

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.02.009

· 基础研究 ·

Cathepsin B 反义 RNA 抑制乳腺癌细胞的侵袭和迁移

王海燕¹, 张和军², 葛爱敏³, 黄 扬¹, 陈水平¹, 万 榕¹(1. 福建医科大学基础医学院病理学系暨肿瘤研究所, 福建 福州 350004; 2. 福建省肿瘤医院病理科, 福建 福州 350014; 3. 菏泽市立医院病理科, 山东 菏泽 274600)

[摘要] 目的:探讨人 cathepsin B (CatB)反义 RNA 在乳腺癌细胞侵袭与迁移中的作用。方法:构建携 CatB 反义 RNA 的重组质粒 pBudCE4.1-antiCatB,采用脂质体法将重组质粒瞬时转染人乳腺癌细胞 MDA-MB-231。Western blotting 法检测 MDA-MB-231 细胞中 CatB 蛋白的表达,MTT 法检测 MDA-MB-231 细胞的增殖,细胞-基质黏附实验检测反义 CatB 对 MDA-MB-231 细胞黏附能力的影响,体外侵袭、迁移实验分析反义 CatB 表达对 MDA-MB-231 细胞体外侵袭和迁移能力的影响。结果:成功构建 pBudCE4.1-antiCatB 表达载体。转染 MDA-MB-231 细胞后,与未转染组细胞和转染空载体组细胞相比,转染组 MDA-MB-231 细胞的 CatB 蛋白表达水平明显降低[(0.96 ± 0.02) vs (1.98 ± 0.23), (1.84 ± 0.08), $P < 0.05$];转染组细胞的增殖受到明显抑制[(0.255 ± 0.017) vs (0.458 ± 0.033), (0.421 ± 0.022), $P < 0.01$];转染组细胞的黏附(基质胶或纤维粘连蛋白)能力明显下降[(0.054 ± 0.017) vs (0.111 ± 0.018), (0.107 ± 0.017), $P < 0.01$;或(0.052 ± 0.008) vs (0.120 ± 0.014), (0.113 ± 0.009), $P < 0.01$];转染组细胞的侵袭和迁移能力也明显降低[(52.80 ± 7.76) vs (124.00 ± 44.54), (116.80 ± 32.87), $P < 0.01$;(60.25 ± 8.73) vs (132.50 ± 12.15), (119.20 ± 25.13), $P < 0.01$]。结论:CatB 反义 RNA 可抑制乳腺癌细胞体外生长、黏附、迁移和侵袭能力。

[关键词] 乳腺肿瘤;cathepsin B 基因;反义 RNA;转染;黏附;侵袭

[文献标志码] A **[文章编号]** 1007-385X(2010)02-0161-07

Antisense cathepsin B RNA inhibits invasion and metastasis of human breast carcinoma cells

WANG Hai-yan¹, ZHANG He-jun², GE Ai-min³, HUANG Yang¹, CHEN Shui-ping¹, WAN Rong¹(1. Department of Pathology, Tumor Research Institute, College of Basic Medical Sciences, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, Fujian, China; 2. Department of Pathology, Fujian Tumor Hospital, Fuzhou 350014, Fujian, China; 3. Department of Pathology, Heze Municipal Hospital, Heze 274600, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of antisense cathepsin B (CatB) RNA on the invasion and migration of human breast carcinoma cells. **Methods:** PBudCE4.1-antiCatB recombinant plasmid carrying antisense cathepsin B (CatB) gene was constructed and transfected into breast carcinoma cell line MDA-MB-231 by lipofection system. The expression of CatB protein in MDA-MB-231 cells was detected by Western blotting analysis; the proliferation of MDA-MB-231 cells was determined by MTT assay. Cell-matrix adhesion assay was used to examine the effect of anti-CatB on adhesion ability of MDA-MB-231 cells. The effects of anti-CatB on the invasion and migration abilities of MDA-MB-231 cells were measured by invasion and migration transwell system. **Results:** The recombinant plasmid PBudCE4.1-antiCatB was successfully constructed. Expression of CatB protein in MDA-MB-231 cells was decreased after PBudCE4.1-antiCatB transfection compared with those in untransfected and mock-vehicle transfected cells[(0.96 ± 0.02) vs (1.98 ± 0.23), (1.84 ± 0.08), $P < 0.05$]; the proliferation of MDA-MB-231 cells was also inhibited in PBudCE4.1-antiCatB transfected group[(0.255 ± 0.017) vs (0.458 ± 0.033), (0.421 ± 0.022), $P < 0.01$]; and the adhesion abilities (binding to matrix or fibronectin) were decreased[(0.054 ± 0.017) vs (0.111 ± 0.018), (0.107 ± 0.017), $P < 0.01$; (0.052 ± 0.008) vs (0.120 ± 0.014), (0.113 ± 0.009), $P < 0.01$]. Transwell assay showed that the invasion and migration a-

