

## 过表达 NK4 对人肺腺癌 A549 细胞增殖和凋亡的影响

朱莹然,俞小卫\*

(南京医科大学附属常州第二医院呼吸科,江苏 常州 213003)

**[摘要]** 目的:构建含有 NK4 基因的重组慢病毒载体(LV-NK4),感染人肺腺癌 A549 细胞后观察 NK4 基因的表达,并研究 NK4 对肺癌 A549 细胞增殖和凋亡的影响。方法:采用 DNA 重组技术,将 NK4 基因克隆至带增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的慢病毒载体 GV358,脂质体介导法将其与慢病毒包装系统共转染 293T 细胞,包装为慢病毒,感染 A549 细胞,观察感染效率。采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)及免疫印迹法(Western blot)检测 NK4 基因和蛋白的表达。建立 A549(空白对照组)、A549/NK4(实验组)、A549/LV(空病毒对照组)3 组细胞;RT-PCR 法测定各组细胞 c-met 基因水平;噻唑蓝(MTT)比色法测定各组细胞第 1~7 天增殖情况,绘制生长曲线;流式细胞术检测各组细胞凋亡率。结果:经基因测序证实 LV-NK4 构建成功;感染后 A549 细胞中可见明显的 NK4 蛋白表达,Western blot 显示 50 000 处有蛋白条带;RT-PCR 结果显示实验组 NK4 mRNA 水平较空白对照组和空病毒对照组明显升高( $P < 0.01$ ),c-met mRNA 水平较其他两组下降( $P < 0.05$ );MTT 结果显示实验组细胞从第 4 天起生长比正常对照组和空病毒对照组均缓慢( $P < 0.05$ );流式细胞术结果显示实验组细胞凋亡率高于正常对照组和空病毒对照组( $P < 0.05$ )。结论:成功构建 NK4 慢病毒载体且有效转染 A549 细胞;NK4 具有抑制 A549 细胞增殖并促进其凋亡的作用,可能与下调 c-met 基因水平有关。

**[关键词]** 慢病毒载体;人肺腺癌 A549 细胞;基因转染;NK4;增殖;凋亡

**[中图分类号]** R734.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)07-950-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS201507010

## Effects of overexpression of NK4 on cell proliferation and apoptosis of human adenocarcinoma A549 cells

Zhu Yingran, Yu Xiaowei\*

(Department of Respiratory Medicine, Changzhou Second Hospital Affiliated to NJMU, Changzhou 213003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the transfection and expression level of human NK4 gene in A549 cells by constructing NK4 of recombinant lentiviral vector, and observe the effect of NK4 on cell proliferation and apoptosis. **Methods:** The NK4 gene was cloned into lentiviral expression vector by recombining DNA technology. The recombinant plasmid was cotransfected with lentiviral packaged systems in 293T cells by lipofectin reagent to produce lentiviral particles. A549 cells were infected with the lentivirus, and the infection efficiency was observed under fluorescence microscope. Expression of NK4 gene and protein was identified by RT-PCR and Western blot, respectively. Three groups of cells were established, including the A549/NK4 group, the negative control group (A549/LV), and the blank control group (A549). Expression of c-met mRNA in the three groups of cells was examined by RT-PCR analysis. Through MTT colorimetric, we assayed the growth of the three groups of cells from the first day to the seventh day, and drew a growth curve to compare the proliferations of cells. The rates of apoptosis of the cells were detected by flow cytometry. **Results:** LV-NK4 transfected A549 cells expressed NK4, and the cells expressed less c-met than the blank and negative group. In MTT test, the A549/NK4 group cells grew slower than the other group from the fourth day ( $P < 0.05$ ). With flow cytometry, the apoptosis rate of the A549/NK4 group was higher than the blank and negative control group. **Conclusion:** The NK4 recombinant lentiviral vector had been successfully constructed and effectively transfected A549 cells. NK4 can inhibit the proliferation and promote the apoptosis of A549 cells, the mechanism may be related to down-regulated c-met.

