

肿瘤机制研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000631

胞浆转导肽介导抑癌基因 NPRL2 对肾癌细胞凋亡及 Bax-Caspase3 凋亡通路的影响

叶 茂, 唐 伟, 常启跃, 罗 琦, 梁思敏

(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:证实胞浆转导肽(cytoplasmic transduction peptide, CTP)介导抑癌基因 NPRL2 以 CTP-NPRL2 融合蛋白形式对肾癌细胞株 786-O 的作用, 检测其诱导的肾癌细胞凋亡及其对 Bax-Caspase3 凋亡通路的影响。**方法:**构建重组质粒 pET28a-CTP-NPRL2 和 pET28a-NPRL2 并转染大肠杆菌 DH5 α , 从而得到原核表达体系用于 CTP-NPRL2 融合蛋白及 NPRL2 蛋白的表达和提取; Western blot 验证 CTP-NPRL2 蛋白和 NPRL2 蛋白的表达; 将肾癌 786-O 细胞分为 2 组, 分别与等量的 NPRL2 蛋白和 CTP-NPRL2 蛋白共培养, 采用免疫荧光染色和激光共聚焦显微镜检测 2 种蛋白在肾癌细胞 786-O 的亚细胞定位情况; 将在 96 孔板培养的 786-O 细胞分为 5 组, 其中 4 组分别用 1.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 蛋白、2.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 蛋白、4.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 蛋白、4.0 $\mu\text{mol/L}$ NPRL2 蛋白处理, 剩余 1 组为对照组; MTT 法检测各组 786-O 细胞增殖的情况; 流式细胞仪分析各组细胞周期和细胞凋亡情况; real-time PCR、Western blot 检测各组 786-O 细胞中 Bax 和 Caspase-3 在 mRNA 及蛋白水平的表达情况。**结果:**质粒测序结果显示成功构建所需的原核表达载体; Western blot 结果显示 CTP-NPRL2 融合蛋白在原核表达载体中有表达。激光共聚焦显微镜结果提示 CTP-NPRL2 蛋白导入 786-O 细胞后定位于胞浆; MTT 发现 CTP-NPRL2 组细胞增殖较 NPRL2 组及空白对照组受到明显的抑制 ($P<0.05$); 流式细胞分析显示, 相对于空白对照组和 NPRL2 组, CTP-NPRL2 组的凋亡率显著增高且处于 G0/G1 期细胞明显增多 ($P<0.05$)。real-time PCR 和 Western blot 结果提示, 与空白对照组和 NPRL2 组比较, CTP-NPRL2 组 Bax 和 Caspase-3 在 mRNA 和蛋白质水平的表达均明显上调 ($P<0.05$)。**结论:**CTP 介导抑癌基因 NPRL2 以 CTP-NPRL2 融合蛋白形式导入肾癌 786-O 细胞中并对其有明显的抑制作用, 可能通过影响 Bax-Caspase3 凋亡通路的活性, 抑制 786-O 细胞的增殖, 并诱导其凋亡将细胞周期阻滞于 G0/G1 期, 从而发挥抑癌作用。

【关键词】CTP-NPRL2 融合蛋白; 肾细胞癌; Bax-Caspase3 凋亡通路**【中图分类号】**R737.11**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2015-01-26

Effect of tumor suppressor gene NPRL2 mediated by CTP on apoptosis of renal cell carcinoma and activity of Bax-Caspase3 apoptotic pathway

Ye Mao, Tang Wei, Chang Qiyue, Luo Qi, Liang Simin

(Department of Urinary Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To confirm the treatment of CTP mediated tumor suppressor gene NPRL2 as CTP-NPRL2 fusing protein on human renal carcinoma cell line 786-O, and to detect the apoptosis of renal cell carcinoma and activity of Bax-Caspase3 apoptotic pathway. **Methods:** Recombinant plasmids pET28a-CTP-NPRL2 and pET28a-NPRL2 were constructed and then transfected into *E. coli* DH5 α , then the prokaryotic expression systems were got to express and collect CTP-NPRL2 fusing protein and NPRL2 protein. Western blot was used to detect the protein expression of CTP-NPRL2 and NPRL2. The 786-O cells were divided into 2 groups and co-cultured with an equal amount of NPRL2 protein and CTP-NPRL2 protein, respectively. Immunofluorescence staining and laser scanning confocal microscopy were used to detect the subcellular localization of the proteins in 786-O cells. The 786-O cells cultured in 96-well plates were divided into 5 groups, 4 groups of all were treated with 1.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 protein, 2.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 protein, 4.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 protein and 4.0 $\mu\text{mol/L}$ NPRL2 protein. The remaining group was taken as a control group. The proliferation of 786-O cells in each group was detected by the MTT assays, the apoptosis and cell cycle in each group were detected by

flowcytometry. Real-time PCR and Western blot were used to detect the expression of Bax and Caspase-3 in each group at the levels of mRNA and protein, respectively. **Results:** The plasmid sequencing showed that the prokaryotic expression vectors were constructed successfully. Western blot showed CTP-NPRL2 fusing proteins were expressed in the prokaryotic expression

作者介绍: 叶 茂, Email: yemao891203@163.com,

研究方向: 泌尿系肿瘤。

通信作者: 梁思敏, Email: lsmgj@163.com。

基金项目: 重庆市渝中区科技计划资助项目 (编号: 20130130)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150518.2346.006.html>

(2015-05-18)

vectors. The results of laser scanning confocal microscope pointed CTP-NPRL2 proteins were localized in the cytoplasm after importing into 786-O cells. MTT assay indicated that compared with the other two groups, CTP-NPRL2 group showed a significant decrease in proliferation ($P < 0.05$). Flowcytometry assay demonstrated that the apoptotic rate and the proportion of the cells at G0/G1 phase were both increased ($P < 0.05$) in CTP-NPRL2 group compared with those of the other two groups. Real-time PCR and Western blot suggested that, compared with those of the control group and NPRL2 group, the expression of Bax and Caspase-3 at the mRNA and protein levels in CTP-NPRL2 group were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** CTP-NPRL2 fusing proteins could import into renal carcinoma cell 786-O and significantly inhibit their growth, possibly by affecting the activity of Bax-Caspase3 apoptotic pathway, thus play a tumor suppressor role.

