

·基础研究·

二肽基肽酶对前列腺癌细胞系1E8侵袭转移的影响*

刘荣华 王世宣 马湘一 王 梅 卢运萍 马 丁

华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤生物医学中心 (武汉市 430030)

摘要 目的:探讨二肽基肽酶(DDPⅣ)对前列腺癌细胞1E8侵袭、转移的影响。方法:用亚克隆技术构建DDPⅣ基因反义真核表达质粒,脂质体法将其分别转入高转移潜能的人前列腺癌细胞1E8,并应用脂质体介导的基因转染技术,将重组质粒导入1E8细胞中,应用细胞增殖抑制试验(CCK-8)、蛋白印迹和体外侵袭实验等方法观察了1E8细胞转染前后,细胞生长、DDPⅣ蛋白表达以及细胞体外侵袭能力等指标的变化。结果:成功构建了反义DDPⅣ真核表达载体;将其转染入1E8细胞36h、48h后,反义DDPⅣ基因对前列腺癌细胞的侵袭和转移有促进作用;DDPⅣ基因表达下调能使1E8细胞的体内外侵袭能力增强。结论:DDPⅣ是前列腺癌的一个抑癌基因,在前列腺癌的侵袭转移过程中发挥着重要作用,下调DDPⅣ基因表达能明显促进前列腺癌细胞的侵袭和转移能力。提示DDPⅣ可作为前列腺癌抗侵袭治疗的分子靶点。

关键词 前列腺癌 肿瘤转移基因 二肽基肽酶 侵袭 转移

Effect of Dipeptidyl Peptidase Ⅳ on the Invasion and Metastasis of Prostatic Carcinoma Cell Line PC-3M-1E8

LIU Ronghua, WANG Shixuan, MA Xiangyi, WANG Mei, LU Yunping, MA Ding

Corresponding author: MA Ding; E-mail: dma@tjh.tjmu.edu.cn

Molecular Cancer Center, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Grant support: The "973" Program of China (No.2002CB513100); National Science Foundation of China (No. 30528012)

Objective: To evaluate the effect of Dipeptidyl Peptidase Ⅳ on the invasion and metastasis of prostatic carcinoma cell line PC-3M-1E8. **Methods:** Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to amplify dipeptidyl peptidase Ⅳ (DDPⅣ) cDNA fragments. RT-PCR products were cloned into plasmid pEGFP-C1 in the proper orientation for expressing antisense RNA, and the recombinant pEGFP-C1/DDPⅣ was transfected into 1E8 cells. We employed the CCK-8 assay to detect changes in cell proliferation. DDPⅣ protein expression and invasiveness were detected by Western blot and wound healing assay, respectively. **Results:** The eukaryotic expression vector pEGFP-C1/DDPⅣ designed to produce antisense DDPⅣ RNA was constructed successfully. At 36 hours and 48 hours after transfection with pEGFP-C1/DDPⅣ, the proliferation of 1E8 cells was significantly higher than that of untransfected cells. Compared with control cells, the pEGFP-C1/DDPⅣ-transfected cells displayed decreased expression of endogenous DDPⅣ protein. Tumor cell motility and invasive potential were enhanced in pEGFP-C1/DDPⅣ-transfected cells. **Conclusion:** DDPⅣ is a tumor suppressor gene that inhibits metastasis of prostatic cancer. Proliferation and invasive potential of 1E8 cells were enhanced by antisense DDPⅣ, suggesting that DDPⅣ may be useful in gene therapy for prostatic carcinoma.

Keywords Prostatic carcinoma; Metastasis gene; Dipeptidyl Peptidase Ⅳ; Invasion; Metastasis

前列腺癌是男性泌尿生殖系统肿瘤中最为重要的一种,浸润和转移是恶性肿瘤的主要生物学特征,恶性肿瘤的发生和发展与基因的异常表型密切相关。有研究表明二肽基肽酶(DDPⅣ)在肿瘤的发生中起着较为重要的作用。在各种肿瘤中其起着

不同的作用,也有不同的观点。DDPⅣ在前列腺癌转移中是否起重要作用尚不清楚。本研究构建DDPⅣ反义真核表达载体,将重组质粒载体导入高转移人前列腺癌细胞,研究其对前列腺癌细胞恶性表型的影响,为前列腺癌的基因治疗提供一定的理

* 本文课题受国家重点基础研究发展规划(973)项目(编号:2002CB513107);国家自然科学基金项目资助(编号:30528012)

