

[文章编号] 1007-385X(2002)04-0269-03

## Tiam-1 反义基因抗肿瘤侵袭转移作用的研究

李兆忠, 张玲, 毛海婷, 王芸, 李登华, 崔树龄(山东省医学科学院基础医学研究所, 济南 250062)

**[摘要]** 目的: 从基因—蛋白—细胞效应多层次水平, 观察 Tiam-1 反义基因下调肿瘤细胞内转移相关基因 Tiam-1 mRNA 和调节细胞骨架结构的 Rho 蛋白表达水平, 探讨遏制肿瘤侵袭转移的作用和机制。方法: 采用反义核酸技术合成 Tiam-1 反义寡核苷酸, 硫代化修饰与脂质体形成复合物(Tiam-1 ASODNS-Lf), 转导入人高转移巨细胞肺腺癌 PG 细胞。采用 RT-PCR 技术检测 Tiam-1 的表达水平, 流式细胞术检测 Rho 蛋白表达水平, Matrigel 体外转移模型检测 PG 细胞的侵袭转移力。结果: Tiam-1 ASODNS-Lf 抑制 PG 细胞 Tiam-1 mRNA 表达水平, 其相对表达值从 0.86 下降为 0.38; 显著抑制 PG 细胞内 Tiam-1 介导的信号传递相关 Rho 蛋白表达水平, 其表达率从 27.96% 降至 16.86% ( $P < 0.001$ )。显著抑制穿过人工基底膜的侵袭转移 PG 细胞数, 从  $945 \pm 40$  下降为  $649 \pm 35$  ( $P < 0.05$ )。结论: Tiam-1 反义基因下调 PG 细胞中侵袭诱导基因 mRNA 表达及其介导的信号传递蛋白 Rho 的表达, 从而遏制其侵袭和转移能力。

**[关键词]** 反义寡核苷酸; Tiam-1 基因; Rho 蛋白; 转移

**[中图分类号]** R730.5 **[文献标识码]** A

## Effect of Tiam-1 Antisense Oligodeoxynucleotides (ASODNS) on Antimetastasis of Tumor

Li Zhao-zhong, ZHANG Ling, MAO Hai-ting, WANG Yun, LI Deng-hua, CUI Shu-ling (Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China)

**[Abstract]** **Objective:** Tiam-1 antisense gene was used to downregulate Tiam-1 mRNA and protein expression, thus tumor metastasis could be suppressed. **Methods:** In this study Tiam-1 mRNA was examined by RT-PCR. The expression of Rho protein was examined by flow cytometry. Basement membrane was used to examine the effect of Tiam-1 antisense gene on metastatic behavior of PG cells. **Results:** The relative expression level of Tiam-1 mRNA was reduced after exposure to Tiam-1 ASODNS-Lf. Only 72 hours of exposure to Tiam-1 ASODNS, cell metastasis of treated group was inhibited significantly. The invasive cell numbers through matrigel reduced from  $945 \pm 40$  to  $649 \pm 35$  ( $P < 0.05$ ). Tiam-1 ASODNS-Lf significantly inhibited Rho protein expression ratio from 27.86% to 16.86% ( $P < 0.001$ ), which related to signal transduction pathway. **Conclusions:** Antisense gene inhibits invasion and metastasis of tumor cells through a cascade reaction of gene-protein-cell effect and provides the theoretical and experimental bases for clinical therapy and study of antimetastasis.

**[Key words]** antisenes oligodeoxyribonucleotides; Tiam-1 gene; Rho protein; metastasis

\* 大量研究表明, 肿瘤转移的核心问题是与之相关基因的改变。转移抑制基因如 nm23, MHC 的低表达和转移诱导基因如 Tiam-1 的高表达都能诱导肿瘤细胞的增殖及转移<sup>[1-2]</sup>, 并支配肿瘤细胞恶性表型和转移力的形成。Tiam-1 基因(T lymphoma invasion and metastasis)是从鼠 T 淋巴瘤中克隆出来的基因, 命名为 T 淋巴瘤侵袭诱导基因, 其在人类多种肿瘤细胞系中均有表达。Tiam-1 表达蛋白具有 GDP-GTP 转换功能

