文章编号:2095 - 1116(2014)04 - 0339 - 04 ·基础医学·

Kiss-1 与结肠癌 SW480 细胞增殖的关系

钟 华,吴雪艳,刘迪群
(南华大学附属第一医院消化内科,湖南 衡阳 421001)

摘 要: **目的** 以结肠癌细胞 SW480 为模型,初步探讨 Kiss-1 基因过表达与结肠癌细胞增殖的关系。 **方法** 采用脂质体转染的方法将 Kiss-1/pEGFP-N1 重组质粒转染至 SW480 细胞,上调结肠癌细胞中 Kiss-1 的表达水平,经 G418 筛选出稳定表达株;根据细胞分为 3 组:阴性对照组(转染 pEGFP-N1 空载体)、实验组(转染 pEGFP-N1-Kiss1)及空白对照组(未转染)。Western blot 检测转染后细胞中 Kiss-1 表达量的变化;采用 CCK8 试验分析 Kiss-1 对 SW480 细胞增殖的抑制效果。 **结果** 成功将 pEGFP-N1-Kiss-1 重组质粒转染至 SW480 结肠癌细胞,western blot 检测出阴性对照组和空白对照组中显示 Kiss-1 低表达,实验组 Kiss-1 表达量增加,CCK8 试验表明实验组细胞增殖率明显低于对照组($P<0.05$)。 **结论** Kiss-1 可抑制结肠癌细胞的增殖率。

关键词: 结肠癌; Kiss-1; 增殖
中图分类号:R735.35 **文献标识码:**A

Effect of Kiss-1 on the Proliferation of Colon Cancer Cell SW480

ZHONG Hua, WU Xueyan, LIU Diqun
(*Department of Digestion, the First Affilliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan* 421001, *China*)

Abstract: **Objective** To use colon cancer cell SW480 as a model, to explore effects of overexpression of Kiss-1 on proliferation of colon cancer cells. **Methods** Using liposome transfection, Kiss-1/pEGFP-N1 recombinant plasmid was transfected into SW480 cells, colon cancer Kiss-1 cells were upregulated, stably expressed cells were selected by G418; the cells were divided into 3 groups: negative control group (pEGFP-N1 transfection with empty vector), experimental group (with pEGFP-N1-Kiss1) and control group (without transfection). Western blot detection was used to detect the expression of Kiss-1 after transfection and CCK8 test was applied to analyze the inhibitory effect of Kiss-1 on the proliferation of SW480 cells. **Results** pEGFP-N1-Kiss-1 recombinant plasmid was successfully transfected into the colorectal cancer cell line SW480, Western blot detected low expression of Kiss-1 in the negative control group and blank control group, while Kiss-1 in experimental group was increased; CCK8 test showed significantly lower rate of proliferation of cells in the experimental group than the control group ($P<0.05$). **Conclusion** Kiss-1 can inhibit the proliferation of colon cancer cells rate.

Key words: colon cancer; Kiss-1; proliferation

结肠癌是我国最常见的消化系统恶性肿瘤之一,其发病率位居第二位,仅次于胃癌,且近年呈现年轻化及上升趋势。细胞恶性增殖是恶性肿瘤的重要生物学特性之一,它与肿瘤的恶性程度直接相关。Kiss-1 是继 nm23 之后,Lee 等[1]应用微细胞介导的染色体杂交技术及差减杂交技术在人黑色素瘤细胞株中发现的一种肿瘤转移抑制基因。其定位于染色体 1q32-q41,基因序列中包含四个外显子,其编码的蛋白 kisspeptin 是由 145 个氨基酸组成的亲水性多肽[2]。本研究旨在体外构建高表达 Kiss-1 的人结直肠腺癌细胞株(SW480)细胞株模型,拟探讨 Kiss-1 基因对结肠癌增殖的影响,为结肠癌患者创造新的治疗靶点提供理论依据。

收稿日期:2013 - 11 - 17
基金项目:湖南省教育厅一般项目(11C1107).
作者简介:钟华,硕士,副主任医师,研究方向:消化道肿瘤及炎症性肠病,E-mail:zhonghuahao@ hotmail. com.

