

KAI1 蛋白对 786-O 细胞增殖及凋亡的影响*

陈峰, 鲁伟[△], 窦红珍, 游刚, 付云锐, 谢鑫

(重庆市南川区人民医院泌尿外科 408400)

摘要:目的 观察转染抑癌基因 KAI1 后对人肾透明细胞癌 786-O 细胞的增殖及凋亡等生物学效应的影响。方法 通过慢病毒载体将 KAI1 基因转染入 786-O 细胞中, 使用荧光显微镜观察 KAI1 基因转入情况; 应用噻唑蓝 (MTT) 方法检测慢病毒载体携带的 KAI1 基因转染 786-O 细胞后的体外增殖情况; 流式细胞技术 (FCM) 检测 KAI1 诱导的细胞凋亡情况。结果 当慢病毒载体转染的量为 MOI-10, 在荧光显微镜下可观察到转染后细胞有大量荧光表达, MTT 及 FCM 检测 KAI1 对 786-O 细胞有显著的抑制作用, 并可诱发 786-O 细胞凋亡的发生。结论 KAI1 通过启动 786-O 细胞发生凋亡而抑制了肿瘤细胞的增殖。

关键词: kangai-1 蛋白; 786-O; 细胞增殖; 细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.13.022

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)13-1594-03

Experiment research of KAI1 on the proliferation and apoptosis of human renal cell carcinoma cell line 786-O*

Chen Feng, Lu Wei[△], Dou Hongzhen, You Gang, Fu Yunrui, Xie Xin

(Department of Neurosurgery, the People's Hospital of Nanchuan District, Chongqing 408400, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of KAI1 on renal cell carcinoma 786-O cells and apoptosis, study on the effect of HAI1 on 786-O growth inhibition. **Methods** The 786-O cells were treated with viral vector carried HKAI1 gene. The MTT test was used to evaluate the proliferation inhibition of HAI1 on 786-O cells. The flow cytometry were utilized to observe and detect the apoptosis of 786-O cells induced by KAI1. **Results** When the amount of lentiviral vector-transfected for MOI-10, could be observed under a fluorescence microscope after transfection tumor cell fluorescence expression, MTT and FCM detection shows that the KAI1 could significantly inhibit the proliferation and induce apoptosis of 786-O cells. **Conclusion** The proliferation inhibiting effects of KAI1 on human renal cell carcinoma cell line 786-O may relate to the apoptosis.

Key words: kangai-1 protein; 786-O cell; proliferation; apoptosis

肾透明细胞癌 (clear cell renal cell carcinoma, CCRCC) 是肾小管上皮细胞发生一系列的链锁基因突变或功能损伤所造成的癌变过程^[1]。CCRCC 是肾癌中最为常见的病理学亚型, 大约占肾癌的 60%~85%^[2]。因此, CCRCC 的致病机制的研究对人类抗肾癌有着重要的作用。

有研究表明^[3], 趋化因子受体 CXCR-4 是一种缺氧性反应分子, 抑癌基因 VHL 可以对 CXCR-4 进行反向调节, 使其表达降低, 当 VHL 抑癌基因失活时可使肿瘤通过依赖缺氧诱导因子 (HIF) 依赖性 CXCR-4 发生转移, 因此, CXCR-4 的表达关系到 CCRCC 的浸润、转移。近年来, 研究证实 KAI1 也是一种肿瘤转移抑制基因, 在肿瘤的转移、增殖方面有明显的作用^[4]。KAI1 最早在前列腺癌细胞中被发现, 因此, 被称为前列腺癌转移抑制基因^[5]。当 KAI1 的正常功能被破坏或丧失时, 可导致肿瘤细胞的黏附力、侵袭性、移动性及分化程度受到影响。目前, 研究已证实, KAI1 在非小细胞肺癌、结直肠癌、鼻咽癌、胃癌等多种肿瘤细胞的转移、增殖及侵袭过程中发挥重要作用^[6-8]。但是, KAI1 在肾透明细胞癌的侵袭、增殖及转移中是否发挥作用, 尚未有研究进行证实。本研究拟通过慢病毒转染 KAI1 基因到肾癌细胞株中, 观察其对人肾透明细胞癌 786-O 的增殖、转移、侵袭及凋亡的影响, 为本研究后续的研究奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 肾透明细胞癌 786-O 细胞株源自中国医学科学院基础医学研究所。大肠埃希菌 DH5 α 源自北京奥科生物技术有限公司, pCMV 慢病毒载体源自上海北诺生物科技有限公司。兔抗人 KAI1 抗体及羊抗兔辣根过氧化物酶二抗均购自美国 Santa Cruz 公司。噻唑蓝 (MTT)、二甲亚砜 (DMSO) 购自上海 Sigma 公司, RPMI-1640 培养基购自 Hyclone 公司。胎牛血清购自杭州四季青公司。Annexin V/FITC 凋亡试剂盒购自南京凯基生物公司。本实验分为 3 组: 转染 KAI1 基因的作为实验组 (pCMV-KAI1)、转染 pCMV 空载体的为阴性对照组 (pCMV-NEG)、未进行处理的 786-O 细胞为空白对照组 (CON)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 786-O 细胞接种于细胞培养瓶中, 用含有 20% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液培养, 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 的恒温培养箱中培养。每 2~3 d 传代一次, 细胞消化使用胰酶, 之后进行培养, 并取对数生长期的 786-O 细胞进行培养。

