

抑癌基因NPRL2对肾癌786-O细胞增殖和凋亡的影响

蒋立唐 伟*

(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016)

摘要 抑癌基因NPRL2(nitrogen permease regulator-like 2)在人类许多正常组织中均有明显的表达,而在人类多种肿瘤组织中的表达明显降低。该实验通过构建重组质粒pEGFP-N1-NPRL2并转染肾癌786-O细胞株,应用倒置荧光显微镜、RT-PCR和Western blot检测NPRL2基因的表达情况;MTT法检测786-O细胞增殖的情况;流式细胞仪分析细胞周期和细胞凋亡情况。结果显示:肾癌786-O细胞株转染重组质粒pEGFP-N1-NPRL2后,通过荧光显微镜可以观察到绿色荧光;RT-PCR和Western blot检测到NPRL2基因的转录和蛋白质表达水平明显增加($P<0.05$);MTT法检测发现72 h时pEGFP-N1-NPRL2组、pEGFP-N1组和空白对照组的细胞 D_{490} 值分别为 0.654 ± 0.030 、 1.528 ± 0.022 和 1.572 ± 0.036 ,pEGFP-N1-NPRL2组细胞的增殖较其他两组受到明显的抑制($P<0.05$);流式细胞仪检测显示pEGFP-N1-NPRL2组、pEGFP-N1组和空白对照组的凋亡率分别为 $18.82\%\pm 0.40\%$ 、 $5.65\%\pm 0.12\%$ 和 $5.85\%\pm 0.07\%$,而处于 G_0/G_1 期的细胞比例分别为 $69.80\%\pm 1.40\%$ 、 $46.24\%\pm 1.30\%$ 和 $47.03\%\pm 0.45\%$,与其他两组相比,pEGFP-N1-NPRL2组的凋亡率显著增高而且 G_0/G_1 期细胞明显增多,表现出 G_0/G_1 期阻滞。提示抑癌基因NPRL2的转染可以抑制786-O细胞的增殖,并诱导其凋亡将细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期。

关键词 NPRL2; 786-O细胞; 肾癌; 增殖; 凋亡

Effect of Tumor Suppressor Gene NPRL2 on Proliferation and Apoptosis of Human Renal Cancer Cell Line 786-O

Jiang Li, Tang Wei*

(Department of Urinary Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The tumor suppressor gene NPRL2 expressed obviously in many normal human tissues, but reduced in expression in many human tumors significantly. In this experiment, the recombinant expressing plasmids pEGFP-N1-NPRL2 were constructed and then transfected into 786-O cells by HG_TransGene. Fluorescent microscopy, RT-PCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression of NPRL2 in the transfected cells, respectively. The proliferation, apoptosis and cell cycle of 786-O cells were detected by the MTT assays and flowcytometry. The results showed that after transfected into 786-O cells, both the mRNA and protein levels of NPRL2 were increased in pEGFP-N1-NPRL2 group compared with pEGFP-N1 group and control group ($P<0.05$). MTT assay demonstrated that the value of D_{490} of the pEGFP-N1-NPRL2 group, pEGFP-N1 group and control group were 0.654 ± 0.030 , 1.528 ± 0.022 and 1.572 ± 0.036 , respectively. Compared with the other two groups, pEGFP-N1-NPRL2-infected 786-O cells showed a significant decrease in proliferation ($P<0.05$). The cell cycle assay indicated that the apoptotic rate of the pEGFP-N1-NPRL2 group, pEGFP-N1 group and control

