

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2004.02.02

· 研究生专栏 ·

nm23-H₁ 基因转染前后 人肺癌细胞中PKC 转位的研究

聂强 朱文 王艳萍 陈小禾 杨俊杰 刘伦旭 付军科 李定彪 李印 周清华

【摘要】 目的 探讨 nm23-H₁ 转染和蛋白激酶 C (PKC) 特异抑制剂 Calphostin C 对人高转移大细胞肺癌细胞株 L9981 细胞 PKC 信号转导通路的作用, 以及 nm23-H₁ 基因对 PKC 激活转位的影响。方法 应用激光扫描共聚焦显微镜观察 nm23-H₁ 基因转染前后和 Calphostin C 处理转基因细胞株 L9981-nm23-H₁ 前后 PKC 在不同的亚细胞区域的定位情况。结果 (1) 原代细胞株 L9981 和空载体细胞株 L9981-pLXSN 中 PKC- α 、PKC- β II 主要位于胞核及核周, 处于激活状态。转染 nm23-H₁ 基因后的人肺癌细胞株 L9981-nm23-H₁ 中 PKC- α 、PKC- β II 主要位于胞浆, 处于未激活状态。(2) Calphostin C 作用后所有细胞中的 PKC 均主要位于胞浆中, 处于未激活状态。结论 (1) nm23-H₁ 基因可使 L9981 细胞株中 PKC 从胞核向胞浆转位, 从而抑制 PKC 信号转导。(2) Calphostin C 可使 L9981、L9981-pLXSN 细胞株中 PKC 从胞核向胞浆转位, 从而抑制 PKC 信号转导。

【关键词】 nm23-H₁ 基因 激光共聚焦显微镜 PKC 转位 人大细胞肺癌细胞株 L9981

【中图分类号】 Q785

Study on protein kinase C translocation before and after transfection of nm23-H1 gene in human lung cancer cells using Laser scanning confocal microscope NIE Qiang, ZHU Wen, Wang Yanping, CHEN Xiaohu, YANG Junjie, LIU Lunxu, FU Junke, LI Dingbiao, ZHOU Qinghua. Key Laboratory of Lung Cancer Molecular Biology of Sichuan Province and Department of Thoracic Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, P. R. China

Corresponding author: ZHOU Qinghua, E-mail: zhouqh@mail.sc.cninfo.net

【Abstract】 Objective To explore the influences of nm23-H1 gene transfection and protein kinase C (PKC) inhibitor Calphostin C on PKC signal transduction pathway in human high-metastasis large cell lung cancer cell line L9981, and to evaluate the effects of nm23-H1 gene on translocation and activation in subcellular region. **Methods** The translocation of PKC in subcellular region was observed in L9981 before and after nm23-H1 gene transfection and Calphostin C treatment by Laser scanning confocal microscope (LSCM) method. **Results** PKC- α and PKC- β II were found to locate in different subcellular site in L9981 before and after nm23-H1 gene transfection. PKC- α and PKC- β II mainly located in nucleus and perinucleus in L9981 and L9981-pLXSN cell lines, which were in active status. PKC- α and PKC- β II mainly located in soluble cytosolic fraction in L9981-nm23-H1 cell line and were inactive status. PKC- α and PKC- β II mainly located in cytosolic fraction and were in inactive status in all the three cell lines after treatment with Calphostin C. **Conclusion** The results suggest that nm23-H1 gene might make PKC to translocate from nucleus and perinucleus to soluble cytosolic fraction in L9981 cell line. PKC inhibitor, Calphostin C, can also make PKC to translocate from nucleus and perinucleus to soluble cytosolic fraction in L9981, L9981-pLXSN cell lines. Both transfection of nm23-H1 gene and treatment with Calphostin C can suppress the PKC signal transduction in L9981 cell line.

