

# nm23-H1 基因逆转人高转移大细胞肺癌细胞 L9981 转移表型的分子机制

车国卫, 周清华, 朱文, 王艳萍, 覃杨,  
刘伦旭, 陈晓禾, 孙艺琳, 孙泽芳

## Molecular Mechanism of Reversing Metastatic Phenotype in Human High-metastatic Large Cell Lung Cancer Cell Line L9981 by nm23-H1

CHE Guo-Wei, ZHOU Qing-Hua, ZHU Wen, WANG Yan-Ping, QIN Yang,  
LIU Lun-Xu, CHEN Xiao-He, SUN Yi-Lin, SUN Ze-Fang

四川大学华西医院  
四川省肺癌分子重点实验室,  
四川 成都 610041

*Sichuan Provincial Key Laboratory  
of Lung Cancer Molecular Biology,  
West China Hospital,  
Sichuan University,  
Chengdu, Sichuan, 610041,  
P.R.China.*

通讯作者:周清华

Correspondence to:ZHOU Qing-Hua  
Tel:86-28-85422584  
Fax:86-28-85560777  
E-mail:zhouqh@mail.sc.cninfo  
.net

基金项目: 国家自然科学基金项目  
(No.30430300,30070333); 高等  
学校博士点专项科研基金项目  
(No.20040610060)

**Grants:** National Natural Science  
Foundation of China  
(No.30430300, No.30070333);  
Research Fund for Doctoral  
Program of Higher Education of  
China (No.20040610060)

收稿日期:2004-06-14  
修回日期:2004-08-30

[ABSTRACT] **BACKGROUND & OBJECTIVE:** nm23-H1, a tumor metastasis suppressive gene, can reverse tumor metastasis phenotype. But the molecular mechanism of nm23-H1 in inhibiting or reversing metastasis of lung cancer is unclear. This study was to explore the molecular mechanism of nm23-H1 in reversing metastasis phenotype of lung cancer. **METHODS:** nm23-H1 gene and pLXSN were separately transfected into human lung cancer cell line L9981. Proliferation of L9981, L9981-pLXSN, and L9981-nm23-H1 cells was detected by MTT assay, cell invasive ability was detected by modified Boyden chamber. Tumorigenesis and experimental lung metastasis were determined *in vivo*. mRNA and protein levels of  $\beta$ -catenin, E-Cadherin, CD44S, CD44V6, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and vascular endothelial growth factor (VEGF) were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot. **RESULTS:** (1) Cell proliferation, clone formation, and invasive ability were significantly lower in L9981-nm23-H1 cells than in L9981 cells [(19.5±2.9)% vs. 100%, 10.3±0.7 vs. 21.7±1.3, 31.0±3.0 vs. 151.0±6.3,  $P<0.01$ ]. (2) The inhibitory rate of tumorigenesis of nude mice was significantly higher in L8891-nm23-H1 group than in L9981 group (85.6% vs. 0%,  $P<0.001$ ); the lung metastatic rate was significantly lower in L9981-nm23-H1 group than in L9981 group (0% vs. 100%,  $P<0.001$ ). (3) nm23-H1 up-regulated mRNA and protein levels of  $\beta$ -catenin, E-Cadherin, and TIMP-1, and down-regulated levels of MMP-2, CD44V6, and VEGF ( $P<0.01$ ). (4) nm23-H1 up-regulated mRNA level of CD44s, protein level of CD44s didn't change ( $P>0.05$ ). **CONCLUSION:** nm23-H1 gene can reverse malignant and metastatic phenotype of L9981 cells through regulating the expressions of lung cancer metastasis-related genes.

**KEYWORDS:** nm23-H1 gene; Metastatic phenotype; Metastasis-related genes; Lung neoplasms

【摘要】背景与目的: nm23-H1 基因已被证明是转移抑制基因, 转染野生型 nm23-H1 基因可以逆转肿瘤的恶性转移表型, 但是 nm23-H1 基因抑制或逆转肺癌转移的分子机制却知之甚少, 我们在建立转 nm23-H1 基因的人高转移大细胞肺癌细胞株 L9981-nm23-H1 的基础上, 进一步探讨 nm23-H1 基因抑制肺癌转移的分子机制。方法: 应用 MTT 法和改良的 Boyden 小室法分析转基因前后细胞的体外增殖能力及体外侵袭力的变化, 体内实验分析转基因前后细胞在裸鼠体内的成瘤性及肺转移能力的改变, 同时应用 RT-PCR 和 Western blot 分别检测各组细胞中转

