

反义封闭 NGAL 基因表达对 SHEEC 食管癌细胞微丝骨架的影响*

林珏龙¹⁾ 许丽艳²⁾ 李恩民³⁾** 蔡唯佳²⁾
牛永东³⁾ 方昆阳¹⁾ 熊华淇²⁾ 沈忠英²⁾ 曾毅⁴⁾

(¹⁾ 汕头大学医学院中心实验室, 汕头 515031; (²⁾ 汕头大学医学院肿瘤病理研究室, 汕头 515031;

³⁾ 汕头大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 汕头 515031; ⁴⁾ 中国预防医学科学院病毒学研究所, 北京 100052)

摘要 为了研究反义封闭 NGAL 基因表达对 SHEEC 食管癌细胞微丝骨架以及肿瘤细胞生物学行为的影响, 以不同长度 NGAL 基因片段反义表达载体和硫代修饰反义寡核苷酸单链片段转染 SHEEC 食管癌细胞, 通过 G418 筛选, 建立一系列旨在封闭 SHEEC 食管癌细胞 NGAL 基因表达的亚细胞克隆。在细胞内 F-肌动蛋白 (F-actin) 及 DNA 荧光双标记基础上, 通过流式细胞术、激光共聚焦显微镜扫描术等技术手段检测封闭反义 NGAL 基因表达后, SHEEC 食管癌细胞中 F-actin 和 DNA 含量、F-actin 形态结构以及肿瘤细胞生物学行为的变化特征。结果显示, 反义封闭 NGAL 基因表达后, SHEEC 食管癌细胞 F-actin 的含量明显降低, 与永生食管上皮细胞 SHEE 相近, 但细胞分裂增殖指数未见明显变化。表明反义封闭 NGAL 基因表达对 SHEEC 食管癌细胞的微丝骨架有明显影响, 而对 SHEEC 食管癌细胞的分裂增殖影响不明显。激光共聚焦显微镜扫描观测显示, 反义封闭 NGAL 基因表达可使 SHEEC 食管癌细胞 F-actin 分布均匀, F-actin 小体减少, 细胞间连接重新建立, 结构较紧密, 主要形态结构特征与 SHEE 细胞趋于一致。提示反义封闭 NGAL 基因表达可对 SHEEC 食管癌细胞的微丝骨架 F-actin 产生明显影响, 推测癌细胞的微丝骨架 F-actin 可能是 NGAL 基因在 SHEEC 食管癌细胞中发挥功能的一种作用环节。

关键词 微丝骨架, F-肌动蛋白, NGAL 基因, SHEEC 细胞, 细胞周期

学科分类号 Q78

NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) 基因是 lipocalin 家族的新成员, 其蛋白质产物具有保护调节基质金属蛋白酶-9 (matrix metallo-proteinase-9, MMP-9) 的活性, 以及作为小分子铁化合物结合蛋白参与机体铁代谢等功能^[1-4]。近年来, 随着 NGAL 基因在人体一些肿瘤组织细胞中出现异常过表达等事实的认证^[5-7], 特别是 NGAL 在小鼠和大鼠中的同源物 24p3 和 NRL (neu-related lipocalin) 已被提出是癌基因^[8,9], 目前在肿瘤领域有关 NGAL 的研究已开始受到重视, 但一些基本问题比如 NGAL 基因在肿瘤中究竟以何种机制发挥作用等尚不清楚。以往我们研究组曾建立两个细胞系, 一个是在人乳头瘤病毒 18 (human papillomavirus 18, HPV18) E6E7 病毒癌基因作用下, 由人正常胎儿食管上皮转化来的人永生食管上皮细胞系 SHEE, 而另一个则是在促癌物 TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) 作用下, 由 SHEE 恶性转化来的人食管癌细胞系 SHEEC^[10]。随后我们研究了 SHEE 与 SHEEC 之间基因的差异表达情况, 发现 NGAL 基因在 SHEEC 中显著过表达, 提示该基因可能与食管上皮细胞恶性变相

关^[11]。而最近我们研究证明, NGAL 基因在食管癌细胞 SHEEC 中的功能可能主要是通过明胶酶在促进肿瘤细胞的侵袭中发挥作用^[12]。在本文中我们采用流式细胞术和激光共聚焦显微扫描术等研究发现, 反义封闭 NGAL 基因表达对 SHEEC 食管癌细胞微丝骨架 F-actin 以及细胞形态结构等生物学特性有显著影响。这将十分有助于深入揭示 NGAL 基因在食管癌等肿瘤中的功能及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 NGAL 基因反义真核表达载体的构建与鉴定

1.1.1 pcDNA-NGAL (-): pcDNA-NGAL (-) 是 NGAL 基因 cDNA 全序列反义真核表达载体, 其构建与鉴定操作见文献 [12]。

* 国家自然科学基金 (39900069, 30170428, 30370641), 广东省自然科学基金 (37788, 990799, 010431), 广东省高校自然科学基金 (200033), 广东省医学科研基金 (A2001419) 和汕头大学研究与发展基金资助项目 (L0004, L00012)。

