

NALP1 基因与骨肉瘤细胞的相关研究

刘浩 郭猛 章浩 王洋 程平 纪方[△]

(第二军医大学长海医院 上海 200433)

摘要 目的 探讨 NALP1 基因在骨肉瘤细胞株 MG-63、U-2OS 中的表达,以及高表达 NALP1 基因对于骨肉瘤细胞体外凋亡的影响。方法:使用 RT-PCR、Western-blot 法检测骨肉瘤细胞株 MG-63、U-2OS 中的 mRNA 及蛋白表达水平并与人成骨细胞株 hFOB1.19 比较。将 NALP1 基因转染质粒 PcDNA3.1 将重组质粒转染骨肉瘤细胞,分成高表达基因组、空质粒组及对照组,加入抗肿瘤药物顺铂及甲氨蝶呤促使肿瘤细胞凋亡,使用流式细胞仪测定各组肿瘤细胞凋亡率。结果 通过统计分析,骨肉瘤细胞株 MG-63、U-2OS 中的 mRNA 及蛋白表达水平均低于人成骨细胞株 hFOB1.19 ($P < 0.05$),NALP1 高表达组的肿瘤细胞凋亡率明显高于空白质粒组及对照组。结论:上调骨肉瘤细胞株 MG-63、U-2OS 中的 NALP1 的表达量可以促进肿瘤细胞凋亡。

关键词 人成骨细胞株 MG-63、U-2OS;NALP1 基因;细胞凋亡

中图分类号:R738 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)06-1040-04

Research on NALP1 Gene and Osteosarcoma Cell

LIU Hao, GUO Meng, ZHANG Hao, WANG Yang, CHENG Ping, JI Fang[△]

(Changhai hospital of Second Military Medical University, 200433, Shanghai, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of NALP1 gene in osteosarcoma cell line MG-63, U-2OS and effect in vitro apoptosis about high expression of NALP1 gene for osteosarcoma cells. **Methods:** We use the methods of RT-PCR, Western-blot to assay the expression of mRNA and protein in osteosarcoma cell line MG-63, U-2OS and compare with human osteoblast cell line hFOB1.19. We transfected the NALP1 gene into plasmid PcDNA3.1, and the recombinant plasmid was. We divided the transfected osteosarcoma cells into three groups, highly expressed genes group, blank plasmid group and control group. Then we add the anticancer drugs cisplatin and methotrexate to promote tumor cell apoptosis. At last we use flow cytometry in each group to determine the apoptosis of tumor cell. **Results:** Through statistical analysis, we get the result that mRNA and protein expression in osteosarcoma cell line MG-63, U-2OS were lower than the human osteoblast cell line hFOB1.19 ($P < 0.05$), and apoptosis of highly expressed NALP1 gene group was significantly higher than the blank plasmid group and the control group. **Conclusions:** Increasing the expression of NALP1 gene in osteosarcoma cell line MG-63 and U-2OS can promote apoptosis of tumor cell.

Key words: Osteosarcoma cell line MG-63, U-2OS; NALP1 gene; Apoptosis

Chinese Library Classification: R738 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)06-1040-04

前言

NALPs(NACHT/LRR/PYD-containing protein)是一种属于 NLRs(NOD-like receptor)家族的重要的免疫分子^[1]。NALP 家族基因位于 17p13.2 染色体上^[2],NALP1(也称为 NAC, CARD7, DEFCAP, CLR17.1^[3])是第一种被鉴别出的 NALP 亚家族成员^[4],它是一个具有复杂结构域的蛋白,其功能主要参与细胞凋亡和细胞炎症反应^[5]。细胞凋亡存在于多细胞有机体的各个发育过程,维持内环境稳定以及调节免疫功能^[6],目前针对于 NALP1 引起细胞凋亡,特别是肿瘤细胞凋亡方面的研究甚少。骨肉瘤(osteosarcoma)是一种起源于间叶组织的恶性肿瘤^[7],由纺锤形的恶性肿瘤细胞形成类骨质或不成熟的骨质为特征的原发性恶性肿瘤^[8]。骨肉瘤是少见的高度恶性肿瘤,具有显著的临床特点:1、主要发病群体为青少年;2、肿瘤几乎全部为高度恶性,预后差;3、易早期转移,肺为最常见的转移靶器官^[9-10]。但

