

晚期糖基化终末产物受体及胞内信号分子 在肺腺癌细胞中的表达及功能

何美伦 徐爱晖

摘要 目的 探讨在肺腺癌细胞株 A549 中,晚期糖基化终末产物受体(RAGE)及其胞内信号分子 DIAPH1 的表达及对细胞迁移及凋亡能力的影响。方法 ①以肺腺癌细胞株 A549 及正常人支气管上皮细胞株 BEAS-2B 为研究对象,利用 qRT-PCR、Western blot 检测 RAGE 及 DIAPH1 在二者中的表达;②以 10、100 $\mu\text{g/ml}$ RAGE 配体 CML-AGE 及 1、10、100 $\mu\text{g/ml}$ RAGE 配体 S100B 处理 A549 细胞,划痕实验检测其对细胞迁移能力的影响;③以 25、50、100 $\mu\text{g/ml}$ RAGE 配体 CML-AGE 处理 A549 细胞,qRT-PCR 法检测凋亡相关基因 BCL-2 和 BAX 的表达情况。结果 ①qRT-PCR、Western blot 检测结果显示 A549 细胞中 RAGE 及 DIAPH1 表达较 BEAS-2B 细胞明显下调($P < 0.001$);②10、100 $\mu\text{g/ml}$ RAGE 配体 CML-AGE 及 1、10、100 $\mu\text{g/ml}$ RAGE 配体 S100B 处理对 A549 细胞的迁移能力皆有明显抑制作用,且作用呈浓度依赖性($P < 0.01$),差异有统计学意义;③以 25、50、100 $\mu\text{g/ml}$ RAGE 配体 CML-AGE 处理 A549 细胞后,抗凋亡基因 BCL-2 表达下调,促凋亡基因 BAX 表达上调,其作用呈浓度依赖性($P < 0.05$),差异有统计学意义。结论 RAGE 及 DIAPH1 在肺腺癌细胞株 A549 中的表达低于正常人支气管上皮细胞 BEAS-2B。RAGE 配体在一定程度上可以抑制 A549 细胞的迁移,促进其凋亡,有望成为肺腺癌治疗新的靶点。

关键词 晚期糖基化终末产物受体;DIAPH1;肺腺癌细胞;细胞迁移;细胞凋亡

中图分类号 R 734.2;R 563

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)02-0242-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.02.016

晚期糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycosylation end products,RAGE)是免疫球蛋白家族中的一员,作为一种多配体的跨膜信号转导受体,通过与细胞表面不同配体结合发挥功效^[1]。其高表达与糖尿病血管性病变、神经退行性

变、急性肺损伤以及肿瘤的发生与恶变密切相关^[2-5]。RAGE 的胞内端重要信号分子 DIAPH1(diaphanous-related formin 1)是 Formin 蛋白家族中的一员,同时为 Rho 蛋白效应器。RAGE 胞内段通过 DIAPH1 的 FH1 区域与其相互作用,并通过激活小 G 蛋白家族 Rho 蛋白诱导细胞迁移^[6]。研究^[7]表明,RAGE 及 DIAPH1 在多类恶性肿瘤中参与调节细胞运动及浸润,但是目前尚未有研究探究 DIAPH1 在非小细胞肺癌中的表达及 RAGE 对非小细胞肺癌细胞的调控情况。该研究将从分子信号水平检测 RAGE 及 DIAPH1 在肺腺癌细胞株 A549 中的表达,探讨 RAGE 的胞外配体对其迁移、凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肺腺癌细胞 A549 购自美国 ATCC;人支气管上皮细胞 BEAS-2B 购自美国 Sigma 公司。