** 通讯联系人。

Tel: 0754-8900847, E-mail: nmli@stu.edu.cn

收稿日期: 2003-10-08, 接受日期: 2003-11-09

1.1.2 pcDNA-NGALa (-): pcDNA-NGALa (-) 是在转录后加工水平特异性阻断 NGAL 基因成熟 mRNA 形成的反义真核表达载体。其构建情况如下: 根据 NGAL 全基因组序列设计引物。NGALa1, 5' TTCACCACTGCAGGCC CAGCCT 3'; NGALa2, 5' TGAACACAGATGAATTCCGGGC 3'。引物 1 的 3'端紧接一个 *Apa* I 酶切位点 GGGCCC, 引物 2 中含有 *Eco*R I 酶切位点 (本段下划线所示)。扩增片段长度为 408 bp, 包括第一内含子一部分、第二外显子全部和第二内含子一部分。应用 DNAzol 试剂 (Invitrogen 公司) 提取 SHEEC 细胞核基因组 DNA, 进行 PCR (MBI kit) 扩增。PCR 反应条件是 94℃, 3 min; 94℃, 30 s, 70℃, 3 min, 30 个循环; 70℃ 3 min。将获得的 PCR 产物直接重组到中间载体 pT-Adv (ClonTech) 中扩增克隆。测序证明序列正确后, 定向克隆到真核表达载体 pcDNA3 (Invitrogen 公司) *Eco*R I + *Apa* I 位点, 用 *Eco*R I 和/或 *Apa* I 酶切鉴定。

1.2 细胞转染及其培养

细胞转染及其培养方法见参考文献 [12]。经 G418 (200 ~ 400 mg/L) 筛选后, 获得 4 个具 G418 抗性的细胞株, 即 pcDNA-SHEE、pcDNA-SHEEC、pcDNA-NGALa (-)-SHEEC 和 pcDNA-NGAL (-)-SHEEC。SHEEC 和 SHEE 空白对照细胞一直在含 10% 小牛血清的 199 培养基 (Invitrogen 公司) 中传代培养。另外, 针对 NGAL 基因 mRNA 的翻译起始位点合成硫代修饰反义寡核苷酸片段 3' CCGGACTTTAGTACGGGGATCCAG 5', 在进行流式细胞术检测和激光扫描共聚焦显微镜观察前 48 h, 采用如上转染方法, 转染 pcDNA-NGALa (-)-SHEEC 细胞, 以实现在 mRNA 剪切加工和蛋白质合成起始两个层面对 NGAL 基因表达的双重封闭, 将此细胞称之为 pcDNA-NGALa + s (-)-SHEEC。

1.3 细胞样品的制备

1.3.1 流式细胞术检测细胞样品: 上述各种细胞经 0.25% 胰酶消化后, PBS 缓冲液洗涤, 制成细胞悬液, 70% 乙醇固定。室温下, 70% 乙醇固定后的细胞悬液经 PBS 缓冲液洗涤 1 ~ 2 次, 1 500 r/min 离心 5 min, 去上清液, 0.2% Triton X-100 处理细胞 10 min, 以 2 mg/L Phalloidin-FITC (Sigma 公司) 标记细胞内 F-actin, 30 min 后, PBS 洗涤 1 ~ 2 次, 20 mg/L RNase 处理 10 min, PBS 洗涤 1 ~ 2 次, 5 mg/L PI (KPL 公司) 染色标记细胞

内 DNA, 20 min 后, PBS 洗涤 1 ~ 2 次, 用 PBS 缓冲液制成 1×10^6 的细胞悬液, 待用。

1.3.2 激光扫描共聚焦显微镜观察细胞样品: 将上述各种细胞分别铺于盖玻片上, 经上述方法培养 24 h, 以 PBS 缓冲液洗涤, 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 缓冲液洗涤 1 ~ 2 次, 以 2 mg/L Phalloidin-FITC 标记细胞内 F-actin 30 min, PBS 洗涤 1 ~ 2 次, 20 mg/L RNase 处理 10 min, PBS 洗涤 1 ~ 2 次, 5 mg/L PI 染色标记细胞内 DNA, 20 min 后, PBS 洗涤 1 ~ 2 次, 封片, 待用。

1.4 流式细胞术检测细胞内 F-actin 和 DNA 的含量

采用 FACSsort 流式细胞仪 (Becton Dickenson Company, BD. Co. USA) 检测细胞样品, 对细胞内 F-actin 以及 DNA 的含量进行双参数分析。以 Phalloidin-FITC 标记细胞内 F-actin, 以 PI 标记细胞内 DNA, 以无 Phalloidin-FITC 或鼠 IgG-FITC 标记的细胞样品为对照组, 使用亚离子激光 448 nm 激发细胞, Phalloidin-FITC 标记的 F-actin 显示绿色荧光, PI 标记的 DNA 显示红色荧光。悬浮细胞单个依次通过检测区, 光学系统收集荧光信号。依据此原理, 分别获取细胞总数、F-actin 和 DNA 的荧光强度等实验数据。每组样品进行 3 次实验, 分别计算二倍体、四倍体细胞 F-actin 标记阳性细胞百分率和荧光强度的平均值与标准偏差, 并以 SSPS 11.5 for Windows 软件包对实验数据是否有显著性差别进行 *F* 检验。

