论著

文章编号:1000-5404(2012)04-0284-06

核糖核酸酶抑制因子过表达抑制B16细胞的侵袭和转移

潘湘阳,李红彦,姚 雪,熊冬梅,陈俊霞 (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院细胞生物学与遗传学教研室,分子医学与肿瘤研究中心)

[摘要] **目的** 构建人核糖核酸酶抑制因子(ribonuclease inhibitor,RI)真核表达载体,检测其对B16细胞侵袭和转移能力的影响。**方法** 提取人7703细胞中的总RNA,RT-PCR特异性扩增RI编码区序列,利用基因重组技术将其克隆到载体pIRES2-EGFP中,稳定转染B16细胞以后,经G418筛选出阳性克隆。根据转染质粒不同分别命名为B16细胞组(未转染组)、空质粒对照组(pIRES2-EGFP组)和实验组(pIRES2-EGFP-RI组)。RT-PCR检测B16细胞中RI mRNA水平的表达,并通过Western blot和细胞免疫化学检测RI蛋白水平的表达;HE染色观察细胞形态的改变,黏附实验、划痕实验和Transwell法检测细胞黏附、迁移和侵袭能力的变化;Western blot检测MMP-2、MMP-9和nm23-H1以及E-cadherin的表达;建立C57BL/6小鼠肺转移模型,观察肺上肿瘤转移灶的变化。**结果** 酶切和测序结果证明重组质粒构建成功,实验组细胞RI的mRNA和蛋白的表达较B16细胞组和空质粒对照组显著升高($P<0.05$);HE染色结果显示,细胞铺展良好,核质比减小;转染pIRES2-EGFP-RI质粒的实验组细胞的黏附、迁移及侵袭能力明显降低($P<0.05$);与两对照组相比,实验组细胞MMP-2和MMP-9的表达水平明显降低,nm23-H1和E-cadherin的表达水平明显升高($P<0.05$);动物实验结果显示与对照组相比,实验组的肺转移灶明显减少。**结论** 成功构建的RI真核表达质粒能升高RI基因及蛋白水平的表达,显著抑制了B16细胞的转移和侵袭能力。

[关键词] 核糖核酸酶抑制因子;B16黑色素瘤细胞;细胞黏附;细胞运动;肿瘤转移;肿瘤侵润

[中图法分类号] R392-33;R73-37;R739.5 [文献标志码] A

Over-expression of human ribonuclease inhibitor suppresses invasion and migration in B16 melanoma cells

Pan Xiangyang, Li Hongyan, Yao Xue, Xiong Dongmei, Chen Junxia (Department of Cell Biology and Genetics, Molecular Medicine and Cancer Research Center, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct the human ribonuclease inhibitor (RI) eukaryotic expression vector and determine the effect of RI over-expression on the invasion and migration in melanoma B16 cells. **Methods** Total RNA was extracted from human 7703 cells by Trizol reagents, the RI cDNA fragment was amplified by RT-PCR and the DNA fragment was inserted into the eukaryotic expression vector pIRES2-EGFP with DNA recombinant techniques. Then the vectors were transfected into B16 cells and positive clones were screened with G418. The efficiency of RI genes over-expression was determined by RT-PCR, Western blotting and immunocytochemical assay. B16 cells were observed for morphological changes by HE staining. Adhesion test, cell scratch test and Transwell chamber test were used for adhesion, migration and invasion abilities of the B16 cells. The expression of MMP-2, MMP-9, nm23-H1 and E-cadherin were detected by Western blotting. Lung metastasis nodule was observed by injecting the cells into c57BL/6 mice *via* tail vein. **Results** Enzyme digestion and DNA sequencing verified the constructed vectors was correct. The RI expression of mRNA and protein levels was significantly increased in B16 cells transfected with pIRES2-EGFP-RI vectors than in control cells. The cells transfected with pIRES2-EGFP-RI expression vectors spread well, with lower nuclear/cytoplasm ratio than controls, and their adhesion, migration and invasion abilities were decreased significantly, while the expression of MMP-2 and MMP-9 was obviously decreased but the nm23-H1 and E-cadherin significantly increased. The mice that were injected with the B16 cells transfected with pIRES2-EGFP-RI showed a smaller number of lung metastasis nodule than those in the control group. **Conclusion** The RI eukaryotic expression

[基金项目] 国家自然科学基金(81071719,81172424);重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5273)

[通信作者] 陈俊霞,电话:(023)68485806,E-mail:chjunxia@126.com

vector is successfully constructed. The vector improves RI expression, and decreases cell migration and invasion significantly in B16 cells.