收稿日期: 2012-10-08 接受日期: 2012-10-31

*通讯作者。Tel: 023-89011122, E-mail: tangwei2060@yahoo.com.cn

Received: October 8, 2012 Accepted: October 31, 2012

*Corresponding author. Tel: +86-23-89011122, E-mail: tangwei2060@yahoo.com.cn

group were $18.82\% \pm 0.40\%$, $5.65\% \pm 0.12\%$ and $5.85\% \pm 0.07\%$, and the proportion of the cell at G_0/G_1 phase was $69.80\% \pm 1.40\%$, $46.24\% \pm 1.30\%$ and $47.03\% \pm 0.45\%$. The cells at G_1 phase and apoptotic rate were both increased ($P < 0.05$) in recombinant group. The cell cycle was arrested in the G_0/G_1 phase after transfection compared with the other two groups. The results suggested that the transfection of *NPRL2* gene could suppress the proliferation, induce cell apoptosis and arrest cell cycle at G_0/G_1 phase of 786-O cells.

Key words NPRL2; 786-O cells; renal cancer; proliferation; apoptosis

NPRL2(nitrogen permease regulator-like 2)亦称肿瘤抑制候选基因4(tumor suppressor candidate 4, *TUSC4*), 是Lerman等^[1]通过基因克隆技术从人染色体3p21.3区域上得到的抑癌基因。该基因全长3.3 Kb, 含有11个外显子和10个内含子。研究证实, 抑癌基因*NPRL2*在人类许多正常组织中均有明显的表达, 如心脏、肝脏、肺、脑、肾脏、胰腺等^[2], 但有趣的是, 抑癌基因*NPRL2*在人类多种肿瘤(如肺癌、肾细胞癌、肝癌、乳腺癌、鼻咽癌、卵巢癌等)组织中的表达明显降低, 其机制至今仍然不够明确^[3-7]。新近一些研究表明, 抑癌基因在参与细胞周期信号转导的调控以及细胞凋亡的生物学功能之中起着重要的作用, 尤其是*NPRL2*能有效干扰多种肿瘤细胞的生长近年得到广泛的重视^[8-9]。由此, 我们推断肾癌的发生可能与抑癌基因*NPRL2*的失活有关。因此, 本实验通过基因转染技术将重组质粒pEGFP-N1-NPRL2转染入肾癌786-O细胞株中, 观察*NPRL2*基因的表达对肾癌细胞的增殖影响, 为进一步探讨肾癌的发病机理奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

真核表达载体pEGFP-N1、肾癌786-O细胞株由重庆医科大学临床与诊断实验室馈赠。基因*NPRL2*购于上海生博医学生物工程科技有限公司; 无内毒素质粒抽提试剂盒购于Omega公司; HG_TransGene购于Healthgene公司; 一抗鼠抗人*NPRL2*多克隆抗体购于Abcam公司。

1.2 重组质粒的构建及转染

1.2.1 重组质粒的构建 以*NPRL2*基因为模板通过PCR扩增目的基因, 引物设计为: 上游引物: 5'-GGA CTC AGA TAT GGG CAG CGG CTG CCG-3', 在上游引物中加入*Xho* I-F酶切位点及保护碱基, 下游引物: 3'-GGC GAC CGG TCT TCC AGC AGA TGA

TGA TGT TGG-5', 在下游引物中加入*Bam*H I-R酶切位点及保护碱基, 扩增产物大小为1 180 bp。用限制性内切酶*Xho* I-F和*Bam*H I-R分别酶切PCR产物和质粒pEGFP-N1并胶回收, 回收后的产物通过T4连接酶连接后转化感受态细胞, 通过含卡那霉素的培养基筛选阳性菌落并抽提质粒, 重组质粒命名为pEGFP-N1-NPRL2。将重组质粒送往上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.2.2 倒置荧光显微镜观察重组质粒在肾癌786-O细胞中的表达 用含10%胎牛血清的培养基RPMI1640培养人肾癌786-O细胞, 转染前1 d, 将细胞以每孔 2.5×10^5 接种于24孔板中培养至细胞融合度达70%~80%。实验设3组: pEGFP-N1-NPRL2组(重组质粒组)、pEGFP-N1组(空质粒组)和空白对照组(786-O未处理组), 采用HG_TransGene转染法进行转染。转染24 h后置于倒置荧光显微镜下观察荧光蛋白的表达。

