本文引用:李娜,王洪兴,廉莹,等. KISS-1 对裸鼠胃癌移植瘤生长的抑制作用[J]. 新乡医学院学报,2015,32(5):388-390,394.

【基础研究】

KISS-1 对裸鼠胃癌移植瘤生长的抑制作用

李 娜[1], 王洪兴[2], 廉 莹[1], 赵二趁[1]
(1. 新乡医学院病理学教研室,河南 新乡 453003;2. 新乡医学院临床免疫学教研室,河南 新乡 453003)

摘要: **目的** 探讨 KISS-1 基因对裸鼠胃癌移植瘤生长的影响。**方法** 通过脂质体介导将 pcDNA3.1-KISS-1 转染人胃癌细胞 BGC-823,用 Western blot 检测转染前后 KISS-1 蛋白的表达。将转染 pcDNA3.1-KISS-1 的 BGC-823 细胞(转基因组)、转染空质粒的 BGC-823 细胞(空质粒转染组)和单纯 BGC-823 细胞(对照组)分别接种于 *BALB/C* 裸鼠,构建裸鼠胃癌移植瘤模型,测量肿瘤体积和瘤质量,并绘制肿瘤生长曲线;采用免疫组织化学法和半定量反转录-聚合酶链反应检测肿瘤组织中 KISS-1 蛋白和 mRNA 的表达。**结果** KISS-1 基因成功转入胃癌 BGC-823 细胞,转基因组 KISS-1 蛋白的表达较空质粒转染组和对照组显著增加($P<0.05$);与空质粒转染组和对照组比较,转基因组裸鼠肿瘤生长速度显著减慢、肿瘤体积显著减小,瘤体质量显著减轻($P<0.05$)。**结论** 通过基因转染的方法能表达有活性的 KISS-1,并能抑制裸鼠胃癌移植瘤的生长。

关键词: 胃癌;KISS-1;BGC-823 细胞;转染;裸鼠
中图分类号: R735.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2015)05-0388-04

Inhibition of KISS-1 transfection on the gastric carcinoma xenograft tumor growth of nude mice

LI Na[1], WANG Hong-xing[2], LIAN Ying[1], ZHAO Er-chen[1]
(1. *Department of Pathology, Xinxiang Medical University, Xinxiang* 453003, *Henan Province, China*; 2. *Department of Clinical Immunology, Xinxiang Medical University, Xinxiang* 453003, *Henan Province, China*)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of KISS-1 transfection on the gastric carcinoma tumor growth of nude mice. **Methods** BGC-823 cells were transfected with pcDNA3.1-KISS-1 by liposome, and pcDNA3.1-KISS-1 protein in transfected and non-transfected cells were detected by Western blot. Nude mice were transplanted subcutaneously with BGC-823 cells stably transfected with pcDNA3.1-KISS-1, BGC-823 stably transfected with empty vectors and BGC-823 cells, respectively. The tumor volume and weight were measured. Immunohistochemistry and reverse transcription-polymerase chain reaction were used to detect KISS-1 protein and mRNA in tumor tissue. **Results** Expression of KISS-1 protein in pcDNA3.1-KISS-1 transfected cells was significantly higher than that in pcDNA3.1 transfected group and control group ($P<0.05$). *In vivo* study showed that the tumor growth speed of nude mice in pcDNA3.1-KISS-1 transfected group was significantly slower than that in pcDNA3.1 transfected group and control group. The tumor volume in pcDNA3.1-KISS-1 transfected group was significantly smaller than that in pcDNA3.1 transfected group and control group ($P<0.05$). The tumor weight in pcDNA3.1-KISS-1 transfected group was significantly lighter than that in pcDNA3.1 transfected group and control group ($P<0.05$). **Conclusion** KISS-1 gene can effectually express by gene transfection and may obviously inhibit the growth of the gastric carcinoma xenograft tumor of nude mice.

