

· 论 著 ·

PDGF-B 慢病毒载体的构建及其对 SGC7901 胃癌细胞侵袭能力的影响

郭 轶¹, 尹江燕², 卢小刚¹, 王子卫^{3△}(1. 重庆市中医院普外科, 重庆 400021; 2. 重庆医科大学附属第一医院超声科, 重庆 400016;
3. 重庆医科大学附属第一医院胃肠外科, 重庆 400016)

摘要:目的 构建血小板源性生长因子 B(PDGF-B)慢病毒载体, 建立 PDGF-B 稳定过表达的 SGC7901 胃癌细胞株并观察 PDGF-B 对 SGC7901 胃癌细胞侵袭能力的影响。方法 采用四质粒系统构建 PDGF-B 慢病毒载体, 转染 293T 细胞包装获得高滴度病毒颗粒; 以病毒颗粒转染 SGC7901 细胞, 通过荧光显微镜观察转染效果, 并用免疫印迹法检测 PDGF-B 的蛋白表达; 用 Transwell 试验观察 SGC7901 细胞侵袭能力的变化。结果 通过 PCR 及酶切鉴定成功构建 PDGF-B 载体; 包装并得到高滴度的病毒颗粒; 成功转染 SGC7901 细胞后, 免疫印迹法检测到 PDGF-B 蛋白表达明显升高; Transwell 试验证明 PDGF-B 过表达增强 SGC7901 细胞侵袭能力。结论 成功构建并包装获得 PDGF-B 慢病毒颗粒, 建立 PDGF-B 稳定过表达 SGC7901 胃癌细胞株, 证明 PDGF-B 过表达可增强胃癌细胞侵袭转移能力。

关键词:血小板源性生长因子; 慢病毒属; 胃肿瘤; 侵袭

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.18.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)18-2260-04

Construction of lentiviral vector pLeno-DCE-PDGF-B and its effect on invasion ability of SGC7901 gastric carcinoma cells

Guo Yi¹, Yin Jiangyan², Lu Xiaogang¹, Wang Ziwei^{3△}(1. Department of General Surgery, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 400021, China;
2. Department of Ultrasound, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3. Department of Gastrointestinal Surgery, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To construct a lentiviral vector that stably express platelet-derived growth factor B (PDGF-B) and to investigate effect of PDGF-B overexpression on invasion of SGC7901 gastric carcinoma cell. **Methods** The lentiviral vector pLeno-DCE-PDGF-B was constructed and transfected into 293T cells. The supernatant containing the lentivirus particles was harvested to determine the virus titer and high titer lentivirus particles was gathered. Then PDGF-B lentiviral vector was transfected into SGC7901 cells for construction of stable PDGF-B overexpression SGC7901 cells. Western-blot and immunofluorescence were used for evaluation of the construction of stable PDGF-B overexpression SGC7901 cells. Transwell test was used for detection the invasion of SGC7901 cells. **Results** The lentiviral vector was correctly constructed and verified by sequencing. High titer PDGF-B lentiviral particles were acquired successfully. After transfection, SGC7901 cells were green color by detection of fluorescence microscope; and the expression of PDGF-B protein in transfected SGC7901 cells were much higher than that in normal SGC7901 cells. Also, PDGF-B overexpression increased the invasion ability of SGC7901 cells. **Conclusion** The PDGF-B lentiviral particles are obtained after successful construction and package. The stable PDGF-B overexpression SGC7901 gastric carcinoma cell line is established, which proves that the PDGF-B overexpression might increase the invasion ability of gastric carcinoma cells.

Key words: platelet-derived growth factor; lentivirus; stomach neoplasms; invasion

