

nm23-H1 基因抑制口腔癌细胞的侵袭转移行为机制的实验研究

陈绍维, 黄洪章

(中山大学附属第二医院口腔颌面外科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】将 nm23-H1 导入口腔癌 BcaCD885 细胞株, 观察 nm23-H1 对 BcaCD885 细胞株侵袭转移能力的影响, 并对相关机制进行分析。【方法】制备高纯度的 nm23-H1 真核表达质粒, 并用阳离子脂质体介导的转染技术, 完成转染方法的建立。检测转染前后的 NDPKA 的表达并观察转染前后细胞的侵袭转移行为能力的变化。【结果】将 nm23-H1 转染口腔癌细胞, 获得了稳定表达, 发现 BcaCD885 细胞株 nm23-H1 基因的转染前后表达水平有明显差异, 实验组和对照组的侵袭细胞相对数目分别为 $41.1\% \pm 1.2\%$ 和 $64.5\% \pm 6.3\%$, 趋化运动细胞相对数目为 $50.0\% \pm 6.3\%$ 和 $81.0\% \pm 3.9\%$, 实验组的粘附能力也显著降低。【结论】nm23-H1 对 BcaCD885 细胞的侵袭转移能力具有显著抑制作用。

关键词: 基因, nm23-h1; 口腔肿瘤; BcaCD885 细胞株; 肿瘤转移; 基因表达

中图分类号: R739.8

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2003)04-0329-04

Study on the Mechanism of nm23-H1 on Suppressing the Invasion and Metastatic Behavior of Oral Cancer Cell

CHEN Shao-wei, HUANG Hong-zhang

(Department of Oral Maxillofacial Surgery, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To transfect nm23-H1 gene into the BcaCD885 cell lines, and observe whether nm23-H1 can affect the invasion and metastatic behavior of BcaCD885 cell lines. 【Methods】nm23-H1 gene was transfected into BcaCD885 cell lines using lipofect technique. The difference in expression of nm23-H1 between transfected and non-transfected cell lines was detected by immunohistochemistry. The difference of invasion and metastatic behavior was detected by transwell-room and wash way methods. 【Results】Stable expression of nm23-H1 was achieved by using PCMV-NEO-BAM system. Significant difference in NDPKA expression between transfected and non-transfected of BcaCD885 cell lines was founded; The cell control number of transfected and non-transfected cells which showed the ability of invasion was $41.1\% \pm 1.2\%$ and $64.5\% \pm 6.3\%$ respectively, while the chemical-trend moving ability was $50.0\% \pm 6.3\%$ and $81.0\% \pm 3.9\%$. The adhesion ability of transfected BcaCD885 cell lines decreased significantly. 【Conclusion】nm23-H1 can significant inhibit the metastases of BcaCD885 cell lines.

Key words: gene, nm23-H1; oral neoplasms; BcaCD885 cell lines; neoplasms metastases; gene expression

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(4): 329 ~ 332]

P. S. Steeg 于 1988 年应用差异杂交法首次克隆出 nm23-H1 基因, 随后的研究发现 nm23-H1 基因参与了肿瘤细胞的增殖、分化和转移等过程, 对

部分肿瘤具有一定的转移抑制功能, 目前已成为肿瘤基因治疗的主要研究方向之一^[1]。但是可能由于肿瘤类型差异等因素的影响, 在对子宫颈癌、喉癌、

收稿日期: 2003-01-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870746); 福建省自然科学基金重点项目(C0220002)

作者简介: 陈绍维(1973-), 男, 湖北荆州人, 博士, 讲师。

肺部腺癌等的研究中,有学者发现 nm23-H1 的表达水平与转移未表现出明确的相关性^[2]。本研究的目的在于利用基因转染技术,通过体外实验,研究 nm23-H1 基因对口腔癌细胞株 BcaCD885 转移能力的影响,评价 nm23-H1 对口腔癌的治疗价值,以期为口腔癌的基因治疗提供一定的参考依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和设备

nm23-H1 真核表达质粒,由美国国立卫生研究院 Patricia S. Steeg 教授提供; BcaCD885 细胞株来源于人类黏膜鳞癌,由卫生部口腔生物医学重点实验室提供; LipofectAMINE, 购自 GIBCO BRL; G418, 购自 Gene 公司; nm23-H1 鼠抗人单克隆抗体, 购自中山生物技术有限公司; 纤粘连蛋白购自 Promega 公司; Matrigel 和 transwell 小室均购自 Costar 公司; 荧光相差显微镜为 OLYMPUS 产品。