[Key words] CTP-NPRL2 fusing protein; renal cell carcinoma; Bax-Caspase3 apoptotic pathway

肾癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤,在所有泌尿系肿瘤中,肾癌的死亡率最高,其对人类健康有极大的危害。肾癌的治疗以手术治疗为主,术后放疗以及化疗均不敏感,患者复发率和死亡率较高。因此,寻找 1 种安全有效的治疗方法势在必行。目前,随着生物大分子药物的出现,分子治疗肽的研发已成为生物治疗领域 1 个新的研究热点^[1-2],但由于大分子药物无法直接穿透细胞膜而极大地限制了蛋白类药物的应用。胞浆转导肽(cytoplasmic transduction peptide, CTP)是由 Kim 等^[3]研究设计的短肽,能介导外源性蛋白导入细胞,从而实现蛋白质类药物在细胞内的治疗作用。NPRL2 是 Lerman 和 Minna^[4]利用基因组测序和生物信息学等技术筛选得到的抑癌基因,有研究^[5]证实 NPRL2 转染入该基因缺失的肾癌 786-O 细胞株能阻滞细胞周期于 G0/G1 期,具有抑制增殖,增加其凋亡的作用。本研究 CTP 介导抑癌基因 NPRL2 以 CTP-NPRL2 融合蛋白的形式对肾癌细胞系 786-O 生物学特性的影响,并初步探讨其分子机制,旨在为肾癌的分子生物治疗药物的研发提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和载体 DH5 α 感受态菌种(MCC001-1),pET28a 质粒(MCV012)购自北京鼎国生物公司,GV141-CTP-NPRL2 真核载体,GV141-NRPL2 真核载体,肾癌 786-O 细胞由实验室保存。

1.1.2 药品与试剂 卡那霉素购自北京鼎国生物公司;胎牛血清、RPMI1640 培养基及 0.25%胰酶购于 HyClone 公司;BCA 蛋白定量试剂盒、SYBRGreen PCR 试剂盒、逆转录试剂盒购于 Thermo 公司;蛋白预染 Marker 购于 Fermentas 公司;鼠抗 NRPL2 单克隆抗体于 Abcam 公司;兔抗人 Bax、Caspase-3、 β -actin 单克隆抗体购自 CST 公司;FITC 蛋白标记试剂盒, Ni-NTA His 标签蛋白纯化亲和柱, RIPA 组织细胞快速裂解液, 4 $\times$ 蛋白上样缓冲液, SDS-PAGE 凝胶电泳试剂盒购自重

庆博培生物公司;羊抗鼠 HRP 标记二抗、山羊抗兔二抗购自碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 原核表达体系的构建 以 GV141-CTP-NPRL2 载体为模板 PCR 扩增目的基因,设计上游引物为:5'-CGCGG-ATCC(BamH I 酶切位点)ATGTACGGACGCCGCGCAC-3',加入 BamH I 酶切位点及保护碱基,下游引物为:5'-ACGCGT-CGAC(Sal I 酶切位点)TTACTTCCAGCAGATGATGATGTTGGG-3',加入 Sal I 酶切位点及保护碱基,扩增产物大小为 1 221 bp;以 GV141-NRPL2 载体为模板 PCR 扩增目的基因,设计上游引物为:5'-CGCGGATCC(BamH I 酶切位点)ATGGGCAGCGGCTGCCGC-3',加入 BamH I 酶切位点及保护碱基,由于两模板的后续序列相同,反向引物同上,扩增产物大小为 1 140 bp,切胶回收扩增后的 PCR 产物。用限制性核酸内切酶 BamH I 和 Sal I 分别酶切 PCR 产物和 pET28a 质粒并切胶回收,回收后的产物通过 T4 DNA 连接酶连接后转化 DH5 α 感受态菌株,用含卡那霉素的 LB 培养基筛选出阳性菌落扩增后保存菌株,分别命名为 pET28a-CTP-NPRL2 菌株和 pET28a-NRPL2 菌株。分别提取质粒并送往北京鼎国生物公司测序。

1.2.2 Western blot 验证目标蛋白的表达 于 2 只 20 ml 离心管中分别加入 10 ml 含 100 μ g/ml Ampr 的 LB 培养液,分别接种以上 2 种菌株,培养 6 h 后加入 IPTG 诱导蛋白表达,12 h 后将 2 组菌株取出离心后弃去培养液,用 PBS 洗涤 3 次后各加入 5 ml 超声裂解液,超声裂菌后离心取上清液,经 Ni-NTA His 标签蛋白纯化亲和柱纯化后,再上样进行聚丙烯酰胺电泳,然后将蛋白条带转移到硝酸纤维素膜上,封闭后置于 4 $^{\circ}$ C 一抗孵育过夜,次日 37 $^{\circ}$ C 二抗孵育 1 h,最后用化学发光试剂显色。

1.2.3 激光共聚焦显微镜观察 CTP-NPRL2 融合蛋白在肾癌 786-O 细胞中的定位 用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基,在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的培养箱常规传代培养肾癌 786-O 细胞。将细胞以每孔 1.5×10^5 个接种于 6 孔板中培养至细胞融合度达 60%~80%,取经过 FITC 标记并用 PBS 洗涤过的 CTP-NPRL2 和 NPRL2 蛋白,分别作用于 786-O 细胞株 10 min 后, PBS 洗涤非特异性结合与细胞表面的蛋白,于激光共聚焦显微镜下观察并照相。