在过去的几个世纪, 胃癌的发病率和病死率呈下降趋势^[1], 但胃癌仍是最常见的恶性肿瘤死亡原因之一^[2]。外科手术联合辅助化疗是当前胃癌的主要治疗方法, 但是可根治性切除的胃癌患者的 5 年生存率仍低于 30%^[3-4]。肿瘤转移是恶性肿瘤的主要特征之一, 并且是导致恶性肿瘤患者死亡的主要因素。近期许多研究发现血小板源性生长因子 B (platelet-derived growth factor B, PDGF-B) 信号通路在多种恶性肿瘤中高表达, 与肿瘤的发生、进展和转移密切相关^[5-9]; 但 PDGF-B 信号通路在胃癌转移中的作用机制尚不清楚。因此, 为进一步研究 PDGF-B 在胃癌转移中的作用, 本研究通过构建 PDGF-B 的慢病毒载体, 建立 PDGF-B 稳定过表达的胃癌细胞系, 并进一步观察其对胃癌细胞侵袭转移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和细胞 四质粒慢病毒载体 (pRsv-REV、pMDlg-pRRE、pMD2G、Transfer Vector)、DH5 α 由 Western Technology 实验室提供。SGC7901 胃癌细胞株、293T 细胞购自中科院上海细胞所。SGC7901 用含有 10% 胎牛血清 (FBS, PAA 公司) 的 RPMI1640 (PAA 公司) 培养, 293T 细胞用含 10% FBS 的 DMEM (PAA 公司) 培养。DL2000 DNA ladder、Taq polymerase、T4 DNA ligase、Not I、EcoR I (Takara 公司); NucleoBond Xtra Midi Plus (MACHEREY-NAGEL 公司); 引物合成与测序 (上海生工); 琼脂糖 (赛百盛公司); PDGF-B 抗体 (Santa Cruz); GAPDH (GenScript 公司); ECL (Biological Industries)。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒载体构建 根据 Genbank 中 PDGF-B(NM_002608.2) 的序列,设计引物 KL-PDGF-B-F: 5'-ATG AAT CGC TGC TGG GCG CTC-3', KL-PDGF-B-R: 5'-CTA GGC TCC AAG GGT CTC CTT C-3'。用 PCR 进行扩增后将产物接入 pLenO-DCE 载体,挑选阳性克隆送上海生工测序。测序正确的 pLenO-DCE 和 pLenO-PDGF-B 分别用 *EcoR* I、*Not* I 酶切后构建成 pLenO-DCE-PDGF-B 慢病毒载体。

1.2.2 慢病毒包装 胰酶消化对数生长期的 293T 细胞,接种于 10 cm 细胞培养皿,37 °C,50 mL/L CO₂ 培养箱内培养。当细胞密度达 60%~70%时将各质粒和磷酸钙混合液转移至细胞的培养液中;混匀后培养 6~8 h 弃去含有转染混合物的培养液。清洗后每瓶细胞中加入含 10%FBS 的 DMEM 培养液 6 mL,继续培养 72 h。收集转染 72 h 的 293T 细胞上清液,将上清液于 4 °C,4 000 r/min 离心 10 min,再将上清液以 0.45 μm 滤器过滤。超速离心(25 000 r/min)2 h;而后以冰 PBS 液重旋病毒沉淀于 4 °C 溶解过夜。

1.2.3 慢病毒滴度测定 293T 细胞铺板,96 孔板每孔中加 1×10⁵ 个细胞,体积为 100 μL。根据病毒的预期滴度,准备 7~10 个无菌的 Ep 管,在每个管中加入不同体积病毒原液并稀释至 100 μL。选取所需的培养孔,吸去 90 μL 培养基,加入等量稀释好的病毒溶液。培养 24 h 后,加入新鲜培养基 100 μL;4 d 后观察细胞生长状况,并收取细胞用流式细胞仪进行病毒滴度测定。

1.2.4 细胞转染 调整预转染细胞浓度为 1×10⁵ 个/mL,培养于 6 孔板中,在 5% CO₂ 37 °C 恒温箱孵育 24 h。然后将慢病毒和磷酸钙混合液按感染指数 10:1 转移至含单层细胞的培养液中并混匀,培养 6~8 h 后弃去含有转染混合物的培养液。最后 PBS 冲洗 3 次,在 6 孔板每个孔中加入 1 mL RPMI1640 培养基。5% CO₂ 37 °C 恒温箱孵育 48 h 后,免疫荧光显微镜观察转染效果。

1.2.5 Western blot 检测 收集转染前、后的细胞,提取总蛋白。50 μg 蛋白裂解液经 12% 丙烯酰胺凝胶电泳后,行 PVDF 转膜,并用 5% BSA 封闭 1 h。封闭后的膜加 PDGF-B 一抗(1:1 000)4 °C 孵育过夜,次日用 HRP 标记的二抗孵育 1 h,

