

GPC5 过表达对人肺腺癌 A549 肿瘤起始细胞生物学功能的影响

周青, 胡静雯, 许有涛, 王洁, 尹荣, 许林*

(南京医科大学第四临床医学院, 南京医科大学附属肿瘤医院胸外科, 江苏省恶性肿瘤分子生物学重点实验室, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的:探讨磷脂酰肌醇蛋白聚糖-5(glypican 5, GPC5)基因对人肺腺癌 A549 肿瘤起始细胞(cancer-initiating cells, CICs)生物学功能的影响。方法:采用前期构建的过表达 GPC5 慢病毒载体稳定转染的细胞株 GPC5-A549, 无血清培养方法富集 A549 细胞中的 CICs 微球, 通过定量分析检测微球大小, 流式细胞术检测 CD133 阳性细胞比率, Matrigel 和 Transwell 小室检测细胞侵袭迁移能力, Western blot 检测上皮细胞间质化相关蛋白表达。结果:与对照组相比, 过表达 GPC5 后 A549 细胞中 CICs 微球形成数目明显减少, 体积变小, CD133 阳性率明显下降($P < 0.05$); 细胞侵袭、迁移能力显著降低($P < 0.05$); E-cadherin 的蛋白表达明显上调, Vimentin、N-cadherin 的表达显著被抑制($P < 0.05$)。结论:GPC5 过表达能够抑制肺腺癌细胞株 A549 中 CICs 的发生、侵袭和迁移, 调控上皮细胞间质化相关蛋白表达。

[关键词] 肺腺癌; 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-5; 肿瘤起始细胞; 上皮细胞间质化

[中图分类号] R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)11-1528-05

doi:10.7655/NYDXBNS20151106

Influence of over-expression of GPC5 on the biological function of human lung adenocarcinoma A549 cancer-initiating cells

Zhou Qing, Hu Jingwen, Xu Youtao, Wang Jie, Yin Rong, Xu Lin*

(Fourth School of Clinical Medicine of NJMU, Thoracic Surgery Department of Cancer Hospital Affiliated to NJMU, Jiangsu Key Laboratory of Molecular and Translational Cancer Research, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of over-expression of GPC5 on the biological function of human lung adenocarcinoma A549 cancer-initiating cells(CICs). **Methods:** Lentivims-induced GPC5 over-expression was used for biological functional analyses in human lung adenocarcinoma A549 cell line, including cancer-initiating cell microspheres counting by light microscopy, CD133 positive cells measured by flow cytometry, migration and invasive activity detected by Matrigel and Transwell assay, as well as epithelial-mesenchymal transition-related protein expression detected by Western blot. **Results:** Compared with the control group, the numbers of cancer-initiating cell microspheres remarkably decreased ($P < 0.05$) and the percent of CD133 positive cells was reduced($P < 0.05$) in the GPC5 over-expressed group. The over-expression of GPC5 also inhibited the invasion and migration ability of CICs, and led to the down-regulation of Vimentin and N-cadherin, as well as the up-regulation of E-cadherin. **Conclusion:** The over-expression of GPC5 can inhibit the genesis, invasion and migration of human lung adenocarcinoma A549-CICs, and regulate the expression of EMT related proteins.

[Key words] lung adenocarcinoma; glypican-5; cancer-initiating cells; epithelial-mesenchymal transition

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(11): 1528-1532]

磷脂酰肌醇蛋白聚糖-5(glypican 5, GPC5)基因属 Glypican 基因家族成员, 是非吸烟人群罹患肺癌

的高危因素。本课题组既往研究表明, GPC5 是新型的肺癌转移抑制基因, 在肺癌组织中低表达, 且与淋巴结转移和预后差相关, 过表达 GPC5 可以抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭转移^[1]。目前, 有关 GPC5 抑癌作用的调控机制尚不清楚, 部分文献报道其可参与调控 Wnt/ β -catenin 信号通路, 而该通路参与肿

