

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.18.005

双歧杆菌介导 CTP-NPRL2 对裸鼠肾癌生长及凋亡的影响^{*}

邓正国¹,唐 伟^{2△},陈 欣²,史晓博²

(1. 重庆市永荣矿业有限公司总医院泌尿外科,重庆荣昌 402460;
2. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科 400016)

[摘要] **目的** 探讨双歧杆菌介导 CTP-NPRL2 对裸鼠肾癌生长及凋亡的影响。**方法** 构建 pET15b-CTP-NPRL2 并电转双歧杆菌,Western blot 验证蛋白表达。采用肾癌细胞悬液皮下注射法建立裸鼠肾癌模型,并分为观察组与对照组(每组 8 只),分别经尾静脉注射携带 pET15b-CTP-NPRL2 的双歧杆菌与生理盐水,每周 1 次,4 周后处死裸鼠,称取裸鼠及荷瘤质量,TUNEL 法检测肾癌组织凋亡。**结果** 观察组与对照组裸鼠质量分别为(26.24±1.98)g、(23.28±2.17)g,荷瘤质量分别为(1.37±0.12)g、(1.68±0.18)g,两组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。TUNEL 检测显示观察组凋亡指数(23.27±5.14)%明显高于对照组(10.37±2.58)%,两组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 双歧杆菌介导 CTP-NPRL2 对裸鼠肾癌生长具有抑制功能,并明显增加了肾癌细胞的凋亡。

[关键词] 肾肿瘤;双歧杆菌;基因治疗;NPRL2;细胞质转导肽
[中图分类号] R737.11;R730.59 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)18-2464-04

Effect of bifidobacterium-mediated CTP-NPRL2 on growth and apoptosis of nude mouse renal carcinoma^{*}

Deng Zhengguo¹,Tang Wei^{2△},Chen Xin²,Shi Xiaobo²

(1. Department of Urology,General Hospital of Yongrong Mining Co.,Ltd.,Chongqing 402460,China;
2. Department of Urology,First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University,Chongqing 400016,China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the effect of bifidobacterium-mediated CTP-NPRL2 on the growth and apoptosis of nude mouse renal carcinoma. **Methods** Recombinant plasmid pET15b-CTP-NPRL2 was constructed and transfected into bifidobacterium by electroporation,and then the expression of fusion protein CTP-NPRL2 was verified by Western blot. The nude mouse renal carcinoma model was constructed by subcutaneous injection of renal carcinoma cells suspension. The nude mice with renal carcinoma were equally and randomly divided into the observation group and control group(8 mice in each group). The mice in the observation group were treated with bifidobacterium containing recombinant plasmid pET15b-CTP-NPRL2 through tail vein injection,and the mice in the control group were treated with normal saline. All mice were treated once a week for four weeks,and then executed for evaluating the weight of mice and bearing tumors. Finally,the apoptosis of renal carcinoma was detected by TUNEL staining. **Results** The mass of nude mice was(26.24±1.98) g in the observation group and(23.28±2.17) g in the control group. The mass of bearing tumors was(1.37±0.12) g in the observation group and(1.68±0.18) g in the control group,and the differences were statistically significant($P<0.05$). The TUNEL detection results showed that the apoptosis index of renal carcinoma cell in the observation group(23.27±5.14)% was significantly higher than that in the control group(10.37±2.58)%,and the difference was statistically significant($P<0.05$). **Conclusion** Bifidobacterium-mediated CTP-NPRL2 has an inhibitory effect on the renal carcinoma growth of nude mouse,and significantly increases the apoptosis of renal carcinoma cells.