1.2.4 MTT 检测细胞生长情况 实验分为:1.0 μ mol/L CTP-NPRL2 组、2.0 μ mol/L CTP-NPRL2 组、4.0 μ mol/L CTP-NPRL2

组、4.0 $\mu\text{mol/L}$ NRPL2 组、空白对照组共 5 组,将细胞按每孔 1×10^4 个接种于 96 孔板,待细胞融合度达到 60%~80% 时用蛋白处理,每组各 3 孔,分别于 12、24、36 h 后在每孔中各加入 20 μl 5 mg/ml 的 MTT 液,培养 4 h,弃上清,再加入 200 μl DMSO 裂解细胞,充分振荡 10 min。最后分别检测每组细胞在 490 nm 的吸光度 (absorbance, A) 值,实验重复 5 次,根据所得数值绘制细胞增殖曲线图。

1.2.5 流式细胞仪分析细胞凋亡和细胞周期 实验分组同 MTT,将用融合蛋白处理 24 h 后的各组细胞用 PBS 洗涤 3 次,加入 10 μl 浓度为 20 $\mu\text{g/ml}$ 的碘化丙锭和 AnnexinV 5 μl ,室温避光反应 20 min,流式细胞仪检测细胞凋亡。上述相同的细胞用 PBS 洗涤 3 次后用 70% 冰乙醇固定过夜,上机前去除固定液并加入终浓度为 50 $\mu\text{g/ml}$ 的碘化丙锭和 RNA 酶,染色 30 min,最后用流式细胞仪检测,实验重复 3 次。

1.2.6 Real-time PCR 检测 786-O 细胞中 Bax、Caspase-3 RNA 表达水平 实验分组同上,分别收集各处理组细胞 5×10^6 个, PBS 漂洗 2 遍, Trizol 法提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 real-time PCR。PCR 循环条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 40 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 实验重复 3 次。引物序列见表 1。

表 1 Real-time PCR 引物序列
Tab.1 Primer sequences for real-time PCR

基因	引物序列	产物大小 (bp)
Bax	F: 5'-CCGATTCATCTACCCTGCTG-3'	111
	R: 5'-TGAGCAATTCAGAGGCACT-3'	
Caspase-3	F: 5'-AGATGGTTTGAGCCTGAGCA-3'	120
	R: 5'-CACTGCGTATGGAGAAATGG-3'	
GAPDH	F: 5'-CACCCACTCCTCCACCTTTG-3'	108
	R: 5'-CCACCACCCTGTTGCTCTAG-3'	

1.2.7 Western blot 检测 786-O 细胞中 Bax、Caspase-3 蛋白表达水平 实验分组同上,在 25 cm 细胞培养瓶中培养各组细胞,待细胞融合度约达 90% 时倾去培养液,用 0.25% 胰酶收集贴壁细胞,离心弃上清液后 PBS 清洗 3 次,加入 990 μl RIPA 细胞快速裂解液及 10 μl 10 mg/ml PMSF 溶液,匀浆至完全裂解,4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 g, 离心 15 min,取上清于 1.5 ml EP 管中,BCA 法测定蛋白浓度。取 30 μg 总蛋白上样,10% SDS-PAGE 电泳,切胶,半干电转膜仪转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别加入兔抗人 Bax (1:1 000 稀释)、Caspase-3 (1:1 000 稀释)、 β -actin (1:1 000 稀释) 一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次,每次 5 min,随后加入 HRP 标记的羊抗兔二抗 (1:1 000 稀释), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次,每次 5 min。ECL 化学发光检测并记录各目的条带与内参条带灰度值,目的条带/内参条带灰度比值为各目的蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理

实验数据采用 SPSS 19.0 进行分析,计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组样本均数的组间比较采用方差分析,

各组间的两两比较采用 LSD 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 测序鉴定

重组质粒 pET28a-NRPL2 采用通用引物正反向测序,并由 BLAST 比对测序结果,所测结果与 NRPL2 基因同源性 100%,重组质粒 pET28a-CTP-NRPL2 测序结果中包含 CTP 核酸序列以及 NRPL2 基因序列 (结果未显示)。

2.2 Western blot 验证目标蛋白的表达

将 pET28a-CTP-NRPL2 菌株和 pET28a-NRPL2 菌株蛋白提取纯化后进行 Western blot 检测。结果显示:pET28a-NRPL2 组在 48 kD 左右有目的条带出现,pET28a-CTP-NRPL2 组在 52 kD 和 48 kD 左右有目的条带出现 (图 1)。

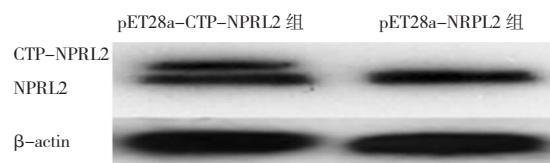
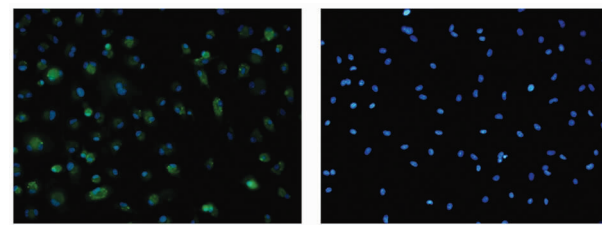


