

· 论 著 ·

Tip30 调节 EGFR 核内化及其与核内 EGFR 靶分子或基因的关联性研究

陈锦章, 李祺, 邓琼, 李爱民

南方医科大学南方医院肿瘤内科, 广东 广州 510515

摘要: **目的** 探讨肿瘤转移抑制基因(Tip30)调节表皮生长因子受体(EGFR)核内化及与核内化 EGFR 靶分子或基因的关联性,为针对 EGFR 分子靶向治疗提供依据。**方法** 采用野生型 Balb/c 小鼠(Tip30 +/+ 小鼠,对照组)和 Tip30 基因敲除、Balb/c 纯背景的小鼠(Tip30 -/- 小鼠)作为动物模型(每组 6 只),饲养 18 个月后处死,取肺组织,福尔马林固定,酒精脱水,石蜡包埋,组织切片后,进行组织学检查、免疫组化检测、组织免疫荧光检测、体外培养细胞免疫荧光/激光共聚焦检测、免疫印迹检测、细胞计数试剂盒-8 方法体外细胞抑制实验、荧光定量 PCR 检测和基因芯片数据库分析。**结果** Tip30 基因敲除促进肺上皮细胞增殖、上调细胞周期蛋白 cyclin D1 表达;基因转染后 Tip30-SH1、Tip30-SH2 细胞抑制 Tip30 表达;Tip 基因抑制致 EGFR 在早期内涵体滞留;表皮生长因子(EGF)处理可诱导 Tip30 细胞核内化;Tip30 基因抑制可促进 EGF 诱导 EGFR 细胞核内化,Tip30 蛋白可在早期内涵体内聚集。**结论** Tip30 基因抑制干扰 EGFR 分选,抑制 EGF 诱导 EGFR 降解,延迟 EGFR 下游信号分子激活时间,同时促进 EGF 诱导的 EGFR 细胞核内化,促进肺癌细胞生长,而与细胞膜或细胞浆内 EGFR 信号通路激活的关联性较小。

关键词: 肺癌; Tip30 基因; 表皮生长因子受体; 表皮生长因子受体核内化; 核内化

中图分类号: R 734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2015)01-0007-04

A study of relationship between EGFR nuclear internalization regulated by Tip30 and intranuclear EGFR target molecule or gene

CHEN Jin-zhang, LI Qi, DENG Qiong, LI Ai-min

*Department of Oncology, South Hospital, South Medical University, Guangzhou Guangdong 510515, China**Corresponding author: LI Ai-min, E-mail: liaimin2005@163.com*

Abstract: **Objective** To explore the relationship between epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear internalization regulated by Tat interacting protein 30 (Tip30) and intranuclear EGFR target molecule or gene to provide a basis for targeted therapy directing to EGFR molecule. **Methods** The wild type Balb/c mice (Tip30 +/+ , control group) and knockout gene and Balb/c pure background (Tip30 -/-) mice ($n=6$ each) were adopted as animal model. All experimental mice were killed 18 months after feeding, and the lung tissues were taken for preparing tissue section via formalin fixation, Alcohol dehydration and paraffin embedding. The histological examination, immunohistochemistry assay, immunofluorescence assay, cultured cells in vitro immunofluorescence/laser confocal detection, Western blotting, CCK8 method for cell inhibition assay in vitro, fluorescence quantitative PCR detection and gene chip database analysis were made. **Results** Knockout of Tip30 gene can promote proliferation of lung epithelial cells and up-regulate the expression of cyclin D1. After transfection, Tip30-SH1 and Tip30-SH2 cells inhibited the expression of Tip30 gene. Tip gene inhibition induced EGFR retention in early endosomes. The epidermal growth factor (EGF) treatment could induce nuclear internalization of Tip30 cells. Tip30 gene inhibition may promote EGF-induced EGFR cell nuclear internalization. Tip30 protein can be gathered in the early endosomes. **Conclusions** Tip30 gene inhibits can interfere EGFR sorting, inhibited EGFR degradation induced by EGF, delay EGFR downstream signaling molecule activation time, promote EGF-induced EGFR cell nuclear internalization, promote the growth of lung cancer cells, but its association with the activation of EGFR signaling passage is weak.

