

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01475

重组质粒 pcDNA3.0-hugl-1 转染结直肠癌细胞后生物学效应的观察

黄士勇,郝立强*,孟荣贵

第二军医大学长海医院肛肠外科,上海 200433

[摘要] **目的:**观察外源基因 hugl-1 转染对结直肠癌 LS174 细胞生物学行为的影响,探讨 hugl-1 基因与结直肠肿瘤的相关性。**方法:**构建重组质粒 pcDNA3.0-hugl-1,转染至结直肠癌细胞株 LS174 细胞中,RT-PCR、Western 印迹检测转染后 hugl-1 mRNA 及蛋白的表达;通过软琼脂集落形成试验、划痕修复试验、细胞黏附试验及 Transwell 细胞侵袭试验等进一步对转染后 LS174 细胞增殖、黏附、运动和侵袭能力进行分析,并与空质粒载体及未转染 LS174 细胞作对照。**结果:**成功构建重组质粒 pcDNA3.0-hugl-1;RT-PCR、Western 印迹检测结果显示,重组体 pcDNA3.0-hugl-1 转染细胞株中 hugl-1 mRNA 及蛋白表达明显高于空载体转染及未转染细胞($P<0.05$)。重组体转染组细胞克隆形成率(32.23%)与未转染及空载体转染组细胞相比(35.76%、33.91%)无明显改变;重组体转染组 LS174 细胞克隆的迁移细胞数(82.14 ± 7.62)明显低于空载体组(135.61 ± 3.74)及未转染组(142.37 ± 6.12 , $P<0.05$);转染后 120 min,重组体转染组 LS174 细胞克隆黏附力明显高于空载体组及未转染组($P<0.05$);重组体转染组穿膜细胞数(63.7 ± 8.0)明显少于空载体组及未转染组(158.3 ± 16.5 、 156.3 ± 13.0 , $P<0.05$)。**结论:**人 hugl-1 基因表达上调能降低结直肠癌细胞迁移运动和侵袭能力,增加细胞黏附能力,但对肿瘤细胞增殖能力无明显影响;其表达降低可使肿瘤细胞播散。

[关键词] 结直肠肿瘤; hugl-1 基因; 软琼脂集落形成; 划痕修复; 细胞黏附试验; Transwell 细胞侵袭试验

[中图分类号] R 735.34

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2008)12-1475-04

Biological effects of recombinant pcDNA3.0-hugl-1 plasmid on colorectal cancer cell line LS174

HUANG Shi-yong, HAO Li-qiang*, MENG Rong-gui

Department of Anorectal Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the biological behaviors of colorectal cancer LS174 cells before and after pcDNA3.0-hugl-1 transfection, so as to investigate the association of hugl-1 with colorectal cancer. **Methods:** The eukaryotic expression vector pcDNA3.0-hugl-1 was constructed and transfected into LS174 cells. RT-PCR and Western blotting methods were used to analyze the expression of hugl-1 mRNA and protein in LS174 cells before and after transfection. Soft agar colony formation assay, wound-healing experiment, adhesion assay and Matrigel invasion assays were used to study the effects of hugl-1 expression on the proliferation, adhesion, movement and invasion in LS174 cells. **Results:** The recombinant plasmid pcDNA3.0-hugl-1 was successfully constructed. RT-PCR and Western blotting showed that the hugl-1 expression was higher in cells transfected with pcDNA3.0-hugl-1 than in those un-transfected or empty vector-transfected cells ($P<0.05$). The colony forming rates showed no significant difference between the 3 groups (35.76%, 33.91% and 32.23%). Wound healing assays showed a significant reduction in the migrated cells in pcDNA3.0-hugl-1 transfected cell clones (82.14 ± 7.62) compared with un-transfected cell lines (142.37 ± 6.12) and empty vector transfected cell line (135.61 ± 3.74 , $P<0.05$). Attachment assays revealed enhanced adhesion of the pcDNA3.0-hugl-1-transfected cell clones compared with the other 2 groups. Matrigel invasion assay showed a significant reduction in the invasive ability of the pcDNA3.0-hugl-1-transfected cell (63.7 ± 8.0) in comparison to the un-transfected cells (156.3 ± 13.0) and pcDNA(-) cells (158.3 ± 16.5 , $P<0.05$). **Conclusion:** Overexpression of hugl-1 eukaryotic expression vector can decrease migratory and invasive ability of LS174 cells, but has no influence on cell proliferation.

