

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2002.05.02

RAB5A 对人肺腺癌细胞系侵袭转移作用的研究

王春梅 李钰 高凌寒 刘芳莉 傅松滨 李璞

【摘要】 目的 探讨 RAB5A 基因在人肺腺癌细胞系侵袭和转移中的作用。方法 采用体外重建基底膜侵袭实验和癌细胞粘附能力、癌细胞趋化性运动能力、癌细胞分泌明胶酶的能力及活性的测定,分析 RAB5A 正义真核表达载体转染后的 AGZY83-a 和反义 RNA 转染后的 Anip973 细胞的侵袭、转移能力的改变。结果 RAB5A 正义表达载体 PcDNA3.1-RAB5A 转染的 AGZY83-a 重建基底膜侵袭能力明显增强,统计学意义显著($P < 0.0005$)。细胞趋化性运动能力显著增高($P < 0.0005$)。对基底膜成分的粘附能力增大($P < 0.05$)。以及明胶酶分泌及活性增强等一系列趋向 Anip973 的变化。PcDNA3-AntiRAB5A 反义 RNA 表达载体对 Anip973 重建基底膜侵袭力明显下降($P < 0.0025$)。趋化性运动能力显著降低($P < 0.005$)。对基底膜成分粘附能力降低($P < 0.05$)。以及明胶酶分泌减少等一系列趋向 AGZY83-a 的变化。结论 RAB5A 在肺腺癌侵袭转移表型形成中发挥重要的作用。反义 RNA 可阻断 RAB5A 基因的翻译过程。

【关键词】 RAB5A 肿瘤转移 反义 RNA

【中图分类号】 Q344+.13;R73.37

The effect of RAB5A gene over-expression on invasive and metastatic capabilities of human lung adenocarcinoma cell lines WANG Chunmei, LI Yu, GAO Linghan, LIU Fangli, FU Songbin, LI Pu. Laboratory of Medical Genetics, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150086, P. R. China

【Abstract】 Objective Over-expression of RAB5A gene has been proved to be associated with neoplasia metastasis. This study is to explore the effect of RAB5A gene on invasion and metastasis of human lung adenocarcinoma cell lines. **Methods** Constituted basement membrane invasion technique, adhesion capability of tumor cell assay, the chemotactic migration of tumor cells assay, and gelatinases SDS-PAGE analysis method were used to detect the changes of invasive and metastatic capability of Anip973 (with high metastatic capability) and its parent AGZY83-a cell lines (with low metastatic capability). **Results** After AGZY83-a cells were transfected by PcDNA3.1-RAB5A plasmid, its invasion was significantly increased ($t = 24.36, P < 0.0005$); adhesion capability of cell was promoted ($P < 0.05$); the chemotactic migration of cells was higher than that of the parent lines ($t = 14.18, P < 0.0005$); and the activity of gelatinases secreted from transfected AGZY83-a was enhanced. The invasion of the transfected Anip973 cells with PcDNA3-AntiRAB5A was lower ($t = 16.5104, P < 0.0025$); adhesion capability of cell was decreased ($P < 0.05$); the chemotactic migration of cells was lower than that of the parent lines ($t = 6.062, P < 0.005$); and the activity of gelatinases was obviously decreased. **Conclusion** This study *in vitro* indicates that over-expression of RAB5A genes plays an important role in tumor invasion and metastatic phenotype formation of human lung adenocarcinoma cells; and antisense RNA can interrupt the translation of RAB5A gene.

【Keywords】 RAB5A Tumor metastasis Antisense RNA

This study was partly supported by grants from the National Natural Scientific Foundation of China (to LI Yu) (No. 39970396) and Provincial Scientific Foundation of Heilongjiang (to LI Yu) (D9809).

