

· 基础医学 ·

IL-17 诱导的 p300 调控 NSCLC 细胞迁移、侵袭和 MMP2 表达的作用

李 雅¹, 葛 文¹, 张志伟¹, 蒋馨怡¹, 何庆玲¹, 阮玉婷¹, 吴宁霞¹, 应 帅¹, 王伟民¹, 张 婧¹, 邱 文¹, 王迎伟^{1*}, 赵晨卉^{2*}

¹南京医科大学免疫学系, 江苏 南京 211166; ²南京医科大学第一附属医院肿瘤科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:探讨 IL-17 刺激非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)细胞上调腺病毒 E1A 相关 300 kDa 蛋白(adenoviral E1A binding protein of 300 kDa, p300)调控其细胞迁移、侵袭及生成基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase 2, MMP2)的作用。方法:用 IL-17 刺激 NSCLC 细胞(H1299)后行划痕和 Transwell 实验观察细胞迁移和侵袭的变化。然后用 Western blot 检查 p300 和 MMP2 蛋白的表达。同时,将 p300 过表达质粒(pcDNA3.1/p300)或 shp300 干扰质粒分别转染 H1299 细胞(后者再行 IL-17 刺激),用前述方法测定细胞迁移、侵袭和 MMP2 的表达。结果:用 IL-17 刺激 H1299 细胞后能显著诱导其迁移和侵袭,并上调 p300 和 MMP2 的表达。过表达 p300 可增强细胞的迁移与侵袭,并提高 MMP2 的生成,但沉默 p300 基因后由 IL-17 诱导的细胞迁移和侵袭能力及 MMP2 的表达均显著降低。结论:IL-17 上调的 p300 能促进 H1299 细胞的迁移与侵袭以及 MMP2 基因的表达。

[关键词] IL-17; NSCLC; p300; MMP2; 细胞迁移和侵袭

[中图分类号] R392.12

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2022)02-160-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20220202

IL-17-induced p300 regulates the migration, invasion and MMP2 production of NSCLC cells

LI Ya¹, GE Wen¹, ZHANG Zhiwei¹, JIANG Xinyi¹, HE Qingling¹, RUAN Yuting¹, WU Ningxia¹, YING Shuai¹, WANG Weimin¹, ZHANG Jing¹, QIU Wen¹, WANG Yingwei^{1*}, ZHAO Chenhui^{2*}

¹Department of Immunology, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; ²Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the effects of adenovirus E1A associated 300 kDa protein (p300) on the migration, invasion and matrix metalloproteinase-2 (MMP2) expression in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells stimulated by IL-17. **Methods:** After NSCLC cells (H1299) incubated with IL-17, scratch and transwell experiments were performed to observe the cell migration and invasion. Then the p300 and MMP2 protein expression was detected using Western blot. Meantime, p300 overexpression plasmids (pcDNA3.1/p300) or short hairpin RNA (shp300) plasmids were transfected into H1299 cells (the latter was stimulated with IL-17), respectively, and the cell migration, invasion and MMP2 synthesis were again examined by the same method described above. **Results:** The migration and invasion as well as the expression of p300 and MMP2 were obviously elevated in H1299 cells treated by IL-17. And p300 overexpression significantly promoted the cell migration, invasion, and MMP2 expression. While p300 gene knockdown by shp300 led to the decrease of migration, invasion and MMP2 production in H1299 cells induced by IL-17. **Conclusion:** IL-17-upregulates p300 in H1299 cells which enhances the cell migration, invasion and MMP2 expression.

