

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.09.007

BMP-2联合温热化疗对 SW480 中 GDF15 和 TFF3 表达的影响

毕德利,王亚旭,舒宁波,谢 凯

(重庆医科大学附属第二医院胃肠外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨骨形态发生蛋白-2(Bone morphogenetic protein-2,BMP-2)联合温热化疗对 SW480 中 GDF15 和 TFF3 表达的影响。方法:BMP-2 作用于大肠癌 SW480 细胞系,置于 43 ℃温热化疗 30 min,培养 6 h。(1)流式细胞法检测 SW480 细胞的凋亡;(2)Western blot 法检测 GDF15 和 TFF3 蛋白表达情况;(3)RT-PCR 半定量检测 GDF15 和 TFF3 的 mRNA 表达。结果:BMP-2 联合 43 ℃温热化疗后 SW480 细胞凋亡增加,GDF15 和 TFF3 蛋白表达水平下降,GDF15 和 TFF3 的 mRNA 表达亦下调。结论:BMP-2 联合温热化疗通过抑制大肠癌 SW480 的 GDF15 和 TFF3 蛋白及其相关基因表达,增强抑制 SW480 的增殖及转移复发的作用;温热疗法联合化疗对 GDF15 和 TFF3 表达抑制有协同作用。

【关键词】骨形态发生蛋白-2;温热化疗;GDF15;TFF3

【中国图书分类法分类号】R285

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-12-25

Effect of bone morphogenetic protein-2 combined with hyperthermic chemotherapy on GDF15 and TFF3 expression in SW480

BI Deli,WANG Yaxu,SHU Ningbo,XIE Kai

(Department of Gastrointestinal Surgery,the Second Affiliated Hospital,Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective:To explore the effect of bone morphogenetic protein-2(BMP-2) combined with hyperthermic chemotherapy on GDF15 and TFF3 expression in SW480. Methods:BMP-2 was acted on SW480 colorectal cancer cell lines,placed in 43 ℃ hyperthermic chemotherapy for 30 min and cultured for 6 h. (1)Apoptosis of SW480 cells was detected by flow cytometry assay;(2)GDF15

作者介绍:毕德利(1982-),男,硕士,

研究方向:结直肠癌的治疗。

通信作者:王亚旭,男,副教授,Email:wangyaxu1967@sina.com.cn。

面的细微改变,并无明显的瘢痕组织增生。

4 结 论

综上所述,每周 1 次、连续 4 次的硬膜外腔复合液注射,在 4 周内即可出现硬脊膜及神经根周围的轻度炎症反应及轻度的 II 型胶原纤维增生,8 周内这种变化虽然存在,但脊髓和神经根未发生器质性改变,其中中药组的炎症反应略轻于其他 2 组。因此,如果穿刺部位准确,无穿刺并发症(脊髓神经物理损伤),该治疗方法是安全可行的。

参 考 文 献

- [1] 张坤全,胡亚明,胡伟民.硬膜外用加手法推拿治疗腰椎间盘突出 50 例[J].中国临床康复,2003,7(11):1710.
Zhang K Q,Hu Y M,Hu W M.The treatment of lumbar disc herniation with epidural block and infusion medicine and massage with 50 cases [J].Chinese Journal of Clinical Rehabilitation,2003,7(11):1710.

- [2] Korovessis P G.The role of steroid and their effects on phospholipase A2[J].Spine(Phila Pa 1976),2000,25(15):2004-2005.
[3] 史可任.颈腰痛注射疗法[J].颈腰痛杂志,1997,18(62):128,200.
Shi K R.Injection method in treating the cervicodynia and lumbodynia [J].The Journal of Cervicodynia & Lumbodynia,1997,18(62):128,200.
[4] Buttemann G R.Lumbar disc herniation regression after successful epidural steroid injection[J].Journal of Spinal Disorders&Techniques,2002,15(6):469-476.
[5] Kitsou M C,Kostopanagiotou G,Kalimeris K,et al.Histopathological alterations after single epidural injection of ropivacaine,methylprednisolone acetate,or contrast material in swine[J].Methylprednisolone Acetate or Contrast Material in Swine,2011,34(6):1288-1295.
[6] Ture H,Eti Z,Gogus F Y,et al.Histopathological effects on epidural tissue of bolus or continuous infusions through an epidural catheter in ewes[J].Anaesthesia,2010,65(4):473-477.
[7] Lima R M,Navarro L H,Carness J M,et al.Clinical and histological effects of the intrathecal administration of methylprednisolone in dogs[J].Pain Physician,2010,13(5):493-501.
[8] Abram S E,Marsala M,Yaksh T L.Analgesic and neuroxic effects of intrathecal corticosteroids in rats[J].Anesthesiology,1994,81(5):1198-1205.