[Key words] kidney neoplasms;bifidobacterium;gene therapy;nitrogen permease regulator-like 2;cytoplasmic transduction peptide

肾癌约占所有成人恶性肿瘤的 3%^[1]。早期手术后有 20%~30% 的患者发生转移^[2];晚期治疗方法有限。抑癌基因 NPRL2(nitrogen permease regulator-like 2)是 Lerman 等^[3]发现的新抑癌基因,在多种肿瘤中的表达下降,课题组前期于肾癌中发现 NPRL2 的表达较癌旁组织明显下降^[4]。细胞质转导肽(cytoplasmic transduction peptide,CTP)可高效携带目的蛋白穿透细胞膜并专性定位于细胞质^[5],课题组前期发现利用 CTP 将 NPRL2 蛋白转入肾癌细胞发挥了很好的肿瘤抑制作

用^[6]。双歧杆菌是良好的肿瘤基因治疗的载体^[7-9]。本课题将上述三者结合起来,构建双歧杆菌介导的 CTP-NPRL2 处理系统,观察其对裸鼠肾癌生长及凋亡的影响,为进一步深入研究打下基础,为肾癌临床治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和动物 肾癌细胞 786-O 由课题组前期保存。健康 BALB/c-nu 雌性裸鼠 24 只,4~5 周龄,体质量 16~18 g,由

^{*} 基金项目:重庆市卫生局面上项目(2013-2-262)。 作者简介:邓正国(1970—),副主任医师,本科,主要从事泌尿系统肿瘤的诊治研究。
[△] 通信作者,E-mail:tangwei2060@163.com。

重庆医科大学动物实验中心提供[许可证号:SCXK(渝) 2012-0001,SYXK(渝) 2012-0001],SPF 级动物房,鼠笼喂养,室温 20~23 ℃,12/12 h 昼夜节律更替,自由进食和饮水,所有动物喂养与操作均遵守《重庆市实验动物管理办法》。

1.1.2 试剂与仪器 双歧杆菌由本实验室保存;pET15b、氨苄西林、LB 培养基、MRSA 培养基、2×pfu colorless mix、2×Taq PCR mix、考马斯亮蓝染色液、PBS 粉剂、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂盒、羊抗鼠辣根过氧化物酶(HRP)标记 IgG、4%多聚甲醛、PVDF 膜及 PCR 产物纯化回收试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司;ECL 化学发光试剂盒、0.25%胰酶及异丙基-β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷(IPTG)购自 Genview;T4 DNA ligase 购自 Biolabs;胎牛血清购自 GEMINI;鼠源 NRPL2 单克隆抗体购自 Santa Cruz;RPMI1640 购自 HyClone;TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购于 Roche。普通显微镜(Olympus),低温高速离心机购自长沙平凡仪器仪表有限公司,电转杯、凝胶成像系统(Bio-Rad),基因导入仪购自宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建及鉴定 根据目的序列和载体 MCS 位点,添加 NdeI、BamHI,合成引物如下:FCCTP-NPRL2:GGA ATT CCA TAT GAT GTA CGG ACG CCG CGC AC;RCTP-NPRL2:CGC GGA TCC TCT TAC TTC CAG CAG ATG ATG ATG TTG GG。PCR 扩增目的基因,切胶回收产物。酶切 PCR 产物和 pET15b 质粒并回收,通过 T4 DNA 连接酶连接后转化 DH5α 感受态菌株,用含氨苄西林的 LB 培养基筛选出阳性菌落并 PCR 鉴定,提取质粒进行测序。

1.2.2 Western blot 验证目的蛋白的表达 37 ℃厌氧培养双歧杆菌,待细菌生长进入对数期后制备成感受态。将重组质粒 pET15b-CTP-NPRL2 电转感受态双歧杆菌,电转条件为:电压 12 kv/cm,电阻 200 Ω,电容 25 uF。电转后加入含氨苄西林的 MRSA 培养液中并做好标记,37 ℃厌氧培养,待细菌生长进入对数生长期,加入 IPTG 诱导蛋白表达,12 h 后离心弃培养液,PBS 液洗涤 3 次,超声裂菌离心取上清液,Ni-NTA 亲和层析柱纯化后,上样 SDS-PAGE 电泳,将蛋白转移到 PVDF 膜上,封闭后置于 4 ℃一抗孵育过夜,次日 37 ℃二抗孵育 1 h,最后用化学发光试剂显色。

