

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2004.04.06

肺癌分子靶向治疗

转染nm23-H₁ 基因靶向阻断人大细胞肺癌 细胞株L9981 Wnt 信号传导通路

付军科 周清华 朱文 王艳萍 刘伦旭 陈小禾 聂强 李定彪 李印

【摘要】 目的 探讨 nm23-H₁ 基因转染靶向阻断人高转移大细胞肺癌细胞株 L9981 Wnt 信号传导通路的可行性,为阐明 nm23-H₁ 基因调控肺癌转移抑制的分子机制和靶向治疗提供实验依据。方法 以转染 nm23-H₁ 基因的 L9981-nm23-H₁、原代 L9981、空载 L9981-pLXSN 三株人高转移大细胞肺癌细胞为研究对象,应用 Western blot 检测比较各株肺癌细胞胞浆、胞核中 Wnt 信号传导通路关键激酶 GSK-3 和 β -连环蛋白表达的变化。结果 GSK-3 在 L9981-nm23-H₁ 肺癌细胞胞浆中表达量 IOD(6 341 ±541)显著高于 L9981(3 736 ±298)和 L9981-pLXSN(3 613 ±383) ($P < 0.001$); GSK-3 在 L9981-nm23-H₁ 肺癌细胞胞核中表达量 IOD(4 356 ±490)显著高于 L9981(657 ±57)和 L9981-pLXSN(705 ±75) ($P < 0.001$); β -连环蛋白在 L9981-nm23-H₁ 肺癌细胞胞浆中表达量 IOD(3 649 ±118)显著高于 L9981(1 401 ±31)和 L9981-pLXSN(1 350 ±55) ($P < 0.001$); β -连环蛋白在 L9981-nm23-H₁ 肺癌细胞胞核中表达量 IOD(2 945 ±68)与 L9981(2 604 ±23)和 L9981-pLXSN(2 652 ±53)比较无显著性差异 ($P > 0.05$); L9981 与 L9981-pLXSN 两者间 GSK-3 和 β -连环蛋白在肺癌细胞胞浆和胞核的表达量均无显著性差异 ($P > 0.05$)。结论 nm23-H₁ 基因能够显著上调人高转移大细胞肺癌细胞 L9981 胞浆和胞核中 GSK-3 表达以及胞浆中的 β -连环蛋白表达,但并未引起胞核内 β -连环蛋白聚积。调控 GSK-3 和 β -连环蛋白表达和靶向性阻断 Wnt 信号传导,可能是 nm23-H₁ 基因抑制肺癌转移的分子机制和信号调节机制之一。

【关键词】 L9981 nm23-H₁ 基因 GSK-3 β -连环蛋白 Wnt 信号通路 分子靶向阻断

【中图分类号】 R734.2

Targeting blockage of Wnt signal transduction pathway of nm23-H1 gene transfection in human high-metastatic large cell lung cancer cell line L9981 FU Junke, ZHOU Qinghua, ZHU Wen, WANG Yanping, LIU Lunxu, CHEN Xiaohu, NIE Qiang, LI Dingbiao, LI Yin. Key Laboratory of Lung Cancer Molecular Biology of Sichuan Province, and Department of Thoracocardiac Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, P. R. China

