

· 论 著 ·

骨桥蛋白抑制 FHIT 表达促进结肠癌细胞增殖存活*

王 丽¹, 刘晓燕¹, 李 娟¹, 杨志惠^{2△}

(泸州医学院:1. 医学分子生物学实验室;2. 病理学教研室, 四川泸州 646000)

摘要:目的 构建骨桥蛋白(OPN)基因真核表达载体,转染人结肠癌细胞 SW480,研究其对 SW480 细胞增殖及生存能力的作用机制。方法 构建重组表达载体 pEGFP-N1/OPN,转染人结肠癌 SW480 细胞。采用 RT-PCR 及免疫印迹法(Western blotting)分别检测 SW480 细胞 OPN 基因及蛋白表达量;Cell Counting Kit-8(CCK-8)测定细胞增殖;软琼脂克隆形成实验观察细胞的锚定非依赖性生长能力。Western blotting 检测脆性组氨酸三联体基因(FHIT)和蛋白激酶 B(PKB/Akt)蛋白在 SW480 细胞中的表达。结果 重组质粒 pEGFP-N1/OPN 转染 SW480 后,OPN 基因获得很好转录,OPN 蛋白表达增高,细胞增殖率(光吸收值)显著高于转染阴性组($P < 0.05$),细胞软琼脂克隆形成速度增快,数量明显多于对照组和空载体组($P < 0.05$);FHIT 蛋白在实验组表达降低,Akt 蛋白在各组中的表达无显著性差异。结论 OPN 基因通过抑制 FHIT 基因表达,促进 SW480 细胞增殖、独立存活能力。

关键词:骨桥蛋白;结肠肿瘤;脆性组氨酸三联体基因

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.34.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)34-3583-03

OPN regulates the FHIT protein expression to promote the proliferation and survival of SW480*

Wang Li¹, Liu Xiaoyan¹, Li Juan¹, Yang Zhihui^{2△}

(1. Medical Molecular Biology Laboratory; 2. Pathology Teaching and Research Section;

Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To construct an OPN eukaryotic expression vector, and evaluate its effects on proliferation and survival in SW480 colon cancer cells in vitro, exploring the possible mechanism. **Methods** OPN gene was cloned into the eukaryotic expression vector pEGFP-N1, after sequencing, the vector was then transfected into SW480 cells. The OPN gene and protein expression in transfected cells were demonstrated by RT-PCR and Western blotting respectively. The impact on proliferation in transfected SW480 cells were investigated by CCK-8 method, anchorage independent growth was measured using soft agar assay. Western blotting was used to analyzing the protein of fragile histidine triad gene(FHIT) and protein kinase B(PKB/Akt). **Results** The levels of OPN gene and protein in colon cancer SW480 cells were distinctly increased after transfection with pEGFP-N1/OPN. The OD450 value of OPN transfection group was higher than negative control group showed by CCK-8 method ($P < 0.05$). They could also significantly increase anchorage independent growth in vitro. FHIT protein was significantly increased in SW480 cells transfected with pEGFP-N1/OPN. **Conclusion** In SW480 colon cancer cells, OPN was involved in promotion proliferation and survival, by regulating the FHIT protein expression.

Key words: osteopontin; colonic neoplasms; fragile histidine triad gene

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一种磷酸化、带负电荷、亲水性的分泌型糖蛋白^[1]。OPN 蛋白分子结构内有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)结构域,其通过 RGD 序列能与多种整合素受体结合,促进细胞趋化、黏附和迁移。研究发现,乳腺癌、胃癌和肺癌等肿瘤组织 OPN 高表达,并且与肿瘤进展、预后相关^[2-3],但具体作用机制不明确,有待进一步研究。本研究拟构建 OPN 基因真核表达载体,转染结肠癌 SW480 细胞株,探讨 OPN 对结肠癌细胞增殖及存活能力的影响及机制,现将结果报道如下。

