

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.09.001

阿霉素诱导肝细胞黏附分子基因下调肾癌细胞
细胞分裂周期基因 2 的表达徐 新¹, 罗春丽¹, 吴小候², 贾 蓓³, 刘 琪¹, 陶 佳¹, 王秋菊¹

(重庆医科大学 1. 检验医学院; 2. 附属第一医院泌尿外科; 3. 附属第一医院感染科, 重庆 400016)

【摘 要】目的:研究阿霉素联合 hepaCAM 基因对肾癌细胞 786-0 生物学的影响。方法:阿霉素处理后,用腺病毒向肾癌 786-0 导入肝细胞黏附分子(Hepatocyte cell adhesion molecule, hepaCAM),以噻唑蓝(Methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)测抑制率,流式细胞术(Flow cytometer, FCM)测细胞周期,实时荧光定量聚合酶链反应(Real time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)、Western blot 检测 hepaCAM 和细胞分裂周期基因 2(Cell division cycle 2, cdc2)的 mRNA 及蛋白水平。结果:MTT 显示:与对照组相比,实验组抑制率显著升高($P<0.01$)。FCM 证实:实验组出现明显 G₂/M 期阻滞。RT-qPCR 及 Western blot 检测到实验组 cdc2 mRNA 及蛋白水平显著下调($P<0.01$)。结论:阿霉素处理后,导入 hepaCAM 基因,可引起细胞抑制率显著升高及 G₂/M 期阻滞,这可能与阿霉素诱导 hepaCAM 下调 cdc2 的表达有关。

【关键词】肾癌;肝细胞黏附分子;阿霉素;细胞周期;细胞分裂周期基因 2

【中国图书分类法分类号】R322.6

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-03-03

Down-regulation of cell division cycle 2 expression in renal carcinoma cell by
Adriamycin induced hepatocyte cell adhesion molecule geneXU Xin¹, LUO Chunli¹, WU Xiaohou², JIA Bei³, LIU Qi¹, TAO Jia¹, WANG Qiuju¹

(1. College of Laboratory Medicine; 2. Department of Urinary Surgery, the First Affiliated Hospital; 3. Department of Infectious Disease, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the biological effects of Adriamycin combined with hepatocyte cell adhesion molecule (hepaCAM) gene on renal carcinoma cell 786-0. Methods: After treated with Adriamycin, 786-0 cells were infected with adenovirus pAdH5-hepaCAM or pAdH5. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to observe the inhibition rates of cells in different groups. Flow cytometer (FCM) was used to analyze the changes of cell cycle. Real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blot were used to detect the mRNA and protein expressions of hepaCAM and cell division cycle 2 (cdc2). Results: MTT assay showed that inhibition rate was markedly increased in ADM/pAdH5-hepaCAM group than in ADM/pAdH5 group and pAdH5-hepaCAM group ($P<0.01$). In FCM assay, remarkable G₂/M phase arrest was seen in ADM/pAdH5-hepaCAM group. RT-qPCR and Western blot showed that mRNA and protein levels of cdc2 were down-regulated in ADM/pAdH5-hepaCAM group ($P<0.01$). Conclusions: When gene transfer used after Adriamycin treatment, remarkable growth inhibition and G₂/M phase arrest can be observed, which may associate with the down-regulation of cdc2 by Adriamycin induced hepaCAM gene.

【Key words】renal carcinoma; hepatocyte cell adhesion molecule; Adriamycin; cell cycle; cell division cycle 2

肾癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,在成人恶性肿瘤中所占比例高达 3%^[1]。我国肾癌发病率仅次于膀胱癌,居泌尿系肿瘤第 2 位,近年来有明显的增加趋势,是威胁人民健康的主要肿瘤之一。以往对原发性肾癌术后进行的放疗、化疗或免疫治

疗都存在着各种不足,致使肾癌的复发率居高不下。据报道,肾癌根治性手术后仍有约 40% 的患者会出现肿瘤转移病灶^[2],因此,对肾癌术后治疗新方法的探索显得尤为重要。