(责任编辑:冉明会)

and TFF3 protein expressions were detected by Western blot; (3)GDF15 and TFF3 mRNA expressions were detected by RT-PCR. **Results:** SW480 cells apoptosis was increased, GDF15 and TFF3 protein levels were decreased after BMP-2 combined with 43 °C hyperthermic chemotherapy. GDF15 and TFF3 mRNA expressions were also reduced. **Conclusions:** BMP-2 combined hyperthermic chemotherapy can inhibit proliferation and metastasis of SW480 by inhibiting GDF15 and TFF3 protein and mRNA expressions. Hyperthermia combined with chemotherapy has synergistic effect on the inhibition of GDF15 and TFF3 expression.

【Key words】bone morphogenetic protein-2; hyperthermic chemotherapy; GDF15; TFF3

随着人们生活方式和膳食结构的改变,大肠癌的发病率呈逐年上升趋势。复发转移仍是制约其生存率的最主要原因,有大约 35% 的患者确诊时发现肝脏或盆腔中重要脏器转移^[1]。研究发现 GDF15 和 TFF3 可作为大肠癌诊断和转移预测指标,骨形态发生蛋白-2(Bone morphogenetic protein-2, BMP-2)可抑制多种肿瘤细胞的增殖、分化,促进肿瘤细胞的凋亡,腹腔温热化疗可对腹腔内游离的癌细胞及微小癌转移灶造成有效杀伤,预防肿瘤复发。本研究通过体外应用 BMP-2 联合 43 °C 温热疗法,观察对 GDF15 和 TFF3 及其相关的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂

人结肠癌细胞株 SW480 购自中国科学院上海细胞所,胎牛血清和 RPMI1640 培养液购于 Life Technologies 公司, BMP-2 购于上海天呈科技有限公司(进口分装, sant cruz 美国)。Rabbit anti-TFF3 和 Rabbit anti-GDF15/MIC-1 体均购自美国 Zymed 公司, Goat anti-Rabbit IgG 购自 Boster 公司。PBS 磷酸缓冲液取自重庆医科大学生命科学院, QYY6C 电泳仪和 DYCP-31A 电泳槽均购自北京市六一仪器厂, RNA 提取试剂盒(北京天根科技生化有限公司), RT-PCR 试剂盒(Toyobo 公司日本);引物由上海生工生物工程技术有限公司合成;总 RNA 提取 Trizol 试剂为 Gibco 公司产品。CO₂ 恒温培养箱购自德国 Leica 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理 SW480 采用 PRMI1640 完全培养液于 5% CO₂, 37 °C 培养并传代。将传代处于指数生长期的细胞更换培养液,进行实验分组处理如表 1。

表 1 实验分组情况

Tab.1 Experimental grouping

组别	实验分组处理
A组(对照组)	未作任何处理的大肠癌细胞 SW480
B组(热疗组)	SW480 于 43 °C 恒温中水浴箱 30 min
C组(化疗组)	在 SW480 培养基中加入替加氟(浓度 6 μg/ml)和奥沙利铂(浓度 8 μg/ml)
D组(热化疗组)	SW480 培养基中加入替加氟(浓度 6 μg/ml)和奥沙利铂(浓度 86 μg/ml)置于 43 °C 恒温中水浴箱 30 min

1.2.2 流式细胞法检测 SW480 细胞的凋亡 首先,计算 50 ml 培养瓶中 SW480 细胞的数量,将生长状态良好,贴壁率达 80% 左右的 SW480 细胞,经 0.125% 的胰蛋白酶消化并收集细胞,制成 3 ml 的细胞悬液。显微镜下仔细查数,1 个 50 ml 培养瓶中所含细胞数量级为 10⁶ 个,达到流式细胞仪测量细胞凋亡时对细胞数量的要求。最后,将以上 4 组分别做相应处理后使用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.3 Western blot 检测 GDF15 和 TFF3 蛋白表达 分别提取 4 组 SW480 细胞总蛋白并定量,与上样缓冲液按比例混匀,煮沸后, SDS-聚丙烯酰胺电泳、转膜,用 5% 脱脂奶粉的 TBS 缓冲液封闭 1 h,加入 I 抗, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次,每 10 min 换液 1 次。加入 II 抗, 37 °C 孵育 45 min, TBST 洗涤 3 次,每 15 min 换液 1 次,在暗室中压片,然后显影、定影。

