

人成纤维细胞生长因子受体 2IIIc 及其突变型重组腺病毒的获得和在乳腺癌细胞中的表达

张勇仓¹, 李丽玲^{1,2}, 陈小佳¹, 秦丽¹, 郭淑军¹, 刘兰¹, 徐丽慧¹, 洪岸¹

1 暨南大学生物工程研究所基因工程药物国家工程研究中心 广东省生物工程药物重点实验室, 广州 510632

2 深圳市南山区慢性病防治院, 深圳 518000

摘要: 获得人成纤维细胞生长因子受体 2IIIc (FGFR2IIIc) 及其 S252W 突变型重组腺病毒, 感染乳腺癌细胞 MDA-MB-231, 为下一步研究 *FGFR2IIIc* 基因的功能和作用机制奠定基础。以本实验室保存的含 *FGFR2IIIc* 基因的质粒为模板, PCR 扩增得到 *FGFR2IIIc* 基因, 重叠延伸法 PCR 获得 *FGFR2 IIIcS252W* 突变型基因; 分别将上述野生型和突变型基因克隆至腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV 上, 得到重组穿梭质粒 pAdTrack-FGFR2IIIc 和 pAdTrack-FGFR2IIIcS252W, DNA 测序证实。Pme I 酶切后分别与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 共转化 *BJ-5183* 感受态细菌同源重组, 得到的重组表达质粒 Ad-FGFR2IIIc 和 Ad-FGFR2IIIcS252W Pac I 酶切线性化后转染 HEK293A 细胞进行重组腺病毒的包装和扩增, 通过 GFP 报告基因观察病毒表达情况。收集重组病毒颗粒并测定滴度, 进一步感染乳腺癌细胞 MDA-MB-231, RT-PCR 和 Western blotting 方法检测目的基因的表达, 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)法和流式细胞术分析细胞增殖情况。结果表明, 成功构建了人 *FGFR2IIIc* 及其 S252W 突变型基因的重组腺病毒表达载体, 获得的重组腺病毒颗粒能高效感染 MDA-MB-231 细胞, 并表达目的基因。MTT 结果显示 FGFR2IIIc 和 S252W 均能抑制 MDA-MB-231 细胞增殖, S252W 抑制效果更加明显。流式细胞术表明 FGFR2IIIc 和 S252W 均能使 MDA-MB-231 细胞周期停滞于 G0/G1 期, 抑制细胞增殖。

关键词: FGFR2IIIc, S252W 突变, 腺病毒载体, MDA-MB-231 细胞

Experssion of human FGFR2IIIc and its S252W mutant in MDA-MB-231 breast cancer cells with adenovirus vectors

Yongcang Zhang¹, Liling Li^{1,2}, Xiaojia Chen¹, Li Qin¹, Shujun Guo¹, Lan Liu¹, Lihui Xu¹, and An Hong¹

1 National Engineering Research Center of Genetic Medicine, Guangdong Provincial Key Laboratory of Bioengineering Medicine, Bioengineering Institute of Jinan University, Guangzhou 510632, China

2 Shenzhen Nanshan Chronic Diseases Prevention and Cure Center, Shenzhen 518000, China

Abstract: To study the functions of human Fibroblast growth factor receptor 2IIIc(FGFR2IIIc) gene in cancer cells, breast cancer cells MDA-MB-231 were infected by recombinant adenoviruses containing FGFR2IIIc and its S252W mutant, respectively. *FGFR2IIIc* gene was amplified from an existing plasmid and its S252W mutant was obtained by overlapping extension PCR. These two genes were separately cloned into the adenoviral shuttle plasmid pAdTrack-CMV, confirmed by DNA sequencing linearized,

Received: October 14, 2009; Accepted: January 15, 2010

Corresponding author: An Hong. Tel: +86-20-85221345; Fax: +86-20-85226616; E-mail: tha@jnu.edu.cn

and co-transformed into *Escherichia coli* BJ-5183 with the adenoviral vector pAdEasy-1. The resulting recombinant expression vectors Ad-FGFR2IIIc and Ad-FGFR2IIIcS252W were linearized and transfected into HEK293A cells to get adenoviral particles. GFP was used to verify the gene expression. The recombinant adenoviral particles were harvested, titrated, and then infected MDA-MB-231 cells. The expression of FGFR2IIIc and its S252W mutant were examined by RT-PCR and Western blotting, and the effect of these recombinant adenoviruses on MDA-MB-231 cell proliferation was analyzed by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and flow cytometry. The results showed the recombinant adenoviral particles could infect MDA-MB-231 cells and express the target proteins. MTT showed that both FGFR2IIIc and its S252W mutant inhibited MDA-MB-231 cell proliferation, but the mutant was more effective. Flow cytometry showed that both FGFR2IIIc and its S252W mutant arrested MDA-MB-231 cell cycle at G₀/G₁ phase, resulting in low cell proliferation.

