

Napsin A 基因对 A549 细胞在上皮 - 间质转化中增殖的影响及其机制

管淑红¹ 郑金旭^{2*} 许清² 汤艳² 刘继柱² 吕晓婷²

(¹ 江苏大学基础医学与医学技术学院, 镇江 212013; ² 江苏大学附属医院呼吸科, 镇江 212001)

摘要 采用慢病毒载体质粒 PLJM1 将 *Napsin A* 基因转染到人肺腺癌细胞——A549 细胞中, 获得稳定表达 *Napsin A* 蛋白的特性并鉴定, 通过转化生长因子- β 1 刺激 A549 细胞发生上皮 - 间质转化, 体外构建上皮 - 间质转化模型并鉴定。MTT 法检测转基因前后 A549 细胞在上皮 - 间质转化过程中生长速率的变化; 流式细胞术检测其细胞周期的改变, 最后予 Western blot 检测黏着斑激酶的表达情况, 探讨 *Napsin A* 基因对 A549 细胞在上皮 - 间质转化过程中增殖的影响及其机制。结果表明转染后的 A549 细胞表达 *Napsin A* 蛋白明显增加($P < 0.01$); A549 细胞发生上皮 - 间质转化后细胞 E 钙蛋白表达下调($P < 0.01$), I 型胶原表达上调($P < 0.01$); 转基因细胞在体外上皮 - 间质转化模型中增殖速度减慢($P < 0.05$), 且细胞周期被阻滞在 G₁ 期($P < 0.01$), 其表达整合素信号传导通路的基础分子——黏着斑激酶的量显著下降($P < 0.01$)。提示 *Napsin A* 基因可以抑制 A549 细胞在上皮 - 间质转化过程中的进一步增殖, 其机制可能与抑制整合素信号传导通路有关。

关键词 *Napsin A*; A549 细胞; 上皮 - 间质转化; 增殖; 黏着斑激酶

上皮来源的肿瘤细胞常常通过自身上皮-间质转化(EMT)获得更强的侵袭和增殖能力, 促使肿瘤病情进一步恶化。1998 年, Tatnell 等^[1]首次发现了天门冬氨酸蛋白酶家族中的一个新成员——*Napsin A*。目前研究 *Napsin A* 的功能有: 具有蛋白水解酶的作用; 参与肺、肾、脾等脏器发育成熟; 在肺内, 它还参与了表面活性物质的合成。Ueno 等^[2]研究表明 *Napsin A* 不仅在正常肺组织的 II 型肺泡上皮细胞中有显著表达, 在异常增生的 II 型肺泡上皮细胞、肺腺癌中也有表达。他们将 *Napsin A* 基因转染给人胚胎肾 HEK293 细胞, 并进行体内外实验, 发现细胞增殖和迁移能力均受到显著抑制。2007 年郭峰等^[3]曾检测正常肺组织以及不同恶化程度的肺腺癌组织分泌 *Napsin A* 蛋白的情况, 发现其分泌量与细胞恶化程度呈负相关, 提示 *Napsin A* 的缺失可能是细胞恶化的原因之一。但是有诸多疑问尚未明确, 如 *Napsin A* 缺失后细胞为什么容易恶性转化、其基因转染后如何抑制细胞增殖等, 这些均需要进一步研究, 并对了解 *Napsin A* 在肿瘤发生发展中的作用具有重要意义。本实验主要目的是了解 *Napsin A* 基因对 A549 细胞在 EMT 过程中增殖的影响并探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞来源及培养方法

人肺腺癌细胞株 A549 细胞(中国科学院上海细胞研究所), 培养于含 10% 小牛血清、双抗(青霉素 100 U/ml、链霉素 100 U/ml)的 RPMI1640 培养基中, 置 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 每 2~3 d 传代 1 次并随时观察细胞形态。

1.2 主要试剂

带有 *Napsin A* 基因的质粒(武汉三鹰公司), PCR 引物(上海生工), PCR 反应液纯化试剂盒(Promega), 载体质粒 PLJM1(Addgene), Taq 酶、EcoR I 和 Nhe I (TaKaRa), RT-PCR 试剂盒(Invitrogen), 酶切产物纯化试剂盒(Omega 和 TaKaRa), T4 连接酶(Promega), 质粒抽提试剂盒(Tiagen), Lipofectamine 2000TM (Invitrogen), MTT(Sigma), 抗 *Napsin A* 多克隆抗体(Sigma), 抗黏着斑激酶(FAK)多克隆抗体(Neomar-