[基金项目] 国家自然科学基金(81201830); 江苏省临床医学科技专项(BL2012030)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xulin83@vip.sina.com

瘤细胞上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),使分化的肿瘤细胞重新获得“干细胞”样特性^[2-3],这类细胞被称为肿瘤起始细胞(cancer-initiating cells, CICs)。因此,拟通过过表达 GPC5 的稳转细胞株,观察人肺腺癌细胞株 A549 中 CICs 微球的形成、侵袭、迁移和 EMT 相关蛋白表达,探讨 GPC5 对肺腺癌 CICs 生物学功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺腺癌 A549 细胞株(中国科学院上海生命科学研究所细胞资源中心)。慢病毒载体 GV287 及过表达 GPC5 的稳转细胞株 GPC5-A549 前期构建由上海吉凯公司完成^[1]。RPMI1640 培养基(Hyclone 公司,美国),胎牛血清(FBS)、0.25% 胰酶、胰岛素(Life 公司,美国),生长因子 β -FGF、EGF (cat356037, cat354052, BD 公司,美国);TRIzol (Life 公司,美国),Primer Script RT reagent(大连宝生物工程公司),SYBR Select Master Mix(Life 公司,美国),PBS 缓冲液(南京凯基生物科技公司); β -actin、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、CD133 一抗(Cell Signaling Technology 公司,美国);Fluor594 标记的羊抗兔二抗(Life 公司,美国),HRP 标记的二抗(北京中杉金桥生物科技公司);预染蛋白 Marker(Fermentas 公司,美国),细胞及组织用蛋白裂解液 RIPA 试剂盒(含 PMSF)、蛋白上样缓冲液、一抗二抗稀释液及去除液、丽春红染色液(海门碧云天公司);PVDF 膜(Millipore 公司,美国),ECL 化学发光试剂(Pierce Biotechnology 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 GPC5-A549 稳转细胞株的验证

将前期构建的 GPC5-A549 稳转细胞株常规培养于含 10%FBS RPMI1640 培养基,传代 2 次后于荧光显微镜下观察增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的表达。同时,收集对数生长期的 A549、空病毒载体 Vector-A549 和 GPC5-A549 组细胞,分别用 TRIzol 法提取总 RNA。取 1 μ g RNA,采用 Primer Script RT reagent RR036A 逆转录合成 20 μ L cDNA,然后用 SYBR Select Master Mix 试剂盒进行 real-time PCR 检测 GPC5 的表达水平,以 β -actin 为内参,结果采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法分析。 β -actin-F:5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3', β -actin-R:5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3'; GPC5-F:5'-GGGCTGCCGATTCCG-3', GPC5-R:5'-CTGGTGCAA-

CATGTAGGCTTTT-3'。

1.2.2 CICs 微球富集

在超低黏附性 24 孔培养板(Coming 公司,美国)中,采用无血清 RPMI1640 培养基培养 A549、Vector-A549 和 GPC5-A549 3 组肺腺癌细胞株,细胞密度为 3 000 个/孔,加入 20 ng/mL EGF、20 ng/mL β -FGF、100 μ g/mL 胰岛素、0.6%葡萄糖、5 mmol/L HEPES、0.4%BSA 及 1%青链霉素。每 3 天半量换入含新鲜 EGF 和 β -FGF 的培养基,持续培养 2~4 周至微球形成。

1.2.3 CICs 微球形成定量分析

细胞培养 2~4 周形成 CICs 微球后,在倒置显微镜下定量计数 24 孔板每孔微球数,随后收集每孔细胞,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,PBS 洗涤 2 遍,加入微球消化液(0.05%胰酶+0.53 mmol/L EDTA-4Na)37 $^{\circ}$ C 孵育 5~10 min,终止消化,吹打成单细胞悬液,台盼兰拒染法计数每孔微球活细胞数,实验重复 3 次。