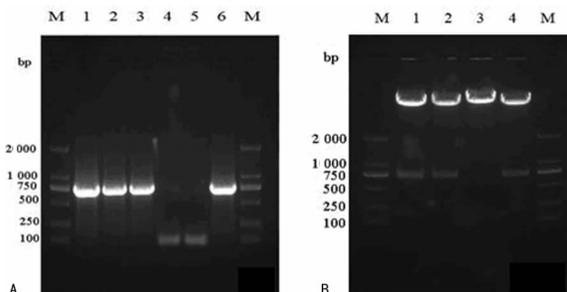
ECL 显色曝光。GAPDH 作为内参。

1.2.6 Transwell 试验检测细胞侵袭能力 取出侵袭小室,加入 30 μL RPMI1640 放入 CO₂ 孵箱待用。调整细胞浓度为 1×10⁵ 个/mL,取 50 μL 细胞悬液加入侵袭小室上室,然后加入完全培养基 250 μL,放入 CO₂ 孵箱培养 24 h。移去小室中的培养基,抹除基质胶表面未侵袭的细胞,加入 95% 乙醇固定 40 min。PBS 冲洗 2 次(3 min/次),锥虫蓝染色 5 min,风干小室,用手术刀切下膜;在光学显微镜下计数下层细胞并采集图像,每孔计数 5 个视野。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数比较用独立样本 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

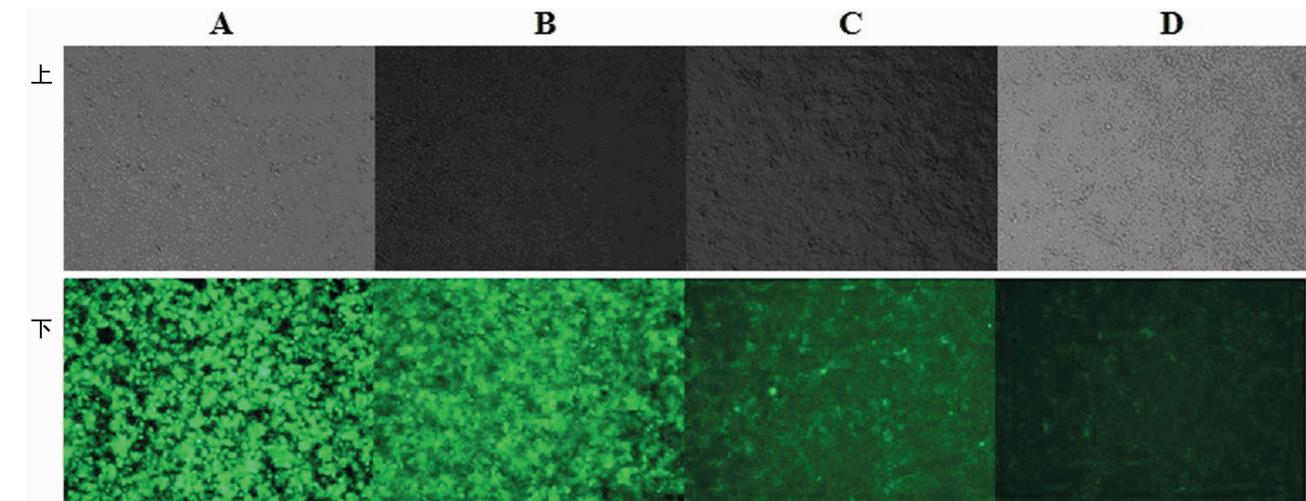
2 结 果

2.1 慢病毒载体 pLeno-DCE-PDGF-B 的构建及鉴定 通过基因库查询 PDGF-B 的基因编码,根据查询结果设计 PCR 引物。采用 PCR 方法扩增 PDGF-B 基因,然后把扩增产物连接于 pLenO-DCE 载体,通过 PCR 鉴定获得 pLenO-DCE-PDGF-B 阳性克隆(图 1A)。将 PCR 和酶切鉴定正确的克隆送华大基因测序。通过测序得到了正确的 pLenO-DCE-PDGF-B(图 1B),用于包装慢病毒。



A: pLeno-DCE-PDGF-B 的 PCR 鉴定,1~3、6: 阳性克隆,4、5: 阴性克隆;B: pLeno-DCE-PDGF-B 的 PCR 与酶切鉴定,1、2、4 号克隆鉴定正确,3: 克隆鉴定错误;M: DL2000 DNA 标记物。

图 1 PDGF-B 慢病毒载体的构建及鉴定



A: 慢病毒包装时质粒转染 293T 细胞 48 h 后的图像;B~D: 1.00、0.10、0.01 μL 慢病毒颗粒感染 293T 细胞 48 h 后的图像;上: 可见光;下: 荧光图像。

