

KL1 在人非小细胞肺癌 A549 细胞中的作用及其相关机制研究

梁 艳, 陈 波, 位云艳, 吴剑卿*

(南京医科大学第一附属医院老年呼吸科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究人非小细胞肺癌 A549 细胞中 Klotho 基因表达的 KL1 蛋白的相关功能及其机制。方法:分别用表达 KL1 蛋白和表达 KL 蛋白(Klotho 基因表达的另一种同源蛋白)的质粒转染非小细胞肺癌细胞株 A549 后,通过 Western blot 验证转染结果;MTT法检测细胞的生长情况;平板细胞克隆形成实验检测细胞增殖活性;流式细胞术检测细胞凋亡;Western blot 检测细胞转染后对碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)信号通路的中下游靶位点蛋白 ERK1/2 磷酸化水平的影响。结果:转染 48 h 后细胞显著表达外源性 KL($P < 0.01$)、KL1 蛋白($P < 0.01$)。KL1 基因过表达后可以抑制 A549 细胞生长($P < 0.01$);同时显著抑制细胞增殖($P < 0.01$),促进细胞凋亡($P < 0.01$);KL1 过表达能够明显降低 bFGF 通路中 ERK1/2 的磷酸化水平($P < 0.01$);过表达 KL1 与过表达 KL 比较,两者在影响细胞生长、增殖、凋亡和对 bFGF 信号通路的激活中并无明显统计学差异($P > 0.05$)。结论:KL1 与 KL 蛋白均能够抑制肿瘤细胞生长增殖,促进肿瘤细胞凋亡,作用效果相当。KL1 能够抑制 bFGF 信号转导通路,可能是 KL 中发挥抑制肿瘤作用的主要功能片段。

[关键词] 非小细胞肺癌;Klotho;碱性成纤维生长因子

[中图分类号] R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)09-1031-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160902

Effects and related mechanism of KL1 in human non-small cell lung cancer A549 cells

Liang Yan, Chen Bo, Wei Yunyan, Wu Jianqing*

(Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects and possible mechanism of action of KL1 protein in human non-small cell lung cancer cells A549. **Methods:** Western blot was used to detect the overexpression of KL or KL1 in A549 cells transfected with pcDNA3.1-MYC-KL1 or pcDNA3.1-MYC-KL. MTT assay, colony-forming assay and flow-cytometry analysis were designed to determine the change of cell growth, proliferation and apoptosis of A549 cells mediated by KL or KL1, respectively. Effects on the phosphorylation of ERK1/2 in the middle and lower target site of the basic fibroblast growth factor (bFGF) signaling pathway were detected by Western blot after transfection. **Results:** After transfected 48 h, exogenous KL or KL1 was overexpressed significantly in A549 cells (both $P < 0.01$). Compared with the control group, the cell growth was inhibited in A549 cells after transfected with KL1 ($P < 0.01$), the proliferation was remarkably inhibited ($P < 0.01$) and the apoptosis was promoted significantly ($P < 0.01$). KL1 overexpression in A549 cells was associated with reduced bFGF-induced phosphorylation of ERK1/2 ($P < 0.01$). There was no significant difference between overexpressed KL and KL1 in cell growth, proliferation and activation of bFGF signal pathway ($P > 0.05$). **Conclusion:** The KL and KL1 have a similar significant ability to inhibit the growth, proliferation and promote the apoptosis of A549 cells. This may be due to the same ability to inhibit bFGF pathway. Thus, KL1 may be the main functional fragment of the KL protein.

