

脂质体介导 KAI1 基因转染对小细胞肺癌 NCI-H446 细胞株的抑制作用

王颖^{1,2}, 谢娟¹, 徐晓薇², 孙世良², 李少林¹

Study of the Inhibition of Small Cell Lung Cancer with Transfection of the Gene KAI1

WANG Yin^{1,2}, XIE Juan¹, XU Xiao-wei², SUN Shi-liang², LI Shao-lin¹

1. Medical University of Chongqing, Chongqing 400016, China; 2. Chongqing Cancer Institute

Abstract: Objective To study the inhibition of proliferation and metastasis of the small cell lung cancer cell with transfection of a new defined tumor metastasis suppressor gene KAI1. **Methods** To establish NCI-H446 cell line with stable expression of tumor metastasis suppressor gene KAI1, the gene KAI1 was transfected into NCI-H446 cells by the vector (PCMV-NEO-XhoI). We got clone cells after selected by G418. MTT method examined the cell proliferation. The CD82 protein expression and apoptosis was detected by cytometry analysis. The change of Myc and MMP-1 was tested by immunohistochemical staining and the expression of LN was tested by radioimmunoassay. **Results** The CD82 protein expression and apoptosis were up-regulated in the cells transfected by KAI1, the difference is significant ($P < 0.05$). The expression of Myc, MMP-1 and LN were descended. **Conclusion** The suppressor gene KAI1 could inhibit the proliferation of the small cell lung cancer cell and descend the expression of Myc, MMP-1 and LN.

Keywords: Suppressor gene KAI1; Transfection; Small cell lung cancer

摘要:目的 探讨新抑癌基因 KAI1 对小细胞肺癌 NCI-H446 细胞株抑制增殖和浸润转移的作用。方法 用脂质体介导的基因转染方法,借助真核质粒表达载体(PCMV-NEO-XhoI),将抑癌基因 KAI1 转入小细胞肺癌 NCI-H446 细胞中,经 G418 筛选,获得稳定表达的细胞克隆。观察 NCI-H446 细胞的生长,MTT 法检测细胞体外增殖能力,流式细胞仪进行细胞凋亡分析,间接免疫荧光染色结合流式细胞仪检测转染前后细胞 CD82 蛋白的表达。免疫组化测定 Myc 及 MMP-1(基质金属蛋白酶-1)的表达,放射免疫测定 LN(层黏蛋白)表达。结果 脂质体-KAI1 基因转染的小细胞肺癌细胞 CD82 表达增加,细胞增殖能力下降,凋亡增加,癌基因 Myc, MMP-1 及 LN 表达下降。结论 抑癌基因 KAI1 抑制小细胞肺癌 NCI-H446 细胞株的增殖,降低 Myc, MMP-1 及 LN 的表达。

关键词: KAI1 抑癌基因; 转染; 小细胞肺癌

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2004)12-0742-03

0 引言

90% 的小细胞肺癌在确诊时已有了远处转移。研究表明,肿瘤的转移与肿瘤的发生一样,与基因的激活,抑癌基因的失活有关。将正常的抑癌基因导入肿瘤细胞,去补偿和代替突变或缺失的抑癌基因是癌症基因治疗的基本思路之一。KAI1/CD82 是 1995 年首次从人染色体 11p11.2 中分离出的新肿瘤转移抑制基因,长约 80Kb。结构基因由 10 个外显子和 9 个内含子组成。KAI1 基因转录的 mRNA 翻译出的蛋白质由 267 个氨基酸残基组成,分析发现,它与已发现的 CD82 结构相同,CD82 分布极其广泛,机体大多数组织均有表达^[1]。肺癌的早期转移也伴有 KAI1 基因表达的下降^[2],因而设想通过

外源性 KAI1 基因导入小细胞肺癌中,探讨 KAI1 基因转染对小细胞肺癌 NCI-H446 细胞株的抑制增殖和转移的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

人小细胞肺癌 NCI-H446 细胞株购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所,于 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中,5% CO₂ 浓度,37℃,湿度饱和的条件下常规培养。

1.1.2 质粒

真核质粒表达载体 (PCMV-NEO-XhoI) 含 1.6 kb KAI1 -cDNA 和筛选标志 neo 基因(由北京医科大学分子生物学教研室惠赠)。

1.1.3 主要试剂

脂质体 (Lipofectin), G418, 胎牛血清, RP-

收稿日期: 2003-09-22; 修回日期: 2003-12-10

作者单位: 1. 400030 重庆医科大学基础医学院; 2. 重庆市肿瘤研究所

MI1640,MTT 检测试剂均购自美国 Sigma 公司。链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)试剂盒,鼠抗人 Myc,MMP-1 单克隆抗体,为迈新公司产品。放免试剂盒,LN 单克隆抗体购于北京中山生物公司。CD82 单抗与同型对照为基因公司产品。