收稿日期: 2010-07-05 接受日期: 2010-10-15

卫生部科研项目(No.wkj2006-2-026)和江苏省“333 工程”(苏人办 2007-16-09)资助项目

* 通讯作者。Tel: 13338812088, E-mail: jxuzh135@163.com

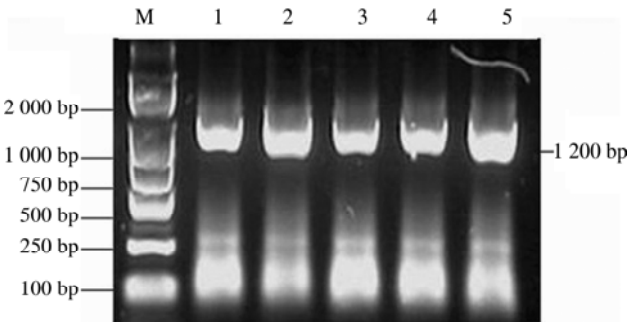


图 1 重组质粒 PCR 鉴定结果
Fig.1 Identification result of PCR

kers), 转化生长因子- β 1(TGF- β 1) (R&D), 抗 E 钙蛋白抗体、抗 I 型胶原抗体和辣根酶标记羊抗小鼠 IgG(武汉博士德)。

1.3 稳定转染 *Napsin A* 基因的 A549 细胞系的建立

1.3.1 重组慢病毒质粒(PLJM1- *Napsin A*)的构建
以带有 *Napsin A* 基因的质粒为模板, PCR 反应扩增 *Napsin A* 基因, 纯化酶切后连接到同样酶切后的载体质粒 PLJM1 上, 转化至大肠杆菌 *E.coli* XL-blue 感受态细胞, 挑取 5 个单克隆进行 PCR 鉴定。选取阳性克隆抽提质粒, 送测序。

1.3.2 A549-PLJM1-*Napsin A* 稳定转染细胞系的建立
以 Lipofectamine 2000TM 细胞转染试剂盒将 PLJM1-*Napsin A* 转染给包装细胞 293T 细胞, 收集 293T 细胞的病毒悬液并感染 A549 细胞, A549 细胞长满后按 1:10 传代, 用嘌呤霉素筛选, 最终得到 A549-PLJM1-*Napsin A* 的稳定细胞株。同时建立空载体转染 A549 细胞系(A549-PLJM1)。Western blot

方法鉴定转基因细胞 *Napsin A* 蛋白的表达。

1.4 细胞分组和处理

细胞分 3 组: (1) A549: 正常 A549 细胞; (2) A549-PLJM1: 空载体转染 A549 细胞; (3) A549-PLJM1-*Napsin A*: 转 *Napsin A* 基因的 A549 细胞。每组细胞均置于两种培养基中培养: RPMI1640 培养基和含 5 ng/ml TGF- β 1 的 RPMI1640 培养基。后者培养基中含有的 TGF- β 1 刺激细胞发生 EMT, 构建体外 EMT 模型, 并在倒置显微镜下观察细胞形态学的变化。

1.5 Western blot 检测 3 组 A549 细胞 EMT 前后 E 钙蛋白和 I 型胶原的表达

分别取 3 组 A549 细胞和接受 TGF- β 1 干预后第 7 d 的 3 组 A549 细胞 2×10^6 个, 提取细胞全蛋白并 Bradford 定量, SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳, 转膜, BSA 封闭, 分别加一抗(均为 1: 400 稀释)和二抗(1:5 000 稀释), 摇荡孵育, 加入 ECL 化学发光显示剂, 室温下反应 5 min 后, Taiphone 扫描结果, Gene Snap/Gene Tool 软件分析蛋白条带。

1.6 MTT 法绘制细胞生长曲线

取 3 组未接受 TGF- β 1 处理的对数生长期细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化后计数按每孔 2×10^4 个细胞接种于 96 孔培养板, 每组设 5 个平行孔, 置含 5 ng/ml TGF- β 1 的 RPMI1640 培养基中培养。连续 5 d, 每天取出一块培养板, 使用 MTT 法检测, 在酶标仪 570 nm 处测各孔吸光度(A)值, 以时间为横坐标, 取相对生长速率为纵坐标绘制生长曲线。