RAB5 蛋白为 RAS 超家族中 RAB 家庭成员之一, 属小 GTP 结合蛋白类, 其功能为细胞内囊泡运输

的调控因子, 能够结合 GTP 并表现出 GTP 酶的活性。李钰等研究发现 RAB5A 在具有高转移潜能的人肺腺癌细胞系 Anip973 中高表达, 在低转移潜能的母系 AGZY83-a 中低表达。通过构建重组 RAB5A 正义真核表达载体^[2]和反义 RNA, 采用细胞转染的方法, 将构建重组体转入 AGZY83-a 及 Anip973 细胞中, 发现细胞形态和表型明显改变。本研究观察了 RAB5A 对人肺

本研究受国家自然科学基金资助项目(39970396)及黑龙江省自然科学基金资助项目(D9809)资助

作者单位: 150086 哈尔滨医科大学遗传学教研室(王春梅为医学遗传学专业硕士研究生)

腺癌细胞系的转移表型影响的体外实验,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 细胞系标本

低转移性人肺腺癌细胞系 AGZY83-a 及由 AGZY83-a 衍生的高转移性亚系 Anip973,由哈尔滨医科大学病理学教研室王吾如教授提供。

RAB5A 正义表达载体 PcDNA3.1-RAB5A 转染的 AGZY83-a (RAB5A AGZY83-a) 及反义重组体 PcDNA3-AntiRAB5A 转染的 Anip973 细胞系 (AntiRAB5A Anip973)。

1.2 主要仪器和试剂

(1) Transwell 细胞培养小室 (美国 Orange scientific) (2) 12 孔培养板 (Orange scientific); (3) PVPF (Polyvinyl Pyrrolidone-Free) 孔径 8.0 μm , 直径 13 mm (美国 ISC BIOExpress) (4) PVPF 孔径 12.0 mm, 直径 13 mm (ISC BIOExpress); (5) 96 孔平底细胞培养板 (Orange scientific); (6) Human-Fibronectin (FN) (北京医科大学) (7) Matrigel (北京医科大学) (8) Laminin (LN) (北京医科大学)。

1.3 方法

1.3.1 重建基底膜侵袭实验

PVPF 膜用 manicure 贴在 Transwell 细胞培养小室上,风干。膜外表面涂 FN 5 μg ,膜内面涂 Matrigel 5 μg ,干燥,形成一个基质屏障层。12 孔培养板内加入 0.1% BSA-RPMI1640。用 1 mmol/L EDTA 消化收集细胞,悬浮于 0.1% BSA-RPMI1640 培养基中,细胞密度为 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 。将细胞悬液加到 Transwell 小室中,每小室 100 μl 将小室浸于 12 孔板的条件培养基上。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 温箱内孵育 4 h。取出 Transwell 小室,滤膜用甲醇固定 1 min,HE 常规染色,用棉签将未穿过膜的细胞擦掉,将擦过的 PVPF 膜置于 400 倍光镜下计数穿透人工基底膜细胞数,每组平行设 3 个滤膜。

1.3.2 癌细胞趋化性运动能力的测定

涂趋化剂 FN 10 μg 于膜的下室面,风干。将膜用 manicure 固定于 Transwell 小室上,风干。上室腔内加入 2×10^5 个癌细胞,悬于 0.1% BSA-RPMI1640 培养液中。将小室浸于 12 孔板的条件培养基上,37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 温箱内孵育 4 h。用棉签擦尽上室膜面的细胞,滤膜用甲醇固定 1 min,HE 常规染色,封片。每张滤膜于 400 倍光镜下计数 8 个视野的癌细胞数,取均值,每组平行设 3 个滤膜。

1.3.3 癌细胞与基底膜成分粘附能力的测定

96 孔板每孔分别铺上 LN、FN、Matrigel 各 2 μg 干燥。每孔加

入 2% BSA 20 μl ,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中,孵育 1 h,PBS 冲洗并弃去。用 0.1% BSA-RPMI1640 培养液中悬浮细胞,每孔加入 8×10^4 个细胞。每种成分做 5~7 个复孔,孵箱内孵育 1 h。弃去培养基,每孔加入 200 μl PBS 抽吸吹打 10 次,共冲洗 3 遍,以去除未粘附的细胞。弃去 PBS,每孔加入 MTT 40 μg ,孵箱孵育 4 h。弃去 MTT,纸巾吸尽痕量残留。加入 200 μl DMSO。酶标定量仪 MR-700 在 600 nm 测定吸光值。