[Key words] non-small cell lung cancer; Klotho; basic fibroblast growth factor

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(09): 1031-1035, 1045]

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,其发生率呈逐年上升趋势,不论在发达国家还是发展中国家,其

病死率均居恶性肿瘤之首^[1-2]。其中非小细胞肺癌患者的 5 年生存率仅为 21%^[2]。目前基因治疗备受研究者们关注,寻找、分析、研究可能与非小细胞肺癌相关的基因是非小细胞肺癌治疗的关键。Klotho 基因是目前公认的抗衰老基因,本课题组既往研究表

[基金项目] 国家自然科学基金(81572259);科技部国际科技合作专项(2014DFA31940)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jwuny@njmu.edu.cn

明,Klotho 基因不仅具有抗衰老作用,还与肿瘤尤其是肺癌的发生发展有着密切联系,Klotho 基因可表达跨膜型 KL 或分泌型 KL1 蛋白,有研究发现 KL 能够通过抑制 IGF-1、Wnt 等信号通路抑制肿瘤生长、增殖,为肺癌的治疗提供了新途径^[3-5]。但 Klotho 基因表达的 KL1 蛋白在肺癌中的作用并无相关验证。本研究拟在非小细胞肺癌 A549 细胞中进一步研究 KL1 对肺癌细胞生长、增殖的影响及相关机制。

1 材料和方法

1.1 材料

A549 细胞株(南京医科大学老年医学实验室保存),DMEM 高糖培养基、胎牛血清(Gibco 公司,美国),质粒 pcDNA3.1-MYC-KL、pcDNA3.1-MYC-KL1、空载体 pcDNA3.1-MYC、Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司,美国),3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒及 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)(ProTech 公司,美国),KL 抗体、KL1 抗体、p-AKT(S473)抗体、T-AKT 抗体、ERK1 (pT202/pY204)+ERK2(pT185/pY187) 抗体、ERK 抗体(Abcam 公司,英国),G418 及吉姆萨染色试剂盒(南京凯基生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 A549 细胞的培养及质粒转染

细胞培养于含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的 DMEM 高糖培养液中,置于 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养,于对数生长期开始实验。转染时按照 Lipofectamine 2000 的操作说明将质粒 pcDNA3.1-MYC(空载对照组)、pcDNA3.1-MYC-KL(过表达 KL 组)和 pcDNA3.1-MYC-KL1(过表达 KL1 组)分别转染 A549 细胞,细胞转染 48 h 后取出,用预冷 PBS 溶液清洗细胞 3 次,加入 RIPA 细胞裂解液提取细胞总蛋白质进行 Western blot 检测。

1.2.2 Western blot 检测过表达质粒转染后 A549 细胞中目的蛋白的表达

收集转染后 48 h 的 A549 细胞,加入细胞裂解液并提取总蛋白质,根据 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书测定相应蛋白浓度,进行 SDS-PAGE 电泳,再转移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉溶液封闭,加入一抗(KL 1:1 000,KL1 1:1 000,GAPDH 1:2 000),4℃过

夜,经 TBST 漂洗 3 次后加二抗孵育 2 h,加化学发光试剂,使用全自动化学发光图像分析系统显示目的蛋白条带并拍照,用 Tanon Gel Image System 软件分析条带灰度值。

1.2.3 MTT 法检测细胞生长活性

A549 细胞转染后 24 h,以 0.25%胰酶消化细胞并吹打混匀形成单细胞悬液后计数,以 4×10⁵ 个/孔铺 96 孔板,每组设 6 个复孔,分别培养 24、48、72 h,在相应时间点,取出 1 块 96 孔板,每孔更换无血清培养液 80 μL 和 MTT(5 mg/mL)溶液 20 μL,继续置于细胞培养箱中培养 4 h 后弃上清,加入 DMSO 150 μL/孔,低速振荡 10 min,放入酶标仪中在 570 nm 处测定吸光度值。细胞生长抑制率(%)=(对照组吸光度值-实验组吸光度值)/对照组吸光度值×100%。

1.2.4 平板克隆实验检测细胞增殖活性

A549 转染后 24 h 加入 G418 (1 mg/mL) 溶液 10 μL/mL 继续培养 14 d,定期更换含 G418 的培养基,筛选出稳定转染株。0.25%胰酶消化细胞,吹打混匀制成单细胞悬液并计数,以 400 个/孔加入 6 孔板,置于细胞培养箱中连续培养 2~3 周,待肉眼可见的细胞集落形成后终止培养,甲醇溶液固定 5 min,Gimsa 染色液室温静置 30 min,吸弃染色液,清水轻柔洗去染色液并晾干,显微镜下分别计数>50 个细胞的克隆数。克隆形成率(%)=克隆形成数/接种细胞数×100%。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡

