文章编号:1000-5404(2013)14-1455-04

论著

PCDH8基因表达对鼻咽癌细胞生物学效应的影响

石宇良,曾 泉,龙表利,向庭秀,洪苏玲,胡国华 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科)

[摘要] **目的** 探讨PCDH8基因表达对鼻咽癌细胞株CNE-1生物学行为的影响。**方法** 采用脂质体介导质粒pcDNA3.1-PCDH8(实验组)与质粒pcDNA3.1(对照组)转染至鼻咽癌细胞株CNE-1,RT-PCR、Western blot检测转染后CNE-1细胞的PCDH8 mRNA及蛋白表达;通过CCK-8细胞生长曲线、流式细胞技术、Transwell侵袭实验及CCK-8细胞药物敏感实验,进一步对转染PCDH8基因质粒的细胞株CNE-1的增殖能力、生长周期、细胞侵袭能力及对化疗药物的敏感性进行了分析,并与转染对照质粒的细胞株进行比较。**结果** RT-PCR、Western blot检测结果表明转染质粒pcDNA3.1-PCDH8的实验组细胞株中PCDH8 mRNA及蛋白成功表达并明显高于转染质粒pcDNA3.1的对照组细胞株。CCK-8细胞生长曲线结果表明实验组细胞株的生长速度明显低于对照组。流式细胞仪检测结果表明实验组细胞株G_0/G_1期较对照组增加,S期细胞较对照组减少;Transwell侵袭实验结果表明实验组细胞株侵袭能力明显低于对照组;CCK-8细胞药物敏感性实验结果表明PCDH8基因的高表达能显著提高鼻咽癌细胞株CNE-1对顺铂化疗药物的敏感性。**结论** PCDH8基因的表达能降低鼻咽癌细胞的增殖、侵袭能力,延缓细胞分裂周期,提高对顺铂化疗药物的敏感性。

[关键词] PCDH8;鼻咽癌;CCK-8;Transwell侵袭实验;流式细胞周期实验;顺铂
[中图法分类号] R394.2;R730.23;R739.63 [文献标志码] A

Biological effects of PCDH8 expression in nasopharyngeal carcinoma cells

Shi Yuliang, Zeng Quan, Long Biaoli, Xiang Tingxiu, Hong Suling, Hu Guohua (Department of Otorhinolaryngology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] Objective To determine the biological effects of PCDH8 gene expression in nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-1. Methods The eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-PCDH8 and pcDNA3.1-vector were transfected into CNE-1 cells, respectively. RT-PCR and Western blotting were used to examine the expression of PCDH8 at mRNA and protein levels after transfection. CCK-8 assay, flow cytometry, invasion assay, and chemosensitivity test were used to determine the effects of PCDH8 expression on the proliferation, chemosensitivity, growth, and invasion in CNE-1 cells. Results RT-PCR and Western blotting showed that the PCDH8 expression was obviously higher in the cells transfected with pcDNA3.1-PCDH8 than those transfected with pcDNA3.1-vector. Cell growth assay by CCK-8 assay indicated that a significant reduction in cell proliferation in the cells transfected with pcDNA3.1-PCDH8 than the cells transfected with blank vector. Flow cytometry proved that exogenous PCDH8 expression resulted in a significant accumulation of cells at the G_0/G_1 phase compared with the control cells, and a concomitant decrease of the cells at the S phase compared with control group cells. Transwell matrigel invasion assay revealed an obvious reduction in the invasive ability of the PCDH8 transfected cells than the control cells. The chemosensitivity assay showed exogenous PCDH8 expression significantly enhanced the chemosensitivity of NPC cells to cis-platinum compared with the control cells. Conclusion The PCDH8 eukaryotic expression vector decreases the proliferation, growth, and invasion ability, and increases the cis-platinum sensitivity in CNE-1 cells.