1.3 RT-PCR检测*NPRL2* mRNA的表达

将各组细胞接种于6孔板中进行培养, 待细胞融合度达到70%~80%后进行转染, 然后培养48 h后用Trizol提取各组细胞总RNA, 经测定所用样品的 D_{260}/D_{280} 比值都在1.8~2.0之间。反转录过程也按试剂说明书进行操作。应用Prime Premier 5.0软件设计*NPRL2*和内参 β -actin基因引物。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列为*NPRL2*上游引物: 5'-GCA TGT CTA TCC TAC GTG ACC A-3', 下游引物: 5'-CTC ATC CAG CTC ATG GTA GCT C-3', 扩增产物大小为315 bp; β -actin上游引物: 5'-ACT GTG CCC ATC TAC GAG G-3', 下游引物: 5'-GAA AGG GTG TAA CGC AAC TA-3', 扩增产物大小为678 bp。

PCR循环条件为: 94 °C预变性2 min; 94 °C变性30 s, 62 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 30 个循环; 72 °C延伸10 min。PCR反应产物的大小分别为315 bp

(NPRL2)和678 bp(β -actin), PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳, Gold View染色。使用紫外光凝胶照像, 经Image软件进行灰度测定, 对NPRL2灰度值与 β -actin灰度值的比值进行分析。

1.4 Western blot检测NPRL2蛋白的表达

对转染后的各组细胞培养48 h后弃去培养液, 用PBS洗涤3次后各加入PMSF 3 μ L和裂解液300 μ L提取蛋白, 离心后取上清液, 再上样进行聚丙烯酰胺电泳, 然后电转并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, 次日二抗孵育1 h, 最后用化学发光试剂显色。

1.5 MTT检测细胞生长情况

将各组细胞按每孔 5×10^3 接种于96孔板, 待细胞融合度达到70%~80%时进行转染。设pEGFP-N1-NPRL2组、pEGFP-N1组、空白对照组各5孔, 然后分别于24, 48, 72 h在每孔中各加入20 μ L MTT液, 培养4 h, 弃上清, 再加入200 μ L DMSO, 充分振荡10 min。最后分别检测3组转染后各个时间点的光密度值(D_{490})并重复3次。根据 D_{490} 值绘制细胞增殖曲线。

1.6 流式细胞仪分析细胞凋亡和细胞周期

将转染后48 h的各组细胞用PBS洗涤3次, 加入7-AAD 10 μ L和AnnexinV-PI 5 μ L, 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, 然后去除固定液并加入碘化丙啶和RNA酶, 染色30 min, 最后用流式细胞仪检测, 实验重复3次。