Keywords: FGFR2IIIc, S252W mutation, adenovirus vector, MDA-MB-231

人成纤维细胞生长因子受体 (Fibroblast growth factor receptors, FGFRs) 是一类具有自身磷酸化活性的酪氨酸激酶受体, 目前已知有 5 种成员, 它们基本结构包括由 3 个免疫球蛋白(Ig)功能区 (分别命名为 D1, D2 和 D3) 组成的胞外区、疏水跨膜区及酪氨酸激酶的胞内区^[1]。由于 mRNA 剪切方式的不同, 每种成员都有不同的亚型。其中, FGFR2 的 D3 区由 3 个外显子编码, 其 mRNA 的选择性剪接使 D3 区的 C 端成为高度可变区, 产生具有跨膜结构的高亲和力 FGFR2IIIb 或 FGFR2IIIc 两种亚型^[2]。

FGFR2IIIc 能与 FGF1、FGF2、FGF4、FGF6、FGF9、FGF16、FGF20 等结合^[3-4], 进而激活受体胞内区的酪氨酸激酶, 导致细胞内一系列的变化, 对细胞的增殖、迁移、分化有关键作用, 并在胚胎发育、组织生长中扮演着极其重要的角色^[5]。

FGFR2IIIc Ser252Trp 点突变能造成 Apert 尖头并指 (趾) 畸形综合症, 该突变位于高度保守的免疫球蛋白样功能区 D2 和 D3 的连接部分, 属于功能获得性突变 (Gain-of-function mutation)^[6-7]。通过对该 S252W 突变体和 FGF2 两者复合晶体结构的分析, 发现较野生型该突变与 FGF2 有更强的亲和力^[8-9]。而有报道称 FGF-2 对乳腺癌细胞有抑制作用, 其通过与高亲和力受体结合来介导^[10]。另有研究发现, 过表达 FGFR2 能够促进原代培养的小鼠乳腺癌上皮细胞的凋亡, 抑制 EMT (Epithelia-mesenchymal-transition) 过程, 而 EMT 与乳腺癌的发生有密切关系^[11]。

为了研究 FGFR2IIIc 及其与配体有更高亲和力的 S252W 突变型对肿瘤细胞生长的影响, 本实验构

建了两者的重组腺病毒表达载体, 转染 HEK293A 细胞获得重组腺病毒颗粒, 然后感染 MDA-MB-231 乳腺癌细胞进行表达及检测。本研究为进一步研究 FGFR2IIIc 及其 S252W 突变型在肿瘤细胞中的功能和作用机制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料、细胞株和质粒及主要试剂

腺病毒载体系统质粒 pAdtrack-CMV、pAdEasy-1, 大肠杆菌 BJ-5183, HEK293A 细胞购自美国 Biogene 公司。LipofectamineTM2000 脂质体转染试剂购自美国 Invitrogen 公司。Kpn I、Hind III、Taq DNA 聚合酶均购自日本 TaKaRa 公司。Pme I 及 Pac I 购自美国 NEB 公司。质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒及 PCR 产物回收试剂盒均购买于 Omega 公司。细胞周期检测试剂盒购自南京凯基科技发展有限公司。

DMEM、胎牛血清购自美国 Gibco 公司。兔抗人 FGFR2IIIc 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz biotechnology 公司, 羊抗兔-HRP 抗体购自美国 Pierce 公司。大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存。引物合成和测序送由上海英骏生物技术有限责任公司完成。

1.2 重组腺病毒质粒 Ad-FGFR2IIIc 和 Ad-FGFR2IIIcS252W 的构建

以本研究所保存的含有人的 *FGFR2 III c* 全基因的质粒为模板, PCR 扩增得到人 *FGFR2IIIc* 基因, 为与内源性 *FGFR2IIIc* 区别, 在外源基因 C 端加入 myc 标签序列, 扩增模板的上下游引物分别含 Kpn I 酶切位点和 Hind III 酶切位点, 引物序列为:

F-IIIc:5'-CATGGGTACCTCAGTGGGGGCGCTTCA TCTGCCTGGTCTTGGTCACAATGGCAACCTT-3'; R-IIIc:5'-CCGAAGCTTTCATGTTTTAACTGCCG TTTATGTG-3'。同样以本研究所保存的含有人的 *FGFR2 IIIc* 全长基因的质粒为模板,采用重叠延伸法 PCR,用上述扩增所用引物和突变引物扩增获得 *FGFR2 IIIcS252W* 突变型基因,突变引物序列如下:F-S252W:5'-GGAGCGATGGCCTCACCGG-3'; R-S252W:5'-CCGGTGAGGCCATCGCTCC-3'。PCR 产物以 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后,切胶回收目的基因片段。

