

分泌型簇集素蛋白在肺癌细胞株中生物学行为的研究

马晓¹ 罗晓莹² 李宗海² 李鹤成¹

1. 复旦大学附属肿瘤医院胸外科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032
2. 上海交通大学医学院附属仁济医院上海市肿瘤研究所, 上海 200032

[摘要] **背景与目的:** 簇集素蛋白(clusterin, CLU)在肺癌的发生、发展中发挥重要作用。本研究用分泌型CLU体外处理肺癌细胞株,旨在探讨分泌型CLU对肺癌细胞株的影响。**方法:** 用真核表达纯化的分泌型CLU处理非小细胞肺癌细胞株H460、A549,采用Boyden小室试验检测细胞的迁移能力,用CCK8检测细胞的增殖能力,利用芯片技术分析CLU处理H460细胞的microRNA表达谱,然后采用实时荧光定量PCR检测分泌型CLU处理H460细胞中microRNA的表达,初步分析分泌型CLU执行肿瘤生物学功能的microRNA相关分子机制。**结果:** 分泌型CLU处理组H460迁移的细胞是BSA处理组的3.10倍($P<0.0001$);分泌型CLU处理组A549迁移的细胞是BSA处理组的3.40倍($P<0.0001$);分泌型CLU抑制了肺癌细胞株H460/A549的生长($P<0.0001$);利用芯片技术发现microRNA-302b-3p、microRNA-23a-5p和microRNA-101-5p高表达。**结论:** 在非小细胞肺癌细胞株H460/A549中,真核表达的分泌型CLU促进了细胞迁移、抑制了细胞生长,并且能引起microRNA表达谱的改变,本研究为探索分泌型CLU在非小细胞肺癌中的作用提供了重要的实验依据。

[关键词] 分泌型簇集素蛋白;非小细胞肺癌;细胞迁移;microRNA

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2013.09.001

中图分类号: R734.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2013)09-0697-06

The study of secretory clusterin on the biological behaviors of non-small cell lung cancer cells MA Xiao¹, LUO Xiao-ying², LI Zong-hai², LI He-cheng¹ (1. Department of Thoracic Surgery, Fudan University Shanghai Cancer Center, Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Shanghai Cancer Institute, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: LI He-cheng E-mail: lihecheng2000@hotmail.com

[Abstract] **Background and purpose:** Primary study showed that clusterin was associated with tumorigenicity. The goal of the study is to investigate the role of secretory clusterin in non-small cell lung cancer cell A549/H460. **Methods:** The lung cancer cell A549/H460 was treated with purified secretory clusterin, the Boyden Chamber migration assay was used to detect the migration of the lung cancer cell; the CCK8 assay was used to detect the growth of the cells; microRNA expression spectrum in H460 treated with secretory clusterin was analyzed, after that, we used the real-time fluorescence quantification to detect the expression of microRNA in H460, and the biological function of microRNA molecular mechanisms of secretory clusterin was analyzed. **Results:** Secretory clusterin promoted the migration in A549/H460 ($P<0.0001$); Secretory clusterin inhibited the growth in H460/A549 ($P<0.0001$); MicroRNA-302b-3p, microRNA-23a-5p and microRNA-101-5p was overexpressed in H460 when treated with secretory clusterin. **Conclusion:** Secretory clusterin could promote the migration and inhibit the growth of lung cancer cell; It could change the microRNA expression spectrum as well. Our studies revealed that secretory clusterin could be used as a tool for further study, and it is a potential target in the treatment of lung cancer.