将对数生长期的 A549 细胞接种于 6 孔板上,转染后 48 h 收集细胞,用 PBS 洗涤 2 次后收集细胞,加入 500 μL Annexin V-FITC 室温避光孵育 5 min,每管加入 5 μL 碘化丙啶(PI)室温避光孵育 15 min,使用流式细胞仪检测。

1.2.6 Western blot 检测转染过表达质粒对 A549 细胞中 bFGF 信号通路的影响

A549 细胞转染 24 h 后更换无血清的 DMEM 高糖培养基饥饿处理 24 h,加入 bFGF(2 ng/μL)使终浓度达 50 ng/mL,混匀后放入细胞培养箱中刺激 20 min,取出置于冰上,加入 RIPA 细胞裂解液,收集细胞蛋白,BCA 法测蛋白浓度,经 SDS-PAGE 电泳分离,转至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h,TBST 清洗 3 遍,10 min/次,加入一抗(p-ERK1/2 1:1 000,T-ERK 1:500,GAPDH 1:1 000)4℃封闭过夜,TBST 洗膜 3 遍后二抗封闭 2 h,使用全自动化学发光图像分析系统显示目的蛋白条带并拍照,Tanon Gel Image System 软件分析条带灰度值。

1.3 统计学方法

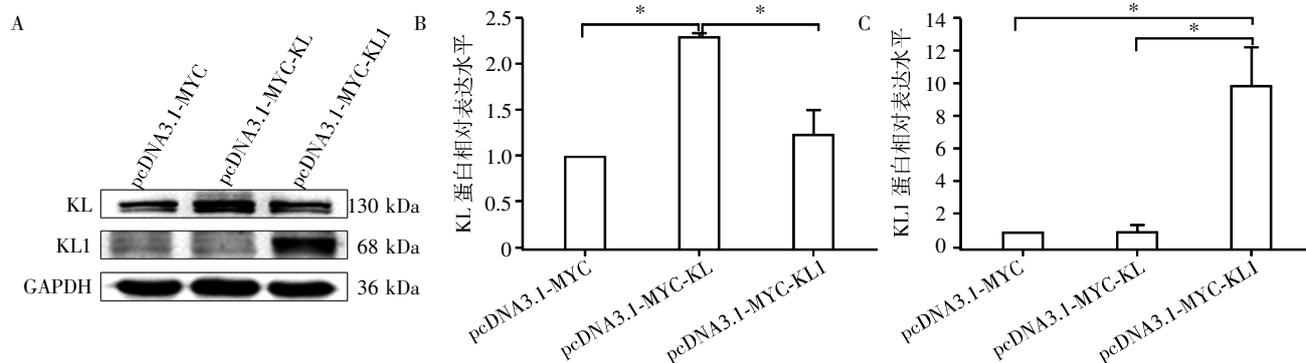
所有实验重复 3 次,应用 SPSS20.0 软件分析处理数据,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染过表达质粒后目的蛋白高表达

用 Western blot 分别检测质粒转染后目的蛋白

KL 和 KL1 的表达情况(图 1A)。转染 pcDNA3.1-MYC-KL 和 pcDNA3.1-MYC-KL1 后 48 h,比较 A549 细胞中各组 KL/GAPDH 的相对灰度值,结果显示过表达 KL 组的 KL 蛋白表达明显高于空载对照组与过表达 KL1 组($P < 0.01$,图 1B)。比较各组的 KL1/GAPDH 相对灰度值,过表达 KL1 组的 KL1 蛋白表达明显高于空载对照组与过表达 KL 组($P < 0.01$,图 1C)。两组实验结果表明过表达质粒转染有效,目的蛋白表达明显。



