

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.04.018

过表达 CDX2 抑制裸鼠结肠癌移植瘤的生长

Over-expression CDX2 inhibits growth of colorectal transplanted tumors in nude mice

任海亮,孙学军,郑见宝,王炜,王伟,成亮(西安交通大学医学院第一附属医院 普外科,陕西 西安 710061)

[摘要] 目的:探讨过表达 CDX2 对结肠癌 LoVo 细胞裸鼠皮下移植瘤的抑制作用,为结肠癌生物治疗提供实验依据。方法:脂质体法介导 pEGFP-C1-CDX2 真核表达载体转染入结肠癌 LoVo 细胞, G418 筛选出稳定表达 CDX2 的 LoVo 细胞(LoVo-CDX2 细胞);接种 LoVo-CDX2 细胞制备裸鼠皮下移植瘤模型,观察 CDX2 过表达对 LoVo 细胞移植瘤生长的影响。结果:Western blotting 结果显示,转染 pEGFP-C1-CDX2 组 LoVo 细胞中 CDX2 蛋白表达量高于 pEGFP-C1 组及未转染组。LoVo-CDX2、LoVo-C1 和 LoVo 细胞接种裸鼠的第 20 天,LoVo-CDX2 组移植瘤质量较 LoVo 组和 LoVo-C1 组移植瘤质量显著减轻[(0.62 ± 0.22) vs (2.10 ± 0.78)、(2.56 ± 0.76)g,分别 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$]。结论:CDX2 过表达可以抑制结肠癌 LoVo 细胞裸鼠移植瘤的生长。[关键词] CDX2 基因;结肠癌;移植瘤;生长抑制

[中图分类号] R735.3⁺5; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)04-0434-03

结直肠癌是临床最常见的恶性肿瘤之一,其发病率占消化道肿瘤的第 3 位。我国在新近制订的《中国癌症预防与控制规划纲要(2004~2010年)》中已将结直肠癌与肺癌、乳腺癌、肝癌、食管癌、胃癌、宫颈癌和鼻咽癌列为我国现阶段重点防治的 8 大癌症^[1]。基因系尾型同源盒基因 2(caudal homeobox gene 2, CDX2)属肠道特异性转录因子,主要负责调控肠上皮细胞的分化和表型的维持^[2],与结直肠癌的发生、发展密切相关^[3-4]。结直肠癌中存在 CDX2 蛋白表达的缺失,且其缺失程度与结直肠癌病理分期存在相关性,肿瘤恶性程度越高 CDX2 表达缺失越严重^[5-7],提示 CDX2 可能是一种抑癌基因。目前人为将 CDX2 基因导入结肠癌细胞后进行动物研究的相关报道较少。鉴于此,本研究拟通过构建好的含 CDX2 的真核表达载体转染结肠癌 LoVo 细胞株,筛选出稳定转染 CDX2 的单克隆 LoVo 细胞株(LoVo-CDX2 细胞),将其种植于裸鼠皮下,探讨 CDX2 对结肠癌生长的影响。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂、细胞株与裸鼠

人结肠癌 LoVo 细胞系购自中国科学院上海细胞库,培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,取生长状态良好的细胞进行实验。质粒 pEGFP-C1 和 pEGFP-C1-CDX2 由本实验室保存^[8]。胎牛血清、DMEM 细胞培养基、脂质体 Lipofectamine 2000 和 G418 均购自美国 Invitrogen 公司。18 只 4 周雄性 BALB/c 裸鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物合格

证号为 SCXK(沪)2007-0005。

1.2 pEGFP-C1-CDX2 转染 LoVo 细胞

在无茵 24 孔培养板中接种处于对数生长期的 LoVo 细胞(1×10^5 /孔),过夜培养至细胞 90% 融合。按照脂质体 Lipofectine 2000 试剂盒说明书,将构建好的真核表达载体 pEGFP-C1-CDX2 与空载体 pEGFP-C1 分别转染 LoVo 细胞,转染 24 h 后荧光显微镜下观察绿色荧光的表达情况。转染 48 h 后,加入含 G418 选择性培养基(G418 600 μg/ml)筛选 14 d,获得稳定表达 CDX2 的多克隆 LoVo 细胞株。有限稀释法挑选单克隆细胞株(稳定表达 CDX2 的 LoVo-CDX2 或稳定表达空载体的 LoVo-C1 细胞),用选择性培养基(G418 300 μg/ml)维持培养^[9]。