**[Key words]** lentiviral vector; A549 cell; gene transfection; NK4 gene; proliferation; apoptosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(07):950-954]

**[基金项目]** 常州市国际科技合作计划(CZ20110021)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: yxwlyy8180102@sina.com

c-met 是一种原癌基因,许多肿瘤表面表达 c-Met 蛋白,c-Met 的过度表达是肿瘤恶性度增高的一个标志。肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF)通过激活 c-Met 受体并导致底物蛋白的酪氨酸磷酸化,参与肿瘤的增殖、分化和侵袭转移过程<sup>[1]</sup>。NK4 为一种新型的肝细胞生长因子拮抗剂,它由 HGF  $\alpha$  链 N 末端的 447 个氨基酸和 4 个 Kringle 区域所组成,因此命名为 NK4,其相对分子质量为 50 000<sup>[2]</sup>。NK4 与 HGF 竞争性结合 c-Met 受体,拮抗 HGF 诱发的肿瘤细胞侵袭、迁移作用,促进肿瘤细胞的凋亡,在癌细胞的转移控制中具有重要意义<sup>[3]</sup>。目前国内外大量研究已经证实,NK4 基因能够抑制结肠癌、胰腺癌、前列腺癌、胃癌、淋巴瘤等肿瘤的增殖和迁移,但有关其在肺癌中的作用,目前尚无定论<sup>[2,4]</sup>,本研究旨在通过构建 NK4 慢病毒载体,转染人肺腺癌 A549 细胞,并进一步观察 NK4 对 A549 细胞增殖和凋亡的影响,为 NK4 用于肺癌治疗的研究及临床应用奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

人肺腺癌细胞株 A549 由南京医科大学附属常州第二医院中心实验室惠赠。RPMI-1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(Gibco 公司,美国);GV358 载体、Help1.0 质粒载体、Help2.0 质粒载体(上海吉凯基因化学技术有限公司);琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(上海天根生化);总 RNA 提取液 TRIzol(Invitrogen 公司,美国);限制性内切酶(NEB 公司,美国);质粒抽提试剂盒 (Promega 公司,美国);In-Fusion™ PCR Cloning Kit(Clontech 公司,美国);dNTP(大连宝生物);DNA Ladder Marker(Fermentas 公司,美国);噻唑蓝 (MTT,Sigma 公司,美国);Annexin V Apoptosis Detection Kit APC(eBioscience 公司,美国)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 细胞培养

从液氮罐中取出 A549 细胞,常规方法复苏,重悬细胞,培养于含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,按每孔  $1 \times 10^6$  个细胞接种至 6 孔板,放置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养。隔天换液,3 d 传代。

#### 1.2.2 质粒的构建和鉴定

从 GenBank 中查找出相应的 NK4 基因 mRNA 序列全长,获取其翻译起始和终止的位点,设计合成引物:上游引物 5'-GAGGATCCCCGGGTACCG-GTCGCCACCATGCAAAGGAAAAAGAAATAC-3',

下游引物 5'-TCCTTGAGTCCATACCGACTATTG-TAGGTGTGGTATC-3'。以克隆质粒为模板,按下列参数循环 30 次:94℃ 30 s,94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 2 min,72℃ 5 min 制备 NK4 的 cDNA。NK4 的 cDNA 经 EcoR I 和 Age I 双酶切后,电泳并割胶回收载体。以 T4 DNA 连接酶连接,制备克隆连接液,并转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。PCR 法挑选出阳性转化子送至上海吉凯公司测序。

#### 1.2.3 慢病毒的包装

提取慢病毒包装系统中 3 种质粒 DNA(GV358-NK4-EGFP 载体、pHelper1.0 载体、pHelper2.0 载体)溶于灭菌的 TE 中。将上述 DNA 溶液与相应体积的 Opti MEM 混合均匀,调整总体积为 2.5 mL,按 Invitrogen 公司 Lipofectamine 2000 使用说明进行共转染 293T 细胞,于 37℃、5%的 CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。转染后 8 h 更换为完全培养基,培养 48 h 后收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液,于 4℃ 4 000 g 离心 15 min,除去细胞碎片,将经过 0.45  $\mu$ m 滤器过滤的病毒上清加入滤膜插件中,再次离心取上清得重组慢病毒,-80℃长期保存。

