

NDRG2 通过影响 CD24 调控乳腺癌细胞的粘附能力 *

郑 瑾^{1,2} 刘 强³ 史恒军² 任秦有² 杨建刚² 刘新平⁴ 刘文超^{1△}

(1 第四军医大学西京医院肿瘤中心 陕西 西安 710032 ;2 第四军医大学唐都医院中医科暨中西医结合肿瘤科 陕西 西安 710038 ;

3 第四军医大学唐都医院血液科 陕西 西安 710038 ;4 生物化学与分子生物学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的 :阐明 NDRG2(N-Myc downstream-regulated gene 2)在乳腺癌细胞中对 CD24 的调控及其对乳腺癌细胞粘附能力的影响。方法 :RT-PCR 和 Western blot 方法检测乳腺癌细胞 MCF-7 及 Bcap-37 中 NDRG2 和 CD24 的表达 ;通过腺病毒上调 MCF-7 细胞中 NDRG2 的表达 ,或利用 siRNA 下调 Bcap-37 细胞中 NDRG2 的表达 ,检测 CD24 基因和蛋白的变化。粘附实验检测改变 NDRG2 表达水平后对 MCF-7 及 Bcap-37 细胞粘附能力的影响。结果 :MCF-7 细胞中 NDRG2 基因和蛋白的表达水平低于 Bcap-37 细胞,而 CD24 的表达水平高于 Bcap-37 细胞 ;在 MCF-7 细胞中通过腺病毒载体上调 NDRG2 可以抑制 CD24 的表达并抑制其粘附能力 ,而在 Bcap-37 细胞中利用 siRNA 下调 NDRG2 的表达可以提高 CD24 的水平及细胞的粘附能力 ;结论 :NDRG2 通过影响 CD24 参与调控乳腺癌细胞的粘附能力。

关键词 NDRG2 ;CD24 ;乳腺癌细胞 ;粘附

中图分类号 R737.9 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273(2012)01-5-04

NDRG2 Expression Regulates CD24 and Adhesion Potential of Breast Cancer Cells*

ZHENG Jin^{1,2}, LIU Qiang³, SHI Heng-jun², REN Qin-you², YANG Jian-gang², LIU Xin-ping⁴, LIU Wen-chao^{1△}

(1 Department of Oncology and State Key Discipline of Cell Biology, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China; 2 Department of Integrated traditional and western medicine of Oncology, Tangdu Hospital, Xi'an, 710038; 3 Department of Hematology, Tangdu Hospital, Xi'an, 710038; 4 Department of Biochemistry and Molecular Biology, the Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of N-Myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) on the adhesion potential of breast cancer cells. **Methods:** Gene and protein expressions of NDRG2 and CD24 were analyzed in MCF-7 and Bcap-37 cells. The expression of CD24 and cell adhesion ability was detected after NDRG2 by adenovirus or siRNA treatment. **Results:** Both the gene and protein expressions of NDRG2 in MCF-7 cells were lower than Bcap-37 cells. In contrast, CD24 expression is higher in MCF-7 cells compared to that in Bcap-37 cells. Up-regulated NDRG2 expression leads to the decrease in CD24 expression and cell adhesion ability in MCF-7 cells. In contrast, NDRG2 down-regulation results in enhancing the expression of CD24 and cell adhesion potential in Bcap-37 cells. **Conclusion:** NDRG2, associated with altered CD24 expression, regulates breast cancer cells adhesion ability.

Key words: NDRG2; CD24; Breast cancer cell; Adhesion

Chinese Library Classification (CLC): R737.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)01-5-04

前言

乳腺癌占女性所有恶性肿瘤的 10%以上 ,是女性第二大常见肿瘤。乳腺癌具有较高的侵袭和转移能力 ,尽管早期诊断和有效的治疗使得乳腺癌的临床预后有所改善 ,但许多患者仍然发生了远处转移并最终死亡^[1]。

NDRG2 (GenBank Accession No. AF159092)是 NDRG 家族的一员 ,该家族包括 4 个成员 :NDRG1~4。NDRG2 蛋白分布在胞浆中 ,参与了细胞生长和分化等重要分子事件^[2]。作为抑癌候选基因 ,NDRG2 在乳腺癌的发生形成过程中同样发挥着重要作用。与正常乳腺组织和癌旁组织相比 ,NDRG2 在癌组织

