

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.12.004

# 转化生长因子β诱导的基因抑制恶性间皮瘤细胞增殖的体外研究

曹艳梅<sup>1</sup>, 张鹤美<sup>1</sup>, 高四海<sup>1</sup>, 贺金奖<sup>1</sup>, 童建<sup>1</sup>, 张增利<sup>1</sup>, Tom K Hei<sup>2</sup>, 李冰燕<sup>1</sup>

Transforming Growth Factor-β Induced Gene Inhibits Cell Proliferation of Malignant Mesothelioma *in vitro*

CAO Yanmei<sup>1</sup>,ZHANG Hemei<sup>1</sup>,GAO Sihai<sup>1</sup>,HE Jinjiang<sup>1</sup>,TONG Jian<sup>1</sup>, ZHANG Zengli<sup>1</sup>, Tom K Hei<sup>2</sup>, LI Bingyan<sup>1</sup>

1.Department of Toxicology,School of Public Health, Soochow University, Suzhou 215123,China;2. Center for Radiological Research, Columbia University

Corresponding Author: LI Bingyan, E-mail:bingyanli@suda.edu.cn

**Abstract: Objective** To explore that transforming growth factor-β induced gene (TGFB1) inhibits NCI-H28 growth *in vitro*. **Methods** TGFB1 was stably transfected into mesothelioma cell line NCI-H28. growth curve, cell proliferation, plating efficiency, and colony formation in soft agar were analyzed. **Results** Exogenous TGFB1 in malignant mesothelioma NCI-H28 had a high expression in stably. After exogenous TGFB1 transferred into tumor cells NCI-H28, doubling time of TGFB1 high expression cell was increased by 4.38 times, compared with the empty vector. Relative plating efficiency of NCI-H28 was decreased by 69.68%. T28 cells with exogenous TGFB1 formed a smaller soft agar; TGFB1 made tumor cells arrest in G<sub>1</sub> phase and delay tumor cells into the S phase .**Conclusion** TGFB1 was able to inhibit the cell proliferation of malignant mesothelioma *in vitro*.

**Key words:** Transforming growth factor-β induced gene (TGFB1); Malignant mesothelioma; Cell proliferation

**摘要:目的** 研究转化生长因子β诱导的基因(transforming growth factor-β induced gene, TGFB1)在体外是否能抑制恶性间皮瘤细胞NCI-H28的增殖。**方法** 将外源性TGFB1稳定性转染到恶性间皮瘤细胞NCI-H28中, 绘制生长曲线图, 测定其细胞增殖、接种效率和软琼脂克隆形成, 并进行细胞周期的分析。**结果** 外源性TGFB1在恶性间皮瘤细胞NCI-H28中能够稳定地高表达; 当外源性的TGFB1转入到肿瘤细胞NCI-H28后, TGFB1高表达的细胞倍增时间增加了4.38倍; 与转染空载体的肿瘤细胞相比: NCI-H28的相对接种效率降低了69.68 %, 外源性TGFB1表达的T28细胞形成了较小的软琼脂克隆; TGFB1可以使肿瘤细胞阻滞在G<sub>1</sub>期, 并延缓肿瘤细胞进入S期的时间。**结论** TGFB1可以抑制恶性间皮瘤细胞的体外增殖。

**关键词:** TGFB1; 恶性间皮瘤细胞;细胞增殖

中图分类号: R73-3 文献标识码: A

## 0 引言

恶性间皮瘤是一类与石棉暴露有关的恶性肿瘤, 具有弥漫性生长和易转移的特点, 约80%的患者在石棉暴露后30年才发病。由于建筑业及工业的迅

速发展, 石棉暴露人群不断增多。恶性间皮瘤的发病率有增高的趋势。恶性间皮瘤的预后极差, 诊断后的平均生存率只有7~11月。目前对间皮瘤上皮细胞恶性转化的机制还不清楚, 而且恶性间皮瘤对传统的化疗和放疗均不敏感<sup>[1]</sup>。因此, 迫切需要阐明恶性间皮瘤发病的分子机制, 并不断探索新的治疗方案。

转化生长因子β诱导的基因(transforming growth factor-β induced gene, TGFB1)是在TGF-β刺激的肺腺癌细胞株A549中首次克隆得到, 又被称为β ig-H3基因(TGF-β induce gene, colone 3, β ig-H3)<sup>[2]</sup>。实验