#### 1.2.4 重组慢病毒感染 A549 细胞

将 A549 细胞常规培养于含 10%胎牛血清 RPMI-1640 培养基,制成浓度为  $1 \times 10^6$  个/L 的细胞悬液,接种至 6 孔板中;当细胞生长到融合度 70%左右时,除去旧培养液,按照最适病毒感染复数 (MOI)加入预先混好重组慢病毒的完全培养液 2 mL,放置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 12 h;更换新鲜培养基继续培养,分别在 72、144 h 和传代 3 次后于荧光显微镜下观察增强型绿色荧光蛋白 (EGFP)的表达。

#### 1.2.5 实验分组及命名

经重组慢病毒感染的 A549 细胞命名为 A549/NK4 细胞,作为实验组;未经任何处理的 A549 细胞作为空白对照组;经空载慢病毒感染的 A549 细胞命名为 A549/LV 细胞,作为空病毒对照组。

#### 1.2.6 RT-PCR 检测 NK4 mRNA 的表达

设计 NK4 基因上游引物:5'-CCATGATACCA-CACGAACAC-3',下游引物:5'-CGTACCTCTG-GATTGCTTG-3',扩增产物长度为 130 bp;设计 c-met 基因上游引物:5'-AGTCATAGGAAGAGGGCATT-3',下游引物 5'-CTTCACTTCGCAGGCACA-3',扩增产物长度为 206 bp。GAPDH 上游引物:5'-TGACTTCAACA-GCGACACCCA-3',下游引物 5'-CACCCCTGTTGCTG-TAGCCAAA-3',扩增产物长度为 121 bp。

取对数生长期的 A549、A549/NK4、A549/LV 3 组细胞, 分别用 TRIzol 法进行总 RNA 抽提, 根据 Promega 公司的 M-MLV 操作说明书将 RNA 反转录获 cDNA, 然后分别进行 RT-PCR 检测。两步法 real-time PCR 定量: ①预变性 95°C 15 s, 之后每一步变性 95°C 5 s, 退火延伸 60°C 30 s, 共进行 45 个循环, 每次在延伸阶段读取吸光度值。②PCR 结束后, 95°C 变性 1 min, 然后冷却至 55°C, 使 DNA 双链充分结合; 从 55°C 开始至 95°C, 每 1 次增加 0.5°C, 保持 30 s, 同时读取吸光度值。

1.2.7 MTT 比色法测定各组细胞生长情况并绘制生长曲线

收集各组对数生长期细胞集落 (A549 细胞、A549/LV 细胞、A549/NK4 细胞), 重悬调整密度为  $5 \times 10^4$  个/mL, 按  $5 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔培养板; 每组设 5 个复孔, 加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 终体积 200  $\mu$ L/孔; 待细胞完全沉淀下来后, 在显微镜下观察各实验组的细胞密度, 放进细胞培养箱中培养; 分别从铺板后第 1~7 天, 在培养终止前 4 h 加入 20  $\mu$ L 5 mg/mL 的 MTT 于孔中, 无需换液, 4 h 后完全吸去培养液, 并加 150  $\mu$ L DMSO 溶解甲瓖颗粒, 振荡器振荡 5~10 min, 酶标仪 490/570 nm 检测吸光度 (OD) 值。实验重复 3 次, 取平均值绘制生长曲线。

1.2.8 流式细胞术检测各组细胞的凋亡

分别收集将处于对数生长期的 A549 细胞、A549/LV 细胞、A549/NK4 细胞于 5 mL 离心管中, D-Hanks 洗涤细胞 1 次, 胰酶消化细胞, 培养上清终止消化, 收集各组细胞于 5 mL 离心管中; 重悬细胞密度为  $1 \times 10^6$  个/mL, 加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 以终体积 200  $\mu$ L/孔接种于 6 孔板, 每组设 3 个复孔; 取细胞悬液 100  $\mu$ L, 加入 5  $\mu$ L Annexin V-APC 染色, 室温避光 10~15 min, 转移至流式上机管中, 上机检测。

