

RKIP 低表达与鼻咽癌侵袭转移和 NF- κ B 信号通路活化相关*

陈彦^{1)**} 李君^{2)**} 易红¹⁾ 欧阳果良¹⁾ 李萃¹⁾ 张鹏飞¹⁾
李茂玉¹⁾ 彭芳¹⁾ 陈主初¹⁾ 李建玲^{1)***} 肖志强^{1)***}

(¹⁾中南大学湘雅医院卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室, 长沙 410008; (²⁾中南大学湘雅医院急诊科, 长沙 410008)

摘要 为筛选鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)发病相关的蛋白质, 采用双向凝胶电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)和质谱(mass spectrometry, MS)技术比较 NPC 组织与癌旁正常鼻咽上皮组织(adjacent normal nasopharyngeal epithelial tissue, ANNET)蛋白质表达的差异, 鉴定了 21 个差异蛋白, 其中 Raf 激酶抑制蛋白(Raf kinase inhibitor protein, RKIP)等 9 个蛋白质在 NPC 组织中的表达水平低于 ANNET. 为探讨 RKIP 在 NPC 转移中的作用和机制, 采用 Western blot 检测 RKIP 在不同转移潜能的 5-8F 和 6-10B NPC 细胞中的表达水平, 采用免疫组化方法检查 RKIP 在石蜡包埋 NPC 组织、正常鼻咽上皮组织(normal nasopharyngeal epithelial tissue, NNET)及淋巴结转移 NPC 组织(lymphnode metastatic NPC, LMNPC)中的表达水平, 采用脂质体转染方法将正义、反义 RKIP 表达质粒及其相应空白载体分别转染 5-8F 和 6-10B 细胞, 建立相应的稳定转染细胞系, 分析 RKIP 表达水平改变对 NPC 细胞体外侵袭能力和 NF- κ B 信号通路活性的影响. 结果显示: RKIP 在高转移 5-8F 细胞中的表达水平低于非转移 6-10B 细胞、在 NPC 组织中的表达水平低于 NNET、在转移癌中表达缺失. 上调 RKIP 表达能抑制 5-8F 细胞的侵袭能力, 而下调 RKIP 表达能增强 6-10B 细胞的侵袭能力; 上调 RKIP 表达能降低 5-8F 细胞的 p-I κ B- α 水平和 NF- κ B 的转录活性, 而下调 RKIP 表达能增加 6-10B 细胞的 p-I κ B- α 水平和 NF- κ B 的转录活性. 研究结果提示, RKIP 可能是 NPC 的一个转移抑制蛋白, RKIP 表达下调可能通过活化 NF- κ B 信号通路促进 NPC 细胞侵袭和转移.

关键词 鼻咽癌, 蛋白质组学, Raf 激酶抑制蛋白, 侵袭转移, 核因子 κ B

学科分类号 R318.0

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00741

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是我国南方及东南亚地区最常见的恶性肿瘤之一^[1], 早期转移是 NPC 最重要的特征之一, 也是 NPC 病人死亡的主要原因. 在新发现的病人中, 70%~80% 有颈部淋巴结转移^[2], 4.2%有远处转移^[3]. 然而, NPC 发生发展的分子机制尚不清楚.

高通量的基因芯片技术和蛋白质组学技术具有发现肿瘤相关分子的潜能. 如 cDNA 芯片分析 NPC 的基因表达谱已发现一些可能与 NPC 发病有关的异常表达基因^[4]. 蛋白质组学作为一种新的肿瘤研究方法, 在发现癌变相关蛋白质方面具有独特的优势, 为揭示肿瘤发病的分子机制提供了新的机遇^[5]. 为识别与 NPC 发病相关的蛋白质, 我们采用蛋白质组学方法比较 NPC 组织与癌旁正常鼻咽上皮组织(ANNET)蛋白质表达的差异, 发现 Raf 激

酶抑制蛋白(Raf kinase inhibitor protein, RKIP)在 NPC 组织中明显下调.

RKIP 属磷脂酰乙醇胺结合蛋白(PEBP)家族成

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2001CB5120), 芙蓉学者特聘教授科研奖励基金(湘教通[2007]362 号), 教育部跨(新)世纪优秀人才培养计划基金([2002]48, [2007]70)和湖南省科技厅重点科研项目(06SK2004)资助项目.

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

李建玲. Tel: 0731-4327334, Fax: 0731-4327332,

E-mail: jianlingli2001@yahoo.com

肖志强. Tel: 0731-4327239, Fax: 0731-4327321,

E-mail: zqxiao2001@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-10-28, 接受日期: 2008-11-25

员, 是一个高度保守、广泛表达的 23 ku 胞浆蛋白^[6]. 研究表明, RKIP 是 NF- κ B 信号通路的内源性抑制子, RKIP 通过抑制 I κ B 激酶(IKK)的活化, 继而抑制 I κ B 磷酸化和泛素化降解, 阻止 NF- κ B 进入胞核, 从而发挥负性调控 NF- κ B 信号通路的作用^[7]. 已有的研究也提示, RKIP 是一个潜在的肿瘤转移抑制蛋白, 能抑制前列腺癌, 乳腺癌和黑色素瘤细胞的转移, 而且 RKIP 下调或缺失与前列腺癌, 乳腺癌和黑色素瘤等多种人类恶性肿瘤的转移和不良预后有关^[8~10]. 然而, RKIP 在 NPC 转移中的作用尚未见报道.

基于比较蛋白质组学研究发现, RKIP 在 NPC 组织中表达下调的结果, 采用 Western blot 和免疫组化方法分别检测 RKIP 在不同转移潜能的 5-8F 和 6-10B NPC 细胞中, 以及在 NPC、正常鼻咽上皮组织(NNET)及颈淋巴结转移癌 NPC(LMNPC)中的表达水平, 并分析 RKIP 表达水平对 NPC 细胞体外侵袭能力和 NF- κ B 信号通路活性的影响. 研究结果发现, RKIP 可能是 NPC 的一个转移抑制基因, 其表达下调 / 缺失可能通过激活 NF- κ B 信号通路促进 NPC 侵袭转移.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织. 10 对新鲜的活检 NPC 组织(未分化型非角化鳞癌即 WHO type III)和配对的癌旁正常鼻咽上皮组织(ANNET)取自中南大学湘雅医院, 用于双向电泳(2-DE)分析. 石蜡包埋组织标本包括 30 例 NPC 组织(WHO type III), 30 例正常鼻咽上皮组织(NNET)和 30 例颈淋巴结转移 NPC 组织(LMNPC)取自湖南省肿瘤医院病理科, 用于免疫组化染色. 病人为未经放疗和化疗的初诊病人, 所有病例经病理学确诊.