[**Key words**] PCDH8; nasopharyngeal carcinoma; CCK-8; transwell invasion assay; flow cytometry; cell cycle; cis-platinum

Supported by the Project of National Clinical Key-discipline Construction (2012-649). Corresponding author: Hu Guohua, E-mail:hghcq@sina.com

[基金项目] 国家临床重点专科建设项目经费资助([2012]649)
[通信作者] 胡国华, E-mail:hghcq@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130425.0903.017.html(2013-04-25)

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是一种在中国南部及东南亚地区比较常见的癌症,尤其是我国广东、广西[1]。NPC的发生、发展是多因素参与的结果,包括EB病毒、遗传因素、饮食因素、环境因素等因素。鼻咽癌的发病部位隐蔽,早期症状不明显,导致早期诊断率低,延误诊疗,对人体健康和生命安全造成严重的威胁。研究发现,表观遗传学机制在癌症的发生、发展中起着重要的作用,部分抑癌基因启动子CpG岛发生甲基化导致抑癌基因沉默,对癌症的发生、发展起到了促进作用[2]。这些发现对鼻咽癌的诊治又提出了新的挑战。

原钙黏蛋白8(protocadherin 8, PCDH8)是原钙黏蛋白家族成员之一,位于染色体上13q14.3位置。前期研究发现在鼻咽癌细胞及组织中存在PCDH8基因启动子高甲基化致使其表达降低的现象[3],但PCDH8基因对鼻咽癌细胞生物学效应的研究还不明确。为进一步研究PCDH8基因与鼻咽癌发生、发展的关系,探讨其在鼻咽癌细胞生长、周期、侵袭、药敏等方面的影响,本研究将重组质粒pcDNA3.1-PCDH8载体转染鼻咽癌细胞株CNE-1,进行细胞生物学行为的相关功能检测。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

鼻咽癌细胞株CNE-1购自中南大学湘雅中心实验室;胎牛血清及RPMI1640培养基购自Gibco公司;Trizol试剂购自Invitrogen公司;PCDH8反转录酶购自TaKaRa公司;无内毒素质粒提取试剂盒购自天根试剂公司;G418(Amrsco)购于Qiagen公司;脂质体Lipofectamine 2000购于Invitrogen公司;质粒pcDNA3.1与pcDNA3.1-PCDH8合成购于广州复能公司;鼠抗人PCDH8抗体购于Abcom公司;BCA试剂盒、SDS-PAGE凝胶试剂盒、Western blot一抗稀释液、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG和羊抗兔IgG、ECL发光试剂盒均购于碧云天生物公司;PVDF膜均购于鼎国生物公司;Matrigel基质胶购买于BD公司;顺铂粉剂购于德州德药制药有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与转染、G418筛选 鼻咽癌细胞株CNE-1用含10%胎牛血清的RPMI1640培养基在5% CO_2、37 ℃培养箱内培养。将CNE-1细胞以1.0×10^5个/mL接种于6孔板内培养24 h,利用脂质体Lipofectamine 2000进行转染,每个孔内加入脂质体5 μL,再分别加入质粒pcDNA3.1-PCDH8 4 μg(实验组)或质粒pcDNA3.1 4 μg(对照组)。在转染48 h后,在细胞培养液中加入G418(300 μg/mL)筛选2周。转染入质粒的细胞在筛选中存活。单克隆形成时,G418溶液浓度改为200 μg/mL维持,并挑选单克隆细胞培养。

1.2.2 RT-PCR检测转染后PCDH8 mRNA的表达 将上述单克隆细胞采用Trizol提取总RNA,用紫外分光光度仪测$D(260)$、$D(280)$、RNA浓度及$D(260)/D(280)$比值,$D(260)/D(280)$比值在1.8~2.0范围内的RNA纯度合格。采用TaKaRa公司的PCDH8反转录酶,按说明书进行cDNA的合成。PCR扩增引物由华大生物技术有限公司合成:PCDH8基因引物上游:5′-CGACAGCGATTCCGACATCA-3′,下游:5′-CTCTGCAGCCCCACTGTCTT-3′,产物长度273 bp;GAPDH引物上游:5′-GGATGACCTTGCCCACAGGGT-3′,下游:5′-GTTGGGGGTTCTGGGGACTGGC-3′,产物长度304 bp。扩增条件:PCDH8 95 ℃预变性2 min;95 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s,共32个循环,最后72 ℃延伸5 min;GAPDG 95 ℃预变性2 min;95 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s,共23个循环,最后72 ℃延伸5 min。将PCR产物放入2%琼脂糖凝胶电泳(120 V,25 min),应用图像分析系统进行分析拍照检验。