1.7 流式细胞术检测 *Napsin A* 对细胞周期的影响

3 组均取接受 TGF- β 1 干预后第 7 d 的对数生长期

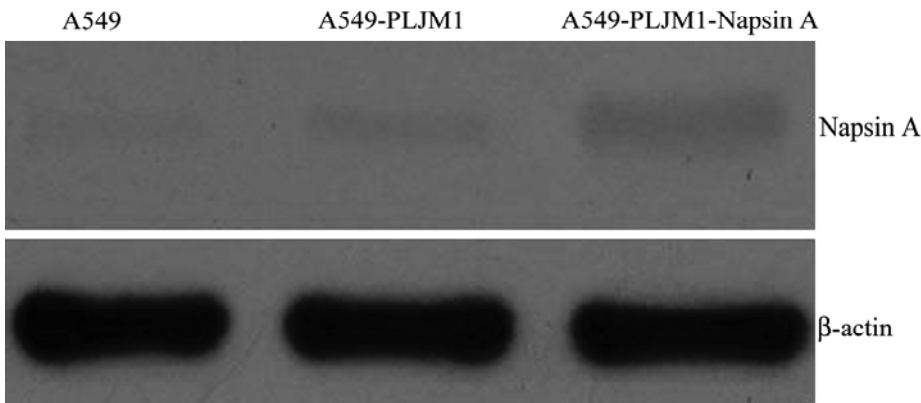


图 2 3 组细胞表达 *Napsin A* 蛋白 Western blot 电泳图
Fig.2 The expression of *Napsin A* protein detected by Western blot

表 1 3 组细胞表达 Napsin A 蛋白 Western blot 泳带相对灰度值
Table 1 The expression of Napsin A protein detected by Western blot

<i>n</i>	组别(Groups)		
	A549	A549-PLJM1	A549-PLJM1-Napsin A
1	0.014	0.027	0.105
2	0.026	0.038	0.084
3	0.035	0.024	0.067
$\bar{x} \pm s$	0.025±0.011	0.029±0.008	0.085±0.019*
<i>F</i>		18.829	
<i>P</i>		0.003	

A549-PLJM1-Napsin A 组与 A549 组和 A549-PLJM1 组比较, * $P < 0.01$ 。

A549-PLJM1-Napsin A compared with A549 and A549-PLJM1, * $P < 0.01$.

细胞,经胰酶消化,制成单细胞悬液,PBS洗2次,70%冷乙醇固定,碘化丙啶(PI)染色,上样于流式细胞仪。

1.8 Western blot 检测 FAK 蛋白的表达

分别取置于两种培养基中培养至第7 d的3组对数生长期细胞,胰酶消化后每组取 2×10^6 个细胞,提取细胞全蛋白后行 FAK 蛋白检测(方法同 1.5)。

1.9 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件,各组数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示;组间比较采用单因素方差分析,多个样本之间的两两比较采用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 重组质粒 PLJM1-Napsin A 鉴定

PCR 鉴定结果为所选取的 5 个克隆均能扩增出 Napsin A mRNA 条带,大小在 1.2 Kb 左右(图 1);测序

结果:经自动基因测序仪测序(上海生工),结果与设计序列完全符合,所含目的基因序列准确无误,重组质粒构建成功。

2.2 转基因细胞表达 Napsin A 蛋白鉴定

经灰度扫描, A549 组和 A549-PLJM1 组 Napsin A 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$),而在 A549-PLJM1-Napsin A 组 Napsin A 蛋白表达量比 A549 组及 A549-PLJM1 组明显增高($P < 0.01$)(图 2 和表 1),提示转 Napsin A 基因 A549 细胞株成功构建并获得稳定表达。

2.3 细胞形态

3 组细胞于 TGF- β 1 刺激后,体外诱导 A549 细胞发生了 EMT,倒置显微镜下观察发现 A549 细胞由原来上皮细胞的鹅卵石状(图 3A)变为梭形并继续变细长,部分细胞可见轴突样结构,在第 7 d 完全演变为间质细胞形态(图 3B)。

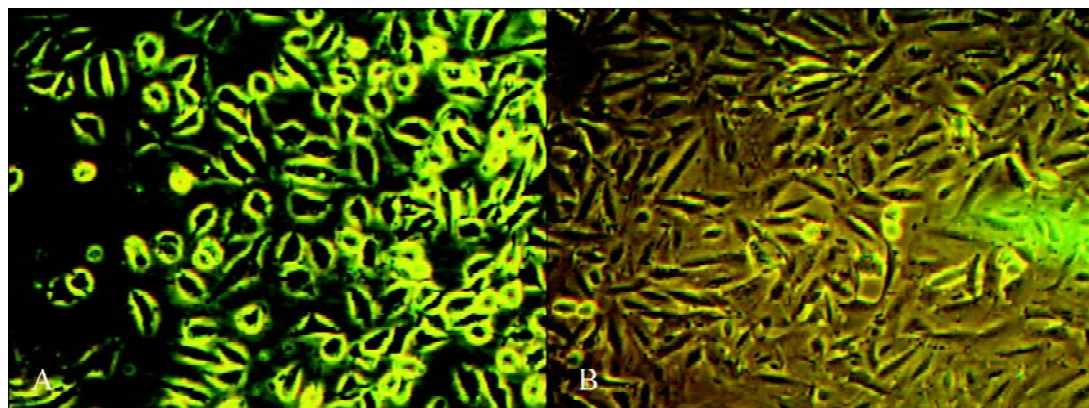


图 3 TGF- β 1 刺激前后 A549 细胞形态学变化(100×)

A: 不予 TGF- β 1 刺激时 A549 的细胞形态; B: 5 ng/ml TGF- β 1 刺激 7 天的细胞形态。

Fig.3 Morphological change of A549 cells induced by TGF- β 1(100×)

Morphology of A549 cells without TGF- β 1 treatment (A) or treated with 5 ng/ml TGF- β 1 for 7 days (B) were detected by invert microscope.