1.2.4 CICs 表型检测

取上述 CICs 单细胞悬液,调整细胞密度为 2 \times 10⁶ 个/mL,抗体孵育、洗涤,采用 FACSCalibu 流式细胞仪(BD 公司,美国)检测,Flowjo7.6 软件分析数据,实验重复 3 次。

1.2.5 CICs 侵袭、迁移能力检测

将 30 μ L 液化的 Matrigel 基质胶均匀铺于 Transwell 小室的微孔膜上,37 $^{\circ}$ C 孵育 120 min,使 Matrigel 聚合成胶。取单细胞 CICs 微球悬液 100 μ L (4 \times 10⁵ 个/mL)加入 Transwell 小室,下室加入 500 μ L 含 20%FBS 的培养基,培养 24 h,甲醇固定,结晶紫染色,在倒置显微镜下随机选取 3 个视野计数,评价侵袭能力。迁移实验采用不含胶的 Transwell 小室,接种单细胞悬液 100 μ L (2 \times 10⁵ 个/mL),实验重复 3 次。

1.2.6 Western blot 检测

分别收集 A549、Vector-A549 和 GPC5-A549 组的 CICs,裂解、离心取上清,BCA 定量后上样,经电泳、转膜、封闭、抗体孵育,ECL 发光成像。以 β -actin 为内参,分别检测上皮细胞标志 E-cadherin 及间充质细胞标志 Vimentin、N-cadherin 蛋白水平,实验重复 3 次,采用 Image J 软件对条带的灰度值进行分析。

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,多样本均数比较用单因素方差分析。*P* \leq 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GPC5-A549 稳转细胞株的验证

将稳转细胞株传代 2 次后,在荧光显微镜下分别对 A549、Vector-A549 和 GPC5-A549 3 组细胞进行观

察,发现 Vector-A549、GPC5-A549 组细胞 EGFP 表达明显(图 1)。Real-time PCR 检测结果显示, GPC5-A549 组 GPC5 mRNA 表达丰度($2\ 488.092 \pm 64.770$)较 A549 (1.033 ± 0.005)和 Vector-A549(0.998 ± 0.014)组明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 1)。

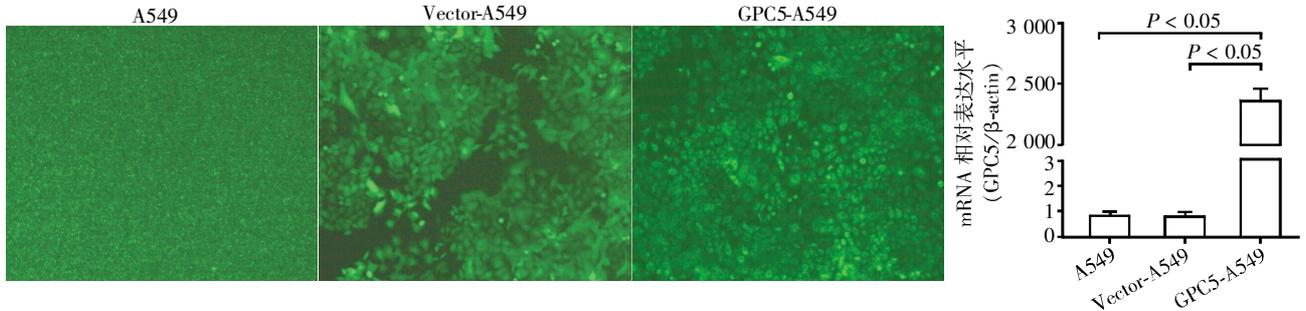


图 1 荧光显微镜下观察 GPC5-A549 稳转细胞株($\times 200$)及 GPC5 mRNA 的表达

Figure 1 Observation of GPC5-overexpressed A549 cell line in fluorescence microscope($\times 200$) and the expression of GPC5 mRNA

