

p27^{mt} 基因对大肠癌 Lovo 细胞粘附作用的影响

宋仕茂¹, 陈 翥²

The Adhesion Effect of Colorectal Carcinoma Lovo cells by Human Mutant p27^{mt} Gene

SONG Shi-mao¹, CHEN Jun²

1. Department of Oncology, Affiliated Taihè Hospital, Affiliated Peoples Hospital, Yunyang Medical College, Shiyang 442000, China; 2. Department of Gastroenterology

Corresponding author: CHEN Jun, E-mail: sycj@sycatv.net

Abstract: Objective To study the effect of p27^{mt} transfected into human colorectal carcinoma Lovo cells, and to explore the mechanism of p27^{mt} gene on the metastases of colorectal carcinoma Lovo cells.

Methods The expression of p27^{mt} on the p27^{mt}-transfected Lovo cells was determined p27^{mt} protein expression with Western Blot. The effect of p27^{mt} gene on the homogeneity adhesion of human colorectal carcinoma was measured with cell count, and the heterogeneity adhesion was determined by MTT method.

Results High expression of p27 on the p27^{mt}-transfected Lovo cell was observed. The homogeneity adhesion of p27^{mt}-transfected Lovo cell group was higher than Ad-lacZ group and contrast group, and the heterogeneity adhesion was lower than Ad-lacZ group and contrast group.

Conclusion The p27^{mt} gene can promote homogeneity adhesion and reduce heterogeneity adhesion of colorectal carcinoma Lovo cells.

p27^{mt} gene might function as inhibitor of colorectal carcinoma metastasis.

Key words p27^{mt} gene; Colorectal neoplasm Lovo cells; Homogeneity adhesion; Heterogeneity adhesion

摘要:目的 研究人突变 p27 基因(p27^{mt})对大肠癌 Lovo 细胞粘附作用的影响,探讨 p27^{mt} 基因在大肠癌 Lovo 细胞转移中的作用机制。**方法** 用 Ad-p27^{mt} 转染大肠癌 Lovo 细胞,采用 Western blot 检测 p27^{mt} 在 Lovo 中的表达。分别采用细胞计数法,MTT 法检测 p27^{mt} 基因对大肠癌 Lovo 细胞同质粘附、异质粘附作用的影响。**结果** Ad-p27^{mt} 转染 Lovo 细胞后,同质粘附作用高于 Ad-LacZ 组和对照组,异质粘附作用低于 Ad-LacZ 组和对照组。**结论** 上调 p27^{mt} 基因的表达,可使大肠癌细胞间的同质粘附作用增强,异质粘附作用降低,因此,p27^{mt} 基因具有抑制大肠癌细胞转移的功能,其机制是改变了细胞基质及细胞间的粘附能力。

关键词 p27^{mt} 基因;大肠癌 Lovo 细胞;同质粘附;异质粘附

中图分类号:R735.3 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2006)05-0346-03

0 引言

p27 是一种多功能细胞周期素依赖激酶抑制因子(cyclin dependent kinase inhibitor, CDKI),其主要功能是通过阻止细胞 G₀/G₁ 期至 S 期的转换,实现对细胞周期的负性调控,对肿瘤细胞有明显的生长抑制和促凋亡作用^[1]。本研究旨在探讨人突变 p27(p27^{mt}) 基因在大肠癌细胞转移过程中对肿瘤细胞粘附作用的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人大肠癌细胞株 Lovo 细胞购自武汉大学典型物保藏中心,人突变 p27 重组腺病毒(Ad-p27^{mt})由陈翥²构建^[2],LacZ 重组腺病毒(Ad-LacZ)由郟阳医学院临床医学研究所王家宁博士构建^[3],纤维粘连蛋白(FN)购于武汉大学医学院病理教研室,RPMI 1640 培养基,四氮唑蓝盐(MTT)为 Sigma 公司产品,小牛血清购自杭州四季青生物公司。Western blot 检测试剂盒为美国 KPL 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

Lovo 细胞培养于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中,置 37℃,5% CO₂ 湿化培养箱内培养,在倒置显微镜下观察生长情况,Lovo 细胞 3 天传代 1 次。取对数生长期细胞,经 5g/L 胰蛋白酶

收稿日期:2005-04-28;修回日期:2005-12-13

基金项目:十堰科技局资助项目(2005ZD036)

