

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.22.002

血小板反应素 4 对肺癌细胞转移及侵袭的影响*

莫正英,王凤琴,艾淑颖

(湖北省十堰市太和医院/湖北医药学院附属太和医院肿瘤科 442000)

[摘要] 目的 探讨血小板反应素 4 (TSP-4)对肺癌细胞转移和侵袭的影响。方法 用 MTT 方法检测细胞的增殖,用 xCELLigence 系统检测细胞的迁移,用 3D 球体细胞侵袭分析试剂盒检测细胞的侵袭。结果 重组 TSP-4 水平为 10 $\mu\text{mol/L}$ 作用肺癌细胞系后,与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,细胞的增殖能力明显增强($P<0.05$);在用 10 $\mu\text{mol/L}$ TSP-4 孵育细胞 72 h 后,细胞的迁移能力显著提高($P<0.05$);加入 10 $\mu\text{mol/L}$ TSP-4 第 7 天时,细胞的侵袭能力显著提高。用 siRNA 干扰的方法,抑制 TSP-4 在细胞中的表达后,明显抑制了其侵袭、迁移和增殖的能力,且差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 TSP-4 是一种细胞外基质糖蛋白,能促进肺癌的侵袭、转移和增殖。

[关键词] 血小板反应素 4;肺肿瘤;转移;侵袭

[中图分类号] R734.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)22-3785-05

Effect of thrombospondin 4 on metastasis and invasion in lung cancer cells*

MO Zhengying, WANG Fengqin, AI Shuying

(Department of Oncology, Taihe Hospital/Affiliated Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of thrombospondin-4 (TSP-4) on the metastasis and invasion of lung cancer cells. **Methods** The cellular proliferation was detected by MTT, the xCELLigence assay was used to detect the cellular migration, and the 3D sphere cells invasion assay kit was applied to detect the cellular invasion. **Results** After recombinant TSP-4 with 10 $\mu\text{mol/L}$ level acting on the lung cancer cell line, compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ group, the cellular proliferation ability was significantly increased, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). After incubating the cells with 10 $\mu\text{mol/L}$ TSP-4, the cellular migration ability was significantly increased ($P<0.05$). On 7 d after adding 10 $\mu\text{mol/L}$ TSP-4, the cellular invasion ability was significantly increased. After inhibiting the expression of TSP-4 in cells by using the siRNA interference method, its invasion, metastasis and proliferation abilities were significantly inhibited, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** TSP-4 is an extracellular matrix glycoprotein and can promote the invasion, metastasis and proliferation of lung cancer cells.

[Key words] thrombospondin-4; lung tumor; metastasis; invasion

随着检测水平的提高,越来越多的癌症被确诊。在非传染性疾病中,癌症已经成为致死率非常高的疾病。其中肺癌在全球的发病率很高,每年大约有 180 万人被诊断为肺癌。肺癌主要分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌,其中后者占到整个肺癌患者的 80%~85%。近年来,肿瘤的治疗手段有了很大的进步,有很多新的治疗靶点被发现,但是由于肺癌具有高的侵袭性和转移性,其疗效一直不能令人满意。因此,深入研究其分子机制将极大推动新的、有效的治疗手段

的应用^[1-3]。研究证实,肿瘤微环境对肿瘤细胞的生长、侵袭及转移等生物学行为有非常大的影响作用。血小板反应素-4(TSP-4)属于基质细胞(ECM)蛋白家族成员,是一种胞外钙结合蛋白,调节细胞和基质之间的反应,在细胞侵袭、转移、黏附和结合方面发挥着重要的作用^[4-5]。现有的一些证据表明,在组织重构和生长中,TSP-4 可能发挥了重要作用。并且,在前列腺癌、乳腺癌及消化道肿瘤中发现,TSP-4 在肿瘤细胞侵袭、转移、黏附和附着中也起着重要的作