移相关基因  $\beta$ -catenin、E-Cadherin、CD44S、CD44V6、MMP-2、TIMP-1、VEGF、基因 mRNA 及蛋白表达水平。结果:(1)转基因细胞株 L9981-nm23-H1 的体外增殖能力[(0% vs. (19.5±2.9)%]、克隆形成能力(10.3±0.7 vs. 21.7±1.3)及侵袭力显著低于 L9981 细胞(31.0±3.0 vs. 151.0±6.3)( $P<0.01$ );(2)nm23-H1 基因在裸鼠体内的抑瘤率显著增高(82.6% vs. 0%),且转染 nm23-H1 基因的 L9981 细胞裸鼠体内移植瘤肺转移显著降低(0% vs. 100%)( $P<0.01$ );(3)nm23-H1 基因能够上调  $\beta$ -catenin、E-Cadherin、TIMP-1 基因 mRNA 及蛋白表达,下调 VEGF、CD44V6 和 MMP-2 基因 mRNA 及蛋白表达( $P<0.01$ );(4)nm23-H1 表达上调 CD44S 基因 mRNA 表达( $P<0.01$ ),而对其蛋白表达无影响( $P>0.05$ )。结论 nm23-H1 基因对肺癌侵袭转移的抑制或逆转作用可能是通过对肺癌转移相关基因的调控实现的。

关键词: nm23-H1 基因; 转移表型; 肿瘤转移相关基因; 肺肿瘤

中图分类号: R73-37 文献标识码: A

文章编号: 1000-467X(2005)03-0278-07

nm23-H1 基因已被证明是肿瘤转移抑制基因,它的结构和功能的异常与肺癌侵袭转移密切相关,我们以前的研究发现, nm23-H1 基因在肺癌组织中以杂合性缺失为主, nm23-H1 基因的低表达和杂合性缺失与肺癌的高转移性和预后不良有密切关系,伴有 nm23-H1 基因缺失的肺癌组织常伴有一些肿瘤侵袭相关分子的表达异常<sup>[1]</sup>。据此,我们推测 nm23-H1 基因可能为肺癌转移相关基因的上游调节基因,它对肿瘤转移潜能的抑制作用可能是通过调控下游转移相关基因实现的,通过转染野生型 nm23-H1 基因有可能逆转肺癌的转移表型。但

nm23-H1 基因抑制肺癌侵袭与转移的分子机制仍不清楚。因此,本研究在前期成功筛选 nm23-H1 基因杂合性缺失人肺癌高转移细胞株 L9981 和建立转基因细胞株 L9981-nm23-H1 的基础上<sup>[2]</sup>,检测了 nm23-H1 基因缺失细胞株 L9981 转染 nm23-H1 基因前后细胞生物学特性及肿瘤转移相关基因 mRNA 与蛋白表达水平的变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株和动物 L9981 细胞株为人肺高转移大细胞肺癌细胞株(四川大学华西医院四川省肺癌分子重点实验室保存),实验动物选用 BALB/CA nu/nu 裸小鼠,均为雄性,由四川大学实验动物中心提供(动物合格证号:045),鼠龄 6~8 周,体重 20~25 g,无特殊病原体环境饲养。

1.1.2 主要试剂和仪器 RNA 抽提试剂盒及 RT-PCR 一步法试剂盒,常用 TaqDNA 聚合酶均购自大连 TAKARA 公司。图像扫描仪(英国,PE 公司)。丙烯酰胺和聚丙烯酰胺和 nm23-H1、C-myc、 $\beta$ -catenin、VEGF、CD44S、CD44V6、E-Cadherin、MMP-2 和 TIMP-1 基因抗体均购自美国 Sigma 公司。蛋白酶抑制剂(Protease inhibitor cocktail tablets)购自 Roche USA。PVDF 膜购自美国 Millipore 公司。BCA 微量蛋白质定量试剂盒及 Supersignal West PicoW 化学发光试剂盒 Pierce 公司。

1.1.3 引物 本实验所用引物均在北京赛百盛基因公司合成。见表 1

表 1 nm23-H1 基因及肺癌转移相关基因引物

Table 1 Primers of nm23-H1 and metastasis-related genes

Gene	Primer	Product length (bp)
$\beta$ -catenin	S, 5'-TTCTAGCTCATCATACTGGC-3'; AS, 5'-CAGGTACTCTGAATGTAATC-3'	300
VEGF	S, 5'-TCTACCTCCACCATGCCAAG-3'; AS, 5'-TCCTCAGTGGCACAACCTC-3'	300
CD44S	S, 5'-CCAACTCCATCTGTGCAG-3'; AS, 5'-AACCTCTGAAGTGCTGC-3'	300
MMP-2	S, 5'-AGCTGCAACCTGTTTGTG-3'; AS, 5'-CCAATGATCCTGTATGTGATC-3'	300
CD44V6	S, 5'-TTCTAGCTCATCATACTGGC-3'; AS, 5'-CAGGTACTCTGAATGTAATC-3'	300
E-Cadherin	S, 5'-CTGAAGTGACTCGTAACGAC-3'; AS, 5'-CATGTCAGCCAGCTTCTTGAAG-3'	300
TIMP-1	S, 5'-AGACATGTGATCAAGATTCC-3'; AS, 5'-CACGAGCAAAGGCATCATCC-3'	300
$\beta$ -actin	S, 5'-GACTACCTCATGAAGATC-3'; AS, 5'-GATCCACATCTGCTGGAA-3'	500

VEGF:vascular endothelial growth factor. MMP-2:matrix metalloproteinase-2. TIMP-1:tissue inhibitor of metalloproteinase-1.