1.2.4 RT-PCR 检测 GDF15 和 TFF3 基因表达 Trizol 法分别提取以上 4 组细胞的总 mRNA, 琼脂糖凝胶电泳初步评价 RNA 质量,分光光度仪测定总 RNA 纯度。按照 TaKaRa 两步法试剂盒说明书进行 RT-PCR 操作,根据 RNA 纯度将每组的 RNA 调至每个反应体系中含 1 μg。引物设计序列见表 2。对 RT-PCR 产物采用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳观测,数字成像系统进行拍照分析。

表 2 引物设计序列

Tab.2 Primer sequences

基因	引物序列	序号 (bp)
TFF3	5'-TGGAGTGCCTTGCTGTTTC-3'	226
	5'-GCATGGGACCTTTATTCGT-3'	
GDF15	5'-GCGGAAACGCTACGAGGAC-3'	227
	5'-TGCAAGGCTGAGCTGACG-3'	

1.3 统计学处理

实验重复 3 次,应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,结果采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,4 组间两两比较采用 SNK 检验分析,4 组同时比较用方差分析法处理数据。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。详见表 3。

2 结果

2.1 流式细胞法检测结果(图 1)

用流式细胞仪检测,细胞凋亡率显示:A 组细胞凋亡率为 $(4.23 \pm 0.56)\%$; B 组为 $(4.35 \pm 0.04)\%$; C 组为 $(33.15 \pm 2.56)\%$; D 组为 $(45.51 \pm 3.23)\%$ 。BMP-2 化疗可促进 SW480 细胞的凋亡, C、D 组与 A、B 组相比,差异有统计学意义 ($P =$

表 3 各组实验灰度值

Tab.3 Gray value of experiment in each group

分组	Western blot 检测		RT-PCR检测	
	GDF15	TFF3	GDF15	TFF3
A组	0.704 2 ± 0.013 0	0.427 5 ± 0.015 0	0.793 4 ± 0.013 0	0.655 0 ± 0.015 0
B组	0.703 6 ± 0.017 0	0.426 3 ± 0.008 0	0.791 2 ± 0.009 0	0.653 8 ± 0.012 0
C组	0.496 3 ± 0.011 0*	0.227 2 ± 0.011 0*	0.664 2 ± 0.011 0*	0.402 2 ± 0.009 0**
D组	0.283 9 ± 0.008 0**	0.426 0 ± 0.012 0**	0.351 9 ± 0.015 0**	0.365 1 ± 0.009 0**

注:*,与 A、B 组相比, $P < 0.05$; #,与 C 组相比, $P < 0.05$

0.000), A 组与 B 组比较差异无统计学意义 ($P = 0.248$)。BMP-2 联合温热疗法更能促进细胞的凋亡,与单独使用时相比较差异有统计学意义 ($P = 0.000$),即 D 组与 C 组相比。

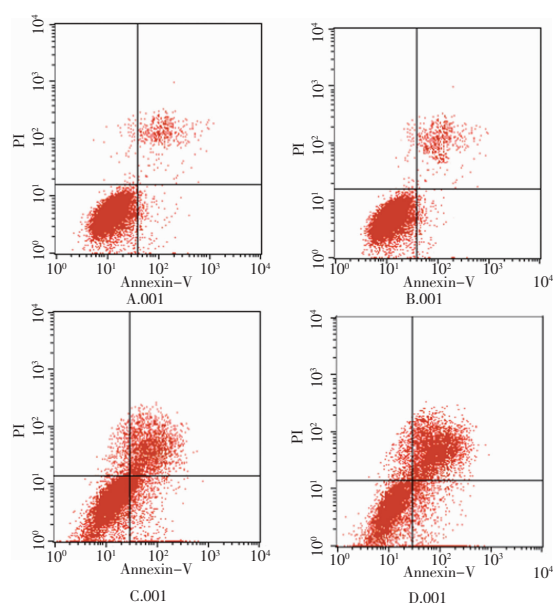


图 1 不同处理组的 SW480 细胞 24 h 凋亡率

Fig.1 Apoptosis rate of SW480 cells within 24 h in different groups

2.2 Western blot 检测结果

由图 2 可以看出, C 组、D 组 GDF15 和 TFF3 蛋白表达明显较 A 组、B 组减低 (均为 $P = 0.000$), A 组和 B 组无明显差异,因此可以看出常规化疗药可以抑制 TFF3 及 GDF15 蛋白的表达,单纯热疗对 2 种蛋白表达无影响; D 组较 C 组表达稍低, P 值均为 0.000,可以得出, BMP-2 联合热化疗可提高化疗药物对 GDF15 和 TFF3 蛋白表达的抑制作用,两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