[Key words] Secretory clusterin; Non-small cell lung cancer; Cell migration; MicroRNA

肺癌是全球范围内最常见的恶性肿瘤之一, 严重威胁人类的健康和生活质量。据统计, 全世界每年因肺癌死亡的患者有140万, 约占所有恶性肿瘤死亡的18%^[1]。相关研究显示, 肿瘤细胞的恶性转化、无限增殖及凋亡调控失衡参与肿瘤的发生、发展^[2]。肺癌的发生、发展是多因素、多步发展的复杂过程, 包括原癌基因的活化、抑癌基因的失活等, 其中细胞增殖和凋亡之间的失衡是重要的因素。

簇集素蛋白(clusterin, CLU)是一个广泛糖基化的蛋白, 其生物学意义仍然存在争议。CLU在正常成熟组织中低表达而选择性的在某些恶性肿瘤中高表达, 如肺癌, 前列腺癌, 乳腺癌、卵巢癌及宫颈癌等^[3]。CLU因能使不同的细胞聚集而命名^[4], 由于选择性剪接的结果, 其有两种主要的亚型, 多功能分子伴侣分泌型CLU(sCLU)和促凋亡的核型CLU(nCLU)^[5]。sCLU开始是一条相对分子质量约 60×10^3 的前体多肽, 经过裂解和糖基化形成了 α 和 β 链, 每条链相对分子质量约 40×10^3 , 并最终形成分泌型异二聚体, 相对分子质量约 49×10^3 的nCLU在转录后修饰成相对分子质量约 55×10^3 有活性的nCLU, 在细胞核集中, 并诱导细胞凋亡^[6]。CLU在肿瘤中的具体作用机制还不明确, Sonn等^[7]合成纯化CLU, 研究其在自然杀伤细胞中的作用。为了探讨CLU在肺癌中的作用, 本研究采用纯化的sCLU体外处理肺癌细胞株, 探讨sCLU对肺癌细胞株的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

细胞培养液DMEM以及胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国Hyclone公司; CCK8购自Invitrogen公司; Boyden Chamber小室购自上海易佰聚经贸有限公司; 质粒小抽提试剂盒和胶回收试剂盒购自德国Qiagen公司; LipofecamineTM2000、optiDMEM和总RNA提取试剂TRIzol购自美国Invitrogen公司; 限制性内切酶、T4 DNA连接酶、高保真酶

PrimeStarTM、RNA反转试剂盒PrimeScriptTM RT Kit均购自宝生物工程(大连)有限公司。兔抗人Clusterin抗体购自美国Santa Cruz公司; 低分子量蛋白marker购自上海Sangon公司; MicroRNA表达试剂盒购自广州锐博公司。

1.2 细胞、质粒菌株及细胞培养

人肺癌H460、A549细胞、大肠杆菌DH5 α 、质粒pRAG5-flag、HEK-293F细胞由上海市肿瘤研究所癌基因及相关基因国家重点实验室保藏, 肺癌细胞均用含10%胎牛血清的DMEM培养液, 置于37℃、CO₂体积分数为5%的培养箱中培养, 取处于对数生长期的细胞用于实验。

1.3 真核表达纯化sCLU

利用人肺癌细胞中提取的RNA逆转录得到cDNA, 以此为模板, 进行PCR实验, 产物回收构建真核表达载体, 将构建的载体转入大肠杆菌DH5 α , 涂在含氨苄青霉素(ampicillin)的LB平皿上, 次日选取单克隆菌落置于培养液中, 在摇床中扩增, 提取质粒后进行酶切鉴定, 随后测序鉴定, 得到正确的序列则进采用质粒提取试剂盒抽提质粒。将构建的质粒转染293F细胞得到目的蛋白, 利用Flag抗体及CLU抗体进行纯化, 鉴定得到纯化的sCLU。

1.4 Boyden小室试验

实验分BSA对照组和sCLU处理组, 采用Boyden小室试验检测牛血清蛋白BSA对照组及sCLU处理组H460/A549细胞的迁移能力, 首先Boyden小室上、下室之间用孔径8 μ m的聚碳酸酯膜分开, 上室加入含5.4 μ mol/L的sCLU及肺癌细胞H460/A549(5×10^5 个/mL)的无血清培养基400 μ L/室, 下室加含有5.4 μ mol/L的sCLU完全培养基, 细胞培养24 h后, 取出小室, 用棉签擦去上室未穿膜的细胞; 用4%甲醛溶液固定黏附到滤膜下室面的细胞, 苏木精染色, 梯度乙醇溶液逐级脱水, 邻苯二甲醛透明后, 置于载玻片上封固。在光学显微镜下随机计数5个视野($\times 100$)下的穿膜细胞数, 以穿过滤膜的细胞数表示细胞的迁移能力, 实验重复4次。