Key words: Lung cancer; Tat interacting protein 30 gene; Epidermal growth factor receptor; Nuclear internalization

肺癌的发生和发展与环境污染、吸烟等众多因素密切相关,在外部因素作用下基因突变和信号因子调节下肺上皮细胞无限制增生、分化不良,最终导致肺癌出现^[1]。基因突变是肺癌发生的重要原因,但关于肺癌发生的详细分子机制尚不明确^[2]。目前,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)激酶抑制剂、单克隆抗体药物、新的化疗药物出现、放疗技术的进步以及手术方式的改进等已经让肺癌的治疗取得了显著的进步,但是整体预后情况不尽人意,其中非小细胞肺癌患者 5 年存活率仅为 16% 左右,小细胞肺癌患者存活率更低^[3]。

核 EGFR 具有促进细胞生成和 DNA 修复以及让肿瘤细胞耐受放化疗的功能,研究肺癌分子机制和 EGFR 信号通路调控机理为临床诊治提供理论依据,并可发现治疗肺癌的新靶点和方法^[4]。本研究探讨肿瘤转移抑制基因 Tip30(tat interacting protein 30)^[5] 调节 EGFR 核内化及其与核内 EGFR 靶分子或基因的关联性,旨在为今后针对 EGFR 分子靶向治疗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物 采用来源于第二军医大学肿瘤研究所制备的野生型 Balb/c 小鼠(Tip30 +/+ 小鼠)和 Tip30 基因敲除、Balb/c 纯背景的小鼠(Tip30 -/- 小鼠)作为动物模型,Tip30 -/- 小鼠制备见参考文献[6]。小鼠饲养于 12 h 光亮/黑暗循环的、25 ℃ 恒温条件、清洁级房间,自由进食进水,参照美国密西根州立大学实验动物规范进行操作。

1.2 试验仪器 FLUOstarOPTIMA 分光光度计、微量移液器、台式微量离心机、台式低温离心机、pH 值测定仪、Odyssey 扫描成像系统、CO₂ 培养箱、超低温冰箱、倒置显微镜、超净工作台、凝胶扫描系统、QRT-PCR 仪、PCR 扩增仪、光学显微镜、荧光显微镜、激光共聚焦显微镜等。

1.3 试验试剂 人肺腺癌细胞株 A549、DMEM 培养基、胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶、青霉素/链霉素混合液、EDTA(乙二胺四乙酸二钠)、细胞计数试剂盒-8(CCK-8)、二甲基亚砜(DMSO)、抗 EGFR 单克隆抗体、抗 Akt 单克隆抗体、抗 pAkt(473)单克隆抗体、抗 pErk1/2 单克隆抗体、抗 β -tubulin 抗体、抗 Tip30 多克隆抗体、抗 β -Actin 抗体、ABC 试剂盒、含 DAPI 的免疫荧光用封片剂、永久封片剂、枸橼酸钠、过氧化氢、牛血清白蛋白、二氨基联苯胺、苏木精、苏丹黑、多聚赖氨酸、不含 EDTA 的蛋白酶抑制剂混合药片、蛋白检测燃料、表皮生长因子(EGF)、亚胺环己酮、Tri-

tonX-100、西妥昔单抗、吉非替尼、十二烷基硫酸钠、shRNA-CON、Tip30-SH5、细胞核蛋白试剂盒、来普霉素 B。

1.4 试验方法

1.4.1 动物处理 选择 Tip30 -/- 小鼠 6 只,同时饲养 Tip30 +/+ 小鼠 6 只作为对照组,连续观察 18 个月,满 18 个月后处死小鼠。