1 材料与方法

1.1 材料与细胞培养

人结肠癌细胞株 SW480(湘雅医学院肿瘤研究所惠赠)培养于含 10% 胎牛血清的 1640 培养基中,置于 37 ℃,5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养。质粒 pEGFP-N1-Kiss-1 及空载质粒由上海吉凯公司合成,两种质粒均含有 GFP 绿色荧光,经上海吉凯公司测序鉴定无误。质粒小提试剂盒为康为公司产品,脂质体转染试剂盒 Lipofectamine2000 购自美国 invitrogen 公司,G418 及 CCK8 试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司,兔抗人 Kiss-1 一抗购自武汉博士德生物工程有限公司,二抗购自美国 Epitomics 公司。

1.2 质粒扩增与提取

LB 肉汤(Luria-Bertani, LB)2.5 g 加入 100 mL 一级水中配置成 25 mg/mL 的 LB 液态培养基,高温蒸汽消毒备用。培养基中加入卡那霉素,使其终浓度为 30 μg/mL。质粒 pEGFP-N1-Kiss-1 及空载质粒各 100 μL 分别加入 5 mL LB 培养基中,37 ℃、180 r/min震荡 16 h。提取纯化质粒并进行琼脂糖凝胶电泳及分光光度计测量质粒浓度。

1.3 稳定转染

细胞生长至 90% ~95% 融合度时进行转染。用无血清 1640 培养基将 8 μg pEGFP-N1-Kiss-1 质粒和 10 μL Lipofectamine2000 分别稀释至总体积为 250 μL,室温下静置 5 min。轻轻混匀两种溶液,室温下静置 20 min,将混合液加入 SW480 细胞中,37 ℃,5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养 6 h。吸去培养基,PBS 液洗两遍,加入含 10% 胎牛血清的 1640 培养基终止转染。42 h 后更换完全培养基,加入 500 μg/mL G418 筛选,培养 3 ~4 天待细胞大量死亡时,降低 G418 浓度至 300 μg/mL 维持筛选 4 周左右,获得稳定转染细胞。空载体 pEGFP-N1 转染 SW480 细胞作为阴性对照组。

1.4 Western blot 鉴定 Kiss-1 在 SW480 细胞中的表达

分别提取空白对照组、阴性对照组及实验组中 SW480 细胞总蛋白,用 15% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,半干转法转移至聚偏二氟乙烯膜(Polyvinylidene Fluoride, PVDF 膜),丽春红染色验证后用含 5% 血清的 TBST 封闭 2 h,依次孵育对应一抗及辣根过氧化物酶标记的二抗,最后暗室曝光显像,检测其中 Kiss-1 表达的变化。

1.5 CCK8 法检测细胞增殖情况

已处对数生长期的各组细胞用 0.25% 胰酶消化,制成细胞悬液接种于 96 孔板内(每孔 2×10^3 个细胞)定容至 100 μL 培养,每组细胞设 3 个复孔,同时设置 3 个空白孔(只含细胞培养基)。分别于 0、24、48 及 72 h 每孔加入 5 μL CCK-8 溶液,5% CO_2 及饱和湿度培养基继续孵育 2 h,检测 450 nm 光谱下的吸光度,根据标准曲线用吸光值计算细胞数量,绘制细胞增殖曲线图。

1.6 统计学方法

采用 SPSS18.0 进行统计学分析。实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析方法分析 0、24、48、72 h 阴性对照组、空白对照组及实验组间细胞数量的差异。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 重组质粒 pEGFP-N1-Kiss-1 的测序鉴定

经上海吉凯基因化学技术有限公司的序列测定分析,显示合成的目的基因 Kiss-1 序列完全符合 Gene Bank 中 Kiss-1 cDNA 的序列(图 1)。

2.2 SW480 细胞转染质粒及筛选

SW480 细胞转染质粒后 24 h,在荧光显微镜下观察细胞,可见绿色荧光。经过 4 周的 G418 筛选,G418 维持浓度为 300 μg/mL,视野里几乎所有细胞都带有绿色荧光蛋白。停用 G418 一周,荧光显微镜下观察绿色荧光基本保持不变。稳定转染细胞株筛选成功。

2.3 Western blot 检测 Kiss-1 在 SW480 细胞中的表达

提取 SW480、SW480-pEGFP-N1 和 SW480-Kiss-1 细胞中总蛋白,Western blot 检测 Kiss-1 蛋白 kisspeptin 的表达,可见 kisspeptin 在实验组的 SW480 细胞中高表达,而在空白对照组及阴性对照组的 SW480 细胞中表达量低。结果表明,Kiss-1 基因在 SW480-Kiss-1 细胞中能稳定、高效表达。

2.4 CCK8 法检测各组细胞的增殖能力

运用 CCK8 法检测 Kiss-1 对 SW480 细胞的增殖情况的影响。分别于种板 0、24、48、72 h 加入 CCK8 试剂,孵育 2 h,用酶标仪测定各组细胞的 450 nm波长吸光值(OD 值),绘制细胞增殖曲线。结果显示,培养 24 h 时各组细胞增殖能力间差异无