目的基因 *FGFR2IIIc* 和 *FGFR2 IIIcS252W* 经 *Kpn I* 和 *Hind III* 双酶切并纯化后克隆至穿梭质粒 pAdTrack-CMV 中,分别转化 DH5 α 感受态细菌,卡那霉素筛选阳性克隆,*Kpn I* 和 *Hind III* 双酶切鉴定重组成功并测序正确的质粒命名为 pAdTrack-FGFR2IIIc 和 pAdTrack-FGFR2IIIcS252W。下一步各重组穿梭质粒用 *Pme I* 酶切线性化,分别与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 共转化 BJ-5183 细菌进行同源重组,卡那霉素筛选阳性克隆得到重组腺病毒表达质粒 Ad-FGFR2IIIc 和 Ad-FGFR2IIIcS252W, *Pac I* 酶切鉴定。

1.3 重组腺病毒 Ad-FGFR2IIIc 和 Ad-FGFR2IIIcS252W 的包装,扩增和滴度测定

重组腺病毒质粒 Ad-FGFR2IIIc 和 Ad-FGFR2IIIcS252W 经 *Pac I* 酶切使其线性化后,乙醇沉淀,然后用 LipofectamineTM2000 脂质体介导将 Ad-FGFR2IIIc 和 Ad-FGFR2IIIcS252W 分别转染 50%~60% 融合的 HEK293A 细胞,转染 6 h 后更换为含 10% 胎牛血清的 DMEM,24 h 后观察细胞形态变化及绿色荧光表达情况。10~12 d 后,当 90% 以上细胞出现病变时,收集细胞,用无血清 DMEM 重悬,-70℃ 和 37℃ 反复冻融 4 次裂解细胞,离心收集上清即为病毒上清,-70℃ 保存或再次感染 HEK293A 细胞,大量扩增腺病毒。

病毒滴度按 AdEasyTM vector system user manual 的说明进行测定,将 HEK293A 细胞悬液 (1 \times 10⁴/孔) 加入 96 孔板中,培养至融合度 70%~80%

时去掉细胞培养液,用新鲜的 2% 胎牛血清的维持细胞培养液将病毒先作 1:1000 稀释,然后将其依次以 1:10 倍比稀释直到 10⁻¹⁰,将稀释的病毒加入到 96 孔板中,每个稀释度同时做 10 个复孔和 2 个无病毒感染阴性对照孔,每孔培养液各 200 μ L。然后将 96 孔板置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养至少 1 周,计数每个稀释度细胞发生 CPE 的孔数,从而计数每个稀释度的 CPE 百分率。用公式 $Titer = 10^{1+d(s-0.5)+1} TCID_{50}/mL = 10^{1+d(s-0.5)+1-0.7} PFU/mL$ 计算病毒的滴度,d = Log 10 稀释倍数 (当 10 倍稀释时=1),s = 每个稀释度的 CPE 百分率之和 (通常从 10⁻¹ 稀释开始计算)。

1.4 重组腺病毒感染 MDA-MB-231 细胞

取 1 \times 10⁵ 个 MDA-MB-231 细胞接种到直径 3.5 cm 的培养皿中,当细胞生长到 60%~70% 时,去除完全培养基,换上含有不同浓度病毒颗粒的无血清培养基,37℃、5% CO₂ 条件下培养 2 h,期间每 0.5 h 轻微摇晃数次混匀,然后加入等量的双倍完全培养基继续培养。48 h 后观察绿色荧光蛋白表达情况,选择感染效率约 80%~95% 所需要的最小 MOI 值作为后续实验使用的病毒浓度。

1.5 RT-PCR 及 Western blotting 检测目的基因表达

MDA-MB-231 细胞以 1 \times 10⁵ 个每孔培养在 6 孔板中,设计无腺病毒感染的对照组、Ad 感染组、Ad-FGFR2IIIc 感染组和 Ad-FGFR2IIIcS252W 感染组,每组 4 个复孔。在病毒感染 48 h 后,去除培养基用冰冷的 PBS 溶液润洗 2 遍,使用细胞刮刀收集细胞。各组中 2 个复孔的细胞使用 Trizol 细胞裂解液室温裂解 10 min,收集的裂解液进一步抽提 RNA,采用 RT-PCR 反转录成 cDNA 后,用含 myc 标签序列的特异性引物检测 FGFR2IIIc 的表达,引物序列如下:F-5'-CTTCGGGGTGTTAATGTG-3'; R-5'-ATCCTCTTCTGCGATGAGTTT-3'。各组另外 2 个复孔的细胞用蛋白质裂解液在冰上裂解 30 min,4℃ 高速离心收集上清制样,取适量蛋白样品经过 SDS-PAGE 胶分离后进行常规的 Western blotting 实验,具体的操作参照文献[12]进行。