1.5 CCK-8 法检测sCLU对H460/A549细胞增殖的影响

取对数生长期的H460及A549细胞, 0.25%胰蛋白酶消化成单细胞悬液, 以 2×10^4 个/mL的细胞密度接种于96孔板中, 100 μ L/孔。细胞培养过夜后分别加入终浓度为5.4 μ mol/L的sCLU或者BSA培养基, 细胞继续培养, 每天进行CCK-8检测, 即吸出上清液, 加入基础培养液100 μ L/孔(其中含10 μ L/孔的CCK-8液); 3 h后, 在酶联免疫检测仪上检测波长为450 nm处各孔的吸光度(A)值, 收集7 d结果计算细胞生长曲线。

1.6 sCLU处理H460细胞microRNA表达谱分析

以5.4 μ mol/L浓度sCLU处理H460细胞48 h, 收集RNA, 委托上海康成公司进行microRNA表达谱分析, 并进行生物信息学分析。

1.7 实时荧光定量PCR 检测分泌型Clusterin处理组H460细胞中microRNA的表达

用TRIzol试剂提取sCLU处理组H460细胞总RNA, 随后利用广州锐博公司定量PCR检测microRNA表达试剂盒分析。大致如下, 取50 ng总RNA加入锐博公司提供的反转录引物, 利用反转录酶进行反转录, 反转录反应体积为20 μ L, 反应条件: 16 $^{\circ}$ C 30 min、42 $^{\circ}$ C 30 min、85 $^{\circ}$ C 10 min。荧光定量PCR反应体系中主要包含2 \times SYBR Green Real-timePCR Master Mix及锐博公司提供的microRNA特异引物, 在ABI 7900实时荧光定量PCR仪上进行。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min、95 $^{\circ}$ C 30 s、62 $^{\circ}$ C 60 s, 共40个循环。在62 $^{\circ}$ C检测荧光强度, 结果分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法: $\Delta\Delta Ct = \text{实验组}(Ct \text{ microRNA} - Ct \text{ U6}) - \text{对照组}(Ct \text{ microRNA} - Ct \text{ U6})$ 。每组实验重复3次。

1.8 统计学处理

通过SPSS 16.0统计软件对数据进行分析, 采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 真核表达纯化sCLU

在人肺癌细胞系H460的cDNA文库中利用引物进行PCR实验, 成功构建了sCLU真核表达质粒, 将其转染进293F细胞7 d后收集培养上清液, 取上清液进行sCLU抗体纯化, 最后利用特异型抗体进行验证, 发现均可被FLAG标签抗体识别, 证明是我们所需要的sCLU。

2.2 sCLU促进H460细胞迁移

在sCLU浓度为5.4 μ mol/L情况下, 检测sCLU对肺癌细胞株H460细胞迁移能力的影响, 发现sCLU能够促进细胞迁移(图1), sCLU处理组迁移的细胞是BSA对照组的3.10倍。

2.3 sCLU促进A549细胞迁移

为了进一步检测sCLU的功能, 我们还在A549细胞中检验了sCLU对细胞迁移的影响, 发现sCLU同样能够促进细胞迁移, sCLU处理组迁移的细胞是BSA对照组的3.44倍(图2)。

2.4 sCLU抑制肺癌细胞株H460/A549的生长

研究结果显示, sCLU抑制肺癌细胞株H460/A549细胞的生长(图3)。

2.5 sCLU对H460细胞的microRNA表达谱

本研究利用芯片探查了microRNA相关的分子机制。首先收集了sCLU处理的H460细胞, 抽提RNA, 然后进行microRNA表达谱芯片的检查和生物信息学分析, 取得结果后使用定量PCR技术进行验证(图4A)。根据芯片结果, sCLU与BSA处理H460细胞中microRNA表达具有明显的相关性(图4B), 主要分布于对称轴附近, 但较多的microRNA被sCLU诱导高表达(位于对角线平行两条斜线之外), 因此高表达microRNA是研究的目标。根据芯片分析, 本研究选择了8个microRNA作为备选的microRNA(图4C)。