A: KL, KL1 和 GAPDH 在各组中的表达;B: 各组 KL 蛋白相对表达水平;C: 各组 KL1 蛋白相对表达水平;两组比较, * $P < 0.01$ 。

图 1 Western blot 检测目的蛋白在 A549 细胞中的表达

Figure 1 Expression of the target protein in A549 cells detected by Western blot

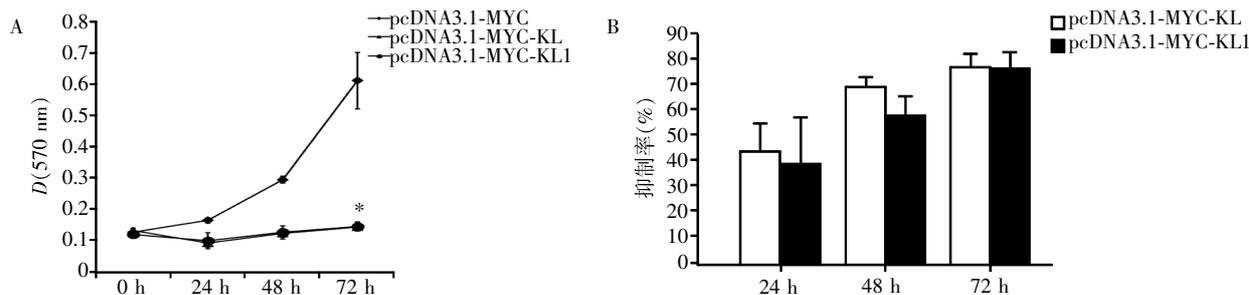
2.2 过表达 KL1 抑制 A549 细胞的生长

A549 细胞转染质粒后,MTT 法观察细胞在 24、48、72 h 的生长活性。结果显示,与空载对照组相比,过表达 KL1 蛋白后,A549 细胞的生长活性受到明显抑制($P < 0.01$,图 2A),抑制率分别为(43.02 \pm 11.16)% (24 h)、(68.32 \pm 3.48)% (48 h)、(75.74 \pm 5.39)% (72 h)。过表达 KL 蛋白对 A549 细胞的生长同样有抑制作用($P < 0.01$,图 2A),抑制率分别为(38.36 \pm 18.04)% (24 h)、(56.91 \pm 7.66)% (48 h)、(75.42 \pm 5.49)% (72 h)。而过表达 KL1 蛋白或过表

达 KL 蛋白,对 A549 细胞的生长抑制并无明显统计学差异($P > 0.05$,图 2B)。上述研究结果显示,过表达 KL1 即可达到与过表达全长 KL 蛋白相似的对 A549 细胞的生长抑制作用,表明 KL1 可能是 KL 抑制肿瘤细胞生长的主要活性部分。

2.3 过表达 KL1 抑制 A549 细胞的增殖活性

细胞平板克隆实验结果显示(图 3),空载对照组的克隆形成率为(70.00 \pm 6.21)%,过表达 KL1 组的克隆形成率为(16.00 \pm 0.90)%,过表达 KL 组的克隆形成率为(15.00 \pm 3.38)%。分析可知,与空载



A: 各组细胞的生长曲线,与空载对照组相比, * $P < 0.01$;B: 过表达 KL 组和过表达 KL1 组细胞生长抑制率比较。

图 2 KL1 过表达抑制 A549 细胞生长

Figure 2 Overexpression of KL1 inhibited the growth of A549 cells

对照组相比,过表达 KL1 能够显著抑制 A549 细胞的增殖活性($P < 0.01$),过表达 KL 同样能够抑制 A549 细胞的增殖活性($P < 0.01$),而过表达 KL1 与过表达 KL 组间并无明显统计学差异($P > 0.05$,图 3)。上述结果显示,KL1 蛋白能够抑制肿瘤细胞自身的增殖,该抑制作用与 KL 蛋白相似,表明 KL1 可能是 KL 中起抑制肿瘤增殖作用的主要片段。

