DOI:10.16016/j.1000-5404.201608077

CTP-NPRL2 融合蛋白对肾癌原代细胞迁移侵袭能力的抑制及机制研究

史晓博,叶 茂,曾 洋,陈明龙,陈志雄,熊 晶,吕不凡,唐 伟 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院泌尿外科)

[摘要] **目的** 将原核表达的氮酶调节因子2(nitrogen permease regulator 2-like,NPRL2)融合蛋白通过胞浆转导肽(cytoplasmic transduction peptide,CTP)转入肾癌原代细胞内,观察其对肾癌原代细胞迁移侵袭的影响,并分析与肾癌上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)的关系。**方法** 胶原酶消化法培养肾癌原代细胞;构建原核表达质粒 pET15b-CTP-NPRL2 和 pET15b-NPRL2,表达融合蛋白 CTP-NPRL2 和 NPRL2,并通过 Western blot 鉴定目的蛋白的表达。将培养成功的原代细胞分为 BLANK 组、NPRL2 组和 CTP-NPRL2 组。免疫荧光检测目的蛋白的细胞定位;Transwell 迁移侵袭实验检测导入 NPRL2 蛋白后,对肾癌细胞迁移侵袭能力的影响;Real-time PCR 检测 Raptor、E-钙粘蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、纤粘蛋白(Fibronectin)mRNA 表达水平;Western blot 检测 Raptor、E-cadherin、Vimentin、Fibronectin 蛋白表达水平。**结果** 成功培养出肾癌原代细胞并通过鉴定;测序结果及 Western blot 检测结果显示质粒构建成功并表达出目的蛋白;免疫荧光检测结果显示 CTP-NPRL2 融合蛋白可以穿过胞膜并定位于胞浆;迁移和侵袭实验显示 CTP-NPRL2 组肾癌细胞迁移侵袭能力明显下降($P<0.05$);Real-time PCR 和 Western blot 检测结果显示 CTP-NPRL2 组 Raptor、Vimentin 与 Fibronectin 的 mRNA、蛋白表达水平与 NPRL2 组和 BLANK 组相比明显降低($P<0.05$),而 E-cadherin 的 mRNA、蛋白表达水平与 NPRL2 组与 BLANK 组相比明显升高($P<0.05$)。**结论** NPRL2 可能通过与 Raptor 相互作用影响 mTORC1 的活性,进而调节 EMT 相关蛋白 E-cadherin、Vimentin、Fibronectin 的表达量,影响肾癌细胞的迁移侵袭能力。

[关键词] NPRL2;mTORC1;迁移;侵袭;上皮间质转化

[中图法分类号] R341;R73-37;R737.11 [文献标志码] A

CTP-NPRL2 fusion protein inhibits migration and invasion of primary renal cell carcinoma cells

Shi Xiaobo, Ye Mao, Zeng Yang, Chen Minglong, Chen Zhixiong, Xiong Jing, Lyu Bufang, Tang Wei (Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of cytoplasmic transduction peptide (CTP)-mediated nitrogen permease regulator 2-like (NPRL2) fusion protein on the migration and invasion of primary renal cell carcinoma (RCC) cells as well as its impact on epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Methods** Primary RCC cells were cultured from clinically resected renal tumor tissue. Prokaryotic expression plasmids pET15b-CTP-NPRL2 and pET15b-NPRL2 were constructed and transfected into *E. coli* BL21. The expression of fusion proteins CTP-NPRL2 and NPRL2 was tested by Western blotting. Primary RCC cells were divided into 3 groups CTP-NPRL2, NPRL2 and blank control by treated with CTP-NPRL2, NPRL2 fusion protein solution and PBS, respectively. Cell invasion and migration ability were evaluated by Transwell assay. The mRNA and protein expression levels of raptor, vimentin, fibronectin and E-cadherin were detected by real-time PCR (RT-PCR) and Western blotting, respectively. **Results** Morphologic observation and immunochemical assay

[基金项目] 重庆市科学技术委员会应用开发(CSTC2013yykfA110004)

[通信作者] 唐 伟,E-mail:tangwei2060@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20161021.1700.012.html

confirmed the successful culture of primary RCC cells derived from patient specimens. After plasmid construction and transfection, the expression of fusion proteins CTP-NPRL2 and NPRL2 were detected by Western blotting. Green fluorescence was only detected in the cytoplasm of CTP-NPRL2 group, suggesting that CTP successfully mediated NPRL2 protein into RCC cells. Compared with NPRL2 and control groups, the invasion and migration ability of primary RCC cells in CTP-NPRL2 group was significantly decreased ($P < 0.05$). Also, the mRNA and protein expression levels of raptor, vimentin and fibronectin were significantly decreased, while E-cadherin was significantly increased ($P < 0.05$) in CTP-NPRL2 group. **Conclusion** CTP-NPRL2 fusion protein inhibits the migration and invasion ability of RCC. This may partly be associated with decreased activity of mTORC1 mediated by interaction between NPRL2 and raptor, consequently regulating the expression of EMT-correlated E-cadherin, vimentin and fibronectin.