1.2 实验方法

1.2.1 nm23-H1 质粒的转化和鉴定 以 JM109 为宿主菌,对 nm23-H1 真核表达质粒进行转化。质粒抽提后采用限制性内切酶 *Bam*H1 酶切鉴定。

1.2.2 细胞培养 RPMI1640 培养基, 37 °C CO₂ 培养箱中培养 BcaCD885 细胞株。

1.2.3 nm23-H1 对细胞株的转染 以转染 nm23-H1 的 BcaCD885 细胞株为实验组,以空白脂质体转染的 BcaCD885 细胞作为对照组。用阳离子脂质体完成 nm23-H1 对细胞株的转染,转染细胞生长接近融合时按 1:4 密度传代,继续培养至细胞密度达 50% -70% 融合。

1.2.4 细胞的筛选 弃去培养液,更换浓度为 800 mg/L 的 G418 培养液进行筛选,换液后浓度降至 250 mg/L,维持筛选作用。

1.2.5 免疫组化染色 将用 G418 筛选 5 周左右的 BcaCD885 细胞分别接种于无菌玻片上,细胞爬片后,SP 法洗涤固定,滴加 nm23-H1 鼠抗人单抗,孵育,PBS 洗涤,依次分别滴加二抗、三抗,DAB 显色,苏木素复染。

1.2.6 细胞侵袭实验 细胞侵袭重建基底膜实验在 transwell 小室中进行。transwell 小室分为上下两层,中间以聚碳酸酯膜(8 μm 孔径)隔开,滤膜上下铺以 Matrigel,实验组和对照组的 BcaCD885 细胞用 EDTA/PBS 消化,约 2.5×10^5 细胞加入 transwell 小室中,细胞在上层培养,通过随机在上下层

的 Matrigel 中选择 5 个 400 倍显微视野,统计细胞数目,重复实验 10 次,以侵袭至下表面层细胞的相对数目均值来表示肿瘤细胞的侵袭能力。

1.2.7 细胞黏附实验 制备浓度为 5×10^9 /L 的实验组和对照组的 BcaCD885 细胞悬液,Hank's 液轻洗 2 遍收集未黏附细胞计数。按公式计算黏附率:黏附率 = 黏附细胞数/总细胞数 × 100%。

1.2.8 细胞趋化运动实验 该实验步骤与 2.6 的差异在于在滤膜上下表面分别铺以 5 μg 纤粘连蛋白,其余相同。统计随机选择 5 个 400 倍显微视野中细胞数目,重复实验 10 次,以趋化运动至下表面层细胞的相对数目均值来表示肿瘤细胞的趋化运动能力。

2 结果

2.1 质粒转化及酶切鉴定的结果

活化后的含有重组质粒的 JM109 在有 AMP 的琼脂平板上生长良好。用碱裂解法提取和聚乙酸沉淀法纯化的质粒 DNA 的 A_{260}/A_{280} 在 1.80 ~ 1.85 之间。限制性内切酶 *Bam*H1 酶切鉴定结果如图,结果证实质粒在 JM109 中的转化产物与酶切图谱相符,nm23-H1 片段长度为 952 bp,质粒片段长度为 6550 bp,nm23-H1 的 cDNA 被插入在真核表达载体 pCMV-Neo-Bam 中的 *Bam*H1 区域。

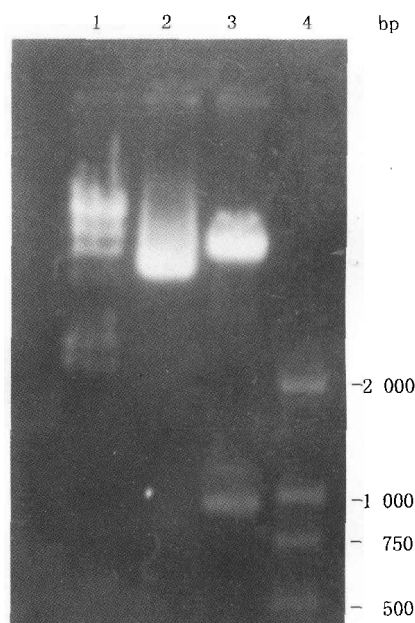


图1 nm23-H1 质粒酶切图谱

Fig. 1 The plasmid of nm23-H1 digested by enzyme *Bam*H1
1. Lambda DNA; 2. *Hind* III Marker; 3. nm23-H1;
4. DL2000