* 基金项目:国家自然科学基金青年项目(81602391);湖北省科技厅基金项目(2017CFB166);湖北省卫生计生委基金项目(WJ2015Z119)。

作者简介:莫正英(1973—),硕士,副主任医师,主要从事肿瘤疾病的诊断与治疗。△ 通信作者,E-mail:529563083@qq.com。

用^[4-5]。但是,其在肺癌中是否会导致肺癌细胞的转移和侵袭还不是很清楚。本研究研究了 TSP-4 在肺癌细胞系中的作用,通过加入重组蛋白和 siRNA 的方法证实了 TSP-4 能够促进肺癌细胞的转移和生长并且能够促进肺癌细胞的侵袭,提示 TSP-4 可能是治疗肺癌的一个潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及试剂 肺癌 A549、H292 细胞购自中国科学院上海生命科学研究所以,培养基为 RPMI-1640,含 10% 胎牛血清(美国 Gibco 公司)、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素,于 37℃、5% CO₂、95% 湿度的 CO₂ 培养箱中培养。重组 TSP-4 蛋白购自美国 Biovision 公司。siRNA 由上海吉玛生物技术有限公司设计和合成。LipofectamineTM2000 Reagent 购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 MTT 增殖实验 将经过不同水平 TSP-4 处理的 A549 及 H292 细胞以 1.5×10^5 个/毫升单细胞混悬液以 100 μ L 每孔接种于 96 孔板中,每孔 200 μ L,每组设 5 个复孔,没经过蛋白处理的细胞作为对照;将培养板置入培养箱中培养,培养结束后每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL)20 μ L,37℃继续孵育 4 h,然后每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷(DMSO),摇床振荡使结晶物充分溶解;选择 490 nm 波长,在酶标仪上检测各孔吸光度,根据后面的公式计算细胞增殖率。增殖率=(检测孔平均 A 值/对照孔平均 A 值)×100%。

1.2.2 细胞迁移实验 A549 及 H292 细胞的迁移能力用 xCELLigence 系统来检测(美国 ACEA Biosciences 公司)。将细胞用含 2% 血清的 DMEM 培养基混匀后取 200 μ L 细胞悬液轻轻加入 CIM-16 plate 的上室,且上室中加入 TSP-4,不加 TSP-4 的作为对照。在下室中加入含 10% 血清的 DMEM 培养基。细胞的迁移率通过检测上下小室的生物电阻来计算。使用 xCELLigence RTCA MP 仪器与 RTCA 软件 1.2 进行 CI 值测定,对细胞持续监测 72 h。

1.2.3 细胞侵袭实验 TSP-4 对肺癌细胞的侵袭能力通过 3D 球体细胞侵袭分析试剂盒检测。成球和侵袭基质成分的准备按照说明书的要求操作。用 DMEM 和成球基质混合细胞,在 3D 球培养板的每个孔中加入 5×10^2 个细胞,在 4℃条件下,200 g 离心 3 min。将培养板放入 37 度孵育 72 h,让球体形成。在加入侵袭基质之前,在 4℃条件下,300 g 离心 5 min。然后将培养板放入 37℃,孵育 1 h,促进侵袭胶的形成。在孔中加入 1 μ mol/L 的 TSP-4,每 48 小时

记录成球的图像。图像用 Image J 软件进行分析。

1.2.4 siRNA 干扰 靶向 TSP-4 基因的特异性 siRNA 序列为:正义链 5'-GGC AGU UCU UGG GUC AAA UTT-3',反义链 3'-AUU UGA CCC AAG AAC UGC CTT-5'。对照 siRNA 的序列为:正义链 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3',反义链 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'。合成的 siRNA 粉末溶解在 RNase Free dH₂O 中,配制成 20 mmol/L 储存液分装保存,按照转染试剂说明书进行转染。转染前 1 d,将 A549 细胞传代于 6 孔板中培养,细胞密度应能在 24 h 内使细胞汇合达到 70%~90%。按 LipofectamineTM2000 Reagent 说明书进行转染。转染后 6~8 h 更换含血清的完全培养液培养。

1.2.5 Real-time PCR 将实验分为 3 组,TSP-4-siRNA 转染组、空 siRNA(NC-siRNA)转染组及未转染组。每组至少 3 个重复。分别提取各组转染后 48 h 细胞总 RNA,总 RNA 进行反转录成 cDNA,通过实时定量 PCR 扩增目的基因。反应体系为 20 μ L,其中 SYBR Ex Taq 10 μ L,上、下游引物各 0.4 μ L,cDNA 2 μ L,ddH₂O 7.2 μ L。反应条件为:95℃预变性 30 s,95℃变性 5 s,60℃退火、延伸 20 s,反应 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析目的基因 mRNA 的相对表达水平。扩增基因的特异性引物序列为:GAPDH:5'-ATC ATC AGC AAT GCC TCC TG-3'(正向),5'-ATG GAC TGT GGT CAT GAG TC-3'(反向)TSP-4:5'-GTT GCA GAA CCT GGC ATT CAG-3'(正向),5'-CCC TGG ACC TGT CTT AGA CTT CA-3'(反向)。