中表达显著下调^[3]。进一步研究证实 NDRG2 能够抑制乳腺癌细胞增殖 ,促进其凋亡^[4]。另外 ,NDRG2 能够通过诱导 BMP-4 的表达 ,抑制 MMP-9 ,从而抑制乳腺癌细胞的转移能力^[5]。总之 ,NDRG2 与乳腺癌的发生发展有密切的关系。然而 ,NDRG2 抑制乳腺癌转移的确切机制仍未明了。本实验通过在乳腺癌细胞中上调或下调 NDRG2 的表达 ,进而检测其粘附能力 ,阐明了 NDRG2 抑制乳腺癌细胞粘附能力的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞系 MCF-7 及 Bcap-37 购自中科院上海细胞

* 基金项目 国家自然科学基金(81072973)

作者简介 :郑瑾(1973-) ,女 ,博士 ,讲师 ,主要研究方向 肿瘤微环境及其转移的分子机制

△通讯作者 :刘文超 ,电话 :029-84775407 ,E-mail: xjcancer@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2011-06-06 接受日期 2011-06-30)

库,DMEM 完全培养基,10%胎牛血清,TRIzol 购自 Invitrogen 公司,表达人 NDRG2(AdNDRG2)或 β -半乳糖苷酶(AdLacZ)的腺病毒载体购自本源正阳公司,PCR 反应引物及特异性抑制 NDRG2 表达的 siRNA (siRNA-NDRG2) 或阴性对照 (siRNA-NC)由 TaKaRa 公司设计合成,反转录试剂盒,SYBR Green PCR Master Mix,ABI PRISM 7500 序列检测系统购自 Applied Biosystems 公司,NC 膜购自 Amersham Biosciences 公司,小鼠抗人 NDRG2 单抗,小鼠抗人 CD24 单抗,小鼠抗人 β -actin 单抗购自 Santa Cruz 公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养

乳腺癌细胞 MCF-7 及 Bcap-37 用 DMEM 完全培养基(含 10%胎牛血清),在 5% CO₂ 饱和湿度、37 °C 培养箱内常规传代培养。

1.3 腺病毒感染

6 孔板中每孔种 5×10⁵ 个 MCF-7 细胞,待细胞长至 80% 底面积时,AdNDRG2,AdLacZ 处理 48 h。病毒感染量为 40MOI(根据预实验结果)。

1.4 siRNA 转染

6 孔板中每孔种 5×10⁵ 个 Bcap-37 细胞,待细胞长至 80% 底面积时,脂质体法转染 siRNA-NDRG2 或 siRNA-NC 作用细胞 48 h。

1.5 RT-PCR

TRIzol 法从细胞中提取总 RNA 并定量。每份样品取 5 μ g 逆转录成 cDNA 后作为 RT-PCR 的模版。NDRG2 上游引物 5'-ATGGCGGAGCTGCAGGAGGTGC-3',下游引物 5'-TGAGGAACGAGGTCTGGGTGGG-3'; CD24 上游引物 5'-ACCTGTTCCATTCAACAAGAGCAC-3',下游引物 5'-TCTGAGATCGCACCCTGCAC-3'; β -actin 上游引物 5'-GATCATTGCTCCTCCTGAGC-3',下游引物 5'-TGTGGAAGTGGGAGAGGACT-3'。反应体系:14.5 μ L DEPC 水,2.5 μ L Buffer, dNTP 0.5 μ L, Taq 酶 0.5 μ L, 上游、下游引物各 1 μ L, 5 μ L cDNA 模版,共 25 μ L。反应条件:94 °C 热变性 5 min, 35 个循环:94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 最后 72 °C, 10min。

