

· 基础研究 ·

腺病毒介导的 P120ctn 基因对 SMMC-7721 细胞侵袭能力的影响*

张毅¹, 邓和军¹, 刘预², 曾严¹, 李伟道¹

(重庆市肿瘤研究所: 1. 肝胆外科; 2. 中心实验室 400030)

摘要:目的 以腺病毒介导连环蛋白 P120(P120ctn)基因, 转染人肝癌 SMMC-7721 细胞, 观察其对 SMMC-7721 细胞侵袭能力的影响。方法 用腺病毒介导的 P120ctn 基因转染 SMMC-7721 细胞, 用逆转录-PCR(RT-PCR)和 Western Blot 检测细胞中 P120ctn 表达水平, 并测定转染后细胞侵袭能力的变化。结果 腺病毒介导的 P120ctn 转染 SMMC-7721 后, P120ctn 的表达水平显著上升; 体外侵袭实验显示转染后 SMMC-7721 的侵袭能力明显下降。结论 腺病毒介导的 P120ctn 基因能够在 SMMC-7721 细胞中有效表达, 并显著抑制肝癌细胞的侵袭能力。

关键词:癌, 肝细胞; P120ctn 基因; 腺病毒载体; 肝细胞癌; 侵袭

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.03.025

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)03-0275-02

Effect of adenovirus-mediated P120ctn gene on invasiveness of human hepatoma cell line SMMC-7721*

Zhang Yi¹, Deng Hejun¹, Liu Yu², Zeng Yan¹, Li Weidao¹

(1. Department of Hepatobiliary Surgery; 2. Central Laboratory, Chongqing Cancer Hospital, Chongqing 400030, China)

Abstract: **Objective** To study the influence of P120ctn gene on invasiveness of human hepatoma cell line SMMC-7721. **Methods** Recombinant adenoviruses containing human wild-type P120ctn cDNA (AdP120ctn) was infected into SMMC-7721 lines. The mRNA and protein expressions of P120ctn were detected with RT-PCR and Western Blot, respectively. And Boyden Chamber were undertaken to assay the change of invasion of transfected cell lines in vitro. **Results** Gene and protein expressions of P120ctn were up-regulated when SMMC-7721 was transfected with AdP120ctn. In vitro invasion of SMMC-7721 cells was significantly inhibited after infected with AdP120ctn. **Conclusion** P120ctn gene mediated by adenovirus can express efficiently in SMMC-7721 cells and decrease the invasiveness of the cells significantly.

Key words: carcinoma, hepatocellular; P120ctn gene; adenovirus vector; invasiveness

连环蛋白 P120(P120ctn)是上皮钙黏附素(E-cadherin)复合体的一员, 其最重要的功能是维持 E-cadherin 的数量^[1]。P120ctn 的缺失将导致 E-cadherin 的迅速降解, 可能通过减少细胞间黏附促进肿瘤转移^[2-3]。作者既往的研究证实, P120ctn 表达缺失与肝细胞癌(HCC)的侵袭和转移密切相关^[4]。本实验通过已构建好的包含 P120ctn 基因的腺病毒载体转染具有高度侵袭、转移能力的肝癌细胞株 SMMC-7721, 探讨其对 SMMC-7721 侵袭能力的影响。

1 材料与与方法

1.1 主要材料和试剂 人肝癌细胞株 SMMC-7721 购自上海麦莎生物科技有限公司, 二甲基亚砷、DMEM 培养基、胎牛血清购自 Hyclone 公司, 蛋白提取、逆转录试剂盒购自 Takara 公司, 侵袭小室购自 Millipore 公司, Matrigel BD 购自公司, 鼠抗人 P120ctn 单克隆抗体、羊抗鼠多克隆抗体购自 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将生长旺盛的 SMMC-7721 细胞经胰蛋白酶消化后加入含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液, 吹打细胞使之脱离瓶壁, 离心弃上清液, 调整细胞浓度至 1×10^6 cells/mL 接种在 60 mm 平皿中, 孵育 24 h 后进行实验。

1.2.2 P120ctn 基因通过腺病毒导入 SMMC-7721 细胞 细胞转染时分组: (1) AdP120ctn 组: AdP120ctn 转染 SMMC-7721 细胞; (2) 对照病毒组: 未携带外来基因的腺病毒载体转染 SMMC-7721 细胞; (3) 空白对照组: 未经转染的细胞。