1.3 统计学方法

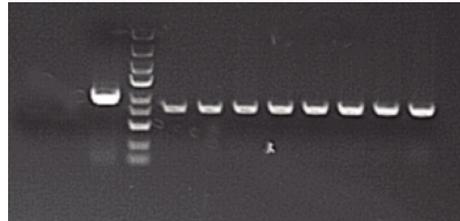
采用 SPSS17.0 统计软件进行统计学处理。计量数据采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两样本均数比较用 *t* 检验, 多样本的均数比较用方差分析。P  $\leq$  0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NK4 克隆产物 PCR 及基因测序结果

重组慢病毒载体转化感受态细胞后进行 PCR 鉴定, 得到的产物约 796 bp (图 1); 将阳性转化子送

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



1: 阴性对照 (ddH<sub>2</sub>O); 2: 阴性对照 (空载自连对照组); 3: 阳性对照 (GAPDH); 4: DL5000 Marker; 5~12: NK4 1~8 号转化子。

图 1 阳性克隆 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析

Figure 1 RT-PCR analysis of positive clones

至上海吉凯公司进行基因测序, 结果与 GenBank 中的 NK4 阅读框架序列完全一致。

2.2 重组慢病毒感染 A549 细胞

以最适 MOI (MOI=10) 感染 A549 细胞 72 h 后镜下见细胞内有绿色荧光, 144 h 后绿色荧光更加明显; 感染细胞经传代 3 次后, 在对数生长期观察 GFP 表达仍明显 (图 2)。

2.3 Western blot 检测感染前后 NK4 蛋白的表达

Western blot 检测示: 两组细胞 (A549/NK4、A549/LV) 在相对分子量为 36 000 处均有 GAPDH 条带; 其中 A549/NK4 细胞组在相对分子量为 50 000 处有 NK4 蛋白条带, 同时 A549/LV 组在相对分子量为 50 000 处无条带 (图 3)。

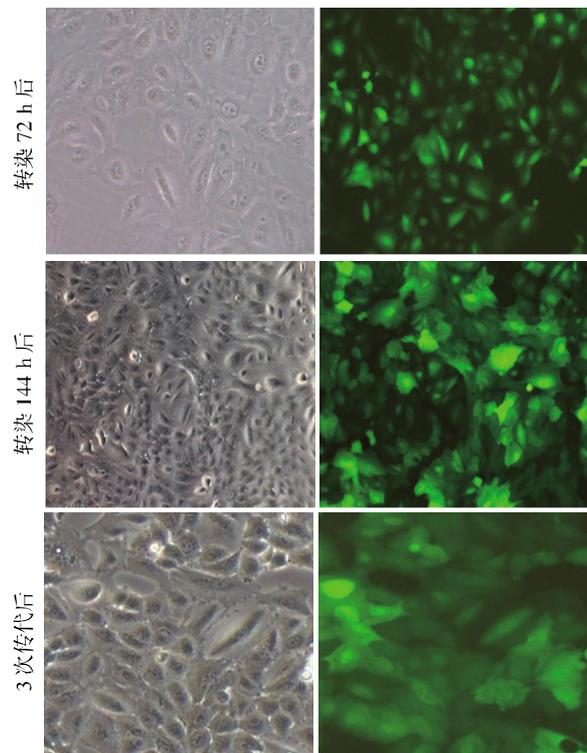
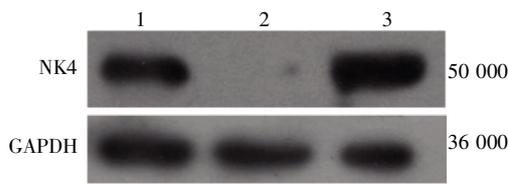


图 2 A549 细胞转染后荧光镜下观察 ( $\times 100$ )

Figure 2 Observation in fluorescence microscope after transfection ( $\times 100$ )



