

# 高表达 Kiss-1 对结肠癌 SW480 细胞增殖和迁移的影响

钟 华 刘迪群 吴雪艳

**摘要** 目的 探讨高表达 Kiss-1 基因对结肠癌 SW480 细胞增殖及迁移的影响。方法 将 pEGFP-N1-Kiss-1 重组质粒转染至 SW480 细胞设为实验组,将 pEGFP-N1 质粒转染至 SW480 细胞设为阴性对照组,将 SW480 细胞设为空白对照组,采用 Western blot 法检测各组细胞中 Kiss-1 表达量;采用 CCK-8 法分析 Kiss-1 对 SW480 细胞增殖的影响;并用划痕实验评估 Kiss-1 对 SW480 细胞迁移能力的影响。结果 将 pEGFP-N1 和 pEGFP-N1-Kiss-1 重组质粒转染至 SW480 结肠癌细胞,检测实验组 Kiss-1 表达量增加,实验组细胞增殖率明显低于对照组( $P < 0.05$ ),且实验组细胞划痕损伤愈合的速度明显下降。结论 高表达 Kiss-1 可抑制结肠癌 SW480 细胞的增殖,降低细胞迁移速度。

**关键词** 结肠癌; Kiss-1; 增殖; 迁移

中图分类号 R 574.62

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)12-1697-04

结肠癌是一种严重威胁人类生命和健康的恶性肿瘤,在我国其发病率逐年增高,且有年轻化趋势,且大多数患者明确诊断时已处于癌症晚期失去了手术治疗的机会,因此如何早期诊断与治疗大肠癌,预防复发与转移,是提高 5 年生存率的关键。积极开展大肠癌增殖、转移机制的研究,对大量大肠癌患者的生存及预后具有很重要的现实意义。Kiss-1 基因是继 nm23 后发现的另一种为数不多的新的肿瘤转移抑制基因<sup>[1]</sup>,Kiss-1 基因定位于染色体 1q32 ~ q41,其基因结构包括 4 个外显子(含 797 个核苷酸)。该研究旨在体外构建高表达 Kiss-1 的结肠癌 SW480 细胞株,拟探讨 Kiss-1 基因对结肠癌增殖及转移的影响,从而为结肠癌患者创造新的治疗靶点提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料与细胞培养** 质粒 pEGFP-N1-Kiss-1 及空载质粒购自上海吉凯公司,并且经公司测序鉴定两种质粒均含有 GFP 绿色荧光;质粒小提试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;G418 及 CCK-8

试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司;Lipofectamine 2000 脂质体转染试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;兔抗人 Kiss-1 一抗购自武汉博士德生物工程技术有限公司;二抗购自美国 Epitomics 公司;在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中将人结肠癌细胞株 SW480(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所惠赠)置于含 10% 胎牛血清的 1640 培养基培养。

**1.2 质粒扩增与提取** LB 肉汤 2.5 g 加入 100 ml 一级水中配置成 25 mg/ml 的 LB 培养基,消毒备用。卡拉霉素加入培养基中,使其终浓度为 30 μg/ml。100 μl 的质粒 pEGFP-N1-Kiss-1 及空载质粒分别于 37 °C、5 ml LB 培养基中,180 r/min 震荡 16 h,提取纯化质粒。通过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** 空载体 pEGFP-N1 转染 SW480 细胞作为阴性对照组。用无血清 1640 培养基将 8 μg pEGFP-N1-Kiss-1 质粒、10 μl Lipofectamine 2000 分别稀释至总体积为 250 μl 并在室温下静置 20 min。在 SW480 细胞生长至 90% ~ 95% 融合度时进行转染,将上述混合液加入其中,细胞混合液培养 6 h 后使用 PBS 液洗两遍,最后加入含 10% 胎牛血清的培养基体内停止转染。

**1.4 Western blot 法鉴定 Kiss-1 在 SW480 细胞中的表达** 分别提取 2 个对照组以及实验组中 SW480 细胞总蛋白。提取的蛋白用 15% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 Bio-Rad 转膜仪半干转至 PVDF 膜,验证后 TBST 封闭,然后结合对应的一抗及二抗孵育过夜,最后暗室凝胶成像分析系统检测并显像,检测 Kiss-1 表达的变化。

