

• 应用基础研究 •

胃癌细胞中 NDRG2 的表达及诱导分化研究*

常晓静, 周欢娣, 薛晓英[△], 李彦格, 张歌, 杨玉, 王立文

050000 石家庄, 河北医科大学第二医院 放疗科

[摘要] 目的: 研究分化相关基因 NDRG2 在胃癌细胞中的表达及与细胞分化的关系。方法: 采用 RT-PCR 及 Western blot 检测胃永生化的粘膜上皮细胞 GES1 及 6 株胃癌细胞株中 NDRG2 的 mRNA 及蛋白的表达情况, 进一步采用分化诱导剂 TPA 处理胃癌细胞株, 分析 NDRG2 的表达水平及恶性表型是否可逆转。结果: 与胃永生化的粘膜上皮细胞 GES1 相比, NDRG2 在 6 株胃癌细胞中有不同程度的表达下调, 未分化胃癌细胞株 HGC27 中表达最低 ($P < 0.05$)。不同浓度的分化诱导剂 TPA (0、10、50、100 nmol/L) 处理胃癌细胞株 HGC27 后, 随 TPA 浓度升高, NDRG2 表达上调, 100 nmol/L 组表达最高 ($P < 0.05$), Transwell 实验显示 TPA 干预组胃癌细胞的侵袭力明显减弱。结论: 分化诱导剂干预可上调胃癌细胞 NDRG2 表达水平, 逆转细胞恶性表型, 且与细胞分化成正相关, 故 NDRG2 可能是胃癌中一种候选的肿瘤抑制基因。

[关键词] 胃癌; 分化相关基因; NDRG2; 细胞分化

[中图分类号] R735.2 [文献标志码] A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2018.06.001

引文格式: Chang XJ, Zhou HD, Xue XY, et al. Expression of NDRG2 and its relationship with cell differentiation in gastric cancer cell lines [J]. J Cancer Control Treat, 2018, 31(6): 381-385. [常晓静, 周欢娣, 薛晓英, 等. 胃癌细胞中 NDRG2 的表达及诱导分化研究 [J]. 肿瘤预防与治疗, 2018, 31(6): 381-385.]

Expression of NDRG2 and Its Relationship with Cell Differentiation in Gastric Cancer Cell Lines

Chang Xiaojing, Zhou Huandi, Xue Xiaoying, Li Yange, Zhang Ge, Yang Yu, Wang Liwen

Department of Radiotherapy, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei, China

Corresponding author: Xue Xiaoying, E-mail: xxy6412@163.com

This study was supported by the Natural Science Foundation of Hebei (NO. 2015206344)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of NDRG2 in gastric cancer cell lines and its relationship with cell differentiation. **Methods:** Protein and mRNA level of NDRG2 were detected in GES1 and 6 gastric cancer cell lines by RT-PCR and western blot, then TPA was utilized to treat gastric cancer cell line (HGC27) to detect NDRG2's expression and invasion. **Results:** The expression of NDRG2 was down-regulated in gastric cancer cell lines compared to GES1, and it was the lowest in HGC27. After treatment with TPA in HGC27, the expression of NDRG2 significantly increased, and its invasion ability obviously weakened. **Conclusion:** It suggests that NDRG2 may be a tumor suppressor gene in gastric cancer, and it is closely related to cell differentiation.

[Key words] Gastric cancer; Differentiation-related gene; NDRG2; Cell differentiation

NDRG2 (N-myc downstream regulated gene 2) 是我国第四军医大学发现的一种与细胞分化相关的基因, 属于 NDRG 家族, 该家族包括 4 个成员, 即 NDRG1~4, 各成员间 57%~65% 的氨基酸具有同源

性^[1]。NDRG2 基因定位于人染色体 14q11.2, 编码的蛋白含 357 个氨基酸残基, 分子量约为 41kDa, 在人体多种组织中均有表达, 不同程度地参与细胞生长发育及分化成熟等过程^[2-4]。近年的研究报道, NDRG2 在多种肿瘤组织中表达下调, 甚至不表达, 发挥特定的抑癌作用^[5-7]。目前诱导分化治疗已成功运用于白血病, 作为一种分化相关基因, NDRG2