1.6 重组腺病毒感染 MDA-MB-231 细胞后的 MTT 法分析

将 MDA-MB-231 细胞以 1×10^4 个每孔接种于 96 孔板, 培养细胞密度至 70% 时, 换成饥饿培养基继续培养 24 h 后, 设计无腺病毒感染的对照组、Ad 感染组、Ad-FGFR2IIIc 感染组、Ad-FGFR2IIIc S252W 感染组, 腺病毒孵育 48 h 后, 弃去培养基, 加入 MTT 液 50 μ L 继续培养 4 h。甩干孔内培养液后, 加入 150 μ L DMSO 微孔板振荡器上振荡 10 min。酶标仪检测各孔 OD 值 (检测波长 570 nm, 参考波长 630 nm)。计算重组腺病毒对 MDA-MB-231 细胞增殖的抑制率 = $(1 - \text{腺病毒组平均 OD} / \text{对照组平均 OD}) \times 100\%$ 。

1.7 流式细胞仪检测 MDA-MB-231 细胞周期

MDA-MB-231 细胞以 1×10^5 个/孔培养在 6 孔板中, 设计无腺病毒感染的对照组、Ad 感染组、Ad-FGFR2IIIc 感染组和 Ad-FGFR2IIIcS252W 感染组, 每组 2 个复孔。在病毒感染 48 h 后, 分别收集各组 MDA-MB-231 细胞, 离心弃上清。用 PBS 平衡液洗涤 1 次后, 离心去上清。加入预冷的 70% 乙醇, -20°C 固定 12 h, 离心弃上清。用南京凯基 PI 单染试剂盒 bufferA 液洗涤 1 次后, 离心去上清, 300 μ L bufferA 液重悬细胞, 加入 RNaseA 至终浓度 250 μ g/mL, 加入 3 μ L PI 染液, 室温避光保存 30 min。筛网过滤细胞悬液。流式细胞仪检测细胞周期变化。

实验数据采用 SPSS13.0 统计软件方差分析的方法处理分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 重组腺病毒质粒 Ad-FGFR2IIIc 和 Ad-FGFR2IIIcS252W 的构建

以人 *FGFR2IIIc* 基因 (大小约为 2675 bp) 为模板通过重叠延伸法获得 *FGFR2 IIIcS252W* 突变型基因 (图 1)。重组穿梭质粒 pAdTrack-FGFR2IIIc 和 pAdTrack-FGFR2 IIIcS252W, 经限制性内切酶 *Kpn I* 和 *Hind III* 消化处理后, 得到目的片段 2675 bp 和线性化质粒 9200 bp, 由于酶切不够充分可见 9875 bp 的转移质粒条带 (图 2)。进一步经 DNA 测序证实, *FGFR2 IIIcS252W* 基因突变成功 (结果未显示), 重

组穿梭质粒 pAdTrack-FGFR2IIIc 和 pAdTrack-FGFR2 IIIcS252W 均构建成功。

本实验所用腺病毒系统骨架质粒与穿梭质粒可产生两种情况: 1) 左右臂重组; 2) 右臂与左臂上游的复制起始位点重组。因此当使用 *Pac I* 酶切时, 就可能出现: 1) 左右臂发生重组时, 酶切出 30 kb 和 3 kb 的条带; 2) 右臂与左臂上游的复制起始位点发生重组时, 酶切出 30 kb 和 4.5 kb 的条带 (Qbiogene Inc. AdEasyTM vector system application manual version 1.4)。图 3 为重组腺病毒表达质粒 Ad-FGFR2IIIc 和 Ad-FGFR2IIIcS252W, 经 *Pac I* 酶切后可见 30 000 bp 和 4500 bp 的特征性的电泳条带, 表明重组发生在右臂与左臂上游的复制起始位点之间, 证明同源重组成功。

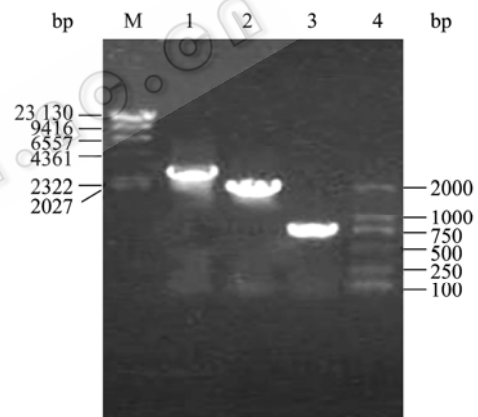


图 1 构建 *FGFR2IIIcS252W* PCR 定点突变图

Fig. 1 Construction of site-specific mutagenesis *FGFR2IIIcS252W* M: DNA marker λ DNA/*Hind III*; 1: *FGFR2IIIc S252W* gene; 2: upstream of *FGFR2IIIc S252W* gene; 3: downstream of *FGFR2IIIc S252W* gene; m: DNA marker DL2000.

