

TGIF对胃癌细胞生长和转移的影响

胡忠良 文继舫* 肖德胜 郑 晖 傅春燕

(中南大学基础医学院病理学教研室, 长沙 410078)

摘要 TGIF (TG-interacting factor) 是 TGF- β 信号传导通路的抑制分子, 而 TGF- β 早期抑制肿瘤生长, 晚期促进肿瘤浸润与转移, 但 TGIF 在肿瘤发生中的作用尚不清楚. 将 TGIF 基因稳定转染胃癌细胞株 SGC-7901, 采用 MTT 法、平板克隆形成试验、流式细胞术和裸鼠成瘤试验探讨 TGIF 对胃癌细胞生物学行为的影响, 通过免疫组织化学分析裸鼠瘤组织基质金属蛋白酶 (matrix metallo proteinases, MMP) MMP2、MMP9 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达, 通过 ELISA 和明胶酶谱试验分别分析 TGIF 转染细胞上清液中 VEGF 和活性 MMP2 与 MMP9 的含量变化. TGIF 对 SGC-7901 细胞的生长、细胞周期分布和克隆形成率无影响. TGIF 转染细胞接种裸鼠后无瘤栓形成, 但对照组有瘤栓形成, 且其瘤组织 MMP9 和 VEGF 的表达明显低于对照组, 但 MMP2 在 3 组间的表达无差别. TGIF 基因转染细胞、PcDNA3.1 转染细胞和 SGC-7901 细胞上清液中 VEGF 的浓度分别为 (635 ± 20.3) ng/L、 (780 ± 25.4) ng/L 和 (791 ± 23.9) ng/L, TGIF 转染细胞 VEGF 的含量明显低于对照组细胞 ($P < 0.01$), TGIF 转染细胞上清液中活性 MMP9 的含量明显低于对照组. 尽管 TGIF 能部分拮抗 TGF- β 1 介导的生长抑制和细胞周期阻滞作用, 但它并不能使胃癌细胞的生物学行为恶化, 相反 TGIF 通过下调 VEGF 和 MMP9 的表达降低胃癌细胞的浸润与转移能力.

关键词 胃癌, TGIF, 转化生长因子 β

学科分类号 R73.3

TGIF (TG interacting factor) 能通过多种机制抑制 TGF- β 信号传导通路^[1-5], 而 TGF- β 是一种多功能性细胞因子, 一方面能抑制上皮细胞的生长, 诱导细胞凋亡, 另一方面能促进血管发生和基质的形成, 从而促进肿瘤的浸润与转移^[6], 但 TGIF 在肿瘤发生中的作用尚不清楚, 为探讨 TGIF 在肿瘤发生中的作用, 我们利用 TGIF 转染胃癌细胞 SGC-7901, 观察它对胃癌细胞生物学行为的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

PcDNA3.1-TGIF 由美国国立卫生研究院遗传药理研究所 Mouradian 教授惠赠; SGC-7901 细胞由中国科学院生物化学与细胞生物学研究所提供.

1.2 主要试剂

TGF- β 1 购自 Sigma 公司; 脂质体 Lipofectin 和 RPMI 1640 培养基购自 Life Technologies 公司; 超级小牛血清购自杭州四季青公司; 硝酸纤维素膜购自基因公司; TGIF 抗体购自 Santa Cruz 公司; VEGF ELISA 试剂盒和蛋白质分子质量标准系晶美公司产品; BCA Protein Assay 试剂盒由 Pierce 公司提供; 质粒抽提纯化试剂盒购自 Qiagen 公司; G418 和 DNA marker 等购自上海生物工程有限公

司; 基质金属蛋白酶 (matrix metallo proteinases, MMP) MMP2、MMP9 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 单克隆抗体购自福建迈新公司.

1.3 基因转染和细胞克隆的筛选

利用脂质体介导法将 PcDNA3.1-TGIF 导入胃癌细胞系 SGC-7901 细胞中, 同时设 PcDNA3.1 空白质粒和未转染的 SGC-7901 细胞作对照. 3 天后换用含 800 mg/L G418 的正常培养基继续培养, 未转染组细胞大量死亡后, 逐渐降低 G418 的含量, 最后以含 200 mg/L G418 的正常培养基维持培养, 直至细胞克隆的形成.

