

GASP-4 基因干扰对非小细胞肺癌细胞恶性侵袭和上皮间质转化以及微管形成的影响

韩贵良 石岩 焦婷 贾友超 任冠颖

摘要 目的 研究 G 蛋白偶联受体相关分选蛋白 1 (GASP-1) 基因干扰对非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞恶性侵袭和上皮间质转化 (EMT) 及微管形成的影响。方法 以肺癌 A549 细胞为模型进行研究。将前期试验筛选出的 shRNA1 用 Lipofectamine 2000 转染到肺癌 A549 细胞。分组: 对照组、shRNA 组和 GASP-4-shRNA1 组。采用 Transwell 实验检测细胞侵袭能力, 划痕实验检测细胞迁移能力; 显微观察上皮间质的形态转化; 微管形成实验检测微管的结节数; Western blot 检测 EMT 标志物 E-cadherin、N-cadherin、Fibronectin 和 VEGF 蛋白的表达量。结果 与对照组相比, GASP-4-shRNA1 组中每个视野的细胞侵袭数目减少, 划痕愈合率降低, 表明干扰 GASP-4 基因可抑制 A549 细胞侵袭和迁移。与对照组相比, GASP-4-shRNA1 组细胞 EMT 现象被抑制。微管形成实验中, 与对照组相比, GASP-4-shRNA1 组细胞微管结节数减少, 血管内皮生长因子 (VEGF) 蛋白表达水平降低。结论 GASP-4 基因干扰可抑制 NSCLC 细胞的恶性侵袭、EMT 和微管形成。

关键词 GASP-4; 基因干扰; 非小细胞肺癌; 上皮间质转化标志物; VEGF 蛋白

中图分类号 R-332

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)03-0396-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.03.012

肺癌是当前世界上造成癌症相关死亡的重要原因, 非小细胞肺癌 (non-small cell lung carcinoma, NSCLC) 为肺癌中的一大类^[1-2]。NSCLC 是一种异质性肿瘤, 约占全世界所有肺癌病例的 85%^[3]。当前, 手术切除仍是治愈的最有效的选择。尽管如此, 在诊断时仍有近 70% 的患者发展为局部晚期或转

移性疾病^[4]。因此, 有必要寻找新的治疗策略和药物。G 蛋白偶联受体相关分选蛋白 1 (G-protein coupled receptor-associated sorting protein 1, GASP-1) 主要在肿瘤上皮和脑肿瘤转化的胶质细胞中表达。研究^[5]发现脑癌、肝癌、乳腺癌和肺癌患者血清中 GASP-1 的表达比正常健康人的多 4~7 倍。类似研究将 GASP-1 鉴定为潜在的几种癌症血清和肿瘤生物标志物, 并推测 GASP-1 可能是癌症治疗药物开发的新靶标^[5-6]。但是 GASP-1 在肺癌中的研究鲜有报道。该文研究了 GASP-1 基因干扰对 NSCLC 细胞侵袭和上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 以及微管形成的影响, 希望能为 NSCLC 的治疗提供新策略。

1 材料与方法

1.1 材料 肺癌 A549 细胞购自中国科学院的细胞库, 并用含 10% 胎牛血清的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) 于 37℃ 进行培养生长。将 sh-RNA 及其相应的阴性对照克隆到 pGPU6 / Neo 质粒 (上海 GenePharma 公司) 中以靶向 GASP-4。将前期筛选的 GASP-4-shRNA1 用于后续试验。GASP-4 抗体购自美国 Abcam 公司; TRIzol、RT-PCR 试剂盒及 SYBR-Green RT-PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; RPMI-1640 培养基购自美国 Hyclone 公司; 胎牛血清购自美国 Gibco 公司; E-cadherin、N-cadherin、vimentin 和 GAPDH 抗体及二抗来自美国 CST 公司。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒感染 肺癌细胞以 5×10^4 个/孔接种 6 孔板, 置培养箱内培养至融合度为 40% 时, 以 MOI = 20 分别添加慢病毒, 再加入适量的 polybrene (终浓度为 5 mg/L); 12 h 后添加新鲜培养液; 培养 72 h 后荧光显微镜下观察荧光表达情况, 以 1 mg/L 的嘌呤霉素筛选稳定转染的细胞系。细胞分组: 对照组不感染慢病毒的细胞; shRNA 组感染阴性对照慢病毒; GASP-4-shRNA1 组感染重组慢病毒的细胞。