[**Key words**] nitrogen permease regulator 2-like; mTORC1; migration; invasion; epithelial-mesenchymal transition

Supported by the Application and Development Program of Chongqing Science and Technology Commission (CSTC2013yykfA110004). Corresponding author: Tang Wei, E-mail: tangwei2060@163.com

肾细胞癌(renal cell carcinoma,RCC)又称肾癌,是起源于肾实质泌尿小管上皮系统的恶性肿瘤,占肾脏恶性肿瘤的80%~90%,占成人恶性肿瘤的3%[1]。而在我国泌尿系统恶性肿瘤中,发病率仅低于膀胱癌。肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma,CCRCC)是最常见的肾癌病理亚型,占肾癌的60%~85%[2-3]。肾癌主要治疗方式仍然是手术切除,但转移性肾癌无法行根治性手术;且根治性手术后患者在短期内仍有可能发生复发、转移。约40%的肾细胞癌患者都会经历病情进展与转移[4]。转移性肾癌通常对化疗和放疗不敏感,免疫治疗也仅对15%~20%的患者有效[5]。因此通过寻找一种新的靶标开展新的治疗方法来治疗转移性肾癌是十分必要的。

氮酶调节因子2(nitrogen permease regulator 2-like,NPRL2)是一种新发现的抑癌基因,NPRL2亦称为肿瘤抑制候选基因4(tumor suppressor candidate4,TUSC4),是Lerman等[6]利用基因组测序和生物信息学技术筛选并寻找定位于人染色体3p21.3区域的肿瘤抑制基因。有研究表明在人类的多种肿瘤中都发现此区域的纯合性缺失,NPRL2作为抑癌基因在多种肿瘤的发生、发展中起重要作用[7-8]。Tang等[9]通过免疫组化的方法检测了78例肾透明细胞癌患者癌组织与癌旁组织,发现肾癌组织中NPRL2呈低表达且与肾癌分期、分级密切相关,表明NPRL2基因与肾癌的发生、发展存在密切关系。

上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)是上皮细胞在形态学上发生向间(充)质细胞表型的转变并获得迁移的能力。在肿瘤的恶性演变过程中,EMT使得肿瘤细胞得以浸润和转移到远处部位。近年来研究发现,肾癌发生、发展过程中与EMT存在密切关系[10]。胞浆转导肽(cytoplasmic transduction peptide,CTP)可高效携带蛋白质穿透胞膜并专性定位于胞浆,以胞吞-非依赖性机制发挥转导功能。本实验采用CTP介导原核表达的NPRL2蛋白进入肾癌原代细胞内,观察其对肾癌原代细胞迁移侵袭能力的影响,并检测EMT相关标志物的表达水平,并初步探讨NPRL2改变肾癌原代细胞EMT过程的可能分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 肾癌组织 肾癌标本取自重庆医科大学附属第一医院泌尿外科手术室,且经患者知情同意,术后病理检查证实为肾透明细胞癌。

1.1.2 实验试剂 胎牛血清购自美国Gemini公司;RPMI 1640细胞培养基和0.25%胰酶购自HyClone公司;胶原酶Ⅳ购自Sigma公司;1×PBS粉剂购自北京鼎国生物技术公司;一次性25 cm^2细胞培养瓶购自美国Corning公司;CO_2培养箱购自美国Thermo公司;大肠杆菌菌种BL21、DH5α由重庆医科大学分子医学与肿瘤实验室赠送;氨苄青霉素、DMSO购自Biosharp公司;异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside,IPTG);His-tag蛋白纯化磁珠购自Beaver公司;超声波细胞粉碎机购自中国新芝公司;酶标仪购自美国Thermo公司;BCA蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE凝胶试剂盒购自碧云天公司;兔抗NPRL2一抗、兔抗6×His-tag、Raptor、GAPDH、E-cadherin、Fibronectin一抗和羊抗兔二抗购自Proteintech公司;SYBR Green PCR试剂盒、逆转录试剂盒、蛋白Marker购自Thermo公司;PVDF膜购自Solarbio公司;羊抗兔

FITC 荧光标记二抗购自美国 Abbkine 公司;Transwell 小室购自美国康宁公司;兔抗人 CK18、CK8、EMA、Vimentin 一抗购自沈阳万类生物科技公司;大肠杆菌 DH5α、BL21 菌株由本室保存;免疫组化法(S-P)通用试剂盒、DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥公司;pET15b-CTP-NPRL2 与 pET15b-NPRL2 质粒购自北京鼎国生物公司。

1.2 *实验方法*

1.2.1 肾癌原代细胞培养 取 10 mL 无血清 1640 培养基于 50 mL 离心管内,放入冰盒,随后带入手术室,标本自手术台取下后,观察包膜是否完整,用无菌敷料蘸干表面血迹,使用无菌手术刀沿纵面小心剖开标本,取肿瘤中心一小块淡黄色或金黄色鱼肉样癌组织,放入离心管内,使无血清培养基淹没肾癌组织块。快速放入冰盒内,带回实验室。

采用胶原酶Ⅳ消化肾癌组织块,减少对肾癌细胞的伤害。将装有标本的离心管放入提前用紫外照射 30 min 的超净台内,把组织块倒入无菌培养皿内,用 4 ℃预冷的 PBS 清洗 5 遍,使用眼科剪与眼科镊小心将组织块剪成 1 mm^3 的小块,去除组织上的血管等组织,用 PBS 冲洗 3 ~5 遍,转入新的离心管内,加入 10 倍体积的胶原酶,37 ℃水浴消化 90 min,每隔 10 min 振荡 1 次,使组织块充分消化。消化完毕后,将组织悬液通过 200 目筛网过滤,收集细胞悬液,1 000 r/min,5 min 离心弃上清,完全培养基重悬,转移到细胞培养瓶内,放入细胞培养箱内培养。原代细胞接种后 48 h 内尽量减少挪动细胞次数,48 h 后第 1 次换液,需 1 ~2 周细胞融合度才能达到 70% 以上。原代细胞成团生长,每个细胞团都由最初的一两个贴壁细胞增殖而来,细胞融合度通常不能达到 100%。当细胞融合度达到 80% 时即可进行第 1 次传代。原代培养主要的干扰细胞是成纤维细胞,成纤维贴壁较快、贴壁较紧。传代的同时可利用差速贴壁法进行原代细胞的纯化,取 1 mL 胰酶加入到细胞培养瓶内,室温下消化 2 min,加入 2 mL 完全培养基终止消化,轻轻吹打培养瓶瓶底,使大部分细胞脱落下来,将细胞悬液转移到离心管内,1 000 r/min离心 5 min,弃去上清,加入完全培养基重悬,将细胞悬液转移到 6 孔板内,放入 37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养 20 min,小心取出培养板,吸取细胞悬液,加入到第 2 孔内,继续培养 20 min,重复此步骤 3 ~4 次,将细胞悬液转移到细胞培养瓶内,放入 CO_2 培养箱内继续培养。

