

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.02.010

KiSS-1 抑制骨肉瘤 MG63 细胞的侵袭和迁移

沈荣凯¹, 张俐², 林建华¹(1. 福建医科大学附属第一医院骨科, 福建福州 350005; 2. 福建中医学院骨伤科, 福建福州 350108)

[摘要] 目的: 探讨人肿瘤转移抑制基因 *KiSS-1* 对人骨肉瘤 MG63 细胞侵袭、迁移能力的影响。方法: 构建 *KiSS-1* 表达质粒 pSNAV2.0-KiSS-1。pSNAV2.0-KiSS-1 质粒转染骨肉瘤 MG63 细胞, 经 G418 筛选稳定表达 *KiSS-1* 基因的 MG63 细胞。应用 real-time PCR、Western blotting 检测 *KiSS-1* mRNA 和蛋白的表达。Transwell 小室法检测 MG63 细胞的侵袭力, millicell 小室、细胞划痕愈合实验检测 *KiSS-1* 基因对 MG63 细胞迁移能力的影响。结果: 成功建立 pSNAV2.0-KiSS-1 质粒并稳定转染 MG63 细胞(MG63-KiSS-1 细胞), MG63-KiSS-1 细胞高表达 *KiSS-1* mRNA 和蛋白。转染 *KiSS-1* 质粒后的 MG63 细胞侵袭力显著降低 ($P < 0.05$); millicell 法、细胞划痕愈合实验证实转染 *KiSS-1* 质粒后的 MG63 细胞迁移力也明显降低 ($P < 0.05$)。结论: *KiSS-1* 基因能显著抑制人骨肉瘤 MG63 细胞的侵袭和迁移能力, 在骨肉瘤的转移中起重要作用。

[关键词] *KiSS-1* 基因; 骨肉瘤; MG63 细胞; 侵袭; 迁移

[文献标志码] A **[文章编号]** 1007-385X(2010)02-0168-06

KiSS-1 inhibits invasion and migration of osteosarcoma MG63 cells

SHEN Rong-kai¹, ZHANG Li², LIN Jian-hua¹(1. Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian, China; 2. Department of Orthopedics and Traumatology, Fujian College of Traditional Medicine, Fuzhou 350108, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of tumor metastasis-suppressor gene *KiSS-1* on the invasion and migration abilities of osteosarcoma MG63 cells. **Methods:** *KiSS-1* expression plasmid pSNAV2.0-KiSS-1 was constructed and transfected into MG63 cells. MG63 cells stably transfected with pSNAV2.0-KiSS-1 (named MG63-KiSS-1) were selected by G418. *KiSS-1* mRNA and protein expression in MG63-KiSS-1 cells was examined by real-time PCR and Western blotting analysis, respectively. The invasion ability of MG63 cells was detected by transwell assay. The effects of *KiSS-1* on the invasion and migration abilities of MG63 cells were measured by millicell assay and cell scratch healing assay. **Results:** MG63 cells stably transfected with pSNAV2.0-KiSS-1 were successfully established. MG63-KiSS-1 cells highly expressed *KiSS-1* protein. The invasion ability of MG63 cells was significantly decreased after pSNAV2.0-KiSS-1 transfection ($P < 0.05$). The migration ability of MG63 cells was also significantly inhibited after pSNAV2.0-KiSS-1 transfection as examined by millicell assay and cell scratch healing assay ($P < 0.05$). **Conclusion:** *KiSS-1* gene can significantly inhibit the invasion and migration abilities of osteosarcoma MG63 cells, which may play a key role in metastasis of osteosarcoma.

[Key words] *KiSS-1* gene; osteosarcoma; MG63 cell; invasion; migration

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(2): 168-173]

从上世纪 Paget 提出肿瘤转移的种子-土壤学说至今,人类对恶性肿瘤转移机制的研究已有百余年的历史。随着肿瘤转移的多因素、多阶段、多步骤理论不断完善,人类对肿瘤转移这一极其复杂的病理过程有了更深入的认识。侵袭和转移是恶性肿瘤最显著的特征。*KiSS-1* 基因最早发现于 1996 年,它位于染色体 1q32,其 mRNA 全长由 771 个碱基构成,编码 164 个氨基酸残基,相对分子质量约为

