基础研究 文章编号:0253-3626(2010)01-0057-03

NHE1 反义基因对胃癌细胞 NHE1 蛋白表达及裸鼠成瘤力的影响

滕小春[1],刘海峰[2]

(1 重钢总医院老年科,重庆 400081;2 北京武警总医院消化科,北京 100039)

【摘 要】目的:探讨人 NHE1 反义基因转染对 SGC-7901 胃癌细胞 NHE1 蛋白表达及裸鼠成瘤力的影响。方法:构建人 NHE1 反义基因真核表达载体,采用脂质体法将其转染至 SGC-7901 胃癌细胞中,通过免疫组织细胞化学 SP 法检测 NHE1 蛋白表达情况,流式细胞仪检测对细胞增殖和凋亡的影响,从电镜水平比较观察转染与未转染细胞形态学的变化,并观察裸鼠成瘤能力的改变。结果:转染 NHE1 反义基因的 SGC-7901 胃癌细胞 NHE1 蛋白表达降低;细胞增殖能力下降,细胞凋亡率增加;透射电镜下细胞线粒体数量增多、体积增大,内质网扩张,核偏向一侧,极性增强;裸鼠成瘤能力下降。结论:NHE1 反义基因能使 SGC-7901 胃癌细胞的 NHE1 蛋白表达明显下调,裸鼠成瘤能力降低,NHE1 蛋白在胃癌细胞生长中起重要作用。

【关键词】NHE1 基因;真核表达载体;反义基因;胃癌

【中国图书分类法分类号】R734.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-08-08

Effect of Antisense gene NHE1 on the expression of NHE1 protein of gastric cancer cell after transfection

TENG Xiao-chun, et al

(*Department of Geriatrics, Chongqing Iron and Steel Company Hospital*)

【Abstract】*Objective*: To study the effects of antisense human NHE1 gene on the expression of the NHE1 protein of SGC-7901 gastric cancer cell and the changes of the carcinoma forming capacity after transplantation in nude mouse. *Methods* Antisense NHE1 eukaryotic expression vector was constructed with recombinant DNA technique and transfected into the cells of gastric carcinoma cell line SGC-7901 with liposome DOTAP.Then, the expression of NHE1 protein with SP and the changes of the carcinoma forming capacity in nude mouse was also observed. *Results*: The expressions of NHE1 protein of SGC-7901 cells transfected with antisense NHE1 gene in vitro were obviously decreased, inhibitions of their proliferation were induced, apoptosis rate increased.Under electron microscope, organelles in these cells were abundant. carcinoma forming capacity in nude mouse were decreased. *Conclusion*:The expression of NHE1 protein was obviously down regulated after the transfection of antisense NHE1 gene, and carcinoma forming capacity in nude mouse was decreased. which implies that NHE1 protein plays an important role in gastric cancer cell growth.

[Keywords] NHE1 gene; Eukaryotic expression vector; Antisense gene; Gastric cancer;

胞膜离子交换蛋白 Na^+-H^+ 交换泵 -1(Na^+-H^+ exchanger1, NHE1)是存在于所有脊椎动物细胞质膜的一种跨膜蛋白,其功能是通过 Na^+-H^+ 交换将胞内过多的 H+ 排出,从而保持细胞内 pH 值稳定[1,2]。由于肿瘤细胞糖酵解优势,导致肿瘤细胞产生大量的乳酸和 H^+,依靠其表达增强的 NHE-1 膜蛋白,使肿瘤细胞进行强大的 Na^+-H^+ 交换,将大部分 H^+ 泵出细胞外,阻止肿瘤细胞内酸化,维持肿瘤细胞内 pH 值在中性或偏碱性,从而保持肿瘤细胞恶性生长的能力[3,4]。本研究拟从转染反义基因的胃癌细胞对裸鼠成瘤力的影响来探索胃癌细胞生长的机制。

