

# 胃肠道肿瘤 TGF- $\alpha$ 基因表达的研究\*

乔 波 孙丛梅 周爱儒

(北京医科大学生物化学教研室, 北京 100083)

**摘要** 用分子杂交技术及流式细胞方法研究了转化生长因子 $\alpha$ (TGF $\alpha$ )在人胃肠道肿瘤组织中的表达。结果表明,胃癌、结肠癌和直肠癌组织较相应癌旁组织 TGF $\alpha$  mRNA 水平增高。佛波脂(TPA 100 $\mu$ g/L)作用胃癌细胞 MGc80-3 后 4h,可使细胞中 TGF $\alpha$  mRNA 水平增高,作用 6h 可使 S 期细胞百分比明显增加。这些结果提示: TGF $\alpha$  在胃肠道肿瘤中起重要作用,其表达可受 TPA 的调节。

**关键词** TGF $\alpha$ , 人胃肠道肿瘤, TPA

转化生长因子 $\alpha$ (TGF $\alpha$ )是由 50 个氨基酸组成的多肽,相对分子量为 6000,它能促进某些非转化细胞发生表型转化,使其丧失生长接触抑制能力<sup>[1]</sup>。

TGF $\alpha$  发生作用的详细机制尚不清楚,但现在普遍认为它主要以自分泌方式发挥作用。目前,除造血系统的肿瘤组织中没有发现 TGF $\alpha$  的高表达外,在包括胃肠道瘤的许多癌瘤组织中均发现 TGF $\alpha$  的高表达。

本文以人胃肠道肿瘤为研究对象,应用分子杂交技术检测了 TGF $\alpha$  mRNA 的表达,并且研究了蛋白激酶 C 激动剂佛波脂(TPA)对胃癌细胞 MGc80-3 TGF $\alpha$  mRNA 表达的影响,为探讨 TGF $\alpha$  在胃肠道肿瘤中的作用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂和仪器

胃癌和肠癌手术标本由北京医科大学第二和第三临床医学院提供。

MGc80-3 胃癌细胞株<sup>[2]</sup>,由北京医科大学肿瘤研究所提供。

TGF $\alpha$  cDNA 探针由中国科学院上海生化所提供。 $\alpha$ -<sup>32</sup>PdCTP 是 Free (北京)生物工程有限公司产品。随机引物试剂盒是 Promega 公司产品。美国 Sigma 公司产品: TPA, 异硫氰酸胍。

其它试剂均为分析纯。

德国 IBSA2000 图象分析仪; FACS-440 流式细胞计数仪。

### 1.2 方法

**1.2.1 组织及细胞总 RNA 提取** 依据文献[3]方法,取 0.5g 胃或肠组织加入 5ml D 溶液, (4mol/L 异硫氰酸胍, 25mmol/L 柠檬酸钠 0.5%  $\beta$ -十二烷基肌酸钠 0.1mol/L 巯基乙醇 pH=7.0), 匀浆组织, 经饱和酚、氯仿/异戊醇 (49:1) 抽提及异丙醇沉淀, 所得 RNA 溶于 0.2% SDS 中, -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

**1.2.2 总 RNA 样品的定量及电泳鉴定** 将样品配成一定浓度, 在紫外分光光度计测定其 260nm 和 280nm 的 A 值。  $A_{260}/A_{280} \geq 2$  表明样品纯度较高。  $1A = 40 \times 10^3 \mu$ g/L RNA, 由此定量。另取 5 $\mu$ g 总 RNA 样品经 0.7% 琼脂糖电泳, 溴化二锭 (EB) 染色后, 于紫外灯下观察。

**1.2.3 探针的标记** 随机引物标记法, 按试剂盒所述方法操作。本实验所用的探针标记参入率为 90%, 标记探针的放射性比活度在  $2 \times 10^8$ — $9 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ g 之间。

**1.2.4 RNA 印迹杂交、点杂交和狭缝杂交** 按分子克隆实验手册 (第二版) 所述方法操作。

**1.2.5 细胞周期分析** 分别将 TPA (100 $\mu$ g/L)

\* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1994-06-18, 修回日期: 1995-01-12

处理 2h 和 6h 的胃癌细胞 MGc80-3, 用胰酶和 EDTA 消化成单个细胞, 经  $-20^{\circ}\text{C}$  无水乙醇固定, 以 PBS 配成每毫升含  $1 \times 10^6$  个细胞. 用 FACS-440 流式细胞计数仪分析各期细胞百分比.