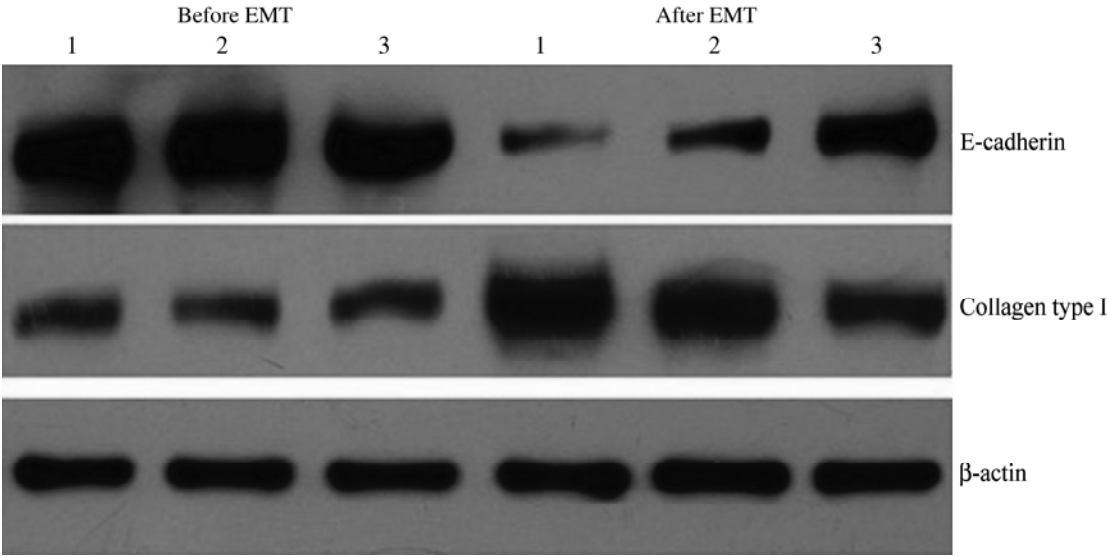


图 4 3 组细胞 EMT 前后表达 E 钙蛋白和 I 型胶原 Western blot 电泳图

1: A549; 2: A549-PLJM1; 3: A549-PLJM1-Napsin A。

Fig.4 The expression of E-cadherin and collagen type I detected by Western blot

1: A549; 2: A549-PLJM1; 3: A549-PLJM1-Napsin A.

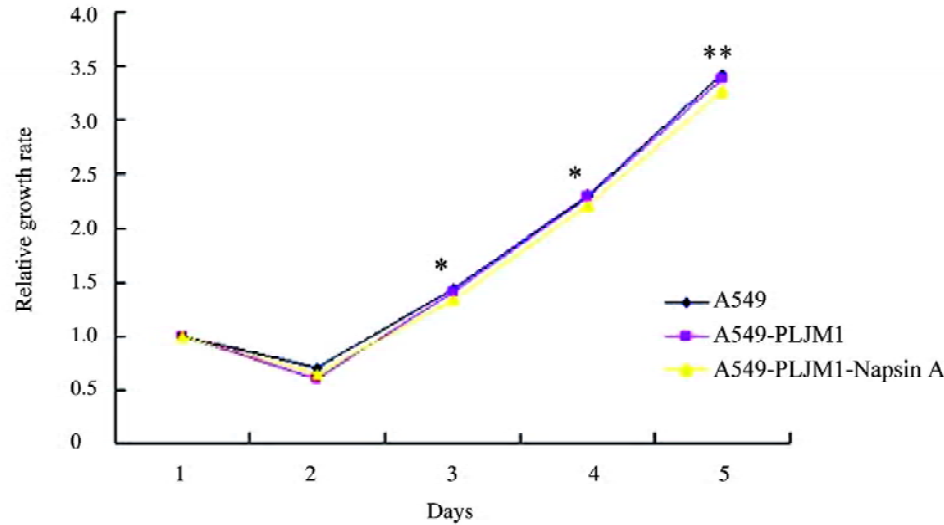


图 5 细胞生长曲线

A549-PLJM1-Napsin A 组与 A549 组和 A549-PLJM1 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

