

IscU2对非小细胞肺癌增殖、迁移、侵袭能力的影响及其作用机制的研究

韩琴霞¹ 孙倩倩^{1,2} 林子帆¹ 周怀彬¹ 吕建新^{1*}

(¹温州医科大学检验医学院, 生命科学学院, 温州 325035; ²青岛大学附属医院, 青岛 266000)

摘要 该文通过shRNA干扰技术敲低IscU2干扰细胞IscU2的表达, 研究了干扰IscU2对非小细胞肺癌(NSCLC)细胞NCI-H520增殖、迁移及侵袭能力的影响。构建了稳定低表达IscU2的非小细胞肺癌细胞系NCI-H520; 采用CCK-8和平板克隆实验检测细胞的增殖能力; 流式细胞仪检测细胞周期、凋亡、ROS、线粒体膜电位变化情况; Transwell实验检测细胞迁移及侵袭能力; Western blot检测相关蛋白的表达。结果表明, 干扰IscU2后, 非小细胞肺癌细胞的增殖及克隆形成能力降低; 细胞周期停滞在G₁/G₀期, 同时伴随有p-AKT和Cyclin D1蛋白含量的下降; 细胞晚期凋亡率明显增加, 凋亡蛋白Cleaved-caspase3和Cleaved-PARP表达上调; 细胞迁移和侵袭能力降低, 上皮标志物E-Cadherin表达上调, 间质标志物N-Cadherin和Snail表达下调; 细胞ROS积累和线粒体膜电位下降。该研究结果表明, 干扰IscU2显著抑制非小细胞肺癌的增殖、迁移、侵袭能力和上皮-间质转化, 这为非小细胞肺癌的诊断和治疗提供了新的潜在靶点和视角。

关键词 非小细胞肺癌; IscU2; 增殖; 迁移; 侵袭

The Effects and Mechanism of IscU2 on Cell Proliferation, Migration and Invasion Ability in Non-small Cell Lung Cancer Cells

HAN Qinxia¹, SUN Qianqian^{1,2}, LIN Zifan¹, ZHOU Huaibin¹, LÜ Jianxin^{1*}

(¹School of Laboratory Medicine and Life Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China;

²The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, China)

Abstract In this study, *IscU2* was knocked down by shRNA interference technology in NSCLC NCI-H520 cell lines, and then we investigated the effects of *IscU2* interference on cell proliferation, migration and invasion ability in NSCLC (non-small cell lung cancer) cells. The proliferation ability was detected by CCK-8 and colony formation assay. The changes of cell cycle, apoptosis, ROS and mitochondrial membrane potential were detected by flow cytometry. Transwell assay was used to detect cell migration and invasion. Western blot was used to detect protein expression. The experiment results showed that when we inhibited the expression of *IscU2* in NSCLC cells, the cell proliferation and colony formation ability were significantly lower than that of control group. Cell cycle was blocked at G₁/G₀ phase, and the expression of p-AKT and Cyclin D1 was downregulated. Meanwhile, the rate of late apoptosis was obviously increased, Cleaved-caspase3 and Cleaved-PARP, the key proteins of apoptosis were significantly upregulated. In addition, the cell migration and invasion capacity were decreased, the epithelial marker

收稿日期: 2019-09-03 接受日期: 2019-11-12

国家自然科学基金(批准号: 31670784)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-86689805, E-mail: jxlu313@163.com

Received: September 3, 2019

Accepted: November 12, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31670784)

*Corresponding author. Tel: +86-577-86689805, E-mail: jxlu313@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5149>

E-Cadherin protein was increased and the mesenchymal markers, N-Cadherin and Snail proteins were reduced. Furthermore, it resulted in the accumulation of ROS and decreased the mitochondrial membrane potential. These results indicated that knockdown of *IscU2* obviously inhibit the proliferation, migration and invasion ability in NSCLC cells, which provide new potential targets and perspectives for treatment of non-small cell lung cancer.

Keywords non-small cell lung cancer; *IscU2*; proliferation; migration; invasion

根据2019年美国癌症统计报告显示,肺癌在男性和女性当中的发病率分别位于前列腺癌和乳腺癌之后,但其死亡率分别高居第一,我国肺癌的发病率和死亡率在所有癌症当中都是最高的^[1]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是肺癌的一种亚型,约占肺癌总数的85%,是导致肺癌患者死亡的主要原因^[2]。目前,临床上治疗非小细胞肺癌多采用手术、放疗、结合药物化疗等方式,但由于易出现耐药性、转移、复发,使得患者的生存率不佳^[3]。研究非小细胞肺癌细胞增殖和迁移侵袭的分子机制,可以有针对性地设计靶向药物抑制非小细胞肺癌的进展,对延长患者的生存时间具有重要意义。

硫酸铁集落蛋白2(iron-sulfur cluster assembly U2, *IscU2*)定位于线粒体中,参与线粒体[2Fe-2S]、[4Fe-4S]和部分胞质铁硫簇的合成^[4]。合成的铁硫簇与脱辅基蛋白结合形成成熟的铁硫簇蛋白,已知人体含有40多种依赖于铁硫簇发挥重要功能的蛋^[5-6]。铁硫簇遇到氧气会发生降解,细胞要在肺部等高氧环境中存活下来,就必须不断合成新的铁硫簇以替换受降解的铁硫簇,因此,铁硫簇组装辅因子的高效运转显得尤为重要。文献报道,在氧浓度高于3%~8%的环境中,癌细胞的存活依赖于高水平的NFS1,下调NFS1并

控制半胱氨酸的剂量可抑制肺腺癌细胞的生长,诱导细胞发生铁死亡^[7]。但是,目前关于铁硫簇组装支架蛋白 *IscU2* 是否参与非小细胞肺癌的发生发展尚未见报道。本文通过 shRNA 干扰技术下调肺腺癌细胞 NCI-H520 中 *IscU2* 的表达,揭示了干扰 *IscU2* 对非小细胞肺癌 NCI-H520 细胞的生长抑制机理,为进一步探究 *IscU2* 蛋白在 NSCLC 中的生物学功能及寻找新的诊断和治疗 NSCLC 的靶点提供了一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 临床组织样本

本研究分析的10例非小细胞肺癌患者的肿瘤组织及其癌旁配对组织收集于2019年温州医科大学附属第一医院心胸外科科室,经手术切除得到,通过蛋白免疫印迹技术分析 *IscU2* 蛋白的表达水平。所有样本均经过组织病理学确诊为非小细胞肺癌,且样本在术前未进行放化疗和靶向治疗。收集样本病人的临床信息及病理资料,其中男性7例,女性3例;年龄41~72岁,平均年龄58.2岁;组织学分类为鳞癌腺癌,病人资料详见表1。本课题所用样本均经过患者本人同意,遵循伦理学相关规定,并签订了相关知

