

逆向第一型轉形生長因子 (Antisense TGF- α) 基因的表現對人類肺癌細胞生長的影響

高中組生物科第三名

北一女中

作者：陳詩蕙

指導教師：方剛、薛如娟

一、研究動機

癌症的形成與細胞的不正常增殖相關，正常細胞因為細胞的增殖受到嚴密控制，所以不至於發生細胞無限制增殖的情況。以皮膚為例，即使一個細胞變成兩個，但依照程式，其中一個不久即會死滅。癌細胞則沒有此種程式，它們會成等比級數增殖下去，因此，病理學上把癌症定義為「失去自律性的增殖」。將正常細胞用培養皿培養時，若培養皿表面覆蓋一層細胞，增殖即會終止。又細胞互相接觸時，就會改變方向而排列在一定方向（接觸阻止現象），這是因為細胞膜經常做為控制增殖或運動的感應器，完成其正常任務的關係。但癌細胞則沒有此種控制功能，所以將無休止的增殖，甚至跨上鄰接的細胞，一再重疊。

而調控細胞增生現象的基因，根據目前所知已有上皮生長因子群(epidermal growth factor family ; EGF family)等，而第一型轉形生長因子(transforming growth factor- α ; TGF- α)即為其成員之一，此基因存在於正常細胞與轉形細胞(transformed cell)中，具多重之功能，包括胚胎細胞遷移(migration)、細胞增殖(proliferation)、細胞分化(differentiation)及細胞外間質的形成等，是肺癌細胞株維持生長的一個極重要生長因子。人類的TGF- α 基因位於第二對染色體的短臂上，基因全長約100Kb包含六個exons。而TGF- α 基因轉錄之mRNA大小約4.8Kb；人類和mouse、rat之TGF- α 胺基酸序列相同度(homology)達90%。

本實驗以人類扁平細胞癌細胞株(squamous cell carcinoma cell line) H226、及H226腦轉移細胞株H226Br為材料取RNA進行反轉錄聚合酵素連鎖反應(RT-PCR)所得TGF- α cDNA經淘選純化(elution)後，再經載入質體，篩選純系(clone)做大量的複製，最後以限制酵素將TGF- α 基因從質體中切出，構築反向(anti-sense) TGF- α 質體，因反向TGF- α 基因能中和正常的TGF- α 基因，使其不能表現。希望將來能夠感染(transfect)至人類肺癌細胞株使降低其生長速率，讓基因治療研究有更

進一步發展。

二、研究目的

為探討逆向第一型轉形生長因子(Anti-sense TGF- α)是否真的對人類肺癌細胞株的生長速率有影響甚而抑制，而以細胞計數的方法，計算細胞株增殖的速率。並藉由RT-PCR放大TGF- α ，觀察TGF- α 基因表現量的改變。

三、研究設備器材

(一)化學藥品

1. JETsorb gel extraction kit(Genomed)
2. 洋菜膠(agarose gel)
3. polyacrylamide gel
4. 勝任細胞(competent cell): TOP
5. pGem-T (Promega)、pcDNA3 (Invitrogen)
6. T4 DNA ligase (3,000 units/ml; Promega)
7. 細菌培養液(LB medium, 含50 μ l/ml ampicillin)
8. 含抗生素之固態培養基(LB medium; 50 μ l/ml ampicillin; 1.5% agar)
9. X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)
10. Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside(IPTG)
11. isopropanol; 70%酒精; 95%酒精; phenol; chloroform
12. RNase (20 μ g/ml)
13. CsCl、EtBr、正丁醇
14. Lipofectamine
15. G418
16. 胎牛血清(FBS; Intergen)
17. PRMI-1640 (ICN)培養液 [含100 IU/ml penicillin (Sigma), 100 μ g/ml streptomycin (Sigma)]
18. trypan blue (0.4%)
19. sodium acetate
20. DNase (1,000 units/ml; Promega)
21. RNAase inhibitor (31,200 units/ml; Pharmacia Biotech)
22. random primers (500 μ g/ml; Promega); dNTP (10mM)
23. M-MLV reverse transcriptase (200,000 units/ml; Promega)