1.7 统计学处理

数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 应用统计学软件SPSS17.0进

行分析, 多组之间比较运用方差分析, 两两比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 测序鉴定

重组质粒pEGFP-N1-NPRL2采用通用引物正反向测序, 并由NCBI BLAST比对测序结果, 所测结果与目的基因同源性100%(数据未显示)。

2.2 重组质粒在786-O细胞中的表达情况

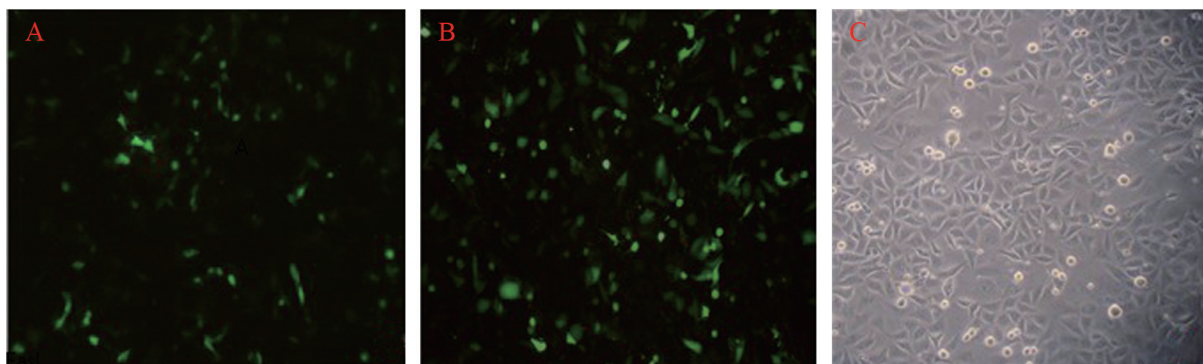
用倒置荧光显微镜观察转染24 h后的各组细胞绿色荧光表达情况, pEGFP-N1-NPRL2组和pEGFP-N1组均可见绿色荧光, 而空白对照组未见绿色荧光, 说明重组质粒成功转染入786-O细胞(图1)。

2.3 RT-PCR检测NPRL2的表达

将转染48 h后的3组细胞分别提取总RNA, 并用RT-PCR进行检测。电泳结果显示: pEGFP-N1-NPRL2组、pEGFP-N1组和空白对照组NPRL2基因表达量与 β -actin灰度比值分别为 1.12 ± 0.07 、 0.68 ± 0.03 和 0.65 ± 0.06 , 重组质粒组与空质粒组以及空白对照组相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 而空质粒组和空白对照组相比无统计学差异($P > 0.05$), 进一步说明pEGFP-N1-NPRL2成功转染入786-O细胞, 并能在其中表达(图2)。

2.4 Western blot检测NPRL2蛋白的表达

将转染48 h后的3组细胞分别提取其总蛋白进行Western blot检测。结果显示: pEGFP-N1-NPRL2组在71 kDa左右有目的条带出现, 而pEGFP-N1组和空白对照组在对应位置无条带出现(图3)。

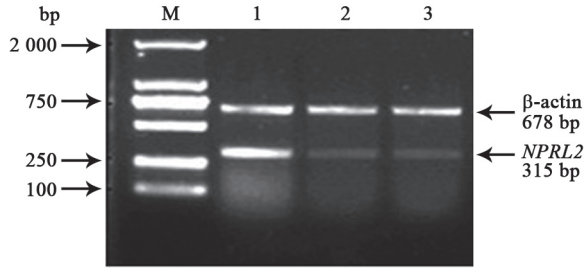


A: 重组质粒组; B: 空质粒组; C: 空白对照组。

A: pEGFP-N1-NPRL2 group; B: pEGFP-N1 group; C: 786-O cells group

图1 荧光显微镜观察GFP在各组质粒转染的786-O细胞中的表达(200 \times)

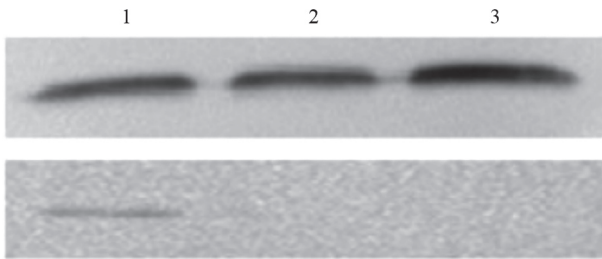
Fig.1 GFP mRNA expression in 3 groups of 786-O cells by fluorescence microscope(200 \times)



M: DNA标准(DL 2 000); 1: 重组质粒组; 2: 空质粒组; 3: 空白对照组。
M: DNA marker(DL 2 000); 1: pEGFP-N1-NPRL2 group; 2: pEGFP-N1 group; 3: 786-O cells group.

图2 RT-PCR检测NPRL2基因在各组细胞中的表达

Fig.2 NPRL2 mRNA expression in 3 groups of 786-O cells



1: 重组质粒组; 2: 空质粒组; 3: 空白对照组。
1: pEGFP-N1-NPRL2 group; 2: pEGFP-N1 group; 3: 786-O cells group.

