

Vinculin 表达对非小细胞肺癌 A549 细胞生物学特征的影响

余秋里¹, 孙佰尔², 陈龙¹, 许立芹²

1. 南通大学附属如皋医院 如皋市人民医院呼吸与危重症医学科, 江苏 南通 226500;

2. 南通大学附属医院呼吸与危重症医学科, 江苏 南通 226001

摘要: **目的** 通过体外实验探讨非小细胞肺癌(NSCLC) A549 细胞系的 Vinculin 表达对其生物学特征的影响。**方法** 购买人 NSCLC A549 细胞系, 体外培养, 分为对照组、空白载体组以及高表达组三组, 高表达组 A549 细胞系转染 Vinculin 过表达载体, 空白载体组 A549 细胞系转染空白载体。体外培养 48 h 后, 应用 RT-PCR 检测各组 A549 细胞系 Vinculin mRNA 表达情况, 应用 MTT 法检测细胞活性, Ki-67 免疫荧光检测细胞增殖能力, Transwell 培养体系 Hoechst 染色观察 A549 细胞系迁移侵袭能力。**结果** RT-PCR 检测结果显示, 与对照组、空白载体组比较, 高表达组 Vinculin mRNA 表达量明显增高 ($P < 0.01$); MTT 法检测结果显示, 与对照组、空白载体组比较, 高表达组的 OD 值明显降低 ($P < 0.01$); Ki-67 免疫荧光检测结果显示, 与对照组、空白载体组比较, 高表达组 Ki-67⁺ 细胞数量明显减少 ($P < 0.01$); Transwell 培养体系 Hoeschst 染色结果显示, 与对照组、空白载体组比较, 高表达组迁移和侵袭的细胞数量明显减少 ($P < 0.01$)。上述各项指标组间比较差异均有统计学意义。**结论** 高表达 Vinculin 能够抑制 NSCLC A549 细胞系增殖、迁移以及侵袭能力, Vinculin 可能是 NSCLC 诊治的潜在生物学靶点。

关键词: 非小细胞肺癌; Vinculin; A549 细胞系; 增殖; 迁移; 侵袭

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2022)01-0038-04

Effects of Vinculin expression on biological characteristics of non-small cell lung cancer A549 cells

YU Qiu-li*, SUN Bai-er, CHEN Long, XU Li-qin

* Department of Respiratory and Critical Care Medicine, The People's Hospital of Rugao

Affiliated to Nantong University, Nantong, Jiangsu 226500, China

Abstract: **Objective** To explore the influences of Vinculin expression on the biological characteristics of non-small cell lung cancer(NSCLC) A549 cell lines through in-vitro experiments. **Methods** After being purchased and cultured in vitro, human NSCLC A549 cell lines were divided into control group, blank vector group(transfected with blank vector) and high expression group(transfected with Vinculin overexpression vector). After in-vitro culture for 48 hours, RT-PCR was used to detect the expression of Vinculin mRNA in A549 cells, MTT was used to measure the cell viability, Ki-67 immunofluorescence was used to determine the cell proliferation, and Transwell culture system and Hoechst staining was used to observe the migration and invasion ability of A549 cells. **Results** RT-PCR showed that the expression of Vinculin mRNA in high expression group significantly increased compared with control group and blank vector group ($P < 0.01$). MTT assay showed that the OD value in high expression group was significantly lower than that in control group and blank vector group ($P < 0.01$). Ki-67 immunofluorescence test showed that the number of Ki-67⁺ cells in high expression group significantly decreased compared with control group and blank vector group ($P < 0.01$). Transwell culture system and Hoeschst staining results showed that the number of migrated and invaded cells in high expression group was significantly lower than those in control group and blank vector group ($P < 0.01$). **Conclusions** Overexpression of Vinculin can inhibit the proliferation, migration and invasion of NSCLC A549 cell line. Vinculin may be a potential biological target for the diagnosis and treatment of NSCLC.