2020-09-17 接收

基金项目: 2019 年保定市科技计划自筹经费项目 (编号: 1941ZF084); 2016 年政府资助省级临床医学优秀人才项目 (编号: 361007)

作者单位: 河北大学附属医院肿瘤内科 (河北省放化疗机制与规程研究重点实验室) 保定 071000

作者简介: 韩贵良 男 硕士 主治医师;

任冠颖 女 硕士 主治医师 责任作者 邮箱: renguanying1982@126.com

1.2.2 Western blot 实验 3 组待测细胞分别用 PBS 洗涤 2 次, 再加入含有 PMSF 的 RIPA 裂解溶液, 于冰上孵育 30 min。以 BCA 法测定蛋白样品浓度, 每孔 30 μg 蛋白样品, 设置 120 V 的电压电泳 2 h 后从玻璃板中间取出凝胶。将 PVDF 膜置于新配置的含体积分数 0.05 牛血清蛋白溶液中, 在室温结合 2 h。把 E-cadherin、N-cadherin、Fibronectin 和 VEGF 一抗按 1:800 倍稀释, PVDF 膜置于一抗反应液中孵育过夜。再将二抗按 1:2 000 倍稀释后, 把 PVDF 膜置于二抗反应液内孵育 2 h。使用 ECL 发光。采用 Image J 分析内参 Actin 和目标条带的灰度值, 目标条带蛋白水平 = 目标条带的灰度值 / Actin 的灰度值。每组实验重复 3 次, 每次设 3 个复孔。

1.2.3 Transwell 检测细胞侵袭 3 组细胞以不含血清的培养液悬浮, 细胞密度调整为 $7 \times 10^7/\text{ml}$, 分别添加到 Transwell 小室的上室内进行侵袭实验。每组添加 200 μl 细胞悬浮液, 下室内添加 500 μl 的含血清培养液。24 h 后, 将小室取出, 把没有穿膜的细胞擦掉并以 PBS 洗涤后, 分别添加多聚甲醛溶液固定 30 min, 添加 0.1% 结晶紫染色后, 在光镜下选取 5 个视野, 计数细胞侵袭数目。每组实验重复 3 次, 每次设 3 个复孔。

1.2.4 GASP-1 诱导细胞上皮间质化 3 组细胞连续 48 h 在倒置显微镜下观察细胞形态的动态变化, 至发现细胞由原有上皮细胞的鹅卵石状变为梭形并继续变细长, 部分细胞可见轴突样结构, 完全演变为间质细胞形态, 提示细胞发生了上皮间质化。

1.2.5 细胞划痕实验 感染后各组 A549 细胞以 3×10^4 个/孔接种到 6 孔板中, 放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱继续培养, 待细胞生长汇合达 90% 以上时, 将培养液更换成低浓度 (0.5%) 胎牛血清的培养液, 使用划

痕仪对细胞进行划痕, 以 PBS 洗涤划掉的细胞, 加入 0.5% 胎牛血清的培养液, 放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱继续培养 24 h, 分别在划痕 0、24 h 观察细胞划痕宽度, 计算细胞迁移率 = (0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度 $\times 100\%$ 。实验重复 3 次, 取均值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件分析实验数据, 计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组差异比较用单因素方差分析, 组间比较用 SNK- q 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GASP-1 基因沉默对 A549 细胞侵袭的影响

Transwell 实验结果显示, 与对照组相比, shRNA 组侵袭细胞数目无明显变化, GASP-1-shRNA1 组侵袭细胞数目减少 ($F = 13.13$, $P < 0.05$)。见图 1。

2.2 GASP-1 基因沉默对 A549 细胞迁移的影响

划痕实验结果如图 2 所示, 与对照组相比, shRNA 组细胞迁移率无明显变化, GASP-1-shRNA1 组细胞迁移率降低 ($F = 54.17$, $P < 0.05$)。

2.3 GASP-1 基因沉默对 A549 细胞 EMT 的影响

EMT 情况如图 3A 所示, 与对照组相比, shRNA 组细胞无明显变化, GASP-1-shRNA1 组细胞 EMT 现象被抑制。Western blot 检测了 EMT 标志物 E-cadherin、N-cadherin 和 Fibronectin 的蛋白表达。检测结果如图 3B、C 所示, 与对照组比较, shRNA 组细胞中 E-cadherin、N-cadherin 和 Fibronectin 的蛋白表达水平无明显变化, GASP-1-shRNA1 组细胞中 E-cadherin 蛋白表达水平上升, 而 N-cadherin 和 Fibronectin 的蛋白表达水平下降, 差异均有统计学意义 ($F_{\text{E-cadherin}} = 95.40$, $P < 0.05$; $F_{\text{N-cadherin}} = 24.82$, $P < 0.05$; $F_{\text{Fibronectin}} = 6.67$, $P < 0.05$)。

