

【论著】

hNIS基因转染介导碘-131杀伤肝癌细胞的研究

朱伟¹, 宁尚义¹, 李素萍², 孙作忠¹, 王传玺³, 于文霞¹, 孙自平¹, 孟斌¹

中图分类号: Q691 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2010)04-0391-13

【摘要】 目的 将 hNIS 基因转染到肝癌细胞使其具备主动吸收碘的功能, 观察转基因肝癌细胞吸收碘的能力, 并进一步观察其介导放射性碘杀伤肝癌细胞的可能性。方法 重组含有 hNIS 的载体, 并转染至肝癌细胞 HepG2, 利用稳定表达的转基因肝癌细胞进行吸碘能力测定, 并应用 MTT 法测定碘-131 杀伤肝癌细胞的效果。结果 γ 计数器测定表达 hNIS 基因的肝癌细胞吸收碘的能力比对照组高 10 倍, MTT 法测定结果显示表达 hNIS 基因的肝癌细胞抑制率明显高于对照组。结论 转基因肝癌细胞具有浓聚碘的能力, 并且可以介导碘-131 杀伤肝癌细胞。

【关键词】 人钠 碘同向转运体; 肝癌; 基因转染; 放射性碘治疗

Research of Kill the Liver cancer Cells by Transfect hNIS Gene into It Across Radioactive Iodine Uptake. ZHU W ei NING Shang-yi LI Su-ping et al Institute of Radiation Medicine Shandong Academy of Medical Sciences Jinan 250062 China

【Abstract】 Objective We transfected the human sodium / iodide symporter (hNIS) gene into liver-cancer cells to help it have the ability of iodine uptake to assess the effect of radioactive iodine uptake by liver-cancer cells and the role of anti-hepatoma by radioactive iodine. Methods Recombinant pCDNA-hNIS was transfected into HepG2 cells. The level of ¹³¹I uptake was assessed using transgenic liver cells stably expressing hNIS and effect of anti-hepatoma was determined by MTT method. Results ¹³¹I uptake was observed in HepG2 cells transfected with pCDNA-hNIS compared with the control group by γ counting correspondingly. The effect of anti-hepatoma was significantly higher in transgenic HepG2 cells compared with the controls. Conclusion HepG2 cells transfected with pCDNA-hNIS could uptake ¹³¹I, accordingly inhibited by ¹³¹I.

【Key words】 hNIS liver-cancer Gene-transfect Radioactive iodine therapy

肝癌是威胁人类的常见病,也是人类生命的主要“杀手”之一。传统的放、化疗存在抗肿瘤能力低、杀伤指数过小、副作用大等缺点。人钠 碘同向转运体 (human sodium/iodide symporter, hNIS) 主要存在于甲状腺滤泡细胞基底膜上,是甲状腺细胞摄取碘的分子基础。hNIS 基因的克隆成功,使 hNIS 基因介导放射性核素进行肿瘤的基因治疗成为国内外的研究热点之一,但在肝癌治疗中少有报道。本研究将 hNIS 基因转染到肝癌细胞,使肝癌细胞表达 hNIS 这种膜蛋白,从而使肝癌细胞可以浓集放射性碘,进而介导放射性碘杀伤肝癌细胞,为探索肝癌治疗新途径提供了实验依据。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 菌株、载体、细胞和组织 大肠杆菌 DH5 α 、pCDNA3.1 (-) 载体、肝癌细胞株 HepG2 由本实验室保存。甲状腺山东

基金项目: 山东省自然科学基金青年基金项目 (Q2007C07)

作者单位: 1 山东省医学科学院放射医学研究所, 山东 济南 250062 2 山东省鄄城县闫什计生站; 3 山东大学附属省立医院肿瘤治疗中心

作者简介: 朱伟 (1973~), 男, 助理研究员, 主要研究方向: 放射性核素治疗。

通讯作者: 李素萍

省肿瘤医院提供。

1.1.2 主要试剂 TRzol 购自 Invitrogen 公司; RT-PCR 试剂盒, DL2000 PMD18+T 载体, 限制性内切酶 BamHI、EcoRI、T4 DNA Ligase 均购自 Takara 公司; Agarose 购自 BOWEST 公司; Gel Extraction Kit 和 Plasmid Mini Kit 购自 OMEGA 公司。DMEM 培养基购自 GIBCO 公司, 胎牛血清购自杭州四季青公司, 其他生化试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 按照 TRzol 说明书提取甲状腺中总 RNA。