1:标准蛋白;2:A549/LV 细胞;3:A549/NK4 细胞。

图 3 Western blot 检测 NK4 在 A549 细胞中的表达

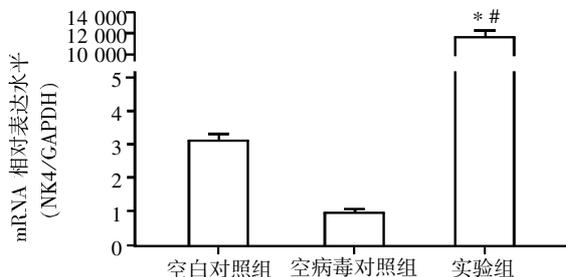
Figure 3 Western blot analysis of the expression product of NK4 in A549

#### 2.4 RT-PCR 方法检测各组细胞 NK4 mRNA 水平

采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算各组细胞 mRNA 的相对表达量,PCR 结果显示 A549/NK4 组 NK4 mRNA 表达丰度( $11\ 994.62 \pm 173.60$ )较 A549 组( $3.11 \pm 0.87$ )明显增加,差异具有统计学意义( $P < 0.001$ ),较 A549/LV 组( $1.03 \pm 0.33$ )也明显增加,差异具有统计学意义( $P < 0.001$ ,图 4)。

#### 2.5 RT-PCR 方法检测各组细胞 c-met mRNA 水平

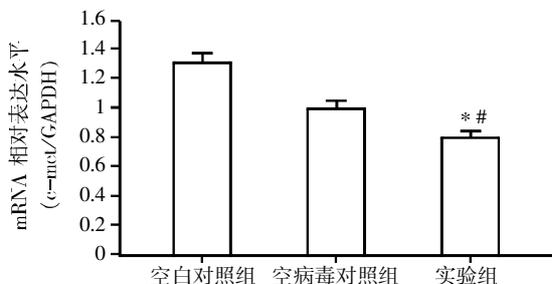
采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算各组细胞 mRNA 的相对表达量,PCR 结果显示 A549/NK4 组 c-met mRNA 表达丰度( $0.80 \pm 0.05$ )较 A549 组( $1.31 \pm 0.06$ )和 A549/LV 组( $1.00 \pm 0.08$ )均下降,差异具有统计学意义



与空白对照组比较, \* $P < 0.01$  ( $n=3$ ); 与空病毒对照组比较, \* $P < 0.01$  ( $n=3$ )。

图 4 RT-PCR 检测 NK4 在空白对照组、空病毒对照组、实验组细胞中的表达

Figure 4 The NK4 mRNA expression in A549, A549/LV, A549/NK4 cells



与空白对照组比较, \* $P < 0.05$  ( $n=3$ ); 与空病毒对照组比较, \* $P < 0.05$  ( $n=3$ )。

图 5 RT-PCR 检测 c-met 在空白对照组、空病毒对照组、实验组细胞中的表达

Figure 5 The c-met mRNA expression in A549, A549/LV, A549/NK4 cells

( $P=0.028, P=0.030$ ,图 5)。

#### 2.6 MTT 法测定各组细胞生长情况并绘制生长曲线

将实验组、空白对照组、空病毒对照组 3 组细胞第 1~7 天所测 OD 值绘制生长曲线(图 6),并将各组每天所测 OD 值进行单因素方差分析,结果显示 3 组细胞中实验组从第 4 天起细胞增殖比空白对照组、空病毒对照组均缓慢( $P=0.032$ )。空病毒对照组和空白对照组细胞增殖差异无统计学意义( $P=0.069$ )。