## 2 结 果

### 2.1 总 RNA 鉴定电泳

图 1 中可见 RNA 样品无降解, 无 DNA 污染.

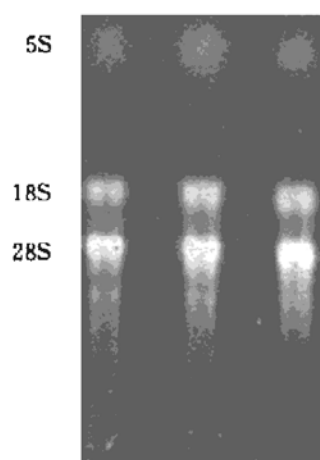


图 1 总 RNA 鉴定电泳  
上样量  $5\mu\text{g}$ , 0.7% 琼脂糖凝胶.

### 2.2 狭缝杂交检测人胃癌组织 TGF $\alpha$ mRNA 的表达

图 2 是杂交反应的放射自显影结果. 经面积光密度 (IOD) 测定结果见表 1.

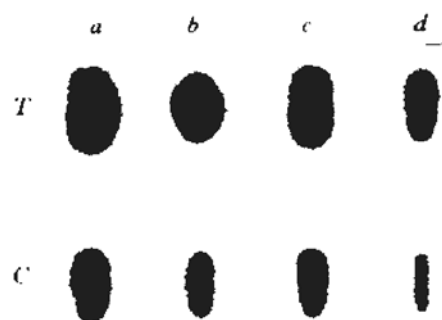


图 2 人胃癌组织 TGF  $\alpha$  mRNA 的狭缝杂交  
T: 人结肠癌组织; C: 相应癌旁组织. 上样量  
a:  $20\mu\text{g}$ , b:  $15\mu\text{g}$ , c:  $10\mu\text{g}$ , d:  $5\mu\text{g}$ .

表 1 人胃癌组织 TGF  $\alpha$  mRNA 表达

| 样品/ $\mu\text{g}$ | 5    | 10   | 15   | 20   |
|-------------------|------|------|------|------|
| IOD               |      |      |      |      |
| 胃癌                | 1071 | 2191 | 2309 | 3640 |
| 癌旁                | 500  | 945  | 1108 | 2250 |

以上结果表明, 人胃癌组织较其相应癌旁组织 TGF  $\alpha$  mRNA 表达水平增高.

### 2.3 点杂交检测人结肠癌组织 TGF $\alpha$ mRNA 的表达

图 3 是点杂交的放射自显影结果. IOD 测定结果见表 2.

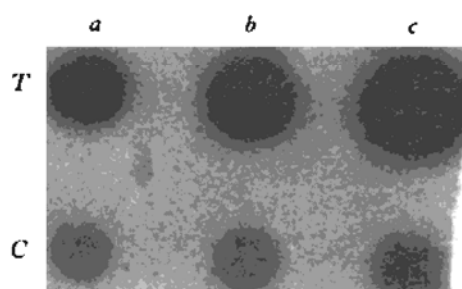


图 3 人结肠癌组织 TGF  $\alpha$  mRNA 的点杂交  
T: 人结肠癌组织; C: 相应癌旁组织. 上样量  
a:  $10\mu\text{g}$ , b:  $15\mu\text{g}$ , c:  $20\mu\text{g}$ .

表 2 人结肠癌组织 TGF  $\alpha$  mRNA 表达

| 样品/ $\mu\text{g}$ | 10  | 15  | 20  |
|-------------------|-----|-----|-----|
| IOD               |     |     |     |
| 结肠癌               | 241 | 371 | 599 |
| 癌旁                | 81  | 117 | 154 |

由上面结果可见, 人结肠癌组织中癌组织较相应癌旁组织 TGF  $\alpha$  mRNA 表达水平增高.