1.1.2 细胞. NPC 细胞系 5-8F、6-10B 由本室保存. 5-8F、6-10B 来源于同一亲本(SUNE1)鼻咽癌细胞株, 5-8F 具有高致瘤和高转移能力, 而 6-10B 具有成瘤能力但不转移^[11]. 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养.

1.1.3 质粒. RKIP 正义质粒 pcDNA3.1(+)-ssRKIP 及其空白质粒 pcDNA3.1(+), 以及 RKIP 反义质粒 pcDNA3.1(-)-asRKIP 及其空白质粒 pcDNA3.1(-)由美国密西根大学 Keller 教授惠赠; 含 NF- κ B 结合

位点[5(GGGGACTTCC)]的 NF- κ B 荧光素酶报告基因质粒 (pNF- κ B-luc) 为 Stratagene 公司产品 (Catalog#219077).

1.1.4 试剂. 小牛血清、RPMI1640 培养基购自 Gibco BRL 公司; 丙烯酰胺、甲叉 - 双丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷、甘氨酸、十二烷基磺酸钠 (SDS)、尿素、硫脲、过硫酸铵、CHAPS、IPG 缓冲液 pH 3~10、24 cm 固相化 pH 梯度干胶条、考马斯亮蓝 G-250、组织研磨试剂盒、2D 蛋白定量试剂盒、ECL 检测试剂盒均购自 Amersham Biosciences 公司; 兔抗人 RKIP 抗体、兔抗人 p-I κ B- α 抗体、兔抗人 I κ B- α 抗体、HRP 标记的羊抗兔 IgG 和 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 均购自 Santa cruz 公司; 二硫苏糖醇 (DTT)、碘乙酰胺、TPCK 处理的胰蛋白酶、铁氰化钾、三氟乙酸 (TFA)、碳酸氢铵、硫代硫酸钠、乙腈、 α - 氰基 -4- 羟基肉桂酸 (CCA)、鼠抗人 β -actin 抗体均购自 Sigma 公司; PVDF 膜购自 Millipore 公司; Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司; BCA 蛋白定量试剂盒购自 Pierce 公司; 荧光酶检测试剂盒 (luciferase assay system) 和 β -galactosidase enzyme assay system 购自 Promega 公司; S-P 免疫组织化学试剂盒购自福州迈新生物技术公司.

1.1.5 主要仪器. IPGphor 等电聚焦仪、Ettan DALT II 垂直电泳系统、Imagescanner 扫描仪、Labscan 扫描软件为 Amersham Biosciences 公司产品; Voyager-DE STR 4307 MALDI-TOF-MS 质谱仪为 Applied Biosystem 公司产品; ESI-Q-TOF 串联质谱仪 (Micromass) 为 Waters 公司产品; PDquest7.0 凝胶图像分析软件为 Bio-Rad 公司产品; Mascot 肽质量指纹图数据库查询软件为 Matrixscience 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 组织总蛋白的提取. 20 mg 组织样品称重后与 300 μ l 组织裂解液 (7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 2% NP-40, 1% Triton X-100, 100 mmol/L DTT, 5 mmol/L PMSF, 4% CHAPS, 0.5 mmol/L EDTA, 40 mmol/L Tris, 2% pharmalyte) 混合后, 用组织研磨试剂盒充分研磨裂解组织, 置室温下 1 h, 间断涡旋混匀, 12 000 r/min、4℃ 离心 1 h, 取上清液即为组织总蛋白, 2-D 蛋白定量试剂盒测定蛋白质浓度.

1.2.2 2-DE. 0.6 mg 细胞总蛋白与水化液(8 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 40 mmol/L Tris, 18 mmol/L DTT, 0.5% IPG pH 3~10 缓冲液, 痕量溴酚蓝)混合至总体积为 450 μ l. 蛋白质样本于 IPGphor 等电聚焦仪上按如下条件: 30 V 水化 14 h 后经 500 V 1 h、1 000 V 1 h、8 000 V 10 h 进行等电聚焦. 等电聚焦结束后分别于平衡 A 液和平衡 B 液中各平衡 15 min. 平衡后的 IPG 胶条转移至 12% SDS-PAGE 胶上端, 在 Ettan DALT II 垂直电泳槽上进行第二向电泳. 电泳结束后, 用考马斯亮蓝染色 2-D 胶.

1.2.3 图像分析. 用 Imagescanner 扫描仪以及 LabScan 扫描软件扫描染色的 2-D 胶, 获取 2-D 图像. PDQuest 图像分析软件依次进行点检测、背景消减、匹配、量化比较从而获取斑点的相关信息, 比较 NPC 与 ANNET 2-DE 图谱的差异, 选取表达水平相差 2 倍以上的蛋白质点进行质谱分析.

1.2.4 质谱分析. 从胶中切取差异蛋白质点于 1.5 ml EP 管中, 加入 1 ml 50%乙腈和 50 mmol/L 碳酸氢铵混合液、置于 37℃ 水浴箱中脱色 30 min, 乙腈脱水冷冻抽干. 加入 10 μ l TPCK 处理的胰蛋白酶(0.1 mg/L)冰上吸胀 60 min, 37℃ 酶解 14 h, 30 μ l 萃取液(100%乙腈: 5%三氟乙酸, 1:1)萃取 30 min, 重复萃取 1 次. 萃取液冷冻浓缩至 10 μ l, 取 0.5 μ l 样品与 1 μ l CCA 基质液混合, 点样于不锈钢板, 在 MALDI-TOF-MS 质谱仪上进行分析, 获得肽质量指纹图谱(PMF), Mascot 软件检索 SwissProt 数据库鉴定蛋白质. 为保证蛋白质鉴定结果的准确性, MALDI-TOF-MS 鉴定的差异蛋白质点再进行 ESI-Q-TOF 串联质谱分析. 所有测定均在正离子方式下进行, 测定结果以 peaklist 文件形式给出, 通过 Mascot 软件检索 SwissProt 数据库鉴定蛋白质点.

