

非小细胞肺癌A549和H520细胞PDCD4和AP-1表达与细胞迁移的相关性研究

钟燕^{1*}, 何琴^{1*}, 范苏苏¹, 朱钰珊¹, 王应霞^{2#}, 张旋^{1#}

¹昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南 昆明

²昆明医科大学第一附属医院病理科, 云南 昆明

收稿日期: 2022年6月13日; 录用日期: 2022年7月6日; 发布日期: 2022年7月15日

摘要

目的: 研究非小细胞肺癌A549和H520细胞PDCD4和AP-1 (JunB和c-Fos)表达及其与细胞迁移的关系。方法: 体外培养非小细胞肺癌肺腺癌细胞A549和肺鳞癌细胞H520, 细胞划痕实验检测细胞迁移情况, western blot方法检测细胞PDCD4和AP-1 (JunB和c-Fos)表达情况, 比较肺腺癌细胞A549和肺鳞癌细胞H520中PDCD4和AP-1 (JunB和c-Fos)表达差异以及细胞迁移能力的差异。结果: 肺腺癌细胞A549中PDCD4蛋白表达明显低于肺鳞癌细胞H520, 而AP-1 (JunB和c-Fos)蛋白表达明显高于肺鳞癌细胞H520, 且肺腺癌细胞A549的迁移能力明显高于肺鳞癌细胞H520, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 肺腺癌细胞PDCD4蛋白表达低于肺鳞癌细胞, AP-1 (JunB和c-Fos)蛋白表达高于肺鳞癌细胞, 细胞迁移能力与PDCD4表达呈负相关, 与AP-1表达呈正相关。

关键词

非小细胞肺癌, 肺腺癌, 肺鳞癌, 程序性细胞死亡因子4, 激活蛋白-1, 迁移

Correlation between the Expression of PDCD4 and AP-1 and Cell Migration in Non-Small Cell Lung Cancer A549 and H520 Cells

Yan Zhong^{1*}, Qin He^{1*}, Susu Fan¹, Yushan Zhu¹, Yinxia Wang^{2#}, Xuan Zhang^{1#}

¹School of Pharmaceutical Sciences & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming Yunnan

*共一作者。

#通讯作者。

文章引用: 钟燕, 何琴, 范苏苏, 朱钰珊, 王应霞, 张旋. 非小细胞肺癌 A549 和 H520 细胞 PDCD4 和 AP-1 表达与细胞迁移的相关性研究[J]. 临床医学进展, 2022, 12(7): 6517-6524. DOI: 10.12677/acm.2022.127941

Abstract

Objective: To study the expression of PDCD4 and AP-1 (JunB and c-Fos) in non-small cell lung cancer A549 and H520 cells and their correlation with the migration ability of cells. **Methods:** Non-small cell lung cancer cells-lung adenocarcinoma cells A549 and lung squamous cell carcinoma cells H520 were cultured *in vitro*. Cell migration was detected by cell scratch test, and the expression of PDCD4 and AP-1 (JunB and c-Fos) was detected by Western blot. The expression difference of PDCD4 and AP-1 (JunB and c-Fos) and the difference of cell migration rate between lung adenocarcinoma cell A549 and lung squamous cell carcinoma cell H520 were compared. **Results:** The expression of PDCD4 protein in lung adenocarcinoma cell line A549 was significantly lower than that in lung squamous cell carcinoma cell line H520, while the expression of AP-1 (JunB and c-Fos) protein was significantly higher than that in lung squamous cell carcinoma cell line H520, and the migration ability of lung adenocarcinoma cell line A549 was significantly higher than that of lung squamous cell carcinoma cell line H520 ($P < 0.05$). **Conclusions:** The expression of PDCD4 protein in lung adenocarcinoma cells is lower than that in lung squamous cell carcinoma cells, and the expression of AP-1 (JunB and c-Fos) protein is higher than that in lung squamous cell carcinoma cells. The cell migration ability is negatively correlated with the expression of PDCD4 and positively correlated with the expression of AP-1.