收稿日期: 2012-09-19; 修回日期: 2013-01-18  
基金项目:国家自然科学基金资助项目(81072286);江苏省自然科学基金资助项目(SBK201221995)  
作者单位: 1. 215123苏州, 苏州大学公共卫生学院卫生毒理学教研室; 2. 哥伦比亚大学放射研究中心  
通信作者: 李冰燕, E-mail: bingyanli@suda.edu.cn  
作者简介: 曹艳梅(1985-), 女, 硕士在读, 主要从事卵巢癌的防治研究

已证实TGFB1突变是颗粒性阿韦利诺晶格和瑞斯伯克勒等角膜营养不良的主要原因<sup>[3-4]</sup>。然而,近几年研究发现<sup>[5]</sup>TGFB1在一些正常或永生化的细胞系,如肺支气管上皮细胞(NHBE和BEP2D)中,其相对表达水平明显上调,而在一些肿瘤细胞系如肺癌(H522、H810和H1417)细胞中,其相对表达水平明显下调或检测不到。

因此,本研究把外源性TGFB1转染到恶性间皮瘤细胞NCI-H28中,观察外源性TGFB1在体外对恶性间皮瘤细胞NCI-H28的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人恶性间皮瘤细胞株(NCI-H28)从美国模式培养物集库存获得,NCI-H28使用DMEM的完全培养液(美国英骏公司),含10%胎牛血清,100 μg/ml 链霉素,100 u/ml青霉素。

1.2 TGFB1的稳定性转染及鉴定

1.2.1 使用Lipofectamine Plus (美国英骏公司)进行细胞转染

制备4 μg载体pRc/CMV2-TGFB1或pRc/CMV2-空载体与转染试剂混合,加入在6孔培养板的NCI-H28细胞中培养3 h;加入血清继续培养72 h。按1:10比例把已转染TGFB1或空载体的细胞分到100 mm的培养板中,在700 mg/ml 的G418(美国Sigma公司)中筛选稳定性TGFB1表达的阳性细胞克隆。

1.2.2 用实时定量 PCR检测TGFB1 mRNA的表达

使用TRIzol(美国英骏公司)提取细胞内总RNA;取2 μg总RNA使用英骏公司的RT试剂盒合成TGFB1的cDNA;7300 实时定量 PCR仪(美国AB公司)进行TGFB1 mRNA的定量分析。使用美国SupperArray公司的内参基因为GAPDH(目录号为PPH00150E)和靶基因TGFB1(目录号为PPH01904B)。PCR循环参数:95℃ 15 min;95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,40 次循环。实验结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示, $\Delta Ct = Ct(TGFB1) - Ct(GAPDH)$ , $\Delta\Delta Ct = Ct(样品) - Ct(对照)$ 。

1.2.3 Western blot检测培养细胞上清液中TGFB1的表达

细胞在含10% FBS的DMEM培养液中培养24 h,加10%的三氯乙酸,室温放置30 min,4℃ 132 000 r/min 离心 30min,弃上清液,用丙酮洗涤,干燥。加50 μl 上样缓冲液煮沸5 min后,上样、电泳、转膜、封闭、孵育1:1000 的TGFB1一抗(美国R&D 公司)、1:5000的二抗(美国SABiosciences公司),用安玛西亚公司的ECL,柯达公司的全自动洗片机进行全自动

显色。

1.2.4 免疫组织化学法检测TGFB1在细胞内的分布

使用美国Vector Laboratories公司的VECTASTAIN试剂盒,其主要操作步骤为:用1.5% 的马血清封闭后;加1:1000的TGFB1一抗于37℃ 孵育2 h后;加生物素标记的1:5000的二抗室温孵育30 min;加ABC(avidinbiotin-peroxidase complex)室温反应30 min;加DAB(chromogen 3,3'-diaminobenzidine)底物显色6 min;脱水、透明、封片。在BX60 奥林巴斯显微镜下观察TGFB1蛋白在细胞内的分布。

1.3 生长曲线绘制

接种5 000个细胞于35mm的培养皿中,在接种后0、1、2、3、5、7、9、11以及13d,使用美国贝克曼公司的细胞计数仪进行细胞计数,每个时间点3个平行样,绘制生长曲线。细胞倍增时间用以下公式计算: $N_t = N_0 2^{t/f}$ 。其中倍增时间=1/f;  $N_t$ : t天的细胞数;  $N_0$ : 接种的细胞数; t:天数; f: 单位时间内细胞周期的频率。