**1.5 CCK-8 法检测细胞增殖情况** 将在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孔板内( $1 \times 10^4$  个/孔)并定容至 100 μl 培养,设置 0、24、48、72 h 4 个时间点及 3 个复孔和 3 个空白孔,每孔加入 5 μl CCK-8,在培养基孵育 2 h,酶标仪检测 450 nm 光谱下的吸光度值(optical density, OD)值,根据每天 OD 值的均数绘制细胞生长曲线。

**1.6 细胞划痕实验** 用标记笔在 24 孔板后画 3 条水平线,间距 1 cm。500 μl 细胞悬液( $2 \times 10^5$  个/孔)接种在 24 孔板中,长至 100% 汇合度时,用 10

2014-08-27 接收

基金项目:湖南省教育厅一般项目(编号:11C1107)

作者单位:南华大学附属第一医院消化内科 衡阳 421001

作者简介:钟 华,女,副主任医师,责任作者,E-mail:zhonghuahao@hotmail.com

μl 移液枪头垂直横线划痕, PBS 冲洗 3 遍, 洗去划下细胞, 加入无血清 1640 培养基, 放入培养箱中培养。分别于 0、24、48 h 显微镜下拍照。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间采用单因素方差分析方法(ANOVA one)。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

### 2 结果

2.1 目的基因测序 上海吉凯基因化学技术有限公司负责完成目的基因及重组质粒的鉴定, 将基因测序显示所合成质粒的基因序列与 GenBank 中 Kiss-1 cDNA 的序列完全吻合, 见图 1。

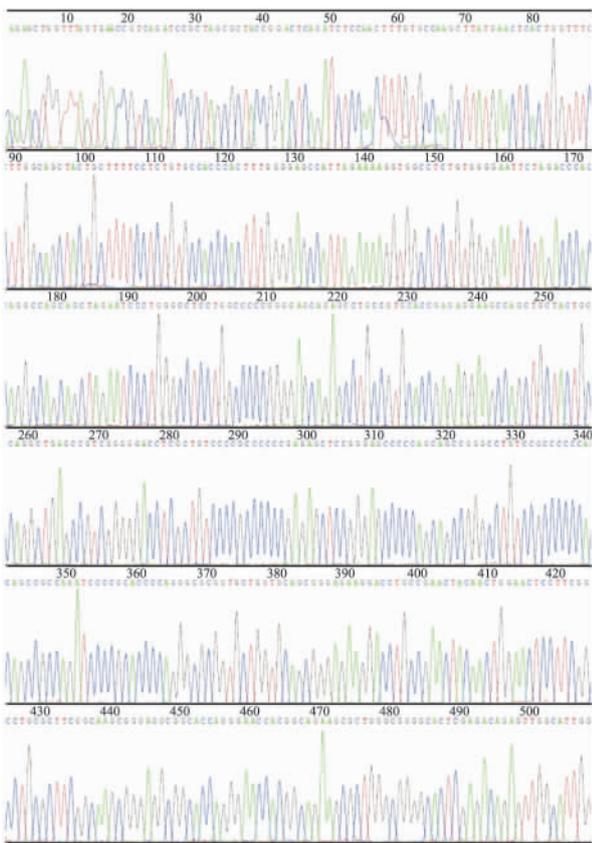


图1 目的基因 Kiss-1 的测序图谱位点 72 ~ 489 区间为目的基因序列

2.2 SW480 细胞转染质粒及筛选 24 h 后于荧光显微镜下观察已转染质粒的 SW480 细胞可以看见绿色荧光。而通过 G418 筛选 4 周后视野所见几乎所有实验组细胞都带有绿色荧光。停用 G418 一周后, 所见绿色荧光保持不变。稳转细胞株筛选成功, 见图 2。

2.3 Western blot 法检测 Kiss-1 在 SW480 细胞中的表达 分别提取空白对照组、阴性对照组和实验组细胞中总蛋白, Western blot 法检测 Kiss-1 基因编码的蛋白 kisspeptin 的表达。在空白对照组及阴性