1.2.2 引物设计 根据 GenBank 人类 hNIS 的 cDNA 基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计相应的 PCR 扩增引物, 见下表 1 其中, hNIS 基因序列的大小为 1913 bp 且为便于后续定向克隆正义引物 5' 端分别加 EcoRI 与 BamHI 酶切位点修饰 (下划线)。然后, 于 GenBank 上进行 BLAST 比对检测其特异性。引物为上海博尚公司合成。

1.2.3 RT-PCR 扩增 于 DEPC 处理过 0.2 ml Eppendorf 管中, 以甲状腺提取总 RNA 为模板, 按照 RT-PCR 反应试剂盒说明书, 反转录克隆 hNIS 基因。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

[3] Lubin JH, Wang ZY, Boice JD et al. Risk of lung cancer and residential radon in China: Pooled results of two studies [J]. Int J Cancer 2004; 109(1): 132-137

[4] World Health Organization (WHO). WHO Handbook on Indoor Radon: a Public Health Perspective [M]. Paris: WHO Press, 2009: 83-93

[5] International Commission on Radiological Protection (ICRP). Protection against ²²²Rn at home and at work [M]. Annals of ICRP Publication No. 65. Oxford: Pergamon Press, 1993

[6] United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR). Sources-to-Effects Assessment for Radon in Homes and Workplaces [R]. UNSCEAR 2006 Report Annex E. New York: United Nations, 2009

[7] Iskandar D, Yamazawa H, Iida T. Quantification of the dependency of radon emanation power on soil temperature [J].

Appl Radiat Isot 2004; 60(6): 971-973

[8] Kōrashi J, Amano H, Andoh M et al. Estimation of ²²²Rn flux from ground surface based on the variation analysis of ²²²Rn concentration in a closed chamber [J]. Radiat Prot Do-sim 2000; 87(2): 121-131

[9] 张培坤, 郭力民. 浙江气候及其应用 [M]. 北京: 气象出版社, 1999: 1-24

[10] Zhuo W, Iida T, Furukawa M. Modeling radon flux density from the earth's surface [J]. J Nucl Sci Technol 2006; 43(4): 479-482

[11] Sesana L, Caprioli E, Marazzan GM. Long period study of outdoor radon concentration in Milan and correlation between its temporal variations and dispersion properties of atmosphere [J]. J Environ Radioact 2003; 65(2): 147-160

(收稿日期: 2010-10-08)

表 1 本实验研究设计的引物

待扩基因	引物序列
hNIS upper	5'CGGAATTCATGGAGGCCGTGGAGACCG 3'
lower	5'GCGGATCCCTCAGAGGTTTGTCTCTCCIGC 3'

1.2.4 真核表达载体的构建 凝胶回收 hNIS的 PCR产物, 连入 pMD18-T载体 (命名为 pMD-hNIS)。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 涂布于 100 mg/L 氨苄青霉素 (Amp) 琼脂 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。挑取单菌落, 于 100 mg/L Amp 液体 LB 培养基 37 $^{\circ}$ C 过夜摇菌。Plasmid MiniKit 提取质粒, 通过 PCR 和酶切验证。

1.2.5 hNIS 连入 pCDNA3.1(-) 载体 用限制性内切酶 EcoR I 与 BamH I 分别双酶切 pMD-hNIS 和 pCDNA3.1(-) 质粒, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4h 后, 酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果。将回收的目的基因 hNIS 与线性载体 pCDNA3.1(-) 按摩尔数之比 3:1 混合, 16 $^{\circ}$ C 过夜, 重组载体命名为 pCDNA-hNIS。

1.2.6 重组载体的鉴定 以 pCDNA-hNIS 重组载体为模板, 利用相对应的引物对扩增 hNIS 进行 PCR 产物电泳鉴定。用限制性内切酶 EcoR I 与 BamH I 双酶切重组载体, 酶切产物电泳鉴定。

1.2.7 细胞培养 DMEM 加 10% FBS 培养 HepG2 细胞, 每 3 天换液 1 次, 0.25% 的胰酶消化传代, 显微镜下观察。

1.2.8 细胞转染 参考脂质体 Lipofectamine 2000 说明书, 在 24 孔板中进行。每孔用脂质体 2 μ l 质粒 pCDNA-hNIS 0.8 μ g 转染 72h 后, 胰酶消化 1:10 传代, 加 80 μ g/mL G418 筛选, 直至转染细胞克隆的形成, 并对克隆细胞株进行扩增培养。