[KEY WORDS] colorectal neoplasms; hugl-1 gene; soft agar colony formation assay; wound-healing; adhesion assay; Transwell invasion

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(12):1475-1478]

[收稿日期] 2008-04-03

[接受日期] 2008-09-09

[基金项目] 上海市科委基金(2006074). Supported by Fund for Tackling Key Program of Shanghai Science and Technology Committee(2006074).

[作者简介] 黄士勇, 博士, 主治医师. E-mail: smmu2005@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25072073, E-mail: smmu2005@sina.com

果蝇巨大幼虫致死基因 lethal(2)giant larvae(lgl)在果蝇中起着抑癌基因的作用,如果 lgl 基因发生突变,功能失活,原有的组织形态消失,成虫盘丧失其上皮单细胞层结构并生长出大量类似哺乳动物癌的无定型肿块^[1-2],表现出恶性肿瘤的特征,导致果蝇幼虫大脑和成虫盘的成体视觉中枢肿瘤的发生发展。如将肿块移植到野生型受体,这些肿瘤组织像哺乳动物转移癌组织的特性一样,可继续生长,并发生远处转移^[3-4]。

人类的 human giant larvae(hugl-1)基因与上述果蝇抑癌基因高度同源,其编码的 hugl-1 蛋白包含数个与果蝇 lgl 蛋白相同的保守功能区域,且外源性 hugl-1 蛋白能够弥补果蝇 lgl 突变所导致的功能缺陷^[5]。人类 hugl-1 基因在结直肠癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌及黑素瘤等肿瘤中均存在表达下降或不表达^[5-6],其表达缺失与肿瘤的分期、转移密切相关。为进一步研究 hugl-1 基因与结直肠癌发生、发展的相关性,探讨其在结直肠癌细胞生长、增殖、侵袭、转移等方面的生物学作用,本研究构建 pcDNA3.0-hugl-1 表达载体,将其转染结直肠癌细胞株 LS174,进行相关细胞生物学功能检测。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 逆转录病毒真核表达载体 pcDNA3.0 为中国科学院上海生命科学研究院细胞与生物化学研究所保存载体;结直肠癌细胞株 LS174 购自上海生命科学研究院细胞与生物化学研究所。RT-PCR 试剂盒和 Western 印迹试剂盒均购自上海宝生物工程公司;Matrigel™ Basement Membrane Matirx 购自 Biosciences Clontech;Transwell 小室(底部微孔滤膜直径 6 mm,孔径 8 μm)购自 Corning Costar Corporation。

1.2 重组质粒的构建及转染 根据 GenBank 人 hugl-1 基因的序列设计引物,克隆人 hugl-1 的全长基因,通过 PCR 法扩增所需片段,利用基因重组技术,将该片段定向插入质粒载体 pcDNA3.0 的多克隆位点,构建含 RNA 序列的重组表达载体 pcDNA3.0-hugl-1。将 hugl-1 基因的真核表达质粒 pcDNA3.0-hugl-1 和空载体 pcDNA3.0 质粒分别转化细菌,扩增提取纯化后,应用阳离子脂质体介导的方法将构建好的真核表达质粒载体 pcDNA3.0-hugl-1 转染不表达或低表达 hugl-1 结直肠癌细胞株 LS174。G418 筛选阳性克隆并扩增培养传代。采用半定量 RT-PCR 和 Western 印迹法检测转染前后细胞 hugl-1 基因 mRNA 和蛋白表达水平的变化,以明确重组载体 pcDNA3.0-