1.3.4 明胶酶分泌能力及活性的测定

24 孔培养板每孔接种 10^5 个细胞培养过夜。次日去培养上清,PBS 洗 2 次,换无血清培养基 (RPMI1640) 0.2~0.3 ml 培养 20 h。收集培养细胞的无血清培养上清,低速离心 (200 r/min) 10 min 去细胞碎片,上清液于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 贮存,备用。将此培养板中细胞进行活细胞计数,按照活细胞数换算成无血清培养上清的体积。配制 10% 分离胶和 5% 浓缩胶,分离胶中加以终浓度为 0.1% 明胶,灌胶及电泳操作同普通 SDS-PAGE 电泳。按等细胞数取相应四种细胞系的培养上清与 1/2 体积样品缓冲液混合均匀,上样后以 120 V 电泳至溴酚蓝前沿进入分离胶,换 300 V 电泳至溴酚蓝距凝胶前沿 2 cm 处停止。取出凝胶,加入 100 ml 2.5% Triton X-100 洗脱 1 h。漂洗后,加入 100 ml 明胶酶缓冲液,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养中温育过夜。漂洗,加新配制的染色液染色过夜。漂洗,脱色 1 h,至出现明显清晰的负染带,在光密度扫描下扫描摄影。

1.3.5 数据处理方法

$$\text{对比率} = \frac{(\text{实验组侵袭细胞数} - \text{对照组侵袭细胞数})}{\text{对照组侵袭细胞数}} \times 100\%$$

实验所得数据应用 t 检验计算 $t = 1.895, P < 0.05$; 对比率 $> 30\%, P < 0.05$ 有显著性意义^[3]。

2 结果

2.1 重建基底膜侵袭实验

镜下观察全膜并计数(表 1) 数据经 t 检验处理后显示 Anip973 细胞对基底膜的侵袭能力明显高于 AGZY83-a 细胞,穿过基底膜的细胞数显著高于 AGZY83-a 细胞 ($t = 24.36, P < 0.0005$)。PcDNA3.1-RAB5A 转染后的 AGZY83-a 穿过基底膜的细胞数高于母系 AGZY83-a,侵袭能力明显高于母系 ($t = 16.5104, P < 0.0025$)。PcDNA3-AntiRAB5A 转染后的 Anip973 对基底膜的侵袭能力明显低于母系 Anip973,侵袭穿过基底膜细胞数仅为 Anip973 的 56.2% ($t = 10.185, P < 0.001$)。

2.2 癌细胞趋化性运动能力的测定

镜下观察趋化

运动过膜的细胞数(表2),对每膜进行分区,取相同区域进行细胞计数,数据经*t*检验处理后显示 Anip973 细胞趋化性运动能力明显增高,趋化过膜的细胞数显著地高于 AGZY83-a($t = 14.18, P < 0.0005$)。PcDNA3.1-RAB5A 转染后的 AGZY83-a 趋化性运动能力明显高于母系 AGZY83-a,趋化过膜的细胞数高于 AGZY83-a($t = 6.062, P < 0.005$)。PcDNA3-AntiRAB5A 转染后的 Anip973 趋化性运动能力低于母系 Anip973,趋化过膜的细胞数仅为 Anip973 的 27.5%($t = 11.64, P < 0.001$)。

表 1 转染前后细胞对重组基底膜侵袭能力的比较

Tab 1 The comparison of capability of invasion of transfected cell lines and its parents

Cell lines	The number of cells through the basement membrane		
	Mebrane 1	Mebrane 2	Mebrane 3
AGZY83-a	103	112	111
RAB5A AGZY83-a	491	515	485
Anti-RAB5A Anip973	483	566	530
Anip973	995	884	930

表 2 转染前后细胞趋化运动能力的比较

Tab 2 The comparison of capability of chemotactic migration of transfected cell lines and its parents