1.2.3 肾癌细胞培养 肾癌细胞 786-O 加入于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基,37 ℃、5%CO₂ 孵箱中常规传代培养。当细胞扩增至对数生长期时,0.25%胰酶消化后离心收集,PBS 洗涤 3 次并重悬,稀释细胞浓度为 2.5×10⁷ 个/mL。

1.2.4 构建裸鼠肾癌模型及分组给药 3.5%水合氯醛腹腔麻醉(350 mg/kg)后,将配制好的肾癌 786-O 细胞悬液皮下注射于裸鼠后项,每只 0.2 mL,共 24 只。2 周后瘤块形成,随机选取 2 只裸鼠处死,瘤块行病理检查。选取荷瘤大小均一的 16 只裸鼠分为对照组与观察组,每组 8 只,分别经尾静脉注射生理盐水与携带重组质粒 pET15b-CTP-NPRL2 的双歧杆菌菌液 0.2 mL,每周注射 1 次,总共 4 周。待处理结束后,处死并称取裸鼠及荷瘤质量。

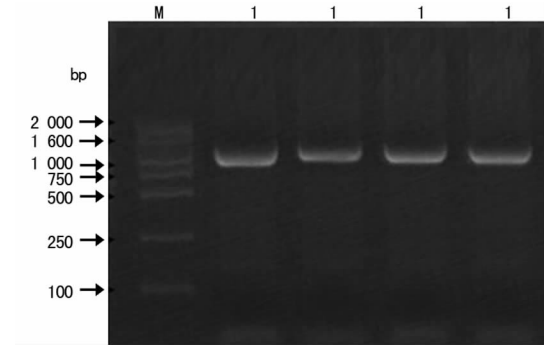
1.2.5 原位末端标记法(TUNEL)检测肾癌组织凋亡 按 TUNEL 试剂盒说明书进行操作。在光学显微镜下观察,凋亡

细胞表现为核固缩、染色质边集或成块、呈棕褐色染色。计数至少 5 个视野,每个视野 100 个细胞,计算凋亡指数(apoptotic index,AI),即凋亡细胞数占细胞总数的百分比。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

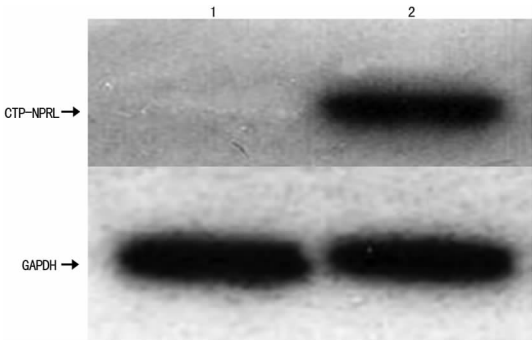
2 结果

2.1 测序鉴定及目的蛋白的表达 CTP-NPRL2 基因 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析,可见 1 221 bp 的条带,与预期大小相符(图 1)。重组质粒 pET15b-CTP-NPRL2 采用 T7、T7ter 引物双向测序。BLAST 比对测序结果显示重组质粒 pET15b-CTP-NPRL2 测序结果中包含 CTP 及 NPRL2 基因序列,NPRL2 基因同源性 100%。Western blot 验证目的蛋白的表达,结果显示携带重组质粒 pET15b-CTP-NPRL2 的双歧杆菌在 50×10³ 左右有目的条带出现,未经诱导的菌体无条带出现,见图 2。



M:DNA Marker DL2000;1:CTP-NPRL2 基因 PCR 产物。

图 1 CTP-NPRL2 基因 PCR 扩增产物电泳图



1:纯双歧杆菌;2:纯化的 CTP-NPRL2 蛋白。

图 2 Western blot 检测目的蛋白的表达

2.2 裸鼠肾癌模型 裸鼠肾癌建模过程中共死亡 2 只,2 只未成瘤,20 只成瘤。随机选取 2 只成瘤裸鼠处死,取出包块 HE 染色病检,光镜下见肾癌细胞呈实性片状,排列较紊乱,极性消失,细胞异质性明显,可见明显核分裂(图 3),说明肾癌模型构建成功。选取肿块大小均一,直径约 5 mm 的 16 只裸鼠平均分组,剩下 2 只裸鼠因瘤块体积过小而弃用,处理过程中无死亡。