[Key words] IL-17; NSCLC; p300; MMP2; cell migration and invasion

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(02): 160-165]

[基金项目] 国家自然科学基金(81902878)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wangyw1508@njmu.edu.cn; candy9023@163.com

肺癌是人类常见的恶性肿瘤,病理上分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)两大类,后者约占临床病例的85%^[1-2]。由于NSCLC发病率高,患者死亡又多与瘤细胞的侵袭转移有关,故研究NSCLC的转移机制极为重要。

NSCLC发生发展与多种因素密切相关。近年来,关于肺部慢性炎症诱发NSCLC的文献日趋增多,其机制不仅涉及肿瘤局部促炎因子的表达上调^[3],而且某些因子还能诱导瘤细胞的侵袭和转移^[4-5]。已知IL-17是一种典型的促炎因子,其在多种肿瘤组织中的表达常显著上调^[4-5]。本课题组以往的研究表明,在NSCLC的癌组织内IL-17及IL-17受体(IL-17RA)的表达明显升高。体外用IL-17刺激NSCLC细胞后也能诱导其增生、迁移与侵袭^[6]。不过,其诱导细胞迁移与侵袭的分子机制并不清楚。

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)是Zn²⁺依赖的蛋白水解酶,可分为6大类28个成员,多由成纤维细胞和肿瘤细胞等合成,通过降解细胞外基质而促进肿瘤转移^[4-5]。有资料显示,MMP2广泛表达,在乳腺癌转移中起增强效应^[4-5]。本课题前期体外实验已发现,受IL-17刺激的NSCLC细胞中MMP2的表达显著增加。

已知腺病毒E1A相关300 kDa蛋白(adenoviral E1A binding protein of 300 kDa, p300)是一种转录辅激活因子^[7]。研究证实,p300能促进NSCLC的迁移与侵袭,其机制与p300辅助修饰某些转录因子促进了靶基因的表达有关^[7]。本课题前期研究表明,用IL-17刺激NSCLC细胞后,其胞内p300和MMP2的表达明显上调。因此,IL-17上调的p300是否能通过调控MMP基因表达增强NSCLC细胞的侵袭和转移,值得进一步探究。

1 材料和方法

1.1 材料

人正常支气管上皮细胞系BEAS-2B和NSCLC细胞系(A549、PC9、H1299)由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供。

胎牛血清(南京诺唯赞生物公司);Lipofectamine 2000(赛默飞世尔科技公司,美国);兔p300多克隆抗体(CST公司,美国);兔MMP2多克隆抗体(杭州华安生物公司);小鼠 β -actin单克隆抗体(上海碧云天生物公司);羊抗兔、鼠IgG-HRP二抗(合肥Biosharp公司)。siIL-17RA购买于上海吉玛基因公司。

1.2 方法

1.2.1 BEAS-2B、A549、PC9和H1299细胞系的培养及IL-17RA的检测

将细胞接种于DMEM完全培养液(10%胎牛血清)中,置于37℃、5%CO₂孵箱中培养48 h。当细胞融合度达到90%时,按1:5比例进行传代培养。

Western blot实验:细胞裂解物离心3 min取30 μ g蛋白行SDS-PAGE电泳。电泳2 h再湿转120 min。待蛋白转印到PVDF后用脱脂牛奶封闭2 h,加IL-17RA一抗4℃过夜。用HRP标记的二抗孵育1 h。最后行ECL化学发光试剂测定。

1.2.2 沉默IL-17RA基因后检测H1299细胞迁移和侵袭能力

培养H1299细胞,待其生长融合度达80%时进行siIL-17RA质粒的转染。先用DMEM对4 μ L lipofectamine 2000和2000 ng siIL-17RA进行稀释,然后将二者混合后静置15 min再加细胞,置37℃、5%CO₂条件下继续培养。

细胞划痕实验:将转染siIL-17RA质粒的H1299细胞饥饿12 h再行培养。当融合度达90%时,用200 μ L移液器吸头产生细胞单层的线性伤口,PBS清洗后加含1%FBS的DMEM,同时加50 ng/mL的IL-17。继续培养并在0 h和24 h观察其生长情况。

Transwell实验:将转染siIL-17RA的H1299细胞饥饿12 h再接种至含1%FBS DMEM的Transwell小室中(5 \times 10⁴个/孔)。另下室加600 μ L相同的培养液。培养24 h去除上清,并洗去未穿透膜的细胞。迁移到膜下的细胞行100%甲醇固定和0.1%结晶紫染色。显微镜下观察后拍摄5个随机选择的视野。