[基金项目] 福建省自然科学基金资助项目(No. X0650058);福建省属高校项目(No. 2006F5047)。Project supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province(No. X0650058), and the Higher Institute Foundation of Fujian Province(No. 2006F5047)

[作者简介] 王海燕(1971-),女,福建省龙海市人,硕士,讲师,主要从事肿瘤病理方面的研究。E-mail: wanghy1971@126.com

[通信作者] 万榕(WAN Rong, corresponding author), E-mail: wannr88@163.com

bilities were inhibited in PBudCE4. 1-antiCatB transfected group compared with those in the non-transfection and mock-vehicle transfected groups([52. 80 ± 7. 76] vs [124. 00 ± 44. 54], [116. 80 ± 32. 87], $P < 0. 01$; [60. 25 ± 8. 73] vs [132. 50 ± 12. 15], [119. 20 ± 25. 13], $P < 0. 01$). **Conclusion:** The expression of antisense CatB RNA can inhibit the growth, adhesion, invasion and migration abilities of MDA-MB-231 cell *in vitro*.

[**Key words**] breast neoplasms; cathepsin B(*CatB*); antisense RNA; transfection; adhesion; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(2): 161-167]

乳腺癌是女性高发的恶性肿瘤,近年来发病率呈逐年上升趋势。肿瘤侵袭和转移是影响乳腺癌患者预后的主要因素。对乳腺癌侵袭、转移相关指标的研究在指导临床治疗和预测肿瘤预后方面具有重要意义。

组织蛋白酶 B(cathepsin B, CatB)是木瓜蛋白酶型的半胱氨酸蛋白酶,主要存在于哺乳类动物和人体细胞溶酶体中。研究^[14]发现,CatB 可降解基底膜和细胞外基质,在乳腺癌等多种肿瘤的发生、发展和转移过程中起重要作用。为进一步研究 CatB 表达对乳腺癌细胞侵袭、转移的影响,本实验采用基因拼接方法构建 *CatB* 反义 RNA 真核表达载体,经脂质体介导转染人高侵袭性的乳腺癌细胞 MDA-MB-231,从肿瘤细胞体外生长、黏附、迁移、侵袭能力等方面的变化评价 *CatB* 反义 RNA 抗乳腺癌侵袭转移的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 为本校生物化学系惠赠。真核表达质粒 PBudCE4. 1、菌株 *E. coli* Top10、一步法 RT-PCR 试剂盒、高保真 TaqDNA 聚合酶试剂盒、转染试剂 Lipofectamine 2000、TRIzol、抗生素 ZeocinTM 均购自美国 Invitrogen 公司。限制性内切酶(*Kpn* I 、*Xho* I)、小肠碱性磷酸酶(CIP)、T₄DNA 连接酶均购自美国 NEB 公司;胶回收试剂盒、小量质粒抽提试剂盒购自上海中科开瑞生物科技有限公司,大量质粒抽提试剂盒购自 Tiangen 公司。DMEM 培养基购自 Gibco 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司。兔抗人 CatB 多克隆抗体购自 Millipore 公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购自美国 Santa Cruz 公司。MTT 购自 Sigma 公司,基质胶、纤维黏连蛋白购自 BD 公司。Transwell 小室购自 Corning 公司。

1.2 *CatB* 基因的体外扩增及扩增片段的回收

TRIzol 试剂提取人胎盘组织总 RNA,RT-PCR 扩增人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 细胞的 *CatB* 基因片段。根据 GeneBank 报道的人 *CatB* 基因(Gene-

Bank 登录号 L16510),应用 VectorNTI5. 5 软件设计引物。*CatB* 上游引物为 5'-CCGCTCGAGTGCCAAC TCCTGGAACACTG-3',下游引物为 5'-CGGGGTACC ATGTTTGGCCAATCCAGTCC-3';分别含有酶切位点 *Xho* I 、*Kpn* I 。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。反应体系:总体积 25 μ l,*CatB* 上下游引物各 0. 5 μ l,RNA 1 μ l,2 $\times$ 反应混合液 12. 5 μ l,Taq 酶 0. 5 μ l,DEPC 水 10 μ l。反应条件:50 $^{\circ}$ C 逆转录 30 min,94 $^{\circ}$ C 变性 2 min;进入循环:94 $^{\circ}$ C 30 s,57 $^{\circ}$ C 30 s,68 $^{\circ}$ C 1 min,共 35 个循环;循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。应用小量胶回收试剂盒回收纯化扩增片段。