SMMC-7721 细胞以 5×10^5 个/孔接种在 6 孔板中培养过夜, 至细胞密度生长至 60%; 需转染 AdP120ctn 者加入浓缩病毒液每孔 10 mL, 继续温育, 4 h 后荧光显微镜观察感染效率;

更换无血清培养基, 48 h 后收集总蛋白、上清液和提取 RNA, 用 BCA 法测定蛋白和上清液浓度。

1.2.3 逆转录-PCR(RT-PCR) RNA 提取步骤按照 Takara 试剂盒说明书进行。使用 Primer 5 软件设计 P120ctn 及内参 β -actin 引物(上海生工生物有限公司合成)。P120ctn 引物, 上游: 5'-AAA CTT CGG GAA TGT GAC GG-3', 下游: 5'-TCT TGG CTC CAA AGC AAC TG-3', 扩增产物长度 228 bp。 β -actin 引物, 上游: 5'-GTG GGC CGC TCT AGG CAC CA-3', 下游: 5'-CGG TTG GCC TTA GGG TTC AGG GGG G-3', 扩增引物长度 238 bp。PCR 扩增条件: 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 10 min, 共 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min 后取 10 μ L 电泳。

1.2.4 Western Blot 配制 8% 分离胶, 按每孔 50 μ L 上样, 电泳分离后转移至 PVDF 膜上, 封闭 2 h 后, TTBS 水洗 5 min, 一抗孵育 4 °C 过夜, 再与 1:200 稀释的 HRP 标记的二抗 37 °C 孵育 2 h, TTBS 洗涤 3 次。将显色试剂均匀涂于膜上约 1~2 min, 即可见到显色, 用数码相机照相后于凝胶扫描系统扫描。以 β -actin 为内参, 目的蛋白量 = 目的蛋白条带光密度/ β -actin 条带光密度, 重复实验 3 次。

1.2.5 侵袭小室实验 采用 Millipore 公司 8 μ m 孔径的侵袭小室进行实验。按说明书以无血清 DMEM 培养液稀释 Matrigel 胶, 并铺到 Transwell 上室, 37 °C 孵育 5 h 制作基底膜。上室加入各组细胞 500 μ L (密度约 10^6 cells/mL), 下室加入含 5 g/mL 纤维粘连蛋白的 DMEM 培养基, 37 °C 孵育 24 h, 移出 Transwell, 甲醇固定, HE 染色, 用棉签刮去上室上面未侵袭的细胞。高倍镜($\times 200$)下任取 10 个不重复的视野计数侵袭细

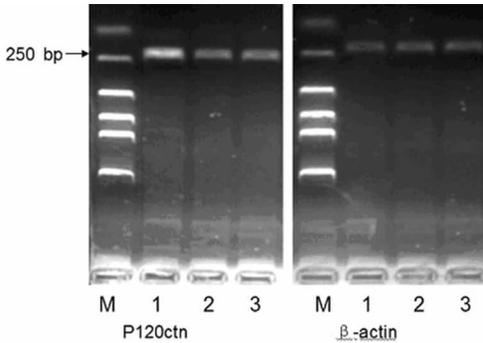
* 基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(2009JJ1298)。

细胞的数目。实验共进行 3 次,计算平均数。细胞数越多,表示细胞侵袭能力越强。

1.3 统计学处理 应用 SPSS17.0 软件进行配对样本的 t 检验和 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

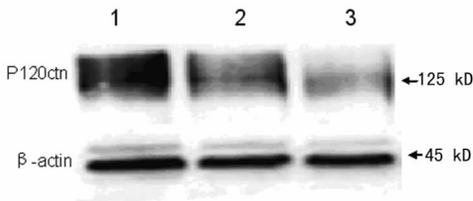
2.1 目的基因 P120ctn 在 SMMC-7721 中的表达 RT-PCR 结果显示各组均扩增到了约 228 bp 的片段。经光密度测定,与空白对照组 (1.05 ± 0.12) 和对照病毒组 (1.12 ± 0.11) 相比, AdP120ctn 组 (1.83 ± 0.33) mRNA 表达水平明显增高 ($P < 0.05$),见图 1。



