

## NIS 基因转染对肝细胞癌 NIS 蛋白表达及摄碘功能的影响

范义湘<sup>1</sup>, 易紫薇<sup>1</sup>, 胡煜麟<sup>1</sup>, 张宏嘉<sup>1</sup>, 林美珍<sup>1</sup>, 陈洁芳<sup>1</sup>, 肖汉<sup>2</sup>

1. 南方医科大学第五附属医院核医学科, 广东 广州 510900; 2. 广东省第二人民医院核医学科, 广东 广州 510317

**【摘要】目的:**探讨肝细胞癌细胞核素靶向治疗方法。**方法:**提取 NIS 基因片段并构建重组质粒 pcDNA3/NIS, 将重组质粒导入肝细胞癌 HepG2 细胞。转染后 24 h 利用 Western-Blot 法检测 HepG2 细胞 NIS 蛋白表达, 采用 <sup>125</sup>I 结合试验评估转染后细胞的摄碘率, 采用 DAPI 染色法评估 HepG2 细胞摄 <sup>125</sup>I 后的凋亡情况。实验组与对照组之间 NIS 蛋白表达、摄碘率以及细胞凋亡率比较采用 *t* 检验。**结果:**蛋白电泳表明经 NIS 基因转染后, 实验组 HepG2 细胞已表达 NIS 蛋白, 表达强度显著高于对照组 ( $t=2.693, P<0.05$ )。实验组 HepG2 细胞摄碘率 B/T% 平均为  $(18.4\pm5.8)\%$ , 显著高于对照组 ( $t=36.842, P<0.05$ )。结合 <sup>125</sup>I 后 24 h, 实验组凋亡细胞数多于对照组, 平均凋亡率为  $(19.2\pm5.3)\%$ , 显著高于对照组 ( $t=3.086, P<0.05$ )。**结论:**转染外源性 NIS 基因可上调肝细胞癌 HepG2 细胞 NIS 蛋白表达, 使其具备摄碘功能, 加快细胞凋亡, 为放射性碘靶向治疗提供实验依据。

**【关键词】**肝细胞癌; 钠碘转运体; 放射性碘治疗; NIS 基因; 摄碘功能; 细胞凋亡

**【中图分类号】**R34; R817.1

**【文献标志码】**A

**【文章编号】**1005-202X(2021)10-1219-04

## Effects of NIS gene transfection on NIS protein expression and iodine uptake in hepatocellular carcinoma

FAN Yixiang<sup>1</sup>, YI Ziwei<sup>1</sup>, HU Yulin<sup>1</sup>, ZHANG Hongjia<sup>1</sup>, LIN Meizhen<sup>1</sup>, CHEN Jiefang<sup>1</sup>, XIAO Han<sup>2</sup>

1. Department of Nuclear Medicine, the Fifth Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510900, China; 2. Department of Nuclear Medicine, Guangdong Second Provincial General Hospital, Guangzhou 510317, China

**Abstract: Objective** To explore the method of targeted radionuclide therapy for hepatocellular carcinoma. **Methods** The NIS gene fragment was extracted, and the recombinant plasmid pcDNA3/NIS was constructed. The recombinant plasmid was introduced into hepatocellular carcinoma HepG2 cells. The NIS protein expression in HepG2 cells at 24 h after transfection was detected by Western-Blot assay; and the iodine uptake rate of the transfected cells was evaluated by <sup>125</sup>I binding assay; and the apoptosis of HepG2 cells after <sup>125</sup>I uptake was evaluated by DAPI staining. NIS protein expression, iodine uptake rate and apoptosis rate were compared between experimental group and control group using *t* test. **Results** Protein electrophoresis showed that after NIS gene transfection, NIS protein was expressed in HepG2 cells in experimental group, and the expression intensity was significantly higher than that in control group ( $t=2.693, P<0.05$ ). The iodine uptake rate (B/T%) of HepG2 cells in experimental group was  $(18.4\pm5.8)\%$ , significantly higher than that of control group ( $t=36.842, P<0.05$ ). At 24 h after <sup>125</sup>I uptake, the number of apoptotic cells in experimental group was larger than that in control group, and the average apoptosis rate in experimental group was  $(19.2\pm5.3)\%$ , significantly higher than that in control group ( $t=3.086, P<0.05$ ). **Conclusion** The transfection of exogenous NIS gene can up-regulate NIS protein expression in hepatocellular carcinoma HepG2 cells, enable the cells to have the function of iodine uptake, and accelerate cell apoptosis. The study provide an experimental basis for targeted radionuclide therapy.