1.5 激光扫描共聚焦显微镜观察细胞形态

使用激光扫描共聚焦显微镜 (ACAS Ultima-312, Meridian. Com. USA) 氩离子激光, 对盖片上的细胞进行扫描定位及形态结构分析, 激发波长分别是 (488 ± 10) nm、 (514 ± 10) nm、 (355 ± 30) nm 和 (500 ± 40) nm。

1.5.1 光学显微镜选择: 将细胞标本正面倒置于激光扫描共聚焦显微镜的载物台上, 在光学显微镜 (100×, NA1.3 物镜) 下寻找细胞。

1.5.2 激光扫描参数选择: 进入 Z-Image 程序, 预扫描, 选择 Pinhole (小孔孔径) 225 μ m, *X* 轴扫描点数 (*X* points) 256, *Y* 轴扫描点数 (*Y* points) 256, 扫描步径 (step size) 1 μ m, *Z* 轴扫描点数 (*Z* points) 0.5 μ m, *Z* 轴扫描次数 (*Z* scan) 4 ~ 5, 镜扫描速度 (speed) 20 mm/s, 扫描强度 (scan strength) 79%, 激光强度 (laser power) 120 mW, 每点采样次数 (sample/Pt) 9, 检测器 1 灵敏度 (PMT1) 50%。

1.5.3 扫描图像: 选择荧光强度适合的层面, 扫描获取单层图像, 或将聚焦平面定在待扫描目标的底部, 由计算机沿 *Z* 轴方向按设定的步距作连续的切片扫描, 获得一系列横截面的图像. FITC 激发波长 494 nm, 发射波长 518 nm, 显示绿色荧光; PI 波长 535 nm, 发射波长 617 nm, 显示红色荧光.

2 结 果

2.1 NGAL 基因反义真核表达载体的构建与鉴定
有关 pcDNA-NGAL (-) 的构建与鉴定情况见文献 [12].

pcDNA-NGALa (-) 的构建与鉴定: 以 SHEEC 细胞基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 法扩增出来的 NGAL 基因片段包括 NGAL 基因的第一内含子一部分、第二外显子全部和第二内含子一部分, 因此可覆盖 mRNA 前体分子的第一和第二剪切点. 测序后与 NCBI 数据库比较确证序列完全正确. 在此基础上, 把该片段定向插入 pcDNA3 真核表达载体 *EcoR* I + *Apa* I 位点, 构建 NGAL 基因反义真核表达载体 pcDNA-NGALa (-). 用 *EcoR* I 和/或 *Apa* I 酶切进行鉴定 (图 1). 从图 1 可见, 无论是外源片段的大小还是外源片段的插入方向均与设计的情况完全符合, 说明已成功构建 NGAL 基因反义真核表达载体 pcDNA-NGALa (-).

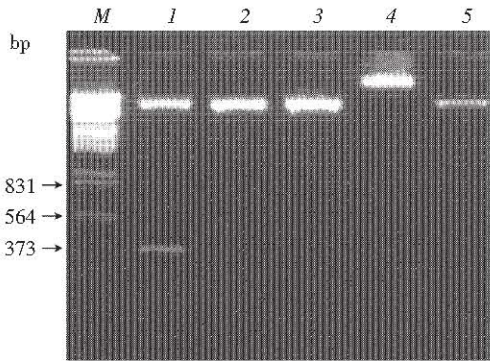


Fig. 1 Construction of NGAL gene antisense expressive vector pcDNA-NGALa (-)
M: λ DNA/*EcoR*I + *Hind*III; *1*: pcDNA-NGALa (-)/*EcoR*I + *Apa*I; *2*: pcDNA-NGALa (-)/*EcoR*I; *3*: pcDNA-NGALa (-)/*Apa*I; *4*: pcDNA-NGALa (-); *5*: pcDNA3/*EcoR*I + *Apa*I.

2.2 对 SHEEC 细胞 F-actin 含量分布模式的影响
以流式细胞术检测 SHEEC、pcDNA-NGAL (-)-SHEEC 和 SHEE 等细胞 F-actin 的含量分布模式 (图 2). 从图 2 中可见, pcDNA-NGAL (-)-SHEEC 细胞 F-actin 含量分布模式明显不同于 SHEEC 食管癌细胞, 细胞分布曲线及其峰值明显左移, 与永生化食管上皮细胞 SHEE 的趋于一致. 表明反义封闭 NGAL 基因表达对 SHEEC 食管癌细胞 F-actin 含量分布模式有明显影响.

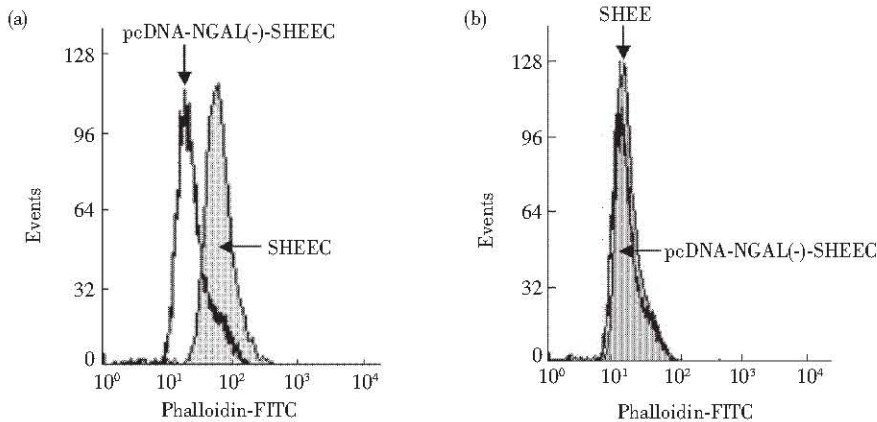


Fig. 2 Compare of distribution image of relative content in cellular F-actin of pcDNA-NGAL (-) -SHEEC, SHEEC and SHEE

(a) pcDNA-NGAL (-) -SHEEC and SHEEC, (b) pcDNA-NGAL (-) -SHEEC and SHEE. SHEEC or SHEE show dark image and pcDNA-NGAL (-) -SHEEC display white image.