1.2.9 稳定转染细胞的鉴定 克隆细胞株扩增培养后用分别提取总蛋白, 利用人钠 碘同向转运体抗体进行 Western blot 鉴定。

1.2.10 转染细胞摄碘能力的测定 我们把稳定表达 hNIS

的 HepG2 细胞和对照组 (没有转入 hNIS 的 HepG2 细胞) 分别用 3.7MBq/ml 的 Na-131 的 HBSS 溶液培养 7h 用 HBSS 溶液反复冲洗细胞 3 次, 分别用 γ 计数器测定两组细胞的每分钟 cpm 计数, 以测定转染细胞吸碘能力。

1.2.11 MTT 实验 选取 1 \times 10³ 个稳定表达的细胞接种于 96 孔板, 加入碘-131 后培养 7h 用 HBSS 溶液清洗 3 次, 继续培养 1.2.3.4.5d 用快速翻转法倒掉原培养基, 每孔加入无血清的 DMEM 培养液 200 μ l 及 5mg/ml 的四氮唑蓝盐 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide MTT] 20 μ l, 继续培养 4h 吸出液体, 每孔加入二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide DMSO) 150 μ l 室温孵育 10min 微振荡器振荡 15min 用 B γ -Rad 酶联免疫检测仪在 570nm 测光密度值。

1.2.12 统计学处理 检测结果用 SPSS13.0 统计软件 检验方法进行统计分析。

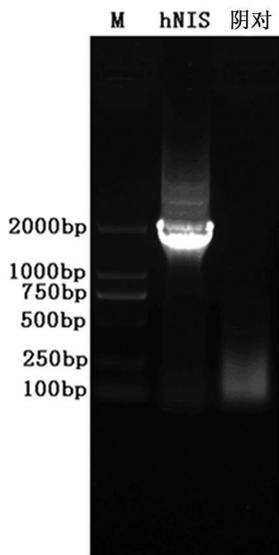
2 结果

2.1 总 RNA 提取 从甲状腺提取的总 RNA 经过微量核酸定量仪检测 OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1.85。

2.2 hNIS 的克隆 以提取 RNA 为模板反转录得到 cDNA 以 cDNA 为模板利用表 1 中 hNIS 引物对进行 PCR 扩增, PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增得到图 1 得到的片段大小与已知的一致。

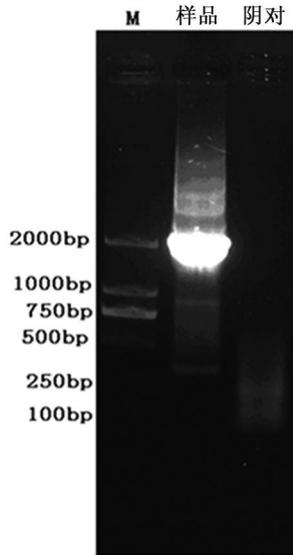
2.3 重组载体 PCR 鉴定 以 pCDNA-hNIS 重组载体为模板, 利用表 1 中 hNIS 引物对扩增 hNIS 片段, 同时设阴性对照组, PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增得到图 2 得到的片段大小与已知的一致。

2.4 重组载体酶切鉴定 用限制性内切酶 EcoR I 与 BamH I 双酶切 pCDNA-hNIS 重组载体, 同时设阴性对照组。切下的小片段为 hNIS 基因 (1913 bp), 大片段为载体 pCDNA (5.4kb)。酶切产物电泳鉴定进行 1% 琼脂糖凝胶电泳得到图 3 得到的片段大小与已知的一致。



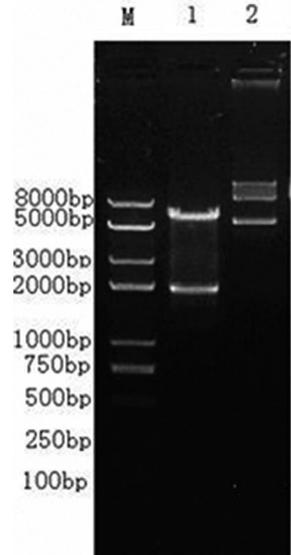
泳道 M: DL2000 marker; hNIS (1913bp); 阴对: 阴性对照。