图 2 慢病毒的包装及滴度测定

2.2 慢病毒制备及滴度测定 pLeno-DCE-PDGF-B 与其他载

体共转染 293T 细胞 48 h 后,绿色荧光蛋白(green fluorescent

protein, GFP) 表达逐渐增强(图 2A)。收集病毒上清并过滤离心得到高滴度的慢病毒颗粒。根据病毒预期滴度,通过倍比稀释的方法以不同浓度(1.00、0.10、0.01 μL)感染 293T 细胞,48 h 后观察 GFP 表达情况(图 2B~D),并取 0.10 μL DCE-PDGF-B 慢病毒感染的 293T 细胞上流式细胞仪检测阳性细胞比率,计算得到慢病毒滴度为 8.7×10^8 TU/mL。

2.3 PDGF-B 过表达胃癌细胞株的免疫荧光观察及蛋白检测
转染 48 h 后,采用免疫荧光显微镜观察,见 PDGF-B 过表达 SGC7901 胃癌细胞株呈绿色荧光(图 3A~B)。PDGF-B 过表达 SGC7901 胃癌细胞株中 PDGF-B 蛋白水平(0.702 ± 0.042)明显高于常规 SGC7901 胃癌细胞中 PDGF-B 蛋白水平(0.021 ± 0.006),差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3C。

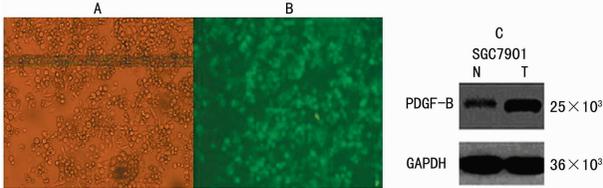


图 3 PDGF-B 在 SGC7901 胃癌细胞中的表达
A:可见光;B:荧光观察;C:Western Blot 检测 PDGF-B 蛋白表达;N:正常细胞;T:转染细胞。

图 3 PDGF-B 在 SGC7901 胃癌细胞中的表达

2.4 PDGF-B 对 SGC7901 细胞侵袭能力的影响 本研究通过 Transwell 试验检测 PDGF-B 过表达对 SGC7901 细胞侵袭能力的影响。结果显示,PDGF-B 过表达 SGC7901 细胞侵袭数为(65.4 ± 2.4)个,明显多于常规 SGC7901 细胞的(21.6 ± 1.6)个($P < 0.05$),见图 4。

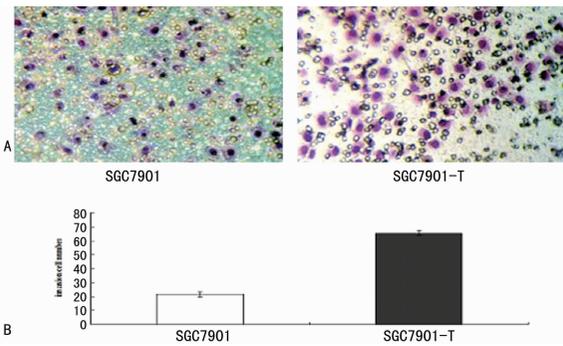


图 4 PDGF-B 过表达和常规 SGC7901 胃癌细胞的侵袭能力(T=转染细胞)

图 4 PDGF-B 过表达和常规 SGC7901 胃癌细胞的侵袭能力(T=转染细胞)

3 讨论

胃癌的转移机制尚不明确,是当前研究的热点。随着科学技术的进步,人类对于医学的研究越来越深入,分子水平的研究越来越广泛。许多研究证实,多种蛋白质、生长因子在恶性肿瘤的发生和发展中起重要作用^[10-12]。PDGF-B 是最早被发现的结缔组织生长因子之一,是 PDGF 家族的重要成员,早期研究发现 PDGF-B 能促进多种间质细胞的生长与分化;近期许多研究证实,PDGF-B 参与了多种恶性肿瘤的发生、发展和转移^[5-9]。通过对比胃癌组织与正常胃黏膜 PDGF-B 的蛋白表达,发现 PDGF-B 是与胃癌转移密切相关的蛋白^[13]。

