

MSP 影响非小细胞肺癌 PC14 细胞周期和上皮间质转化的研究

施雪旎¹, 魏诗航¹, 彭旭², 刘艳², 何学令², 尹海林^{2△}

1. 四川大学生命科学学院(成都 610041); 2. 四川大学实验动物中心(成都 610041)

【摘要】 目的 研究巨噬细胞刺激蛋白(MSP)在无巨噬细胞刺激蛋白受体(ROn)的情况下对非小细胞肺癌 PC14 细胞周期的影响,并分析其对 PC14 上皮间质转化(EMT)的影响。**方法** 取 MSP 阴性、ROn 阴性的 PC14 细胞系,稳定表达 MSP 的细胞系 PC14-Mst1-pEGFP-N1 和稳定表达荧光蛋白的空载体细胞系 PC14-pEGFP-N1,流式细胞术检测各细胞系细胞周期的影响;透射电镜观察在细胞增殖期间细胞之间的连接间隙;逆转录(RT)-PCR 和 Western blot 分别检测 E-钙粘蛋白(E-cadherin)和波形蛋白(Vimentin) mRNA、蛋白表达水平。**结果** 流式细胞术结果显示与 PC14、PC14-pEGFP-N1 相比,PC14-Mst1-pEGFP-N1 细胞 G₁/G₀ 期数量增多,S 期与 G₂/M 期减少;透射电镜发现 PC14-Mst1-pEGFP-N1 细胞之间的细胞连接较紧密,细胞之间空隙距离缩小;RT-PCR 和 Western blot 检测结果显示,与 PC14 细胞相比,PC14-Mst1-pEGFP-N1 细胞 E-cadherin 的 mRNA 和蛋白表达水平升高,而 Vimentin 的 mRNA、蛋白表达水平降低。**结论** MSP 在 ROn 阳性的情况下,可使 G₁ 期肺癌细胞增多、分裂相减少,抑制 EMT。

【关键词】 巨噬细胞刺激蛋白 PC14 细胞 上皮间质转化 细胞周期

Effects of MSP on Cell Cycle and EMT of Non-Small Cell Lung Cancer PC14 SHI Xue-ni¹, WEI Shi-hang¹, PENG Xu², LIU Yan², HE Xue-ling², YIN Hai-lin^{2△}. 1. College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Laboratory Animal Centre, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: 13183830576@163.com

【Abstract】 Objective To study the effect of macrophage stimulating protein (MSP) on the cell cycle of non-small cell lung cancer PC14 cells without expression of receptor d'originenanta (ROn) and MSP, and analyse its effect on PC14's epithelial mesenchymal transition (EMT) capacity. **Methods** Vitro culture PC14 (blank control), PC14-Mst1-pEGFP-N1 (stably expressed MSP) and PC14-pEGFP-N1. Cell cycles were detected by flow cytometry and the gaps between cells during growth were measured by transmission electron microscope (TEM); RT-PCR and Western blot were used to figure out the shifts of EMT related gene expression in PC14-Mst1-pEGFP-N1 cells. **Results** Compared with the PC14 group and PC14-pEGFP-N1 group, PC14-Mst1-pEGFP-N1 population of G₁/G₀ phase were significantly increased while S and G₂/M phase were significantly reduced; The gaps between PC14-Mst1-pEGFP-N1 cells decreased; RT-PCR and Western blot showed that mRNA and protein levels of E-cadherin of PC14-Mst1-pEGFP-N1 were significantly higher than that of PC14, but mRNA and protein levels of Vimentin were significantly lower. **Conclusion** MSP may affect the cell cycle of PC14 and inhibit its EMT procedure by regulating the expression of related proteins including E-cadherin and Vimentin when ROn was not expressed.

【Key words】 Macrophage stimulating protein PC14 cell Epithelial mesenchymal transition Cell cycle

肺癌是目前发病率和死亡率增长最快、对人群健康和生命威胁最大的恶性肿瘤之一^[1]。尽管随着治疗技术的不断进步,对肺癌尤其是非小细胞肺癌(NSCLC)的治疗已经有了长足的进步,但由于许多患者就诊时已发生不同程度的转移,导致目前 NSCLC 的 5 年生存率仍较低(约 24%)^[2]。近年来,上皮间质转化(EMT)被认为是癌细胞迁移和浸

