

IGF- II 对宫颈癌细胞中 KCC1 基因表达的影响

吴晓娟, 张淑兰

(中国医科大学附属盛京医院妇产科, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的:探讨胰岛素样生长因子 2(IGF- II)对宫颈癌 SiHa 细胞中 K-Cl 协同转运子 1(KCC1)表达的影响。方法:应用半定量 RT-PCR 及 Western-blot 法检测宫颈癌 SiHa 细胞经不同时间不同浓度 IGF- II 作用后,其 KCC1 mRNA 及蛋白表达的变化。结果:经 IGF- II 作用后的 SiHa 细胞,其 KCC1 mRNA 及蛋白表达明显增加,并且这种变化呈一定的时间剂量依赖关系。结论:IGF- II 作用下 KCC1 表达的增加可能在宫颈癌的发生发展中发挥重要作用。

[关键词] 胰岛素样生长因子;钾氯协同转运子;宫颈癌

[中图分类号] R735.7 [文献标识码] A [文章编号] 0258-4646(2007)06-0715-03

Influence of IGF- II on the expression of KCC1 in cervical cancer cells

WU Xiao-juan, ZHANG Shu-lan

(Department of Obstetrics and Gynecology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China)

[Abstract] Objective: To discuss the influence of insulin-like growth factors-2(IGF- II) on the expression of K, Cl cotransport-1(KCC1) of cervical cancer SiHa cells. Methods: Using semi-quantitative RT-PCR and Western-blot, the changes of KCC1 mRNA and protein expression of SiHa cells were detected after treated with IGF- II at different time and concentrations. Results: After treated with IGF- II, the expression of KCC1 mRNA and protein in SiHa cells increased obviously, showing a time-dose dependent relationship. Conclusion: The increased expression of KCC1 by IGF- II may play an important role in the development of cervical cancer.

[Key words] insulin-like growth factors; K-Cl cotransport; cervical cancer

胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF)家族(IGFs)通过调节细胞增殖,分化与抑制凋亡,从而在恶性肿瘤的发生、发展中发挥重要作用,胰岛素样生长因子 2(IGF- II)是该家族中的一员,通过激活胰岛素样生长因子 I 受体(IGF- I R)发挥其促肿瘤活性。钾氯共同转运子(K-Cl cotransport, KCC)是细胞表面膜蛋白,能够介导 K, Cl 离子在胞膜水平的成对移动,它们的活化在细胞体积调节,上皮运输及离子稳态中发挥着重要的作用。本研究采用 RT-PCR 及 Western-blot 的方法检测人宫颈癌 SiHa 细胞接受 IGF- II 作用后其表面 KCC1 mRNA 及蛋白的表达情况,从而探讨 IGF- II 影响肿瘤进展过程的可能途径及其与宫颈癌发生、发展的关系。

1 材料与方 法

1.1 实验材料及来源

1.1.1 研究对象:人宫颈癌 SiHa 细胞株购自中科院上海细胞所;该细胞株来源于 55 岁亚洲女性,为宫颈低分化鳞状上皮细胞癌,病理分级(根据 FIGO 标准,2000 年)Ⅱ级。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30672220)

[作者简介] 吴晓娟(1983-),女,医师,硕士。

E-mail: xj-wu1983@hotmail.com

1.1.2 实验材料,器材及仪器:IGF- II 购自美国 RD 公司;MEM 培养基(41500-067)购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自德国 Chrome 公司;RNAiso 试剂(TaKaRa)及逆转录扩增试剂盒(TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)Ver3.0,DRR019A)购自大连宝生物工程有限公司;KCC1 mRNA 引物由大连宝生物工程有限公司合成;RT-PCR 反应仪为 GnenAmp PCR System 2400;图像分析采用 Image PC alpha 9 图像分析系统;KCC1 山羊多克隆抗体(KCC1(P-20):sc-25037),购自美国 SANTA CRUZ 生物有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养:人宫颈癌 SiHa 细胞株参照美国标准菌库(ATCC)方法培养,即含非必需氨基酸及谷氨酰胺的 MEM 培养基加 10%胎牛血清培养,2~3 d 传代一次。