1.3 PBudCE4. 1-antiCatB 重组载体的构建

取 PCR 扩增的 *CatB* 基因片段及载体 PBudCE4. 1 分别用 *Xho* I 、*Kpn* I 双酶切,纯化回收。酶切后的 PBudCE4. 1 进行去磷酸化处理,应用 T₄DNA 连接酶将酶切后的目的基因片段与载体 4 $^{\circ}$ C 连接过夜。取 20 μ l 的连接产物转化 *E. coli* Top10 感受态细胞,选用含 Zeocin 的低渗培养液筛选阳性克隆,扩增阳性克隆,小量抽提质粒用后 *Xho* I 、*Kpn* I 双酶切鉴定,并用引物 BGHR(牛生长激素反向启动位) 测序,序列测定由 Invitrogen 公司完成。测序正确的重组体命名为 PBudCE4. 1-antiCatB。大量质粒抽提按 Tiangen 公司试剂盒进行。

1.4 人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的培养和转染

人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内培养。待 MDA-MB-231 细胞生长至 60% ~ 70% 融合作为待转染细胞,转染前 4 h 更换上述培养液 1 次。载体转染采用脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 按照试剂说明书进行,分别转染质粒 PBudCE4. 1-antiCatB 及空白载体至肿瘤细胞。转染后 4 ~ 6 h 后更换细胞培养液继续培养。将转染质粒 PBudCE4. 1-antiCatB 和 PBudCE4. 1 乳腺癌细胞分别命名为转染组(MDA/antiCatB) 和空载体组(MDA/PBudCE4. 1),未转染的 MDA-MB-231 细胞命名为未转染组(MDA)。

1.5 Western blotting 检测转染后 MDA-MB-231 细胞 CatB 蛋白的表达

收集转染重组质粒和空载体质粒后 48 h 的及未转染的 MDA-MB-231 细胞,提取细胞总蛋白后进行 SDS-PAGE(16.5% 分离胶和 4% 浓缩胶)。将蛋白转印至 PVDF 膜,以含 3% BSA 的 TBS 液封闭 2 h,加入兔抗人 CatB 多克隆抗体(1:1 000),4 ℃ 过夜, TBS-T 洗膜 10 min × 3 次。然后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1:250)二抗,37 ℃ 孵育 2 h, TBS-T 洗膜 5 min × 5 次, ECL 显色 1 ~ 2 min,用 X 线片显影,以 β -actin 作为内参照。图像用凝胶图像处理系统分析。

1.6 MTT 法检测 CatB 反义 RNA 对 MDA-MB-231 细胞生长的影响

转染 24 h 后,将转染组 MDA/antiCatB、空载体组 MDA/PBudCE4.1 及未转染组 MDA-MB-231 细胞,每孔按 1×10^4 个细胞数接种于 96 孔细胞培养板中,于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。接种 48 h 后,每孔加入 20 μl 的 MTT(5 mg/ml)混匀。37 ℃ 孵育 4 h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入 120 μl DMSO,振荡 10 min。用酶标仪检测波长为 492 nm 时的 D 值以表示 MDA-MB-231 细胞的生长情况。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.7 细胞-基质黏附实验检测 CatB 反义 RNA 对 MDA-MB-231 细胞黏附能力的影响

在 96 孔培养板中分别加入 40 μl 纤维黏连蛋白和基质胶,置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 1 h, PBS 液小心冲洗 2 次,加入 0.1% BSA 200 μl ,37 ℃ 孵育 2 h 以封闭非特异性位点, PBS 液清洗 2 次。转染 48 h 后,转染组 MDA/antiCatB、空载体组 MDA/PBudCE4.1、未转染组细胞分别用含 0.1% BSA 无血清 DMEM 培养液制成细胞悬液,调整细胞密度均至 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 。将上述细胞悬液 100 μl 分别接种于已包被纤维黏连蛋白和基质胶的 96 孔培养板中。37 ℃、5% CO_2 培养 1 h 后,取出 96 孔板用 PBS 液清洗未黏附的细胞 2 次,每孔分别加入 100 μl ,含 0.1% BSA 的 DMEM 培养液和 20 μl 的 MTT(5 mg/ml),继续培养 4 h 后,去除孔中培养液加入 120 μl DMSO,室温孵育 10 min。用酶标仪检测波长为 492 nm 时的 D 值以表示 MDA-MB-231 细胞的黏附情况。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.8 体外侵袭实验检测 CatB 反义 RNA 对 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的影响

在 transwell 侵袭小室聚碳酸酯膜外侧滴加 10 μl 纤维黏连蛋白(0.5 mg/ml)并风干,膜内侧加入 20 μl 基质胶(原液 10.8 mg/ml,用无血清 DMEM 培养液按 1:6 稀释)并风干。转染 24 h 后,将 MDA/

antiCatB、MDA/PBudCE4.1 和 MDA 细胞分别制成细胞悬液,于小室上室内分别加入 200 μl (含 4×10^4 个细胞),下室加 600 μl 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中 48 h。取出小室弃除上室液体,用棉签擦尽上室膜面未穿膜的细胞,室温下甲醇固定 10 min,常规 H-E 染色,中性树胶封片,400 倍光镜下计数 5 个视野的侵袭细胞数,取其平均值,以侵袭细胞的相对数目表示肿瘤细胞的侵袭能力。每组实验重复 3 次。