2.2 CICs 微球形成的定量分析

如图 2 所示,在普通光学显微镜下观察,定量分析表明,A549 组 CICs 微球数 (22.00 ± 9.62)个/视野,Vector-A549 组 CICs 微球数 (20.00 ± 5.88)个/视野。GPC5-A549 组 CICs 微球数(5.00 ± 3.32)个/视野,与对照组比较,CICs 微球体积变小,形成数目明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05, n=3$)。台盼兰染色活细胞比率检测,A549 组 CICs 中细胞存活率为(82.5 ± 3.3)%,Vector-A549 组 CICs 中细胞存活率为(80.5 ± 2.3)%。GPC5-A549 组 CICs 中

细胞存活率为(67.8 ± 2.6)%,与对照组比较明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05, n=3$)。

2.3 流式细胞术检测 CICs CD133 阳性率

流式细胞术检测结果显示(图 3),A549 组 CICs 中 CD133 阳性率为(22.8 ± 5.6)%,Vector-A549 组 CICs 中 CD133 阳性率为(22.4 ± 5.2)%,GPC5-A549 组 CICs 中 CD133 阳性率[$(10.4 \pm 2.1)\%$]较对照组明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05, n=3$)。

2.4 GPC5 抑制 CICs 的侵袭、迁移

Matrigel 侵袭实验显示(图 4),GPC5-A549 组

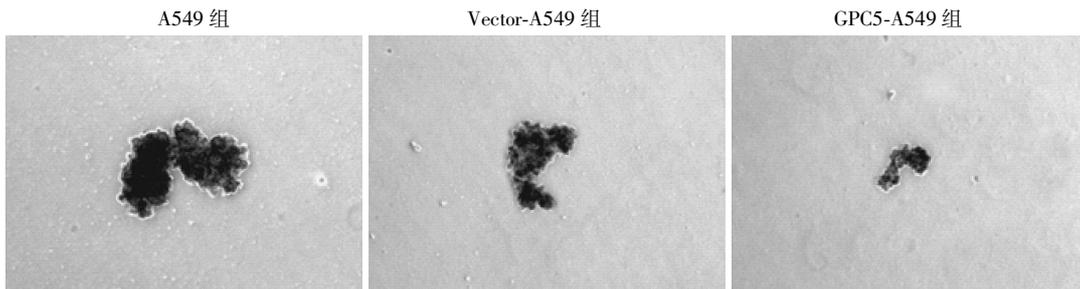


图 2 光镜下观察 A549 形成 CICs 微球的情况($\times 200$)

Figure 2 Observation of A549 cancer-initiating cell microspheres in light microscope($\times 200$)