润能力增强的一个步骤^[3]。EMT 是指在生理或病理状态下,上皮细胞通过特定的程序转化为间质表型细胞的过程^[4]。发生 EMT 的特征表现是细胞变得狭长、离散,运动能力增强,重要的上皮标志分子 E-cadherin 部分或完全丢失,Vimintin 等间质标志物表达上调^[5],这也是肿瘤的侵袭和转移中的重要环节^[6]。巨噬细胞刺激蛋白受体(ROn)是一种受体酪氨酸激酶,属于 MET 原癌基因家族。ROn 能通过多条信号通路介导细胞形态学的改变,从而影

响细胞黏附性,引起细胞骨架重组,降低细胞间相互作用^[7]。巨噬细胞刺激蛋白(MSP)是一种具有免疫调节活性的糖蛋白^[7]。许多研究发现,MSP是RON目前唯一已知的配体,与RON结合后,能够促进癌细胞增殖、迁移侵袭,促进血管生成^[8],并促进EMT过程^[9]。但是研究发现MSP与其受体RON分别在25%~44%和62%~72%的肿瘤中过表达,两种蛋白的表达并没有一定的对应的关系^[10]。我们前期研究发现,MSP蛋白能降低RON阴性的人NSCLC细胞PC14的增殖、迁移和侵袭能力^[11]。本实验旨在探讨MSP是否也影响PC14细胞周期和EMT,进一步阐明MSP在RON阴性时的生物学功能。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞系 人NSCLC细胞系PC14购于上海生博医药科技有限公司,RT-PCR及Western blot未检测出PC14有RON与MSP的表达^[11];重组细胞:稳定表达MSP的细胞系PC14-Mst1-pEGFP-N1和稳定表达荧光蛋白的空载质粒细胞系PC14-pEGFP-N1^[11]由本实验室构建。

1.1.2 主要试剂和仪器 主要试剂:蛋白裂解液(RIPA)(碧云天);DMEM培养基、胰蛋白酶(HyClone);胎牛血清(FBS,Gbico);Trizol试剂(美国Ambion);GADPH抗体、E-cadherin抗体和Vimentin抗体(美国Abcam);羊抗兔-HRP(Santa Cruz)。凝胶成像仪(北京鼎昊源科科技有限公司);流式细胞仪(ACEA NovoCyte);倒置显微镜(OLYMPUS);PCR扩增仪(Labnet International);CO₂培养箱、酶标分析仪、低温离心机(Thermo);SDS-PAGE电泳仪(Bio-Rad)。

1.2 方法

1.2.1 细胞复苏与传代 水浴锅加热至37℃,从液氮中取出冻存的PC14、PC14-pEGFP-N1、PC14-Mst1-pEGFP-N1细胞,迅速放入水浴锅溶解,溶解完成后加入10倍体积的DMEM完全培养基,放入37℃、体积分数5%CO₂培养箱中进行培养。次日更换DMEM完全培养基。当细胞汇合度达到90%时,用胰酶消化细胞,按1/3的接种比例进行传代。取对数期细胞进行实验。

1.2.2 流式细胞术检测细胞周期 取对数生长期的3种细胞并调整浓度为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 。离心弃上清。用预冷的PBS润洗细胞,将细胞重悬于500 μL

PBS,滴加预冷的无水乙醇1.5 mL,使其终浓度为75%,置-20℃过夜。次日离心弃上清。加入3 mL预冷的PBS润洗细胞,离心取细胞沉淀,加150 μL Rnase重悬细胞,37℃孵育30 min。加PI染液150 μL,以PC14为对照,用流式细胞仪检测。增殖指数(PI)为 $(S+G_2) \div (G_1+S+G_2) \times 100\%$ 。

1.2.3 透射电镜观察细胞连接 取对数生长期的3种细胞,用PBS洗2次,刮下细胞,离心后弃上清。加2.5%戊二醛溶液4℃固定细胞过夜。次日PBS洗2次,分别用30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%乙醇逐级脱水后,进行临界点干燥。透射电镜下观察细胞间连接情况。