图 1 hNIS 的 RT-PCR 电泳图



泳道 M: DL2000 marker; 样品: hNIS (1913bp); 阴对: 阴性对照。

图 2 重组载体 PCR 电泳图



泳道 M: DL2000 plus marker
1: pCDNA-hNIS hNIS (1913 bp);
2: 未酶切 pCDNA-hNIS

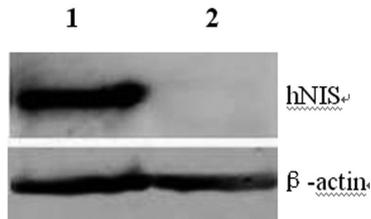
图 3 重组载体酶切电泳图

2.5 Western blot 利用 Western blot 进一步验证 hNIS 蛋白表达情况, 结果显示 hNIS 在细胞株中稳定表达 (图 4)。

2.6 HepG2 细胞吸碘能力的测定 测定结果转染 hNIS 的细胞 γ 计数为 (4260 \pm 232) min⁻¹; 对照组 γ 计数为 (360 \pm 36) min⁻¹; 实验组吸碘能力高于对照组 10 倍, 两者差异具有显著

统计学意义 (P < 0.001)。

2.7 碘-131 对肝癌细胞的杀伤作用 碘-131 细胞作用后, 与稳定转染空白载体组相比, hNIS 基因转染组细胞的 1d, 2d, 3d, 4d 抑制率分别为 12.5%、22.5%、35.1%、54.5% (图 5)。



HePG2/hNIS细胞; lane 2 HePG2/mock 细胞
图 4 Western blot方法鉴定 hNIS的表达

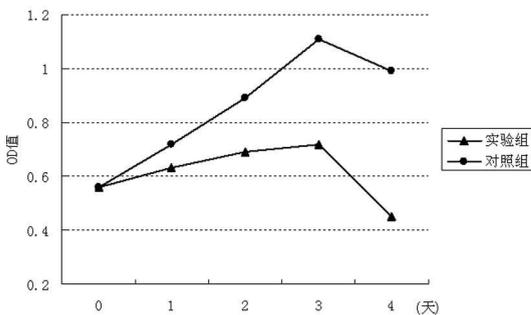


图 5 MTT法测定碘 131对肝癌的杀伤作用

3 讨论

放射性碘是治疗恶性肿瘤的手段之一,但放射性碘发挥杀伤肿瘤细胞效应的基础是肿瘤细胞必须具有摄取碘的能力。但是大多数恶性肿瘤摄取碘的能力普遍较低^[1-4],使放射性碘治疗难以发挥治疗作用。hNIS主要存在于甲状腺滤泡细胞基底膜上,属于钠-葡萄糖协同转运体家族。它对碘的主动运输使甲状腺内的碘浓度高于血浆 20~40倍,被称为“碘泵”^[15],是甲状腺细胞摄取碘的分子基础。Dai G等^[5]于 1996年首先发表了对大鼠钠-碘同向转运体(NIS)基因的克隆结果。在此基础上,同年,Smank PA等^[6]从 NIS基因核苷酸序列获得引物,以人滤泡性甲状腺癌细胞的 RNA为模板,通过聚合酶链反应(PCR)法获取了人钠-碘同向转运体(hNIS)的 cDNA片段,并进而从人甲状腺细胞 cDNA文库中分离出 hNIS基因。

hNIS基因的克隆成功,使肿瘤细胞转染 hNIS基因,使其具有摄碘功能,进一步通过应用放射性碘杀伤肿瘤细胞成为可能。相继有文献对放射性碘杀伤肿瘤细胞进行了报道。如用逆转录病毒^[7]或腺病毒^[8,9]为载体将 NIS基因转入黑色素瘤、卵巢肿瘤细胞、人胶质瘤细胞、结肠癌细胞,实验显示转染肿瘤细胞碘摄取显著增加,将转染后的人黑色素瘤细胞注射到裸鼠后肢腹侧,经放射性碘治疗后,有 56%~69%的肿瘤细胞被杀死。以上研究提示了通过基因转染的方法治疗肿瘤的可行性。

Spitzweg^[10]等在体外构建了以前列腺特异性抗原为启动子指导 NIS基因表达的前列腺癌细胞株(LNCaP),将其接种于无胸腺裸鼠皮下,建立了表达 NIS基因的前列腺肿瘤细胞模型,碘摄取增加了 25%~30%,为肿瘤的靶向性放射性核素治疗提供了有力的实验依据。

