DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.031

论著

文章编号:1000-5404(2002)10-1196-03

nm23-H1基因转染对人胆管癌细胞系QBC_{939}体外浸润能力的影响

李大江[1],王曙光[1],陈长宏[1],张开泰[2],谢 玲[2] ([1]第三军医大学附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院,重庆 400038;[2]军事医学科学院二所,北京 100850)

提 要:目的 探讨nm23-H1基因转染对人胆管癌细胞系QBC_{939}体外浸润能力的影响。方法 将含有全长nm23-H1 cDNA的真核表达载体通过脂质体法转染人胆管癌细胞系。结果 转染成功的QBC_{939}细胞,其nm23-H1基因的mRNA、蛋白表达明显增加,转染nm23-H1基因的胆管癌细胞体外浸润能力下降,穿越matrigel的细胞数明显低于亲本QBC_{939}细胞,代表浸润能力的Ⅳ型胶原酶(MMP-9)分泌量下降。结论 nm23-H1基因可以抑制胆管癌细胞的体外浸润能力。

关键词:胆管癌;nm23-H1基因;肿瘤浸润;转染
中图法分类号:R394.2;R73-37;R735.8 文献标识码:A

Effects of nm23-H1 gene transfection on *in vitro* invasion potential of human cholangiocarcinoma cell line QBC_{939}

LI Da-jiang, WANG Shu-guang, CHEN Chang-hong, ZHANG Kai-tai, XIE Ling (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the role of nm23-H1 gene overexpression in invasion potential of human cholangiocarcinoma cell line for its potential application in gene therapy for cancer. Methods A mammalian expression vector containing nm23-H1 cDNA was transfected into human cholangiocarcinoma cell line QBC_{939}. Northern blotting and immunohistochemistry were used to analyze the expression levels of nm23-H1 and MMP-9, and *in vitro* invasion potentials the tumor cells before and after the gene transfection. Results After transfection, the nm23-H1 mRNA and protein expression was up-regulated significantly. The ability of *in vitro* invasion through matrigel was remarkably decreased. Immunohistochemical staining showed the expression of MMP-9 were decreased after transfection. Conclusion Up-regulation of nm23-H1 in cholangiocarcinoma cell line suppresses its ability of *in vitro* invasion and reduces the expression of MMP-9 in it.

Key words: cholangiocarcinoma; nm23-H1 gene; neoplasm invasion; transfection

国内外研究已表明,nm23-H1与恶性肿瘤生物学表型,特别是与肿瘤转移密切相关。本实验利用含有全长nm23-H1 cDNA的真核表达载体,用脂质体法转染人胆管癌细胞系QBC_{939},Northern Blot检测转染后QBC_{939}细胞nm23-H1基因mRNA的变化,免疫组化法检测蛋白表达水平的变化;并观察转染后QBC_{939}细胞体外侵袭能力的变化及Ⅳ型胶原酶(MMP-9)分泌量变化等。旨在探讨nm23-H1基因对胆管癌细胞体外浸润的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

pCMV-Neo-Bam-nm23-H1是巨细胞病毒(CMV)启动子调控下的真核表达载体,内含全长的nm23-H1 cDNA[1],由美国Michael Mair教授(Women's Cancers Section, Laboratory of Pathology, National Cancer Institute, NIH)惠赠。质粒pCI-neo购自美国Promega公司。NIH3T3细胞系、大肠杆菌DH5α由军事医学科学院二所保存。Transwell小室(Corning)。

1.2 质粒扩增、小批量提取质粒,酶切鉴定

按文献[2]介绍的方法进行。

1.3 细胞培养

人胆管癌QBC_{939}细胞系由本实验室建立[3],用含10%热灭活新鲜小牛血清的RPMI1640培养液于37 ℃,5%CO_2条件下培养。

1.4 质粒的转染及筛选

采用美国LipofectAMINE™(GIBCO BRL),按说明书进行基因转染,转染后用G418(500 μg/ml)进行筛选,G418(200 μg/ml)维持筛选。nm23-H1基因、空载体转染QBC_{939}细胞分别命名为QBC_{939}-nm23和QBC_{939}-C,亲本细胞QBC_{939}作为未转染对照。

1.5 Northern blot杂交

采用DNA快速纯化回收试剂盒进行质粒酶切片段的回收及纯化,用Prime-a-Gene® Labeling System(Promega),随机引物延伸法合成放射性标记探针,用GAPDH作内参照探针再次杂交。

1.6 贴壁细胞免疫组化染色检测nm23-H1及MMP-9

丙酮固定细胞,一抗nm23-H1(1∶50),MMP-9(工作液),操作按说明书进行,DAB显色,应用Mias图像分析系统,选定胞浆的阳性颗粒,测量阳性面积百分比。取8个视场的均数。

