

人乳铁蛋白提高 MCF7 细胞放射敏感性的初步研究

王 勇, 于晓明, 杜利青, 杨青山, 田 源, 王 彦, 樊飞跃

中图分类号: R817.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2009)04-0385-02

【摘要】 目的 观察 hLF 对于人乳腺癌细胞放射敏感性的影响。方法 用 PBC1-hLF 载体转染 MCF7 细胞, 同时以 hLF 标准品处理为参照, 细胞活力实验、克隆形成试验和流式检测细胞凋亡来观察 hLF 基因高表达对 MCF7 细胞生长特性和放射敏感性的影响。结果 hLF 基因高表达可以显著抑制 MCF7 的生长, 提高其对射线的敏感性。hLF 可促进 MCF7 细胞自发和受照后的凋亡, 降低克隆形成能力。但胞外直接供给 hLF 却不能抑制 MCF7 的生长, 也不能显著提高其对射线的敏感性, 甚至有提高克隆形成能力的趋势。结论 hLF 基因高表达可以在体外显著抑制人乳腺癌 MCF7 细胞的生长, 提高其放射敏感性, 而直接供给 hLF 却没有上述作用。

【关键词】 hLF 细胞活力; 克隆形成; 细胞凋亡; 放射敏感性

The Primary Study of the radiosensitive effect on the MCF7 Cell Line by Human Lactotransferrin High Expression In vitro WANG Yong YU Xiao-ming DU Li-qing et al. Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China

【Abstract】 Objective To investigate the possible radiosensitive effect of human Lactotransferrin (hLF) high expression in breast cancer cell line MCF7, we hereby constructed and transfected a recombinant vector PBC1 containing exogenous hLF gene. Methods Firstly the recombinant plasmid PBC1-hLF is transferred into MCF7 and the hLF expression was evaluated by western blotting. Then we test the cell viability, apoptosis and clone formation after radiation along with the standard hLF treatment control. Results The hLF gene had been successfully transfected into MCF7 cells and hLF high expression can reduce the clone formation after radiation and inhibit the cell proliferation with induced apoptosis. But treatment with standard hLF outside of the cell does not work. Conclusions Our primary data shows that hLF high expression can radio sensitize the MCF7 cell in vitro while outside treatment have no such effect.

【Key words】 Human lactotransferrin Cell Viability, Clone Formation, Apoptosis, Radio Sensitization

人乳铁蛋白 (human lactotransferrin hLF, human lactoferrin hLF) 是铁结合蛋白, 在人乳汁中含量最高。hLF 具有抗菌和抗病毒活性^[1], 最近发现 hLF 可抑制肿瘤形成^[2]。hLF 可能通过激活 NK 细胞或提高 NK 靶细胞对于 NK 细胞的敏感性来抑制肿瘤形成^[3]。促进 IL、IFN 等细胞因子的表达, 进而激活免疫机体细胞功能^[4]。

1 材料与与方法

1.1 材料及主要试剂 PBC1-hLF 载体由本实验室构建, 人乳腺癌细胞 MCF7 细胞购自中国医学科学院细胞中心。Celltiter-Glo 试剂盒 (G756B) 购自 Promega 脂质体 LipofectamineTM 2000 以及引物合成和测序服务由 Invitrogen 提供。小鼠抗 hLF 单抗购自 Abcam, hLF 标准品购自 Sema (61326), 二抗购自北京中杉金桥。质粒 pMD19T-PB uescript SK(+), PCR 试剂盒购自 Takara 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染 MCF7 细胞 10% 胎牛血清的 1 640 培养基培养称 MCF7 对照组; 向培养基中添加 hLF 至 10⁻⁴ M 处理 24 h 称 hLF 处理组; 选择指数生长期的 MCF7 细胞, 消化计数按 1.0×10⁶ 接种 6 孔板中, 每孔 3 ml 10% 胎牛血清的 1 640 培养基培养。至细胞 90% 融合后改用无血清 Opti-MEM 培养, 按 Lipofectamine 说明书转染, 12 h 后转用含 10% 胎牛血清的 1 640 培养基培养称 PBC1-hLF 转染组。