[收稿日期] 2017-09-05 [修回日期] 2018-04-15

[基金项目] * 河北省自然科学基金项目(编号:2015206344)

[通讯作者] [△] 薛晓英, E-mail: xxy6412@163.com

与胃癌的关系尚缺乏研究。本研究重在探讨 NDRG2 在胃癌细胞中的表达及其与细胞分化的关系,为胃癌的分化治疗提供新的依据。

1 材料和方法

1.1 材料

胃永生化粘膜炎上皮细胞 GES1 及 6 株胃癌细胞 SGC7901、MGC803、MKN45、BGC823、AGS 和 HGC27 均购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物研究所。采用 Invitrogen 公司的 TRIzol 试剂提取总 RNA,采用 Fermentas 公司的 RT-PCR 逆转录试剂盒及 DreamTaq DNA 聚合酶行 2 步法 RT-PCR。RPMI 1640 购自 GibcoBRL 公司,胎牛血清购自杭州四季青生物工程公司。BCA 试剂盒、ECL 发光剂及 TPA 试剂购自上海碧云天生物公司。Matrigel 胶购自美国 BD 公司,Transwell 小室购自美国 Corning 公司,引物由上海华大公司合成。

1.2 细胞培养

人胃永生化粘膜炎上皮细胞 GES1 和胃癌细胞株 SGC7901、MGC803、MKN45、BGC823、AGS 和 HGC27,单层贴壁生长于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,37℃,5% CO₂ 培养箱中培养,隔天换液,取对数生长期细胞进行试验。

1.3 TPA 处理

胃癌细胞株 HGC27 以 5×10^5 接种于 6 孔板,含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液,37℃,5% CO₂ 培养箱中培养过夜。TPA 以 10、50、100nmol/L 培养 3 天,对照组为不加 TPA 的 1640 培养液培养。

1.4 细胞 RNA 提取及 RT-PCR

TRIzol 提取液裂解细胞,按 TRIzol 试剂盒说明书提取细胞 RNA。RNA 沉淀溶解于 30ul DEPC 水中,紫外分光光度法定量。NDRG2 引物:上游 5'-GCCAGCGATCCTTACCTACC-3',下游 5'-GGCTGCCAATCCATCCAACC-3',365bp; GAPDH 引物:上游 5'-CCA CCCATGGCAAATCCCATGGCA-3',下游 5'-TCTAGACGGCAGGTCA GGTCCACC-3',597bp。RT-PCR 扩增体系:5 × Buffer 5uL, dNTP 5uL, Taq 酶 0.25uL,上下游引物各 1uL, cDNA 2uL,加 DEPC 至 25uL。扩增条件:95℃ 5min 预变性,95℃ 30s, 59℃ 30s, 72℃ 30s,30 个循环,72℃ 5min 延伸。取 5uL PCR 扩增产物进行琼脂糖电泳,紫外投射仪下观察结果。

1.5 Western blot

提取细胞沉淀,在细胞沉淀中加入 200μL 蛋白

裂解液,震荡摇匀,冰上静置 30min,12 000g 离心 30min,提取上清并用 BCA 试剂盒(碧云天,上海,中国)测定蛋白浓度,取 60ug 蛋白与上样缓冲液混合(1:4),煮沸 5min 变性;将变性蛋白加入 10% SDS 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离转膜;5% 脱脂牛奶室温封闭 2h,兔多克隆抗体 NDRG1(1:1000, Cell Signaling 公司,美国)封膜,4℃ 过夜,鼠抗人 GAPDH 一抗(1:1000)作为内参照;TBST 洗,5min,3 次,加相应二抗,室温摇床上孵育 2h,ECL 发光,照相,quantity one 软件定量分析。

1.6 侵袭实验(Transwell assay)