通讯作者:马丁 dma@tjh.tjmu.edu.cn

论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

人前列腺癌细胞系 1E8 为北京大学医学院病理学系郑杰教授提供的高转移细胞株;真核表达载体 pEGFP-C1、TRIzol 提取试剂、和大肠杆菌 DH5 α 购自 Invitrogen 公司;新生牛血清和 DMEM 培养基购自 Gibco BRL 公司;Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒购自日本株式会社同仁化学研究所;T4 连接酶、BamH1 和 EcoRI 限制性内切酶均为 Promega 公司产品;引物采用 Oligo 6.0 软件设计,引物合成和插入片段的测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

细胞培养和质粒的构建 1E8 前列腺癌细胞在 5%CO₂, 37℃ 条件下培养于含 10% 胎牛血清的 1640 培养基中。收获对数生长期的细胞,按 TRIZOL 试剂说明书常规提取总 RNA,经紫外分光光度计定量, RNA 浓度和纯度,逆转录合成 cDNA, RT 反应条件为 42℃ 60min。通过 GenBank Blast 搜索人源 DDP IV 基因的全长序列 3913bp,以 DDP IV 全长 cDNA 为模板,采用引物设计软件 Oligo 6.0,设计了特异扩增翻译起始点上游第 30 个碱基和下游第 1331 个碱基共的片段的一对引物,在 5' 端分别加上 EcoR I 和 BamH I 的酶切位点序列。其序列分别为: 5' CGCGGATCC AGA GGC GAA GTA TTA TCA GC 3'; 5'CCGGAATTC AAA CAA TAA AAC CCG ACC 3'。采用玻璃奶纯化试剂盒法从琼脂糖胶中分离回收,双酶切后反向连接到 pEGFP-C1 真核表达载体上,转化受体菌,得到阳性克隆,经双酶切和测序验证。

1.3 细胞转染

1E8 前列腺癌细胞在 5% CO₂, 37℃ 条件下培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中。在 6 孔板中接种 2×10^5 个 1E8 细胞,接种 24h 后,分别取 pEGFP-C1/DDP IV 和空载 pEGFP-C1 转染细胞,转染方法参照试剂操作指南,分别收集转染前、转染后 12h、24h、36h 和 48h 的条件培养液和细胞。

1.4 荧光倒置显微镜观察

荧光倒置显微镜下观察转染 pEGFP-C1/DDP IV 的细胞中发绿色荧光的细胞。

1.5 CCK-8 法检测转染细胞生长曲线

以胰酶消化对数生长期 1E8 细胞,收集生长良好的 1E8 细胞,用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基配制成 5×10^4 /ml 细胞悬液,接种于 96 孔板内,每孔 100 μ l (约含 5000 个细胞),置于 37℃、5% CO₂ 孵箱内,待细胞完全贴壁后吸去培养基,加入 1mL 完全培养基。每个组设五个复孔,于 37℃、5% CO₂

孵箱内培养 24h。弃去培养液,在每个孔内加入 10 μ l 的 CCK-8 试剂,把培养板放在培养箱内培养 4 小时,轻微振荡后 Biotek 酶标仪检测波长 450nm、参考波长 600nm 下的吸光度。按下式计算肿瘤毒性,细胞毒性百分率=[1-(加药组细胞 A 值/不加药对照组细胞 A 值)] $\times$ 100%。实验重复 3 次。

1.6 伤口愈合试验

细胞接种于 12 孔细胞培养板,完全培养基 37℃ 培养,待细胞 80%~90% 融合度时,用 10ul 的微量吸管头划痕。立刻更换培养基,在 0h、24h、48h 倒置显微镜下根据标志观察细胞迁移运动。

1.7 Western blot 检测转染后 1E8 细胞 DDP IV 蛋白的表达

收获分组处理的细胞,裂解细胞提取总蛋白并蛋白定量(采用考马斯亮蓝 G250 法蛋白定量),灌制 10%SDS-PAGE 凝胶,每孔上样量 50 μ g,经电泳、转膜、封闭,依次与 DDP IV 抗体(稀释度 1:1 000)和碱性磷酸酶标记的二抗(稀释度 1:500)反应 1h,加底物 NBT/BCIP 显色 30min。