hugl-1 对 hugl-1 基因转录、翻译的影响。引物由第二军医大学东方肝胆外科医院分子生物实验室合成。

1.3 RT-PCR 及 Western 印迹检测转染效果

1.3.1 RT-PCR 细胞总 RNA 提取采用美国 Roche 公司 TRIzol 试剂盒按步骤提取,并经紫外分光光度计检测 D_{260}/D_{280} 比值为 1.8~2.0,28S 和 18S 比例约为 2:1,提示核酶未降解。采用肿瘤细胞纯化的总 RNA 进行半定量 RT-PCR 检测并以 β -actin 为内参照。取 20 μl 扩增产物加入 1%琼脂糖凝胶孔内,50 V 恒压条件下电泳 60 min 左右,紫外灯下观察电泳结果并照相。采用光密度定量扫描仪(GS-800)扫描图像,用“Quality One”图像处理软件(Bio-Rad)进行凝胶电泳条带的定量分析,以同一泳道中 hugl-1 和 β -actin 条带积分光密度值之比值表示标本中 hugl-1 mRNA 的表达量。

1.3.2 Western 印迹法 经裂解液处理各组细胞,蛋白抽提液样本作 SDS-PAGE 电泳后转膜。采用基于辣根过氧化物酶的电化学发光底物系统检测免疫印迹实验的结果。其化学发光信号记录在感光胶片上(Kodak X-Omat BT Film),并且用光密度定量扫描仪(GS-800)扫描图像,用“Quality One”图像处理软件进行蛋白印迹条带的定量分析,以同一泳道中 hugl-1 和 β -actin 条带积分光密度值之比值表示标本中 hugl-1 蛋白的表达量。

1.4 软琼脂集落形成试验 软琼脂克隆形成试验按双层软琼脂培养法进行,在 6 孔培养板中测定 LS174、pcDNA3.0-hugl-1 转染组及空载体转染组 3 组细胞的克隆形成能力。倒置显微镜下计数,每个细胞集落细胞数>50 时计为 1 个克隆。

1.5 划痕修复(Wound-healing)试验 3 组待测细胞种植进入 6 孔板,用 100 μl 微量移液头在 6 孔板内垂直划痕。24 h 后相差显微镜下随机选择 5 个 100 倍视野内计算迁移至划痕空隙中的细胞总数,每组重复 3 次。

1.6 细胞黏附试验 分别将未转染组细胞、空载体转染组细胞、重组体转染细胞悬液按照 1×10^6 细胞/孔接种于细胞孔内,37℃、5%CO₂ 培养箱常规培养。分别于转染后 30、60、90、120 min 每种细胞取 3 个孔,吸弃上清培养液,PBS 缓冲液清洗 2 次,去除附着但并未真正黏附的细胞,0.25%胰蛋白酶消化,收集黏附细胞,血球计数板计数细胞。计算公式:细胞黏附率=黏附细胞数/总细胞数×100%。