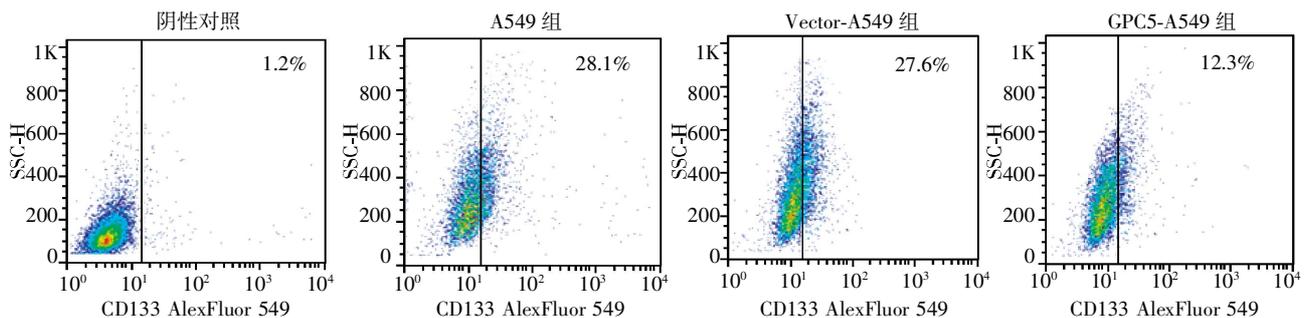


图 3 GPC5 过表达对各组 CICs 中 CD133 阳性率的影响

Figure 3 Effect of GPC5 over-expression on the CD133 positive cell ratio of CICs

CICs 穿膜数为(47 ± 6)个/视野,较 A549 组[(156 ± 11)个/视野]和 Vector-A549[(142 ± 9)个/视野]显著减少($P < 0.05, n=3$)。Transwell 迁移实验表明(图 5),过表达 GPC5 对 CICs 迁移能力有明显抑制作用($P < 0.05, n=3$)。

2.5 GPC5 对 EMT 相关蛋白表达的影响

Western blot 结果表明(图 6),与对照组比较, GPC5-A549 组中 CICs 上皮细胞标志 E-cadherin 蛋白表达显著上调,而间充质标志 Vimentin、N-cadherin 蛋白表达被抑制,差异有统计学意义($P < 0.05, n=3$),提示 GPC5 能够影响 EMT 相关蛋白表达。

3 讨论

GPC5 属硫酸乙酰肝素糖蛋白 (heparan sulfate

proteoglycan, HSPG) 家族,通过糖基磷脂酰肌醇 (glycosylphosphatidylinositol, GPI) 锚定在细胞膜上,可结合一系列配体参与调控细胞的增殖、分化、黏附和迁移等过程。本课题组前期实验证实 GPC5 在非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 中低表达,且与淋巴结转移相关,过表达 GPC5 显著抑制肿瘤细胞恶性进展^[1]。本研究通过探讨过表达 GPC5 对肺腺癌细胞株 A549 的 CICs 生成、侵袭、迁移和 EMT 相关蛋白表达的影响,进一步揭示 GPC5 的抑癌机制。

实验结果显示, GPC5-A549 稳转细胞株形成 CICs 微球数目、体积明显降低,且细胞迁移、侵袭能力下降, CD133 阳性率较对照组明显减少,提示 GPC5 可以抑制肺腺癌 CICs 的形成,并影响其生物

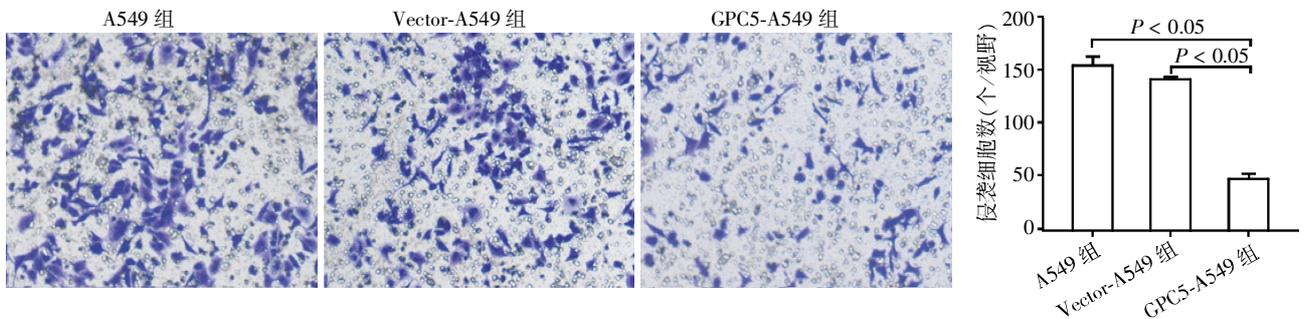


图 4 GPC5 过表达抑制 A549 CICs 的侵袭(×400)

Figure 4 GPC5 over-expression inhibited the invasion ability of A549-CICs(×400)