1.7 Transwell小室检测体外侵袭能力[5]

Transwell小室的下室加入2 ml趋化因子,上室的聚碳酸脂膜(孔径8 μm,直径24 mm)铺上200 μl无血清培养液1∶1稀释

基金项目:全军"九五"医药卫生科研基金(96Q067);重庆市科委应用基础研究项目资助(1997)
作者简介:李大江(1972-),男,湖南省邵阳市人,硕士,主治医师,主要从事肿瘤浸润及转移方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68754000-73078
收稿日期:2001-11-21;修回日期:2002-01-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的 matrigel 胶，干燥后，往上室分别加入 2 ml 已经消化的细胞数为 2×10^5 的 QBC_{939}-nm23 和 QBC_{939}-C 细胞细胞悬液，培养 12 h 后，快速擦掉聚碳酸脂膜上的 matrigel 胶，用倒置显微镜（×100）计数 6 个视野的穿过孔径的细胞数，取均数。每组细胞设 3 个平行样本。

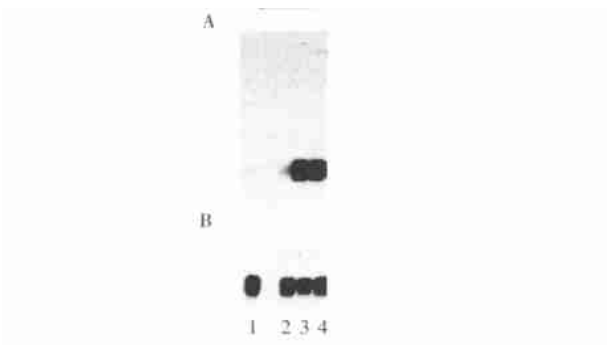
1.8　统计学处理

采用 SPSS 8.0 Windows 版统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　pCMV-Neo-Bam-nm23-H1 质粒的扩增及酶切鉴定

酶切片段位于 DNA Marker 1 000 bp 附近。证实插入的片段为 nm23-H1 cDNA，见图 1。



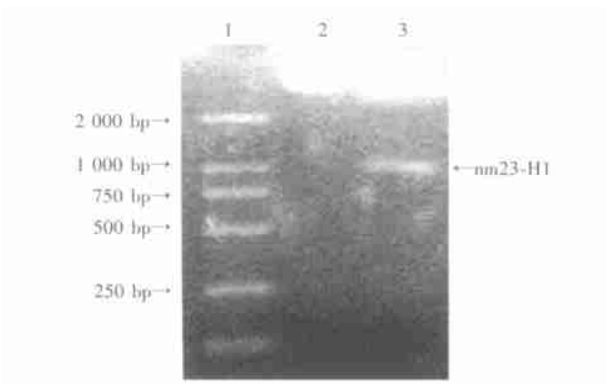
A：nm23-H1；B：GAPDH；1：QBC_{939}；2：QBC_{939}-C；3，4：QBC_{939}-nm23

图 1　Northern Blot 分析

Fig 1　Northern blot analysis

2.2　Northern Blot 杂交

可见转染成功的 QBC_{939}-nm23 细胞，其 nm23-H1 mRNA 的表达明显高于亲本 QBC_{939} 细胞及空载体转染组 QBC_{939}-C 细胞，见图 2。



1：DL-2000 marker；2：Plasmid CMV-Neo-Bam-nm23-H1；3：Plasmid pCMV-Neo-Bam-nm23-H1＋*BamH*Ⅰ

图 2　质粒 ***BamH*Ⅰ** 酶切图

Fig 2　Electrophoresis of the plasmid after *BamH*Ⅰ digestion

2.3　免疫组织化学检测转染前后细胞中 nm23-H1 蛋白表达变化

转染成功的 QBC_{939}-nm23 细胞，其 nm23-H1 蛋白的阳性面积百分比为 4.32±0.39，明显高于未转染组 QBC_{939} 细胞 nm23-H1 蛋白的阳性面积百分比，1.36±0.11，相差有显著性意义（$P<0.05$）。

2.4　QBC_{939} 细胞转染前后 MMP-9 免疫组织化学染色

QBC_{939}-nm23 细胞中 MMP-9 蛋白阳性面积百分比为 1.57±0.09，明显低于 QBC_{939} 细胞中 MMP-9 蛋白阳性面积百分比，4.09±0.33，相差有显著性意义（$P<0.05$）。

2.5　QBC_{939} 细胞转染前后体外侵袭实验

QBC_{939}-nm23 细胞穿越 matrigel 的细胞数为 44±15，明显低于亲本 QBC_{939} 细胞，173±26。差异非常显著（$P<0.01$），见图 3，4。