1.4.2 组织学检查 小鼠全部肺详细解剖,常规 10% 福尔马林固定,梯度酒精脱水,石蜡包埋,组织切片,苏木精-伊红(HE)染色,两位病理专家阅片。

1.4.3 免疫组化检测 参照 Cell Signaling 公司所提供的操作步骤进行,取 3~4 μ m 厚组织切片,二甲苯脱蜡,梯度酒精再水化,醋酸钠溶液和微波加热抗原修复,过氧化氢中和组织中过氧化氢酶,5% BSA 封闭,加一抗后 4 ℃ 过夜,第 2 天加亲合素结合的二抗,ABC 溶液孵育,DAB 染色,苏木精复染细胞核,永久封闭液封片,光学显微镜下观察。

1.4.4 组织免疫荧光检测 和免疫组化一样进行切片、脱蜡、水化、抗原修复、封闭,然后加一抗过夜。第 2 天加相关荧光素标记的二抗,室温孵育 1 h 后冲洗,0.2% 的苏丹黑去除组织自发荧光,加 DAPI 进行细胞核染色,盖玻片覆盖后荧光显微镜下观察。

1.4.5 体外培养细胞免疫荧光/激光共聚焦检测 细胞爬片,不同处理因素处理后不同时间点,4% 多聚甲醛固定,0.1% Triton-100 透膜,5% BSA 封闭,然后加一抗 4 ℃ 过夜,第 2 天加荧光素标记的二抗,室温孵育 1 h 后冲洗,加 DAPI 进行细胞核染色,盖玻片覆盖后激光共聚焦显微镜下观察。

1.4.6 免疫印迹检测 提取组织/细胞蛋白后萃取细胞核/细胞浆蛋白,采用免疫印迹法检测。

1.4.7 基因转染及细胞凋亡检测 利用已有质粒制备慢病毒质粒,转染细胞、puromycin 筛选,转染后细胞经免疫印迹证实转染效果。利用 TUNEL 检测细胞凋亡。

1.4.8 CCK8 方法体外细胞抑制实验 细胞生长于 96 孔板,按照实验设计的不同分组和不同时间,在需检测的培养孔中加入 10 μ l CCK-8 溶液,37 ℃ 孵育 1 h 后测定 OD 值。

1.4.9 荧光定量 PCR 检测 从肝组织中使用 Qia-gen RNA 试剂盒提取 RNA,用 Invitrogen 公司的 oligodT、dNTP、Reversetranscriptase III 将 mRNA 逆转录成 cDNA,使用 Biorad 公司生产的 SybrGreen qPCR,使用 RNA polymerase II 做内参。小鼠 SP-1 上游引物为 TCCATGGATGAAGTGACAGCTG,下游引物为 TGGGAGTTGTGCTGTTCTGTTCTCAT;小鼠 IL-6 上

游引物为 AGAGGAGACTTCACAGAGGAT, 下游引物为 TACTCCAGGTAGCTATGGTAC。使用 Biorad iQ5 仪器运行 PCR。95℃ 预变性 30s, 55℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 连续 40 个循环, 样本表达量计算: 表达量 = $2^{-(C_t\text{样品} - C_t\text{内参})}$, 进行基因芯片数据库分析。

1.5 统计学处理 将研究所得数据均录入 SPSS 18.0 软件进行统计学分析, 采用双尾两样本等方差 Student *t* 检验分析两组分子表达的差异。采用 Graphpad Prism 5 进行 Log-Rank (Mantel-Cox) 检验和卡方检验, Excel 2003 进行双尾两样本等方差 Student *t* 检验分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Tip30 基因敲除促进肺上皮细胞增殖 Tip30 -/- 小鼠的肺肿瘤均为 EGFR 阳性表达, 非典型增生的肺泡上皮细胞 EGFR 也高表达, EGFR 阳性细胞百分比为 $(12.70 \pm 4.26)\%$, 明显高于 Tip30 +/+ 小鼠的 EGFR 阳性表达百分比 $(2.95 \pm 1.05)\%$ ($t = 4.9690, P = 0.0011$)。Tip30 -/- 小鼠肿瘤组织内 EGFR 阳性细胞百分比为 $(50.00 \pm 17.81)\%$, 明显高于 Tip30 -/- 小鼠肺泡组织的 $(12.70 \pm 4.26)\%$ ($t = 4.5546, P = 0.0019$)。提示 Tip30 基因敲除可导致小鼠肺泡上皮细胞和肿瘤细胞 EGFR 高表达, Tip30 -/- 小鼠肺组织和肺肿瘤组织中, EGFR 表达显著上调, EGFR 下游信号分子活性明显上调, 提示 Tip30 基因敲除导致肺自发肿瘤跟 EGFR 信号通路及其下游分子活性上调相关。