1.2.2 原代细胞鉴定 流式细胞仪检测细胞 DNA 含量,按正常消化方法收获细胞,PBS 洗 3 次,加入 70% 乙醇 4 ℃固定 24 h 以上。离心弃去乙醇,4 ℃预冷的冰 PBS 洗 3 次,加入 RNase 37 ℃消化 1 h,加入 PI 染液室温避光染色 30 min,上流式细胞仪检测。

S-P 检测抗原,按正常方法消化细胞,制成细胞悬液,接种到 24 孔板内,每孔加入 500 μL 完全培养基,放入 CO_2 培养箱内培养。待细胞长到合适密度后,取出培养板,弃去培养基,冰 PBS 洗 3 遍,加入 4% 多聚甲醛室温固定 20 min,PBS 洗 3 遍,0.1% Triton X-100 室温下打孔通透 20 min,PBS 洗 3 遍,正常山羊血清室温封闭 20 min,弃去血清,各个孔依次加入 CK8、CK18、Vimentin、EMA、CD118 一抗(1∶100),4 ℃隔夜孵育,弃去一抗,PBS 洗 3 遍,每次 5 min,余下步骤按照 S-P 试剂盒和 DAB 显色试剂盒说明操作,显色结束后,在倒置显微镜下观察结果并拍照记录。

1.2.3 Western blot 验证融合蛋白表达 取含有质粒 PET15b-CTP-NPRL2、PET15b-NPRL2 的大肠杆菌 *E. coli* DH5α 1∶100 接种到新鲜 LB 培养基里(氨苄青霉素浓度 50 μg/mL)37 ℃ 200 r/min 隔夜摇菌,4 ℃ 6 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,提取质粒转化感受态 *E. coli* BL21,37 ℃ 200 r/min 摇菌 1 h,3 000 r/min 离心 5 min,去上清,加 1 mL 新鲜 LB 培养基重悬,涂 LB 琼脂平板(氨苄青霉素浓度 50 μg/mL)。37 ℃隔夜培养,挑单克隆菌落,37 ℃ 200 r/min 隔夜摇菌,1∶100转接加入新鲜 LB 培养基 200 mL(氨苄浓度 50 μg/mL),37 ℃ 200 r/min 摇菌至光密度值为 0.5 ~1.0,加入 IPTG 使终浓度为 0.5 mmol/L,28 ℃ 150 r/min 诱导 10 h,4 ℃ 6 000 r/min 离心 10 min,PBS 洗 2 遍,加入10 mL 超声裂解液,冰浴超声,超声条件:功率 200 W,超声5 s,间歇 5 s,共 20 min。4 ℃ 10 000 r/min 离心15 min收集上清,融合蛋白以天然、可溶的形式存在于上清中。因 pET15b 作为载体所表达的基因工程重组蛋白在其 N 端带有 1 个由 6 个组氨酸组成的标签(His-tag),使用 His-tag 标签蛋白纯化磁珠进行亲和层析纯化。取纯化好的融合蛋白,BCA 测蛋白浓度,调节上样量为 50 μg,10% SDS-PAGE 电泳跑胶。跑胶结束后,使用 PVDF 膜转膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 1.5 h,兔抗人 NPRL2 一抗(1∶1 000)4 ℃隔夜孵育。去除一抗,TBST 洗 3 遍。加入羊抗兔二抗(1∶5 000),室温孵育 1 h。TBST 洗 3 遍,使用 ECL 发光液试剂盒显影,使用 Bio-Rad 显影仪显影拍照。

1.2.4 免疫荧光观察融合蛋白在亚细胞中的定位

将肾癌原代细胞以每孔 1×10^5 接种到 6 孔板里,分为 BLANK 组、NPRL2 组和 CTP-NPRL2 组。待细胞融合度达到 80% 时,分别加入 100 μL 完全培养基,100 μL 10 μmol/L NPRL2 与 10 μmol/L CTP-NPRL2 融合蛋白,细胞培养箱里培养 12 h。弃去培养基,用

PBS 浸洗 3 次,每次 3 min。每孔加入 200 μL 的 4% 多聚甲醛固定 15 min,PBS 浸洗 3 次,每次 3 min。0.5% Triton X-100 室温通透 20 min,PBS 浸洗 3 次,每次 3 min。每孔加入 200 μL 山羊血清,室温封闭 30 min。吸掉多余的封闭液,每孔加入 200 μL 兔抗 6×His-tag 一抗(1∶100),4 ℃过夜孵育。吸去一抗,PBST 洗 3 次,每次 3 min。每孔加入 200 μL FITC 荧光标记二抗(1∶100),37 ℃避光孵育 1 h。吸出多余二抗,PBST 浸洗 3 次,每次 3 min。每孔加入 200 μL DAPI 染液,避光染色 5 min。吸出多余染液,PBST 洗 3 次,每次 3 min,使用荧光显微镜观察荧光并拍照。