Corresponding author: ZHOU Qinghua, E-mail: zhouqh@mail.sc.cninfo.net

【Abstract】 Objective To explore the possibility of targeting blockage of Wnt signal transduction pathway of nm23-H1 gene transfection in human high-metastatic large cell lung cancer cell line L9981, and to provide evidence to elucidate the signal conductive mechanism of nm23-H1 mediated tumor metastasis suppression. **Methods** The expression of GSK-3 and β -catenin of Wnt signal pathway was detected in cytoplasm and nucleus in L9981 cell line with nm23-H1 deletion, L9981-pLXSN cell line transfected with vector and L9981-nm23-H1 cell line transfected with nm23-H1 gene by Western blot. **Results** GSK-3 expression in L9981-nm23-H1 cytoplasm (6 341 ±541) was significantly higher than those in L9981 (3 736 ±298) and L9981-pLXSN (3 613 ±383) cell lines ($P < 0.001$); GSK-3 expression in L9981-nm23-H1 nucleus (4 356 ±490) was significantly higher than those in L9981 (657 ±57) and L9981-pLXSN (705 ±75) cell lines ($P < 0.001$); β -catenin expression in L9981-nm23-H1 cytoplasm (3 649 ±118) was significantly higher than those in L9981 (1 401 ±31) and L9981-pLXSN (1 350 ±55) cell lines ($P < 0.001$); No statistical difference of the β -catenin expression in nucleus was observed among L9981-nm23-H1 (2 945 ±68), L9981 (2 604 ±23) and L9981-pLXSN (2 652 ±53) ($P > 0.05$); No significant

本研究受国家自然科学基金(No. 30070333 和 No. 30100075)资助

作者单位:610041 成都,四川大学华西医院四川省肺癌分子重点实验室、胸心外科(付军科现在在西安交通大学第一医院胸外科)(通讯作者:周清华, E-mail:zhouqh@mail.sc.cninfo.net)

difference of GSK-3 or β -catenin expression in cytoplasm and nucleus was observed between L9981 and L9981-pLXSN ($P > 0.05$). **Conclusion** nm23-H1 gene can remarkably upregulate the expression of GSK-3 in cytoplasm and nucleus, and β -catenin expression in cytoplasm in L9981-nm23-H1 cell, but can not induce the nucleus accumulation of β -catenin. Regulation of GSK-3 and β -catenin expression, and targeting blockage of Wnt signaling pathway may be one of molecular mechanisms that nm23-H1 contributes to play a vital role in the "Lung Cancer Metastasis Suppressive Cascade".

【Key words】 Human high-metastatic large cell lung cancer cell line L9981 nm23-H1 gene GSK-3 β -catenin Wnt signaling pathway Molecular targeting blockage

This work was supported by grants from the National Natural Sciences Foundation of China (to ZHOU Qinghua and LIU Lunxu) (No. 30070333 and No. 30100075).

肺癌的侵袭转移是一个多基因参与和多步骤发展的过程,其中一些关键基因和细胞信号传导通路的异常,导致了肺癌侵袭和转移表型的表达。nm23-H1 基因是重要的肺癌转移抑制基因^[1]。研究发现在 nm23-H1 基因缺失的肺癌细胞株 L9981 中,转染野生型的 nm23-H1 基因,不仅能逆转肺癌的转移表型,而且对肺癌细胞中 β -连环蛋白 (β -catenin) 等转移相关基因表达具有显著调节作用^[1]。 β -连环蛋白是 Wnt 信号通路中的重要信号分子^[2],nm23-H1 基因是否通过 Wnt 信号通路实现其在“肺癌转移抑制级联”中的转移抑制作用,国内外尚未见报道。因此,本研究在前期工作的基础上,以人高转移大细胞肺癌细胞株 L9981 (nm23-H1 杂合性缺失)、L9981-nm23-H1 (转染 nm23-H1 基因的 L9981) 细胞株以及 L9981-pLXSN (转染空载体的 L9981) 细胞株为对象^[3],研究 nm23-H1 转染是否能靶向阻断人肺癌细胞中 Wnt 信号通路,以揭示 nm23-H1 和 Wnt 信号通路间的作用关系和分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞系 人高转移大细胞肺癌细胞株 L9981 (缺失 nm23-H1 基因的原代人高转移大细胞肺癌细胞株)、L9981-nm23-H1 (转染 nm23-H1 基因的 L9981) 和 L9981-pLXSN (转染空载体的 L9981) 均为本实验室筛选构建^[2,3]。

1.1.2 主要试剂 β -连环蛋白抗体、GSK-3 抗体、Biotinylated Protein Ladder、ECL (LumiGLO Reagent and Peroxide) 均购自美国 Cell Signaling。