1.1.2 仪器和试剂 高糖 DMEM 培养基、PBS 缓冲液、胎牛血清、青-链霉素双抗、EDTA-胰酶、实时荧光定量 PCR 试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(美国 ThermoFisher 公司);BEGM 支气管上皮细胞培养液、支气管上皮细胞传代试剂(美国 Lonza 公司);RNA 提取试剂盒(美国 QIAGEN 公司);cDNA 合成试剂盒、聚丙烯酰胺凝胶、Western blot 电泳缓冲液($10\times$)、Western blot 转膜缓冲液($10\times$)、PVDF 膜(美国 Bio-Rad 公司);DIAPH1 抗体(美国 BD 公司);GAPDH 抗体(美国 Abcam 公司);Rage 抗体(美国 Gene Tex 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞复苏、传代培养 在无菌超净台中预备 2 个无菌的 75 cm^2 培养瓶,将 A549 细胞株和 BEAS-2B 复苏后分别加入含 10% FBS 以及 1% 双抗的 DMEM 和 BEGM 完全培养基。置入含 5% CO_2 的 37°C 培养箱中培养过夜。待细胞密度长到 95% 左右时,以 0.25% EDTA-胰酶消化传代,取生长状态

2018-12-03 接收

基金项目:国家卫计委重大专项支持项目(编号:201302003)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院呼吸内科,合肥 230022

作者简介:何美伦,女,硕士研究生;

徐爱晖,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: Xuaihui0909@163.com

良好的第2代细胞用于后续实验。

1.2.2 qRT-PCR 检测 将呈对数生长期的 A549 及 BEAS-2B 以 $8 \times 10^3 / \text{cm}^2$ 分别接种至 6 孔板中。待细胞汇合至 95% 时,使用 QIAGEN 试剂盒提取总 RNA 并逆转录成 cDNA。使用美国 Thermo Fisher 公司所提供的引物及 Taq 酶进行 PCR 扩增。为校正标本中 RNA 质量及逆转录效率的差异,将标本检测所得到的 Ct 值与相应的 18S rRNA 基因 Ct 值相减进行标化,实验重复 3 次。

1.2.3 Western blot 检测 将呈对数生长期的 A549 及 BEAS-2B 以 $8 \times 10^3 / \text{cm}^2$ 分别接种至 6 孔板中。待细胞汇合至 95% 时,弃去培养基,以细胞裂解液提取细胞中的总蛋白。以 BCA 法测定蛋白浓度后计算出含有 30 μg 蛋白的溶液体积,加入 $4 \times$ 上样缓冲液及 $10 \times$ reducing buffer,最终定容为 30 μg / 30 μl 样品,置于 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热孔中 5 min,使蛋白变性。使用 4% ~ 15% 聚丙烯酰胺凝胶分离胶电泳分离,常规转膜后封闭,一抗孵育、二抗结合,使用 Odyssey 双色红外荧光成像系统进行显影。为校正蛋白质样品中的质量,用所得 GAPDH 蛋白信号标准化所测得的 RAGE 及 DIAPH1 蛋白信号。

1.2.4 细胞划痕实验 取对数生长期且生长状态佳的 A549 细胞以 $5 \times 10^4 / \text{ml}$ 将细胞接种于 12 孔细胞培养板中。待细胞汇合率达到 90% 时,将细胞饥饿。用无菌黄枪头在 12 孔板底部中间轻轻划出“|”字型伤口后加入含不同浓度的 CML-AGE (10、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 及不同浓度的 S100B (1、10、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 10% FBS 完全培养基,设立不含刺激物的 BLANK 组,并以 Odyssey 光学倒置显微镜在 0 h 及 16 h 进行拍照,利用 ImageJ 软件测量划痕间距离。

1.2.5 凋亡检测 取对数生长期且生长状态佳的 A549 细胞,以 $8 \times 10^3 / \text{cm}^2$ 将细胞接种于 6 孔细胞培养板中。待细胞汇合率达到 90% 时,加入含不同浓度的 CML-AGE (25、50、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 10% FBS 完全培养基,设立不含刺激物的 BLANK 组。24 h 后,利用前述方法提取 mRNA 并逆转录 cDNA。使用美国 ThermoFisher 公司所提供的 BCL-2 及 BAX 引物及 Taq 酶进行 PCR 扩增。为校正标本中 RNA 质量及逆转录效率的差异,将标本检测所得到的 Ct 值与相应的 18S 基因 Ct 值相减,进行标准化,实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行分析。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 *t* 检验方法检测目的基因及目的蛋白在两种细胞中的表达水平。采用 ANOVA 方差分析比较 RAGE 配体在不同浓度