(GEF 作用), 可活化 Rho 样 GTPases, 因此采用反义基因技术封闭和下调 Tiam-1 基因和 Rho 蛋白表达, 可能是抑制肿瘤细胞侵袭转移的重要途径。本研究采用反义核酸技术、RT-PCR 技术、流式细胞术和体外转移模

\* [基金项目] 山东省自然科学基金资助项目(Y99C06)

[作者简介] 李兆忠(1967-), 男, 山东临沂人, 硕士生, 主要从事免疫调控和抗肿瘤的研究。

[通讯作者] 张玲

型等研究方法,将 Tiam-1 反义基因经脂质体包裹,转入高表达 Tiam-1 基因的人高转移巨细胞肺腺癌 PG 细胞,从细胞-基因-蛋白 3 个水平上观察对目的基因的封闭作用,阐明反义基因下调 Tiam-1 基因表达及其对相关 Rho 信号传递的影响,遏制 PG 细胞侵袭和转移的机理,为反义基因在抗肿瘤转移的临床应用,提供理论和实验依据。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 细胞株和主要试剂

PG 细胞为人高转移巨细胞肺腺癌细胞, NIN3T3 细胞为小鼠成纤维细胞,引自北京医科大学病理系,本室常规传代培养。检测细胞黏附侵袭力主要试剂:人工基底膜( Matrigel ),购自北京医科大学细胞生物室。

#### 1.2 流式细胞术( FCS )及其试剂

FITC( 异硫氰酸荧光素 )标记的羊抗小鼠 IgG 抗体,邦定生物公司产品; Triton X-100, Merck 公司产品;小鼠抗人 Rho 单抗,晶美生物工程有限公司。

#### 1.3 逆转录 PCR( RT-PCR )及其试剂

TRI Zol Reagent, GIBCO 公司, Random Primer, 湖南银河生化工程有限公司; MLV Reverse Transcriptase, Taq DNA polymerase 为 promerger 产品;  $\beta$ -actin 引物: forward: 5' ATCATGTTTGAGA CCTTCAACA3', reverse: 5' CATCTCTTGCTCGAA GTCCA3' 扩增产物大小为 318 bp; Tiam-1 引物: forward: 5' AAGACGTA CT CAGGCCAT-CTCC3' reverse: 5' GACCCAAATGTCGCAGCAG3' 扩增产物大小为 253 bp, 由上海生工生物工程公司合成。

#### 1.4 反义寡核苷酸合成

Tiam-1 反义寡核苷酸序列互补于 DH 区, Tiam-1 反义寡核苷酸( antisenes oligodeoxyribonucleotides, ASODNS )序列为: 5'-TCCAGGAGCTCGCAGATC3'; Tiam-1 正义寡核苷酸( senses oligodeoxyribonucleotides, SODNS )序列为: 5'-GATCTGCGAGCTCCTGGA3' 由上海生工生物工程公司合成, 并进行硫代化修饰。采用 Lipofectamine 介导法, 将 Tiam-1 正、反义寡核苷酸与脂质体( Lipofectin, Lf GIBCOBRL 公司)形成复合物( Tiam-1 A/SODNS-Lf )。

#### 1.5 逆转录 PCR( RT-PCR )检测 Tiam-1A/SODNS-Lf 处理后 PG 细胞中 Tiam-1 mRNA 表达水平的变化<sup>[3]</sup>

取对数生长期的 PG 细胞, 调细胞浓度为  $5 \times 10^4$  / ml。接种培养瓶(  $> 10^6$  ), 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵育过夜后, 加入 Tiam-1 A/SODNS-Lf, 分组为①对照组( 不加 Tiam-1 A/SODNS-Lf ), ②Tiam-1 SODNS-Lf( 1  $\mu$ mol/L )对照组, ③Tiam-1 ASODNS-Lf( 1  $\mu$ mol/L )组, 培养 5 h 后, 弃去培养液, 重新加入不含 Tiam-1 A/SODNS-Lf 的新鲜