[基金项目] 卫生部科学研究基金-福建卫生教育联合攻关计划 (No. WKJ2008-2-042)。Project supported by the Joint Scientific Research Foundation of Ministry of Health and the Health and Education Department of Fujian Province (No. WKJ2008-2-042)

[作者简介] 沈荣凯 (1981-),男,福建漳州人,硕士,主要从事骨肉瘤的临床与基础研究。E-mail: zhuzhusrk@126.com

[通信作者] 林建华 (LIN Jian-hua, corresponding author), E-mail: Jianhual@126.com

14 000。*KiSS-1* 基因对人类多种恶性肿瘤的侵袭和转移具有显著的抑制作用^[1-3]，临床研究中已有学者^[4]应用人血浆中 *KiSS-1* 蛋白的水平来预测肿瘤患者的预后。然而，国内外对 *KiSS-1* 基因在转移性较高的骨肉瘤中作用的研究较少，本实验旨在探讨 *KiSS-1* 基因对成骨肉瘤 MG63 细胞侵袭和迁移能力的影响。

1. 材料与方法

1.1 细胞株及器材

腺相关病毒质粒载体 pSNAV2.0 购于北京本元正阳基因有限公司，人成骨肉瘤 MG63 细胞株购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。兔抗人 *KiSS-1*、兔抗人 β -tubulin 一抗购自 Santa Cruz 公司，HRP 标记的鼠抗兔二抗购自 Pierce 公司。逆转录试剂盒购自 Fermentas 公司，PCR 试剂盒购自 Promaga 公司，PCR 引物由大连宝生生物公司合成，实时荧光定量 PCR 试剂盒购自大连宝生生物公司，lipofectamine 购自 Invitrgene 公司，millicell 小室购自 Millipore 公司，matrigel 胶购自 BD 公司，纤维连接蛋白购自 Sigma 公司，牛血清白蛋白购自 Gibico 公司。低温高速离心机、PCR 仪购自 Heraeus 公司，Gel Doc 2000 凝胶成像仪购自 Bio-Rad 公司，DU800 分光光度仪购自 Beckman 公司，细胞培养箱购自 Thermo 公司，相差倒置显微镜及摄像系统购自 Olympus 公司。

1.2 pSNAV2.0-KiSS-1 载体构建

从正常人胎盘组织提取 *KiSS-1* 基因(上游引物: 5'-CGGGATCCCGATGAACCTCACTGGTTTCTTG-3'; 下游引物: 5'-CCGCTCGAGGCACTGCCCGCACCTGCGC-3')，经双酶切(*Bam*H I、*Xho* I)反应后与线性化的 pSNAV2.0 载体连接，转化大肠杆菌 DH-5 α ，经质粒小量抽提获得 pSNAV2.0-KiSS-1 载体，所得载体经双酶切初步鉴定阳性者，送测序鉴定。

1.3 *KiSS-1* 基因转染骨肉瘤 MG63 细胞

培养 MG63 细胞至 80% 融合时进行转染，取 1 μ g 质粒 pSNAV2.0-KiSS-1，以无血清的 DMEM 稀释至 250 μ l。取 lipofectamine 10 μ l 溶于 250 μ l DMEM 中，室温孵育 5 min。将上述两种液体混匀，室温孵育 20 min，加入 MG63 细胞中，置 37 $^{\circ}$ C 培养 6 h 后，小心吸去上清，更换为含 10% FBS 的 DMEM，继续培养 30 h。转染 36 h 后更换培养液，加入 G418 使其终质量浓度达 500 μ g/ml，继续培养 3~4 d，细胞大部分死亡后，调整 G418 质量浓度至 300 μ g/ml，继续培养 4 周左右，单克隆形成后挑取单克

隆至 96 孔板中，待其长满后于 6 孔板中继续扩增。筛选得到转染 *KiSS-1* 基因的 MG63-KiSS-1 细胞、转染空载体 pSNAV2.0 的 MG63-neo 细胞。