Keywords

Non Small Cell Lung Cancer, Lung Adenocarcinoma, Lung Squamous Cell Carcinoma, Programmed Cell Death Factor 4, Activator Protein-1, Migration

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

肺癌是全球最常见的恶性肿瘤之一, 发病率高, 预后差, 全球每年死于肺癌的患者超过 100 万例, 其已成为恶性肿瘤死亡原因的第 1 位[1]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是肺癌的主要病理类型, 占有肺癌的 80%左右, 其病因并不单一且具备较高的侵袭性[2]。非小细胞肺癌早期没有显著的临床表现, 约 75%的 NSCLC 患者诊断时已为中晚期, 化疗 5 年生存率不超过 5% [3] [4]。因此, 研究肺癌相关的重要基因及关键信号通路, 有助于进一步揭示肺癌的发病机制, 对肺癌的防治意义重大。

程序性细胞死亡因子 4 (PDCD4)是一种细胞凋亡相关基因, 研究发现其在肾脏、肺脏、乳腺等肿瘤细胞系中表达降低或缺失, 且在肺癌组织中缺失率高达 83% [5] [6]。但 PDCD4 在肺癌中的确切功能和具体分子机制目前尚不清楚。激活蛋白-1 (activator protein-1, AP-1)是具有广泛作用的早期基因编码核转录因子[7]。Jun 蛋白(c-Jun、JunB、JunD)和 Fos 蛋白(c-Fos、FosB、Fra-1、Fra-2)构成的同异源二聚体是最为典型的 AP-1 [8]。AP-1 的活化不仅与细胞的增殖、分化、肿瘤转化有关, 还可以从多个环节上促进肿瘤的浸润转移[9]。

MicroRNA (miRNA)是一类内源性非编码单链 RNA, 参与细胞生长、发育和凋亡等重要生物过程。miR-21 是普遍存在的致癌基因, 在许多肿瘤包括肺癌、肝癌中都检测出较高表达[10]。研究发现, PDCD4 是 miR-21 的直接靶基因, 肺小细胞肺癌中 miR-21 的表达与 PDCD4 呈负相关[11]。并且 AP-1 活化能够上调 miR-21 表达, 而 miR-21 介导的 PDCD4 下调是 AP-1 活化的必要条件[12]。因此, 猜想 PDCD4/AP-1 形成的自我调节环路在肺癌的发展、侵袭、转移中可能发挥重要作用。所以本研究旨在体外细胞水平观察非小细胞肺癌细胞 PDCD4 与 AP-1 表达情况及其与细胞迁移能力的相关性。

2. 材料和方法

2.1. 细胞系与主要试剂

人非小细胞肺癌细胞株 A549 (批号: 9S6LY48FOY)、H520 (货号: CL-0402)购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) (批号: 2130209)、DMEM/F12 (1:1)培养基(批号: 2203019)、RPMI1640 培养基(批号: 2208047)、购自 BI 公司, RIPA、PMSF 蛋白裂解液(增强型) (批号: 20211104)、SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒(批号: 121821211221)购自碧云天, PDCD4 (批号: 5)、c-Fos (批号: 11)、JunB (批号: 2)一抗购自美国 CST 公司, β -actin (批号: 10021293)一抗、HRP 标记的抗鼠(批号: 20000487)、抗兔二抗(批号: 20000455)购自 Proteintech 公司。

2.2. 细胞培养

将 A549 细胞和 H520 细胞复苏后, 分别转入含 10% FBS、体积比为 1% 的青 - 链霉素溶液的 DMEM/F12 培养基和 RPMI1640 培养基中, 于 37°C、5% CO₂ 培养箱内培养并观察细胞形态。A549 细胞每 1~2 d 传代一次, H520 细胞每 2~3 d 传代一次, 取对数生长期细胞用于实验。