BD 基质胶以含 1% 胎牛血清 RPMI1640 将其调整浓度为 1:15,用力吹打混匀,取 50μL 置于预冷的 transwell 小室上层,待其均匀平整后,室温 5min 后置于 37℃ 培养箱中晾干。8 小时后待基质胶彻底凝固,取出备用。将 100nmol/L TPA 培养 72 小时后的 HGC27 细胞与未处理的 HGC27 细胞常规胰酶消化,离心,调整密度为 5×10^4 定容于 200μL 含 1% 胎牛血清 RPMI1640 培养液中,接种于小室上层。小室下层置含 20% 胎牛血清 RPMI1640 培养液 500μL,放入培养箱继续培养。24 小时后,取出小室,用棉棒擦除小室上层未穿膜的细胞,置于预先配制好的甲醇、冰乙酸(3:1)固定液中 30min,取出晾干,吉姆萨染色 8min,自来水轻轻冲洗,晾干,显微镜观察照相计数,每孔任意选取 3 个 200 × 视野拍照,计数侵袭细胞数量取其平均值进行分析。

1.7 统计学处理

结果分析均采用 SPSS17.0 统计软件,均数 ± 标准差表示。组间差异采用 one-way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 NDRG2 在不同分化程度胃癌细胞株中的表达

我们采用 RT-PCR 及 Western blot 检测 NDRG2 在胃永生化粘膜炎上皮细胞 GES1 及 6 株不同分化程度的胃癌细胞中 mRNA 及蛋白的表达情况。结果显示,与胃永生化粘膜炎上皮细胞 GES1 相比,NDRG2 的 mRNA 水平在 6 株胃癌细胞中呈不同程度的表达下调(图 1A),即 SGC7901(0.406 ± 0.018),MGC803(0.361 ± 0.009),MKN45(0.307 ± 0.008),BGC823(0.654 ± 0.024),AGS(0.123 ± 0.002)和 HGC27(0.10 ± 0.002),其中 HGC27 细胞的表达最低($P < 0.05$)(图 1B)。Western blot 结果进一步验证发现,NDRG2 在 GES1 和 6 株胃癌细胞系中的蛋