1.4 RT-PCR 检测 *KiSS-1* mRNA 的表达

TRIzol 法抽提总 RNA，逆转录获得各组细胞 cDNA。PCR 反应体系: cDNA 2 μ l，dNTP 5 μ l，上下游引物混合物 2 μ l，缓冲液 2.5 μ l，Tag DNA 聚合酶 0.5 μ l，补水至 25 μ l。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min，94 $^{\circ}$ C 变性 30 s，65 $^{\circ}$ C 退火 45 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s，共 30 个循环。以 β -actin 为内参照， β -actin 引物序列: 上游引物为 5'-ATTCCTATGTGGCGACGAG-3'，下游引物为 5'-AGAGCGGTACAGGGATAGCA-3'。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 4 min，94 $^{\circ}$ C 30 s，58 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 45 s，30 个循环，最后一循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束后进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测 *KiSS-1* mRNA 的表达

采用染料法，引物委托大连宝生生物公司合成，序列为: *KiSS-1* 上游引物为 5'-TACCCTCAGAGGCTCCGACACT-3'; *KiSS-1* 下游引物为 5'-AGCCCAGG-GATTCTAGCTG-3'。采用两步法 PCR 扩增程序，反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min，95 $^{\circ}$ C 10 s，60 $^{\circ}$ C 31 s，扩增 40 个循环。提取 *KiSS-1* 基因，将其按 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 稀释，按上述条件进行扩增，所得数据制作一标准曲线。将目的样本分别加入上述扩增反应中，经后续分析得出各样本 *KiSS-1* 基因拷贝数。

1.6 Western blotting 检测 *KiSS-1* 蛋白的表达

收集培养板内细胞，用 15% 分离胶、5% 浓缩胶行 SDS-PAGE(100 mA, 60 min)。转膜后经脱脂奶粉 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜，加入兔抗人 *KiSS-1* 一抗(1:200)，室温孵育 2 h。TBST 洗 10 min \times 3 次，加入辣根过氧化物酶标记鼠抗兔二抗(1:1000)，室温孵育 1 h。TBST 洗 10 min \times 3 次。按照 ECL 发光试剂盒说明书进行曝光、显影。

1.7 Transwell 法检测细胞的侵袭能力

将冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱的 matrigel 4 $^{\circ}$ C 静置 24 h，使之转为液态。将 1 ml 预冷的无血清 DMEM 培养基加入 200 μ l matrigel 中，混匀(冰浴操作)，在 millicell 上室加入 50 μ l，37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 5 h，弃培养液，用无血清 DMEM 清洗 2 遍，每孔加入 100 μ l 细胞悬液(1 \times 10⁵ 个/孔)，培养液为含 1% FBS 的 DMEM 培养液，并加入 BSA 使其终质量浓度达 10 g/L。下室中加入 1.5 ml 含 10% FBS 的 DMEM 培养基，37 $^{\circ}$ C 培养箱中继续培养 16 h。16 h 后取出 transwell，用棉签拭去膜表面的胶及细胞，PBS 清洗 2 遍，甲醇固定 15 min。苏木精染色 10 min，盐酸酒

精分化,伊红染色 5 min,蒸馏水漂洗 2 遍。自然晾干,中性树胶封片,显微镜下观察并记录结果。

1.8 Millicell 小室法检测细胞的迁移能力

将 millicell-PCF 放入 24 孔板中,下层加入 1.5 ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,上室加入 100 μ l 密度为 1×10^5 /ml 的细胞悬液,即每孔 1×10^4 个,每组设 7 个复孔,常规培养 8 h。8 h 后取出 millicell 小室,0.25% 胰酶消化穿过 millicell 膜的细胞,同时收集下层培养液及孔板中的细胞,750 $\times g$ 离心 5 min,用 200 μ l 无血清 DMEM 培养液重悬细胞,细胞计数板中计数细胞数量。

1.9 划痕愈合实验检测 MG63 细胞的迁移能力

将 50 μ l 人纤维连接蛋白(10 mg/L)加入 96 孔板中,4 $^{\circ}$ C 过夜,吸出孔中上清,每孔加入 50 μ l 含 10 g/L BSA 的无血清 DMEM 培养液,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 消化细胞,调整细胞为 5×10^5 /ml,接种已包被入纤维连接蛋白的 96 孔培养板中,每组 7 复孔。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液常规培养 3 d 左右,直至细胞形成单层。用无菌 1 ml Tip 沿培养板底部划“—”字划痕,镜下记录划痕区相对距离。用无血清 DMEM 洗涤细胞 2 遍,更换含 10 g/L BSA 和 1% 胎牛血清的 DMEM 培养液,培养 24 h 后,更换含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,继续培养 24 h,于培养 0、24、48 h 时观察并照相。