1.3 Western blotting 检测 LoVo 细胞中 CDX2 蛋白的表达

收集 LoVo-CDX2、LoVo-C1 和 LoVo 细胞各 5×10^6 个,使用细胞裂解液提取蛋白。用 BCA 法进行蛋白含量测定。取 75~100 μg 蛋白行 10% SDS-PAGE,然后转移至硝酸纤维素膜,5% 脱脂奶 37 °C 封闭 1 h,加入兔抗人 CDX2 抗体,于 4 °C 孵育过夜;加入羊抗兔抗体 IgG 常温孵育 1 h,在凝胶成像仪内曝光成像,以 β-actin 为内参照。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30672070, No. 30400430)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30672070, No. 30400430)

[作者简介] 任海亮(1982-),男,河北省秦皇岛市人,硕士生,主要从事消化道肿瘤的基础与临床研究。E-mail: rhl2112@163.com

[通信作者] 孙学军(SUN Xue-jun, corresponding author), E-mail: sunxy@mail.xjtu.edu.cn

1.4 裸鼠移植瘤模型的建立

BALB/c 裸鼠随机分为 3 组(LoVo-CDX2、LoVo-C1 和 LoVo 细胞组), 每组 6 只。收集处于对数生长期的各组细胞, 于每组裸鼠后背部皮下注射 0.2 ml 各组细胞, 细胞密度均为 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 。细胞种植完成后, 每天观察并记录肿瘤出现时间。肿瘤形成后, 继续观察 20 d, 每 2 d 用游标卡尺测量肿瘤的长径 a 和短径 b , 并计算肿瘤体积 ($V = \pi/6 \times ab^2$), 绘制肿瘤生长曲线。于第 20 d 断颈处死裸鼠, 摘取移植瘤称质量, 并计算抑瘤率。抑瘤率 (%) = (LoVo-C1 组瘤质量 - LoVo-CDX2 组瘤质量) / LoVo-C1 组瘤质量 $\times 100\%$ 。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS13.0 统计学软件进行方差分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 稳定表达 CDX2 的 LoVo 细胞的筛选及鉴定

通过 G418 (600 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 筛选稳定转染 pEGFP-C1-CDX2 的 LoVo 细胞, 荧光显微镜下可见细胞内绿色荧光持续表达(图 1A)。Western blotting 结果(图 1B)显示, 野生型 LoVo 细胞本身有少量 CDX2 表达, 转染 pEGFP-C1-CDX2 组 LoVo 细胞中 CDX2 蛋白表达量高于 pEGFP-C1 组及未转染组。

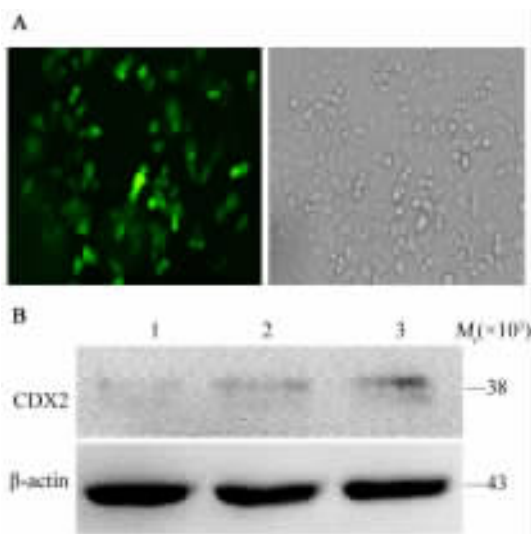


图 1 稳定表达 CDX2 的 LoVo 细胞的筛选及鉴定($\times 400$)

A 左: 荧光显微镜下观察($\times 400$); A 右: 光镜下观察($\times 400$); B: Western blotting 法检测 CDX2 蛋白的表达; 1: Untreated; 2: pEGFP-C1; 3: pEGFP-C1-CDX2

2.2 CDX2 抑制 LoVo 细胞裸鼠移植瘤的生长

LoVo-CDX2、LoVo-C1 和 LoVo 细胞接种裸鼠后 8 ~ 10 d, 均可于裸鼠皮下触及肿瘤。接种后 10 d, 每 2 d 测量肿瘤大小, 绘制肿瘤生长曲线。结果(图 2)可见, LoVo-CDX2 细胞移植瘤的生长明显慢于 LoVo-C1 和 LoVo 细胞($P < 0.05$)。说明, CDX2 可抑制 LoVo 细胞裸鼠移植瘤的生长。