白表达水平与 mRNA 水平相一致(图 1C,D)。

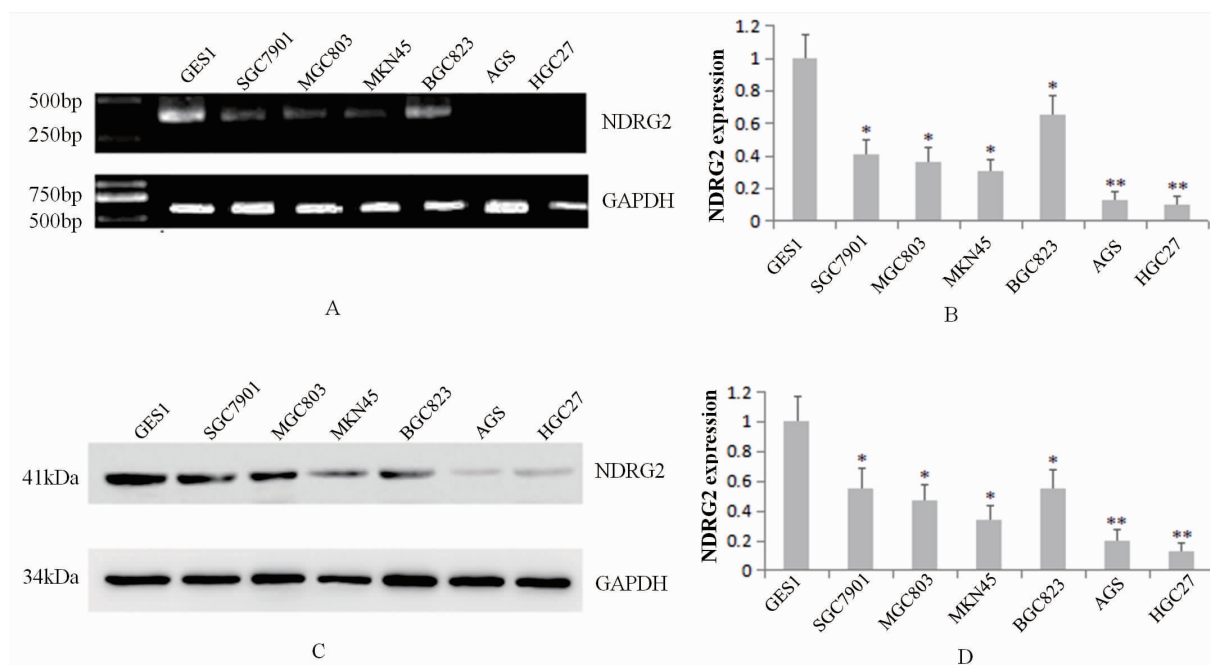


图 1. NDRG2 在胃永生粘膜上皮细胞 GES1, 以及胃癌细胞系 SGC7901、MGC803、BGC823、MKN45、AGS 和 HGC27 中的表达情况

A 和 C 分别为各细胞中 mRNA 和蛋白质的表达情况。B 和 D 分别为 NDRG2 mRNA 及蛋白表达的柱状图。GAPDH 为内参照。NDRG2 在 GES1 中表达最强, 在 HGC27 胃癌细胞系中表达最低。* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

Figure 1. NDRG2 Levels in Human Gastric Cancer Cells (SGC7901, MGC803, BGC823, MKN45, AGS and HGC27) and One Immortalized Normal Gastric Cell Line (GES1)

Protein (C) and mRNA (A) levels of NDRG2 in each cell line were showed, with GAPDH as control. B, D: The histogram showed that NDRG2 in GES1 was higher than that in 6 gastric cancer cell lines, and it was in the lowest level in HGC27. * P value < 0.05 , ** P value < 0.01 .

2.2 分化诱导剂 TPA 处理后 NDRG2 表达上调

选择 NDRG2 表达最低的未分化胃癌细胞株 HGC27, 经不同浓度的分化诱导剂 TPA 处理 72h 后, NDRG2 表达随 TPA 浓度变化不同程度的上调

(图 2A), 相对含量分别为为对照组 (0.197 ± 0.012), 10nmol/L TPA 组的 (0.330 ± 0.014), 50nmol/L TPA 组的 (0.435 ± 0.006), 100nmol/L TPA 组的 (0.747 ± 0.011), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2B)。

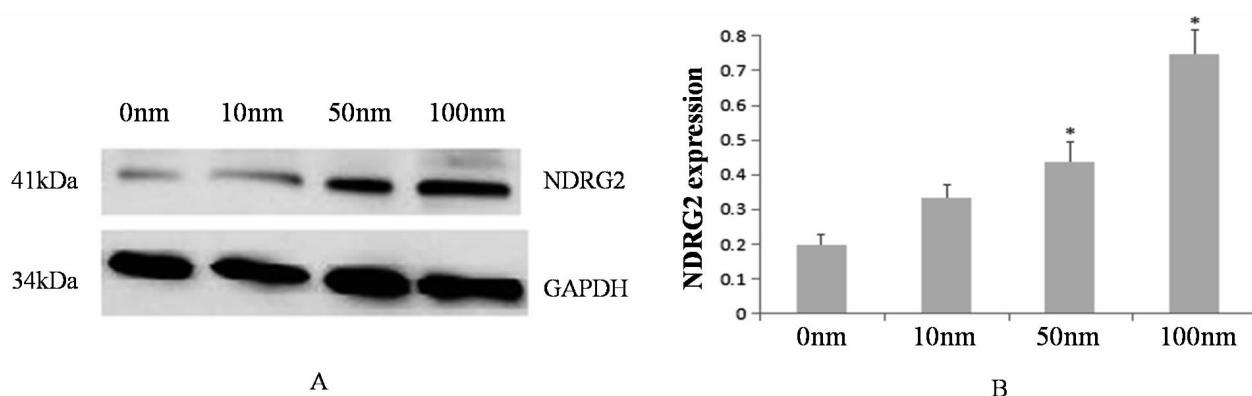


图 2. HGC27 细胞经分化诱导剂 TPA 处理后 NDRG2 的表达情况

A 和 B 分别为 NDRG2 的蛋白表达情况及表达柱状图。100umol/L 的 TPA 处理组 NDRG2 表达最强。* $P < 0.05$

Figure 2. The Protein Level of NDRG2 in Human Gastric Cancer Cell (HGC27) after Treatment with TPA
NDRG2 was gradually up-regulated as the concentration of TPA increased, and it was in the highest level in the 100 umol/L group. * P value < 0.05

