组比较($P < 0.05$), 有显著差异, 细胞生长抑制率为23.7%, 而LST174/pBabe和LST174之间差别不显著. 集落形成能力: LST174/AS-EGFR组全培养孔形成3个集落, 集落形态不明显, 几乎失去了集落形成能力; LST174/pBabe组101个集落/10个视野, 集落直径93 μ m-1 mm; LST174组112个集落/10个视野, 集落直径100 μ m-1 mm.

3 讨论

随着分子生物学及免疫学的发展, 促使人们从分子免疫水平对肿瘤的发病机制、生物学行为等方面进行深入研究. 近20 a的研究发现, 信号转导异常与肿瘤的发生、发展有密切关系, 其中酪氨酸激酶途径尤为重要. 生长因子结合特异性受体可将生长信号传入到细胞内. 受体的结构作为跨膜蛋白, 具有细胞外的配体结合区、跨膜区和细胞质的功能区. 大多数生长因子受体的细胞质部分含有完整的蛋白酪氨酸激酶(PTK)功能区, 并含有数个可自身磷酸化的酪氨酸位点, 后者对调节PTK活性具有重要的作用. 在正常情况下, 当配体与相应的受体结合后, 可诱导受体发生构型变化使受体的PTK活性增强, 通过PTK对靶蛋白上酪氨酸残基的磷酸化, 调节这些蛋白的活性, 引发一系列的生化反应而改变细胞的生长状态. 表皮生长因子受体具有酪氨酸蛋白激酶活性, 他在结构和功能上与c-erbB-2癌基因蛋白具有相似性, 因此两者在肿

■应用要点

反义EGFR对内源性EGFR自泌因子表达的阻断可抑制结肠癌细胞的生长、增殖及恶性表型的转化, 为进一步开展动物实验及人结肠癌的基因治疗提供理论依据.

■同行评价

本文应用细胞转染技术及MTT等免疫学方法从细胞学角度观测了EGFR反义寡聚核苷酸对人结肠癌细胞增殖的抑制作用,其研究结果在某种程度上对于进一步探讨在体动物实验研究及结肠癌的基因治疗提供了一定的理论依据.文章立题较新颖,研究方法较先进,研究结论有一定的学术价值.

表 1 反义EGFR对LST174细胞生长的影响(cell/well, mean $\pm$ SD)

Group	3 d	5 d	7 d	8 d	9 d
LST174/AS-EGFR	94 657 $\pm$ 66 123	176 954 $\pm$ 28 546	248 815 $\pm$ 48 720	445 605 $\pm$ 48 168	778 235 $\pm$ 15 389
LST174/pBabe	130 563 $\pm$ 36 621	259 024 $\pm$ 41 745	1 082 701 $\pm$ 351 466	1 869 090 $\pm$ 393 377	3 276 458 $\pm$ 412 063
LST174	95 626 $\pm$ 6833	226 528 $\pm$ 34 307	943 588 $\pm$ 372 671	1 851 156 $\pm$ 654 608	3 316 434 $\pm$ 718 015

瘤的发生和生物学行为等方面可能存在协同作用. 当他与配体EGF和/或TGF α 结合后,即可激活酪氨酸激酶而产生放大生长信号的作用,促进细胞异常增生,进而转化为癌细胞^[1-7]. 研究表明,EGFR在人类许多上皮源性恶性肿瘤组织中表达增强,过度表达的EGFR不断将表皮生长因子的刺激导入细胞内,引起细胞持续分裂增殖,最终导致肿瘤发生^[8]. 反义技术的开展为抑制胃肠道肿瘤的基因治疗提供了新技术^[9],即根据碱基互补的原理,用生物体内或者人工合成的互补DNA或RNA片段来抑制或封闭靶细胞基因的表达,也可能是用于根治肿瘤极具希望的基因治疗手段. 人结肠癌细胞系存在EGFR基因及蛋白水平的过度表达且有自分泌环的存在,用抗EGFR的mAb可以阻断EGFR与其配体的结合^[4-5],对体外培养的结肠癌细胞具有抑制作用. 本实验应用反义EGFR逆转录病毒表达载体转染结肠癌LST174细胞系,转染稳定后的细胞易脱落,细胞膜毛糙,细胞生长呈小片状,不密集. 经反义EGFR转染的LST174细胞,生长速度和MTT值均低于对照组,表明细胞生长慢, DNA合成速率慢;在软琼脂上几乎不呈集落生长,且少、松散,不象对照组呈叠落堆积生长,说明应用反义EGFR逆转录病毒表达载体转染人结肠癌细胞,具有抑制肿瘤生长、增殖及恶性表型的转化. 其机制可能与反义EGFR RNA与细

胞内源性表达的EGFR mRNA结合,阻止EGFR mRNA翻译成蛋白,从而达到有效的抑制作用. 为此,本实验为进行在体动物实验及结肠癌的基因治疗提供了实验依据,具有深入研究的价值.

4 参考文献

- 1 Yang H, Jiang D, Li W, Liang J, Gentry LE, Brattain MG. Defective cleavage of membrane bound TGF α leads to enhanced activation of the EGF receptor in malignant cells. *Oncogene* 2000; 19: 1901-1914
- 2 Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2958-2970
- 3 张晓晶, 张亮, 刘云鹏, 侯科佐, 王舒宝. EGFR信号通路影响Caco-2细胞黏附和侵袭的分子机制. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 483-488
- 4 曲娴, 陈杰, 刘彤华. 表皮生长因子受体单克隆抗体抗人结肠癌LST174的作用. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 841-842
- 5 曲娴, 胡景新. EGFR单克隆抗体抗结肠癌作用的实验研究. *中国病理生理杂志* 2002; 18: 1130-1132
- 6 Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 1989; 119: 203-210
- 7 曲娴, 刘建平, 曲宏, 孙红霞. 大肠癌C-erbB-2和EGFR的表达意义. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 838-839
- 8 呼闯营, 贺彩峰. TGF- α 和EGFR在Barrett食管和食管腺癌的表达. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 879-883
- 9 Wang HM, Rajagopal S, Chakrabarty S. Inhibition of human colon cancer malignant cell behavior and growth by antisense epidermal growth factor receptor expression vector. *Anticancer Res* 1998; 18: 2297-2300

电编 张敏 编辑 张焕兰