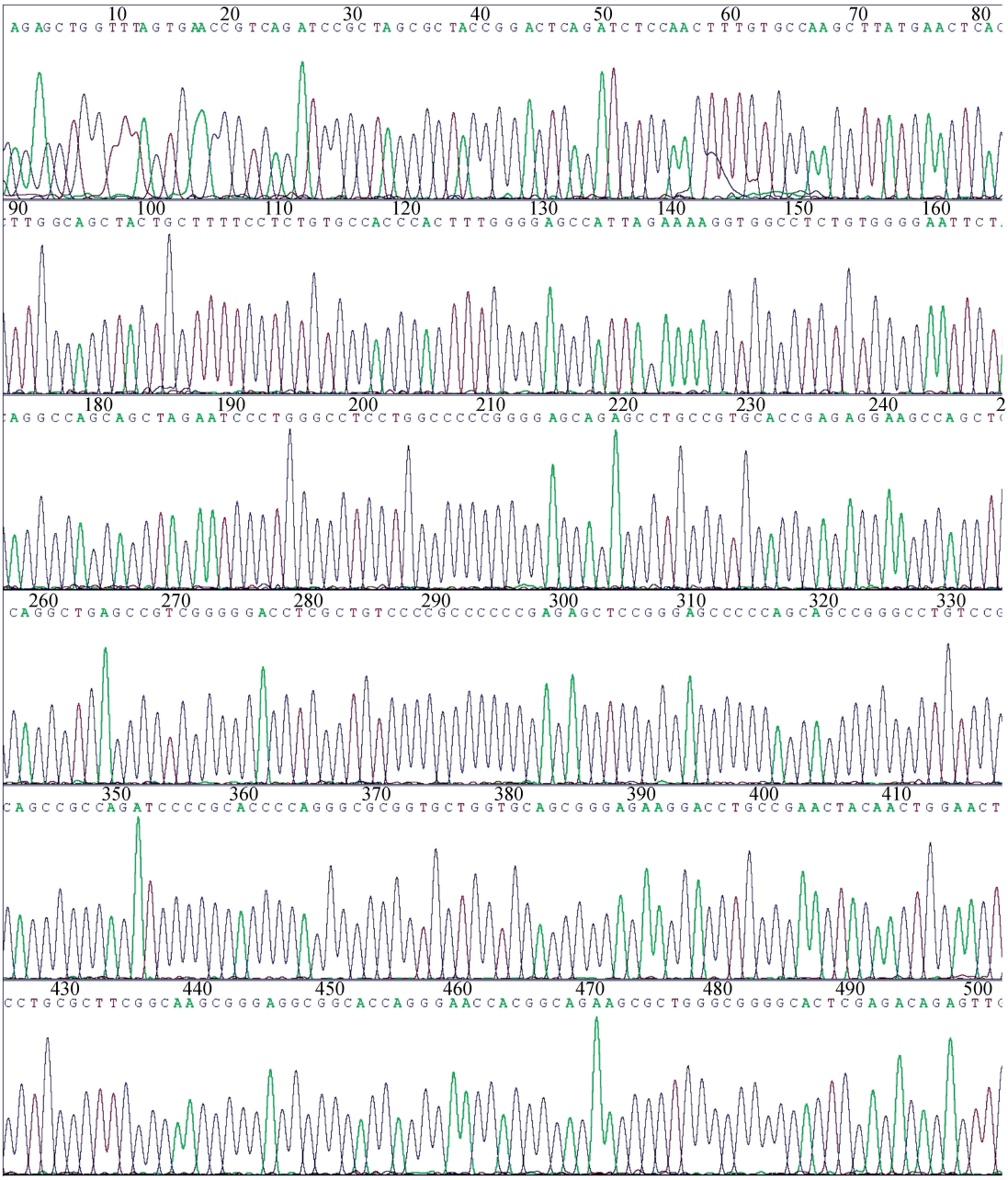

图 1　目的基因 Kiss-1 的测序图谱位点 72-489 区间为目的基因序列

统计学意义($P>0.05$)。48 h 后,随着培养时间延长,实验组细胞增殖能力明显低于对照组($P<0.05$)。而空白对照组与阴性对照组间细胞增殖能力无明显差异($P>0.05$)(图 2)。