[**Key words**] ribonuclease inhibitor; B16 cells; cell adhesion; cell movement; neoplasm metastasis; neoplasm invasiveness

Supported by the National Natural Science Foundation of China(81071719,81172424) and the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2009BB5273).
Corresponding author: Chen Junxia, Tel:86-23-68485806, E-mail: chjunxia@126.com

核糖核酸酶抑制因子(ribonuclease inhibitor,RI)是一种酸性糖蛋白,是核糖核酸酶 A(ribonuclease A,RNase A)的抑制剂。RI 由许多亮氨酸的重复序列组成,含有这样重复序列的一百多种蛋白质显示广泛的功能,包括细胞周期调节、DNA 修复、细胞外基质的相互作用等[1-2]。有研究[3]表明:RI 不仅是 Rnase A 的抑制剂,而且还能抑制血管的生成以及小鼠体内实体瘤的生长;同时上调 RI 在细胞内的表达能力致使黑色素瘤 B16 细胞的迁移能力下降,并能抑制肿瘤在动物体内转移[4];而下调 RI 不仅体外能显著提高膀胱癌 BIU-87 细胞的迁移和侵袭能力,而且体内也显著促进肿瘤生长和非侵袭性膀胱癌 BIU-87 细胞的转移潜能[5]。但是上调 RI 对细胞侵袭的作用,以及 RI 表达水平上调后对肿瘤细胞侵袭和转移的分子机制的影响尚有待探明,其与肿瘤细胞侵袭和转移之间的关系仍不清楚。为了进一步探讨 RI 的功能,本实验构建了 RI 的真核表达质粒,观察其对 B16 细胞的侵袭、迁移和黏附的影响,并检测细胞中 MMP-2、MMP-9、nm23-H1 和 E-cadherin 的表达,建立小鼠肺转移模型,观察 B16 细胞体内转移能力的变化。为进一步研究上调 RI 对肿瘤的生长和迁移的作用及机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

B16 黑色素瘤细胞由重庆医科大学生物医学工程系王智彪教授惠赠,逆转录试剂盒、高保真 *Taq* DNA 聚合酶、T_4 DNA 连接酶等购自大连宝生物公司,转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司,胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自OMGA 公司,MMP-2、MMP-9 和 nm23-H1 以及 E-cadherin 单克隆抗体购自 Bioworlde 公司,兔抗人 β-actin、兔抗人 RI、表达载体 pIRES2-EGFP、人肝癌细胞系 7703 以及大肠杆菌 DH5α 由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 pIRES2-EGFP-RI 真核表达载体的构建与鉴定 根据 GenBank 提供的人 RI cDNA 序列(NM_002939),用 Primer 5.0 软件设计合成引物。引物序列:上游 5′-CG*GAATTC*CTTCAC-CTCCACCATGAGC-3′;下游 5′-GC*GTCGAC*AGGAAGACCTCAG-GAGATG-3′。分别在上游引物 5′端加入 *Eco*R Ⅰ酶切位点(斜体)和下游引物 5′端加入 *Sal* Ⅰ酶切位点(斜体)。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

用 Trizol 从人 7703 细胞中提取人的 mRNA,以其为模板,逆转录合成 cDNA 后,进行 RI 基因的 PCR 扩增。PCR 产物在 1% 琼脂糖进行凝胶电泳检测,并对正确 PCR 产物胶回收纯化,用 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ分别切割纯化后的 PCR 产物与表达载体 pIRES2-EGFP,1% 琼脂糖凝胶电泳回收。在 T_4 DNA 连接酶的作用下,16 ℃连接过夜。将连接产物转化至 DH5α 感受态细菌中,涂布于 LB(含 Kana 抗生素)平板,37 ℃过夜,次日挑选单菌落扩增提取重组质粒,经 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切鉴定,将阳性质粒命名为 pIRES2-EGFP-RI,并将阳性克隆送华大基因公司测序。

1.2.2 黑色素瘤 B16 细胞的培养及转染

1.2.2.1 细胞的培养 黑色素瘤 B16 细胞用含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基(含青霉素和链霉素浓度均为 1×10^5 U/L),于 37 ℃和 5% CO_2 的培养箱中培养。

1.2.2.2 细胞的转染和分组 取对数生长期的细胞均匀接种于 6 孔培养板中,约 80% 细胞融合时开始实验,用脂质体 Lipofectamine 2000 分别转染不同的质粒到细胞中,根据转染质粒不同分别命名为 B16 细胞组(未转染组)、空质粒对照组(pIRES2-EGFP 组)和实验组(pIRES2-EGFP-RI 组),每组设 3 个复孔,操作按照试剂说明书进行。

1.2.3 建立稳定转染人 RI 的小鼠黑色素瘤 B16 细胞系 将 pIRES2-EGFP-RI 质粒和空质粒分别转染 B16 细胞,转染 24 h后,1∶3进行传代培养,转染 48 h 后,改用含 1 000 μg/ ml G418、10% 血清的培养基培养。筛选 10 ~ 14 d 后,采取有限稀释法挑取单个有荧光细胞于 96 孔板中培养。10 ~ 15 d 后,将孔中生长的单克隆细胞团块消化下来后逐级扩大培养,即可得到单克隆细胞系。