**Keywords:** hepatocellular carcinoma; sodium/iodine symporter; radioactive iodine therapy; NIS gene; iodine uptake; apoptosis

### 前言

肝细胞癌(HCC)是我国高发肿瘤, 目前根治性切除、肝动脉栓塞化疗等可以取得较好的近期疗效, 但复发率高、远期疗效不理想, 尤其对于肝癌转移瘤的治疗更为困难<sup>[1]</sup>。钠碘转运体(Sodium/Iodine

**【收稿日期】**2021-05-18

**【作者简介】**范义湘, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 甲状腺癌的核医学诊断与治疗, E-mail: 13802990971@163.com

Symporter, NIS)是甲状腺滤泡细胞调节碘摄入的膜蛋白通道,既往报道采用转基因技术,使低分化或未分化甲状腺癌等肿瘤具备摄碘功能,为肿瘤的核素靶向治疗提供新思路<sup>[2]</sup>。本研究采用转染外源性NIS基因,上调HCC细胞NIS蛋白表达,使HCC细胞具备摄碘功能,为HCC提供新的治疗方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂与仪器

总RNA提取试剂Trizol reagent和脂质体lipofectamine 2000、DMEM培养基、胎牛血清均购自Invitrogen公司。RT-PCR试剂盒、限制性内切酶EcoRI等购自Takara公司。质粒提取试剂盒、DNA凝胶纯化试剂盒等购自Omega公司。Triton X-100购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。Na<sup>125</sup>I为成都中核高通同位素公司生产,放射化学纯度99.7%,无载体,pH 8.0。NIS扩增片段上游引物序列为:5'-CTCCCTGCTAAACGACTCCAG-3',下游引物序列为:5'-AACAGACGATCCCTCATTGGTG-3',购自Invitrogen公司。人肝癌细胞株HepG2购自武汉益普生物科技股份有限公司。核酸蛋白分析仪为美国Beckman公司DU-530型,基因扩增仪为美国Perkin Elmer公司PE-460型,放射性 $\gamma$ 计数器为上海核福光电有限公司SN-682型,流式细胞仪为美国BD FACSCanto II型,荧光倒置显微镜为德国Leica DMi8型。

### 1.2 人肝癌细胞株HepG2培养

参照文献[3],选择人肝癌细胞株HepG2作为研究对象。以DMEM为培养液,培养液均含质量分数10%的胎牛血清及100 U/mL青霉素、100  $\mu$ g/mL链霉素,置37℃、体积分数5% CO<sub>2</sub>孵箱培养。倒置显微镜观察细胞生长情况,细胞为贴壁生长。定期采用含0.25%胰酶EDTA溶液消化传代。待细胞生长至对数生长期进行实验。

### 1.3 PCR扩增人NIS(hNIS)基因片段测序克隆

参照既往研究方法<sup>[4]</sup>,采用Trizol法提取人8505C细胞总的RNA,并设计NIS基因的1对引物。以逆转录合成的DNA为模板进行PCR扩增。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后,回收目的片段并用T<sub>4</sub>DNA连接酶将其直接与克隆载体pUCmT连接,连接产物转化感受态大肠杆菌XL Blue。将含有正确hNIS序列的重组质粒pUCmThNIS及真核载体pcDNA3经HindIII和XbaI双酶切、连接、转化,得到重组质粒pcDNA3/hNIS。

### 1.4 体外NIS转染

在6孔培养板中接种处于对数生长期的肝癌细

胞HepG2,每孔细胞数约为 $5 \times 10^5$ 。以上述相同方法培养并观察细胞生长情况,待生长密度达到90%以上时,采用电转染法进行转染。转染后继续培养24 h。对照组细胞不转染NIS基因。