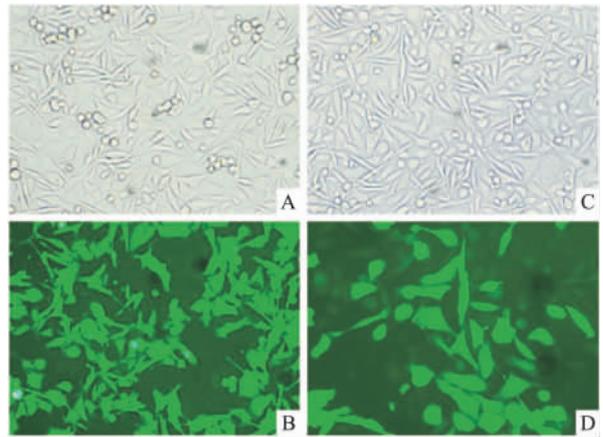


图2 转染 pEGFP-N1-Kiss-1 和 pEGFP-N1 后经 G418 筛选 4 周后细胞 SP × 200

A、B: 同一视野下阴性对照组细胞; C、D: 同一视野下实验组细胞

对照组的 SW480 细胞中表达量低, 而在实验组中 kisspeptin 的表达明显升高, 见图 3。结果表明, 本研究成功将 Kiss-1 基因转染至 SW480 细胞中, 并增加 kisspeptin 的表达。

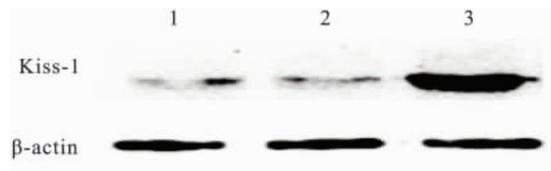


图3 稳定转染后 Western blot 法检测蛋白 kisspeptin 的表达  
1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: 实验组

2.4 CCK-8 法检测各组细胞的增殖能力 CCK-8 检测结果显示, 培养 24 h 时各组细胞增殖能力差异无统计学意义。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差异无统计学意义。见图 4。

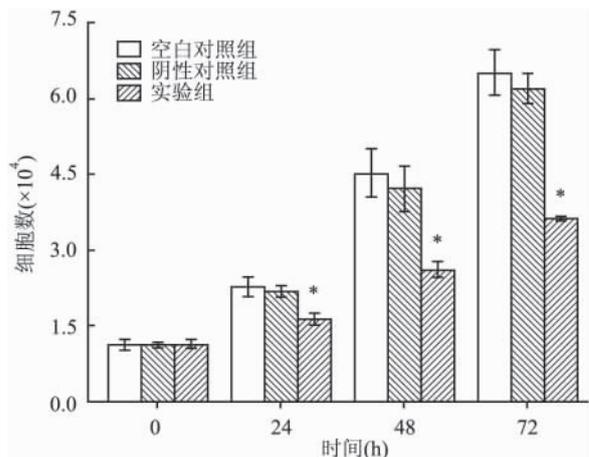


图4 CCK-8 法检测 Kiss-1 对 SW480 细胞增殖能力的影响  
与对照组比较: \*  $P < 0.05$

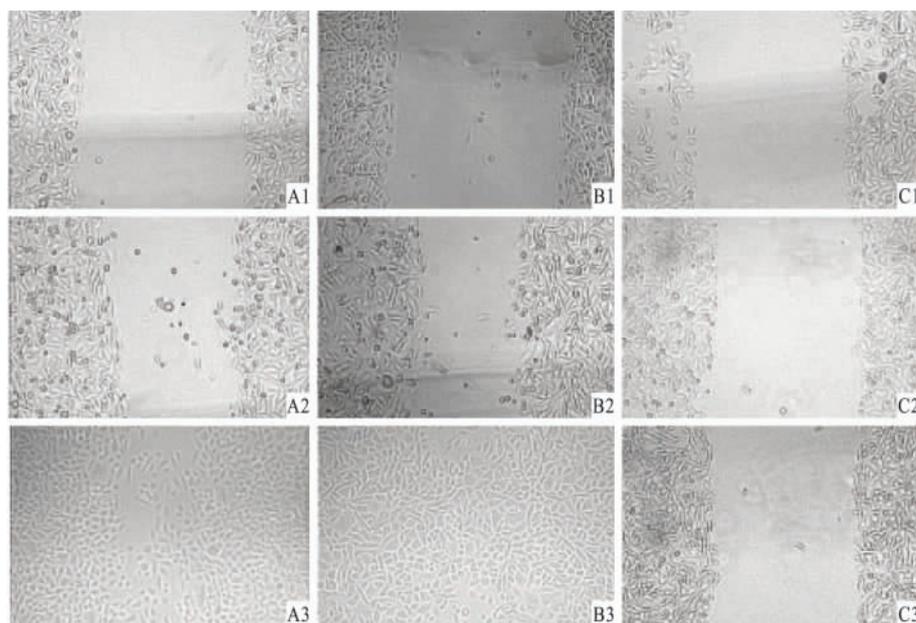


图5 划痕实验检测 Kiss-1 对 SW480 细胞迁移能力的影响 SP × 100

A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: 实验组; 1: 0 h; 2: 24 h; 3: 48 h