1 材料与与方法

1.1 材料 SW480 细胞株购自中国科学院细胞库, E. coli TG1 菌株及 pEGFP-N1 载体为本实验室保存。

1.2 试剂 脂质体 Lipofectamine 2000、LA Taq with GC Buffer PCR 试剂盒、限制性内切酶、连接酶购自 Takara 公司; DNA 片段快速回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购于 Qiagen 公司; Cell Counting Kit-8(CCK-8)购自上海同仁化学研究所; OPN 鼠抗

人多克隆抗体、脆性组氨酸三联体基因(fragile histidine triad gene, FHIT)兔抗人多克隆抗体购自美国 Bioworld Technology 公司; 蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB/Akt)兔抗人多克隆抗体购自上海康成生物工程有限公司; β -actin 兔抗人多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司; 其他所用试剂均为国产或进口分析纯。

1.3 方法

1.3.1 重组表达载体 pEGFP-N1/OPN 的构建与鉴定

1.3.1.1 OPN 基因的扩增 提取结肠癌细胞株 HCT116 总 RNA,按说明书合成 cDNA。根据 OPN 序列 NM_001040060 设计引物,上游添加 Xho I 酶切位点,下游添加 BamH I 酶切位点,引物序列为 F: ACC TCG AGG CCA TGA GAA TTG CAG TGA TTT G, R: TAG GAT CCC GAT TGA CCT CAG AAG ATG CAC T,产物长度为 863 bp。

1.3.1.2 OPN 基因的克隆与测序 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,回收 863 bp 处 DNA 带,与 7Z 载体连接,转化

TG1 感受态细胞, 筛选白斑, 提取质粒, 菌落 PCR 鉴定及 BamH I 和 Xho I 双酶切鉴定后, 阳性克隆送上海生物工程有限公司测序。

1.3.1.3 重组表达载体 pEGFP-N1/OPN 的构建与鉴定 用 Xho I 和 BamH I 双酶切 7Z/OPN, 酶切产物与同样的酶双酶切的克隆载体 pEGFP-N1 连接, 构建重组表达载体 pEGFP-N1/OPN, 转化 E. coli TG1。筛选重组质粒的转化子并提取重组质粒, PCR 和酶切鉴定后, 阳性克隆送上海生物工程有限公司进行序列分析。

1.3.2 pEGFP-N1/OPN 质粒转染人结肠癌 SW480 细胞株 以含 10% 胎牛血清的 L-15 培养液, 在 37 °C 5% 的 CO₂ 培养箱中培养人结肠癌 SW480 株, 转染前 1 天以 3×10⁵ 密度接种对数期 SW480 于 6 孔培养板中, 当达到 90% 融合时, 随机分为 3 组: 空白组(用无菌水代替质粒), 对照组(加空载体 pEGFP-N1)和实验组(pEGFP-N1/OPN)。每孔加入 2 mL 无血清培养基, 分别配制溶液 1(240 μL 无血清培养基及 10 μL lip 2 000 per well, 温育 5 min)和溶液 2(240 μL 无血清培养基及 4 μg 质粒 per well), 混合溶液 1, 2 于室温下放置 20 min 后逐滴加入孔中, 摇动培养板, 轻轻混匀, 在 37 °C、5% CO₂ 中保温 6 h, 之后更换含有血清的全培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 中培养 48~72 h, 荧光显微镜下检测转染效率。RT-PCR 检测 SW480 细胞转染后 OPN 表达; 免疫印迹法(Western blotting)检测 SW480 细胞转染后 OPN 蛋白表达量。

1.3.3 转染 OPN 后 SW480 生物学功能研究

1.3.3.1 CCK-8 测定细胞增殖 取对数生长期 SW480 细胞, 以 5×10⁴ 密度接种于 96 孔培养板中, 待细胞贴壁后随机分为空白组, 空载体组和实验组, 每组 3 复孔, 按常规方式进行转染, 更换含有血清的全培养基后分别培养 24、48、72 h, 在各对应时间点取出培养板, 每孔加入 10 μL CCK-8, 37 °C 下继续孵育 2 h, 酶联免疫检测仪上以 450 nm 为检测波长, 630 nm 为参考波长测量各孔的吸光度值(A)。