2.6 sCLU引起microRNA表达变化

根据芯片提示, 本研究使用定量PCR方法, 对目标microRNA表达变化进行检测, 发现我们确定的8个目标microRNA, 其中3个microRNA表达, 而且与BSA处理的样本差异有统计学意义(图5)。

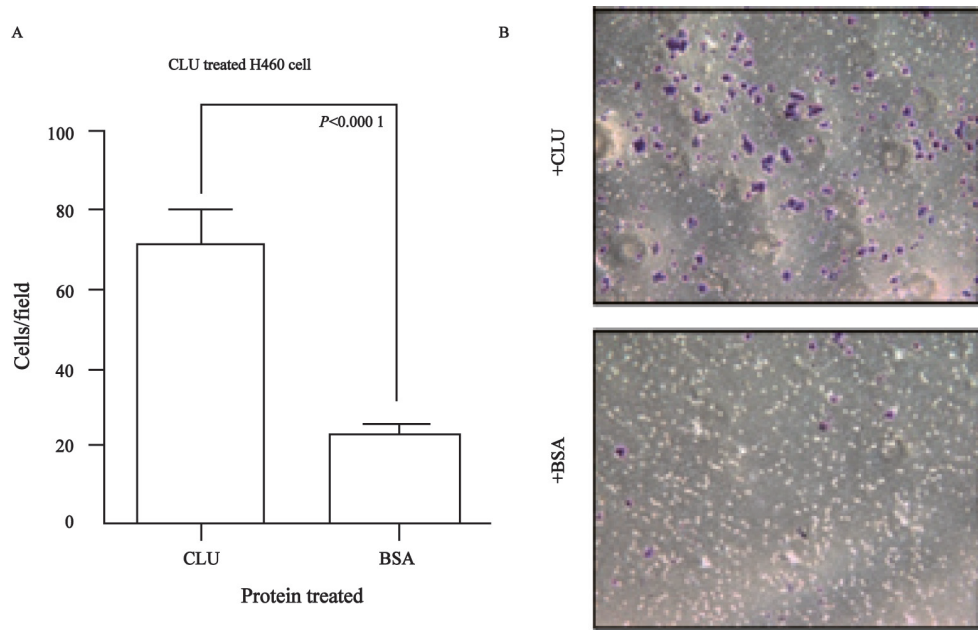


图 1 sCLU促进H460细胞迁移

Fig. 1 sCLU promoted migration in H460

The promotion of migration ability of lung cancer H460 cells treated with sCLU protein (5.4 $\mu\text{mol/L}$) was analysed by Boyden chamber; BSA (bovine serum albumin) was served as a control ($\times 100$).