1.2.3 IL-17刺激H1299细胞后检测不同时间p300和MMP2的表达

收集IL-17刺激后0、1、2、3、6、12 h的H1299细胞蛋白,行Western blot检测p300和MMP2的表达,方法同前。

1.2.4 沉默IL-17RA基因后p300和MMP2蛋白表达的测定

将siIL-17RA质粒转染H1299细胞后48 h,再用IL-17刺激3 h。用Western blot检测p300和MMP2的表达,实验分组及检查方法同前所述。

1.2.5 过表达或沉默p300对细胞迁移、侵袭及MMP2表达的影响

1.2.5.1 p300过表达和shp300小干扰质粒的来源及验证

将p300过表达质粒用Lipofectamine 2000转染

H1299细胞48 h,实验分组为:①pcDNA3.1组;②pcDNA3.1/p300组。收集细胞蛋白行Western blot检查。

同样,将shp300小干扰质粒转染细胞48 h,之后用IL-17刺激3 h。实验分组为:①shCTR+IL-17组;②shp300-1+IL-17组;③shp300-2+IL-17组;④shp300-3+IL-17组。收集细胞蛋白行Western blot检查。

1.2.5.2 过表达或沉默p300对H1299细胞迁移和侵袭的影响

实验分为:①pcDNA3.1组;②pcDNA3.1/p300组;③shCTR+IL-17组;④shp300+IL-17组。检查时间点为0 h和24 h。具体方法同前。

1.2.5.3 过表达或沉默p300影响H1299细胞表达MMP2的测定

过表达p300的分组为:①pcDNA3.1组;②pcDNA3.1/p300组。沉默p300的分组为:①shCTR组;②shCTR+IL-17组;③shp300+IL-17组。用Western blot检查MMP2的表达,时间点选择见前所述。

1.3 统计学方法

所有实验均独立重复3次,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用SPSS 19.0统计软件进行统计学分析,多组间比较则采用单因素方差分析,Bonferroni法进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC细胞系IL-17RA的表达

为了证实NSCLC细胞表面存在IL-17RA,检测了正常支气管上皮细胞BEAS-2B及NSCLC的3种细胞系(A549、PC9和H1299)。结果显示,这些细胞均有IL-17RA的表达,但NSCLC细胞系表达更为明显,尤以H1299细胞显著(图1),故后续选择H1299细胞系开展实验。

2.2 敲低IL-17RA对IL-17诱导的H1299细胞迁移和侵袭的影响

为了确定IL-17可通过结合IL-17RA来影响H1299细胞的迁移和侵袭,在转染了siIL-17RA的H1299细胞中进行划痕和Transwell实验。结果发现,转染siIL-17RA质粒48 h后再用IL-17(50 ng/mL)刺激24 h,siIL-17RA+IL-17组的细胞迁移和侵袭能力均明显降低(图2)。

2.3 IL-17刺激H1299细胞不同时间p300和MMP2蛋白表达的变化

用前述剂量的IL-17刺激H1299细胞0、1、2、3、6、12 h,采用Western blot检测p300和MMP2蛋白表

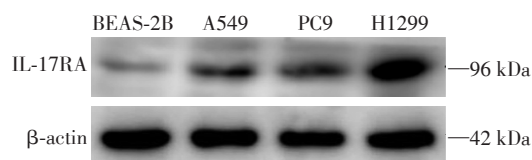


图1 IL-17RA在支气管上皮细胞(BEAS-2B)和NSCLC细胞系(A549、PC9和H1299)中的表达

Figure 1 The expression of IL-17RA in bronchi epithelial cell (BEAS-2B) and NSCLC cell line (A549, PC9 and H1299)

达。IL-17刺激后2 h,p300和MMP2的表达显著升高,3 h时达到高峰(图3)。因此,后续选择了IL-17刺激细胞3 h作为蛋白检测的时间点。

2.4 敲低IL-17RA表达对IL-17诱导的H1299细胞p300和MMP2表达的影响

为了明确p300和MMP2蛋白的表达确为IL-17刺激及IL-17结合IL-17RA所致,将H1299细胞转染siIL-17RA 48 h再用IL-17刺激3 h。结果显示,IL-17刺激细胞后3 h能显著上调p300和MMP2的蛋白表达,而siIL-17RA+IL-17组p300和MMP2的蛋白水平则显著减少(图4)。