1.3.3.2 软琼脂克隆形成实验 取对数生长期 SW480 细胞, 0.25% 胰蛋白酶消化吹打成单细胞, 用含 20% 胎牛血清的 L-15 培养基调整细胞密度为 1×10⁶/L。制备 0.7% 和 1.2% 的低熔点琼脂糖液, 等比例分别与 2×L-15 培养基混合成上层和下层, 加 1.5 mL 下层培养基于 6 孔板凝固后, 将约 2 000 个细胞与 1.5 mL 上层培养基混合, 加到已凝固的底层琼脂上, 形成双琼脂层, 置于 5% CO₂、37 °C 饱和湿度条件下培养 10 d, 倒置显微镜下观察, 镜下(×40)随机挑选 10 个视野计数细胞克隆数, 实验重复 3 次。

1.3.3.3 Western blotting 检测 FHIT 蛋白和 Akt 蛋白 按 Western blotting 常规操作对 3 组转染细胞行 FHIT、Akt、β-actin 蛋白检测, 结果以累积光密度比值(FHIT IOD/β-actin IOD)表示。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 实验计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SW480 细胞转染后 OPN 基因及蛋白表达 转染 48 h 后检测 OPN 基因在 SW480 中的表达, 结果显示, 空白组和空质粒转染组有非常微弱的目的条带, 而重组质粒 pEGFP-N1/OPN 转染组可见 850 bp 左右目的条带, 3 组细胞均在 263 bp 处出现 GAPDH 目的条带, 表明重组质粒 pEGFP-N1/OPN 转染之后外源 OPN 获得很好转录。转染 72 h 后检测 OPN 基因在 SW480 中的表达, 检查结果显示, SW480 细胞经 pEGFP-

N1/OPN 转染后 OPN 蛋白表达增高, 而空白组和空载体组 OPN 蛋白表达弱, 表明细胞转染成功, 见图 1、2。

2.2 细胞增殖分析 CCK-8 法检测 3 组转染细胞增殖情况, 结果显示, 随培养时间延长, 细胞增殖活性逐渐增强, 转染 pEGFP-N1/OPN 质粒组与对照组和空载体组相比, 任何时间段转染细胞增殖程度均出现明显增强, 表明 OPN 具有促进 SW480 细胞增殖的作用, 而对照组和空载体组间的差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 1。

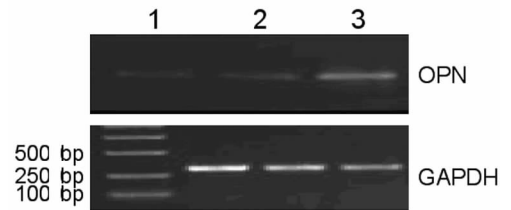
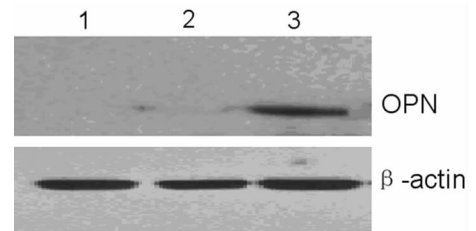


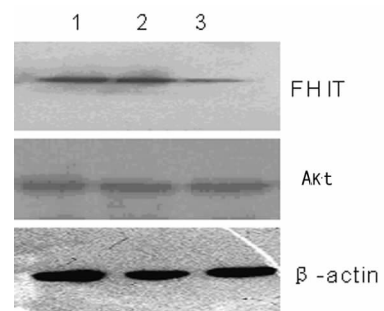
图 1 RT-PCR 检测 OPN 转染 SW480 细胞后的表达



1: 空白组; 2: 空载体 pEGFP-N1 转染组; 3: 重组质粒 pEGFP-N1/OPN 转染组。

图 2 Western blotting 检测 OPN 转染 SW480 细胞后的表达

2.3 软琼脂克隆形成实验 本实验发现, 转染 pEGFP-N1/OPN 后, SW480 细胞软琼脂克隆形成速度增快, 数量明显多于对照组和空载体组, 3 组细胞每视野平均克隆个数分别为: 21.00±3.16, 14.40±2.30, 14.60±1.14, 差异有统计学意义($F = 12.74, P < 0.05$)。