1.2.6 Western blot 实验分组同上,转染 48 h 后,提取各组蛋白,测定蛋白水平。取各组等量的总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,封闭,一抗、二抗孵育后显影。所加一抗分别为 TSP-4(1:500)及 b-Actin(1:1000)。将所得结果进行分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析及 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TSP-4 对肺癌细胞增殖的影响 在 TSP-4 水平为 10 μ mol/L 的条件下,对细胞产生了最大的促进作用,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。并且随着 TSP-4 水平的增加,对细胞的促进效率也增加。

2.2 TSP-4 对肺癌细胞的迁移能力的影响 在用 TSP-4 孵育细胞 72 h 后,在 10 μ mol/L 水平条件下,能显著增强细胞的迁移($P < 0.05$)。见图 2。

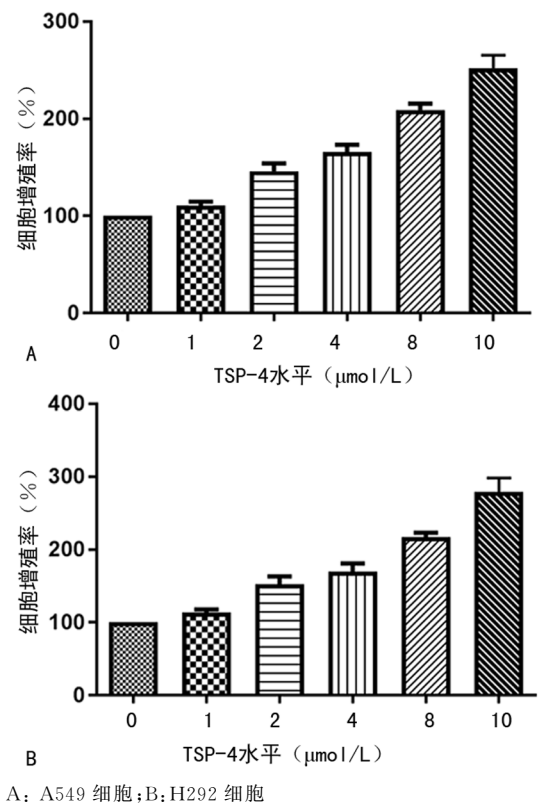


图1 TSP-4对肺癌细胞增殖的影响

2.3 TSP-4对肺癌细胞侵袭能力的影响与0