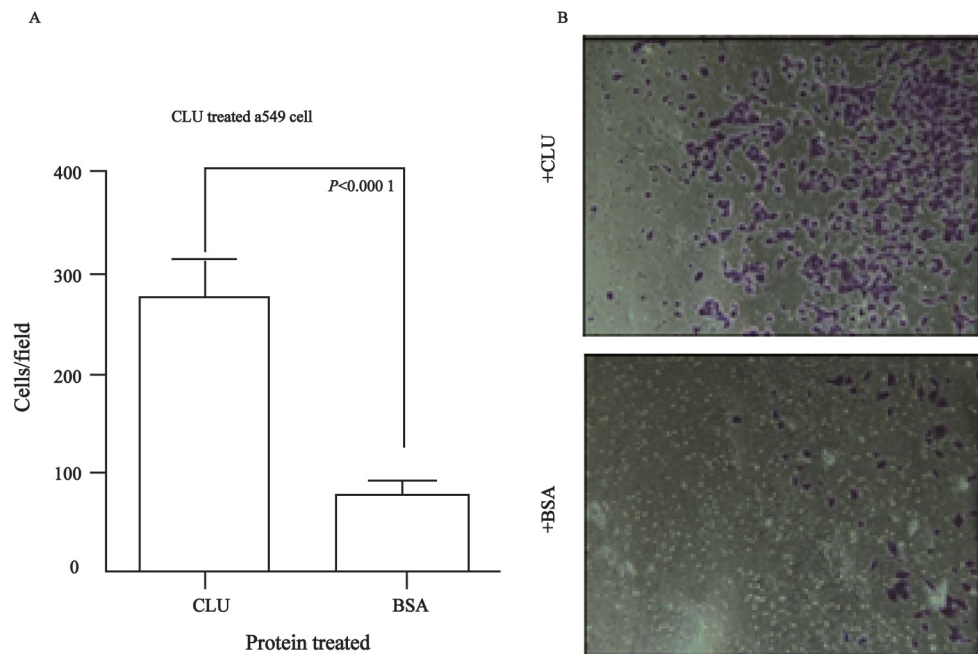


图 2 sCLU促进A590细胞迁移

Fig. 2 sCLU promoted migration in A549

The promotion of migration ability of lung cancer A549 cells treated with sCLU protein (5.4 $\mu\text{mol/L}$) was analysed by Boyden chamber; BSA (bovine serum albumin) was served as a control ($\times 100$).

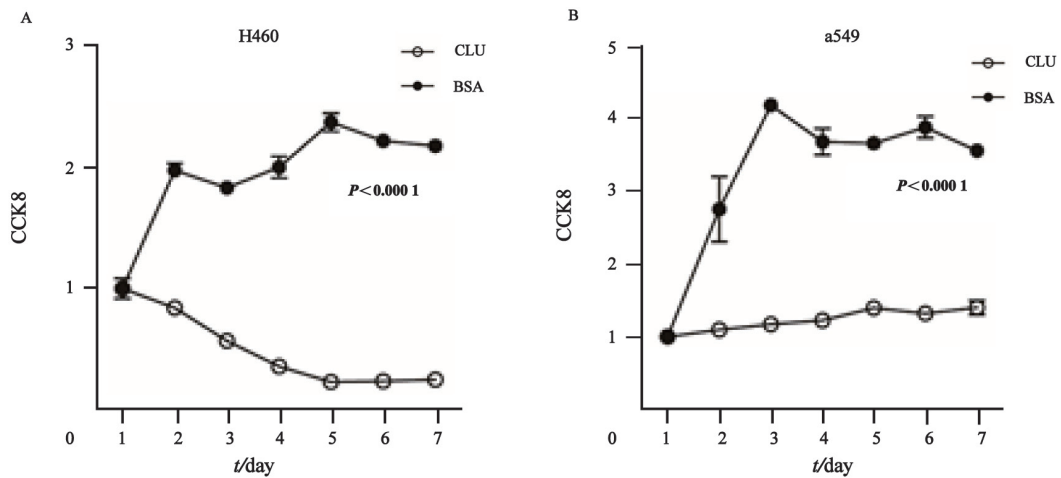


图3 sCLU抑制H460/A549细胞生长

Fig. 3 sCLU (secretory clusterin) inhibited the growth of lung cancer cells

The growth of lung cancer cells H460/A549 treated with sCLU protein (5.4 μ mol/L) was analysed by CCK8; BSA (bovine serum albumin) was served as a control.