2.2 Tip 基因敲除可上调细胞周期蛋白 cyclin D1 表达 利用免疫组化染色方法检测小鼠肺组织周期蛋白 cyclin D1, Tip30 -/- 小鼠肺泡细胞 cyclinD1 阳性率为 $(24.20 \pm 5.37)\%$, 明显高于 Tip30 +/+ 小鼠肺泡细胞的 $(6.05 \pm 5.75)\%$ ($t = 4.6138, P = 0.0036$); Tip30 -/- 小鼠支气管肺泡结合部细胞的 cyclin D1 阳性率为 $(57.85 \pm 11.23)\%$, 明显高于 Tip30 +/+ 小鼠肺泡细胞的 $(26.05 \pm 10.62)\%$ ($t = 4.1148, P = 0.0063$); Tip30 -/- 小鼠肿瘤组织中 cyclin D1 阳性细胞占 $(66.25 \pm 9.58)\%$, 明显高于 Tip30 -/- 小鼠肺泡细胞的 $(24.20 \pm 5.37)\%$ ($t = 7.6577, P = 0.0003$), 但和 Tip30 -/- 小鼠支气管肺泡结合部细胞的 $(57.82 \pm 11.23)\%$ 比较, 差异无统计学意义 ($t = 1.1422, P = 0.2969$)。提示 Tip30 基因敲除可上调小鼠肺内 cyclin D1 表达。

2.3 基因转染后 Tip30-SH1、Tip30-SH2 细胞抑制 Tip30 表达 选取具有 II 型肺泡上皮细胞特性的人肺腺癌 A549 细胞株, 应用基因抑制技术, 抑制 A549

细胞 Tip30 蛋白表达, 经 Tip30-SH1、TIP30-SH2、shRNA-CON 基因转染后, 免疫印迹检测发现 Tip30-SH1 细胞 Tip30 蛋白表达相对值为 β -actin 的 $(1.28 \pm 0.28)\%$, 明显低于 shRNA-CON 细胞的 $(4.42 \pm 0.53)\%$ ($t = 10.4769, P = 0.0000$); Tip30-SH2 细胞 Tip30 蛋白表达相对值为 β -actin 的 $(1.66 \pm 0.25)\%$, 明显低于 shRNA-CON 细胞的 $(4.42 \pm 0.53)\%$ ($t = 9.4197, P = 0.0001$)。Tip30-SH1 细胞 Tip30 蛋白表达下降 71%, Tip30-SH2 细胞 Tip30 蛋白表达被显著抑制。

2.4 Tip 基因抑制致 EGFR 在早期内涵体滞留 EGF 诱导 2 h, Tip30 基因抑制的 Tip30-SH1 细胞 EGFR 荧光强度大于 shRNA-CON, 大部分 EGFR 仍然跟 EEA1 重叠在一起, 定位于早期内涵体的 EGFR 比例为 $(51.7 \pm 13.6)\%$, 显著高于 shRNA-CON 细胞的 $(27.2 \pm 5.7)\%$ ($t = 3.7151, P = 0.0059$), 提示 Tip30 基因抑制可干扰 EGF 诱导的 EGFR 细胞浆内运转, 使 EGFR 不能顺利早期内涵体分选至溶酶体。Tip30 基因抑制的 Tip30-SH1 细胞, EGF 处理 8 h 后, Tip30-SH1 细胞 EGFR 仍有 $(43.4 \pm 7.7)\%$ 未降解, 显著高于 shRNA-CON 细胞的 $(18.8 \pm 3.2)\%$ ($t = 5.1099, P = 0.0069$)。提示 Tip 基因抑制致 EGFR 在早期内涵体滞留。