2.3. 细胞划痕实验

将 A549 细胞按 3.5×10^5 /孔、H520 细胞按 5×10^5 /孔接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 于 37°C、5% CO₂ 培养箱内培养 24 h, 待细胞生长至 100% 基本融合时, 用 100 μ L 枪头在 6 孔板细胞表面划 1 条平行线, 并用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤以去除漂浮细胞, 细胞分组为 A549 正常组和 H520 正常组, 每个细胞设 3 个副孔, 分别于 0, 24, 48 h 时采用倒置相差显微镜观察各组细胞迁移情况, 并在 100 倍条件下拍照, 照片使用 ImageJ 软件处理, 计算空白区域面积并计算细胞迁移率, 细胞。

2.4. Western Blot 检测 PDCD4、c-Fos、JunB 相关蛋白的表达

将 A549 和 H520 细胞分别按 2×10^5 /孔接种于六孔板, 每孔 2 ml, 待细胞铺满六孔板 90% 左右, RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, 用 BCA 法测定蛋白浓度后, 取一定量细胞上清和 5 \times 蛋白上样缓冲液按 4:1 混合, 100°C 水浴变性 10 min; 按 20 μ g 蛋白统一上样量, 电泳, 浓缩胶恒压 80 V 25 min, 分离胶恒压 120 V 90 min; 采用湿转法转膜, 恒流 300 mA 电转 90 min;

10% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 一抗(1:1000)及 β -actin 鼠抗人单克隆抗体(1:5000), 4°C 孵育过夜, TBST 洗膜(3 次, 每次 10 min); 次日二抗室温孵育 1.5 h, TBST 洗膜(3 次, 每次 10 min), 用 ECL 化学发光液显影。