1.6 Real-time PCR

TRIzol 法从细胞中提取总 RNA 并定量。每份样品取 2 μ g 逆转录成 cDNA 后作为 Real-time PCR 的模版。NDRG2 上游引物 5'-GCCCAGCGATCCTTACCTACC-3',下游引物 5'-GGCTGCCCAATCCATCCAACC-3'; CD24 上游引物 5'-ACCTGTTCCATTCAACAAGAGCAC-3',下游引物 5'-TCTGAGATCGCACCCTGCAC-3'; β -actin 上游引物 5'-GATCATTGCTCCTCCTGAGC-3',下游引物 5'-TGTGGAAGTGGGAGAGGACT-3'。SYBR Green PCR Master Mix 及 ABI PRISM 7500 序列检测系统检测反应产物的相对定量。反应体系:12.5 μ L SYBR Green PCR Master Mix, 上游、下游引物各 10 pmol, 5 μ L cDNA 模版,共 25 μ L。反应条件:95 °C 热变性 10 s, 共一个循环;两步法:95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 共 45 个循环。

1.7 Western blot

RIPA 裂解液(0.05 mol/L Tris-HCl [pH 7.4], 0.15 mol/L NaCl, 1% NP-40, 1 mmol/L EDTA,使用前加入蛋白酶抑制剂)提取

细胞蛋白。BCA 法测定蛋白浓度,聚丙烯酰胺凝胶电泳后将蛋白转至 NC 膜上。一抗用抗 NDRG2(1:1000)单抗,抗 CD24(1:500)单抗,抗 β -actin(1:2000)单抗。二抗为 HRP 标记的种属匹配的二抗。增强化学发光剂显色。

1.8 粘附实验

型胶原预处理的 24 孔板中每孔种腺病毒或 siRNA 作用 48 小时后的细胞 1×10⁵ 个,培养 80 min。PBS 清洗两遍以去除未粘附的细胞。在光镜下随机选取 5 个视野计数剩余粘附的细胞。每组计数 5 个孔,实验重复三次。

1.9 统计分析

数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,计量资料采用统计学软件 SPSS 16.0 进行单因素方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NDRG2 和 CD24 在乳腺癌细胞中的表达

本研究检测了 NDRG2 和 CD24 在两种乳腺癌细胞系 MCF-7 及 Bcap-37 中的表达水平,结果发现 NDRG2 基因和蛋白在 MCF-7 细胞中表达较低,在 Bcap-37 中表达较高;而 CD24 在 MCF-7 细胞中表达较高,在 Bcap-37 中表达较低(见图 1,图 2)。

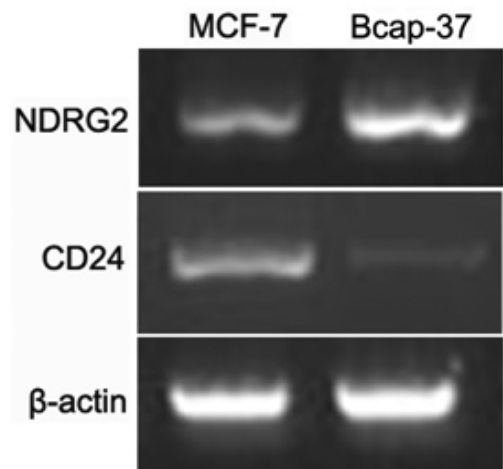


图 1 MCF-7 和 Bcap-37 细胞中 NDRG2 mRNA 的含量

Fig.1 The expression of NDRG2 mRNA in MCF-7 and Bcap-37 cells

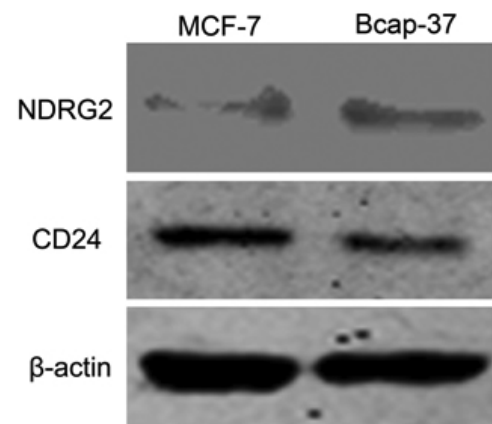


图 2 MCF-7 和 Bcap-37 细胞中 NDRG2 蛋白的含量

Fig.2 The expression of NDRG2 protein in MCF-7 and Bcap-37 cells

2.2 NDRG2 调控 CD24 在乳腺癌细胞中的表达

为了进一步证实 NDRG2 和 CD24 在乳腺癌细胞中的关系,本研究在 NDRG2 表达水平较低的 MCF-7 细胞中通过腺病毒载体上调 NDRG2 的表达,Real-time PCR 及 Western blot 结果显示,与 AdLacZ 相比,AdNDRG2 能够有效上调 MCF-7 细胞中 NDRG2 的水平,而 NDRG2 含量的提高降低了 MCF-7 细胞中 CD24 的表达(见图 3)。当在 NDRG2 表达水平较高的 Bcap-37 细胞中通过 siRNA 下调 NDRG2 的表达后,该细胞中 CD24 的水平升高(见图 4)。