表1 10例NSCLC患者临床资料

Table 1 10 cases NSCLC patients with clinical data

病理号	性别	年龄	分期	病理分级	是否转移	组织学分支
Pathology No.	Gender	Age	Stage	Grade	Metastasis	Histology type
1106913	Male	53	III	Medium-poor differentiation	+	LUSC
1108092	Male	72	II	Medium differentiation	-	LUSC
1108393	Male	54	I	High differentiation	-	LUAD
1108014	Female	62	II	High differentiation	+	LUAD
1109096	Male	41	III	Medium-poor differentiation	+	LUAD
1105575	Male	64	II	Medium differentiation	-	LUSC
1108383	Male	59	III	High-Medium differentiation	+	LUSC
1105202	Male	63	II	Medium differentiation	-	LUSC
1123941	Female	57	III	High-Medium differentiation	+	LUAD
1108461	Female	57	I	High differentiation	-	LUAD

+: 转移, -: 未转移; LUSC: 肺鳞癌, LUAD: 肺腺癌。

+: metastasis, -: no metastasis; LUSC: lung squamous carcinoma, LUAD: lung adenocarcinoma.

情同意书。

1.2 细胞株、菌种及质粒

人非小细胞肺癌NCI-H520细胞、293T细胞购自上海中国科学院细胞库。大肠杆菌DH5 α 菌株、pLKO.1质粒和psPAX2、pMD2.G包装质粒为本实验室保存。

1.3 试剂及耗材

Opti-MEM培养基和Trizol试剂购自美国Invitrogen公司。Polybrene购自Sigma公司。胎牛血清和RPMI-1640培养基购自美国Gibco公司。ECL化学发光试剂盒和蛋白浓度测定试剂盒购自美国Thermo Fisher Scientific公司。RIPA细胞裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司。细胞周期检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司。细胞凋亡检测试剂盒和基质胶购自美国BD公司。Cell Counting Kit-8购自日本同仁化学研究所。 β -actin抗体和 β -IscU2抗体购自Santa Cruz公司。Snail、N-Cadherin、E-Cadherin、Cleaved-caspase3、Cleaved-RAPA、AKT、Cyclin D1抗体购自Cell Signaling Technology公司。

1.4 细胞培养

人非小细胞肺癌NCI-H520细胞和293T细胞分别用含10% FBS、1%抗生素(青霉素100 U/mL和链霉素100 μ g/mL)的RPMI 1640和DMEM培养基置于37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 的培养箱内培养,当细胞培养至对数生长期时,收集用于后续实验。

1.5 质粒构建、慢病毒包装及稳转细胞株的构建

登录NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>)查询人源IscU2基因的cDNA序列,设计干扰序列:IscU2 shRNA#1、IscU2 shRNA#2(表2)。将寡核苷酸双链分别与线性载体pLKO.1相连,经测序验证构建成功的重组质粒(sh-IscU2#1、sh-IscU2#2)和空载体(shCont)分别与辅助质粒psPAX2、pMD2.G按Lipofectamine 3000转染步骤共转染293T细胞。72 h后收集病毒上清,用0.45 μ m滤器过滤后感染NCI-H520细

胞,并用嘌呤霉素进行筛选,随后通过Western blot验证干扰效果。

1.6 CCK-8实验检测细胞的增殖能力

收集对数生长期的对照及干扰IscU2的NCI-H520细胞,用无血清细胞培养液重悬并计数,调整细胞密度为1.0 $\times$ 10 4 个/mL,每孔1 000个分别接种于96孔板内,每组设置3个复孔,共设5组。待细胞贴壁后加入10 μ L CCK-8溶液,在37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 的细胞培养箱避光孵育1 h,随后用酶标仪检测450 nm处的吸光度(D)值,连续测5天绘制细胞增殖曲线。

1.7 克隆形成能力检测

收集对数生长期的对照及干扰IscU2的NCI-H520细胞,以500个/孔接种到6孔板内,每组2个复孔,加入培养基常规培养14~16天。待细胞长出肉眼可见的克隆时,用4%的多聚甲醛固定、结晶紫染色,拍照,计算细胞的克隆形成率。

1.8 细胞周期检测

收集对数生长期的对照及干扰IscU2的NCI-H520细胞,用70%的乙醇溶液重悬后置于-20 $^{\circ}$ C固定过夜。第2天,离心弃掉乙醇,PBS洗2遍,按照细胞周期检测试剂盒说明进行PI染色,流式细胞仪检测细胞DNA含量变化,并用modfitLT软件进行细胞周期分析。

1.9 细胞凋亡水平检测

收集对数生长期的对照及干扰IscU2的NCI-H520细胞,用预冷的1 $\times$ binding buffer重悬细胞,避光,按照细胞凋亡检测试剂盒说明书对细胞进行PE Annexin V和7-ADD染色,流式细胞仪检测细胞的凋亡情况,并用FlowJo软件分析结果。

1.10 Transwell实验检测细胞的迁移及侵袭能力

收集对数生长期的对照及干扰IscU2的NCI-H520细胞,用无血清培养基调整细胞浓度至12.5 $\times$ 10 4 个/mL。在Transwell小室的下室中加入600 μ L含有20% FBS的细胞培养液,将细胞悬液(200 μ L)分别加入包被、

表2 *IscU2*基因的干扰寡核苷酸序列

Table 2 The interference nucleotide sequence of *IscU2* gene

序列名称	shRNA 序列(5'→3')
Sequence name	shRNA sequence (5'→3')
IscU2 shRNA#1-F	CCG GTC ACA AGA AGG TTG TTG ATC ACT CGA GTG ATC AAC AAC CTT CTT GTG ATT TTTG
IscU2 shRNA#1-R	AAT TCA AAA ATC ACA AGA AGG TTG TTG ATC ACT CGA GTG ATC AAC AAC CTT CTT GTGA
IscU2 shRNA#2-F	CCG GAA GAA GGT TGT TGA TTA TCT CGA GAT AAT GAT CAA CAA CCT TCTTTT TTTG
IscU2 shRNA#2-R	AAT TCA AAA AAA GAA GGT TGT TGA TTA TCT CGA GAT AAT GAT CAA CAA CCT TCTT

未包被Matrigel基质胶的Transwell小室上室,随后放入37℃、5% CO₂的细胞培养箱内培养。30 h后取出小室,吸弃上室溶液并用冷的PBS轻柔洗2遍,室温固定(4%多聚甲醛)、染色(结晶紫染色液)各15 min,用棉棒小心擦去上室细胞,PBS洗掉多余的染色液,晾干。在显微镜下观察,随机选取5个视野拍照,分析评估细胞的迁移及侵袭能力。