肝细胞黏附分子(Hepatocyte cell adhesion molecule, hepaCAM)是一种免疫球蛋白类细胞黏附分子,具有抑制肿瘤生长、增殖的作用,其在多种肿瘤组织中表达水平均显著降低,上调其表达可显示出显著的肿瘤抑制效应^[3-5]。本课题组的前期研究显

作者介绍:徐 新(1983-),女,硕士,

研究方向:泌尿生殖系统肿瘤。

通信作者:罗春丽,女,教授,Email:luochunli79@126.com。

基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(编号:81072086)。

示:hepaCAM 基因在肾癌组织及肾癌细胞系 786-0 中同样呈低表达,且 786-0 细胞重新表达 hepaCAM 基因后出现了明显的生长抑制^[6],并通过细胞实验证实:这种作用可能是通过抑制 c-myc 产生的^[7]。

细胞分裂周期基因 2 (Cell division cycle 2, cdc2)是与细胞周期调节密切相关的一类基因,其最初在酵母中被发现。它与细胞周期蛋白 CyclinB1 结合能调控细胞周期由 G₂ 期至 M 期过渡,抑制其表达可引起 G₂/M 期阻滞。本次研究利用腺病毒将外源性 hepaCAM 基因导入肾癌细胞系 786-0 中,探讨阿霉素联合 hepaCAM 基因对肾癌细胞 786-0 增殖及细胞周期的影响,为 hepaCAM 的临床运用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

腺病毒质粒 pAdH5-hepaCAM 及阴性对照 pAdH5 由重庆医科大学附属第一医院感染科贾蓓副教授馈赠。肾癌细胞系 786-0 及 HEK-293 由本室保存。限制性内切酶 *Pac* I 购自 New England Biolabs 公司。Trizol、逆转录试剂盒、SYBR Green II 荧光定量 PCR 试剂盒及 DNA marker 购自宝生物工程(大连)有限公司,引物由 Invitrogen 公司合成。阿霉素注射液 10 mg/瓶购于辉瑞制药(无锡)有限公司。噻唑蓝(Methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、胰酶、二甲亚砜购自 Sigma 公司。hepaCAM 抗体购自 Lifespan Biosciences 公司。cdc2 及 β -actin 抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 腺病毒质粒 pAdH5-hepaCAM 及阴性对照 pAdH5 的鉴定及腺病毒的包装、扩增 取 1 μ g pAdH5-hepaCAM 及 pAdH5 质粒 DNA, *Pac* I 酶切 2 h 后,琼脂糖凝胶电泳鉴定。确定腺病毒构建成功后,再取 5 μ g pAdH5-hepaCAM 及 pAdH5 质粒 DNA, *Pac* I 酶切线性化后,转染至 HEK-293 细胞内,14 d 后收获细胞。反复冻融 3 次,离心取病毒上清,感染 HEK-293 细胞进行病毒大量扩增。扩增后病毒于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.2 细胞培养及腺病毒感染 待 786-0 细胞复苏后,置于含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液中,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。当培养瓶中细胞长至 70% 时,弃去旧培养液,向培养瓶中加入无血清的 RPMI1640 培养液,滴入病毒,放入培养箱培养,半小时后将培养瓶中的培养液轻轻摇匀,继续培养,1.5 h 后向培养瓶中加入等量的含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液,感染 24 h 后观察细胞病变。将细胞分为 3 组:实验组(阿霉素/pAdH5-hepaCAM 组)、药物对照组(阿霉素/pAdH5 组)和基因对照组(pAdH5-hepaCAM 组),以备后续实验。

