

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00157

## Kai1/CD82 对人喉癌 Hep-2 细胞株增殖能力的影响

王洪鹏<sup>1</sup>, 王 驰<sup>2</sup>, 谭 毅<sup>3</sup>, 叶 琳<sup>4</sup>, 陈鸿雁<sup>1\*</sup>

1. 重庆医科大学附属第一医院耳鼻喉科, 重庆 400016

2. 重庆医科大学药学院药物化学教研室, 重庆 400016

3. 重庆医科大学动物实验中心, 重庆 400016

4. 重庆医科大学附属第一医院胸心外科, 重庆 400016

**[摘要]** **目的** 探讨肿瘤转移抑制基因 Kai1/CD82 对人喉癌 Hep-2 细胞株增殖能力的影响。**方法** 以喉癌 Hep-2 细胞株为研究对象, 将携带有 Kai1 基因的重组腺病毒(rAd-Kai1)进行扩增、纯化并测定其滴度, 用适量 rAd-Kai1 转染人喉癌 Hep-2 细胞株, 以转染空病毒载体及未转染 Kai1 的喉癌细胞株为对照, 用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法测定 Kai1 对细胞增殖能力的影响, 用 RT-PCR 技术对转染后的细胞进行检测。**结果** rAd-Kai1 经扩增、纯化后, 滴度可达  $6 \times 10^{10}$  PFU/ml, 当病毒量为 30 MOI 时, Hep-2 细胞的转染率可达 90% 以上。MTT 实验显示转染空腺病毒组与未转染组比较, Hep-2 细胞株体外增殖能力无统计学差异, 转染 Kai1 组 Hep-2 细胞株体外增殖能力明显弱于未转染组 ( $P < 0.05$ ), 抑制率可达 29%。**结论** 肿瘤转移抑制基因 Kai1/CD82 对喉癌细胞株体外增殖能力具有抑制作用。

**[关键词]** Kai1/CD82; Hep-2; 喉肿瘤; 腺病毒载体; 转染; 细胞增殖

**[中图分类号]** R 739.65 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)02-0157-04

### Effect of metastasis suppressor gene Kai1/CD82 on proliferation of laryngo-carcinoma Hep-2 cell line

WANG Hong-peng<sup>1</sup>, WANG Chi<sup>2</sup>, TAN Yi<sup>3</sup>, YE Lin<sup>4</sup>, CHEN Hong-yan<sup>1\*</sup>

1. Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

3. Laboratory Animal Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

4. Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of metastasis suppressor gene Kai1/CD82 on the cell proliferation of Hep-2 cell line. **Methods** Recombinant adenovirus rAd-Kai1 was amplified, purified, and was used to transfect laryngo-carcinoma Hep-2 cell line. Cells transfected with blank vector and untransfected cells served as controls. MTT assay was used to assess the influence of Kai1 gene on proliferation of Hep-2 cells; RT-PCR was used to examine the expression of Kai1 gene in cells of different groups. **Results** The titer of rAd-Kai1 reached  $6 \times 10^{10}$  PFU/ml after expansion and purification. When the concentration of the adenovirus was 30 MOI, the transfection rate of Hep-2 cells could be higher than 90%. MTT assay showed that the cell proliferation abilities were similar in the two control groups, and the proliferation ability of cells in the Kai1 transfection group was significantly lower than that in the non-transfected group ( $P < 0.05$ ), with the inhibitory rate in the Kai1 group being 29%. **Conclusion** The Kai1/CD82 gene can inhibit the proliferation of Hep-2 cells.

**[Key words]** Kai1/CD82; Hep-2; laryngeal neoplasms; adenovirus vector; transfected; cell proliferation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(2):157-160]

肿瘤的恶性生物学行为是一个多个基因在不同时相差异表达进行复杂调控的过程<sup>[1]</sup>。喉癌是常见的头颈部恶性肿瘤, 近年来发病率逐渐上升。肿瘤转移抑制基因因其在恶性肿瘤发生、发展和侵袭转

移中的作用逐步受到广泛重视, 成为目前研究的热点。肿瘤转移抑制基因 Kai1/CD82 与多种肿瘤的发生、发展有关, 如胰腺癌<sup>[2]</sup>、宫颈癌<sup>[3]</sup>等。本课题组前期研究发现, 喉癌组织中有 Kai1/CD82 表达, 但其