2.3 对 SHEEC 二倍体细胞 F-actin 的影响

反义封闭 NGAL 基因表达后, SHEEC 二倍体细胞 F-actin 阳性百分率及其荧光强度的实验结果

见图 3 和图 4. 从图 3 和图 4 可见, a. SHEEC 二倍体细胞 F-actin 阳性百分率及其荧光强度与 SHEE 的相比均明显高; b. 反义封闭 NGAL 基因表达既

可明显降低 SHEEC 二倍体细胞 F-actin 的阳性百分率, 同时也可明显降低这些 F-actin 阳性细胞的荧光强度, 使两者均与 SHEE 的趋于一致。这些结果说明, 反义封闭 NGAL 基因表达, 可从上述两个方面明显抑制 SHEEC 二倍体细胞微丝骨架系统所表现的 F-actin 结构特征, 提示 NGAL 基因可能与 SHEEC 二倍体细胞微丝骨架的某种功能相关。

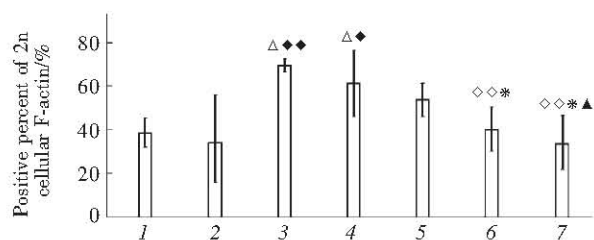


Fig. 3 Comparing with positive percent (%) of diploid cell (2n) F-actin before and after antisense blocking NGAL gene expression in SHEEC

1: SHEE without plasmid; 2: pcDNA3-SHEE; 3: SHEEC without plasmid; 4: pcDNA3-SHEEC; 5: pcDNA-NGALa (-)-SHEEC; 6: pcDNA-NGALa + s (-)-SHEEC; 7: pcDNA-NGAL (-)-SHEEC. Comparing with SHEE, Δ showed to be obviously different in positive percent of cellular F-actin ($P < 0.05$). Comparing with pcDNA3-SHEE, $\diamond$ and $\diamond\diamond$ respectively represented to be evidently variant ($P < 0.05$) and very obviously different ($P < 0.01$) in positive percent of cellular F-actin. Comparing with SHEEC, $\diamond\diamond$ display very markedly differential in positive percent of cellular F-actin ($P < 0.01$). Comparing with pcDNA3-SHEEC, * expressed obviously variant in positive percent of cellular F-actin ($P < 0.05$). Comparing with pcDNA-NGALa (-)-SHEEC, $\blacktriangle$ indicated remarkably different in positive percent of cellular F-actin ($P < 0.05$).

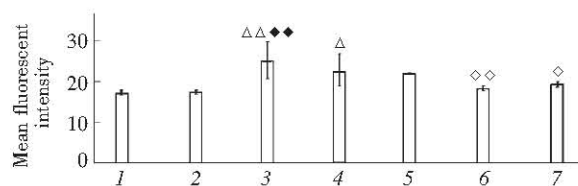


Fig. 4 Comparing with mean fluorescent intensity of 2n F-actin before and after antisense blocking NGAL gene expression in SHEEC

1: SHEE without plasmid; 2: pcDNA3-SHEE; 3: SHEEC without plasmid; 4: pcDNA3-SHEEC; 5: pcDNA-NGALa (-)-SHEEC; 6: pcDNA-NGALa + s (-)-SHEEC; 7: pcDNA-NGAL (-)-SHEEC. Comparing with SHEE, Δ and $\Delta\Delta$ respectively represented to be evidently variant ($P < 0.05$) and very obviously different ($P < 0.01$) in mean fluorescent intensity of 2n cell of F-actin positive. Comparing with pcDNA3-SHEE, $\diamond\diamond$ display very markedly differential in mean fluorescent intensity of 2n cell of F-actin positive ($P < 0.01$). Comparing with SHEEC, $\diamond$ and $\diamond\diamond$ respectively represented to be evidently variant ($P < 0.05$) and very obviously different ($P < 0.01$) in mean fluorescent intensity of 2n cell of F-actin positive.