2 结果

2.1 PCR 和质粒构建图

见图 1。

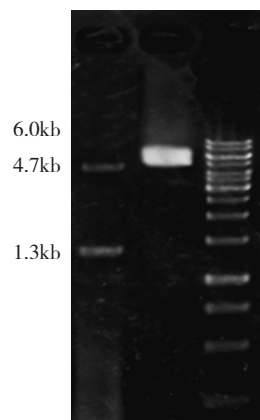


图1 重组质粒酶切
Figure 1 Restriction enzyme digestion of recombinant plasmid

2.2 细胞转染结果

见图 2。

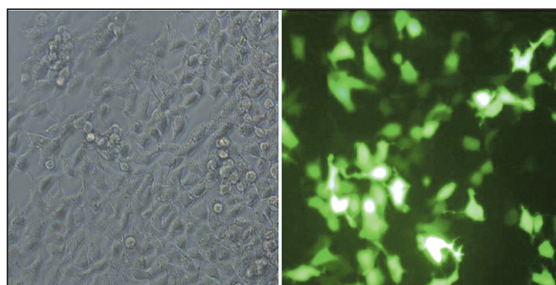


图2 转染细胞的荧光图

Figure 2 Fluorogram of transfected cells

2.3 Western blot 检测转染后 1E8 细胞 DDP IV 蛋白的表达

1E8 细胞转染 pEGFP-C1/DDPⅣ后,与转染空质粒和未转染的细胞相比,DDPⅣ蛋白表达明显减少(图5)。

2.4 细胞毒性试验

细胞转染 pEGFP-C1/DDPⅣ后,随着时间的延长,对细胞的增殖抑制作用逐渐增强,转染48h后与转染空质粒和未转染的细胞相比,细胞毒性作用有明显差异性($P<0.01$)(图3)

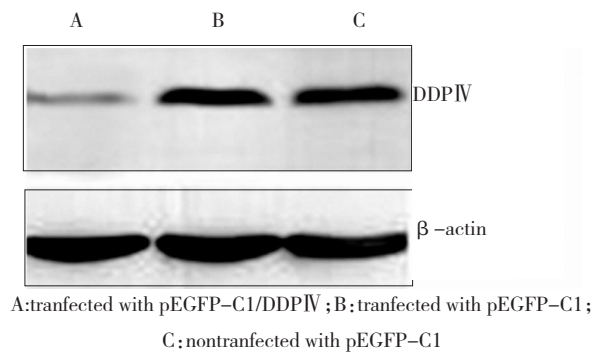


图3 1E8细胞转染pEGFP-C1/DDPⅣ后,DDPⅣ蛋白表达变化图
Figure 3 Expression of DDPⅣ protein in pEGFP-C1/DDPⅣ transfected 1E8 cells

2.5 体外侵袭实验

分别在0h、24h、48h时,在倒置显微镜下照相获得图片(如图4)。24h时转染pEGFP-C1/DDPⅣ后,细胞划痕处还有一小段距离,而未转染的细胞划痕处几乎融合。结果表明抑制细胞内源性DDPⅣ的表达后,细胞自发迁移运动能力增强。

