

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.04.006

慢病毒介导 *NDRG2* 基因过表达抑制人膀胱癌 T24 细胞的侵袭和迁移

李瑞晓¹, 于垂恭¹, 张璟², 王禾³, 武国军¹(1. 第四军医大学西京医院 泌尿外科, 陕西 西安 710032; 2. 第四军医大学生物化学与分子生物学教研室, 陕西 西安 710032; 3. 第四军医大学唐都医院 泌尿外科, 陕西 西安 710038)

[摘要] **目的:**观察 N-Myc 下游调节基因-2(N-Myc downstream-regulated gene 2, *NDRG2*)过表达对人膀胱癌 T24 细胞体外侵袭和迁移的影响。**方法:**采用携带 *NDRG2* 基因的慢病毒 Lenti-*NDRG2* 感染 T24 细胞,构建稳定过表达 *NDRG2* 的细胞株。Western blotting 检测 T24 细胞中 *NDRG2*、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-2 和 MMP-9 的表达,Transwell 体外迁移和侵袭实验观察过表达 *NDRG2* 对 T24 细胞体外迁移和侵袭的影响。**结果:**建立了稳定过表达 *NDRG2* 的 T24 细胞株。与 Lenti-LacZ 组和空白对照组相比,Lenti-*NDRG2* 组 *NDRG2* 蛋白的表达[(30.1 ± 1.27) vs (9.9 ± 1.24)、(8.2 ± 1.28)], $P < 0.01$]明显提高;Lenti-*NDRG2* 组 MMP-2 [(13.5 ± 1.32) vs (30.7 ± 1.29)、(28.8 ± 1.30)], 均 $P < 0.01$]和 MMP-9 [(11.7 ± 1.27) vs (25.2 ± 1.28)、(26.4 ± 1.31)], 均 $P < 0.01$]的表达明显降低;Lenti-*NDRG2* 组 T24 细胞的侵袭细胞数[(18.1 ± 3.4) vs (88.5 ± 4.2)、(90.2 ± 4.1)个,均 $P < 0.01$]和迁移细胞数[(20.1 ± 3.5) vs (109.4 ± 5.6)、(113.0 ± 4.9)个,均 $P < 0.01$]明显减少。**结论:**慢病毒介导的 *NDRG2* 基因过表达可能通过降低 MMP-2 和 MMP-9 的表达而抑制人膀胱癌 T24 细胞的转移与侵袭。

[关键词] 膀胱癌;T24 细胞;N-Myc 下游调节基因-2;侵袭;迁移

[中图分类号] R737.14; R730.54 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2013)04-0414-05

Lentivirus-mediated *NDRG2* overexpression inhibits invasion and metastasis of human bladder cancer T24 cells

Li Ruixiao¹, Yu Chuigong¹, Zhang Jing², Wang He³, Wu Guojun¹(1. Department of Urology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China; 3. Department of Urology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi, China)

[Abstract] **Objective:**To observe the effect of *NDRG2* (N-myc downstream-regulated gene 2) overexpression on invasion and metastasis of human bladder cancer T24 cell *in vitro*. **Methods:** The T24 cells were infected with lentivirus carrying *NDRG2* gene (Lenti-*NDRG2*) to construct a stable cell line overexpression *NDRG2*. Western blotting was performed to examine the expression of *NDRG2*, matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in T24 cells. The effects of *NDRG2* overexpression on the invasion and migration of T24 cells were examined by the transwell invasion and migration assays, respectively. **Results:** The T24 cell line stable overexpression *NDRG2* was successfully constructed. Compared with the LEN-LacZ group and the control group, the *NDRG2* expression was efficiently increased in the Lenti-*NDRG2* group ([30.1 ± 1.27] vs [9.9 ± 1.24], [8.2 ± 1.28]; $P < 0.01$); the MMP-2 ([13.5 ± 1.32] vs [30.7 ± 1.29], [28.8 ± 1.30]; $P < 0.01$) and MMP-9 expressions ([11.7 ± 1.27] vs [25.2 ± 1.28], [26.4 ± 1.31]; $P < 0.01$) in T24 cells of Lenti-*NDRG2* group were significantly suppressed; the capabilities of the invasion ([18.1 ± 3.4] vs [88.5 ± 4.2], [90.2 ± 4.1]; $P < 0.01$) and migration ([20.1 ± 3.5] vs [109.4 ± 5.6], [113.0 ± 4.9]; $P < 0.01$) of T24 cells were significantly suppressed in the Lenti-*NDRG2* group. **Conclusion:** The lentivirus-mediated *NDRG2* overexpression can suppress the invasion and migration of human bladder cancer T24 cells.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.31070681)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No.31070681)