Fig.5 Effect of Napsin A on TGF- 1 induced A549 cells proliferation

A549-PLJM1-Napsin A compared with A549 and A549-PLJM1, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

2.4 Western blot 检测 3 组细胞 EMT 前后 E 钙蛋白和 I 型胶原的表达

E 钙蛋白在 A549 细胞 EMT 后表达明显下调 ($P<0.01$), I 型胶原表达则显著上调 ($P<0.01$)(图 4), 提示体外构建 A549 细胞 EMT 模型成功。

2.5 细胞生长速率曲线

MTT 结果表明, 与 A549 组和 A549-PLJM1 组相比, A549-PLJM1-Napsin A 组细胞增殖速度明显变慢。Napsin A 对 A549 细胞增殖的影响从第 3 d 开始具有统计学意义 ($P<0.05$), 至第 5 d 差异进一步明

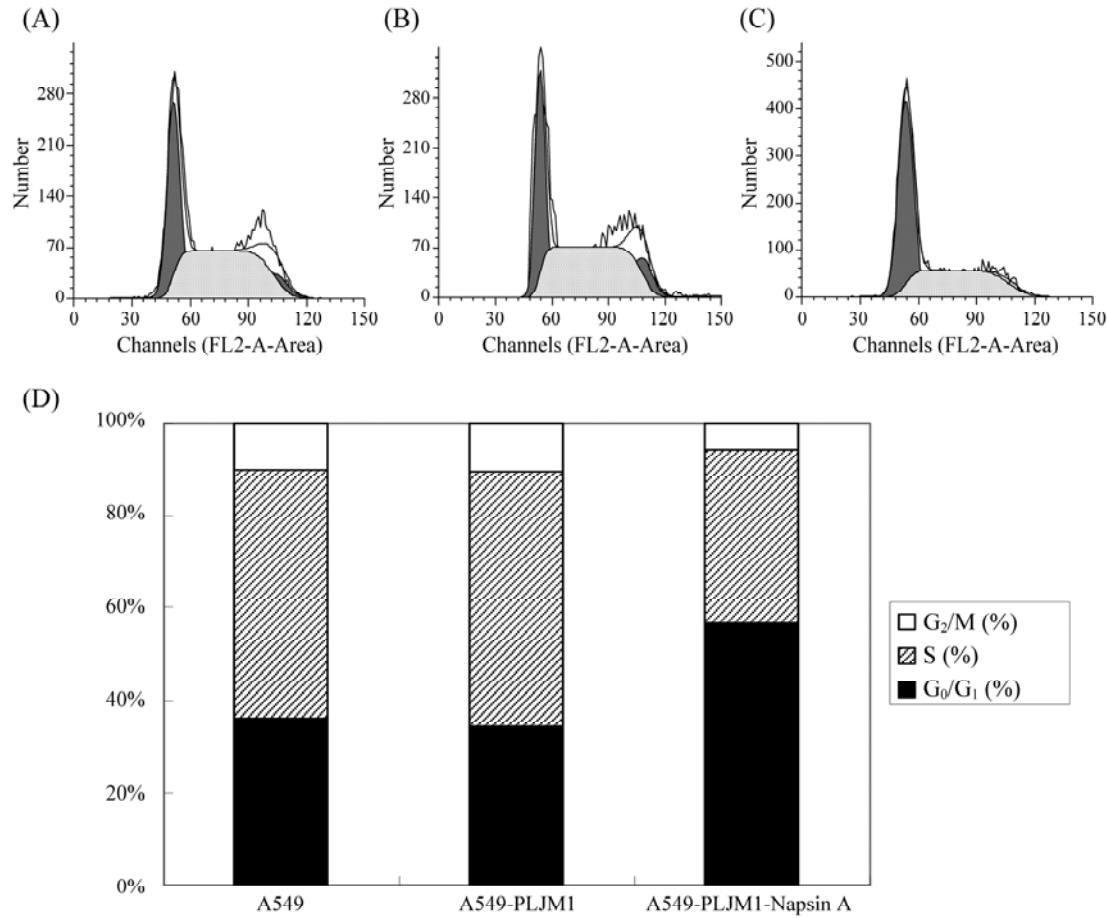


图 6 5ng/ml TGF-β1 刺激第 7 天的细胞周期

A: A549; B: A549-PLJM1; C: A549-PLJM1-Napsin A; D: 统计学分析结果。

Fig.6 Cell cycle after stimulated for 7 days by 5 ng/ml TGF-β1

A549 cells (A), A549-PLJM1 cells (B) or A549-PLJM1-Napsin A cells (C) were treated with 5ng/ml TGF-β1 for 7 days and cell cycle was detected by PI staining. Stastics analysis was presented (D).