Keywords: Non-small cell lung cancer; Vinculin; A549 cell line; Proliferation; Migration; Invasion

Fund program: Nantong Science and Technology Plan Project (MSZ1844)

我国肺癌发病率日益增高,是临床常见的肿瘤之一,虽然手术、放化疗技术水平进展较快。但是肺癌预后仍然较差,5年存活率只有20%左右^[1-2],严重影响患者生命健康,给社会和家庭带来沉重的负担。笔者以往的研究发现,非小细胞肺癌(NSCLC)患者肺癌组织中 Vinculin 蛋白表达降低,且其降低与 NSCLC 的 TNM 分期、淋巴结转移有关, Vinculin 阴性患者3年生存率较低, Vinculin 阴性是 NSCLC 预后的独立危险因素,研究结果表明, Vinculin 表达量低促进了 NSCLC 的恶性程度^[3]。本研究针对 NSCLC 细胞中高表达 Vinculin 能否改变肺癌细胞的生物学特征这一问题进行如下实验。

1 材料与方法

1.1 材料 A549 细胞系(普诺赛);DMEM 培养液(Sigma);pGFP(C3)-Vinculin(Biofeng);兔抗-Ki67(Abcam);Alexa Fluor[®]568 标记的山羊抗兔 IgG(Molecular Probes 公司);MTT 试剂盒(碧云天);Hoechst 染色剂(Abcam);Trizol 总 RNA 抽提试剂盒(Sangon 公司);Lipofectamine[™]2000(Invitrogen), First Strand cDNA Synthesis Kit(Invitrogen);FastStart Universal SYBR Green Master(Roche)。

1.2 细胞培养以及分组 A549 细胞用 DMEM 培养液(含 15%胎牛血清、100 u/ml 青霉素-链霉素)并置于 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,取对数增殖期的细胞进行后续相关实验。细胞分为对照组、空白载体组以及高表达组,对照细胞不做特殊处理,空白载体组[转染空质粒 pGFP(C3)],高表达组[转染质粒 pGFP(C3)-Vinculin]。依据使用说明将质粒与 Lipofectamine[™]2000(Invitrogen)混合转染 A549 细胞。培养 48 h 后在倒置荧光显微镜(Leica)下观察转染情况,用于后续实验。

1.3 检测方法

1.3.1 RT-PCR 将上述三组细胞,以 5×10³ 密度接种于 24 孔培养板,培养 48 h 后,收集各组细胞,用 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒(Sangon 公司)提取各组细胞总 RNA,使用 cDNA 合成试剂盒(Fermentas)逆转录扩增 cDNA。在 Corbett RG-6000 PCR 系统(QIAGEN)中通过 SYBR Green Master Mix(Roche)进行 RT-PCR 检测。Vinculin 引物为:上游 5'-CCA AAA CAT GTC TCC TAT ATC CTG G-3',下游 5'-GAA GTG

TCC TTC AGA CAG GG-3';内参 GAPDH 引物:上游 5'-ATG TCG TGG AGT CTA CTG GC-3',下游 5'-TGA CCT TGC CCA CAG CCT TG-3'。用 2^{-ΔΔCt} 法计算 Vinculin mRNA 的相对表达量。

1.3.2 MTT 法检测细胞活力 将上述三组细胞,以 5×10³ 密度接种于 24 孔培养板,培养 48 h 后,收集各组细胞,应用 MTT 试剂盒按照使用说明检测各组细胞的 OD 值。

1.3.3 Ki67 免疫荧光检测细胞增殖能力 将上述三组细胞,以 5×10³ 密度接种于 24 孔培养板,培养 48 h 后,收集各组细胞,移去培养液,封闭液封闭后,先后用兔抗-Ki67(1:600,Abcam)、Alexa Fluor[®]568 标记的山羊抗兔 IgG(1:800, Molecular Probes 公司)在湿盒、37 °C 条件下各孵育 3 h。在荧光显微镜(Leica)下,400 倍视野观察 Ki67⁺ 细胞数量情况。