**[收稿日期]** 2009-07-17 **[接受日期]** 2009-11-09

**[基金项目]** 重庆市科委资助课题(渝科发计字[2006]29号, CSTC, 2006BB)。Supported by Chongqing Science and Technology Committee (2006BB)。

**[作者简介]** 王洪鹏, 硕士生。E-mail: anick2000@163.com

\* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 023-89012758, E-mail: cchyy787@sohu.com

表达水平明显低于癌旁组织,提示 Kai1/CD82 的异常表达可能与喉癌转移有关<sup>[4]</sup>。为进一步探讨 Kai1/CD82 的生物学功能并明确其对喉癌的影响,本实验选用喉癌 Hep-2 细胞株,转染 Kai1 基因,探讨其在体外对喉癌细胞株增殖能力的影响。

## 1 材料和方法

1.1 病毒与细胞 喉癌细胞株 Hep-2 由本课题组成员重庆医科大学药学院药物化学教研室王驰副教授提供。Kai1 基因表达型腺病毒及 HEK293 细胞株由本课题组成员重庆医科大学动物实验中心谭毅教授提供。

1.2 主要试剂 RPMI 1640 培养液购于美国 Gibco 公司,新生小牛血清购于杭州四季青生物工程材料有限公司,DMEM、胰蛋白酶、MTT、DMSO(冻存用)购于美国 Sigma 公司, $\beta$ -actin 购于北京博奥森生物技术有限公司,PBS 购于北京中杉金桥生物技术有限公司,DNA 提取试剂盒、Kai1 基因的 PCR 引物及 PCR 通用试剂盒购于上海生工生物工程技术有限公司。

### 1.3 主要实验方法

1.3.1 Hep-2 细胞株培养 Hep-2 细胞株培养于含 10% 新生小牛血清的 RPMI 1640 培养液中,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱孵育,倒置显微镜观察其生长情况,按 1:3 传代,收集对数生长期细胞,胰酶消化,新鲜培养液制备细胞悬液,加入锥虫蓝兰进行活细胞计数。

1.3.2 rAd-Kai1 的扩增<sup>[5]</sup> HEK293 细胞株接种于培养瓶,培养至细胞接近饱和时加入 10 MOI 的 rAd-Kai1 病毒上清液,3 d 后待细胞全部病变、死亡时,收集细胞及上清液,4℃ 冰浴,超声破碎每次 15 s,间隔 5 s,共 3 次。离心去除细胞碎片,收集上清液,4℃、35 000×g 高速离心 6 h,浓缩病毒,重悬于 PBS 中,再用 1.34 g/ml CsCl 100 000×g、4℃ 超速离心 12 h,收集病毒,除菌待用。

1.3.3 rAd-Kai1 的滴度测定<sup>[5]</sup> HEK293 细胞株按  $1 \times 10^5$ /孔接种于 24 孔板中,48 h 后当细胞铺满达孔底约 80% 时,加入 rAd-Kai1 病毒上清液 0.5 ml,每组 6 孔,24 h 后加入 42℃ 预温的染色琼脂(组成为:2×DMEM 10 ml,小牛血清 1 ml,0.1% 中性红 1 ml 混合后 37℃ 保温,再与 10 ml 50℃ 2% 琼脂混合) 2 ml/孔,2 d 后再补充营养琼脂(组成为:2×DMEM 10 ml,小牛血清 1 ml,0.1% 中性红 2 ml,3% 琼脂 10 ml) 2 ml/孔,置 37℃ 培养箱继续培养,直至空斑出现且数量不再变化。计数空斑数、病毒滴度(PFU/ml)。

1.3.4 rAd-Kai1 对 Hep-2 肿瘤细胞的感染率测定<sup>[6]</sup> Hep-2 细胞株接种于 24 孔板,约 80% 饱和时分别加入 10、20、30 MOI rAd-Kai1,6 h 后弃上清液,换含 10% 新生小牛血清的 RPMI 1640 培养液继续培养 24 h,用免疫荧光显微镜观察结果,计算感染率。按下式计算:感染率 = 荧光细胞数/全部细胞数 × 100%。

1.3.5 rAd-Kai1 感染肿瘤细胞的 PCR 检测 培养 48 h 收集对照组细胞,实验组于转染后 48 h 收集细胞,分别提取细胞总 RNA。Kai1 上游引物:5'-AGG ATG CCT GGG ACT ACG TG-3',下游引物:5'-GCT CAG CGT TGT CTG TCC AGT-3',产物大小 735 bp。 $\beta$ -actin 上游引物:5'-TCG TGC GTG ACA TTA GGA G-3',下游引物:5'-GTC AGG CAG CTC GTA GCT CT-3',产物大小 247 bp。扩增条件:94℃ 变性 30 s,61℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环。

