

基因转染 CLD1 对大肠癌细胞株 SW480 粘附作用的影响

陈琳, 魏亚楠, 李林茂, 左文娟, 黄定贵, 张文欣, 罗珍玉, 杨敏, 覃素娇

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(编号:桂科自 0832206)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院体检中心

作者简介: 陈琳(1967-), 女, 医学博士, 硕士研究生导师, 副主任医师, 研究方向: 消化系统肿瘤的诊治。E-mail: 15007718280@139.com

[摘要] 目的 探讨基因转染 CLD1 对大肠癌细胞株 SW480 粘附作用的影响。方法 对 SW480^{CLD1} (转染 CLD1 的 SW480 细胞株)、SW480^{control} (转染了 pEGFP-C1 的 SW480 细胞株)、SW480 细胞株分别进行细胞同质粘附实验和细胞异质粘附实验。结果 细胞同质粘附实验结果显示 SW480^{CLD1} 细胞粘附细胞数量少于 SW480^{control} ($P=0.000$) 和 SW480 细胞 ($P=0.000$), SW480^{control} 的粘附细胞数与 SW480 无差异 ($P=0.376$), 粘附细胞数顺序为 SW480^{CLD1} < SW480^{control} 和 SW480。异质粘附实验的结果显示 SW480^{CLD1} 粘附细胞数多于 SW480^{control} ($P=0.000$) 和 SW480 ($P=0.000$), 差异有统计学意义。SW480^{control} 和 SW480 粘附细胞数无显著差异 ($P=0.334$)。粘附细胞数顺序为 SW480^{CLD1} > SW480^{control} 和 SW480。结论 CLD1 基因转染后可减少 SW480 细胞之间的同质粘附作用, 增加 SW480 细胞与 IV 型胶原的粘附性。

[关键词] 大肠癌; CLD1 (claudin-1); 基因转染; 粘附实验

[中图分类号] R 730 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2014)05-0394-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2014.05.03

The adhesive effects of colorectal cancer cells SW480 by CLD1 gene transfection CHEN Lin, WEI Ya-nan, LI Lin-mao, et al. Department of Medical Examination Center, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To investigate the adhesive effects of colorectal cancer cells SW480 by CLD1 gene transfection. **Methods** Cell homotypic adhesive tests and cell-matrix adhesive tests were performed on SW480^{CLD1} (SW480 by CLD1 gene transfection), SW480^{control} (SW480 by pEGFP-C1 transfection) and SW480 cells. **Results** The result of homotypic adhesive tests showed that the number of homotypic adhesive SW480^{CLD1} cells were less than those of SW480^{control} ($P=0.000$) and SW480 cells ($P=0.000$). No significant difference was detected between SW480^{control} and SW480 cells ($P=0.376$). The sequence of number of adhesive cell were SW480^{CLD1} < SW480^{control} and SW480. The result of cell-matrix adhesive tests showed that the number of SW480^{CLD1} adhesive cells were more than those of SW480^{control} ($P=0.000$) and SW480 cells ($P=0.000$), significant difference was detected. No significant difference was detected between SW480^{control} and SW480 cells ($P=0.334$). The sequence of number of adhesive cell were SW480^{CLD1} > SW480^{control} and SW480. **Conclusion** The homotypic adhesion was decrease between SW480 cells by CLD1 gene transfection. The adhesion was increase between SW480 cells and collagen IV mediated by CLD1 gene transfection.

[Key words] Colorectal carcinoma; CLD1 (claudin-1); Gene transfection; Adhesive tests

紧密连接蛋白 (claudin-1, CLD1) 是一种膜蛋白, 主要功能是封闭腺上皮顶端的间隙, 形成一个能阻止大分子物质通过细胞膜之间的间隙进入基底外侧区域的屏障。紧密连接是主导细胞粘附、细胞极性和腺体分化的关键因素之一。由于它可作为胞外

环境到胞内信号通道的结合点, 因此在细胞增生、肿瘤形成、细胞骨架等方面扮演了重要角色。肿瘤细胞表面膜的改变直接影响了细胞内、外环境之间的正常平衡关系^[1]。肿瘤细胞要向外进行粘附、迁移、侵袭、转移必须经过细胞膜的改变才能发生。粘