1.1.3 主要仪器 mini-PROTEAN 3 电泳及电转仪、高速冷冻离心机 (Beckman J2-21)、PVDF 膜购自美国 Bio-Rad 公司,X-线胶片购自 Kodak 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理 L9981、L9981-nm23-H1 及 L9981-pLXSN 三组细胞株分别在 RPMI1640 培养液

中加入 15% 胎牛血清,于 5% CO₂ 孵箱 37 传代培养。

1.2.2 细胞胞浆和胞核蛋白提取 培养瓶中细胞约生长至 80% 密度时,用冷 PBS 液洗涤两次,加裂解缓冲液 (10 mmol/L Tris, pH 7.5, 10 mmol/L NaCl, 3 mmol/L MgCl₂, 0.05% Nonidet P-40, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L sodium orthovanadate, 50 mmol/L sodium fluoride, 100 μ mol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mg/L leupeptin, 10 mg/L aprotinin, 5 mg/L pepstatin A) 冰上孵育 5 min,细胞刮刀从瓶壁轻轻刮下细胞。裂解细胞液收集到微量离心管,18 000 \times g 4 离心 20 min,上清液即为胞浆提取液。收集于离心管 -80 保存。取以上离心沉淀加入核提取液 (20 mmol/L HEPES, pH 7.9, 300 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L β -glycerophosphate, 1 mmol/L sodium orthovanadate, 50 mmol/L sodium fluoride, 100 μ mol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mg/L leupeptin, 10 mg/L aprotinin, 5 mg/L pepstatin A) 冰上孵育 30 min,18 000 \times g 4 离心 15 min,收集于离心管 -80 保存。采用 Bradford 法测定蛋白质浓度。

1.2.3 细胞胞浆胞核中 GSK-3 和 β -连环蛋白表达的检测 应用 Western blot 法:40 μ g 蛋白质样品上样,10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳后,电转到 PVDF 膜,分别与抗 GSK-3、抗 β -连环蛋白抗体 (1:1 000) 4 孵育过夜,加入偶联 HRP 的二抗及偶联 HRP 的抗体素抗体 (1:2 000) 室温孵育 1 h,洗膜后加入 ECL 化学发光试剂,X 线胶片显影检测阳性信号。

1.2.4 GSK-3 和 β -连环蛋白表达信号的检测 应用 Bio-Rad 2000 图像分析软件将 X 线胶片上的 Western blot 阳性信号条带进行灰度扫描,以其积分吸光值 IOD 大小反映信号的相对强弱。

1.3 统计学处理 实验数据为计量资料,应用 F 检验,用美国 SPSS11.0 统计软件,以 $P < 0.05$ 为有显著

性差异。

2 结果

2.1 不同肺癌细胞株胞浆与胞核中 GSK-3 表达量的比较

2.1.1 不同肺癌细胞株胞浆中 GSK-3 表达量的比较 L9981、L9981-pLXSN 和 L9981-nm23-H₁ 细胞株胞浆 GSK-3 表达量分别为 3 736 ±298、3 613 ±383 和 6 341 ±541。经 *F* 检验三株细胞间胞浆中 GSK-3 表达量有非常显著性差异 ($P < 0.001$)；两两比较：L9981-nm23-H₁ 胞浆 GSK-3 表达量显著高于 L9981 和 L9981-pLXSN，而 L9981 与 L9981-pLXSN 间比较则无显著性差异(图 1、2)。

2.1.2 不同肺癌细胞株胞核中 GSK-3 表达量的比较 L9981、L9981-pLXSN 和 L9981-nm23-H₁ 胞核中 GSK-3 的表达量分别为 657 ±57、705 ±75 和 4 356 ±490。经 *F* 检验三株细胞间胞核中 GSK-3 表达量有非常显著性差异 ($P < 0.001$)；两两比较：L9981-nm23-H₁ 胞核 GSK-3 表达量显著高于 L9981 和 L9981-pLXSN，而 L9981 与 L9981-pLXSN 间比较则无显著性差异(图 1、2)。