1.2.5 免疫组织化学染色及其评分. 免疫组织化学染色按 S-P 免疫组化试剂盒说明进行. 简要步骤如下: a. 石蜡切片常规脱蜡和水化; b. 0.1 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0) 98℃, 20 min 进行微波抗原修复; c. 过氧化酶阻断溶液(试剂 A)阻断内源性过氧化物酶的活性 10 min; d. 非免疫动物血清(试剂 B)室温孵育 10 min; e. 一抗(1:100 稀释的兔抗人 RKIP) 4℃ 孵育过夜, 用 PBS 代替一抗作为阴性对照; f. 二抗(试剂 C)室温孵育 12 min; g. 链霉菌抗生素 - 过氧化物酶溶液(试剂 D)室温孵育

10 min; h. DAB 显色, 苏木素复染, 中性树胶封固. 随机选取至少 10 个高倍镜视野($\times 200$), 至少计数 1 000 个细胞, 以积分法计算结果^[12], 即根据每张切片的染色强度和阳性细胞比例计分. 着色强度: 无色 0 分; 浅黄色 1 分; 棕黄色 2 分; 棕褐色 3 分. 着色细胞比例: 无着色 0 分; <30%为 1 分; 30%~60%为 2 分; $\geq 60\%$ 为 3 分. 两者相加 0~2 分为弱阳性; 3~4 分为阳性; 5~6 分为强阳性.

1.2.6 细胞转染. 在转染前一天, 以 3×10^5 个 / 孔密度接种 5-8F, 6-10B 细胞于 6 孔培养板, 次日细胞达到约 80%融合, 按 Lipofectamine2000 转染试剂盒说明将 pcDNA3.1 (+)-ssRKIP 和空白质粒 pcDNA3.1(+)-分别转染 5-8F 细胞, 将 pcDNA3.1(-)-asRKIP 和空白质粒 pcDNA3.1(-)-分别转染 6-10B 细胞. 转染 48 h 后, 细胞按 1:4 传代, 用含 450 mg/L G418 的 DMEM 培养基进行筛选, 2~3 周后挑取 G418 抗性克隆, 扩大培养, Western blot 检测 RKIP 表达, 建立稳定转染细胞系.

1.2.7 细胞侵袭能力检测. 采用 Corning 公司的 24 孔 Transwell 小室检测细胞的侵袭能力. 8 μ m 孔径聚碳酸酯膜将 Transwell 小室分隔为上下两室, 用 B&D 公司的 Matrigel 包被聚碳酸酯膜. 具体步骤如下: a. 用含 1% FBS 的 DMEM 培养基重悬细胞, 调整细胞数为 1.25×10^4 /ml; b. 下室中加入 500 μ l 含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 上室中加入 500 μ l 细胞悬液; c. 37℃, 5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h; d. 结晶紫染色: 取出聚碳酸酯膜, PBS 冲洗 3 次, 无水乙醇固定 2 min, PBS 冲洗 1 次, 0.1%结晶紫染色 15 min; e. 用棉签擦掉膜上表面的细胞, 显微镜下计数穿过膜的细胞, 观察 5 个高倍视野($\times 200$). 穿过膜的细胞为侵袭细胞. 实验重复 3 次.

1.2.8 Western blot. 收集实验组和对照组 NPC 细胞, 加入细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.5% NP40, 1 mmol/L PMSF, 25 mg/L aprotinin, 25 mg/L leupeptin)冰上裂解 30 min, 12 000 r/min、4℃ 离心 15 min 后取上清即为细胞总蛋白. BAC 定量试剂盒测定蛋白质的浓度. 30 μ g 总蛋白进行 10% SDS-PAGE 分离, 蛋白质电转移至 PVDF 上, 印迹膜用 3% BSA 室温封闭 2 h; 1:1 000 稀释的兔抗人 RKIP, 1:2 000 稀释的兔

抗人 p-I κ B- α 和 I κ B- α 抗体 4℃ 温育 12 h, TBST 缓冲液洗膜 3×10 min, 1:3 000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔二抗室温温育 1 h, TBST 缓冲液洗膜 3×10 min, ECL 试剂发光、显影和定影. 实验重复 3 次.

1.2.9 荧光素酶报告基因系统检测 NF- κ B 的转录活性. 接种 10^4 个细胞于 96 孔培养板, 次日细胞达到约 80% 融合, 按 Lipofectamine2000 转染试剂盒说明将 NF- κ B 荧光素酶报告基因质粒 (pNF- κ B-luc) 分别转染实验组和对照组 NPC 细胞, 每组设 3 个平行孔. 转染 48 h 后, 按荧光酶活性检测试剂盒说明, 每孔加入 100 μ l 裂解液, 室温裂解 15 min, 12 000 r/min 室温离心 15 s, 取 20 μ l 上清, 加入 100 μ l 反应底物, 用 Promega 公司单光子检测仪 (Luminometer) 检查荧光素酶活性 (relative luciferase unite, RLU). 实验结果用 β -gal 作对照进行校正. 转染效率的校正按 β -galactosidase enzyme assay system 的说明进行. 实验重复 3 次.

2 结 果

2.1 NPC 和 ANNET 2-DE 图谱的建立及其差异蛋白质点的识别

组织总蛋白经 2-DE 分离, 考染显色后得到背景清晰、分辨率高的 NPC 和 ANNET 的 2-DE 图谱各 10 张, 每张胶展示大约 1 000 个蛋白质点. 建立同组内的所有 2-D 凝胶的平均胶即计算同组内所有凝胶上的同一蛋白质点的平均表达量, 某个蛋白质点的表达量是其在胶上的灰度体积 (面积×灰度). 比较两组平均胶的差异 (均数进行成组比较的 t 检验, $P < 0.05$), 得到 NPC 和 ANNET 组差异大于 2 倍的蛋白质点共 32 个. 图 1a 为代表性的 NPC 和 ANNET 蛋白质的 2-DE 图谱, 图 1 中标出了 32 个差异蛋白质点. 图 1b 为 31 号差异蛋白质点 (RKIP) 的局部放大, 它在 NPC 中的表达水平明显低于 ANNET.