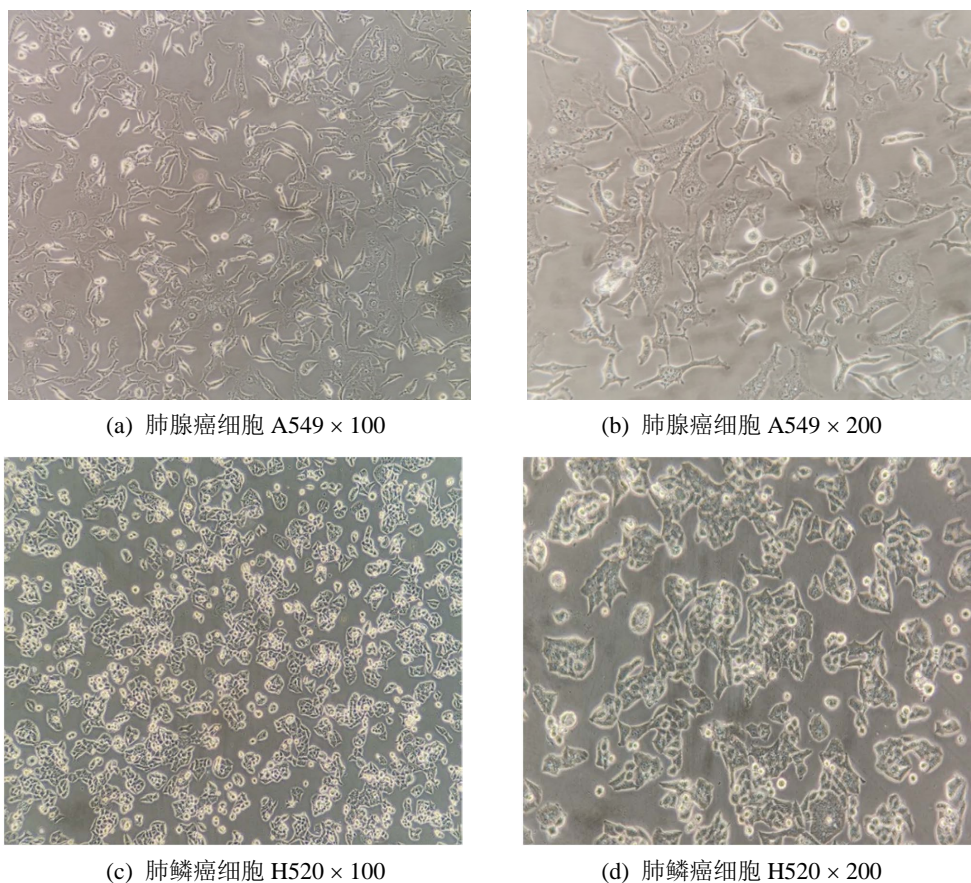
2.5. 统计学方法

本次实验数据均采用 SPSS22.0 统计分析软件进行统计学分析, 计量资料均以均数 \pm 标准差表示, 组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 肺腺癌细胞 A549 和肺鳞癌细胞 H520 细胞形态

肺腺癌细胞 A549 和肺鳞癌细胞 H520 均为贴壁细胞, A549 为长梭形或鹅卵石样多边形的上皮细胞, 排列整齐规则; 而 H520 为类圆形、长圆形或多边形上皮细胞, 细胞排列紧密, 聚集成团生长。(图 1)



(a) (b) A549 细胞呈长梭形或鹅卵石样多边形, 细胞排列规则; (c) (d) H520 细胞呈类圆形、长圆形或多边形, 细胞排列紧密, 聚集成团生长。

Figure 1. Morphology of non-small cell lung cancer cells A549 and H520

图 1. 非小细胞肺癌 A549 和 H520 细胞形态

3.2. 非小细胞肺癌 A549 和 H520 细胞迁移情况

通过细胞划痕实验来比较非小细胞肺癌 A549 和 H520 细胞迁移情况。结果如图 2、图 3、表 1 所示, 随着时间的推移, 肺腺癌细胞 A549 和肺鳞癌细胞 H520 的细胞迁移率均呈增长趋势, 且在划痕后 24 小时和 48 小时, 腺癌细胞 A549 的迁移率明显高于鳞癌细胞 H520, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 表明腺癌细胞的迁移能力明显强于鳞癌细胞。

3.3. PDCD4、AP-1 蛋白表达情况

如图 4、图 5 所示, 肺鳞癌细胞 H520 中 PDCD4 蛋白表达水平明显高于肺腺癌细胞 A549, 而 AP-1 (JunB 和 c-Fos) 蛋白表达水平明显低于肺鳞癌细胞 H520, 差异有统计学意义($P < 0.001$)。

