

抑癌候选基因 NDRG2 对结肠癌细胞 SW620 的迁移和侵袭力的影响 *

王建勋² 初大可² 徐春盛² 张 健¹ 王为忠^{2△}

(1 第四军医大学生物化学与分子生物学教研室 陕西 西安 710032 2 第四军医大学西京医院胃肠外科 陕西 西安 710032)

摘要 目的 观察 NDRG2 对结肠癌 SW620 细胞侵袭、转移等生物学行为的影响,探讨其可能的调节机制。方法 用阳离子脂质体转染方法分别转染 pcDNA3.1-NdrG2 和 SiRNA-NdrG2 于 SW620 细胞内 48h,上调 / 下调 NDRG2 的表达 检测 NDRG2 基因 mRNA 及蛋白表达水平的变化;通过划痕试验及 transwell 细胞侵袭试验进一步对上调 / 下调 NDRG2 表达水平后的结肠癌细胞迁移和侵袭能力进行分析。结果 :pcDNA3.1-NdrG2 转染 SW620 后,NDRG2 的 mRNA 和蛋白表达水平明显升高,细胞的迁移和侵袭能力下降, SiRNA-NdrG2 转染 SW620 后,NDRG2 的 mRNA 和蛋白表达水平明显降低,细胞的迁移和侵袭能力上升,差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。结论 NDRG2 作为抑癌候选基因能够降低结肠癌细胞转移和侵袭能力。

关键词 NDRG2 结肠癌 划痕试验 transwell 细胞侵袭实验

中图分类号 R735.35 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 09-1605-04

Effects of Candidate Tumor Suppressor Gene NDRG2 on Migratory and Invasive Ability of Colon Cancer Cells*

WANG Jian-xun², CHU Da-ke², XU Chun-sheng², ZHANG Jian¹, WANG Wei-zhong^{2△}

(1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Fourth Military Medical University, 710032, Xi'an, China;

2 Department of Gastrointestinal Surgery, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, 710032, Xi'an, China)

ABSTRACT Objective: To observe the influence of NDRG2 on the migratory and invasive ability of human colon cancer cell line SW620. **Method:** pcDNA3.1-NdrG2 and SiRNA-NdrG2 were transfected transiently respectively into SW620 by LipofectamineTM 2000. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were used to investigate the expression of mRNA and protein of NDRG2. Matrigel invasion assays and wound - healing experiment were used to study the movement and invasion in human colon cancer cell line SW620. **Result:** After transfecting pcDNA3.1-NdrG2 into SW620 cells, the mRNA and protein level of NDRG2 increased markedly and the ability of migration and invasion decreased significantly. After transfecting SiRNA-NdrG2 into SW620 cells, the mRNA and protein level of NDRG2 declined markedly and the ability of migration and invasion increased significantly. **Conclusion:** NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene can reduce the ability of metastasis and invasion of colon cancer cells.

Key words: NDRG2; SW620 cell; Colon cancer; Transwell invasion; Wound healing

Chinese Library Classification: R735.35 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)09-1605-04

前言

NDRG (N-myc downstream-regulated gene) 基因家族由 NDRG1~4 共四个成员组成,它们之间有 57 %~65 %的同源性^[1],其中 NDRG2 基因由我校首先发现并克隆^[2]。目前研究发现 NDRG2 在众多肿瘤组织中低表达,如肝癌、胰腺癌、甲状腺癌和脑膜瘤,被认为在肿瘤抑制中起一定的作用^[3-4]。我们前期的研究也发现在结肠癌及高危腺瘤中 NDRG2 表达量明显低于正常组织,并且随着 Dukes' 分级的增高,NDRG2 表达有下降趋势,同时 NDRG2 的表达与结直肠癌的再发呈负相关^[5],这均提示 NDRG2 在结肠癌发生过程中起着抑制作用,并可能参与结肠癌细胞的侵袭和转移^[6]。本研究从结肠癌细胞的侵袭和转移入手,应用分子生物学方法,改变结肠癌细胞 SW620 中 NDRG2 的表达,分析其对结肠癌细胞侵袭和转移力的影响,初