## 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 各组细胞均应用 10%的国产小牛血清,RPMI-1640 培养基,培养基中含有青霉素

100 u/ml 及链霉素 100  $\mu$ g/ml,在 5% CO<sub>2</sub>、37℃培养箱内培养。细胞收集采用 0.25%胰酶消化,Hank's 液洗涤,离心。

1.2.2 体外实验 生长曲线(MTT 法),克隆形成

率(平板法),具体方法参照说明书。

1.2.3 体外侵袭力(Boyden 小室法)检测 在细胞体外迁移实验中,接种 500  $\mu\text{l}$  含  $1 \times 10^5$  细胞的 RPMI1640 培养液于上室,下室加入 750  $\mu\text{l}$  NIH-3T3 细胞的无血清(NIH3T3 细胞上清)培养基,培养 24 h 后,取下膜,行 HE 染色,并在显微镜下计数( $10 \times 20$ )。每组设置 3 个平行实验,计算每组每个样本 5 个高倍视野( $10 \times 20$ )的平均穿膜细胞数。

1.2.4 基因转染方法 nm23-H1 基因转染步骤见参考文献[2]。

1.2.5 RNA 及蛋白提取 RNA 提取采用一步法试剂盒,按说明书进行操作。蛋白提取采用细胞裂解法,以 BCA 微量蛋白质定量试剂盒进行定量。

1.2.6 RT-PCR 检测 mRNA 表达 反应体系:RNA 2  $\mu\text{g}/4 \mu\text{l}$ ,  $10 \times \text{PCR buffer}$  5  $\mu\text{l}$ , 25 mol/L  $\text{MgCl}_2$  3  $\mu\text{l}$ ,  $4 \times \text{dNTP}$  (10 mmol/L) 3  $\mu\text{l}$ , 目的基因及内参照上、下游引物各 2  $\mu\text{l}$ , *Taq* DNA 聚合酶 0.5  $\mu\text{l}$ , 加双蒸水至反应总体积为 50  $\mu\text{l}$ 。反应条件:48 $^\circ\text{C}$  逆转录反应 30 min, 95 $^\circ\text{C}$  变性 5min, 然后 94 $^\circ\text{C}$  变性 40 s, 55 $^\circ\text{C}$  退火 40 s, 72 $^\circ\text{C}$  延伸 60 s, 共 30 个循环,再 72 $^\circ\text{C}$  反应 7 min, 4 $^\circ\text{C}$  终止反应。取产物 5  $\mu\text{l}$  进行电泳。

1.2.7 Western blot 分析转移相关基因蛋白表达 将浓缩的无血清细胞总蛋白定量后进行杂交分析。应用  $\text{dH}_2\text{O}$  对抗体进行稀释, nm23-H1 抗体的稀释比例为 1:500, 其它抗体均为 1:200, 第二抗体稀释比例 1:5000。显色及拍片以 Supersignal West Pico 化学发光试剂盒说明书进行。

1.2.8 裸鼠体内成瘤性及肺癌转移分析 取对数生长期的各组细胞(L9981, L9981-pLXSN 和 L9981-nm23-H1), 细胞总数为  $1.6 \times 10^7$  个/ml。共分 3 个组, 第一组为对照组(L9981), 第二组为转染空载体组(L9981-pLXSN), 第三组为实验组(L9981-nm23-H1)。每组 7 只裸鼠, 每只小鼠前腿右腋窝皮下注射 0.2 ml 细胞悬液(细胞数为  $2 \times 10^6$  个)。每日观察小鼠的成瘤情况, 于接种后的第 60 天处死小鼠, 瘤组织称重并立即液氮中保存。成瘤性分析及计算抑瘤率, 抑瘤率 = (对照组瘤重 - 实验组瘤重) / 对照组瘤重  $\times 100\%$ 。肉眼及用膨胀压片法观察有各脏器及淋巴结, 尤其是肺部有无肿瘤结节。

1.2.9 结果分析 本实验以半定量 RT-PCR 法, 在凝胶成像分析系统 Gel Doc 2000 型分析仪上用 Bios con sort 30 分析软件把目的基因的扩增条带

与  $\beta$ -actin 条带进行比较(比值为 A 值), 比较 A 值的变化。蛋白分析也采用类似的方法, 测量蛋白表达的 A 值, 以  $\beta$ -actin 作为内对照。

### 1.3 统计学方法

实验数据为计量资料, 应用  $\chi^2$  或 *F* 检验, 用美国 SPSS10.0 统计软件, 并经计算机处理全部数据, 以  $P < 0.05$  为有显著性差异,  $P > 0.05$  为无显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 nm23-H1 基因高表达抑制肺癌细胞株 L9981 细胞增殖

转基因细胞 L9981-nm23-H1 增殖水平 [(19.5 $\pm$ 2.9)%] 显著低于 L9981-pLXSN (100%) 和 L9981 细胞 (100%) ( $P < 0.001$ ); 而 L9981-pLXSN 细胞株的细胞增殖水平与 L9981 细胞株无统计学差异 ( $P > 0.05$ ) (见图 1)。