图3 Western blot检测融合蛋白在各组细胞中的表达

Fig.3 Fusion protein expression in 3 groups of 786-O cells

2.5 MTT检测细胞的增殖情况

MTT检测结果显示: 与空质粒组和空白对照组相比, 重组质粒组细胞的增殖明显受到抑制($P < 0.05$); 而空质粒组与空白组对比细胞的增殖没有明显变化($P > 0.05$)。其结果提示, 抑癌基因NPRL2的转染能抑制肾癌细胞786-O的增殖(图4)。

2.6 流式细胞仪分析细胞凋亡情况

转染48 h后的各组细胞经流式细胞仪分析发现: 重组质粒组的凋亡率($18.82\% \pm 0.40\%$)明显高于空

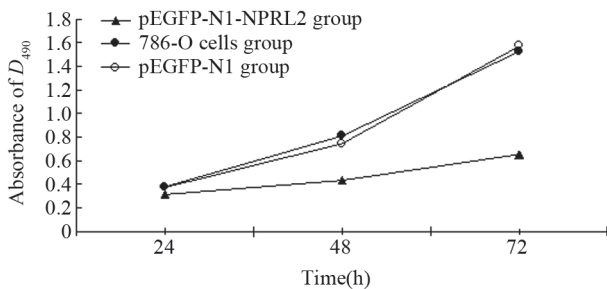


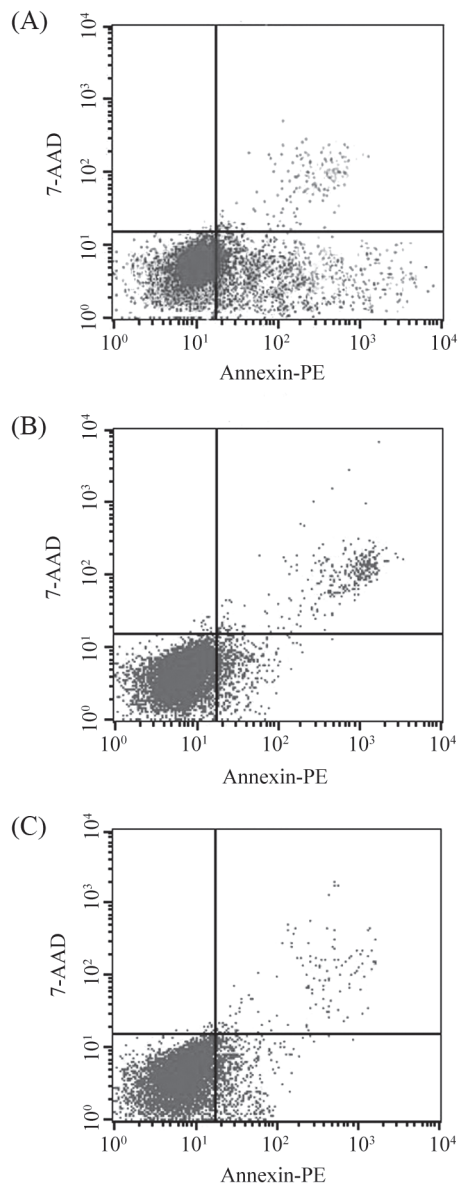
图4 各组细胞的增殖曲线

Fig.4 Cell proliferation curves of 3 groups

质粒组($5.65\% \pm 0.12\%$)与空白对照组($5.85\% \pm 0.07\%$) ($P < 0.05$)。由此可推断, 抑癌基因NPRL2可诱导肾癌786-O细胞的凋亡(图5)。