2.2 不同肺癌细胞株胞浆与胞核中 -连环蛋白表达量的比较

2.2.1 不同肺癌细胞株胞浆中 -连环蛋白表达量的比较 L9981、L9981-pLXSN 和 L9981-nm23-H₁ 胞浆中 -连环蛋白的表达量分别为 1 401 ±31、1 350 ±55 和 3 649 ±118。经 *F* 检验三株细胞间胞浆中 -连环蛋白表达量有非常显著性差异 ($P < 0.001$)；两两比较：L9981-nm23-H₁ 胞浆 -连环蛋白表达量显著高于 L9981 和 L9981-pLXSN，而 L9981 与 L9981-pLXSN 间比较则无显著性差异(图 1、3)。

2.2.2 不同肺癌细胞株胞核中 -连环蛋白表达量的比较 L9981、L9981-pLXSN 和 L9981-nm23-H₁ 胞核中 -连环蛋白的表达量分别为 2 604 ±23、2 652 ±53 和 2 945 ±68。经 *F* 检验三株细胞间胞核中 -连环蛋白表达量无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 1、3)。

3 讨论

nm23-H₁ 是一个重要的肿瘤转移抑制基因，研究证实其在“肺癌的转移抑制级联”中起上游关键基因的作用^[1]。然而，nm23-H₁ 调控肺癌细胞信号传导的分子机制仍未阐明。

Wnt 信号通路不仅与恶性肿瘤的发生有关，也在肿瘤的侵袭转移中发挥着重要的调节作用。在 Wnt

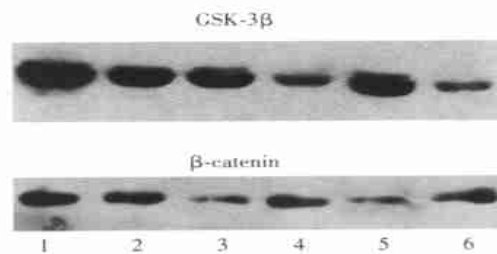


图 1 GSK-3 和 -连环蛋白在 L9981-nm23-H₁、L9981 和 L9981-pLXSN 肺癌细胞株胞浆和胞核中的蛋白表达

Fig 1 The expression of GSK-3 and -catenin in cytoplasm and nucleus among L9981-nm23-H₁, L9981 and L9981-pLXSN lung cancer cell lines

1: L9981-nm23-H₁ cytoplasm; 2: L9981-nm23-H₁ nucleus; 3: L9981 cytoplasm; 4: L9981 nucleus; 5: L9981-pLXSN cytoplasm; 6: L9981-pLXSN nucleus

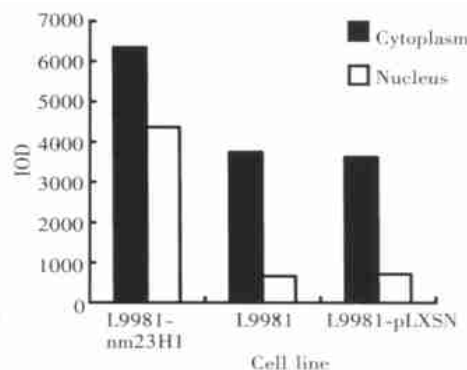


图 2 L9981-nm23-H₁、L9981 和 L9981-pLXSN 肺癌细胞株胞浆和胞核 GSK-3 蛋白表达量 (IOD) 的比较

Fig 2 Comparison of expression of GSK-3 in cytoplasm and nucleus among L9981-nm23-H₁, L9981 and L9981-pLXSN lung cancer cell lines