1.2.3 Western blot法检测转染后PCDH8蛋白的表达 在转染不同质粒的CNE-1中分别提取蛋白。加入裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.5% NP40, 1 mmol/L PMSF, 25 μg/mL Aprotinin, 25 μg/mL Leupeptin)冰上裂解15 min, 12 000 r/min、4 ℃离心15 min后取上清即为细胞总蛋白质,BCA法测定蛋白质浓度。以4:1比例加入上样SDS-PAGE buffer,混匀后在100 ℃变性15 min。GAPDH蛋白配置12%聚丙烯酰胺凝胶,PCDH8蛋白配置8%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,蛋白电转移至PVDF膜上。印迹膜放置5%脱脂牛奶中,室温封闭1 h。以1:1 000稀释GAPDH抗体,以1:200稀释PCDH8抗体,加于印迹膜上,放置4 ℃过夜。TBST缓冲液洗膜3次×10 min;以1:1 000分别稀释HRP标记的羊抗兔和羊抗鼠二抗,加于印迹膜上室温孵育30 min。TBST缓冲液洗膜5次×10 min,ECL试剂发光,显影。

1.2.4 CCK-8测定细胞生长曲线 分别取对数生长期实验组和对照组细胞,使用血细胞计数板对细胞悬液计数,以每孔1.0×10^4个/mL细胞接种于96孔板中,共接种5个96孔板,实验组与对照组细胞分别设6个复孔。分别于细胞贴壁后0、24、48、72、96 h检测对应96孔培养板细胞生长情况,按照说明书向培养板内加入CCK-8试剂,再将培养板重新放入37 ℃孵箱中培养1 h。酶联免疫检测仪在450 mm处测量细胞的光密度值[$D(450)$]。

1.2.5 流式细胞仪分析细胞周期 采用Annexin V-FITC/PI双标法检测细胞凋亡。质粒pcDNA3.1-PCDH8、pcDNA3.1分别转染CNE-1细胞株48 h后,分别将细胞收集,PBS洗涤2次。逐渐滴加4 ℃ 70%乙醇1 mL,过夜固定。800 r/min离心5 min,用PBS洗2次,再加1 mg/mL RNaseA溶液0.2 mL重悬细胞沉淀,37 ℃水浴30 min,加0.3 mL含50 μg/mL PI的PBS染色20 min后上机检测。实验重复3次。

1.2.6 Transwelll侵袭实验 以3:1比例用无血清1640稀释的Matrigel基质胶加入Transwell小室中,放置37 ℃孵箱内1 h,待Matrigel胶凝固。分别取对数生长期实验组和对照组细胞以4×10^4个/mL接种于上室,在每个小室内加200 μL无血清培养液。下室加入含10%胎牛血清培养液600 μL。在5% CO_2、37 ℃培养箱内培养24 h。吸去上室液体,4%甲醛固定进入下室的细胞,吉姆萨染色12 h。用湿棉签擦去上室PET膜表面未侵袭细胞及Matrigel胶。取每张膜在高倍光镜下计数穿膜细胞数。重复3次。

1.2.7 CCK-8 检测顺铂药物的细胞毒作用 分别取对数生长期实验组和对照组细胞,使用血细胞计数板对细胞悬液计数,将每孔 1.0×10^5 个/mL 细胞接种到 96 孔板中,待细胞贴壁后按 CCK-8 说明书加入 CCK-8 溶液,继续在 37 ℃培养箱内孵育 1 h。用酶联免疫检测仪在 450 mm 处测量未加顺铂药物的细胞光密度值[D(450)]。将细胞培养液换成顺铂浓度为 0.78 mmol/L 的培养液,每组细胞设 3 个复孔,放入 5% CO_2、37 ℃培养箱中培育 24 h,用 CCK-8 试剂测量细胞 D(450)值。