【Key words】 nm23-H1 gene Laser scanning confocal microscope PKC translocation Human large cell lung cancer cell line L9981

This work was supported by grants from the National Natural Sciences Foundation of China (to ZHOU Qinghua and LIU Lunxu) No. 30070333 and No. 30100075).

nm23 基因是 Steeg 等在 1988 年首先发现并分离出的肿瘤转移抑制基因, 编码 17 kU 蛋白质, 有 H₁ 和 H₂ 两个主要亚型。目前已知 nm23 基因与肿瘤侵袭和转移呈负相关, 但其详细的作用机制还不清楚。蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 属于丝/苏氨酸激酶家族成员, 在细胞增殖、分化、凋亡、基因表达、肿瘤促进、癌基因激活、膜转运和信号转导等过程中起重要调节作用^[1-3]。已有研究报道 PKC 在恶性肿瘤的侵袭和转移过程中起关键作用^[4,5], 但有关 nm23 基因同 PKC 在细胞信号传导通路中的相互作用关系却鲜见报道。为了探讨 nm23-H₁ 基因转染和 PKC 抑制剂 Calphostin C 对人肺癌细胞株中 PKC 信号传导通路的作用, 本研究应用多光子激光共聚焦显微镜观察了转染 nm23-H₁ 基因前后 PKC- α 、PKC- β II 在人高转移大细胞肺癌细胞株 L9981 中转位的变化, 以探讨 nm23-H₁ 基因功能与 PKC 细胞信号通路之间的联系。

1 材料和方法

1.1 细胞株

人高转移大细胞肺癌细胞株 L9981, 人高转移大细胞肺癌空载体转染细胞株 L9981-pLXSN, 人高转移大细胞肺癌 nm23-H₁ 转基因细胞株 L9981-nm23-H₁, 均由四川大学华西医院四川省肺癌分子重点实验室提供^[6]。

1.2 实验材料

1.2.1 抗体

兔源多克隆 PKC- α 、PKC- β II 抗体购自美国 Sigma 公司。FITC 标记荧光抗体 (IgG) 购自 Molecular Probe 公司。

1.2.2 PKC 抑制剂

PKC 特异抑制剂 Calphostin C 购自美国 Sigma 公司。

1.2.3 实验仪器

多光子激光共聚焦显微镜为美国 BioRad 公司生产, 型号为 MRC-1024 型。

1.2.4 实验试剂

新生小牛血清由成都哈里生物有限公司生产, RPMI1640 培养基为 Gibico 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

在无菌条件下使用 RPMI1640 培养基, 含 10% 的新生小牛血清、链霉素 100 mg/L 和青霉素 100 U/mL, 在 37℃、CO₂ 浓度为 5% 的孵箱中培养, 并用 0.25% 胰酶消化, 将三株细胞株进行常规的传代。

1.3.2 细胞分组

让每个细胞株的细胞在盖玻片上正常生长 48 h, 并分成两组: 对照组, 不施加任何处理因素; 处理组, 加入浓度为 1.0 μ mol/L 的 Calphostin C, 37℃ 培养 24 h。

1.3.3 PKC 亚型的间接免疫荧光染色

每组细胞经 10% 甲醛固定, 100% 甲醇打孔, 0.1% BSA 作用 1 h 后加入兔源多抗 (稀释度为 1: 100) PKC- α 、PKC- β II, 4℃ 过夜, PBS 洗 3 次, 加入 FITC 标记的二抗 IgG (1: 50 稀释), 37℃ 暗室中安置 1 h, 90% 甘油封片, 镜检, 以 PBS 代替一抗作为阴性对照。实验均重复三次。

1.3.4 PKC 亚型的共聚焦显微镜检测

激发波长 488 nm, 发射波长 522 nm, Iris6.0, Pixel size 1.291 μ m, Power 30%, Gain 1500, 观察荧光在细胞内亚细胞区域的分布变化。

2 结果

2.1 PKC- α 、PKC- β II 在细胞株中的表达和定位

在原代细胞株 L9981 和空载体细胞株 L9981-pLXSN 中, PKC- α 主要位于胞核和核周, 尤以胞核明显, PKC- β II 亦主要位于核膜, 两者均处于激活状态 (图 1)。

在转基因细胞株 L9981-nm23-H₁ 细胞中, PKC- α 主要位于胞浆, 呈弥漫分布, 核周表达极少, PKC- β II 亦位于胞浆, 两者处于未激活状态 (图 1)。