目前骨肉瘤的发生、发展、转移等机制尚未完全明了^[11]。本次研究目的是通过一系列实验来探求 NALP1 基因与骨肉瘤的发生及发展的相关关系,以期初步了解 NALP1 对骨肉瘤细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 试验用主要材料及试剂

人成骨肉瘤细胞株 U-2OS、MG-63,人成骨细胞株 hFOB1.19 三种细胞株购于中国科学院上海生命科学研究院-细胞资源中心;大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、质粒 PcDNA3.1 为第二军医大学免疫实验室室存;DMEM 培养基购于美国 Thermo 公司;二甲基亚砷购于美国 Gibco 公司;胎牛血清购于德国 PAA 公司;总 RNA 抽提试剂 Trizol 购于美国 Invitrogen 公司;NALP1 兔抗人单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的二抗购于上海工硕生物技术有限公司;JUNI-Q-10 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒购于上海生工生物工程有限责任公司;Annexin V 购于 BD 公司。PCR 仪检测、Western-blot 检测、流式细胞仪检测等实验均于第二军医大学免疫实验室进行。

作者简介:刘浩(1976-),男,硕士,主治医师,主要研究方向:骨创伤。电话:021-81873397 E-mail:lh149gk@163.com

[△]通讯作者:纪方 E-mail:doctorjif@yahoo.com.cn

(收稿日期:2011-11-18 接受日期:2011-12-13)

1.2 实验方法

1.2.1 细胞的传代及冻存 人成骨肉瘤细胞株 U-2OS、MG-63, 人成骨细胞株 hFOB1.19 的培养液为含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液, 置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱内培养, 待细胞融合率达 90%时进行传代, 使细胞保持对数生长状态。将对数生长的细胞制备成细胞悬液, 离心后弃上清, 加入含 DMSO(二甲基亚砷)的冻存液, 放置于液氮中保存。

1.2.2 RT-PCR 法检测 U-2OS、MG-63 细胞及 hFOB1.19 细胞中 NALP1 基因的 mRNA 表达水平差异, Western 印迹法检测细胞株蛋白表达的差异 A)、检测各细胞株 mRNA 表达水平: Trizol 法分别提取 U-2OS、MG-63、hFOB1.19 三种细胞株的总 RNA, 紫外线分光光度计检测各样品的 RNA 纯度及浓度。将 RNA 产物进行逆转录反应, 引导出 cDNA, 设计 PCR 引物, 上游引物 5'-GCAGTGCTAATGCCCTGGA T-3' 下游引物 5'-GAGCTTGGTAGAGGAGTGAGG-3'。以基因 GAPDH 作为内参, 同时设计内参引物。通过反转录反应从总 RNA 引导出 cDNA 作为模板, 进行 RT-PCR 反应, 检验得出的 RQ 值进行 t 检验。B)、Western 印迹法检测细胞株蛋白表达的差异: 将 U-2OS、MG-63、hFOB1.19 三种细胞株样本进行蛋白分离, 进行蛋白电泳, 转膜, 加入一抗(NALP1 兔抗人单克隆抗体)孵育 PVDF 膜, 加二抗(辣根过氧化物酶标记的抗体)标记一抗。二抗孵育完成后进行显影、照相。