图 1 Western blot 检测融合蛋白在各组中的表达

Fig.1 Fusing protein expression detected by Western blot in each group

2.3 激光共聚焦显微镜观察 CTP-NRPL2 融合蛋白在肾癌 786-O 细胞中的定位

用激光共聚焦显微镜观察用 CTP-NRPL2 和 NRPL2 蛋白处理 10 min 后的 786-O 细胞,pET28a-CTP-NRPL2 细胞浆可见绿色荧光,而 pET28a-NRPL2 组未见绿色荧光,说明 CTP 介导 NRPL2 蛋白导入 786-O 细胞后定位于胞浆 (图 2)。



A. pET28a-CTP-NRPL2 组 B. pET28a-NRPL2 组

图 2 激光共聚焦显微镜下 CTP-NRPL2 融合蛋白在 786-O 细胞定位情况

Fig.2 Subcellular localization of CTP-NRPL2 protein in renal carcinoma 786-O under laser scanning confocal microscope

2.4 MTT 检测细胞生长情况

取 36 h A 值做统计分析 ($F=58.617, P=9.18723 \times 10^{-11}$) 发现:与空白对照组比较,1.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NRPL2、2.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NRPL2、4.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NRPL2 处理组 P 值分别为 0.001、2.69988E-8、4.37876E-11 ($P<0.05$);与 4.0 $\mu\text{mol/L}$ NRPL2 处理组比较,1.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NRPL2、2.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NRPL2、4.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NRPL2 处理组 P 值分别为 0.012、1.74568E-7、1.81995E-10 ($P<0.05$);各种浓度 CTP-NRPL2 处理组间比较 P 值分别为 6.66259E-5、1.72664E-8、6.85939E-4 ($P<0.05$);而

4.0 $\mu\text{mol/L}$ NRPL2 处理组与空白组相比,细胞的增殖没有明显变化($P=0.336$)。MTT 结果提示,CTP-NPRL2 融合蛋白能抑制肾癌 786-O 细胞生长,且其对细胞抑制作用随蛋白浓度增加而增强(图 3)。

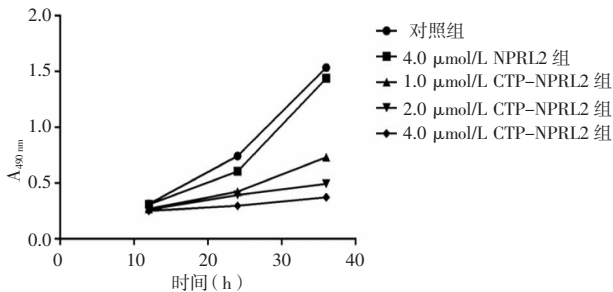


图 3 各组细胞的增殖曲线 ($\bar{x} \pm s$)

Fig.3 Cell proliferation curves of all groups ($\bar{x} \pm s$)

2.5 流式细胞仪分析细胞凋亡

流式细胞仪分析细胞凋亡($F=313.132, P=1.85812E-10$)发现:空白对照组、4.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 处理组、1.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 处理组、2.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 处理组、4.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 处理组细胞的凋亡率分别为 $(0.84 \pm 0.07)\%$ 、 $(1.02 \pm 0.07)\%$ 、 $(1.92 \pm 0.10)\%$ 、 $(2.35 \pm 0.06)\%$ 、 $(3.63 \pm 0.20)\%$;与空白对照组比较,1.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2、2.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2、4.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 处理组 P 值分别为 $2.81810E-7$ 、 $1.16282E-8$ 、 $2.89567E-11$ ($P<0.05$);与 4.0 $\mu\text{mol/L}$ NRPL2 处理组比较,1.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2、2.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2、4.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 处理组 P 值分别为 $1.51758E-6$ 、 $3.93294E-8$ 、 $5.59889E-11$ ($P<0.05$);各种

浓度 CTP-NPRL2 处理组间比较 P 值分别为 $7.60851E-4$ 、 $3.69219E-9$ 、 $6.10722E-8$ ($P<0.05$);而 4.0 $\mu\text{mol/L}$ NRPL2 处理组与空白组相比,细胞的凋亡率没有统计学差异($P=0.074>0.05$)。由此可推断,CTP-NPRL2 融合蛋白可诱导肾癌 786-O 细胞的凋亡,且其凋亡诱导作用随蛋白浓度增加而增强(图 4)。

2.6 流式细胞仪分析细胞周期

统计分析各组处于 G0/G1 期($F=163.158, P=4.63761E-9$)的细胞差异性:与空白对照组比较,1.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2、2.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2、4.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 处理组 P 值分别为 0.001 、 $1.66377E-7$ 、 $1.16845E-9$ ($P<0.05$);与 4.0 $\mu\text{mol/L}$ NRPL2 处理组比较,1.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2、2.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2、4.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 处理组 P 值分别为 0.004 、 $3.16806E-7$ 、 $1.73402E-9$ ($P<0.05$);各种浓度 CTP-NPRL2 处理组间比较 P 值分别为 $9.03115E-6$ 、 $1.17891E-8$ 、 $6.58962E-6$ ($P<0.05$);而 4.0 $\mu\text{mol/L}$ NRPL2 处理组与空白组相比,细胞的 G0/G1 期阻滞没有明显差异($P=0.420$)。其结果表明,CTP-NPRL2 融合蛋白能将肾癌 786-O 细胞阻滞在 G0/G1 期,且其阻滞作用呈现随着 CTP-NPRL2 蛋白浓度增高而增强(表 2 和图 5)。

2.7 qRT-PCR 检测 786-O 细胞中 Bax、Caspase-3 mRNA 表达水平

各组 Bax 相对于对照组的相对表达量($F=265.599, P=2.39323E-8$):与 4.0 $\mu\text{mol/L}$ NRPL2 处理组相比,1.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2、2.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2、4.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 处理组 P 值分别为 $6.37891E-8$ 、 $1.92016E-8$ 、 $5.13441E-9$ ($P<0.05$),各种浓度 CTP-NPRL2 处理组间比较 P 值分别为