2.3 分化诱导剂 TPA 诱导 NDRG2 表达上调后可抑制胃癌细胞的侵袭

我们进一步采用 Transwell 细胞侵袭实验分析经分化诱导剂 TPA 处理诱导 NDRG2 表达上调后胃癌细胞的侵袭能力。结果显示,100nmol/L TPA 处理 HGC27 细胞 72h 后,显微镜下观察,穿过 Transwell 小室的胃癌细胞数较对照组明显减少($P < 0.05$) (图 3A,B)。这提示 NDRG2 高表达可明显减弱胃癌细胞株 HGC27 的侵袭能力。

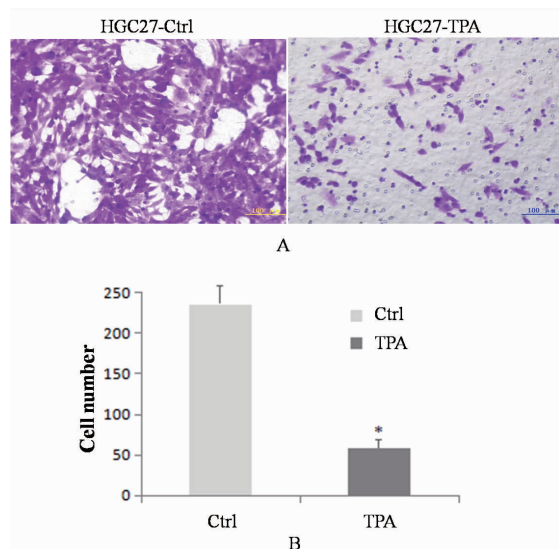


图 3 TPA 处理后 HGC27 细胞的侵袭力情况

分化诱导剂 TPA 处理后, HGC27 细胞的侵袭明显减弱, A: Transwell 结果显示经 TPA 处理后, HGC27 胃癌细胞数较对照组明显减少; B: 显微镜下计数 TPA 处理组及对照组穿过 Transwell 小室的胃癌细胞数。* $P < 0.05$

Figure 3. The invasion of HGC27 cells was inhibited after treatment with TPA

A: Result of Transwell showed that the number of cells decreased in the TPA group compared with those in the control group. B: The columns indicated the number of invaded cells which were counted under the microscope. * P value < 0.05

3 讨论

胃癌是消化道最常见的恶性肿瘤,居所有癌症死因第三位,主要发生在东亚,尤其是我国^[8]。近年来,随着胃癌早诊率的提高、手术技术的不断改进及新辅助化疗的应用,患者的生存率得到一定程度改善,但目前死亡率仍居高不下,且发病呈年轻化趋势,而组织学类型呈低分化趋势。逆转分化并抑制癌细胞转移将是肿瘤治疗的一个重要研究方向,且目前已成功应用于白血病的治疗。

NDRG2 是新近发现的一种细胞分化相关基因,在中枢神经系统大脑皮质、唾液上皮组织及肌肉组

织等正常组织中表达,不同程度参与细胞的生长发育及分化成熟^[2-3]。研究报道 NDRG2 在多种肿瘤组织,如结肠癌、乳腺癌、肝癌等中无表达或低表达,与患者预后呈正相关,诱导其表达上调可抑制癌细胞的浸润、转移,被认为是一种候选的抑癌基因^[9-10]。研究发现, NDRG2 通过调控 c-Myc、CD24、MMPs 等参与 P53 诱导的细胞凋亡而抑制癌细胞转移^[11-13]。目前 NDRG2 在胃癌中的表达及与胃癌细胞分化的关系尚缺乏研究。同家族成员 NDRG1 研究较为成熟,其在多种肿瘤组织中呈低或无表达,分化诱导剂如丁本酸、佛波酯(TPA)等可以诱导其表达,逆转癌细胞恶性表型^[14-15]。已有研究发现 NDRG1 可以促进白血病细胞的分化,逆转细胞恶性表型,不同程度改善白血病患者预后,这为肿瘤的分化治疗带来了新的希望^[16]。我们的前期研究也显示,同家族成员 NDRG1 基因在胃癌细胞及组织中低表达,与组织学分化及预后密切相关,分化诱导剂 TPA 可以上调 NDRG1 表达及逆转恶性生物学行为^[17]。同属于 NDRG 家族成员, NDRG2 与 NDRG1 约有 60% 的氨基酸同源性,这也提示 NDRG2 可能同样参与细胞的分化成熟,分化诱导剂可能逆转其在癌细胞中的表达及恶性表型。