作者单位:1. 442000 湖北十堰,郟阳医学院附属太和医院肿瘤科;2. 郟阳医学院附属人民医院消化内科

通讯作者:陈翥²,E-mail:sycj@sycatv.net

作者简介:宋仕茂(1970-),男,在读硕士,主治医师,主要从事消化道肿瘤的基础和临床研究

消化,用 PBS 液或无血清 RPMI 1640 培养液制成细胞悬液。采用血细胞计数板计数,台盼蓝拒染法测定细胞活力,只有细胞活力大于 95% 以上方可用于实验。

1.2.2 腺病毒转染效率测定

待 Lovo 细胞达到 60% ~ 80% 融合,用 Ad-LacZ 转染,感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 分别为 20、30、40、50,继续培养 48h,经 5g/L 戊二醛固定 15min, PBS 洗 2 次后加入 X-gal 染液,37 °C,50ml/L CO₂ 培养箱内孵化 4 ~ 24h 计数蓝染细胞数。

1.2.3 Western blot 检测 p27mt 蛋白的表达

取 75cm 培养瓶中用于实验的 Lovo 细胞,分别用 Ad-p27mt (MOI= 50) 和 Ad-LacZ (MOI= 50) 转染,同时设不加病毒的 Lovo 细胞对照。分别将细胞用 2.5g/L 胰蛋白酶消化,收集细胞,用 PBS 洗 2 次。经 1 × SDS-PAGE 细胞裂解液 500μl 裂解后,煮沸 5min,离心取上清,提取蛋白质,分别取 0.5ml 行 Western blot 检测。

1.2.4 同质性粘附实验^[4]

采用机械法测定细胞粘附性,具体操作如下:96 孔板中加入 Lovo 细胞 (10⁵ 个/ml),每孔 100μl,置于 37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养。当 Lovo 细胞铺至 70% ~ 80% 时,实验组加入 Ad-p27mt (MOI= 50),Ad-LacZ 组加入 Ad-LacZ (MOI= 50) 而对照组加入未转染的 Lovo 细胞,均在 37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养 6h 然后用无钙镁的 PBS 洗涤 2 次,0.25% 胰蛋白酶消化制备细胞悬液,调整细胞浓度为 10⁵ 个/ml。以 100μl/孔的量加入 96 孔已铺满 Lovo 细胞的培养板中,设 6 个复孔,置 37 °C,5% CO₂ 培养箱中分别孵育 60min、90min、120min 后,吸出未结合的细胞悬液。在光镜下计数,以加入和吸出肿瘤细胞之差,计算肿瘤细胞粘附值,取其均值。

1.2.5 异质性黏附实验

采用文献报告的方法^[5]。将浓度为 50μg/ml 的 FN 75μl 加入 96 孔培养板中,用 37 °C 预热的 PBS 液冲洗 2 次,加入 10g/L PBS 缓冲液稀释的小牛血清白蛋白 (100μl/孔),封闭非特异性位点,再用 PBS 200μl 冲洗 2 次。在已经铺好 FN 的 96 孔板中加入 Lovo 细胞,浓度为 10⁵ 个/ml,实验组加入 Ad-p27mt (MOI= 50),Ad-LacZ 组加入 Ad-LacZ (MOI= 50) 而对照组加入未转染的 Lovo 细胞,分别培养 60min、90min、120min。培养结束后,在倒置显微镜下观察,之后缓慢吸出培养液,用 PBS 冲洗未粘附的细胞,冲洗 2 次,加入含 10g/L FCS RPMI1640

培养液 200μl,每孔加入 5mg/ml 的四氮唑兰盐 (MTT) 20μl,继续培养 4h。吸出液体,每孔加入二甲基亚砷 (DMSO) 150μl,室温孵育 10min。用 Biol Rad 酶联免疫检测仪在 570nm 处测光密度值 (A₅₇₀)。每组设 6 个复孔,取其均值。

1.3 统计学处理

数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 students 't 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 重组腺病毒对 Lovo 细胞转导率的影响

X-gal 染色,用 Ad-LacZ 转染 Lovo 细胞后,对腺病毒的转导率进行评估,结果显示 MOI= 50 时,Lovo 细胞就可达 100% 转导率,表明重组腺病毒能有效地介导目的基因在 Lovo 细胞中表达。