2.3 两组裸鼠及荷瘤质量比较 观察组较对照组裸鼠质量明显增加(*P* < 0.05),而荷瘤质量明显降低(*P* < 0.05),见表 1。

2.4 两组裸鼠肾癌细胞凋亡比较 TUNEL 染色可见两组肾癌细胞均有一定的凋亡(图 4)。观察组 AI 值(23.27±

5.14)%明显高于对照组(10.37±2.58)%,差异有统计学意义($P<0.05$)。

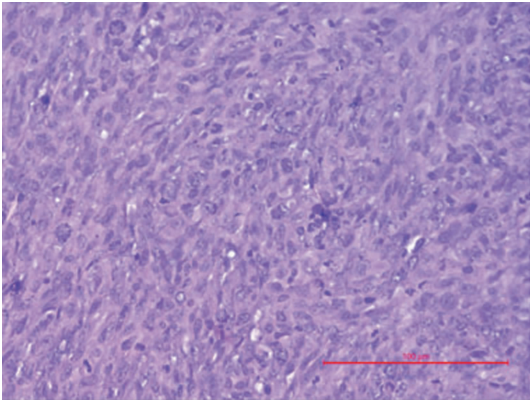
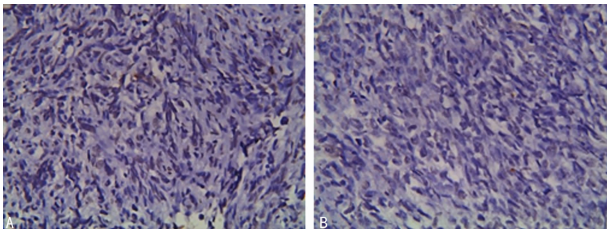


图3 裸鼠肾癌模型(HE染色,×400)

表1 两组裸鼠质量及荷瘤质量比较($\bar{x}\pm s, n=8, g$)		
组别	裸鼠质量	荷瘤质量
对照组	23.28±2.17	1.68±0.18
观察组	26.24±1.98 ^a	1.37±0.12 ^a

^a: $P<0.05$ 与对照组比较。



A:观察组;B:对照组。

图4 各组裸鼠肾癌组织(TUNEL染色,×400)

3 讨 论

肾癌亦称肾细胞癌,是起源于肾实质泌尿小管上皮系统的恶性肿瘤,约占肾脏肿瘤的90%,病理类型以透明细胞癌为主,约占肾癌的80%^[10]。近年来,肾癌的发病率有上升的趋势,并且许多患者就诊时已处于晚期^[11]。肾癌早期以根治性肾切除术为主,而晚期患者失去手术机会,同时由于肾癌具有多药物耐药基因,对放、化疗不敏感,缺乏特效治疗方法。基因疗法是肾癌治疗的研究热点,但目前研究都未能突破到临床应用,需进一步探索。

抑癌基因NPRL2,也称肿瘤抑制候选基因4(tumor suppressor candidate-4, TUSC4),表达于许多正常组织,而在相应的恶性肿瘤组织中表达明显下降,如肺癌、乳腺癌、结肠癌^[3]。研究表明,抑癌基因NPRL2与肿瘤的发生、发展及预后关系密切。Otani等^[12]学者研究认为,NPRL2的表达在肝细胞癌的发展过程中作为一个独立的预后因子扮演了重要的角色。外周血中的NPRL2 mRNA也可作为一个有用的分子标记物来检测出早期阶段的结肠腺瘤与结肠癌^[13]。本课题组前期研究发现NPRL2在肾癌组织标本中的表达降低,并与肾癌组织学分级、TNM分期密切相关,通过转染带有抑癌基因NPRL2的质粒能抑制肾癌细胞786-O增殖,阻滞细胞周期于G₀/G₁期并增加细胞凋亡^[-4]。