1.2.3 实时荧光定量聚合酶链反应(Real time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测 hepaCAM 基因和 cdc2 基因的 mRNA 含量 用 Trizol 提取不同处理组的总 RNA,用逆转录试剂盒将所提 RNA 逆转录为 cDNA,并于 -20 $^{\circ}$ C 备用。根据 hepaCAM、cdc2、 β -actin 的序列设计其引物,以 β -actin 为内参。hepaCAM 正义链:5'-TACTGTAGATGTGCCCATTTCG-3',反义链:5'-CTTCTGGTTTCAGGCGGTC-3',产物长度 461 bp;cdc2 正义链:5'-AAAGTGAAGACGAAGGGGT-3',反义链:5'-CTGGAGTTGAGTAACGAGC-3',产物长度 441 bp; β -actin 正义链:5'-ACGAGACCACCTTCAACTCCATC-3',反义链:5'-TAGAAGCATTTCGCGGTGGACGA-3',产物长度 304 bp。hepaCAM 的 PCR 扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环。Cdc2 和 β -actin 的 PCR 扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环。

1.2.4 MTT 检测各组 786-0 细胞的增殖能力 将细胞接种于 96 孔板中,每孔 3 000 个细胞,接种首日细胞贴壁后设为第 1 个检测点,以后每 24 h 检测 1 次,共连续检测 5 d。测定时每孔加入 20 μ l MTT(5 mg/ml),继续培养 4 h 后弃去培养液,每孔再加入 150 μ l 的 DMSO,于摇床上振荡 10 min,使蓝紫色结晶完全溶解。用酶联免疫检测仪在 490 nm 处检测其吸光度 A 值,计算出各组的细胞抑制率,计算公式为:抑制率(%)=(1-某组某日所测得的平均吸光度 A 值/该组首日测得的平均吸光度 A 值) $\times$ 100%。

1.2.5 流式细胞术(Flow cytometer, FCM)检测细胞周期 先将 786-0 细胞用阿霉素处理,清洗去除死细胞后感染腺病毒,48 h 后,将 3 组细胞用不含 EDTA 的胰酶分别消化下来,吹散成单个细胞,离心后将上清弃去,磷酸盐缓冲液(Phosphate buffer solution, PBS)清洗 3 次,70% 的预冷乙醇在 4 $^{\circ}$ C 中固定过夜后送检。

1.2.6 Western blot 检测 hepaCAM 及 cdc2 的蛋白表达 786-0 细胞用预冷的 PBS 洗 3 遍,加入预冷的 RIPA 裂解液,提取细胞总蛋白。测定蛋白浓度后,加入适量蛋白上样缓冲液,煮沸 5 min 后于 -80 $^{\circ}$ C 保存。SDS-PAGE 凝胶电泳时每孔加入等量蛋白,转膜后用 5% 脱脂奶粉常温下封闭 4 h,一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜,洗膜后加入生物素标记的二抗,室温孵 1 h,最后化学发光法显色。

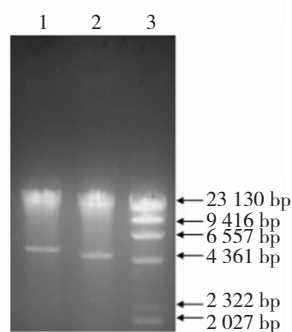
1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,先行方差分析,如果总体差异有统计学意义,再用 SNK 检验进行两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 腺病毒质粒的酶切鉴定

pAdH5-hepaCAM 及 pAdH5 腺病毒质粒经 *Pac* I 酶切得出两条带,大小约为 30 kb 和 4.5 kb,证明腺病毒质粒构建成功(图 1)。



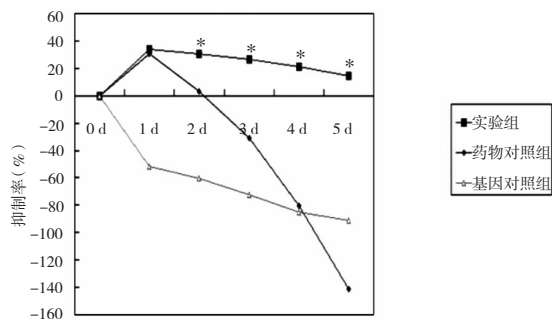
1. pAdH5-hepaCAM; 2. pAdH5; 3. DNA Marker