1.7 Transwell 细胞侵袭试验 Transwell 小室中加入 120 μg Matrigel 胶(用 2 倍体积的无血清 1640 稀释),37℃ 30 min 待胶凝固,在小室下部加入

600 μl NIH3T3 上清作为趋化因子。取对数生长期细胞, 消化后进行活细胞计数, 调整细胞密度, 培养基中加入 0.1% 的 BSA。在每个 Transwell 小室中加入 300 μl 含有 4×10^4 个细胞的细胞悬液。每组设 3 个平行样本。5% CO_2 、饱和湿度的 CO_2 孵箱中培养 48 h。吸去上室液体, 湿棉签擦去膜表面未侵袭的细胞及 Matrigel 胶, 生理盐水漂洗, 稍干, 甲醛固定 30 min, 苏木精染色。每张膜计数 3 个 400 倍显微镜视野下的穿膜细胞数。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析, 计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用成组设计 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 转染细胞中 hugl-1 基因 mRNA 和蛋白表达的改变 RT-PCR(图 1A)、Western 印迹(图 1B)显示重组体 pcDNA3.0-hugl-1 转染细胞株中目的基因 hugl-1 在 mRNA 和蛋白质水平上表达均较空载体转染细胞株和未转染细胞株增强, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 增殖分析结果 软琼脂集落形成试验结果显示, 与未转染及空载体转染组细胞相比(35.76%、33.91%), 重组体转染组细胞克隆形成率(32.23%)无统计学差异, 提示 hugl-1 基因表达对细胞增殖无明显影响。

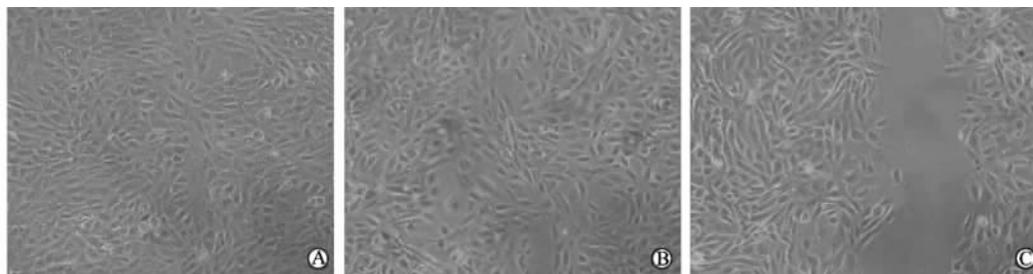


图 2 不同组别细胞划痕修复试验结果

Fig 2 Results of wound-healing experiment of different groups

A: Un-transfected; B: pcDNA(-)-transfected; C: pcDNA3.0-hugl-1-transfected. Original magnification: $\times 100$

2.4 黏附分析结果 细胞黏附试验结果(表 1)显示, 与空载体组及未转染组相比, 转染后 120 min, hugl-1 阳性表达的重组体转染组 LS174 细胞克隆黏附力明显增高, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 侵袭分析结果 细胞侵袭试验显示, 与空载体组及未转染组相比(158.3 ± 16.5 、 156.3 ± 13.0), 重组体转染组穿膜细胞数(63.7 ± 8.0)明显减少, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

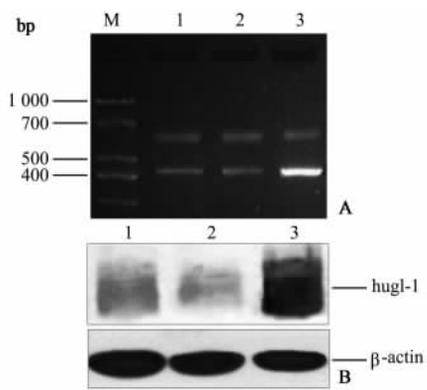


图 1 转染细胞 hugl-1 基因 mRNA(A)及蛋白(B)表达水平

Fig 1 Expression of hugl-1 mRNA(A) and protein(B) in LS174 cells before and after transfection

A: RT-PCR results; M: Marker, 1: Un-transfected cell line, 2: pcDNA(-), 3: pcDNA3.0-hugl-1. B: Western blotting results; 1: Un-transfected cell lines, 2: pcDNA(-); 3: pcDNA3.0-hugl-1

2.3 划痕分析结果 划痕后使用无血清培养基继续培养 24 h, 结果(图 2)显示 hugl-1 阳性表达的重组体转染组 LS174 细胞克隆的迁移细胞数(82.14 ± 7.62)明显低于空载体组(135.61 ± 3.74)及未转染组(142.37 ± 6.12)细胞, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结果提示重组体转染组 LS174 细胞的移行能力明显低于空载体组及未转染组。