附作用是癌细胞向外转移的重要步骤。前期实验我们鉴定了三种具有不同转移潜能的大肠癌细胞株的 CLD1 表达量^[2,3],结果显示具有不同转移潜能的大肠癌细胞株的 CLD1 表达量不同,并对低表达的细胞株 SW480 进行基因转染,增加 SW480 的 CLD1 表达量,通过 G418 筛选出稳定表达该重组质粒的 SW480 细胞株(SW480^{CLD1}),以及转染空质粒 pEGFP-C1 的 SW480 细胞株(SW480^{control})以利于对照进行研究^[4]。为进一步探讨基因转染 CLD1 对大肠癌细胞株 SW480 粘附作用的影响,我们对 SW480^{CLD1}、SW480^{control} 和 SW480 三株细胞株分别进行细胞同质粘附实验和细胞异质粘附实验,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料 SW480 细胞株来自 ATCC(美国组织培养保藏中心),由中国科学院上海细胞生物学研究所提供;稳定表达 CLD1 重组质粒的 SW480 细胞株(SW480^{CLD1})(自己培养)^[4]、转染空质粒 pEGFP-C1 的 SW480 细胞株(SW480^{control})(自己培养)^[4];RPMI1640 培养基干粉、BSA 购自 Gibco 公司;collageon IV 购自 Amresco 公司;Opti-MEM 无血清培养基购自 Invitrogen 公司;胰蛋白酶购自 Oxoid 公司;24 孔 Tranwell 双层细胞培养板购自 Corning 公司。

1.2 方法 共设三个实验组:SW480^{CLD1}组、SW480^{control}组和 SW480。每组设 6 个复孔。

1.2.1 细胞同质粘附实验 ①台盼兰证实细胞活力>95%;②细胞接种于 48 孔培养板,培养至单层融合不留空隙;③弃培养液,37℃预热 RPMI1640 培养基,小心冲洗细胞 2 次去除悬浮细胞;④各组细胞用 RPMI1640 培养基制备成 1×10^5 /ml 浓度,每孔 200 μ l 将细胞植入 48 孔板;⑤37℃培养 60 min,小心吸出未粘附细胞,用 0.01 M PBS 洗细胞 2 次充分收集未粘附细胞,计数未粘附细胞,加入细胞减去未粘附细胞数量之差即为同质粘附细胞数。

1.2.2 细胞异质粘附实验 取细胞对数生长期,用无血清 RPMI1640 培养过夜。25 μ g/ml collageon IV 溶液(0.01 M PBS 配制)每孔 150 μ l,置 37℃铺板 1 h。10 g/LBSA(0.01 M PBS 配制)煮沸 13 min 变性后,每孔加 200 μ l 封闭 1 h,封闭结束后用 1xPBS 冲洗 2 次。用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化细胞,0.01 M PBS 洗涤细胞,800 r/min 离心 5 min 沉淀细胞,弃上清,将细胞重悬于含氯化钙 1 mmol/L,氯化镁 1 mmol/L,氯化锰 0.2 mmol/L 及 5 g/LBSA 的 RPMI1640 中,调整细胞浓度为 1×10^5 /ml。按 200 μ l/孔加入细胞悬液,37℃温育,动态观察细胞贴壁情况,90 min 后终

止培养。取出 48 孔板,0.01 M PBS 冲洗 3 次,4%多聚甲醛固定细胞 15 min,0.01 M PBS 清洗,在 400 $\times$ 高倍镜下,每孔取上、下、左、右、中 5 个视野计数。