1.2.3 NALP1 基因真核表达质粒的构建 将 Trizol 法提取 RNA, 进行反转录反应得到 cDNA, 设计含有限制性内切酶酶切位点的 PCR 引物, 上游引物 5'-GGTACCTctctcgcctgatacc-3', 下游引物 5'-GGATCCaagcctctct ggcttcatt-3'(引物序列大小写变化处为酶切位点)。两种限制性内切酶分别为 *KpnI* 和 *BamHI*。加入 PCR 引物进行 PCR 扩增, 得到 DNA 产物, 用两种限制性内切酶酶切 DNA 序列, 酶切后的 DNA 进行凝胶电泳及 DNA 片段回收, 利用 UNIQ-10 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒抽提 DNA, 将提取出的 NALP1 的 DNA 产物与 PcDNA3.1 质粒载体在 T4 连接酶的作用下进行 DNA 连接重组, 得到 PcDNA3.1/NALP1 重组质粒。用 CaCl₂ 法制备和转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 提取质粒 DNA 进行测序验证, 经上海生工公司测序检验, 提取质粒的 DNA 片段与 Gene Bank 中 NALP1 序列一致, 证明重组质粒转化大肠杆菌成功, 选取转化成功的菌株进行细菌培养, 并提取中等量质粒进行肿瘤细胞的转染。

1.2.4 PcDNA3.1/NALP1 重组质粒转染 U-2OS、MG-63 细胞 使用脂质体介导法转染骨肉瘤细胞 MG-63、U-2OS, 转染试剂 LIPOFECTAMINE 2000(invitrogen 公司提供)。共进行两组细胞转染, 即 PcDNA3.1/NALP1 重组质粒分别转染骨肉瘤细胞 MG-63、U-2OS。进行 RT-PCR 检测验证转染细胞成功, 检验得出的 RQ 值进行 t 检验。

1.2.5 外源性 NALP1 基因转染对人成骨肉瘤细胞 U-2OS 体外生长的抑制作用 细胞系铺 6 孔板进行培养, 分为 3 组, 分别为 U-2OS 组、U-2OS 转染空白质粒组、U-2OS 转染 NALP1 组。向细胞中加入甲氨蝶呤刺激 24h, 胰酶消化细胞, 离心取细胞, 加 PBS 冲洗细胞, 加 PI 与 Annexin V 于暗箱孵育, 将细胞转移到流式管中, 上流式细胞仪检测。

2 结果

2.1 人成骨肉瘤细胞株 U-2OS、MG-63, 人成骨细胞株 hFOB1.19 中 NALP1 的 mRNA 的表达差异

经 RT-PCR 实验进行各细胞株中 mRNA 的增殖表达, 结果显示, 人成骨肉瘤细胞株 U-2OS、MG-63 中 NALP1 的 mRNA 的表达量明显低于人成骨细胞株 hFOB1.19 中 NALP1 的 mRNA 的表达量, 各组 RQ 值经 t 检验后显示, U-2OS 组、MG-63 组中 mRNA 的表达量与 hFOB1.19 中 mRNA 的表达量有差异($P < 0.05$)(图 1)。

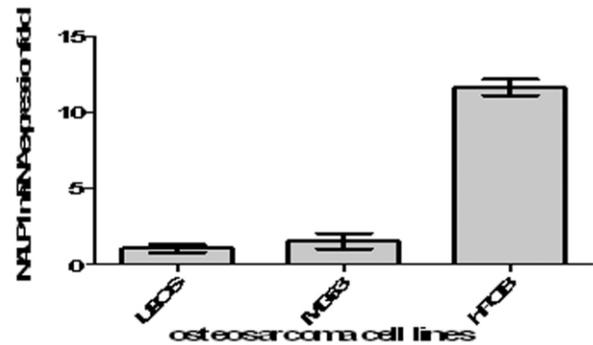


图 1 U-2OS、MG-63、hFOB1.19 中 mRNA 的表达量

Figure 1 Expression of mRNA in U-2OS, MG-63 and hFOB1.19

2.2 人成骨肉瘤细胞株 U-2OS、MG-63, 人成骨细胞株 hFOB1.19 中 NALP1 蛋白的表达差异

采用 Western 印迹法检测细胞株蛋白表达的差异, 实验证明, U-2OS、MG-63 中的 NALP1 蛋白表达量明显低于 hFOB1.19 中 NALP1 蛋白的表达量(图 2)。