1.9 迁移实验检测 CatB 反义 RNA 对 MDA-MB-231 细胞迁移能力的影响

聚碳酸酯膜内侧不加基质胶,37 ℃、5% CO_2 中培养 24 h,其余操作步骤和计数方法同 1.8 中 transwell 小室侵袭实验。

1.10 统计学处理

所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.5 统计软件进行方差分析和 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CatB 基因克隆的结果

由人胎盘组织提取的总 RNA 经 RT-PCR 扩增出 CatB 基因的目的片段 257 bp,片段的大小与预计结果相符(图 1)。



图 1 RT-PCR 体外扩增 MDA-MB-231 细胞中 CatB 基因片段

Fig.1 Fragment of CatB gene in MDA-MB-231 cells amplified by RT-PCR in vitro

M: Marker; 1, 2: CatB

2.2 PBudCE4.1-antiCatB 重组质粒的鉴定结果

将 RT-PCR 扩增的 CatB 基因片段克隆入 PBudCE4.1,随机挑取 2 ~ 3 个菌落进行双酶切鉴定。PBudCE4.1-antiCatB 重组质粒经 *Xho* I、*Kpn* I 双酶切后出现 257 bp 和 4 600 bp 两个片段,与理论值相符;且阳性重组质粒经 PCR 鉴定,扩增出 257 bp 的目的片段,初步说明 PBudCE4.1-antiCatB 载体

构建成功(图2)。以 PBudCE4.1 上的 BGHR 为测序引物进行序列分析显示, *CatB* 基因片段已正确反向插入 PBudCE4.1 的 *Xho* I 和 *Kpn* I 位点间(图3)。

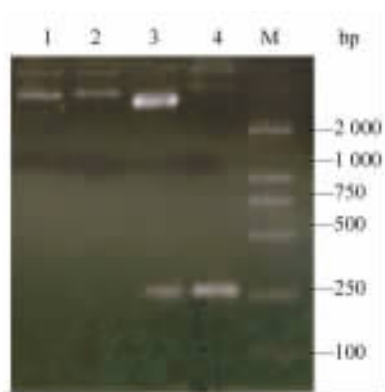


图2 PBudCE4.1-antiCatB 质粒的 *Kpn* I、*Xho* I 双酶切鉴定

Fig.2 Identification of PBudCE4.1-antiCatB plasmid by *Kpn* I and *Xho* I digestion

1: PBudCE4.1; 2: PBudCE4.1-antiCatB;
3: PBudCE4.1-antiCatB digested by
Kpn I and *Xho* I; 4: CatB; M: Marker

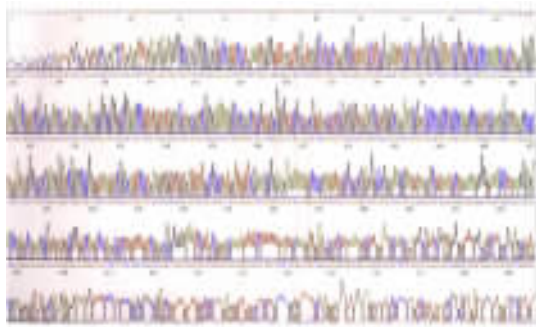


图3 PBudCE4.1-antiCatB 质粒的测序图

Fig.3 Sequence map of PBudCE4.1-antiCatB plasmid

2.3 *CatB* 反义 RNA 转染抑制乳腺癌细胞中 *CatB* 蛋白的表达

转染 48 h 后, Western blotting 检测 *CatB* 蛋白表达, 发现未转染组、空载体转染组 MDA/PBudCE4.1 和转染组 MDA/antiCatB 细胞中均有相对分子质量约 45 000(蛋白前体)和 30 000(蛋白成熟体)的 *CatB* 蛋白表达, 但未转染组及空载体转染组细胞的 *CatB* 蛋白表达量较高(1.98 ± 0.230 , 1.84 ± 0.08), 而在转染组细胞表达量较低(0.96 ± 0.02), 差异均有统计学意义($P=0.024$ 或 $P=0.004$)(图4)。上述结果表明, 转染 48 h 后, 转染组的 MDA-MB-231 细胞中 *CatB* 蛋白表达受到抑制。