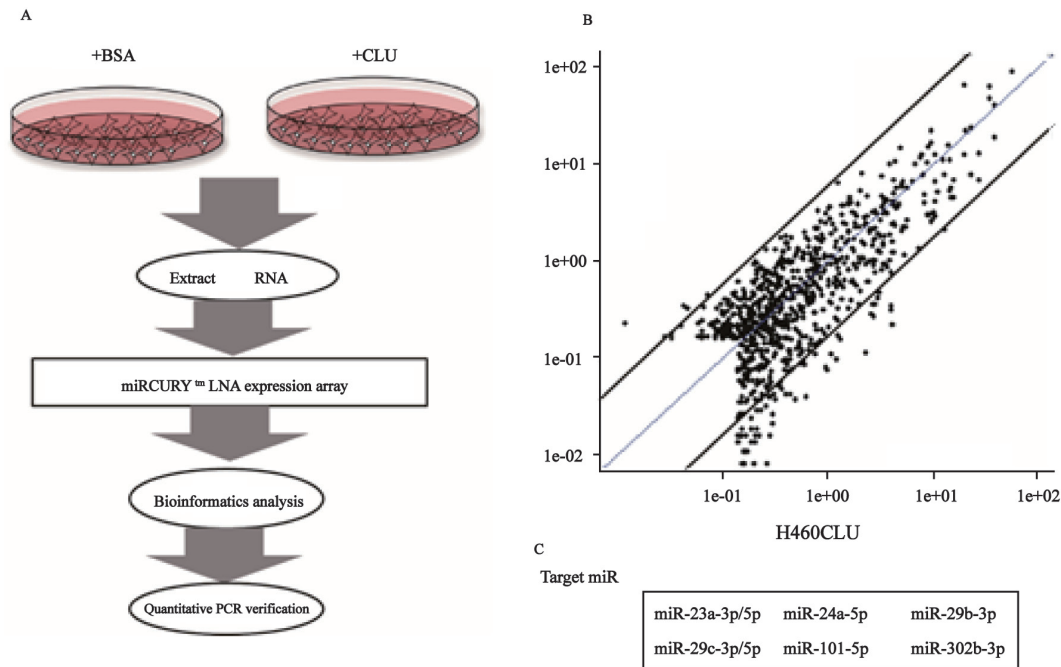


图4 sCLU处理组H460细胞的microRNA表达谱式分析

Fig. 4 The analysis of microRNA expression spectrum in H460 treated with secretory clusterin

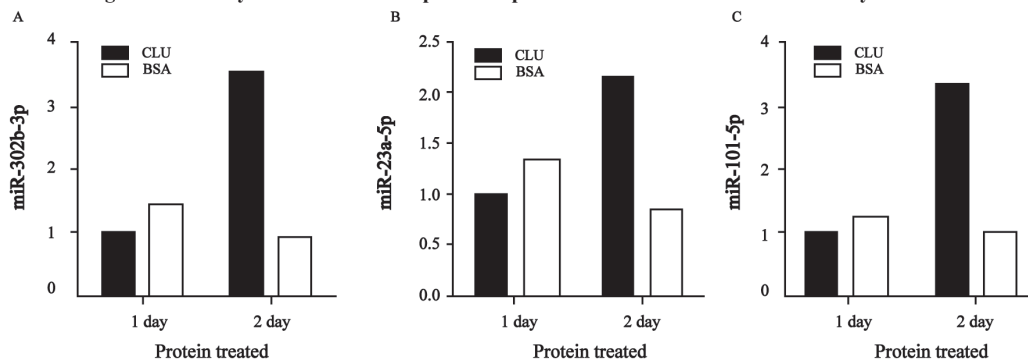


图5 microRNA-302b-3p、microRNA-23a-5p和microRNA-101-5p高表达

Fig. 5 microRNA-302b-3p, microRNA-23a-5p and microRNA-101-5p overexpressed in H460

H460 was treated with sCLU (secretory clusterin) two days, while BSA (bovine serum albumin) was served as a control.

3 讨 论

本研究前期的实验证明上调nCLU的表达具有明显抑制肿瘤增殖的作用, 并且可以使细胞的运动迁移和侵袭能力明显减弱。Bettuzzi等^[8]认为sCLU对于肿瘤细胞的生长、增殖没有作用, 而Matsuda等^[9]的研究显示sCLU能降解细胞基质, 可作为VI膜型基质金属蛋白酶(membrane-type 6 matrix metalloproteinase, MT6-MMP)的负性调节因子, 对于肿瘤的侵袭起到重要的作用。

本研究结果显示, 在肺癌细胞A549中, sCLU处理组迁移的细胞是BSA对照组的3.44倍; 在肺癌细胞H460中, 则是BSA对照组的3.10倍。因此可以得出sCLU对于肺癌细胞的迁移同样存在促进作用。随后CCK-8检测结果也显示sCLU抑制肺癌细胞的生长。