CTP是Kim等^[5]报道的一种可高效携带蛋白质穿透胞膜并专性定位于细胞质的转导肽,以胞吞-非依赖性机制发挥转导功能,也避免了传统的转导肽PTD作为蛋白转导体时主要定位于细胞核而存在损伤遗传物质和致瘤等潜在危害。Huang等^[14]通过原核表达CTP-OD-HA融合蛋白,成功转染慢性粒细胞白血病细胞发挥出OD-HA的作用抑制了细胞的增殖。Xun等^[15]同样通过原核表达anti-HBc scFv-CTP,利用CTP将anti-HBc scFv转入HepG2.2.15细胞,抑制了乙型肝炎病毒的复制。本课题组前期证实,利用CTP同样能使抑癌基因NPRL2蛋白转入肾癌细胞并发挥该蛋白的抑癌作用^[6]。双歧杆菌属于革兰阳性菌,严格厌氧,是人体中的重要益生菌,广泛用于各种奶制品发,被美国食品和药品管理局(FDA)定为最高安全级别。许多研究表明,双歧杆菌对肿瘤中心厌氧区具有很好的靶向性,是良好的基因治疗靶向载体^[7-9]。本课题拟将NPRL2、CTP与双歧杆菌三者联合起来,结合本课题组前期工作经验,构建双歧杆菌介导的CTP-NPRL2处理系统,观察其对裸鼠肾癌组织生长及细胞凋亡的影响。

本研究结果显示,双歧杆菌介导CTP-NPRL2对裸鼠肾癌组织的生长具有明显的抑制作用,并且显著增加了肾癌细胞的凋亡,从而减轻了裸鼠的肿瘤负荷,改善了裸鼠的身体质量。该结果初步表明,利用双歧杆菌介导CTP-NPRL2治疗肾癌切实可行,并为下一步继续深入细致的研究打下了基础,也为临床上肾癌的基因治疗提供了新的思路。然而,本实验仅仅初步证实了双歧杆菌介导CTP-NPRL2对肾癌组织具有肿瘤抑制作用,还需要进一步进行深入的研究,以期阐述清楚双歧杆菌介导CTP-NPRL2治疗肾癌的分子机制,为临床药物开发与应用提供最可靠的实验依据。

参考文献

[1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5-29.

[2] Eggener SE, Yossepowitch O, Pettus JA, et al. Renal cell carcinoma recurrence after nephrectomy for localized disease: predicting survival from time of recurrence[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(19): 3101-3106.

[3] Lerman M, Minna JD. The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes [J]. Cancer Res, 2000, 60 (21): 6116-6133.

[4] Tang YY, Jiang L, Tang W. Decreased expression of NPRL2 in renal cancer cells is associated with unfavourable pathological, proliferation and apoptotic features[J]. Pathol Oncol Res, 2014, 20(4): 829-837.

[5] Kim D, Jeon C, Kim JH, et al. Cytoplasmic transduction peptide(CTP): new approach for the delivery of biomolecules into cytoplasm in vitro and in vivo [J]. Exp Cell Res, 2006, 312(8): 1277-1288.

[6] Zeng Y, Shi XB, Yuan ZY, et al. Biological characteristics of renal cancer cells after CTP-mediated cancer suppres-

sor gene NPRL2 protein treatment[J]. Biol Chem,2016, 397(11):1163-1171.

[7] 江虹锐,鲁志刚,马玉彦,等. 两歧双歧杆菌在荷瘤鼠模型中的靶向定植及对巨噬细胞的免疫激活[J]. 肿瘤,2009, 29(8):721-726.

[8] Yin X,Yu B,Tang Z,et al. Bifidobacterium infantis-mediated HSVTK/GCV suicide gene therapy induces both extrinsic and intrinsic apoptosis in a rat model of bladder cancer[J]. Cancer Gene Ther,2013,20(2):77-81.

[9] 吴瑜,易成,王树人,等. 婴儿双歧杆菌对小鼠黑色素瘤模型肿瘤组织的靶向性[J]. 四川大学学报(医学版),2003, 34(3):435-438.