现有基因治疗载体均难以活体转导肿瘤的全部细胞,但是³²P等核素发射的β粒子射程可达数毫米,使未转导的肿瘤细胞也得以被杀灭,产生“旁观者效应”。因此,联合应用 NIS和放射性核素治疗肿瘤具有明显的优势^[11]。我们的实验构建了携带 hNIS基因的真核表达载体,并转染 HePG2肝癌细胞,使肝癌细胞表达 hNIS基因,具备了聚集放射性元素碘的能力,然后给与¹³¹I第四天时杀伤了约 55%的转基因肝癌细胞。

基因转染技术和放射性碘结合是治疗低摄碘肿瘤的一种思路^[12-15]。以上研究结果已充分显示了通过基因转染的方法

诱导肿瘤细胞选择性摄取放射性碘的可能性与可行性,使一些本身不能摄取放射性碘的恶性肿瘤可以主动摄取放射性碘,从而使放射性碘浓集在肿瘤细胞内以达到杀伤肿瘤细胞的目的。

参考文献:

- [1] Levy Q, Vreja A, Ginter CS, et al. N-linked glycosylation of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter [J]. J Biol Chem 1998; 273: 22 657-22 663
- [2] Vaire L, Sabourin J, Caillib B, et al. Immunohistochemical analysis of Na⁺/I⁻ symporter distribution in human extra-thyroid tissues [J]. Eur J Endocrinol 1999; 49: 517-523
- [3] Ajjan RA, Kamaruddin NA, Crisp M, et al. Regulation and tissue distribution of the human sodium iodide symporter gene [J]. Clin Endocrinol(Oxf) 1998; 49: 517-523
- [4] Spitzweg C, Joba W, Eisele W, et al. Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acid from salivary gland, mammary gland and gastric mucosa [J]. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83: 1 746-1 751
- [5] Dai G, Levy Q, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter [J]. Nature 1996; 379: 458-460
- [6] Smank PA, Liu Q, Fuminger TL, et al. Cloning of the human sodium iodide symporter [J]. Biochem Biophys Res Commun 1996; 226: 339-345
- [7] Manell RB, Mendell LZ, Link CJ. Radioisotope concentrator gene therapy using the sodium iodide symporter gene [J]. Cancer Res 1999; 59: 661-668
- [8] Shimura H, Haraguchi K, Miyazaki A, et al. Iodide uptake and experimental ¹³¹I therapy in transplanted undifferentiated thyroid cancer cells expressing the Na⁺/I⁻ symporter gene [J]. Endocrinology 1997; 138(10): 4 493-4 496
- [9] Cho JY, Xing S, Liu X, et al. Expression and activity of human Na⁺/I⁻ symporter in human glioma cells by adenovirus-mediated gene delivery [J]. Gene Ther 2000; 7(9): 740-749
- [10] Spitzweg C, Zhang S, Elizabeth R, et al. Prostate-specific Antigen (PSA) Promoter-driven Androgen-inducible Expression of Sodium Iodide Symporter in Prostate Cancer Cell Lines [J]. Cancer Res 1999; 59: 2 136-2 141
- [11] Rahmouni K, Sibug RM, DeK, et al. Effects of brain mineralocorticoid receptor blockade on blood pressure and renal functions in DOCA-salt hypertension [J]. Eur J Pharmacol 2002; 436(3): 207-216
- [12] 贾悦,唐伟,刘超. 钠-碘转运体转基因介导放射性碘治疗非甲状腺恶性肿瘤的研究进展 [J]. 国外医学,肿瘤学分册, 2003; 30(3): 197-199
- [13] Nakamoto Y, Saga T, Misaki T, et al. Establishment and characterization of a breast cancer cell line expressing Na⁺/I⁻ symporters for radioiodide concentrator gene therapy [J]. J Nucl Med 2000; 41: 1 898-1 904
- [14] Bokard A, Ricard M, Opolon P, et al. Adenovirus mediated transfer of the thyroid sodium iodide symporter gene into tumors for a targeted radiotherapy [J]. Cancer Res 2000; 60: 3 484-3 492
- [15] Carrenard EP, Foglietti MJ, Beaudoux JL. Sodium iodide symporter: Physiological aspects and therapeutic perspectives [J]. Pathological Biology 2005; 53: 174-182

(收稿日期: 2010-09-16)