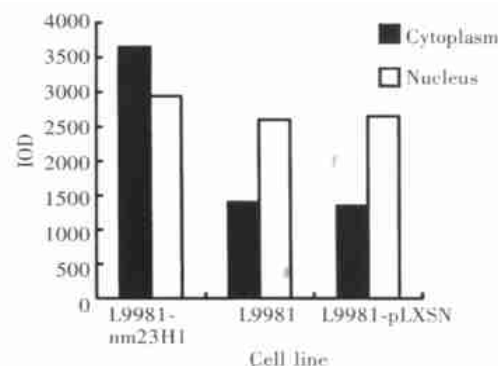


图 3 L9981-nm23-H₁、L9981 和 L9981-pLXSN 肺癌细胞株胞浆和胞核中 -连环蛋白表达量 (IOD) 的比较

Fig 3 Comparison of expression of -catenin in cytoplasm and nucleus among L9981-nm23-H₁, L9981 and L9981-pLXSN lung cancer cell lines

信号通路中, GSK-3 是决定 β -连环蛋白/Axin/APC 复合物中 β -连环蛋白磷酸化的关键激酶。Wnt 通路激活时, 细胞内的 Dvl 抑制 GSK-3 的活性, 使 β -连环蛋白氨基末端的 Ser、Thr 四个位点不被磷酸化而降解, 从而发生 β -连环蛋白核聚集, 激活转录 T 细胞因子 (TCF/LEF), 促进细胞增殖分化^[2]。Uematsu 等^[4]研究发现, 与正常肺组织相比, 75% 的非小细胞肺癌组织标本 (3/4 鳞癌和 3/4 腺癌) 中存在 Dvl-3 过度表达; 另外, 在 6 例 Dvl-3 过度表达的肺癌组织中有 5 例出现 Wnt-1 或 Wnt-2 的过度表达, 过度表达的 Dvl 蛋白可以引起 β -连环蛋白聚集和 β -连环蛋白/TCF 转录活性的增加, 证实肺癌细胞中存在着 Wnt 信号通路的异常活化。本研究发现转染 nm23-H₁ 基因后, 人高转移大细胞肺癌细胞株 L9981-nm23-H₁ 胞浆和胞核中 GSK-3 的表达量显著增高, 表明 nm23-H₁ 基因上调了 GSK-3 的蛋白表达水平。同时, L9981-nm23-H₁ 胞浆中的 β -连环蛋白显著增高, 而胞核内 β -连环蛋白未出现积聚。

β -连环蛋白不仅在胞膜与 E-钙粘素结合构成粘附复合体, 参与调节细胞间的粘附和迁徙, 而且是 Wnt 信号传导通路中的重要传递子^[5]。 β -连环蛋白的突变和异常表达在结肠癌、食管癌、肝癌等许多肿瘤中很常见, 其高表达与肿瘤转移和不良预后密切相关^[6]。然而在肺癌中, β -连环蛋白的突变率很低, 常见的是 β -连环蛋白的异常表达。但对于 β -连环蛋白的表达与肺癌转移间关系的研究尚存在分歧, 多数研究报道, 在肺癌中 β -连环蛋白的高表达与临床分期早和预后良好有关^[7-9]; Hommura 等^[9]研究发现 β -连环蛋白的高、中及低表达水平率分别为 17.1%、66.8% 以及 16.1%, β -连环蛋白高表达患者的 5 年生存率 (84%) 显著高于中和低表达者 (55% 与 32%), 从而认为 β -连环蛋白是非小细胞肺癌的一个独立预后因素。而杨秀等^[10]发现, β -连环蛋白表达正常的肺癌患者中, 淋巴结转移率为 9.1%, 明显低于 β -连环蛋白表达异常者的淋巴结转移率 46.2%, 淋巴结转移与 β -连环蛋白的表达呈正相关。究其原因可能是不同组织类型细胞 β -连环蛋白的调节机制不同, 也可能是细胞中 β -连环蛋白存在不同的“池”^[11]。本研究同样发现, 在转染 nm23-H₁ 基因的 L9981-nm23-H₁ 细胞中胞浆 β -连环蛋白表达显著增加, 但胞核 β -连环蛋白表达量并无显著改变。

nm23-H₁ 调节细胞信号传导与 G 蛋白活性和其基因中的 RGS 序列有关, 而 RGS 是 Wnt 信号通路蛋白 Axin 的重要功能域。在 Wnt 通路中, Axin 在 β -连环蛋白降解复合体 GSK-3 / Axin/APC 中起支架蛋白