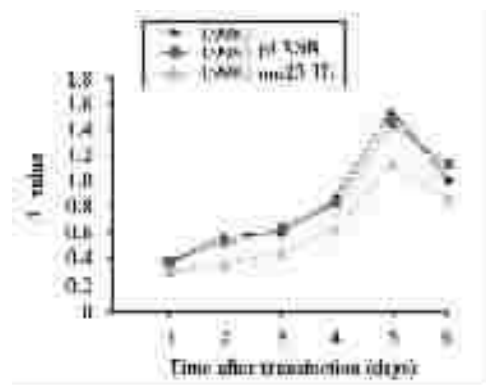


图 1 L9981, L9981-pLXSN 和 L9981-nm23H1-EGFP 细胞的生长曲线图 (MTT 法)

Figure 1 Growth curves of L9981, L9981-pLXSN, and L9981-nm23-H1 cells detected by MTT assay

### 2.2 L9981 细胞转导 nm23-H1 基因前后细胞克隆形成能力的改变

L9981-nm23-H1 细胞的克隆形成能力 ( $10.3 \pm 0.7$ ) 显著低于 L9981-pLXSN ( $20.7 \pm 1.0$ ) 和 L9981 细胞 ( $21.7 \pm 1.3$ ) ( $P < 0.001$ ); 而 L9981-pLXSN 和 L9981 细胞间无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。

### 2.3 nm23-H1 基因高表达降低 L9981 细胞体外侵袭力

L9981-nm23-H1 细胞的侵袭力 ( $31.0 \pm 3.0$  个/200 倍视野) 显著低于 L9981-pLXSN ( $142.0 \pm 3.0$  个/200 倍视野) 和 L9981 ( $151.0 \pm 6.3$  个/200 倍视野) 细

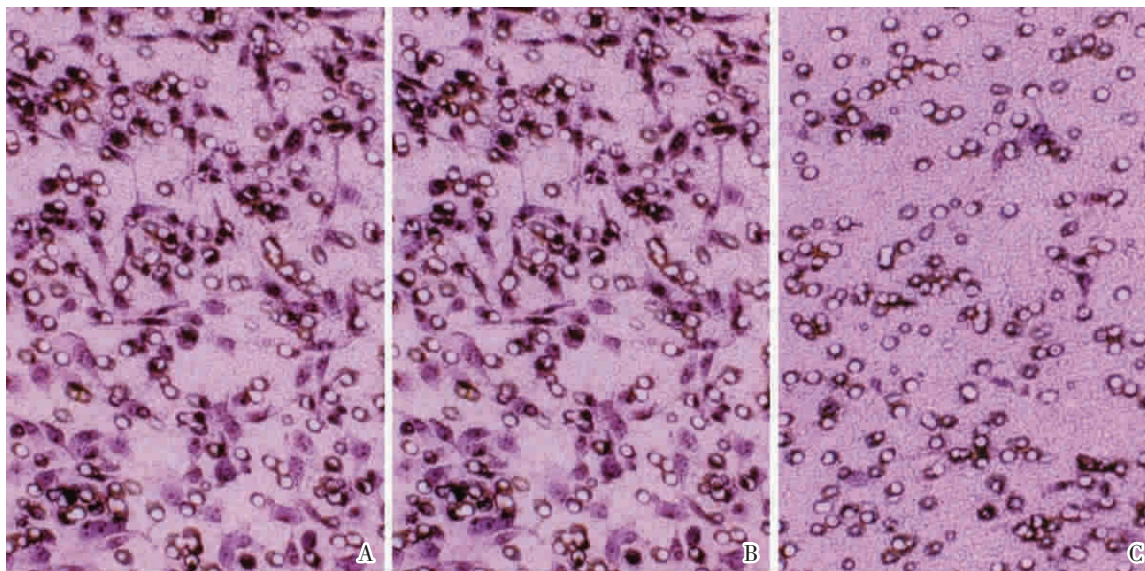


图2 L9981、L9981-pLXSN 和 L9981-nm23-H1 细胞体外侵袭力 (HE ×175)

Figure 2 Invasive abilities of L9981, L9981-pLXSN, and L9981-nm23-H1 cells detected by modified Boyden chamber methods (HE ×175)

A, L9981 cells; B, L9981-pLXSN cells; C, L9981-nm23-H1 cells.