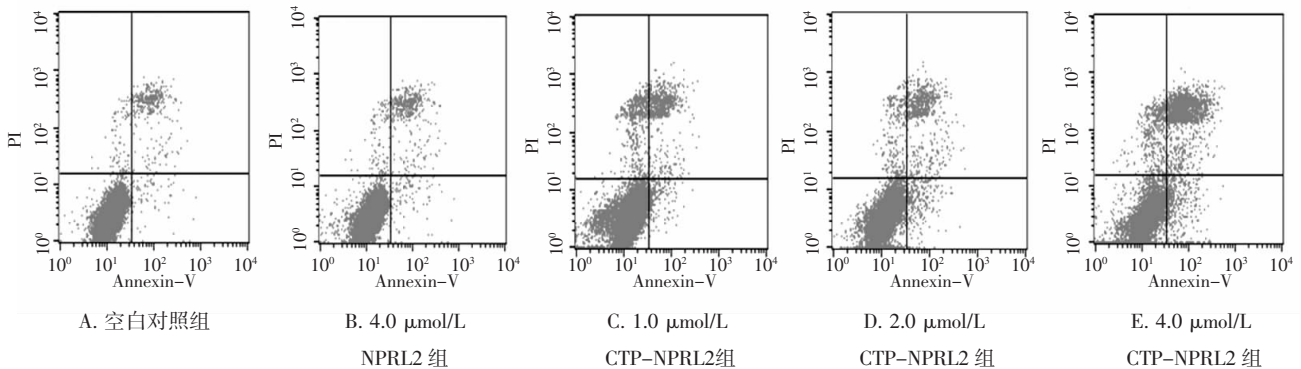


图 4 各组细胞的凋亡

Fig.4 Apoptosis of cells in all groups

表 2 流式细胞术检测各组细胞周期 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Flow cytometric analysis of cell cycle in cells ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	G0/G1期 (%)	S期 (%)	G2/M期 (%)
空白对照组	3	42.96 $\pm$ 0.58	36.44 $\pm$ 0.78	20.60 $\pm$ 0.25
4.0 $\mu\text{mol/L}$ NPRL2 组	3	43.82 $\pm$ 0.26 ^a	37.38 $\pm$ 0.83	18.79 $\pm$ 0.66
1.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 组	3	47.57 $\pm$ 2.11 ^b	30.84 $\pm$ 1.58	21.59 $\pm$ 0.53
2.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 组	3	56.04 $\pm$ 1.21 ^c	31.46 $\pm$ 3.73	12.50 $\pm$ 4.84
4.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 组	3	64.81 $\pm$ 1.27 ^d	23.49 $\pm$ 1.75	11.70 $\pm$ 2.38

注:a,与空白对照组相比, $P>0.05$,与其余 3 组相比 $P<0.05$;b、c、d 与其余 4 组相比, $P<0.05$

0.014、1.00551E-4、0.004 ($P<0.05$)。各组 Caspase-3 相对于对照组的相对表达量 ($F=241.250, P=3.50026E-8$)；与 4.0 $\mu\text{mol/L}$ NRPL2 处理组相比, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2、2.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2、4.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 处理组 P 值分别为 2.02385E-7、2.59504E-8、7.18776E-9 ($P<0.05$)，各种浓度 CTP-NPRL2 处理组间比较 P 值分别为 0.001、2.52952E-5、0.006 ($P<0.05$)。结果表明：各浓度 CTP-NPRL2 处理组的 Bax、Caspase-3 mRNA 相对表达量较 4.0 $\mu\text{mol/L}$ NRPL2 处理组明显增多，且其相对表达量随着 CTP-NPRL2 蛋白浓度增高而增加 (表 3 和图 6)。

2.8 Western blot 检测 786-O 细胞中 Bax、Caspase-3 蛋白表达水平

空白对照组、4.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 组、1.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 组、2.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 组、4.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2

组细胞 Bax 灰度分别为 $1\ 020.90 \pm 3.36$ 、 $1\ 015.45 \pm 2.88$ 、 $1\ 345.22 \pm 5.42$ 、 $1\ 554.99 \pm 4.66$ 、 $2\ 361.38 \pm 6.85$ ($F=39\ 056.099, P=6.44533E-21$)，与空白对照组比较, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2、2.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2、4.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 处理组 P 值分别为 1.80210E-15、1.23362E-17、1.24631E-21 ($P<0.05$)；与 4.0 $\mu\text{mol/L}$ NRPL2 处理组比较, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2、2.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2、4.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 处理组 P 值分别为 1.52551E-15、1.11444E-17、1.19670E-21 ($P<0.05$)；各种浓度 CTP-NPRL2 处理组间比较 P 值分别为 1.39254E-13、1.98818E-20、2.00661E-19 ($P<0.05$)；而 4.0 $\mu\text{mol/L}$ NRPL2 处理组与空白组相比, Bax 表达水平无明显差异 ($P=0.198$)。空白对照组、4.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 组、1.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 组、2.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 组、4.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 组细胞 Caspase-3 灰度分别为 931.4 ± 10.32 、 936.87 ± 12.44 、 $1\ 314.77 \pm$