以 IGF- II 作用细胞:无血清培养细胞 24 h 后,按下列方法加入 IGF- II:相同浓度不同时间:以 IGF- II 加入无血清细胞培养液 2 ml 至终浓度 50 ng/ml 分别作用细胞 1 h, 3 h, 6 h。相同时间不同浓度:以终浓度 100 ng/ml, 50 ng/ml, 10 ng/ml IGF- II 分别加入无血清细胞培养液 2 ml 作用细胞 6 h。

1.2.2 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 KCC1 mRNA 表达:Trizol TM 试剂一步法提取细胞总 RNA

，逆转录合成第一条 cDNA，以其为模板进行 PCR 反应扩增 KCC1，同时扩增管家基因 β -actin 为内参；KCC1 引物使用 Primer Designer 5.0 软件设计，各引物序列如下：KCC1,278 bp，上游：5'-TGGGAC-CATTTTCCTGACC-3'下游：5'-CATGCTTCTC CACGATGTCAC-3'； β -actin,498 bp，上游：5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3'，下游：5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'；取扩增产物电泳后利用凝胶图像分析系统扫描及测量各条带吸光度(A)值，以 KCC1 与 β -actin 的吸光度比值代表 KCC1 表达的相对强度(即强度)，并分析 IGF- II 作用后 KCC1 mRNA 表达强度的变化。

1.2.3 Western blot 测定 KCC1 蛋白表达：裂解细胞提取蛋白，常规电泳、转膜、封闭，加入一抗(山羊抗人 KCC1 多克隆抗体，稀释度 1 : 200)及相应二抗室温摇床孵育 2 h，以增强化学发光显色系统显色曝光、显影、定影。

1.2.4 图像分析：应用 Image PC alpha 9 图像分析系统对 RT-PCR 和 Western 印迹结果进行图像分析，计算条带的积分吸光度。

1.3 统计学方法

实验结果经 SPSS13.0 软件分析，所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示， $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 IGF- II 对宫颈癌细胞中 KCC1 mRNA 表达的影响

采用 RT-PCR 法半定量检测 IGF- II 对宫颈癌 SiHa 细胞 KCC1 mRNA 表达的影响发现，随着 IGF- II 作用浓度的加大及作用时间的延长，KCC1 的 mRNA 含量逐渐升高。与空白对照组相比，IGF- II 100 ng/L、50 ng/L 组的 KCC1 mRNA 含量显著升高 ($P < 0.01$)，IGF- II 10 ng/L 组 KCC1 mRNA 含量亦有升高 ($P < 0.05$)。与空白对照组相比，IGF- II 作用后 1 h 即可检测到 KCC1 mRNA 表达的增高，且随着时间的延长(3 h, 6 h)，其表达有逐渐升高趋势 ($P < 0.01$)。结果表明：IGF- II 对宫颈癌 SiHa 细胞 KCC1 mRNA 的表达具有明显的影响，且此影响具有时间剂量依赖性(表 1)。

2.2 IGF- II 对宫颈癌细胞中 KCC1 蛋白表达的影响

Western blot 检测 IGF- II 对宫颈癌 SiHa 细胞 KCC1 蛋白表达的影响与 KCC1 mRNA 表达结果相一致，随着 IGF- II 作用浓度的加大及作用时间的延

表 1 IGF- II 作用下 KCC1 mRNA 表达的变化($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 KCC1 mRNA expression of SiHa cell treated with IGF- II ($\bar{x} \pm s$)

分组(IGF- II 浓度、作用时间)	相对 A 值
10 ng/ml; 6 h	0.11 ± 0.04
50 ng/ml; 6 h	0.13 ± 0.17 ¹⁾
100 ng/ml; 6 h	0.52 ± 0.11 ²⁾
50 ng/ml; 1 h	0.34 ± 0.12 ²⁾
50 ng/ml; 3 h	0.59 ± 0.17 ²⁾
50 ng/ml; 6 h	0.69 ± 0.23 ²⁾