胞 ( $P < 0.01$ ); L9981-pLXSN 与 L9981 细胞间比较无统计学差异 ( $P > 0.05$ ) (见图 2)。

#### 2.4 nm23-H1 基因转染对人肺癌细胞株 L9981 裸鼠体内成瘤性的影响

对照组与空载体组在裸鼠体内的成瘤性均为 100% 显著高于转基因组 (57.1%) ( $P < 0.05$ ); 转基因组 L9981-nm23-H1 [(0.6±0.3)g] 组瘤重显著低于未转基因组 L9981-pLXSN [(3.2±0.6)g] 和 L9981 组 [(3.8±0.1)g] ( $P < 0.01$ ); L9981-nm23-H1 细胞株抑瘤率 (82.6%) 显著高于 L9981-pLXSN (14.0%) 和 L9981 细胞株 (0%) ( $P < 0.05$ ) (见表 2)。

表 2 nm23-H1 抑制 L9981 细胞株在裸鼠体内的成瘤性  
Table 2 Suppression of tumorigenesis of L9981 cells in nude mice by nm23-H1

Group	Tumorigenesis		Weight of tumor (g, $\bar{x} \pm s$ )	Inhibitory rate (%)
	Number	Rate (%)		
L9981	7	100.0	3.8±0.1	0
L9981-pLXSN	7	100.0	3.2±0.6	14.0
L9981-nm23-H1	4	57.1	0.6±0.3	82.6
<i>P</i> value		<0.05	<0.01	<0.01

Each group contains 7 mice.

#### 2.5 nm23-H1 基因转染对人肺癌细胞株 L9981 移植瘤肺转移的影响

肉眼观察: 三个实验组共 21 只裸鼠除肺以外

其它部位均未发现结节及淋巴结肿大。采用平板法观察肺部转移灶, L9981 和 L9981-pLXSN 细胞株 7 只均有肺部转移灶, 而 L9981-nm23-H1 细胞组均没有发现转移灶。L9981-nm23-H1 细胞株肺部转移率 (0%) 显著低于 L9981-pLXSN (100%) 和 L9981 (100%) 细胞组 ( $P < 0.01$ ), L9981-pLXSN 与 L9981 细胞组间肺转移率主无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。(表 3)

表 3 nm23-H1 基因转染对裸鼠移植瘤肺转移的影响  
Table 3 Effects of nm23-H1 on lung metastasis of L9981 cells in nude mice

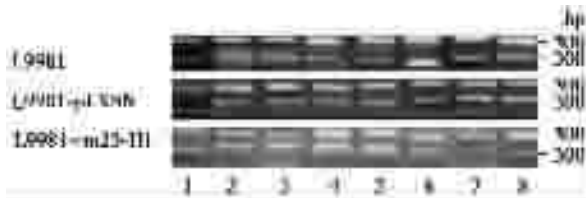
Group	Lung metastasis of transplanted tumor			
	Cases	Incidence (%)	Number of metastatic foci	
			Median	Range
L9981	7	100.0	5	0-9
L9981-pLXSN	7	100.0	4	1-7
L9981-nm23-H1	0	0	0	0
<i>P</i> value	<0.05	<0.05		

Each group contains 7 mice.

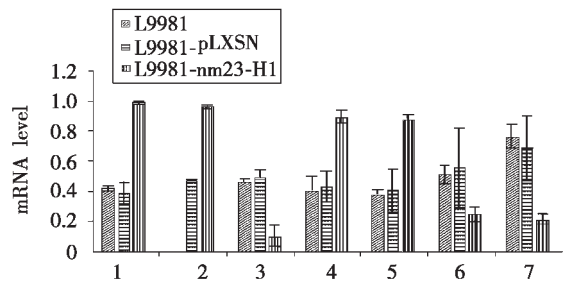
#### 2.6 L9981 细胞株转染 nm23-H1 前后肿瘤转移相关基因 mRNA 表达水平的改变

L9981-nm23-H1 细胞株  $\beta$ -catenin、E-Cadherin、TIMP-1 和 CD44S 基因表达水平均显著高于 L9981 和 L9981-pLXSN 细胞株 ( $P < 0.05$ ), 而 L9981-nm23-

H1 细胞株 VEGF、CD44V6 和 MMP-2 基因表达水平均显著低于 L9981 和 L9981-pLXSN 细胞株 ( $P < 0.05$ )。L9981 和 L9981-pLXSN 细胞之间无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。(图 3)



A



B

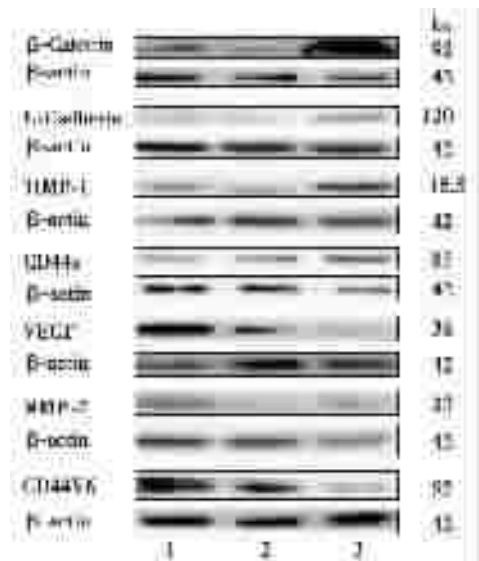
图 3 RT-PCR 检测人肺癌细胞 L9981、L9981-pLXSN 和 L9981-nm23-H1 中肿瘤转移相关基因 mRNA 表达