第 20 天处死荷瘤裸鼠, 取瘤称瘤质量, LoVo-CDX2 组移植瘤质量较 LoVo 组和 LoVo-C1 组移植瘤质量显著减轻[LoVo-CDX2 vs LoVo: (0.62 ± 0.22) vs (2.10 ± 0.78)g, $P < 0.01$; LoVo-CDX2 vs LoVo-C1: (0.62 ± 0.22) vs (2.56 ± 0.76)g, $P < 0.05$]。而 LoVo 组和 LoVo-C1 组移植瘤的差异没有统计学意义($P > 0.05$)。

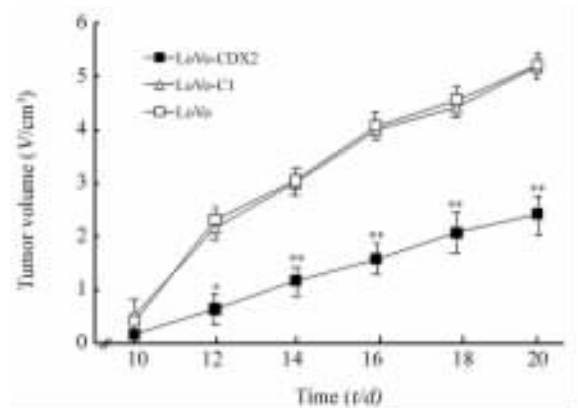


图 2 CDX2 抑制 LoVo 细胞裸鼠移植瘤的生长

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs LoVo group or LoVo-C1 group

3 讨论

CDX2 基因最初在果蝇的保守序列中发现, 是果蝇尾部 Caudal 同源基因家族成员之一。CDX2 对肠道上皮细胞的增殖、分化、柱状形态以及极化的形成和维持起着重要作用^[10-11]。在人体, CDX2 是一种具有较高敏感性的肠上皮特异标志物, 除肠道上皮外其他各系统正常上皮内较少检测到 CDX2 的表达^[12]。前期研究^[13]发现, CDX2 在正常大肠组织中的表达显著高于结直肠癌组织; 随着结直肠癌分化程度降低, CDX2 蛋白的表达明显减少; 有淋巴结转移组 CDX2 蛋白的表达明显少于无淋巴结转移组; CDX2 在结直肠癌 Dukes A 期到 D 期的表达依次减少, 提示 CDX2 参与结直肠癌的发生。CDX2 的表达与结直肠癌的恶性程度呈负相关, 恶性程度高、浸润转移能力强的肿瘤, CDX2 表达减少^[14]。以上实验结果说明, CDX2 在结直肠癌发生、发展的扮演了肿瘤抑制基因的角色, CDX2 表达降低可能是结直

肠癌细胞分化停止的主要原因,上调 *CDX2* 的表达可能抑制结直肠癌细胞的生长。

本研究给裸鼠接种 LoVo-*CDX2*、LoVo-C1 以及野生型 LoVo 细胞,接种后 8~10 d,裸鼠可以触及皮下肿瘤,且接种 LoVo-*CDX2* 细胞裸鼠的肿瘤生长相对其他两组明显减慢 ($P < 0.05$),而 LoVo-C1 组和 LoVo 组的差异无统计学意义,说明 *CDX2* 在 LoVo 细胞中的过表达能够抑制移植瘤的生长。本研究结果支持前期研究得出的结论:结肠癌中 *CDX2* 基因表达下降可加速肿瘤的恶性生长、*CDX2* 低表达可能与结肠癌的恶性程度和浸润转移有关^[13]。因此, *CDX2* 蛋白可能是一种重要的肿瘤抑制蛋白,可能是肿瘤生物靶向治疗的新靶点。

[参考文献]