1.2.4 各组细胞 RI 基因表达的检测

1.2.4.1 RI 基因 mRNA 转录水平的检测 用 Trizol 抽提各组细胞总 RNA,RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司)测定 RI mRNA 的水平。RI 基因上游引物:5′-TCAGCGACAACCTCTTGGG-3′,下游引物:5′-CACAATGCCGCACAGGTC-3′,扩增产物约 310 bp;GAPDH 基因上游引物:5′-GCTGTCCCTGTCGCCTCTG-3′,下游引物:5′-TGCCGATGGTGATGACCTGG-3′,扩增产物约 330 bp。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后,由 Bio-Rad 凝胶成像仪摄取凝胶图像,用 Quantity One 进行 RI 与 GAPDH 相对强度的比率分析。

1.2.4.2 Western blot 检测 RI 蛋白的表达 用蛋白裂解液(10^6个细胞/100 μl)抽提各组细胞的总蛋白,经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,常规湿法转膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,一抗 4 ℃ 孵育过夜(兔抗人 RI 1∶500,兔抗人 β-actin 1∶1 000),HRP 标记的羊抗兔(1∶3 000)二抗 37 ℃孵育 2 h,ECL 化学发光显色,Bio-Rad 凝胶成像仪下观察照相并用 Quantity One 进行 RI 与 β-actin 相对强度的比率分析。

1.2.4.3 细胞免疫化学分析 使用兔 S-P 检测试剂盒完成免疫组化检测。取固定好的各组细胞爬片 PBS 漂洗 3 遍,3%

H_2O_2作用10 min,正常羊血清封闭10 min,一抗兔抗人RI多抗4 ℃孵育过夜(1∶100稀释),加入生物素标记的羊抗兔IgG,37℃孵育15 min,再加入HRP标记的链酶卵白素工作液37 ℃孵育15 min,最后加入DAB显色,使用苏木精复染胞核,倒置显微镜下观察,拍照。

1.2.5 HE染色 取固定好的各组细胞爬片PBS漂洗3遍后,苏木精染色5 min,盐酸乙醇分化30 s,自来水洗,伊红染色10 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,观察拍照。

1.2.6 各组细胞黏附、迁移和侵袭能力的检测

1.2.6.1 细胞黏附实验 96孔板每孔加入50 μl的50 μg/ml的matrigel,4 ℃风干过夜,37 ℃水化1 h,每孔加入100 μl含5 000个细胞的10% FBS培养基,培养2 h后PBS洗涤3次,洗去未黏附的细胞后每孔加入20 μl MTT,继续孵育4 h,弃去培养基,再加入150 μl二甲亚砜,震荡混匀10 min,490 nm波长下读取光密度值[$D(490)$][6]。

1.2.6.2 划痕法迁移试验 6孔板培养对数期的B16细胞至汇合度达到95%时,用200 μl的枪头划痕,更换无血清培养基培养。培养48 h后,4%多聚甲醛固定30 min,Gimesa染色10 min,观察伤口愈合程度,细胞相对迁移能力=0 h时划痕距离−48 h时划痕距离。

1.2.6.3 细胞侵袭能力检测 用50 μl的400 μg/ml的matrigel稀释液包被Transwell 8 μm小室基底膜的上室面,4 ℃风干过夜,使用前37 ℃水化2 h,使用无血清、含0.1% BSA的培养基稀释细胞,按细胞密度为2×10^6/ml接种100 μl培养基稀释液到上室中,下室中加入含10% FBS的RPMI1640培养基。常规培养48 h,甲醇固定,0.1%结晶紫染色,光镜下随机选取5个视野观察计数,取平均值[6]。

1.2.7 Western blot检测MMP-2、MMP-9和nm23-H1以及E-cadherin蛋白的表达 用蛋白裂解液(10^6个细胞/100 μl)抽提各组细胞的总蛋白,经10% SDS-PAGE凝胶电泳、常规湿法转膜、5%脱脂奶粉封闭2 h、一抗4 ℃孵育过夜(兔抗MMP-2、MMP-9、nm23-H1以及E-cadherin均为1∶500,兔抗β-actin 1∶1 000)、HRP标记的羊抗兔(1∶3 000)二抗37℃孵育2 h、ECL化学发光显色,于Bio-Rad凝胶成像仪下观察照相并用Quantity One进行各蛋白与β-actin相对强度的比率分析。

1.2.8 动物体内实验 胰酶消化对数生长期的实验组和空质粒对照组细胞,制备成0.1 ml含有5×10^5个细胞的悬液,分别注射到C57BL/6小鼠尾静脉中(小鼠购自重庆医科大学实验动物中心,雌雄各半,分开喂养,6~8周龄,体质量约为20 g,每组各8只)。注射21 d后,处死小鼠,观察各组小鼠肺转移灶数。