Figure 3 mRNA levels of metastasis-related genes in L9981, L9981-pLXSN, and L9981-nm23-H1 cells detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

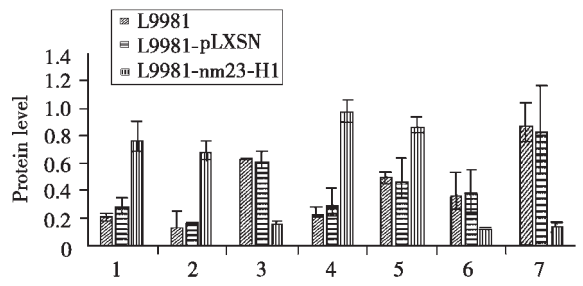
A: electrophoresis of RT-PCR products.  
Lane 1, DL2000 marker; lane 2, β-catenin; lane 3, E-Cadherin; lane 4, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1); lane 5, CD44S; lane 6, CD44V6; lane 7, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2); lane 8, vascular endothelial growth factor (VEGF).  
B: comparison of mRNA levels of metastasis-related genes among L9981, L9981-pLXSN, and L9981-nm23-H1 cells.  
1, β-catenin; 2, E-Cadherin; 3, MMP-2; 4, TIMP-1; 5, CD44S; 6, CD44V6; 7, VEGF.

### 2.7 L9981 细胞株转染 nm23-H1 基因前后肿瘤转移相关基因蛋白表达水平的改变

细胞株蛋白提取液,测定含量为 400~500 mg/L。经 SDS-PAGE 凝胶电泳和考马斯亮蓝染色后,蛋白质条带清晰,转膜后其蛋白质有 90%左右转移到膜上。L9981-nm23-H1 细胞株中 β-catenin、E-Cadherin 和 TIMP-1 基因蛋白表达水平均显著增高,而 VEGF 和 CD44V6 基因蛋白表达水平均明显降低 ( $P < 0.01$ )。CD44s 蛋白表达水平在三组间比较无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。(图 4)。



A



B

图 4 L9981、L9981-pLXSN 和 L9981-nm23-H1 细胞中肿瘤转移相关基因蛋白表达

Figure 4 Protein levels of metastasis-related genes in L9981, L9981-pLXSN, and L9981-nm23-H1 cells detected by Western blot

A: electrophoresis maps.  
Lane 1, L9981 cells; lane 2, L9981-pLXSN cells; lane 3, L9981-nm23-H1 cells.  
B: comparison of protein levels of metastasis-related genes among L9981, L9981-pLXSN, and L9981-nm23-H1 cells.  
1, β-catenin; 2, E-Cadherin; 3, MMP-2; 4, TIMP-1; 5, CD44S; 6, CD44V6; 7, VEGF.

### 3 讨论

nm23-H1 基因的低表达与多种肿瘤的高转移潜能密切相关,将 nm23-H1 cDNA 导入人黑色素瘤、乳腺癌、卵巢癌细胞株中,可以显著降低其转移能力<sup>[3-5]</sup>。我们以前的研究表明 nm23-H1 在肺癌中的缺失率为 26.67%,并且 nm23-H1 的缺失与肺癌的恶性程度和患者预后密切相关,可见在肺癌中 nm23-H1 的表达具有重要的生物学功能<sup>[6,7]</sup>。

本研究发现将 nm23-H1 cDNA 转入 nm23-H1 基因缺失的人大细胞肺癌细胞株 L9981 细胞后,转

基因细胞的体外增殖能力、克隆形成能力及体外侵袭力均显著降低,这与多数在黑色素瘤细胞株 MDA-MB-435 中的研究结果一致。然而有研究发现 nm23-H1 对乳腺癌细胞株的体外生长能力没有影响,但最近发现 nm23-H1 能够抑制肝癌细胞株体外扩增<sup>[8,9]</sup>。这些研究结果提示 nm23-H1 是一个多功能蛋白,其不同组织和细胞的表达具有不同的功能。