1.11 Western blot检测相关蛋白质的表达水平

匀浆组织或收集对数生长期的各处理组细胞,RIPA裂解液裂解提取总蛋白。以40 μg/孔的上样量对蛋白进行SDS-PAGE电泳,电泳分离好的蛋白转移到PVDF膜上,随后用5%的脱脂牛奶室温封闭2 h。分别加入相应的一抗溶液于4℃摇床孵育过夜。第2天,取出膜用TBST洗3遍,每遍5 min。加入HRP标记的相应二抗,室温孵育1.5 h,TBST洗4遍,每遍10 min。向PVDF上滴加ECL发光液暗室反应1 min,用Bio-Rad成像仪成像,ImageJ软件分析各蛋白的灰度值用于统计学分析。

1.12 流式细胞术检测细胞的ROS水平

收集对数生长期的两组对照及干扰IscU2的NCI-H520细胞,PBS洗2遍。避光,配制终浓度为100 μmol/L的DCFH-DA溶液,按照活性氧检测试剂盒说明书于37℃孵育细胞20 min,为了使探针和细胞充分接触,孵育期间每3~5 min颠倒混匀1遍。洗掉未进入细胞的探针,随后其中一组细胞用3%的H₂O₂溶液室温刺激5 min,PBS洗3遍后加入上机缓冲液,另一组细胞内加入缓冲液,流式细胞仪检测两组细胞的活性氧

(reactive oxygen species, ROS)水平。

1.13 线粒体膜电位检测

收集对数生长期的对照及干扰IscU2的NCI-H520细胞。按照膜电位检测试剂盒说明书进行操作:避光,将25 μL JC-1(200×)加入4 mL超纯水和1 mL 5× JC-1染色缓冲液中,混匀,配制染色工作液,向每管细胞内分别加入PBS和JC-1工作液各500 μL,37℃培养箱孵育20 min,每3~5 min颠倒混匀1遍使细胞与染料充分反应。孵育完成后用1× JC-1缓冲液洗细胞4遍,弃上清。随后在每个处理组内加入300 μL JC-1缓冲液,立即用流式细胞仪检测细胞的膜电位变化。

1.14 统计学分析

采用SPSS 19.0进行统计学分析。所有实验至少进行了3次独立重复实验,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间的比较采用单因素方差分析,两组之间的比较采用 t 检验。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 和 $***P<0.001$ 具有统计学差异,ns代表差异无统计学意义。

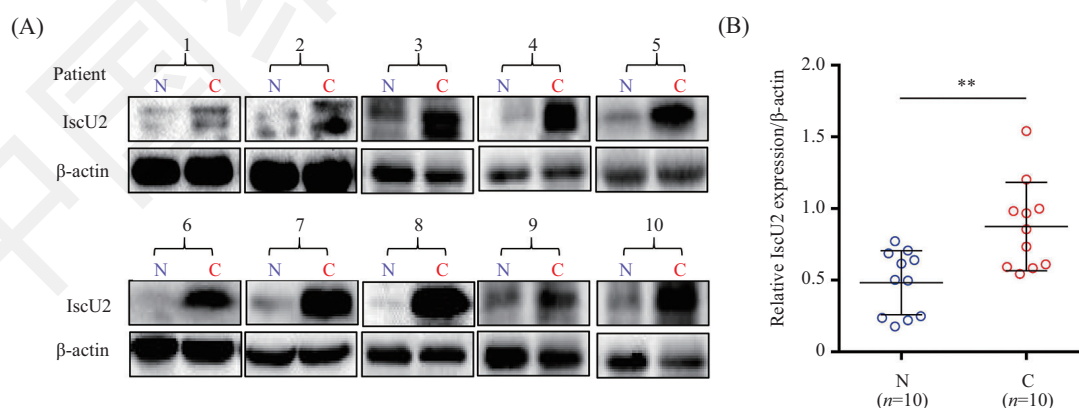
2 结果

2.1 IscU2在非小细胞肺癌组织中高表达

免疫印迹技术检测了10例非小细胞肺癌肿瘤组织及癌旁组织中IscU2的表达。结果显示,与癌旁组织相比,IscU2在癌组织中的表达水平明显升高(图1),提示IscU2可能在NSCLC的发生发展过程中发挥作用。

2.2 干扰IscU2抑制NCI-H520细胞的增殖

慢病毒感染NCI-H520细胞构建对照(shCont)



A: Western blot检测非小细胞肺癌临床组织样本中IscU2的表达; B: 蛋白相对表达量分析, $**P<0.01$; $n=10$ 。N代表癌旁正常组织, C代表非小细胞肺癌组织。

A: Western blot detect the expression of IscU2 in clinical tissue samples of non-small cell lung cancer; B: the analysis of relative expression levels of IscU2, $**P<0.01$; $n=10$. In normal (N) and matched non-small cell lung cancer tissue (C).

图1 非小细胞肺癌临床组织样本中IscU2的表达

Fig.1 Expression of IscU2 in clinical tissue samples of non-small cell lung cancer

及干扰IscU2的NCI-H520细胞系(sh-IscU2#1、sh-IscU2#2),通过Western blot验证干扰效果(图2A)。利用CCK-8实验检测干扰IscU2后细胞的生长情况。结果显示,干扰IscU2后NCI-H520细胞的生长明显受到了抑制(图2B)。进一步通过集落形成实验检测细胞的增殖情况。发现干扰IscU2后细胞的克隆数明显减少,且形成的克隆较小(图2C)。

2.3 干扰IscU2使NCI-H520细胞的周期阻滞在G₁/G₀期

流式细胞术探究干扰IscU2对非小细胞肺癌细胞周期进程的影响。结果表明,与shCont组相比,sh-IscU2处理组G₁/G₀期细胞比例明显升高,S细胞明显减少($P<0.05$)(图3),表明干扰IscU2使NCI-H520细胞周期阻滞在G₁/G₀期。提示非小细胞肺癌细胞中过表达IscU2蛋白的作用可能是使其顺利通过G₁/G₀期进入S期。