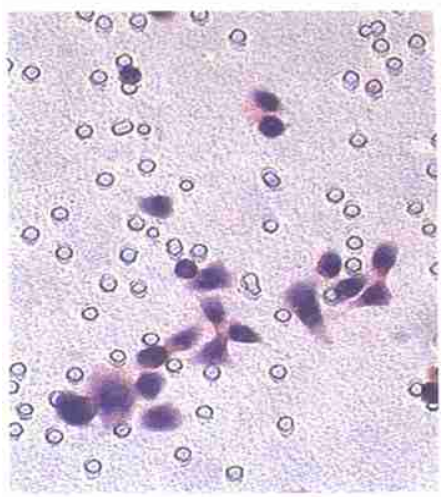


图 3　QBC_{939} 细胞穿越 matrigel 的细胞数　（HE× 200）

Fig 3　QBC_{939} cells invading matrigel　（HE× 200）

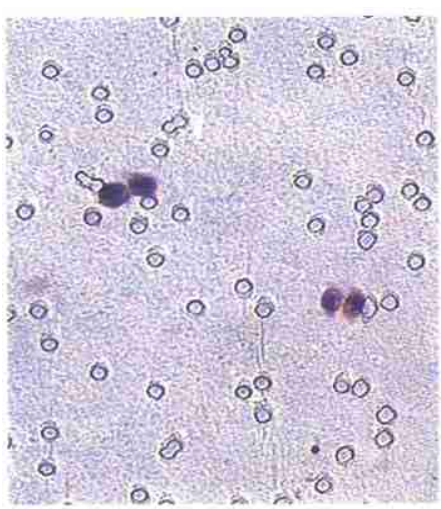


图 4　转染后的 QBC_{939}-nm23 细胞穿越 matrigel 的细胞数显著减少　（HE×200）

Fig 4　Numbers of QBC_{939} cells invading matrigel markedly decreased　（HE×200）

3　讨论

nm23-H1 基因是近几年来研究最为活跃的肿瘤抑制基因之一，研究表明，nm23-H1 基因的蛋白产物二

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

磷酸核苷酸激酶(Nucleoside diphosphate kinases, NDPK)可能以组氨酸依赖性磷酸转移酶活性和丝氨酸自磷酸化为基础,参与调控细胞间信号传递系统,通过磷酸的转移,为G蛋白提供GTP而使其活化,并调控初始化因子eIF和eIF-4E,nm23/NDPK水平的提高,可降低eIF-4E的表达水平,从而抑制肿瘤细胞的浸润和实验性转移;nm23/NDPK增高与Ⅳ型胶原酶和CD44v6下降间有明显关系,从而参与限制肿瘤的转移[6~12]。它还可以通过影响微管的装配和微管相关蛋白功能而对细胞的分化及增殖起作用。

本实验采用实验性直接干预,向人胆管癌细胞系QBC_{939}转染含有全长nm23-H1 cDNA的真核表达载体,改变胆管癌细胞nm23-H1基因表达。结果表明,转染成功的QBC_{939}细胞,其nm23-H1基因的mRNA、蛋白表达明显增加,体外浸润能力下降,穿越matrigel的细胞数明显低于亲本QBC_{939}细胞,代表浸润能力的Ⅳ型胶原酶(MMP-9)分泌量下降。我们推测,nm23-H1基因参与调控Ⅳ型胶原酶及粘附分子的合成,从而影响细胞的浸润和转移。

本研究证实了nm23-H1基因参与胆管癌的浸润和转移过程,进一步深入研究nm23-H1基因的作用机制,将有助于揭示肿瘤细胞浸润和转移的普遍规律,并根据其机制发展有效的抗浸润和转移的手段和方法,特别是能够应用于临床的抗转移基因治疗,限制或阻断癌细胞的浸润和转移能力,以减少术后复发机会,为肿瘤的治疗开辟新的途径。

参考文献:

[1] MacDonald N J, Freije J M P, Stracke M L, *et al*. Site-directed mutagenesis of nm23-H1. Mutation of proline 96 or serine 120 abrogates its motility inhibitory activity upon transfection into human breast carcinoma cells[J]. J Biol Chem, 1996, 271(41): 25 107-25 116.

[2] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京: 科学技术出版社, 1998. 16-372

[3] 王曙光, 韩本立, 陈意生, 等. 肝外胆管癌细胞系的建立[J]. 中华实验外科, 1997, 14(2): 67-68.