1.4 蛋白质印迹

将提取的细胞总蛋白质按 BCA 试剂盒说明书测总蛋白质浓度, 取 40 μ g 总蛋白质在不连续 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 电转移至硝酸纤维素膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加 anti-TGIF 抗体, 37 $^{\circ}$ C 孵育 12 h, PBS 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, PBS 洗膜 3 次, 每次 10 min, DAB 显色, 以转膜时丽春红染

* 通讯联系人.

Tel/Fax: 0731-2650400, E-mail: jifangwen@hotmail.com

收稿日期: 2005-04-07, 接受日期: 2005-04-30

色作内对照。

1.5 流式细胞术分析

收集细胞, PBS 洗涤 2 次后, 1 000 r/min 离心 10 min, 75% 乙醇固定, 经流式细胞仪测定并用 Cell Quest 软件分析各组细胞的细胞周期分布 (FAC Sort, Becton Dickinson)。

1.6 MTT 分析

取对数生长期细胞, 0.02% EDTA 和 0.25% 胰蛋白酶消化后计数, 调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml, 按 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 加 20 μ l 5 g/L 的 MTT, 继续培养 4 h, 弃培养液, 加 150 μ l DMSO, 轻轻振荡后于酶标仪 (波长 570 nm) 测定各孔的 A 值。

1.7 平板克隆形成试验

将对数生长期细胞接种到 6 孔板, 每种细胞接种 3 孔, 1×10^3 个/孔, 以十字方向轻轻晃动 6 孔板, 使细胞分散均匀。在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中, 静止培养至 6 孔板出现肉眼可见的克隆。PBS 小心洗涤细胞 2 次, 甲醇固定 15 min, 姬姆萨应用液染色 15 min, 流水缓慢洗去染色液, 空气干燥。肉眼直接计数克隆数, 并计算克隆形成率, 克隆形成率 = (克隆数 / 接种细胞数) $\times$ 100%。

1.8 裸鼠成瘤试验

0.25% 胰蛋白酶消化 TGIF 转染细胞、PcDNA3.1 转染细胞和 SGC-7901 细胞, 离心收集细胞; 细胞沉淀重悬于 PBS 中; 将 4~6 周龄的 BALB/c 雌性裸小鼠 (体重为 16~18 g) 随机分配到 3 组, 在裸鼠腋下进行接种。每个部位注射 0.2 ml 细胞悬液, 约含细胞数 7×10^6 个。肿瘤形成后用游标卡尺测量肿瘤结节的长度(a)、宽度(b)和高度(c), 每周测量 2 次, 按公式 $V = (\pi/6) \times (abc) (\text{cm}^3)$ 计算肿瘤的近似体积。

1.9 上清液 VEGF 水平检测

分别取 TGIF 转染细胞、PcDNA3.1 转染细胞和 SGC-7901 细胞, 用 D-Hanks 液洗涤, 0.25% 胰酶消化计数后, 用 10% 小牛血清重悬成 4×10^6 L, 各取 200 μ l 加入到 96 孔板, 每组设 3 个平行孔, 于 37℃ 5% CO₂ 培养箱培养 36 h, 各取 100 μ l 上清液按照 VEGF ELISA 试剂盒说明检测其蛋白质分泌水平, 最后用酶标仪测 A₄₉₀ 值。

1.10 明胶酶谱分析

将收集的细胞培养上清液在非还原性的 100 g/L 丙烯酰胺凝胶 (含有 1.0 g/L 明胶) 中电泳。室温下在 25 g/L Triton X-100 中振洗 3 次,

15 min/次, 然后在 37℃ 明胶酶缓冲液中孵育过夜 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4; 200 mmol/L NaCl; 5 mmol/L CaCl₂)。室温下在含 1.0 g/L 考马斯亮蓝的固定液中 (乙酸: 甲醇: 水的浓度比为 1:4:5) 固定、染色 30 min; 再用不含考马斯亮蓝的固定液脱色。蛋白酶的活性部位为白色条带。

