

[文章编号] 1007-385X(2004)03-0204-04

重组人 NDRG2 蛋白对肿瘤细胞抑制作用研究

张 翊¹, 陈 杰¹, 裴德宁¹, 饶春明¹, 药立波², 王军志¹(1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050; 2. 中国人民解放军第四军医大学, 西安 710038)

[摘 要] **目的:** 考察原核表达的重组人 NDRG2 蛋白对肿瘤细胞的作用。**方法:** 通过设置不同浓度的蛋白剂量并设置对照组, 采用细胞 MTT 比色法和细胞计数检测 NDRG2 蛋白对 7901、HHCC 细胞的抑制效果, 流式细胞仪检测细胞周期的变化, 体内实验采用裸鼠抑瘤试验。**结果:** 重组人 NDRG2 对肿瘤细胞生长有较强的抑制作用, 约 50 μg/ml 浓度时对肿瘤细胞生长的抑制作用明显, 流式细胞术结果显示肿瘤细胞 G1 期变化, 体外能抑制裸鼠肿瘤的生成。**结论:** 重组人 NDRG2 蛋白在体内体外具有一定的抑制肿瘤细胞生长作用, 在肿瘤治疗方面将具有一定的意义。

[关键词] NDRG2; HHCC 细胞; 7901 细胞; 肿瘤抑制

[中图分类号] R730.5 [文献标识码] A

Antitumor Effect of Recombinant NDRG2 Protein on Tumor Cells

ZHANG Yi¹, CHEN Jie¹, PEI De-ning¹, RAO Chun-ming¹, YAO Li-bo², WANG Jun-zhi¹(1. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050; 2. The Fourth Military Medical University, Xi'an 710038)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of prokaryotically expressed recombinant human NDRG2 on tumor cell lines. **Methods:** Recombinant human NDRG2's inhibitory effects on cell lines 7901 and HHCC at a range of protein concentrations were measured by MTT colorimetric assay and cell counting against control groups. In the present study, the cell cycle changes were assessed by flow cytometry, and *in vivo* tumor inhibition study was performed on nude mice. **Results:** Recombinant human NDRG2 exerted strong inhibitory effects on tumor cell growth, and started to significantly suppress tumor cell growth at the concentration of about 50 μg/ml. Flow cytometry analysis indicated that such inhibition triggered changes to the G1 phase in the tumor cell cycle. In addition, the growth of the tumor xenografts in nude mice was significantly suppressed in the *in vivo* study. **Conclusion:** Recombinant human NDRG2 exhibits certain inhibitory effects on tumor cell growth both *in vivo* and *in vivo*, which presents an interesting finding that will offers us insight into the cancer treatment.

[Key words] NDRG2; HHCC cell line; 7901 cell line; tumor growth inhibition

* 癌症是原癌基因的激活及/或抑癌基因的缺失或灭活的产物。抑癌基因应符合 3 个基本条件:(1)该基因在恶性肿瘤的相应正常组织中必须正常表达;(2)在恶性肿瘤中该基因出现功能失活或结构改变或表达缺陷;(3)将该基因的野生型导入该基因异常的肿瘤细胞内,可部分或全部改变其恶性表型。人的 N-myc 下游调节基因(human N-myc downstream regulated gene)分为以下几个亚型,即:NDRG₁, NDRG₂, NDRG₃, NDRG₄, NDRG-like 和脑发育相关分子(bdrm),它们具有较高的同源性,但表达水平在组织发育阶段和分布上差异

明显,具体功能还不清楚^[1-2]。

ndrg2 基因为我国第四军医大学首次发现,已被 GenBank 收录,登陆号为 AFI59092^[3-4],经原位杂交实验证实,ndrg2 mRNA 在正常脑组织内广泛表达,在正常脑和肺组织中的表达水平分别显著高于胶质瘤和肺癌组织^[5],在胃与胃癌组织中的表达无显著差异^[6]。

[作者简介] 张 翊(1969-), 男, 上海人, 在职博士研究生, 副研究员, 主要从事基因组和基因工程药物研究
E-mail: zhangyi@nicpbp.org.cn

[通信作者] 药立波, E-mail: bioyao@fmmu.edu.cn

尽管目前的研究已经认为它可能和肿瘤的发生相关,并将它列为抑癌候选基因^[3],但上述研究只是针对离体细胞系进行的,迄今为止并没有关于 NDRG2 蛋白抑制动物体或人体中肿瘤细胞生长和肿瘤形成的报道。本研究使用基因工程方法,大量表达 NDRG2 所编码的蛋白,通过流式细胞术、裸鼠致瘤抑制等动物试验证实了 NDRG2 对肿瘤细胞的生长以及对裸鼠的肿瘤形成具有显著的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料来源