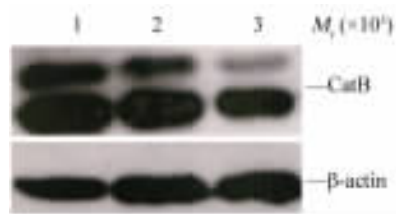


图4 Western blotting 检测 PBudCE4.1-antiCatB 质粒转染后 MDA-MB-231 细胞中 *CatB* 蛋白的表达

Fig.4 *CatB* protein expression in MDA-MB-231 cells after PBudCE4.1-antiCatB transfection as detected by Western blotting

1: MDA-MB-231 cells; 2: MDA-MB-231 cells transfected with PBudCE4.1; 3: MDA-MB-231 cells transfected with PBudCE4.1-antiCatB

2.4 *CatB* 反义 RNA 转染抑制乳腺癌细胞的生长

为了探讨反义 *CatB* 表达对 MDA-MB-231 细胞生长的影响, 应用 MTT 法测定转染组 MDA/antiCatB 细胞、空载体组 MDA/PBudCE4.1 细胞和未转染 MDA-MB-231 细胞的生长情况。结果显示, 转染组(0.255 ± 0.017)与空载体组(0.421 ± 0.022)和未转染组(0.458 ± 0.033)相比, 转染组细胞的生长受到明显抑制($P=0.000$)。

2.5 *CatB* 反义 RNA 转染抑制乳腺癌细胞的基质黏附能力

实验用 MTT 法测定与基质胶黏着的 3 组细胞的 D_{492} , 结果显示, 转染组 MDA/antiCatB 为 0.054 ± 0.017 , 明显低于空载体组 MDA/PBudCE4.1 的 0.107 ± 0.017 和未转染组的 0.111 ± 0.018 ($P=0.000$); 同样方法检测与纤维黏连蛋白黏着的 3 组细胞, 结果显示, 转染组 MDA/antiCatB 细胞的 D_{492} nm 为 0.052 ± 0.008 , 也显著低于空载体组 MDA/PBudCE4.1 的 0.113 ± 0.009 和未转染组的 0.120 ± 0.014 ($P=0.000$ 或 $P=0.001$)。由此表明, 反义 *CatB* 表达对乳腺癌细胞与基质黏附具有显著的抑制作用。

2.6 *CatB* 反义 RNA 转染抑制乳腺癌细胞的侵袭

转染反义 *CatB* 后, MDA-MB-231 细胞侵袭穿越重建基底膜的能力明显受到抑制, 侵袭至 transwell 小室下室表面的细胞数明显低于空载体组和未转染组[(52.80 ± 7.76) vs (116.80 ± 32.87), (124.00 ± 44.54), $P=0.003$ 或 $P=0.007$, 图5]。由此可见, 反义 *CatB* 可明显降低乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的体外侵袭能力。

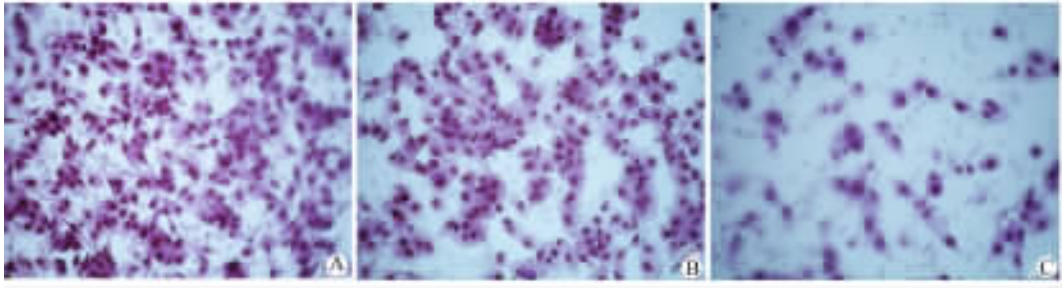


图5 PBudCE4.1-antiCatB 转染抑制 MDA-MB-231 细胞的体外侵袭(H-E, ×400)

Fig.5 PBudCE4.1-antiCatB transfection inhibited invasion of MDA-MB-231 cells *in vitro*(H-E, ×400)

A: MDA-MB-231 cells; B: MDA-MB-231 cells transfected with PBudCE4.1;
C: MDA-MB-231 cells transfected with PBudCE4.1-antiCatB

2.7 CatB 反义 RNA 转染抑制乳腺癌细胞的迁移

迁移运动实验中,转染后 MDA-MB-231 细胞在 FN 的趋化下穿过聚碳酸酯膜的能力明显受到抑制,迁移至 transwell 小室下室表面的细胞数明显低于空

载体组和未转染组细胞[(60.25 ± 8.73) vs (119.20 ± 25.13), (132.50 ± 12.15), $P=0.003$ 或 $P=0.000$,图 6]。由此可见,反义 *CatB* 可明显降低乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的体外迁移能力。