### 1.5 Western-Blot法测定NIS基因表达

实验组和对照组细胞,去培养上清液,用PBS液洗涤细胞2次,加入预冷的细胞裂解液150  $\mu$ L,以细胞刮将细胞刮取,收集到细胞离心管,冰浴20 min后于4℃、12 000 g离心15 min,收集上清液。琼脂糖凝胶电泳分离,EB染色后照相。Kodak Digital Science ID软件系统扫描分析,测定光密度值并计算NIS/GAPDH光密度比值<sup>[5]</sup>。其结果为3次重复实验结果。

### 1.6 细胞摄碘率测定

按以往研究方法<sup>[6]</sup>,于转染后24 h,将实验组和对照组细胞接种于24孔细胞培养板,每孔约 $1 \times 10^5$ ,37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱培养24 h,培养至细胞约80%融合时吸掉培养液,Hanks平衡盐溶液(HBBS)洗涤1次,以微量加样器(0~50  $\mu$ L)加入含Na<sup>125</sup>I 13.7 kBq(0.37  $\mu$ Ci)的培养液,37℃温育摇床振荡24 h。收集细胞置入测量管,用放射性 $\gamma$ 计数器测量每分钟放射性计数(T),之后离心去上清液,细胞沉淀用HBBS洗涤2次,离心去上清液,测定结合于细胞的每分钟放射性计数(B)。对照组和NIS转染组细胞摄碘率以B/T%表示,每组细胞设置3个重复样品。

### 1.7 DAPI染色检测HepG2细胞凋亡

取上述培养后消化的HepG2细胞,制成细胞悬液,接种于24孔细胞培养板,每孔约 $1 \times 10^5$ ,加入含Na<sup>125</sup>I 13.7 kBq(0.37  $\mu$ Ci)的培养液,37℃温育摇床振荡24 h。收集细胞置入测量管,置于6孔培养板,每孔约 $1 \times 10^6$ ,培养72 h后以PBS液洗涤细胞2次,以4%多聚甲醛在4℃固定细胞30 min,固定过的细胞再以PBS洗涤2次,然后以含0.1% Triton X-100的0.1%柠檬酸钠溶液于4℃孵育细胞5 min,加入DAPI于4℃暗箱孵育10 min,360 nm紫外线激活,荧光显微镜观察细胞染色。计数每个高倍镜( $\times 400$ )下荧光染色细胞数及细胞总数,以前者除以后者为凋亡率。

### 1.8 统计学分析

采用SPSS13.0统计软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,采用 $t$ 检验比较实验组与对照组之间的差异性,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 转染后HepG2细胞NIS表达测定

实验组NIS蛋白电泳条带粗浓、宽厚,对照组条带细小、稀疏(图1),NIS/GAPDH光密度比值在实验

组平均值为  $0.49 \pm 0.12$ , 对照组为  $0.18 \pm 0.11$ 。经比较, 实验组 HepG2 细胞 NIS 表达强度显著高于对照组 ( $t=2.693$ ,  $P<0.05$ ), 说明经 NIS 基因转染后实验组 HepG2 细胞已表达 NIS 蛋白。

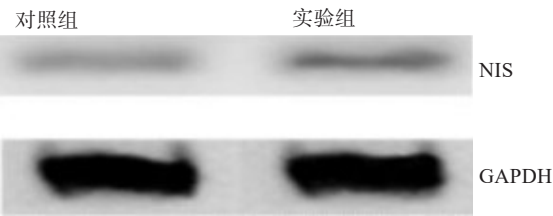


图1 HepG2 细胞 NIS 蛋白表达的 Western-Blot 检测结果  
Fig.1 NIS protein expression in HepG2 cells was detected by Western-Blot assay