步揭示 NDRG2 抑制侵袭、转移的作用机制,希望能为结肠癌的基因靶向治疗提供有意义的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂及仪器 质粒小量提取试剂盒购自 Omega 公司,细胞培养基 L15 购自 Sigma 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,脂质体 2000、RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司,Transwell 小室购自 Corning 公司,RT-PCR 试剂盒及引物购自 Takara 公司。质粒 PcDNA3.1-NDRG2 为本实验室保存。SiRNA-NDRG2 为 Invitrogen 合成。

1.1.2 细胞与培养 SW620 细胞为本实验室保存,培养于 37℃ 含 5 % CO₂ 细胞培养箱内,培养液为含 10 %胎牛血清的 L15,0.25 %胰蛋白酶消化传代,倒置显微镜下观察细胞生长状

* 基金项目 国家 863 高技术研究发展计划(2006AA02Z194) 国家自然科学基金(30700416,30672074)

作者简介 王建勋 (1981),男,硕士研究生,研究方向:胃肠道疾病。E-mail: wangjianxun08@gmail.com

△通讯作者 王为忠,E-mail: weichang@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2011-02-14 接受日期 2011-03-10)

态。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞转染 6孔板中接种 SW620 细胞,待细胞贴壁后长至 70%,利用阳离子脂质体转染方法,按照 4 μ g 质粒/10 μ l 脂质体、5 μ g siRNA/5 μ l 脂质体的比例分别将 pcDNA3.1-NdrG2 和 siRNA-NdrG2 转染入 SW620 细胞内,同时以空载体 pcDNA3.1 和 siRNA-negative 各自设置对照,48 小时后收集细胞进行后续检测。

siRNA-NdrG2 序列 Sense 5'-AUAGUUGAGUCCCA-CAUCGTG-3'

Antisense 5'-CGAUGUGGGACUCAACUAUAA-3'

siRNA-negative 序列 Sense 5'-UUCUCCGAACGUGU-CACGUTT-3'

Antisense 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'

1.2.2 RT-PCR 检测 NDRG2 在 SW620 细胞中的表达 按 Trizol 试剂盒说明书分别提取转染后 48 h pcDNA3.1-NdrG2 组、pcDNA3.1 组、siRNA-NdrG2 组以及 siRNA-negative 组 SW620 细胞的总 RNA。RT-PCR 反应按照 Takara 反转录 PCR 试剂盒说明书进行操作,反转录合成 cDNA 的第一条链,利用 Primer 5.0 设计 NDRG2 的鉴定引物:上游 5'-AACCACCCGGACACT-GTTGAA-3',下游 5'-AAGGATCATCTCCGGAATGGAAG-3',扩增片段长度 123 bp。PCR 扩增条件:95℃预变性 5 min,94℃30 s,退火 58℃30 s,延伸 72℃1 min,30 个循环;最后延伸 72℃7 min。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内参照。GAPDH 上游引物:5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3',下游引物:5'-TGGTGAA-GACGCCAGTGGA-3',扩增片段长度为 138 bp。以上两对 PCR 引物均由 Takara 公司合成。PCR 反应结束后取 10 μ l 反应产物行 1%琼脂糖凝胶电泳观察目的片段。

1.2.3 Western-blot 检测 NDRG2 在 SW620 细胞中的表达 分别收集转染后 48 h pcDNA3.1-NdrG2 组、pcDNA3.1 组、siRNA-NdrG2 组以及 siRNA-negative 组 SW620 细胞,用放射免疫沉淀裂解液裂解细胞,提取蛋白,加入 5×SDS 凝胶加样缓冲液,沸水浴 5 min,每孔加样 20 μ l,行 12%十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳,采用半干法将蛋白转移至硝酸纤维素膜上。硝酸纤维素膜用 5%脱脂奶封闭 1 h,加入 NDRG2 pAb(1:400)或 α -tubulin mAb(1:1000)工作液,4℃过夜,山羊抗兔或山羊抗小鼠二抗(1:4000)于室温下孵育 1 h,化学法发光,胶片显色,分析结果。以 α -tubulin 作为内参照。