[作者简介] 李瑞晓(1986-),男,陕西省定边县人,硕士生,主要从事泌尿系肿瘤的研究。E-mail:liruixiao4@163.com

[通信作者] 武国军(Wu Guojun, corresponding author),E-mail:wuguojunxian@163.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130722.1256.003.html>

[**Key words**] bladder cancer; T24 cell; N-Myc downstream-regulated gene 2(*NDRG2*); invasion; metastasis

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(4): 414-418]

N-Myc 下游调节基因-2(N-Myc downstream-regulated gene 2, *NDRG2*)是 *NDRG* 家族的重要成员之一,最初在 *N-Myc* 基因敲除小鼠中被发现,人源 *NDRG2* 是第四军医大学生化实验室首先发现并命名的(GenBank 登录号:AF159092)。随着对其功能的深入研究,发现 *NDRG2* 在前列腺癌、肾癌、肝癌等肿瘤中低表达,并且对肿瘤的转移与侵袭具有抑制作用^[1]。本课题组前期研究^[2]发现,*NDRG2* 在膀胱肿瘤中低表达,在正常膀胱组织中高表达。本研究利用携带 *NDRG2* 的慢病毒(Lenti-*NDRG2*)感染人膀胱癌 T24 细胞,建立 *NDRG2* 过表达的稳转细胞株,检测 *NDRG2* 与细胞转移相关蛋白 MMP-2 及 MMP-9 表达之间的关系及其对 T24 细胞侵袭和迁移的影响,为临床上膀胱癌的诊断和治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

人膀胱癌细胞株 T24 购于中国科学院上海细胞库。RPMI 1640 和 DMEM 培养基购于美国 Gibco 公司,新生牛血清购于天津灏洋生物技术公司。T24 细胞常规复苏后接种于 25 cm² 培养瓶中,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。表达 *NDRG2* 的慢病毒 Lenti-*NDRG2* 及对照组 LacZ 病毒(Lenti-LacZ, 含红色荧光蛋白 *cherry* 基因)均由第四军医大学生化教研室提供,保存于 -80 °C。鼠抗人 *NDRG2* 单克隆一抗由第四军医大学免疫教研室制备,鼠抗人 GAPDH 多克隆一抗、MMP-2 及 MMP-9 一抗购于武汉博士德公司。细胞裂解液购于日本 TaKaRa 公司,BCA 蛋白定量试剂盒购于美国 Thermo Scientific 公司。

1.2 慢病毒 Lenti-*NDRG2* 稳定感染人膀胱癌 T24 细胞

取对数生长期的 T24 细胞随机分为 3 组:实验组(Lenti-*NDRG2*)、对照组(Lenti-LacZ)及空白组,接种于 6 孔板中,37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 18 ~ 24 h 后,至细胞约 70% 汇合时,吸去 6 孔板中的细胞培养基,Lenti-*NDRG2* 组和 Lenti-LacZ 对照组分别加入 Lenti-*NDRG2* 及对照 Lenti-LacZ 病毒上清,空白组常规 DMEM 培养基换液培养,24 h 后重复上述操作,继续加入相应病毒上清;依上述换液 3 次后,荧光显微镜下观察 Lenti-LacZ 对照组细胞内红色荧