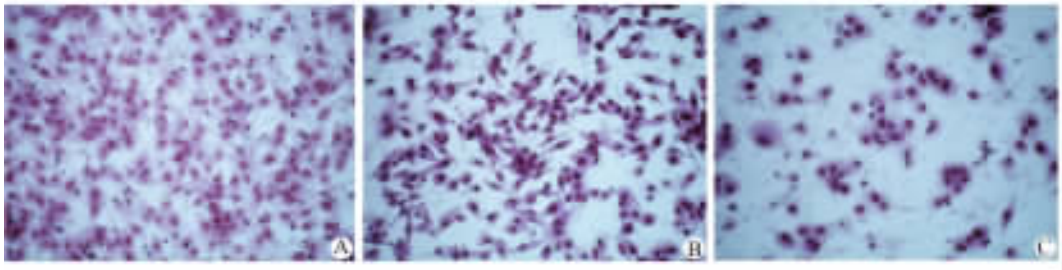


图6 PBudCE4.1-antiCatB 转染抑制 MDA-MB-231 细胞的体外迁移(H-E, ×400)

Fig.6 PBudCE4.1-antiCatB transfection inhibited migration of MDA-MB-231 cells(H-E, ×400)

A: MDA-MB-231 cells; B: MDA-MB-231 cells transfected with PBudCE4.1;
C: MDA-MB-231 cells transfected with PBudCE4.1-antiCatB

3 讨 论

侵袭转移是涉及多因素、多环节的复杂的动态过程,其中蛋白水解酶对细胞外基质成分的降解破坏是肿瘤细胞突破基底膜进而发生侵袭、转移的关键步骤。CatB 是生物体广泛存在的一种半胱氨酸蛋白水解酶,可参与调节机体的各种生理和病理活动^[5-6]。CatB 具有内、外肽酶活性。Halangk 等^[7]发现,在溶酶体的酸性环境中 CatB 主要是外肽酶,而在碱性或中性环境中的 CatB 则为内肽酶。CatB 的双重酶活性使之可与细胞内外的多种蛋白质发生作用,如可直接降解包括纤维黏连蛋白、层黏连蛋白、I 型胶原蛋白、IV 型胶原蛋白和蛋白多糖等多种细胞外基质成分,还可激活能降解细胞外基质的尿激

酶型纤溶蛋白酶原激活剂和基质金属蛋白酶等,从而有利于肿瘤的侵袭过程并促进肿瘤血管的增生、增强肿瘤细胞的运动能力^[8-9]。国内外的研究^[10-13]发现,在食管癌、肠癌、肺癌、恶性黑色素瘤、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌等恶性肿瘤中,CatB 的表达及活性均明显高于邻近正常组织;且在结肠癌、前列腺癌等多种肿瘤中,CatB 的过表达在肿瘤侵袭边缘最为显著^[14]。Hazen 等^[15]研究发现,伴有淋巴结转移的结直肠癌组织中,CatB 蛋白阳性表达率明显高于无淋巴结转移组。这些现象均提示 CatB 促进了肿瘤的浸润转移。反义 RNA 是一种能与靶基因 mRNA 特异互补结合,并抑制靶基因功能的小片段 RNA。自从 1980 年代初发现反义 RNA 以来,反义 RNA 被作为一种调控特定基因表达的手段,进行了

广泛的研究^[16-17]。近年来,反义技术被广泛应用于肿瘤基因治疗的研究中,通过构建反义 RNA 表达载体封闭肿瘤相关癌基因的表达,从而抑制肿瘤生长的反义基因治疗方案,已进入临床试验阶段^[18-20]。

目前关于 *CatB* 基因表达抑制对乳腺癌细胞侵袭等生物学行为影响的研究较少。本实验从人胎盘组织中提取总 RNA,采用 RT-PCR 方法扩增出 257 bp 的 *CatB* 基因片段。利用 pBudCE4.1 质粒是由 pBudCE4 演变而来的高效真核表达质粒,全长 4600 bp,质粒所含有的人类巨细胞病毒(CMV)启动子,能够在大多数哺乳类真核细胞中提供高水平稳定表达或瞬时表达,其编码区含 Zeocin 抗性基因,便于阳性克隆筛选的特点,将 *CatB* 基因反向克隆入 pBudCE4.1 的 *Xho* I 和 *Kpn* I 位点间,成功构建了 *CatB* 反义 RNA 真核表达载体。