1.2 方法

1.2.1 基因转染及转染细胞株的筛选

细胞培养至对数生长期,传代细胞孵育 24h 后转染,加入真核质粒表达载体(PCMV-NEO-XhoI)与脂质体(Lipofectin)混合的转染液,培养 10h 后换正常培养液终止培养。待细胞达到 80% 的融合时,加入不同浓度 G418 继续培养 2 周筛选抗药克隆株(NCI-KAI1)。以未转染组为对照组(NCI)。

1.2.2 间接免疫荧光染色结合流式细胞仪检测转染前后细胞 CD82 的表达

取对数生长期 NCI-KAI1 及 NCI 组细胞,制成细胞悬液,各取 40μl,分别加工作浓度的 FITC-CD82 单抗及同型对照 20μl,4 30min。洗涤细胞 PBS2 次,弃上清。加 500μl 固定液后上机检测。

1.2.3 细胞凋亡分析

NCI-KAI1 及 NCI 组细胞,制成单细胞悬液,终浓度 70% 酒精固定,重新收集细胞,PBS 洗去固定液,加入 RNA 酶反应液过夜,与 PI(碘化丙锭)混匀后,流式细胞仪检测。

1.2.4 细胞增殖测定

用 MTT 法。96 孔酶标板,每孔接种 10.0×10^3 细胞,加入培养液,设空白对照,移入 37 饱和湿度的 5% 孵箱中培养 3 天,每孔加入 5mg/ml 的 MTT 20μl,37 继续孵育 4h,终止反应,小心吸取各孔内的液体,每孔加入 100μlDMSO,振荡 10min,使结晶物充分溶解,选择 570nm 和 630nm 双波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度;计算生长抑制率:计算生长抑制率(%) = (对照组 - 实验组) / (对照组 - 空白组)。

1.2.5 免疫组化检测 Myc 及 MMP-1 蛋白

将处理过的盖玻片置于培养皿中接种细胞,80% 铺满后取出盖玻片,用丙酮固定后按 SABC 试剂盒进行免疫组化反应,以 NCI 细胞为对照。用双目显微镜观察免疫组化染色的切片,计算任意 10 个高倍视野下总阳性细胞数占总细胞数的百分数,重复 3 次。

1.2.6 放射免疫法检测 LN 蛋白表达

取对数生长期 NCI-KAI1 及 NCI 组细胞上清液,按放免试剂盒说明检测 LN 蛋白表达。

1.2.7 统计学处理

实验结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,应用 SPSS 统计进行方差分析。成组设计 *t* 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 四唑盐(MTT)比色实验

细胞增殖能力的比较为 $P < 0.05$ 。

表 1 二组 NCI H446 细胞增殖能力的比较

组别	n	A ($\bar{x} \pm s$)
NCI-KAI1	48	0.369 ±0.017
NCI	48	0.801 ±0.014

2.2 流式细胞仪结合间接免疫荧光检测 CD82 表达

结果显示,当 NCI 对照的荧光强度为 2.5% 时,NCI-KAI1 组为 79.4%,后者的 CD82 表达明显增强。

2.3 流式细胞仪检测凋亡形成率(Apoptosis)

NCI 组 2.82%;NCI-KAI1 组:13.45%,二组有显著性差别 ($P < 0.05$)。显示 CD82 有促进凋亡,抑制细胞增殖的作用。

2.4 免疫组化检测 Myc 及 MMP-1 蛋白表达

Myc 蛋白表达:NCI 组 (72% ±2.2%);NCI-KAI1 组 (26% ±4.3%)。 $P < 0.05$ 。MMP-1 蛋白表达:NCI 组 (65.8% ±5.6%);NCI-KAI1 组 (19.1% ±2.4%), $P < 0.05$ 。见图 1~4。

2.5 放射免疫法检测 LN 蛋白表达

NCI 组 LN 值为 133.22;NCI-KAI1 组 LN 值为 27.55。NCI-KAI1 组的 LN 蛋白明显降低。

4 讨论

小细胞肺癌治疗失败多因为早期易转移,90% 以上的患者在诊断成立时已有了远处转移。KAI1 基因是新发现的肿瘤转移抑制基因,位于人第 11 号染色体 p11.2 区,长约 80Kb。它翻译出的蛋白质分析与 CD82 结构相同,是 TM4SF (trans-membrane4 superfamily) 家族成员。CD82 分布极其广泛,机体大多数组织均有表达,其中在前列腺、肺、肝、膀胱、骨髓、胎盘等组织表达较高。KAI1 基因在前列腺癌转移中的作用已经得到公认:Don g 等用免疫组织化学的方法发现,正常的前列腺组织和前列腺良性增生组织 KAI1 表达大致相同,大部分组织 (80%) 表达丰富,而前列腺癌原发灶表现为下降或缺失;转移瘤则全部表现为下降或缺失^[3]。KAI1 基因表达异常的原因目前认为,主要可以归结为 3 个方面