1.11 统计方法

方差分析。

2 结 果

2.1 稳定表达 TGIF 蛋白的细胞克隆的建立

蛋白质印迹结果显示: 表达质粒转染细胞的 TGIF 蛋白表达水平明显高于 SGC-7901 细胞和 PcDNA3.1 转染细胞 (图 1), 表明稳定表达 TGIF 蛋白的细胞系已建立。

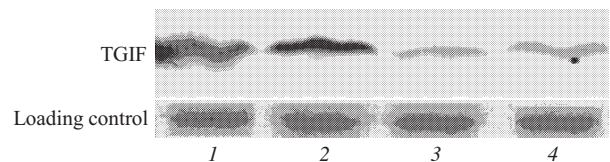


Fig.1 Analysis of TGIF protein level in SGC-7901 cells, pcDNA3.1 transfected cells and TGIF transfected cells with Western blotting

1 and 2: cell clones of TGIF transfected cells; 3: PcDNA3.1 transfected cells; 4: SGC-7901 cells. Ponceau S staining was used as a loading control.

2.2 TGIF 对 SGC-7901 细胞生长的影响

SGC-7901 细胞、PcDNA3.1 转染细胞和 TGIF 转染细胞的细胞倍增时间分别为 42.5 h, 43.8 h 和 43.5 h (图 2a)。3 种细胞的倍增时间无明显差别 ($P > 0.05$)。TGF- β 1 作用后, SGC-7901 细胞、PcDNA3.1 转染细胞和 TGIF 转染细胞的细胞倍增时间分别为

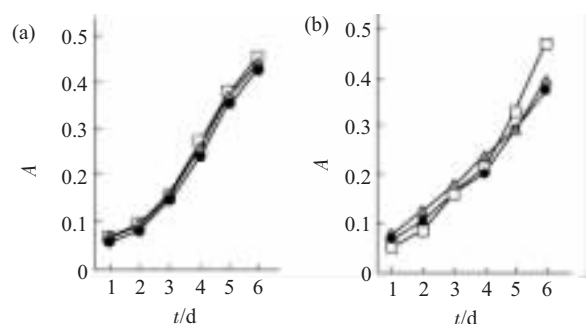


Fig.2 The growth curves of SGC-7901 cells, PcDNA3.1 transfected cells and TGIF transfected cells without (a) or with (b) the treatment of TGF- β 1 (10 μ g/L) for indicated times

●—●: SGC-7901; △—△: PcDNA3.1, □—□: TGIF.

49.3 h, 51.9 h 和 43.4 h (图 2b). 3 组细胞的倍增时间差异显著($P < 0.05$), 并且 TGIF 转染细胞在 TGF- β 1 作用前后的倍增时间无差别 ($P > 0.05$).

2.3 TGIF 对细胞周期的影响

TGIF 转染对 SGC-7901 细胞的细胞周期也无明显改变 (表 1). TGF- β 1 作用后, SGC-7901 细胞和 PcDNA3.1 转染细胞的 G1 期细胞含量均明显增多, 但 TGIF 转染细胞的 G1 期细胞含量无改变.

	TGF- β 1(-) /%			TGF- β 1(+) /%		
	G1	G2	S	G1	G2	S
SGC-7901	55.2	15.8	29.0	63.2	14.2	22.6
PcDNA3.1	50.1	15.8	34.2	60.3	13.9	25.8
TGIF	50.9	18.4	30.6	50.1	21.2	28.7

2.4 平板克隆形成试验

SGC-7901 细胞、PcDNA3.1 转染细胞和 TGIF 转染细胞的克隆形成率分别为 15.1%、12.4% 和 16.9% (图 3), 3 种细胞的克隆形成率之间无明显差别 ($P > 0.05$).