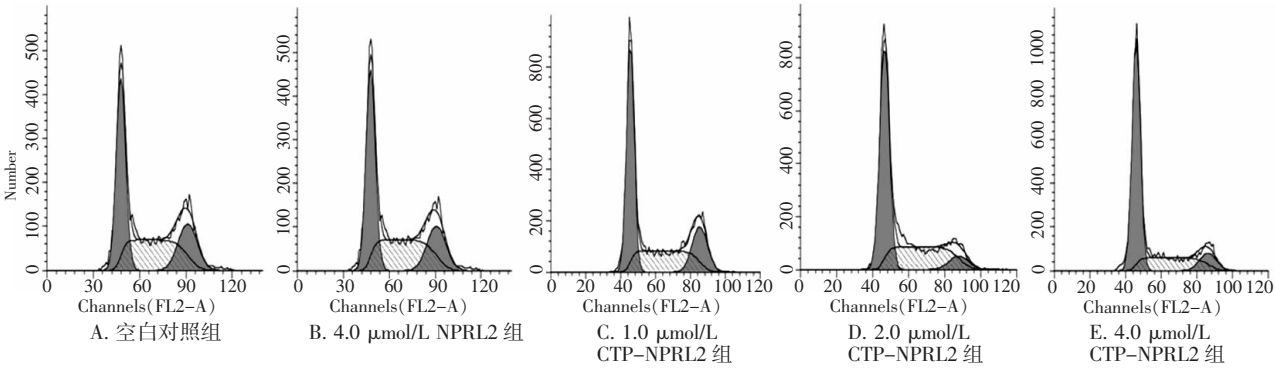


图 5 各处理组对 786-O 细胞周期的影响

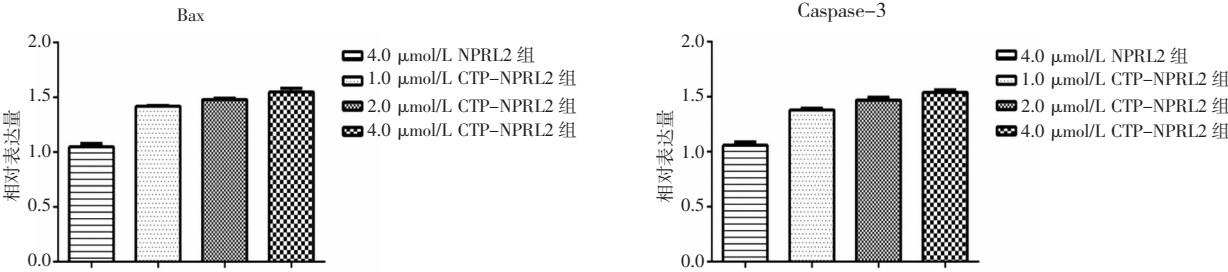
Fig.5 Assessment of cell cycle in all groups of 786-O cells

表 3 Real-time PCR 各组 Ct 值及相对于对照组的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Ct value of real-time PCR of each group and the relative expression compared to the control group ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Bax	Caspase-3	GAPDH	Bax 相对表达量	Caspase-3 相对表达量
空白对照组	3	19.260 $\pm$ 0.055	25.150 $\pm$ 0.060	15.070 $\pm$ 0.045	1.000 $\pm$ 0.000	1.000 $\pm$ 0.000
4.0 $\mu\text{mol/L}$ NRPL2 组	3	19.180 $\pm$ 0.055	25.050 $\pm$ 0.045	15.060 $\pm$ 0.042	1.050 $\pm$ 0.030	1.060 $\pm$ 0.029
1.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 组	3	18.640 $\pm$ 0.056	24.580 $\pm$ 0.060	14.960 $\pm$ 0.050	1.420 $\pm$ 0.006 ^a	1.380 $\pm$ 0.017 ^a
2.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 组	3	18.560 $\pm$ 0.026	24.460 $\pm$ 0.050	14.940 $\pm$ 0.026	1.480 $\pm$ 0.012 ^b	1.470 $\pm$ 0.026 ^b
4.0 $\mu\text{mol/L}$ CTP-NPRL2 组	3	18.320 $\pm$ 0.032	24.230 $\pm$ 0.021	14.780 $\pm$ 0.006	1.550 $\pm$ 0.034 ^c	1.540 $\pm$ 0.022 ^c

注：相对表达量按照公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各组相对于空白对照组的相对表达倍数，a、b、c 与其余 3 组相比， $P<0.05$

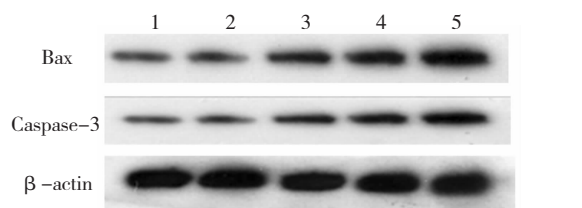


注：数据见表 3 中的 Bax 和 Caspase-3 相对表达量，各组间比较， $P<0.05$

图 6 各组细胞中 Bax、Caspase-3 mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

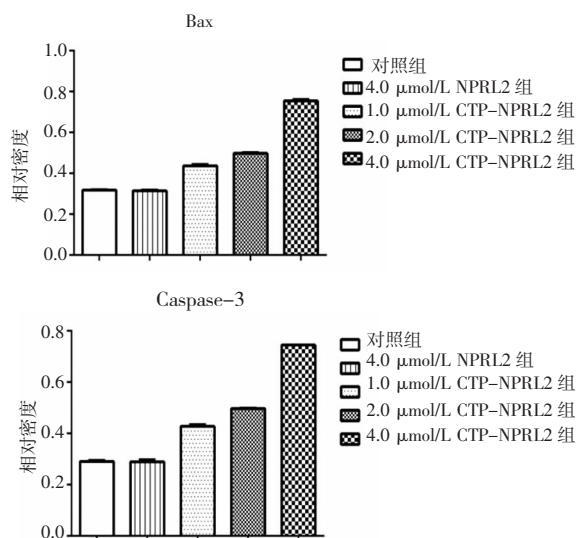
Fig.6 Relative expression levels of Bax and Caspase-3 mRNA in cells of all groups ($\bar{x} \pm s$)