对肿瘤细胞迁移及凋亡能力的影响。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A549 细胞中 RAGE 及 DIAPH1 mRNA 表达水平 经 qRT-PCR 检测结果表明,肺腺癌细胞 A549 中 RAGE 及 DIAPH1 的 mRNA 表达水平 (0.570 ± 0.057 、 0.421 ± 0.028) 较支气管上皮细胞 BEAS-2B (1.064 ± 0.092 、 1.045 ± 0.080) 表达明显下调 ($P < 0.001$)。见图 1。

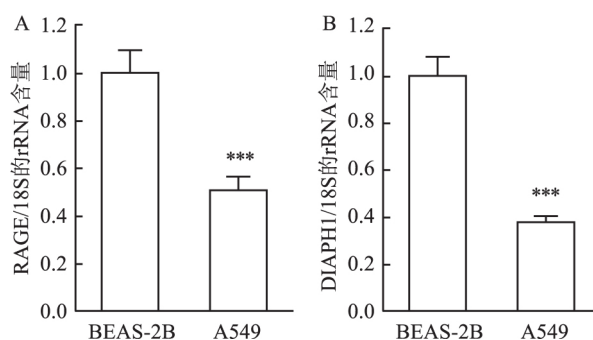


图1 qRT-PCR 检测 A549 及 BEAS-2B 中 RAGE 与 DIAPH1 的表达

A: RAGE; B: DIAPH1; 与 BEAS-2B 比较: *** $P < 0.001$

2.2 A549 细胞中 RAGE 及 DIAPH1 蛋白表达水平 经 Western blot 检测两组细胞中 RAGE 及 DIAPH1 蛋白表达水平,并进行灰度值分析。结果显示,肺腺癌细胞 A549 中 RAGE 及 DIAPH1 的蛋白表达水平 (0.381 ± 0.073 、 0.351 ± 0.115) 较支气管上皮细胞 BEAS-2B (1.000 ± 0.089 、 1.000 ± 0.020) 表达明显下调 ($P < 0.001$)。见图 2。