2.7 流式细胞仪分析细胞周期

将转染48 h后的细胞进行流式细胞仪检测, 其结果显示: 重组质粒组处于G₀/G₁期的细胞明显多于空质粒组和空白对照组($P < 0.05$), 而空质粒组与空白对照组对比差异无统计学意义($P > 0.05$)。其结果表明, 抑癌基因NPRL2的转染将肾癌786-O细胞阻滞在G₀/G₁期(表1和图6)。



A: 空白对照组; B: 空质粒组; C: 重组质粒组。

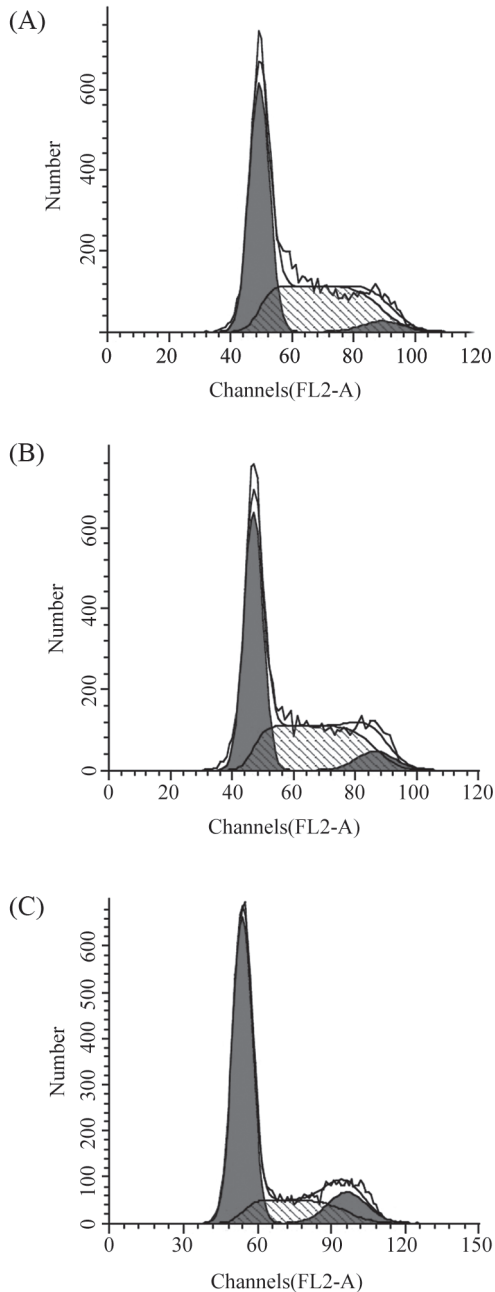
A: 786-O cells group; B: pEGFP-N1 group; C: pEGFP-N1-NPRL2 group.

图5 转染不同质粒对786-O细胞凋亡的影响

Fig.5 Assessment of apoptosis in 3 groups of 786-O cells

表1 流式细胞术检测各组细胞周期($\bar{x}\pm s$)Table 1 Flow cytometric analysis of cell cycle in cells($\bar{x}\pm s$)

组别 Groups	G ₀ /G ₁ 期 G ₀ /G ₁ phase	S期 S phase	G ₂ /M期 G ₂ /M phase
pEGFP-N1-NPRL2	69.80%±1.40%*	16.92%±1.3%*	13.28%±2.08%*
pEGFP-N1	46.24%±1.30%	41.46%±0.6%	12.30%±1.92%
786-O cells	47.03%±0.45%	40.96%±1.5%	12.01%±1.87%

* $P<0.05$, 与其他两组比较。* $P<0.05$ compared with other two groups.

A: 空白对照组; B: 空质粒组; C: 重组质粒组。

A: 786-O cells group; B: pEGFP-N1 group; C: pEGFP-N1-NPRL2 group.