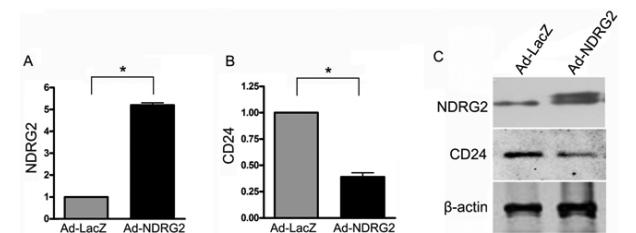


图 3 MCF-7 细胞中上调 NDRG2 的含量抑制了 CD24 的表达 (*P<0.05)
Fig.3 NDRG2 up-regulation inhibited the expression of CD24 in MCF-7 cells (*P<0.05)

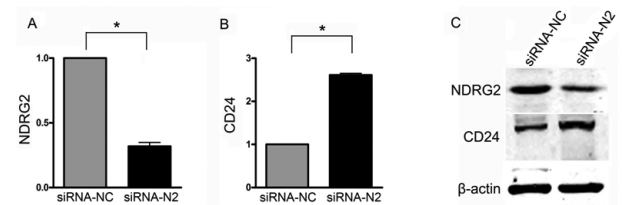


图 4 Bcap-37 细胞中下调 NDRG2 的含量促进了 CD24 的表达 (*P<0.05)
Fig.4 NDRG2 down-regulation increased the expression of CD24 in Bcap-37 cells (*P<0.05)

2.3 NDRG2 通过抑制 CD24 调控乳腺癌细胞的粘附能力

CD24 与肿瘤的粘附能力密切相关,因此我们检测了在改变 NDRG2 表达水平的情况下,乳腺癌细胞的粘附能力是否有改变。通过腺病毒上调 MCF-7 细胞中 NDRG2 的表达后,该细胞的粘附能力显著下降(见图 5)。而通过 siRNA 下调 Bcap-37 细胞中 NDRG2 的表达后,该细胞的粘附能力显著提高(见图 6)。

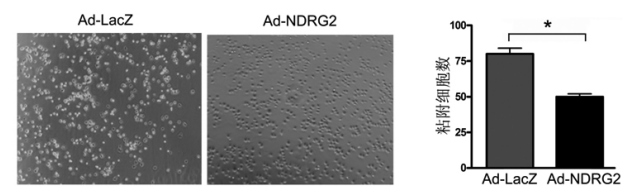


图 5 上调 NDRG2 的含量抑制了 MCF-7 细胞的粘附能力 (*P<0.05)
Fig.5 NDRG2 up-regulation inhibited the adhesion ability of MCF-7 cells (*P<0.05)

随着对 NDRG2 这一抑癌候选基因研究的深入,发现 NDRG2 不仅能够抑制肿瘤细胞增殖,促进其凋亡,而且还能有效的抑制肿瘤细胞的侵袭和转移。邓艳春等^[6]发现将 NDRG2

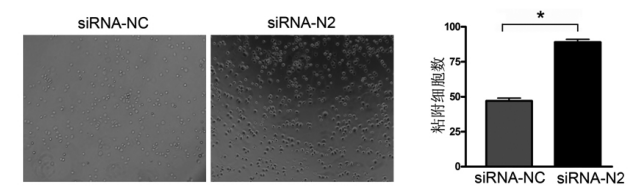


图 6 下调 NDRG2 的含量提高了 Bcap-37 细胞的粘附能力 (*P<0.05)
Fig.6 NDRG2 down-regulation increased the adhesion ability of Bcap-37 cells (*P<0.05)

