肿瘤分子学相关研究 文章编号:0253-3626(2009)07-0841-04

hepaCAM 基因转染对肾癌 786-0 细胞增殖和侵袭活性的影响

荀春华[1],罗春丽[1],吴小候[2],谢建红[1],杨淑哲[1],潘翠翠[1]
(1. 重庆医科大学医学检验系临床检验诊断学、省部共建教育部重点实验室、重庆市重点实验室;
2. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:肝细胞粘附分子(Hepatocyte cell adhesion molecule,hepaCAM)是近年来发现的一类免疫球蛋白超家族细胞黏附分子,具有抑癌基因特性。本文研究 hepaCAM 基因转染对肾癌(Renal cell carcinoma,RCC)细胞 786-0 增殖和侵袭能力的影响。方法:将携有 hepaCAM 基因的重组质粒 hepaCAM-pEGFPN2 转染 786-0 细胞(实验组)后用 G418 筛选形成阳性克隆并扩增培养,以转染了 pEGFPN2(空载组)和未转染的 786-0 细胞(空白组)为对照,采用逆转录—聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测 hepaCAM mRNA 的表达,四甲基偶氮唑蓝比色法(MTT 法)检测 786-0 细胞增殖活性,Transwell 小室法检测细胞体外侵袭能力。结果:稳定转染 hepaCAM 后 786-0 细胞的 hepaCAM mRNA 表达水平明显上调($P<0.01$),MTT 显示实验组与空载组相比 hepaCAM 基因抑制细胞成活率在 4、5、6 d 分别为 26.5%、38.1%、35.7%($P<0.01$);侵袭实验显示细胞穿透 ECM 膜的数目为 24.6±5.3(实验组)、35.5±6.23(空载组)和 37.1±7.0(空白组),实验组细胞明显少于 2 对照组($P<0.01$)。结论:抑癌基因 hepaCAM 转染能降低肾癌细胞 786-0 的增殖和侵袭活性。

【关键词】hepaCAM 基因;转染;肾癌细胞;增殖与侵袭
【中国图书分类法分类号】R737.11 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-04-08

Effects of hepaCAM gene transfection on proliferation and invasion of human renal cancer cell line 786-0

XUN Chun-hua, et al
(*Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: hepaCAM (hepatocyte cell adhesion molecule) is a kind of immunoglobulin superfamily member which was discovered as a tumor suppressor. This study was to investigate the effects of hepaCAM transfection on proliferation and invasion of human renal cancer cell line 786-0. *Methods*: An eukaryotic expression plasmid containing hepaCAM, hepaCAM-pEGFPN2 was transfected into 786-0 cells, then positive cell clones were selected with G418 and amplified. pEGFPN2 transfected cells and untreated cells were set as controls. The expression of hepaCAM was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Proliferative ability of 786-0 cells was measured by MTT assay and the invasive ability in vitro was determined by transwell chambers method. *Results*: Plasmid pEGFPN2, hepaCAM-pEGFPN2 were successfully constructed and stably transfected into 786-0 cells. After transfection, the inhibitory rates of cell growth at the fourth、fifth and sixth day were 26.5%, 38.1% and 35.7%, respectively. The penetrating cells were significantly less in 786-0/ hepaCAM- pEGFPN2 group than in 786-0/pEGFPN2 and 786-0 groups (24.6±5.3vs35.5±6.2 and 37.1±7.0, $P<0.01$). *Conclusion*: Transfection with hepaCAM might suppress proliferative and invasive ability of renal cancer 786-0 cells.

【Key words】hepaCAM; Transfection; Renal cancer cell; Proliferation&Invasion

肾癌(Renal cell carcinoma,RCC)占肾肿瘤的 85%,是泌尿系统常见恶性肿瘤之一[1],大约 20%~30%患者在获得诊断时就有不同程度的扩散与转移,20%~40%行肾切除术的患者会形成转移[2]。尽管各种类型的治疗策略不断改进,但是肾癌的治疗仍然是一大挑战,基因突变已经被确认为是癌症发生的标志,因此,开展肾癌基因治疗研究具有特殊意义。Shen Shali 等[3,4]研究发现肝细胞粘附分子(Hepatocyte cell adhesion molecule,hepaCAM)是一种免疫