2.2 Calphostin C 处理后 PKC- α 、PKC- β II 在细胞中的分布变化

与未用 Calphostin C 处理的细胞株比较, 抑制剂处理 L9981 及 L9981-pLXSN 后细胞株中 PKC- α 主要位于胞浆, 核周荧光表达极少, PKC- β II 亦主要位于胞浆内, 两者处于未激活状态 (图 2)。

经 Calphostin C 处理后, L9981-nm23-H₁ 细胞株中的 PKC- α 及 PKC- β II 亦均位于胞浆内, 在核内和核膜处几乎无表达, 两者处于未激活状态 (图 2)。

3 讨论

nm23 基因作为肿瘤转移抑制基因早已成为共识, 在肺癌方面, 周清华等^[7-9]从 20 世纪 90 年代初开始研究 nm23-H₁ 基因, 并从 DNA、mRNA 和蛋白水平均证实了 nm23-H₁ 基因的低表达、等位基因缺失与肺癌的高恶性、高转移率等有密切关系, 存在 nm23-H₁ 基因低表达和等位基因缺失的肺癌常常伴有其它转移相关基因表达异常, 并由此提出了肺癌中存在“肺癌转移抑制级联”和 nm23-H₁ 基因是“肺癌转移抑制级联”中的上游基因和关键基因的假说。但 nm23 基因发挥作用的机理一直未被阐明。nm23 蛋白表达产物是二磷酸核苷激酶 (nucleoside diphosphate protein kinase, NDPK), 而 NDPK 又是跨膜信息传递中 G 蛋白的功能调节者之一^[10]。研究证明, 肿瘤侵袭和转移的各个阶段, 都与肿瘤细胞的跨膜机制密切相关。因