**2.5 细胞划痕实验** 细胞划痕实验显示, 实验组细胞的划痕损伤愈合速度明显慢于空白对照组及阴性对照组, 高表达 Kiss-1 基因的 SW480 细胞体外迁移能力较对照组慢, 表明 Kiss-1 基因能抑制结肠癌 SW480 细胞的体外迁移能力, 见图 5。

### 3 讨论

肿瘤恶性增殖与转移是一个涉及到多种促癌因子和抑癌因子的复杂过程<sup>[2]</sup>。肿瘤细胞由原发肿瘤脱落分离是肿瘤发生转移的首发过程, 通过局部浸润渗入血液循环、淋巴循环, 最后到达远处组织, 在多种分子机制作用下细胞增殖形成克隆灶。人类 Kiss-1 基因的表达产物是一个命名为 kisspeptin 的亲水性多肽。Kisspeptin 由 145 个氨基酸残基组成, 可进一步裂解为 kisspeptin-10、kisspeptin-13、kisspeptin-14 及 kisspeptin-54 等, 这些裂解产物统称 kisspeptins, 具有相似的生物活性和功能。其中, kisspeptin-54 又名 metastin, 即转移抑素(因其具有转移抑制功能而得名)<sup>[3]</sup>。Metastin 是 Kiss-1 基因最主要的编码产物, 也是发挥转移抑制功能的关键。有研究<sup>[4]</sup>显示 Kiss-1 在多种正常人体组织均有表达。其中, 胎盘的表达水平最高, 其次是脑垂体和脊髓, Kiss-1 在正常人体肝脏、肺脏、胰腺及小肠等组织呈现低水平表达。在多种人体肿瘤中, Kiss-1 发挥转移抑制作用<sup>[5-6]</sup>。研究<sup>[7]</sup>表明, Kiss-1 表达缺

失与肾细胞癌发生远处转移呈正相关。在肝癌组织中, Kiss-1 是否表达关系到肿瘤 TNM 分期及肝内转移, Kiss-1 表达水平越低, 肿瘤恶性程度越高, 其发生肝内转移的可能性越大<sup>[8]</sup>。发生脑转移的乳腺癌组织中, Kiss-1 表达水平明显低于非转移乳腺癌组织。Li et al<sup>[9]</sup>同时采用体内、外实验发现 Kiss-1 可明显抑制胃癌细胞增殖及远处转移的发生。研究者<sup>[10]</sup>发现 Kiss-1 通过激活 p38MAPK 途径抑制 MMP-9 的表达, 从而起到抑制胃癌细胞转移的作用。此外, 研究<sup>[11-15]</sup>表明 Kiss-1 基因与人黑色素瘤、膀胱癌的转移能力亦呈负相关, 直接影响肿瘤的侵袭与转移, 其抑制肿瘤转移的途径主要是通过降低癌细胞的移行能力、抑制肿瘤细胞的集落形成等机制实现的。

本研究通过将 Kiss-1 基因转染至结肠癌 SW480 细胞, CCK-8 实验显示, Kiss-1 重组质粒转染 SW480 细胞后, SW480 细胞的体外增殖能力从细胞周期的 48 h 开始下降, 差异有统计学意义, 从而推测 Kiss-1 抑制结肠癌细胞增殖是通过诱导肿瘤细胞分化, 促进细胞凋亡实现。通过细胞划痕实验显示, 高表达 Kiss-1 基因的 SW480 细胞体外迁移能力较对照组慢, 表明 Kiss-1 基因能抑制结肠癌 SW480 细胞的体外迁移能力, 其作用原理可能与 Kiss-1 激活 p38MAPK 途径、抑制 MMP-9 的表达等多种机制相关, 有待进一步研究。因此, 推测 Kiss-1 基因能有效