为更好、更深入地研究这类分子在恶性肿瘤发生、发展和在转移中的作用机制,基因方面的研究成为最大的热点。基因载体是基因研究的重要组成部分,主要包括病毒载体和非病毒

载体^[14]。慢病毒载体因其稳定的细胞转染能力而被广泛运用于细胞转染方面的研究^[15]。当前最常用的慢病毒构建包装方式为:采用 PCR 法扩增和钩取目的基因,鉴定成功后连接载体并以瞬时转染 293T 细胞的方式生产病毒载体^[16-17]。将获得的高滴度病毒颗粒按比例转染可以获得目的基因稳定高表达的细胞株,为基因研究提供可靠的研究对象。本实验中,通过查询基因库获得 PDGF-B 的基因编码信息并成功构建其 PCR 引物;采取 PCR 扩增方法获得 PDGF-B 基因产物并与 pLeno-DCE 载体连接获得 pLeno-DCE-PDGF-B 慢病毒载体;行基因测序确定 pLeno-DCE-PDGF-B 慢病毒载体后瞬时转染 293T 细胞获得高滴度的 PDGF-B 慢病毒颗粒。并通过感染 SGC7901 胃癌细胞,构建了 PDGF-B 稳定表达 SGC7901-PDGF-B 细胞,进一步通过 Western blot 检测验证 PDGF-B 在 SGC7901-PDGF-B 细胞中稳定过表达。

有研究证实,肿瘤侵袭能力的增强在肿瘤的进展和转移过程中起极其重要作用^[18],高侵袭能力的肿瘤细胞可以快速地突破基底膜,使肿瘤细胞突入间质进而侵袭血管及淋巴管而诱发转移^[19]。并有许多研究指出,多种生长因子可以增强肿瘤细胞的侵袭能力^[20-21];所以增强肿瘤侵袭能力的生长因子是促进肿瘤进展和转移的重要因素。本实验发现,PDGF-B 可以明显提高胃癌细胞的侵袭能力,从而可能促进胃癌进展及转移;因此,PDGF-B 可能成为肿瘤靶向治疗的潜在靶点,但其具体作用机制尚待进一步阐明。

综上所述,采用慢病毒技术可成功构建 pLeno-DCE-PDGF-B 慢病毒载体并转染成功构建 PDGF-B 稳定过表达的胃癌细胞株,为研究 PDGF-B 信号通路与胃癌发生、发展转移的相关性奠定基础。同时 PDGF-B 过表达可以增强 SGC7901 胃癌细胞的侵袭能力,可能与胃癌的进展和转移相关。

参考文献:

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer Statistics 2009 [J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225-249.
- [2] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002 [J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108.
- [3] Alberts SR, Cervantes A, van de Velde CJH. Gastric Cancer: Epidemiology, Pathology and Treatment [J]. Ann Oncol, 2003, 14 Suppl 2: S31-36.
- [4] Green D, Ponce DL, Leon-Rodriguez E, et al. Adenocarcinoma of the stomach: univariate and multivariate analysis of factors associated with survival [J]. Am J Clin Oncol, 2002, 25(1): 84-89.
- [5] Liu KW, Hu B, Cheng SY. Platelet-derived growth factor signaling in human malignancies [J]. Chin J Cancer, 2011, 30(9): 581-584.
- [6] Cao Y, Cao R, Hedlund EM. Regulation of tumor angiogenesis and metastasis by FGF and PDGF signaling pathways [J]. J Mol Med, 2008, 86(7): 785-789.
- [7] Donnem T, Al-Saad S, Al-Shibli K, et al. Co-expression of PDGF-B and VEGFR-3 strongly correlates with lymph node metastasis and poor survival in non-small-cell lung cancer [J]. Ann Oncol, 2010, 21(2): 223-231.
- [8] Calzolari F, Appolloni I, Tutucci E, et al. Tumor Progress-