1.10 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建 *KiSS-1* 表达质粒 pSNAV2.0-KiSS-1

采用四色荧光、双脱氧终止法将重组载体菌液于 DNA 测序仪上测序,所得测序图与 *KiSS-1* 基因片段完全相符(图 1)。

2.2 骨肉瘤 MG63 细胞的转染及筛选

转染后 48 h,在 G418 筛选培养基中生长的 MG63 细胞开始死亡,细胞数量减少。G418 筛选 2 周后,转染 pSNAV2.0 载体及 pSNAV2.0-KiSS-1 载体的 MG63 细胞出现阳性克隆。4 周后细胞呈集落生长,6 周后细胞长满,即稳定转染 pSNAV2.0 或 pSNAV2.0-KiSS-1 质粒的 MG63 细胞(分别记为 MG63-neo 细胞和 MG63-KiSS-1 细胞)。

2.3 MG63-KiSS-1 细胞表达 *KiSS-1* 基因

TRIzol 法提取各组细胞 RNA,经电泳分析所得 RNA,可见清晰的 28S、18S 和 5S 三条带,表明所提

取的 RNA 无降解。RT-PCR 法检测 MG63 细胞、MG63-neo 细胞、MG63-KiSS-1 细胞中 *KiSS-1* 基因的转录水平,结果显示,MG63-KiSS-1 细胞中存在 *KiSS-1* 基因转录,而 MG63 细胞及 MG63-neo 细胞组中无 *KiSS-1* 基因转录(图 2)。实时荧光定量 PCR 检测 MG63-KiSS-1 细胞中 *KiSS-1* 基因的表达,结果表明,转染 pSNAV2.0-KiSS-1 的 MG63 细胞中 *KiSS-1* 基因的拷贝数为 6 200(图 3)。

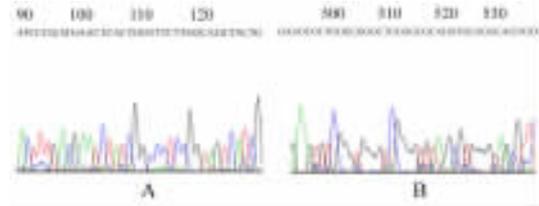


图 1 pSNAV2.0-KiSS-1 质粒测序结果

Fig. 1 Sequencing results of pSNAV2.0-KiSS-1 plasmid

A: Upstream; B: Downstream

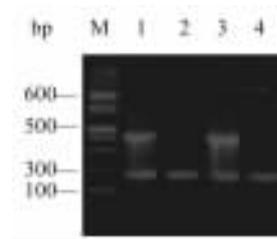


图 2 RT-PCR 检测各组 MG63 细胞中 *KiSS-1* mRNA 的表达

Fig. 2 *KiSS-1* mRNA expressions in different MG63 cells as detected by RT-PCR

M: Marker; 1,3: MG63-KiSS-1 cells; 2: MG63 cells; 4: MG63-neo cells

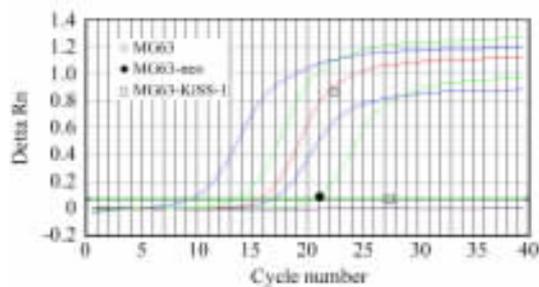


图 3 实时荧光定量 PCR 检测各组 MG63 细胞中 *KiSS-1* mRNA 的表达

Fig. 3 *KiSS-1* mRNA expressions in different MG63 cells as detected by real-time PCR

2.4 MG63-KiSS-1 细胞表达 *KiSS-1* 蛋白

MG63、MG63-neo、MG63-KiSS-1 细胞应用 Western blotting 检测 *KiSS-1* 蛋白的表达,结果显示,*KiSS-*

1 蛋白在转染 pSNAV2.0-KiSS-1 载体的 MG63 细胞中高表达,而在 MG63 细胞及转染空载体 pSNAV2.0 的 MG63-neo 细胞不表达(图 4),表明 *KiSS-1* 基因能在 MG63-KiSS-1 细胞中稳定、高效地表达。