1.3.4 Transwell 培养体系 Hoechst 染色观察 A549 细胞系迁移侵袭能力 (1)迁移实验:将各组细胞以 5×10³ 密度接种于 8 μm 孔膜包被的 24 孔 Transwell 上室,加无血清 DMEM 培养液,下室加含 15%胎牛血清 DMEM 培养液,培养 48 h 后,迁移至 Transwell 上室下表面的细胞用甲醇固定 5 min,并用 Hoechst(1:2000)染色。在荧光显微镜(Leica)下,400 倍视野观察膜上的细胞数量情况。(2)侵袭实验:细胞接种前在 Transwell 上室涂一层 100 μl(1 mg/ml)基质胶,其余过程同迁移实验。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 21.0 统计学软件对本研究的所得数据进行统计分析。本研究所得数据均为计量资料,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,三组间比较用单因素方差分析,两两比较用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

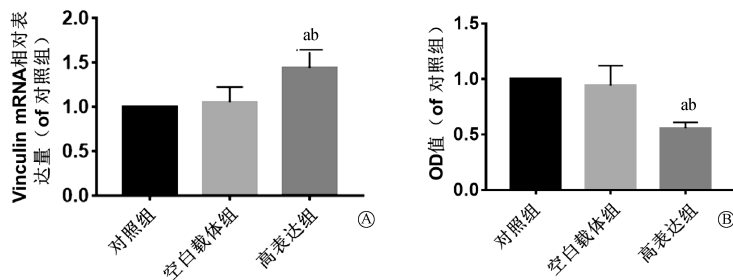
2.1 三组细胞 Vinculin mRNA 表达和细胞活力 RT-PCR 检测 结果显示,三组间比较差异有统计学意义($F = 14.68, P < 0.01$),与对照组、空白载体组比较,高表达组 Vinculin mRNA 表达明显增高($P < 0.05$)。见图 1A。各组细胞活力检测 MTT 法检测结果显示,三组间比较差异有统计学意义($F = 29.98, P < 0.01$),与对照组、空白载体组比较,高表达组的 OD 值明显降低($P < 0.05$)。见图 1B。

2.2 三组细胞增殖能力检测 Ki-67 免疫荧光检测

结果显示,三组间比较差异有统计学意义($F=29.69$, $P<0.01$),与对照组、空白载体组比较,高表达组 Ki67⁺细胞数量明显减少($P<0.05$)。见图2。

2.3 三组细胞迁移侵袭能力检测 Transwell 培养体

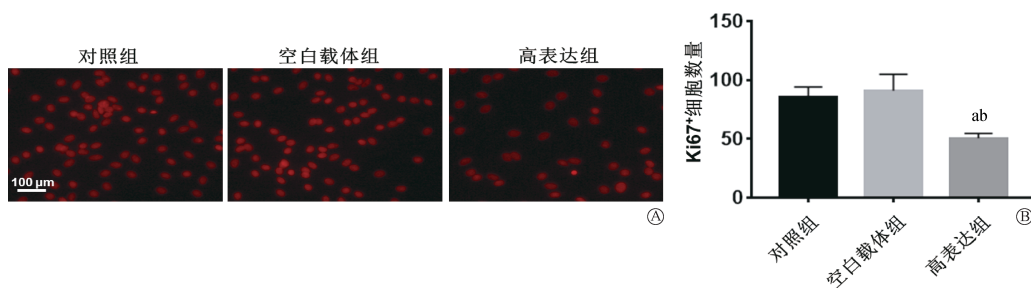
系 Hoeschst 染色结果显示,三组间比较差异有统计学意义($F=64.58$, $P<0.01$; $F=27.30$, $P<0.01$),与对照组、空白载体组比较,高表达组迁移和侵袭的细胞数量明显减少($P<0.05$)。见图3。



注:A为RT-PCR检测三组细胞的Vinculin mRNA表达;B为MTT法检测三组细胞的OD值;与对照组相比,^a $P<0.05$;与空白载体组相比,^b $P<0.05$ 。