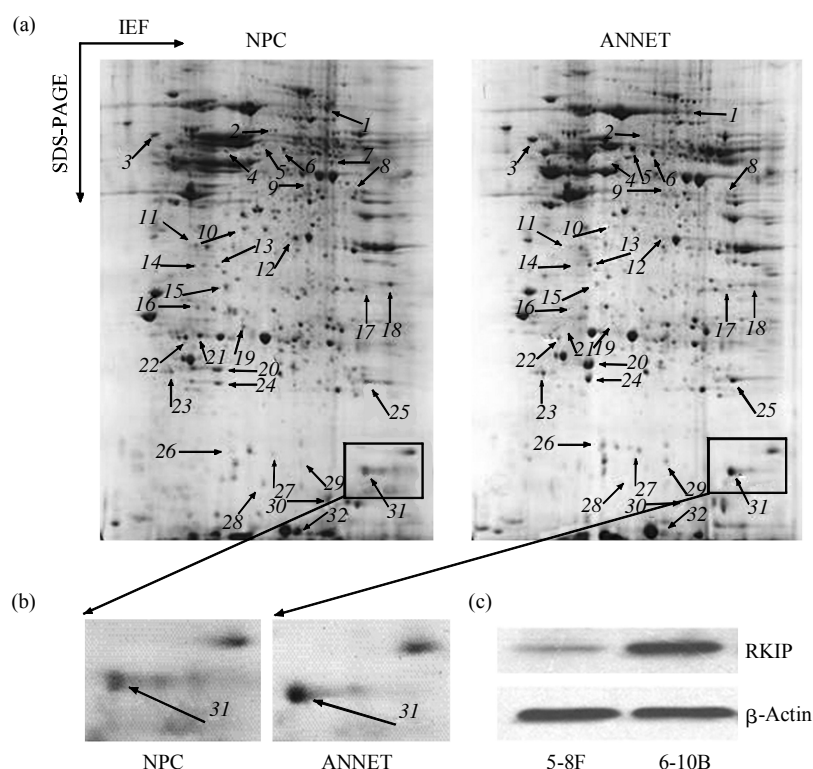


Fig. 1 2-DE maps of ANNET and NPC tissue

(a) Representative 2-DE maps of adjacent normal nasopharyngeal epithelial tissue (ANNET) and NPC tissue. 32 differential protein spots are marked with arrows. (b) A close-up image of the region of 2-D gels shows the downregulation of protein spot 31 (RKIP) in NPC tissue compared with ANNET. (c) A representative result of Western blot analysis shows the downregulation of RKIP expression in NPC cell line 5-8F compared with 6-10B. β -Actin was used as an internal control for loading.

2.2 差异蛋白质点的质谱鉴定

从胶中切取 32 个差异蛋白质点, 胶内酶解后进行 MALDI-TOF-MS 和 ESI-Q-TOF 分析, 分别获取肽质量指纹图谱及肽序列标签, 数据库搜寻共鉴定出 21 个差异表达的蛋白质(表 1). 在 NPC 中表

达下调的 31 号蛋白点鉴定结果见图 2. 该差异蛋白的肽质量指纹图谱检索 SwissProt 数据库显示为 RKIP 蛋白, ESI-Q-TOF 分析亦显示, 来自该蛋白质的肽片段(m/z 975.4539)序列 GNDISSGTVLSDYVGSGPPK 为 RKIP 氨基酸序列的一部分.