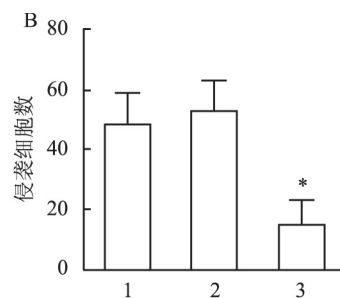
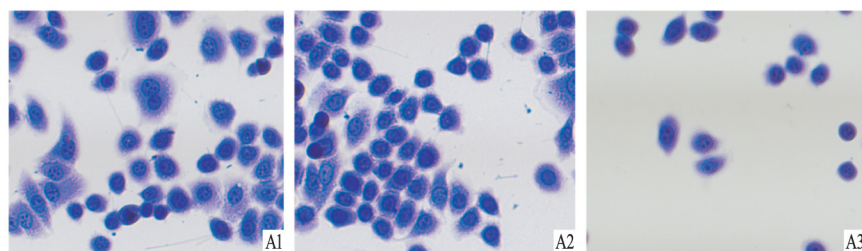


图1 不同处理组细胞侵袭实验结果

A: 细胞侵袭典型图像 $\times 400$; B: 每个视野中的侵袭细胞数目; 1: 对照组; 2: shRNA 组; 3: GASP-1-shRNA1 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

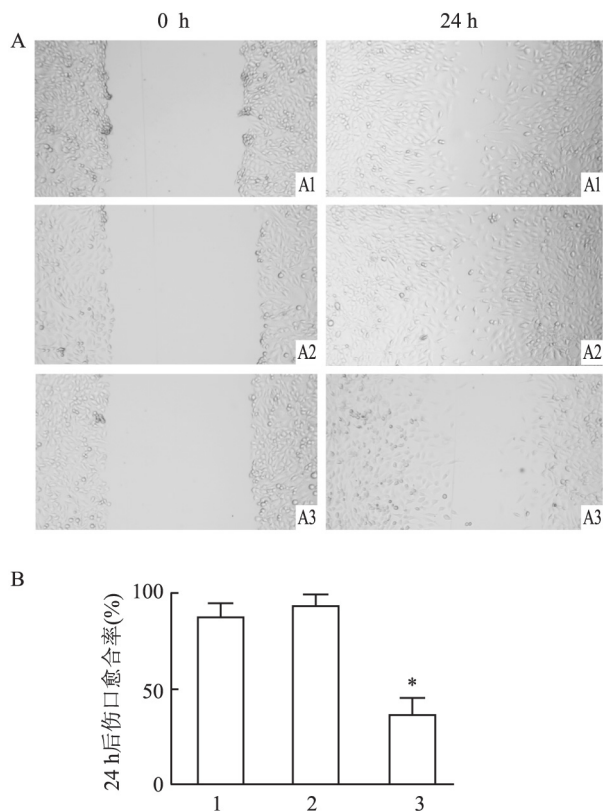


图2 不同处理组细胞迁移实验结果

A: 划痕实验典型图像 $\times 400$; B: 24 h 后划痕闭合率; 1: 对照组; 2: shRNA 组; 3: GASP-1-shRNA1 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

2.4 GASP-1 基因沉默对 A549 细胞微管形成的影响

微管形成实验结果如图 4A、B 所示,与对照组相比,shRNA 组细胞中微管结节数目变化不明显,

GASP-1-shRNA1 组细胞中微管结节数目减少,差异有统计学意义 ($F = 16.33, P < 0.05$)。Western blot 检测结果显示(如图 4C、D),与对照组相比,shRNA 组细胞中 VEGF 蛋白表达水平无变化,GASP-1-shRNA1 组细胞中 VEGF 蛋白表达水平降低,差异有统计学意义 ($F = 32.43, P < 0.05$)。