注：与对照组相比 1) $P < 0.05$, 2)与对照组相比 $P < 0.01$

长，KCC1 蛋白表达逐渐升高。与空白对照组相比，IGF- II 100 ng/ml, 50 ng/ml, 10 ng/ml 组的 KCC1 mRNA 含量升高 ($P < 0.05$)，IGF- II 作用后 1 h 即可检测到 KCC1 蛋白表达的增高，且随着时间的延长(3 h, 6 h)，其表达有逐渐升高趋势 ($P < 0.05$)。结果表明：IGF- II 对宫颈癌 SiHa 细胞 KCC1 蛋白的表达具有明显的影响，且此影响具有时间剂量依赖性(图 1)。

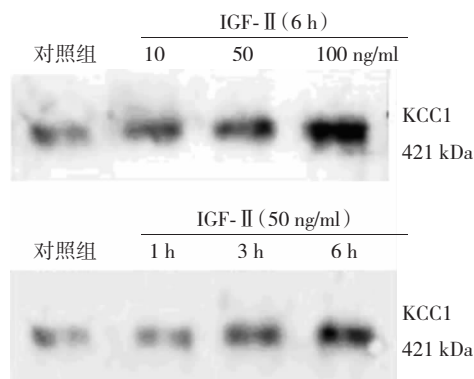


图 1 IGF- II 作用后 KCC1 蛋白表达的变化

Fig.1 KCC1 protein expression of SiHa cell treated with IGF- II

3 讨论

宫颈癌是世界范围内女性生殖系统第二大肿瘤，而人乳头瘤状病毒(human papillomavirus HPV)感染作为宫颈癌的病因已得到越来越广泛的证实^[1]。然而，在 HPV 感染的妇女中，只有少数可发展成为宫颈癌，这表明，在 HPV 感染的基础上，仍存在着大量最终导致宫颈癌发生发展的其他因素。

恶性肿瘤细胞往往比正常细胞拥有更高的新陈代谢率，有丝分裂能力及迁徙游走能力，当细胞过量生长，有丝分裂及大量游走的过程细胞体积调节的平衡状态遭到破坏时，绝大多数细胞都拥有完整的体积调节机制来对抗由渗透压改变导致的细胞肿胀休克，这种机制被称为细胞调节性体积缩小(regula-

tory volume decrease ,RVD)^[2],KCC 是 RVD 的主要通路,存在于红细胞与上皮细胞中,它将 K,Cl 离子同时泵出细胞膜外,与其他离子转运通道一起协同调节肿瘤细胞的体积大小^[3],肿瘤细胞通过磷酸激酶 PKC 介导的途径及一氧化氮/环磷酸鸟苷/磷酸激酶 G 途径促进 KCC 蛋白的表达,而胰岛素样生长因子系统是最近发现的一种与血清因素相关的调节机制^[4]。

研究发现,IGF- I 可通过自分泌和旁分泌的形式以剂量-时间依赖的方式增强 KCC mRNA 的表达以及 KCC 活性。然而最近大量研究表明,IGF- II 比 IGF- I 与宫颈癌的关系更为密切。它通过自分泌与旁分泌方式激活胰岛素样生长因子受体 I (IGFR- I)在局部发挥其促进恶性肿瘤增殖和转移的作用^[5,6]。本研究采用 RT-PCR 及 Western blot 方法测定 IGF- II 作用后宫颈癌 SiHa 细胞表面 KCC1 mRNA 及蛋白的表达情况,试图从基因转录及翻译水平揭示 IGF- II 激活细胞表面 KCC1 表达对宫颈癌发生发展的作用。结果显示:在 IGF- II 作用 1h 后,KCC1 mRNA 及蛋白表达开始升高,随着时间的延长,其表达明显增强,呈逐渐上升趋势,作用 1 h, 3 h,6 h KCC1 mRNA 表达强度(A 值)分别为 0.34±0.12,0.59±0.17,0.69±0.13,;KCC1 蛋白表达强度分别为 1.43±0.07,1.64±0.011,2.07±0.4,与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在相同作用时间(6 h)下,随着 IGF- II 作用浓度的加大,KCC1 mRNA 及蛋白表达呈现逐渐上升趋势,作用终浓度 10 ng/ml,50 ng/ml,100 ng/ml 时,KCC1 mRNA 表达强度分别为 0.11±0.04,0.13±0.17,0.52±0.11,KCC1 蛋白表达强度分别为 1.32±0.07,1.50±0.03,2.07±0.11,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。这一结果表明,IGF-II 对 KCC 在宫颈癌细胞中的表达具有增强作用,KCC 可能作为 IGF-II 的下游因子,参与 IGF-II 对宫颈癌细胞发生发展的促进作用。