2.2 质粒转染 BcaCD885 细胞及阳性克隆的筛选

转染后 24 h, 在 G418 筛选培养基中生长的细胞出现短暂抑制, 实验组和对照组的细胞数量均减少。2 周后实验组出现阳性克隆, 3 周后细胞开始集落生长, 5 周后细胞长满, 而 5 周后对照组未见细胞生长。

2.3 免疫组化观察

实验组: 出现较多的深棕黄色的团块分布的蛋白质, 核膜周围可见较为密集分布的颗粒状物质, 细胞核稍大, 核膜深染, 核仁染色亦较深, 细胞形态稍膨大变圆 (图 2)。对照组: 未见颗粒状或团块分布的深棕黄色蛋白物, 细胞形态及大小未见变化 (图 3)。

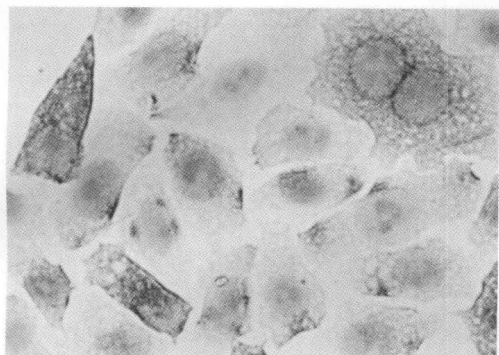


图 2 BcaCD885/nm23-h1 免疫组化染色

Fig. 2 The immunohistochemistry of nm23-h1 transfected cell lines ($\times 40$)



图 3 BcaCD885 免疫组化染色

Fig. 3 The immunohistochemistry of nm23-h1 untransfected cell lines ($\times 40$)

2.4 转染后的细胞侵袭能力的变化

重建后的 Matrigel 能在聚碳酸滤膜表面形成类似天然基底膜的结构, 细胞侵袭穿过重建 Matrigel 的能力反映出该细胞的侵袭能力。对照组侵袭细胞的相对数目为 $64.5\% \pm 6.3\%$, 实验组侵袭细胞的相对数目为 $41.1\% \pm 1.2\%$, 实验组侵袭至滤膜下表面的细胞数低于对照组 ($P < 0.01$, χ^2 检

验), 表明通过转染 nm23-H1 明显降低了细胞的侵袭能力。

2.5 细胞黏附能力的变化

通过不同时间的黏附率 (图 4) 来判断黏附能力, 可见转染后 60 min 肿瘤细胞的黏附能力明显下降 ($P < 0.01$, t 检验)。

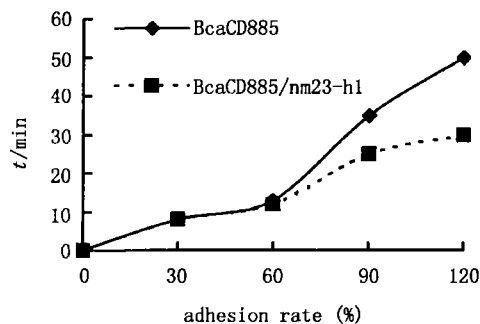


图 4 BcaCD885 黏附能力比较

Fig. 4 The ability of adhesion of transfected and untransfected BcaCD885 cells

2.6 细胞趋化能力的变化

侵袭至滤膜下表面的细胞相对数目为: 对照组为 $81.0\% \pm 3.9\%$, 实验组为 $50.0\% \pm 6.3\%$, 转染后的细胞趋化运动能力明显下降 ($P < 0.01$, χ^2 检验)。

3 讨论

3.1 pCMV-Neo-Bam-nm23-H1 真核表达载体系统转染的优点

本研究采用的真核表达载体 pCMV-Neo-Bam, 具有两个独立的转录单位, 第一个转录单位包含了巨细胞病毒 (cytomegalovirus, CMV) 启动子和增强子, 能够驱动插入 BamH1 位置的的目的基因的表达, 多腺苷酸和连接区域来源于兔的 β 珠蛋白基因, 保证了在细胞中的转录过程。第二个转录单位包括了单纯疱疹病毒腺苷酸 (herpes simplex virus, HSV) 启动子和增强子, 单独控制新霉素耐药基因而产生了对 G418 的耐药性, 以供转染后筛选。源于 PBR322 的复制和 β -乳糖激酶基因加速了质粒在 JM109 中的转化。这一表达系统具有易于转化, 转染效率高, 筛选准确性高等优点。

nm23-H1 的 cDNA 被插入 pCMV-Neo-Bam 中的 BamH1 区域, 形成了 nm23-H1 的真核表达质粒。实验中发现, 当脂质体-质粒复合体导入的第一个 24 h, 实验组和对照组均出现短暂生长抑制后