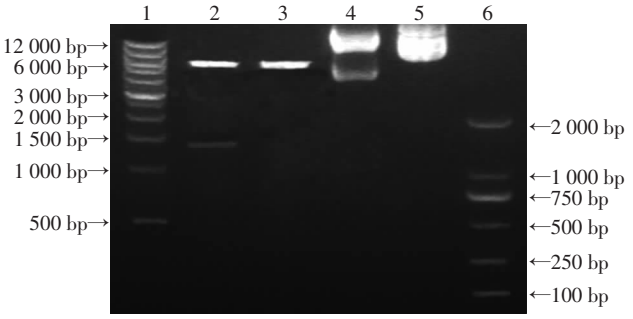
1.3 统计学分析

采用SPSS 11.5软件进行数据统计分析,实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,配对组间比较采用配对样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 重组质粒pIRES2-EGFP-RI双酶切和测序鉴定

双酶切后产生两条带,分别为5 300 bp和1 400 bp左右,酶切结果与预期的一致(图1),证明人RI基因已成功插入目的载体中,测序结果也证明PCR扩增正确。

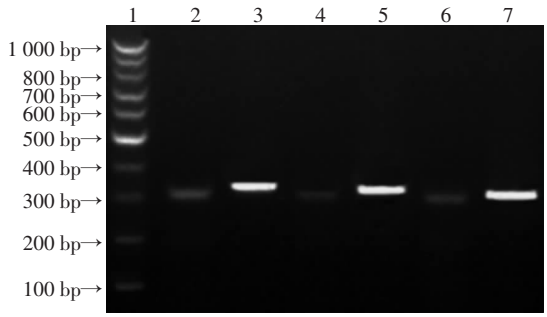


1:DNA标准(DL 12 000);2:pIRES2-EGFP-RI酶切;3:pIRES2-EGFP酶切;4: pIRES2-EGFP质粒; 5:pIRES2-EGFP-RI质粒;6:DNA标准(DL 2 000)

图1 pIRES2-EGFP-RI重组质粒*Eco*R Ⅰ和*Sal* Ⅰ双酶切鉴定

2.2 稳定转染的B16细胞克隆过表达RI的鉴定

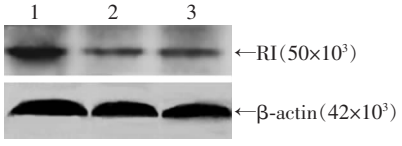
2.2.1 B16细胞RI mRNA的表达结果 半定量RT-PCR结果见图2。与B16细胞组(0.118±0.021)和空质粒对照组(0.164±0.022)相比,实验组细胞的RI mRNA表达(0.320±0.0277)分别升高了172%和95%($P<0.05$),而2个对照组间无明显差异。



1:标准(100 bp ladder);2、3:实验组;4、5:空质粒对照组;6、7:B16细胞组;2、4、6: RI mRNA;3、5、7: GAPDH mRNA

图2 RT-PCR检测各组细胞RI mRNA的表达

2.2.2 B16细胞RI蛋白的表达结果 与B16细胞组(0.217 2±0.048 2)和空质粒对照组(0.428 9±0.026 5)相比,实验组的RI表达水平(0.619 0±0.052 7)明显升高。如图3所示,分别升高了185%和114%($P<0.05$),而2个对照组间无明显差异。这和RT-PCR结果一致。



1:实验组;2:空质粒对照组;3:B16细胞组

图3 Western blot检测各组细胞RI蛋白的表达

2.2.3 免疫细胞化学分析 RI在细胞质中表达,检测结果显示实验组细胞细胞质染色较深,灰度值比2个对照组高,见图4,表明在实验组细胞细胞质中RI含量较2个对照组明显升高。