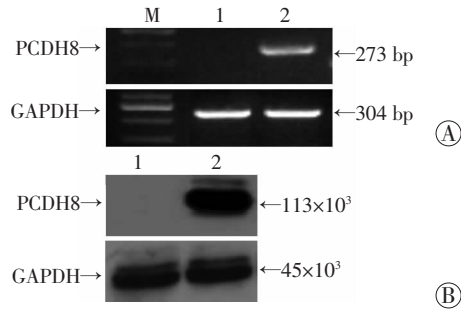
1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析,计量资料采用单因素方差分析,各组间采用 LSD 法多重比较。

2 结果

2.1 转染细胞中的 PCDH8 基因 mRNA 和蛋白的表达

脂质体介导质粒转染 48 h 后,通过 RT-PCR、Western blot 印迹试验显示重组质粒 pcDNA3.1-PCDH8 转染的鼻咽癌细胞株 CNE-1 中,目的基因 PCDH8 在 mRNA 和蛋白水平上的表达均比空载质粒 pcDNA3.1 转染的鼻咽癌细胞株 CNE-1 有明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图 1。



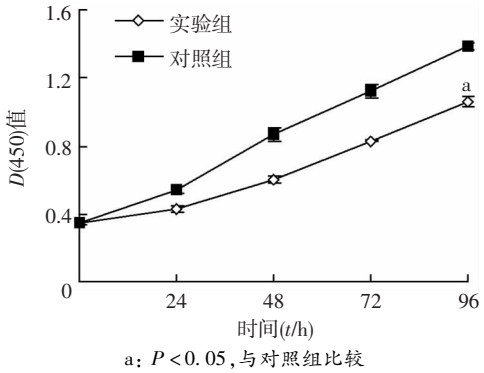
M:标准;1:重组质粒 pcDNA3.1;2:重组质粒 pcDNA3.1-PCDH8

A: RT-PCR 检测结果;B: Western blot 检测结果

图 1 转染 48 h 后 2 组 PCDH8 mRNA 及蛋白的表达

2.2 CCK-8 法检测细胞生长

通过对 0、24、48、72、96 h 几个不同时间点的检测,发现 PCDH8 基因表达阳性的 CNE-1 细胞株在除 0 h 以外的几个时间点 D(450)值都较对照组低,其细胞的生长能力明显降低($P<0.05$)。说明 PCDH8 基因表达对 CNE-1 细胞生长有抑制作用(图 2)。

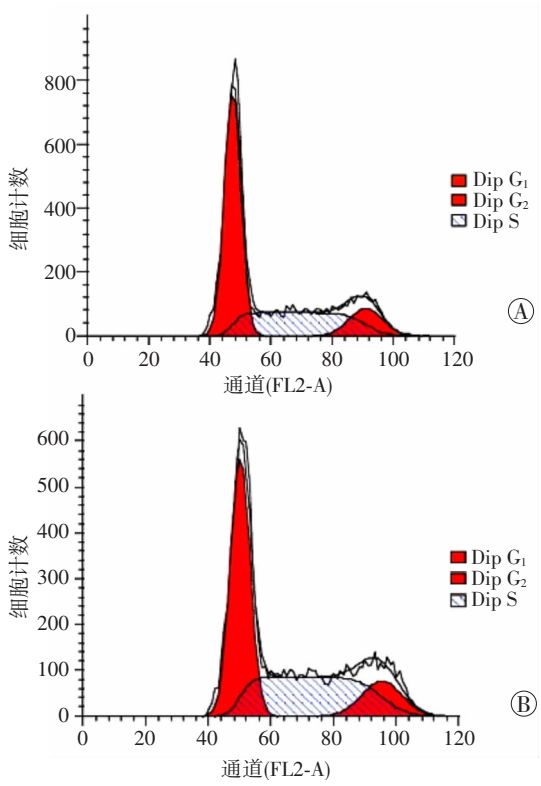


a: $P<0.05$,与对照组比较

图 2 CCK-8 法检测细胞生长曲线

2.3 流式细胞仪测定细胞周期

结果表明实验组细胞周期 G_0/G_1 期的细胞为 61.84%,较对照组(51.09%)增多;同时实验组 S 期细胞数为 26.27%,低于对照组 S 期(37.99%),差异均有统计学意义($P<0.05$)。说明 PCDH8 基因的表达能阻止或抑制癌细胞有丝分裂的进行,使细胞阻滞在 G_1 期(图 3)。