MDA-MB-231 细胞株是具有高侵袭性的乳腺癌细胞株,本课题先前研究发现,其 *CatB* 表达水平明显高于低侵袭性乳腺癌细胞株 T47D。故本实验选用 MDA-MB-231 细胞制作实验细胞模型。本实验中,利用脂质体 2000 将反义 *CatB* 真核表达载体瞬时转染入乳腺癌细胞株 MDA-MB-231,Western blotting 检测转染后 *CatB* 蛋白表达。结果显示,转染组 MDA/anti*CatB* 细胞的 *CatB* 蛋白表达水平较空载体组 MDA/PBudCE4.1 细胞和未转染组 MDA-MB-231 细胞明显降低($P < 0.05$)。通过细胞生长实验、细胞-基质黏附实验、体外侵袭实验和迁移实验综合分析肿瘤细胞侵袭潜能的变化。结果显示,转染组 MDA/anti*CatB* 细胞的生长能力、瘤细胞-基质黏附能力、体外迁移能力和侵袭能力均明显低于空载体组以及未转染组细胞($P < 0.01$)。这些结果与 Gondi 等^[21]应用反义技术下调 *CatB* 在神经胶质瘤细胞中的表达和 Tummalapalli 等^[22]应用 RNA 干扰技术沉默 *CatB* 在恶性脑膜瘤细胞中表达,致使肿瘤细胞的侵袭能力大大减弱相一致。实验结果提示,*CatB* 反义 RNA 可通过抑制 *CatB* 基因的表达,抑制其对基底膜和细胞外基质降解,从而降低乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的体外生长、黏附和侵袭转移潜能。总之,反义 RNA 通过抑制 *CatB* 基因表达,对乳腺癌侵袭转移起抑制作用。随着对 *CatB* 作用及调控机制的深入研究和分子生物学技术的飞速发展,*CatB* 可望成为乳腺癌基因治疗的新靶点和辅助诊断的指标。

[参考文献]

- [1] Lah TT, Cercek M, Blejcek A, Kos J, Gorodetsky E, Somers R, *et al.* Cathepsin B, a prognostic indicator in lymph node-negative breast carcinoma patients: comparison with cathepsin D, cathepsin L, and other clinical indicators [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(2): 578-584.
- [2] 万 榕, 葛爱敏, 王海燕, 高美钦. 原发性乳腺癌组织蛋白酶 B 和 Cystatin M 的表达 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2006, 15(6): 613-616.
- [3] Colin C, Voutsinos-Porche B, Nanni I, Fina F, Metellus P, Intagliata D, *et al.* High expression of cathepsin B and plasminogen activator inhibitor type-1 are strong predictors of survival in glioblastomas [J]. *Acta Neuropathol*, 2009, 118(6): 745-754.
- [4] Talieri M, Papadopoulou S, Scorilas A, Xynopoulos D, Arnogianaki N, Plataniotis G, *et al.* Cathepsin B and cathepsin D expression in the progression of colorectal adenoma to carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2004, 205(1): 97-106.
- [5] Caglic D, Pungercar JR, Pejler G, Turk V, Turk B. Glycosaminoglycans facilitate procathepsin B activation through disruption of propeptide-mature enzyme interactions [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(45): 33076-33085.
- [6] Sun B, Zhou Y, Halabisky B, Lo I, Cho SH, Mueller-Stainer S, *et al.* Cystatin C-cathepsin B axis regulates amyloid beta levels and associated neuronal deficits in an animal model of Alzheimer's disease [J]. *Neuron*, 2008, 60(2): 247-257.
- [7] Halangk W, Lerch MM, Brandt-Nedelev B, Roth W, Ruthenbuerger M, Reinheckel T, *et al.* Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis [J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(6): 773-781.
- [8] Koblinski JE, Dosesescu J, Sameni M, Moin K, Clark K, Sloane BF. Interaction of human breast fibroblasts with collagen I increases secretion of procathepsin B [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(35): 32220-32227.
- [9] Nishikawa H, Ozaki Y, Nakanishi T, Blomgren K, Tada T, Arakawa A, *et al.* The role of cathepsin B and cystatin C in the mechanisms of invasion by ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 92(3): 881-886.
- [10] 陈奎生, 曹学全, 孙森森, 姜 欣, 高冬玲, 张 红. 组织蛋白酶 B 表达与食管鳞癌浸润转移的关系 [J]. *中国肿瘤临床*, 2006, 33(15): 846-849.
- [11] Werle B, Kotzsch M, Lah TT, Kos J, Gabrijelcic-Geiger D, Spiess E, *et al.* Cathepsin B, plasminogenactivator-inhibitor (PAI-1) and plasminogenactivator-receptor (uPAR) are prognostic factors for patients with non-small-cell lung cancer [J]. *Anticancer Res*, 2004, 24(6): 4147-4161.
- [12] Fröhlich E, Schlagenhauff B, Möhrle M, Weber E, Klessen C, Rassner G. Activity, expression, and transcription rate of the cathepsins B, D, H, and L in cutaneous malignant melanoma [J]. *Cancer*, 2001, 91(5): 972-982.
- [13] 王素梅, 李 力, 张 玮, 黎丹戎, 唐步坚. 组织蛋白酶 B 及其组织抑制剂在卵巢恶性肿瘤组织中表达及其意义的研究 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2008, 15(5): 363-366.
- [14] Fernández PL, Farré X, Nadal A, Fernández E, Peiró N, Sloane BF, *et al.* Expression of Cathepsins B and S in the progression of prostate carcinoma [J]. *Int J cancer*, 2001, 95(1): 51-55.