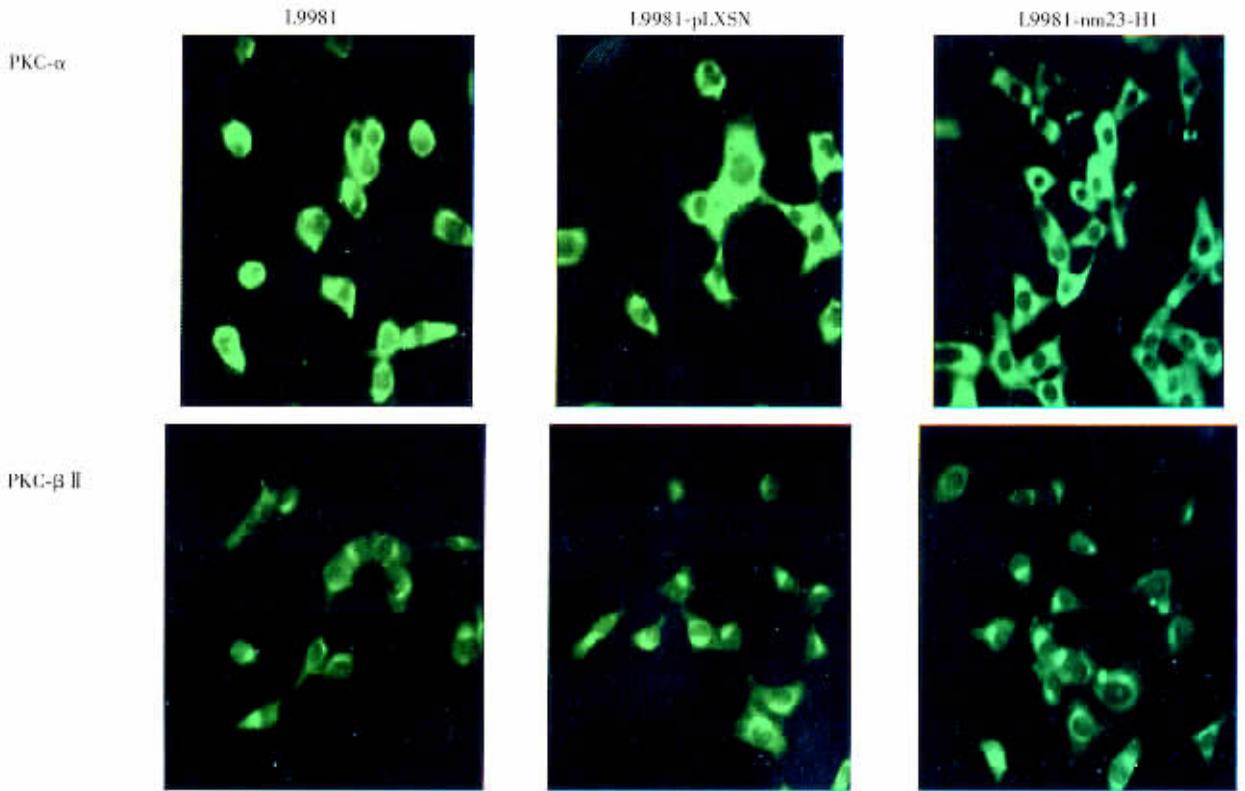


图 1 PKC-α、PKC-β II 在人大细胞肺癌细胞株中的表达和定位

Fig 1 Expression and location of PKC-α and PKC-β II in human large cell lung cancer cell lines

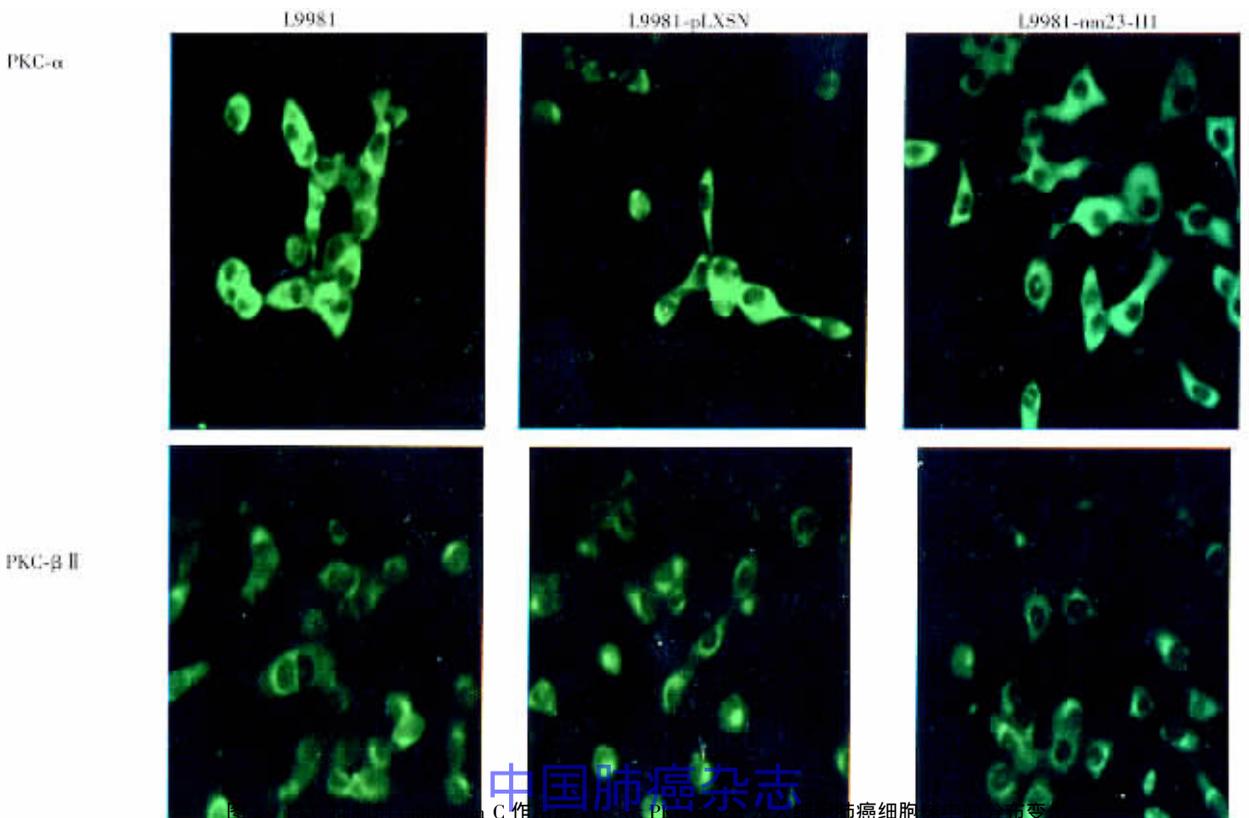


Fig 2 The distribution changes of PKC-α and PKC-β II in human large cell lung cancer cell lines after treatment with PKC inhibitor, Calphostin C