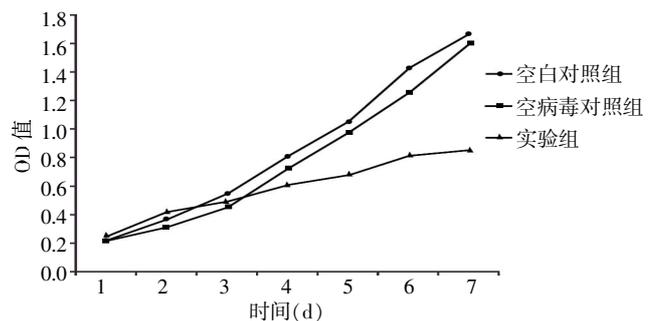


图 6 NK4 对细胞增殖的影响

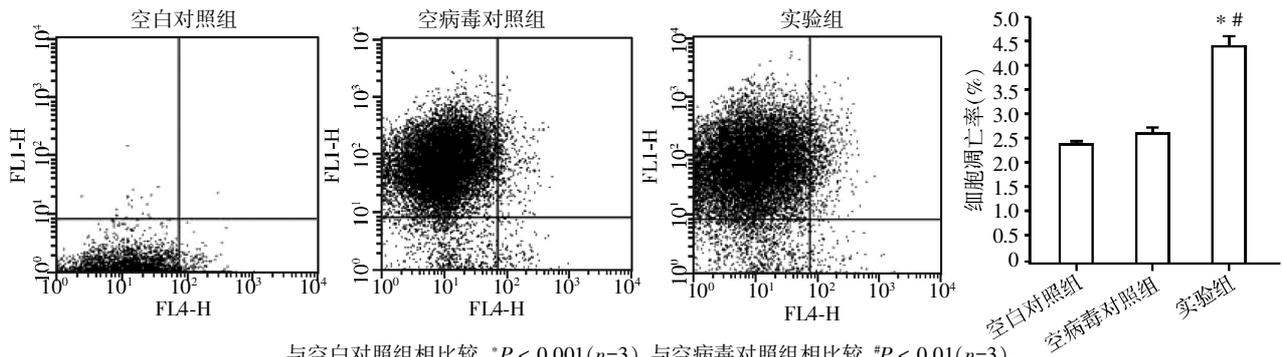
Figure 6 Effects of NK4 overexpression on cell proliferation

#### 2.7 流式细胞术分析各组细胞凋亡率

实验组与空白对照组相比,凋亡率从 ( $4.39 \pm 0.24$ )%下降为 ( $2.41 \pm 0.13$ )%,差异有统计学意义( $P < 0.001$ );实验组与空病毒对照组相比,凋亡率从 ( $4.39 \pm 0.24$ )%下降为 ( $2.66 \pm 0.07$ )%,差异有统计学意义( $P=0.003$ );而空白对照组与空病毒对照组凋亡率相比,差异无统计学意义( $P=0.059$ ,图 7)。

### 3 讨论

肺癌是目前全球最常见的恶性肿瘤之一,虽然近年来我们在化疗药物及其外科治疗上有所进展,但是其病死率仍居首位<sup>[5]</sup>,因此,探讨新的治疗机制显得尤为重要,而当前基因治疗为研究热点之一。HGF 通过与其受体 c-Met 结合表现出蛋白质酪氨酸激酶(PTK)活性,并引起 c-Met 自身发生磷酸化,进一步快速激活各种效应蛋白,如 GAB1、GRB2、磷脂酶 C(PLC)和 Src 等,通过吸引更多的停靠分子和酶,最终共同激活了下游通路,即 Ras/MAPK 和 PI3K/AKT 通路,再通过其介导的转录因子 ETS 家族和核转录因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)影响基因转录,进而调控细胞有丝分裂、增殖和分化<sup>[6]</sup>。而 HGF/c-Met 系统就是通过这一途径参与肿瘤的增殖、分化和侵袭转移过程。研究发现 HGF/c-Met 在肺癌组织中高表达<sup>[7]</sup>,且 c-Met 与非小细胞肺癌分期密切相关,在非小细胞肺癌侵袭、转移过程中起重要作用<sup>[8]</sup>。因此如



与空白对照组相比较, \* $P < 0.001$  ( $n=3$ ), 与空病毒对照组相比较, # $P < 0.01$  ( $n=3$ )。

图 7 NK4 过表达对 A549 细胞凋亡的影响

Figure 7 The effect of NK4 overexpression on the apoptosis of A549 cells

果能够通过某种手段阻断 HGF/c-Met 系统, 将为肺癌的治疗领域开辟出一条新路径。

NK4 与 HGF 竞争 c-Met 受体结合, 影响 HGF/c-Met 系统的信号转导, 从而抑制 HGF 所诱导的细胞增殖、运动和形态形成等, 但不诱导其酪氨酸磷酸化, 不表现 HGF 的任何活性<sup>[9]</sup>, 本研究的目的是构建含有 NK4 基因的重组慢病毒载体, 并转染人肺腺癌 A549 细胞从而进一步探讨 NK4 对肺癌细胞体外生物学功能的影响。