2.2 p27mt 蛋白表达的检测结果

将 Lovo 细胞用 Ad-p27mt (MOI= 50) 转染 24h 后收集细胞,用 1 × SDS-PAGE 裂解液裂解细胞后,在 100 °C 条件下煮沸 5min,离心取上清,用 KPL 公司的 Western blot 检测试剂盒对 p27 蛋白进行检测,经 TMB 染色后,Ad-p27mt 转染的细胞呈蛋白高表达,而 Ad-LacZ 转染的细胞和不加病毒对照组仅有微量 (内源性) 27KD 的蛋白质表达,说明本实验所构建的人突变 p27 重组腺病毒在 Lovo 中可正确表达 p27mt 基因,并在细胞内实现了蛋白产物的高表达,见图 1。

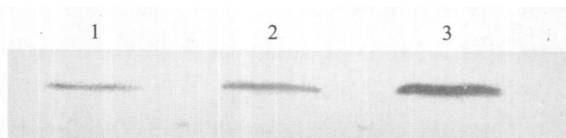


图 1 Western blot 检测 p27 蛋白的表达

2.3 p27mt 对 Lovo 细胞粘附的影响

Ad-p27mt 作用于 Lovo 细胞 120min 后,即有同质粘附作用增强,与 Ad-LacZ 组和对照组比较有显著统计学意义 (P < 0.01),而 Ad-LacZ 组和对照组比较没有显著统计学意义 (P > 0.05),见表 1。

表 1 p27mt 对 Lovo 细胞同质粘附的影响 (细胞个数, $\bar{x} \pm s$, n = 6)

组别	作用时间		
	60min	90min	120min
对照组	1040 ± 31	1540 ± 26	1788 ± 24
Ad-LacZ 组	1037 ± 20 *	1535 ± 21 *	1799 ± 31 *
Ad-p27mt 组	1244 ± 29 **	1731 ± 28 **	2019 ± 25 **

** 与 Ad-LacZ 组和对照组比较有显著性意义 (P < 0.01); * Ad-LacZ 组和对照组比较没有显著性意义 (P > 0.05)

2.4 p27mt 对 Lovo 细胞异质粘附的影响

p27mt 可以使 Lovo 细胞与基质的粘附作用

(异质性粘附作用)降低,明显低于 Ad-LacZ 组和对照组 ($P < 0.01$)。Ad-LacZ 组和对照组细胞作用 120min 后,细胞与 FN 全部发生了粘附,且 FN 表面有降解现象,而 Ad-p27mt 组细胞只有少部分发生了粘附, FN 表面没有降解现象,见表 2。

表 2 p27mt 诱导 Lovo 细胞异质粘附的影响

($A_{570}, \bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	作用时间		
	60min	90min	120min
对照组	0.230 \pm 0.036	0.378 \pm 0.089	0.419 \pm 0.102
Ad-LacZ 组	0.232 \pm 0.031 *	0.369 \pm 0.075 *	0.410 \pm 0.110 *
Ad-p27mt 组	0.210 \pm 0.028 **	0.143 \pm 0.036 **	0.130 \pm 0.025 **

* Ad-p27mt 组与 Ad-LacZ 组和对照组比较 ($P < 0.01$); Ad-LacZ 组和对照组比较无统计学意义 ($P > 0.05$)

3 讨论

肿瘤转移是多因素、多基因综合作用的结果,其中与癌细胞的运动、粘附、瘤体内血管形成、癌细胞凋亡等有密切关系。癌基因与抑癌基因的发现有助于探讨促进或抑制肿瘤生长、转移的有关问题。近年来的研究提示,p27 基因的表达对大肠癌的转移、患者预后、治疗都具有十分重要的意义^[69]。Zhang 等^[9]研究发现,p27 基因的表达与性别、年龄、肿瘤的位置、生长方式、以及 p53、p73、DCC 的表达无关,而与患者的预后明显相关。Yao 等^[10]研究发现 p27 基因的表达下调可以降低肿瘤细胞之间的粘附。Nakamura 等^[11]证实 p27 蛋白的低表达与大肠癌的侵袭行为密切相关。这些均提示 p27 基因的表达与大肠癌的转移有密切关系。