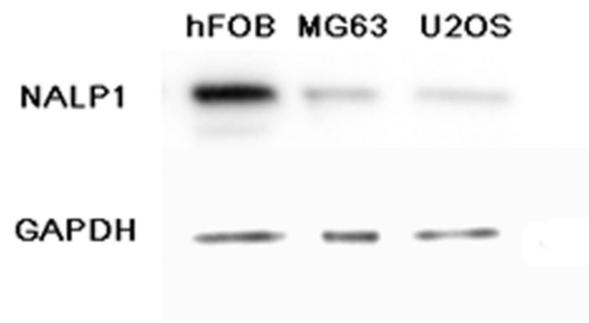


图 2 U-2OS、MG-63、hFOB1.19 中 NALP1 蛋白的表达

Figure 2 Expression of protein in U-2OS, MG-63 and hFOB1.19

2.3 PcDNA3.1/NALP1 重组质粒转染骨肉瘤细胞 U-2OS、MG-63 的 RT-PCR 检验

常用 RT-PCR 实验检验 PcDNA3.1/NALP1 重组质粒转染骨肉瘤细胞 U-2OS、MG-63 的 NALP1 的 mRNA 的表达量与骨肉瘤细胞 U-2OS、MG-63 比较, 证明重组质粒转染骨肉瘤细胞 U-2OS、MG-63 成功, 且重组质粒在肿瘤细胞中能正常表达。各组 RQ 值经 t 检验后显示, 重组质粒转染组中 NALP1 的 mRNA 的表达量与空白组的表达量有差异 ($P < 0.05$), 各组内 NALP1 的 mRNA 的表达量比较无明显差异(图 3)。

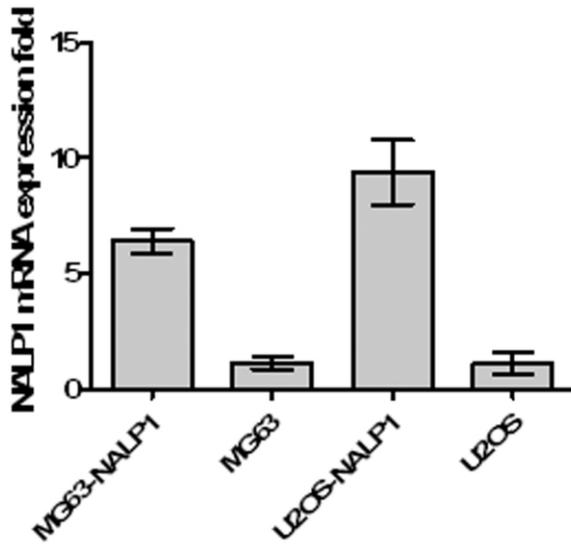


图3 重组质粒转染 U-2OS, MG-63 的 mRNA 的表达量与 U-2OS、MG-63 空白细胞比较

Figure 3 Expression of mRNA in transfected cell U-2OS, MG-63 and compare with blank cell

2.4 外源性 NALP1 基因转染对人成骨肉瘤细胞 U-2OS 体外生长的抑制作用

将外源性 NALP1 基因转染骨肉瘤细胞 U-2OS，将细胞分

为三组,即 NALP1 转染肿瘤细胞组、空质粒转染肿瘤细胞组、肿瘤细胞组,分别加入抗肿瘤药物甲氨蝶呤促进其凋亡,利用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率进行比对。结果显示,NALP1 转染肿瘤细胞组的早期细胞凋亡率明显高于空质粒转染肿瘤细胞组及肿瘤细胞组(图 4,图片顺序分别为肿瘤细胞组、空质粒转染肿瘤细胞组、NALP1 转染肿瘤细胞组)。

3 讨论

NALP1 是体内免疫系统的基本免疫调节因子,它对于细菌及病毒感染的监控起着重要作用^[12],它主要表达于郎格罕细胞及 T 细胞^[13]。NALP1 是一个具有复杂结构域的蛋白,N 末端是 PYD(pyrin domain),其后是 NACHT 结构,紧连接 LRR 结构域以及 FIIND 结构域,C 末端是 CARD^[14]。其中 PYD 和 CARD 均属于死亡结构域家族成员^[15],其功能与炎症反应和细胞凋亡有关。它能识别与病原体相关联的分子模式,进而触发 NALP1 炎症体(Inflammasome)的组装和活化,最后刺激体内炎症反应及导致细胞凋亡^[16]。细胞凋亡在肿瘤的发生、发展中起到了重要作用^[17]。细胞凋亡是一个被严格控制调节的过程,它可以被多种细胞内外的刺激而引发特有的细胞凋亡形态^[18]。然而目前针对骨肉瘤组织的凋亡通路的系统性研究却很少^[19],至今还存在着一个比较有争议的论点,那就是是否在凋亡率、肿瘤的恶性程度以及患者的预后之间存在着相关关系^[20],这都有待于进一步研究。