1.2.2 慢病毒感染及感染率的检测 慢病毒载体感染 786-O 细胞, 具体过程参见文献^[9], 786-O 细胞接种于 24 孔板, 待细胞生长至约 80% 融合时, 分别加入不同效价的 pCMV-KAI1, 培养 6 h 后弃上清液, 换含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养

* 基金项目: 重庆市医学科研计划基金资助项目 (2010-2-474)。 作者简介: 陈峰 (1967-), 主任医师, 本科, 主要从事泌尿外科工作。

[△] 通讯作者, Tel: 13452568468; E-mail: lulu120zhang@163.com。

液继续培养 48 h, 荧光显微镜下观察细胞转染情况, 计算感染率。感染率(%) = 荧光细胞数/全部细胞数 × 100%。

1.2.3 MTT 实验 将对数生长期的 786-O 细胞数量调整为大约 1×10^5 /细胞培养瓶, 并将其接种于 96 孔细胞培养板, 每孔的接种量为 100 μ L, 在细胞培养箱中培养 24 h 后, 分别转染 pCMV-KAI1 载体及 pCMV 空载体, 空白对照组使用同体积的 PBS 溶液。继续静止培养 24 h, 加入 10 mg/mL 的 MTT 试剂, 培养 3 h 后加入 DMSO, 在酶标仪 540 nm 波长出检测每一孔的吸光度值 A。

786-O 细胞抑制率 = (1 - 实验组孔平均 A 值) / 空白对照组空 A 值 × 100%。

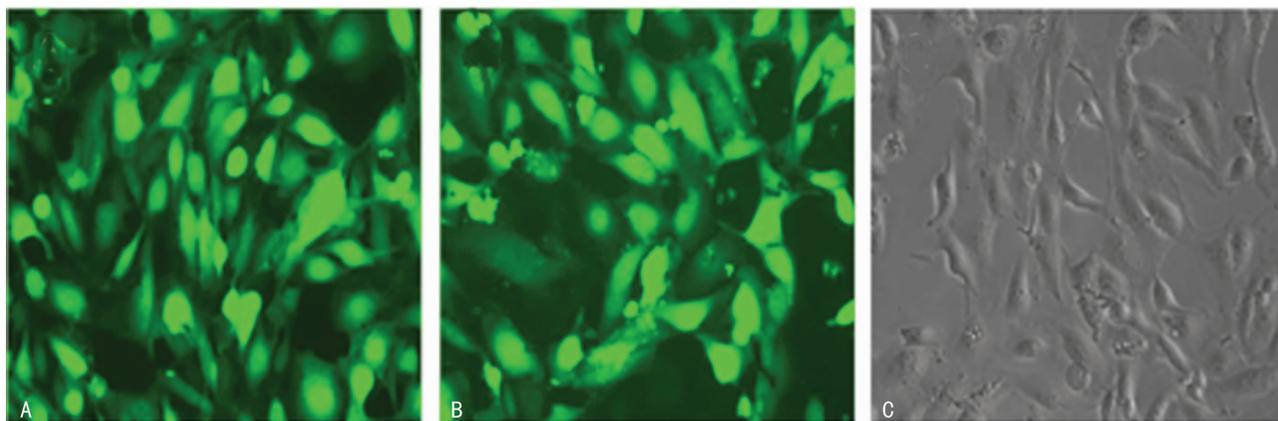
1.2.4 流式细胞仪检测 将对数生长期的 786-O 细胞接种于

六孔板中, 保证每孔细胞数大约为 2×10^4 /孔, 培养 24 h 后加入 pCMV-KAI1 表达载体, 继续培养 24 h 后用胰酶进行消化, 并收集 786-O 细胞。根据 Annexin V/FITC 凋亡检测试剂盒的使用说明书进行细胞凋亡的检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析处理, 计量资料 $\bar{x} \pm s$ 进行表示。采用单因素方差分析进行组间比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 慢病毒转染效率测定 慢病毒载体感染细胞 48 h, 由于 pCMV 携带有 GFP 标签, 所以, 在荧光显微镜下观察慢病毒载体转染效率。慢病毒载体转染的量为 MOI-10, 实验组可见大量的荧光表达, 而空白对照组中未见荧光表达, 见图 1。