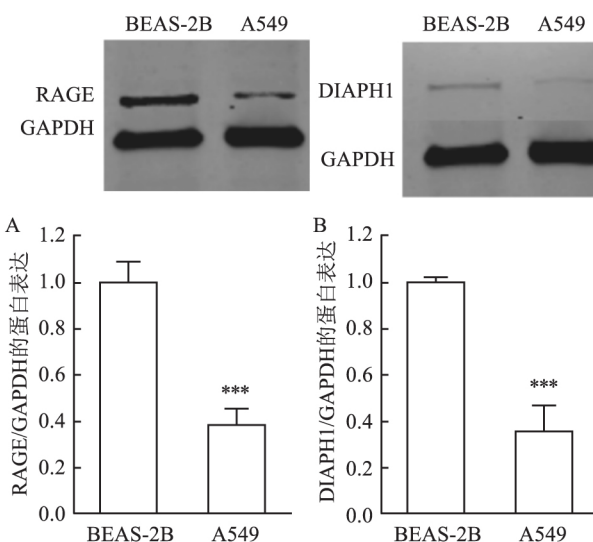


图2 Western blot 检测 A549 及 BEAS-2B 中 RAGE 与 DIAPH1 的表达

A: RAGE; B: DIAPH1; 与 BEAS-2B 比较: *** $P < 0.001$

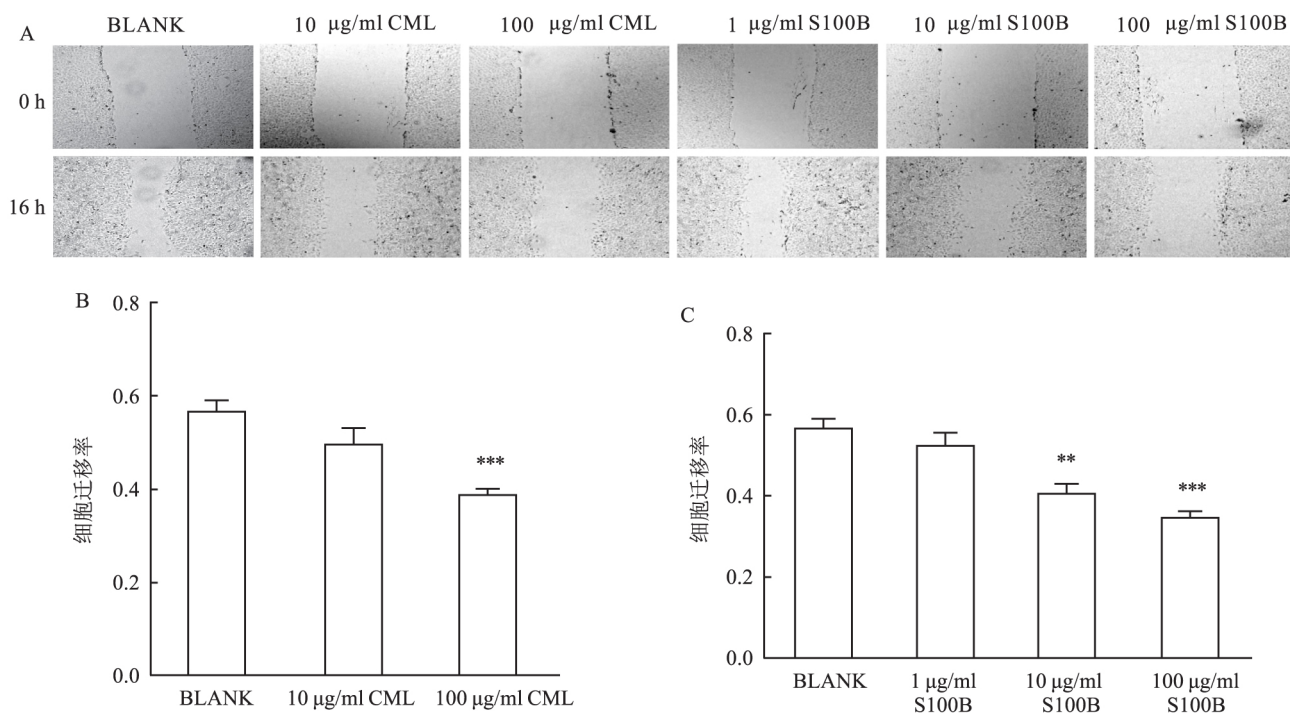


图3 RAGE配体对A549细胞迁移能力的影响

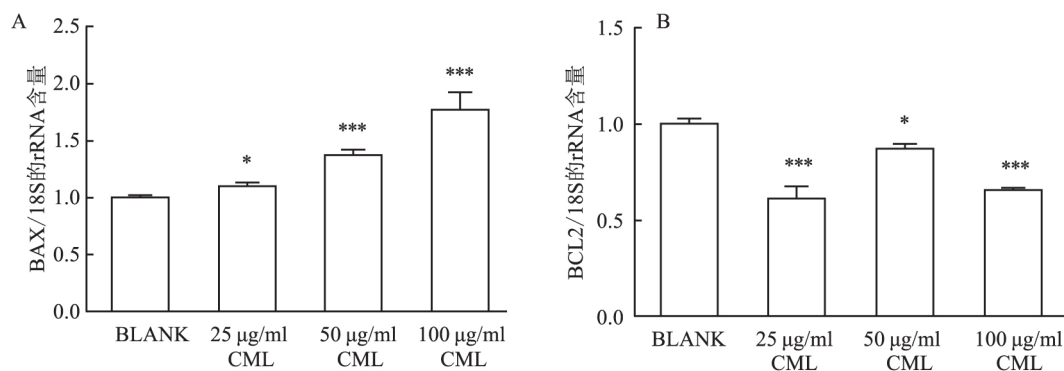
A: 划痕实验图; B: CML-AGE组; C: S100B组; 与BLANK组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 