本研究结果表明 NK4 基因能成功转染人肺腺癌 A549 细胞, 并且转染后的细胞连续传代 3 次, 即 A549/NK4 细胞 (第 3 代), 培养 48 h 观察荧光显微镜下观察结果显示荧光标记蛋白表达仍明显, 说明 NK4 蛋白能在 A549 细胞内持续表达。实验中发现 A549 细胞转染 NK4 基因后, c-met 基因水平下降; 进一步行细胞功能学实验结果显示转染后, 实验组细胞从第 4 天起生长比正常对照组和空病毒对照组均缓慢, 流式细胞术分析细胞凋亡结果显示实验细胞凋亡率高于正常对照组和空病毒对照组; 说明转染 NK4 可以直接或间接下调 c-met 基因水平, 抑制 A549 细胞的生长和促进其凋亡。NK4 在乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肝癌、甲状腺癌等肿瘤中的研究表明, NK4 的潜在抗肿瘤价值主要表现为: 一方面它可以作为 HGF 的拮抗剂, 从而发挥抗肿瘤作用; 另一方面它本身是一种血管形成的抑制剂, 可以抑制肝细胞生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、血管内皮细胞生长因子所诱导的血管形成作用。而目前国内外对于 NK4 基因作为独立因素影响肿瘤细胞生长、凋亡的报道尚不多见。本研究通过 NK4 基因转染人肺腺癌 A549 细胞后发现 NK4 能够不依赖于 HGF 等细胞生长因子, 成为影响人肺腺癌 A549 细胞增殖和凋亡的一个独立因素, 这可能与直接或间接下调 c-met 基因水平有关, 更加突显了 NK4

基因在肺癌治疗方面的价值, 为其以后的临床应用奠定坚实的基础。

[参考文献]

- [1] Horiguchi N, Takayama H, Toyoda M, et al. Hepatocyte growth factor promotes hepatocarcinogenesis through c-Met autocrine activation and enhanced angiogenesis in transgenic mice treated with diethylnitrosamine [J]. *Oncogene*, 2002, 21(12): 1791-1799
- [2] Date K, Matsumoto K, Shimura H, et al. HGF/NK4 is a specific antagonist for pleiotrophic actions of hepatocyte growth factor [J]. *FEBS Lett*, 1997, 420(1): 1-6
- [3] Cecchi F, Rabe DC, Bottaro DP. Targeting the HGF/Met signaling pathway in cancer therapy [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16(6): 553-572
- [4] Yue D, Wang Y, Ma P, et al. Effects of transferred NK4 gene on proliferation, migration, invasion and apoptosis of human prostate cancer DU145 cells [J]. *Asian J Androl*, 2010, 12(3): 381-389
- [5] Siegel R, Naishadham D, Jemal A, et al. Cancer statistics [J]. 2012, *CA Cancer J Clin*, 2012, 62(1): 10-29
- [6] Murakami M, Nagai E, Mizumoto K, et al. Suppression of metastasis of human pancreatic cancer to the liver by transportal injection of recombinant adenoviral NK4 in nude mice [J]. *Int J Cancer*, 2005, 117(1): 160-165
- [7] Nakamura T, Sakai K, Nakamura T, et al. Anti-cancer approach with NK4: Bivalent action and mechanisms [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2010, 10(1): 36-46
- [8] Coltella N, Manara MC, Cerisano V, et al. Role of the MET/HGF receptor in proliferation and invasive behavior of osteosarcoma [J]. *FASEB J*, 2003, 17(9): 1162-1164
- [9] Martin TA, Mason MD, Jiang WG. HGF and the regulation of tight junctions in human prostate cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(1): 213-224

[收稿日期] 2015-03-03