不含血清的 1640 培养基采用 GIBCO 公司产品,新生牛血清购自杭州四季青公司, cycletest plus DNA reagent kit 购自 BD 公司、酶标仪(MD 公司)、流式细胞仪(BD 公司)、裸鼠。重组人 NDRG2 蛋白,由本室构建表达,经过检验,纯度大于 95%,分子量、等电点、N 端氨基酸序列等指标与理论值相符。HHCC 细胞、7901 细胞由第四军医大学药立波教授惠赠。

1.2 血清浓度依赖性实验

将 10% 血清的 1640 培养基用不含血清的 1640 培养基稀释成血清浓度分别为 10%、5%、2.5%、1.25% 等共 10 个浓度,加入 96 孔板,复孔每孔 100 μ l,复孔加入 HHCC 细胞 100 μ l,浓度为 7×10^4 /ml,37 $^{\circ}$ C 培养 72 h。取出后于 37 $^{\circ}$ C MTT 染色 4 h,DMSO 裂解,酶标测定。另对相同浓度的 7901 细胞同法考察。

1.3 NDRG2 对肿瘤细胞的抑制性实验

取 1% 血清的 1640 培养基分别稀释 HHCC 细胞、7901 细胞为 7×10^4 /ml,分别加入 96 孔板 1~12 孔,复孔每孔 100 μ l,培养至细胞贴壁。用 1% 血清的 1640 培养基与 NDRG2 蛋白(2 mg/ml)以 5:1 混合,100 μ l 复孔加入 96 孔板的第 1 孔,对倍稀释至 8~12 孔,同时以缓冲液 Tris(pH8.5)、变性 NDRG2 蛋白(Tris 缓冲液混匀)做对照。培养 72 h。细胞检测方法同 1.2。

1.4 流式细胞术考察 NDRG2 的对 7901 和 HHCC 细胞周期的影响

取 7901 细胞和 HHCC 细胞各 60×10^4 共 5 ml 加入培养瓶,共 3 瓶,分别加入 NDRG2 Pr 各 300 μ l,另一瓶加入空白缓冲液 300 μ l,在 36 h 取出,依照 cycletest plus DNA reagent kit 操作说明,测定细胞周期。

1.5 裸鼠致瘤抑制实验

取 HHCC 细胞消化,用 P. B. S.(含 1% 血清)稀释成 6×10^6 /ml,共 6 ml。取 1.5 ml 加蛋白原液 1 ml,得 2.5 ml 为高剂量组。取 1.5 ml 加蛋白原液 0.125 ml,加 0.875 ml P. B. S. 得 2.5 ml 为低剂量组。取 1.5 ml 加 1 ml P. B. S. 得 2.5 ml 为阴性组。取 1.5 ml 加环磷

酰胺溶液 1 ml 得 2.5 ml 为阳性组(环磷酰胺加 P. B. S. 制成 21 mg/ml)。取 24 只裸鼠,分成 4 组,每组 6 只,分别注射 0.3 ml,观察 4 周。

2 结果

2.1 细胞血清依赖试验

本实验结果(如图 1)可见,7901、HHCC 细胞血清依赖性实验中血清浓度降为 1% 左右时细胞生长开始受到明显影响,证实细胞在血清浓度为 1% 的 1640 培养基中生长时对外界刺激敏感,是我们进行功能研究实验选择的血清浓度。

图 1 HHCC 和 7901 细胞血清依赖性实验

Fig. 1 Results of serum-dependence tests of HHCC and 7901 cells

A: HHCC cells; B: 7901 cells

2.2 NDRG2 对肿瘤细胞的抑制作用结果

从图 2 结果可见,经过对比试验排除了缓冲液及杂质干扰后证实 NDRG2 对 7901 和 HHCC 细胞均有明显抑制作用。抑制任用大小与 NDRG2 的浓度成正的量效关系。从图 3 细胞计数实验结果可见,从 12~24 h 开始,实验组的 HHCC 和 7901 细胞生长速度较对照组明显减慢,细胞生长受到明显抑制。

2.3 NDRG2 对 7901 和 HHCC 细胞周期的影响

由(图4)结果可见,NDRG2 对 7901 细胞影响表现在 G1 期延长。而 NDRG2 对 HHCC 细胞影响表现在 G1,G2 期缩短。这说明尽管 NDRG2 对 7901 和 HHCC 细胞都表现出抑制作用,但作用于细胞周期的不同阶段,对 7901 细胞是阻滞在 G1 期而对 HHCC 细胞是阻滞在 S 期。

用,与空白对照组比较有显著性差异,低剂量组与空白组相比没有显著性差异,表明 NDRG2 抑瘤作用具有剂量依赖性(见表 1)。

图 2 NDRG2 对 7901 和 HHCC 细胞的抑制作用

Fig.2 The inhibited effects of NDRG2 on 7901 cells and HHCC cells

A: 7901 cells; B: HHCC cells

a: 7901 cells; b: HHCC cells; c: Samples

图 4 流式细胞术检测 NDRG2 对 7901 细胞周期的影响

Fig.4 Effects of NDRG2 on cell cycle of 7901 cells by flow cytometry

图 5 流式细胞术检测 NDRG2 对 HHCC 细胞周期的影响

Fig.5 Effects of NDRG2 on cell cycle of HHCC cells by flow cytometry

图 3 NDRG2 蛋白对细胞生长速度的影响
Fig. 3 Effects of NDRG2 on therate of 7901 and HHCC cell growth