1.2.4 细胞体外侵袭能力检测 在 24 孔 transwell 上室聚碳酸酯膜(膜孔径 8 μ m)上涂 1 mg/ml 的 matrigel 70 μ l,37℃,60 分钟,使之在微孔滤膜上重组为基底膜结构。分别取转染后 48 h pcDNA3.1-NdrG2 组、pcDNA3.1 组、siRNA-NdrG2 组以及 siRNA-negative 组 SW620 细胞,以 L15 培养液(不加胎牛血清)调整细胞浓度为 1×10⁵/ml,取细胞 200 μ l 接种于 transwell 上室内,下室加入 10%胎牛血清的 L15 培养液 500 μ l,37℃,5%CO₂,培养 24 h,将滤膜上层细胞用棉签抹去,滤膜以甲醇固定,然后用结晶紫染色 15 分钟。100 倍光镜下随机选取膜上下左右中 5 个不同视野,计算穿膜细胞数,求平均值。

1.2.5 细胞体外迁移能力检测 分别取转染后 48 h pcDNA3.1-NdrG2 组、pcDNA3.1 组、siRNA-NdrG2 组以及 siRNA-negative 组 SW620 细胞,用含有 10%胎牛血清的 L15 培养液将细胞密度调整为 5×10⁵/ml 接种于 6 孔板中,待细胞生长至 80%左右,将培养液换为无血清的 L15,24 h,用 200 μ l 的枪头在单层细胞上划痕,用 PBS 洗一遍,继续在无血清培养液中培养 24 h,倒置显微镜下,于 0 h 和 24 h 在同一视野内观察划痕两侧边缘的距离。

1.3 统计学处理

使用 Graphpad prism v5.0 软件进行数据分析。数据以 mean $\pm$ SD 表示。样本均数间比较行方差分析(ANOVA)。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞中 NDRG2 基因 mRNA 表达的改变

RT-PCR 显示 pcDNA3.1-NdrG2 组 NDRG2 在 mRNA 水平上表达较 pcDNA3.1 组升高,siRNA-NdrG2 组 NDRG2 在 mRNA 水平上表达较 siRNA-negative 组降低,pcDNA3.1 组与 siRNA-negative 组无明显差异。

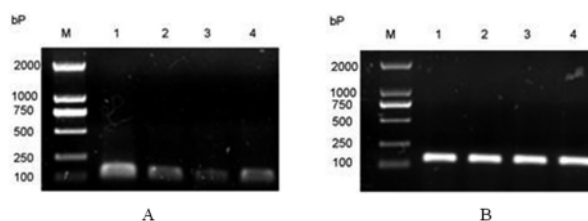


图 1 各组细胞 NDRG2 基因 mRNA 表达水平

Fig.1 Expression of NDRG2 mRNA in different groups

A NDRG2 mRNA 表达 B GAPDH 表达 1 pcDNA3.1-NdrG2 组 2 pcDNA3.1 组 3 siRNA-NdrG2 组 4 siRNA-negative 组

2.2 各组细胞中 NDRG2 蛋白表达的改变

Western blot 显示 pcDNA3.1-NdrG2 组 NDRG2 蛋白表达水平较 pcDNA3.1 组升高,siRNA-NdrG2 组蛋白表达水平较 siRNA-negative 组降低,pcDNA3.1 组与 siRNA-negative 组无明显差异。

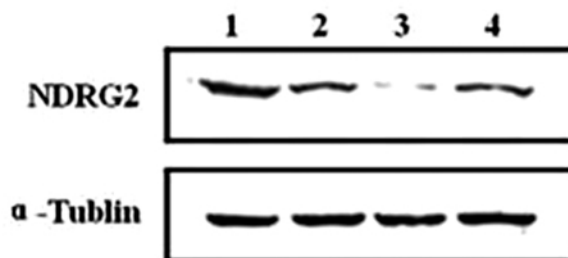


图 2 各组细胞 NDRG2 蛋白表达水平

Fig.2 Expression of NDRG2 protein in different groups

1 pcDNA3.1-NdrG2 组 2 pcDNA3.1 组 3 siRNA-NdrG2 组 4 siRNA-negative 组

2.3 NDRG2 对细胞侵袭力的影响

上调 NDRG2 的表达能降低 SW620 细胞穿过聚碳酸酯膜的能力,而下调 NDRG2 的表达增强细胞穿过聚碳酸酯膜的能力。细胞侵袭实验显示,pcDNA3.1-Ndr2 组 (64.60 ± 7.23) 与 pcDNA3.1 组 (89.20 ± 9.94) 相比,穿膜细胞数明显减少,siR-