3 讨论

随着工业化发展和城市现代化的进程加快,环境污染和空气污染影响日益显著,肺癌已经成为严重威胁人类生命健康的常见恶性肿瘤。当前常用的治疗手段以切除、放射和化疗为主,但由于这些手段的局限性,生物疗法成为医学工作者研究的热点^[7]。研究^[8]发现 miR-30a-5p 与 miR-210-3p 结合可区分癌组织与非癌组织,因而成为 NSCLC 潜在的诊断性生物标志物。程宇等^[9]发现 PEDF 可抑制肺癌细胞增殖和转移,因此 PEDF 可成为治疗肺癌的新途径。GASP-1 存在于人体的许多组织中^[10],并且在多种癌症组织(乳腺癌、胰腺癌)中的含量比正常组织增加了约 10 倍,而在乳腺癌和肺癌患者的血清中的含量高于正常人约 4~7 倍,被作为癌症诊断生物标志物^[5]。本文前期研究显示 GASP-1 基因的下调能抑制肺癌细胞增殖并促进细胞凋亡,抑制肿瘤形成。为进一步研究 GASP-1 基因干扰在肺癌治疗中的潜在可能,本文研究了 GASP-1 基因干扰对 NSCLC 细胞恶性侵袭、EMT 及微管形成的影响。

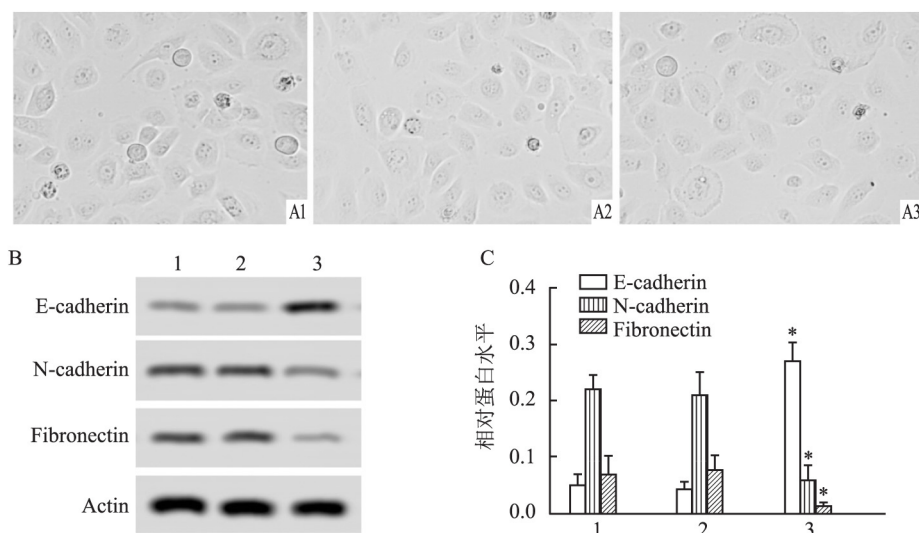


图3 不同处理组细胞 EMT 情况

A: EMT 典型图像 $\times 400$; B: Western blot 典型图像; C: EMT 相关蛋白含量; 1: 对照组; 2: shRNA 组; 3: GASP-1-shRNA1 组; 与对照组比较:

* $P < 0.05$

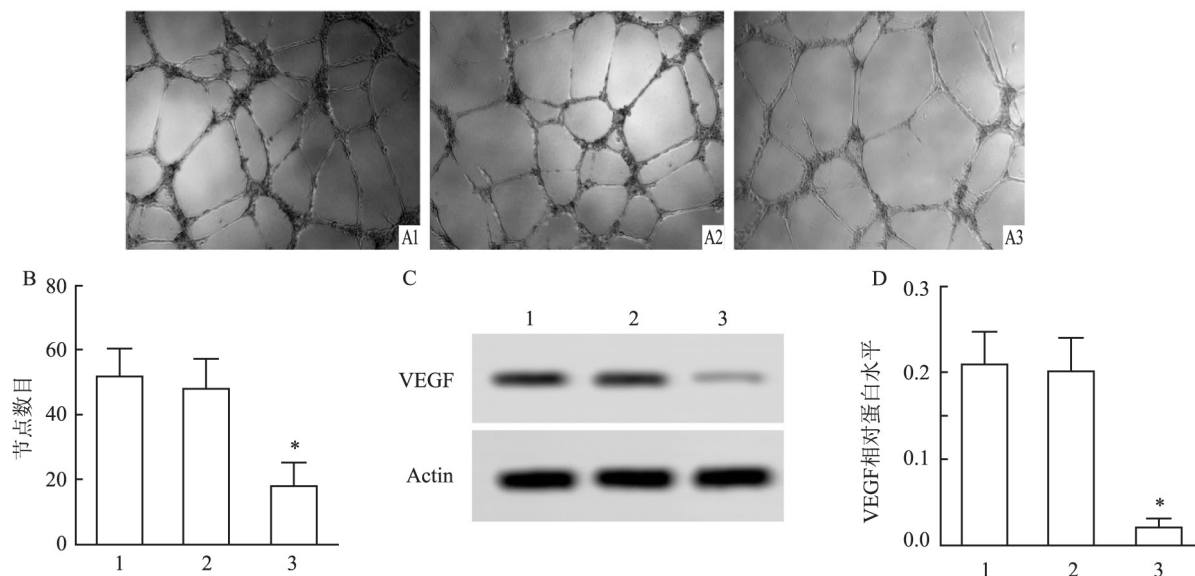


图4 不同处理组细胞微管形成情况

A: 微管形成典型图像 $\times 400$; B: 微管结节数; C: Western blot 典型图像; D: VEGF 相对蛋白水平; 1: 对照组; 2: shRNA 组; 3: GASP-4-shRNA1 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

本研究显示, G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs) 参与多种生理过程, 其下游信号靶点在癌症的生长和发展中起着重要的作用。GASP-4 是常见的与 GPCRs 相互作用的蛋白。Tuszynski et al^[6] 发现乳腺癌患者血清中存在 GASP-4, 而正常人群血清中则没有, 并且 GASP-4 可调节神经细胞中各种 GPCRs 的溶酶体分选和功能。将 GASP-4 鉴定为潜在的乳腺癌新血清和肿瘤生物标志物, 并表明 GASP-4 可能是乳腺癌治疗药物开发的新靶标。

研究发现下调肿瘤标志物是癌症预防和治疗的一条有力途径。Zhou et al^[11] 研究表明肺癌患者血清 miR-520f 表达下调, 并且 miR-520f 与肺癌 TNM stage 和肺癌转移有显著相关性, 被作为肺癌早期诊断生物标志物。在本研究中, Transwell 实验结果显示, GASP-4-shRNA1 组中侵袭细胞数目显著减少, 细胞伤口愈合率显著下降。表明沉默 GASP-4 基因可显著抑制 A549 细胞侵袭和迁移。

EMT 被认为是肿瘤细胞侵袭和转移的关键和初始环节之一^[12], 是肿瘤恶化过程中的重要组成部分^[13]。在 EMT 进展过程中, 细胞会失去上皮特性, 包括细胞黏附和极性, 并获得间质形态和迁移能力。从生化角度看, 细胞会关闭上皮标志物 (如黏附连接蛋白 E-cadherin) 的表达, 并打开包括波形蛋白和纤连蛋白的间质标志物^[14]。本研究表明, GASP-4-shRNA1 组中细胞 EMT 现象较对照组有所好转。

Western blot 检测结果显示 GASP-4 基因干扰可显著提升细胞中 E-cadherin 蛋白表达水平并降低 N-cadherin 和 Fibronectin 的蛋白表达水平。表明沉默 GASP-4 基因可显著抑制 A549 细胞 EMT。

血管生成对于癌症的发展和生长至关重要: 在肿瘤长到 1~2 mm 之前, 它需要血管来吸收营养和氧气。肿瘤产生的 VEGF 和其他生长因子导致“血管生成转换”在肿瘤内和周围形成新的脉管系统, 使其呈指数增长。VEGF 是高度特异性的促血管内皮生长因子, 是癌症中血管生成的关键介质^[15]。本研究检测了 GASP-4 基因干扰对 A549 细胞微管形成的影响, 结果显示, GASP-4 基因干扰可显著减少微管结节数目, 同时下调 VEGF 蛋白表达水平。这一结果提示沉默 GASP-4 基因可抑制 A549 细胞微管形成。

肺癌是全球公认的恶性肿瘤疾病, 因其病症出现晚、治疗难度大、预后结果差等原因成为医学难题。本研究证明 GASP-4 基因干扰对 NSCLC 细胞恶性侵袭、EMT 及微管形成都有显著的抑制作用, 有望为肺癌的治疗提供一定思路。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2007, 57(1): 43-66.
- [2] Inamura K, Ishikawa Y. Lung cancer progression and metastasis from the prognostic point of view [J]. Clin Exp Metastasis, 2010, 27(6): 389-97.