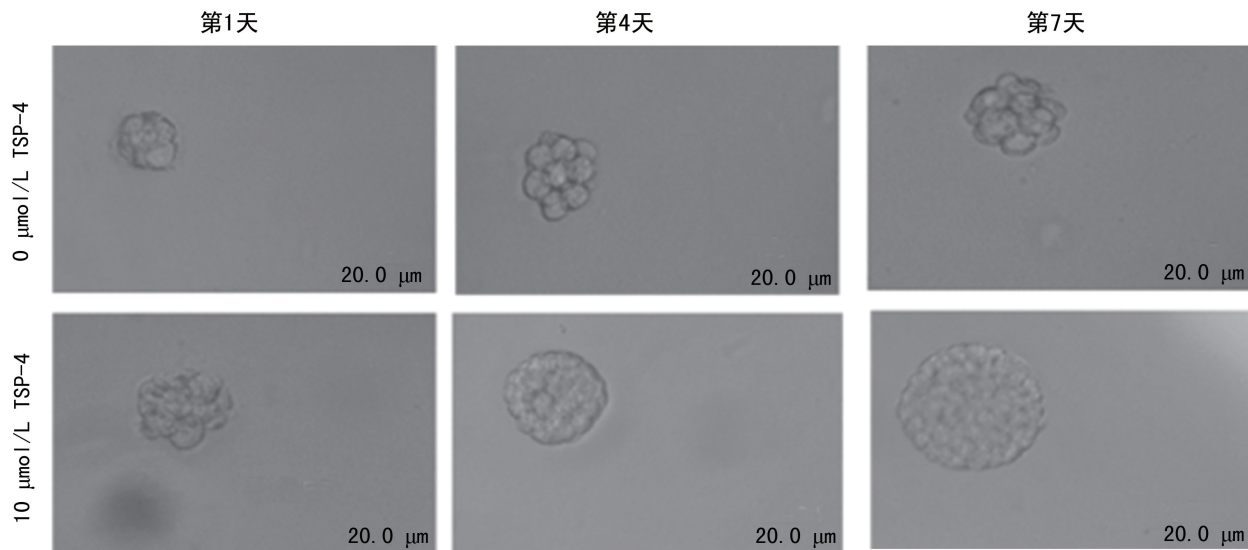


图3 TSP-4对肺癌细胞侵袭能力的影响

2.4 转染 siRNA 后 A549 细胞中 TSP-4 mRNA 水平和蛋白水平的变化 转染 48 h 后,分别提取各组 A549 细胞的 RNA 进行检测,验证其干扰效果,TSP-4-siRNA 转染组 (0.62 ± 0.09) 较 NC-siRNA 组 (1.12 ± 0.04) 及未转染组 (1.15 ± 0.07) A549 细胞中 TSP-4 mRNA 水平明显下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。转染 48 h 后,提取各组细胞的蛋白进行 Western blot 检测,TSP-4 蛋白相对表达强度各组分

别为 TSP-4-siRNA 转染组 0.30 ± 0.05 ,NC-siRNA 组 0.65 ± 0.03 ,未转染组 0.62 ± 0.04 ;与 NC-siRNA 组及未转染组比较,TSP-4-siRNA 转染组细胞中 TSP-4 蛋白水平下降。见图 4。

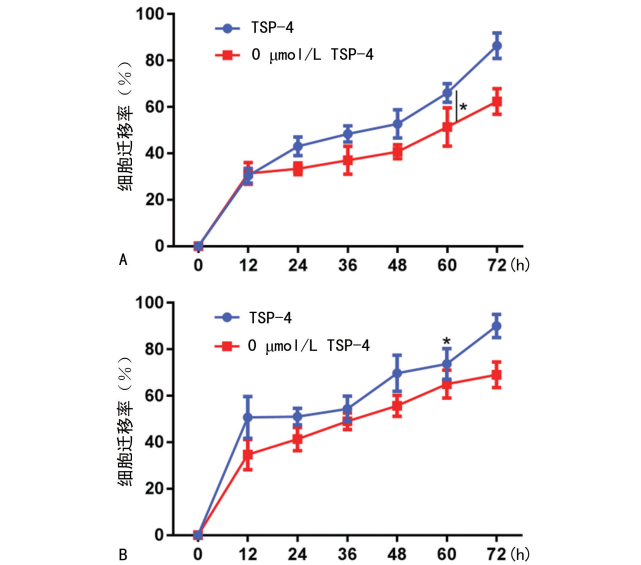
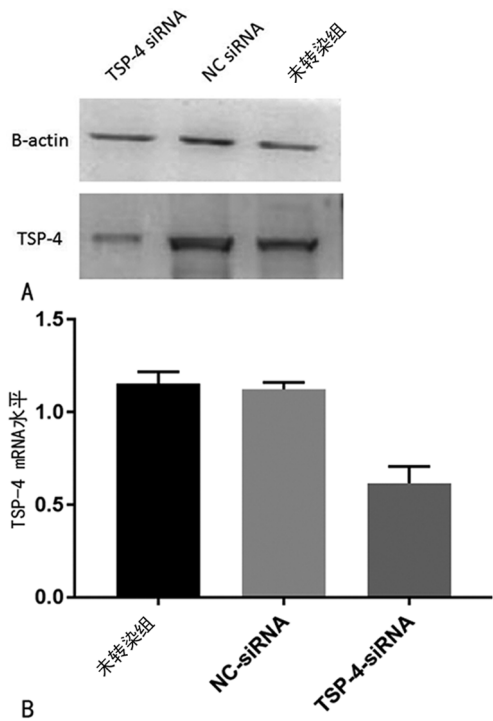