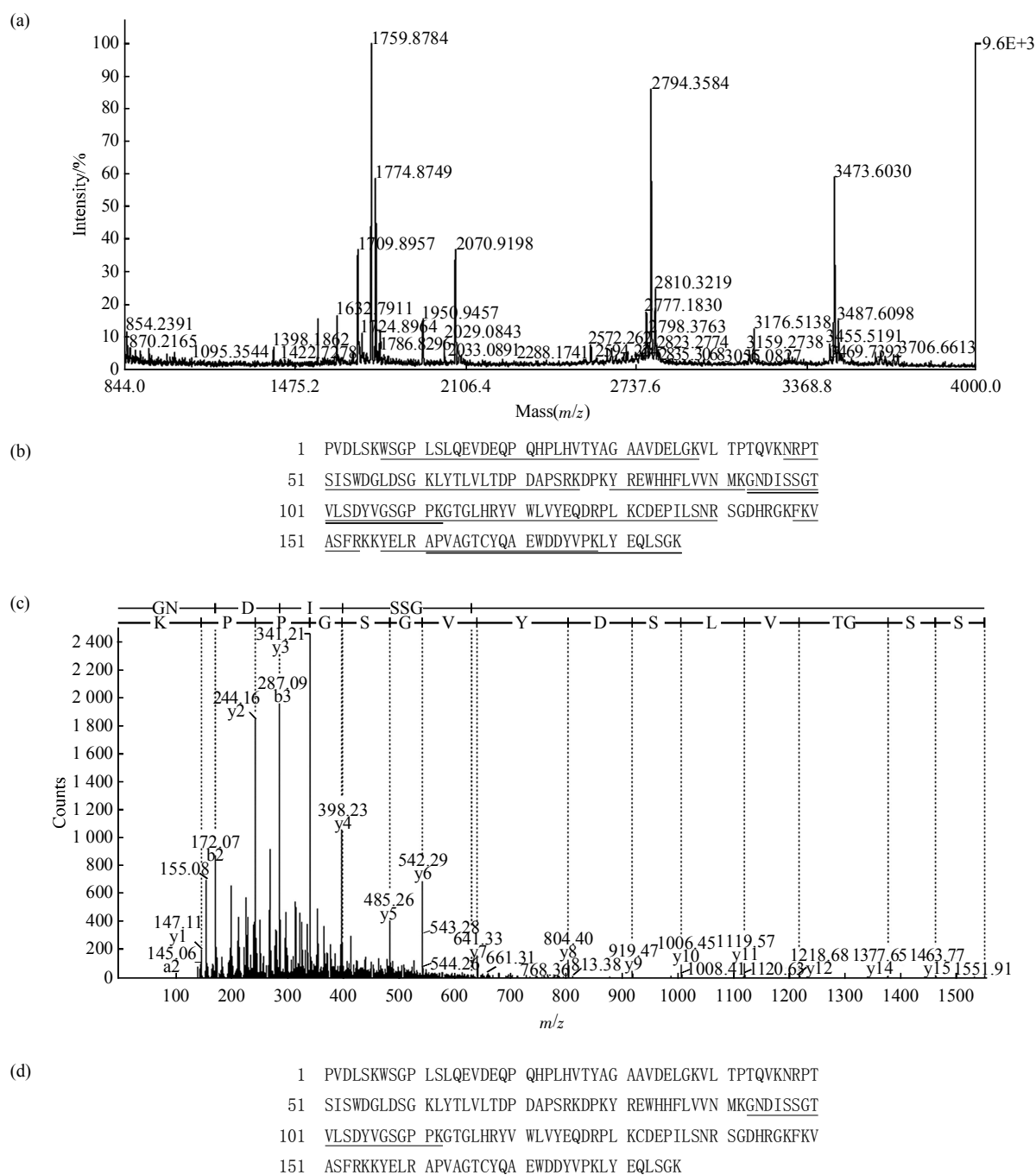


Fig. 2 MALDI-TOF-MS and ESI-Q-TOF-MS analysis of differential protein spot 31

(a) The MALDI-TOF MS mass spectrum of spot 31 identified as the RKIP according to the matched peaks is shown. (b) Protein sequence of RKIP is shown, and matched peptides are underlined. (c) The ESI-Q-TOF MS sequenced spectrum of spot 31. The amino acid sequence of a doubly charged peptide with m/z 975.4539 was identified as GNDISSGTVLSDYVGSGPPK from mass differences in the y and b fragment ions series, matched with residues 94~112 of RKIP. (d) Protein sequence of RKIP is shown. Matched MS/MS fragmentation is underlined.

Table 1 Differential expression proteins between NPC and ANNET identified by MS

Spot No.	Swiss-Prot AC	Protein name	M/u	pI	Score	Coverage (%)	Expression in NPC/ANNET
1	P05787	Keratin-8	53 540	5.52	195	71	↑
2	P07942	Lamin B1	66 653	5.11	76	50	↑
3	P08670	Vimentin	53 545	5.06	122	57	↓
4	P08727	Keratin 19	44 065	5.04	254	71	↑
5	P00558	Phosphoglycerate kinase 1	44 854	8.30	92	38	↓
7	P06733	Alpha-enolase	47 350	6.99	70	37	↑
8	P12429	Annexin A3	36 393	5.63	64	25	↑
9	P04083	Annexin A1	38 787	6.64	74	52	↑
10	P04792	Heat shock protein 27	22 826	5.98	112	84	↑
11	Q56G89	Serum albumin	67 931	5.69	216	56	↑
12	P62333	Proteasome endopeptidase complex	44 418	7.10	66	37	↑
13	P14550	Alcohol dehydrogenase [NADP ⁺]	36 761	6.34	124	61	↓
16	P07237	Protein disulfide-isomerase	57 480	4.76	111	36	↑
18	P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36 070	8.58	99	62	↓
25	P60174	Triosephosphate isomerase	26 807	6.51	121	58	↓
26	A3RRX2	Superoxide dismutase	16 154	5.70	75	68	↓
27	Q6PUJ7	Prohibitin	29 859	5.57	156	68	↓
28	P02792	Ferritin light chain	19 933	5.51	70	44	↑
29	Q5VUJ9	EF hand domain containing 2	26 795	5.15	105	55	↓
30	O75947	ATP synthase D chain, mitochondrial	18 405	5.22	93	49	↑
31	P30086-00-00-00	Raf kinase inhibitor protein	21 027	7.42	164	86	↓

AC: Accession code; M: Molecular mass; pI: Isoelectric point.

2.3 RKIP 在 NPC 细胞系和组织中的表达

为探讨 RKIP 是否与 NPC 的转移有关, 采用 Western blot 方法检测 RKIP 在高转移 5-8F 细胞和不转移 6-10B 细胞中的表达. 结果如图 1c 所示, RKIP 在高转移的 5-8F 细胞中表达水平明显低于不转移的 6-10B 细胞, 提示 RKIP 表达下调可能与 NPC 细胞的转移有关. 为进一步探讨 RKIP 与临床 NPC 转移的关系, 采用免疫组化方法检测 RKIP 在石蜡包埋的 30 例原发 NPC, 30 例 NNET 及 30 例 LMNPC 中的表达. 结果显示: RKIP 在原发 NPC 组织中的表达明显低于 NNET, 在 LMNPC 中表达缺失 ($P < 0.01$, 图 3, 表 2), 提示 RKIP 表达下调可能与临床 NPC 转移有关.

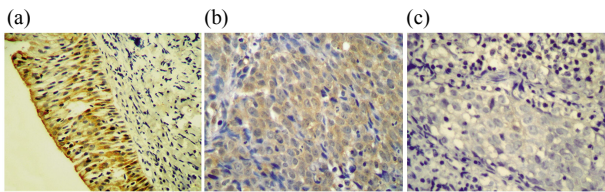


Fig. 3 A representative result of RKIP immunohistochemistry
(a) Strong staining of NNET. (b) Moderate staining of primary NPC tissue. (c) Negative staining of LMNPC. Original magnification, $\times 200$.

Table 2 The difference of RKIP expression among NNET, primary NPC and LMNPC

Tissues	RKIP staining			Total	P
	0~2	3~4	5~6		
NNET	3	11	16	30	0.009 ¹⁾
NPC	7	17	6	30	
LMNPC	30	0	0	30	0.000 ²⁾

¹⁾ $P < 0.01$ by Mann-Whitney U test, NNET *vs.* NPC. ²⁾ $P < 0.01$ by Mann-Whitney U test, NPC *vs.* LMNPC.

2.4 RKIP 表达水平对 NPC 细胞侵袭能力的影响

为检测 RKIP 在 NPC 转移中的作用, 建立了 RKIP 表达上调的 5-8F 细胞系 (5-8F-ssRKIP#1, 5-8F-ssRKIP#2), 以及 RKIP 表达下调的 6-10B 细胞系 (6-10B -asRKIP#1, 6-10B-asRKIP#2, 图 4a), 分析 RKIP 表达水平改变对 NPC 侵袭能力的影响. 结果如图 4a 和 4b 所示, RKIP 表达上调能抑制 5-8F 细胞的侵袭能力, 而 RKIP 表达下调能增强 6-10B 细胞的侵袭能力. 结果表明, RKIP 表达水平与 NPC 细胞体外侵袭能力负相关.