2.2 HepG2 细胞摄碘率比较

培养板每孔细胞加入的  $\text{Na}^{125}\text{I}$  经  $\gamma$  计数器测量, 其放射性总计数 T (Total, T) 为 89 720 CPM (counts/min)。实验组 HepG2 细胞所摄取的  $\text{Na}^{125}\text{I}$  放射性计数 B (Binding, B) 平均为  $(16\,528 \pm 5\,200)$  CMP, 经计算其摄碘率  $B/T\%$  平均为  $(18.4 \pm 5.8)\%$ 。对照组 HepG2 细胞所摄取的  $\text{Na}^{125}\text{I}$  放射性计数 B 平均为  $(1\,820 \pm 1\,610)$  CPM, 经计算摄碘率  $B/T\%$  为  $(1.9 \pm 1.8)\%$ 。两者比较具有显著性差异 ( $t=36.842$ ,  $P<0.05$ ), 即经 NIS 基因转染后, 实验组 HepG2 细胞摄碘率显著提高。

2.3 细胞凋亡测定

HepG2 细胞经 DAPI 染色后镜下呈蓝白色荧光。凋亡细胞呈核浓缩, 染色加深, 或者核染色质呈新月形聚集于核膜一侧。有些细胞表现为核碎裂呈大小不等的圆形小体, 被细胞膜包绕, 形成凋亡小体。实验组具有凋亡特征的染色细胞数多于对照组 (图 2)。细胞经稀释并调整细胞浓度后, 显微镜下每个高倍视野内 ( $\times 400$ ) 细胞数约 70 个, 实验组含有核凋亡特征的细胞数为 10~14 个, 实验组凋亡率平均为  $(19.2 \pm 5.3)\%$ , 对照组高倍视野下凋亡细胞数为 2~5 个, 凋亡率为  $(5.8 \pm 3.1)\%$ , 显著低于实验组 ( $t=3.086$ ,  $P<0.05$ )。

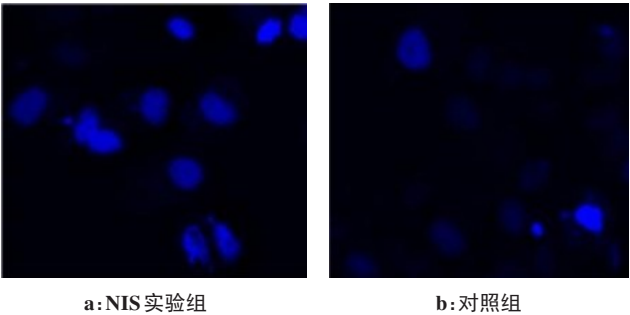


图2 NIS 表达对 HepG2 细胞摄碘-125 后细胞凋亡的影响 ( $\times 400$ )  
Fig.2 Effects of NIS protein expression on apoptosis of HepG2 cell after iodine-125 uptake ( $\times 400$ )

3 讨论

HCC 是世界 5 大最常见肿瘤之一, 占中国癌症发病率第 2 位和病死率的第 1 位, 在亚洲的一些地区, HCC 是癌症死亡最常见的原因<sup>[1,7]</sup>。