1.2.4 逆转录(RT)-PCR检测细胞E-cadherin和Vimentin mRNA的表达 取对数生长期的3种细胞,用TRIzol试剂盒分别提取细胞的总RNA。采用RT-PCR检测mRNA的表达。每组设3个复孔,设β-actin为内参。E-cadherin上游引物序列为5'-ACAGCCCCGCCTTATGATTCTC-3',下游引物序列为5'-AAGCGATTGCCCATTCGTT-3',扩增产物长度为187 bp;Vimentin上游引物序列为5'-AGGAGATGCTTCAGAGAGAGG-3',下游引物序列为5'-GACATGCTGTTCCTGAATCTGA G-3',扩增产物长度为192 bp;β-actin上游引物序列为5'-GTTGCGTTACACCCTTCTTG-3',下游引物序列为5'-GACTGCTGTCACCTTCACCGT-3',产物长度为154 bp。PCR约40个循环。用AmpliTaq Gold进行PCR,用goldview染色使条带可视化。cDNA的PCR扩增条件:95℃3 min的变性,然后94℃30 s;5℃退火30 s;72℃延伸1 min;30个循环后,72℃延伸10 min。20 g/L琼脂糖凝胶电泳和goldview染色,用UV光可视化观察分析PCR产物,使用Image-Pro Plus10.0对图像进行灰度值分析。以目的条带灰度值与内参条带灰度值的比值为mRNA的相对表达量。

1.2.5 Western blot检测细胞E-cadherin和Vimentin蛋白表达 取对数生长期的3种细胞,裂解细胞提取其总蛋白,BCA法测定蛋白浓度后变性,采用100 g/L SDS-PAGE凝胶电泳,转膜,封闭,孵育E-cadherin(1:1 000)、Vimentin(1:1 000)、GADPH(1:1 000)以及相应的HRP标记二抗,ECL显色;采用Image-Pro Plus10.0分析软件对条带作灰度值分析。以目的条带灰度值与内参条带灰度值的比值为蛋白的相对表达量。

1.2.6 统计学方法 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组

组间比较采用 *t* 检验, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 MSP 对细胞周期的影响

流式细胞仪检测结果发现 PC14-Mst1-pEGFP-

表 1 MSP 对 PC14 细胞周期的影响

Table 1 Effects of MSP transfection on cell cycle of PC14 cells

Group	<i>n</i>	(G ₁ /G ₀)/%	S/%	(G ₂ /M)/%	PI
PC14	3	23.10±0.19	74.01±1.89	2.89±1.69	76.90±3.58
PC14-pEGFP-N1	3	24.01±2.65	73.83±2.55	2.37±0.40	76.20±2.95
PC14-Mst1-pEGFP-N1	3	31.98±0.34*	66.22±2.23*	1.65±0.94*	67.87±3.17*

* $P<0.05$, vs. PC14 and PC14-pEGFP-N1 groups

透射电镜观察结果(图 1)显示,与 PC14 组的细胞间距[(43.51±7.27) nm]、PC14-pEGFP-N1 组的细胞间距[(38.36±10.91) nm]相比,PC14-Mst1-pEGFP-N1 组细胞间距为(27.87±6.96) nm,细胞连接较紧密,差异有统计学意义($P<0.05$)。

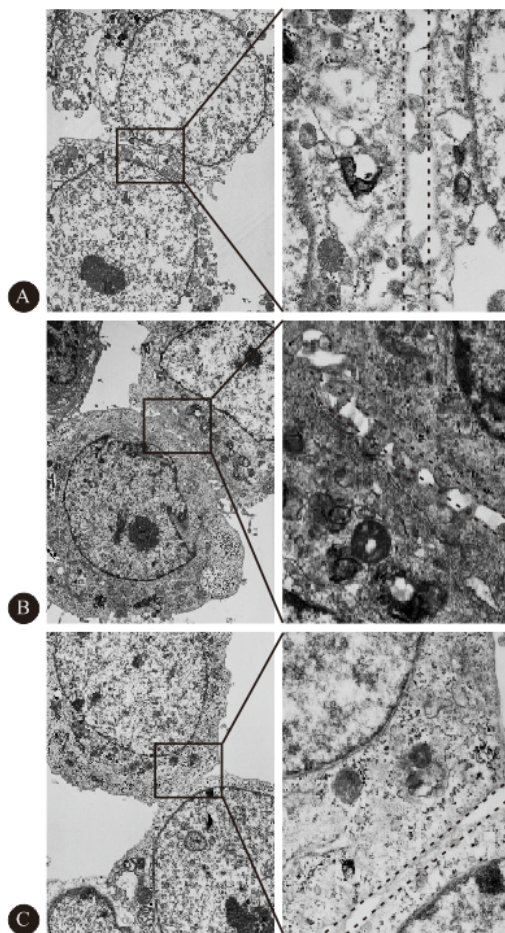


图 1 透射电镜观察 MSP 对 PC14 细胞间距(虚线)的影响(左, $\times 2000$;右, $\times 5000$)

Fig 1 Effects of MSP transfection on cell gaps (dotted line) between PC14 by TEM (left, $\times 2000$; right, $\times 5000$)

A; PC14; B; PC14-pEGFP-N1; C; PC14-Mst1-pEGFP-N1.