图 1 腺病毒质粒酶切鉴定结果

Fig.1 Identification of adenovirus plasmid by restriction enzyme digestion

2.2 阿霉素与携带野生型 hepaCAM 基因的腺病毒联合运用,对肾癌细胞 786-0 增殖能力的影响

MTT 实验结果显示:在先给予阿霉素处理再导入基因的各組中,实验组 786-0 细胞的抑制率要显著高于药物对照组及基因对照组(图 2),数据统计分析如表 1 所示。



*:与药物对照组及基因对照组相比, $P < 0.01$

图中第 1 个 24 h, 实验组及药物对照组细胞予以阿霉素 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 处理;第 2 个 24 h, 撤除阿霉素, 实验组及基因对照组导入 hepaCAM 基因。实验组第 2、3、4、5 天的抑制率显著高于药物对照组及基因对照组

图 2 先予阿霉素处理再感染腺病毒的抑制率

Fig.2 Inhibition rates after treated with Adriamycin and adenovirus

表 1 MTT 数据的重复测量方差分析表

Tab.1 Variance analysis of MTT results after repeated measures

变异来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
不同处理组	2	75 838.965	37 919.483	4 496.693	$P < 0.01$
不同时间点	4	34 923.556	8 730.889	1 194.903	$P < 0.01$
不同处理组 $\times$ 不同时间点	8	26 508.657	3 313.582	453.494	$P < 0.01$
组间误差	6	50.596	8.433		
组内误差	24	175.363	7.307		

2.3 阿霉素与携带野生型 hepaCAM 基因的腺病毒联合运用时,786-0 细胞周期的变化

FCM 结果显示:当先给予阿霉素处理,后导入基因时,实验组 786-0 细胞 G_2/M 期的值为 $(34.53 \pm 1.19)\%$,与药物对

照组 $(15.79 \pm 0.54)\%$ 及基因对照组 $(22.65 \pm 1.17)\%$ 相比,显示出了明显差异 ($F=261.653, P < 0.01$) (图 3)。

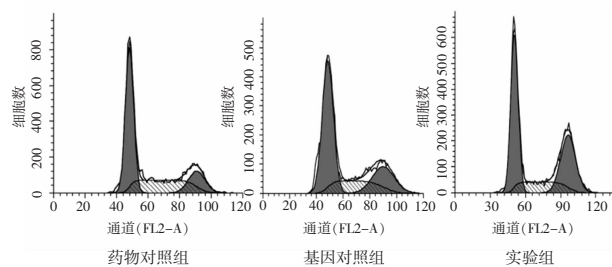
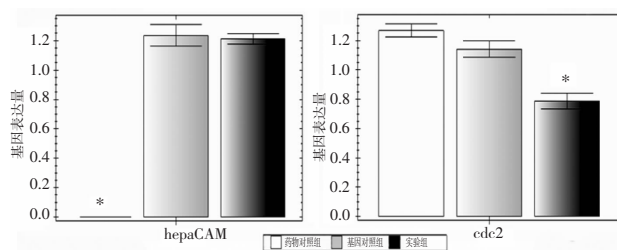


图 3 FCM 检测细胞周期的结果

Fig.3 Cell cycle changes tested by FCM

2.4 阿霉素与携带野生型 hepaCAM 基因的腺病毒联合运用时,786-0 细胞 cdc2 mRNA 表达的变化

RT-qPCR 结果显示:与药物对照组 786-0 细胞 hepaCAM 基因的表达量 (0.03 ± 0.01) 相比,实验组 (1.21 ± 0.10) 及基因对照组 (1.19 ± 0.07) hepaCAM 基因 mRNA 水平发生了明显上调 ($F=268.633, P < 0.01$);与药物对照组 (1.27 ± 0.06) 及基因对照组 (1.13 ± 0.08) 相比,实验组 (0.79 ± 0.06) cdc2 的 mRNA 水平发生了显著下调 ($F=40.029, P < 0.01$) (图 4)。