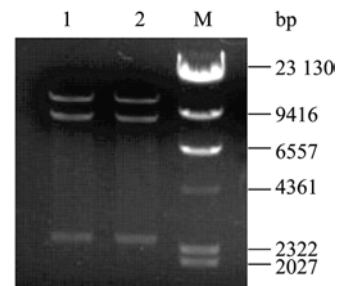


图 2 穿梭质粒 pAdTrack-FGFR2IIIc 和 pAdTrack-FGFR2IIIcS252W 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of shuttle plasmids pAdTrack-FGFR2IIIc and pAdTrack-FGFR2IIIcS252W by restriction enzyme digestion 1: pAdTrack-FGFR2IIIc/*Kpn I*+*Hind III*; 2: pAdTrack-FGFR2IIIc S252W/*Kpn I*+*Hind III*; M: DNA marker λ DNA/*Hind III*.

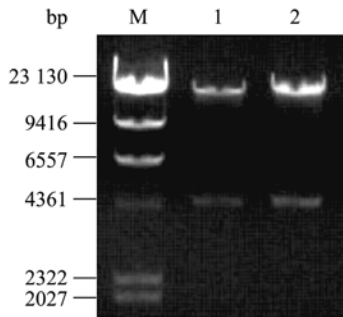


图 3 重组质粒 Ad-FGFR2IIIc 和 Ad-FGFR2IIIcS252W 的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant plasmids Ad-FGFR2IIIc and Ad-FGFR2IIIcS252W by restriction enzyme digestion. M: DNA marker λ DNA/*Hind* III; 1: Ad-FGFR2IIIc/*Pac* I; 2: Ad-FGFR2IIIc S252W/*Pac* I.

2.2 病毒颗粒的包装、扩增和滴定

Ad-FGFR2IIIc 和 Ad-FGFR2IIIcS252W 经过 *Pac* I 线性化之后, 分别转染 HEK293A 细胞, 3 d 后荧光显微镜下见 GFP 表达, 随时间延长 GFP 表达逐渐增多增强, 培养 12 d 后, 细胞出现肿胀、圆缩, 呈葡萄串样等典型细胞病变 (CPE) (图 4), 收获病毒, 并进行 3 代扩增。

用 TCID₅₀ 法测定病毒滴度, 第 4 代重组腺病毒 Ad 的滴度为 6.31×10^8 PFU/mL, Ad-FGFR2IIIc 的滴度为 1.26×10^9 PFU/mL, Ad-FGFR2IIIcS252W 的滴度为 3.16×10^8 PFU/mL。

2.3 重组腺病毒在 MDA-MB-231 细胞中的表达

用第 4 代重组腺病毒悬液感染 MDA-MB-231 细胞, 当 MOI=60 时已经可以达到较高的感染效率, 48 h 后 GFP 的表达见图 5。

2.4 RT-PCR 及 Western blotting 检测外源目的基因表达

以 MOI=60 感染 MDA-MB-231 细胞 48 h 后, 抽提总 RNA, 用带 myc 标签的特异引物扩增出约 498 bp 的特异性条带 (图 6), 而 Ad 组和未感染对照组未检测到目的条带, 证明外源基因在转录水平有表达。Western blotting 进一步鉴定, 结果显示病毒感染组能检测到目的蛋白 (图 7), 而 Ad 组和未感染对照组不能检测到目的蛋白的表达, 证明 FGFR2IIIc 和 FGFR2IIIcS252W 能在 MDA-MB-231 中特异性表达。

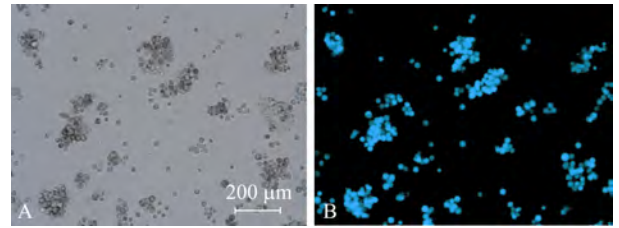


图 4 重组腺病毒感染 HEK293A 细胞 12 d 后 GFP 的表达情况

Fig. 4 Expression of GFP in HEK293A cells infected by recombinant adenoviruses. (A) HEK293A cells infected by recombinant adenoviruses (bar=200 μ m). (B) Fluorescent image of HEK293A cells infected by recombinant adenoviruses.