2.4 过表达 KL1 促进 A549 细胞的凋亡

采用流式细胞术分析过表达 KL 或 KL1 后 A549 细胞凋亡的改变,结果显示,空载对照组的细胞凋亡率为(5.17 ± 0.47)%,而过表达 KL1 组的细胞凋亡率为(25.37 ± 4.86)%,过表达 KL 组的细胞凋亡率为(26.38 ± 3.06)%。与空载对照组相比,过表达 KL1 或过表达 KL 质粒能够明显增加 A549 细胞的凋亡率($P < 0.01$,图 4)。上述结果显示,KL1 蛋白能够促进肺癌细胞的凋亡,且该促进作用与 KL 蛋白相似,表明 KL1 可能是 KL 中发挥促进肿瘤细胞凋亡的主要功能结构。

2.5 KL1 能够抑制 bFGF 信号通路的激活

A549 细胞转染过表达质粒,饥饿 24 h 后,加入 bFGF(50 ng/mL)刺激 20 min,然后收集细胞提取蛋白质,进行 Western blot 检测(图 5A)。结果显示过

表达 KL1 组,由 bFGF 介导的信号通路下游靶位点 ERK1/2 的磷酸化水平有明显下降($P < 0.01$),过表达 KL 组,由 bFGF 介导的 ERK1/2 磷酸化水平也有明显下降($P < 0.01$),但两组间差异没有统计学意义($P > 0.05$,图 5B)。上述结果表明,KL 蛋白可能通过其 KL1 片段来抑制 bFGF 信号通路的激活。

3 讨论

抗衰老蛋白 Klotho 主要在肾脏和脑中表达,分泌入血和脑脊液中^[6]。人类的 Klotho 基因位于 13q12 染色体上,由 5 个外显子组成,全长约 50 kb。一方面,Klotho 基因通过选择性 RNA 剪切产生两种不同的转录产物:跨膜型 KL cDNA 全长 3 036 bp,分泌型 KL1 cDNA 全长 1 647 bp,分别翻译跨膜型 KL 或分泌型 KL1 蛋白^[7]。另一方面,跨膜型 KL 蛋白由 1 个 N 端信号序列、1 个胞外区域、1 个单跨膜区域和 1 个短的胞内区域组成,而胞外区域由 2 个内部重复区域 KL1 和 KL2 组成,在两者之间存在 1 个 Lys-Lys-Arg-Lys 序列,是蛋白裂解的部位,裂解后同样可形成 KL1 蛋白^[8]。跨膜型 KL 蛋白含有 1 012 个氨基酸,分子量 130 kDa,主要作为成纤维细胞生长因子 23 的共受体,参与磷酸盐的代谢调节,抑制磷酸