- [15] Hazen LG, Bleeker FE, Lauritzen B, Bahns S, Song J, Jonker A, *et al.* Comparative localization of cathepsin B protein and activity in colorectal cancer [J]. *J Histochem Cytochem*, 2000, 48(10): 1421-1430.
- [16] 司马妮, 王 薇, 徐 茜, 田 训, 罗爱月, 卢运萍, 等. 人乳头瘤病毒 16 型 E6、E7 反义 RNA 对人宫颈癌 SiHa 细胞的恶性逆转作用 [J]. *癌症*, 2007, 26(1): 26-31.
- [17] 季守平, 吴 英, 侯春梅, 由 英, 毛 宁, 章扬培. 应用反义 RNA 技术降低肿瘤细胞的耐药性 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15(1): 157-158.
- [18] Song JJ, Lee H, Kim E, Kim YS, Yoo NC, Roh JK, *et al.* Transduction effect of antisense k-ras on malignant phenotypes in gastric cancer cell [J]. *Cancer Lett*, 2000, 157(1): 1-7.
- [19] Liang X, Da M, Zhuang Z, Wu W, Wu Z, Wu Y, *et al.* Effects of survivin on cell proliferation and apoptosis in MG-63 cells *in vitro* [J]. *Cell Biol Int*, 2009, 33(1): 119-124.
- [20] Finn RS, Zhu AX. Targeting angiogenesis in hepatocellular carcinoma: focus on VEGF and bevacizumab [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2009, 9(4): 503-509.
- [21] Gondi CS, Lakka SS, Yanamandra N, Olivero WC, Dinh DH, Gujrati M, *et al.* Adenovirus-mediated expression of antisense urokinase plasminogen activator receptor and antisense cathepsin B inhibits tumor growth, invasion, and angiogenesis in gliomas [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(12): 4069-4077.
- [22] Tummalapalli P, Spomar D, Gondi CS, Olivero WC, Gujrati M, Dinh DH, *et al.* RNAi-mediated abrogation of cathepsin B and MMP-9 gene expression in a malignant meningioma cell line leads to decreased tumor growth, invasion and angiogenesis [J]. *Int J Oncol*, 2007, 31(5): 1039-1050.
- [收稿日期] 2009 - 11 - 29 [修回日期] 2010 - 01 - 18
[本文编辑] 王 莹

· 书 讯 ·

《免疫学前沿进展》已出版

由中国免疫学会理事长曹雪涛院士牵头、全国免疫学各领域知名专家联合编著的《免疫学前沿进展》,于 2009 年 12 月初由人民卫生出版社正式出版。免疫学是一门重要的基础学科,与临床医学紧密相关,是生物医学乃至整个生命科学中发展最快的学科之一。《免疫学前沿进展》是国内第一本及时反映国、内外免疫学研究现状与进展的专著。本书的编者都是免疫学相关领域学术造诣精深、研究成果卓著的专家,其工作受到国、内外同行的高度关注和认可,有着很高的国内、国际影响力。在本书中他们结合自己的工作,特别是近年来的研究成果,介绍该领域的研究现状、热点、进展、存在的问题,并展望未来的发展趋势。

该书在概要介绍免疫学基本理论的基础上,分专题阐述免疫学当前重要研究领域和热点问题,内容涉及 NK 细胞、T 细胞、抗原提呈细胞、MHC 分子、天然免疫识别、调节性 T 细胞、Th1/Th2/Th17 细胞、记忆性 T 细胞、免疫受体编辑、CD 分子、协同刺激分子、趋化因子及其受体、炎症性细胞因子与炎症反应等基础研究,此外还介绍了肿瘤免疫、抗病毒免疫、艾滋病免疫学、原发性免疫缺陷病、自身免疫性病、移植免疫、过敏性疾病、生殖免疫、骨免疫等临床免疫学科的现状与进展,最后还介绍了兽医免疫学、结构免疫学、免疫药理学、免疫疫苗设计、抗体工程、抗体药物、重组蛋白质药物等近年来的研究进展。

该书面向免疫学专业的研究生和青年教师,是第二届免疫学新进展研讨班的培训教材,可作为免疫学及相关专业研究生的教材,对从事免疫学工作的研究人员和临床各科医务工作者也有非常好的参考作用。

出版社地址:北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼(100078)

购书热线:010 - 67605754, 010 - 65264830; E-mail: pmph@pmph. com;

经销:新华书店;标准书号:ISBN978-7-117-12311-2/R · 12312;定价:180 元