NIS 是一种介导碘转运的糖化膜蛋白, 即所谓的“碘泵”, 主要位于甲状腺细胞基底膜, 其功能主要是借助钠/钾交换产生的钠离子浓度梯度, 逆浓度转运血液内活性碘进入细胞, 从而可使细胞内碘含量为血浆的 20~200 倍<sup>[8]</sup>。它实现了甲状腺组织摄取碘并进行甲状腺激素的生物合成, 实现了甲状腺功能亢进和分化型甲状腺癌的显像诊断和放射性碘治疗。因此, NIS 是细胞浓聚碘并进行放射性碘治疗的基础<sup>[9]</sup>。1996 年有学者首先从 FRTL-5 细胞的 cDNA 文库克隆出鼠 NIS 基因<sup>[10]</sup>, 随后另有学者采用针对鼠 NIS cDNA 序列的引物, 经逆转录-聚合酶链反应法扩增出 hNIS 的细胞 cNDA 片段, 并从人甲状腺细胞 cNDA 文库中克隆出 hNIS。hNIS 基因位于 19 号染色体, 整个编码区由 15 个外显子和 14 个内含子构成, 其开放阅读框架为 1 929 个核苷酸, 编码 643 个氨基酸残基<sup>[10-11]</sup>。随着 NIS 结果和功能的阐明, 采用提取 hNIS mRNA, 以此为起始原料经逆转录产生 cDNA, 再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 将得到的 NIS 基因克隆到含有巨细胞病毒启动子, 再将扩增的质粒 DNA 转染肿瘤细胞, 诱导细胞 NIS 基因表达, 这对于不表达 NIS 的 HCC 等恶性肿瘤, 为实施放射性治疗提供了实验基础和新思路<sup>[12]</sup>。随着基因转染方法的应用, 使不表达 NIS 的肿瘤具备摄碘功能, 如未分化甲状腺癌、未分化甲状腺癌、乳腺癌、胶质瘤、肺癌等, 具备摄碘功能而实施放射性内照射治疗<sup>[12-15]</sup>。有研究发现用 hNIS 基因转染无摄碘功能的鼠甲状腺癌细胞, 其摄碘能力提高了 60 倍, 从而为难治性肿瘤的放射性碘治疗开辟了新思路<sup>[16]</sup>。本研究将 NIS 基因稳定转染至原发性肝癌细胞 HepG2 细胞, 经 Western-Blot 方法检测出转染的细胞具备 NIS 蛋白表达, 而未转染细胞内没有 NIS 表达。因为转染后细胞具备了 NIS 蛋白通道, 从而具有摄碘功能, 其平均摄碘能力达 18.4%, 为未转染组的 9.6 倍, 与目前类似研究结果接近<sup>[15]</sup>。因此, 我们认为 HCC 细胞表达 NIS 基因和蛋白, 并具备摄碘能力, 是基因转染的结果。放射线可引起肿瘤细胞凋亡<sup>[3,16]</sup>。本研究转染组细胞因为摄取  $^{125}\text{I}$  引起细胞改变, 靶向为细胞呈核浓缩, 染色加深, 或者核染色质呈新月形聚集于核膜一侧, 有些细胞甚至出现核碎裂, 形成凋亡小体<sup>[17-18]</sup>。而未转染 NIS 的对照组具有凋亡特征的染色细胞数较少。