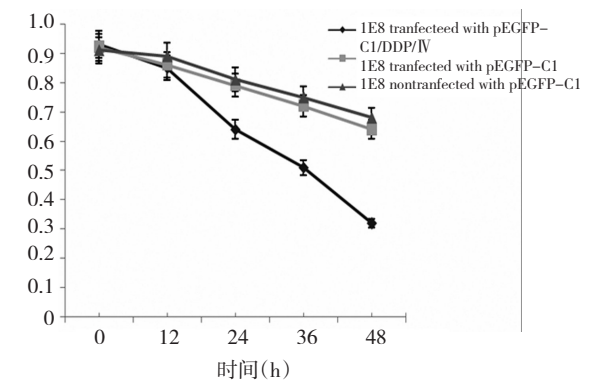
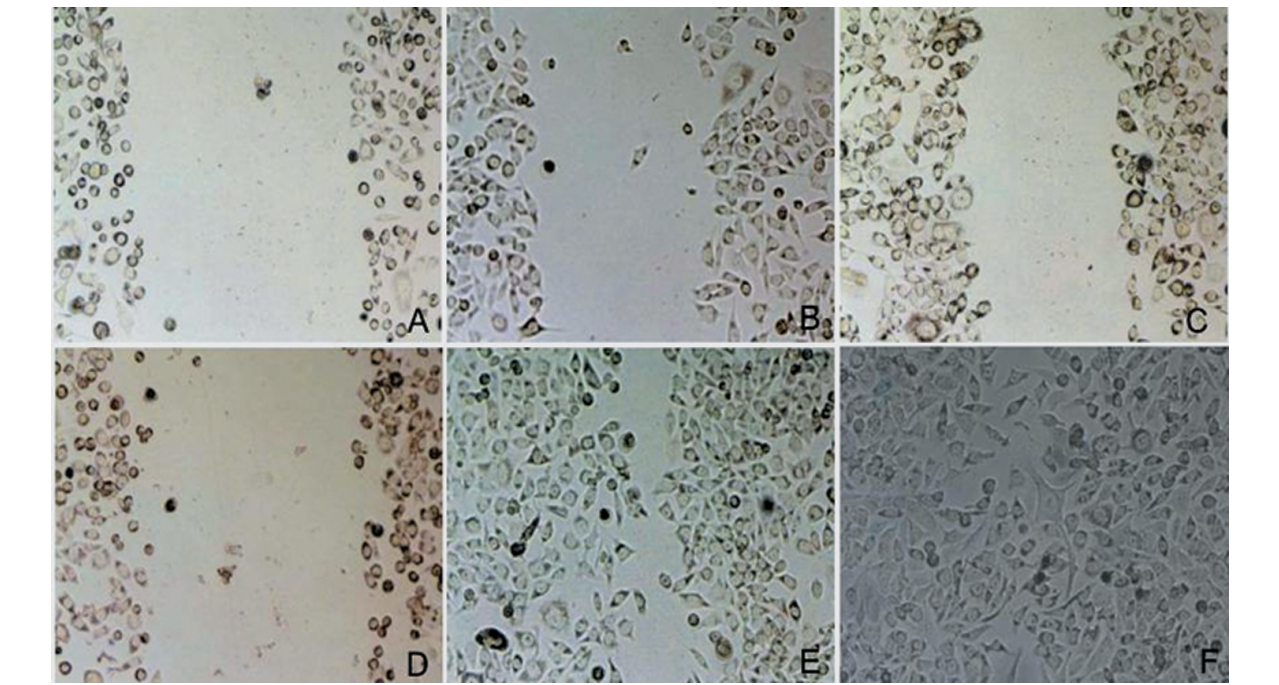


图4 细胞转染pEGFP-C1/DDPⅣ后对细胞增殖的抑制作用
Figure 4 The inhibitory effect of pEGFP-C1/DDPⅣ transfection on cell proliferation



A,B,C分别为1E8细胞未转染pEGFP-C1/DDPⅣ后0h,24h和48h的细胞伤口愈合;
D,E,F分别为转染pEGFP-C1/DDPⅣ的1E8细胞0h,24h和48h的细胞伤口愈合
图5 细胞转染pEGFP-C1/DDPⅣ前后的伤口愈合图

Figure 5 Wound healing in cells with or without pEGFP-C1/ddpⅣ transfection

3 讨论

CD26/DPPⅣ分子是一种高度糖基化的Ⅱ型跨膜蛋白,由两个同源亚单位组成,通过N末端亲水区结合在细胞膜上。首次从小鼠肺提取的抗原NH2末端序列分析确定为二肽基肽酶^[1]。DPPⅣ是一种

细胞表面氨基肽酶,具有丝氨酸蛋白酶活性。能降解肽链N末端第二个残基上的脯氨酸或甘氨酸,产生N端二肽,故称二肽基肽酶,又有二肽肽酶-4活性,故又称二肽肽酶Ⅳ(Dipeptidyl PeptidaseⅣ,DPPⅣ)。其单克隆抗体:mAb 8.6A3可以明显地抑制肺

源性的囊泡特异性粘附到肺转移性的乳腺癌细胞和前列腺癌细胞上^[2]。另有学者^[3]认为DPP IV是乳腺癌细胞转移到肺毛细血管内皮的一个粘附受体,而细胞和血浆中的纤维连接蛋白(Fibronectin, FN)被证实是DPP IV的一个主要的配体,DPP IV/FN的结合是癌细胞发生肺转移一种较为普遍的规律。

DUZHANG^[4]等发现,DPP IV是介导黑色素瘤肺转移的一个肺上皮粘附分子。也有学者证实DPP IV可以抑制黑色素细胞向黑色素瘤转化,同时发现DPP IV可诱导黑色素瘤细胞出现肿瘤原性消失,表现出恶性表型向良性表型转化的特点。认为在黑色素细胞瘤中DPP IV的高表达完全阻断了抑制凋亡基因BCL-2,从而促进癌细胞凋亡。Hiroaki等^[5,6]证实卵巢癌细胞系中DPP IV高表达时表现出低侵袭性,进一步发现,SKOV3细胞DPP IV的表达水平很低,但可以引起细胞形态明显的变化,在细胞运动和侵袭方面显著减弱。他们把DPP IV转染入该细胞时,细胞向腹膜转移的能力明显减弱,存活时间也延长。Bogenrieder T^[7]等认为DPP IV表达升高可以抑制前列腺癌细胞的恶性转化过程。