1.3 统计学方法 应用 SPSS19.0 软件进行统计学处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞同质粘附实验结果 在单层细胞培养时,SW480^{CLD1}细胞形态学表现为伸展、呈纺锤形,细胞生长较松散,易消化,不利于细胞之间的粘附;而 SW480^{control}细胞与 SW480 细胞相似,多为圆形或类圆形,成团生长,不易消化,细胞之间容易粘附。SW480^{CLD1}细胞互相粘附的细胞数量显著少于 SW480^{control}($P = 0.000$)和 SW480($P = 0.000$),具有统计学差异。SW480^{control}的粘附细胞数与 SW480 无差异($P = 0.376$),粘附强弱顺序为 SW480^{CLD1} < SW480^{control} 和 SW480。说明提高 CLD1 表达后可减少 SW480 细胞之间的同质粘附,使肿瘤细胞脱离原发灶,便于进一步侵袭。并且同质粘附的下降可使紧密连接渗透性改变,导致更多的营养物质和生长因子供肿瘤生长,紧密连接完整性的丧失可能是肿瘤转移发展进程中重要一步。见表 1,图 1。

表 1 基因转染 CLD1 对 SW480 细胞同质粘附的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	同质粘附细胞数
SW480 *	6	4354 $\pm$ 28.04
SW480 ^{control} * #	6	4336 $\pm$ 29.95
SW480 ^{CLD1}	6	2547 $\pm$ 38.81
F	-	6080.234
P	-	0.000

注: * 与 SW480^{CLD1} 比较差异有统计学意义, $P = 0.000$; # 与 SW480 比较差异无统计学意义, $P = 0.376$

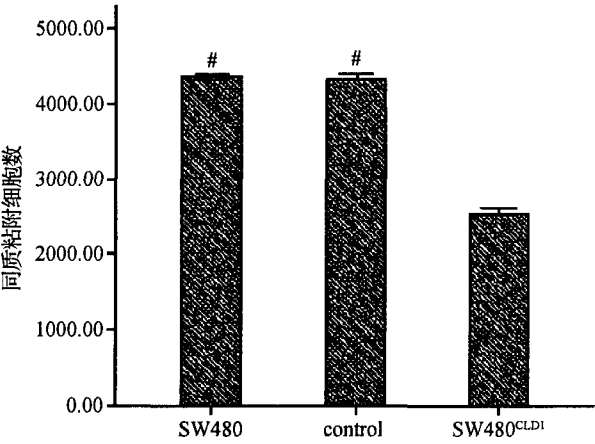


图 1 基因转染 CLD1 对 SW480 细胞同质粘附的影响图

2.2 细胞异质粘附实验结果 三组细胞培养 90 min 后随机计数 6 个 400 倍视野粘附细胞,结果显示三个细胞株总体粘附性有差异。其中,SW480^{CLD1}粘附细胞数显著多于 SW480^{control} ($P = 0.000$) 和 SW480 ($P = 0.000$),差异有统计学意义。SW480^{control}的粘附细胞数与 SW480 细胞差异无统计学意义 ($P = 0.334$)。粘附性强弱顺序为 SW480^{CLD1} > SW480^{control} 和 SW480。表明提高 CLD1 表达后 SW480 细胞与 IV 型胶原基底的粘附力增强。见表 2,图 2。

表 2 基因转染 CLD1 对 SW480 细胞与 IV 型胶原粘附的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	异质粘附细胞数
SW480 *	6	25.33 ± 1.50
SW480 ^{control} **	6	24.17 ± 1.17
SW480 ^{CLD1}	6	43.00 ± 1.67
<i>F</i>	-	311.580
<i>P</i>	-	0.000