24. DyNAZyme™ II thermostable DNA polymerase (5 units/ μ l; Finnzymes Oy; Finland)

(二) 溶液配方

1. T4 DNA ligase 10 \times buffer (300 mM Tris-HCl, pH 7.5; 100mM MgCl₂; 100mM DTT; 10 mM ATP)
2. solution 1 (50 mM glucose; 25mM Tris-HCl, pH8.0; 10mM EDTA, pH 8.0)
3. solution 2 (0.2 N NaOH; 1% SDS)
4. solution 3 (3 M potassium acetate; 10% acetic acid)
5. TE buffer (10mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH8.0)
6. trypsin buffer (0.05% trypsin; 0.02% EDTA; Gibco)
7. PBS (Phosphate buffered saline) 溶液 (KCl 0.2 g/L; NaCl 8.0 g/L; KH₂PO₄ 0.2 g/L; Na₂HPO₄ 5.7 g/L)
8. solution D (4 M guanidinium thiocyanate; 25 mM sodium citrate, pH 7.0; 0.5% sodium lauryl sarcosinate; 0.1 M 2-mercaptoethanol)
9. 10 \times DNase buffer (400 mM Tris-HCl, pH 7.9; 100 mM NaCl; 60 mM MgCl₂; 100 mM CaCl₂)
10. M-MLV RT 5 \times buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 50 mM DTT)
11. 10 \times PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.8; 15mM MgCl₂; 500 mM KCl; 1% Triton X-100)

四、研究過程及方式

由肺癌細胞萃取RNA \rightarrow RT-PCR放大TGF- α 基因 \rightarrow 淘選、純化DNA片段(elute DNA) \rightarrow 將基因與質體接合(ligate DNA)成爲pGemT-TGF- α \rightarrow 質體殖(transformation) \rightarrow 篩選純系(clone), 鑑定TGF- α 基因DNA序列 \rightarrow 抽出質體DNA (mini-preparation) \rightarrow 以限制酵素切出所要的DNA片段(enzyme digestion) \rightarrow 將此段DNA反向嵌入可置入哺乳類動物細胞內的載體成反向質體(pcDNA3-AS-TGF- α) \rightarrow 將質體送進細胞觀察其表現及細胞生長速率的變化 \rightarrow 萃取細胞中的RNA \rightarrow 以RT-PCR放大TGF- α 基因, 觀察基因表現量的多寡。

五、研究結果

(一)外加逆向基因(Antisense-TGF α)對細胞株生長的影響

將pcDNA3-AS-TGF α 質體及不含TGF- α 基因的pcDNA3分別感染至H460細胞後，由G418篩選純系，培養於含6%FBS的RPMI-1640中，每個well含 1×10^4 個細胞，各有6個well，於指定的時間內計數後，繪成細胞總數曲線圖（圖一）。如圖所示，作為對照組只含pcDNA3的H460細胞其細胞增殖數目一開始比含pcDNA3-AS-TGF α 的H460細胞多出許多，而含pcDNA3-AS-TGF α 的H460細胞株的增殖數目並不高。但到了第八天以後，此細胞株的細胞總數便近於只有pcDNA3-transfected H460細胞的總數。

(二)TGF- α 基因的表現

本實驗以RT-PCR的方法偵測pcDNA3-transfected H460細胞株及pcDNA3-AS-TGF α -transfected H460細胞株TGF- α 基因的表現量。首先自該細胞株萃取RNA，再由0.8% agarose gel觀察18S、28S環帶，鑑定出分離RNA的完整性。經RT-PCR反應後，自 $12.5 \mu\text{l}$ TGF- α PCR產物中取 $6 \mu\text{l}$ 以0.6%polyacrylamide gel電泳分離。發現pcDNA3-AS-TGF α -transfected H460細胞株已觀察不出TGF- α 基因的表現。而作為對照組的pcDNA3-transfected H460細胞株仍有TGF- α 基因表現（圖二）。顯示出pcDNA3-AS-TGF α -transfected H460所轉錄出的TGF- α mRNA較H460及pcDNA3-transfected H460為少。