作者介绍:荀春华(1979-),女,主管检验师,硕士,研究方向:泌尿系肿瘤诊治的研究。
通讯作者:罗春丽,女,教授,E-mail:luochunli79@126.com。

球蛋白类细胞粘附分子,当野生型 hepaCAM 基因重新表达在缺失的肝癌细胞中,具有抑制肿瘤细胞的增殖能力以及改变细胞骨架以及细胞-细胞外基质之间相互作用的特性,从而认为 hepaCAM 可能对肿瘤形成及侵袭转移具有抑制作用。而 hepaCAM 在肾癌中的研究目前国内外尚未见报道。本研究将外源性 hepaCAM 转染 hepaCAM 低表达的人肾癌细胞系 786-0 中观察其对肿瘤细胞增殖和侵袭活性的影响,以进一步补充肿瘤发生发展的机制并探索肾癌基因治疗的新思路。

1 材料和方法

1.1 材料

TRIZOL、Lipofectamine2000(Invitrogen 公司);RT-PCR 试剂盒(TAKARA 生物技术有限公司);DNA Marker、PCR 引物(大连宝生物公司合成);hepaCAM-pEGFPN2 质粒及 pEGFP-N2 质粒(新加坡国立大学 Shen Shali 教授惠赠);DH5α、786-0 细胞(实验室保存);质粒提取试剂盒(北京 TIANGEN 公司);限制性内切酶 *BamH* Ⅰ/*Hind* Ⅲ(华美公司);胰蛋白酶、MTT、DMSO(sigma 公司);RPMI1640、卡那霉素、青链霉素、G418(GIBCO 公司);胎牛血清(杭州四季青公司);Transwell 小室及基质胶(B.D 公司)。

1.2 方法

1.2.1 hepaCAM 基因真核表达质粒的鉴定 将重组质粒 hepaCAM-pEGFPN2 进行 *BamH* Ⅰ/*Hind* Ⅲ双酶切并且在 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。鉴定后的重组质粒转化 DH5α 感受态细胞,经卡那霉素(终浓度 30 μg/ml)抗性的 LB 平板筛选,挑选单克隆摇菌过夜扩增培养,测序,用快速质粒提取试剂盒提取质粒保存备用。

1.2.2 细胞培养和转染 786-0 细胞复苏后在完全培养基中置于 37℃含 5%CO_2 孵箱中培养。取对数生长期的细胞进行转染,接种细胞 1.5×10^5 个/孔于 24 孔培养板,每孔加入 500 μl 无抗生素培养基,转染前弃培养液,细胞转染采用阳离子脂质体 lipofectamine2000 介导法,操作按试剂盒说明书进行;继续培养 24~48 h 后在含有 800 mg/L 的 G418 培养基筛选,出现阳性克隆继续在 400 mg/L 的 G418 培养基培养。将细胞分为 3 组:空白组(即未转染组)、空载组(稳定转染 pEGFPN2 组)为对照及实验组(稳定转染 hepaCAM 组),以备后续实验。

1.2.3 逆转录-聚合酶链反映(RT-PCR) 取 3 组对数生长期的细胞用 Trizol 提取总 RNA,紫外法检测 RNA 含量及纯度,取 A_{260}/A_{280} 值位于 1.8~2.1 之间者做后续实验。提取的总 RNA 立即反转录或 -80℃冰箱冻存。总 RNA 溶于经过 DEPC 处理的水,定量后稀释至 1 μg/μl 用于 cDNA 合成。RT-PCR 反应参照 TAKARA 两步法说明书进行。根据基因数据库,其中 hepaCAM 及 β-*actin* 基因序列使用 Primer5.0 软件设计引物如下:hepaCAM 上游 5'-AGCGGGAAATCGTGCGTG-3' 461 bp;下游 5'-CTTCTGGTTTCAGGCGGTC-3'。β-actin 上游 5'-AGCGGGAAATCGTGCGTG-3' 309 bp;下游 5'-CCAGGGTACATGGTGGTGC-3'。hepaCAM 的 PCR 反应条件均为 94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,59℃退火 45 s,72℃延伸 45 s,共 35 个循环;72℃延伸 5 min。β-actin 反应条件为 94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,54℃退火 30 s,72℃延伸 45 s,共 30 个循环;72℃延伸 5 min。反应完成后取 5 μl PCR 产物,加少量溴乙锭染色,1.5% 琼脂糖凝胶电泳,BIO-RAD 凝胶成像仪观察分析 hepaCAM 与内参照 β-actin 灰度比值。