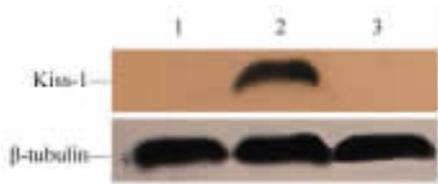


图 4 Western blotting 检测各组 MG63 细胞中 KiSS-1 蛋白的表达

Fig. 4 *KiSS-1* protein expressions in different MG63 cells as detected by Western blotting

1: MG63 cells; 2: MG63-KiSS-1 cells; 3: MG63-neo cells

2.5 *KiSS-1* 抑制 MG63 细胞的侵袭力

Matrigel 能在聚碳酸酯微孔滤膜表面形成类似天然基底膜的结构,故可用骨肉瘤细胞穿过 matrigel 的情况反映骨肉瘤细胞侵袭能力。3 组 MG63 细胞穿膜细胞数检测结果显示, MG63-KiSS-1 细胞侵袭能力较 MG63 细胞与转染空载体的 MG63-neo 细胞明显下降 ($P < 0.05$, 表 1), 而 MG63 细胞组与转染空载体的 MG63-neo 细胞组穿膜细胞数的差别无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 5)。

表 1 *KiSS-1* 抑制 MG63 细胞的侵袭力
Tab. 1 *KiSS-1* inhibited invasion of MG63 cells

Group	N	Invasion cell
MG63	8	25.50 ± 2.777
MG63-neo	8	23.25 ± 2.866
MG63-KiSS-1	8	11.13 ± 2.780*

* $P < 0.05$ vs MG63 or MG63-neo

2.6 *KiSS-1* 抑制 MG63 细胞的迁移力

以各组 MG63 细胞侵入 millicell 小室下层的细胞数来判定,3 组 MG63 细胞常规诱导 8 h 后,结果(表 2)显示: MG63-KiSS-1 迁移细胞数较 MG63 组、MG63-neo 组明显减少 ($P < 0.05$); MG63 细胞迁移数量虽较 MG63-neo 组多,但其差别无统计学意义 ($P > 0.05$),表明 *KiSS-1* 基因转染可抑制 MG63 细胞的迁移力。

应用细胞划痕愈合实验观察 MG63、MG63-neo、MG63-KiSS-1 细胞的迁移能力,结果显示, MG63-KiSS-1 细胞迁移速度较 MG63 细胞及 MG63-neo 细

胞慢,在划痕损伤 48 h 后 MG63-KiSS-1 细胞仅部分向损伤区迁移,而 MG63 细胞、MG63-neo 细胞的损伤区已基本长满(图 6)。说明 *KiSS-1* 基因转染能显著抑制人骨肉瘤 MG63 细胞的迁移能力。

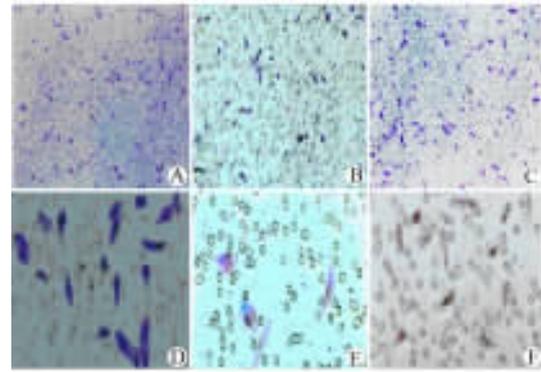


图 5 *KiSS-1* 抑制 MG63 细胞的侵袭力

Fig. 5 *KiSS-1* inhibited invasion ability of MG63 cells
A, D: MG63 cells; B, E: MG63-KiSS-1 cells; C, F: MG63-neo cells (A, B, C: ×40; D, E, F: ×400)

表 2 *KiSS-1* 抑制 MG63 细胞的迁移

Tab. 2 *KiSS-1* inhibited migration of MG63 cells

Group	n	Migration cell
MG63	8	1 692 ± 401.9
MG63-neo	8	1 561 ± 389.2
MG63-KiSS-1	8	988 ± 264.1*