1.3.6 MTT 法测 Kai1 基因对 Hep-2 细胞株增殖的影响 实验分为转染组、空腺病毒组、未转染组,每组设 6 复孔。取对数生长期细胞,胰蛋白酶消化后,用含 10% 小牛血清的完全培养液配制单细胞悬液,调整细胞密度为  $2.5 \times 10^4$ /ml 接种于 96 孔板,每孔 200  $\mu$ l,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度环境下常规培养 24 h。弃上清液,3 组分别加入 30 MOI rAd-Kai1、30 MOI 空腺病毒、无血清 RPMI 1640,6 h 后弃上清,换含 10% 新生小牛血清的 RPMI 1640 培养液继续培养。分别在转染后 24、48、72 h,每孔加入 20  $\mu$ l MTT 液,孵箱内常规培养 4 h,吸尽上清液,每孔加入 DMSO 200  $\mu$ l,振荡 10 min 使结晶物充分溶解。空白孔调零后,以酶标仪检测 570 nm 处的光密度值( $D_{570}$ )。计算细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率 =  $(1 - \text{处理组 } D_{570} / \text{细胞对照组 } D_{570}) \times 100\%$ 。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件包对数据进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,转染与未转染组间比较采用配对  $t$  检验, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 rAd-Kai1 的扩增及滴度测定 rAd-Kai1 经 HEK293 细胞株扩增及纯化后,滴度可达到  $6 \times 10^{10}$  PFU/ml。

2.2 rAd-Kai1 对 Hep-2 肿瘤细胞株的感染率测定 10、20 及 30 MOI 的 rAd-Kai1 病毒对 Hep-2 细胞株的感染率分别为 23%、65%、90%。据此确定 30 MOI 为以下实验的感染剂量(图 1)。

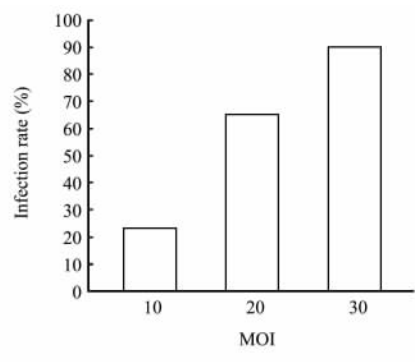


图 1 不同 MOI 值 rAd-Kai1 病毒对 Hep-2 细胞株的感染效果

Fig 1 Infection rates of Hep-2 cells with rAd-Kai1 at different MOIs

2.3 转染 Hep-2 细胞后 Kai1 mRNA 的表达 在 Kai1 转染组中可扩增出约 735 bp 的基因片段, 而其他两组中未见相应目的条带的表达。故可以认为转染 Kai1 基因组细胞中有 Kai1 mRNA 的表达, 结果见图 2。

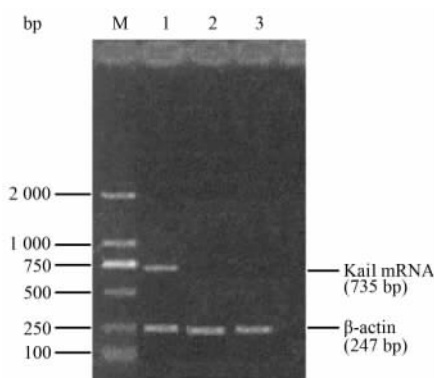


图 2 RT-PCR 检测 Kai1 mRNA 的表达

Fig 2 Expression of Kai1 mRNA by RT-PCR

M; DNA marker; 1: Kai1-transfected group; 2: Blank control; 3: Non-transfected group

2.4 MTT 测定细胞生长增殖情况 MTT 法结果显示, 转染 24、48、72 h 后, 转染空腺病毒组与未转染组  $D_{570}$  值无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。Kai1 转染组与未转染组比较, 抑制率分别为 16%、24%、29%, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 结果见表 1。

表 1 MTT 法检测 Kai1 对 Hep-2 细胞增殖的影响

Tab 1 Inhibitory effects of Kai1 gene against Hep-2 cell proliferation as determined by MTT assay

( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Group	Time after transfection $t/h$		
	24	48	72
Non-transfected	1.403 ± 0.032	1.597 ± 0.062	1.838 ± 0.018
Blank control	1.387 ± 0.019	1.603 ± 0.045	1.794 ± 0.031
Kai1-transfected	1.181 ± 0.025*	1.225 ± 0.037*	1.305 ± 0.040*

\*  $P < 0.05$  vs non-transfected group

### 3 讨论

喉癌是常见的头颈部恶性肿瘤, 抑制基因转移是目前肿瘤治疗的研究热点之一。Kai1 基因(Kang Ai 1), 是从人第 11 号染色体中分离到的转移到 AT6.1 细胞系中的能特异性抑制肿瘤转移的基因, 属于跨膜超家族成员(transmembrane 4 superfamily, TM4SF)之一, 是公认的肿瘤转移抑制基因之一<sup>[7]</sup>。以腺病毒载体作为基因治疗的运载系统近年来发展较快。该病毒宿主广泛, 插入外源基因容量大, 相对安全和稳定, 是基因治疗的主要基因载体之一<sup>[5]</sup>。研究表明, Kai1 基因在人类多种恶性肿瘤中均存在表达下调现象, 提示该基因的表达可能在多种肿瘤转移中起抑制作用<sup>[8]</sup>。徐建华等<sup>[2]</sup>研究发现, 转染重组质粒 pCMV-Kai1 使人胰腺癌细胞增殖受到明显抑制。欧阳运薇等<sup>[3]</sup>用体外实验证明, 转染 Kai1 后宫颈癌细胞的生长速度明显减慢, 说明

Kai1 可以抑制肿瘤细胞的体外增殖能力。在其机制方面, 有研究认为 Kai1 基因抑制肿瘤细胞增殖能力可能与其调节细胞周期功能有关<sup>[9]</sup>。Odintsova 等<sup>[10]</sup>研究发现, Kai1 基因能降低 EGFR 的信号转导; 胡莘等<sup>[11]</sup>亦通过实验得出, Kai1 基因可能通过控制 EGFR 作用抑制肿瘤的转移。另有文献报道, Kai1 基因可经 Src 依赖性通路诱导同类细胞聚集, 从而抑制肿瘤转移<sup>[12]</sup>。Zhang 等<sup>[13]</sup>通过对 Kai1 基因与前列腺癌的研究, 发现 Kai1 基因可减少细胞转移分子开关 P130CAS-Crk II 复合体形成, 从而抑制细胞转移。彭志红等<sup>[14]</sup>通过对肝癌细胞转染 Kai1 正、反结构基因发现, Kai1 可能降低肝癌细胞对细胞外基质黏附力, 抑制肝癌细胞的侵袭和转移。本课题组前期研究采用免疫组织化学法半定量检测喉癌组织中 Kai1 基因的表达水平, 并与癌旁组织的表达水平进行了对比分析, 发现喉癌组织中 Kai1 基因有表达, 但其表达水平明显低于癌旁组织, 提示

Kai1 基因缺失可能是喉癌基因治疗的一个理想靶点<sup>[8]</sup>。吴祖良等<sup>[15]</sup>研究了 Kai1 在喉癌中的表达及其与喉癌发生、发展的关系,提示 Kai1 低表达在喉鳞癌的发生、发展中可能起着重要作用,可望作为喉鳞癌早期诊断、评估肿瘤细胞侵袭转移潜能及患者病程发展阶段的指标之一。张炳辉等<sup>[16]</sup>研究了 Kai1/CD82、P2 选择素的表达与喉癌浸润转移的相关性,显示 Kai1/CD82、P2 选择素在喉癌中表达呈负相关,Kai1/CD82、P2 选择素联合表达可以判断喉癌浸润转移情况。白伟良等<sup>[17]</sup>研究了 Kai1 基因在喉鳞状细胞癌中的表达及其临床意义,结果显示 Kai1 mRNA 表达下降可能与喉鳞状细胞癌的病理低分化和淋巴结转移有关。