此推测 nm23/NDPK 对瘤细胞转移行为中的跨膜信息传递机理可能存在着某些调节作用。但是,关于该基因作用机理同细胞信号转导通路之间的关系却鲜见报道。

为进一步对 nm23-H₁ 基因进行深入研究,以周清华教授为首的课题组应用 Southern Blot、RT-PCR、Western blot、PCR-SSCP 和 DNA Sequence 技术从 9 株人肺癌细胞株中筛选鉴定出缺失 nm23-H₁ 基因的人高转移肺癌细胞株 L9981;并且应用质粒 DNA 的转化、酶切、连接技术成功构建了逆转录病毒真核表达载体 pLXSN-nm23-H₁-EGFP,将质粒 pLXSN-nm23-H₁-EGFP 转染 L9981 细胞株后 nm23-H₁-EGFP 融合蛋白能够在受染细胞内持续、稳定和高效地表达^[6]。三株细胞株(L9981、L9981-pLXSN 和 L9981-nm23-H₁)的建立,为研究 nm23-H₁ 基因在“肺癌转移抑制级联”中的作用分子机理,以及相关细胞信号转导通路奠定了基础。

PKC 是细胞信号转导系统的关键酶,它处于第二信使的下游,是第二信使 Ca²⁺ 和二酰基甘油(diacylglycerol, DAG)的靶蛋白^[11,12]。已有的研究表明,在细胞中,未被激活的 PKC 不同亚型在细胞内各自定位于特定亚细胞区域。当使用去甲肾上腺素和 PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate)刺激后,PKC 在胞内发生转位,各自重新分布到新的亚细胞区域。因此认为 PKC 在细胞中的重新分布同其激活相关^[13,14]。PKC 的激活需要 PKC 与膜的连接。细胞受到刺激后,PKC 从胞液转位到质膜及其他细胞器膜上,这已被作为体内 PKC 活化的一个标志^[15,16]。研究表明,PKC 在肿瘤转移的某些过程中起重要的调节作用,肿瘤细胞的 PKC 活性高,而且细胞核膜 PKC 活性与肿瘤转移能力有关,高转移肿瘤细胞核膜 PKC 活性明显高于低转移肿瘤细胞,PKC 膜转位的肿瘤细胞容易发生血行转移^[17-19]。La Porta 等^[4]发现在肺癌细胞和肺癌淋巴结转移病灶中 PKC 表达明显增加,肿瘤细胞核 PKC 的活性增加且在转移淋巴结中表达明显增加。在肿瘤侵袭方面,Aflalo 等^[20]发现 PKC 表达水平高的白血病细胞 BS-24-1 的侵袭能力远强于 PKC 表达水平低的 RO2T 细胞。因此,人们推测 PKC 可能在恶性肿瘤细胞浸润、转移过程中起关键作用。同时国外研究发现,阿糖胞苷、柔佛素、顺铂等化疗药物就是通过作用于 PKC 发挥抗肿瘤作用的,而某些抗癌药物如 Tamoxifen 便是 PKC 的抑制剂。因此,PKC 作为抗肿瘤药物的靶点已受到人们的重视^[21-23]。但是关于 PKC 激活转位同肺癌侵袭与转移之间的关系,以及肿