* $P < 0.05$ vs MG63 or MG63-neo

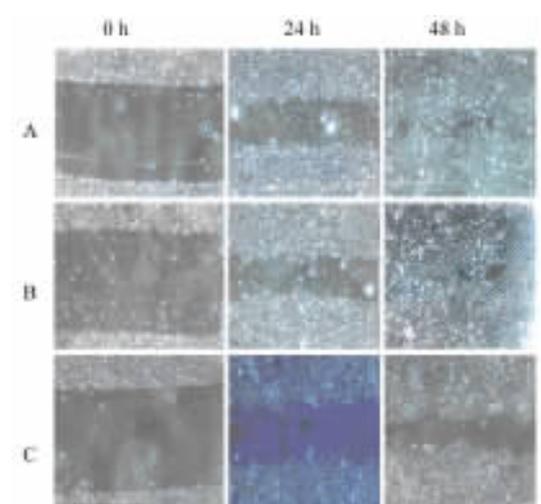


图 6 *KiSS-1* 抑制 MG63 细胞的迁移力(×40)

Fig. 6 *KiSS-1* inhibited migration ability of MG63 cells(×40)

A: MG63 cells; B: MG63-neo cells;
C: MG63-KiSS-1 cells

3 讨论

近年来,随着手术、放疗、化疗、免疫治疗等各种治疗方法的应用,骨肉瘤患者的5年生存率有大幅度提高。然而,仍有30%~40%的骨肉瘤患者发生转移,尤其是肺部转移。骨肉瘤的转移是多因素、多步骤、多阶段综合作用的结果^[5]。肿瘤转移抑制基因的发现对治疗方案的选择、肿瘤患者预后的评估都有重要的意义。

KiSS-1基因最早由Lee等^[6]运用微细胞介导染色体转移法及消减杂交技术分离得到。此后众多研究^[7-11]发现,KiSS-1的表达水平与人类多种恶性肿瘤的转移能力呈负相关。动物研究表明,将携带KiSS-1基因的人染色体注入高转移性的恶性黑色素瘤细胞中,该细胞的转移能力受到显著的抑制,而其局部致瘤性无明显降低^[12-13]。本课题前期研究表明,KiSS-1基因在恶性度、侵袭性低的骨肉瘤U2细胞中弱表达,而在低分化、恶性度高的骨肉瘤MG63细胞中表达缺失。应用KiSS-1基因转染MG63细胞后,发现它能将细胞阻滞于G₂/M期,并诱导肿瘤细胞凋亡,其机制可能为KiSS-1基因及受体结合能激活Rho及其相关激酶,诱导TNF的表达^[14-15]。

侵袭和转移是恶性肿瘤最显著的特征,matrigel穿膜侵袭实验是研究肿瘤细胞在体外侵袭能力的常用实验之一。通过transwell观察肿瘤细胞侵袭人工基底膜情况,能间接反映肿瘤细胞在体内侵袭能力。应用不同孔径及经不同处理的聚碳酸酯膜,可进行共培养、细胞趋化、细胞迁移、细胞侵袭等多方面的研究。肿瘤降解基质胶是通过基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的作用完成的。MMPs及其抑制剂TIMPs在体内维持基质的平衡。某些因素使MMPs在肿瘤细胞内过表达,当其表达大于TIMPs时,这种平衡发生改变,导致基质降解,肿瘤易发生浸润和转移。本实验结果显示:MG63-KiSS-1细胞组的穿膜细胞数为(11.13 ± 2.780)个,其亲代MG63细胞穿膜细胞数为(25.50 ± 2.777)个,两者差异有统计学意义(P < 0.05)。其机制可能是KiSS-1抑制胞质中NF-κB向细胞核内转移,减少NF-κB与MMP-9启动子的结合,下调MMP-9的表达,抑制肿瘤细胞的侵袭力^[16]。最近的一项关于胃癌的研究表明,KiSS-1基因还可能通过抑制p38 MAPK的活性而抑制MMP-9的表达^[17]。此外,KiSS-1基因还能通过抑制RhoA介导的NF-κB的激活,抑制乳腺癌细胞的侵袭^[18]。