本实验通过腺病毒介导,将携带有 Kai1 基因的重组腺病毒(rAd-Kai1)成功地转入人喉癌 Hep-2 细胞株中。采用免疫荧光显微镜观察 Kai1 转染细胞的荧光表现,计算感染率。当病毒量为 30 MOI 时,对 Hep-2 细胞株的转染率达 90% 以上。通过 RT-PCR 进一步从 mRNA 水平确认 Kai1 基因成功转染人喉癌细胞中。通过 MTT 法检测,转染空腺病毒组细胞体外增殖能力与未转染组比较无显著差异( $P>0.05$ ),转染 rAd-Kai1 的 Hep-2 细胞株与未经腺病毒转染的 Hep-2 细胞株比较,由于 Kai1 基因的转入,转染组细胞增殖受到较强抑制,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。综上所述,Kai1 基因可以抑制喉癌细胞株的体外增殖能力,将 Kai1 用于喉癌的基因治疗具有潜在的应用价值。

## [参考文献]

- [1] Murphy P M. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis[J]. *N Engl J Med*,2001,345:833-835.
- [2] 徐建华,郭晓钟,任丽楠,赵佳钧,崔忠敏,刘民培. KAI1 基因抗胰腺癌细胞转移的研究[J]. *中华消化杂志*,2004,24:541-543.
- [3] 欧阳运薇,潘小玲,屈艺,彭芝兰,魏大鹏,王霞. KAI1 基因对宫颈癌细胞增殖和侵袭能力的影响[J]. *四川大学学报:医学版*,2008,39:753-756.
- [4] 舒艳,陈鸿雁,谭毅. KAI1/CD82 在喉癌组织中的表达及其临床意义[J]. *临床耳鼻咽喉科杂志*,2005,19:1065-1067.
- [5] Working P K, Lin A, Borellini F. Meeting product development

challenges in manufacturing clinical grade oncolytic adenoviruses[J]. *Oncogene*,2005,24:7792-7801.

- [6] Ghosh S S, Gopinath P, Ramesh A. Adenoviral vectors: a promising tool for gene therapy[J]. *Appl Biochem Biotechnol*,2006,133:9-29.
- [7] Kauffman E C, Barocas D A, Chen Y T, Yang X J, Scherr D S, Tu J J. Differential expression of KAI1 metastasis suppressor protein in renal cell tumor histological subtypes[J]. *J Urol*,2009,181:2305-2311.
- [8] Bari R, Zhang Y H, Zhang F, Wang N X, Stipp C S, Zheng J J. Transmembrane interactions are needed for KAI1/CD82-mediated suppression of cancer invasion and metastasis[J]. *Am J Pathol*,2009,174:647-660.
- [9] Choi U J, Jee B K, Lim Y, Lee K H. KAI1/CD82 decreases Rac1 expression and cell proliferation through PI3K/Akt/mTOR pathway in H1299 lung carcinoma cells[J]. *Cell Biochem Funct*,2009,27:40-47.
- [10] Odintsova E, Sugiura T, Berditchevski F. Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin CD82/KAI1[J]. *Curr Biol*,2000,10:1009-1012.
- [11] 胡苹,左焕琮,马雄君,王泰龄,李占魁. 人类表皮因子受体在人脑胶质瘤中的表达及其与增殖潜能的相关性研究[J]. *中华肿瘤杂志*,2000,22:406-407.
- [12] Jee B, Jin K, Hahn J H, Song H G, Lee H. Metastasis-suppressor KAI1/CD82 induces homotypic aggregation of human prostate cancer cells through Src-dependent pathway[J]. *Exp Mol Med*,2003,35:30-37.
- [13] Zhang X A, He B, Zhou B, Liu L. Requirement of the p130CAS-Crk coupling for metastasis suppressor KAI1/CD82-mediated inhibition of cell migration[J]. *J Biol Chem*,2003,278:27319-27328.
- [14] 彭志红,唐波,杨建民,司遂海,陈文生,房殿春. KAI1 基因对 MHCC97-H 肝癌细胞粘附力的影响[J]. *第三军医大学学报*,2005,23:2311-2313.
- [15] 吴祖良,吴正虎,郭星. 肿瘤转移抑制基因 KAI1 在喉鳞状细胞癌中表达的研究[J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*,2003,38:413-416.
- [16] 张炳辉,徐秀玉,李艳双,张丽华,郭化敏,韩瑞珠. KAI1/CD82、P-选择素的表达与喉癌浸润转移的相关性研究[J]. *哈尔滨医科大学学报*,2004,38:229-232.
- [17] 白伟良,任重,潘子民,高红. KAI1 基因在喉鳞癌中的表达及其临床意义[J]. *中华肿瘤杂志*,2005,27:289-291.

[本文编辑] 陈波