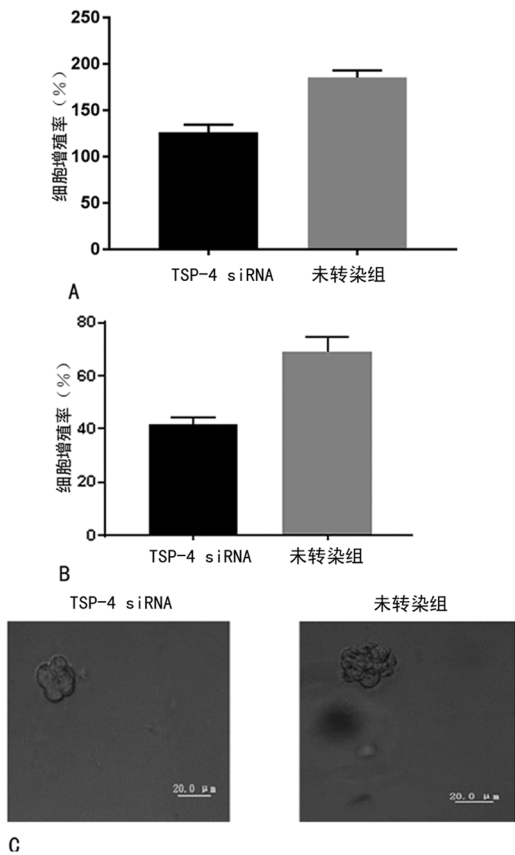
图2 TSP-4对肺癌细胞迁移能力的影响

2.5 转染 siRNA 后 A549 细胞增殖、迁移和侵袭能力的变化 转染成功后,TSP-4-siRNA 转染组对肺癌细胞的促进率 (25.30 ± 1.45)% 相对未转染组 (81.67 ± 3.76)% 明显降低,差异有统计学意义 ($P <$

0.05)。同时,转染成功后,TSP-4-siRNA 转染组对肺癌细胞的迁移和侵袭能力相对未转染组明显降低($P<0.01$)。见图 5。



A: TSP-4 基因蛋白表达水平; B: TSP-4 基因 mRNA 表达水平
图 4 转染后各组 A549 细胞 TSP-4 蛋白和 mRNA 的表达



A: 增殖影响; B: 迁移影响; C: 侵袭能力影响
图 5 转染 siRNA 后对 A549 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响

3 讨 论

肺癌在中国是常见的恶性肿瘤,且病死率很高。目前肺癌的治疗以手术切除为主,辅以放化疗等其他治疗手段,虽然在一定程度上缓解了病情,但总体的疗效不满意,复发率高,预后差。造成这种结果的原因是肺癌具有高度的侵袭性,使得肺癌细胞很容易侵袭转移到其他的组织中去。因此,研究肺癌的侵袭转移机制对指导肺癌的治疗有重要意义。

TSPs 是一类多功能蛋白质家族,参与多种生物学过程的调控^[6]。TSP-1 是第 1 个被发现的 TSPs 家族成员,参与抑制肺癌和膀胱癌中的血管生成从而抑制肿瘤生长,但在乳腺癌和胰腺癌中的作用相反^[7]。TSP-4 是结构上不同于 TSP-1 的多功能细胞基质糖蛋白,其相对分子质量为 550×10^3 ,由每端带有球型结构域的 5 个亚基组成,参与调控关键的细胞生理过程,包括细胞增殖、黏附及侵袭,细胞骨架重构,细胞与细胞的相互作用等^[8-9]。现有的研究证实,TSP-4 和肿瘤相关,尤其是在乳腺癌中研究的较多^[10-11];但是这种参与肿瘤发生的机制了解的并不是很清楚^[12],仍需要很多工作去探究。

TSP-4 参与调节肿瘤的发生、发展,尤其在一些肿瘤中能够增强肿瘤细胞的转移、侵袭及内皮细胞管的形成。LIN 等^[4]报道,在人的胃癌中,TSP-4 的表达和肿瘤大小、TNM 分期相关;MCCART 等^[5]发现,在乳腺癌胞外基质中,TSP-4 的高表达激活基质细胞的反应,促进肿瘤细胞的侵袭。但是,TSP-4 的表达水平和肺癌的发生、发展之间的关系仍然是不清楚的。本研究发现了 TSP-4 能促进肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭的能力,表明 TSP-4 在肺癌的发生、发展中起重要的作用。并且通过 siRNA 干扰技术,下调肺癌细胞中 TSP-4 的表达,观察 TSP-4 水平降低对肺癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力的影响。结果显示,TSP-4 表达明显下降,A549 细胞的侵袭、迁移和增殖能力均显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。表明抑制 TSP-4 表达可明显降低肺癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力。