大量研究显示,IGF 受体属于络氨酸激酶生长因子受体家族,而在其下游信号传导通路中,丝裂素激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路是目前研究最多也比较清楚的核内刺激转录增加的信号传导通路,其中的 Erk1/2 通路对

肿瘤细胞的分化和增殖有重要的调控作用,是受外界刺激时决定细胞命运的关键性因素,而 ERK 的激活最终促进细胞的增殖和恶性转化^[7]。有研究表明,生长因子介导的 ERK 通路的激活需要有钾离子的参与,数据显示由多种离子转运系统共同参与介导的细胞内钾离子外流是 Erk1/2/MAPK 通路不可缺少的一部分,在 MAPK 通路中起着重要的作用^[8]。因此,KCC 作为 IGF-II 的下游因子,通过调节细胞体积的平衡参与 IGF-II 对宫颈癌细胞发生发展的促进作用的同时,其介导的细胞内钾离子外流可能是其进一步促进 IGF-II 发挥作用的另一重要途径。那么,是否可以通过干预二者的相互作用阻断这一途径,从而到达治疗胰岛素依赖性的宫颈癌的增殖和侵袭的目的,尚有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] SCHOELL WM, JANICEK MF, MIRHASHEMI R. Epidemiology and biology of cervical cancer[J]. *Semin Surg Oncol*, 1999, 16(3):203-211.
- [2] F LANG, M FOLLER, K S LANG, et al. Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death[J]. *J Membr Biol*, 2005(3): 147-157.
- [3] MENG-RU SHEN, CHENG-YANG CHOU, J CLIVE ELLORY, et al. Volume-sensitive KCl cotransport associated with human cervical carcinogenesis[J]. *Eur J Physiol*, 2000, 400(5): 751-760.
- [4] DI FULVIO M, LAUF PK, SHAH S, et al. NO₂Oates regulate potassium-chloride cotransporter-1 and -3 mRNA expression in vascular smooth muscle cells[J]. *Am J Physiol*, 2003, 284 (5): H1686-H1692.
- [5] MATHUR SP, MATHUR RS, UNDERWOOD PB et al. Circulating levels of insulin-like growth factor II and IGF-binding protein 3 in cervical cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2003, 91 (3) :245-248.
- [6] SARRANO ML, ROMERO A. Serum levels of insulin-like growth factor-I and -II and insulin-like growth factor binding protein 3 in women with squamous intraepithelial lesions and cervical cancer [J]. *Biomedica*, 2006, 26(2):258-268.
- [7] DAVID R, CLEMMONS, LAURA A MAILE. Minireview: integral membrane proteins that function coordinately with the Insulin-like growth factor I receptorto regulate intracellular signaling [J]. *Endocrinology*, 2003, 144(5): 1664-1670.
- [8] DE LOS HEROS P, KAHLE KT, RINEHART J. WNK3 bypasses the tonicity requirement for K-Cl cotransporter activation via a phosphatase-dependent pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103 (6):1976-1981.

[收稿日期] 2007-04-13

(编辑 孙宪民)