Key words: gastric carcinoma; KISS-1; BGC-823 cells; transfection; nude mice

KISS-1 基因是 1996 年克隆的一个肿瘤转移抑制基因,其编码的蛋白质与受体结合在人类多种肿瘤中发挥抑制转移作用[1-2]。目前的研究多集中在其与肿瘤侵袭、转移的关系,本课题组前期研究已证明在食管癌中 KISS-1 具有抑制肿瘤生长的作用[3],但 KISS-1 与消化系统其他肿瘤如胃癌的关系尚不十分清楚,国内外也鲜见相关报道。本研究通过脂质体介导将 KISS-1 基因转染胃癌细胞株 BGC-823,并构建裸鼠胃癌移植瘤模型,探讨其对裸鼠胃癌移植瘤生长的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 4~6 周龄 *BALB/C* 雌性裸鼠,体质量 18~22 g,购自中国科学院上海实验动物中心。

1.2 主要试剂、质粒及细胞系 KISS-1(BA-1654)

DOI:10.7683/xxyxyxb.2015.05.002
收稿日期:2014-10-06
基金项目:河南省科技厅科技攻关资助项目(编号:112102310206);河南省教育厅自然科学资助项目(编号:2011A310005);河南省高校青年骨干教师资助项目(编号:2012GGJS-136)
作者简介:李 娜(1977-),女,河南遂平人,博士,副教授,主要从事消化道肿瘤分子病理学研究。

兔抗人多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司;β-actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司;TRIzol 试剂、SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒和 PCR 试剂盒等均购自美国 Invitrogen 公司;引物由上海生物工程公司合成;pcDNA3.1-KISS-1 真核表达质粒由本实验室构建并保存;人低分化胃腺癌细胞株 BGC-823 由本实验室保存。

1.3　方法

1.3.1　质粒制备和脂质体法转染 BGC-823 细胞　BGC-823 细胞用含体积分数 10% 胎牛血清 1640 培养基在 37 ℃、体积分数 5% CO_2 培养箱传代培养。取对数生长期细胞,接种于 12 孔培养板,每孔(1 ~ 2) ×10^5 个,培养 24 h 后用无血清 1640 培养基洗涤 2 次备转染用。用 Lipofectamine 2000 脂质体介导的基因转移技术将 pcDNA3.1-KISS-1 真核表达转染到 BGC-823 细胞,G418 筛选稳定表达 KISS-1 的细胞株,同时以转染空质粒和未转染细胞作为对照。

1.3.2　实验分组及动物成瘤　裸鼠在超净生物层流架内适应性饲养 1 周,随机分为 3 组,对照组:接种 BGC-823 亲本细胞;空质粒转染组:接种空质粒转染 BGC-823 细胞;转基因组:接种 pcDNA3.1-KISS-1 转染 BGC-823 细胞,每组 6 只。右前肢腋背部皮下接种细胞,接种 1 周左右,接种部位皮下长出米粒大小的硬结,每隔 3 d 用游标卡尺测量肿瘤结节的长径(a)、短径(b),按公式求出肿瘤近似体积(V),$V = 0.523\ 6ab^2$,实验结束时处死小鼠,称取瘤质量,计算肿瘤抑制率。公式为:肿瘤抑制率 = [(对照组瘤体体积或质量 - 空质粒转染组或转基因组瘤体体积或质量)/对照组瘤体体积或质量] × 100%。

1.3.3　Western blot　按照试剂盒说明书提取细胞质、细胞核蛋白,蛋白上清经 SDS-聚丙烯酰氨凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrohoresis,SDS-PAGE)后转移至硝酸纤维素膜,用含质量分数 1% 脱脂奶粉的 TBST(Tris-Buffered Saline Tween-20)封闭 30 min,一抗于 4 ℃孵育过夜,TBST 洗涤 3 次 ×10 min;辣根过氧化物酶标记的二抗于室温孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次 ×10 min,膜与化学发光底物孵育 5 min,经 X 线片曝光、显影、定影。显色结果用软件 Total Lab 2.0 进行灰度分析,并计算蛋白的相对表达水平。