六、討 論

由外加逆向基因(Antisense-TGF α)對細胞株生長的影響顯示，初步得到Antisense-TGF α 基因可能會抑制細胞株生長的結果。然而第八天之後，pcDNA3-AS-TGF α -transfected H460細胞增殖總數近於pcDNA3-Transfected H460細胞的總數。我們推論：可能是細胞其他生長因子表現彌補了H460生長所需TGF- α 。更進一步由RT-PCR的結果顯示，pcDNA3-AS-TGF α -transfected H460轉錄出的TGF- α mRNA減少了，推論是由於Antisense-TGF α 在CMV啟動子促進下可轉錄出具有互補序列的mRNA，而中和了細胞株原有TGF- α 基因所轉錄的mRNA，使其TGF- α 基因表現降低，進而提供了解釋使細胞增殖速率減緩的理由。

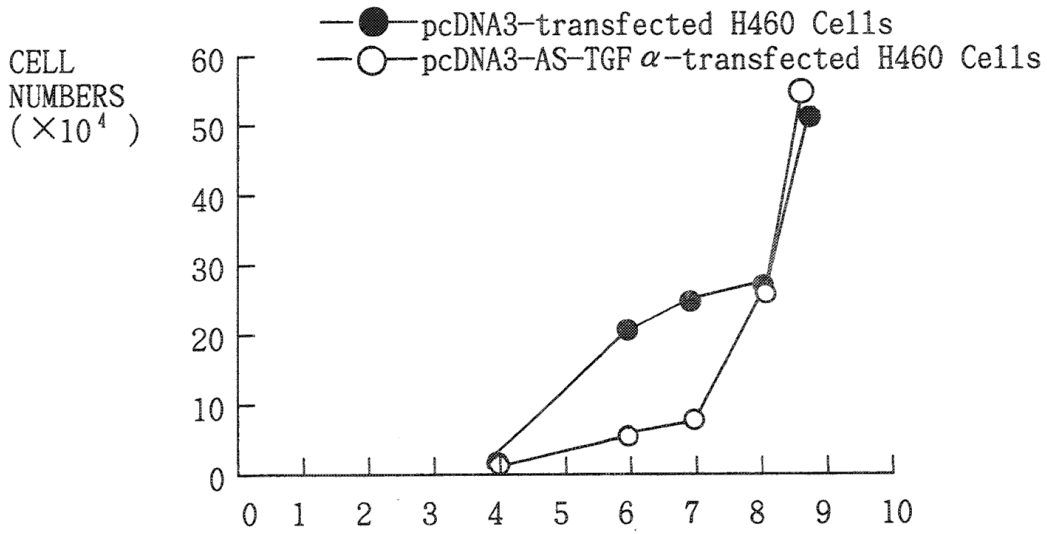
七、結 論

目前我們確實已構築出 Antisense-TGF α 質體，並且已成功地感染(transfect)至一個非小細胞肺癌細胞株。由初步的結果看來，Antisense-TGF α 基因可能會抑制細胞株的生長。將來還需繼續培養其他細胞株，比較這些細胞株之間的差異，探討transfected與未transfected細胞的差別，以獲得足夠的數據。由這種感染方式

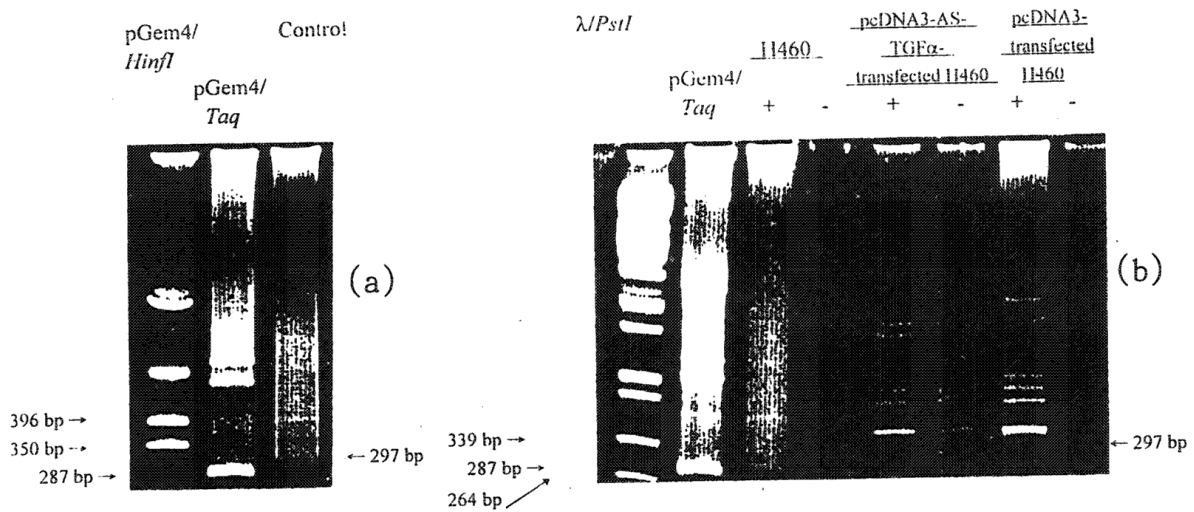
篩選出的細胞可成爲穩定細胞株，進而作爲將來觀察其他生長情形之用，相較於直接由反向寡核苷酸(oligo nucleotides)感染，僅有毒性胞殺作用，此法用途較爲廣泛。此外已經萃取出細胞的RNA，做RT-PCR放大，觀測到TGF- α 基因表現量的改變，而導致細胞增殖速率的差異。這說明了TGF- α 的表現，在調控人類肺癌細胞的增生方面，是一個極爲重要的生長因子。