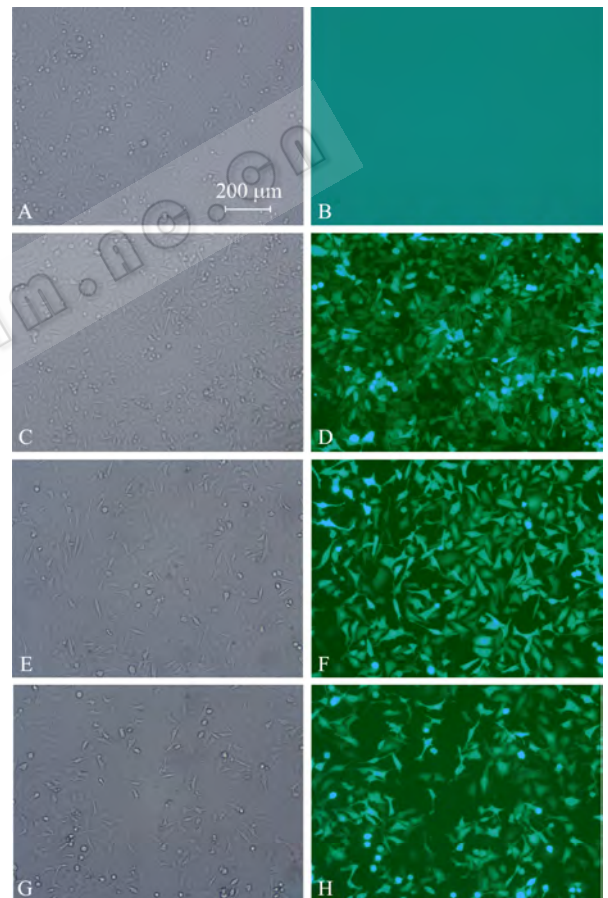


图 5 感染后 MDA-MB-231 细胞的形态学观察

Fig. 5 Morphology of infected MDA-MB-231 cells. (A) Non-infected MDA-MB-231 cells (bar=200 μ m). (B) Fluorescent image of non-infected MDA-MB-231 cells. (C) MDA-MB-231 cells infected by Ad. (D) Fluorescent image of MDA-MB-231 cells infected by Ad. (E) MDA-MB-231 cells infected by Ad-FGFR2IIIc. (F) Fluorescent image of MDA-MB-231 cells infected by Ad-FGFR2IIIc. (G) MDA-MB-231 cells infected by Ad-FGFR2IIIcS252W. (H) Fluorescent image of MDA-MB-231 cells infected by Ad-FGFR2IIIcS252W.

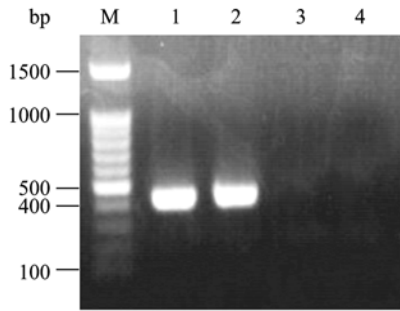


图 6 感染后 MDA-MB-231 细胞中 FGFR2IIIc 和 FGFR2IIIcS252W mRNA 的表达

Fig. 6 RT-PCR detection of FGFR2IIIc and FGFR2IIIcS252W mRNA expression in infected MDA-MB-231 cells. M: 100 bp marker; 1: MDA-MB-231 cells infected by Ad-FGFR2IIIc; 2: MDA-MB-231 cells infected by Ad-FGFR2IIIcS252W; 3: MDA-MB-231 cells infected by Ad; 4: non-infected MDA-MB-231 cells.

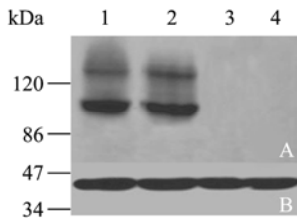


图 7 Western blotting 检测 FGFR2IIIc 和 FGFR2IIIcS252W 的表达

Fig. 7 Detection of FGFR2IIIc and FGFR2IIIcS252W expression in infected MDA-MB-231 cells by Western blotting. (A) 1: MDA-MB-231 cells infected by Ad-FGFR2IIIc; 2: MDA-MB-231 cells infected by Ad-FGFR2IIIcS252W; 3: MDA-MB-231 cells infected by Ad; 4: non-infected MDA-MB-231 cells. (B) β -actin.

2.5 Ad-FGFR2IIIc 和 Ad-FGFR2IIIcS252W 对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

MTT 结果显示 (图 8), 与对照组比较, 感染 MDA-MB-231 细胞 48 h 后, Ad 对细胞增殖的抑制率仅为 0.55%, Ad-FGFR2IIIc 对细胞增殖的抑制率为 8.79%, 而 Ad-FGFR2IIIcS252W 对细胞增殖的抑制率高达 66.04%, 说明 FGFR2IIIc 及 FGFR2IIIcS252W 都能抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖, FGFR2IIIcS252W 抑制效果更加明显。

而流式细胞结果 (表 1) 进一步表明, 感染 MDA-MB-231 细胞 48 h 后, 对照组和 Ad 组各期细胞比例均无显著差异。Ad-FGFR2IIIc 组 G0/G1 期细胞比例较对照组和 Ad 组显著增加, G2/M 期细胞比例明显减少。同时, Ad-FGFR2IIIcS252W 组与对照组和 Ad