1.3.4　免疫组织化学法检测 KISS-1 蛋白的表达　采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶连接法,KISS-1 多抗稀释倍数为 1 ∶ 100,实验步骤按说明书进行,二氨基联苯胺(diaminobenzidine,DAB)显色,苏木精复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution,PBS)代替一抗作为阴性对照。KISS-1 阳性显色为棕黄色颗粒,主要位于肿瘤细胞质,每张片子随机计数 5 个高倍视野(×400),每个视野观察 200 个细胞,记录其中阳性细胞数,计算每张片子 200 个细胞中的阳性细胞平均数作为结果进行统计分析,无着色为阴性。

1.3.5　半定量反转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction,RT-PCR)检测 KISS-1 mRNA 的表达　RNA 提取过程按照 TRIzol RNA 提取试剂盒说明书进行,体外反转录合成 cDNA 的第 1 条链,以 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增 KISS-1 mRNA。引物序列如下:KISS-1 上游引物 5′-ATGAACTCACTGGTTTCTTGGCAG-3′,下游引物 5′-TCACTGCCCCGCACCTG-3′;GAPDH 上游引物 5′-GGAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3′,下游引物 5′-CTTCTCCATGGTGGTCAAGAC-3′,预期扩增片段大小分别为 438 bp 和 315 bp。取 5 μL 扩增产物用于质量分数 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,并在凝胶成像仪上成像及测定分析,以目的基因与内参条带的比值作为目的基因的相对含量,实验重复 6 次。

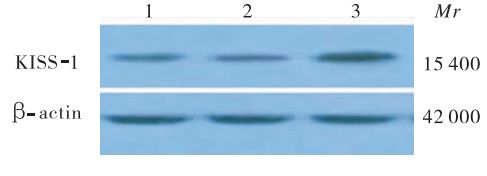
1.4　统计学处理

应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析。检验水准 $\alpha = 0.05$。

2　结果

2.1　转染后 BGC-823 细胞中 KISS-1 蛋白的表达

Western blot 结果显示 KISS-1 蛋白在相对分子质量 15 400 处出现印迹条带(图 1)。KISS-1 蛋白在转基因组的表达水平为 0.967 ± 0.124,显著高于空质粒转染组(0.795 ± 0.128)和对照组(0.787 ± 0.128)($P < 0.05$)。空质粒转染组和对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。



1:对照组;2:空质粒转染组;3:转基因组。

图 1　转染前后 BGC-823 细胞中 KISS-1 蛋白的表达

Fig. 1　Expression of KISS-1 protein in BGC-823 cells before and after transfection

2.2　KISS-1 对裸鼠移植瘤的形成及肿瘤体积的影响

转基因组肿瘤的平均体积为(939.38 ± 82.08)mm^3,显著小于对照组[(1 284.36 ± 55.26)mm^3]

和空质粒转染组[（1 250.46 ± 44.36）mm^3]（$P < 0.05$）。转基因组抑瘤率为 26.86%，而空质粒转染组抑瘤率仅为 2.64%。3 组裸鼠肿瘤体积增大的程度也明显不一致，从肿瘤的生长曲线上可以看出转基因组肿瘤的体积增长速度明显慢于对照组和空质粒转染组（图 2）。

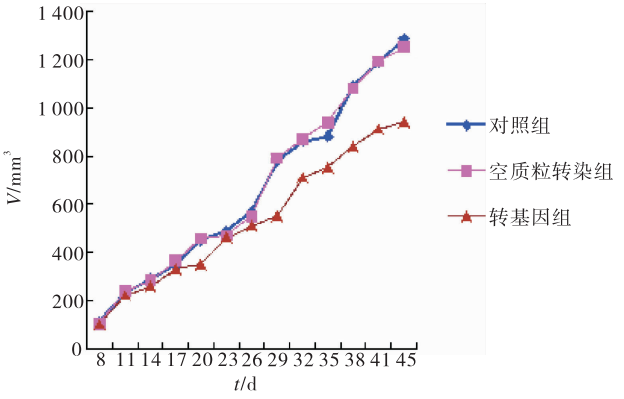


图 2 KISS-1 转染对裸鼠肿瘤生长的影响

Fig. 2 Effect of KISS-1 transfection on growth of BGC-823

2.3 KISS-1 对裸鼠移植瘤瘤体质量的影响 转基因组瘤体平均质量为（0.494 ± 0.084）g，显著低于对照组[（0.682 ± 0.380）g]和空质粒转染组[（0.668 ± 0.550）g]（$P < 0.05$）。对照组和空质粒转染组比较瘤体质量差异无统计学意义（$P > 0.05$）。转基因组抑瘤率为 27.57%，而空质粒转染组抑瘤率仅为 2.05%。