- [3] Gridelli C, Rossi A, Carbone D P, et al. Non-small-cell lung cancer [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2015, 1: 15009.
- [4] Molina J R, Yang P, Cassivi S D, et al. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship [J]. *Mayo Clin Proc*, 2008, 83(5): 584–94.
- [5] Zheng X Y, Chang F, Zhang X M, et al. G-protein coupled receptor-associated sorting protein 1 (Gasp-1), a ubiquitous tumor marker [J]. *Exp Mol Pathol*, 2012, 93(1): 111–5.
- [6] Tuszyński G P, Rothman V L, Zheng X M, et al. G-protein coupled receptor-associated sorting protein 1 (Gasp-1), a potential biomarker in breast cancer [J]. *Exp Mol Pathol*, 2011, 91(2): 608–13.
- [7] 袁飞, 王新乐, 张灿, 等. NSCLC 肿瘤及癌旁组织 CD4 ~ + 和 CD8 ~ + T 细胞 PD-1 的表达及意义 [J]. *安徽医科大学学报* 2019, 54(8): 1295–8.
- [8] Świtlik W, Karbownik M S, Suwalski M, et al. miR-30a-5p together with miR-210-3p as a promising biomarker for non-small cell lung cancer: A preliminary study [J]. *Cancer Biomark*, 2018, 21(2): 479–88.
- [9] 程宇, 束军, 徐胜, 等. PEDF 对肺腺癌 A549 细胞迁移、侵袭能力和转移相关蛋白表达水平的影响 [J]. *安徽医科大学学报* 2016, 51(3): 345–50.
- [10] Zhai X W, Zhang L, Guo Y F, et al. Alternative binding modes identified for growth and differentiation factor-associated serum protein (GASP) family antagonism of myostatin [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(12): 7506–16.
- [11] Zhou Y Y, Shen S. MiR-520f acts as a biomarker for the diagnosis of lung cancer [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(30): e16546.
- [12] Zhang L, Song Y, Ling Z, et al. R-spondin 2-LGR4 system regulates growth, migration and invasion, epithelial-mesenchymal transition and stem-like properties of tongue squamous cell carcinoma via Wnt/beta-catenin signaling [J]. *EbioMedicine*, 2019, 44: 275–88.
- [13] Yu M, Bardia A, Wittner B S, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition [J]. *Science*, 2013, 339(6119): 580–4.
- [14] Hay E D. Interaction of embryonic surface and cytoskeleton with extracellular matrix [J]. *Am J Anat*. 1982, 165(1): 1–12.
- [15] Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer [J]. *Oncology*, 2005, 69(3): 4–10.

Effects of GASP-1 gene interference on malignant invasion , epithelial-mesenchymal transition and microtubule formation in non-small cell lung carcinoma

Han Guiliang , Shi Yan , Jiao Ting , et al

(Dept of Medical Oncology , Affiliated Hospital of Hebei University;

Hebei Key Laboratory of Cancer Radiotherapy and Chemotherapy , Baoding 071000)

Abstract Objective To study the effects of GDF-associated serum protein-1 (GASP-1) gene interference on malignant invasion , epithelial-mesenchymal transition (EMT) and microtubule formation in non-small cell lung carcinoma (NSCLC) cells. **Methods** Lung cancer A549 cells were used as a model. The shRNA1 screened in the previous experiment was transfected into lung cancer A549 cells with Lipofectamine 2000. Grouping: control group , shRNA group and GASP-1-shRNA1 group. Transwell test was used to detect cell invasion ability , scratch test was used to detect cell migration ability; microscopic observation was used to observe EMT; microtubule formation test was used to detect the number of microtubule nodules; Western blot was used to detect EMT markers E-cadherin , N-Expression of cadherin , Fibronectin and VEGF protein. **Results** Compared with the control group , the number of cell invasions per field in the GASP-1-shRNA1 group significantly reduced , and the rate of scratch healing significantly reduced , indicating that interference with the GASP-1 gene could significantly inhibit the invasion and migration of A549 cells. Compared with the control group , the EMT in the GASP-1-shRNA1 group was significantly inhibited. In the microtubule formation experiment , compared with the control group , the number of microtubule nodules in the GASP-1-shRNA1 group significantly reduced , and the expression level of vascular endothelial growth factor (VEGF) protein significantly reduced. **Conclusion** GASP-1 gene interference can significantly inhibit the malignant invasion , EMT and microtubule formation of NSCLC cells.

Key words GASP-1; gene interference; non-small cell lung carcinoma; epithelial mesenchymal transformation markers; VEGF protein