2.4 裸鼠致瘤抑制实验结果

结果表明,NDRG2 高剂量组有明显的肿瘤抑制作

3 讨 论

血清依赖性实验是本部分中所有细胞实验和动物实验的基础,通过它摸清了对 7901 及 HHCC 细胞敏感的血清浓度,同时确定了适合测定的合适的细胞浓度,这为下面的肿瘤抑制实验中选择合适的测定用细胞浓度、测定时间及血清浓度提供了数据支持。

细胞增殖是通过细胞周期实现的。细胞周期 G1 期是细胞质复制的主要阶段,蛋白质、RNA 及多聚核蛋白体都在此期合成。本研究发现,NDRG2 能抑制肝癌细胞 HHCC 的增殖,加入 NDRG2 表现在 G1 和 G2 期缩短、S 期延长,HHCC 细胞停留在 S 期。对于 7901 细胞,加入 NDRG2 后,G1 期明显延长、S 期缩短,说明

细胞分裂阻滞在 G1 期,这与有关文献报道也是相吻合的^[6]。

表 1 NDRG2 蛋白对裸鼠肿瘤生成的作用效果
Tab. 1 The effects of NDRG2 proteins on tumor formation of nude mice

Groups	Dose(mg/kg)	Number of mice	Weight of tumor(g)
Blank	P. B. S	6	0.2628 ± 0.0556
Cyclophosphamide	2.5	6	0.0292 ± 0.0424 ***
Higher dosage	24	6	0.0134 ± 0.0235 ***
Lower dosage	3	6	0.1785 ± 0.0999 *

* $P > 0.05$; * * * $P < 0.01$ compared with blank group

通过设定空白对照、变性蛋白对照,可以排除由于溶液杂质、小分子蛋白或氨基酸等造成的细胞活性假象,同时也证实变性后的蛋白不再具有细胞活性;说明蛋白质的结构对于其肿瘤抑制作用是必需的,从理论上分析,细胞表面分子应存在 NDRG2 蛋白受体或信号传导分子的可能性,我们也做了蛋白分子的荧光标记进行蛋白质定位,由于灵敏度关系,未能得到肯定的答案,有待于进一步实验证实。

[参 考 文 献]

- [1] 张文红, 刘新平, 王吉村, 等. 兔抗人 NDR2 高效价抗血清的制备、纯化及鉴定[J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(8): 716-719.
- [2] Kalaydjieva L, Gresham D, Gooding R, *et al.* N-myc downstream-regulated gene 1 is mutated in hereditary motor and sensory neu-

ropathy-Lom[J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 67(1): 47-58.

- [3] 邓艳春, 药立波, 刘新平, 等. 一种含有 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.
- [4] Qu X, Zhai Y, Wei H, *et al.* Characterization and expression of three novel differentiation-related genes belong to the human NDRG gene family[J]. *Mol Cell Biochem*, 2002, 229(1-2): 35-44.
- [5] 李 剑, 刘新平, 林树新, 等. 一种新的抑癌候选基因-NDR2 在人类正常组织及相应肿瘤中的表达[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2002, 29(2): 223-227.
- [6] 刘新平, 邓艳春, 韩 炯, 等. NDRG2 基因表达对胃癌细胞增殖调控及其机理的研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2003, 30(1): 116-121.

[收稿日期] 2004 - 03 - 29

[收稿日期] 2004 - 06 - 04

《 临 床 肿 瘤 学 杂 志 》 征 订 启 事

《 临床肿瘤学杂志 》 为国家新闻出版总署和解放军总政治部批准创办的国家级专业学术刊物, 属中国生物医学核心期刊和中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊, 并同时被多家专刊为网站收录。本刊侧重于肿瘤临床, 并结合基础研究, 以肿瘤专业工作者及其他医药卫生人员为主要对象。重点刊登肿瘤防治新成果、新进展和新经验, 具有内容丰富、资料新颖、编辑规范等, 已逐步实现了编辑手段和期刊载体的现代化, 纸质媒体、光盘版及网络版同步发展。国内标准刊号: CN32 - 1577/R, 国际标准刊号: ISSN1009 - 0460。本刊为十六开、双月刊, 每期 112 页、激光照排胶印, 进口铜板纸, 国内外公开发售, 邮发代号 28 - 267。定价每期 10.00 元(包括邮资费), 全年 60.00 元。2005 年将以更丰富的内容和崭新的面貌与读者见面。欢迎投稿和订购。读者可从全国各地邮局订购, 漏订者直接汇款到南京市杨公井 34 标 34 号《 临床肿瘤学杂志 》 编辑部补订。邮编: 210002, 电话: 025 - 84400143