转染 nm23-H1 基因可以逆转肿瘤细胞的恶性转移表型,已被多种肿瘤细胞的转染实验所证实。Khan 等<sup>[10]</sup>对三种低表达 nm23-H1 基因的人口腔癌细胞株转染 nm23-H1 cDNA 后,发现癌细胞的增殖能力,迁移能力,穿越基底膜的能力均降至原来的 20%~30%; Hsu 等<sup>[11]</sup>发现 nm23-H1 基因转染能阻断 TGF- $\beta$  引起的细胞运动能力增强。Cheng 等<sup>[12]</sup>证明 nm23-H1 可以通过抑制明胶酶 A 的转录降低 MMP-2 和 MMP-9 基因的表达以抑制肿瘤转移。在本实验中观察到 nm23-H1 基因转染可以显著降低 L9981 细胞的增殖能力、克隆形成能力及体外侵袭能力,以及裸鼠体内的成瘤性及肺癌转移能力,使肺癌的恶性表型得到逆转,这些结果与高庆蕾等在卵巢癌中的研究结果一致<sup>[13]</sup>。但是 nm23-H1 基因抑制肿瘤转移的分子机制仍不清楚,最近研究发现 nm23 基因的异常导致一些肿瘤转移相关基因及细胞分子的变化, Kantor 等<sup>[14]</sup>用 nm23-H1 基因转染肿瘤细胞,结果抑制了鼠黑色素瘤细胞和人乳腺癌细胞株的恶性表型,并且降低了血清中 PDGF 和 IGF-1 表达水平。Zabrenetzky 等<sup>[15]</sup>将 nm23-H1 基因分别转入具有低转移和高转移潜能的鼠黑色素瘤细胞中,发现 TSP (Thrombospondin) 表达水平在低转移潜能细胞中明显高于高转移潜能细胞。应用基因定点突变技术研究发现 nm23 基因抑制肿瘤转移的功能与组氨酸蛋白激酶活性呈正相关<sup>[16]</sup>。Nm23 蛋白能够与亚细胞内不同的蛋白结合,并呈现不同的 NDPK 活性,从而发挥不同的功能,如在细胞浆内可与 GTP 及其交换因子,细胞膜内面的热休克蛋白、细胞骨架蛋白、以及核转录因子(menin)结合而发挥不同的生理功能<sup>[17-21]</sup>。最近研究发现 nm23-H1 通过对 ERK-MAPK 信号传导通路中 KSR (kinase suppressor of Ras) 磷酸化,降低 KSR 活性抑制肿瘤的侵袭与转移<sup>[22]</sup>。我们应用基因芯片技术检测了 L9981 细胞转染 nm23-H1 基因前后 14 000 种肿瘤相关基因的变化,发现有 300 多种基因发生

显著的变化,并分属于 13 种不同的功能组别,如肿瘤转移相关基因、细胞凋亡相关基因、细胞代谢相关基因、细胞信号传导和转录因子等(结果另行发表)。在本研究中我们应用 RT-PCR 和 Western blot 分别检测了转移相关基因 mRNA 和蛋白表达的变化,发现 nm23-H1 基因转染能显著上调  $\beta$ -catenin, E-Cadherin 和 TIMP-1 基因 mRNA 和蛋白表达水平,同时显著下调 MMP-2、VEGF、CD44V6 和 C-Met 基因 mRNA 和蛋白表达水平,而对 CD44S 基因的表达无影响。由于这些基因参与了肿瘤侵袭与转移的不同阶段,可见这些研究结果提示, nm23-H1 基因可能是肺癌侵袭与转移的上游调控基因。 $\beta$ -catenin, E-Cadherin 基因介导细胞与细胞之间的粘附,它们的低表达有助于肿瘤细胞的扩散,而细胞基质膜的降解是肿瘤远处转移的关键, MMP 与 TIMP 的平衡对维持细胞基质膜的完整具有重要作用, nm23 基因通过上调  $\beta$ -catenin, E-Cadherin 基因表达,促进细胞粘附,下调 MMP-2 并同时上调 TIMP-1 基因表达,阻止细胞外基质的降解,并进而降低与肿瘤远处转移粘附分子 CD44V6 和血管生成相关因子 VEGF 基因的表达,达到抑制肿瘤侵袭与转移,复发的作用<sup>[23-25]</sup>。

本研究提示 nm23-H1 基因通过降低 L9981 细胞的运动能力而抑制肿瘤侵袭, L9981 细胞转染外源性 nm23-H1 基因后可以显著上调  $\beta$ -catenin, E-Cadherin, TIMP-1 下调 VEGF, CD44V6, MMP-2 基因的表达。总之, nm23-H1 基因可能为“肺癌转移抑制级联”中的上游基因,向人高转移肺癌细胞株 L9981 中导入 nm23-H1 基因能恢复“肺癌转移抑制级联”抑制肺癌转移的功能,并能逆转肺癌侵袭转移表型,其分子机理可能是上调肺癌转移抑制基因,下调肺癌转移促进基因的 mRNA 和蛋白表达来实现的<sup>[26]</sup>。

#### [参 考 文 献]

- [1] 周清华, 王艳萍, 车国卫, 等. 人大细胞肺癌细胞系 NL9980 和 L9981 的建立及其生物学特性的研究 [J]. 中国肺癌杂志, 2003, 6(6): 464-469.
- [2] 车国卫, 周清华, 王艳萍, 等. 人肺癌细胞株 L9981-nm23-H1 的建立 [J]. 中国肺癌杂志, 2004, 7(3): 187-190.
- [3] Bhujwalla ZM, Aboagye EO, Gillies RJ, et al. Nm23-transfected MDA-MB-435 human breast carcinoma cells form tumors with altered phospholipid metabolism and pH: a 31P nuclear magnetic resonance study *in vivo* and *in vitro* [J]. Magn Reson Med, 1999, 41(5): 897-903.