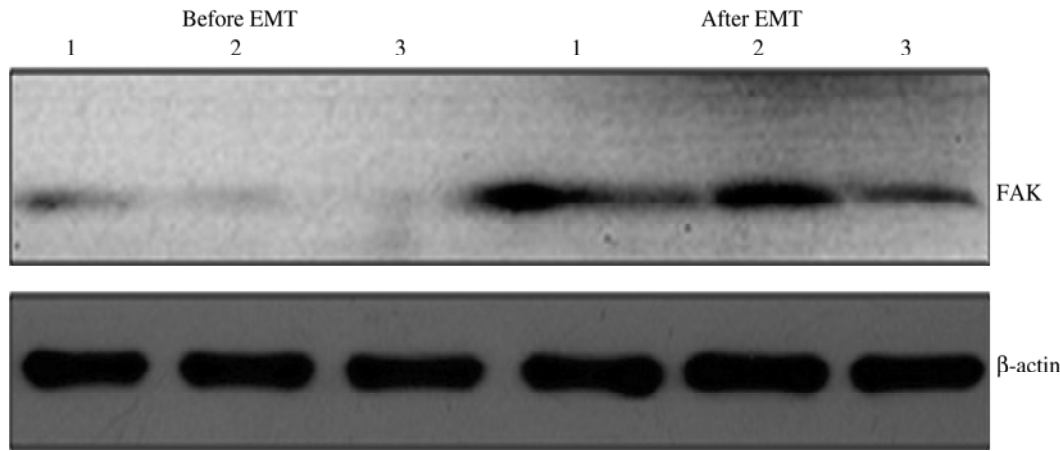


图 7 3 组细胞 EMT 前后表达 FAK Western blot 电泳图

1: A549; 2: A549-PLJM1; 3: A549-PLJM1-Napsin A。

Fig.7 The expression of FAK detected by Western blot

1: A549; 2: A549-PLJM1; 3: A549-PLJM1-Napsin A.

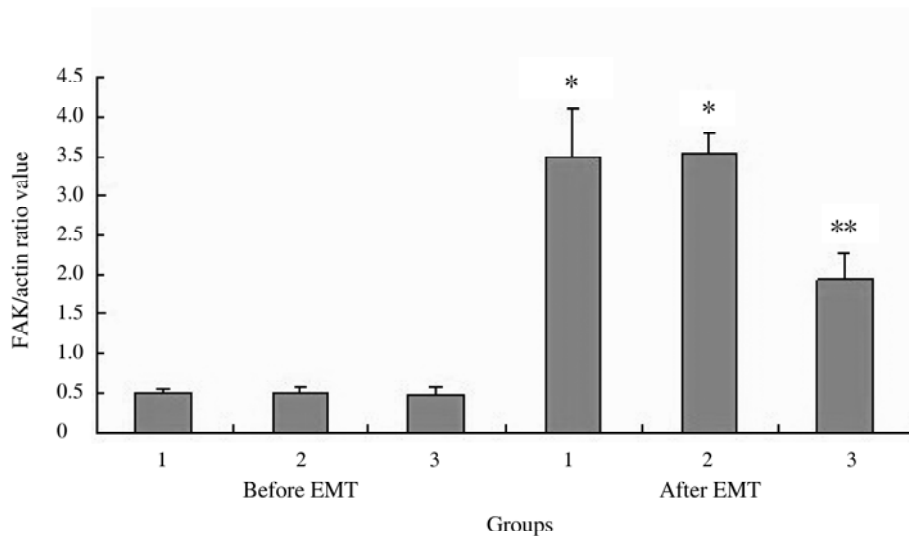


图 8 3 组细胞 EMT 前后表达 FAK Western blot 泳带相对灰度值

1: A549; 2: A549-PLJM1; 3: A549-PLJM1-Napsin A。与 EMT 前 3 组比较, $*P<0.01$; 与其他 5 组比较, $**P<0.01$ 。

Fig.8 The expression of FAK detected by Western blot

1: A549; 2: A549-PLJM1; 3: A549-PLJM1-Napsin A. Compared with groups of before EMT, $*P<0.01$; compared with others, $**P<0.01$.