2.4 干扰IscU2对NCI-H520细胞增殖相关蛋白表达的影响

Western blot检测了干扰IscU2后细胞增殖相关蛋白的表达。结果显示,与shCont组相比,干扰IscU2

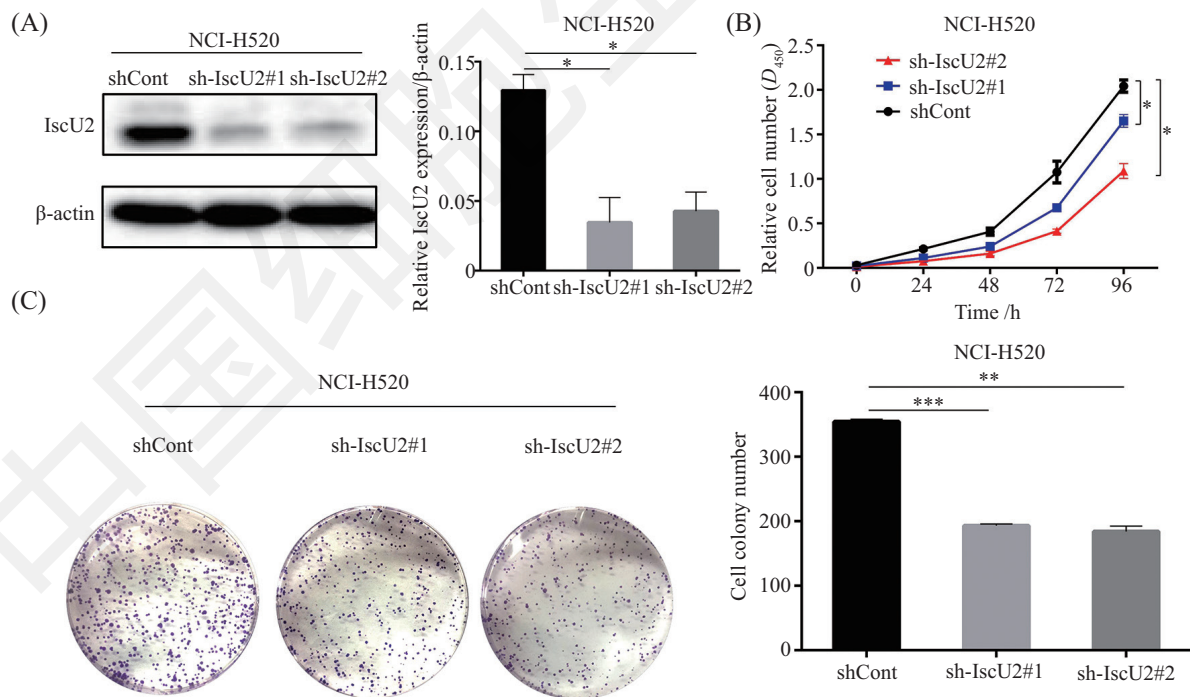
后细胞AKT总蛋白表达没有发生变化,但其磷酸化水平降低,同时Cyclin D1蛋白的表达水平也降低(图4)。已研究证实,磷酸化激活的AKT蛋白能够促进Cyclin D1的表达,而Cyclin D1通过结合并激活周期蛋白依赖性激酶4/6(cyclin-dependent kinases 4/6, CDK4/6)使细胞顺利通过G₁期进入S期^[8]。这进一步证实,干扰IscU2能使NCI-H520细胞周期阻滞在G₁/G₀期。

2.5 干扰IscU2促进NCI-H520细胞的晚期凋亡

流式细胞仪检测干扰IscU2后细胞的凋亡水平。结果显示,与shCont组相比,干扰IscU2后细胞的晚期凋亡率明显增加(图5),表明干扰IscU2可有效促进非小细胞肺癌NCI-H520细胞的凋亡。

2.6 干扰IscU2后NCI-H520细胞中凋亡相关蛋白的表达

Western blot检测干扰IscU2后凋亡相关蛋白的表达的变化。结果显示,与shCont组相比,干扰IscU2后凋亡蛋白Cleaved-caspase3和Cleaved-PARP的表达明显升高(图6)。Caspase3是重要的凋亡执行蛋白,其活化后可作用于PARP蛋白进而引发细胞凋

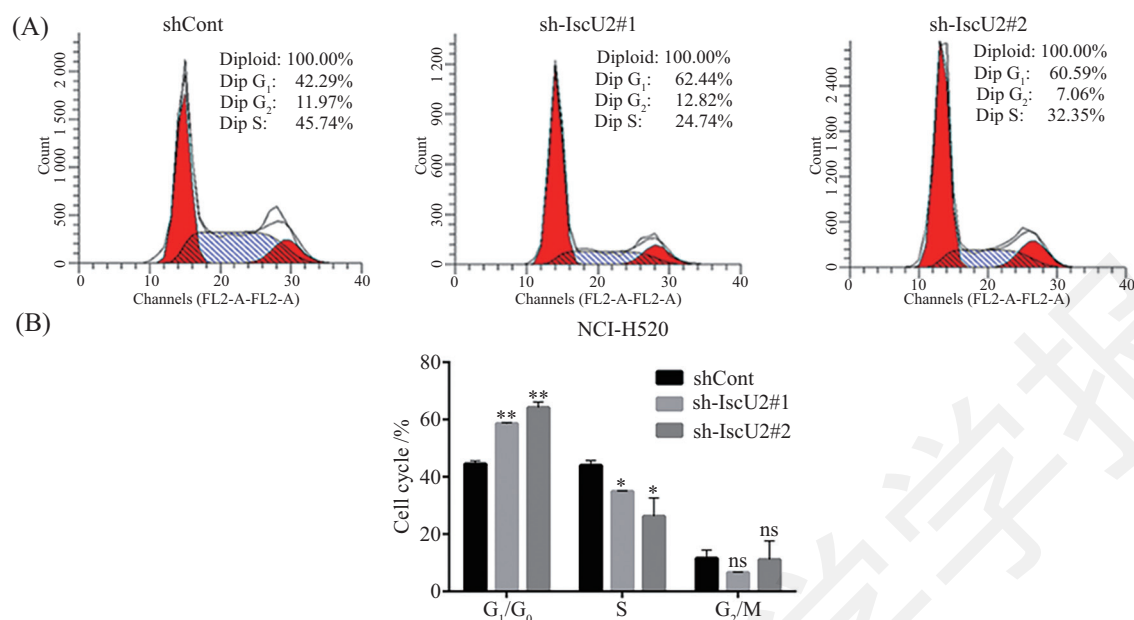


A: Western blot验证NCI-H520细胞中IscU2蛋白的干扰效果; B: CCK-8检测干扰IscU2对NCI-H520细胞增殖能力的影响; C: 干扰IscU2对NCI-H520细胞克隆形成能力的影响。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: the interference effect of IscU2 protein in NCI-H520 cells; B: cell growth was determined by CCK-8 assay; C: effect of IscU2 inhibition on colony formation ability in NCI-H520 cells. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图2 干扰IscU2对NCI-H520细胞增殖及克隆形成能力的影响