1.2.5 Transwell 检测肾癌原代细胞侵袭能力 用 50 mg/L Matrigel 1∶8稀释液包被 Transwell 小室底部膜的上室面,4 ℃风干。吸出培养板中残余液体,每孔加入 50 μL 含 10 g/L BSA 的无血清培养液,37 ℃、30 min,吸出残余液体。消化细胞,终止消化后离心弃去培养液,用 PBS 洗 1~2 遍,用含 BSA 的无血清培养基重悬。取细胞悬液 200 μL 加入 Transwell 小室,实验分组同 1.2.4,每组独立重复 3 次。24 孔板内下室加入 500 μL 含 10% 胎牛血清的完全培养基。37 ℃、5% CO_2 培养 12 h。用棉签擦去基质胶和上室内的细胞,使用 0.1% 结晶紫溶液染色,在显微镜下观察并进行细胞计数。

1.2.6 Transwell 检测肾癌原代细胞迁移能力 Transwell测迁移能力时不使用基质胶,其他方法步骤同 Transwell 侵袭实验。

1.2.7 Real-time PCR 检测 Raptor、E-cadherin、Vimentin、Fibronectin 的表达量 实验分组同 1.2.4,使用 TRIzol 提取各组细胞总 RNA。分别收集各组细胞,PBS 漂洗 2 遍,TRIzol 提取总 RNA,逆转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 Real-time PCR。PCR 引物如下:E-cadherin 上游:5′-ACCATTAACAGGAACACAGG-3′,下游:5′-CAGTCACTTTCAGTGTGGTG-3′;Raptor 上游:5′-GCCATTACGGACACGATTGC-3′,下游:5′-CCATGATGGCGCTGACAATG-3′;Vimentin 上游:5′-GACCTCTACGAGGAGGAGAT-3′,下游:5′-TTGTCAACATCCTGTCTGAA-3′;GAPDH 上游:5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′,下游:5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′;Fibronectin 上游:5′-ACAAGCATGTCTCTCTGCCA-3′,下游:5′-TTTGCATCTTGGTTGGCTGC-3′。PCR 循环条件为:95 ℃预变性 10 min,95 ℃ 变性 15 s,60 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 30 s,共 40 个循环,72 ℃延伸 10 min,实验重复 3 次。

1.2.8 Western blot 检测 Raptor、E-cadherin、Vimentin、Fibronectin 的表达量 将肾癌原代细胞接种到 6 孔板内,实验分组同 1.2.4,分别加入 100 μL 完全培养基,100 μL 10 μmol/L NPRL2 与 10 μmol/L CTP-NPRL2 融合蛋白,细胞培养箱里培养 24 h。弃去培养基,使用 4 ℃预冷的 PBS 洗 2 遍。每孔加入 150 μL RIPA 裂解液,冰上静置 20 min。用细胞刮迅速挂下细胞,温和地转移到离心管内,4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min。收集上清,BCA 测蛋白浓度。调节每孔上样量 30 μg,上样跑胶电泳。电泳结束后,使用 PVDF 膜转膜。5% 脱脂奶粉室温封闭 1.5 h,兔抗人 Raptor、E-cadherin、Vimentin、Fibronectin、GAPDH 一抗(1∶1 000)4 ℃隔夜孵育。吸净一抗,TBST 洗 3 遍,每次 8min。加入羊抗兔二抗(1∶5 000),室温孵育 1 h。TBST 洗 3 遍,每次 8 min。使用 ECL 发光液试剂盒发光,使用 Bio-Rad 显影仪显影拍照。

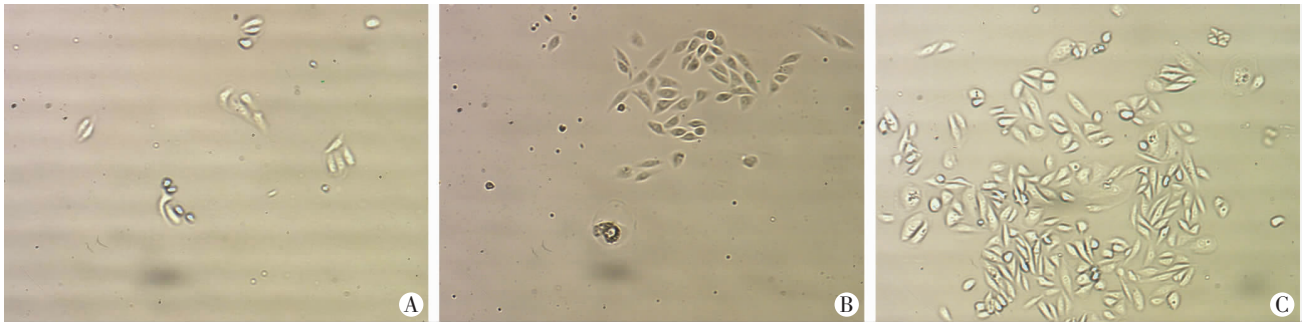
1.3 统计学分析

数据处理采用 Graphpad Prism 5 统计软件进行分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha = 0.05$。