1: 空白组; 2: 空载体 pEGFP-N1 转染组; 3: 重组质粒 pEGFP-N1/OPN 转染组。

图 3 Western blotting 检测 OPN 转染 SW480 细胞后 FHIT 和 Akt 蛋白的表达

2.4 Western blotting 检测 FHIT 蛋白和 Akt 蛋白 FHIT IOD/β-actin IOD 在空白组、空载体组和实验组分别为 0.156±0.008、0.165±0.008、0.044±0.006, 比较差异有统计学意义($F = 248.47, P = 0.000$), 两两比较显示实验组与空白组、空载体组均有显著性差异, 空白组和空载体组间变化不明显($P = 0.186$); Akt 蛋白在 3 组间的表达分别为 0.022±0.004、0.024±0.003、0.024±0.002, 组间差异无统计学意义($F = 0.205, P = 0.820$), 见图 3。

表 1 CCK-8 法检测转染对人结肠癌细胞 SW480 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	A ₄₅₀		
	24 h	48 h	72 h
空白组	0.277±0.010	0.335±0.030	0.457±0.051
空载体组	0.232±0.023	0.323±0.028	0.424±0.027
实验组	0.358±0.038	0.614±0.055	0.877±0.025
F	17.763	51.512	147.534
P	0.003	0.000	0.000

3 讨 论

肿瘤的发生、发展与所处的微环境密切相关,因此细胞外基质蛋白对肿瘤的发生、发展至关重要。新近发现一些细胞外基质蛋白如 OPN 等,在促进肿瘤细胞生长、存活、侵袭和抗凋亡等方面都发挥着重要的作用。OPN 与其受体结合后激活细胞内相应的信号通路引起相应基因表达的改变,促进肿瘤侵袭转移^[4-5]。OPN 与结肠癌侵袭转移密切相关,但 OPN 促进结肠癌侵袭转移的机制仍不明确,有待进一步研究^[6]。

本研究结果显示,重组质粒 pEGFP-N1/OPN 转染 SW480 后,OPN 基因获得很好转录,OPN 蛋白表达增高,OPN 能促进 SW480 细胞增殖,软琼脂克隆形成速度增快,数量明显增多。为研究其分子机制,Western blotting 检测 FHIT 蛋白和 Akt 蛋白在转染 OPN 后 SW480 细胞中的表达。结果显示,与空白组和空载体组相比,FHIT 蛋白在实验组中表达显著降低;而 Akt 蛋白在各组中的表达差异无统计学意义($P>0.05$)。

Akt 是 PI3K 的主要下游效应分子之一,可通过调节包括核因子- κ B 在内的转录因子参与多种生命活动。研究表明,PI3K/Akt 途径的活化参与多种肿瘤的发生,抑制该通路可诱导细胞程序性死亡和抑制肿瘤的生长。有研究显示,肿瘤细胞在面临生存压力时,OPN 通过与 $\alpha v \beta 3$ 整合素结合,增强 Akt Ser473 位点的磷酸化作用,激活 PI3K/Akt 途径,拮抗生存压力,提升细胞存活能力。根据本实验结果,OPN 并没有引起 Akt 蛋白表达量增加。

FHIT 位于人类 3 号染色体短臂 3p14.2。研究表明,FHIT 在人类许多肿瘤组织或细胞系中呈现高频率异常,在许多肿瘤组织或肿瘤细胞株中,FHIT 基因呈现多发性、广泛性