Fig.2 Effect of IscU2 interference on cell proliferation and colony formation ability of NCI-H520 cells

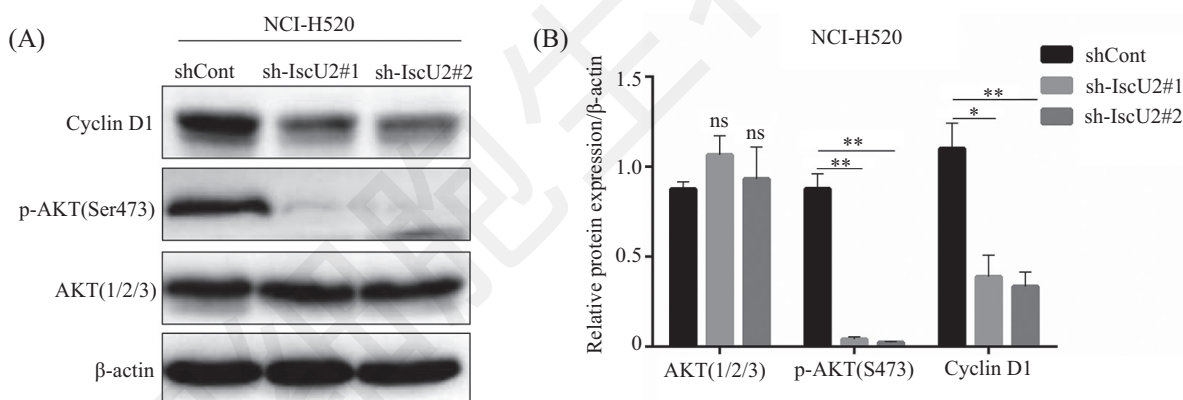


A: 流式细胞仪检测干扰IscU2后细胞周期分布变化; B: 细胞周期结果分析。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与shCont组比较。ns代表无统计学差异。

A: the cell cycle distribution after IscU2 interference in NCI-H520 cells; B: analysis the results of cell cycle. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the shCont group. ns means no sense.

图3 流式细胞术检测干扰IscU2对NCI-H520细胞周期的影响

Fig.3 Detected the effect of IscU2 interference on cycle progression in NCI-H520 cells by flow cytometry



A: 干扰IscU2后NCI-H520细胞中AKT和Cyclin D1蛋白的表达; B: 蛋白相对表达量灰度分析。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与shCont组比较, ns代表无统计学差异。

A: expression of AKT and Cyclin D1 after interference of IscU2; B: relative protein expression detected by densitometry. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the shCont group. ns means no sense.

图4 干扰IscU2后NCI-H520细胞增殖相关蛋白的表达变化

Fig.4 The expression of proliferation related proteins in NCI-H520 cells after interference of IscU2

亡。上述结果表明, 干扰IscU2可通过增加Cleaved-caspase3、Cleaved-PARP的表达促进非小细胞肺癌细胞的凋亡。

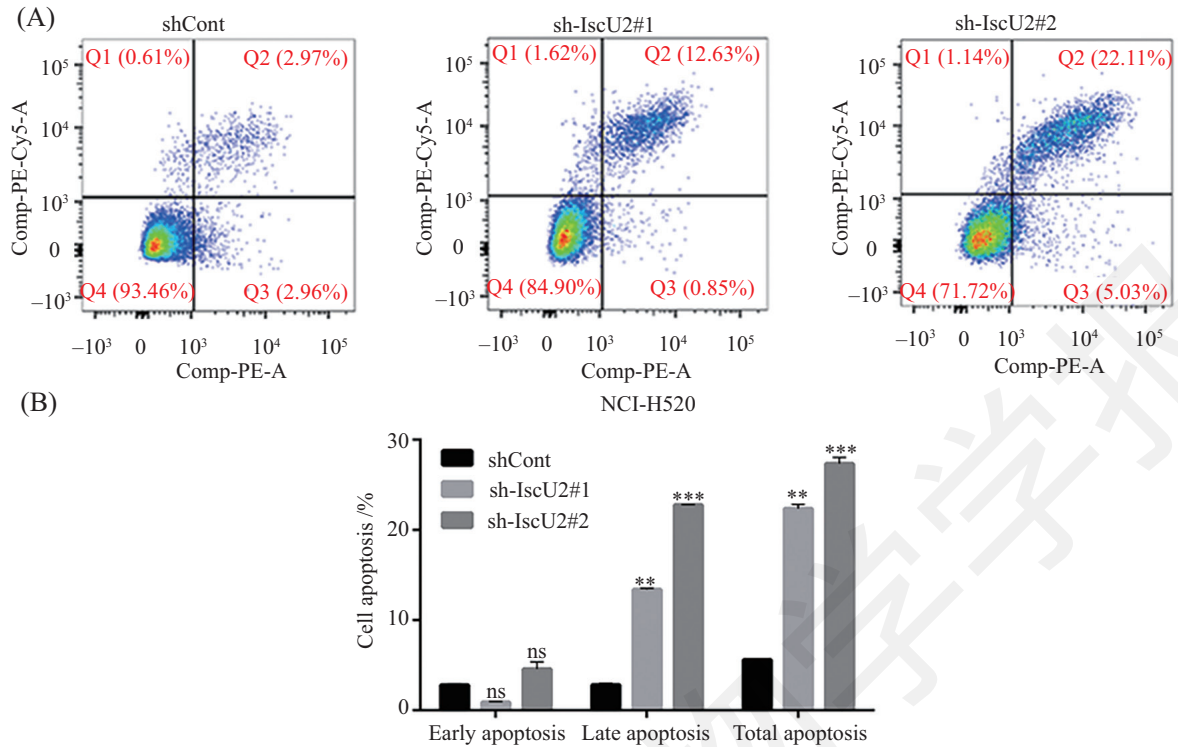
2.7 干扰IscU2抑制NCI-H520细胞的迁移及侵袭能力

Transwell实验检测干扰IscU2后细胞迁移和侵袭能力的变化。结果显示, 与shCont组相比, 干扰IscU2后迁移(图7A)和侵袭(图7B)的细胞数目都明显

减少。表明干扰IscU2可以抑制非小细胞肺癌NCI-H520细胞的迁移和侵袭, IscU2表达与非小细胞肺癌细胞的迁移及侵袭具有一定的相关性。

2.8 干扰IscU2对NCI-H520细胞EMT相关蛋白表达的影响

Western blot检测了EMT相关蛋白的表达。结果显示, 与shCont组相比, 干扰IscU2后Snail、N-Cadherin表达水平下降, E-Cadherin表达量升高(图