2.5 Tip30 蛋白可在早期内涵体内聚集 EGF 诱导 shRNA-CON 细胞 15 min 后, 大量 Tip30 荧光和 EEA1 荧光重叠, 提示 EGF 诱导后, Tip30 蛋白可聚集于早期内涵体, 参与 EGFR 运输。

2.6 Tip30 基因抑制可促进 EGF 诱导 EGFR 细胞核内化 EGF 诱导 3 h, Tip30 基因抑制的 Tip30-SH1 细胞其细胞核内 EGFR 荧光强度大于 shRNA-CON 细胞, 免疫印迹检查 Tip30-SH1 细胞的细胞核内 EGFR 蛋白和 β -actin 相对水平为 $(28.6 \pm 6.89)\%$, 明显高于 shRNA-CON 细胞的 $(12.9 \pm 2.72)\%$ ($t = 3.6711, P = 0.0214$)。提示 Tip30 基因抑制能促进 EGF 诱导的 EGFR 细胞核内化。

2.7 EGF 处理可诱导 Tip30 细胞核内化 EGFR 诱导后 2 h, A549 细胞 Tip30 信号主要集中于细胞核, 未经 EGF 处理细胞, Tip30 信号多位于细胞浆, 提示 EGFR 处理能诱导 Tip30 细胞核内化。

3 讨论

Tip30 基因敲除可增加细支气管肺泡交界部位的肺上皮干细胞/祖细胞的数目、上调 EGFR 表达及其下游信号分子 Akt 和 Erk1/2 的磷酸化、上调细胞增殖性抗原 PCNA 和细胞周期蛋白 cyclin D1 的表

达、促进 II 型肺泡上皮细胞增殖。Tip30 基因抑制可通过干扰 EGFR 自内涵体向溶酶体的分选、抑制 EGF 诱导的 EGFR 降解、促进 EGF 诱导的 EGFR 自内涵体向溶酶体的分选、促进 EGF 诱导的 EGFR 细胞核内化、延长 EGFR 下游信号分子的活化时间来促进人肺癌细胞生长^[7]。

EGFR 及其下游信号通路为调节人体细胞生长的重要信号之一,EGFR 过表达和其下游信号通路激活与多种肿瘤的发生、发展、转移明显相关^[8]。研究证实^[9],在所有肺腺癌中,约 50% 患者 EGFR 过表达,已经成为治疗肺癌的重要靶点,多种针对 EGFR 的靶向治疗药物已经被批准治疗非小细胞肺癌。EGFR 基因突变已经成为非小细胞肺癌治疗重要的疗效预测指标,但其基因突变患者仅占肺腺癌患者很少部分,大部分患者仍不能获得良好的病情缓解,需要寻找新的治疗靶点和方法,以期提高肺癌治疗的有效率^[10]。

EGFR 表达失调或基因突变导致其细胞膜内区域酪氨酸激酶持续增强,细胞增殖加快,并逐步演变为肿瘤^[11]。人类众多肿瘤都检测到 EGFR 表达,肿瘤细胞本身也能通过自分泌、旁分泌作用促进生长。EGFR 和 EGF 等配体结合后,可致膜内部分磷酸化,可激活下游信号通路和 EGFR 本身内化至细胞浆,进入细胞浆内的 EGFR 仍处于活化状态^[12]。核内化的 EGFR 还能和磷酸化的 RNA 多聚酶 II 结合,促进 DNA 转录^[13]。研究证实,EGFR 表达上调可见于约半数的人肺腺癌,EGFR 及其下游信号分子激活和肺癌的发生、发展、转移明显相关,已经成为肺癌治疗的最重要的分子靶点^[14]。