注: * 与 SW480^{CLD1} 比较差异有统计学意义, $P = 0.000$; # 与 SW480 比较差异无统计学意义, $P = 0.188$

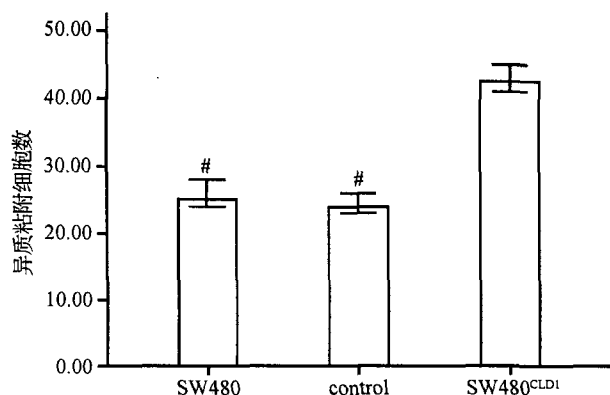


图 2 基因转染 CLD1 对 SW480 细胞与 IV 型胶原粘附的影响图

3 讨论

3.1 癌细胞的侵袭与转移过程 为多步骤过程,大致可分为以下几步^[5-8]: (1) 肿瘤细胞之间相互粘合减弱,细胞连接松散从而导致肿瘤细胞从瘤体脱落。(2) 肿瘤细胞破坏并穿过基底膜,侵袭基底膜下的结缔组织。(3) 侵袭并穿过血管或淋巴管壁进入血液循环或淋巴系统,并在其中存活下来。(4) 在血液或淋巴中形成瘤栓停滞于小血管腔。(5) 粘附于脉管内皮细胞并使之回缩暴露出内皮下基膜,分泌蛋白水解酶破坏基膜,迁移并穿出脉管。(6) 在远处组织、器官中增殖,长入新的血管,形成转移瘤。因此,癌细胞粘附运动是肿瘤侵袭转移的重要环节,运用粘附实验可证明肿瘤细胞的转移潜能。

3.2 细胞同质粘附实验的意义 同质粘附指的是相同细胞之间的粘附,同质粘附的提高不利于肿瘤细胞与母体分离并侵犯基底膜等正常组织向外转移,它的降低是肿瘤脱离原发灶的前提^[9]。我们在实验中发现转染 CLD1 上调其基因后,SW480 细胞的内质粘附细胞数量减少,说明 CLD1 抑制同质细胞之间的粘附,使细胞之间松散、分离、脱落,易于远处转移。

3.3 细胞异质粘附实验的意义 基底膜是癌细胞侵袭、迁移的天然屏障,为以 IV 型胶原为主的三维网络结构。在转移过程中,恶性肿瘤细胞先与基底膜或细胞外基质粘附,然后释放和激活多种蛋白水解酶降解基底膜和细胞外基质,在趋化因子、自分泌以及旁分泌生长因子等作用下定向迁移到达靶组织,克隆增殖形成转移灶。侵袭和转移过程的任一环节均有可能影响肿瘤的转移能力,其中肿瘤细胞对基底膜成分粘附能力的强弱,对肿瘤细胞的侵袭转移过程有重要影响。因此,肿瘤细胞与基底膜的粘附性,是反映肿瘤细胞侵袭、转移能力的主要指标,即细胞-基质粘附性越强,肿瘤的侵袭转移能力越强^[10]。异质粘附是肿瘤细胞与细胞外基质之间的粘附。异质粘附是肿瘤侵袭转移的前提,提示侵犯基底膜的能力。我们发现上调 CLD1 表达后,SW480 细胞与 IV 型胶原粘附的细胞数量增多,说明提高 CLD1 表达后 SW480 细胞与 IV 型胶原粘附性增加,CLD1 可促进癌细胞对基底膜的粘附。

综上所述,本实验说明 CLD1 可减少大肠癌 SW480 细胞之间的粘附性,使癌细胞之间细胞连接松散,导致肿瘤细胞从瘤体松散、分离、脱落,易于远处转移;同时也增加 SW480 细胞与基底膜的粘附性,利于肿瘤细胞穿过基底膜,侵袭基底膜下的结缔组织,粘附于脉管内皮下基膜,利于迁移并穿出脉管,在远处组织、器官形成转移瘤。此结果为进一步研究 CLD1 对大肠癌细胞的影响提供了理论基础。

参考文献

- 1 Singh AB, Sharma A, Smith JJ. Claudin-1 up-regulates the repressor ZEB-1 to inhibit E-cadherin expression in colon cancer cells [J]. Gastroenterology, 2011, 141(6):2140-2153.
- 2 陈琳,黄宝琴,冯国生,等.激光共聚焦显微镜检测大肠癌细胞株中 claudin-1 的表达[J].广东医学,2009,30(11):1259-1261
- 3 陈琳,姜泊,张亚历,等.运用 FQ RT-PCR 和 Western-blot 检测 Claudin-1 在人类大肠癌细胞株表达[J].广西医科大学学报,2007,24(2):205-207
- 4 陈琳,姜泊,张亚历,等.紧密连接蛋白 claudin-1 基因的克隆