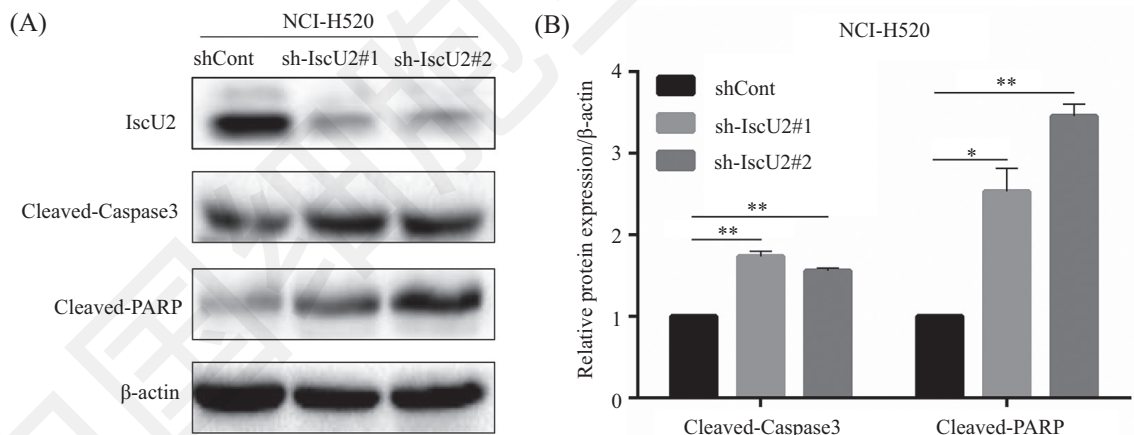


A: 流式细胞仪检测干扰IscU2后细胞的凋亡情况; B: 凋亡结果分析。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与shCont组比较。 ns代表无统计学差异。

A: cell apoptosis was quantified after IscU2 interference by FCM; B: analysis the rate of apoptosis. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs the shCont group. ns means no sense.

图5 流式细胞术检测干扰IscU2对NCI-H520细胞凋亡的影响

Fig.5 Detected the effect of IscU2 interference on cell apoptosis in NCI-H520 cells by flow cytometry



A: 干扰IscU2后细胞凋亡相关蛋白的表达; B: 蛋白相对表达量灰度分析。 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与shCont组比较。

A: expression of apoptosis-related proteins after interference of IscU2; B: relative protein expression detected by densitometry. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the shCont group.

图6 干扰IscU2后NCI-H520细胞中凋亡相关蛋白的表达量变化

Fig.6 The expression of apoptosis-related proteins in NCI-H520 cells after interference of IscU2