Choi 等^[18]的研究显示 NDRG2 在胃癌细胞及组织中均表达下调,与胃癌患者的预后呈正相关, NDRG2 表达阴性者预后较差。Ling 等^[19]的研究也得到相似的结果,进一步研究发现 NDRG2 启动子区 DNA 高甲基化导致其在胃癌中的表达下调。本实验选取胃永生化黏膜上皮细胞 GES1 及 6 种不同分化程度的胃癌细胞株检测 NDRG2 基因的表达及与细胞分化的关系,结果显示与胃永生化黏膜上皮细胞 GES1 相比, NDRG2 基因的 mRNA 与蛋白水平在 6 株胃癌细胞中均有不同程度的表达下调,中分化胃癌细胞株 SGC7901 及低分化胃癌细胞株 BGC823 中相对高表达,低分化胃癌细胞株 MKN45、MGC803 和 AGS 细胞中呈中度表达,未分化胃癌细胞株 HGC27 中表达最低。这进一步支持 NDRG2 是胃癌中一种候选的抑癌基因,同时也与朱瑞雪等^[20]的研究结果相一致,他们发现 NDRG2 在胃癌组织中表达下调,且与组织学分化程度呈正相关,这提示 NDRG2 可能参与细胞分化成熟,参与维持胃黏膜上皮细胞的正常分化状态,其表达下调或沉默导致细胞去分化,恶性程度升高,促进癌细胞的转移,导致差的预后。

TPA(12-氧-十四烷酰佛波醇-13-乙酸酯,简称

佛波酯)是一种很强的分化诱导剂,研究发现低浓度的 TPA 不仅对小鼠和人的白血病细胞具有很强的诱导分化作用,而且能使白血病细胞去分化,出现一系列形态、功能方面的变化及某些生理生化特征的变化^[21]。随后我们采用分化诱导剂 TPA 处理未分化的胃癌细胞株 HGC27,结果显示 NDRG2 随 TPA 浓度的升高其表达逐渐上调,100nmol/L 组表达最高。而 100nmol/L 的 TPA 处理胃癌细胞系 HGC27 后,细胞侵袭实验显示胃癌细胞的侵袭力明显减弱。这进一步证实 NDRG2 与细胞分化相关,分化诱导剂可以逆转 NDRG2 表达及胃癌的恶性表型,为胃癌的临床治疗提供了新的方向和依据。

综上所述,NDRG2 在胃癌细胞中表达明显下调,是胃癌中一种候选的肿瘤抑制基因,在胃癌的发生发展中起着重要作用,而其在胃癌细胞株中的表达与细胞分化呈正相关,分化诱导剂可逆转 NDRG2 的表达及恶性生物学行为。下一步我们将进行体内实验进一步验证 NDRG2 与细胞分化的关系,为胃癌的分化治疗提供新的依据。

作者声明:本文第一作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任;

利益冲突:本文全部作者均认同文章无相关利益冲突;

学术不端:本文在初审、返修及出版前均通过中国知网(CNKI)科技期刊学术不端文献检测系统学术不端检测;

同行评议:经同行专家双盲外审,达到刊发要求。

[参考文献]