2.4 裸鼠移植瘤中 KISS-1 蛋白及 mRNA 的表达 免疫组织化学结果显示，转基因组裸鼠移植瘤中 KISS-1 蛋白的阳性细胞百分比（83.5%）显著高于对照组（65.5%）和空质粒转染组（68.0%）（$P < 0.05$）；同样 KISS-1 mRNA 的相对表达量在转基因组（0.968 ± 0.060）也显著高于对照组（0.764 ± 0.076）和空质粒转染组（0.733 ± 0.048）（$P < 0.05$），对照组和空质粒转染组裸鼠移植瘤中的 KISS-1 蛋白和 mRNA 比较差异均无统计学意义（$P > 0.05$）。

3 讨论

众所周知，任何治疗方法的研究目的，最终都是为了在临床实践中得到应用和推广，尽管细胞系的研究工作可以部分阐明肿瘤发生及生物学行为等方面的机制，可以作为体外实验模型而成为研制新药物和（或）治疗方法疗效观察的重要初筛手段，但由于其生长环境与体内不同，且由于选择性生长等因素，导致其研究结果具有一定的局限性。动物体内实验使肿瘤生长环境更接近于临床实际，在很大程度上弥补体外实验的不足。KISS-1 基因是目前发现的一个肿瘤转移抑制基因，近年来研究显示其可与受体结合，在控制细胞生长、增殖，抑制肿瘤细胞的浸润性、运动性、化学趋向性和黏附性中具有重要作用[4]。本实验就是在体外胃癌细胞研究的基础上，选用 4 ~ 6 周龄 *BALB/C* 雌性裸鼠，利用体外转染的方法，将 KISS-1 基因转移到裸鼠体内，建立裸鼠皮下移植瘤模型，观察 KISS-1 在体内对胃癌细胞生长的抑制作用，为胃癌的基因治疗提供理论依据。

本研究结果显示，转染 pcDNA3.1-KISS-1 的胃癌细胞 BGC-823 中 KISS-1 蛋白的表达明显高于对照组，表明构建的靶基因能够在真核细胞中有效表达，为其蛋白功能的研究奠定了基础。本课题组以往研究结果显示外源性 KISS-1 基因对胃癌 BGC-823 细胞的体外生长具有抑制作用[5]。有研究发现转染了 hOT7T175 的细胞株 B16-BL6[6]、HEK293[7] 和 CHO-K1[8] 经 Metastin 处理后，细胞内钙离子浓度急剧上升。Metastin 与 hOT7T175 结合后，产生 2 种重要的细胞内第二信使三磷酸肌醇和二甘油酯，二者分别促进细胞内钙离子释放和磷脂酶 C 的活化。细胞内钙离子的增加可以抑制肿瘤细胞增生，诱导肿瘤细胞分化和凋亡。

为了进一步探讨 KISS-1 在体内的肿瘤抑制作用，本课题组进行了裸鼠体内实验。结果显示，转染 pcDNA3.1-KISS-1 的裸鼠形成的移植瘤体积明显减小，抑瘤率为 26.86%；转染 pcDNA3.1-KISS-1 的裸鼠形成的移植瘤瘤体质量亦明显减轻，抑瘤率为 27.57%；此外，转染 pcDNA3.1-KISS-1 的裸鼠肿瘤生长速度明显较空质粒转染组和对照组慢。本研究还利用免疫组织化学及 RT-PCR 技术检测了 3 组裸鼠移植瘤组织中 KISS-1 的表达，结果显示，在转染 pcDNA3.1-KISS-1 的移植瘤组织中，KISS-1 蛋白和 mRNA 的表达均显著增高。以上结果与课题组前期对食管癌的研究结果一致[9]。因此，有效地转染外源性 KISS-1，不仅可在体内提升 KISS-1 基因的活性，对移植瘤的生长还具有抑制作用，但无阻止移植瘤形成的作用。