作用。本研究结果显示, 转染 nm23-H₁ 基因可以调节人高转移大细胞肺癌细胞株中 GSK-3 和 β -连环蛋白的蛋白表达水平, 并逆转人高转移大细胞肺癌细胞株 L9981 的侵袭转移能力 (将另文发表), 其作用机制可能与 nm23-H₁ 基因直接或间接地靶向抑制 Wnt 信号通路有关。

综上所述, nm23-H₁ 基因调控肺癌细胞信号传导的机制十分复杂, 除可能直接或间接抑制 Wnt 信号通路外, 还可能通过其它途径调节 β -连环蛋白的表达和分布。nm23-H₁ 基因实现肺癌转移抑制的细胞信号机制还需进一步深入研究探索。

参 考 文 献

- Zhou QH, Che GW, Qin Y, et al. Experimental study on nm23-H1 gene reversing phenotype of lung cancer and its molecular mechanism. Chin J Lung Cancer, 2003, 6(2): 141-143. [周清华, 车国卫, 覃扬, 等. nm23-H1 基因逆转肺癌转移表型及其分子机制的实验研究. 中国肺癌杂志, 2003; 6(2): 141-143.]
- Polakis P. Wnt signaling and cancer. Genes Dev, 2000, 14(15): 1837-1851.
- Zhou QH, Wang YP, Che GW, et al. Establishment and their biological characteristics of clonal cell subpopulations (NL9980 and L9981) from a human large cell lung cancer cell line (WCQH9801). Chin J Lung Cancer, 2003, 6(6): 464-468. [周清华, 王艳萍, 车国卫, 等. 人大细胞肺癌细胞系 NL9980 和 L9981 的建立及其生物学特性研究. 中国肺癌杂志, 2003, 6(6): 464-468.]
- Uematsu K, He B, You L, et al. Activation of the Wnt pathway in non small cell lung cancer: evidence of dishevelled overexpression. Oncogene, 2003, 22(46): 7218-7221.
- Bogenrieder T, Herlyn M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. Oncogene, 2003, 22(42): 6524-6536.
- Morin PJ. β -catenin signaling and cancer. Bioessays, 1999, 21(12): 1021-1030.
- Tang XJ, Zhou QH, Zhang SF, et al. A study on the relationship between E-cadherin, β -catenin expression and metastasis and prognosis in non-small cell lung cancer. Chin J Lung Cancer, 2002, 5(4): 263-267. [唐小军, 周清华, 张尚福, 等. E-钙粘素和 β -连环素在非小细胞肺癌中的表达及其与转移和预后关系的研究. 中国肺癌杂志, 2002, 5(4): 263-267.]
- Reiter JM, Leers MP, Sulzer MA, et al. The expression of β -catenin in non-small-cell lung cancer: a clinicopathological study. J Clin Pathol, 1998, 51(12): 891-894.
- Hommura F, Furuuchi K, Yamazaki K, et al. Increased expression of β -catenin predicts better prognosis in non-small cell lung carcinomas. Cancer, 2002, 94(3): 752-758.
- Yang X, Li QC, Qiu XS, et al. Expression of β -catenin and its prognostic value for lung cancer. J China Med Univ, 2001, 30(3): 174-175. [杨秀, 李庆昌, 邱雪杉, 等. β -catenin 在肺癌中的表达与预后研究. 中国医科大学学报, 2001, 30(3): 174-175.]
- Hinck L, Nathke IS, Papkoff J, et al. Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. J Cell Biol, 1994, 125(6): 1327-1340.

(收稿: 2004-07-10 修回: 2004-07-31)

(本文编辑 李蓓兰)