抑制结肠癌 SW480 细胞的增殖与迁移能力, 从而影响结肠癌细胞的增殖和转移。但是其具体作用机制仍不明确, 有待于进一步研究。

### 参考文献

- [1] Stark A M, Tongers K, Maass N, et al. Reduced metastasis-suppressor gene mRNA-expression in breast cancer brain metastases [J]. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005, 131(3): 191–8.
- [2] Croker A K, Allan A L. Cancer stem cells: implications for the progression and treatment of metastatic disease [J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(2): 374–90.
- [3] Kotani M, Dethoux M, Vandenberghe A, et al. The metastasis suppressor gene Kiss-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(37): 34631–6.
- [4] Tena-Sempere M. GPR54 and kisspeptin in reproduction [J]. *Hum Reprod Update* 2006, 12(5): 631–9.
- [5] West A, Vojta P J, Welch D R, et al. Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene (KISS1) [J]. *Genomics*, 1998, 54(1): 145–8.
- [6] Lee J H, Miele M E, Hicks D J, et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1996, 88(23): 1731–7.
- [7] Chen Y, Yusenko M V, Kovacs G. Lack of KISS1R expression is associated with rapid progression of conventional renal cell carcinoma [J]. *J Pathol* 2011, 223(1): 46–53.
- [8] Shengbing Z, Feng L J, 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): 1128–34.
- [9] Li N, Wang H X, Zhang J, et al. KiSS-1 inhibits the proliferation and invasion of gastric carcinoma cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(15): 1827–33.
- [10] Lee K H, Kim J R. KiSS-1 suppresses MMP-9 expression by activating p38 MAP kinase in human stomach cancer [J]. *Oncol Res*, 2009, 18(2–3): 107–16.
- [11] Pentheroudakis G, Kostadima L, Dova L, et al. A twisted kiss: *in vitro* and *in vivo* evidence of genetic variation and suppressed transcription of the metastasis-suppressor gene KISS1 in early breast cancer [J]. *Neoplasia*, 2010, 57(1): 47–54.
- [12] Ruppen I, Grau L, Orenes-Pinero E, et al. Differential protein expression profiling by iTRAQ-two-dimensional LC-MS/MS of human bladder cancer EJ138 cells transfected with the metastasis suppressor KiSS-1 gene [J]. *Mol Cell Proteomics* 2010, 9(10): 2276–91.
- [13] McNally L R, Welch D R, Beck B H, et al. KISS1 over-expression suppresses metastasis of pancreatic adenocarcinoma in a xenograft mouse model [J]. *Clin Exp Metastasis* 2010, 27(8): 591–600.
- [14] Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor [J]. *Nature* 2001, 411(6837): 613–7.
- [15] Navenot J M, Fujii N, Peiper S C. KiSS1 metastasis suppressor gene product induces suppression of tyrosine kinase receptor signaling to Akt, tumor necrosis factor family ligand expression, and apoptosis [J]. *Mol Pharmacol* 2009, 75(5): 1074–83.

## The effect of overexpression of Kiss-1 on proliferation and migration of SW480 colon cancer cell

Zhong Hua Liu, Diqun Wu, Xueyan

(Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001)

**Abstract Objective** To investigate the relationship between overexpression of Kiss-1 gene and the proliferation and migration of colon cancer cells. **Methods** The pEGFP-N1-Kiss-1 recombinant plasmid transfected into SW480 cells were desired to be experimental group, the pEGFP-N1 transfected into SW480 cells were negative control group, and normal SW480 cells were control group. Western blot was used to detect the expression of Kiss-1 in every group; CCK-8 test was used to test effect of Kiss-1 on proliferation of SW480 cells; migration was measured by wound healing assay. **Results** The recombinant plasmid pEGFP-N1-Kiss-1 was transfected into SW480 cells, and the expression of Kiss-1 in experimental group was significantly higher than the control group. The proliferation rate of cells in the experimental group ( $P < 0.05$ ) was lower than the other two groups, and the experimental group cell scratch wound healing rate dropped significantly. **Conclusion** Kiss-1 can inhibit the proliferation of colon cancer cells and reduce the cell migration velocity.

**Key words** colon cancer; Kiss-1; proliferation; migration