图1 三组 A549 细胞 Vinculin mRNA 表达和 OD 值比较

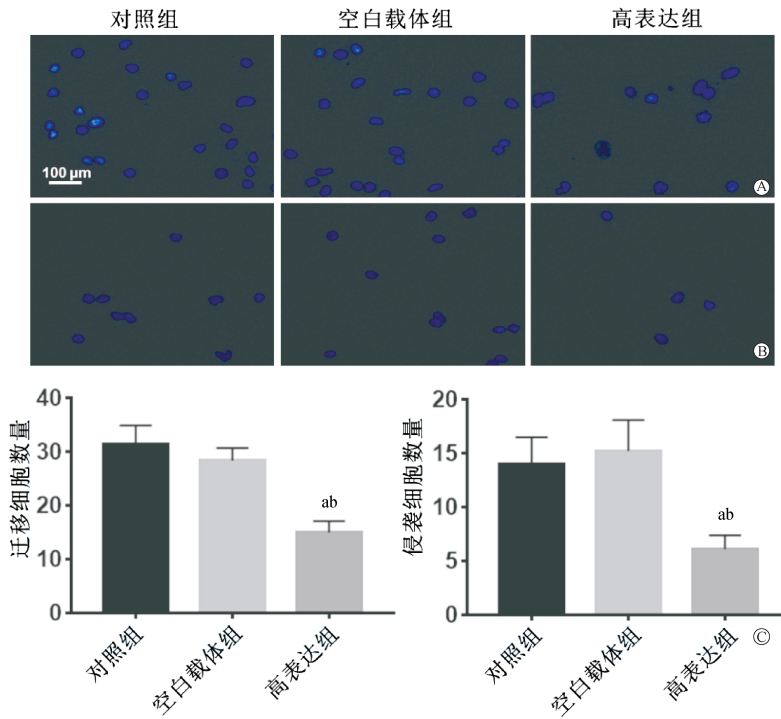
Fig.1 Comparison of Vinculin mRNA expression and OD value of A549 cells among three groups



注:A为Ki-67免疫荧光图;B为Ki-67⁺细胞数量统计图;与对照组相比,^a $P<0.05$;与空白载体组相比,^b $P<0.05$ 。

图2 三组细胞增殖能力的Ki-67免疫荧光检测结果

Fig.2 Ki-67 immunofluorescence test results of cell proliferation ability among three groups



注:A为迁移细胞情况;B为侵袭细胞情况;C为迁移侵袭数量统计图;与对照组相比,^a $P<0.05$;与空白载体组相比,^b $P<0.05$ 。

图3 三组细胞迁移侵袭能力检测结果

Fig.3 Test results of cell migration and invasion ability among three groups

3 讨论

肺癌是世界上死亡率最高的恶性肿瘤之一^[3]。根据组织病理学特征,肺癌可分为小细胞肺癌和 NSCLC^[4]。NSCLC 是临床上常见的肺癌类型。尽管分子生物学技术发展迅速,但关于 NSCLC 的发病机制仍知之甚少^[5]。许多 NSCLC 患者被确诊时已经为晚期。晚期患者通常已经出现肿瘤浸润和转移,这是 NSCLC 患者治疗失败和死亡的主要原因。

最近的研究表明,恶性肿瘤的侵袭和转移与细胞外基质的破坏和细胞迁移有关。在这个过程中,肿瘤细胞的黏附,细胞骨架蛋白的重组和重塑起着关键作用^[6]。细胞基质黏附和细胞间黏附对于细胞代谢、蛋白质合成、细胞存活和肿瘤细胞转移至关重要。跨膜受体主要是整合素和钙黏蛋白,前者负责细胞基质的黏附,后者在细胞间黏附中起重要作用^[7]。已经发现整合素介导的细胞基质黏附参与肿瘤的各个阶段。肿瘤转移需要细胞侵袭结缔组织,这实质上是一种机械事件,涉及黏附、形状改变、运动和力的产生^[6]。有研究表明 Vinculin 在此过程中起着关键作用,Vinculin 基因充当抑癌基因,影响肿瘤的发生、转移和侵袭^[8]。Vinculin 是一种肌动蛋白结合蛋白,由 1 066 个氨基酸组成,分子量为 117 000。Vinculin 没有酶活性,通过直接结合肌动蛋白,刺激肌动蛋白聚合和重塑来调节黏附力。几项研究表明,Vinculin 低表达的细胞具有增加转移的潜能,并且与肿瘤的恶性程度密切相关^[9-15]。笔者既往研究也发现,在 NSCLC 患者组织中 Vinculin 基因转录受到抑制,Vinculin 的低表达促进 NSCLC 的恶性^[3]。