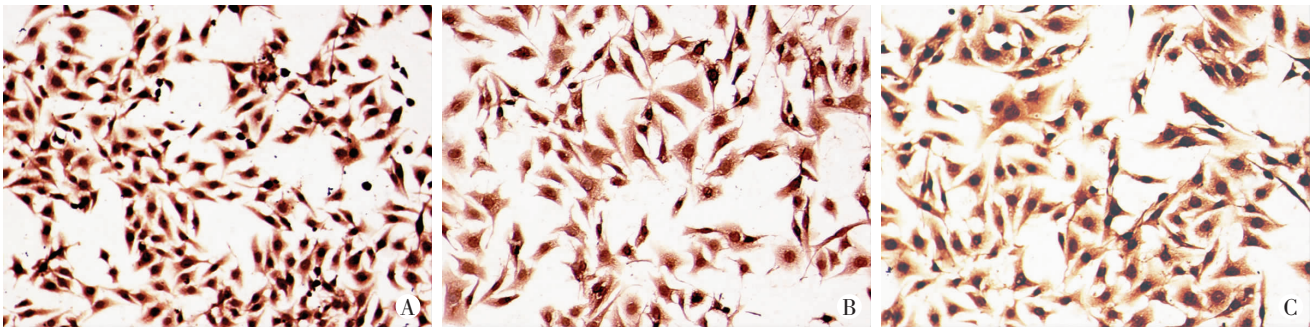
2.3 细胞形态学观察

相对于2个对照组,实验组细胞铺展良好,细胞核质比明显降低,核分裂象减少,核仁减小,染色较浅,表明细胞的恶性程度降低。见图5。

2.4 过表达 RI 后各组细胞黏附、迁移和侵袭能力的变化

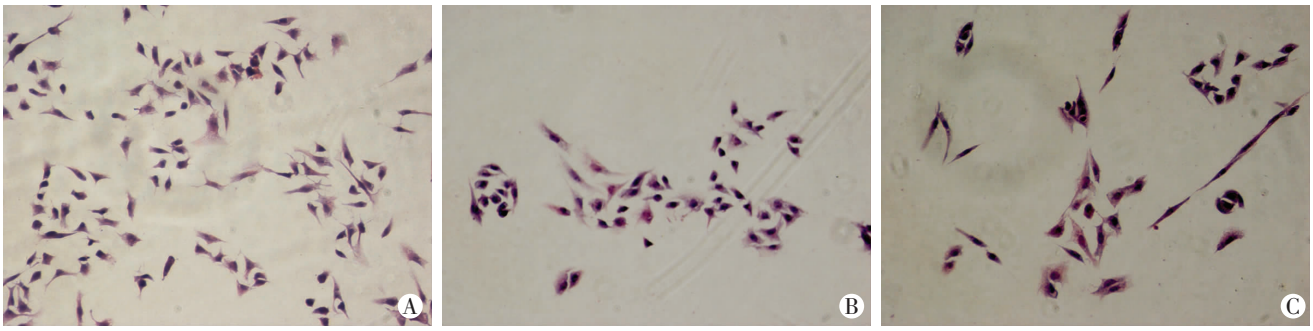
2.4.1 细胞与基底膜间黏附能力检测 实验组 D(490)值为(0.070 ± 0.010),而 2 个对照组细胞 D(490)值分别为(0.110 ± 0.008)和(0.105 ± 0.013)。因此,实验组细胞与基底膜的黏附能力相对于对照组分别降低了 36.4% 和 33% (F = 28.80, P < 0.05),黏附能力显著降低。

2.4.2 划痕法检测细胞迁移能力 结果见图 6。实验组的迁移距离为(633.00 ± 153.22) μm,而 2 个对照组的迁移距离分别为(1 212.46 ± 51.65) μm 和(1 262.51 ± 94.54) μm,实验组细胞的迁移能力显著小于 2 个对照组细胞,且差异具有统计学意义(F = 52.345, P < 0.05)。