1.4 细胞增殖测定

用英骏公司的CyQUANT NF 细胞增生测定试剂盒进行细胞增殖的检测。主要实验过程为:将细胞接种于96孔培养板过夜。然后用无血清的DMEM培养36 h后,加10% FBS的DMEM进行刺激。在血清刺激后0、12、16、20以及24 h时用PBS冲洗,加100 μl 染料结合液37℃孵育1 h。使用美国Bio-Tec公司的酶标仪测定荧光强度。结果用增加的百分数表示,即增加的百分比=(n时的荧光强度 - 接种细胞的荧光强度)/接种细胞的荧光强度。

1.5 接种效率测定

接种500个NCI-H28细胞于100 mm的培养皿中,第12天可以观察到明显的集落。然后用甲醛固定,吉姆萨染色,用英国RB Scientific公司的克隆计数仪计算每个培养皿的集落数,结果用相对接种效率和相对接种面积表示,即相对接种效率= 外源性TGFB1表达细胞的接种效率 / 母代细胞的接种效率。

1.6 软琼脂克隆形成测定

将1000个NCI-H28细胞与1 ml 0.35%琼脂糖混合,接种于底部铺有0.75%琼脂糖的培养皿中,每组4个平行样。在10倍显微镜下观察并计算集落数(colonies),实验结果用相对集落数表示,即相对克隆形成数 = 外源性TGFB1表达细胞的克隆形成数 /母代细胞的克隆形成数。

1.7 细胞周期分析

首先用无血清的DMEM培养细胞36 h,使细胞

同步化于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期。然后用10% FBS刺激细胞，使细胞重新进入周期，在血清刺激后0、4、8、12、16、20、24以及32h后，收集所有细胞包括已死亡的悬浮细胞，用75% 冰的乙醇固定，用PI标记细胞，用美国BD公司的流式细胞仪分析细胞周期。

1.8 统计学方法

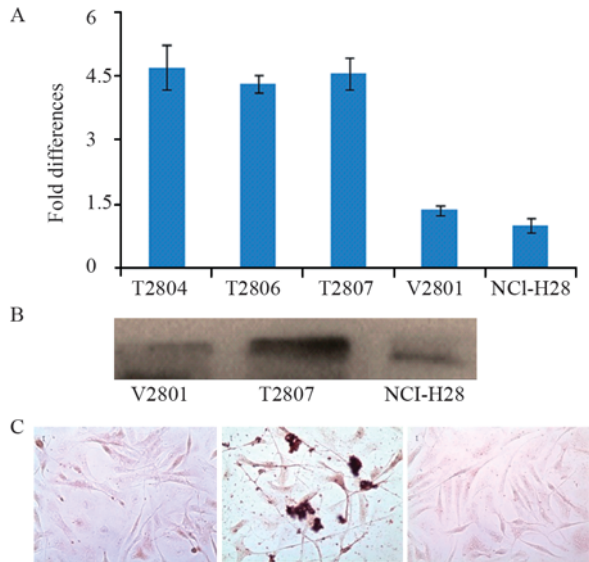
采用SPSS 17.0进行统计学分析，各组实验数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ )表示，先进行方差齐性检验，再用*t-test*进行两个均数之间的比较，*P*<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TGFBI稳定性表达恶性间皮瘤细胞株的鉴定

转染外源性TGFBI后,得到了在NCI-H28中稳定性表达TGFBI的细胞株,命名为T28,从中挑选T2804、T2806和T2807等细胞株用于本研究。T2804、T2806和T2807等细胞株中TGFBI的mRNA表达明显高于其母代NCI-H28，见图1A。T2807的细胞培养上清液中TGFBI蛋白表达明显高于其母代细胞，见图1B。免疫组织化学的结果表明TGFBI在T2807的细胞质和细胞核中均有表达,见图1C。这些结果表明外源性TGFBI已在NCI-H28细胞中稳定表达。