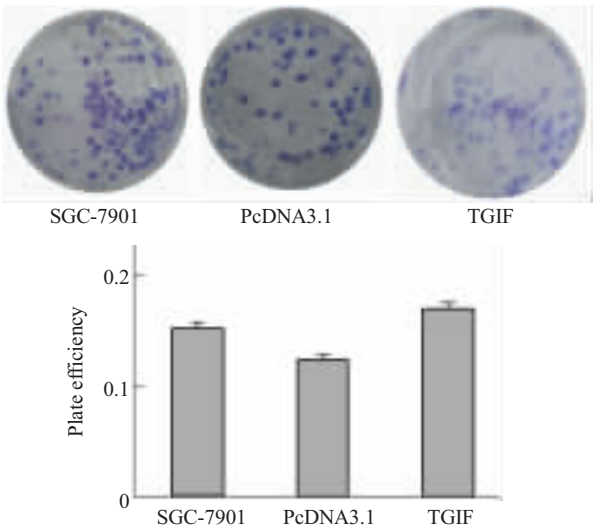


Fig.3 The plate efficiency of SGC-7901 cells, PcDNA3.1 transfected cells and TGIF transfected cells

2.5 TGIF 基因转染对 SGC-7901 细胞在裸鼠体内成瘤及生长的影响

SGC-7901 细胞、PcDNA3.1 转染细胞和 TGIF 转染细胞成瘤潜伏期均为 7 天, 瘤体重量分别为 (0.85 $\pm$ 0.09) g、(0.87 $\pm$ 0.13) g 和 (0.87 $\pm$ 0.27) g, 瘤体积分别为 (0.99 $\pm$ 0.08) cm³、(1.01 $\pm$ 0.11) cm³ 和 (1.10 $\pm$ 0.12) cm³. 经统计学检验, 差别均无显著性

($P > 0.05$). 经连续切片发现 SGC-7901 细胞和 PcDNA3.1 转染细胞接种瘤组织有明显癌栓形成, 但 TGIF 组无癌栓 (图 4).

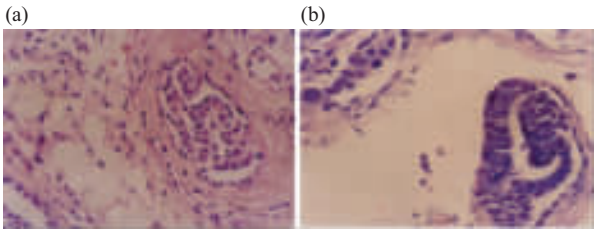


Fig.4 Cancerous embolism in tumor tissues from nude mice inoculated with SGC-7901 cells (a) and PcDNA3.1 transfected cells (b)

2.6 TGIF 基因转染对 MMP2、MMP9 和 VEGF 表达的影响

SGC-7901、PcDNA3.1 转染细胞接种瘤组织 MMP9 和 VEGF 均呈强阳性表达, 表达水平明显高于 TGIF 组, 且它们在靠近包膜的瘤组织中表达水平明显高于瘤组织中央的表达, 但 MMP2 在 3 组间的表达无明显差别 (图 5).