1.2.4 MTT 法测定细胞生长曲线 取对数生长期的细胞配制成单细胞悬液,以每孔 5×10^3 个细胞分别种在 6 个 96 孔板上,每天在同一时间点各检测 1 板,共 6 d;每板分别种 3 组:空白组、空载组及实验组,每组复 6 孔。置于 37℃含 5% CO_2 及饱和湿度的孵箱中培养,每次随机选 1 板,每孔加 MTT 20 μl(5mg/ml),继续置孵箱中培养孵育 4 h,2 000 r/min 离心 5 min 后去掉上清液,加 150 μl DMSO,振荡 10 min 于酶标仪上 492 nm 检测吸光度值。细胞生长抑制率 =(1- 实验组 OD/ 对照组 OD)×100%[5]。

1.2.5 Transwell 侵袭小室模型测定细胞体外侵袭能力 将 1:5 稀释的 Matrigel 人工基质胶 40 μl 铺于 Transwell 侵袭小室聚碳酯微孔膜(孔径 8 μm)上表面,置 37℃ 30 min 使其聚成凝胶。Transwell 上室中分别加入已消化重悬的各组细胞 100 μl(1×10^8 个/L),下室中加入 600 μl 含趋化因子的无血清 RPMI1640 培养基,培养 24 h 后取出 PBS 清洗,去除滤膜上层细胞,将已经侵入并贴附于微孔膜下层细胞固定,HE 染色,显微镜下直接观察穿过膜的细胞数。每组设 3 个复孔,每孔随机计数 5 个视野,计数每个视野内穿过 8 μm 微孔的细胞数,以侵袭细胞相对数目来表示肿瘤细胞侵袭能力。

1.3 统计学处理

所有资料以 SPSS 13.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,先进行 one-way ANOVA分析,如差异有统计学意义则采用 SNK 检验进行两两比较,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 重组质粒的酶切鉴定

hepaCAM-pEGFPN2 重组质粒经 *BamH* Ⅰ/*Hind* Ⅲ双酶切得出 2 条带:1 条为 pEGFPN2 质粒,4.7 kb;另 1 条为 1.25 kb hepaCAMcDNA 片段,说明 hepaCAM-pEGFPN2 含有目的基因 hepaCAM,如图 1。

2.2 hepaCAMmRNA 的表达

以 RT-PCR 检测 3 组 786-0 细胞 hepaCAMmRNA 表达(见图 2)。3 组 hepaCAM 与 β-actin mRNA

比值分别为空白组 0.36±0.18、空载组 0.38±0.17 及实验组 1.03±0.20;空白组及空载组 hepaCAM 的 mRNA 表达水平明显低于实验组($P<0.01$),而前 2 组 hepaCAM 表达水平差异没有统计学意义($P>0.05$);说明 hepaCAM 转染筛选成功。

2.3 786-0 细胞体外增殖活性

MTT 法检测发现实验组 OD 值与空白组 OD 值进行比较,除第 1 d 差异无统计学意义之外($P=0.795$),第 2~6 d 差异均有统计学意义($P=0.001<0.01$),而空白组与空载组差异无统计学意义(见图 3),提示 hepaCAM 基因转染能够抑制肾癌细胞 786-0 的增殖能力。以空载组 786-0 细胞为对照,实验组细胞在第 4、5、6 d 其抑制率达到 26.5%、38.1%、35.7%。

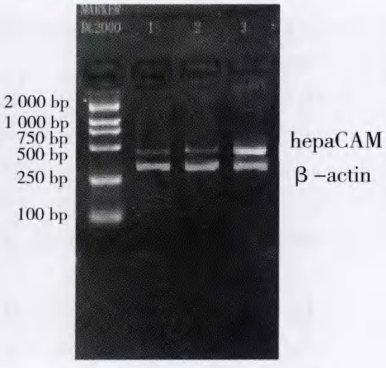
2.4 Transwell 侵袭小室测定细胞体外侵袭能力

Transwell 侵袭小室中 3 组细胞穿膜细胞数分别为空白组:37.1±7.0,空载组:35.5±6.2,实验组:24.6±5.3;实验组穿膜细胞数明显减少,差异有统计学意义($P<0.01$),空白组与空载组比较差异无统计学意义($P>0.05$);表明 hepaCAM 基因转染明显抑制 786-0 细胞体外侵袭能力(见图 4)。