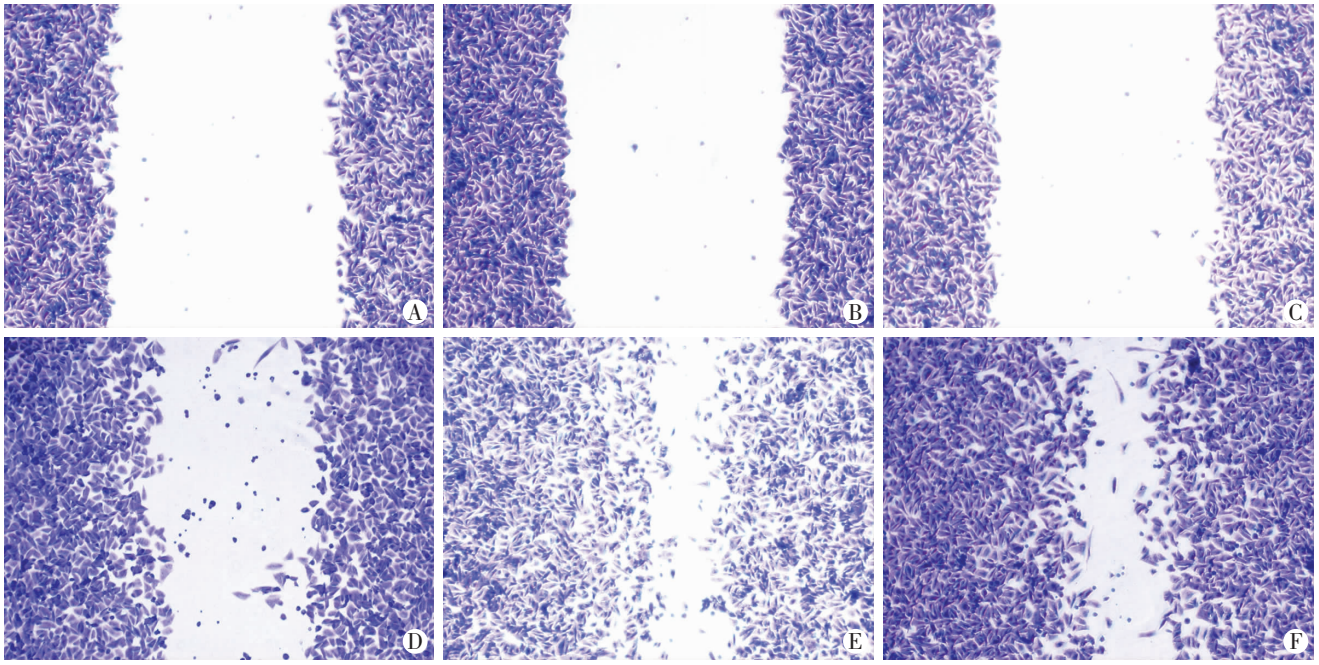
A:实验组;B:空质粒对照组;C:B16 细胞组

图 4 免疫细胞化学观察各组细胞 RI 蛋白的表达 (S-P ×200)



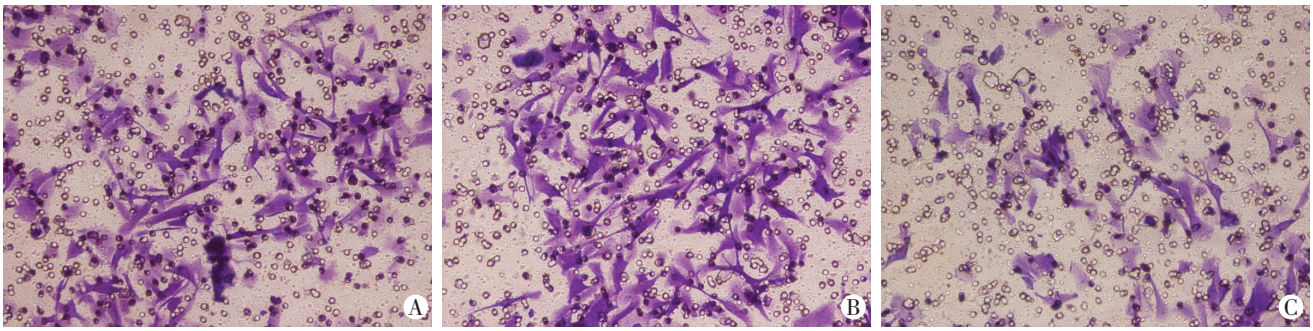
A:实验组;B:空质粒对照组;C:B16 细胞组

图 5 各组细胞形态学观察 (HE ×200)



A:实验组 0 h; B:空质粒对照组 0 h; C: B16 细胞组 0 h; D:实验组 48 h; E:空质粒对照组 48 h; F: B16 细胞组 48 h

图 6 细胞划痕试验检测各组细胞的迁移能力 (Gimesa ×100)



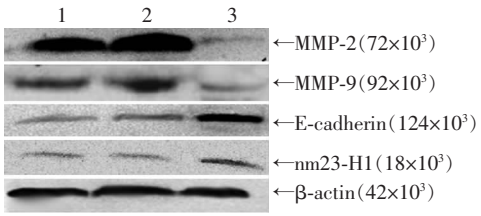
A:空质粒对照组;B:B16细胞组;C:实验组

图7 侵袭小室检测各组细胞的侵袭能力 (结晶紫 ×200)

2.4.3 Transwell检测各组细胞体外侵袭能力 结果见图7。光镜下,空质粒对照组和B16细胞组平均视野侵袭细胞数分别为(187.87±14.57)个和(193.33±21.00)个,而实验组平均视野侵袭细胞数为(80.00±10.44)个,即实验组分别为两个对照组的42.5%和41.2%,侵袭能力显著下降,且差异具有统计学意义($F=48.125$,$P<0.05$),与迁移实验结果一致,说明过表达RI会降低细胞的迁移运动和侵袭能力。

2.5 各组细胞中MMP-2、MMP-9和nm23-H1以及E-cadherin蛋白的表达

与空质粒对照组(1.201 4±0.072 1,0.475 1±0.038 7)和B16细胞组(1.663 8±0.113 4,0.739 0±0.097 3)相比,实验组中MMP-2和MMP-9蛋白表达(0.216 3±0.046 4,0.204 3±0.019 7)明显降低,MMP-2分别降低了82%和87%($P<0.05$),MMP-9分别降低了57%和71%($P<0.05$)。而与两对照组(0.118 6±0.028 6、0.172 2±0.045 1;0.156 3±0.054 9、0.175 2±0.047 8)相比,实验组中nm23-H1和E-cadherin的蛋白表达量(0.320 2±0.064 5,1.016 0±0.092 1)明显升高,nm23-H1的蛋白表达量分别升高了170%和86%,E-cadherin分别升高了550%和480%,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。见图8。