2.5 过表达或敲低p300对H1299细胞迁移、侵袭及表达MMP2的影响

2.5.1 p300过表达和shp300质粒验证及shp300有效沉默靶点的确定

将pcDNA3.1/p300过表达质粒和对照质粒分别转染H1299细胞48 h(转染效率约70%),收集细胞蛋白检测p300的表达。结果显示,转染pcDNA3.1/p300的细胞中,p300的表达显著增加(图5)。

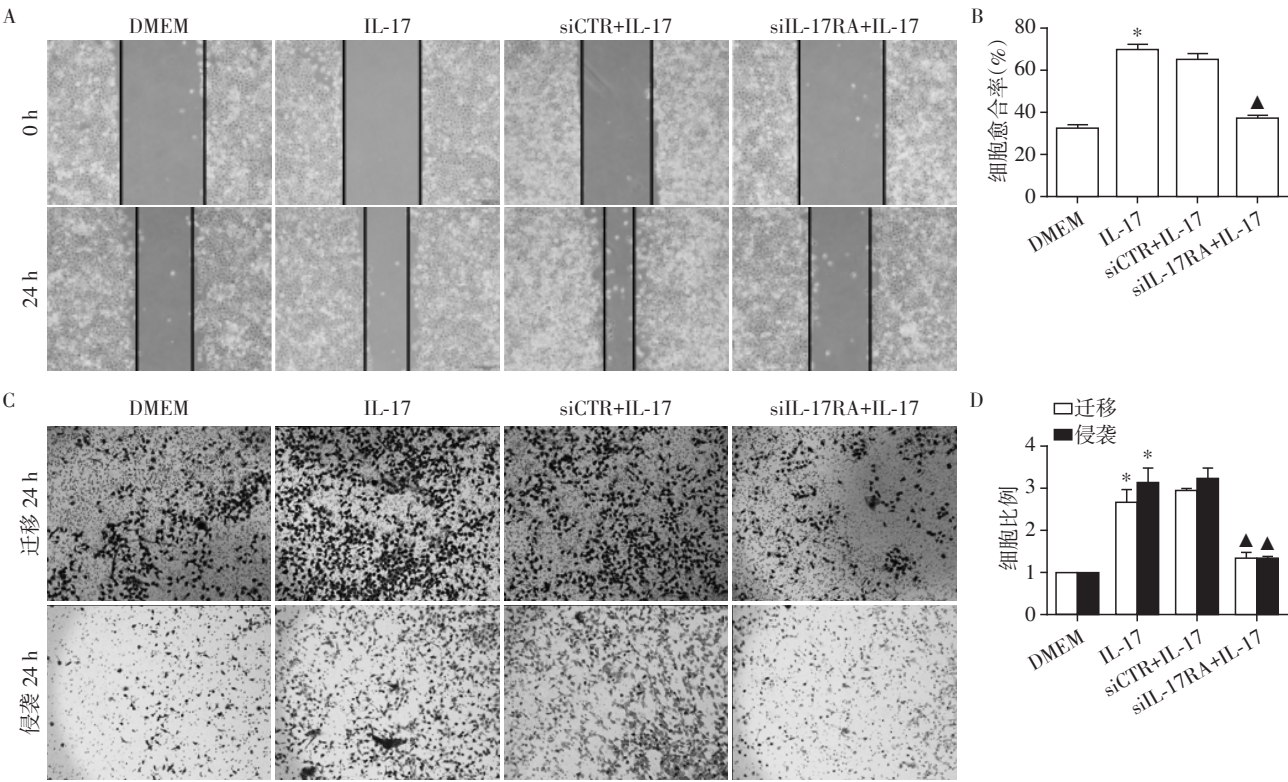
将构建的3个针对不同靶点的shRNAp300-1、shRNAp300-2、shRNAp300-3质粒和其对照shCTR质粒分别转染H1299细胞48 h发现,shp300-2能显著下调p300蛋白的表达(图5),故后续选取了shp300-2进行实验,并统一简化命名为shp300。