除了细胞的黏附、基质蛋白降解外,肿瘤细胞的

迁移也是肿瘤转移的关键步骤之一。恶性肿瘤细胞从原发部位经淋巴、血液、体腔等途径播散到其他部位的过程为肿瘤的迁移,这是其区别于正常细胞的生物学特征之一。肿瘤细胞的迁移是其危及肿瘤患者生命及影响治疗效果的主要原因。MG63细胞是一种转移性较强的骨肉瘤细胞,本实验采用millicell小室及细胞划痕愈合实验研究MG63-KiSS-1对MG63细胞迁移能力的影响。结果表明,MG63-KiSS-1细胞组的迁移能力较其亲代细胞明显降低(P < 0.05)。在细胞划痕愈合实验中观察到划痕损伤48h后,MG63-KiSS-1细胞仅少量细胞向损伤区迁移,而MG63细胞、MG63-neo细胞的损伤区已基本长满,这一结果与肿瘤细胞在millicell小室中的迁移情况相符。由此说明,KiSS-1基因在骨肉瘤细胞内的稳定表达能降低骨肉瘤细胞的迁移能力,从而影响肿瘤的转移。其机制可能与KiSS-1基因参与细胞内多种黏附分子的表达调控有关,如钙黏附素与肿瘤细胞的迁移有关。最近的研究^[19]还表明KiSS-1基因还能抑制VEGF的表达,从而抑制肿瘤新生血管的生成。

侵袭和转移是恶性肿瘤最显著的特征。本研究证实,KiSS-1基因能显著降低人骨肉瘤MG63细胞的侵袭和迁移能力,可能在骨肉瘤的转移中发挥重要的作用,但其具体分子机制尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Shirasaki F, Takata M, Hatta N, Takehara K. Loss of expression of the metastasis suppressor gene KiSS-1 during melanoma progression and its association with LOH of chromosome 6q16.3-q23 [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(12): 7422-7425.
- [2] Sanchez-Carbajo M, Capodiceci P, Cordon-Cardo C. Tumor suppressor role of KiSS-1 in bladder cancer: loss of KiSS-1 expression is associated with bladder cancer progression and clinical outcome [J]. *Am J Pathol*, 2003, 162(4): 609-617.
- [3] 姜涛, 张淑兰, 林蓓, 高红. KiSS-1 mRNA和GPR54 mRNA在子宫内膜癌中的表达及意义[J]. *中华肿瘤杂志*, 2005, 27(4): 229-223.
- [4] Katagiri F, Nagai K, Kida A, Tomita K, Oishi S, Takeyama M, et al. Clinical significance of plasma metastatin level in pancreatic cancer patients [J]. *Oncol Rep*, 2009, 21(3): 815-819.
- [5] Yokota J. Tumor progression and metastasis [J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(4): 497-503.
- [6] Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1996, 88(23): 1731-1737.
- [7] Stathatos N, Bourdeau I, Espinosa AV, Saji M, Vasko VV, Burman KD, et al. KiSS-1/G protein-coupled receptor 54 metastasis