基因转入胶质瘤细胞后抑制了瘤细胞增殖,刘新平等^[7]发现胃癌细胞转染 NDRG2 后可抑制细胞增值。Lorentzen 等^[8]研究表明结肠癌及高危腺瘤中 NDRG2 的 mRNA 表达量显著低于正常组织。胡晓岚等发现在肝癌及胰腺癌标本中,NDRG2 基因表达量明显低于癌旁及正常组织^[9]。吴国强^[10]等发现过表达 NDRG2 可使肝癌细胞阻滞于 G1 期并伴有大量凋亡。Lee 等研究表明 NDRG2 能通过拮抗 TGF-β1 起到抑制肝癌转移的作用^[11]。另外在脑膜瘤、甲状腺癌、肾透明细胞癌和皮肤癌中也发现 NDRG2 表达减低。在针对乳腺癌的研究中,刘娜等^[12]发现在 21 例乳腺肿瘤组织中有 5 例、在 4 种乳腺癌细胞系中有 3 种 NDRG2 表达水平明显下调。

人的 CD24 分子具有典型的蛋白样结构,是一种高度糖基化的低分子量蛋白质黏附分子^[13],CD24 阳性的肿瘤细胞更容易与血小板及内皮细胞黏附并参与肿瘤转移^[14]。多个体内外实验均证实 CD24 高表达于多种肿瘤细胞表面并参与调节肿瘤生长、侵袭及转移相关特性。在乳腺癌中,Fogel 等^[15]发现 CD24 表达量随肿瘤组织学分级增高而增加。侵袭性乳腺癌中 CD24 于细胞质和膜上都有表达,其表达量和乳腺癌淋巴转移、高病理分期显著相关。本研究前期基因芯片的结果提示,NDRG2 能够调控 CD24 的表达。CD24 是许多恶性肿瘤的标志分子,与肿瘤细胞的粘附和转移能力相关。乳腺癌细胞中 CD24 的表达增高,其表达水平与患者的预后及淋巴结侵袭有密切的关系。有研究报道 CD24 通过与 P-selectin 相互作用,从而调控了乳腺癌的进展、转移^[16]。因此,可以认为 NDRG2 抑制乳腺癌细胞的转移可能是通过影响 CD24 实现的。本实验结果证实了这一设想:在乳腺癌细胞中,NDRG2 的表达水平与 CD24 呈负相关,上调 NDRG2 可以抑制 CD24 的表达,降低细胞的粘附能力;而下调 NDRG2 则起到相反的作用。深入的研究将阐明 NDRG2 调控 CD24 表达的分子机制,并且为临床上治疗肿瘤转移提供理论依据。

参考文献(References)

[1] Popescu NC, Zimonjic DB. Chromosome and gene alterations in breast cancer as markers for diagnosis and prognosis as well as pathogenetic targets for therapy [J]. Am J Med Genet, 2002, 115: 142-149
[2] Shen L, Zhao ZY, Wang YZ, et al. Immunohistochemical detection of NdrG2 in the mouse nervous system [J]. Neuroreport, 2008, 19: 927-931