2 结果

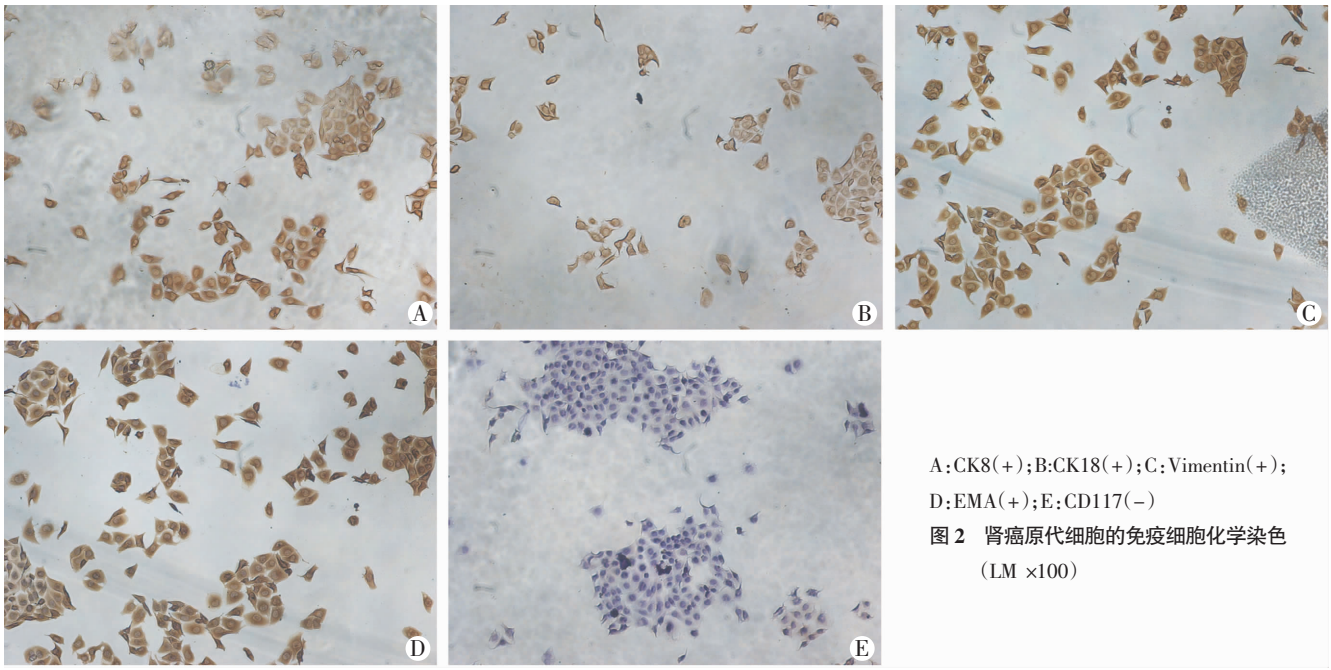
2.1 肾癌原代培养

通过胶原酶Ⅳ消化后过 200 目筛网可培养出原代细胞,通过差速贴壁法与多次传代纯化肾癌细胞,观察细胞形态,可见典型的上皮样细胞(图 1)。



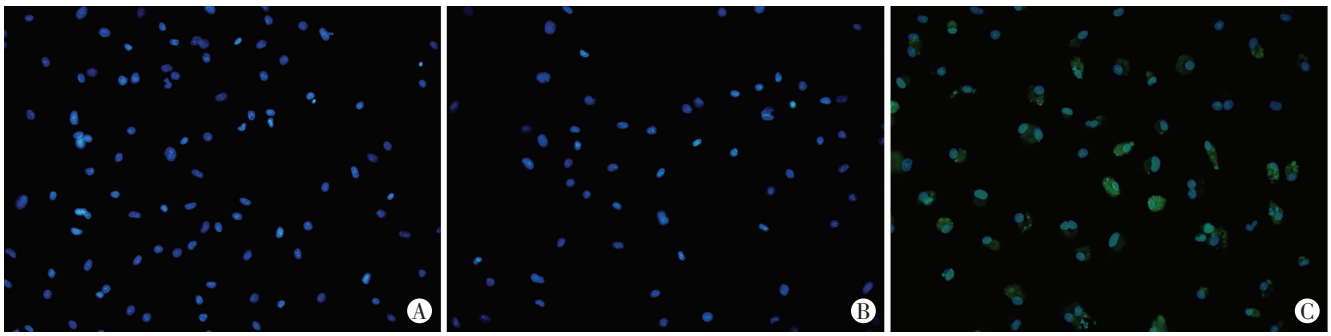
A:原代培养 2 d;B:原代培养 5 d;C:原代培养 8 d

图 1 肾癌原代细胞的生长情况 (LM ×100)



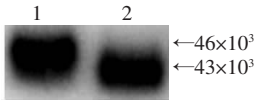
A:CK8(+);B:CK18(+);C:Vimentin(+);
D:EMA(+);E:CD117(-)

图2 肾癌原代细胞的免疫细胞化学染色
(LM ×100)



A:BLANK 组;B:NPRL2 组;C:CTP-NPRL2 组

图4 免疫荧光检测融合蛋白的亚细胞定位 (荧光显微镜 ×100)



1:CTP-NPRL2 组;2:NPRL2 组

图3 Western blot 验证融合蛋白表达

2.2 原代细胞的鉴定

流式细胞术检测细胞周期与细胞 DNA 含量,G_2/G_1 = 1.80 为亚三倍体细胞,细胞周期符合肿瘤细胞的特征。免疫细胞化学检测结果显示,CK8(+)、CK18(+)、Vimentin(+)、EMA(+)、CD117(-),与肾癌标本术后免疫组化结果一致(图2)。