培养液继续培养 72 h。收集上述各组 PG 细胞, 采用 TRIzol Reagent 提取总 RNA, RNA 定量后进行 RT-PCR, 逆转录反应体系总体积为 20  $\mu$ l, PCR 扩增, 循环参数, 变性 95℃ 5 min, 退火 55℃ 1 min, 延伸 72℃ 1 min, 扩增 26 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物进行 DNA 凝胶电泳, 紫外分析仪下观察结果并拍照。

#### 1.6 PCR 产物定量

Gel Dos 1000 凝胶图像分析仪扫描底片各条带, 以  $\beta$ -actin 基因作为内参照, 测定各基因 mRNA 的相对表达量。

#### 1.7 流式细胞术检测 Tiam-1A/SODNS-Lf 对 PG 细胞 Rho 蛋白表达水平的影响

参考文献[ 4 ]分别收集上述处理 72 h 各组和对照组细胞(  $> 10^6$  ), 采用间接免疫荧光标记法, 流式细胞仪( Calibur, BD 公司)检测。

#### 1.8 趋化因子制备及侵袭实验

采用 NIH3T3 细胞株参照文献[ 5 ]制备趋化因子。侵袭实验参照文献[ 6 ]略改进, 取双层 48 孔培养分析装置, 下层底板各孔中加入上述趋化因子, 上层无底板与下层间放醋酸纤维素膜并铺 Matrigel。收集 72 h 处理各组和对照组 PG 细胞  $3 \times 10^5$ , 加入醋酸纤维素膜上已铺有 Matrigel 的孔内, 置 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养 6 h 后取出醋酸纤维素膜, 擦去膜上未穿过的细胞, 将膜置甲醇中固定 30 min 后氨基黑染色, 透明液透明, 光镜下计数穿膜细胞数。

#### 1.9 统计学处理

采用 *t* 检验及  $X^2$  检验等对数据进行单变量分析。

## 2 结 果

### 2.1 Tiam-1 基因 RT-PCR 扩增片段电泳结果

图 1 Tiam-1 基因的 RT-PCR 扩增片段电泳结果  
Fig. 1 DNA electrophoresis analysis of Tiam-1 mRNA expression of control and treated PG cells

1: Masker; 2: Tiam-1ASODNS-Lf;  
3: Tiam-1SODNS-Lf; 4: Control

如图 1 所示,对照组和 Tiam-1SODNS-Lf 对照组可见 318 bp 的  $\beta$ -actin 基因片段和 253 bp Tiam-1 基因片段, Tiam-1 ASODNS-Lf 组与上述两对照组相比, Tiam-1 基因表达降低, 相对定量值从对照组和 Tiam-1SODNS-Lf 对照组的 0.86, 0.81 明显降低至 0.38。

## 2.2 流式细胞术检测 Tiam-1 A/SODNS-Lf 对 PG 细胞 Rho 蛋白表达水平的影响

Tiam-1 A/SODNS-Lf 处理组 Rho 蛋白表达明显受到抑制, 表达率从对照组和 Tiam-1 ASODNS-Lf 对照组的 27.96% 和 30.71% 降至 16.86% ( $P < 0.001$ )。

## 2.3 侵袭实验结果

Tiam-1 A/SODNS-Lf 作用 PG 细胞 72 h 后, 处理组与对照组相比, 细胞转移力受到明显的抑制, 其穿越人工基底膜进入醋酸纤维膜的细胞个数, 从对照组和 Tiam-1 A/SODNS-Lf 对照组的  $945 \pm 40$  和  $875 \pm 30$ , 减少为  $649 \pm 35$  ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