Tip30 基因具有激酶活性,主要通过调节和细胞增殖、凋亡以及血管生成相关基因而达到抑制肿瘤转移的作用,Tip30 表达下调和多种肿瘤的发生密切相关^[15]。Tip30 基因能以 RAN-GTP 非依赖形式直接和细胞核转运蛋白 Importin β 结合,降低 Importin β 的核转运能力,阻断需要借助 Importin β 的核转运的核定位信号和 M9 信号蛋白向细胞核内运输,进而促进细胞凋亡^[16]。近期研究发现,Tip30 除了参与调节基因转录外,还具有调节 DNA 损伤修复、调节细胞对葡萄糖的耐受性、调控胞浆内分子运输等多项功能^[17]。本研究亦证实 EGF 诱导的 cyclin D1 表达主要和 EGFR 细胞核内化有关,而与细胞膜或细胞浆内 EGFR

信号通路激活的关联性较小。

参考文献

- [1] 何文婷,孟莎莎,吴晓彬,等. 人肺癌组织中 MCPHI 基因过表达后协同化疗药物抑制肺癌 A549 细胞的增殖[J]. 基础医学与临床,2014,34(9):1211-1214.
- [2] 卓毅,冯茂辉. 黑皮质素受体 4 基因在肺癌中的表达及其临床意义[J]. 中华实验外科杂志,2014,31(8):1635-1636.
- [3] 周安燕,田蕊,吴拥军,等. p16 和 FHIT 基因启动子甲基化与肺癌的关系[J]. 国际呼吸杂志,2014,34(10):744-748.
- [4] 张锁连,宋腾腾,梁琨,等. 被动吸烟所致小鼠肺癌中 Angiopoietin-3 基因过表达及其意义的初步探讨[J]. 武警医学,2013,24(12):1056-1060.
- [5] 马云超,李丛丛,赵健,等. 肿瘤转移抑制基因 Tip30/CC3 研究进展[J]. 动物医学进展,2007,28(3):65-69.
- [6] Naugler WE, Sakurai T, Kim S, et al. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production[J]. Science,2007,317(5834):121-124.
- [7] 周小昀,李龙芸,崔巍,等. 检测肺癌患者血清游离 DNA 的 EGFR 基因点突变与 EGFR-TKI 疗效的相关性分析[J]. 癌症进展,2011,9(1):13-18.
- [8] 郑军,谢贵元,李姣,等. 非小细胞肺癌 EGFR 基因突变的临床意义研究[J]. 中国肿瘤临床,2014,41(14):904-907.
- [9] 张杰,吴浩,高慧,等. 肺癌表皮生长因子受体基因突变和扩增与临床病理相关性研究[J]. 中华病理学杂志,2011,40(10):675-678.
- [10] 范苗静,李海刚,吕志强,等. 表皮生长因子受体基因突变与非小细胞肺癌临床病理特征及预后的关系[J]. 中华病理学杂志,2011,40(10):679-682.
- [11] 王理扬,姚文秀. 非小细胞肺癌表皮生长因子受体基因突变的研究进展[J]. 重庆医学,2011,40(28):2897-2899.
- [12] 冯勤,李向红,陈钊,等. 非小细胞肺癌表皮生长因子受体基因突变检测及其与临床病理特征的相关性[J]. 中华病理学杂志,2011,40(10):660-663.
- [13] 张海萍,阮力,郑立谟,等. 特异引物双扩增实时 PCR 法和 Sanger DNA 测序法检测肺癌组织中表皮生长因子受体基因突变[J]. 中华肿瘤杂志,2013,35(1):28-32.
- [14] 周建娅,莫伟芳,赵菁,等. 非小细胞肺癌患者 EGFR 基因突变的临床病理特征[J]. 中华医学杂志,2014,94(30):2332-2336.
- [15] 孙孟红,杨飞,沈磊,等. 非小细胞肺癌中表皮生长因子受体基因突变直接测序分析及其与临床病理特征的相关性[J]. 中华病理学杂志,2011,40(10):655-659.
- [16] 林芳,杨明金,唐万艳,等. 非小细胞肺癌 EGFR 基因突变阳性的临床意义[J]. 现代医药卫生,2014,30(11):1615-1617.
- [17] 周永春,王熙才,黄云超. sox4 基因与肺癌关系的研究进展[J]. 医学综述,2013,19(5):823-826.

收稿日期:2014-12-02 修回日期:2014-12-16 编辑:王国品