图4 CML-AGE对A549细胞凋亡能力的影响

A: BAX基因表达; B: BCL-2基因表达; 与BLANK组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

2.3 RAGE配体对A549细胞迁移能力的影响

划痕实验结果显示,以不同浓度RAGE配体CML-AGE及S100B刺激A549肺腺癌细胞株。16 h后,与BLANK组(0.567 ± 0.004)相比,CML-AGE实验组(0.495 ± 0.037 、 0.387 ± 0.015 , $F = 12.23$, $P < 0.001$)及S100B实验组(0.523 ± 0.032 、 0.405 ± 0.024 、 0.343 ± 0.018 , $F = 14.45$, $P < 0.001$)对细胞迁移能力有明显抑制作用,其作用呈现出浓度依赖性。见图3。

2.4 CML-AGE对A549细胞凋亡能力的影响

qRT-PCR检测结果表明,以不同浓度RAGE配体CML-AGE刺激A549肺腺癌细胞株后,相比于

BLANK组,CML-AGE刺激组中抗凋亡基因BCL-2表达下调(1.002 ± 0.029 、 0.612 ± 0.065 、 0.871 ± 0.030 、 0.656 ± 0.012 , $F = 22.22$, $P < 0.001$);促凋亡基因BAX表达上调(1.003 ± 0.027 、 1.099 ± 0.036 、 1.375 ± 0.046 、 1.764 ± 0.160 , $F = 17.50$, $P < 0.001$),其作用呈现出浓度依赖性。见图4。

3 讨论

Jemal et al^[8]在Cancer statistics中指出,肺癌是造成全世界发病率及死亡率较高的主要原因之一,目前已成为全世界死亡率最高的恶性肿瘤,严重危害人类的生命健康。除此以外,肺癌患者的五年生

存率仅约为 18% ,正因为肺癌在其早期阶段对周围血管造成的浸润 ,进一步导致其发生远处转移 ,使得患者失去了手术治疗的机会。因此 ,寻找控制肺癌的浸润转移的有效治疗靶点变得极为重要。

晚期糖基化终产物受体 ,又称 RAGE ,是免疫球蛋白家族中的一员 ,作为一种多配体的跨膜信号转导受体 ,通过细胞外段与细胞表面不同配体结合发挥功效。既往研究^[9-10]表明 ,RAGE 在正常肺组织 ,尤其是肺泡 I 型上皮细胞中的表达较高 ,而在肺癌组织中 ,RAGE 的表达较正常肺组织明显下调 ,其下调原因尚未明确。

近年来有研究表明 ,RAGE 除了与细胞外配体结合 ,其与细胞内信号分子的结合在信号传导的过程中同样起重要作用。有学者研究^[6]证实 ,RAGE 胞内段通过 DIAPH1 的 FH1 区域与其相互作用 ,并通过激活小 G 蛋白家族 Rho 蛋白 ,尤其是 Rac1 及 Cdc42 诱导细胞迁移。DIAPH1 在多项恶性肿瘤 ,如神经胶质瘤、乳腺癌、结肠癌中的表达明显上调 ,并参与调节细胞运动及浸润^[11-13] ,但其在非小细胞肺癌中的表达情况尚未明确。在本研究中 ,选用肺腺癌细胞 A549 为实验组 ,以人支气管上皮细胞 BEAS-2B 为对照组 ,在无刺激的完全培养基培养后 ,提取细胞中的全部 RNA 及蛋白质。通过 qRT-PCR 及 Western blot 检测 RAGE 及 DIAPH1 的 mRNA 及蛋白质表达。结果表明 ,在肺腺癌细胞 A549 中 ,RAGE 的 mRNA 及蛋白质水平较 BEAS-2B 细胞明显下降 ($P < 0.001$)。该结果与此前多项研究^[8-9]结果相符合。同时 ,本实验首次检测出在肺腺癌细胞 A549 中 ,DIAPH1 的 mRNA 及蛋白质水平较 BEAS-2B 细胞也明显下降 ($P < 0.001$) ,结果进一步验证了既往研究中对于 RAGE 在肺腺癌细胞中表达降低的假说。并通过在肺腺癌细胞中 DIAPH1 和 RAGE 表达同时降低 ,为 RAGE 与 DIAPH1 在细胞内结合并进一步激活信号通路提供证据。