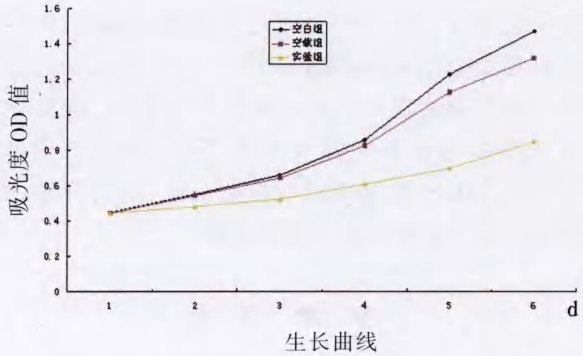
1. hepaCAM-pEGFPN2;
2. PEGFPN2

图 1 质粒酶切鉴定结果



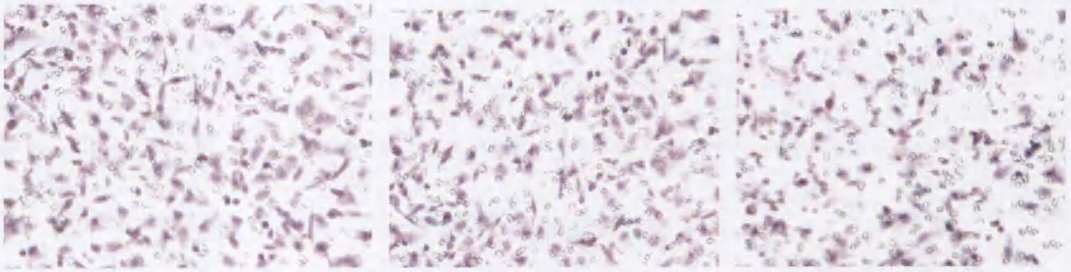
1. 空白组;2. 空载组;3. 实验组;

图 2 3 组细胞 hepaCAMmRNA 表达水平图谱



生长曲线

图 3 MTT 法检测细胞生长曲线:从第 1~6 d 3 组各自 OD 值的平均值连成线即形成各自的生长曲线



空白组　　空载组　　实验组

图 4 3 组细胞体外侵袭能力(HE 染色,×100)

3 讨 论

hepaCAM 是 2005 年 Shen 等从人类肝脏中分离的具有抑癌基因特性的免疫球蛋白类细胞粘附分子;其基因定位于人类染色体 11q24.2 上,全长 3 563 bp,编码区 mRNA 长度为 1 251 bp,编码产物是一种含 416 个氨基酸,分子量为 46 kD 的蛋白(Gene Bank NM_152722)。Shen 等[3,4]报道:hepaCAM 基因在人类正常肝组织上表达,在肝癌组织中表达缺失或明显减少,当野生型 hepaCAM 基因重新表达在缺失的肝癌细胞中,癌细胞增殖能力下降。研究表明肿瘤形成及发生侵袭转移与粘附分子是密切相关的[6],例如:NCAM(神经细胞粘附分子),在肿瘤形成期间表达下调,并且在腺样囊性癌细胞中可逆转癌侵袭,而使用 Rip1Tag2 鼠做动物实验显示缺失 NCAM 基因的裸鼠易发生淋巴结转移[7,8];TSLC1(非小细胞肺癌肿瘤抑制基因 1),在乳腺癌中低表达[9]并且与鼻咽癌转移高度相关[10]。我们通过 MTT 测生长曲线、Transwell 测体外侵袭实验显示 hepaCAM 在肾癌细胞 786-0 表现为抗增殖和侵袭的生物学特性:首先肾癌体外转染 786-0 细胞实验中,MTT 显示与空载