### 2.4 RNA 印迹杂交检测人直肠癌组织 TGF $\alpha$ mRNA 表达

图 4 是杂交反应的放射自显影结果. 表 3 是 IOD 测定结果.

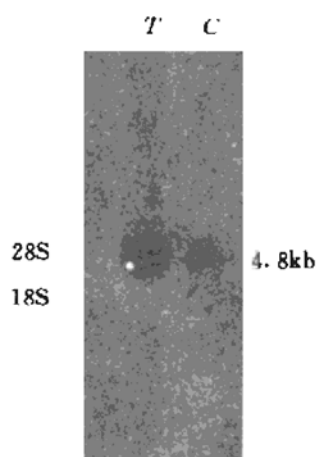


图4 人直肠癌组织 TGF  $\alpha$  mRNA 的 RNA 印迹杂交

每泳道上样量为 30  $\mu$ g 总 RNA. T: 人直肠癌组织; C: 相应癌旁组织.

表3 人直肠癌组织 TGF  $\alpha$  mRNA 表达

| 样品  | RNA/ $\mu$ g | IOD  |
|-----|--------------|------|
| 直肠癌 | 30           | 1379 |
| 癌旁  | 30           | 513  |

由结果可见, 人直肠癌组织较其相应癌旁组织 TGF  $\alpha$  mRNA 表达水平增高.

## 2.5 TPA 对 MGc80-3 细胞 TGF $\alpha$ mRNA 水平的影响

图5是 TPA (100  $\mu$ g/L) 作用 MGc80-3 细胞 4h, 提取细胞总 RNA 应用狭缝杂交技术检测其 TGF  $\alpha$  mRNA 水平的放射自显影结果. 表4是 IOD 测定结果.

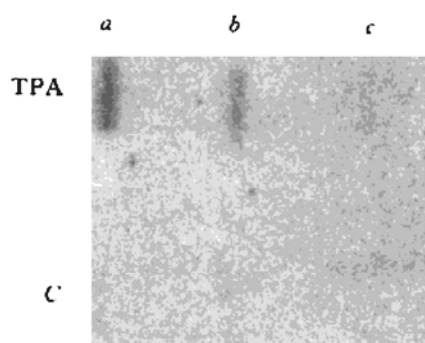


图5 TPA 处理胃癌细胞 4h TGF  $\alpha$  mRNA 的狭缝杂交

TPA 组; C: 对照组. 上样量 a: 20  $\mu$ g, b: 10  $\mu$ g, c: 5  $\mu$ g.

表4 TPA 处理人胃癌细胞 4h TGF  $\alpha$  mRNA 表达

| 样品/ $\mu$ g | 5   | 10 | 20 |
|-------------|-----|----|----|
|             | IOD |    |    |
| TPA         | 27  | 47 | 65 |
| 对照          | 18  | 29 | 31 |

由以上结果可见, TPA 处理胃癌细胞 4h 后 TGF  $\alpha$  mRNA 表达水平增高.

## 2.6 流式细胞分析技术检测 TPA 对人胃癌细胞 MGc80-3 细胞周期的影响

表5是 TPA (100  $\mu$ g/L) 处理胃癌细胞 2h 和 6h 各期细胞的参数.

表5 TPA 处理胃癌细胞后各期细胞参数

|      |    | %              |      |                   |
|------|----|----------------|------|-------------------|
| 细胞周期 |    | G <sub>1</sub> | S    | G <sub>2</sub> +M |
| 对照   | 2h | 66.7           | 18.7 | 14.6              |
|      | 6h | 46.9           | 36.8 | 16.3              |
| TPA  | 2h | 59.5           | 24.1 | 16.4              |
|      | 6h | 36.4           | 63.5 | 0.2               |

由以上结果可见, TPA 处理胃癌细胞 2h, S 期细胞比例变化不明显. 而作用 6h 后, S 期细胞比例由 36.8% 变成 63.5%, 表明 S 期细胞比例明显增加.