3 讨论

- [3] Liu N, Wang L, Liu X, et al. Promoter methylation, mutation, and genomic deletion are involved in the decreased NDRG2 expression levels in several cancer cell lines [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 358: 164-169
- [4] Liu N, Wang L, Li X, et al. N-Myc downstream-regulated gene 2 is involved in p53-mediated apoptosis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36: 5335-5349
- [5] Shon SK, Kim A, Kim JY, et al. Bone morphogenetic protein-4 induced by NDRG2 expression inhibits MMP-9 activity in breast cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 385: 198-203
- [6] Deng YC, Yao LB, Chau L, et al. N-Myc downstream-regulated gene2 (NDRG2) inhibits glioblastoma cell proliferation [J]. *Int J Cancer*, 2003, 106(3): 342-347
- [7] 刘新平,邓艳春,韩炯,等. Ndr2 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
Liu Xin-ping, Deng Yan-chun, Han Jiong, et al. Effect of Ndr2 Gene Expression on Gastric Carcinoma Cell Proliferation [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2003,30 (1): 116-121
- [8] Lorentzen A, Vogel LK, Lewinsky RH, et al. Expression of NDRG2 is down-regulated in high-risk adenomas and colorectal carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2007,(7): 192
- [9] Hu XL, Liu XP, Lin SX, et al. NDRG2 expression and mutation in human liver and pancreatic cancers. [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10 (23): 3518-3521
- [10] 吴国强,刘新平,王立峰,等. NDRG2 对肝癌细胞 HepG2 凋亡的诱导作用[J]. *细胞与免疫学杂志*, 2003,19(4): 357-360
Wu Guo-qiang, Liu Xin-ping, Wang Li-feng, et al. Induction of apoptosis of Hep G2 cells by NDRG2 [J]. *Chin j cell mol immunol*, 2003,19(4): 357-360
- [11] Lee DC, Kang YK, Kim WH, et al. Functional and clinical evidence for NDRG2 as a candidate suppressor of liver cancer metastasis. *Cancer Res*, 2008, 68: 4210-4220
- [12] Liu N, Wang L, Liu X, et al. Promotermethylation, mutation, and genomic deletion are involved in the decreased NDRG2 expression levels in several cancer cell lines [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007,358 (1): 164-169
- [13] Kay R, Rosten P M, Humphries R K. CD24, a signal transducermodulating B cell activation responses, is a very short peptide with a glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor [J]. *J Immunol*, 1997, 147 (4): 1412-1416
- [14] Friedrichs J, Zeller Y, Hafezi-Moghadam A, et al. The CD24/P-selectin binding pathway initiates lung arrest of human A125 adenocarcinoma cells[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(23): 6714-6722
- [15] Fogel M, Friedrichs J, Zeller Y, et al. CD24 is a marker for human breast carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 1999, 143(1): 87-94
- [16] Aigner S, Ramos CL, Hafezi-Moghadam A, et al. CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin[J]. *FASEB J*, 1998, 12: 1241-1251

(上接第 15 页)

- [7] Wang XX, Zhang, FR,Shang Y, et al. Transplantation of Autologous Endothelial Progenitor Cells May Be Beneficial in Patients with Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension [J].*Journal of the American College of Cardiology*, 2007(14):1566-1571
- [8] Long L, Crosby A, Yang X, et al. Altered bone morpho-genetic protein and transforming growth factor-beta signaling in rat models of pulmonary hypertension: potential for activin receptor- like kinase-5 inhibition in prevention and progression of disease [J]. *Circulation*, 2009, 119 (4): 566-576
- [9] 王聪,刘文莉,王海英,等.内源性硫化氢抑制高肺血流大鼠肺动脉弹力蛋白的表达[J]. *基础医学与临床*, 2007, 27(12): 1329-1333
Wang Cong, Liu Wenli, Wang Haiying, et al. Endogenous hydrogen sulfide inhibits expression of elastin of pulmonary artery with high pulmonary blood flow in rats [J]. *Basic& Clinical Medicine*, 2007, 27 (12): 1329-1333
- [10] Morrell NW, Yang X, Upton PD, et al. Altered growth responses of pulmonary artery smooth muscle cells from patients with primary pulmonary hypertension to transforming growth factor-beta1 and bone morphogenetic proteins[J]. *Circulation*, 2001, 104(7): 790-795
- [11] Moussad E E, Brigstock D R. Connective tissue growth factor: what's in a name? [J].*Mol Genet Metab*, 2000, 71(1-2): 276-292
- [12] Kidd M, Modlin IM, Shapiro MD, et al. CTGF, intestinal stellate cells and carcinoid fibrogenesis [J].*World J Gastroenterol*, 2007, 13 (39): 5208-5216
- [13] Grotendorst GR, Lau LF, Perbal.B.CCN Proteins are distinee from and should not be considered members of theinsulin-like growth factor-binding protein superfamily [J].*Endocrinology*, 2000,14 (6): 2254-2256
- [14] Shimo T, Koyama E, Sugito H, et al. Retinoid signaling regulates CTGF expression in hypertrophic chondrocytes with differential involvement of MAP kinases [J]. *J Bone Miner Res*, 2005, 20 (5): 867-877
- [15] Junglas B, Yu AH, Tamm ER, et al. Connective tissue growth factor induces extracellular matrix deposition in human trabecular meshwork cells[J]. *Exp Eye Res*, 2009, 88(6):1065-1075