组比较, G0/G1 期细胞比例明显增加, S 期和 G2/M 期细胞比例明显减少; 与 Ad-FGFR2IIIc 组相比, G0/G1 期细胞亦明显增加, S 期细胞比例明显减少。说明 FGFR2IIIc 和 FGFR2IIIcS252W 均能使 MDA-MB-231 细胞出现 G0/G1 期阻滞, 从而抑制细胞增殖, 而 FGFR2IIIcS252W 抑制细胞增殖的效果更加明显。

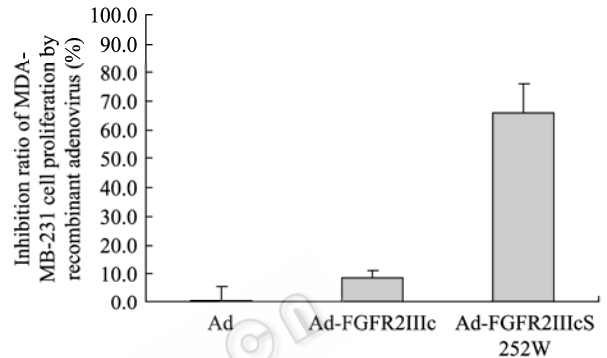


图 8 重组腺病毒对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响 (n = 3)

Fig. 8 Effects of recombinant adenoviruses on the proliferation of MDA-MB-231 cells (n = 3).

表 1 重组腺病毒对 MDA-MB-231 细胞周期的影响 (n=3)
Table 1 The effect of recombinant adenoviruses on cell cycle in MDA-MB-231 cells (n=3)

| Groups | G0G1 (%) | S-Phase (%) | G2M (%) |
|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|
| Control | 14.52±0.55 | 81.21±2.23 | 4.27±0.88 |
| Ad | 14.79±0.23 | 81.25±0.45 | 3.96±0.37 |
| Ad-FGFR2IIIc | 17.13±1.66 *& | 82.12±1.65 | 0.75±0.15 *& |
| Ad-FGFR2IIIcS252W | 24.23±1.09 *&^ | 75.13±4.23 *&^ | 0.65±0.16 *& |

*: $P < 0.05$, Ad-FGFR2IIIc or Ad-FGFR2IIIcS252W vs control; &: $P < 0.05$, Ad-FGFR2IIIc or Ad-FGFR2IIIcS252W vs Ad; ^: $P < 0.05$, Ad-FGFR2IIIcS252W vs Ad-FGFR2IIIc.

3 讨论

本研究成功构建了重组腺病毒载体 Ad-FGFR2IIIc 和 Ad-FGFR2 IIIcM252, 并感染了乳腺癌细胞 MDA-MB-231, 为这两种受体在肿瘤细胞中的功能研究提供了很好的工作基础。本研究中之所以选择 MDA-MB-231 细胞作为一种研究模型, 是因为 Chandler 等通过灵敏的 RNA 探针检测 60 种不同组织来源的肿瘤细胞中各种 FGFR 的 mRNA 表达, 发现几乎检测不到 MDA-MB-231 中 FGFR2 的表达^[13],

该结果也被 McLeskey 等验证^[14], 而本研究用 Western blotting 实验亦未检测到内源 FGFR2 蛋白的表达。因此, 采用该模型可以避免内源 FGFR2 的干扰, 对这两个受体的后期功能研究有重要意义。

对于膜蛋白受体的功能研究, 在显微镜下观察其在细胞膜上的定位及其与相关蛋白的相互作用就非常重要。有文献采用重组人 FGFR2 质粒转染 HEK293 细胞来研究, 这是因为 HEK293 细胞本身能表达出足够大量的外源 FGFR2 而又无内源的干扰^[17]。但是对于本课题在乳腺癌细胞中研究 FGFR2IIIc 及其突变型的功能而言, 常用的重组质粒转染法无法在乳腺癌细胞中获得足够量的膜蛋白表达, 而腺病毒表达系统由于其宿主范围广, 能同时高水平介导多个外源基因表达, 侵染之后不会整合到宿主细胞的基因组中, 从而可以避免引发新的基因突变等风险, 相比逆转录病毒等载体有明显优势^[15-16], 加上其同时携带有 GFP 标记, 在重组腺病毒质粒转化包装细胞后能直接通过荧光显微镜观察转染是否成功及其对靶细胞的感染效率, 为实验研究提供了方便, 故成为该研究首选的表达系统。