## 3 讨 论

在以前的研究中, 癌组织和相应癌旁组织 TGF  $\alpha$  mRNA 表达水平有不同的报道结果<sup>[4,5]</sup>. 我们对现有手术标本研究结果表明, 人胃癌、结肠癌和直肠癌组织中, 癌组织较相应癌旁组织 TGF  $\alpha$  mRNA 有高表达, 这些结果和一些文献报道相符<sup>[4]</sup>. TGF  $\alpha$  mRNA 在胃肠道肿瘤中的高表达, 提示它在肿瘤中起重要作用.

我们室以前证明<sup>[6]</sup>, TPA 能提高人膀胱移行上皮癌 BIU-87 细胞中 TGF  $\alpha$  mRNA 和活性分子的水平. 本实验证明 TPA (100  $\mu$ g/L) 对胃癌细胞 MGc80-3 TGF  $\alpha$  mRNA 水平也有上

调作用. 这些结果表明, 蛋白激酶 C (PKC) 的活性与 TGF  $\alpha$  的生成有关, PKC 对 TGF  $\alpha$  mRNA 的上调作用和 TGF  $\alpha$  自分泌作用可能存在不同的调节通路<sup>[7]</sup>. TPA 与胃癌细胞 TGF  $\alpha$  mRNA 表达关系的研究目前尚未见报道.

### 参 考 文 献

- 1 Delarco J, Todaro G T. Proc Natl Acad Sci USA, 1978; 75: 4001
- 2 王凯华. 实验生物学报, 1983; 16 (3): 257
- 3 Chomezynski P, Sacchi N. Anal Biochem, 1987; 162: 156
- 4 Coffey R J, Shipley G D, Moses H L. Cancer Res, 1986; 46: 1164
- 5 Malden L T, Novak V, Burgess A W. Int J Cancer, 1989; 43: 380
- 6 葛振龙, 周爱儒. 生物化学杂志, 1992; 8 (4): 468
- 7 Klein S B, Fisher G J, Jensen T C *et al.* J Cell Physiol, 1992; 151: 326

**Investigation of Expression of TGF  $\alpha$  mRNA in Human Gastrointestinal Carcinoma.** Qiao Bo, Sun Congmei, Zhou Airu (*Department of Biochemistry, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

**Abstract** The expression of transforming growth factor  $\alpha$  (TGF  $\alpha$ ) in human gastrointestinal carcinoma by methods of molecular hybridization and cell FIT cell-cycle analysis was investigated. The results show that the levels of TGF  $\alpha$  mRNA are higher in gastric carcinoma tissues, colonic carcinoma tissues and rectal carcinoma tissues than in the corresponding control tissues. After treating with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA, 100 $\mu$ g/L, 4h), the level of TGF  $\alpha$  mRNA in gastric carcinoma cell line (MGc80-3) increases, and percentage of S phase cells is markedly increased after 6 hours. These results suggest that TGF  $\alpha$  plays an important role in gastrointestinal carcinoma tissues and expression of TGF  $\alpha$  mRNA can be regulated by TPA.

**Key words** transforming growth factor  $\alpha$ , human gastrointestinal carcinoma, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate

(上接第 277 页)

### 参 考 文 献

- 1 Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S *et al.* Science, 1988; 239: 487
- 2 Keohavong P, Thilly W G. Proc Natl Acad Sci USA, 1989; 86: 9253
- 3 Ennis P D, Zemmour J, Salter R D *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1990; 87: 2833

**The Calculation of the Minimum of Non-Base-Mismatch Copy Proportion of the PCR Products.** Fang Yuequn, Wang Bingrui (*Lanzhou Institute of Biological Products, Ministry of Public Health, Lanzhou 730046, China*).

**Abstract** The quantity change of the copies with mismatch bases in PCR products was

analyzed. The general formulas of numbers of copies in different modes after certain cycles ( $n$ ) were gained and the math relation between the minimum ( $R_n$ ) of the non-base-mismatch copy proportion of PCR products and the efficiency cycle numbers ( $N$ ), the copy chain length ( $H$ ) catalyzed by Taq polymerase and the mismatch frequency ( $f$ ) was concluded by way of substituting step by step:  $R_n = (1 - Hf/2)^{N-1}(1 - Hf)$ . The formula has a guidance sense for preparing the gene segments used for the gene expression by PCR technique.

**Key words** polymerase chain reaction, base mismatch, gene expression