蛋白组学在癌症的研究中起到重要作用^[10], microRNA是其中的一种方法, 越来越多的研究表明, microRNA通过与靶基因的相互作用, 调控人类至少1/3基因的表达, 在生理和病理过程中有重要作用^[11], 生物芯片技术是20世纪90年代初发展起来的新技术, 具有高通量、高集成、微型化、连续化和自动化的特点, 此技术现已成熟运用到mRNA水平基因表达检测上, 是检测细胞或组合microRNA表达谱的理想方法^[12]。sCLU在肺癌细胞中具有明显的功能, 但其分子机制还不清楚, 本研究利用芯片技术探查了microRNA的分子。结果显示部分microRNA可能参与了肺癌发生的分子机制。对于microRNA, Liu等^[13]在肺腺癌中发现MicroRNA-449a能够增强放疗的敏感性。Miao等^[14]发现microRNA-449c能抑制非小细胞肺癌的进展。Kuo等^[15]发现MicroRNA-33a可作为肺癌中骨转移的抑制因子。本研究中发现高表达的microRNA可能通过某些特殊机制与sCLU相互作用, 为后续研究提供了重要的依据。

[参 考 文 献]

[1] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, et al. Global cancer

- statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] KAMIHIRA S, YAMADA Y, HIRAKATA Y, et al. Aberrant expression of caspase cascade regulatory genes in adult T-cell leukaemia: survival is an important determinant for prognosis [J]. *Br J Haematol*, 2001, 114(1): 63-69.
- [3] 马晓, 李鹤成. Clusterin在恶性肿瘤治疗中的研究进展 [J]. *肿瘤*, 2013, 33(4): 368-371.
- [4] LAKINS J, BENNETT S, CHEN J, et al. Clusterin biogenesis is altered during apoptosis in the regressing rat ventral prostate [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(43): 27887-27895.
- [5] YANG C R, LESKOV K, HOSLEY-EBERLEIN K, et al. Nuclear clusterin/XIP8, an x-ray-induced Ku70-binding protein that signals cell death [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(11): 5907-5912.
- [6] O'SULLIVAN J, WHYTE L, DRAKE J, et al. Alterations in the post-translational modification and intracellular trafficking of clusterin in MCF-7 cells during apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2003, 10(8): 914-927.
- [7] SONN C H, YU Y B, YONG Y J, et al. Clusterin synergizes with IL-2 for the expansion and IFN- γ production of natural killer cells [J]. *J Leukoc Biol*, 2010, 88(5): 955-963.
- [8] BETTUZZI S, SCORCIONI F, ASTANCOLLE S, et al. Clusterin (SGP-2) transient overexpression decreases proliferation rate of SV40-immortalized human prostate epithelial cells by slowing down cell cycle progression [J]. *Oncogene*, 2002, 27(21): 4328-4334.
- [9] MATSUDA A, ITOH Y, KOSHIKAWA N, et al. Clusterin, an abundant serum factor, is a possible negative regulator of MT6-MMP/MMP-25 produced by neutrophils [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(38): 36350-36357.
- [10] ZHAO Y, LEE W N, XIAO G G. Quantitative proteomics and biomarker discovery in human cancer [J]. *Expert Rev Proteomics*, 2009, 6(2): 115-118.
- [11] STROHMENGER H U, KRISMER A, WENZEL V. Vasopressin in shock states [J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2003, 16(2): 159-164.
- [12] GOMES W J, CARVALHO A C, PALMA J H, et al. Vasoplegic syndrome after open heart surgery [J]. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 1998, 39(5): 619-623.
- [13] LIU Y J, LIN Y F, CHEN Y F, et al. MicroRNA-449a enhances radiosensitivity in CL1-0 lung adenocarcinoma cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62383. doi: 10.1371/journal.pone.0062383. Print 2013.
- [14] MIAO L J, HUANG S F, SUN Z T, et al. MiR-449c targets c-Myc and inhibits NSCLC cell progression [J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(9): 1359-1365.
- [15] KUO P L, LIAO S H, HUNG J Y, et al. MicroRNA-33a functions as a bone metastasis suppressor in lung cancer by targeting parathyroid hormone related protein [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(6): 3756-3766.

(收稿日期: 2013-05-07 修回日期: 2013-07-17)