NA-Ndr2 组 (118.80 ± 12.28) 与 siRNA-negative 组 (90.20 ± 9.09) 相比,穿膜细胞数明显增加。差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。pcDNA3.1 组与 siRNA-negative 组无明显差异。

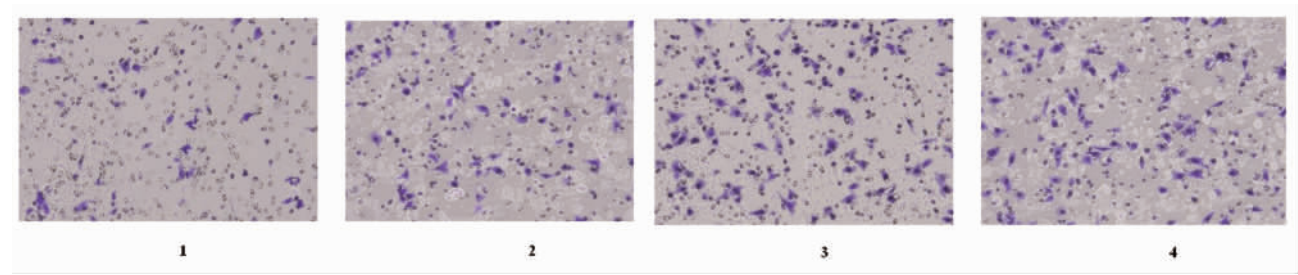


图 3 各组细胞穿过聚碳酸酯膜结果(结晶紫染色 $\times 100$)

Fig.3 Results of cells through the polycarbonate membrane (Crystal violet staining: $\times 100$)
1 pcDNA3.1-Ndr2 组 2 pcDNA3.1 组 3 siRNA-Ndr2 组 4 siRNA-negative 组

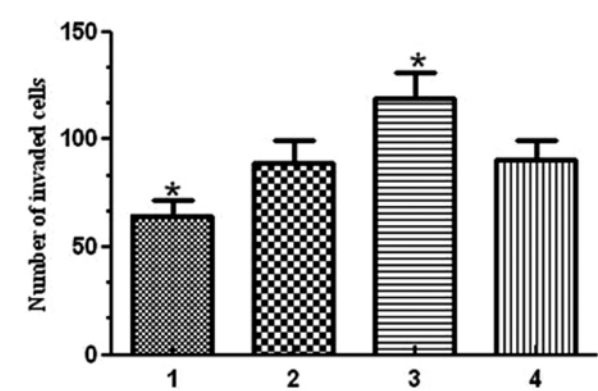


图 4 各组细胞穿过聚碳酸酯膜和 Matrigel 胶后的穿膜细胞数比较
Fig.4 Numbers of cell through the polycarbonate membrane and matrigel
1 pcDNA3.1-Ndr2 组 2 pcDNA3.1 组 3 siRNA-Ndr2 组 4 :
siRNA-negative 组 ; * $P < 0.05$, 1vs2, 3vs4

2.4 NDRG2 对细胞迁移力的影响

划痕后使用无血清的培养液继续培养 24 h, 结果显示 : pcDNA3.1-Ndr2 组 (45.00 ± 6.40) 的细胞迁移距离与 pcDNA3.1 组 (72.40 ± 7.70) 相比较小, siRNA-Ndr2 组 (103.80 ± 11.84) 的细胞迁移距离与 siRNA-negative 组 (73.60 ± 9.34) 相比较较大, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), pcDNA3.1 组与 siRNA-negative 组无明显差异。