综上所述, 本研究通过转染 NIS 基因, 使 HCC 细胞具备摄碘功能, 放射性碘引起细胞凋亡, 抑制肿瘤细胞增殖, 为下一步体内实验奠定了理论基础。



## 【参考文献】

- [1] 吴建国, 吴博. 原发性肝癌的治疗进展[J]. 医药前沿, 2019, 9(15): 11-12.  
WU J G, WU B. The research progress of primary hepatic carcinoma treatment[J]. Journal of Frontiers of Medicine, 2019, 9(15): 11-12.
- [2] LUBITZ C C, FAHEY T J. The differentiation of benign and malignant thyroid nodules[J]. Adv Surg, 2005, 39: 355-377.
- [3] GINORI A, SCARANUZZINO F, MARSILI S, et al. Late hepatic metastasis from a duodenal gastrointestinal stromal tumors (29 years after surgery): report of case and review of the literature[J]. Int J Surg Pathol, 2015, 23(4): 317-321.
- [4] FAN Y X, LIANG Z X, XIAO H, et al. Cell penetrating peptide of sodium-iodide symporter (NIS) affect on the I-131 radiotherapy on thyroid cancer[J]. Exp Ther Med, 2017, 13(3): 989-994.
- [5] 范义湘, 石卫民, 罗荣城, 等.  $^{131}\text{I}$ -Herceptin 在荷人乳腺癌裸鼠模型中的生物分布及抗肿瘤活性研究[J]. 中华核医学杂志, 2009, 29(5): 311-315.  
FAN Y X, SHI W M, LUO R C, et al. Experimental study on biodistribution and anticancer activity of  $^{131}\text{I}$ -Herceptin in breast cancer xenograft[J]. Chinese Journal of Nuclear Medicine, 2009, 29(5): 311-315.
- [6] 范义湘, 石卫民, 黄凯龄, 等. 干扰素- $\gamma$ 上调结肠癌细胞系 CEA 表达的实验研究[J]. 现代消化及介入诊疗, 2010, 15(2): 78-81.  
FAN Y X, SHI W M, HUANG K L, et al. Effect of different concentration of interferon- $\gamma$  on CEA expression of colorectal cancer cells[J]. Modern Digestion & Intervention, 2010, 15(2): 78-81.
- [7] 文晓涛, 林丽珍, 颜丽巧, 等. 原发性肝癌的治疗进展[J]. 大众科技, 2018, 20(7): 89-91.  
WEN X T, LIN L Z, YAN L Q, et al. Progress in the treatment of primary hepatic carcinoma[J]. Popular Science & Technology, 2018, 20(7): 89-91.
- [8] FENTON M S, MARION K M, HERSHMAN J M. Identification of cyclic adenosine 3,5-monophosphate response element modulator as an activator of the human sodium/iodide symporter upstream enhancer[J]. Endocrinology, 2008, 149(5): 2592-2606.
- [9] VADYSIRISACK D D, VENKATESWARAN A, ZHANG Z, et al. MEK signaling modulates sodium iodide symporter at multiple levels and in a paradoxical manner[J]. Endocr Relat Cancer, 2007, 14(2): 421-432.
- [10] PATEL A, JHIANG S, DOGRA S, et al. Differentiated thyroid carcinoma that express sodium-iodide symporter have a lower risk of recurrence for children and adolescents[J]. Pediatr Res, 2002, 52(5): 737-744.
- [11] SCHMITZ G, FUZESIL L, STRUCK J, et al. Expression of the sodium iodide symporter in differentiated thyroid cancer: clinical evidence[J]. Nuklearmedizin, 2005, 44(3): 86-93.
- [12] BRUNO R, GIANNASIO P, RONGA G, et al. Sodium iodide symporter expression and radioiodine distribution in extrathyroidal tissues[J]. J Endocrinol Invest, 2004, 27(11): 1010-1014.
- [13] KIM Y H, LEE D S, KANG J H, et al. Reversing the silencing of reporter sodium/iodide symporter transgene for stem cell tracking[J]. J Nucl Med, 2005, 46(2): 305-311.
- [14] SMIT J W, SCHRODER V, ELST J P, et al. Expression of the human sodium/iodide symporter (hNIS) in xenotransplanted human thyroid carcinoma[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2001, 109(1): 52-55.
- [15] 钟兴, 弓健, 曾祥凤, 等. hNIS 转基因介导  $^{131}\text{I}$  对鼻咽癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2010, 31(4): 387-392.  
ZHONG X, GONG J, ZENG X F, et al. Effect of  $^{131}\text{I}$  on proliferation and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cell transferred human sodium/iodide symporter gene[J]. Journal of Jinan University (Natural Science & Medicine Edition), 2010, 31(4): 387-392.
- [16] JEONG J H, KONG F J, JEONG S Y, et al. Clinical outcomes of low-dose and high-dose postoperative radioiodine therapy in patients with intermediate-risk differentiated thyroid cancer [J]. Nucl Med Commun, 2017, 38(3): 228-233.
- [17] KITAZONO M, ROBERY R, ZHAN Z, et al. Low concentrations of the histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228), increase expression of the Na(+)/I(-) symporter and iodide accumulation in poorly differentiated thyroid carcinoma cells[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(7): 3430-3435.
- [18] SMITH J A, FAN C Y, ZOU C, et al. Methylation status of genes in papillary thyroid carcinoma[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2007, 133(10): 1006-1010.
- [19] TUTTLE R M. Controversial issues in thyroid cancer management[J]. J Nucl Med, 2018, 59(8): 1187-1194.
- [20] EROL V, MAKAY O, ICOZ G, et al. Prognostic factors of survival and recurrence pattern in differentiated thyroid cancer: a retrospective study from Western Turkey[J]. Endocr Regul, 2014, 48(4): 173-181.

(编辑:黄开颜)