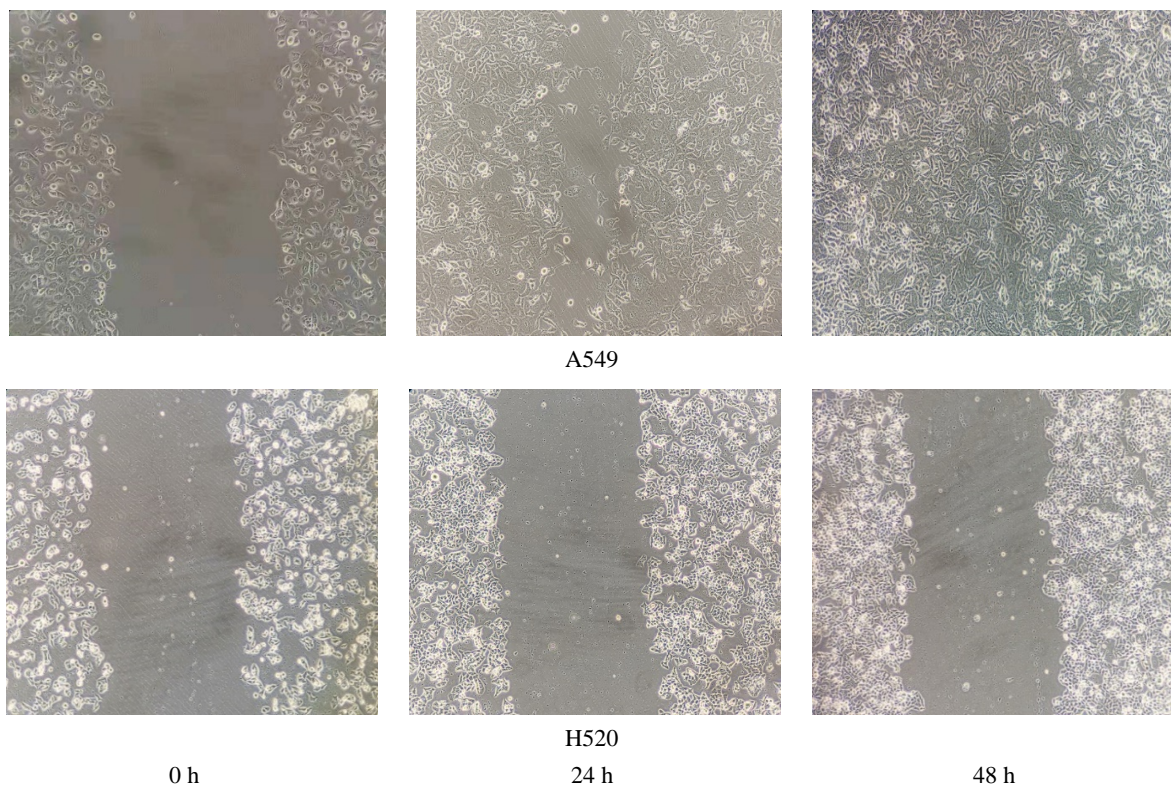


Figure 2. Migration of non-small cell lung cancer cells A549 and H520 (×100)

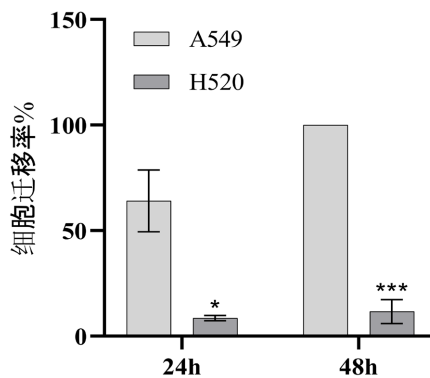
图 2. 非小细胞肺癌 A549 和 H520 细胞迁移情况(×100)

Table 1. Migration rate of non-small cell lung cancer cells A549 and H520

表 1. 非小细胞肺癌 A549 和 H520 细胞迁移率

组别	细胞迁移率(%)	
	24 h	48 h
A549	64.1 ± 14.6	100.0 ± 0.0
H520	8.4 ± 1.3*	11.6 ± 5.7***