7.23、1 554.63 ± 8.25、2 328.49 ± 10.36 ($F=10\ 169.256$, $P=5.38001E-18$), 与空白对照组比较, 1.0 μmol/L CTP-NPRL2、2.0 μmol/L CTP-NPRL2、4.0 μmol/L CTP-NPRL2 处理组 P 值分别为 4.14978E-13、3.25991E-15、1.02349E-18 ($P<0.05$); 与 4.0 μmol/L NRPL2 处理组比较, 1.0 μmol/L CTP-NPRL2、2.0 μmol/L CTP-NPRL2、4.0 μmol/L CTP-NPRL2 处理组 P 值分别为 4.78788E-13、3.55966E-15、1.06440E-18 ($P<0.05$); 各种浓度 CTP-NPRL2 处理组间比较 P 值分别为 4.37547E-11、2.52662E-17、3.75122E-16 ($P<0.05$); 而 4.0 μmol/L NR-PL2 处理组与空白组相比, Bax 表达水平无明显差异 ($P=0.514$)。其结果表明, 各浓度 CTP-NPRL2 处理组的 Bax、Caspase-3 蛋白表达量较 4.0 μmol/L NRPL2 处理组及空白对照组明显增多, 且其表达量随着 CTP-NPRL2 蛋白浓度增高而增加(图7)。



A. Caspase-3、Bax 蛋白表达的 Western blot 结果

1. 空白对照组; 2. 4.0 μmol/L NRPL2 组; 3. 1.0 μmol/L CTP-NPRL2 组; 4. 2.0 μmol/L CTP-NPRL2 组; 5. 4.0 μmol/L CTP-NPRL2 组



B. Bax 和 Caspase-3 相对于内参的表达量

相对密度是各组灰度与内参灰度的比值。各组 Bax 相对密度分别为: 0.320 ± 0.001、0.310 ± 0.003、0.440 ± 0.006、0.500 ± 0.003、0.760 ± 0.007 ($F=4863.782$, $P=2.14624E-16$), 4.0 μmol/L NRPL2 组与对照组相比, $P>0.05$, 其余各组间比较 $P<0.05$; 各组 Caspase-3 相对密度分别为: 0.290 ± 0.004、0.290 ± 0.007、0.290 ± 0.006、0.500 ± 0.001、0.740 ± 0.004 ($F=4914.696$, $P=2.03742E-16$), 4.0 μmol/L NRPL2 组与对照组相比, $P>0.05$, 其余各组间比较 $P<0.05$

图 7 各处理组 Caspase-3、Bax 蛋白表达

Fig.7 Caspase-3 and Bax protein expression in all groups

3 讨论

肾癌亦称肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC), 是肾脏最常见的恶性肿瘤, 其发病占成人恶性肿瘤的 3%, 且近二十年来其发病率呈现上升的趋势, 大部分患者首次就诊就已是晚期肾癌, 其传统治疗方式主要采用根治性手术治疗结合术后放化疗, 透明细胞癌是肾癌最重要的亚型, 约占 83%, 放化疗效果均较差^[6-7]。随着对肿瘤发病的研究, 发现体细胞突变对于肿瘤的发生发展起重要作用, 通过上调和下调基因产物的基因治疗已经成为中晚期肿瘤治疗的热点, 蛋白质类基因靶向药物治疗也随之兴起^[2,8], 这也为肾癌的治疗提供了新的方向。

NPRL2 是在肺癌中发现的新型抑癌基因, 其与肺癌的发生发展及预后密切相关^[4]。Hu 等^[9]发现 NPRL2 基因能有效抑制胃癌细胞的增殖, 抑制胃癌的发展。Jayachandran 等^[10]发现 NRPL2 基因的高表达能增强顺铂对非小细胞肺癌的治疗, 起到化疗增敏作用。此外, Tang 等^[5]研究证实 NPRL2 转染入该基因缺失的肾癌 786-O 细胞株能阻滞细胞周期于 G0/G1 期, 具有抑制增殖, 增加其凋亡的作用。可见, NPRL2 基因与肿瘤发生发展密切先关。目前, 蛋白质类药物的研发已经成为热点, 但由于大分子蛋白无法穿越生物膜而限制其发展。传统的蛋白质载体 PTD 转导效率低下且其定位于细胞核, 使其无法得到推广^[2]。CTP 是 Kim 等^[3]设计的新型蛋白质载体, CTP512 为活性最高的 CTP, 其氨基酸为 YGRRAR-RRRRR, 其对各种细胞类型都有转导活性且定位于细胞浆, 从而使其可能成为最有效的蛋白质类药物载体。Huang 等^[11]通过原核表达 CTP-OD-HA 融合蛋白, 成功转导入慢性粒细胞白血病细胞起到抑制细胞增殖作用, 这进一步肯定了 CTP 的转导效果。

本实验通过构建重组质粒 pET28a-CTP-NPRL2 并转染大肠杆菌 DH5α, 从而得到原核表达体系用于 CTP-NPRL2 融合蛋白的表达和提取。786-O 是最常见的透明细胞癌细胞系, 本实验将 CTP-NPRL2 融合蛋白与肾癌 786-O 细胞共培养, 观察融合蛋白对 786-O 细胞的影响。激光共聚焦显微镜观察发现 CTP-NPRL2 融合蛋白成功导入细胞并定位于细胞浆。MTT 法检测结果提示 CTP-NPRL2 融合蛋白可以明显抑制 786-O 细胞的增殖, 且其抑制作用呈浓度依赖性; 此外, 流式细胞检测结果发现 CTP-NPRL2 组的凋亡率和处于 G0/G1 期的细胞数明显多于 NPRL2 组和空白对照组, 其凋亡率及 G0/G1 阻滞率