本研究在体外研究的基础上，进一步通过体内实验观察了 KISS-1 基因对裸鼠胃癌移植瘤生长的影响，初步证实 KISS-1 对裸鼠胃癌移植瘤的生长具有一定的抑制作用，转染 KISS-1 基因能有效提升 BGC-823 细胞中 KISS-1 的活性，并在体内抑制了肿瘤细胞的生长与增殖。因此该研究成果对揭示 KISS-1 与胃癌生长的关系具有重要意义，为胃癌的治疗提供一个新的思路与途径。

（下转第 394 页）

作用,Bax 则对细胞凋亡起促进作用[16]。研究发现周围神经损伤后肌肉组织 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达水平显著增高[17]。Bcl-2 和 Bax 蛋白是调节细胞凋亡的关键蛋白,且细胞凋亡结果取决于这 2 类基因表达的比值,如果 Bcl-2 表达高于 Bax,则促进生存,而 Bcl-2 水平低于 Bax,则促进凋亡[18]。本研究结果显示,观察组大鼠术后 2、4、6 周肌肉组织 Bcl-2 表达水平高于对照组,Bax 表达水平则低于对照组。BMSCs 上调 Bcl-2 的表达,抑制 Bax 的表达,说明细胞对凋亡的抵抗性增强,提示 BMSCs 在治疗失神经肌肉萎缩中具有重要作用。

总之,BMSCs 移植于大鼠离断的坐骨神经断端可促进神经生长,延缓肌肉萎缩,改善大鼠神经及运动功能,为临床上周围神经损伤后肌肉萎缩的防治提供了新的思路和方法。当然,如何使 BMSCs 移植于人体,如何进一步提高干细胞移植后失神经肌肉萎缩改善效果仍是今后深入研究的方向。

参考文献:

[1] 彭建平,何继业,王栋梁,等. 骨髓间充质干细胞成肌诱导后移植对延缓失神经肌肉萎缩的作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(25):4824-4828.

[2] 陈传煌,杨涛,吴芳,等. 脐带间充质干细胞移植可延缓大鼠失神经肌肉的萎缩[J]. 中国组织工程研究,2014,18(1):69-74.

[3] 王斌,刘茹,陈春芳,等. 血管内皮生长因子基因转染骨髓间充质干细胞对支气管肺发育不良大鼠肺发育的影响[J]. 中华实用儿科临床杂志,2013,28(2):102-106.

[4] 武俊芳,吴艳芳,李晓鹏,等. 5-氮杂胞嘧啶核苷诱导小鼠骨髓间充质干细胞凋亡[J]. 中华实用儿科临床杂志,2014,29(17):1337-1338.

[5] 徐志刚,穆敬中,吕淑慧,等. 骨髓间充质干细胞向光感受器样细胞和视网膜神经样细胞的分化[J]. 眼科新进展,2013,33(2):126-129,134.

[6] Zhou J,Tian G P,Wang J E,*et al*. *In vitro* differentiation of adipose-derived stem cells and bone marrow-derived stromal stem cells into neuronal-like cells[J]. *Neural Regen Res*,2011,6(19):1467-1472.

[7] 田涛,吴朝晖,金惠铭,等. 大鼠臂丛神经损伤后骨骼肌萎缩时肌细胞凋亡的研究[J]. 中华医学杂志,2000,80(7):530-533.

[8] Daussin F N,Godin R,Ascah A,*et al*. Cyclophilin-D is dispensable for atrophy and mitochondrial apoptotic signalling in denervated muscle[J]. *J Physiol*,2011,589(4):855-861.