[10] Leibovich BC,Lohse CM,Crispen PL,et al. Histological subtype is an independent predictor of outcome for patients with renal cell carcinoma[J]. J Urol,2010,183(4): 1309-1315.

[11] Ridge CA,Pua BB,Madoff DC. Epidemiology and staging of renal cell carcinoma[J]. Semin Intervent Radiol,2014, 31(1):3-8.

[12] Otani S,Takeda S,Yamada S,et al. The tumor suppressor NPRL2 in hepatocellular carcinoma plays an important role in progression and can be served as an independent prognostic factor[J]. J Surg Oncol,2009,100(5):358-363.

[13] Liu AY,Liu DG,Du YJ,et al. Relationship between tumor and peripheral blood NPRL2 mRNA levels in patients with colorectal adenoma and colorectal cancer[J]. Cancer Biol Ther,2014,15(5):489-495.

[14] Huang SF,Liu DB,Zeng JM,et al. Cloning,expression, purification and functional characterization of the oligomerization domain of Bcr-Abl oncoprotein fused to the cytoplasmic transduction peptide[J]. Protein Expr Purif, 2009,64(2):167-178.

[15] Xun YH,Pan QC,Tang ZH,et al. Intracellular-delivery of a single-chain antibody against hepatitis B core protein via cell-penetrating peptide inhibits hepatitis B virus replication in vitro[J]. Int J Mol Med,2013,31(2):369-376.

(收稿日期:2017-01-02 修回日期:2017-03-16)

(上接第 2463 页)

membranous glomerulonephritis[J]. Clin Nephrol,1986, 25(3):122-128.

[8] Beck LH,Bonegio RG,Lambeau G,et al. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy[J]. N Engl J Med,2009,361 (1):11-21.

[9] Debiec H,Ronco P. PLA2R autoantibodies and PLA2R glomerular deposits in membranous nephropathy[J]. N Engl J Med,2011,364(7):689-690.

[10] Svobodova B,Honsova E,Ronco P,et al. Kidney biopsy is a sensitive tool for retrospective diagnosis of PLA2R-related membranous nephropathy[J]. Nephrol Dial Transplant,2013,28(7):1839-1844.

[11] Qin W,Beck LH,Zeng C,et al. Anti-phospholipase A2 receptor antibody in membranous nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol,2011,22(6):1137-1143.

[12] 祝爽爽,周树录,周朝敏,等. 成人特发性膜性肾病肾脏组织 M 型磷脂酶 A2 受体 1 抗原的检测[J]. 南方医科大学学 报,2015(4):526-529.

[13] 周广宇,金玲,于晶,等. 成人膜性肾病患者血清抗 PLA2R 抗体与病情的相关性[J]. 中华肾脏病杂志, 2012,28(2):111-114.

[14] Tomas NM,Beck LH,Meyer-Schwesinger C,et al. Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy[J]. N Engl J Med,2014,371(24): 2277-2287.

[15] Xun C,Shuai L,Wang W,et al. Comparison of biomarkers between PLA2Rab+ and PLA2Rab- in patients with idiopathic membranous nephropathy[J]. Int Urol Nephrol, 2015,47(5):831-835.

[16] Floege J,Amann K. Primary glomerulonephritides[J]. Lancet,2016,387(132):2036-2048.

[17] Ronco P,Debiec H. Pathophysiological advances in membranous nephropathy: time for a shift in patient's care [J]. Lancet,2015,385(9981):1983-1992.

(收稿日期:2017-01-17 修回日期:2017-03-16)

医学统计工作的基本内容

按工作性质及其先后顺序,可将医学统计工作分为实验设计、收集资料、整理资料、分析资料。实验设计是开展某项医学研究工作的关键,包括医学专业设计和统计学设计,医学专业设计的内容包括研究对象纳入和排除标准、样本含量、获取样本的方法、分组原则、观察(检测)指标、统计方法等。收集资料的方法包括各种试验、检测或调查,要求资料完整、准确、及时、有足够数量、具有代表性和可比性等。整理资料包括原始资料的检查与核对、对资料进行分组与汇总等。分析资料即对资料进行统计学分析,包括进行统计描述和统计推断。