与 A549 组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。



与 A549 组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

Figure 3. Migration rate of non-small cell lung cancer cells A549 and H520

图 3. 非小细胞肺癌 A549 和 H520 细胞迁移率

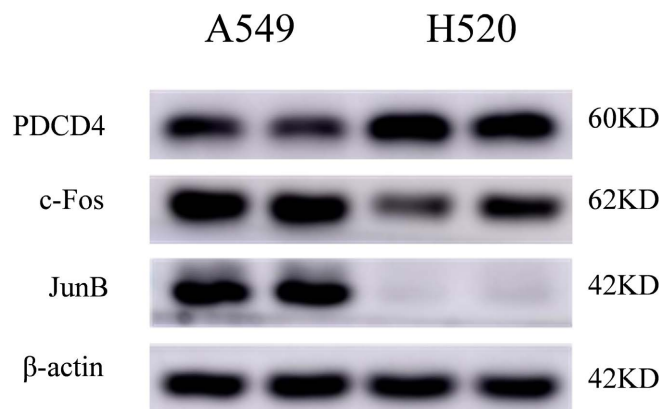
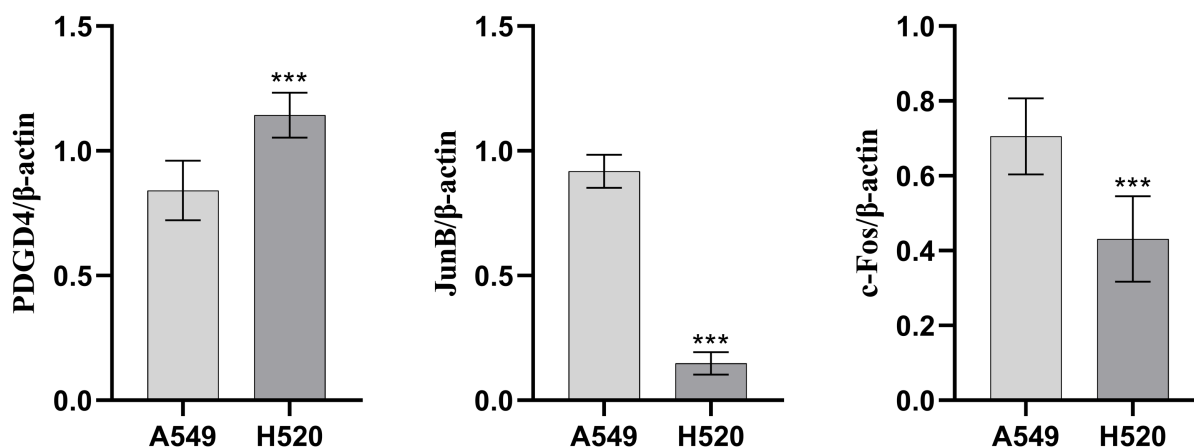


Figure 4. Expression of PDCD4 and AP-1 (c-Fos and JunB) in non-small cell lung cancer cells A549 and H520
图 4. 非小细胞肺癌 A549 和 H520 细胞 PDCD4 和 AP-1 (c-Fos 和 JunB) 表达情况



与 A549 组比较, *** $P < 0.001$ 。

Figure 5. Expression levels of PDCD4 and AP-1(c-Fos and JunB) in non-small cell lung cancer cells A549 and H520
图 5. 非小细胞肺癌 A549 和 H520 细胞 PDCD4 和 AP-1 表达水平

4. 讨论

目前非小细胞肺癌的发病率和死亡率仍呈上升趋势, 其治疗是世界范围内亟待解决的难题[13]。非小细胞肺癌临床上多采用化疗疗法, 而长期服用化学药物, 一些患者不可避免地会出现多种不良反应及耐药性, 使得患者生命健康及生存质量下降[14]。所以, 发现肺癌早期标志物和新的干预靶点能够为肺癌治疗提供新的策略。

腺癌和鳞癌是两类主要的非小细胞肺癌, 单从细胞生长特性而言, 腺癌细胞生长速度快, 鳞癌细胞生长速度相对较慢。腺癌浸润和转移能力强, 一般原发病灶较小时即可出现转移, 肺腺癌常常伴随有癌性淋巴管炎和远处转移, 而鳞癌发生远处转移的时间相对较晚。本研究通过划痕实验也证实了腺癌细胞 A549 的细胞迁移率明显高于鳞癌细胞 H520 细胞。

PDCD4 是一种抑癌基因, 其表达水平与肿瘤细胞增殖、侵袭和迁移呈负相关。研究发现, miR-21 能够靶向抑制 PDCD4 表达, 促进肺腺癌细胞 A549 细胞的增殖与迁移能力, 表明 PDCD4 是 miR-21 的负性调控基因, PDCD4 表达水平与肺腺癌细胞 A549 细胞的增殖与迁移能力呈负相关[15]。本研究发现, 与鳞癌细胞 H520 细胞比较, 肺腺癌细胞 A549 细胞中 PDCD4 蛋白表达水平较低, 这与其较高的细胞迁移率呈负相关。