- [1] Melotte V, Qu X, Ongenaert M, et al. The N-myc downstream regulated gene(NDRG) family: diverse functions, multiple applications[J]. FASEB J, 2010, 24(11):4153-4166.
- [2] Hu XL, Liu XP, Deng YC, et al. Expression analysis of the NDRG2 gene in mouse embryonic and adult tissues[J]. Cell Tissue Res, 2006, 325(1):67-76.
- [3] 胡晓兰,药立波,张远强,等. NDRG2 在人胚胎组织中的表达分布特点[J]. 生理学报,2006, 58(4):331-336.
- [4] Shi H, Jin H, Chu D, et al. Suppression of N-Myc downstream-regulated gene 2 is associated with induction of Myc in colorectal cancer and correlates closely with differentiation[J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(6):968-975.
- [5] Faraji SN, Mojtahedi Z, Ghalamfarsa G, et al. N-myc downstream regulated gene 2 overexpression reduces matrix metalloproteinase-2 and -9 activities and cell invasion of A549 lung cancer cell line in vitro[J]. Iran J Basic Med Sci, 2015, 18(8):773-779.
- [6] Gödeke J, Luxemburger E, Trippel F, et al. Low expression of N-myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) correlates with poor prognosis in hepatoblastoma[J]. Hepatol Int, 2016, 10(2):370-376.
- [7] Yin A, Wang C, Sun J, et al. Overexpression of NDRG2 increases iodine uptake and inhibits thyroid carcinoma cell growth in situ and in vivo[J]. Oncol Res, 2016, 23(1-2):43-51.
- [8] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2):87-108.
- [9] Klotten V, Schlenzog M, Eschenbruch J, et al. Abundant NDRG2 expression is associated with aggressiveness and unfavorable patients' outcome in basal-like breast cancer[J]. PLoS One, 2016, 11(7):e0159073.
- [10] Hu W, Yang Y, Fan C, et al. Clinical and pathological significance of N-Myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) in diverse human cancers[J]. Apoptosis, 2016, 21(6):675-682.
- [11] Xu X, Li J, Sun X, et al. Tumor suppressor NDRG2 inhibits glycolysis and glutaminolysis in colorectal cancer cells by repressing c-Myc expression[J]. Oncotarget, 2015, 6(28):26161-26176.
- [12] Zheng J, Li Y, Yang J, et al. NDRG2 inhibits hepatocellular carcinoma adhesion, migration and invasion by regulating CD24 expression[J]. BMC Cancer, 2011, 11, 251:1-9.
- [13] Liu N, Wang L, Li X, et al. N-myc downstream-regulated gene 2 is involved in p53-mediated apoptosis[J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(16):5335-5349.
- [14] Sahni S, Bae DH, Lane DJ, et al. The metastasis suppressor, N-myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1), inhibits stress-induced autophagy in cancer cells[J]. J Biol Chem, 2014, 289(14):9692-9709.
- [15] Wangpu X, Yang X, Zhao J, et al. The metastasis suppressor, NDRG1, inhibits "stemness" of colorectal cancer via down-regulation of nuclear β -catenin and CD44[J]. Oncotarget, 2015, 6(32):33893-33911.
- [16] Chen S, Han YH, Zheng Y, et al. NDRG1 contributes to retinoic acid-induced differentiation of leukemic cells[J]. Leuk Res, 2009, 33(8):1108-1113.
- [17] Chang X, Zhang S, Ma J, et al. Association of NDRG1 gene promoter methylation with reduced NDRG1 expression in gastric cancer cells and tissue specimens[J]. Cell Biochem Biophys, 2013, 66(1):93-101.
- [18] Choi SC, Yoon SR, Park YP, et al. Expression of NDRG2 is related to tumor progression and survival of gastric cancer patients through Fas-mediated cell death[J]. Exp Mol Med, 2007, 39(6):705-714.
- [19] Ling ZQ, Ge MH, Lu XX, et al. Ndr2 promoter hypermethylation triggered by helicobacter pylori infection correlates with poor patients survival in human gastric carcinoma[J]. Oncotarget, 2015, 6(10):8210-8225.
- [20] 朱瑞雪,时永全,张连峰. NDRG2 和 Bel-2 在胃癌组织中的表达及意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2015, 31(4):516-519.
- [21] Schaar DG, Liu H, Sharma S. 12-O-tetradecan oylphorbol-13-acetate (TPA)-induced dual-specificity phosphatase expression and AML cell survival[J]. Leuk Res, 2005, 29(10):1171-1179.