The box in the left figure was zoomed in to the right

N1 组细胞处于 G₁/G₀ 期比例高于 PC14 组与 PC14-pEGFP-N1 组($P<0.05$);而 S 期和 G₂/M 期细胞比例及 PI, 均低于对照组 PC14 与 PC14-pEGFP-N1, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见表 1。

2.2 MSP 对细胞连接的影响

2.3 MSP 对细胞 E-cadherin 和 Vimentin mRNA 及蛋白表达的影响

见图 2。PC14-Mst1-pEGFP-N1 组细胞 E-cadherin 的 mRNA 及蛋白表达水平升高($P<0.05$), Vimentin 的 mRNA 及蛋白表达水平降低, 与 PC14 组及 PC14-pEGFP-N1 组相比, 差异有统计学意义($P<0.05$)。

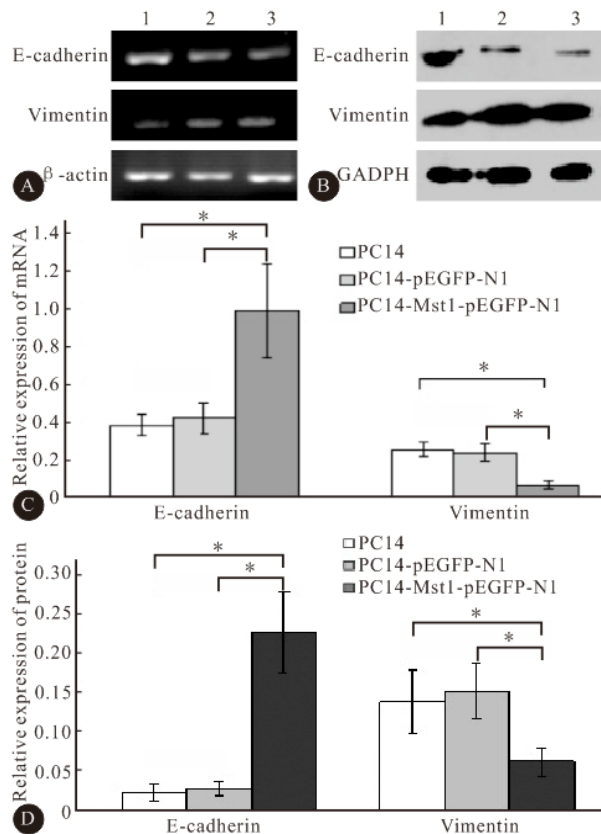


图 2 MSP 对 PC14 细胞 E-cadherin 和 Vimentin mRNA (A,C)和蛋白(B,D)表达的影响

Fig 2 Effects of MSP transfection on the expressions of E-cadherin and Vimentin mRNAs (A, C) and proteins (B, D) in PC14

1; PC14-Mst1-pEGFP-N1; 2; PC14-pEGFP-N1; 3; PC14; A,

B; Electrophoretogram; C, D; Charts. * $P<0.05$

3 讨论

肿瘤转移是恶性肿瘤发展一个重要的过程:细胞之间的黏附能力降低,癌细胞与基底膜黏附力增强,基底膜逐渐被降解,最后癌细胞游离,浸润渗透基质,生成新的淋巴管和血管^[7]。EMT 可以促进肿瘤的转移^[1],研究表明在 MSP 充足的情况下,RON 过表达可以促进 EMT 发生,增强细胞的迁移、侵袭能力^[9]。MSP 是一种具有免疫调节活性的糖蛋白,参与炎症反应,并且在多种动物的肝、肾、肺等器官的炎症疾病模型中扮演一个关键的调节器角色,此外 MSP 还参与调控细胞凋亡,具有促进和抑制细胞凋亡的双重功能^[12]。目前,许多研究表明 MSP 在 RON 过表达的情况下对癌细胞有影响,但对于 MSP 通过其他路径影响肿瘤的发生却未见报道。PC14 是 RON 和 MSP 阴性的 NSCLC 细胞,前期本课题组发现在无 RON 的情况下,MSP 可以抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和浸润能力^[11]。这提示 MSP 对肿瘤细胞的生物学特性可能会通过非 RON 的途径而产生影响。癌细胞能无限增殖是因为细胞周期调控失常。我们推测 MSP 通过影响细胞周期抑制细胞增殖,以及通过抑制 EMT 反应抑制细胞的迁移、侵袭。因此,本实验通过对细胞周期 EMT 标志物和细胞间隙的检测,探讨 MSP 对 PC14 细胞周期和 EMT 的影响。