光表达情况,当转染效率达 70% 时,每孔加入浓度为 4 μg/ml 的杀稻瘟菌素(blasticidin),杀死未感染病毒的正常 T24 细胞,建立稳定感染 Lenti-*NDRG2* 的 T24 细胞。

1.3 Western blotting 检测 *NDRG2* 过表达对 T24 细胞 *NDRG2*、MMP-2 及 MMP-9 表达的影响

待感染率达 95% 以上时,分别取上述病毒感染的 Lenti-*NDRG2* 实验组、Lenti-LacZ 对照组及空白组 T24 细胞,常规培养 48 h 后收取细胞样本,分别提取 3 组细胞的总蛋白,按 BCA 法定量试剂盒说明书定量总蛋白。取 5 μg 总蛋白样品进行 SDS-PAGE,将蛋白电转移到硝酸纤维素膜上,行 Western blotting 检测。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,分别加入鼠抗人 *NDRG2* 单克隆一抗、MMP-2 多克隆一抗、MMP-9 多克隆一抗和鼠抗人 GAPDH 多克隆一抗室温孵育,1 h 后,4 °C 孵育过夜,洗涤后加入荧光素标记的羊抗鼠二抗,室温孵育 1 h,洗涤后使用计算机-荧光扫描成像系统对硝酸纤维素膜进行扫描、分析并保存结果图片。

1.4 Transwell 实验检测 *NDRG2* 过表达对 T24 细胞侵袭的影响

Lenti-*NDRG2* 组、Lenti-LacZ 组及空白组 T24 细胞常规培养 24 h 后胰酶消化,无血清培养基重悬细胞并调整密度至 2 × 10⁵ 个/ml。用无血清培养基将 Matrigel 基质胶按 1:7 进行稀释并包被于 Transwell 小室滤膜的上表面,37 °C 孵箱放置 2 h 使其固化。在作为下室的 24 孔板中加入 600 μl 含有 15% 血清的 RPMI 1640 培养基,每个小室加入 200 μl 细胞悬液后放入 24 孔板,每组做 5 个复孔。培养 24 h 后取出小室,小心擦去小室内面的未穿过的细胞。无水乙醇固定小室 10 min,随后结晶紫染液染色 10 min,自来水冲洗,空气中晾干。光镜下拍照、计数穿过人工基底膜和微孔膜的细胞数目,进行统计学分析并绘制直方图。

1.5 Transwell 实验检测 *NDRG2* 过表达对 T24 细胞迁移的影响

T24 细胞常规培养 24 h 后胰酶消化,无血清培养基重悬调整细胞密度至 2 × 10⁵ 个/ml。在 24 孔板中加入 600 μl 含有 15% 血清的 RPMI 1640 培养基,每个小室加入 200 μl 细胞悬液后放入 24 孔板,每组做 5 个复孔。培养 24 h 后取出小室,小心擦去小室内面的未穿过的细胞。无水乙醇固定小室

10 min, 随后结晶紫染液染色 10 min, 自来水冲洗, 空气中晾干。光镜下拍照、计数穿过人工基底膜和微孔膜的细胞数目, 进行统计学分析并绘制直方图。

1.6 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS19.0 统计软件分析, 不同组间比较采用方差分析(ANOVA), 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒 Lenti-LacZ 高效感染 T24 细胞

Lenti-LacZ 慢病毒载体中 *cherry* 基因在荧光显微镜下显示红色蛋白。荧光显微镜下观察结果显示, 经过稳定筛选, Lenti-LacZ 对照组 T24 细胞均呈现红色荧光。Lenti-NDRG2 组和 Lenti-LacZ 组病毒为同一批次包装, 因此以上结果可初步说明 Lenti-NDRG2 组和 Lenti-LacZ 组病毒感染 T24 细胞成功(图 1)。