M:DNA Marker;1:AdP120ctn 组;2:对照病毒组;3:空白对照组。

图 1 RT-PCR 检测 P120ctn 在 SMMC-7721 细胞中的表达

Western Blot 结果显示,AdP120ctn 组目的蛋白表达量显著上升,相对值为 2.87 ± 0.52 ,与空白对照组 (1.35 ± 0.22) 和对照病毒组 (1.14 ± 0.16) 比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Western Blot 和 RT-PCR 结果一致,证实 P120ctn 已成功导入靶细胞,见图 2。



1:AdP120ctn 组;2:对照病毒组;3:空白对照组。

图 2 Western Blot 检测 P120ctn 在 SMMC-7721 细胞中的表达

2.2 侵袭小室实验结果 AdP120ctn 组穿膜细胞数为 (6.23 ± 1.1),空白对照组及对照病毒组分别为 (15.28 ± 2.9)、(14.91 ± 2.6)。AdP120ctn 组与空白对照组、对照病毒组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见封 3 图 3。

3 讨论

连环蛋白(Catenin)属胞内糖蛋白家族,开始被分为 α 、 β 、 γ 三类,最近又发现 P120ctn^[5]。它们共同与钙黏附素(cadherin)的胞内肽段及细胞骨架结合,形成一个完整的复合体,介导细胞黏附和信号转导功能^[6-7]。其中 E-cadherin 复合体介导的细胞间黏附在肿瘤转移的过程中扮演了十分重要的角色,其表达缺失与许多肿瘤细胞的失分化和转移密切相关^[8-9]。

正常情况下,P120ctn 主要分布在胞膜,与 E-cadherin 结合并维持其黏附功能^[10]。但在乳腺癌、恶性黑色素瘤等多种肿瘤中,均有不同程度的 P120ctn 细胞膜表达减少或缺失,提示 P120ctn 在肿瘤的发生和转移中可能扮演着重要的角色^[11-12]。

肝癌细胞株 SMMC-7721 恶性程度很高,侵袭、转移能力强,其 E-cadherin 复合体表达水平很低^[13]。作者利用腺病毒

载体作为高效的基因转移工具,以携带目的基因 P120ctn 的腺病毒成功转染 SMMC-7721 细胞,感染效率近 100%,并通过 RT-PCR、Western Blot 检测证实了外源性 P120ctn 基因的表达。通过侵袭小室实验,作者发现 P120ctn 基因表达上调可以明显减弱 SMMC-7721 细胞的运动和侵袭能力。而这种能力是癌细胞脱离原发病灶,侵袭周边正常组织,穿入、穿出血管所必不可少的^[14]。所以,P120ctn 基因有可能作为一个新的治疗靶点。

参考文献:

- [1] Davis MA, Ireton RC, and Reynolds AB. A core function for P120-catenin in cadherin turnover[J]. Cell Bio, 2003, 163(3):525-534.
- [2] Michael RD, Meredith VB, Reynolds AB. An essential role for p120-catenin in Src- and Rac1-mediated anchorage-independent cell growth[J]. Cell Biol, 2009, 184 (2): 437-450.
- [3] Kristin S, Arnaud B, Christophe S, et al. E-cadherin regulates human nanos1, which interacts with P120ctn and induces tumor cell migration and invasion[J]. Cancer Res, 2006, 66(10):1007-1015.
- [4] 张毅,朱谨,杨占宇. P120ctn 表达在 HCC 中的临床意义[J]. 消化外科, 2006, 5(6):431-434.
- [5] Yueh MH, Yih FC, Cheng YC, et al. KCl cotransporter-3 down-regulates E-cadherin/ β -catenin complex to promote epithelial-mesenchymal transition[J]. Cancer Res, 2007, 67(11):1495-1497.
- [6] Yasuto J, Naohiko I. Connexin43, E-cadherin, β -catenin and ZO-1 expression, and aberrant methylation of the connexin43 gene in NSCLC[J]. Anticancer Res, 2010, 30 (6):2271-2278.
- [7] Amrita D, Sadie C, Slater, et al. MMP-9 and -12 cause N-cadherin shedding and thereby β -catenin signalling and vascular smooth muscle cell proliferation[J]. George Cardiovasc Res, 2009, 81(1):178-186.
- [8] Loredana M, Stefania C, Gianluca B, et al. Evidences that leptin up-regulates E-cadherin expression in breast cancer: effects on tumor growth and progression[J]. Cancer Res, 2007, 67(24):3412-3421.
- [9] 江海,李斌,李炳,等. E-钙黏素在 68 例食管鳞状细胞癌中的表达及意义[J]. 重庆医学, 2010, 39(3):346-347.
- [10] Beate F, Krakstad, Vandana V, et al. A role for G12/G13 in p120ctn regulation[J]. PNAS, 2004, 101 (7): 1014-1019.
- [11] Paredes J, Correia AL, Ribeiro AS, et al. Breast carcinomas that co-express E- and P-cadherin are associated with p120-catenin cytoplasmic localisation and poor patient survival[J]. Clin Pathol, 2008, 61(7):856-862.
- [12] Isabel MO, Ruben A, Bartolome P, et al. Overexpression of E-cadherin on melanoma cells inhibits chemokine-promoted invasion involving p190RhoGAP/p120ctn-dependent inactivation of RhoA[J]. Biol Chem, 2009, 284(4): 568-571.
- [13] Wen Y, He XY, Lei C, et al. Wnt/ β -Catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells[J]. Cancer Res, 2008, 68(下转第 278 页)