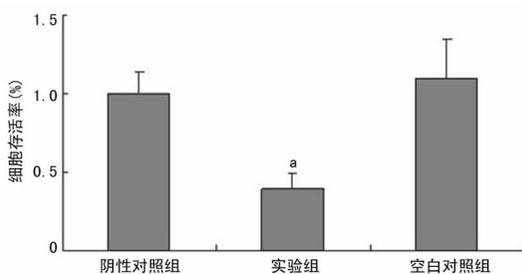


A: 实验组; B: 阴性对照组; C: 空白对照组。

图 1 倒置荧光显微镜观察慢病毒转染 786-O 细胞的转染效率 (荧光显微镜 × 400)

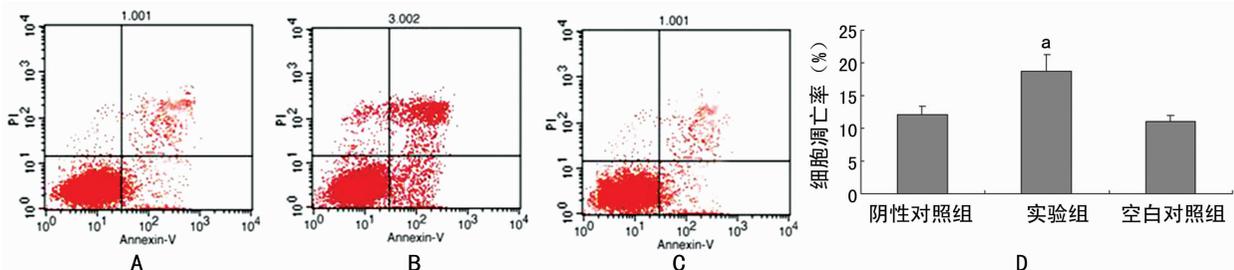
2.2 KAI1 的表达对 786-O 细胞增殖活性的影响 实验组转染 pCMV-KAI1 载体后, 通过 MTT 法检测出实验组分别与阴性对照组和空白对照组比较, 786-O 细胞的增值能力显著下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其细胞存活率为 39.43%, 见图 2。

2.3 KAI1 促发 786-O 细胞凋亡的发生 由于 MTT 结果证实 KAI1 高表达使 786-O 细胞的增殖活性降低, 作者推测活性的降低可能是由于 KAI1 诱发了细胞凋亡的发生, 因此, 流式细胞技术 (FCM) 检测细胞凋亡情况。结果显示, KAI1 的表达显著的增加了 786-O 细胞凋亡的数量, 与阴性对照组和空白对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。



a: $P < 0.05$, 分别与阴性对照组和空白对照组比较。

图 2 KAI1 对 786-O 细胞增殖活性的影响



A: 阴性对照组; B: 实验组; C: 空白对照组; D: 凋亡分析图。

图 3 流式细胞技术检测 KAI1 对 786-O 细胞凋亡的影响

3 讨 论

CCRCC 是最为常见的泌尿系统恶性肿瘤, 成人肾癌的发

病中有大约三分之二为 CCRCC, 其 5 年平均生存率一般不足 20%^[10], 同时随着人们生活水平的不断提高, 其发病率也在不

断升高。CCRCC 不同于一般肿瘤,在临床上应用放疗及化疗的方法治疗效果较差,因此,大多的 CCRCC 患者最终都必须进行手术切除。但是,存在的问题是 CCRCC 的发病比较隐蔽,症状表现不明显,在确诊时可能已经是肿瘤晚期,发生了大量增殖、扩散,一般预后不佳^[11]。尽管 CCRCC 转移率较高、容易扩散,但其发生发展的分子机制目前尚未十分明确,因此,发现 CCRCC 增殖及转移的分子机制对于 CCRCC 的控制及寻找其转移的早期分子标记具有十分重要的意义。

研究显示,KAI1 能够抑制肿瘤的增殖及转移,在分离的肿瘤细胞中,KAI1 蛋白水平显著降低。这说明 KAI1 与肿瘤细胞的增殖间进行着激烈的博弈,此消彼长。本研究中,作者首次尝试探讨 KAI1 蛋白在 CCRCC 786-O 细胞增殖及细胞凋亡中的作用。