- [4] Zhao H, Jhanwar-Uniyal M, Datta PK, et al. Expression profile of genes associated with antimetastatic gene: nm23-mediated metastasis inhibition in breast carcinoma cells [J]. *Int J Cancer*, 2004,109(1):65-70.
- [5] 李 静, 陈 刚, 高庆蕾, 等. 重组腺相关病毒介导的 nm23-H1 对转移性卵巢癌原位移植模型的逆转研究 [J]. *中华医学杂志*, 2003,83(19):1671-1675.
- [6] 陈 军, 周清华, 覃 扬, 等. 人肺癌中 nm23 等位基因的缺失研究 [J]. *中国肺癌杂志*, 2000,3(1):8-13.
- [7] 陈晓峰, 周清华, 石应康, 等. 转化抑制基因 nm23-H1 在肺癌中的表达及其与预后的关系 [J]. *中华实验外科杂志*, 1998,15(6):501-502.
- [8] Srinivas P, Madhavan M, Ahamed I, et al. Nm23H1 and p53 proteins are differentially correlated to metastasis in breast carcinoma [J]. *Neoplasma*, 2002,49(4):225-230.
- [9] Liu Y, Chen X, Peng S, et al. The expression and significance of heparanase and nm23-H1 in hepatocellular carcinoma [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2002,82(22):1553-1556.
- [10] Khan MH, Yasuda M, Higashino F, et al. nm23-H1 suppresses invasion of oral squamous cell carcinoma-derived cell lines without modifying matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expression [J]. *Am J Pathol*, 2001,158(5):1785-1791.
- [11] Hsu S, Huang F, Wang L, et al. The role of nm23 in transforming growth factor beta 1-mediated adherence and growth arrest [J]. *Cell Growth Differ*, 1994,5(9):909-917.
- [12] Cheng S, Alfonso-Jaume MA, Mertens PR, et al. Tumour metastasis suppressor, nm23-beta, inhibits gelatinase A transcription by interference with transactivator Y-box protein-1 (YB-1) [J]. *Biochem J*, 2002,366(Pt 3):807-816.
- [13] 高庆蕾, 马 丁. nm23-23H1 基因表达与卵巢癌转移的相关性 [J]. *癌症*, 2004,23(6):650-654.
- [14] Kantor JD, McCormick B, Steeg PS, et al. Inhibition of cell motility after nm23 transfection of human and murine tumor cells [J]. *Cancer Res*, 1993,53(9):1971-1973.
- [15] Zabrenetzky V, Harris CC, Steeg PS, et al. Expression of the extracellular matrix molecule thrombospondin inversely correlates with malignant progression in melanoma, lung and breast carcinoma cell lines [J]. *Int Int J Cancer*, 1994,59(2):191-195.
- [16] Steeg PS, Palmieri D, Ouatas T, et al. Histidine kinases and histidine phosphorylated proteins in mammalian cell biology, signal transduction and cancer [J]. *Cancer Lett*, 2003,190(1):1-12.
- [17] Fischbach MA, Settleman J. Specific biochemical inactivation of oncogenic Ras proteins by nucleoside diphosphate kinase [J]. *Cancer Res*, 2003,63(14):4089-4094.
- [18] Rochdi MD, Laroche G, Dupre E, et al. Nm23-H2 interacts with a G protein-coupled receptor to regulate its endocytosis through an Rac1-dependent mechanism [J]. *J Biol Chem*, 2004,279(18):18981-18989.
- [19] Nylandsted J, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A, et al. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization [J]. *J Exp Med*, 2004,200(4):425-435.
- [20] Suzuki E, Ota T, Tsukuda K, et al. nm23-H1 reduces in vitro cell migration and the liver metastatic potential of colon cancer cells by regulating myosin light chain phosphorylation [J]. *Int J Cancer*, 2004,108(2):207-211.
- [21] Ratineau C, Bernard C, Roncet G, et al. Reduction of menin expression enhances cell proliferation and is tumorigenic in intestinal epithelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2004,279(23):24477-24484.
- [22] Hartsough MT, Morrison DK, Salerno M, et al. Nm23-H1 metastasis suppressor phosphorylation of kinase suppressor of Ras via a histidine protein kinase pathway [J]. *J Biol Chem*, 2002,277(35):32389-32399.
- [23] Salerno M, Ouatas T, Palmieri D, et al. Inhibition of signal transduction by the nm23 metastasis suppressor: possible mechanisms [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2003,20(1):3-10.
- [24] Ray S, Chattopadhyay N, Mitra A. Curcumin exhibits antimetastatic properties by modulating integrin receptors, collagenase activity, and expression of Nm23 and E-cadherin [J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2003,22(1):49-58.
- [25] 李 勇, 张景华, 邝 刚, 等. 胃癌组织及区域淋巴结 MUC1、CD44v6、nm23 表达与胃癌侵袭转移及预后的关系 [J]. *癌症*, 2003,22(9):985-989.
- [26] 周清华, 陈 军, 刘伦旭, 等. nm23-H1, 基因缺失与人体小细胞肺癌转移相关性研究 [J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 1998,5(3):131-134.

[编辑及校对:杨允贵]