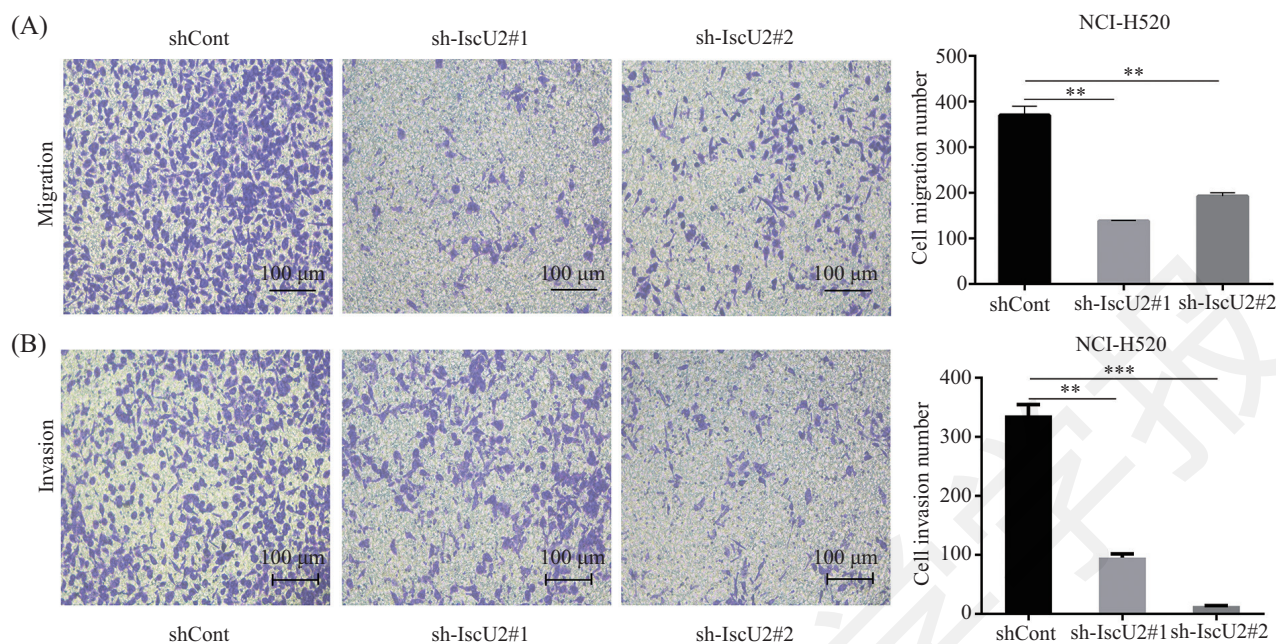
8)。提示下调IscU2可以影响NCI-H520细胞EMT相关分子的表达。

2.9 干扰IscU2促使NCI-H520细胞ROS积累和线粒体膜电位下降

用DCFH-DA探针染色检测干扰IscU2后细胞

ROS水平的变化。结果显示,与shCont组相比,干扰IscU2后细胞的ROS水平明显升高(图9A)。提示非小细胞肺癌过表达IscU2可能有助于ROS的清除。

用JC-1染色液检测线粒体膜电位的变化。结果显示,与shCont组相比,干扰IscU2后非小细胞肺癌

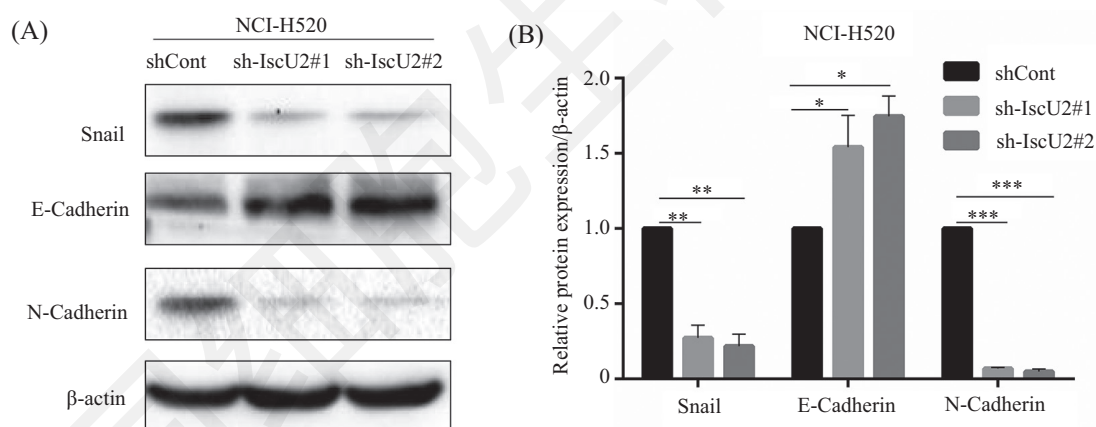


A: 干扰IscU2后细胞的迁移能力变化; B: 干扰IscU2后细胞的侵袭能力变化。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与shCont组比较。

A: effect of IscU2 interference on migration ability; B: effect of IscU2 interference on invasion ability. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs the shCont group.

图7 干扰IscU2对NCI-H520细胞迁移及侵袭能力的影响

Fig.7 Effect of IscU2 interference on migration and invasion ability in NCI-H520 cells



A: 干扰IscU2后EMT相关蛋白的表达; B: 蛋白相对表达量灰度分析。 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与shCont组比较。

A: expression of EMT-related proteins after interference of IscU2; B: relative protein expression detected by densitometry. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs the shCont group.

图8 干扰IscU2后NCI-H520细胞中EMT相关蛋白的表达

Fig.8 The expression of EMT related proteins in NCI-H520 cells after interference of IscU2

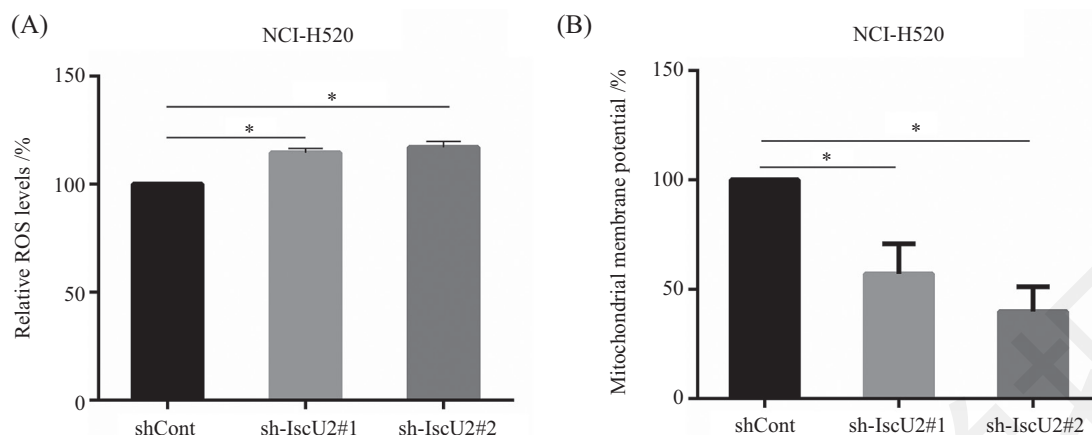
细胞线粒体的膜电位明显下降(图9B)。

3 讨论

IscU2作为铁硫簇组装支架蛋白, 将半胱氨酸脱氢酶NFS1催化半胱氨酸提供的硫和Frataxin(FXN)/IscA提供的铁在其活性中心进行组装, 随后与脱辅基蛋白结合形成成熟的铁硫簇蛋白^[5-6]。铁硫簇蛋白在细胞正常生命活动中发挥重要作用, 如参与能

量转化, 细胞铁代谢平衡, RNA修饰和蛋白质翻译, DNA复制和修复及基因表达调控等^[9-10]。同时, 有研究表明, *IscU*基因表达改变与肾癌^[11]、乳腺癌^[12]、结直肠癌^[13]、头颈部副神经节瘤^[14]等多种肿瘤的恶性转化过程有关。本文通过检测发现, *IscU2*蛋白在非小细胞肺癌组织中的表达水平明显高于癌旁对照组织。推测IscU2可能参与了非小细胞肺癌的进展。

为了探究IscU2在非小细胞肺癌中的作用, 通



A: 干扰IscU2对NCI-H520细胞ROS水平的影响; B: 干扰IscU2对NCI-H520细胞线粒体膜电位的影响。* $P < 0.05$, 与shCont组比较。

A: effect of IscU2 interference on the levels of ROS; B: effect of IscU2 interference on the mitochondrial membrane potential (MMP). * $P < 0.05$ vs the shCont group.

图9 干扰IscU2对NCI-H520细胞ROS水平和线粒体膜电位的影响

Fig.9 Effect of IscU2 inhibition on the levels of ROS and mitochondrial membrane potential in NCI-H520 cells

过shRNA干扰技术下调了非小细胞肺癌NCI-H520细胞中IscU2的表达。随后进行CCK-8、克隆形成实验及流式细胞检测,发现干扰IscU2明显抑制NCI-H520细胞的增殖,并使细胞周期阻滞在G₁/G₀期。WANG等^[15]研究证实,莪术醇(curcumin)作用于结肠癌细胞可以促进细胞ROS的积累,并通过Akt/GSK3-β/Cyclin D1途径使细胞周期停滞在G₁/G₀期,进而抑制结肠癌细胞的生长。本文为了探究IscU2通过何种机制影响非小细胞肺癌增殖,随后检测了相关蛋白的表达。发现干扰IscU2后,NCI-H520细胞中p-AKT和Cyclin D1蛋白表达量下降。这与AKT、Cyclin D1在其他肿瘤的研究结果相一致。即下调IscU2使AKT发生去磷酸化,抑制Cyclin D1的表达,使细胞周期受到阻滞,进而抑制了非小细胞肺癌细胞的增殖。

细胞凋亡是细胞在生理或病理条件下受基因调控的程序性死亡方式,对有机体维持正常的生命活动具有重要意义^[16]。我们进一步探究了干扰IscU2对NCI-H520细胞凋亡的影响。发现干扰IscU2使非小细胞肺癌细胞的晚期凋亡率明显增加。HSU等^[17]研究发现,使用岩藻多糖(fucoidan)和顺铂(cisplatin)作用于肺癌细胞可以通过增加凋亡执行蛋白Caspase-3、PARP的表达促进肺癌细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用。本文进一步检测发现,干扰IscU2促进了凋亡执行蛋白Cleaved-caspase3和Cleaved-PARP的表达。表明干扰NCI-H520细胞中的IscU2蛋白通过活化Caspase-3引发下游DNA修复酶PARP的切割进