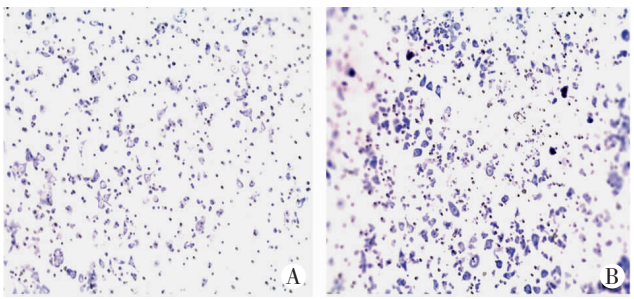


A:实验组;B:对照组

图 3 PCDH8 过表达对 CNE-1 细胞周期的调控

2.4 Transwell 侵袭实验

结果显示,与对照组穿膜细胞数(391±18)相比,实验组穿膜细胞数(201±12)明显减少,细胞穿膜能力明显减弱($P<0.05$,图 4)。



A:实验组;B:对照组

图 4 PCDH8 过表达对 CNE-1 侵袭功能的影响(吉姆萨染色 ×400)

2.5 药物敏感性实验

通过 CCK-8 法检测顺铂药物对细胞的抑制作用,计算细胞抑制率。结果表明,实验组细胞抑制率为(50.69±0.63)%,对照组细胞抑制率为(31.84±0.51)%,与对照组比较,顺铂对实验组细胞的抑制作用更明显,差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

细胞抑癌基因的表达减弱或消失,是肿瘤发生、发展的重要机制之一。近年来有研究显示,肿瘤抑癌基因的沉默不一定发生基因序列改变,而可能是基因启动子甲基化致使抑癌基因在DNA序列未发生改变的情况下失活,并参与肿瘤的发生、发展[2,4]。鼻咽癌的发生、发展与许多因素有关。目前已有研究发现多种抑癌基因在鼻咽癌细胞中存在甲基化的现象,Seng等[5]发现RhoGTP酶激活蛋白的肿瘤抑制基因DLC1在鼻咽癌组织及细胞中表达下调,通过MSP技术检查出该基因在鼻咽癌中启动子存在甲基化。Li等[6]发现鼻咽癌细胞中E-钙粘素基因启动子存在异常甲基化,导致其表达下调,提示可能与癌细胞的侵袭、转移相关。

原钙黏蛋白为膜结合蛋白,是钙黏蛋白家族中最大的亚家族。目前对其功能及信号转导作用在神经生物学领域有较多研究,主要参与细胞发育、细胞骨架形成、细胞间信号传导、细胞间黏附、迁移等作用,但对其复杂的作用了解甚少[7-9]。最近发现原钙黏蛋白作为一种抑癌基因,其表达降低或缺失与肿瘤发生、发展密切相关[10-13]。PCDH8是原钙黏蛋白的成员之一。研究发现鼻咽癌、乳腺癌、胰腺癌、胃癌等癌症中存在PCDH8基因甲基化现象,导致其表达降低[3,14-16]。但目前该基因对细胞生物学行为的影响还没有明确的研究。

本实验将质粒pcDNA3.1-PCDH8转染入鼻咽癌细胞株CNE-1中,显著上调细胞中PCDH8 mRNA及蛋白的表达,进一步对转染后细胞生物学特性进行分析研究。结果显示,PCDH8蛋白表达使癌细胞增殖能力减弱,阻止或抑制癌细胞的有丝分裂;流式细胞仪检测发现表达PCDH8基因的细胞生长周期在G_1期出现阻滞,使细胞周期变长。Transwell细胞侵袭实验表明PCDH8基因表达增高能降低癌细胞的侵袭能力,增加细胞的粘附功能,提示PCDH8基因表达降低可能会导致上皮细胞结构不稳定,促进癌细胞播散和肿瘤发展。在药物敏感性实验中,PCDH8基因表达使鼻咽癌细胞对顺铂药物的抑制作用更为敏感。