- suppressor pathway increases myocyte-enriched calcineurin interacting protein 1 expression and chronically inhibits calcineurin activity [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(9): 5432-5440.
- [8] Stark AM, Tongers K, Maass N, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Reduced metastasis-suppressor gene *Mma2* expression in breast cancer brain metastases [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2005, 131(3): 191-198.
- [9] Dhar DK, Naora H, Kubota H, Maruyama R, Yoshimura H, Tonomoto Y, *et al.* Downregulation of *KiSS-1* expression is responsible for tumor invasion and worse prognosis in gastric carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2004, 111(6): 868-872.
- [10] Pentheroudakis G, Kostadima L, Dova L, Georgiou I, Tzavaras T, Vartholomatos G. A twisted kiss: *in vitro* and *in vivo* evidence of genetic variation and suppressed transcription of the metastasis-suppressor gene *KiSS-1* in early breast cancer [J]. *Neoplasma*, 2010, 57(1): 47-54.
- [11] Shengbing Z, Feng LJ, Bin W, Lingyun G, Aimin H. Expression of *KiSS-1* gene and its role in invasion and metastasis of human hepatocellular carcinoma [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2009, 292(8): 1128-1134.
- [12] Miele ME, Robertson G, Lee JH, Coleman A, McGary CT, Fisher PB, *et al.* Metastasis suppressed, but tumorigenicity and local invasiveness unaffected, in human melanoma cell line MelJuSo after introduction of human chromosomes 1 or 6 [J]. *Mol Carcinogen*, 1996, 15(7): 284-299.
- [13] Lee JH, Welch DR. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, *KiSS-1* [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(12): 2384-2387.
- [14] Navenot JM, Fujii N, Peiper SC. Activation of Rho and Rho-associated kinase by GPR54 and *KiSS-1* metastasis suppressor gene product induces changes of cell morphology and contributes to apoptosis [J]. *Mol Pharmacol*, 2009, 75(6): 1300-1306.
- [15] Navenot JM, Fujii N, Peiper SC. *KiSS-1* metastasis suppressor gene product induces suppression of tyrosine kinase receptor signaling to Akt, tumor necrosis factor family ligand expression, and apoptosis [J]. *Mol Pharmacol*, 2009, 75(5): 1074-1083.
- [16] Ringel MD, Hardy E, Bernet VJ, Bruch HB, Schuppert F, Burman KD, *et al.* Metastin receptor is overexpressed in papillary thyroid cancer and activates MAPK in thyroid cancer cells [J]. *J Clin Endocrin Metab*, 2002, 87(5): 2399-2400.
- [17] Lee KH, Kim JR. *KiSS-1* suppresses MMP-9 expression by activating p38 MAP kinase in human stomach cancer [J]. *Oncol Res*, 2009, 18(2-3): 107-116.
- [18] Cho SG, Li D, Stafford LJ, Luo J, Rodriguez-Villanueva M, Wang Y, *et al.* *KiSS-1* suppresses TNF alpha-induced breast cancer cell invasion via an inhibition of RhoA-mediated NF-kappa B activation [J]. *J Cell Biochem*, 2009, 15, 107(6): 1139-1149.
- [19] Cho SG, Yi Z, Pang X, Yi T, Wang Y, Luo J, *et al.* Kisspeptin-10, a *KiSS-1*-derived decapeptide, inhibits tumor angiogenesis by suppressing Sp1-mediated VEGF expression and FAK/Rho GTPase activation [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(17): 7062-7070.
- [收稿日期] 2009 - 11 - 19 [修回日期] 2010 - 02 - 28
[本文编辑] 徐红梅

· 科技动态 ·

抗体特异性识别肿瘤 EGFR 的隐蔽表位

表皮生长因子受体(EGFR)异常活化是多种肿瘤细胞的重要特征,EGFR已成为潜在的肿瘤治疗靶点,但靶向EGFR的药物也会作用到正常细胞的EGFR,限制了此类靶向药物的临床应用。

Johns 小组研究人员前期工作中制备了一系列针对胶质瘤突变型EGFR(D2-7 EGFR)的单抗,发现其中2株单抗能够结合肿瘤细胞上过表达的野生型EGFR(wt EGFR),但不能结合正常细胞上表达的wt EGFR。本研究中,该研究小组进一步利用U87MG肿瘤(表达D2-7 EGFR)裸鼠移植模型检测了这2株单抗的抗肿瘤活性。结果显示,抗EGFR单抗可使肿瘤体积明显减少。DU145前列腺癌细胞可通过自分泌方式诱导wt EGFR的表达,在DU145裸鼠移植瘤模型中,抗EGFR单抗具有更为明显的抗肿瘤效果。作者随之解析了抗EGFR单抗-EGFR复合物的晶体结构,发现抗EGFR单抗识别的表位是EGFR胞外区的一个短的半胱氨酸环。正常细胞中该EGFR表位虽然具有类似的构象,但2个半胱氨酸残基形成的链内二硫键可能通过空间位阻,阻碍与抗EGFR单抗的结合。为此,作者将这2个半胱氨酸突变为丙氨酸,结果隐蔽的EGFR表位暴露,抗EGFR单抗即可与之结合。

为什么这2株抗EGFR单抗只与肿瘤细胞上的wt EGFR结合?一种可能性是,肿瘤细胞表达错误折叠的EGFR,其表位中的二硫键是断裂的。但更合理的解释可能是,在肿瘤细胞表达EGFR的过程中,EGFR发生了构象转换,暴露了隐蔽表位,使抗EGFR单抗特异结合肿瘤细胞上异常活化的EGFR。因此,特异性靶向错误折叠或异常活化的EGFR的抗体将有助于肿瘤的治疗。

[向俊宇 摘译,李楠 审阅. Garrett TP, Burgess AW, Gan HK, Luwor RB, Cartwright G, Walker F, *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(13): 5082-5087.]