瘤转移抑制基因 nm23-H₁ 对 PKC 激活转位的影响的研究国内外均未见报道。

在 PKC 的研究中,其调节剂(激动剂、抑制剂)作为研究 PKC 功能的常用工具药被广泛应用于科学实验中。体外研究证实 PKC 抑制剂可诱导多种肿瘤细胞凋亡和抑制瘤细胞的侵袭与转移。为了探讨 nm23-H₁ 基因同 PKC 激活转位之间的关系,本研究应用了 PKC 特异抑制剂 Calphostin C,该抑制剂对 PKC 活性抑制的 IC₅₀ 值为 0.05 μmol/L^[24]。本研究室发现以 1.0 μmol/L Calphostin C 处理三株癌细胞并作用 24 h 后,其抑制 PKC 转位激活的效果最明显(相关数据及文章尚未发表),因此在激光共聚焦显微镜的实验中均使用该恒定浓度。本实验结果表明 Calphostin C 能使 nm23-H₁ 基因缺失的人肺癌细胞株 L9981 细胞中处于激活转位状态的 PKC 回到激活前状态,同转染了 nm23-H₁ 基因的 L9981-nm23-H₁ 细胞株中的 PKC 状态相似,这可能是 Calphostin C 抑制 PKC 活性的又一生化机理。同时,本研究观察到人肺大细胞癌株 L9981 及人肺大细胞癌空载体转染细胞株 L9981-pLXSN 中的 PKC 主要位于胞核和核周以及质膜,明显处于活化状态,而转基因细胞株 L9981-nm23-H₁ 细胞中的 PKC 主要位于胞浆内,处于激活转位前的状态。经 Calphostin C 处理后,三株细胞中 PKC 均主要位于胞浆中,处于未活化状态。上述结果充分表明 nm23-H₁ 基因可发挥类似 PKC 抑制剂的作用,使人大细胞肺癌细胞株中已处于转位激活状态的 PKC 重新回到胞浆,处于激活前状态,不能对相应底物相关作用,由此抑制了癌细胞的增殖、侵袭及转移等。

总之,我们推测 nm23-H₁ 基因可能是通过影响细胞内 PKC 的激活转位从而抑制 PKC 活性的,通过此方式调节细胞信号转导中 PKC 通路来发挥其相关作用的。但是关于 nm23-H₁ 基因是通过何种方式来调控 PKC 的激活转位的详细机理,有待进行更深入的研究加以阐明。

参 考 文 献

- 1 Goodnight JA, Mischak H, Kolch W, et al. Immunocytochemical localization of eight protein kinase C isozymes overexpressed in NIH 3T3 fibroblasts. Isoform-specific association with microfilaments, Golgi, endoplasmic reticulum, and nuclear and cell membranes. *J Biol Chem*, 1995 270(17): 9991-10001.
- 2 Kelly ML, Tang Y, Rosensweig N, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor rescues TF-1 leukemia cells from ionizing radiation-induced apoptosis through a pathway mediated by protein kinase Calpha. *Blood*, 1998 92(2): 416-424.