图6 转染不同质粒对786-O细胞周期的影响

Fig.6 Assessment of cell cycle in 3 groups of 786-O cells

3 讨论

肾癌亦称肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC), 为最常见的肾实质恶性肿瘤, 占成人恶性肿瘤的2%~3%, 且近年来呈现出不断上升的趋势^[10]。大约一半的患者首次就诊时已属肾癌晚期, 传统的手术治疗目前仍为肾癌的主要治疗手段, 放化疗治疗效果均不佳。然而, 随着基因治疗的研究和应用逐渐深入, 基因治疗已经成为肾癌特别是中晚期肾癌治疗的研究热点^[11-12], 这也为肾癌的生物治疗带来了曙光。

虽然NPRL2是一个新发现的肿瘤抑制基因, 但是众多研究证实其与肿瘤的发生发展、预后可能存在一定的关系。Wang等^[13]对多种肿瘤细胞进行基因失活检测发现, 在肺癌细胞和肾癌细胞中NPRL2的表达明显下降。梁大英等^[14]也发现NPRL2蛋白的低表达可能与非小细胞肺癌的发生发展密切相关。裴凤华等^[15]检测到NPRL2在大肠癌患者外周血DNA中明显缺失, 并且在大肠癌的分子筛查和诊断中具有一定应用价值。程智勇等^[16]采用免疫组化SP法检测到胃癌组织中NPRL2蛋白表达降低, 但与胃癌的分化程度和分期等无明显相关。NPRL2在多种肿瘤组织中的表达明显降低, 但是其在许多正常组织明显表达。由此可推断NPRL2基因失活与多种恶性肿瘤的发生发展有关。但目前国内外对于NPRL2的研究还主要集中在一些基础的研究上, 对于其抑制肿瘤的具体机制和作用仍需要进一步的研究。

本实验通过基因亚克隆技术构建成了真核表达载体pEGFP-N1-NPRL2, 并且成功将其转染入肾癌786-O细胞株中。通过基因转染后, 检测到重组质粒组NPRL2基因的表达量较空质粒组与空白组明显增高, 目的蛋白表达量与空质粒组和空白组相比明显增高, 说明重组质粒构建成功。MTT法检测结果显示, 72 h时重组质粒组的细胞增殖显著低于空质粒组和空白对照组, 说明NPRL2可以明显抑制肾癌肿瘤细胞的增殖, 此结果与Ji等^[17]对非小细胞肺癌的

研究结果一致。此外, 流式细胞仪检测结果发现重组质粒组的凋亡率和处于G₀/G₁期的细胞数明显高于空质粒组和空白对照组, 表现出G₀/G₁期阻滞, 与江拥军(中南大学博士学位论文, 2008年)对肺癌的研究结论相似。实验结果表明, 抑癌基因NPRL2能有效调节肾癌细胞周期检查点, 将其阻滞于G₀/G₁期, 并能起到抑制肾癌细胞增殖和诱导其凋亡的作用。

综上所述, 本实验显示抑癌基因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, 从而起到抑制增殖的作用, 说明抑癌基因NPRL2与肾癌的发生发展密切相关, 这为今后进一步研究抑癌基因NPRL2在肾癌中的作用机制及其途径奠定了良好的基础。

参考文献 (References)