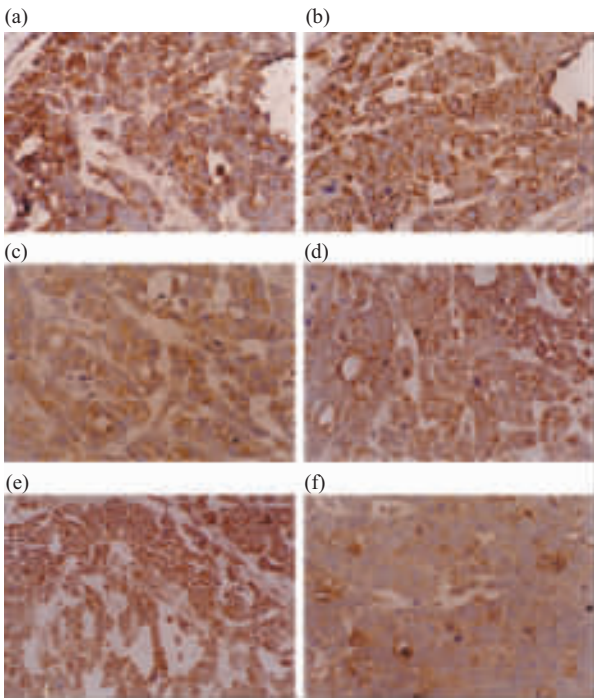


Fig.5 The expressions of MMP9 and VEGF proteins in tumor tissues from nude mice inoculated with TGIF transfected, PcDNA3.1 transfected cells or SGC-7901 cells
MMP9 shows intense positive in tumor tissues from SGC-7901 cells and PcDNA3.1 transfected cells (a and b), but weak positive in TGIF transfected cells (c). VEGF also shows intense positive in tumor tissues from SGC-7901 cells and PcDNA3.1 transfected cells (d and e), but weak positive in TGIF transfected cells (f).

2.7 TGIF 转染对 VEGF 表达的影响

经 ELISA 分析, TGIF 基因转染细胞、PcDNA3.1 转染细胞和 SGC-7901 细胞上清液中, VEGF 的浓度分别为 (635.0 ± 20.3) ng/L、 (780.0 ± 25.4) ng/L 和 (791.0 ± 23.9) ng/L (图 6), TGIF 基因转染细胞 VEGF 的含量明显低于 PcDNA3.1 转染细胞和 SGC-7901 细胞, $F = 99.45$, $P < 0.01$.

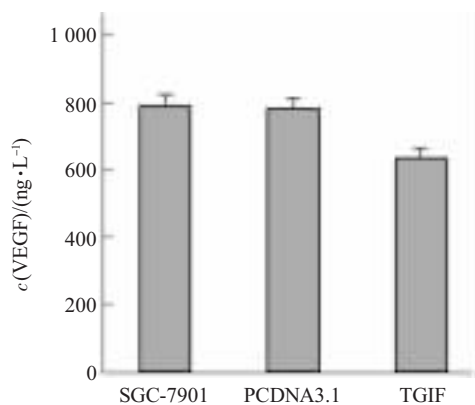


Fig.6 The concentrations of VEGF in supernatants from SGC-7901 cells, PcDNA3.1 transfected cells and TGIF transfected cells

2.8 TGIF 基因转染对 SGC-7901 细胞明胶酶谱的影响

SGC-7901 细胞、PcDNA3.1 转染细胞和 TGIF 转染细胞均无活性 MMP2 的表达, SGC-7901 细胞和 PcDNA3.1 转染细胞上清液可见明显活性 MMP9 的表达, 但 TGIF 转染细胞无活性 MMP9 的表达 (图 7).

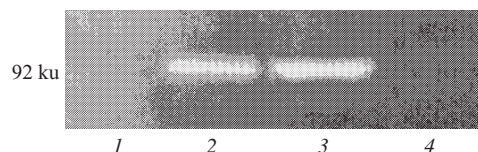


Fig.7 Gelatin zymogram of SGC-7901 cells, PcDNA3.1 transfected cells and TGIF transfected cells

1: protein molecular mass marker; 2: SGC-7901; 3: PcDNA3.1 transfected cells; 4: TGIF transfected cells.

3 讨论

TGIF 属于 TGIF 同源结构域家族, 它位于 18p11.3, 编码一种由 272 个氨基酸残基组成的分子质量约为 30 ku 的核蛋白. TGF- β 信号传导通路能抑制细胞生长、诱导细胞凋亡和细胞分化等, TGIF 则能抑制 TGF- β 信号通路^[1-5]. TGIF 功能的增

强可能抑制 TGF- β 对细胞的负性调节作用. 它在肿瘤发生中的作用引起我们的极大兴趣. Nakakuki 等^[7]发现在食管癌细胞系中有 TGIF 基因的扩增, Voortter 等^[8]通过比较基因组杂交发现, 在膀胱移行细胞癌中 TGIF 基因所在位点 18p11 存在基因扩增, Luo 等^[9]发现, 在卵巢癌患者的血清中存在针对 TGIF 的抗体. Edwards 等^[10]的研究表明: TGIF 能使酵母细胞突破细胞周期阻滞. 这些研究均提示 TGIF 可能促进肿瘤的发生与发展, 但仍缺乏直接的实验依据.