研究^[10]显示 ,在非小细胞肺癌患者组织标本中 RAGE 表达较正常对照组明显下降 ,同时其下调水平与 TNM 肿瘤分级呈正相关性。由此可推测 ,激活 RAGE 后非小细胞肺癌恶性程度越低 ,肿瘤细胞迁移能力越弱。本试验中 ,选用 RAGE 的胞外配体 CML-AGE、S100B 作为刺激物 ,探究其不同浓度情况下对肺腺癌细胞 A549 迁移能力的影响。结果显示 ,相比于无 RAGE 配体刺激的 BLANK 组 ,CML-AGE 及 S100B 刺激组对肿瘤细胞迁移有明显的抑制作用 ,且呈现出浓度依赖性 ($P < 0.01$)。结果提

示激活 RAGE 的表达可一定程度抑制肺腺癌细胞的迁移 ,从而可以减缓其转移速度。本研究显示 ,RAGE 在非小细胞肺癌细胞中的表达低于在正常支气管上皮细胞中的表达 ,且与细胞迁移能力有关 ,提示 RAGE 与非小细胞肺癌的发生及浸润转移相关 ,可作为临床上一项判断肿瘤恶性程度和是否转移的辅助指标。

恶性肿瘤的发展过程可视为细胞生长/细胞凋亡失衡所造成的结果 ,过度表达抗凋亡基因或低表达促凋亡基因 ,都会造成细胞的非正常死亡减少 ,从而引发恶性肿瘤。研究^[14-15]表明 ,恶性肿瘤中已发现 BCL-2 表达上调、BAX 表达下调 ,并且认为下调 BCL-2/BAX 比率可诱导细胞凋亡。本研究中 ,使用 qRT-PCR 检测经 RAGE 配体 CML-AGE 及 S100B 刺激后 A549 细胞中二者的表达。结果显示 ,肺腺癌细胞 A549 中 BCL-2 的表达明显下降且 BAX 的表达明显上调 ,其作用呈现出浓度依赖性 ($P < 0.05$)。本实验结果表明 ,激活 RAGE 后 ,可一定程度促进细胞凋亡 ,提示 RAGE 在非小细胞肺癌的生长及凋亡中起重要作用 ,也为今后非小细胞肺癌的治疗提供新的靶点。但非小细胞肺癌组织中 RAGE 和 DIAPH1 表达的具体调控机制以及其与非小细胞肺癌的发生、发展、迁移的关系还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Neeper M , Schmidt A M , Brett J , et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins[J]. *J Biol Chem* ,1992 ,267(21) :14998 - 5004.
- [2] Tanji N , Markowitz G S , Fu C , et al. Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease [J]. *J Am Soc Nephrol* 2000 ,11(9) :1656 - 66.
- [3] Falcone C , Emanuele E , D'Angelo A , et al. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary artery disease in nondiabetic men [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 ,25(5) :1032 - 37.
- [4] Emanuele E , D'Angelo A , Tomaino C , et al. Circulating levels of soluble receptor for advanced glycation end products in Alzheimer disease and vascular dementia [J]. *Arch Neurol* 2005 ,62(11) :1734 - 36.
- [5] Riehl A , Németh J , Angel P , et al. The receptor RAGE: bridging inflammation cancer [J]. *Cell Commun Signal* ,2009 ,7: 12.
- [6] Manigrasso M B , Pan J , Rai V , et al. Small molecule inhibition of ligand-stimulated RAGE-DIAPH1 signal transduction [J]. *Sci Rep* ,2016 ,6: 22450.
- [7] Tanji M , Ishizaki T , Ebrahimi S , et al. mDial targets v-Src to the cell periphery and facilitates cell transformation , tumorigenesis ,