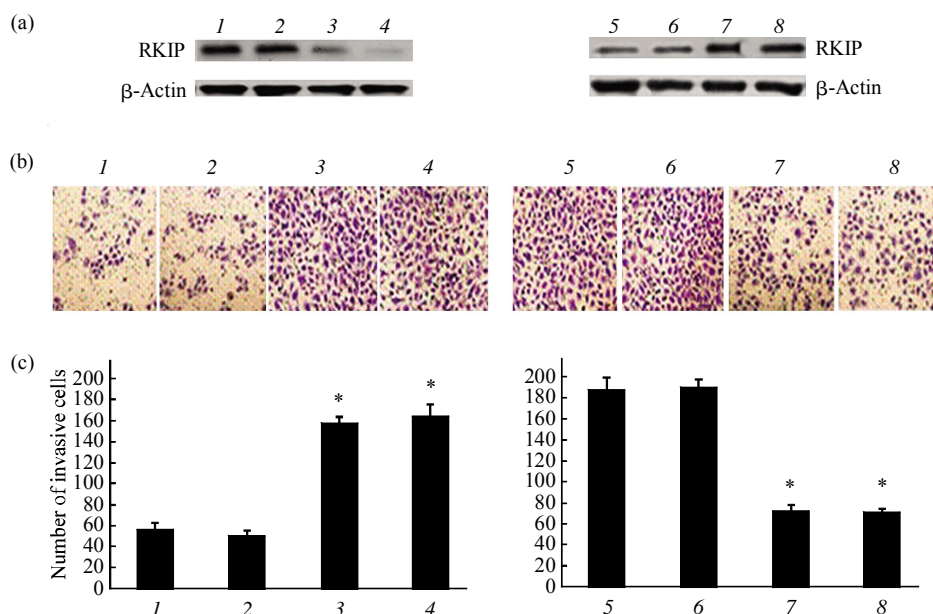


Fig. 4 *In vitro* invasion assay

(a) Western blot analysis shows the levels of RKIP expression in 6-10B (left panel) and 5-8F (right panel) cells and their transfectants. β -Actin was used as an internal control for loading. (b) The *in vitro* invasion of 6-10B (left panel) and 5-8F (right panel) cells and their transfectants was measured by using transwell chambers. Cancer cells penetrating the pre-coated polycarbonate membrane were photographed. (c) The average numbers of invasive cancer cells per field in 6-10B (left panel) and 5-8F (right panel) cells and their transfectants. * $P < 0.01$. Vector: Transfected with an empty vector; ssRKIP: Transfected with a sense RKIP vector; asRKIP: Transfected with an antisense RKIP vector. 1: 6-10B; 2: 6-10B vector; 3: asRKIP#1; 4: asRKIP#2; 5: 5-8F; 6: 5-8F vector; 7: ssRKIP#1; 8: ssRKIP#2.

2.5 RKIP 表达水平对 NPC 细胞 NF- κ B 信号通路活性的影响

由于 RKIP 是 NF- κ B 信号通路的内源性抑制因子, RKIP 的表达水平在高转移 5-8F 细胞中低于非转移 6-10B 细胞, 而且在颈淋巴结转移 NPC 组织中表达缺失, 这提示 NF- κ B 信号通路可能在转移 NPC 细胞中被活化. 为测试这种可能性, 我们检测磷酸化 I κ B- α (p-I κ B- α) 及总 I κ B- α 在 5-8F 和 6-10B 细胞及其转染细胞中的表达水平. 结果如图 5 所示, p-I κ B- α 的表达水平在 5-8F 细胞中明显高于 6-10B 细胞, 上调 RKIP 表达能降低 5-8F 细胞 (5-8F-ssRKIP#1, 5-8F-ssRKIP#2) 的 p-I κ B- α 水平, 下调 RKIP 表达能增加 6-10B 细胞 (6-10B-asRKIP#1, 6-10B-asRKIP#2) 的 p-I κ B- α 水平, 但 RKIP 表达水平与总 I κ B- α 的水平不相关, 这表明, 随着非转移 6-10B 细胞移行到高转移的 5-8F 细胞, RKIP 表达水平下降, 而 NF- κ B 信号通路被活化. 为进一步检测 RKIP 对 NF- κ B 信号通路活性的影响, 采用 NF- κ B 荧光酶报道基因系统分析表达水平改变 RKIP 对 NF- κ B 转录因子活性的影响, 结果

如图 6 所示, 上调 RKIP 表达能降低 5-8F 细胞 (5-8F-ssRKIP#1, 5-8F-ssRKIP#2) NF- κ B 的转录活性, 而下调 RKIP 表达能增加 6-10B 细胞 (6-10B-asRKIP#1, 6-10B-asRKIP#2) NF- κ B 的转录活性, 这表明, RKIP 表达水平与 NF- κ B 转录因子的活性负相关. 上述结果提示, RKIP 表达下调可能通过活化 NF- κ B 信号通路促进 NPC 细胞侵袭和转移.

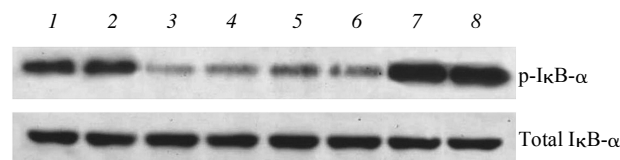


Fig. 5 Modulation of RKIP expression is associated with alterations in I κ B- α phosphorylation in NPC cells

Representative results of Western blot analysis of the levels of phosphorylated I κ B- α (p-I κ B- α ; top panel) and total I κ B- α (bottom panel) in untransfected 5-8F and 6-10B cells as well as their transfectants. Vector: Transfected with an empty vector; ssRKIP: Transfected with a sense RKIP vector; asRKIP: Transfected with an antisense RKIP vector. 1: 5-8F; 2: 5-8F vector; 3: ssRKIP#1; 4: ssRKIP#2; 5: 6-10B; 6: 6-10B vector; 7: asRKIP#1; 8: asRKIP#2.