- [1] 卫生部. 中国癌症预防与控制规划纲要(2004~2010) [J]. 中国肿瘤, 2004, 13(2): 65-68.
- [2] Grainger S, Savory JG, Lohnes D. *CDX2* regulates patterning of the intestinal epithelium [J]. *Dev Biol*, 2010, 339(1): 155-165.
- [3] Baba Y, Noshō K, Shima K, et al. Relationship of *CDX2* loss with molecular features and prognosis in colorectal cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(14): 4665-4673.
- [4] Wani Y, Notohara K, Nakatani Y, et al. Aberrant nuclear *CDX2* expression in morule-forming tumours in different organs, accompanied by cytoplasmic reactivity [J]. *Histopathology*, 2009, 55(4): 465-468.
- [5] Winn B, Tavares R, Matoso A, et al. Expression of the intestinal biomarkers Guanylyl cyclase C and *CDX2* in poorly differentiated colorectal carcinomas [J]. *Hum Pathol*, 2010, 41(1): 123-128.
- [6] Bakaris S, Cetinkaya A, Ezberci F, et al. Expression of homeodomain protein *CDX2* in colorectal adenoma and adenocarcinoma [J]. *Histol Histopathol*, 2008, 23(9): 1043-1047.
- [7] 李伟华, 王宗敏, 鲁杰琼, 等. *CDX2* 在结肠癌组织中的表达及其临床意义 [J]. *浙江医学*, 2009, 31(7): 924-926.
- [8] 李守帅, 孙学军, 郑见宝, 等. 尾型同源盒基因-2 过表达对结肠癌细胞生物学性状的影响 [J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2011, 32(1): 114-118.
- [9] 王玮, 孙学军, 郑见宝, 等. 缺氧促进 5HRE 和 AFPP 调控的 NTR/CBI954 自杀基因系统特异杀伤 HepG2 细胞 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16(2): 125-129.
- [10] Kawai H, Tomii K, Toyooka S, et al. Promoter methylation down-regulates *CDX2* expression in colorectal carcinomas [J]. *Oncol Rep*, 2005, 13(3): 547-551.
- [11] Keller MS, Ezaki T, Cuo RJ, et al. *CDX1* or *CDX2* expression activates E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and compaction in human colo 205 cells [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, 287(1): 104-114.
- [12] Werling RW, Yaziji H, Bacchi CE, et al. *CDX2*, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: An immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas [J]. *Am J Surg Pathol*, 2003, 27(3): 303-310.
- [13] Zheng J, Sun X, Wang W, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α modulates the down-regulation of the homeodomain protein *CDX2* in colorectal cancer [J]. *Oncol Rep*, 2010, 24(1): 97-104.
- [14] Choi BJ, Kim CJ, Cho YG, et al. Altered expression of *CDX2* in colorectal cancers [J]. *APMIS*, 2006, 114(1): 50-54.

[收稿日期] 2011-04-12

[修回日期] 2011-06-18

[本文编辑] 王莹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

化学元素和核素符号规范书写的要求

化学符号虽然是化学专业的学术交流语言,但在生物医学领域也有很广泛的使用。化学符号的书写有其特殊的规律和要求,生物医学论文中必须重视化学符号书写的规范化。根据 GB3102.8-93《物理化学和分子物理学的量和单位》的规定,把化学元素和核素符号书写的规范要求介绍如下:

- (1) 元素或核素的单字母符号均用正体大写,双字母符号首字母正体大写,第二个字母用正体小写。
- (2) 核素的核子数(质子数)应标注在元素符号的左上角,例如:⁶⁰Co, ³²P, ^{99m}Tc, ¹²⁵I 等;过去习惯把核子数标注在元素符号右上角的写法是错误的,例如: N¹⁴, Co⁶⁰ 等。
- (3) 离子价态的字符应标注在元素符号的右上角,例如: H⁺, Cl⁻, O²⁻, Mg²⁺, Al³⁺, PO₄³⁻ 等,不应写成 O⁻², O⁻⁻, Mg⁺², Mg⁺⁺, Al⁺⁺⁺, PO₄⁻³ 等。
- (4) 激发态的字符(电子激发态用 *; 核子激发态用正体 m, 也可用 *)标注在元素或核素符号的右上角,例如: ¹¹⁰Ag^m, ¹¹⁰Ag*, He*, NO* 等。
- (5) 分子中核素的原子数标注在核素符号右下角,例如: H₂, FeSO₄ 等。
- (6) 质子数(原子序数)标注在元素符号左下角,例如: ₈₂Pb, ₂₆Fe 等。
- (7) 对于形状相似的元素符号、化合物的化学式符号,书写时应注意区分,如: Co(钴)—CO(一氧化碳), No(锿)—NO(一氧化氮), Ba(钡)—Ra(镭), Nb(铌)—Nd(钕)—Np(钚), Hf(铪)—Hf(铪) 等。

(本刊编辑部)