p27 蛋白的降解,主要是由泛素介导 p27 的 187 位苏氨酸磷酸化引起的。Jean 等^[12]将 p27 基因 187 位苏氨酸置换成丙氨酸 (T187A) 转染 HeyC₂ 细胞,发现细胞生长明显抑制。并且证明突变 p27 (T187A) 基因比野生型 p27 基因的抑制作用更强。Park 等^[13]将 p27mt [p27 (thr-187/pro-188 to met-187/Ile-188)] 构建复制缺陷重组腺病毒,用于转染肺癌细胞株,发现 p27mt 比野生型 p27 (wild type p27, p27wt) 有更强的抑制增殖作用。本研究用 Ad-p27mt 转染大肠癌 Lovo 细胞后,通过 Western blot 检测证实了 p27mt 在 Lovo 细胞中获得了蛋白高表达。Ad-p27mt 转染的 Lovo 细胞同质粘附能力强于 Ad-LacZ 组和对照组,而异质粘附能力明显下降,且在作用于 60min 时就开始出现,并在作用于 120min 时同质粘附作用显著增强,而异质粘附作用显著下降。从而证实了 p27mt 基因具有抑制

大肠癌细胞转移的功能,且随着 p27 蛋白表达的增加,作用时间的延长,抑制转移能力亦增强,其机制是改变了细胞与基质及细胞间的粘附能力。前期研究^[14]发现 p27mt 基因抑制肿瘤细胞的生长及促进细胞的凋亡,也是抗肿瘤转移的机制之一。

参考文献:

- [1] Noguchi T, Kikuchi R, Ono K, et al. Prognostic significance of p27/kip1 and apoptosis in patients with colorectal carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2003, 10(4): 827-831.
- [2] 陈曦,徐少勇,邓长生,等. 细菌内同源重组高效制备人突变 p27 基因重组腺病毒[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(5): 406-409.
- [3] 王家宁,黄永章,孔霞,等. 细菌内同源重组快速构建和制备表达 -半乳糖苷酶的重组腺病毒[J]. 邵阳医学院学报, 2004, 23(1): 1-5.
- [4] 刘玉,丁彦青,梁莉,等. 昆布多糖对大肠癌细胞生长转移能力抑制作用的研究[J]. 中国临床康复, 2003, 7(26): 3588-3590.
- [5] 刘莉,李祖国,杨之光,等. 抑癌基因 KAI1 对大肠癌细胞生物学行为的影响[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(6): 587-590.
- [6] Nagaoka S, Shiraiishi J, Utsuyama M, et al. Poor prognosis of colorectal cancer in patients over 80 years old is associated with down-regulation of tumor suppressor genes[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2003, 37(1): 48-54.
- [7] Gongoll S, Peters G, Mengel M, et al. Prognostic significance of calcium-binding protein S100A4 in colorectal cancer [J]. *Gastroenterology*, 2002, 123(5): 1478-1484.
- [8] Schwandner O, Bruch HP, Broll R. Prognostic significance of p21 and p27 protein, apoptosis, clinical and histologic factors in rectal cancer without lymph node metastases [J]. *Eur Surg Res*, 2002, 34(6): 389-396.
- [9] Zhang H, Sun XF. Loss of p27 expression predicts poor prognosis in patients with Dukes' B stage or proximal colorectal cancer[J]. *Int J Oncol*, 2001, 19(1): 49-54.
- [10] Yao J, Eu KW, Seow-Choen F, et al. Down-regulation of p27 is a significant predictor of poor overall survival and may facilitate metastasis in colorectal carcinomas[J]. *Int J Cancer*, 2000, 89(3): 213-220.
- [11] Nakamura T, Kato Y, Fuji H, et al. E-cadherin-dependent intercellular adhesion enhances chemoresistance [J]. *Int J Mol Med*, 2003, 12(5): 693-704.
- [12] Jean A, Hurteau MD, Susan A, et al. Over expression of a stabilized mutant form of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 inhibits cell growth[J]. *Gynecologic oncology*, 2002, 86(5): 19-23.
- [13] Park KH, Seol JY, Kim TY, et al. An adenovirus expressing mutant p27 showed more potent antitumor effects than adenovirus-p27 wild type[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(16): 6163-6170.
- [14] 陈曦,徐少勇,邓长生,等. 腺病毒介导的人突变 p27 基因转染对人大肠癌细胞系的作用[J]. 中国医师杂志, 2004, 6(7): 882-885.

[编辑:刘红武]