表 1 不同组别细胞黏附能力比较

Tab 1 Cell adhesion results in three groups

Group	Time after transfection t /min			
	30	60	90	120
Un-transfected	12.2	32.9	46.4	57.6
pcDNA(-)-transfected	13.4	31.2	43.7	59.5
pcDNA3.0-hugl-1-transfected	16.8	43.6	56.5	72.6*

* $P < 0.05$ vs pcDNA(-)-transfected group

3 讨论

细胞极性的丧失是肿瘤的重要标志之一,并与癌肿的侵袭性相关^[7-8]。在上皮细胞肿瘤的发展过程中,浸润前沿的细胞经历一种上皮细胞-间充质转化,表现出细胞极性消失、失去黏附及迁移能力增加等特点^[8]。果蝇新生物肿瘤抑制基因 *lgl*、*dlg* 和 *scrib* 进化上保守,共同作用于同一遗传通路,在上皮细胞中起到联系细胞极性及细胞增殖的功能,这3种基因突变可导致细胞极性的破坏及组织癌变^[1-2]。其中 *lgl* 的突变易导致细胞顶-底极性的丧失、上皮细胞结构的丧失及细胞无限增殖^[9-12]。人基因 *hugl-1* 与果蝇肿瘤抑制基因 *lgl* 高度同源,同源性达到 27%^[13],*hugl-1* cDNA 的序列分析显示其具有一较长的可读框,可编码 1 057 个氨基酸的蛋白质,相对分子质量约 115 000。人 *hugl-1* 蛋白包括数个与 *lgl* 中类似的保守功能区域,其中包括多个同型寡聚化区域、成簇的磷酸化位点及至少 2 个 WD-40 重复序列,从而提示这些蛋白质可能有密切相关的功能^[5,14]。Klezovitch 等^[15]发现,*hugl-1* 基因敲除小鼠存在胚胎神经上皮顶底极性的破坏及细胞缺乏分化及过度增殖,而外源性人 *hugl-1* 基因能拯救果蝇基因 *lgl* 的突变,提示这些基因都具有保守的抑癌基因功能^[5,16-20]。

本研究构建了人 *hugl-1* 基因的重组表达载体 pcDNA3.0-*hugl-1*,并成功转染至结直肠癌细胞株 LS174 细胞中,显著上调 *hugl-1* mRNA 及蛋白的表达。进一步对转染后细胞生物学特性进行分析发现,转染 *hugl-1* 基因并不能抑制 LS174 肿瘤细胞的增殖,*hugl-1* 基因的再表达及据此的调控通路可以调节细胞极性,但并不会负性调控肿瘤细胞增殖,与果蝇中 *lgl* 基因的作用并不一致^[1-2]。本研究的划痕修复、细胞黏附和 Transwell 细胞侵袭试验结果表明,*hugl-1* 再表达降低了细胞的移行侵袭能力,并且增加了细胞的黏附,提示 *hugl-1* 表达降低可导致上皮细胞结构不稳定,促进癌细胞播散和肿瘤发展。

综上所述,人 *hugl-1* 蛋白表达有助于维持上皮细胞的完整性,提高结直肠癌细胞株的黏附能力,降低其移行、转移、侵袭能力,但对其增殖影响不大,值得进一步研究其失活机制。

(志谢 本研究得到第二军医大学东方肝胆外科医院满晓波研究员及第二军医大学基础部医学遗传学教研室颜宏利副教授的支持和帮助,在此一并表示感谢!)