1.2.2 Western 印记检测 hLF 表达水平 检测样品经 SDS/PAGE (10% 分离胶, 4% 浓缩胶) 电泳后, 半干转 PVDF 膜行蛋

白印记检测, 一抗 1:10 000 稀释, 二抗 1:2 000 稀释, ECL 显色显影, 内参 β -actin 结果见图 1。

1.2.3 细胞照射 细胞贴壁于培养瓶中, 照射时反置培养瓶, C₆₁₃₇ 辐射仪 0.82 Gy/min 照射 2.48 Gy。

1.2.4 细胞活性实验 将各组受照细胞以每孔 10 000 个转移至不透光 96 孔板, 按照 Celltiter 说明书操作, 荧光发光仪读板, 积分时间 0.25 s 记录数据作存活曲线图。

1.2.5 流式细胞凋亡检测 选择指数生长期的细胞, C₆₁₃₇ 照射 2.48 Gy 后, 70% 乙醇 4℃ 固定, 分析前 PBS 洗细胞 2 次, 再分散, 加 1 ml PI 工作液 (PBS 0.5 mg/mL RNase, 0.1 mg/mL Propidium iodide), 流式检测细胞周期分步和亚 G₁ 凋亡峰。结果图 2。

1.2.6 克隆形成实验 选择指数生长期的各组细胞室温照射不同剂量后, 梯度稀释接种 60 mm 培养皿, 100 个细胞每皿加 10 ml 预热的培养基, 培养至肉眼可见克隆时终止培养 (约 2~3 周), 甲醇固定 15 min, 姬姆萨染色 15 min, 洗去染色液干燥后显微镜下计大于 50 个细胞的克隆, 计算克隆形成率。

2 结果

2.1 Western 印记检测 hLF 表达水平 图 1 显示 PBC1-hLF 转染组 24 h 的 hLF 表达比对照组增加。

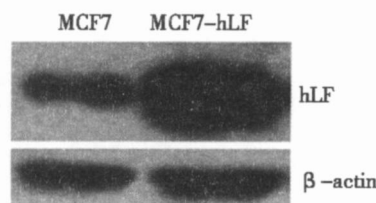


图 1 MCF7 细胞 PBC1-hLF 转染后 hLF 的表达

基金项目: 天津市应用基础研究计划项目 (07JCJC02600)

作者单位: 中国医学科学院放射医学研究所, 天津市分子核医学重点实验室, 天津 300192

作者简介: 王勇 (1979~), 男, 助理研究员, 研究方向: 放射肿瘤生物学。通讯作者: 樊飞跃, 研究员, 博士生导师。

2.2 细胞活性实验 显示 hLF 处理组和与对照组比较存活率无显著差异 PBC1-hLF 转染组的受照存活率显著下降 ($P < 0.05$) ID50 分别为: 对照组 2.73 hLF 处理组 2.85 hLF 转染组 2.22 与对照组比较辐射增敏率分别为 hLF 处理组 0.96 和 PBC1-hLF 转染组 1.23

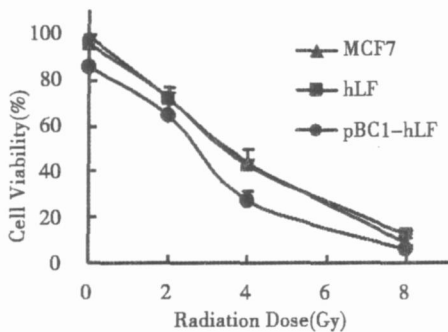


图 2 受照细胞存活曲线

2.3 流式细胞凋亡检测 图 3 显示各组细胞受照后凋亡率的变化, 无统计学意义。与对照组和 hLF 处理组比较, PBC1-hLF 转染组的凋亡率则显著升高 ($P < 0.001$)。

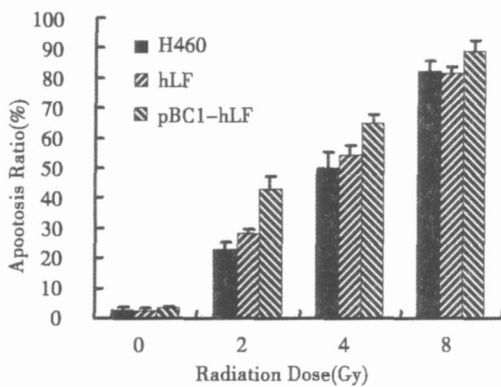


图 3 受照细胞凋亡实验

2.4 克隆形成实验 图 4 显示各组细胞受照后克隆形成能力的变化, hLF 处理组和与对照组比较克隆形成无显著差异, 但有升高的趋势。PBC1-hLF 转染组与对照组和 hLF 处理组比较, 照射后克隆形成均显著下降 ($P < 0.001$)。