量差,医生判断不准确,延误了病情,这会对医院的形象造成极大的负面影响,会降低医院在患者中的信誉度,因此,医疗质量与医院的发展息息相关。作者对医院近段时间的医疗纠纷进行了统计,结果显示,绝大部分纠纷发生在常规手术、常见病中,往往大家认为容易出现纠纷的危重复杂病,还很少发生患者投诉。分析其原因,还是重视的程度问题,越小的手术、越常见的病情,医生越不重视,处置较随意,而越复杂、越危重的病情,随着医生的关注力度加大,处置谨慎,往往效果令患者满意。著名的临床医学专家张孝骞教授曾经说过:“临床工作如履薄冰,如临深渊,要小心翼翼地诊断,避免误诊和差错。”临床医务工作者应借鉴张教授的话,病无大小,一视同仁,有效的强化医疗质量管理,构建和谐医患关系^[2]。

3.2 注重医患沟通 患者认为影响医患关系的因素其次是医生和患者的沟通。作者认为良好的医患沟通有助于降低医患纠纷,首先,良好的医患沟通能提高诊断的准确率,降低发生错误的可能,从而相应地降低因误诊引起的投诉。其次,良好的医患沟通能让患者及其家属对治疗效果有比较现实的预期,这样,当最后的治疗结果不太理想时,患者或其家属也较能够接受,而不会简单地怪罪于医生^[3]。

中科院院士韩启德教授,在一次作报告时呼吁:医生应当回归“人的医学”,照顾人的心理。他恳切地说:“我非常认同一位美国医生的名言:有时去治疗,常常去帮助,总是去安慰。”他讲了这样一个故事,已故著名医学家裘法祖教授,曾遇到一位腹部不适的患者前来就诊,裘老轻柔地为其做了腹部触诊。患者感动得当场落泪。为什么呢?因为患者之前在六七家医院看过病,却没有一位医生摸过他的腹部,每次都一样——问诊完,就开药或是做检查。

作者认为,人的医学,即是建立良好、和谐的医患沟通关系^[4]。医生和护士在和患者接触的过程中,一个温暖的微笑都会有效减轻患者的痛苦,一句鼓励的话语都会促进患者康复的愿望。而一个冷淡的眼神、一句冷嘲热讽的话语,无疑会让患者陷入对病情的不安和对医生的误解中。医务人员的态度时刻影响着患者,以患者为中心,尊重和鼓励患者,让患者在就医的过程中随时随地都可以感受到医生护士的理解和关怀,这也是医患沟通的关键所在^[5]。在医患沟通中,由于患者受教育的程度、对医学知识的了解程度不同,有些患者无法正确表达自己的病情感受,这时候就需要医生仔细、认真的启发式提问,让患者畅所欲言,完整叙述病情过程。另外,在医生向患者及其家属介绍病情和治疗方案时,医生应避免使用书面语言、高深的医学词汇,而应尽量使用口头语言,深入浅出地告诉患者得病的原因,治疗的目的、过程和风险,在良好的沟通下,患者才能有效地配合医生治疗。通过良好的沟通,患者也会对医生增加信任感,提高依从性,即使有不可预计的风险,患者及家属也会表示理解^[6]。