3.1 TGIF 对 TGF- β 介导的生长抑制作用的影响

TGIF 基因转染胃癌细胞株 SGC-7901 细胞后, SGC-7901 细胞的生长速度和细胞周期分布无明显改变, 说明在无外源性 TGF- β 的作用下, TGIF 对细胞的增殖和细胞周期没有影响, 我们的结果与 Edwards 等^[10]的报道不一致, 他们发现人类 TGIF 蛋白的过表达能使酵母细胞通过 G1 期细胞周期阻滞点, 促进酵母细胞的增殖, 这种差异可能是由于细胞类型不同所致. 3 种细胞的集落形成率、裸鼠的成瘤时间、瘤重与瘤体积没有明显差别, TGIF 并未使胃癌细胞恶性生物学行为加重, TGIF 很可能不能促进肿瘤的发生与进展.

我们的结果也证实 TGF- β 1 能抑制 SGC-7901 细胞的生长^[11]. 外源性 TGF- β 1 作用后, SGC-7901 细胞和 PcDNA3.1 转染细胞的生长速度均有明显下降, 但 TGIF 转染组细胞的生长未受到明显抑制, 细胞周期分析也得到了类似的结果. 这证实 TGIF 能拮抗 TGF- β 对细胞周期的负性调节作用, TGIF 可能通过这种机制降低 TGF- β 对 SGC-7901 细胞的生长抑制作用. 我们的研究与 Lo 等^[9]报道一致, 他们发现稳定转染 TGIF 基因的 HaCaT 细胞能拮抗 TGF- β 介导的生长抑制作用. 有趣的是, 肿瘤细胞自身能分泌 TGF- β 1, 我们在裸鼠成瘤试验中发现, TGIF 并不能通过抑制 TGF- β 信号通路进而促进肿瘤的生长, 这种体内和体外实验的不一致性可能是由于 SGC-7901 细胞本身分泌 TGF- β 1 的量少, 导致 TGIF 抑制 TGF- β 信号通路的效果不明显所致.

3.2 TGIF 对 TGF- β 介导的促肿瘤浸润与转移作用的影响

TGF- β 也是一种促转移的因子. 临床资料显示, 多种肿瘤患者的血清中 TGF- β 1 水平升高, 它能提示肿瘤的复发, 与患者的预后呈负相关^[12, 13], 在瘤组织中的研究也表明 TGF- β 1 的表达水平与肿瘤的浸润深度和淋巴结转移呈正相关, 与患者的预后呈

负相关^[13, 14]. Nakata 等^[15]证实 TGF- β_1 能促进大鼠乳腺癌细胞的转移和体外浸润能力. Weeks 等^[16]发现, TGF- β_1 转基因鼠经诱导后表达的 TGF- β_1 能使由化学致癌剂诱变的乳头状瘤迅速恶变并发生转移. Kuga 等^[17]证明, TGF- β_1 通过 smad2 和 smad3 上调尿激酶型纤溶蛋白酶原激活因子 (uPA) 和 MMP9 的表达而促进胃癌细胞系 GCTM-1 的浸润, 金晓明等^[18, 19]发现, TGF- β_1 能使口腔鳞癌细胞系 GNM 上调 MMP2、MMP9、uPA 和 PAI 等转移相关分子的表达. 相反地, 使用针对 TGF- β 的单克隆抗体和反义寡核苷酸能抑制肿瘤转移. Yang 等^[20]构建了表达 Fc (人免疫球蛋白片段) 与 T β R II 融合蛋白的转基因鼠, 发现这种可溶性的融合蛋白能抑制转移瘤的形成. Muraoka 等^[21]也得到了类似的结果, 发现这种融合蛋白能抑制乳腺癌细胞的迁移和转移. Oft 等^[22]也证实 T β R II 显性负性突变体能抑制小鼠结肠癌细胞的体外浸润能力和转移瘤的形成, 抗 TGF- β 中和抗体也能抑制部分癌细胞系的侵袭能力.