3 讨论

转移是恶性肿瘤细胞的一个重要特征,同时也是造成肿瘤患者死亡的重要原因,它是一个多步骤过程,包括粘附细胞外基质、蛋白分解消化细胞外基质、侵袭淋巴结和血管^[7]。在以上研究中,我们证实了在 NDRG2 表达降低的人结肠癌转移瘤细胞系 SW620 中, 升高 NDRG2 的表达可以显著降低肿瘤细胞的转移能力,相反,降低 NDRG2 的表达则提高了肿瘤细胞的转移能力。上述结果证明 NDRG2 作为抑癌候选基因能够降低

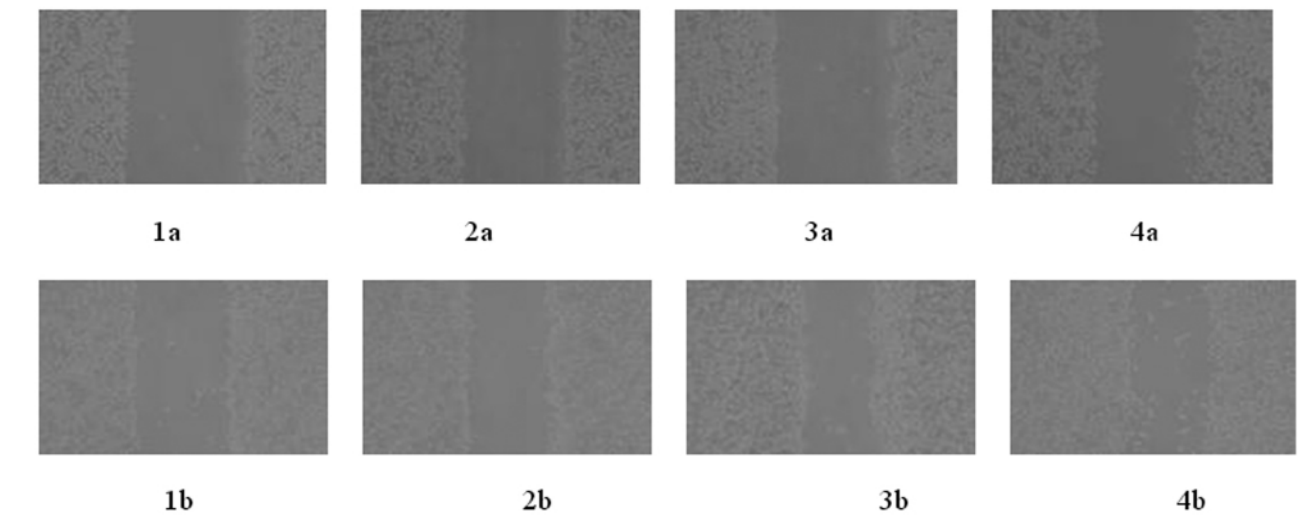


图 5 各组细胞划痕试验结果

Fig.5 Results of wound-healing experiment
1 pcDNA3.1-Ndr2 组 2 pcDNA3.1 组 3 siRNA-Ndr2 组 4 siRNA-negative 组 a 0h b 24h

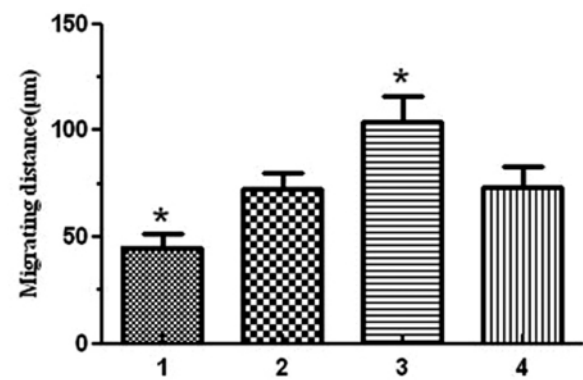


图 6 各组细胞划痕试验迁移距离

Fig.6 Results of wound-healing experiment

1 pcDNA3.1-NdrG2 组 2 pcDNA3.1 组 3 siRNA-NdrG2 组；
4 siRNA-negative 组 * P<0.05,1vs2,3vs4