- sion and Oncogene Addiction in a PDGF-B-Induced Model of Gliomagenesis[J]. *Neoplasia*, 2008, 10(12):1373-1382.
- [9] Yu J, Ustach C, Kim HR. Platelet-derived growth factor signaling and human cancer [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2003, 36(1):49-59.
- [10] Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression[J]. *Nature Genetics*, 2001, 29(2):117-129.
- [11] Korc M, Friesel RE. The role of fibroblast growth factors in tumor growth[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2009, 9(5):639-651.
- [12] Yu H, Rohan T. Role of the Insulin-Like Growth Factor Family in Cancer Development and Progression[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92(18):1472-1489.
- [13] Guo Y, Yin JY, Zha L, et al. Clinicopathological significance of platelet-derived growth factor B, platelet-derived growth factor receptor- β , and E-cadherin expression in gastric carcinoma[J]. *Wspolczesna Onkol*, 2013, 17(2):150-155.
- [14] Mátrai J, Chuah MK, VandenDriessche T. Recent Advances in Lentiviral Vector Development and Applications[J]. *Molecular Therapy*, 2010, 18(3):477-490.
- [15] Romano G. Current Development of Lentiviral-Mediated Gene Transfer[J]. *Drug News Perspect*, 2005, 18(2):128-130.
- [16] Gustavo T, Oded S, Inder MV. Production and purification of lentiviral vectors [J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(1):241-245.
- [17] Bruce LL, Laurent MH, Jean B, et al. Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector [J]. *PNAS*, 2006, 103(46):17372-17377.
- [18] Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis [J]. *Cell*, 2001, 11(11):37-43.
- [19] Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis[J]. *Cellul Mol Life Sci*, 2000, 57(1):25-40.
- [20] Grugan KD, Miller CG, Yao Y, et al. Fibroblast-secreted hepatocyte growth factor plays a functional role in esophageal squamous cell carcinoma invasion[J]. *PNAS*, 2010, 107(24):11026-11031.
- [21] Wheeler SE, Suzuki S, Thomas SM, et al. Epidermal growth factor receptor variant III mediates head and neck cancer cell invasion via STAT 3 activation[J]. *Oncogene*, 2010, 29(37):5135-5145.

(收稿日期:2014-01-17 修回日期:2014-02-25)

(上接第 2259 页)

- epidemiology: Implications for prevention and management[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2002, 28(2):3-13.
- [4] Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, et al. The epidemiology of venous thromboembolism in the community [J]. *Thromb Haemost*, 2001, 86(1):452-463.
- [5] Stein PD, Beernath A, Olson RE. Obesity as a risk factor in venous thromboembolism [J]. *Am J Med*, 2005, 118(9):978-980.
- [6] Kucher N, Tapson VF, Goldhaber SZ, et al. Risk factors associated with symptomatic pulmonary embolism in a large cohort of deep vein thrombosis patients[J]. *Thromb Haemost*, 2005, 93(3):494-498.
- [7] Linnemann B, Zgouras D, Schindewolf M, et al. Impact of sex and traditional cardiovascular risk factors on the risk of recurrent venous thromboembolism: results from the German maistro registry[J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2008, 19(2):159-165.
- [8] Goldhaber SZ, Grodstein F, Stampfer MJ, et al. A prospective study of risk factors for pulmonary embolism in women[J]. *JAMA*, 1997, 277(8):642-645.
- [9] Goldhaber SZ, Savage DD, Garrison RJ, et al. Risk factors for pulmonary embolism: the framingham Study[J]. *Am J Med*, 1983, 74(6):1023-1028.
- [10] Tsai AW, Cushman M, Rosamond WD, et al. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism incidence: The longitudinal investigation of thromboembolism etiology[J]. *Arch Intern Med*, 2002, 162(10):1182-1189.
- [11] Hansson PO, Ericksson H, Welin L, et al. Smoking and abdominal obesity-Risk factors for venous thromboembolism among middle-aged Men; the study of men born in 1913[J]. *Arch Intern Med*, 1999, 159(16):1886-1890.
- [12] Glynn RJ, Rosner B. Comparison of risk factors for the competing risks of coronary heart disease, stroke, and venous thromboembolism [J]. *Am J Epidemiol*, 2005, 162(10):975-982.
- [13] Simon T, Beau Yon de Jonage-Canonico M, Oger E, et al. Indicators of lifetime endogenous estrogen exposure and risk of venous thromboembolism[J]. *J Thromb Haemost*, 2006, 4(1):71-76.
- [14] Cushman M, Kuller LH, Prentice R, et al. Estrogen plus progestin and risk of venous thrombosis [J]. *JAMA*, 2004, 292(13):1573-1580.
- [15] Di Minno G, Mannucci PM, Tufano A, et al. The first ambulatory screening on thromboembolism: a multicentre, cross-sectional, observational study on risk factors for venous thromboembolism [J]. *J Thromb Haemost*, 2005, 3(7):1459-1466.

(收稿日期:2013-12-08 修回日期:2014-02-22)