作者介绍:滕小春(1969-),男,副主任医师,硕士,研究方向:胃癌发病机制研究。

1 材料与方法

1.1 材料

人 NHE1cDNA 的 PEAP 克隆载体由 Jossete Noel (Montreal university, Canada)博士惠赠;真核表达载体 pcDNA3.1(-)/Zeo、Zeocin 为 Invitrogen 公司产品; 限制性内切酶 *EcoR* Ⅰ、*Hind* Ⅲ为 TakaRa 公司产品;DOTAP 脂质体为 Roche 公司产品; RPMI1640 培养基、小牛血清、胰酶、EDTA 购自华美生物公司;SP 试剂盒、DAB 试剂盒购自北京中山生物公司,

其余试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 NHE1 反义真核表达载体的构建及鉴定　见文献[5]。

1.2.2 细胞培养　SGC-7901 细胞培养于含 10%灭活的小牛血清、100 μg/ml 链霉素、100 U/ml 青霉素的 RPMI1640 培养液中，培养条件为 37℃、5%CO_2、饱和湿度，每隔 2～3 d 用 0.25%胰酶、0.02%EDTA 消化，传代培养。

1.2.3 基因转染　1）待细胞长至对数生长期，于转染前 1 d 换液，转染前 2 h 换无血清培养基。2）脂质体转染复合物的制备：（1）2.5 μg 质粒 DNA 溶于优化转化液中，终体积 25 μl。（2）15 μl 脂质体溶于优化转化液中，终体积 35 μl。二者混匀，室温下 10~15 min。3）移去培养基，加入 2 ml 无血清培养基。加入转染复合物，混匀，培养 3~6 h。4）换有血清培养基，加 Zeocin，终浓度 100 μg/ml。每 2~3 d 换培养基，同时加 Zeocin 筛选，直到克隆形成。

1.2.4 外源基因是否整合的分析　常规抽提DNA，采用 PCR 法扩增外源 ZeoR 基因，Zeo 基因引物根据文献由上海基康公司设计合成，反应条件：先 94℃ 5 min，然后 94℃ 30s，53℃30 s，72℃ 30 s，30 个循环，最后 72℃延伸 5 min，1%琼脂糖电泳，紫外灯下观察并拍照。

1.2.5 SP 法检测 NHE1 蛋白的表达　染色方法参照试剂盒说明书进行。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。主要实验步骤：（1）将消过毒的盖玻片放入六孔板内，待细胞长至对数生长期，胰酶消化，制成单细胞悬液，将细胞悬液接种在盖玻片上，于 37℃、5%CO_2 饱合湿度下培养 24~48 h，待细胞长成单层，取出盖玻片，PBS 洗 2 次，然后用 75%酒精固定 2 h 以上。（2）将固定的细胞盖玻片用 PBS 洗 5 min，取出吹干，3%H_2O_2 孵育 5 min，以消除内源性过氧化物酶活性，蒸馏水冲洗，PBS 浸泡 5 min。（3）10%正常山羊血清封闭，室温 10 min，倾去血清，加入 1:250 抗 NHE 1 抗体，4 ℃过夜。（4）PBS 冲洗，5 min × 3 次，滴加生物素标记的二抗，37℃孵育 10 min，PBS 冲洗，5 min × 3 次，滴加辣根酶标记的链霉卵白素，37℃孵育 10 min，PBS 冲洗，5 min × 3 次，DAB 显色，自来水充分冲洗。（5）复染，透明脱水，封片。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡及细胞周期　待细胞长至对数生长期，胰酶消化，1 500 r/min 离心 5 min，再以生理盐水洗 2 次，每次 800 r/min 离心 2 min。将细胞用 70%酒精固定，置 4℃冰箱备检。测量资料的方法：增殖指数（proliferation index，PI）表示细胞的增殖活性，PI=(S+G_2M)/(G_0/G_1+S+ G_2M)。凋亡率为流式细胞仪直接测出的细胞凋亡情况。

1.2.7 透射电镜下的观察　待细胞生长至对数生长期后，低浓度胰酶常规消化细胞，1 000 r/min 离心 5 min，去上清，生理盐水洗 1 次，3%戊二醛固定后送检。