2.4 对 SHEEC 四倍体细胞 F-actin 的影响

反义封闭 NGAL 基因表达后, SHEEC 四倍体细胞 F-actin 的实验结果见图 5 和图 6。从图 5 可见: a. SHEEC 四倍体细胞 F-actin 阳性百分率与 SHEE 的相比未见明显差别; b. 反义封闭 NGAL 基因表达对 SHEEC 四倍体细胞 F-actin 阳性百分率的影响不明显。从图 6 可见: a. SHEEC 四倍体 F-actin 阳性细胞的荧光强度与 SHEE 的相比明显高; b. 反义封闭 NGAL 基因表达可明显降低 SHEEC 四倍体 F-actin 阳性细胞的荧光强度, 使之与 SHEE

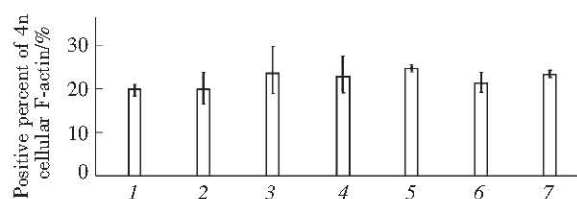


Fig. 5 Comparing with positive percent (%) of tetraploid cell (4n) F-actin before and after antisense blocking NGAL gene expression in SHEEC

1: SHEE without plasmid; 2: pcDNA3-SHEE; 3: SHEEC without plasmid; 4: pcDNA3-SHEEC; 5: pcDNA-NGALa (-)-SHEEC; 6: pcDNA-NGALa + s (-)-SHEEC; 7: pcDNA-NGAL (-)-SHEEC.

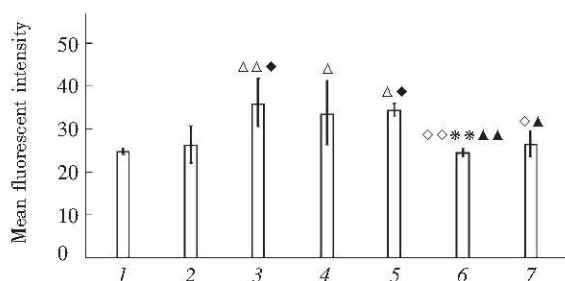


Fig. 6 Comparing with mean fluorescent intensity of 4n F-actin positive before and after antisense blocking NGAL gene expression in SHEEC

1: SHEE without plasmid; 2: pcDNA3-SHEE; 3: SHEEC without plasmid; 4: pcDNA3-SHEEC; 5: pcDNA-NGALa (-)-SHEEC; 6: pcDNA-NGALa + s (-)-SHEEC; 7: pcDNA-NGAL (-)-SHEEC. Comparing with SHEE, Δ and $\Delta\Delta$ respectively showed obviously different ($P < 0.05$) and very obviously different ($P < 0.01$) in mean fluorescent intensity of 4n cell of F-actin positive. Comparing with pcDNA3-SHEE, $\diamond$ represented obviously different ($P < 0.05$) in mean fluorescent intensity of 4n cell of F-actin positive. Comparing with SHEEC, $\diamond$ and $\diamond\diamond$ respectively display very markedly differential ($P < 0.05$) and very obviously different ($P < 0.01$) in mean fluorescent intensity of 4n cell of F-actin positive. Comparing with pcDNA3-SHEE, * represented very obviously different in mean fluorescent intensity of 4n cell of F-actin positive ($P < 0.01$). Comparing with pcDNA-NGALa (-)-SHEEC, $\blacktriangle$ and $\blacktriangle\blacktriangle$ respectively showed obviously different ($P < 0.05$) and very obviously different ($P < 0.01$) in mean fluorescent intensity of 4n cell of F-actin positive.

的趋于一致。这些结果说明,反义封闭 NGAL 基因表达不能使更多的 SHEEC 四倍体细胞转变成 F-actin 阳性,但却可促进那些 F-actin 阳性细胞更充分表现 F-actin 微丝骨架结构特征。

2.5 对 SHEEC 细胞 F-actin 形态结构的影响

Phalloidin 特异性结合 F-actin, PI (含 RNA 酶) 结合 DNA。在激光共聚焦显微镜下,Phalloidin-FITC 标记的细胞 F-actin 呈绿色,PI 标记的细胞核 DNA 呈红色。在细胞核区域, F-actin 的绿色和 DNA 的红色两者重叠显示黄色。反义封闭 NGAL 基因表达前后 SHEEC 食管癌细胞 F-actin 形态结构的改变结果

见图 7。从图 7 中可见,未反义封闭 NGAL 基因表达的 SHEEC 食管癌细胞,其细胞内 F-actin 主要沿细胞膜内侧分布, F-actin 小体含量丰富,并聚集成颗粒状、短杆状或在细胞膜内侧形成较粗大的束状结构,细胞间连接丧失(图 7a)。而反义封闭 NGAL 基因表达后, SHEEC 食管癌细胞 F-actin 的分布变得相对均匀、分散, F-actin 小体减少,细胞间重新建立较紧密的片状连接,细胞的整体形态结构与 SHEEC 永生化食管上皮细胞相近(图 7b, c, d)。表明反义封闭 NGAL 基因表达对 SHEEC 细胞 F-actin 形态结构有显著影响。