逐渐缓解,两组间无明显差异,这种变化可能与脂质体导入后的短暂抑制作用^[5]以及培养液中小牛血清浓度变化,培养液的更换有关。24 h 后,由于 G418 的筛选作用,对照组和实验组的增殖活性均明显下降,细胞数目均明显减少。2 周后实验组细胞开始逐渐出现克隆,3 周后集落生长,而对照组无此变化,说明阳性克隆株已初步出现。5 周后,实验组细胞生长活跃,而对照组已无明显细胞生长。

免疫组化的结果表明,转染后的细胞胞浆内,胞内网状结构中出现特异性的棕色颗粒,胞突、核膜周也可见深染区颗粒状的分布呈散在型,团块状分布呈密集型,线形分布具有连续性。我们还发现转染后的细胞胞体和细胞核增大,轻度肿胀,核浆比例有所增大。这说明 nm23-H1 的真核表达质粒已成功转染了肿瘤细胞并获得较强表达。

3.2 nm23-H1 基因抑制 BcaCD885 细胞的转移行为的机制

实验结果表明,nm23-H1 对口腔癌细胞株的侵袭、黏附、趋化运动能力均有明显抑制作用。肿瘤细胞对人工基膜的侵袭是目前检测肿瘤细胞侵袭能力的有效方法。细胞要穿透人工基膜和直径只有 8 μm 的聚碳酸酯微孔滤膜,需要降解 Matrigel 成分和细胞的高度变形。

本研究发现,当 BcaCD885 细胞转染后,其侵袭能力明显下降,一方面可能与其运动能力的下降有关,另一方面,可能其降解细胞外基质能力也有明显降低。在侵袭早期发生的肿瘤细胞与细胞外基质的相互作用可分为黏附和铺展两个过程,前者指细胞表面分子与细胞外基质蛋白的被动结合作用,而后者则包括细胞在细胞外基质表面伸展和由此引起的细胞内信号转导^[3]。实验的结果已证明转染后细胞的亲合力下降,而趋化运动能力的降低则影响了铺展过程,从而改变了细胞的信号传导过程。

其他研究也证实^[4,5],nm23-H1 的过表达会引起细胞在分化过程中形态和生化合成的一些变化,nm23-H1 的运动抑制的关键在于 k-pn 基团和丝氨

酸 120(在人的 nm23 中为 P96),而不是以前认为的丝氨酸 44。这两个基团使 nm23-H1 通过减弱对 K^+ 通道拮抗剂 (I_{KACH}) 的敏感性来完成对 K^+ 通道的调节,以达到对细胞运动的抑制作用。

Kantor 等^[6]将 nm23-H1 转染到 MDA-MB-435 和鼠 K-1735 细胞株后,这两株细胞均失去了对各种化学诱导剂刺激反应而引起的细胞运动,因此,nm23-H1 的对外来刺激引起的细胞运动的抑制作用,可能是在在其下游控制细胞运动的信号传导途径上,由于非 NDPK 磷酸化的影响所致的微丝微管聚合及其稳定性改变的结果。这与实验的结果是相一致的。

参考文献:

- [1] Kauffman E C, Robinson V L, Stadler W M, *et al.* Metastasis suppression: the evolving role of metastasis suppressor genes for regulating cancer cell growth at the secondary site[J]. *J Urol*, 2003, 169(3): 1122.
- [2] Postel E H, Berberich S J, Rooney J W, *et al.* Human NM23/nucleoside diphosphate kinase regulates gene expression through DNA binding to nuclease-hypersensitive transcriptional elements[J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2000, 32(3): 277.
- [3] Parhar R S, Shi Y, Zou M, *et al.* Effects of cytokine mediated modulation of nm23 expression on the invasion and metastatic behavior of B16F10 melanoma cells [J]. *Int J Cancer*, 1995, 60(2): 204.
- [4] Cipollini G, Moretti A, Ghimenti C, *et al.* Mutational analysis of the NM23-H1 gene in human breast cancer [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2000, 121(2): 181.
- [5] Lin K H, Shieh H Y, Hsu H C. Negative regulation of the antimetastatic gene Nm23-H1 by thyroid hormone receptors [J]. *Endocrinology*, 2000, 141(7): 2540.
- [6] Kantor J D, McCormick B, Steeg P S, *et al.* Inhibition of cell motility after nm23 transfection of human and murine tumor cells [J]. *Cancer Res*, 1993; 53(8): 1971.

(编辑 刘清海)