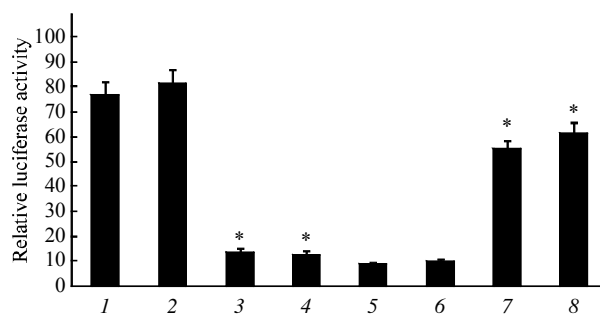


Fig. 6 The effect of RKIP expression levels on the transactivation activity of NF- κ B in NPC cells detected by NF- κ B luciferase reporter gene system

The relative luciferase activity normalized to the value of β -gal activity. * $P < 0.01$. Vector: Transfected with an empty vector; ssRKIP: Transfected with a sense RKIP vector; asRKIP: Transfected with an antisense RKIP vector. 1: 5-8F; 2: 5-8F vector; 3: ssRKIP#1; 4: ssRKIP#2; 5: 6-10B; 6: 6-10B vector; 7: asRKIP#1; 8: asRKIP#2.

3 讨 论

NPC 是我国南部和东南亚最常见的恶性肿瘤之一, 虽然 NPC 对放疗敏感, 但 5 年生存率仍然徘徊在 50%~60%, 绝大多数病人死于复发和转移。因此, 发现 NPC 转移相关蛋白对于提高 NPC 疗效和生存率至关重要, 也有助于阐明 NPC 转移的分子机制。为筛选 NPC 发病相关的蛋白质, 我们采用蛋白质组学方法比较 NPC 组织与癌旁正常鼻咽上皮组织蛋白质表达谱的差异, 共鉴定 21 个差异表达的蛋白质, 其中一个潜在的转移抑制蛋白 RKIP 在 NPC 组织中的表达水平明显低于癌旁正常鼻咽上皮组织。

RKIP 是一个高度保守、广泛表达的小分子胞浆蛋白, 调节许多重要的生理过程如心脏和神经功能, 精子发生和生殖行为^[13]。研究表明, RKIP 是 NF- κ B 信号通路的负性调控因子^[6]。由于 NF- κ B 信号通路不仅具有调控细胞增殖、分化和凋亡等重要的生理功能, 而且其异常活化与肿瘤发生发展密切相关。因此, RKIP 异常表达可能在肿瘤发生发展中具有重要作用^[14]。Fu 等^[15]于 2003 年采用基因芯片技术比较转移性前列腺细胞系 C4-2B 与非转移前列腺细胞系 LNCaP 的基因表达谱差异, 首先发现并证实 RKIP 具有抑制前列腺转移的作用。随后的研究表明, RKIP 的表达水平不仅与多种人类恶性肿瘤的转移能力呈负相关, 而且与肿瘤预后相

关, RKIP 表达下调/缺失的病人预后差^[8~10, 15]。因此, 目前的研究认为 RKIP 是一个潜在的肿瘤转移抑制蛋白。然而, RKIP 在 NPC 转移中的作用尚未见报道。

为了研究 RKIP 的表达水平与 NPC 转移的关系, 我们采用 Western blot 检测 RKIP 在不同转移潜能的 NPC 细胞中的表达水平, 结果显示: 与非转移 6-10B 细胞相比, RKIP 在高转移 5-8F 细胞中的表达水平明显降低, 提示 RKIP 表达下调可能与 NPC 细胞的转移潜能有关。为进一步探讨 RKIP 与临床 NPC 转移的关系, 采用免疫组化方法检测 RKIP 在石蜡包埋的原发 NPC, 正常鼻咽上皮组织及淋巴结转移 NPC 组织中的表达。结果显示: RKIP 在原发 NPC 组织中的表达明显低于正常鼻咽上皮组织, 在颈淋巴结转移 NPC 组织中的表达缺失, 提示 RKIP 表达下调可能与临床 NPC 转移有关。由于侵袭是肿瘤转移的关键步骤, 因此我们检测 RKIP 表达水平是否与 NPC 细胞的体外侵袭能力相关。结果显示, 上调 RKIP 表达能抑制 5-8F 细胞的侵袭能力, 而下调 RKIP 表达能增强 6-10B 细胞的侵袭能力, 表明 RKIP 表达水平与 NPC 细胞侵袭能力负相关。

核因子 κ B(NF- κ B)是一种作用十分广泛的真核细胞转录因子, 而 I κ B- α 是 NF- κ B 活化的抑制物。在经典 NF- κ B 活化途径中, 细胞在某些细胞外信号或致癌因素的刺激下, IKK 引起 I κ B- α 特定位点上的丝氨酸残基磷酸化, 随后泛素化降解, 释放出 NF- κ B, NF- κ B 转入细胞核, 与特定的 DNA 序列结合, 启动相关基因转录。NF- κ B 信号通路参与细胞增生、分化和凋亡调控, 其异常活化与肿瘤发生发展密切相关。RKIP 是 NF- κ B 信号通路的内源性抑制子, RKIP 下调/缺失可能导致 NF- κ B 信号通路的激活, 促进肿瘤的侵袭与转移。为此, 我们进一步研究 RKIP 下调能否激活 NPC 细胞的 NF- κ B 信号通路。在建立 RKIP 表达上调的 5-8F 细胞系和 RKIP 表达下调的 6-10B 细胞系的基础上, 分析 RKIP 表达水平改变对 NPC 细胞 NF- κ B 信号通路的影响。结果显示, 上调 RKIP 在 5-8F 细胞中的表达水平能明显降低 p-I κ B- α 的水平和 NF- κ B 的转录活性, 下调 RKIP 在 6-10B 细胞中的表达水平能明显增强 p-I κ B- α 表达水平和 NF- κ B 的转录活性。结果说明, RKIP 表达下调能激活

NPC 细胞的 NF- κ B 信号通路, 并提示 RKIP 表达下调可能通过活化 NF- κ B 信号通路促进 NPC 细胞侵袭和转移.