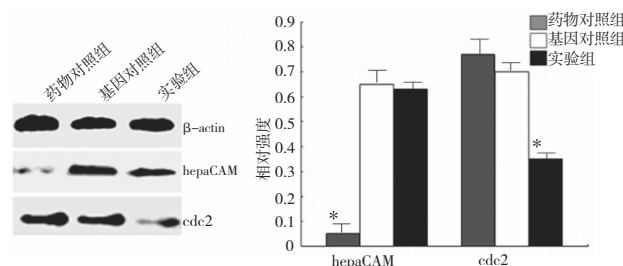
*:与药物对照组及基因对照组比较, $P < 0.01$

图 4 hepaCAM 及 cdc2 基因 mRNA 的含量

Fig.4 mRNA expressions of hepaCAM and cdc2

2.5 阿霉素与携带野生型 hepaCAM 基因的腺病毒联合运用时,786-0 细胞 cdc2 蛋白表达的变化

Western blot 结果显示:与药物对照组 (0.04 ± 0.03) 相比,基因对照组 (0.64 ± 0.06) 及实验组 (0.61 ± 0.05) hepaCAM 蛋白表达明显增加 ($F=158.423, P < 0.01$),与药物对照组 (0.75 ± 0.06) 及基因对照组 (0.69 ± 0.03) 相比,实验组 (0.36 ± 0.04) cdc2 蛋白表达明显降低 ($F=65.097, P < 0.01$) (图 5)。



*:与其他组相比, $P < 0.01$

图 5 hepaCAM 及 cdc2 蛋白表达

Fig.5 Protein expressions of hepaCAM and cdc2

3 讨 论

肾癌术后的治疗一直是一个比较棘手的难题。迄今为止所采用的放疗、化疗或免疫治疗都因为敏感性较差或缺乏特异性抗原而存在着各种不足。生物治疗作为一种新方法在肾癌的综合治疗中显示出了重要的作用。在生物治疗中,主要的方法之一是基因治疗,其常见的治疗手段是将抑癌基因导入机体以逆转肿瘤恶性产物的表达,进而抑制肿瘤生长^[8,9]。

hepaCAM 基因最初是从人类肝脏中分离出来的一种免疫球蛋白超家族黏附分子,该基因具有抑癌基因的属性,它能抑制癌细胞的生长、增殖^[3-5]以及抑制血管的发生^[10]。本课题组的前期研究已经证实:hepaCAM 基因在肾癌组织及肾癌 786-0 细胞中呈低表达,上调 786-0 细胞中 hepaCAM 的水平能产生抑制肾癌细胞生长、增殖的作用^[6]。因此推测,利用 hepaCAM 对肾癌的抑制作用,能改善肾癌术后的治疗效果,降低肾癌的复发率。本次研究首次尝试在体外将阿霉素与 hepaCAM 基因治疗联合运用。研究发现:在阿霉素处理后,予以 hepaCAM 基因治疗,肾癌细胞 786-0 可出现明显 G₂/M 期阻滞,同时,其 cdc2 的表达也显著降低。

cdc2 是与细胞周期调节密切相关的一类基因,其最初在酵母中被发现。它与细胞周期蛋白 CyclinB1 结合能调控细胞周期由 G₂ 期至 M 期过渡。降低 cdc2 的表达或抑制 cdc2 的活性^[11],可使细胞发生 G₂/M 期阻滞。

在本次研究中所使用的化疗药物阿霉素,是一种蒽环类细胞毒性抗生素,有研究指出在转移性肾癌^[12]和肉瘤样肾癌^[13]中联合运用阿霉素有助于延长患者的生存期。目前,其确切的抗肿瘤机制尚不清楚,一般认为它具有诱导细胞凋亡^[14,15]、抑制 DNA、RNA 和蛋白合成的作用。它对 S 期及 M 期细胞作用强,对 G₁ 期和 G₂ 期作用要弱。在阿霉素处理 786-0 细胞后用腺病毒导入 hepaCAM 基因,48 h 后可见明显的 G₂/M 期阻滞,这与本课题组先前证实的 hepaCAM 将 786-0 细胞阻滞于 G₁ 期^[7]的结果不同,推测这可能是阿霉素诱导 hepaCAM 下调 cdc2 的结果。