2.3 Western blot 验证融合蛋白表达

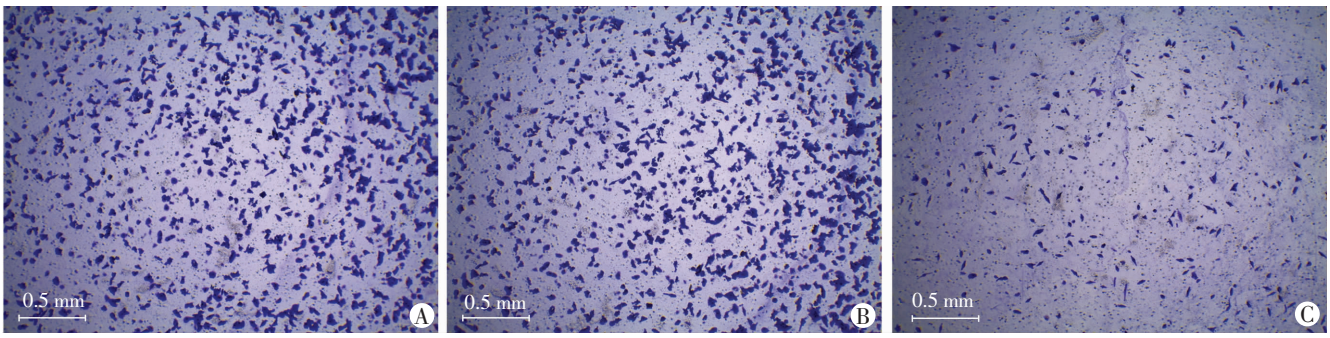
原核表达的目的蛋白 NPRL2 和 CTP-NPRL2 经纯化后,进行 Western blot 验证。Western blot 检测结果显示在 43×10^3 与 46×10^3 处有条带,分别是 NPRL2 和 CTP-NPRL2 融合蛋白(图3),证明质粒构建成功且可正常表达目的蛋白。

2.4 免疫荧光检测融合蛋白在肾癌原代细胞中的亚细胞定位情况

免疫荧光检测结果显示,CTP-NPRL2 组可见明显的绿色荧光,证明 CTP 可介导 NPRL2 蛋白进入细胞且定位于胞浆。NPRL2 组与 BLANK 组未见明显绿色荧光(图4)。

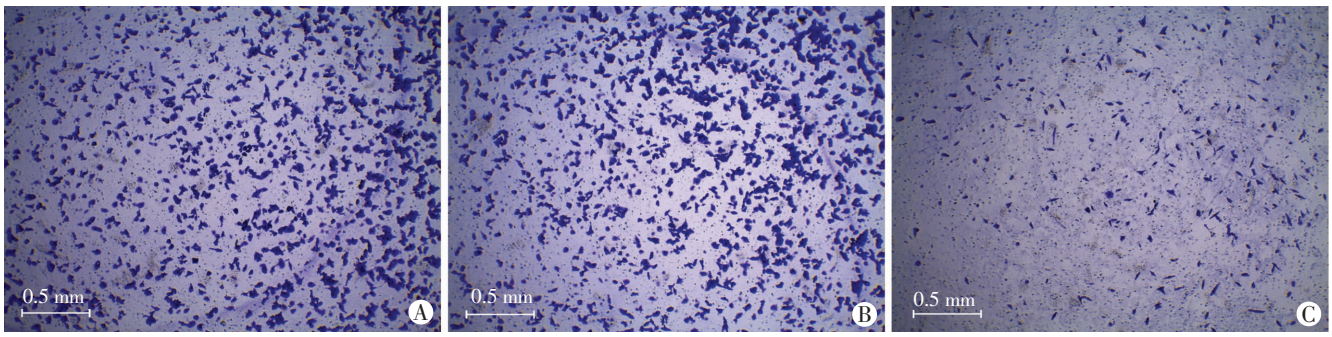
2.5 Transwell 侵袭实验结果

Transwell 侵袭实验后对各组细胞计数,方差分析结果显示3组之间差异有统计学意义(F = 153.9,P < 0.05),CTP-NPRL2 组细胞数(266.00 ± 38.49)同 BLANK 组(816.67 ± 43.17)与 NPRL2 组(821.33 ± 24.11)比较,差异有统计学意义(P < 0.05)。结果表明 CTP-NPRL2 转导入细胞后,肾癌细胞侵袭能力明显下降(图5)。



A:BLANK 组;B:NPRL2 组;C:CTP-NPRL2 组

图 5 Transwell 侵袭实验检测各组侵袭细胞数目变化 (LM)



A:BLANK 组;B:NPRL2 组;C:CTP-NPRL2 组

图 6 Transwell 迁移实验检测各组侵袭细胞数目变化 (LM)

表 1 Real-time PCR 检测各组指标的相对表达量 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	E-cadherin	Vimentin	Fibronectin	Raptor
BLANK 组	1.015 ± 0.222	1.006 ± 0.136	1.037 ± 0.355	1.017 ± 0.036
NPRL2 组	1.091 ± 0.023	0.923 ± 0.014	0.962 ± 0.136	1.063 ± 0.029
CTP-NPRL2 组	1.936 ± 0.023[a]	0.152 ± 0.213[a]	0.623 ± 0.026[a]	0.446 ± 0.005[a]

a:$P<0.05$,分别与 BLANK 组和 NPRL2 组比较

2.6 Transwell 迁移实验结果

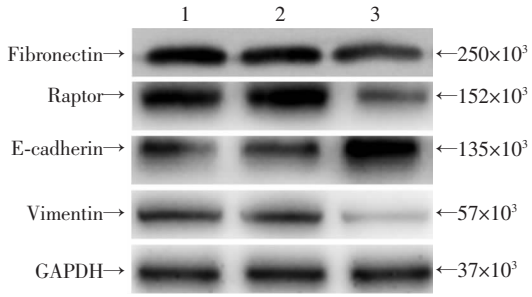
Transwell 迁移实验后对各组细胞计数,方差分析结果显示,3 组之间差异有统计学意义($F=521$, $P<0.05$),CTP-NPRL2 组细胞数(285.00 ± 21.41)同 BLANK 组(893.33 ± 25.22)与 NPRL2 组(859.45 ± 15.83)比较,差异有统计学意义($P<0.05$),NPRL2 组与 BLANK 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结果表明 CTP-NPRL2 转导入细胞后,肾癌细胞迁移力明显下降(图 6)。