1.2.8 裸鼠体内致瘤性分析　收集基因转染后 48 h 的细胞，并进行细胞计数。离心沉淀细胞。加入无血清培养基洗 1 次，离心并沉淀细胞。用无血清培养基重悬细胞，调整细胞密度为(4~6) × 10^7 个 /ml。共接种 5 只裸鼠，裸鼠右下侧皮背下接种 0.1 ml SGC-7901 细胞悬液，右上侧皮背下接种同样数量的转染反义基因细胞悬液，左下侧皮背下接种同种数量的转染空载体细胞悬液。观察裸鼠体内成瘤情况。

2 结　果

2.1 NHE1 反义真核表达载体的构建及鉴定

详见文献[5]。

2.2 基因转染及转染正确性鉴定

每 2~3 d 换培养基，同时加 Zeocin 筛选，2 周后可见转染细胞形成克隆，对照组细胞全部死亡。采用 PCR 法扩增外源性 ZeoR 基因，Anti-7901（转染反义基因的 SGC-7901 细胞）、Zeo-7901（转染空质粒的 SGC-7901）胃癌细胞可见 1 条特异性条带，大小为 375 bp，而 SGC-7901 胃癌细胞未见特异性条带，说明反义重组质粒、空载体已成功转染至胃癌细胞内，见图 1。

2.3 Anti-7901 细胞 NHE1 蛋白表达水平的变化

Anti-7901 细胞 NHE1 蛋白表达水平较 Zeo-7901、SGC-7901 细胞明显减少，见图 2。

2.4 细胞周期及细胞凋亡检测

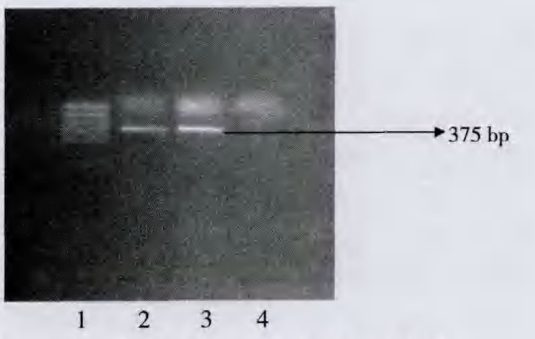
流式细胞仪检测显示，Anti-7901 细胞凋亡率显著高于 Zeo-7901 细胞和 SGC-7901 细胞。Anti-7901 细胞增殖指数为 40.43%，与 Zeo-7901 细胞和 SGC-7901 细胞无统计学差异。Anti-7901 细胞 G_0/G_1、S 和 G_2M 期与 Zeo-7901 细胞和 SGC-7901 细胞无统计学差异（见表 2）。

2.5 透射电镜结果

透射电镜下 SGC-7901、Zeo-7901 细胞核大、核仁突出，形状不规则，核膜有皱缩，细胞器不发达，线粒体、粗面内质网少见，可见大量的游离核糖体；Anti-7901 细胞线粒体丰富，形态较为成熟，并可见髓鞘样改变，可见粗面内质网、Golgi 较发达，内质网扩张，核偏向一侧，极性增强，胞浆内出现大量空泡样结构。

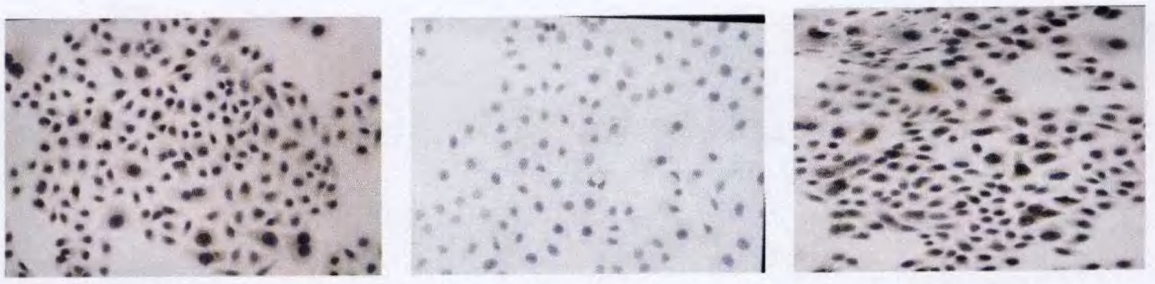
2.6 裸鼠体内致瘤性分析

在接种约（4~6）× 10^6 个细胞/只裸鼠的情况下，6 周后接种 SGC-7901 胃癌细胞的裸鼠右下侧皮下和接种同样数量的转染空载体细胞的裸鼠左下侧皮背下长出肿瘤，而接种反义细胞的裸鼠右上侧皮下未长出肿瘤。见图 3。