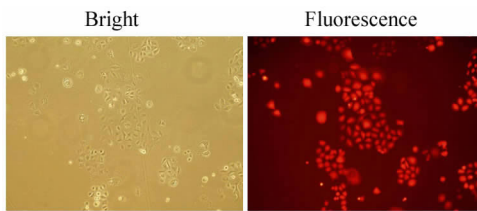


图 1 慢病毒 Lenti-LacZ 感染 T24 细胞后荧光蛋白的表达($\times 200$)

Fig. 1 Expression of fluorescent protein in T24 cells infected with Lenti-LacZ lentivirus ($\times 200$)

2.2 慢病毒 Lenti-NDRG2 感染降低 T24 细胞中 MMP-2、MMP-9 蛋白的表达

Western blotting 检测结果(图 2)显示, 与 Lenti-LacZ 对照组和空白对照组相比较, Lenti-NDRG2 慢病毒感染组 T24 细胞 NDRG2 表达量明显增加 [(30.1 ± 1.27) vs (9.9 ± 1.24) 、 (8.2 ± 1.28) ; 均 $P < 0.01$], 进一步说明慢病毒 Lenti-NDRG2 成功感染 T24 细胞; 而 MMP-2 [(13.5 ± 1.32) vs (30.7 ± 1.29) 、 (28.8 ± 1.30) ; 均 $P < 0.01$] 和 MMP-9 [(11.7 ± 1.27) vs (25.2 ± 1.28) 、 (26.4 ± 1.31) ; 均 $P < 0.01$] 表达水平降低, 说明 NDRG2 过表达可以抑制 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达。

2.3 慢病毒 Lenti-NDRG2 感染抑制 T24 细胞的侵袭能力

侵袭实验结果(图 3)显示: Lenti-NDRG2 感染组 T24 细胞穿过人工基底膜 Matrigel 胶和微孔膜的

细胞数较 Lenti-LacZ 组及空白组明显减少 [(18.1 ± 3.4) vs (88.5 ± 4.2) 、 (90.2 ± 4.1) 个; $P < 0.01$], 说明 Lenti-NDRG2 感染过表达 NDRG2 可以降低人膀胱癌 T24 细胞的体外侵袭能力。

2.4 慢病毒 Lenti-NDRG2 感染抑制 T24 细胞的迁移能力

迁移实验结果(图 4)显示, 慢病毒 Lenti-NDRG2 感染组穿入下室面的 T24 细胞数较 Lenti-LacZ 组及空白组明显减少 [(20.1 ± 3.5) vs (109.4 ± 5.6) 、 (113.0 ± 4.9) 个; $P < 0.01$], 说明慢病毒 Lenti-NDRG2 感染过表达 NDRG2 可以降低膀胱癌 T24 细胞的体外迁移能力。

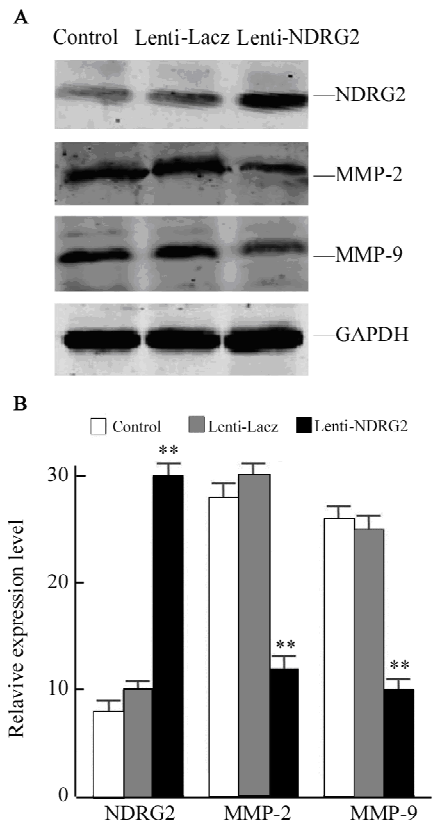


图 2 Lenti-NDRG2 慢病毒感染对 T24 细胞 NDRG2、MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of Lenti-NDRG2 lentivirus infection on the expressions of NDRG2, MMP-2 and MMP-9 proteins in T24 cells