本研究采用比较蛋白质组学方法识别了 21 个可能与 NPC 发病有关的蛋白质, 首次发现 RKIP 可能是 NPC 的转移抑制蛋白, 其表达下调 / 缺失可能通过活化 NF- κ B 信号通路促进 NPC 转移, 本研究结果将有助于揭示 NPC 转移的分子机制.

参 考 文 献

- 1 Yu M C, Yuan J M. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol*, 2002, **12**(6): 421~429
- 2 King A D, Ahuja A T, Leung S F, *et al.* Neck node metastases from nasopharyngeal carcinoma: MR imaging of patterns of disease. *Head Neck*, 2000, **22**(3): 275~281
- 3 Huang C J, Leung S W, Lian S L, *et al.* Patterns of distant metastases in nasopharyngeal carcinoma. *Kaohsiung J Med Sci*, 1996, **12**(4): 229~234
- 4 Sriuranpong V, Mutirangura A, Gillespie J W, *et al.* Global gene expression profile of nasopharyngeal carcinoma by laser capture microdissection and complementary DNA microarrays. *Clin Cancer Res*, 2004, **10**(15): 4944~4958
- 5 Reymond M A, Schlegel W. Proteomics in cancer. *Adv Clin Chem*, 2007, **44**: 103~142
- 6 Keller E T, Fu Z, Brennan M. The role of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) in health and disease. *Biochem Pharmacol*, 2004, **68**(6): 1049~1053
- 7 Yeung K C, Rose D W, Dhillon A S, *et al.* Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol*, 2001, **21**(21):7207~7217
- 8 Fu Z, Smith P C, Zhang L, *et al.* Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst*, 2003, **95**(12): 839~841
- 9 Hagan S, Al-Mulla F, Mallon E, *et al.* Reduction of Raf-1 kinase inhibitor protein expression correlates with breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res*, 2005, **11**(20): 7392~7397
- 10 Schuierer M M, Bataille F, Hagan S, *et al.* Reduction in Raf kinase inhibitor protein expression is associated with increased Ras-extracellular signal-regulated kinase signaling in melanoma cell lines. *Cancer Res*, 2004, **64**(15): 5186~5192
- 11 Song L B, Yan J, Jian S W, *et al.* Molecular mechanisms of tumorigenesis and metastasis in nasopharyngeal carcinoma cell sublines. *Chin J Cancer*, 1998, **17**(5): 324~327
- 12 Hara A, Okayasu I. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in human astrocytic gliomas: correlation with angiogenesis and prognostic significance. *Acta Neuropathol*, 2004, **108**(1): 43~48
- 13 Keller E T, Fu Z, Brennan M. The role of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) in health and disease. *Biochem Pharmacol*, 2004, **68**(6): 1049~1053
- 14 Keller E T, Fu Z, Brennan M. The biology of a prostate cancer metastasis suppressor protein: Raf kinase inhibitor protein. *J Cell Biochem*, 2005, **94**(2): 273~278
- 15 Fu Z, Kitagawa Y, Shen R, *et al.* Metastasis suppressor gene Raf kinase inhibitor protein (RKIP) is a novel prognostic marker in prostate cancer. *Prostate*, 2006, **66**(3): 248~256

RKIP Downregulation Associated With The Metastasis and Activation of NF- κ B Signaling Pathway in Nasopharyngeal Carcinoma*

CHEN Yan^{1)**}, LI Jun^{2)**}, YI Hong¹⁾, OUYANG Guo-Liang¹⁾, LI Cui¹⁾, ZHANG Peng-Fei¹⁾,
LI Mao-Yu¹⁾, PENG Fang¹⁾, CHEN Zhu-Chu¹⁾, LI Jian-Ling^{1)***}, XIAO Zhi-Qiang^{1)***}

¹⁾Key Laboratory of Cancer Proteomics of Chinese Ministry of Health, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China;

²⁾Department of Emergency Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract To identify the proteins associated with nasopharyngeal carcinoma (NPC) oncogenesis, a two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry was used to screen for differential proteins between NPC and adjacent normal nasopharyngeal epithelial tissue (ANNET). As a result, 21 differential proteins were identified, and Raf kinase inhibitor protein (RKIP) was one of the nine downregulated proteins in NPC compared to ANNET. To investigate for the role and mechanisms of RKIP in the metastasis of NPC, Western blot and immunohistochemistry was respectively used to detect RKIP expression in 5-8F and 6-10B NPC cell lines with the different metastatic potentials, as well as in the normal nasopharyngeal epithelial tissue (NNET), primary NPC and NPC metastasis. Furthermore, 5-8F and 6-10B cells were stably transfected with plasmids that expressed sense and antisense RKIP cDNA, respectively, or with empty vector to establish the stable transfected cell lines. The effects of RKIP expression on *in vitro* cell invasion, and the activity of NF- κ B signaling pathway were analyzed in the transfected cell lines. The results showed that RKIP was significantly downregulated in 5-8F compared with 6-10B, in NPC compared with NNET, and not detectable in NPC metastasis. Overexpressed RKIP in 5-8F could decrease its *in vitro* cell invasion, whereas downregulated RKIP in 6-10B could increase its *in vitro* cell invasion. Overexpressed RKIP in 5-8F could decrease phosphorylated-I κ B- α level and transactivation activity of NF- κ B, whereas downregulated RKIP in 6-10B could increase phosphorylated-I κ B- α level and transactivation activity of NF- κ B. Taken together, the results suggest that RKIP may be a NPC cell metastasis suppressor, and decreased RKIP expression is associated with the increased metastasis capability of NPC cells possibly through the activation of NF- κ B signaling pathway.

Key words nasopharyngeal carcinoma, proteomics, RKIP, metastasis, NF- κ B

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00741

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2001CB510207), Hibiscus Scholars of Hunan Province, China (2007-362), Program for New Century Excellent Talents in University (2002-48, 2007-70), Key Research Program from the Science and Technology Committee of Hunan Province, China (06SK2004).

**CHEN Yan and LI Jun contributed equally to this work.

***Corresponding author.

LI Jian-Ling. Tel: 86-731-4327334, Fax: 86-731-4327332, E-mail: jianlingli2001@yahoo.com.

XIAO Zhi-Qiang. Tel: 86-731-4327334, Fax: 86-731-4327321, E-mail: zqxiao2001@yahoo.com.cn

Received: October 28, 2008 Accepted: November 25, 2008