2.5.2 过表达或敲低p300对H1299细胞迁移和侵袭的影响

为了检查p300基因对H1299细胞迁移和侵袭的影响,在细胞转染p300表达质粒和shp300质粒后进行了划痕和侵袭实验。结果表明,转染pcDNA3.1/p300质粒可增加细胞的迁移和侵袭能力,而转染shp300质粒48 h后再行IL-17刺激24 h,其迁移和侵袭能力均明显降低(图6)。

2.5.3 过表达或沉默p300基因对H1299细胞表达MMP2的影响

细胞转染质粒同前。Western blot检测结果显



用 siIL-17RA 沉默 IL-17RA 后,由 IL-17(50 ng/mL)上调 H1299 细胞的迁移和侵袭能力明显下降。A:划痕实验图片($\times 40$)及半定量分析柱形图;B:Transwell 实验图片($\times 100$)及半定量分析柱形图。与 DMEM 组比较,* $P < 0.01$;与 siCTR+IL-17 组比较,▲ $P < 0.01$ ($n=3$)。

图 2 敲低 IL-17RA 表达对 IL-17 诱导细胞迁移和侵袭的影响

Figure 2 Influence of IL-17RA knockdown on IL-17-induced cell migration and invasion

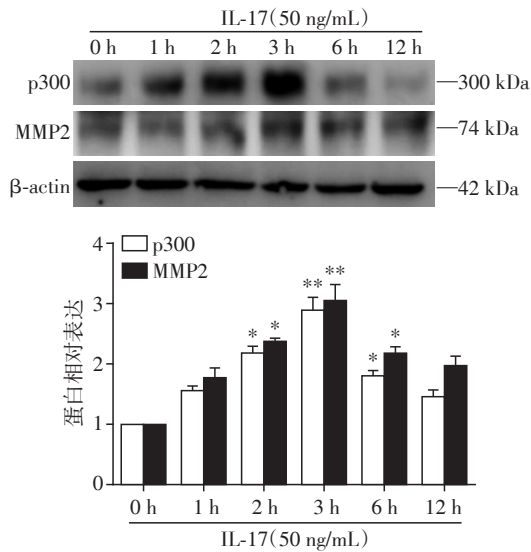


图 3 Western blot 检测 IL-17 刺激 H1299 细胞不同时间 p300 和 MMP2 的表达

Figure 3 Expression of p300 and MMP2 at different time in H1299 cell stimulated with IL-17 by Western blot

示,转染 pcDNA3.1/p300 组,MMP2 蛋白表达明显增加(图 7A),但在 shp300+IL-17 组,MMP2 的表达则显

著降低(图 7 B)。

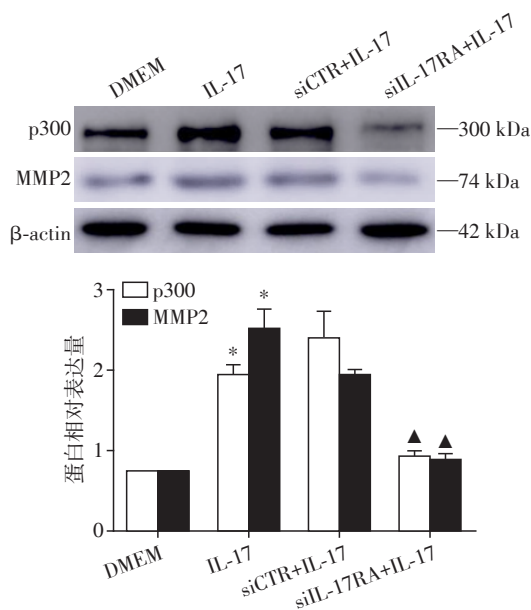
3 讨论

文献报道,无论是 SCLC 还是 NSCLC 患者,其肿瘤组织多有炎症微环境的存在^[8],而炎症微环境中生成的促炎因子(如 IL-17)不仅可使支气管上皮细胞发生改变,而且还能加剧细胞的损害,促进肺癌的发生与发展^[4-5]。