[9] 张文辉. 成肌调节因子 Myf-5 在失神经骨骼肌萎缩不同时段表达的研究[D]. 太原:山西医科大学,2009.

[10] Lin S,Xu L,Hu S,*et al*. Optimal time-point for neural stem cell transplantation to delay denervated skeletal muscle atrophy[J]. *Muscle Nerve*,2013,47(2):194-201.

[11] Ohishi M,Schipani E. Bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *J Cell Biochem*,2010,109(2):277-282.

[12] Ding Y,Arai M,Kondo H,*et al*. Effects of capsaicin-induced sensory denervation on bone metabolism in adult rats[J]. *Bone*,2010,46(6):1591-1596.

[13] Ohlendieck K. Proteomics of skeletal muscle differentiation,neuromuscular disorders and fiber aging[J]. *Expert Rev Proteomics*,2010,7(2):283-296.

[14] Chang H M,Shyu M K,Tseng G F,*et al*. Neuregulin facilitates nerve regeneration by speeding Schwann cell migration via ErbB2/3-dependent FAK pathway[J]. *PLoS One*,2013,8(1):e53444.

[15] Kim S S,Yoo S W,Park T S,*et al*. Neural induction with neurogenin1 increases the therapeutic effects of mesenchymal stem cells in the ischemic brain[J]. *Stem Cells*,2008,26(9):2217-2228.

[16] Jiang J,Yao P,Gu Y,*et al*. Adult rat mesenchymal stem cells delay denervated muscle atrophy[J]. *Cell Mol Neurobiol*,2012,32(8):1287-1298.

[17] Lim J H,Kim D Y,Bang M S. Effects of exercise and steroid on skeletal muscle apoptosis in the mdx mouse[J]. *Muscle Never*,2004,30(4):456-462.

[18] 左侠,张坤,陈蕾. 骨髓间充质干细胞移植对环磷酰胺诱导卵巢损伤大鼠 Bax 及 Bcl-2 蛋白表达的影响[J]. 新乡医学院学报,2014,31(12):965-969.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:王 燕)

(上接第 390 页)

参考文献:

[1] Papaoiconomou E,Lymperi M,Petraki C,*et al*. KISS-1/GPR54 protein expression in breast cancer[J]. *Anticancer Res*,2014,34(3):1401-1407.

[2] Prabhu V V,Sakthivel K M,Guruvayoorappan C. Kisspeptins(KiSS-1):essential players in suppressing tumor metastasis[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*,2013,14(11):6215-6220.

[3] Li N,Wang H X,Zhang J,*et al*. KISS-1 inhibits the proliferation and invasion of gastric carcinoma cells[J]. *World J Gastroenterol*,2012,18(15):1827-1833.

[4] Zhang Y,Tang Y J,Li Z H,*et al*. KISS1 inhibits growth and invasion of osteosarcoma cells through inhibition of the MAPK pathway[J]. *Eur J Histochem*,2013,57(4):e30.

[5] 王洪兴,秦川,张贵虎,等. 体外转染 KISS-1 基因对 BGC-823 细胞增殖能力的影响[J]. 新乡医学院学报,2010,27(3):217-219.

[6] Kushiro K,Núñez N P. Ethanol inhibits B16-BL6 melanoma metastasis and cell phenotypes associated with metastasis[J]. *In Vivo*,2012,26(1):47-58.

[7] Babwah A V,Pampillo M,Min L,*et al*. Single-cell analyses reveal that KISS1R-expressing cells undergo sustained kisspeptin-induced signaling that is dependent upon an influx of extracellular Ca^{2+}[J]. *Endocrinology*,2012,153(12):5875-5887.

[8] Ikeguchi M,Hirooka Y,Kaibara N. Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis for KISS-1 and orphan G-protein-coupled receptor (hOT7T175) gene expression in hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*,2003,129(9):531-535.

[9] 李娜,李珊珊,张红艳,等. 转染 KISS-1 对裸鼠食管鳞癌移植瘤生长的影响[J]. 肿瘤防治研究,2010,37(2):136-140.

(本文编辑:王 燕 英文编辑:王 燕)