Cell lines	The number of chemotactic migration cells		
	Mebrane 1	Mebrane 2	Mebrane 3
AGZY83-a	18	13	19
RAB5A AGZY83-a	43	33	40
Anti-RAB5A Anip973	18	27	26
Anip973	82	95	81

2.3 癌细胞粘附能力的测定 对 AGZY83-a、Anip973 及其转染后的两种细胞系粘附能力实验测得的吸光值经*t*检验处理,显示转染前后的瘤细胞对基底膜成分粘附能力有明显改变(图1)。

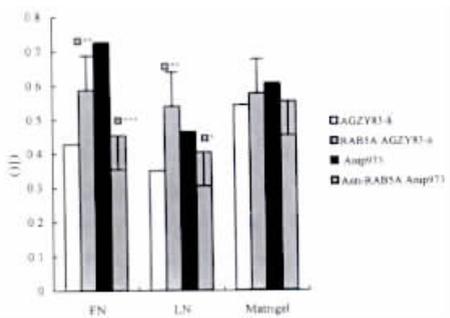


图 1 转染前后细胞粘附能力结果分析

Fig 1 The comparison of capability of adhesion of transfected cell lines and its parents

AGZY83-a 和 Anip973 对 FN、LN、Matrigel 粘附能力均有差异,其中对 FN、LN 的差异显著($t = 5.121, P < 0.0025; t = 2.473, P < 0.05$);对 Matrigel 粘附能力的差异无显著性($t = 1.251, P > 0.05$)。PcDNA3.1-RAB5A 转染后的 AGZY83-a 对 FN、LN、Matrigel 粘附能力均高于母系,其中对 FN、LN 的差异显著($t = 3.677, P < 0.01; t = 3.844, P < 0.005$);对 Matrigel 粘附能力的差异无显著性($t = 1.300, P > 0.05$)。PcDNA 3.1-AntiRAB5A 转染后的 Anip973 对 FN、LN、Matrigel 粘附能力均高于母系,其中对 FN、LN 的差异显著($t = 5.121, P < 0.0025; t = 1.529, P \approx 0.05$);对 Matrigel 粘附能力的差异无显著性($t = 0.8656, P > 0.05$)。

2.4 癌细胞分泌明胶酶能力及活性的测定 经考马斯亮蓝染色后发现在对照组 AGZY83-a 和 Anip973 细胞两个泳道中,在近 67 kU 处可见因明胶酶降解明胶而产生的负染带区,其中 Anip973 的负染带明显清晰,而 AGZY83-a 的负染带极弱(图 2)。转染后的 AGZY83-a 明胶酶分泌量及活性明显增强,其负染带接近于 Anip973 经 PcDNA3-AntiRAB5A 质粒转染后的 Anip973 明胶酶分泌量及活性明显降低,其负染带接近于 AGZY83-a。

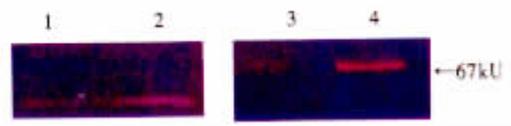


图 2 转染前后细胞明胶酶谱分析

Fig 2 The analysis of activity of gelatinases for transfected lines and its parents
1:AGZY83-a 2:RAB5A AGZY83-a;
3:Anti-RAB5A Anip973 4:Anip973

3 讨论

李钰等采用 mRNA 差异显示技术分析了一对细胞来源相同而转移能力不同的人肺腺癌细胞系 AGAZY83-a 和 Anip973,发现 RAB5A 基因在具有高转移潜能的 Anip973 中高表达^[1,4-6]。本研究构建 PcDNA3.1-RAB5A 的正义表达载体转染 AGZY83-a^[5],构建 RAB5A 反义 RNA 转染 Anip973。对转染前后的细胞进行重组基底膜试验,其结果表明 RAB5A 转染后的侵袭基底膜能力比 AGZY83-a 显著增强,提示 RAB5A 的表达增高显著提高瘤细胞侵袭基底膜的能力,转染细胞趋化运动能力也明显增加,提示 RAB5A 诱导细胞运动能力提高。转染后的细胞分泌溶解细胞外基质的明胶酶活力也呈现增强趋势,提示转染后的