裸鼠瘤组织 HE 切片发现, TGIF 转染细胞接种瘤组织的周围未见癌栓, 免疫组织化学、ELISA 和明胶酶谱分析进一步表明, TGIF 可能通过下调 MMP9 和 VEGF 的表达, 抑制胃癌细胞的浸润和转移, 我们也通过生物信息学分析发现, 多种转移相关分子如 MMP3 和骨桥蛋白等的启动子中有 TGIF 蛋白的结合位点, 转录因子 TGIF 也可能通过下调这些分子表达, 抑制肿瘤的转移. 此外, 我们的实验中并没有出现远处转移, 这可能与皮下移植瘤模型本身转移率低有关.

总之, 尽管 TGIF 能抑制 TGF- β_1 介导的生长抑制作用, 但并不能使恶性的胃癌生物学行为加重, 相反地, TGIF 可以通过下调 MMP9 和 VEGF 的表达抑制胃癌细胞的转移.

参 考 文 献

- Wotton D, Lo R S, Swaby L A, *et al.* A Smad transcriptional corepressor. *Cell*, 1999, **97** (1): 29~39
- Melhuish T A, Wotton D. The interaction of the carboxyl terminus-binding protein with the Smad corepressor TGIF is disrupted by a holoprosencephaly mutation in TGIF. *J Biol Chem*, 2000, **275** (50): 39762~39766
- Wotton D, Knoepfler P S, Laherty C D, *et al.* The Smad transcriptional corepressor TGIF recruits mSin3. *Cell Growth Differ*, 2001, **12** (9): 457~463
- Wotton D, Lo R S, Swaby L A, *et al.* Multiple modes of repression by the Smad transcriptional corepressor TGIF. *J Biol Chem*, 1999, **274** (52): 37105~37110
- Lo R S, Wotton D, Massague J. Epidermal growth factor signaling via Ras controls the Smad transcriptional co-repressor TGIF. *EMBO J*, 2001, **20** (1~2): 128~136
- Siegel P M, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2003, **3** (11): 807~821
- Nakakuki K, Imoto I, Pimkhaokham A, *et al.* Novel targets for the 18p11.3 amplification frequently observed in esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis*, 2002, **23** (1): 19~24
- Voorter C, Joos S, Bringuier P P, *et al.* Detection of chromosomal imbalances in transitional cell carcinoma of the bladder by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol*, 1995, **146** (6): 1341~1354
- Luo L Y, Herrera I, Soosaipillai A, *et al.* Identification of heat shock protein 90 and other proteins as tumour antigens by serological screening of an ovarian carcinoma expression library. *Br J Cancer*, 2002, **87** (3): 339~343
- Edwards M C, Liegeois N, Horecka J, *et al.* Human CPR (cell cycle progression restoration) genes impart a Far-phenotype on yeast cells. *Genetics*, **147**: 1063~1107
- 乔文, 胡家露. 转化生长因子 β_1 对胃腺癌细胞凋亡诱导的研究. *解放军医学杂志*, 1997, **22** (5): 338~340
- Qiao W, Hu J L. *Med J Ch in PLA*, 1997, **22** (5): 338~340
- Saito H, Tsujitani S, Oka S, *et al.* An elevated serum level of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) significantly correlated with lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric carcinoma. *Anticancer Res*, 2000, **20** (6B): 4489~4493
- 许洪卫, 王元和, 谭龙益. 组织和血清 TGF β_1 水平升高与胃癌侵袭性增强的相互关系. *癌症*, 1999, **18** (2): 156~158
- Xu H W, Wang Y H, Tan L Y. *Chinese Journal of Cancer*, 1999, **18** (2): 156~158
- Machara Y, Kakeji Y, Kabashima A, *et al.* Role of transforming growth factor beta 1 in invasion and metastasis in gastric carcinoma. *J Clin Oncol*, 1999, **17** (2): 607~614
- Nakata D, Hamada J, Ba Y, *et al.* Enhancement of tumorigenic, metastatic and *in vitro* invasive capacity of rat mammary tumor cells by transforming growth factor-beta. *Cancer Lett*, 2002, **175** (1): 95~106
- Weeks B H, He W, Olson K L, *et al.* Inducible expression of transforming growth factor beta1 in papillomas causes rapid metastasis. *Cancer Res*, 2001, **61** (20): 7435~7443
- Kuga H, Morisaki T, Nakamura K, *et al.* Interferon-gamma suppresses transforming growth factor-beta-induced invasion of gastric carcinoma cells through cross-talk of Smad pathway in a three-dimensional culture model. *Oncogene*, 2003, **22** (49): 7838~7847
- 金晓明, 李金荣, 李祖兵, 等. 转化生长因子 β_1 对口腔鳞癌细胞系基质金属蛋白酶 -2 和 -9 活性的影响. *现代口腔医学杂志*, 2001, **15** (6): 412~413
- Jin X M, Li J R, Li Z B, *et al.* *J Modern Stomatol*, 2001, **15** (6):