[参考文献]

- [1] Gateff E. Malignant neoplasms of genetic origin in *Drosophila melanogaster*[J]. *Science*, 1978, 200: 1448-1459.
- [2] Agrawal N, Kango M, Mishra A, Sinha P. Neoplastic transformation and aberrant cell-cell interactions in genetic mosaics of lethal(2) giant larvae (*lgl*), a tumor suppressor gene of *Drosophila*[J]. *Dev Biol*, 1995, 172: 218-229.
- [3] Woodhouse E, Hersperger E, Shearn A. Growth, metastasis, and invasiveness of *Drosophila* tumors caused by mutations in specific tumor suppressor genes[J]. *Dev Genes Evol*, 1998, 207: 542-550.
- [4] Woodhouse E, Hersperger E, Stetler-Stevenson W G, Liotta L A, Shearn A. Increased type IV collagenase in *lgl*-induced invasive tumors of *Drosophila*[J]. *Cell Growth Differ*, 1994, 5: 151-159.
- [5] Grifoni D, Garoia F, Schimanski C C, Schmitz G, Laurenti E, Galle P R, et al. The human protein Hugl-1 substitutes for *Drosophila* lethal giant larvae tumour suppressor function *in vivo*[J]. *Oncogene*, 2004, 23: 8688-8694.
- [6] Schimanski C C, Schmitz G, Kashyap A, Bosserhoff A K, Bataille F, Schäfer S C, et al. Reduced expression of Hugl-1, the human homologue of *Drosophila* tumour suppressor gene *lgl*, contributes to progression of colorectal cancer[J]. *Oncogene*, 2005, 24: 3100-3109.
- [7] Bissell M J, Radisky D. Putting tumours in context[J]. *Nat Rev Cancer*, 2001, 1: 46-54.
- [8] Thiery J P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2: 442-454.
- [9] Baek K H. The first oncogene in *Drosophila melanogaster*[J]. *Mutat Res*, 1999, 436: 131-136.
- [10] Bilder D. Cell polarity: squaring the circle[J]. *Curr Biol*, 2001, 11: R132-R135.
- [11] Humbert P, Russell S, Richardson H. Dlg, Scribble and Lgl in cell polarity, cell proliferation and cancer[J]. *Bioessays*, 2003, 25: 542-553.
- [12] Justice N J, Jan Y N. A lethal giant kinase in cell polarity[J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5: 273-274.
- [13] Betschinger J, Mechtler K, Knoblich J A. The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl[J]. *Nature*, 2003, 422: 326-330.
- [14] Kalmes A, Merdes G, Neumann B, Strand D, Mechler B M. A serine-kinase associated with the p127-l(2) *lgl* tumour suppressor of *Drosophila* may regulate the binding of p127 to nonmuscle myosin II heavy chain and the attachment of p127 to the plasma membrane[J]. *J Cell Sci*, 1996, 109(Pt 6): 1359-1368.
- [15] Klezovitch O, Fernandez T E, Tapscott S J, Vasioukhin V. Loss of cell polarity causes severe brain dysplasia in *Lgl1* knockout mice[J]. *Genes Dev*, 2004, 18: 559-571.
- [16] Massimi P, Narayan N, Thomas M, Gammoh N, Strand S, Strand D, et al. Regulation of the hDlg/hScrib/Hugl-1 tumour suppressor complex[J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314: 3306-3317.
- [17] Tsuruga T, Nakagawa S, Watanabe M, Takizawa S, Matsumoto Y, Nagasaka K, et al. Loss of Hugl-1 expression associates with lymph node metastasis in endometrial cancer[J]. *Oncol Res*, 2007, 16: 431-435.
- [18] Kuphal S, Wallner S, Schimanski C C, Bataille F, Hofer P, Strand S, et al. Expression of Hugl-1 is strongly reduced in malignant melanoma[J]. *Oncogene*, 2006, 25: 103-110.
- [19] Grifoni D, Garoia F, Bellosta P, Parisi F, De Biase D, Collina G, et al. aPKCzeta cortical loading is associated with Lgl cytoplasmic release and tumor growth in *Drosophila* and human epithelia[J]. *Oncogene*, 2007, 26: 5960-5965.
- [20] Dollar G L, Weber U, Mlodzik M, Sokol S Y. Regulation of Lethal giant larvae by Dishevelled[J]. *Nature*, 2005, 437: 1376-1380.