细胞降解细胞外基质的能力有了明显的增强,但与 Anip973 比其分泌量还较弱。瘤细胞粘附能力也有明显改变,其中转染后细胞对 FN、LN 的粘附能力显著增强。RAB5A 转染后的细胞对 Matrigel 的粘附能力也稍高于 AGZY83-a,但统计学意义不显著。以上试验结果充分说明 RAB5A 在肿瘤侵袭转移表型形成中发挥着重要的作用。RAB5A 被认为是原癌基因,其功能为主要参与调控蛋白的转运,综合前面的分析,推测 RAB5A 可能影响了某些包括 IV 明胶酶在内的细胞外基质蛋白水解酶的活化或高表达。已有研究提示 RAB5A 与细胞粘附因子相关联,可以推论 RAB5A 高表达与转移的发生和表型形成有直接关系,很可能反映了跨膜信号系统在转移调控改变中的一个侧面。

转染后的 Anip973 细胞对基底膜侵袭能力显著降低,细胞的趋化性运动能力明显减弱,对基底膜成分的粘附能力降低,细胞的明胶酶分泌量及活性明显降低,一系列趋向 Anip973 变化。体外试验结果充分表明了 RAB5A 的反义分子能够有效地阻断 RAB5A 基因的翻译过程。就其所构建的反义表达载体本身,其可在细

胞内发挥预期作用,为进一步进行体内试验奠定了实验室基础,同时也提示了 RAB5A 的反义分子可能成为一种有效的临床抗转移药物。

参 考 文 献

- 1 Li Y(李钰), Feng HCh, Chen Y, et al. Different expression of RAB5A in human lung adenocarcinoma cells with different metastasis potential. Clin Exp Metastasis, 1999, 17(3): 213-219.
- 2 陈宇, 李钰, 冯会臣, 等. 定向克隆构建 RAB5A 基因哺乳动物细胞表达载体. 哈尔滨医科大学学报, 2000, 34(2): 79-84.
- 3 韩锐. 抗癌药物研究与实验技术. 第 1 版. 北京: 中国协和医科大学北京医科大学联合出版社, 1997. 686-694.
- 4 Li Y(李钰), Fen HCh, Chen Y, et al. Over-Expression of RAB5A in human lung adenocarcinoma cells with different metastasis potential. Chin Med Sci J, 1999, 14(2): 96-102.
- 5 李钰, 冯会臣, 陈宇, 等. 与肺癌与胃癌转移可能相关基因 RAB5A. 中华肿瘤杂志, 1999, 21(3): 178-185.
- 6 李钰, 宋岩, 陆纲, 等. 一个与非小细胞肺癌转移相关的基因 RAB5A. 遗传, 1999, 21(4): 6.

(收稿 2001-06-11 修回 2001-11-26)
(本文编辑 张世雯)

· 会议消息 ·

Time 5 April 2003 – 9 April 2003

Meeting AACR 's 2003 Annual Meeting

Place

Metro Toronto Convention Centre

Toronto, Ontario, Canada

Mail

AACR

(American Association for Cancer Research)

Public Ledger Building, Suite 826

150 South Independence Mall West

Philadelphia, PA 19106 – 3483

USA

Tel 215 440 – 9300

Fax 215 440 – 9313

Event UBL <http://www.aacr.org>

时间 2003 年 4 月 5 ~ 9 日

会议 2003 年第 94 届 AACR 年会

地点

加拿大安大略省多伦多市

Metro Toronto Convention Centre

联系地址

AACR

(American Association for Cancer Research)

Public Ledger Building, Suite 826

150 South Independence Mall West

Philadelphia, PA 19106 – 3483

USA

电话 215 440 – 9300

传真 215 440 – 9313

网址 <http://www.aacr.org>