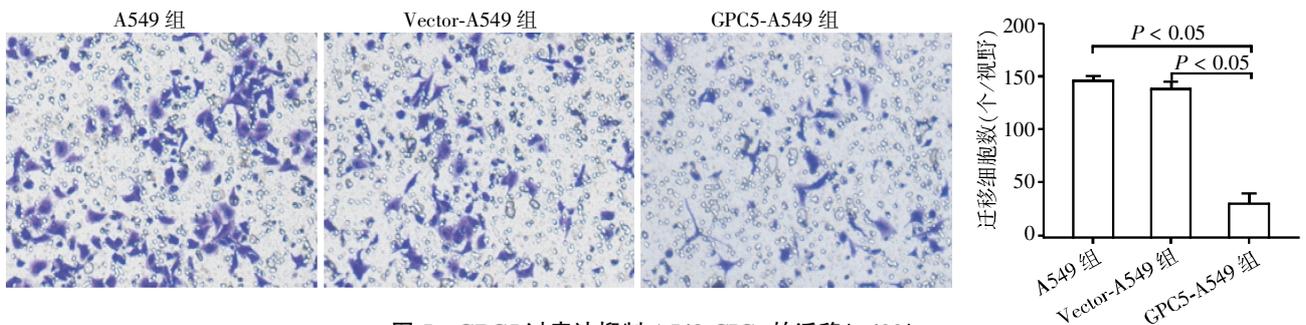


图 5 GPC5 过表达抑制 A549 CICs 的迁移(×400)

Figure 5 GPC5 over-expression inhibited the migration ability of A549-CICs(×400)

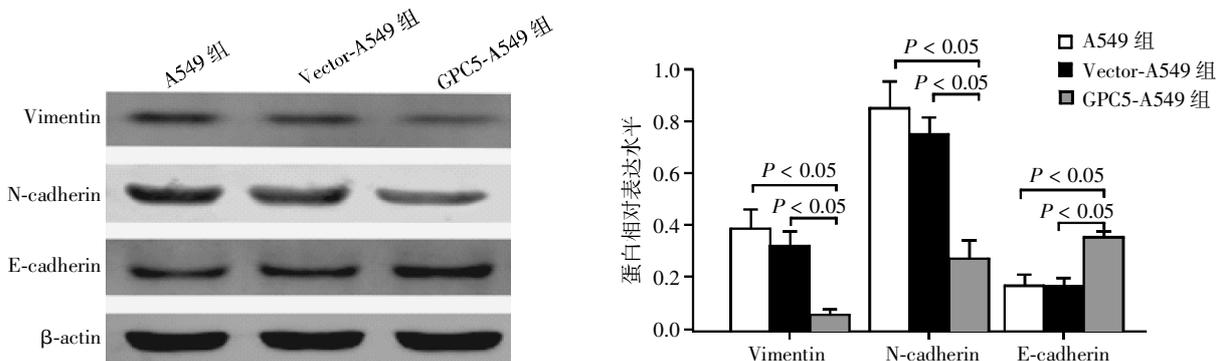


图 6 Western blot 检测各组 CICs 中 EMT 相关蛋白的表达

Figure 6 Western blot analysis of the expression of EMT related proteins

学功能。肺癌起始细胞(lung cancer initiating cells, LCICs)被认为与肿瘤耐药,复发转移有关^[4-5],极少量的CICs(50~1 000个)就可在免疫缺陷小鼠中形成异质性肿瘤。CD133是LCICs的特异性表面标志,在早期NSCLC患者中,CD133阳性率与患者的无病生存期及总生存相关^[6],过表达CD133可以促进肿瘤细胞增殖、血管浸润和复发,同时影响NSCLC化疗耐药^[7]。本研究表明,GPC5有可能通过影响CD133阳性LCICs的生成、侵袭和迁移发挥抑癌作用。