1:空质粒对照组;2:B16细胞组;3:实验组

图8 Western blot检测各组细胞中MMP-2、MMP-9、nm23-H1及E-cadherin蛋白的表达

2.6 过表达RI后对小鼠体内肺转移的影响

接种21 d后处死小鼠,实验组[(15.54±3.455)个]与对照组[(36.25±6.174)个]相比,肺转移灶明显减少($t=21.00$,$P<0.01$),抑制转移率为57.13%。表明过表达RI能够显著抑制B16细胞在小鼠体内的侵袭和转移。

3 讨论

侵袭和转移是肿瘤的一大生物学特性,同时也是导致绝大多数肿瘤患者死亡的原因。目前研究[7]认为,肿瘤的侵袭和转移主要分为三步,细胞与基底膜的黏附、细胞外基质的降解和细胞的迁移。在肿瘤侵袭3个相互协调的基本过程中,肿瘤细胞首先通过膜表面受体黏附于基膜上,然后肿瘤细胞分泌蛋白酶降解基膜和基质,最后定向运动穿越基膜和基质,并经血管和淋巴管向远处转移[8]。因此,本课题将这三大步骤较为系统的进行了实验,并检测肿瘤细胞的侵袭转移相关分子MMP-2、MMP-9和nm23-H1以及E-cadherin蛋白的表达,来研究RI对B16细胞侵袭和转移的影响和作用机制。

本研究表明RI的过表达引起了一系列生物学功能的改变。形态学观察显示实验组细胞与对照组细胞相比细胞铺展良好,细胞核质比明显降低,核分裂象减少,核仁减小,染色较浅,提示细胞恶性程度降低。细胞与基底膜黏附能力的改变是侵袭和迁移的关键一步,高侵袭的肿瘤细胞与基底膜成分的黏附能力通常增高,这样有利于肿瘤细胞的浸润和转移[9],本实验运用Matrigel探讨各组细胞与基底膜黏附能力的改变,实验结果显示过RI表达增加后,引起细胞与基底膜间的黏附能力降低。在肿瘤侵袭转移过程中,肿瘤细胞必须穿过血管和淋巴管的基底膜才能进入血管和淋巴管,因此,肿瘤细胞穿过基底膜的能力是侵袭和转移的关键因素之一[10],本研究运用Matrigel为人工基底膜,通过Transwell侵袭小室观察发现过表达RI能引起B16细胞侵袭能力减弱。肿瘤细胞与母体瘤分离,侵袭周边正常组织时,需要一定的运动能力[10]。划痕实验结果显示RI表达上调后,细胞向划痕中央迁移的速度明显减慢,细胞迁移能力受到明显抑制。

本研究对RI表达上调后抑制B16细胞侵袭和转移的作用机制进行了初步探讨。肿瘤细胞侵袭与转移灶的形成与其诱导产生蛋白酶降解细胞外基质和基底膜密切相关,而肿瘤细胞分泌的MMPs中,MMP-2和MMP-9是降解Ⅳ型胶原最主要的酶,当其表达异常

时会导致基质降解,肿瘤易发生浸润与转移[11]。多项研究已证实,MMP-2 和 MMP-9 的高表达与乳腺癌转移密切相关[12]。我们前期研究[5]也表明,MMP-2、MMP-9 的高表达会促进非浸润性膀胱癌 BIU-87 细胞的转移潜能。本研究发现,RI 表达上调后,可以显著性抑制了 B16 细胞中 MMP-2、MMP-9 的表达,防止过量的 MMP 聚集在细胞周围,降低了 B16 细胞侵袭和转移潜能。细胞黏附可分为细胞与基质黏附和细胞与细胞黏附两大类。细胞与基质的黏附主要有细胞与基底膜和细胞与细胞外基质的黏附,而细胞与细胞的黏附包括同质黏附和异质黏附,同质黏附是指同一种类型细胞间的黏附,两种以上细胞间的黏附称异质黏附[13]。E-cadherin 是一种介导同种细胞相互黏附的钙依赖性跨膜糖蛋白,参与调节细胞间的黏附,移动和上皮细胞增殖的机制,对维持细胞形态、细胞运动及同种细胞黏附功能具有重要作用[14]。组织结构的稳定性依赖于 E-cadherin 介导的细胞间黏附作用,E-cadherin 介导同型细胞间的黏附从而抑制肿瘤细胞的侵袭和转移[15]。有实验[16]证明,E-cadherin 的表达缺失增强了肿瘤细胞的侵袭力和抗凋亡能力。nm23-H1 是一种具有二磷酸核苷激酶(NDPK)活性的蛋白,其在肿瘤的发生、发展及其转移具有重要作用,具有抑制肿瘤转移的作用[17]。相关研究表明和同类、非转移性细胞系相比,它在高转移的小鼠黑色素瘤细胞中低表达,同时研究发现在乳腺癌等 11 个独立模型中,外源表达 nm23-H1 可以降低其转移能力[18]。本次实验结果表明,RI 表达上调后,可以显著性升高了 B16 细胞中 E-cadherin 和 nm23-H1 的表达,结合动物实验,RI 表达上调后,实验组小鼠的肺转移灶数明显减少,从而进一步提示,过表达 RI 具有抑制 B16 细胞侵袭和转移作用。