的因素:DNA 水平,包括基因突变、缺失等原因造成的正常基因量的下降;mRNA 水平,指由于启动子过度甲基化或基因表达调控异常等引起转录生成的 mRNA 量不足;蛋白水平,指在 mRNA 翻译过程中出现差错导致蛋白质减少^[4]。本实验的一个关键环节是基因转染技术,其中脂质体介导是一种常用且有效的方法,脂质体是一种阳离子,其与核酸结合形成复合物,通过内吞作用进入细胞达到转染的目的。本实验通过脂质体介导的基因转染及 G418 筛选获得了高表达 CD82 的小细胞肺癌细胞株(NCI-KAI1)。NCI-KAI1 细胞较 NCI 细胞增殖能力下降,凋亡增加。

Myc 原癌基因编码细胞周期特异性核磷酸蛋白,Myc 蛋白作为转录因子,主要通过与其 S 期有关的 DNA 结合,调节这些 DNA 的表达,从而控制细胞的增殖。Myc 基因异常改变的主要形式为过度表达,转染细胞株降低了 Myc 蛋白表达,控制了细胞的增殖。肿瘤的浸润与转移和间质的改建有关,CD82 的分子结构则提示它在细胞与细胞间粘附、细胞与基质的连接中可能起有一定作用^[5]。间质的降解和合成主要由一系列蛋白酶和蛋白酶抑制剂调控,其中 MMP-1 是基质金属蛋白酶类中的一种,MMP-1 蛋白表达下降,提示肿瘤转移能力下降。肿瘤的浸润与转移同时与黏连分子有关,正常情况下,黏连分子的重要作用是维持细胞与细胞之间及细胞与基质间的关系,使组织建立正常的结构和分化,对

肿瘤细胞的侵入起屏障作用,层黏蛋白属于黏连分子中整合蛋白家族的一员,同时层黏蛋白还能支持血管内皮细胞形成毛细血管^[6]。本实验中 NCI-KAI1 细胞株层黏蛋白表达的显著下降,提示与浸润和转移能力下降有关。

(本文图见封 2)

参考文献:

- [1] Dong JT, Isaacs WB, Barrett JC, et al. Genomic organization of the human KAI1 metastasis suppressor gene [J]. *Genomics*, 1997, 41 (1): 25-32.
- [2] Shinohara T, Nishimura N, Hanibuchi M. Transduction of KAI1/CD82 cDNA promotes hematogenous pread of human lung cancer cells in natural killer cell-depleted SCID mice [J]. *Int J Cancer*, 2001, 94 (1): 16-23.
- [3] Dong JT, Suzuki H, Pin S, et al. Down-regulation of the KAI1 metastasis suppressor gene during the progression of human prostatic cancer frequently involves gene mutation or allelic loss [J]. *Cancer Res*, 1996, 56 (19): 4387-4390.
- [4] Mashimo T, Bandayopadhyay S, Goodarzi G, et al. Activation of the tumor metastasis suppressor gene, KAI1, by p53 and c-Jun genes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 274 (2): 370-376.
- [5] Duriez C, Falette N, Cortes U, et al. Absence of p53-dependent induction of the metastasis suppressor KAI1 gene after DNA damage [J]. *Oncogene*, 2000, 9 (20): 2461-2464.
- [6] 吴一龙. 肺癌多学科综合治疗的理论与实践 [M]. 第 1 版. 北京:人民卫生出版社, 2000. 311-315.

[编辑:周永红;校对:安凤]

脂质体介导 KAI1 基因转染对小细胞肺癌 NCI-H446 细胞株的抑制作用

(正文见 742 页)