已知 IL-17 主要的生物学特征是加剧炎症反应,如诱导更多促炎因子和介质的生成。不过,近年来深入研究 IL-17 后发现,IL-17 既能参与炎症性疾病^[9],又可在促进某些肿瘤血管生成、细胞增殖和转移等方面发挥作用^[9]。

本研究体外用 IL-17 刺激 NSCLC 的 H1299 细胞后进行细胞划痕和 Transwell 实验发现,IL-17 刺激能增加细胞的迁移和侵袭,而敲低 IL-17RA 后再行 IL-17 刺激,其迁移和侵袭能力未见提升。提示,NSCLC 受 IL-17 刺激时可与其受体结合,最终引发了细胞的迁移和侵袭。

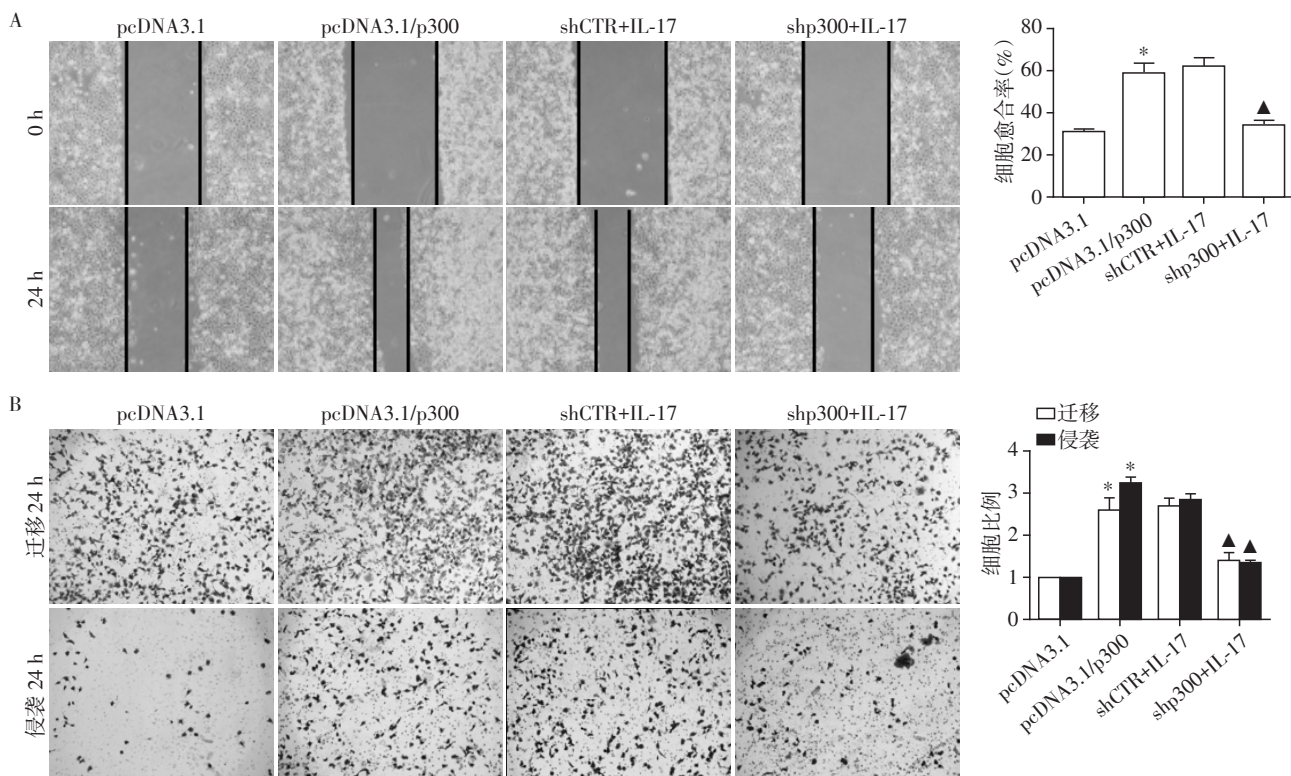
众所周知,细胞行为的变化除了受外界刺激原作用外,还与刺激原诱导的某些转录因子、转录辅