组细胞相比,实验组细胞在第 4、5、6 d 其抑制率分别为 26.5%、38.1%、35.7%,而空载组与空白组差异无统计学意义,证实 hepaCAM 在肾癌中起了抗增殖作用;其次 Transwell 小室计数穿膜细胞数显示转染 hepaCAM 基因组细胞穿膜细胞数明显比空载组及未转染组细胞数少,其差异有统计学意义;另外,hepaCAM 基因定位于人类染色体 11q24.2 位点上,分子遗传学及细胞遗传学显示 11 号染色体在癌症形成中最易发生突变,如肿瘤抑制基因 TSLC1 是定位在 11q23 位点上[11],hepaCAM 与 TSLC1 基因同属免疫球蛋白超家族细胞粘附分子,并且均定位于 11 号染色体上,进一步从理论上推测 hepaCAM 可能具有与 TSLC1 同样的抑癌作用。由此可见,hepaCAM 是一种与肿瘤发生发展密切相关的基因,将其导入该基因表达水平低的人肾癌 786-0 细胞株中可明显抑制 786-0 细胞增殖和侵袭活性,这为肾癌的基因治疗提供实验依据和新的思路。

参 考 文 献

[1] Drucker B J. Renal cell carcinoma: Current status and future prospects[J].Cancer Treatment Reviews,2005,31(7):536-545.

[2] Michael S,Nicolas H,Gita S,et al. Modern therapeutic approaches in metastatic renal cell carcinoma[J]. Germany Eau - ebu update series,2007,5(1):26-37.

[3] Moh M C,Lay H,Shen S L,et al.Cloning and characterization of hepaCAM,a novel Ig-like cell adhesion molecule suppressed in human hepatocellular carcinoma[J]. Journal of hepatology,2005,42(6):833-841.

[4] Moh M C,Zhang C L,Luo C L,et al. Structural and functional analyses of a novel Ig-like cell adhesion molecule,hepaCAM,in the human breast carcinoma MCF7 cells[J]. The journal of Biological Chemistry,2005,280(29):27366-27374.

[5] 张 蕾,温洪涛,张 岚,等. Bcl-XL 反义寡核苷酸转染对食管癌细胞增殖及裸鼠体内人食管癌移植瘤生长的抑制作用[J].中华病理学杂志,2005,34(7):402-406.

[6] Nguyen T H. Mechanisms of metastasis[J]. Clinics in Dermatology,2004,22(3):209-216.

[7] Franca C M,Jaeger R G,Freitas V M,et al.Effect of NCAM on in vitro invasion of human adenoid cystic carcinoma cells[J]. Oral oncology,2001,37(8):638-642.

[8] Shang J,Sheng L,Wang K,et al.Expression of neural cell adhesion molecule in salivary adenoid cystic carcinoma and its correlation with perineural invasion[J]. Oncol Rep,2007,18(6):1413-1416.

[9] Heller G,Geradts J,Ziegler B,et al.Downregulation of TSLC1 and DAL-1 expression occurs frequently in breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat,2007,103(3):283-291.

[10] Lung H L,Cheung A K,Xie D,et al.TSLC1 is a tumor suppressor gene associated with metastasis in nasopharyngeal carcinoma [J].Cancer Res,2006,66(19):9385-9392.

[11] Mathew T P,Takahiro N,Hiroshi F,et al.Identification of tumor suppressor candidate genes by physical and sequence mapping of the TSLC1 region of human chromosome 11q23[J]. Gene,2001,273(2):181-189.

(责任编辑:冉明会)

参考文献著录规则

按国家标准 GB7714-87《文后参考文献著录规则》采用顺序编码制著录。参考文献中的作者,1~3 名全部列出,3 名以上只列前 3 名,后加“,等”或其他与之相应的文字。

外文期刊名称为缩写,《Index Medicus》的格式为准;中文期刊用全名。

[期刊格式]作者.文题[J].刊名,年份,卷(期):起页.

例:[1]吴孟超,张柏和.我国肝脏外科现状和发展前景[J].中华外科杂志,1993,34(1):515.

[2]Iizuka H,Obara K,Ishijima A,et al.Correlation beween anti-Hbc titers and HBV DNA in blood units withiut detecable HbsAg[J].Vpx Aang,1992,63(1):107.

[书籍格式]主编者.书名[M].版次.出版者,年份.起页-迄页.(或作者.文题.见:主编者.书名[M].版次.出版地:出版者,年份.起页-迄页.

例:[1]王波贞.实用妇立科学[M].北京:人民卫生出版社,1987.953-959.

[2]裘法祖.脾脏疾病.见:黄家驷,吴阶平,外科学[M].上册.北京:人民卫生出版社,1979.880-883.