1. PCR marker；2. Zeo-7901；3. Anti-7901；4. SGC-7901

图 1 外源性 ZeoR 基因 PCR 扩增结果



A. SGC-7901　　B. Anti-7901　　C. Zeo-7901

图 2　NHE1 蛋白表达水平的变化(SP×100)

表 2　SGC-7901、Zeo-7901、Anti-7901 细胞的细胞周期分布、增殖指数和细胞凋亡率

细胞	G_0/G_1	S	G_2/M	PI	凋亡率
Anti-7901	59.57%	33.99%	6.44%	40.43%	26.1%*
Zeo-7901	54.52%	36.85%	8.63%	45.48%	5.12%
SGC-7901	55.13%	37.44%	7.42%	44.86%	4.48%

*：$P<0.01$ 与 Zeo-7901 组，SGC-7901 组相比



图 3　裸鼠右下侧皮下长出肿瘤

3　讨　论

糖酵解增强且占优势并产生大量乳酸和过多氢离子的肿瘤细胞主要通过其表达增强的胞膜 Na^+-H^+ 交换蛋白 -1 将细胞内过多的氢离子泵出细胞外，以保持其细胞内 pH 值的稳定，并形成细胞外呈酸性、细胞内呈中性或偏碱性的特殊微环境，以利其恶性生长[6]。NHE1 亚型为保守的看家基因，在所有正常细胞中均有低表达，以 1 比 1 进行 Na^+-H^+ 交换，防止胞内酸化，以维持细胞的基本功能。NHE1 基因的超表达对癌细胞的 pHi 调节发挥重要作用，癌细胞通过增加胞膜上 NHE1 的数量分布，从而加强 Na^+-H^+ 交换，是其 pHi 调节的主要分子机制和特点，对维持其 pHi 稳定及恶性生长具有重要的生物学意义。

我们研究了转染反义 NHE1 基因后 SGC-7901 胃癌细胞 NHE1 蛋白明显下调，细胞增殖明显受抑，凋亡率明显增加，电镜下细胞线粒体丰富，形态较为成熟，并可见髓鞘样改变，可见粗面内质网、Golgi 较发达，内质网扩张，核偏向一侧，极性增强。胞浆中出现分泌泡样结构及胞质内微囊，可能与细胞的分泌功能有关。裸鼠体内致瘤性消失。据此我们可以推测，NHE-1 基因在胃癌中表达增加，使细胞形成内碱外酸的微环境，可能是胃癌细胞增殖、逃避凋亡的主要机制之一，表明 NHE1 蛋白在胃癌细胞生长中起重要作用。

参　考　文　献

[1] Sardet C, counillon L, Franchi A, et al. Growth factors induce the phosphorylation of the Na^+/H^+ antiporter a glycoprotein [J]. Science, 1990, 247(4993): 723-726

[2] Putney L K, Denker S P, Barber D L, et al. The changing face of the Na^+/H^+exchanger, NHE1: Structure, relation, and cellular actions[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002, 42: 527-552.

[3] Stephan J, Antonia B, Sandra C, et al. Na^+/H^+ exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes[J]. FASEB J, 2000, 14: 2185-2197.

[4] Muller T, Wijmenga C, Phillips A D, et al. Congenital sodium diarrhea is an autosomal recessive disorder of sodium/proton exchange but unrelated to known candidate genes [J]. Gastroenterol, 2000, 119(6): 1506-1513.

[5] 滕小春，刘海峰，陈　刚，等. 人 NHE-1 基因反义真核表达载体的构建及初步鉴定[J]. 第三军医大学学报，2004，26(2)：112-114.

[6] 滕小春，刘海峰. Na^+-H^+ 交换蛋白与肿瘤[J]. 重庆医学，2004，26(4)：623-625.

(责任编辑：冉明会)