肺癌的侵袭、迁移是涉及多基因改变、多因素参与的复杂生理过程^[13]。本研究中的 TSP-4 可能是参与肺癌侵袭、迁移的调控因素之一,其他的因素也参与其中。而且,TSP-4 是否参与调节肿瘤血管生成有待进一步研究证实,且其机制是否与其具有调控血管内皮细胞的增殖和迁移功能,需要进一步研究。因此,TSP-4 可能在肺癌发生和发展中起重要的作用,但确切的作用及机制还有待更多深入的研究。

参考文献

- [1] LANCET T. Lung cancer; despite advances, prevention is still best[J]. Lancet, 2016, 388(10044): 533.
 - [2] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA, 2015, 65(2): 87-108.
 - [3] HORINOUCI H. The Prospect of patritumab for treating non-small cell lung cancer[J]. Expert Opin Biol Ther, 2016, 16(12): 1549-1555.
 - [4] LIN X, HU D, CHEN G, SHI Y, et al. Associations of THBS2 and THBS4 polymorphisms to gastric cancer in a Southeast Chinese population[J]. Cancer Genet, 2016, 209(2): 215-222.
 - [5] MCCART REED AE, SONG S, KUTASOVIC JR, et al. Thrombospondin-4 expression is activated during the stromal response to invasive breast cancer[J]. Virchows Arch, 2013, 463(4): 535-545.
 - [6] KIM D J, CHRISTOFIDOU E D, KEENE D R, et al. Intermolecular interactions of thrombospondins drive their accumulation in extracellular matrix[J]. Mol Biol Cell, 2015, 26(14): 2640.
 - [7] HUANG T, WANG L, LIU D, et al. FGF7/FGFR2 signal promotes invasion and migration in human gastric cancer through upregulation of thrombospondin-1[J]. Int J Oncol, 2017, 50(5): 1501-1512.
 - [8] LIU J, CHENG G, YANG H, et al. Reciprocal regulation of long noncoding RNAs THBS4-003 and THBS4 control migration and invasion in prostate cancer cell lines[J]. Mol Med Reports, 2016, 14(2): 1451-1458.
 - [9] SU F, ZHAO J, QIN S, et al. Over-expression of thrombospondin 4 correlates with loss of miR-142 and contributes to migration and vascular invasion of advanced hepatocellular carcinoma[J]. Oncotarget, 2017, 8(14): 23277-23288.
 - [10] MUPPALA S, XIAO R, KRUKOVETS I, et al. Stenina-Adognravi O; Thrombospondin-4 mediates TGF-beta-induced angiogenesis [J]. Oncogene, 2017, 36(36): 5189-5198.
 - [11] CURTIS C, SHAH S P, CHIN S F, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups[J]. Nature, 2012, 486(3): 346-352.
 - [12] GUO Y, ZHANG Z, WU H E, et al. Increased thrombospondin-4 after nerve injury mediates disruption of intracellular calcium signaling in primary sensory neurons [J]. Neuropharmacology, 2017, 117(3): 292-304.
 - [13] HORIGUEHI H, YAMAGATA S, RONG QIAN Z, et al. Thrombospondin-1 is highly expressed in desmoplastic components of invasive ductal carcinoma of the breast and associated with lymph node metastasis[J]. J Med Invest, 2013, 60(1/2): 91-96.
- (收稿日期: 2019-06-05 修回日期: 2019-09-10)
-
- (上接第 3784 页)
- [14] PACURARI M, KAFOURY R, TCHOUNWOU P B, et al. The Renin-Angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling [J]. Int J Inflam, 2014, 2014: 689360.
 - [15] BOSSUYT J, HELMSTADTER K, WU X, et al. Ca²⁺ / calmodulin-dependent protein kinase IIdelta and protein kinase D overexpression reinforce the histone deacetylase 5 redistribution in heart failure[J]. Circulat Res, 2008, 102(6): 695-702.
 - [16] TAN M, XU X, OHBA M, et al. Angiotensin II -induced protein kinase D activation is regulated by protein kinase Cdelta and mediated via the angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24(12): 2271-2276.
 - [17] MEREDITH E L, BEATTIE K, BURGIS R, et al. Identification of potent and selective amidobipyridyl inhibitors of protein kinase D[J]. J Med Chem, 2010, 53(15): 5422-5438.
- (收稿日期: 2019-05-09 修回日期: 2019-08-08)