而引发细胞凋亡。

转移是肺癌患者死亡的关键因素^[18]。许多转移性癌症都涉及上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),主要表现为细胞黏附能力下降,同时伴随有E-钙黏蛋白下调和N-钙黏蛋白、Snail蛋白上调,这是肿瘤细胞获得迁移、侵袭能力的主要原因^[19-21]。本文检测发现,干扰NCI-H520细胞中IscU2的表达后其体外迁移和侵袭能力明显降低。为了探究其改变是否与EMT相关分子的表达有关,随后检测了Snail、E-Cadherin和N-Cadherin蛋白的表达,结果显示,干扰IscU2后细胞中E-Cadherin表达上调, N-Cadherin和Snail蛋白表达明显下调。表明EMT相关分子在NSCLC细胞迁移及侵袭过程中发挥着重要的作用。

研究表明,细胞ROS积累对其生长具有重要影响,如低水平ROS通过激活PI3K/Akt信号通路促进肿瘤细胞的周期进展^[22],而过量或急剧增加的ROS因加速细胞氧化损伤而抑制肿瘤生长,导致细胞发生凋亡甚至坏死^[23]。同时,LEVRAUT等^[24]在探究缺血-再灌注诱导细胞死亡的机制时发现,ROS积累会导致线粒体膜电位下降,进而影响细胞的生存。IscU2作为线粒体铁硫簇组装支架蛋白,干扰其表达是否对线粒体功能有影响呢?随后我们检测了细胞ROS水平和线粒体膜电位变化。结果显示,干扰IscU2后NCI-H520细胞的ROS水平明显升高,线粒体膜电位下降。

综上所述,本文通过研究证实干扰IscU2通过

增加ROS的积累抑制NCI-H520细胞的生长,使细胞周期阻滞在G₁/G₀期;通过促进Cleaved-caspase3和Cleaved-PARP的表达诱导细胞凋亡,并伴随有线粒体膜电位下降;通过影响EMT相关分子的表达抑制细胞的迁移及侵袭能力。但其具体机制以及过表达对其生物学功能的影响还需要进一步的研究。本文为通过IscU2诊断和治疗非小细胞肺癌提供了一定的理论依据。

参考文献 (References)

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(1): 7-34.
- [2] PHILIP C H, ANN M M, EVERETT E V. Lung cancer [J]. *Lancet*, 2000, 355(9202): 479-85.
- [3] PHILIP C H, ANN M M, EVERETT E V. Lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(13): 1367-80.
- [4] TONG W H, ROUAULT T. Distinct iron-sulfur cluster assembly complexes exist in the cytosol and mitochondria of human cells [J]. *EMBO J*, 2000, 19(21): 5692-700.
- [5] JOHNSON D C, DEAN D R, SMITH A D, et al. Structure, function and formation of biological iron-sulfur clusters [J]. *Annu Rev Biochem*, 2005, 74(1): 247-81.
- [6] WACHNOWSKY C, FIDAI I, COWAN J A. Iron-sulfur cluster biosynthesis and trafficking-impact on human disease conditions [J]. *Metallomics*, 2018, 10(1): 9-29.
- [7] ALVAREZ S W, SVIDERSKIY V O, TERZI E M, et al. NFS1 undergoes positive selection in lung tumours and protects cells from ferroptosis [J]. *Nature*, 2017, 551(7682): 639-43.
- [8] KLEIN E A, ASSOIAN R K. Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(23): 3853-7.
- [9] SAHA P P, VISHWANATHAN V, BANKAPALLI K, et al. Iron-sulfur protein assembly in human cells [J]. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 2017, 174: 25-65.
- [10] BONIECKI M T, FREIBERT S A, MÜHLENHOFF U, et al. Structure and functional dynamics of the mitochondrial Fe/S cluster synthesis complex [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1287.
- [11] MCCORMICK R I, BLICK C, RAGOISSIS J, et al. MiR-210 is a target of hypoxia-inducible factors 1 and 2 in renal cancer, regulates ISCU and correlates with good prognosis [J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(5): 1133-42.
- [12] LIU D, XIA H, WANG F, et al. MicroRNA-210 interacts with FBXO31 to regulate cancer proliferation cell cycle and migration in human breast cancer [J]. *Oncotargets Ther*, 2016, 9: 5245-55.
- [13] QU A, DU L, YANG Y, et al. Hypoxia-inducible miR-210 is an independent prognostic factor and contributes to metastasis in colorectal cancer [J]. *PloS One*, 2014, 9(3): e90952.
- [14] MERLO A, DE QUIROS S B, SECADES P M, et al. Identification of a signaling axis HIF-1 α /microRNA-210/ISCU independent of SDH mutation that defines a subgroup of head and neck paragangliomas [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(11): E2194-200.
- [15] WANG J, LI X M, BAI Z, et al. Curcumin induces cell cycle arrest in colon cancer cells via reactive oxygen species and Akt/GSK3 β /cyclin D1 pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 210: 1-9.
- [16] PISTRITTO G, TRISCIUOGGIO D, CECI C, et al. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies [J]. *Aging (Albany NY)*, 2016, 8(4): 603-19.
- [17] HSU H Y, LIN T Y, HU C H, et al. Fucoidan upregulates TLR4/CHOP-mediated caspase-3 and PARP activation to enhance cisplatin-induced cytotoxicity in human lung cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2018, 432: 112-20.
- [18] YEUNG K T, YANG J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis [J]. *Mol Oncol*, 2017, 11(1): 28-39.
- [19] BATLLE E, SANCHO E, FRANCI C, et al. The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(2): 84-9.
- [20] NGUYEN T, MÈGE R. N-Cadherin and fibroblast growth factor receptors crosstalk in the control of developmental and cancer cell migrations [J]. *Eur J Cell Biol*, 2016, 95(11): 415-26.
- [21] VALCOURT U, CARTH Y, OKITA Y, et al. Analysis of epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor β [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1344: 147-81.
- [22] MIYATA S, WANG L Y, KITANAKA S. 3EZ,20Ac-ingenol induces cell-specific apoptosis in cyclin D1 over-expression through the activation of ATR and downregulation of p-Akt [J]. *Leuk Res*, 2018, 64: 46-51.
- [23] ZOROV D B, JUHASZOVA M, SOLLOTT S J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release [J]. *Physiol Rev*, 2014, 94(3): 909-50.
- [24] LEVRAUT J, IWASE H, SHAO Z H, et al. Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 284(2): H549-58.