- and invasion[J]. *Mol Cell Biol* ,2010 ,30(19) : 4604 – 15.
- [8] Jemal A ,Siegel R ,Xu J , et al. Cancer Statistics ,2010 [J]. *CA Cancer J Clin* ,2010 ,60(5) :277 – 300.
- [9] Bartling B , Hofmann H S , Weigle B , et al. Down-regulation of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) supports non-small cell lung carcinoma[J]. *Carcinogenesis* 2005 ,26(2) : 293 – 301.
- [10] Schraml P , Bendik I , Ludwig C U. Differential messenger RNA and protein expression of the receptor for advanced glycosylated end products in normal lung and non-small cell lung carcinoma [J]. *Cancer Res* ,1997 ,57(17) : 3669 – 71.
- [11] Lin Y N , Izbicki J R , König A , et al. Expression of DIAPH1 is up-regulated in colorectal cancer and its down-regulation strongly reduces the metastatic capacity of colon carcinoma cells [J]. *Int J Cancer* ,2014 ,134(7) : 1571 – 82.
- [12] Kim D , Jung J , You E , et al. mDial regulates breast cancer invasion by controlling membrane type 1-matrix metalloproteinase localization [J]. *Oncotarget* ,2016 ,7(14) :17829 – 43.
- [13] Lizárraga F , Poincloux R , Romao M , et al. Diaphanous-related formins are required for invadopodia formation and invasion of breast tumor cells[J]. *Cancer Res* ,2009 ,69(7) : 2792 – 2800.
- [14] Danial N N. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death [J]. *Clin Cancer Res* ,2007 ,13(24) : 7254 – 63.
- [15] Chiu T L , Su C C. Curcumin inhibits proliferation and migration by increasing the Bax to Bcl-2 ratio and decreasing NF- κ Bp65 expression in breast cancer MDA-MB-231 cells [J]. *Int J Mol Med* ,2009 ,23(4) : 469 – 75.

Expression and function of advanced glycosylation end product receptors and intracellular signal molecules in lung adenocarcinoma cells

He Meilun , Xu Aihui

(Dept of Respiratory Medicine ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the expression of the receptor for advanced glycosylation end products (RAGE) and its intracellular signaling molecules DIAPH1 in lung adenocarcinoma A549 cells and the effect of RAGE ligands on cell migration and apoptosis. **Methods** The expressions of RAGE and DIAPH1 in lung adenocarcinoma A549 cells and human bronchial epithelial cells BEAS-2B were tested by qRT-PCR and Western blot. A549 cells was treated with 10 ,100 μ g/ml RAGE ligands CML-AGE and 1 ,10 ,100 μ g/ml S100B , and wound healing test was used to identify the effect of migration ability. A549 cells was treated with 25 ,50 ,100 μ g/ml RAGE ligands CML-AGE , the gene expression of BCL-2 and BAX were tested by using qRT-PCR. **Results** The results of qRT-PCR and Western blot showed , compared with human bronchial epithelium cells BEAS-2B , the expression of RAGE and DIAPH1 were both significantly down-regulated in lung adenocarcinoma A549 cells ($P < 0.001$). After treated with 10 ,100 μ g/ml RAGE ligands CML-AGE and 1 ,10 ,100 μ g/ml S100B , both groups showed the ligands inhibit lung adenocarcinoma A549 cells migration in concentration-depend manners ($P < 0.01$). After treated with 25 , 50 ,100 μ g/ml RAGE ligands CML-AGE , the expression of anti-apoptotic gene BCL-2 was down-regulated and pro-apoptotic gene BAX was upregulated in the experimental group in concentration-depend manners ($P < 0.05$) , the difference was significant. **Conclusion** The expression levels of RAGE and DIAPH1 in lung adenocarcinoma A549 cells are both significantly lower than human bronchial epithelium cells BEAS-2B. RAGE ligands can inhibit cells migration and promote cell apoptosis in lung adenocarcinoma A549 cells and may provide a new target for the therapy of lung adenocarcinoma cells.

Key words receptor for advanced glycation end products; DIAPH1; lung adenocarcinoma cells; cell migration; cell apoptosis