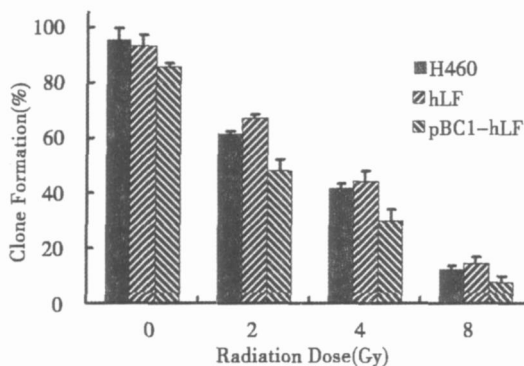


图 4 受照细胞克隆形成实验

3 讨论

对于 hLF 可能的抗肿瘤作用目前的报道有限, 而 hLF 与辐

射敏感性的研究报道还未见。Zhou 等从鼻咽癌的分子流行病学研究发现 hLF 可能是抑癌基因, 在体外可下调细胞周期蛋白 CyclinD1 上调周期抑制蛋白 P21、P27 将细胞阻滞于 G₀/G₁ 期, 协同调节 MAPK 通路来发挥抑制增殖作用^[5]。Xiao 等报道用 hLF 处理体外头颈部癌细胞可以激活细胞周期监控蛋白 P27 和 CyclinE 协同部分 Akt 通路功能, 导致 G₀/G₁ 周期阻滞, 抑制细胞增殖^[6]。为探讨 hLF 对于人乳腺癌细胞 MCF7 辐射敏感性的影响, 我们用 PBC1-hLF 载体转染 MCF7 细胞, 同时以培养基中加 hLF 标准品处理为参照, 观察 hLF 基因高表达对细胞生长特性和对于辐射的敏感性的影响。细胞活力实验说明 hLF 基因的高表达可以显著抑制 MCF7 的生长, 提高其对射线的敏感性, 但是直接加入 hLF 标准品处理对于 MCF7 细胞却没有抑制作用和辐射增敏作用。凋亡检测和克隆形成试验显示 hLF 基因的高表达可以促进 MCF7 细胞受照后的凋亡, 降低克隆形成能力, 但直接加入 hLF 标准品处理对于 MCF7 细胞也没有显著凋亡诱导作用, 反而有促进克隆形成的趋势。由于 MCF7 细胞自身就可以表达 hLF 因而存在于细胞外的 hLF 可能主要起营养作用, 从而促进了细胞增殖。另一方面, 在细胞内表达的 hLF 可能无需跨膜运输入胞就直接激活抗肿瘤信号通路, 产生诱导凋亡和抑制生长的效应。上述关于 hLF 对于人乳腺癌 MCF7 细胞辐射敏感性影响的初步研究结果, 提示 hLF 基因表达的空间分步位置和时间顺序不同可能导致其在不同的肿瘤组织细胞发挥不同的作用, 这需要我们继续更加深入的研究 hLF 基因肿瘤抑制作用的可能机制。

参考文献:

- [1] Hiroyuki Wakabayashi, Koji Yamachika, Mitsunori Takasea. Lactoferrin research technology and applications [J]. International Dairy Journal 2006 16(11): 1241-1251.
- [2] Rodrigues L, Teixeira J, Schmitt F, et al. Lactoferrin and cancer disease prevention [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2009 49(3): 203-217.
- [3] Bezault J, Bhimani R, W Provnick J, et al. Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice [J]. Cancer Res, 1994 54 2 310-2 312.
- [4] Iigo M, Alexander DB, Long N, et al. Anticarcinogenesis pathways activated by bovine lactoferrin in the murine small intestine [J]. Biochimie, 2009 91(1): 86-101.
- [5] Zhou Y, Zeng Z, Zhang W, et al. Lactotransferrin: a candidate tumor suppressor—Deficient expression in human nasopharyngeal carcinoma and inhibition of NPC cell proliferation by modulating hemogen-activated protein kinase pathway [J]. Int J Cancer, 2008 123(9): 2065-2072.
- [6] Xiao Y, Monito CL, Minhas KM, et al. Lactoferrin down-regulates G₁ cyclin-dependent kinases during growth arrest of head and neck cancer cells [J]. Clin Cancer Res, 2004 10 (24): 8683-8686.

(收稿日期: 2009-06-28)