综上所述,RI 基因与细胞的黏附、侵袭和转移能力密切相关,上调 RI 的表达能改变细胞特性,引起黏附、侵袭和迁移能力下降,改善肿瘤细胞的恶性程度。结合以往研究,下调 RI 表达后,能升高体内外肿瘤细胞的侵袭和转移能力。因此,RI 基因有望成为肿瘤治疗的一种新的药物靶点。

参考文献:

[1] Shapiro R. Cytoplasmic ribonuclease inhibitor[J]. Methods Enzymol, 2001, 341: 611 – 628.

[2] Haigis M C, Kurten E L, Raines R T. Ribonuclease inhibitor as an intracellular sentry[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(3): 1024 – 1032.

[3] Chen J X, Gao Y, Liu J W, *et al*. Antitumor effects of human ribonuclease inhibitor gene transfected on B16 melanoma cells[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(6): 1219 – 1231.

[4] 陈俊霞, 田余祥, 傅攀峰, 等. 转染人核糖核酸酶抑制因子基因对 B16 黑色瘤细胞及肿瘤转移的影响[J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31(6): 523 – 531.

[5] Chen J, Ou-Yang X, Gao J, *et al*. Knockdown of ribonuclease inhibitor expression with siRNA in non-invasive bladder cancer cell line BIU-87 promotes growth and metastasis potentials[J]. Mol Cell Biochem, 2011, 349(1/2): 83 – 95.

[6] 朱军, 高娟, 李红彦, 等. 特异性 ILK-siRNA 对膀胱癌 EJ 细胞侵袭和迁移的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(4): 360 – 364.

[7] Makrilia N, Kollias A, Manolopulos L, *et al*. Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer[J]. Cancer Invest, 2009, 27(10): 1023 – 1037.

[8] 张力冰, 张维东, 王朝霞, 等. 蝎毒多肽提取物体外抑制胰腺癌细胞侵袭转移及相关机制[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(6): 820 – 824.

[9] Ruoslahti E, Bhatia S N, Sailor M J. Targeting of drugs and nanoparticles to tumors[J]. J Cell Biol, 2010, 188(6): 759 – 768.

[10] 王玲, 单保恩, 张建彬. 塞来昔布对人三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 迁移、侵袭及黏附性的影响[J]. 中国癌症杂志, 2011, 21(4): 266 – 271.

[11] Deryugina E I, Quigley J P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis[J]. Cancer Metastasis Rev, 2006, 25(1): 9 – 34.

[12] Jezierska A, Motyl T. Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review[J]. Med Sci Monit, 2009, 15(2): RA32 – RA40.

[13] Morris M A, Young L S, Dawson C W. DNA tumour viruses promote tumour cell invasion and metastasis by deregulating the normal processes of cell adhesion and motility[J]. Eur J Cell Biol, 2008, 87(8/9): 677 – 697.

[14] 王玲玲, 姚根有, 张布衣, 等. 胃癌中 CD147 和上皮型钙黏蛋白的表达及意义[J]. 中华肿瘤杂志, 2009, 31(7): 515 – 519.

[15] Cavey M, Rauzi M, Lenne P F, *et al*. A two-tiered mechanism for stabilization and immobilization of E-cadherin[J]. Nature, 2008, 453(7196): 751 – 756.

[16] Onder T T, Gupta P B, Mani S A, *et al*. Loss of E-cadherin promotes metastasis *via* multiple downstream transcriptional pathways[J]. Cancer Res, 2008, 68(10): 3645 – 3654.

[17] 张萍, 王平, 韩林, 等. X 射线对人外周全血细胞 nm23-H1 基因表达的影响[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2010, 30(2): 161 – 164.

[18] Horak C E, Lee J H, Elkahloun A G, *et al*. Nm23-H1 suppresses tumor cell motility by down-regulating the lysophosphatidic acid receptor EDG2[J]. Cancer Res, 2007, 67(15): 7238 – 7246.

(**收稿**:2011-08-23;**修回**:2011-10-27)

(编辑 汪勤俭)