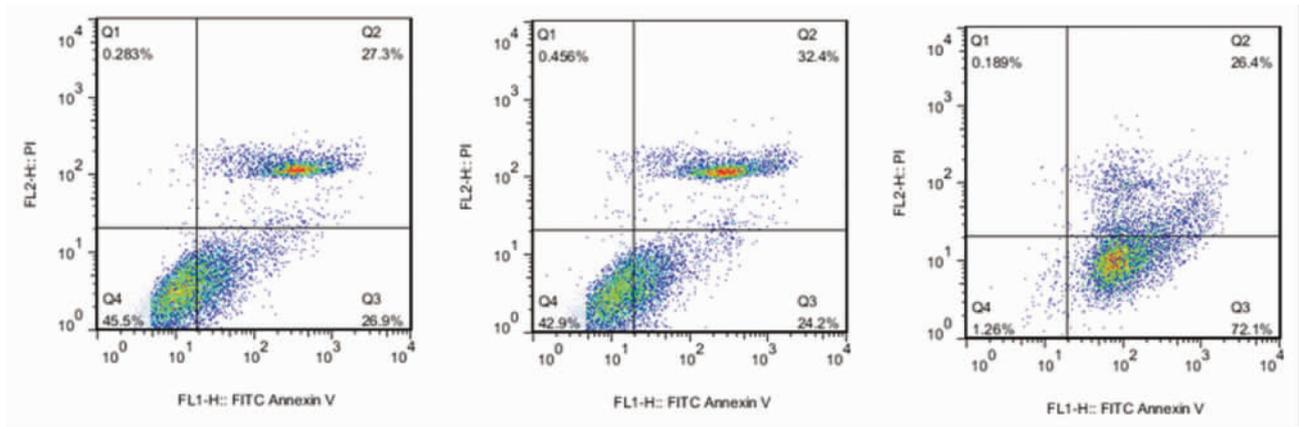


图 4 U-2OS 细胞检测细胞凋亡率

Figure 4 The apoptosis of U-2OS cell

从 U-2OS, MG-63 细胞及 hFOB1.19 细胞中 NALP1 基因的 mRNA 及蛋白表达的差异的实验结果看,骨肉瘤细胞的 NALP1 的 mRNA 及蛋白表达量明显低于正常人成骨细胞,这提示 NALP1 基因在肿瘤细胞中的低表达状态可抑制肿瘤细胞凋亡而引起细胞异常增殖,可能与肿瘤的发生及局部浸润密切相关,进而为骨肉瘤的基因诊断提供了一种肿瘤标记物。而将外源性 NALP1 基因转染骨肉瘤细胞,从而上调 NALP1 基因的表达,再加入抗肿瘤药物刺激细胞凋亡,从实验结果看,肿瘤细胞组及空质粒转染肿瘤细胞组的细胞在抗肿瘤药物甲氨蝶呤的作用下出现了细胞早期及后期凋亡,早期凋亡率分别为 26.9%和 24.2%,后期凋亡率为 27.3%、32.4%,而 NALP1 转染肿瘤细胞组细胞的早期凋亡率为 72.1%,后期凋亡率为 26.4%,

三组细胞的后期细胞凋亡率则差别不大,但是 NALP1 转染肿瘤细胞组的细胞早期细胞凋亡率明显高于前两组,这表明,高表达 NALP1 基因可以促进肿瘤细胞凋亡,实验结果为骨肉瘤疾病的基因治疗提供一个指导方向。但从目前的研究结果看,对于 NALP1 促进肿瘤细胞凋亡的具体的细胞信号通路还没有被完全明确,其上游及下游靶基因及其作用方式还没有被完全了解,我们相信随着针对骨肉瘤癌变机制、癌细胞信号转导、癌细胞遗传特征等的研究深入,针对骨肉瘤的诊断及治疗必将取得重大突破。