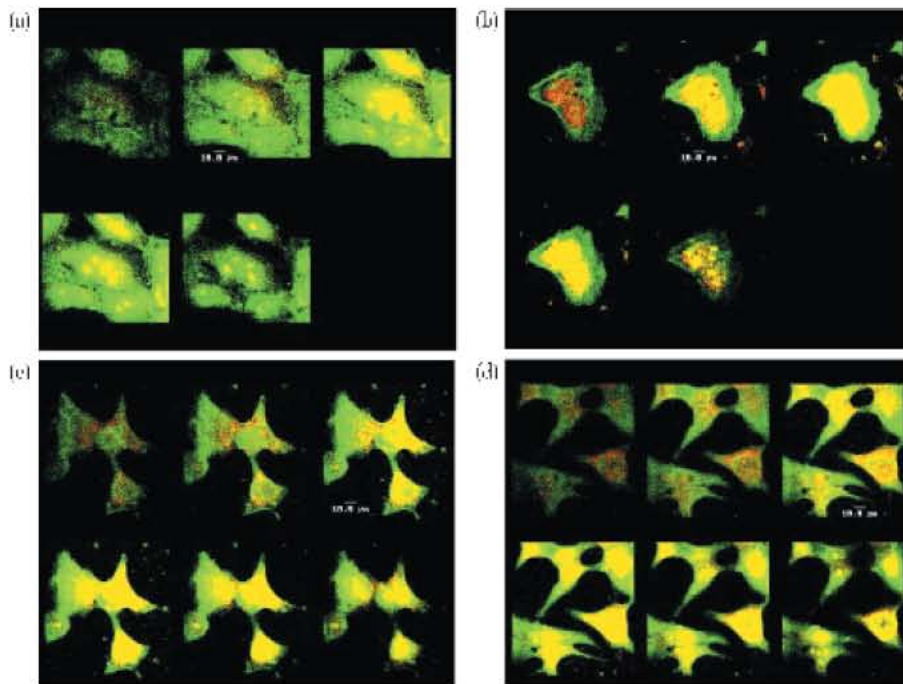


Fig. 7 In analysis with the CSLM, the image of the F-actin distribution and structure of SHEEC cell (a), SHEEC cell (b), pcDNA-NGAL(-) - SHEEC cell (c) and pcDNA-NGAL(-) - SHEEC cell (d) were stained by phalloidin-FITC

3 讨 论

SHEEC 是由永生化的食管上皮细胞 SHEEC 恶变转化来的食管癌细胞^[10]。以往我们研究证明 NGAL 基因在 SHEEC 中显著地过表达^[11], 其功能可能主要是通过明胶酶在促进肿瘤细胞的侵袭中发挥作用^[12]。在此基础上, 本文通过流式细胞术和激光扫描共聚焦显微镜等技术研究证明, 反义封闭 NGAL 基因表达可对 SHEEC 食管癌细胞的微丝骨架 F-actin 产生明显影响, 提示细胞的微丝骨架 F-actin 可能是 NGAL 基因在 SHEEC 食管癌细胞中发

挥功能的另一个作用环节, 推测可能与癌细胞在侵袭过程中的变形行为相关联。细胞微丝骨架由微丝骨架蛋白, 即肌动蛋白、肌球蛋白和多种连接蛋白等组成。在非肌肉细胞中, 微丝骨架蛋白在细胞内组成束状应力纤维, 其主要结构成分是纤维型即 F-actin, 与细胞形态维持、细胞贴壁粘附与张力支持、细胞运动迁移以及细胞增殖分化等相关信息传递关系密切。有研究表明, 伴随着细胞的恶性转化, 细胞内正常的微丝骨架结构往往遭到很大破坏, 表现为: 束状应力纤维解聚, 微丝束减少或消失, 肌动蛋白分子重组形成 F-actin 小体, 而荧光

染色发现这种 F-actin 小体常常呈现散乱云雾状, 且边缘不齐^[13,14], 这些现象与本文的观察结果是一致的. 另有研究表明, 恶性转化细胞微丝骨架的上述变化与细胞的侵袭等恶性行为是密切相关的, 细胞的微丝骨架系统所遭受的破坏程度越大, 细胞的侵袭性越强^[15,16]. 而针对肿瘤细胞的这种恶性行为, 可通过减少细胞内 F-actin 的聚合或改变细胞内 F-actin 骨架的异常分布, 来抑制癌细胞的侵袭^[17,18]. 因此联系我们以往的研究结果^[12], 有理由认为反义封闭 NGAL 基因表达之所以能够有效地抑制 SHEEC 食管癌细胞侵袭, 其机制可能是通过改变细胞微丝骨架 F-actin 而发挥作用的. 细胞微丝骨架 F-actin 可能是反义封闭 NGAL 基因表达抑制 SHEEC 食管癌细胞侵袭的有效靶点.