A: Western blotting; B Statistical analysis

** $P < 0.01$ vs Lenti-LacZ or Control group

3 讨论

世界范围内, 膀胱癌发病率居恶性肿瘤的第 11 位, 男性排名第 7 位、女性排在第 10 位之后^[3]。在

欧美国家,膀胱癌在男性中发病率为继前列腺癌、肺癌和结肠癌之后的第 4 位,在女性中排在 10 位之后^[3]。2008 年中国男性膀胱癌发病率(11.41/10 万)是中国女性膀胱癌发病率(3.51/10 万)的 3.3 倍^[4]。任何年龄段均可发生膀胱癌,甚至是儿童,但其主要发病率多为中年之后,并且发病率随年龄的增长而增加^[4]。膀胱癌的术后高复发及高度转移恶性潜能是临床上治愈的重大难题,50%~80%

的膀胱癌患者会发生侵袭和转移,这也是膀胱癌治疗失败的主要原因^[5]。目前膀胱癌的主要治疗措施是手术治疗加术后放化疗,但治疗效果欠佳^[6]。基因治疗是目前肿瘤治疗的热点,膀胱癌的发生是一个复杂多变的过程,受到多种相关基因的调控,每一个环节的异常都可能是基因治疗的靶点,探索膀胱癌的发病机制、发生发展过程,可为膀胱癌的基因治疗发现有效靶点^[7]。

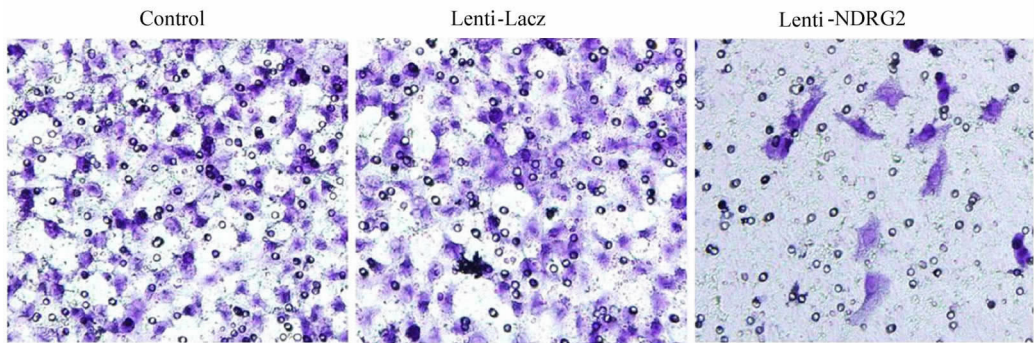


图 3 Lenti-NDRG2 慢病毒感染降低 T24 细胞的侵袭能力(×400)

Fig. 3 Lenti-NDRG2 lentivirus infection suppressed invasion ability of T24 cells (×400)