2.7 Real-time PCR 检测 E-cadherin、Vimentin、Fibronectin 和 Raptor 的表达量

Real-time PCR 检测结果显示,CTP-NPRL2 组与另外 2 组相比,E-cadherin 表达量明显增加($P<0.05$),Vimentin、Raptor、Fibronectin 表达量明显下降($P<0.05$,表 1)。

2.8 Western blot 检测 E-cadherin、Vimentin、Fibronectin 和 Raptor 的表达量

Western blot 检测结果显示,CTP-NPRL2 组与另外 2 组相比 E-cadherin 表达量增加,Vimentin、Fibronectin 和 Raptor 表达量下降(图 7)。



1:BLANK 组;2:NPRL2 组;3:CTP-NPRL2 组

图 7 Western blot 检测 E-cadherin、Vimentin、Fibronectin 和 Raptor 蛋白的表达

3 讨论

目前针对肾透明细胞癌已建立了多种细胞系,但细胞系在建立过程中经过了多次传代,而经过体外多次传代的细胞为适应体外的生存环境,细胞形态、遗传物质同体内的肾癌细胞相比都发生了变化,即使是不同的肾透明细胞癌细胞系之间也有差别。直接用原代癌细胞进行体外实验,更能反映不同肿瘤的个体差异,在肿瘤临床诊断和治疗监测方面具有重要的意义。Perego 等[11]培养了 14 例肾细胞癌原代细胞,并通过免疫组化、2-DE、Western blot、质谱分析比较了肾癌原代细胞与对应的肾癌组织蛋白表达谱的变化,结果表明短期的原代培养的细胞蛋白质表型与相应肾癌组织极为相似,因此证明利用原代培养对进行蛋白质相关方面的研究具有重要意义。本研究通过胶原酶消化肾癌组织块,过 200 目筛网后种植培养,成功培育出肾癌原代细胞,并通过免疫细胞化学鉴定。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)是一种丝/苏氨酸蛋白激酶,在细胞生长、增殖、分化、细胞周期调控等多个方面起到重要作用。近年来发现 mTOR 相关的信号通路复杂且涉及面广泛,其中某些因素的调控与肿瘤的发生、发展密切相关。mTOR 在生物体中的存在形式为 mTORC1(mTOR complex 1)与 mTORC2(mTOR complex 2),其中 mTORC1 由 mTOR、Raptor、GβL、PRAS40 组成。mTORC1 现在被认为与肾细胞癌的病因有关,60% ~ 85% 的肾透明细胞癌中 mTORC1 表现活跃[12-13]。Kwak 等[14]通过研究发现 NPRL2 可以通过与 Raptor 相互作用影响 mTORC1 的活性,进而改变细胞的多项功能。

上皮-间质转化的概念最初是在 1982 年 Greenburg 等[15]发现晶状体上皮细胞可以在胶原凝胶中转化为间质细胞样形态而被提出的。EMT 是一种基本的生理病理现象,是胚胎发育中及形态发生过程中的重要组成部分。EMT 不仅在多细胞生物胚胎发育过程中起作用,而且在肿瘤迁移侵袭中也起着重要作用[16]。在肿瘤 EMT 过程中,上皮标志物 E-cadherin 表达下调,间质标志物 Vimentin、N 型钙粘蛋白(N-cadherin)、Fibronectin等表达上调,表现为上皮源性的肿瘤细胞失去细胞极性,细胞间的连接变得疏松,肿瘤细胞的粘附能力下降,迁移侵袭能力增强;同时抵抗凋亡的能力增强,使得肿瘤细胞易于离开原有位置,发生原位浸润或者随血行、淋巴等途径转移到体内其他器官或组织[17]。侵袭性与转移能力是癌细胞区别于正常细胞的最基本特征,越来越多的证据表明,EMT 是肿瘤侵袭和转移的一个早期标志[18]。Sugimoto 等[19]发现在 73 例肾透明细胞癌中 E-cadherin 低表达,而 Vimentin 呈高表达,说明肾癌发生、发展过程中与 EMT 存在密切关系。Piva 等[10]探讨了 EMT 在肾细胞癌中可能的分子机制,并指出 EMT 可以作为肾癌治疗的潜在靶点。Gulhati 等[20]发现 mTORC1 和 mTORC2 可以通过 RhoA 和 Rac1 信号通路调节 EMT,改变结直肠癌的转移能力,他们使用雷帕霉素抑制 mTORC1 和 mTORC2 的活性,减弱了结直肠细胞迁移侵袭能力。这一发现使通过药物作用于 mTOR 通路相关因子来抑制肿瘤细胞的迁移侵袭能力成为可能。

本实验通过构建 PET15b-CTP-NPRL2 与 PET15b-NPRL2 原核表达质粒,转入 *E. coli* BL21 菌株内,成功表达重组蛋白 CTP-NPRL2 与 NPRL2,并通过 Western blot 验证目的蛋白的表达。同时利用 CTP 可以介导蛋白质大分子进入细胞并定位于胞浆的特性[21],成功将 CTP-NPRL2 融合蛋白导入肾癌原代细胞内,并通过免疫荧光确认重组蛋白定位于胞浆中。将重组蛋白导入肾癌细胞后,Transwell 迁移侵袭实验发现肾癌细胞迁移和侵袭能力下降。Real-time PCR 检测 mTORC1 关键因子 Raptor 和 EMT 相关标志物 E-cadherin、Vimentin、Fibronectin 的表达水平变化,并通过 Western blot 验证相关蛋白的表达量,结果显示将 CTP-NPRL2 融合蛋白转入肾癌细胞内后,CTP-NPRL2 组 Raptor 因子与 Vimentin、Fibronectin 的 mRNA、蛋白表达水平与 NPRL2 组和 BLANK 组相比明显降低($P<0.05$);CTP-NPRL2 组 E-cadherin 的 mRNA、蛋白表达水平与 NPRL2 组和 BLANK 组相比明显升高($P<0.05$)。结果说明 NPRL2 可以通过调节 Raptor 影响 mTORC1 的活性,进而调节 EMT 相关蛋白 E-cadherin、Vimentin、Fibronectin 的表达量,降低肾癌细胞的迁移侵袭能力。