- 3 Moore ED, Ring M, Scriven DR, et al. The role of protein kinase C isozymes in bombesin-stimulated gastrin release from human antral gastrin cells. *J Biol Chem* ,1999 274(32): 22493-22501.
- 4 La Porta CA, Tessitore L, Comolli R. Changes in protein kinase C alpha, delta and in nuclear beta isoform expression in tumour and lung metastatic nodules induced by diethylnitrosamine in the rat. *Carcinogenesis* , 1997 18(4): 715-719.
- 5 Fichter M, Hinrichs R, Eissner G, et al. Expression of CD44 isoforms in neuroblastoma cells is regulated by PI 3-kinase and protein kinase C. *Oncogene* ,1997 14(23): 2817-2824.
- 6 Zhou QH, Che GW, Qin Y, et al. Experimental study on nm23-H1 gene reversing phenotype of lung cancer and its molecular mechanism. *Chin J Cancer* ,2003 6(2): 141-143. [周清华, 车国卫, 覃扬, 等. nm23-H1 基因逆转肺癌转移表型及其分子机制的实验研究. *中国肺癌杂志* ,2003 6(2): 141-143.]
- 7 Chen XF, Zhou QH, Shi YK, et al. Study on expression of metastatic suppression gene of nm23-H1 in human non-small-cell lung cancer. *Chin J Clin Thorac Cardiovasc Surg* ,1997 4(2): 80-82. [陈晓峰, 周清华, 石应康, 等. 转移抑制基因 nm23-H1 在人非小细胞肺癌中的表达研究. *中国胸心血管外科临床杂志* ,1997 4(2): 80-82.]
- 8 Liu LX, Zhou QH, Shi YK, et al. Slot blot analysis of metastasis suppression gene nm23 expression in human lung cancer. *J West China Univ Med Sci* ,1998 29(4): 364-367. [刘伦旭, 周清华, 石应康, 等. 狭缝印迹杂交分析癌转移抑制基因 nm23 在人肺癌中的表达. *华西医科大学学报* ,1998 29(4): 364-367.]
- 9 Liu LX, Qin Y, Zhou QH, et al. Northern blot analysis of nm23 gene expression in human lung cancer. *Chin J Oncol* ,1998 20(5): 342-344. [刘伦旭, 覃扬, 周清华, 等. Northern 印迹杂交分析 nm23 基因在人肺癌中的表达研究. *中华肿瘤杂志* ,1998 20(5): 342-344.]
- 10 Wallet V, Mutzel R, Troll H, et al. Dictyostelium nucleoside diphosphate kinase highly homologous to Nm23 and Awd proteins involved in mammalian tumor metastasis and Drosophila development. *J Natl Cancer Inst* , 1990 82(14): 1199-1202.
- 11 Chiang HS, Yang RS, Lin SW, et al. Tissue factor activity of SW-480 human colon adenocarcinoma cells is modulated by thrombin and protein kinase C activation. *Br J Cancer* ,1998 78(9): 1121-1127.
- 12 Mohri T, Kameshita I, Suzuki S, et al. Rapid adhesion and spread of non-adherent colon cancer Colo201 cells induced by the protein kinase inhibitors, K252a and KT5720 and suppression of the adhesion by the immunosuppressants FK506 and cyclosporin A. *Cell Struct Funct* ,1998 23(5): 255-264.
- 13 Mochly-Rosen D, Henrich CJ, Cheever L, et al. A protein kinase C isozyme is translocated to cytoskeletal elements on activation. *Cell Regul* , 1990 1(9): 693-706.
- 14 Newton AC. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* ,1995 270(48): 28495-28498.
- 15 Hug H, Sarre TF. Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J* ,1993 291(Pt 2): 329-343.
- 16 Newton AC. Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol* , 1997 9(2): 161-167.
- 17 Gopalakrishna R, Barsky SH. Tumor promoter-induced membrane-bound protein kinase C regulates hematogenous metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* ,1988 85(2): 612-616.
- 18 Hart IR, Goode NT, Wilson RE. Molecular aspects of the metastatic cascade. *Biochim Biophys Acta* ,1989 989(1): 65-84.
- 19 Liu B, Renaud C, Nelson KK, et al. Protein-kinase-C inhibitor calphostin C reduces B16 amelanotic melanoma cell adhesion to endothelium and lung colonization. *Int J Cancer* ,1992 52(1): 147-152.
- 20 Aflalo E, Wolfson M, Ofir R, et al. Elevated activities of protein kinase C and tyrosine kinase correlate to leukemic cell aggressiveness. *Int J Cancer* ,1992 50(1): 136-141.
- 21 Sava G, Bergamo A. Drug control of solid tumour metastases: a critical view. *Anticancer Res* ,1999 19(2A): 1117-1124.
- 22 Sellers LA. Prolonged activation of extracellular signal-regulated kinase by a protein kinase C-dependent and N17Ras-insensitive mechanism mediates the proliferative response of G-protein-coupled somatostatin ss(4) receptors. *J Biol Chem* ,1999 274(34): 24280-24288.
- 23 Sun W, Vincent S, Settleman J, et al. MEK kinase 2 binds and activates protein kinase C-related kinase 2. Bifurcation of kinase regulatory pathways at the level of an MAPK kinase kinase. *J Biol Chem* 2000 275(32): 24421-24428.
- 24 Kobayashi E, Nakano H, Morimoto M, et al. Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* ,1989 159(2): 548-553.

(收稿 2004-01-04 修回 2004-02-28)

(本文编辑 张世雯)

· 启事 ·

致作者

为报道我国肺癌领域的新进展以及与肺癌临床紧密结合的基础理论研究, 本刊从本期起新开设了研究生论文专栏, 欢迎广大医学院校、研究机构在读研究生踊跃投稿。我们将组织专家对稿件进行审阅, 对科学性高、学术性强的稿件予以优先发表。投稿时需附研究生所在单位研究生处或研究生院的证明材料。

本刊编辑部

中国肺癌杂志
www.lungca.org