- 和大肠癌细胞表达载体的构建[J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(3): 349-351
- 5 Huo Q, Kinugasa T, Wang L, et al. Claudin-1 protein is a major factor involved in the tumorigenesis of colorectal cancer[J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(3): 851-857.
- 6 陈琳, 黄宝琴, 黄景宁, 等. 紧密连接蛋白 Claudin-1 与肿瘤关系的研究进展[J]. *内科*, 2008, 3(5): 774-775
- 7 Chao YC, Pan SH, Yang SC, et al. Claudin-1 is a metastasis suppressor and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 179(2): 123-133.
- 8 Wanka S, Kappl M, Wolkenhauer M, et al. Measuring adhesion forces in powder collectives by inertial detachment[J]. *Langmuir*, 2013, 29(52): 16075-16083.
- 9 Zumwalde NA, Domae E, Mescher MF, et al. ICAM-1-dependent homotypic aggregates regulate CD8 T cell effector function and differentiation during T cell activation[J]. *Immunol*, 2013, 191(7): 3681-3693.
- 10 Richard M, Jamet S, Fouquet C, et al. Homotypic and heterotypic adhesion induced by odorant receptors and the β 2-adrenergic receptor[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): 80-100.
- [收稿日期 2014-02-24][本文编辑 杨光和 蓝斯琪]

课题研究 · 论著

壮医通路酒皮肤毒性动物实验研究

曾平, 梁景超, 秦刚, 黄瑾明, 冯纬纭

基金项目: 广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项课题(编号: GZYZ1103; GZMZ1206)

作者单位: 530023 南宁, 广西中医药大学第一附属医院骨科(曾平, 秦刚), 壮医科(黄瑾明), 皮肤科(冯纬纭); 530001 南宁, 广西中医药大学 2012 级研究生(梁景超)

作者简介: 曾平(1971-), 女, 医学博士, 博士后, 副教授, 研究方向: 关节炎的防治。E-mail: zengpinggxzyxy@sina.com

【摘要】目的 观察实验家兔皮肤接触壮医通路酒后的毒性反应。方法 以实验家兔为试验动物, 选取体重(2.5 ± 0.25) kg 的家兔按雌雄各半标准随机分组并造模, 用壮医通路酒涂于创面, 以米酒作对照, 观察各组皮肤反应。结果 与对照组比较, 用药后实验用药各组家兔的正常皮肤和破损皮肤均无急性毒性、长期毒性及皮肤刺激反应, 并且实验用药组与对照组对比无明显差异($P > 0.05$)。结论 壮医通路酒皮肤局部用药治疗痹证有较好的安全性。

【关键词】兔; 壮医通路酒; 皮肤长期毒性; 皮肤急性毒性; 皮肤刺激性

【中图分类号】R 965 【文献标识码】A 【文章编号】1674-3806(2014)05-0397-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2014.05.04

Animal experimental study of dermal toxicity of Zhuangyi Tonglu Medicinal Liquor ZENG Ping, LIANG Jing-chao, QIN Gang, et al. *The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China*

【Abstract】Objective To observe toxic reactions in the experimental rabbits after skin touching the Zhuangyi Tonglu Medicinal Liquor. Methods The experimental rabbits weighing (2.5 ± 0.25) kg were used as testing animal, then randomly divided into groups and molded according to the half genders standard. Each experimental groups were smeared Zhuangyi Tonglu Medicinal Liquor onto the wound or the normal skin while the control group was smeared rice wine. Dermal reactions of different groups were observed. Results The normal and wounded skin of rabbits in different groups showed no acute toxicity and long term toxicity, and Zhuangyi Tonglu Medicinal Liquor did not cause dermal irritation of rabbits. The experimental groups showed no significant difference compared with the control group ($P > 0.05$). Conclusion Treating arthralgia syndrome with Zhuangyi Tonglu Medicinal Liquor by the means of topical skin smearing has reasonable security.

【Key words】Rabbits; Zhuangyi Tonglu Medicinal Liquor; Acute toxicity; Long term toxicity; Dermal irritation