将 siIL-17RA 转染 H1299 细胞 48 h,再用 IL-17 (50 ng/mL)刺激 3 h。与 DMEM 组比较,* $P < 0.01$;与 siCTR+IL-17 (50 ng/mL)组比较,▲ $P < 0.01$ ($n=3$)。

图4 Western blot 检测敲低 IL-17RA 影响 p300 和 MMP2 的表达

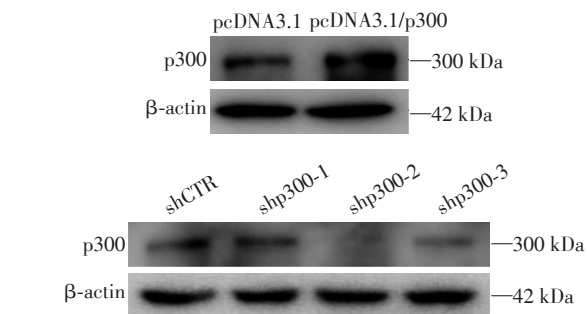
Figure 4 IL-17RA knockdown affects p300 and MMP2 expression by Western blot



转染 pcDNA3.1/p300 组 24 h 时,细胞迁移与侵袭能力明显升高,而 shp300+IL-17 组的细胞迁移及侵袭能力则显著下降。A:划痕实验代表图片($\times 40$)及半定量分析柱形图;B:Transwell 实验代表图片($\times 100$)及半定量分析柱形图。与 pcDNA3.1 组比较,* $P < 0.01$;与 shCTR+IL-17 组比较,▲ $P < 0.01$ ($n=3$)。

图6 过表达和敲低 p300 影响细胞的迁移与侵袭

Figure 6 Effects of p300 overexpression and knockdown on cell migration and invasion



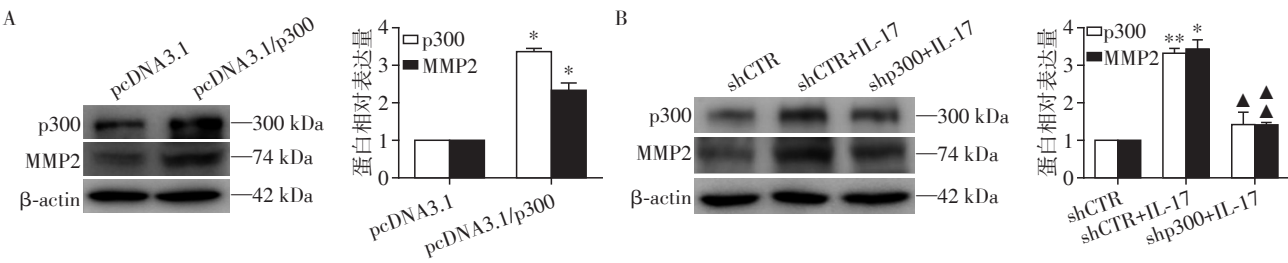
将 pcDNA3.1/p300 转染 H1299 细胞 48 h,p300 蛋白表达明显增加,而将 shp300 转染 48 h 时再用 IL-17 (50 ng/mL)刺激 3 h,可见 shp300-2 处理的细胞 p300 的表达量显著减少。

图5 Western blot 检测 pcDNA3.1/p300 和 shp300 质粒表达的验证

Figure 5 Expression verification of pcDNA3.1/p300 and shp300 plasmids by Western blot

激活因子和靶分子的表达紧密相关^[10-11]。本研究测定受 IL-17 刺激的 H1299 细胞内一些因子变化后发现,转录辅激活因子 p300 和 MMP2 的表达明显上调,且两者的表达时相基本一致。提示 p300 和 MMP2 升高之间可能存在某种联系。

已知 p300 是一含有多个功能结构域的蛋白分



A: 将 H1299 细胞转染 pcDNA3.1/p300 48 h (与 pcDNA3.1 组比较, * $P < 0.01$, $n=3$); B: 转染 shp300 质粒 48 h 时再用 IL-17 (50 ng/mL) 刺激 3 h (与 shCTR 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 shCTR+IL-17 组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$, $n=3$)。