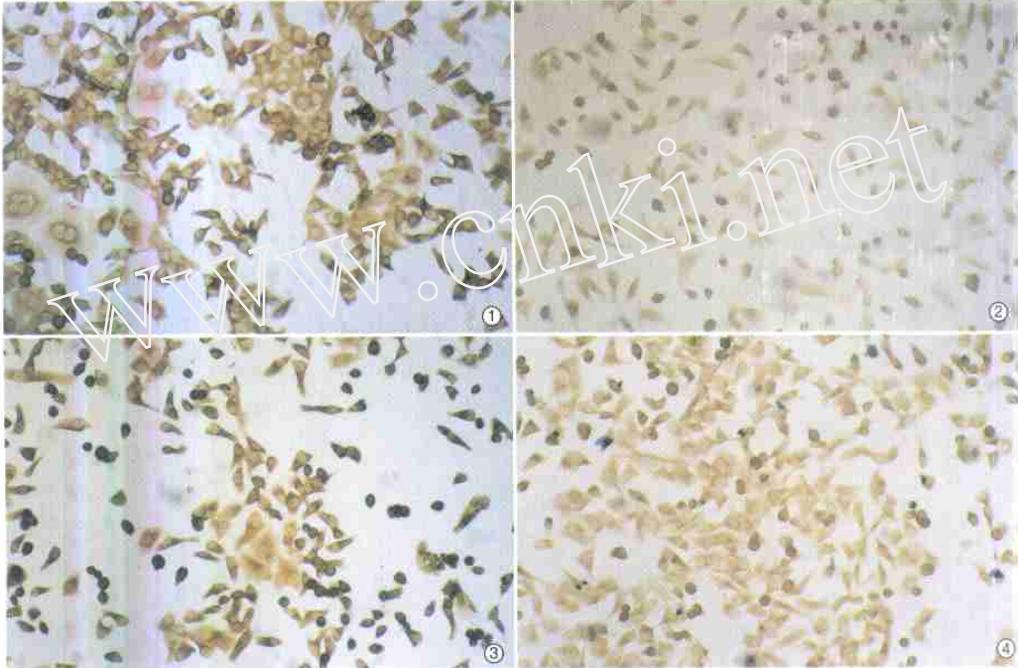


图1 Myc 蛋白表达(NCI组)

图3 MMP-1 蛋白表达(NCI组)

图2 Myc 蛋白表达(NCI-KAI1组)

图4 MMP-1 蛋白表达(NCI-KAI1组)

MMP-9、EGFR 和 E-cadherin 在非小细胞肺癌中的表达及意义

(正文见 745 页)

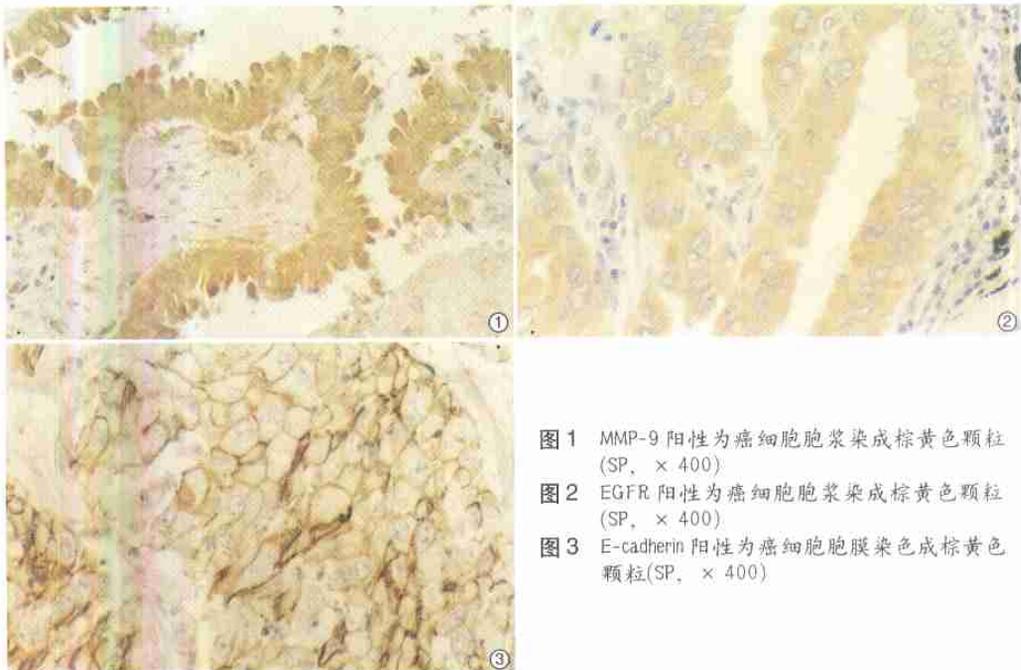


图1 MMP-9 阳性为癌细胞胞浆染成棕黄色颗粒(SP, × 400)

图2 EGFR 阳性为癌细胞胞浆染成棕黄色颗粒(SP, × 400)

图3 E-cadherin 阳性为癌细胞胞膜染色成棕黄色颗粒(SP, × 400)