综上所述,本研究利用 CTP 将 NPRL2 蛋白转入肾癌原代细胞内,降低了肾癌细胞的迁移侵袭能力,原因可能是通过 mTORC1 影响了 EMT 进程,为今后转移性肾癌的治疗提供了一个新的靶点和方向。

参考文献:

[1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2016 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30. DOI:10.3322/caac.21332

[2] Ljungberg B, Bensalah K, Canfield S, *et al*. EAU guidelines

on renal cell carcinoma:2014 update[J]. Eur Urol,2015,67(5):913-924. DOI:10.1016/j.eururo.2015.01.005

[3] Chen W, Zheng R, Baade P D, *et al*. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132. DOI:10.3322/caac.21338

[4] Alonso A H, García M C, Enguita C G. Is there a role for systemic targeted therapy after surgical treatment for metastases of renal cell carcinoma? [J]. World Journal of Nephrology, 2015,4(2): 254-262. DOI: 10.5527/wjn.v4.i2.254

[5] Najjar Y G, Rini B I. Novel agents in renal carcinoma: a reality check[J]. Ther Adv Med Oncol, 2012, 4(4): 183-194. DOI:10.1177/1758834012443725

[6] Lerman M I, Minna J D. The 630-kb Lung Cancer Homozygous Deletion Region on Human Chromosome 3p21.3:Identification and Evaluation of the Resident Candidate Tumor Suppressor Genes [J]. Cancer Research, 2000, 60(21): 6116-6133.

[7] Li J, Wang F, Haraldson K, *et al*. Functional characterization of the candidate tumor suppressor gene NPRL2/G21 located in 3p21.3C[J]. Cancer Res, 2004, 64(18): 6438-6443. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-03-3869

[8] Ji L, Nishizaki M, Gao B, *et al*. Expression of several genes in the human chromosome 3p21.3 homozygous deletion region by an adenovirus vector results in tumor suppressor activities *in vitro* and *in vivo*[J]. Cancer Res, 2002, 62(9): 2715-2720.

[9] Tang Y, Jiang L, Tang W. Decreased expression of NPRL2 in renal cancer cells is associated with unfavourable pathological, proliferation and apoptotic features[J]. Pathol Oncol Res, 2014, 20(4): 829-837. DOI:10.1007/s12253-014-9761-2

[10] Piva F, Giulietti M, Santoni M, *et al*. Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Cell Carcinoma: Implications for Cancer Therapy[J]. Mol Diagn Ther, 2016, 20(2): 111-117. DOI:10.1007/s40291-016-0192-5

[11] Perego R A, Bianchi C, Corizzato M, *et al*. Primary cell cultures arising from normal kidney and renal cell carcinoma retain the proteomic profile of corresponding tissues[J]. J Proteome Res, 2005, 4(5): 1503-1510. DOI:10.1021/pr050002o

[12] Pantuck A J, Seligson D B, Klatte T, *et al*. Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma: implications for molecular patient selection for targeted therapy [J]. Cancer, 2007, 109(11): 2257-2267. DOI:10.1002/cncr.22677

[13] Robb V A, Karbowniczek M, Klein-Szanto A J, *et al*. Activation of the mTOR signaling pathway in renal clear cell carcinoma[J]. J Urol, 2007, 177(1): 346-352. DOI:10.1016/j.juro.2006.08.076

[14] Kwak S S, Kang K H, Kim S, *et al*. Amino acid-dependent NPRL2 interaction with Raptor determines mTOR Complex 1 activation[J]. Cell Signal, 2016, 28(2): 32-41. DOI:10.1016/j.cellsig.2015.11.008

[15] Greenburg G, Hay E D. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells[J]. J Cell Biol, 1982, 95(1): 333-339. DOI:10.1083/jcb.95.1.333

[16] Thiery J P, Acloque H, Huang R Y, *et al*. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. Cell, 2009, 139(5): 871-890. DOI:10.1016/j.cell.2009.11.007

[17] Kalluri R, Neilson E G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis[J]. J Clin Invest, 2003, 112(12): 1776-1784. DOI:10.1172/JCI20530

[18] Thiery J P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(6): 442-454. DOI:10.1038/nrc822

[19] Sugimoto M, Kohashi K, Itsumi M, *et al*. Epithelial to Mesenchymal Transition in Clear Cell Renal Cell Carcinoma with Rhabdoid Features[J]. Pathobiology, 2016, 83(6): 277-286. DOI:10.1159/000445752

[20] Gulhati P, Bowen K A, Liu J, *et al*. mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways[J]. Cancer Res, 2011, 71(9): 3246-3256. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-4058

[21] Kim D, Jeon C, Kim J H, *et al*. Cytoplasmic transduction peptide (CTP): new approach for the delivery of biomolecules into cytoplasm *in vitro* and *in vivo*[J]. Exp Cell Res, 2006, 312(8): 1277-1288. DOI:10.1016/j.yexcr.2005.12.029

(收稿:2016-08-15;修回:2016-09-26)

(编辑 邓强庭)