2.2 外源性TGFBI对恶性间皮瘤细胞倍增时间和细胞增殖率的影响



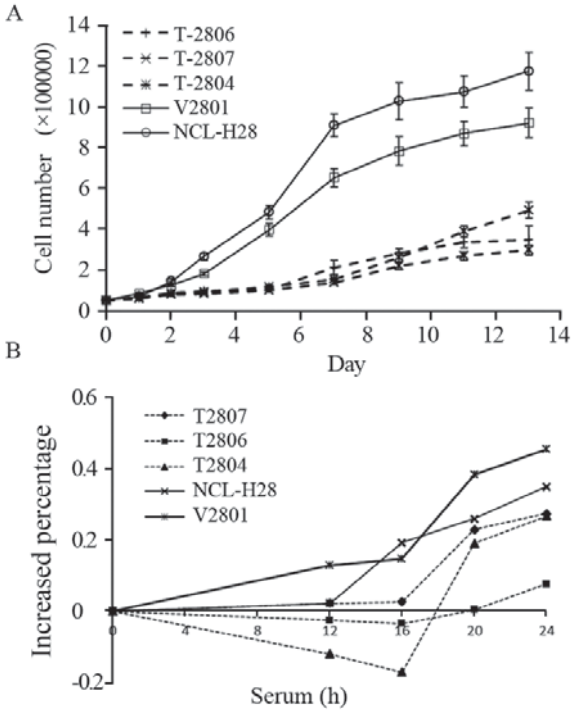
A: the expression levels of TGFBI mRNA of the stable transfected cells was calculated by  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ; B: expression of TGFBI protein in NCI-H28 transfected with TGFBI was detected by Western blot; C: immunohistochemical staining (DAB ×400)

图1 TGFBI mRNA和蛋白在外源性TGFBI稳定性转染的恶性间皮瘤细胞中的表达  
Figure 1 Levels of TGFBI mRNA and protein in mesothelioma NCI-H28 cells transfected with exogenous TGFBI

当外源性TGFBI在恶性间皮瘤NIH-H28中表达时，生长曲线显示T2804、T2806和T2807细胞的倍增时间在第3至第7天时平均增加了4.38倍，见图2A。

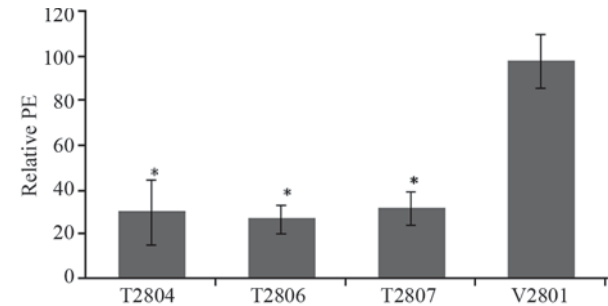
细胞同步化后在血清刺激后的不同时间，细胞增殖率的变化。母代NCI-H28细胞在血清刺激后12h就增加了12.95%，24 h时增殖率高达40.18%；而当外源性TGFBI表达时，在血清刺激后20 h，T2804、T2806和T2807细胞增殖率平均增加了14.17%，24h细胞增殖率为20.58%，见图2B。说明TGFBI可以显著抑制恶性间皮瘤细胞对血清刺激反应的增殖。

2.3 TGFBI对恶性间皮瘤细胞接种效率的影响



A: growth curves of NCI-H28 cells transfected with TGFBI; B: proliferation rates of NCI-H28 cells transfected with TGFBI  
图2 外源性TGFBI对恶性间皮瘤细胞倍增时间和细胞增殖率的影响

Figure 2 Effect of ectopic TGFBI on the doubling time and proliferation rate in Mesothelioma cells



\*: *P*<0.05, corresponding group compared with V2801 group

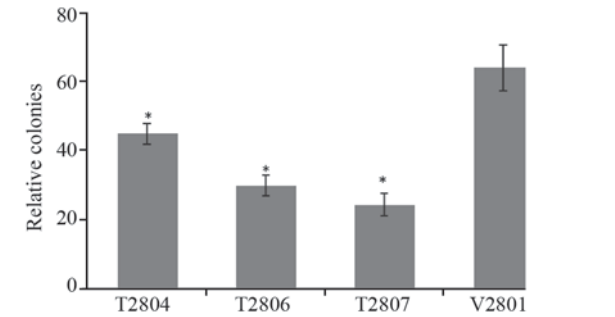
图3 外源性TGFBI对恶性间皮瘤细胞接种效率的影响  
Figure 3 Effect of exogenous TGFBI on PE in Mesothelioma cells



当外源性TGFBI表达时，T2804、T2806和T2807细胞的相对接种效率分别是30.40%、27.11%和31.62%，明显低于对照组细胞V2801的98%，见图3。说明TGFBI可以显著减少恶性间皮瘤细胞的接种效率。

2.4 外源性TGFBI对恶性间皮瘤细胞锚定独立性生长的影响

与转染空载体的V2801细胞相比，外源性TGFBI表达的T28细胞形成了较小的克隆，而且相对软琼脂克隆形成数减少了48.54%，见图4。说明TGFBI显著抑制了恶性间皮瘤的锚定独立性生长。