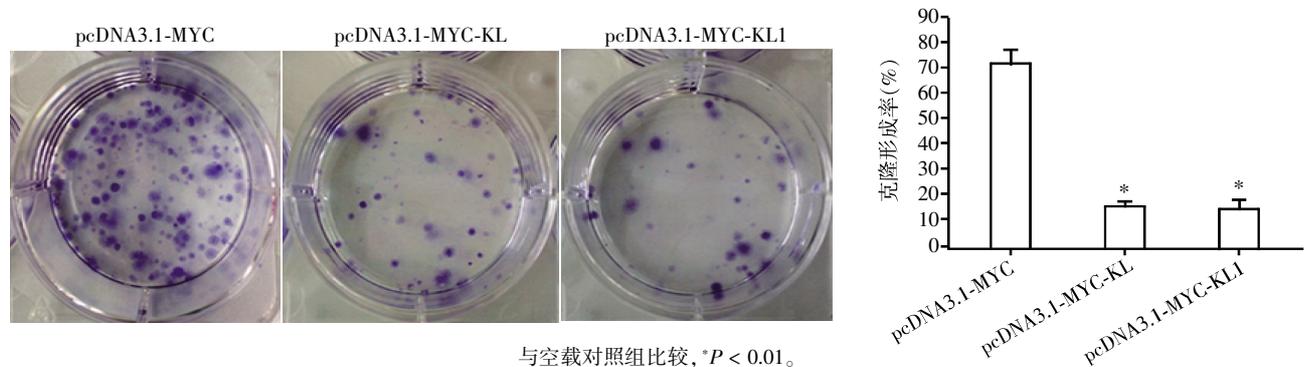


图 3 KL1 过表达抑制 A549 细胞增殖
Figure 3 Overexpression of KL1 inhibited the proliferation of A549 cells

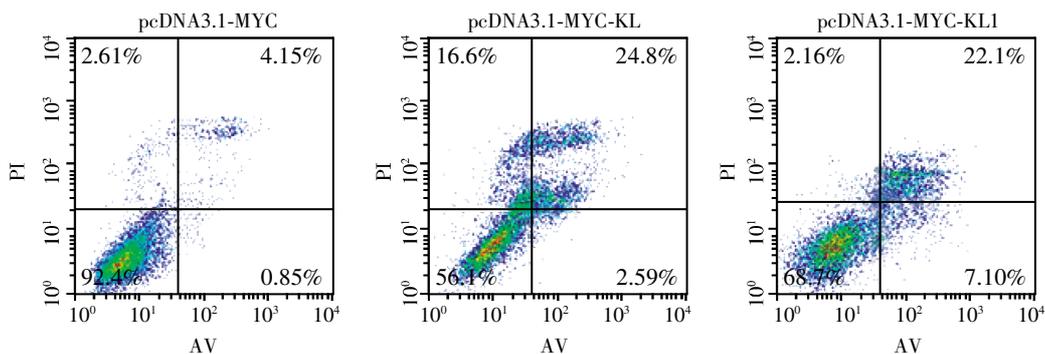
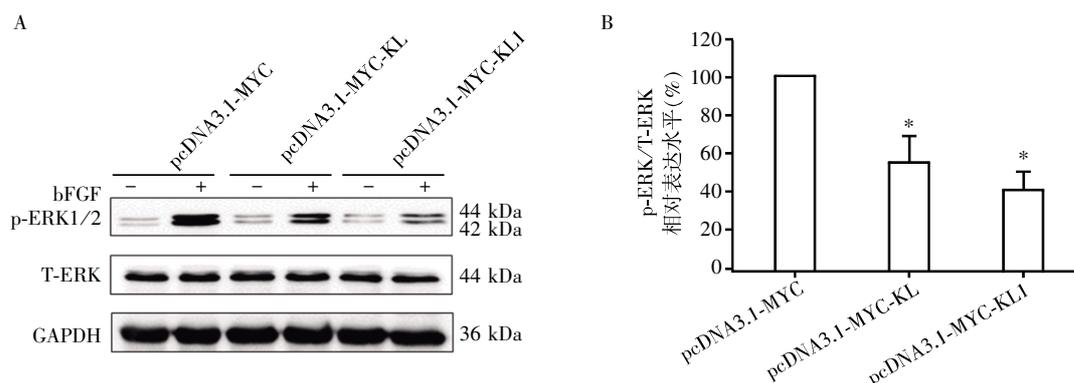


图 4 KL1 过表达促进 A549 细胞凋亡
Figure 4 Overexpression of KL1 promoted the apoptosis of A549 cells



A: Western blot 显示各组 ERK1/2 的表达情况;B:加入 bFGF,各组 p-ERK/T-ERK 的蛋白水平,与空载对照组比较,* $P < 0.01$ 。