- 412~413
- 19 金晓明, 李金荣, 李祖兵, 等. 转化生长因子 $\beta 1$ 对口腔鳞癌细胞系尿激酶纤溶酶原激活剂及其抑制剂活性的影响. 实用口腔医学杂志, 2001, **17** (2): 102~104
- Jin X M, Li J R, Li Z B, *et al.* J Pract Stomatol, 2001, **17** (2): 102~104
- 20 Yang Y A, Dukhanina O, Tang B, *et al.* Lifetime exposure to a soluble TGF- β antagonist protects mice against metastasis without adverse side effects. J Clin Invest, 2002, **109** (12): 1607~1615
- 21 Muraoka R S, Dumont N, Ritter C A, *et al.* Blockade of TGF- β inhibits mammary tumor cell viability, migration, and metastases. J Clin Invest, 2002, **109** (12): 1551~1559
- 22 Oft M, Heider K H, Beug H. TGF β signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. Curr Biol, 1998, **8** (23): 1243~1252

Effects of TG Interacting Factor (TGIF) on Growth and Metastasis of Gastric Carcinoma Cells

HU Zhong-Liang, WEN Ji-Fang*, XIAO De-Sheng, ZHENG Hui, FU Chun-Yan

(Department of Pathology, Basic Medical Institute, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract TGIF (TG interacting factor) is an inhibitor of TGF- β signaling pathway. However, TGF- β can overcome the cell growth in the early stage of tumorigenesis, but promote the invasion and metastasis of neoplasms in the later stage. However its role in carcinogenesis is still unknown. After gastric carcinoma cell line, SGC-7901, was stably transfected with plasmid PcDNA3.1-TGIF, the effect of TGIF on it was investigated via MTT method, flow cytometry, plate clone formation, nude mice tumorigenicity and the expressions of MMP2, MMP9 and VEGF proteins were detected in tumors originated from inoculated TGIF transfected, PcDNA3.1 transfected and SGC-7901 cells via immunohistochemistry. The contents of VEGF, active MMP2 and MMP9 in supernants of three cells were examined via ELISA and zymograph respectively. TGIF has no effect on the proliferation, cell cycle distribution and plating efficacy of SGC-7901 cells. *In vivo* experiment, tumors originated from TGIF transfected cells have no embolism formed inside whereas tumors originated from control cells have obvious embolisms. The expression levels of MMP9 and VEGF in tumors from TGIF transfectant cells are less than that from appropriate control cells, whereas MMP2 has no detectable difference among the three cells. The concentrations of VEGF in supernants of TGIF transfectant, PcDNA3.1 transfectant and SGC-7901 cells were (635 ± 20.3) ng/L, (780 ± 25.4) ng/L and (791 ± 23.9) ng/L respectively. The content of VEGF in TGIF transfectant cells was significantly lower than that in control cells ($P < 0.01$). The contents of active MMP9 protein in supernants of TGIF transfectant cells were also significantly lower than that in control cells. Although TGIF can partially resist TGF- β mediated growth inhibition, it can not worsen the biological behaviors of gastric cancer cells. Inversely, TGIF can downregulate the expressions of VEGF and MMP9 and then mitigate their metastasis.

Key words gastric carcinoma, TG-interacting factor (TGIF), transforming growth factor beta

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-731-2650400, E-mail: jifangwen@hotmail.com

Received: April 7, 2005 Accepted: April 30, 2005