本研究发现,与 PC14 及 PC14-pEGFP-N1 细胞相比,PC14-Mst1-pEGFP-N1 细胞处于 G₁/G₀ 期的比例增高,S 期及 G₂/M 期比例降低。G₁ 期是细胞接受外部信息、进入分裂期的关键期,恶性细胞的细胞周期往往发生改变,成为无限增殖的细胞,此结果说明 MSP 抑制 PC14 细胞从 G₁ 进入到 S 期的过程,从而抑制细胞的增殖、侵袭和迁移。当细胞发生 EMT 时,细胞之间的连接被打断,细胞间隙增大。与 PC14 及 PC14-pEGFP-N1 细胞相比,PC14-Mst1-pEGFP-N1 细胞之间的间隙减小,细胞连接较紧密,这从形态学上说明细胞的 EMT 能力受到 MSP 抑制。PC14-Mst1-pEGFP-N1 细胞 E-cadherin 表达量升高,而 Vimentin 表达量降低,这两个 EMT 分子标志物的变化,表明 MSP 在一定程度上抑制了 PC14 细胞 EMT 能力。

以上结果表明 MSP 除了与 RON 受体结合外,还能与其它受体发生反应,起到抑制肿瘤细胞 EMT

以及影响细胞周期的作用。但 MSP 存在何种非 RON 途径影响 PC14 细胞的 EMT 和细胞周期,以及在生物体内 MSP 如何作用于 PC14 细胞,还尚未明确,需要进一步探究。

参 考 文 献

- [1] 张 满,特木热,郭占林. 上皮间质转化(EMT)与肺癌的关系. 内蒙古医学杂志,2014,46(12):172-174.
- [2] 陈万青,张思维,邹小农. 中国肺癌发病死亡的估计和流行趋势研究. 中国肺癌杂志,2010,13(5):488-493.
- [3] LI J, CHANDA D, SVERDLOV R, *et al.* MSP: an emerging player in metabolic syndrome. *Cytokine Growth Factor Rev*,2015,26(1):75-82.
- [4] 赵俊卿,李云峰,杨之斌. 肿瘤细胞发生细胞上皮-间质转变机制的研究. *肿瘤*,2010,30(10):890-893.
- [5] SCANLON CS, VANTUBERGEN EA, D' SILVA NJ. Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *Dent Res*,2013,92(2):114-121.
- [6] WANG MH, WANG D, CHEN YQ. Oncogenic and invasive potentials of human macrophage-stimulating protein receptor, the RON receptor tyrosine kinase. *Carcinogenesis*,2003,24(8):1291-1300.
- [7] WANG MH, LEE W, LUO YL, *et al.* Altered expression of the RON receptor tyrosine kinase in various epithelial cancers and its contribution to tumorigenic phenotypes in thyroid cancer cells. *J Pathol*,2007,213(4):402-411.
- [8] CAMP ER, YANG A, GRAY MJ, *et al.* Tyrosine kinase receptor RON in human pancreatic cancer. *Cancer*,2007,109(6):1130-1139.
- [9] CÔTÉM, MILLER AD, LIU SL. Human RON receptor tyrosine kinase induces complete epithelial-to-mesenchymal transition but causes cellular senescence. *Biochem Biophys Res Commun*,2007,360(1):219-225.
- [10] WANG MH, GONIAS SL, SKEEL A, *et al.* Proteolytic activation of single-chain precursor macrophage-stimulating protein by nerve growth factor-gamma and epidermal growth factor-binding protein, members of the kallikrein family. *J Biol Chem*,1994,269(19):13806-13810.
- [11] 刘 霞,魏诗航,施雪旋,等. Msp 对人非小细胞肺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力影响的实验研究. *四川大学学报(医学版)*,2017,48(1):41-45.
- [12] IWAMAL A, YAMAGUCHI N, SUDA T. STK/RON receptor tyrosine kinase mediates both apoptotic and growth signals via the multifunctional docking site conserved among the HGF receptor family. *EMBO*,1996,5(2):15866-15875.

(2017-09-10 收稿,2017-12-25 修回)

编辑 吕 熙