随着 CTP-NPRL2 蛋白浓度升高而升高。实验结果表明,CTP 能介导 NPRL2 蛋白导入 786-O 细胞并定位于细胞浆,阻滞细胞周期于 G0/G1 期,抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,从而起到肿瘤抑制作用,且其作用呈现浓度依赖性。

细胞死亡分为坏死和凋亡:凋亡亦称程序性细胞死亡,是由环境和遗传因素共同决定的主动的细胞死亡过程,其对于肿瘤的发生起重要作用。细胞凋亡主要通过以下 2 条途径实现:细胞外的死亡受体途径和细胞内的线粒体途径,2 条途径最后都是通过激活凋亡相关蛋白酶 Caspase 起到凋亡作用^[12-13]。Bax 是 Bcl-2 家族中 1 个重要促凋亡蛋白,由 6 个外显子编码,在胞浆有 2 种蛋白形式(β 和 γ),其作用主要是在线粒体外膜形成通道蛋白,从而促使细胞色素 C 等物质进入胞浆,激活下游凋亡蛋白 Caspase^[12-17]。Caspase-3 是 Caspase 家族中最重要的 1 个凋亡效应因子,其能直接诱导凋亡,也可通过影响其他凋亡因子而诱导凋亡^[18-19]。

本实验 real-time PCR 结果提示 CTP-NPRL2 组 Bax 和 Caspase-3 mRNA 表达量明显高于 NPRL2 组和空白对照组,且其表达量随 CTP-NPRL2 蛋白浓度升高而增加;Western blot 显示 CTP-NPRL2 组 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达量高于 NPRL2 组和空白对照组,且其表达量随 CTP-NPRL2 蛋白浓度升高而增加。该结果说明 CTP-NPRL2 蛋白对肾癌 786-O 细胞的抑制作用与 Bax-Caspase3 凋亡通路有密切相关。

综上所述,本实验结果表明 CTP 能介导 NPRL2 蛋白导入 786-O 细胞,并阻滞细胞周期于 G0/G1 期,抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,其机制可能是通过 Bax-Caspase3 凋亡通路起作用。这为今后开发针对肾癌的蛋白质类药物奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Bielecka ZF, Czarnicka AM, Szczylik C. Genomic analysis as the first step toward personalized treatment in renal cell carcinoma[J]. *Frontiers in Oncology*, 2014(4): 194.
- [2] Chauhan A, Tikoo A, Kapur AK, et al. The taming of the cell penetrating domain of the HIV Tat: myths and realities[J]. *Journal of Controlled Release*, 2007, 117(2): 148-162.
- [3] Kim D, Jeon C, Kim JH, et al. Cytoplasmic transduction peptide (CTP): new approach for the delivery of biomolecules into cytoplasm in vitro and in vivo[J]. *Experimental Cell Research*, 2006, 312(8): 1277-1288.
- [4] Lerman MI, Minna JD. The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. The International Lung Cancer Chromosome3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium[J]. *Cancer Research*, 2000, 60(21): 6116-6133.
- [5] Tang Y, Jiang L, Tang W. Decreased expression of NPRL2 in renal cancer cells is associated with unfavourable pathological, proliferation and apoptotic features[J]. *Pathology & Oncology Research*, 2014, 20(4): 829-837.
- [6] Zaravinos A, Pieri M, Mourmouras N, et al. Altered metabolic pathways in clear cell renal cell carcinoma: a meta-analysis and validation study focused on the deregulated genes and their associated networks[J]. *Oncoscience*, 2014, 1(2): 117-131.
- [7] Virtuoso A, Policastro T, Izzo M, et al. Long lasting response to second-line everolimus in kidney cancer[J]. *World Journal of Clinical Cases*, 2013, 1(5): 166-168.
- [8] Kim D, Li R, Dudek SM, et al. Binning somatic mutations based on biological knowledge for predicting survival: an application in renal cell carcinoma[J]. *Pacific Symposium on Biocomputing*, 2015(20): 96-107.
- [9] Hu ZM, Wang C, Ji W, et al. Effect of recombinant plasmid pEGFP-N1-NPRL2 on the biological characteristics of human gastric cancer cells[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2012, 28(10): 1020-1024.
- [10] Jayachandran G, Ueda K, Wang B, et al. NPRL2 sensitizes human non-small cell lung cancer (NSCLC) cells to cisplatin treatment by regulating key components in the DNA repair pathway[J]. *PLoS One*, 2010, 5(8): e11994.
- [11] Huang SF, Liu DB, Zeng JM, et al. Cloning, expression, purification and functional characterization of the oligomerization domain of Bcr-Abl oncoprotein fused to the cytoplasmic transduction peptide[J]. *Protein Expression and Purification*, 2009, 64(2): 167-178.
- [12] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 205-219.
- [13] Neuzil J, Wang XF, Dong LF, et al. Molecular mechanism of 'mitotocan'-induced apoptosis in cancer cells epitomizes the multiple roles of reactive oxygen species and Bcl-2 family proteins[J]. *FEBS Letters*, 2006, 580(22): 5125-5129.
- [14] Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death[J]. *Cell*, 1993, 74(4): 609-619.
- [15] Degli EM, Dive C. Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 304(3): 455-461.
- [16] Tan C, Dlugosz PJ, Peng J, et al. Auto-activation of the apoptosis protein Bax increases mitochondrial membrane permeability and is inhibited by Bcl-2[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(21): 14764-14775.
- [17] Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, et al. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(15): 11615-11623.
- [18] Jia LT, Chen SY, Yang AG. Cancer gene therapy targeting cellular apoptosis machinery[J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2012, 38(7): 868-876.
- [19] Joseph EK, Levine JD. Caspase signalling in neuropathic and inflammatory pain in the rat[J]. *European Journal of Neuroscience*, 2004, 20(11): 2896-2902.

(责任编辑:关蕴良)