[4] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 北京: 世界图书出版公司, 1996 5-304

[5] Albini A, Iwamoto Y, Kleinman H K, *et al*. A rapid *in vitro* assay for quantiating the invasion potential of tumor cells[J]. Cancer Res, 1987, 47(12): 3 239-3 245.

[6] Freije J M, Blay P, MacDonld N J, *et al*. Site-directed mutation of nm23-H1 mutation lacking motility suppressive capacity upon transfection are deficient in histidine-dependent protein phosphotransferase pathways *in vitro*[J]. J Biol Chem, 1997, 272(9): 5 525-5 532

[7] MacDonld N J, De-la-Rosa A, Benedict M A, *et al*. A serine phosphorylation of nm23, and not its nucleoside diphosphate kinase activity, correlates with suppression of tumor metastatic potential[J]. J Biol Chem, 1993, 268(34): 25 780-25 789.

[8] Howlett A R, Petersen O W, Steeg P S. *et al*. A novel function for the nm23-H1 gene: overexpression in human breast carcinoma cells leads to the formation of basement membrane and growth arrest [see comments][J]. J Natl Cancer Inst, 1994, 86(24): 1 838-1 844

[9] Lombardi D, Sacchi A D, Agostino G, *et al*. The association of nm23-H1 protein and beta-tubulin correlates with cell differentiation[J]. Exp Cell Res, 1995, 217(2): 267-271.

[10] Graff J R, Boghaert E R, De Benedetti A, *et al*. Reduction of translation initiation factor 4E decreases the malignancy of ras-transformed cloned rat embryo fibroblasts[J]. Int J Cancer, 1995, 60(2): 255-263.

[11] Lombardi D, Lacombe M L, Paggi M G, *et al*. nm23: unraveling its biological function in cell differentiation[J]. J Cell Physiol, 2000, 182(2): 144-149.

[12] Liu F, Qi H L, Chen H L. Effects of all-trans retinoic acid and epidermal growth factor on the expression of nm23-H1 in human hepatocarcinoma cells[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2000, 126(2): 85-90.

(编辑 冯崇英)

(上接1195页)

养而坏死。16例均于全麻清醒后即制作佩戴直到拆线,皮片全部成活。护理要点是避免颈托边缘对皮肤的磨擦,观察有无呼吸压迫症状,患者在平卧时,将矫形器每日取脱3次,每次1 h以增加透气。在皮片存活后,拆除颈部敷料进行第二次塑形,此时的作用是压力治疗,低温热塑板材塑形后材料变硬、无弹性,使用时应内衬棉垫或纱布,防止其直接与皮肤磨擦,造成皮肤溃烂,尤其对矫形器边缘应尽量打磨光滑,使用期间随时观察有无发红、疼痛等症状。对出院患者应每月随访1次,检查矫形器的形态及使用效果,坚持佩戴半年以上。

钢丝制作的颈托在皮片完全存活,伤口拆线后进行佩戴,即使有未愈创面或进行了补充植皮,也可以盖上薄层敷料进行使用。为保护刚愈合的创面,也可在钢丝支撑部位内衬纱布或棉垫,1周后可直接使用。注意调节固定搭扣松紧,以不感到明显压迫症状为度,如果太松,不利于颌颈角成形,且易发生皮片挛缩。除每日3餐时取下休息外,均应坚持使用,定期随访,直至半年。

4 小结

以往临床上所用颈托大多为已成形的泡沫或塑料颈托,虽分为大、中、小型号,但在使用时却远不能满足不同患者的需要,经常出现功能不到位或过度支撑;少数根据患者尺寸用石膏绷带制作的颈托又重又硬,透气性差且容易形成棱角磨压皮片,造成皮肤破溃,临床上已很少应用。我们选择的两种材料可根据其特点及患者情况的不同进行量体裁衣,均能达到3个目的[1],即使颈部保持伸展位置,保持颈前曲线特别是颌颈角的形态,对所植皮片施加均匀的一定程度的压力保证皮片平滑柔软,表面不起皱褶。另外,厚中厚皮片移植后的挛缩状态为一个渐进的过程,一般始于植皮后两周,3个月为高峰,6~12个月基本稳定。因此,选择皮片成活后即开始佩戴颈托,直至半年,坚持昼夜均用并指导患者使用矫形器期间产生皮肤变红、疼痛等症状时的临时处置方法[2],定期对矫形器进行检查及使用效果的追踪也是一个不可忽视的重要环节。

关键词:颈部瘢痕;矫形器;临床护理
中图法分类号:R473.3 文献标识码:B

参考文献

[1] 汪良能, 高学书. 整形外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 758.

[2] 加仓井周一. 矫形器学[M]. 北京:华夏出版社, 1997.5-9.

(编辑 冷怀明)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net