图 7 Western blot 检测过表达或敲低 p300 对 MMP2 表达的影响

Figure 7 Effects of p300 overexpression and knockdown on MMP2 expression by Western blot

子,能作为辅激活因子与转录因子结合,参与靶基因表达的调控^[10-11]。另 MMP2(也称明胶水解酶)是 MMP 家族的重要成员,它不仅可水解 IV 型胶原蛋白和其他生物活性分子,而且还能激活 MMP9^[10-11],故它是肿瘤侵袭与转移重要的调节因子。

为了进一步探讨 p300 表达对 NSCLC 细胞迁移与侵袭及 MMP2 表达的影响,本研究在 H1299 细胞内进行了 p300 过表达和敲低的相关实验。结果表明,过表达 p300 后既可促进 NSCLC 细胞的迁移和侵袭,也能上调 MMP2 的表达,而敲低 p300 后由 IL-17 诱导的迁移和侵袭能力及 MMP2 的表达均显著降低。鉴于 IL-17 诱导 NSCLC 细胞 p300 和 MMP2 的表达高峰时间明显早于细胞的迁移和侵袭。因此推测, p300 的表达上调或许是通过增加 MMP2 的生成,最终促进了细胞的迁移和侵袭。不过,这一推测还有待后续的实验加以证实。

【参考文献】

[1] SHIROYAMA T, SUZUKI H, TAMIYA M, et al. Pretreatment advanced lung cancer inflammation index (ALI) for predicting early progression in nivolumab-treated patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. Cancer Med, 2018, 7(1): 13-20
[2] 赵 薇, 赵有财, 丁 薇, 等. METTL3 蛋白的表达水平对 NSCLC 患者 PD-1 抑制剂疗效的预测价值[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2021, 41(6): 879-884
[3] MCFARLAND D C, SARACINO R M, MILLER A H, et al. Prognostic implications of depression and inflammation in patients with metastatic lung cancer [J]. Future Oncol. 2021, 17(2): 183-196
[4] KWIECIEŃ I, STELMASZCZYK-EMMEL A, POLUBIEC-

KOWNACKA M, et al. Elevated regulatory T cells, surface and intracellular CTLA-4 expression and interleukin-17 in the lung cancer microenvironment in humans [J]. Cancer Immunol Immunother, 2017, 66(2): 161-170
[5] CHANG Y H, YU C W, LAI L C, et al. Up-regulation of interleukin-17 expression by human papillomavirus type 16 E6 in nonsmall cell lung cancer [J]. Cancer, 2010, 116(20): 4800-4809
[6] ZHAO C, LI Y, ZHANG W, et al. IL-17 induces NSCLC A549 cell proliferation via the upregulation of HMGA1, resulting in an increased cyclin D1 expression [J]. Int J Oncol, 2018, 52(5): 1579-1592
[7] ZHANG J, LI Y, SHAN K, et al. Sublytic C5b-9 induces IL-6 and TGF-β1 production by glomerular mesangial cells in rat Thy-1 nephritis through p300-mediated C/EBPβ acetylation [J]. Faseb J, 2014, 28(3): 1511-1525
[8] WEINBERG F, DICKSON R P, NAGRATH D, et al. The lung microbiome: a central mediator of host inflammation and metabolism in lung cancer patients? [J]. Cancers (Basel). 2020, 13(1): 13
[9] WANG B, ZHAO C H, SUN G, et al. IL-17 induces the proliferation and migration of glioma cells through the activation of PI3K/Akt1/NF-κB-p65 [J]. Cancer Lett, 2019, 10(4): 93-104
[10] WANG B, LIU T, WU J C, et al. STAT3 aggravates TGF-β1-induced hepatic epithelial-to-mesenchymal transition and migration [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 98(2): 214-221
[11] DUFF D, LONG A. Roles for RACK1 in cancer cell migration and invasion [J]. Cell Signal, 2017, 35(6): 250-255

【收稿日期】 2021-11-23

(本文编辑:唐 震)