慢病毒载体是以慢病毒的基因组结构框架为模版,将病毒复制及致病的有关基因敲除,并将某些分子标记物及治疗性基因插入,从而组建而成为慢病毒基因治疗工具。慢病毒载体具有转染效率高、在细胞及动物体内维持时间长的特点,同时能够感染多种哺乳动物细胞^[12]。本研究选择慢病毒载体 p-CMV,其带有绿色荧光标签,可以标记 KAI1 从而检测其在 786-O 细胞中的表达效率。GFP 绿色荧光显示,在实验组细胞中有 80%左右的细胞呈现出了 GFP 表达阳性,证明 KAI1 在 786-O 细胞中的表达效率较高。

MTT 结果显示,786-O 细胞转染了 pCMV-KAI1 载体后,786-O 细胞的活性显著降低 ($P < 0.01$),这说明 CCRCC 癌细胞 786-O 的增殖受到 KAI1 表达的影响,这与 Shi 等^[13]报道的结果相似。Uchida 等^[14]应用免疫组织化学法对食管癌和正常食管中 KAI1 表达进行研究,显示食管癌组织中 KAI1 的表达显著降低,这也证实 KAI1 的表达可以保证正常食管不发生癌变。由于 786-O 增殖活性降低,本研究推测可能是由于 786-O 细胞发生了细胞凋亡。因此,本研究应用 FCM 检测了 KAI1 表达后 786-O 细胞的凋亡情况,结果证实 KAI1 表达细胞与阴性对照组和空白对照组相比,早期凋亡数和晚期凋亡数都显著降低,说明 KAI1 对 786-O 细胞增殖的抑制作用可能是通过启动细胞凋亡而实现的。Li 等^[15]也证实,KAI1 在非小细胞肺癌中的表达可诱导细胞凋亡的发生,并且抑制了细胞增殖。因此,KAI1 蛋白在 786-O 细胞中的表达,可促进肿瘤细胞的凋亡,从而抑制肿瘤细胞的增殖。因此,术后 KAI1 蛋白的常规检查可能对诊断和判断预后有一定的价值。对其致病机制的进一步研究,可以为 CCRCC 的治疗提供新的靶点。

参考文献:

[1] Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells[J]. *N Engl J Med*, 2002, 347(20):1593-1603.

[2] Gigante M, Li G, Ferlay C, et al. Prognostic value of serum CA9 in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma under targeted therapy [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(12):5447-5451.

[3] Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, et al. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour

suppressor pVHL[J]. *Nature*, 2003, 425(6955):307-311.

[4] Jiang WX, Song BG, Wang PJ. Expression of nm23, KAI1 and spiral computed tomography findings in primary gallbladder carcinoma[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2009, 122(21):2666-2668.

[5] Dong JT, Lamb PW, Rinker-Schaeffer CW, et al. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate Cancer on human chromosome 11p11.2[J]. *Science*, 1995, 268(5212):884-886.

[6] 吕铮, 阎继东, 张志勇, 等. KAI1 和 Smad4 在非小细胞肺癌的表达及临床病理意义[J]. *重庆医科大学学报*, 2012, 37(11):968-971.

[7] Malik FA, Sanders AJ, Jones AD, et al. Transcriptional and translational modulation of KAI1 expression in ductal carcinoma of the breast and the prognostic significance [J]. *Int J Mol Med*, 2009, 23(2):273-278.

[8] 季润元, 赵玉芳, 束晓明, 等. 胃癌组织 KAI1/CD82、MRP1/CD9 的表达及临床意义[J]. *江苏医药*, 2012, 38(14):1640-1642.

[9] Ghosh SS, Gopinath P, Ramesh AA, et al. Denoviral vectors: a promising tool for gene therapy[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2006, 133(1):9-30.

[10] Li JW, Shen Y, Zhang YG. Experiment research of curcumin on the proliferation and apoptosis of human renal cell carcinoma cell line 786-O[J]. *中国医药导报*, 2012, 9(11):19-21.

[11] Seligson D, Janzen N, Yu H, et al. Using tumor markers to predict the survival of patients with metastatic renal cell carcinoma[J]. *J Urol*, 2005, 173(5):1496-1501.

[12] Nishitsuji H, Ikeda T, Miyoshi H, et al. Expression of small hairpin RNA by lentivirus-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary non-dividing cells[J]. *Microbes Infect*, 2004, 6(1):76-85.

[13] Shi H, Deng JH, Zheng SB, et al. Lentivirus mediated clusterin silence inhibits proliferation and promotes apoptosis in human renal cell Cancer line 786-O in vitro[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 8(1):35-40.

[14] Uchida S, Shimada Y, Watanabe G, et al. Motility-related protein (MRP-1/CD9) and KAI1/CD82 expression inversely correlate with lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 1999, 79(7/8):1168-1173.

[15] Li C, Wang ZY, Wang P, et al. Expression of metastasis suppressor gene KAI1 in non-small cell lung Cancer and its significance[J]. *Chinese Journal of General Practice*, 2010, 8(1):15-17.