3.3 医生应恪守医德医风规范 由于医疗行业存在着严重的信息不对称,医生在治病的过程中可以对患者的消费进行诱导^[7]。医生为了回扣会诱导患者做一些不必要的检查和开一些不必要的药品,韩启德教授在报告中也提到了医疗高新技术,他指出,高新技术带来了医疗高消费。20年前,胃癌诊断

只需 440 元,而现在基础诊断需要 2 830 元,如果运用最高端的诊断技术,所需费用则上升到 8 000~10 000 元;胃癌化疗从 20 年前每人平均 100 元,提高到现在的 15 050 元。虽然诊断精度提高了,化疗的不良反应减轻了,但调查显示,胃癌 5 年生存率并没有显著提高。为了有效规范医护人员的行为,医院应加强医德医风建设。要制定和完善各级、各类人员的工作职责、工作标准以及违反纪律的处罚规定等,做到有章可循,有法可依^[8]。医院相关部门要定期地对门诊或住院患者进行医疗服务满意度调查,调查结果要及时反馈至院领导、相关科室和全体医务人员。要重视对患者来信、来访反映问题的查处,发现一起,查处一起,决不姑息。另外,在对医生的调查问卷中,医生也反映就诊患者量大、工作强度高导致无法细致地与患者进行沟通。患者应该多体谅医生的工作强度与难度,多与医生主动沟通^[9]。医院的管理者也应合理安排医生的就诊时间,缓解医生的工作压力,同时对医护人员多进行沟通训练及情商培训,这些都能有效地促进和谐医患关系^[10]。另外,信息化技术的应用,如通过医疗消费积分系统的客户管理平台的建立和运行,可以为医院管理层提供较以往更加及时、准确的数据统计分析,为患者提供高水平医疗服务的同时,可以有效培养患者的忠诚度,让患者获得更大的满意度,促进医患和谐关系,最大限度地提高医院的经济效益和社会效益^[11]。

参考文献:

- [1] 王明旭. 医患关系学[M]. 北京: 科学技术出版社, 2008: 1-2.
- [2] 郭利侠, 和颖, 高建民. 医务人员关于医患沟通认知及需求的调查分析[J]. 中国医学伦理学, 2010, 23(1): 48-50.
- [3] 唐宏, 刘薇. 和谐医患关系的影响因素及对策研究[J]. 重庆医学, 2009, 38(24): 3177-3178.
- [4] 刘慧, 徐步敏. 加强医患沟通提高服务质量[J]. 解放军医院管理杂志, 2008, 15(2): 125-127.
- [5] 郑大喜. 医患诚信缺失的原因及其重构策略[J]. 现代医院管理, 2007, 5(1): 16-20.
- [6] 张银峰, 白宏治, 陈飞. 构建和谐医患关系 预防医疗纠纷[J]. 中国医药导报, 2010, 7(2): 128-129.
- [7] 张英. 对医患关系的再认识[J]. 中国当代医药, 2010, 17(2): 131-132.
- [8] 张平. 思想政治工作在构建和谐医患关系中的 5 种作用[J]. 江苏卫生事业管理, 2008, 19(1): 109-111.
- [9] 袁欣, 张雪梅, 蒋德川. 医院患者满意度调查的现状与思考[J]. 医学与社会, 2010, 23(1): 50-52.
- [10] 闫广庆, 任家顺, 陈洪, 等. 医务人员人文素养在医患沟通中的应用探讨[J]. 重庆医学, 2010, 39(14): 1927-1928.
- [11] 陈燕凌, 赵存现. 基于城市一卡通的医疗消费积分系统应用与探讨[J]. 中国卫生质量管理, 2010, 17(1): 51-52.

(收稿日期: 2011-01-09 修回日期: 2011-05-22)

(上接第 276 页)

(6): 852-855.

[14] Yan NL, Ying L, Han JL, et al. Activated androgen receptor downregulates E-cadherin gene expression and pro-

notes tumor metastasis[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(12): 1704-1706.

(收稿日期: 2011-08-04 修回日期: 2011-10-26)