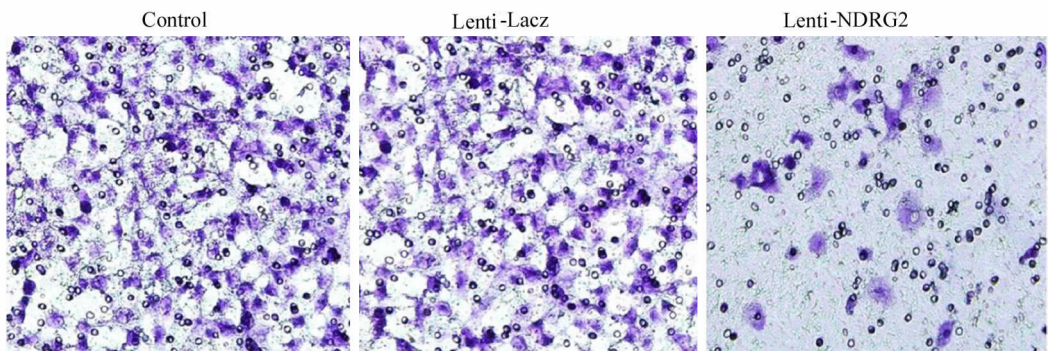


图 4 慢病毒 Lenti-NDRG2 感染降低 T24 细胞的迁移能力(×400)

Fig. 4 Lenti-NDRG2 infection suppressed migration ability of T24 cells (×400)

NDRG2 与 *NDRG1*、*NDRG3* 及 *NDRG4* 同属于 *NDRG* 家族,是第四军医大学生化实验室首先发现并报道的一种新的抑癌基因^[8],在抑制肿瘤增殖和转移,诱导细胞凋亡等方面发挥着重要的作用^[9]。*NDRG2* 全长 2 024 bp,编码蛋白的相对分子质量约 41 000,是一个含有 357 个氨基酸残基的功能未知蛋白。Lee 等^[10]研究表明,*NDRG2* 能通过拮抗 TGF- β 1 通路抑制肝癌转移。研究^[11-12]发现,*NDRG2* 在甲状腺癌、乳腺癌中低表达,上调 *NDRG2* 的表达可抑制肿瘤的淋巴结转移。*NDRG2* 在正常组织中高

表达,在肾细胞癌组织中低表达,其阳性表达率与肾细胞癌恶性程度呈负相关;并且,*NDRG2* 通过抑制 MMP-9 的活性而抑制肾癌的侵袭与转移^[13-14]。*NDRG2* 在前列腺癌组织中的表达情况与肾癌相似,上调 *NDRG2* 的表达在体外及裸鼠体内均能抑制前列腺癌 PC3 细胞的增殖、促进其凋亡,以及抑制前列腺癌骨转移^[15-16]。MMP-2、MMP-9 是金属蛋白酶家族中成员,研究^[17]证实 MMP-2 和 MMP-9 能降解多种包括基底膜 IV 型胶原在内的细胞外成分,使癌细胞向深层间质浸润的同时,突破淋巴管和血管的基底

膜而向脉管浸润,最终发生转移。

慢病毒载体可以用于基因治疗,因为它可以稳定地将目的基因整合到宿主基因组中,并长期地表达该目的基因。慢病毒介导的基因治疗可持续的表达外源目的基因,而且慢病毒是复制缺陷型,可有效避免野生型功能复制性病毒的产生^[18-19];并且随着基因技术的发展,慢病毒技术的应用不仅仅可上调基因的表达,也可用于从基因组水平来研究基因的功能^[20]。本实验通过载有 *NDRG2* 的慢病毒 Lenti-*NDRG2* 稳定感染人膀胱癌 T24 细胞,成功构建过表达 *NDRG2* 的 T24 细胞,发现 Lenti-*NDRG2* 组 T24 肿瘤细胞的侵袭和迁移能力均明显低于 Lenti-LacZ 组和空白组,说明上调 *NDRG2* 表达可以抑制膀胱癌 T24 细胞的侵袭与迁移。*NDRG2* 过表达还可使 T24 细胞中 MMP-2、MMP-9 蛋白的表达量下降,推测 *NDRG2* 可通过抑制 MMP-2 和 MMP-9 的表达,从而抑制膀胱癌的转移与侵袭。