八、參考資料及附圖

- 1.K Fang (1996) : An enhanced and sensitive autocrine stimulation by transforming growth factor- α is acquired in the brain metastatic variant of a human non-small-cell lung cancer line, *British Journal of Cancer* 74, 1776-1782.
- 2.Aaronson SA. (1993) : Growth factors and cancer, *Science*, 254, 1146-1153.
- 3.Chomczynski P and Sacchi N. (1987) : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- 4.Jakowlew, S. B., Kondaiah, P., Dillard, P. J., Sporn, M B., and Roberts, A. B, (1988) : .A novel low molecular weight ribonucleic acid(RNA) related to transforming growth factor α messenger RNA. *Mol. Endocrinol.*, 2, 1056-1063.
- 5.譚懿文 (1995) : 第一型轉形生長因子(TGF- α)在人類非小細胞肺癌(NSCLC)細胞株中的表現，國立台灣師範大學生物研究所碩士論文。
- 6.譚懿文；方剛 (1995) : 第一型轉形生長因子(TGF- α)在人類非小細胞肺癌細胞株中的表現與自泌刺激效應，師大生物學報30 (1)41-53。
- 7.方剛；Limin Li；施河 (1995) : 上皮生長因子受體在人類肺癌腺細胞轉移後表現漸減之探討，*Proceedings of the National Science Council, ROC* , Part B: Life Science , Vol. 19, No.1, pp. 1-7。
- 8.癌症面面觀，牛頓雜誌，第93期，pp. 30-51，1991。
- 9.基因治療的時代終於來臨，牛頓雜誌，第142期，pp. 96-113，1995。



圖一 人類非小細胞肺癌細胞株H460為pcDNA3或pcDNA3-AS-TGF α 感染(transfected)之後，經由G418篩選之後留下穩定細胞，觀察細胞生長速率。取 1×10^4 細胞置入12-well plate中，於37°C培養後，用trypsin-EDTA處理之後，分別計算細胞的數目。



圖二 自H322、H460、pcDNA3-transfected H460、及pcDNA3-AS-TGF α -transfected H460細胞株萃取RNA，經RT-PCR反應後，自 $12.5 \mu\text{l}$ TGF- α PCR產物中取 $6 \mu\text{l}$ 以0.6% polyacrylamide gel電泳分離。圖(a)為正控制組(H322)的TGF- α PCR。圖(b)為實驗組pcDNA3-AS-TGF α -transfected H460及對照組pcDNA3-transfected H460的TGF- α PCR。發現pcDNA3-AS-TGF α -transfected H460細胞株已觀察不出 TGF- α 基因的表現。而作為對照組的pcDNA3-transfected H460細胞株仍有TGF- α 基因表現。

評語

本計畫由人類扁平細胞癌細胞株H226等抽取RNA並用RT-PCR得TGF- α 基因，放入pcDNA3-AS-TGF- α 感染人類non-Small lung cancer cell line H460，並以antisense試圖中和TGF- α 之表現，以供基因治療之基本參考，本探討具應用價值。