近年来, 许多研究表明, 微丝骨架系统是细胞内相关信号传递途径的结构支撑, F-actin 在细胞信号传递中扮演着重要角色. Caloca 等^[19]研究发现, Vav 和 Ras 两条信号传递途径存在着交叉对话, 其交叉点 GDP/GTP 交换因子 (RasGRP1) 的活化依赖二脂酰甘油的生成和 F-actin 的聚合. 胸腺素 $\beta 4$ 是一种 G-actin 结合蛋白, 具有调节 F-actin 聚合的功能. Wang 等^[20]研究发现, 胸腺素 $\beta 4$ 在 SW480 结肠癌细胞恶性变中过表达, 可引起 F-actin 正常结构破坏、排列紊乱, 并进一步证实这是导致细胞恶性增殖与运动性改变的主要原因. 肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 通过与其受体/原癌基因 Met 蛋白表达产物结合传递相关信息, 改变细胞的增殖与运动活性, 与肿瘤的转移相关联. McAllister 等^[21]研究发现, 用 HGF 处理 HepG2 肝癌细胞可导致 p27 蛋白 Ser-10 磷酸化, 同时引发该蛋白质由核向胞浆转移, 并与 F-actin 共域存在. 而转导这种 p27 蛋白至 HepG2 肝癌细胞可导致细胞骨架重排, 同时伴有细胞运动性改变. 实际上, 从某种意义上讲, NGAL 蛋白本身即是一种信号分子, 在铁离子的运输以及细胞外基质稳态平衡调节中发挥作用^[1-4]. 然而, 本文有关反义封闭 NGAL 基因表达能够明显影响细胞微丝骨架 F-actin 的实验事实提示, NGAL 蛋白并非一种普通的信号分子, 推测可能在相关信号传递途径的构筑中发挥着某种调节作用.

最近, Kawano 等^[22]成功构建了三维鳞状上皮细胞体, 并发现在三维细胞体皮质层表面伴随着 F-actin 结构重排, 同时表现出 fascin 的大量堆积并生成许多微刺突 (microspikes). Fascin 也是一种

细胞骨架蛋白, 可与 F-actin 结合, 通常定位于细胞膜皱褶 (ruffles) 边缘的丝状伪足、微棘和张力纤维中. 最近我们联合运用生物质谱、免疫组织化学和蛋白质印迹等技术研究, 证明 fascin 1 基因在 SHEE 的恶性转化中, 在蛋白质和 mRNA 两个层面上均呈现明显上调表达, 但生物学功能意义尚不清楚. 然而无论如何这都将预示着在我们的研究系统中, 伴随着细胞的恶性转化, 影响细胞骨架系统的因素是复杂多样的, 利用 SHEE/SHEEC 这对十分难得的细胞转化模型, 围绕 F-actin 在肿瘤细胞中的生物学作用给予深入探讨将是十分有意义的.

参 考 文 献

- 1 Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, *et al.* The high molecular weight urinary matrix metallo- proteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *J Biol Chem*, 2001, **276** (40): 37258 ~ 37265
- 2 Tschesche H, Zolzer V, Triebel S, *et al.* The human neutrophil lipocalin supports the allosteric activation of matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem*, 2001, **268** (7): 1918 ~ 1928
- 3 Yang J, Goetz D, Li J Y, *et al.* An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell*, 2002, **10** (5): 1045 ~ 1056
- 4 Goetz D H, Holmes M A, Borregaard N, *et al.* The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell*, 2002, **10** (5): 1033 ~ 1043
- 5 Stoesz S P, Friedl A, Haag J D, *et al.* Heterogeneous expression of the lipocalin NGAL in primary breast cancers. *Int J Cancer*, 1998, **79** (6): 565 ~ 572
- 6 Furutani M, Arai S, Mizumoto M, *et al.* Identification of a neutrophil gelatinase-associated lipocalin mRNA in human pancreatic cancers using a modified signal sequence trap method. *Cancer Lett*, 1998, **122** (1 ~ 2): 209 ~ 214
- 7 Friedl A, Stoesz S P, Buckley P, *et al.* Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in normal and neoplastic human tissues. Cell type-specific pattern of expression. *Histochem J*, 1999, **31** (7): 433 ~ 441
- 8 Kjeldsen L, Cowland J B, Borregaard N. Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1482** (1 ~ 2): 272 ~ 283
- 9 Chu S T, Lin H J, Huang H L, *et al.* The hydrophobic pocket of 24p3 protein from mouse uterine luminal fluid: Fatty acid and retinol binding activity and predicted structural similarity to lipocalins. *J Pept Res*, 1998, **52** (5): 390 ~ 397
- 10 Shen Z, Cen S, Shen J, *et al.* Study of immortalization and malignant transformation of human embryonic esophageal epithelial cells induced by HPV18 E6E7. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2000, **126** (10): 589 ~ 594
- 11 许丽艳, 李恩民, 熊华淇, 等. NGAL 基因在永生化食管上皮细胞恶性转化中过表达的研究. *生物化与生物物理进展*, 2001, **28** (6): 839 ~ 843
- 12 Xu L Y, Li N M, Xiong H Q, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28** (6): 839 ~ 843
- 13 李恩民, 许丽艳, 蔡唯佳, 等. SHEEC 食管癌细胞中 NGAL 基因的功能. *生物化学与生物物理学报*, 2003, **35** (3): 247 ~ 254
- 14 Li E M, Xu L Y, Cai W J, *et al.* *Acta Bichim Biophys Sin*, 2003, **35** (3): 247 ~ 254
- 15 Boivin D, Bilodeau D, Beliveau R. Regulation of cytoskeletal