显($P<0.01$), 而 A549 组和 A549-PLJM1 组之间无统计学差异(图 5)。

2.6 细胞周期

在接受 TGF- β 1 干预第 7 d, A549-PLJM1-Napsin A 组与 A549 组和 A549-PLJM1 组比较, G_0/G_1 期细胞比例明显增加, 而 S 期细胞比例显著下降(图 6)。

2.7 Western blot 检测 EMT 对 A549 细胞表达 FAK 蛋白的影响

A549 细胞经 TGF- β 1 刺激后, 其 FAK 表达显著上调($P<0.01$), 但是转基因组上调幅度较小($P<0.01$)(图 7 和图 8), 说明 Napsin A 部分抑制了 FAK 蛋白表达。

3 讨论

肿瘤的发生在于细胞受多种异常激活的信号传导通路调控导致失控性生长。在肿瘤进展过程中, 细胞发生异常增殖和分化, 通过 EMT 可以获得更强的增殖和侵袭能力, 整合素信号传导通路在其中扮演了重要角色^[4]。肿瘤细胞 EMT 后具备了纤维原细胞或间质细胞的“特性”, 间质蛋白表达上调, 波形蛋白、骨桥蛋白、Snail、纤维连接蛋白、I 型胶原等间质蛋白表达增加, 间质蛋白氨基酸序列中大多有 Arg-Gly-Asp(RGD)短肽序列, 可以被整合素识别并结合, 促使黏着斑(FAP)形成。在 FAP 处除了多种细胞骨架蛋白如纽蛋白、桩蛋白等外, 还存在其他重

要的信号传导分子。其中, FAK 是非受体酪氨酸蛋白激酶, 是整合素信号传导通路的基础分子, 在由整合素介导的信号传导通路中起关键作用^[4,5]。活化的 FAK, 可以激活多条信号传导通路, 如 PI-3K 途径^[6]、Ras-MAPK 途径^[7]、STAT1 途径等^[8], 而多种信号传递事件则促使细胞进一步增殖生长并离开发源地侵袭外周^[9,10]。

TGF- β 1 可以体外诱导细胞发生 EMT。本课题培养肺腺癌细胞——A549 细胞, 为观察肿瘤细胞 EMT 过程中整合素信号传导通路在其增殖能力改变中所发挥的生物学作用, 我们体外构建 A549 细胞 EMT 模型。将 A549 细胞置于含 TGF- β 1 的培养基中培养, 倒置显微镜下观察发现 A549 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, 并且检测到上皮细胞特征性蛋白——E 钙蛋白表达下调, 而间质细胞蛋白 I 型胶原表达则明显上调, 提示细胞在体外发生了 EMT, A549 细胞 EMT 模型体外构建获得成功。

慢病毒属于逆转录病毒科, 为 RNA 病毒。慢病毒载体是以 HIV-1 病毒为基础发展起来的, 是一种新兴的全新的基因转染媒介, 相比较其他传统的病毒载体系统(如腺病毒等)而言具有诸多优势, 具有高效、长期、稳定和安全等特点。本课题采用慢病毒载体质粒 PLJM1 将 *Napsin A* 基因转染到 A549 细胞, 常规

培养转基因细胞,用 Western blot 检测 Napsin A 蛋白的表达,发现其表达量比正常 A549 细胞和空转染 A549 细胞显著增多,说明转染成功并获得持久稳定表达。我们用 MTT 法绘制细胞生长速率曲线发现转基因细胞在 EMT 过程中增殖速度减慢;用流式细胞仪检测细胞周期,发现 A549 细胞 EMT 后,转基因细胞较未转基因细胞 G₀/G₁ 期细胞比例增加, S 期细胞比例下降,较多细胞被阻滞在 G₁ 期,表明 Napsin A 可以部分抑制 A549 细胞在 EMT 过程中的进一步增殖生长。

Napsin A 基因含有 5 个外显子,其转录产物由 1 263bp 构成,编码 420 个氨基酸的多肽,在羧基末端存在 RGD 序列。Napsin A 氨基酸序列中的 RGD 序列也可以被细胞表面的整合素识别并结合,通过竞争性抑制阻断了整合素与间质蛋白的结合,从而直接干扰了由整合素介导的信号传导通路,进而部分阻止了 A549 细胞进一步获得增殖能力。

整合素介导的信号传导途径中起着关键作用的是 FAK,活化的 FAK 是多条信号传导通路的上游蛋白。本课题通过 Western blot 检测 EMT 对 A549 细胞表达 FAK 蛋白的影响,进一步探讨 A549 细胞在 EMT 过程中 Napsin A 干扰其增殖生长能力的机制。结果表明 EMT 后 FAK 蛋白表达显著上调,但转 Napsin A 基因 A549 细胞的 FAK 蛋白表达明显少于非转染组细胞,提示 Napsin A 可以阻止 A549 细胞在 EMT 过程中过多表达 FAK 蛋白,从而间接抑制了整合素介导的信号传导通路。