人 Tiam-1 蛋白具有 1 591 个氨基酸, 是 Ras 超家族的分裂刺激因子, 具有 DH 和 PH 功能区, 能调节 Ras 超家族 Rho 样小 GTPases 的活性。Rho 样小 GTPases 能够通过调节细胞骨架结构而参与细胞运动。在多种肿瘤组织或肿瘤细胞中, Tiam-1 基因呈高表达。Tiam-1 表达的蛋白质富含丝氨酸, 因而具有许多潜在的磷酸化位点, 蛋白激酶 C (PKC) 在 Tiam-1 的磷酸化过程中起重要作用<sup>[7-9]</sup>, 其产物能够通过活化 Rho 样蛋白酶, 诱导肌动蛋白弹性纤维的高度聚集, 从而产生片足 (Lamellipodia), 诱导肿瘤细胞侵袭转移<sup>[10]</sup>。本研究针对肿瘤细胞侵袭转移的关键基因 Tiam-1, 采用反义核酸技术合成 Tiam-1 反义寡核苷酸, 硫代化修饰后, 与脂质体形成复合物 Tiam-1 ASODNS-Lf, 转导入人高转移巨细胞肺癌细胞系 PG 细胞, 发现反义 Tiam-1 转导后, PG 细胞内 Tiam-1 mRNA 水平显著降低, 相对表达值从 0.86 降至 0.38, 表明 Tiam-1 基因受到封闭。体外侵袭模型实验结果表明, 反义 Tiam-1 基因能够降低 PG 细胞的侵袭力, 其穿透人工基底膜的能力降低, 其穿越进入醋酸纤维素膜的细胞数从  $945 \pm 40$  减少为  $649 \pm 35$ 。其反义基因能明显地降低 Tiam-1 介导的信号传导通路中 Rho 蛋白的表达, 其表达率从 37.11% 下降到 15.73%, 表明反义 Tiam-1 可能调节 Rho 蛋白的表达并进而影响其活性, 这一点与

Habets 等报道的反义基因调节 Rho 的活性相一致<sup>[1]</sup>。反义基因 Tiam-1 调节信号传导通路有关蛋白的详细机制, 还有待于进一步研究。本研究从基因-蛋白-细胞效应三个水平上阐明了反义基因通过封闭、抑制肿瘤细胞内 Tiam-1 基因表达和 Rho 蛋白表达, 切断可能的信号传导通路, 下调肿瘤细胞的侵袭力, 抑制肿瘤细胞的侵袭转移, 为肿瘤的抗转移治疗提供了新的理论和实验依据。

## [参考文献]

- [1] Habets GG, Scholtes EH, Zuydgeest D, *et al.* Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho like proteins [J]. *Cell*, 1994, 77: 537-549.
- [2] Habets GG, Van der Kammen RA, Stam JC, *et al.* Sequence of the human invasion-inducing Tiam-1 gene, its conservation in evolution and its expression in tumor cell lines of different tissue origin [J]. *Oncogene*. 1995, 10(7): 1371-1376.
- [3] J 萨姆布鲁克, EF 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南 [M]. 金东雁, 黎孟枫译, 北京: 科学出版社, 1993: 304-313; 679-684.
- [4] 左连富. 流式细胞术样品制备技术 [M]. 北京: 华夏出版社, 1991, 81-98.
- [5] Junger WG, Cardoza TA, Liu FC, *et al.* Improved rapid photometric assay for quantitative measurement of PMN migration [J]. *J Immunol Methods*, 1993, 160: 73-79.
- [6] 章崇杰, 魏大鹏, 赵宗蓉, 等. 促炎刺激物对淋巴细胞黏附和穿透内皮细胞的影响 [J]. *上海免疫学杂志*, 1995, 17(2): 95-97.
- [7] Ian N, Cassondra M, John G, *et al.* Lysophosphatidic acid induces threonine phosphorylation of Tiam-1 in swiss 3T3 fibroblasts via activation of protein kinase C [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272 (52): 33105-33110.
- [8] Fleming IN, Elliott CM, Exton JH, *et al.* Phospholipase C-gamma, Protein kinase C and  $Ca^{++}$ /calmodulin independent protein kinase II are involved in platelet induced growth factor induced phosphorylation of Tiam-1 [J]. *FEBS Lett*, 1998, 429(3): 229-233.
- [9] Fleming IN, Elliott CM, Exton JH, *et al.*  $Ca^{++}$ /calmodulin dependent Protein Kinase II regulates tiam1 by reversible protein phosphorylation [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(18): 12753-12758.
- [10] Michiels F, Collard JG. Rho-like GTP ases: Their role in cell adhesion and invasion [J]. *Biochem Soc Symp*, 1999, 65: 125-146.

[收稿日期] 2002-06-19

[修回日期] 2002-08-15