3　讨　　论

肿瘤的发生发展与细胞恶性增殖密切相关,细胞增殖失控级凋亡异常导致肿瘤细胞寿命延长。多种癌基因与抑癌基因参与肿瘤的发生与发展过程。Kiss-1 是近来颇受关注的一种抑癌基因,其基因结构由四个外显子区域组成,外显子Ⅰ与外显子Ⅱ为非编码区,外显子Ⅲ的结构依次为翻译起始位点、38 个非编码碱基、及 103 个编码碱基,外显子Ⅳ含 335 个翻译碱基、翻译终止点、多腺苷酸化信号和 121 个非编码碱基。先前有学者研究表明其对胃癌、肾细胞癌等多种人类恶性肿瘤有转移抑制作用[3-5]。同时在小细胞肺癌、骨肉瘤、胃癌等肿瘤细胞增殖过程中,Kiss-1 也发挥着负性调节作用[4,6-7]。同样地,对鼻咽癌、肝癌患者的研究显示,低表达 Kiss-1 的患者

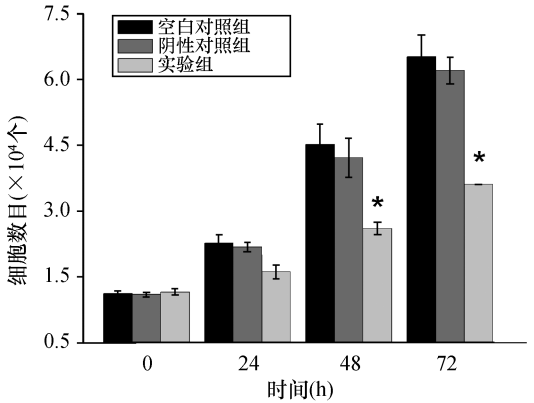

图 2 CCK8 法检测 Kiss-1 对 SW480 细胞增殖能力的影响

与空白对照组和阴性对照组比较，$*P<0.05$

恶性程度更高，患者的预后明显落后于高表达 Kiss-1 的患者，而 Kiss-1 表达水平高的肿瘤患者，肿瘤发展慢，预后相对较好[8]。国内外亦不乏学者对 Kiss-1 基因与结肠癌组织进行研究。Liang 等[9]通过免疫组织化学方法发现，Kiss-1 基因与结肠癌的分级、分期、肿瘤大小及淋巴结转移存在一定的关联性，提出 Kiss-1 对诊断结肠癌、判断其预后具有重要的潜在意义。本研究通过构建 pEGFP-N1-Kiss-1 重组质粒，成功将 Kiss-1 重组质粒转染 SW480 细胞。CCK8 实验证实 SW480 细胞的体外增殖能力从细胞周期的 48h 开始显著下降，实验组细胞生长速度较阴性对照组及空白对照组明显减慢，差异有统计学意义。因此，推测 Kiss-1 基因能有效抑制结肠癌 SW480 细胞的增殖能力，从而影响结肠癌的发生、发展。

肿瘤的发生是多种基因共同作用的多步骤、多阶段的过程，很多研究结果显示 Kiss-1 基因的表达与多种肿瘤的增殖、浸润、转移密切相关，然而其在肿瘤的发生发展中的具体作用机制有待进一步研究。

参考文献：

[1] Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene [J]. J Natl Cancer Inst, 1996, 88(23): 1731-1737.

[2] Lee YR, Tsunekawa K, Moon MJ, et al. Molecular evolution of multiple forms of kisspeptins and GPR54 receptors in vertebrates [J]. Endocrinology, 2009, 150(6): 2837-2846.

[3] Ji K, Ye L, Mason MD, et al. The Kiss-1/Kiss-1R complex as a negative regulator of cell motility and cancer metastasis (Review) [J]. Int J Mol Med, 2013, 32(4): 747-754.

[4] Li N, Wang HX, Zhang J, et al. KISS-1 inhibits the proliferation and invasion of gastric carcinoma cells [J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(15): 1827-1833.

[5] Chen Y, Yusenko MV, Kovacs G. Lack of KISS1R expression is associated with rapid progression of conventional renal cell carcinomas [J]. J Pathol, 2011, 223(1): 46-53.

[6] 胡向东，熊声贺，熊丽. 人 Kiss-1 重组质粒的构建及其对小细胞肺癌 NCI-H446 细胞增殖能力的影响 [J]. 实用临床医学，2013，14(4)：7-9.

[7] 林建华，沈荣凯，张俐. KiSS-1 基因对骨肉瘤 MG63 细胞增殖与黏附能力影响的研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志，2011，18(9)：667.

[8] Shengbing Z, Feng LJ, Bin W, et al. Expression of KiSS-1 gene and its role in invasion and metastasis of human hepatocellular carcinoma [J]. Anat Rec (Hoboken), 2009, 292(8): 1128-1134.

[9] Liang QL, Chen XD, Wang SM, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and metastin in colorectal carcinoma [J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2007, 27(10): 1584-1587.

（此文编辑：蒋湘莲）