的纯合性或杂合性缺失,为多种肿瘤的候选抑制基因^[7-8]。作为肿瘤抑制基因,它的缺失或失活将导致肿瘤的发展和恶性度的升高,与肿瘤的发生、发展有关。本实验结果显示,OPN 转染组 FHIT 蛋白表达降低,故推测 OPN 通过抑制 FHIT 表达而促进结肠癌细胞增殖、存活。

本研究构建真核表达载体 pEGFP-N1/OPN,转染人结肠癌细胞 SW480 细胞。结果显示 OPN 通过降低 FHIT 蛋白表达促进人结肠癌细胞 SW480 增殖存活能力,促进肿瘤发生、发展。

参考文献:

- [1] Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions[J]. *FASEB J*, 1993, 7(15): 1475-1482.
- [2] Coppola D, Szabo M, Boulware D. Correlation of osteopontin protein expression and pathological stage across a wide variety of tumor histologies[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(1 Pt 1): 184-190.
- [3] Uhlmann ME, Georges RB, Boleij A, et al. Influence of osteopontin expression on the metastatic growth of CC531 rat colorectal carcinoma cells in rat liver[J]. *Cancer Gene Ther*, 2011, 18(11): 795-805.
- [4] Chakraborty G, Jain S, Behera R, et al. The multifaceted roles of osteopontin in cell signaling, tumor progression and angiogenesis[J]. *Curr Mol Med*, 2006, 6(8): 819-830.
- [5] Rittling SR, Chambers AF. Role of osteopontin in tumour progression[J]. *Br J Cancer*, 2004, 90(10): 1877-1881.
- [6] Georges R, Adwan H, Zhivkova M, et al. Regulation of osteopontin and related proteins in rat CC531 colorectal cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2010, 37(2): 249-256.
- [7] Siprashrili Z, Sozzi G, Barnes LD, et al. Replacement of Fhit in cancer cells suppresses tumorigenicity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(25): 13771-13776.
- [8] 卢德成, 罗佐杰, 洗晶. 肾上腺皮质肿瘤增殖抗原和脆性组氨酸二联体表达的相关性及意义[J]. *中国综合临床*, 2008, 24(8): 753-754.

(收稿日期: 2012-06-13 修回日期: 2012-09-12)

(上接第 3582 页)

genotyping single nucleotide polymorphisms[J]. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(12): 930-942.

- [4] Engelberg D. Stress-activated protein kinases-tumor suppressors or tumor initiators[J]. *Semin Cancer Biol*, 2004, 14(4): 271-282.
- [5] Cheung CC, Ezzat S, Freeman JL, et al. Immunohistochemical diagnosis of papillary thyroid carcinoma[J]. *Mod Pathol*, 2001, 14(4): 338-342.
- [6] Sigurdson AJ, Landa CE, Bhatti P, et al. Thyroid nodules, polymorphic variants in DNA repair and RET-related genes, and interaction with ionizing radiation exposure from nuclear tests in Kazakhstan[J]. *Radiat Res*, 2009, 171(1): 77-88.
- [7] Lang BH, Lo CY, Chan WF, et al. Staging systems for follicular thyroid carcinoma: application to 171 consecutive patients treated in a tertiary referral centre[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2007, 14(11): 29-42.

- [8] Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(4): 292-306.
- [9] Castro P, Reboeh AP, Snares RJ, et al. PAX8-PPAR-gamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(1): 213-220.
- [10] Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, et al. PAX8-PPARG-gamma fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected][J]. *Science*, 2000, 289(5483): 1357-1360.
- [11] Namba H, Yamashita S. Gene abnormalities in thyroid cancer[J]. *Nippon Rinsho*, 2007, 65(11): 1967-1972.
- [12] Tartari CJ, Donadoni C, Manieri E, et al. Dissection of the RET/ β -catenin interaction in the TPC1 thyroid cancer cell line[J]. *Am J Cancer Res*, 2011, 1(6): 716-725.

(收稿日期: 2012-06-09 修回日期: 2012-08-22)