肿瘤的反义核酸是基因工程的一个重要组成部分,可以选择性改变某个特定基因的功能。我们尝试从反义的角度探讨DPP IV在实体肿瘤的侵袭和转移方面所起的作用。我们在前期工作已证实在前列腺癌不同转移潜能的细胞株(高转移潜能细胞株1E8和低转移潜能细胞株2B4)以及乳腺癌转移潜能不同的细胞株中DPP IV的表达确实存在着差异。高转移潜能细胞株该基因表达弱,而低转移潜能细胞株则表达高(另文发表)。

我们应用基因重组技术成功构建了反义DPP IV真核表达载体,并应用脂质体转染将其导入1E8细胞中,对比观察转染前后DPP IV的表达情况发现,转染后,DPP IV蛋白的表达明显减少。细胞增殖抑制试验也表明,细胞转染pEGFP-C1/DDP IV后,对肿瘤细胞的毒性作用也增强。转染反义pEGFP-C1/DDP IV 36小时后,肿瘤细胞的增殖能力有一定程度的增强,表现为细胞的运动加快。下调了肿瘤细胞DPP IV的内源性表达,增强了肿瘤细胞体外侵袭能力。结果表明,通过反义核酸技术在核酸或蛋白水平阻断DPP IV的表达,下调DDP IV基因表达能明显促进前列腺癌细胞的侵袭和转移能力。DDP IV是前列腺

癌的一个抑癌基因^[8],在前列腺癌的侵袭转移过程中发挥着一定的作用。DPP IV有可能成为靶向调控前列腺癌侵袭与转移的靶点。

高表达DPP IV分子能抑制bFGF在细胞核内定位,降低bFGF的表达水平,抑制bFGF下游信号传导途径,从而抑制前列腺癌细胞的恶化进程。而bFGF表达升高导致肿瘤恶变和转移。而我们的反义核酸技术可能是阻断了这一过程而发挥作用的。我们下一步的工作用正义核酸的方法,阻断该基因的功能,全面探讨该基因的功能,从而为前列腺癌基因治疗提供一定的实验理论依据。

参考文献

- 1 López-Otín C, Matrisian LM. Emerging roles of proteases in tumour suppression[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(10): 800-808.
- 2 Johnson RC, Zhu D, Augustin-Voss HG, et al. Lung endothelial dipeptidyl peptidase IV is an adhesion molecule for lung-metastatic rat breast and prostate carcinoma cells[J]. *J Cell Biol*, 1993, 121(6): 1423-1432.
- 3 Hung-Chi Cheng, Mossaad Abdel-Ghany and Randolph C. Elble. Lung Endothelial Dipeptidyl Peptidase IV Promotes Adhesion and Metastasis of Rat Breast Cancer Cells via Tumor Cell Surface associated Fibronectin[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1993; 273(37): 24207-24215.
- 4 Zhu DZ, Cheng CF, Pauli BU. Mediation of lung metastasis of murine melanomas by a lung-specific endothelial cell adhesion molecule[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88(21): 9568-9572.
- 5 Kajiyama H, Kikkawa F, Suzuki T, et al. Prolonged survival and decreased invasive activity attributable to dipeptidyl peptidase IV overexpression in ovarian carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(10), 2753-2757.
- 6 Kajiyama H, Kikkawa F, Khin E, et al. Dipeptidyl peptidase IV overexpression induces up-regulation of E-cadherin and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, resulting in decreased invasive potential in ovarian carcinoma cells[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(9): 2278-2283.
- 7 Bogenrieder T, Finstad CL, Freeman RH, et al. Expression and localization of aminopeptidase A, aminopeptidase N, and dipeptidyl peptidase IV in benign and malignant human prostate tissue[J]. *Prostate*, 1997, 33(4): 225-232.
- 8 McGuinness C, Wesley UV. Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV), a candidate tumor suppressor gene in melanomas is silenced by promoter methylation[J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 2435-2443.

(2008-02-20收稿)

(2008-05-20修回)

(杨红欣校对)