结肠癌细胞的转移和侵袭能力。人结肠癌的体内扩散方式主要为淋巴和血行转移以及局部浸润。肿瘤细胞通过蛋白水解酶降解细胞外结缔组织间质和血管基底膜。蛋白水解酶主要包括四类：丝氨酸蛋白酶(如纤溶酶原激活物)、半胱氨酸蛋白酶(如组织蛋白酶 B)、天门冬氨酸蛋白酶(如胃蛋白酶)和基质金属蛋白酶 MMPs,其中基质金属蛋白酶最为重要。而在 MMPs 家族众多成员中,又以 MMP-2 和 MMP-9 对肿瘤细胞转移意义最大。Aeyung Kim 等研究发现 NDRG2 的表达与基质金属蛋白酶 MMP-2 和 MMP-9 的活性呈负相关,同时这种负相关是通过抑制 NF-κB 信号通路而实现的^[8]。YJ Kim 等研究发现 NDRG2 通过降低 AP-1 的活性,进而抑制 CyclinD1 通路,以此实现对细胞周期和肿瘤转移的调控^[9]。

目前人类对于肿瘤细胞转移的发生机制还不十分清楚,寻求新的治疗靶点以遏制肿瘤细胞的转移,提高肿瘤治疗效果,一直是医学研究的热点之一。NDRG2 目前定位为一种抑癌候选基因,在正常组织与肿瘤组织中的差异表达,表明它与细胞生长、转移以及分化等生物学行为相关,但其生物学功能至今尚未完全明确。因此,NDRG2 作为一种肿瘤相关基因可能在细胞的生物学进程中有着更多功能,通过对其结构、功能以及诱

导、活化调控机制的进一步研究,可对其与肿瘤细胞转移的关系产生新的认识,并为今后肿瘤基因治疗提供新的治疗方向。

参考文献(References)

[1] Qu X, Zhai Y, Wei H, et al. Characterization and expression of three novel differentiation-related genes belong to human NDRG gene family [J]. Mol Cell Biochem, 2002,229(1-2):35-44

[2] 邓艳春,药立波,刘新平,等.人脑内一含有 ACP 样结构域新基因的发现[J].生物化学与生物物理进展,2001,28:72-76

Deng Yan-chun, Yao Li-bo, Liu Xin-ping, et al. Exploring a new gene containing ACP like domain in human brain and expression it in E. coli.[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001,28:72-76

[3] Lorentzen,A. et al. Expression of NDRG2 is down-regulated in high-risk adenomas and colorectal carcinoma. BMC Cancer [J]. 2007,7: 192

[4] Zhao,H. et al. Reduced expression of N-Myc downstream-regulated gene 2 in human thyroid cancer[J]. BMC Cancer, 2008 ,8:303

[5] Chu D,Zhang Z,Li Y, et al. Prediction of colorectal cancer relapse and prognosis by tissue mRNA levels of NDRG2 [J]. Mol Cancer Ther, 2011 ,10(1):47-56

[6] 初大可,张健,施海,等.抑癌候选基因 NDRG2 在结肠癌组织中的表达[J].中华胃肠外科杂志,2008,11(4):354-357

Chu Da-ke, Zhang Jian, Shi Hai, et al.Expression of candidate tumor suppressor gene N-Myc downstream-regulated gene 2 in colon cancer [J]. Chin J Gastrointest Surg, 2008,11(4):354-357

[7] Jiang,Z.Q. et al. Relationship between expression of matrix metalloproteinase (MMP-9) and tumor angiogenesis, cancer cell proliferation, invasion, and metastasis in invasive carcinoma of cervix [J]. Ai Zheng, 2003,22:178-184

[8] Aeyung Kim, Myung-Jin Kim, Young Yang, et al. Suppression of NF-κB activity by NDRG2 expression attenuates the invasive potential of highly malignant tumor cells [J]. Carcinogenesis, 2009,30(6): 927-936

[9] Young-Jun Kim, Sun Y.Yoon1, Jong-Tae Kim, et al. NDRG2 expression decreases with tumor stages and regulates TCF/b-catenin signaling in human colon carcinoma [J]. Carcinogenesis, 2009,30 (4): 598-605