AP-1 是一类型原癌基因, 主要是由 Jun 蛋白(c-Jun、JunB、JunD)和 Fos 蛋白(c-Fos、FosB、Fra-1、Fra-2)构成的同源或异源二聚体。JUN 及 FOS 蛋白高表达为肺癌频发早期事件, 可诱导癌基因表达, 参与细胞恶性转化[16]。同时, AP-1 也是 miR-21/PDCD4/AP-1 反馈环路中的关键环节, 参与肺癌的发生发展。研究发现, 在非小细胞肺癌组织中 c-Fos/AP-1 表达阳性率明显高于癌旁组织, 与肺癌淋巴结转移有关[17]。上皮-间质转化(EMT)是指上皮细胞在特定的生理或病理状况下向间质细胞表型转变的过程。研究发现, EMT 与肺癌的侵袭、转移及化疗耐药相关[18]。JunB/AP-1 是上皮-间质转化(EMT)重要转录调节因子之一, m6A 甲基转移酶 METTL3 可通过调节 JunB/AP-1, 促进 TGF- β 诱导的肺癌细胞 EMT [19]。本研究发现, 肺腺癌细胞 A549 细胞中 AP-1 (JunB 和 c-Fos)蛋白表达水平均明显高于肺鳞癌细胞 H520 细胞, AP-1 (JunB 和 c-Fos)高表达与其高细胞迁移率呈正相关。

总之, 我们发现肺腺癌细胞 PDCD4 蛋白表达低于肺鳞癌细胞, AP-1 (JunB 和 c-Fos)蛋白表达高于肺鳞癌细胞, 腺癌细胞迁移能力高于鳞癌细胞, 表明细胞迁移能力与 PDCD4 表达呈负相关, 与 AP-1 表达呈正相关。但 miR-21/PDCD4/AP-1 反馈环路如何调节非小细胞肺癌的增殖、迁移和侵袭有待进一步深入研究。

5. 研究局限性

本研究仅是选择了 AP-1 家族中具有代表性的两个蛋白 JunB 和 c-Fos 来探讨非小细胞肺癌 A549 和 H520 细胞中 AP-1 表达差异及其与细胞迁移的相关性, 下一步将研究 AP-1 其他蛋白表达差异, 并采用相关抑制剂来阻断 miR-21/PDCD4/AP-1 反馈环路, 深入探讨 miR-21/PDCD4/AP-1 反馈环路影响非小细胞肺癌增殖、迁移和侵袭的作用机制。