图 5 KL1 过表达抑制 bFGF 信号通路的激活

Figure 5 Overexpression of KL1 inhibited activation of bFGF pathway

盐的重吸收,同时抑制 1,25-二羟维生素 D₃ 表达,调节钙磷代谢^[9];分泌型KL1 蛋白含有 549 个氨基酸,分子量为 68 kDa,不仅可以调节多个离子通道的活性,具有潜在的糖苷酶活性,能够调控细胞表面糖蛋白的功能^[10],还能够抑制体内一些细胞信号转导,如 bFGF 信号通路,在人类衰老相关疾病和肿瘤的发生、发展中具有重要作用。

bFGF 是一种多肽生长因子,其主要功能是促进细胞增殖以及促进血管生成等^[11-12]。大量临床和实验数据表明,bFGF 可以通过激活 ERK,进而磷酸化相应底物,还可以进入细胞核去磷酸化并激活转录因子,在肺癌的发生发展及预后中起重要作用。bFGF 能够直接作用于肺癌细胞分泌各种蛋白水解酶和胶原酶,从而促进肺癌的转移和浸润,也能够促进肿瘤毛细血管内皮增殖,增加肿瘤血液供应,还可以通过调控 MAPK 信号通路增加肺癌细胞对厄洛替尼的耐药性^[13-17]。

有研究证实,在乳腺癌和胰腺癌中,KL 能够调控 bFGF 信号通路进而影响肿瘤的生长和增殖^[5,18]。而已经证实 KL1 在胰腺癌中具有非常重要的肿瘤抑制作用,且具有更高的安全性^[5]。因此推测在非小细胞肺癌中,KL1 同样能够通过抑制 bFGF 信号通路转导,进而抑制下游靶点 ERK 的磷酸化,来抑制肺癌细胞的生长和增殖,促进凋亡。本研究旨在进一步研究 KL1 能否抑制 bFGF 信号转导,从而抑制肺癌细胞生长和增殖。本研究结果表明过表达 KL1 后,A549 细胞的生长和增殖均受到明显抑制,细胞凋亡明显增加,而其作用与过表达 KL 并无明显区别。进一步研究在 A549 细胞中,过表达 KL 后能够抑制 ERK1/2 的磷酸化,从而抑制 bFGF 介导的信号通路转导,而仅过表达 KL1 后,这种抑制作用并没有

减弱,具有与 KL 类似的抑制肿瘤生长增殖的作用。但 KL1 是否能够影响肿瘤细胞的迁移、侵袭以及对化疗药的敏感性等,从而延缓非小细胞肺癌患者的病程,改善患者预后,还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Guo P,Huang ZL,Yu P,et al. Trends in cancer mortality in China;an update[J]. *Ann Oncol*,2012,23(10):2755-2762
- [2] American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2015* [R]. Atlanta:American Cancer Society,2015
- [3] Chen B,Wang X,Zhao W,et al. Klotho inhibits growth and promotes apoptosis in human lung cancer cell line A549[J]. *J Exp Clin Cancer Res*,2010,29:99
- [4] Chen B,Ma X,Liu S,et al. Inhibition of lung cancer cells growth,motility and induction of apoptosis by Klotho,a novel secreted Wnt antagonist,in a dose-dependent manner[J]. *Cancer Biol Ther*,2012,13(12):1221-1228
- [5] Abramovitz L,Rubinek T,Ligumsky H,et al. KL1 internal repeat mediates klotho tumor suppressor activities and inhibits bFGF and IGF-I signaling in pancreatic cancer[J]. *Clin Cancer Res*,2011,17(13):4254-4266
- [6] Chen CD,Tung TY,Liang J,et al. Identification of cleavage sites leading to the shed form of the anti-aging protein klotho[J]. *Biochemistry*,2014,53(34):5579-5587
- [7] Matsumura Y,Aizawa H,Shiraki-Iida T,et al. Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,1998,242(3):626-630
- [8] Wang Y,Sun Z. Current understanding of klotho[J]. *Ageing Res Rev*,2009,8(1):43-51
- [9] Kuro-o M. Klotho,phosphate and FGF-23 in ageing and disturbed mineral metabolism[J]. *Nat Rev Nephrol*,2013,9(11):650-660

(下转第 1045 页)