- functions by Rho small GTP-binding proteins in normal and cancer cells. *Can J Physiol Pharmacol*, 1996, **74** (7): 801 ~ 810
- 14 林仲翔, 徐光炜, 朝亚玲. 人乳癌原代培养细胞内 F-肌动蛋白小体和微丝微管的研究. *中华肿瘤杂志*, 1993, **15** (1): 8 ~ 11
Lin Z X, Xu G G, Chao Y L. *Chin Ag Oncol*, 1993, **15** (1): 8 ~ 11
 - 15 Gerharz C D, Moll R, Meister P, *et al.* Cytoskeletal heterogeneity of an epithelioid sarcoma with expression of vimentin, cytokeratin, and neurofilaments. *Amer J Surg Pathol*, 1990, **14** (3): 274 ~ 283
 - 16 Zachary J M, Cleveland G, Kwock L, *et al.* Actin filament organization of the Dunning R3327 rat prostatic adenocarcinoma system: correlation with metastatic potential. *Cancer Res*, 1986, **46** (2): 926 ~ 932
 - 17 Young M R. Protein phosphatases-1 and -2A regulate tumor cell migration, invasion and cytoskeletal organization. *Adv Exp Med Biol*, 1997, **407**: 311 ~ 318
 - 18 Cowell H E, Garrod D R. Activation of protein kinase C modulates cell-cell and cell-substratum adhesion of a human colorectal carcinoma cell line and restores 'normal' epithelial morphology. *Int J Cancer*, 1999, **80** (3): 455 ~ 464
 - 19 Caloca M J, Zugaza J L, Matallanas D, *et al.* Vav mediates Ras stimulation by direct activation of the GDP/GTP exchange factor Ras GRP1. *EMBO J*, 2003, **22** (13): 3326 ~ 3336
 - 20 Wang W S, Chen P M, Hsiao H L, *et al.* Overexpression of the thymosin beta-4 gene is associated with malignant progression of SW480 colon cancer cells. *Oncogene*, 2003, **22** (21): 3297 ~ 3306
 - 21 McAllister S S, Becker H M, Pintucci G, *et al.* Novel p27 (kip1) C-terminal scatter domain mediates Rac-dependent cell migration independent of cell cycle arrest functions. *Mol Cell Biol*, 2003, **23** (1): 216 ~ 228
 - 22 Kawano K, Kantak S S, Murai M, *et al.* Integrin alpha 3 beta1 engagement disrupts intercellular adhesion. *Exp Cell Res*, 2001, **262** (2): 180 ~ 196

Antisense Blocking of NGAL Gene Expression Affects The Microfilament Cytoskeleton in SHEEC Esophageal Cancer Cells*

LIN Jue-Long¹⁾, XU Li-Yan²⁾, LI En-Min³⁾**, CAI Wei-Jia²⁾,
NIU Yong-Dong³⁾, FANG Kun-Yang¹⁾, XIONG Hua-Qi²⁾, SHEN Zhong-Ying²⁾, ZENG Yi⁴⁾

(¹⁾Center Laboratory, Medical College, Shantou University, Shantou 515031, China;

²⁾Department of Tumor Pathology, Medical College, Shantou University, Shantou 515031, China;

³⁾Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical College, Shantou University, Shantou 515031, China;

⁴⁾Institute of Virology Research, Academy of Preventive Medicine Sciences, Beijing 100052, China)

Abstract In order to study the effect of microfilament cytoskeleton on SHEEC esophageal cancer cells and the biological activity variation of cancer cells caused by antisense blocking of NGAL gene expression, making use of antisense expressing vector of different length NGAL gene segments and antisense oligonucleotide segments of thio-modification to transfer the SHEEC cancer cells of esophagus, a series of subcellular clones aiming at the blocking of NGAL gene expression of SHEEC esophageal cancer cells were established by means of G418 selection. On the basis of the fluorescent dual-labeling of F-actin and DNA within cells and after antisense blocking of NGAL gene expression, the content of F-actin and DNA, the F-actin cytoskeleton structure in SHEEC cell and the variational characteristics of biological action on the tumor cell were tested by use of flow cytometry and confocal scanning laser microscope (CSLM). The results showed that F-actin level in the SHEEC cells was obviously reduced after antisense blocking and it was similar to that in SHEE cells, but no obvious change of cellular division index was found. This indicates that the blocking of NGAL gene expression has an obvious effect on the microfilament cytoskeleton of SHEEC cells, but no obvious influence on SHEEC cell proliferation. With the technique of CSLM, it is revealed that the blocking of NGAL gene expression could make the cellular F-actin cytoskeleton of SHEEC cell uniformly distributed, F-actin body evidently decreased, the joint structure of the cell reestablished, the cellular structure more compact, and the main structure characteristics of SHEEC cell and those of F-actin cytoskeleton structures of SHEE cell consistently approached. The result suggests that SHEEC cellular F-actin cytoskeleton of the esophagus cancer could be obviously affected by antisense blocking of NGAL gene expression, and it is conjectured that microfilament cytoskeleton F-actin in cancer cell could be a function key of NGAL gene that plays a role in SHEEC cancer cell.

Key words microfilament cytoskeleton, F-actin, NGAL gene, SHEEC cell, cell cycle

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (39900069, 30170428, 30370641), The National Natural Sciences Foundation of Guangdong Province (990799, 010431, 37788), The High School Natural Science of Guangdong Province (200033), The Medical Science of Guangdong Province (A2001419), The Study and Developing of Shantou University (L0004, L00012).

** Corresponding author. Tel: 86-754-8900847, E-mail: nmli@stu.edu.cn

Received: October 8, 2003 Accepted: November 9, 2003