\*:  $P<0.05$ , corresponding group compared with V2801 group

图 4 外源性TGFBI对恶性间皮瘤细胞锚定独立性生长的影响

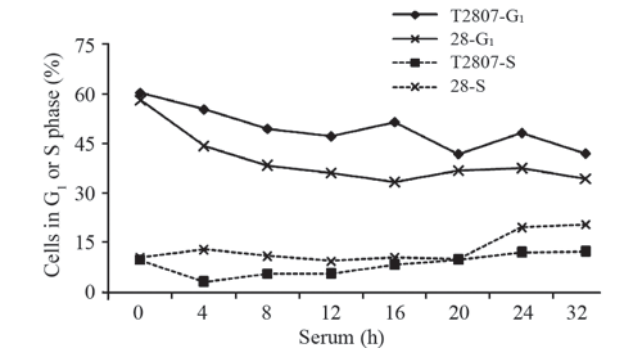
Figure 4 Effect of exogenous TGFBI on anchorage independent growth of mesothelioma cells

2.5 TGFBI对恶性间皮瘤细胞周期的影响

细胞同步化后，母代和TGFBI表达的NCI-H28的细胞处在G<sub>1</sub>期的比例分别是57.99% 和 60.27%。以10%的血清刺激后4 h，TGFBI表达的T2804、T2806和T2807细胞处在G<sub>1</sub>期的比例明显高于母代细胞 (55.26% vs. 44.15%)，而S期比例却明显低于母代细胞 (3.22% vs. 13.03%)。在血清刺激后8 h，进入S期的TGFBI表达的细胞只有5.59%，而母代细胞已经有 10.97% 进入S期。在血清刺激后16 h，处在G<sub>1</sub>期的TGFBI表达的细胞有51.43%；而母代NCI-H28细胞却只有33.3%。结果表明外源性TGFBI增加了G<sub>1</sub>期细胞的比例，减少了S期的比例，说明TGFBI延缓了细胞周期的进程，即推迟了细胞从G<sub>1</sub>期进入S期。该研究与细胞增殖率的结果相一致，见图5。

3 讨论

TGFBI最初从TGF- $\beta$ 刺激的A549细胞中获得<sup>[1]</sup>。在TGF- $\beta$ 刺激下，TGFBI的mRNA转录水平增高，翻译成蛋白质分泌到细胞外基质，因此被称为细胞外基质蛋白。TGFBI蛋白由683个氨基酸组成，含有4个同源性内部重复结构域，即Fas-1区域。Fas-1区域通



Exogenous expression of TGFBI resulted in G<sub>1</sub> phase arrest and S phase delay. Flow cytometry analysis of cell cycle profiles in mesothelioma cells was shown

图 5 TGFBI对恶性间皮瘤细胞周期的影响

Figure 5 Effect of exogenous TGFBI on cell cycle profiles in Mesothelioma cells

常被认为具有调节细胞生长和凋亡的功能，与其配体FasL结合可诱导细胞凋亡。在肿瘤细胞中，Fas-1的表达多下调，提示TGFBI除了具有细胞外基质蛋白的功能外，还可能和细胞增殖有关。Billings等<sup>[5]</sup>研究人的膀胱平滑肌细胞和成纤维细胞，发现TGFBI不仅存在于细胞质和细胞核中，也存在于培养细胞的上清液中。本实验结果也发现，TGFBI蛋白存在于培养细胞的上清液以及细胞质和细胞核中。对小鼠胚胎组织的研究<sup>[2]</sup>发现胚胎发育全阶段的许多组织间质都可以检测到TGFBI的高表达，如眼、心脏、血管和肠道等，提示TGFBI对正常组织的发育是不可缺少的。由此推断，TGFBI可能还具有其他的调节和（或）结构功能。

Zhao等<sup>[6-7]</sup>研究发现，在石棉或射线诱导的恶性转化细胞中，TGFBI的表达显著下降，并且明显地抑制肿瘤发生。因此，本研究设想把外源性的TGFBI转入到NCI-H28细胞中，探索TGFBI是否具有抑制恶性间皮瘤生长的作用。实验首先证实了外源性TGFBI在恶性间皮瘤NCI-H28中能够稳定地高表达。并且发现TGFBI高表达的细胞其倍增时间增加了4.38倍，与以往的研究结果一致。例如，Munier等<sup>[4]</sup>把外源性TGFBI转染到H522细胞中，稳定性TGFBI表达的肺癌细胞株生长速度明显减慢，在培养至第9天时，与母代H522细胞相比，其细胞数目降低了4倍。