综上所述,*NDRG2* 在膀胱癌中发挥着重要作用,可调节膀胱癌细胞的转移和侵袭能力,具有作为膀胱癌生物治疗靶分子的潜力,但是其发挥抑制肿瘤作用的分子机制尚不明确。因此,下一步的研究将在动物实验以及分子信号通路方面开展,通过建立裸鼠体内种植瘤模型,观察 *NDRG2* 对肿瘤细胞增殖、凋亡及转移的影响,为 *NDRG2* 在临床膀胱癌诊断、治疗及术后检测中的应用提供实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] Kim A, Kim M J, Yang Y, et al. Suppression of NF-kappaB activity by *NDRG2* expression attenuates the invasive potential of highly malignant tumor cells [J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30(6): 927-936.
- [2] 李瑞晓,于垂恭,张璟,等. 抑癌候选基因 *NDRG2* 在膀胱肿瘤中的表达研究 [J]. *中国医师杂志*, 2012, 14(12): 1585-1588.
- [3] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [4] 韩苏军,张思维,陈万青,等. 中国膀胱癌发病现状及流行趋势分析 [J]. *癌症进展*, 2013(1): 89-95.
- [5] 易正金,何云锋,王勇,等. miRNA 沉默 ILK 基因对人膀胱癌 T24 细胞侵袭功能的影响 [J]. *生命科学研究*, 2012, 16(2): 164-168.
- [6] Logan C, Brown M, Hayne D. Intravesical therapies for bladder cancer-indications and limitations [J]. *BJU Int*, 2012, 110(Sup-

pl 4): 12-21.

- [7] Cross D, Burmester JK. Gene therapy for cancer treatment: Past, present and future [J]. *Clin Med Res*, 2006, 4(3): 218-227.
- [8] 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(1): 72-76.
- [9] Yao L, Zhang J, Liu X. *NDRG2*: A Myc-repressed gene involved in cancer and cell stress [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2008, 40(7): 625-635.
- [10] Lee DC, Kang YK, Kim WH, et al. Functional and clinical evidence for *NDRG2* as a candidate suppressor of liver cancer metastasis [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(11): 4210-4220.
- [11] Zheng J, Liu Q, Li Y, et al. *NDRG2* expression regulates CD24 and metastatic potential of breast cancer cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2010, 11(6): 1817-1821.
- [12] Mordalska A, Latek J, Ferenc T, et al. Evaluation of *NDRG2* gene expression in primary papillary thyroid carcinoma and in metastases of this neoplasm to regional lymph nodes [J]. *Thyroid Res*, 2010, 3(1): 6.
- [13] Ma J, Jin H, Wang H, et al. Expression of *NDRG2* in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(7): 1316-1320.
- [14] Ma JJ, Kong LM, Liao CG, et al. Suppression of MMP-9 activity by *NDRG2* expression inhibits clear cell renal cell carcinoma invasion [J]. *Med Oncol*, 2012, 29(5): 3306-3313.
- [15] Yu C, Wu G, Dang N, et al. Inhibition of N-myc downstream-regulated gene 2 in prostatic carcinoma [J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 12(4): 304-313.
- [16] Gao L, Wu GJ, Liu XW, et al. Suppression of invasion and metastasis of prostate cancer cells by overexpression of *NDRG2* gene [J]. *Cancer Lett*, 2011, 310(1): 94-100.
- [17] Zhang S, Li L, Lin JY, et al. Imbalance between expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in invasiveness and metastasis of human gastric carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(5): 899-904.
- [18] De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Chuah MK, et al. Phenotypic correction of von Willebrand disease type 3 blood-derived endothelial cells with lentiviral vectors expressing von Willebrand factor [J]. *Blood*, 2006, 107(12): 4728-4736.
- [19] Lemiale F, Korokhov N. Lentiviral vectors for HIV disease prevention and treatment [J]. *Vaccine*, 2009, 27(25/26): 3443-3449.
- [20] Shtutman M, Maliyekkel A, Shao Y, et al. Function-based gene identification using enzymatically generated normalized shRNA library and massive parallel sequencing [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(16): 7377-7382.

[收稿日期] 2013-03-20

[修回日期] 2013-05-24

[本文编辑] 黄静怡