综上所述,在阿霉素处理后,导入 hepaCAM 基因能显著降低 cdc2 的表达,引起 G₂/M 期阻滞,从而抑制残留癌细胞的增殖,巩固阿霉素的作用,进而有望能够减少肾癌的复发。

参 考 文 献

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58 (2): 71-96.
- [2] Basting R, Corvin S, Handel D, et al. Adjuvant interferon alpha therapy in renal carcinoma(RCC): prognostic value of DNA cytophotometry[J]. Anticancer Res, 1999, 19 (2C): 1493-1495.
- [3] Chung Moh M, Hoon Lee L, Shall S, et al. Cloning and characterization of hepaCAM, a novel Ig-like cell adhesion molecule suppressed in human hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2005, 42(6): 833-841.
- [4] Moh M C, Zhang T, Lee L H, et al. Expression of hepaCAM is down-regulated in cancers and induces senescence-like growth arrest via a p53/p21-dependent pathway in human breast cancer cells[J]. Carcinogenesis, 2008, 29(12): 2298-2305.
- [5] Lee L H, Moh M C, Zhang T, et al. The immunoglobulin-like cell adhesion molecule hepaCAM induces differentiation of human glioblastoma U373-MG cells[J]. J Cell Biochem, 2009, 107(6): 1129-1138.
- [6] Xun C, Luo C, Wu X, et al. Expression of hepaCAM and its effect on proliferation of tumor cells in renal cell carcinoma[J]. Urology, 2010, 75(4): 828-834.
- [7] Zhang Q L, Luo C L, Wu X H, et al. HepaCAM induces G1 phase arrest and promotes c-Myc degradation in human renal cell carcinoma[J]. J Cell Biochem, 2011, 112(10): 2910-2919.
- [8] Datta K, Sundberg C, Karumanchi S A, et al. The 104-123 amino acid sequence of the beta-domain of von Hippel-Lindau gene product is sufficient to inhibit renal tumor growth and invasion[J]. Cancer Res, 2001, 61(5): 1768-1775.
- [9] 吴阶平. 吴阶平泌尿外科学[M]. 济南: 山东科学出版社, 2004: 868.
- [10] Wu J P. Wu jieping's urology [M]. Jinan: Shandong Science Press, 2004: 868.
- [11] Yang S, Wu X, Luo C, et al. Expression and clinical significance of hepaCAM and VEGF in urothelial carcinoma[J]. World J Urol, 2010, 28(4): 473-478.
- [12] Kaufmann W K, Levedakon E N, Grady H L, et al. Attenuation of G₂ checkpoint function precedes human cell immortalization[J]. Cancer Res, 1995, 55(1): 7-11.
- [13] Roubaud G, Gross-Goupil M, Wallerand H, et al. Combination of gemcitabine and doxorubicin in rapidly progressive metastatic renal cell carcinoma and/or sarcomatoid renal cell carcinoma[J]. Oncology, 2011, 80(3-4): 214-218.
- [14] Haas N B, Lin X, Manola J, et al. A phase II trial of doxorubicin and gemcitabine in renal cell carcinoma with sarcomatoid features: ECOG 8002[J]. Med Oncol, 2012, 29(2): 761-767.
- [15] Jin X, Wu X X, Jin C, et al. Delineation of apoptotic genes for synergistic apoptosis of lexatumumab and anthracyclines in human renal cell carcinoma cells by polymerase chain reaction array[J]. Anticancer Drugs, 2012, 23 (4): 445-454.
- [16] Yao Y, Xu X, Zhang G, et al. Role of HMGB1 in doxorubicin-induced myocardial apoptosis and its regulation pathway[J]. Basic Res Cardiol, 2012, 107(3): 267.

(责任编辑: 关蕴良)