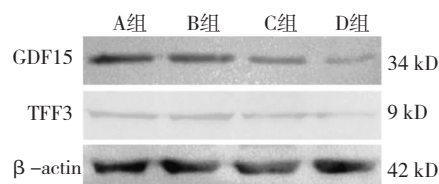


图 2 Western blot 法分析 GDF15 和 TFF3 蛋白表达情况

Fig.2 GDF15 and TFF3 protein expression level and β -actin protein expression level determined by Western blot

2.3 RT-PCR 试验结果

RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳,灰度分析显示 2 种 mRNA 转录水平的表达; C、D 组 GDF15 mRNA 表达较 A、B 组明显下降, D 组较 C 组表达稍低, A 组与 B 组无明显变化; TFF3 基因表达 GDF15 类似, C、D 组 TFF3 基因表达较 A、B 组明显下降, D 组较 C 组表达低, P 值均为 0.000, A 组与 B 组无明显变化,灰度分析差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3、4。

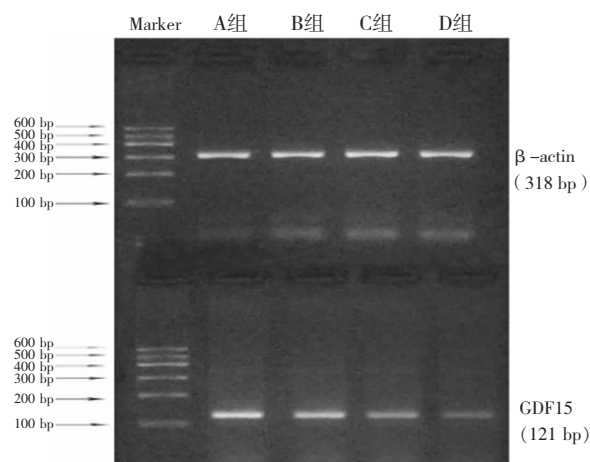


图 3 GDF15 mRNA 的表达情况

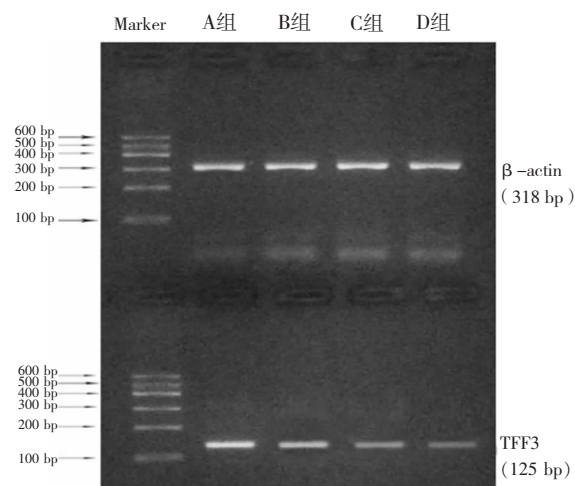
Fig.3 GDF15 mRNA and β -actin mRNA expression level

图 4 TFF3 mRNA 的表达情况

Fig.4 TFF3 mRNA and β -actin mRNA expression level

3 讨 论

研究大肠癌复发和转移机制,以探寻有效防治药物一直是困扰肿瘤医学界的难题。来茂德博士研究小组^[2]发现 GDF15 和 TFF3 2 种蛋白可作为预测大肠癌转移有潜力的生物标记,从而对大肠癌进行早期有效干预和治疗。GDF15 的前体肽和成熟肽均可被分泌至细胞外,但研究证实仅后者能够进入循环系统^[3]。Lee 等^[4]还发现,将 GDF15 稳定转染至人胃癌细胞 SNU-216 中后,SNU-216 细胞的侵袭性显著增加。从以上研究可以看出 GDF15 作为大肠癌转移因子可能性极大。TFF3 具有诱导上皮细胞迁移、促进细胞增殖、抑制细胞凋亡和促血管形成等作用^[5,6],这些过程也是肿瘤发生和发展过程中的关键步骤,所以其表达失调可能会导致细胞恶性转化和肿瘤进展。Taupin 等^[7]认为抗凋亡可能是 TFF3 引起结直肠癌化疗抵抗的一个重要机制。国际大肠癌研究组织经过长时间研究统计证实结肠癌患者的癌细胞中 TFF3 染色程度相比直肠癌高出很多^[8],这表明 TFF3 上调幅度与肿瘤在大肠中部位密切相关;结直肠癌 TMN 的Ⅲ期和Ⅳ期患者中 GDF15 表达强度较Ⅰ期和Ⅱ期患者明显增强,表明 GDF15 上调幅度与 TMN 分期有深切关系。