基金项目

云南省科技厅——昆明医科大学应用基础研究面上基金资助项目(2019FE001-220); 云南省教育厅科学基金资助项目(2018JS202)。

参考文献

- [1] Zhang, Y., Ren, J.S., Huang, H.Y., Shi, J.F., Li, N., Zhang, Y., *et al.* (2018) International Trends in Lung Cancer Incidence from 1973 to 2007. *Cancer Medicine*, **7**, 1479-1489. <https://doi.org/10.1002/cam4.1359>
- [2] 苏艳云, 邵月山. 非小细胞肺癌靶向治疗的研究进展[J]. 中国城乡企业卫生, 2022, 37(3): 55-57.
- [3] Cao, W.B., Wei, M., Li, B., Liu, Y., Lu, Y., Tang, Z., *et al.* (2016) Functional Role of Eukaryotic Translation Initiation Factor 4 γ 1(EIF4G1) in NSCLC. *Oncotarget*, **7**, 24242-24251. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8168>
- [4] Ye, Z.C., Huang, Y.M., Ke, J., Zhu, X., Leng, S. and Luo, H. (2021) Breakthrough in Targeted Therapy for Non-Small-Cell Lung Cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **133**, Article ID: 111079. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111079>
- [5] Wu, Y., Zhu, X., Shen, R., Huang, J., Xu, X. and He, S. (2019) miR-182 Contributes to Celladhesion-Mediated Drug Resistancin Multiple Myeloma via Targeting PDCD4. *Pathology - Research and Practice*, **215**, Article ID: 152603. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152603>
- [6] Hao, Y.J., Huang, J.W., Ma, Y., Chen, W., Fan, Q., Sun, X., *et al.* (2018) Asiatic Acid Inhibits Proliferation, Migration and Induces Apoptosis by Regulating Pdc4 via the PI3K/Akt/mTOR/p70S6K Signaling Pathway in Human Colon Carcinoma Cells. *Oncology Letters*, **15**, 8223-8230. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8417>
- [7] Rylski, M. and Kaczmarek, L. (2004) Ap-1 Targets in the Brain. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, **9**, 8-23. <https://doi.org/10.2741/1207>
- [8] Shaulian, E. and Karin, M. (2002) AP-1 as a Regulator of Cell Life and Death. *Nature Cell Biology*, **4**, E131-E136. <https://doi.org/10.1038/ncb0502-e131>
- [9] Eferl, R. and Wagner, E.F. (2003) AP-1: A Double-Edged Sword in Tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*, **3**, 859-868. <https://doi.org/10.1038/nrc1209>

-
- [10] Alder, H., Taccioli, C., Chen, H., Jiang, Y., Smalley, K.J., Fadda, P., *et al.* (2012) Dysregulation of miR-31 and miR-21 Induced by Zinc Deficiency Promotes Esophageal Cancer. *Carcinogenesis*, **33**, 1736-1744. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs204>
- [11] Fischer, N., Goke, F., Splittstosser, V., Lankat-Buttgereit, B., Müller, S.C. and Ellinger, J. (2012) Expression of Programmed Cell Death Protein 4 (PDCD4) and miR-21 in Urothelial Carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **417**, 29-34. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.035>
- [12] 朱潇鹏, 徐庆福, 吕胜青. miR-21 与 AP-1 构成的自我调节环路在脑胶质瘤中的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学志, 2013, 40(4): 387-390.
- [13] 林小峰, 陈龙. 晚期非小细胞肺癌化疗现状及进展[J]. 广西医科大学学报, 2019, 36(5): 850-855.
- [14] Santarpia, M., Liguori, A., Karachaliou, N., Gonzalez-Cao, M., Daffinà, M.G., D'Aveni, A., *et al.* (2017) Osimertinib in the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer: Design, Development and Place in Therapy. *Lung Cancer*, **8**, 109-125. <https://doi.org/10.2147/LCTT.S119644>
- [15] 李明, 裴晓宁, 岳恺, 木亚林, 张成辉. miR-21 靶向 PDCD4 调控非小细胞肺癌 A549 细胞的增殖与迁移[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2021, 28(4): 332-338.
- [16] 罗麟洁, 王鸿程. JUN 和 FOS 在非小细胞肺癌中的表达及其与 STAT 关系的研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2008, 28(13): 818-821.
- [17] 陈娟, 毕明宏, 高振远, 王雅萍. COX-2 和 c-Fos 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)学报, 2018, 39(11): 1248-1250.
- [18] 张满, 特木热, 郭占林. 上皮间质转化(EMT)与肺癌的关系[J]. 内蒙古医学杂志, 2014, 46(12): 1472-1474.
- [19] Wanna-Udom, S., Terashima, M., Lyu, H., Ishimura, A., Takino, T., Sakari, M., *et al.* (2020) The m6A Methyltransferase METTL3 Contributes to Transforming Growth Factor-Beta-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition of Lung Cancer Cells through the Regulation of JUNB. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **524**, 150-155. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.01.042>