参考文献(References)

[1] Kristof Kersse, Mathieu J.M. Bertrand, Mohamed Lamkanfi, et al. NOD-like receptors and the innate immune system: Coping with dan-

- ger,damage and death [J].Cytokine & Growth Factor Reviews, 2011,22:257-276
- [2] Magdalena Zurawek, Marta Fichna, Danuta Januszkiewicz-Lewandowska, et al. A coding variant in NLRP1 is associated with autoimmune Addison's disease [J]. Human Immunology,2010,71: 530-534
- [3] Benjamin Faustin,Lydia Lartigue,Frederic Luciano, et al. Reconstituted NALP1 Inflammasome Reveals Two-Step Mechanism of Caspase-1 Activation[J]. Molecular Cell,2007,25(5):713-724
- [4] Hlating T,Guo RF,Dilley KA, et al. Molecular cloning and characterization of DEFCAP-L and -S,two isoforms of a novel member of mammalian Ced-4 family of apoptosis proteins [J]. J Biological Chemistry,2001,276(12) :9230-9238
- [5] Grace Y. Chen, Gabriel NÚÑEZ. Reviews in basic and clinical gastroenterology and hepatology [J]. Gastroenterology, 2011, (141): 1986-1999
- [6] Linde Duprez, Ellen Wirawan, Tom Vanden Berghe, Peter Vandenabeele. Major cell death pathways at a glance [J]. Microbes and Infection,2009,11,1050-1062
- [7] Jakob K. Anninga, Hans Gelderblom, Marta Fiocco, et al. Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma:Where do we stand[J]. European Journal of Cancer, 2011,47:2431-2445
- [8] J. Majó , R. Cubedo, N. Pardo. Treatment of Osteosarcoma. A Review [J]. Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología, 2010,54(5): 329-336
- [9] Marianna S, Zsuzsa P. Allelic losses from chromosome 17 in human osteosarcoma[J].Pathol Oncol Res,1997,3:115-120
- [10] Dahlin DC. Pathology of osteosarcoma [J]. Clin Orthop,1975,111: 23-32
- [11] CS Siller, IJ Lewis. Update and review of the management of bone tumours[J]. Paediatrics and Child Health, 2010, 20(3): 103-108
- [12] Austin L. Hughes. Evolutionary relationships of vertebrate NACHT domain-containing proteins [J] Immunogenetics,2006,58:785-791
- [13] Kummer JA, Broeckhuizen R. Inflammasome components NALP1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues, suggesting a site-specific role in the inflammatory response [J]. J Histochem Cytochem,2007,55:443-452
- [14] Martinon F, Tschopp J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens[J]. Trends Immunol, 2005,26:447-454
- [15] Jean-Marie Bruey, Nathalie Bruey-Sedano, Frederic Luciano, et al. Bcl-2 and Bcl-XL Regulate Proinflammatory Caspase-1 Activation by Interaction with NALP1[J]. Cell, 2007,01:045
- [16] Church LD, Cook GP, McDermott ME.Primer:inflammasomes and interleukin 1 β in inflammatory disorders[J]. Nat ClinPract Rheumatol, 2008, 4:34-42
- [17] Gerl R,Vaux DL.Apoptosis in the development and treatment of cancer[J]. Carcinogenesis 2005,26:263-270
- [18] Garabet Yeretssian,Katherine Labbé ,Maya Saleh. Molecular regulation of inflammation and cell death [J]. Cytokine, 2008,43 :380-390
- [19] Szilvia Benko, Dana J. Philpott, Stephen E. Girardin. The microbial and danger signals that activate Nod-like receptors [J]. Cytokine, 2008,43:368-373
- [20] Oldenhuis CN, Oosting SF, Gietema JA, de Vries EG. Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology [J]. Eur J Cancer, 2008,44:946-953