近年来临床常规化疗药的更新换代并没有明显改善术后大肠癌患者的预后,大肠癌术后常见腹腔内复发及肝转移,虽然常规化疗对降低肝转移有一定作用,但对腹腔内播散和复发作用不显著。因此,研发有效针对性化疗药是医学界的重大难题。Beck 等^[9]发现人大肠癌中 BMP-2 高表达,并通过 Smad 4 独立信号通路对细胞增殖起抑制作用。Taniguchi 等^[10]利用兔的腹膜癌肿模型对腹腔温热化疗进行研究时发现,温热化疗组中肿瘤细胞凋亡更多见。术后腹腔内温热化疗可减少腹腔复发及阻止腹腔内病灶的进展。并且术后腹腔内温热化疗可提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,肿瘤细胞受热后其异质性增高,有利于免疫治疗^[11]。

本研究中,BMP-2 单独应用和与热化疗联合作用均能对 SW480 的凋亡产生影响,联合使用较单独使用更能促进细胞的凋亡,且差别具有统计学意义 ($P < 0.05$),说明 BMP-2 与热化疗具有协同抗肿瘤作用,且能够增加热化疗的敏感性从而达到更好的抗肿瘤效果。BMP-2 与化疗药物联合运用时可以降低单纯化疗药物的浓度,为减轻化疗药物的毒副反应

提供了依据。此抗肿瘤机制在本研究中主要是通过明显抑制 TFF3 和 GDF15 2 种转移蛋白及其相关基因的表达,从而有效地阻断大肠癌细胞的增殖及转移,提高大肠癌患者的生存率及减少术后复发率。提示 BMP-2 和温热化疗可作为大肠癌根治术后潜在治疗策略。

参 考 文 献

- [1] Cho J H, Lim D R, Hur H, et al. Oncologic outcomes of a laparoscopic right hemicolectomy for colon cancer; results of a 3-year follow-up [J]. J Korean Soc Coloproctol, 2012, 28(1): 42-48.
- [2] Xue H, Lv B J, Zhang J, et al. Identification of serum biomarkers for colorectal cancer metastasis using a differential secretome approach [J]. J Proteome Res, 2010, 9(1): 545-555.
- [3] Selander K S, Brown D A, Sequeiros G B, et al. Serum macrophage inhibitory cytokine-1 concentrations correlate with the presence of prostate cancer bone metastases [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007, 16(3): 532-537.
- [4] Lee D H, Yang Y, Lee S J, et al. Macrophage inhibitory cytokine-1 induces the invasiveness of gastric cancer cells by up-regulating the urokinase-type plasminogen activator system [J]. Cancer Res, 2003, 63(15): 4648-4655.
- [5] Meyerzum Buschenfelde D, Tauber R, Huber O. TFF3-peptide increases transepithelial resistance in epithelial cells by modulating claudin-1 and -2 expression [J]. Peptides, 2006, 27(12): 3383-3390.
- [6] Durer U, Hartig R, Bang S, et al. TFF3 and EGF induce different migration patterns of intestinal epithelial cells in vitro and trigger increased internalization of E-cadherin [J]. Cell Physiol Biochem, 2007, 20(5): 329-346.
- [7] Taupin D R, Kinoshita K, Podolsky D K. Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(2): 799-804.
- [8] Benizri E I, Bernard J L, Rahili A, et al. Small bowel involvement is a prognostic factor in colorectal carcinomatosis treated with complete cytoreductive surgery plus hyperthermic intraperitoneal chemotherapy [J]. World J Surg Oncol, 2012, 10(1): 56.
- [9] Beck S E, Jung B H, Del Rosario E, et al. BMP-induced growth suppression in colon cancer cells is mediated by p21WAF1 stabilization and modulated by RAS/ERK [J]. Cell signal, 2007, 19(7): 1465-1472.
- [10] Taniguchi M, Ochiai M, Sakurai Y, et al. Experimental study of intraperitoneal hyperthermic chemotherapy [J]. Gan to Kagaku Ryoho, 1998, 25(7): 1083-1086.
- [11] Al-Shammaa H A, Li Y, Yonemura Y. Current status and future strategies of cytoreductive surgery plus intraperitoneal hyperthermic chemotherapy for peritoneal carcinomatosis [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(8): 1159-1166.

(责任编辑:冉明会)