- 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 chromosome 3p21.3 tumor suppressor gene consortium. *Cancer Res* 2000; 60(21): 6116-33.
- Li J, Wang F, Haraldson K, Protopopov A, Duh FM, Geil L, *et al.* Functional characterization of the candidate tumor suppressor gene NPRL2/G21 located in 3p21.3C. *Cancer Res* 2004; 64(18): 6438-43.
- Sasatomi E, Finkelstein SD, Woods JD, Bakker A, Swalsky PA, Luketich JD, *et al.* Comparison of accumulated allele loss between primary tumor and lymph node metastasis in stage II non-small cell lung carcinoma: Implications for the timing of lymph node metastasis and prognostic value. *Cancer Res* 2002; 62(9): 2681-9.
- Senchenko VN, Anedchenko EA, Kondratieva TT, Krasnov GS, Dmitriev AA, Zabarovska VI, *et al.* Simultaneous down-regulation of tumor suppressor genes RBSP3/CTDSPL, NPRL2/G21 and RASSF1A in primary non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 2010; 10: 75.
- Otani S, Takeda S, Yamada S, Sakakima Y, Sugimoto H, Nomoto S, *et al.* The tumor suppressor NPRL2 in hepatocellular carcinoma plays an important role in progression and can be served as an independent prognostic factor. *J Surg Oncol* 2009; 100(5): 358-63.
- Zabarovsky ER, Lerman MI, Minna JD. Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers. *Oncogene* 2002; 21(45): 6915-35.
- Yi Lo PH, Chung Leung AC, Xiong W, Law S, Duh FM, Lerman MI, *et al.* Expression of candidate chromosome 3p21.3 tumor suppressor genes and down-regulation of BLU in some esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Lett* 2006; 234(2): 184-92.
- Chow LS, Lo KW, Kwong J, To KF, Tsang KS, Lam CW, *et al.* RASSF1A is a target tumor suppressor from 3p21.3 in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 2004; 109(6): 839-47.
- Li J, Wang F, Protopopov A, Malyukova A, Kashuba V, Minna JD, *et al.* Inactivation of RASSF1C during *in vivo* tumor growth identifies it as a tumor suppressor gene. *Oncogene* 2004; 23(35): 5941-9.
- 郭应禄, 周利群(译). 坎贝尔-沃尔什泌尿外科学. 第9版. 北京: 北京大学医学出版社(Guo Yinglu, Zhou Liqun. Campbell-Walsh UROLOGY. 9th Edition. Beijing: Beijing Medical University Press) 2009, 1668-725.
- Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) alpha: Its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 2004; 36(1): 1-12.
- Hirota E, Yan L, Tsunoda T, Ashida S, Fujime M, Shuin T, *et al.* Genome-wide gene expression profiles of clear cell renal cell carcinoma: Identification of molecular targets for treatment of renal cell carcinoma. *Int J Oncol* 2006; 29(4): 799-827.
- Wang F, Grigorieva EV, Li J, Senchenko VN, Pavlova TV, Anedchenko EA, *et al.* HYAL1 and HYAL2 inhibit tumor growth *in vivo* but not *in vitro*. *PLoS One* 2008; 3(8): e3031.
- 梁大英, 谢宗涛. 非小细胞肺癌组织中NPRL2蛋白的表达及意义. *实用肿瘤学杂志*(Liang Daying, Xie Zongtao. The correlation between the expression of NPRL2 protein and prognosis in non-small cell Lung cancer. *Journal of Practical Oncology*) 2011; 25(2): 1002-3070.
- 裴凤华, 赵晶, 杜雅菊, 程艳秋, 王晓芬, 陈晶, 等. 外周血DNA TUSC4基因缺失在大肠癌分子筛查及早期诊断中的应用. *世界华人消化杂志*(Pei Fenghua, Zhao Jing, Du Yaju, Cheng Yanqiu, Wang Xiaofen, Chen Jing, *et al.* Significance of detection of TUSC4 gene deletion in peripheral blood DNA for molecular screening and diagnosis of colorectal carcinoma. *World Chinese Journal of Digestology*) 2010; 18(31): 3320-6.
- 程智勇, 韩猛, 门晓彦, 易喜贤. 胃癌组织中NPRL2蛋白的表达变化. *山东医学*(Cheng Zhiyong, Han Meng, Men Xiaoyan, Yi Xixian. *Shandong Medical Journal*) 2011; 51(14): 42-3.
- Ji L, Nishizaki M, Gao B, Burbee D, Kondo M, Kamibayashi C, *et al.* Expression of several genes in the human chromosome 3p21.3 homozygous deletion region by an adenovirus vector results in tumor suppressor activities *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 2002; 62(9): 2715-20.