据报道,CICs不仅可来源于恶变的正常干细胞,亦可由已分化的肿瘤细胞通过EMT“去分化”而重新获得干细胞样特性。这些获得干细胞样特性的细胞不仅能够摆脱细胞黏附,浸入周围基质或转移入血液、淋巴^[8],同时抗凋亡特性增强,并对EGFR-TKI等耐药^[9-11]。因此,本研究进一步检测了EMT相关蛋白表达,初步探讨了GPC5通过影响肿瘤细胞EMT抑制CICs形成的分子机制。Western blot结果显示,过表达GPC5后,A549CICs中上皮细胞标志E-cadherin的蛋白表达明显上调,而间充质标志Vimentin、N-cadherin的表达显著被抑制,说明GPC5有可能通过EMT调控LCICs的生成。

既往文献认为,GPC5主要通过调控Wnt/hedgehog(Hh)和EGF信号通路抑制肺癌进展。其中,Wnt/ β -catenin的异常表达不仅与NSCLC恶性程度相关,并且参与肿瘤细胞的EMT及CICs的干细胞样特性维持^[12-13]。因此,本文猜测GPC5影响LCICs生成及生物学功能有可能通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路导致,其具体机制还需要进一步实验证实。

[参考文献]

- [1] Yang X,Zhang Z,Qiu M,et al. Glypican-5 is a novel metastasis suppressor gene in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Lett*,2013,341(2):265-273
- [2] Li Y,Yang P. GPC5 gene and its related pathways in lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*,2011,6(1):2-5
- [3] Qi J,Yu Y,Akilli Ozturk O,et al. New Wnt/beta-catenin target genes promote experimental metastasis and migration of colorectal cancer cells through different signals[J/OL]. *Gut*,2015,[2014-11-01]http://gut.bmj.com/content/early/2015/07/08/gutjnl-2014-307900;Long. DOI: 10.1136/gutjnl-2014-307900
- [4] Bertolini G,D'Amico L,Moro M,et al. Microenvironment modulated metastatic CD133⁺/CXCR4⁺/EpCAM-lung cancer initiating cells sustain cancer dissemination and correlate with poor prognosis[J]. *Cancer Res*,2015,75(17):3636-3649
- [5] Bertolini G,Roz L,Perego P,et al. Highly cancerigenic lung cancer CD133⁺ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*,2009,106(38):16281-16286
- [6] Herpel E,Jensen K,Muley T,et al. The cancer stem cell antigens CD133,BCRP1/ABCG2 and CD117/c-KIT are not associated with prognosis in resected early-stage non-small cell lung cancer [J]. *Anticancer Res*,2011,31(12):4491-4500
- [7] Salnikov AV,Gladkikh J,Moldenhauer G,et al. CD133 is indicative for a resistance phenotype but does not represent a prognostic marker for survival of non-small cell lung cancer patients[J]. *Inter J Cancer*,2010,126(4):950-958
- [8] Battula VL,Evans KW,Hollier BG,et al. Epithelial-mesenchymal transition-derived cells exhibit multilineage differentiation potential similar to mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells*,2010,28(8):1435-1445
- [9] Suda K,Tomizawa K,Fujii M,et al. Epithelial to mesenchymal transition in an epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer cell line with acquired resistance to erlotinib[J]. *J Thorac Oncol*,2011,6(7):1152-1161
- [10] Nurwidya F,Takahashi F,Murakami A,et al. Acquired resistance of non-small cell lung cancer to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors [J]. *Respir Investig*,2014,52(2):82-91
- [11] Shien K,Toyooka S,Yamamoto H,et al. Acquired resistance to EGFR inhibitors is associated with a manifestation of stem cell-like properties in cancer cells[J]. *Cancer Res*,2013,73(10):3051-3061
- [12] Zhang Y,Zhang X,Huang J,et al. Wnt signaling regulation of stem-like properties in human lung adenocarcinoma cell lines [J]. *Med Oncol*,2015,32(5):157
- [13] Ghahhari NM,Babashah S. Interplay between microRNAs and WNT/beta-catenin signalling pathway regulates epithelial-mesenchymal transition in cancer[J]. *Eur J Cancer*,2015,51(12):1638-1649

[收稿日期] 2015-06-19