接种效率反映了细胞增殖能力的指标之一。与转染空载体的肿瘤细胞相比，外源性TGFBI表达的NCI-H28细胞相对接种效率明显降低；提示TGFBI通过降低恶性间皮瘤细胞的克隆形成能力，抑制肿瘤细胞的增殖。

细胞锚定独立性生长是指细胞在半固体环境中

形成克隆，反映细胞在体外恶性转化的能力。本实验结果发现，与转染空载体的对照组细胞相比，外源性TGFB1表达的T28细胞形成了较小的软琼脂克隆，克隆形成数分别减少了48.54%。提示TGFB1具有减少恶性间皮瘤细胞体外恶性转化的功能。

细胞周期G<sub>1</sub>至S期进程是细胞增生的一个主要检查站，G<sub>1</sub>/S期转变的控制失调易导致突变、染色体片段和基因组不稳定性，从而引起肿瘤的发生和发展。本实验结果显示，当细胞同步化在G<sub>0</sub>/ G<sub>1</sub>期，血清刺激后4 h至20 h之间，外源性TGFB1表达的恶性间皮瘤G<sub>1</sub>期的比例明显高于其母代肿瘤细胞，说明TGFB1增加了肿瘤细胞进入G<sub>1</sub>期的比例。对S期的影响方面，母代NCI-H28细胞在血清刺激后4 h开始进入S期，而TGFB1高表达的恶性间皮瘤细胞推迟到16 h才开始进入S期。Billings等<sup>[5]</sup>用TGFB1基因敲除小鼠与野生型小鼠相比较，发现前者的胚胎成纤维细胞的染色体畸变率和微核率增高，细胞增生明显，并提前进入S期。抗生长信号分子一般通过两条途径阻滞细胞增生。一是在细胞外信号的刺激下，使细胞脱离激活的增生状态而进入静止状态（G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期）；二是在获得特异性分化相关的特征后，通过诱导细胞进入分裂后状态使细胞永久消除增生能力，最终通过pRB家族分子p107和p130发挥作用<sup>[6]</sup>。在高磷酸化的状态下，pRB通过隔离或改变G<sub>1</sub>/S期进程的转录因子E2F的功能表现阻滞增生的作用。从TGFB1对肿瘤细胞周期影响的实验结果，TGFB1可以使肿瘤细胞阻滞在G<sub>1</sub>期，并延缓肿瘤细胞进入S期的

时间，因此具备了抗生长信号分子的特征，但它作用的最后靶点是否也是pRB有待于进一步研究。

总之，本实验结果提示，TGFB1可以抑制恶性间皮瘤细胞的体外增生，作为恶性间皮瘤分子治疗的肿瘤抑制基因具有潜在的应用价值。

参考文献:

[1] Astoul P, Roca E, Galateau-Salle F, *et al.* Malignant pleural mesothelioma: from the bench to the bedside[J]. *Respiration*,2012, 83(6):481-93.

[2] Liang Q, Sun X, Jin X. TGFB1 gene mutation in a Chinese pedigree with Reis-Bücklers corneal dystrophy[J]. *Ophthalmic Physiol Opt*,2012,32(1):74-80.

[3] Choi SI, Kim BY,Dadakhjaev S, *et al.* Impaired autophagy and delayed autophagic clearance of transforming growth factor β-induced protein (TGFB1) in granular corneal dystrophy type 2[J]. *Autophagy*,2012,8(12) :1782-97.

[4] Munier FL,Korvatska E,Djemai A, *et al.* Kerato-epithelin mutations in four 5q31-linked corneal dystrophies[J]. *Nat Genet*,1997,15(3):247-51.

[5] Billings PC, Herrick DJ, Kucich U, *et al.* Extracellular matrix and nuclear localization of beta ig-h3 in human bladder smooth muscle and fibroblast cells[J]. *J Cell Biochem*,2000,79(2):261-73.

[6] Zhao Y, El-Gabry M, Hei TK. loss of Betaig-h3 protein is frequent in primary lung carcinoma and related to tumorigenic phenotype in lung cancer cells[J].*Mol Carcinog*,2006,45(2):84-92.

[7] Zhang Y, Wen G, Shao G, *et al.* TGFB1 deficiency predisposes mice to spontaneous tumor development[J]. *Cancer Res*,2009,69(1):37-44.

[编辑:安 凤; 校对:周永红]