综上所述,本实验对PCDH8基因在鼻咽癌发生、发展中的作用有了新的认识。PCDH8基因表达对鼻咽癌细胞的生长增殖能力有一定抑制作用;能提高鼻咽癌细胞株的黏附能力,降低其转移、侵袭能力;增强对顺铂药物作用的敏感性等生物学效应。本实验为研究鼻咽癌提供了新思路,为鼻咽癌的病因、预防、治疗等提供新靶点。但目前对PCDH8基因在鼻咽癌中的作用机制尚不清楚,我们将在这一方面进行更深入的研究。

参考文献:

[1] 邓伟, 黄天壬, 陈万青, 等. 中国2003-2007年鼻咽癌发病与死亡分析[J]. 肿瘤, 2012, 32(3): 189-193.

[2] Novik K L, Nimmrich I, Genc B, *et al*. Epigenomics: genome-wide study of methylation phenomena [J]. Curr Issues Mol Biol, 2002, 4(4): 111-128.

[3] He D, Zeng Q, Ren G, *et al*. Protocadherin8 is a functional tumor suppressor frequently inactivated by promoter methylation in nasopharyngeal carcinoma[J]. Eur J Cancer Prev, 2012, 21(6): 569-575.

[4] Herman J G, Baylin S B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation [J]. N Engl J Med, 2003, 349(21): 2042-2054.

[5] Seng T J, Low J S, Li H, *et al*. The major 8p22 tumor suppressor DLC1 is frequently silenced by methylation in both endemic and sporadic nasopharyngeal, esophageal, and cervical carcinomas, and inhibits tumor cell colony formation[J]. Oncogene, 2007, 26(6): 934-944.

[6] Li Z, Ren Y, Lin S X, *et al*. Association of E-cadherin and beta-catenin with metastasis in nasopharyngeal carcinoma[J]. Chin Med J (Engl), 2004, 117(8): 1232-1239.

[7] Redies C, Vanhalst K, Roy F. delta-Protocadherins: unique structures and functions [J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62(23): 2840-2852.

[8] Morishita H, Yagi T. Protocadherin family: diversity, structure, and function [J]. Curr Opin Cell Biol, 2007, 19(5): 584-592.

[9] Becker S F, Langhe R, Huang C, *et al*. Giving the right tug for migration: cadherins in tissue movements [J]. Arch Biochem Biophys, 2012, 524(1): 30-42.

[10] Yang Y, Liu J, Li X, *et al*. PCDH17 gene promoter demethylation and cell cycle arrest by genistein in gastric cancer [J]. Histol Histopathol, 2012, 27(2): 217-224 .

[11] Imoto I, Izumi H, Yokoi S, *et al*. Frequent silencing of the candidate tumor suppressor PCDH20 by epigenetic mechanism in non-small-cell lung cancers [J]. Cancer Res, 2006, 66(9): 4617-4626.

[12] Ying J, Li H, Seng T J, *et al*. Functional epigenetics identifies a protocadherin PCDH10 as a candidate tumor suppressor for nasopharyngeal, esophageal and multiple other carcinomas with frequent methylation [J]. Oncogene, 2006, 25(7): 1070-1080.

[13] 胡琴, 胡国华. 鼻咽癌中PCDH17基因启动子甲基化状态的研究[J]. 重庆医科大学学报, 2012, 37(1): 47-50.

[14] Yu J S, Koujak S, Nagase S, *et al*. PCDH8, the human homolog of PAPC, is a candidate tumor suppressor of breast cancer [J]. Oncogene, 2008, 27(34): 4657-4665.

[15] 吕顺莉, 高军, 杜奕奇, 等. 胰腺癌细胞株原钙黏附蛋白8基因的甲基化状态[J]. 中华胰腺病杂志, 2010, 10(3): 190-192.

[16] Zhang D, Zhao W, Liao X, *et al*. Frequent silencing of protocadherin 8 by promoter methylation, a candidate tumor suppressor for human gastric cancer[J]. Oncol Rep, 2012, 28(5): 1785-1791.

(**收稿**:2013-03-18;**修回**:2013-04-01)

(编辑 汪勤俭)