本研究证实转染 Napsin A 基因后的肿瘤细胞在 EMT 过程中其增殖生长能力受到部分抑制,机制可能与 Napsin A 蛋白中的 RGD 序列直接抑制整合素信号传导通路和 Napsin A 基因转染后下调整合素信号传

导通路的关键因子——FAK 蛋白表达,从而间接抑制整合素信号传导通路有关,此研究结果可以为临床上基因治疗肿瘤提供新思路。

参考文献(References)

- 1 Tatnell PJ, Powell DJ, Hill J. Napsins: new human aspartic proteinases. Distinction between two closely related genes. FEBS Lett 1998; 441(1): 43-8.
- 2 Ueno T, Linder S, Elmberger G. Aspartic proteinase napsin is a useful marker for diagnosis of primary lung adenocarcinoma. Br J Cancer 2003; 88(8): 1229-33.
- 3 郭峰,卢兆桐,耿明,邹志强,丁吉元,李明。Napsin A mRNA 在原发性肺腺癌中表达的临床意义。中华实验外科杂志 2007; 24(2): 250.
- 4 Ramsay A, Marshall JF, Hart IR. Integrin trafficking and its role in cancer metastasis. Cancer Metastasis Rev 2007; 26(3-4): 567-78.
- 5 Hsia DA, Mitra SK, Hauck CR. Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. J Cell Biol 2003; 160(5): 753-67.
- 6 Matter ML, Ruoslahti E. A signaling pathway from the alpha-beta1 and alpha-beta3 integrins that elevates bcl-2 transcription. J Biol Chem 2001; 276(30): 27757-63.
- 7 Yee KL, Weaver VM, Hammer DA. Integrin-mediated signaling through the MAP-kinase pathway. IET Syst Biol 2008; 2(1): 8-15.
- 8 Xie B, Zhao J, Itagawa M. Focal adhesion kinase activates Stat1 in integrin-mediated cell migration and adhesion. J Biol Chem 2001; 276(22): 19512-23.
- 9 Aguirre Ghiso JA. Inhibition of FAK signaling activated by urokinase receptor induces dormancy in human carcinoma cells *in vivo*. Oncogene 2002; 21(16): 2513-24.
- 10 Liu G, Guibao CD, Zheng J. Structural insight into the mechanisms of targeting and signaling of focal adhesion kinase. Mol Cell Biol 2002; 22(8): 2751-60.

The Effect of *Napsin A* Gene on the Proliferation in Ephethlial-Mesenchymal Transition of Cell A549 and Its Mechanism

Shu-Hong Guan¹, Jin-Xu Zheng^{2*}, Qing Xu², Yan Tang², Ji-Zhu Liu², Xiao-Ting Lü²

(¹School of Medical Science and Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; ²Department of Respiration, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China)

Abstract A recombinant lentiviral plasmid PLJM1-*Napsin A* was constructed and transfected into lung adenocarcinoma cell A549. Western blot assay was used to identify the stable expression of *Napsin A* protein. Ephethlial-mesenchymal transition model was established *in vitro* by the A549 cells treated with transforming growth factor beta-1. The cell proliferation was detected by MTT assay. The alteration of cell cycle were determined by flow cytometry. Then the expression of focal adhesion kinase were determined by Western blot. This study was to investigate the effect of *Napsin A* gene on the proliferation in ephethlial-mesenchymal transition of cell A549 and its mechanism. *In vitro* experiment showed A549 cell line with *Napsin A* gene infection was constructed successfully and *Napsin A* protein was expressed stably ($P<0.01$). Transforming growth factor beta-1 induced ephethlial-mesenchymal transition in A549 cells, as demonstrated by significant reduction of E-cadherin ($P<0.01$) as well as up-regulation of collagen type I ($P<0.01$). Also transforming growth factor beta-1-inuced cell proliferation was inhibited by *Napsin A* ($P<0.05$). Further study demonstrated that *Napsin A* can cause G₀/G₁ arrest ($P<0.01$) and inhibit expression of focal adhesion kinase ($P<0.01$), a key protein in integrin signaling pathway, *in vitro* ephethlial-mesenchymal transition model. Sustained *Napsin A* expression in A549 cells can inhibit the ephethlial-mesenchymal transition-induced proliferation. This may be due to blocked integrin signaling pathway by *Napsin A*.

Key words *Napsin A*; A549 cell; ephethlial-mesenchymal transition; proliferation; focal adhesion kinase

Received: July 5, 2010 Accepted: October 15, 2010

This work was supported by the Scientific Research Project of Ministry of Public Health (No.wkj2006-2-026) and the 333 Project of Jiangsu Province (the Leading Group Office of Managing the Talents in Jiangsu Province, No.2007-16-09)

*Corresponding author. Tel: 13338812088, E-mail: jxuzh135@163.com