从 MTT 和流式细胞术的结果来分析, 过表达 FGFR2IIIc 和 FGFR2IIIcS252W 均能使 MDA-MB-231 细胞出现 G0/G1 期阻滞, 从而抑制细胞增殖, 而 FGFR2IIIcS252W 的抑制效果更明显, 说明这两个受体虽然只有一个碱基的差异, 但引起胞内的变化是不一样的。有文献指出, 这两个受体与配体的亲和力不同, 突变型显著增强^[7]; Ahmed 等也对这两个受体在膜上停靠时间以及与膜内蛋白结合的时间进行了研究, 发现有显著差别^[17], 以上实验数据和文献结果均为进一步对该两受体在肿瘤细胞中的功能研究提供了很好的基础。

REFERENCES

[1] Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, **8**(3): 235-253.
[2] Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth*

Factor Rev, 2005, **16**(2): 139-149.
[3] Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, et al. Receptor specificity of the FGF family. *J Biol Chem*, 1996, **271**(25): 15292-15297.
[4] Zhang X, Ibrahim OA, Olsen SK, et al. Receptor specificity of the FGF family: the complete mammalian FGF family. *J Biol Chem*, 2006, **281**(23): 15694-15700.
[5] Li X, Jiang HX, Chen G, et al. Correlations of *Helicobacter pylori* infection with the expression of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-2 in gastric mucosa and their significances. *World Chin J Digestol*, 2007, **15**(9): 964-969.
李信, 姜海行, 陈罡, 等. 幽门螺杆菌与胃黏膜 bFGF, FGFR-2 表达的关系及意义. *世界华人消化杂志*, 2007, **15**(9): 964-969.
[6] Ibrahim OA, Yeh BK, Eliseenkova AV, et al. Analysis of mutations in fibroblast growth factor (FGF) and a pathogenic mutation in FGF receptor (FGFR) provides direct evidence for the symmetric two-end model for FGFR dimerization. *Mol Cell Biol*, 2005, **25**(2): 671-684.
[7] Pollock PM, Gartside MG, Dejeza LC, et al. Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes. *Oncogene*, 2007, **26**(50): 7158-7162.
[8] Ibrahim OA, Eliseenkova AV, Plotnikov AN, et al. Structural basis for fibroblast growth factor receptor 2 activation in Apert syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(13): 7182-7187.
[9] Mohammadi M, Olsen SK, Ibrahim OA. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, **16**(2): 107-137.
[10] Fenig E, Szyper-Kraviz M, Yerushalmi R, et al. Basic fibroblast growth factor mediated growth inhibition in breast cancer cells is independent of ras signaling pathway. *Oncol Rep*, 2002, **9**(4): 875-877.
[11] Xian W, Schwertfeger KL, Rosen JM. Distinct roles of FGFR1 and FGFR2 in regulating cell survival and epithelial-mesenchymal transition. *Mol Endocrinol*, 2007, **21**(4): 987-1000.
[12] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 888-898.
[13] Chandler LA, Sosnowski BA, Greenlees L, et al. Prevalent expression of fibroblast growth factor (FGF) receptors and FGF2 in human tumor cell lines. *Int J Cancer*, 1999,

- 81(3): 451-458.
- [14] McLeskey SW, Ding IYF, Lippman ME, *et al.* MDA-MB-134 breast carcinoma cells overexpress fibroblast growth factor (FGF) receptors and are growth-inhibited by FGF ligands. *Cancer Res*, 1994, **54**(2): 523-530.
- [15] Li ZY, Ren YM, Rong ZL, *et al.* Construction and characterization of hSef recombinant adenoviral vectors. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(2): 193-197.
- 李智勇, 任永明, 荣知立, 等. 人 Sef 基因重组腺病毒载体的构建与鉴定. *生物工程学报*, 2008, **24**(2): 193-197.
- [16] Barnett BG, Crews CJ, Douglas JT. Targeted adenoviral vectors. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1575**(1/3): 1-14.
- [17] Ahmed Z, Schüller AC, Suhling K, *et al.* Extracellular point mutations in FGFR2 elicit unexpected changes in intracellular signalling. *Biochem J*, 2008, **413**(1): 37-49.

《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要: 基本要素包括研究目的、方法、结果和结论 (不用单列标题书写)。目的 (Purpose): 主要说明作者写此文章的目的, 或说明本文主要要解决的问题; 方法 (Methods): 重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要, 可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果 (Results): 本文最后得出的结果 (实验数据部分)。结论 (Conclusions): 如系基础研究, 应写明本文的创新之处, 及文章在讨论部分表述的观点; 如系应用性研究, 应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要: 包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望, 尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点: 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后, 务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的, 即使学术上可以达到刊出的水平, 本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称, 尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊尽量不用, 这样可以免好多长句, 以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句, 避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态, 语法正确, 句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语, 除非是那些人人皆知的 (如DNA、ATP等), 或者确实是非常长, 而且出现多次的短语才允许用缩写语, 并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中, 不要使用任何汉字字符, 包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。