早期有学者研究表明,与对照细胞相比,从 Vinculin 缺陷小鼠分离的成纤维细胞的黏附能力降低,迁移能力增强,恢复 Vinculin 蛋白的表达可以逆转这一结果,Vinculin 缺陷癌细胞也显示出相似的结果^[12]。本研究中,在 NSCLC A549 细胞中高表达 Vinculin 后,细胞的增殖、迁移和侵袭能力都明显降低,与以往研究的结果比较,提示在 NSCLC 中高表达 Vinculin,能够逆转癌细胞的恶性程度,这与其他学者在其它细胞中观察到的结果基本一致。所有研究均表明,Vinculin 可能是抑癌基因。有研究表明,Vinculin 可能是通过支持锚定依赖性细胞生长和降低细胞运动性来抑制肿瘤^[10-13]。但是,Vinculin 发挥抑癌作用的机制仍不清楚,有待进一步探讨。

参考文献

- [1] Bade BC, Brasher PB, Luna BW, et al. Reviewing lung cancer screening: the who, where, when, why, and how [J]. Clin Chest Med, 2018, 39(1): 31-43.
- [2] Noor ZS, Cummings AL, Johnson MM, et al. Targeted therapy for non-small cell lung cancer [J]. Semin Respir Crit Care Med, 2020, 41(3): 409-434.
- [3] Yu QL, Xu LQ, Chen L, et al. Vinculin expression in non-small cell lung cancer [J]. J Int Med Res, 2020, 48(1): 300060519839523.
- [4] 曾广, 张文成, 王广舜. 铁蛋白轻链在非小细胞肺癌中的表达及意义 [J]. 中国临床研究, 2020, 33(6): 749-753.
Zeng G, Zhang WC, Wang GS. Expression and significance of ferritin light chain in non-small cell lung cancer [J]. Chin J Clin Res, 2020, 33(6): 749-753.
- [5] 何伟娜, 庞敏, 张卫华, 等. ¹²⁵I 粒子植入联合微波消融术对中晚期非小细胞肺癌的近期疗效 [J]. 中国临床研究, 2020, 33(2): 180-182.
He WN, Pang M, Zhang WH, et al. ¹²⁵I seed implantation combined with microwave ablation in the treatment of advanced non-small cell lung cancer [J]. Chin J Clin Res, 2020, 33(2): 180-182.
- [6] West H. Management of oligometastatic disease in advanced non-small cell lung cancer [J]. Clin Chest Med, 2020, 41(2): 249-258.
- [7] Gerashchenko TS, Novikov NM, Krakhmal NV, et al. Markers of cancer cell invasion; are they good enough? [J]. J Clin Med, 2019, 8(8): 1092.
- [8] Gkretsi V, Stylianopoulos T. Cell adhesion and matrix stiffness: coordinating cancer cell invasion and metastasis [J]. Front Oncol, 2018, 8: 145.
- [9] Izard T, Brown DT. Mechanisms and functions of vinculin interactions with phospholipids at cell adhesion sites [J]. J Biol Chem, 2016, 291(6): 2548-2555.
- [10] Shi XH, Guo XJ, Li X, et al. Loss of Linc01060 induces pancreatic cancer progression through vinculin-mediated focal adhesion turnover [J]. Cancer Lett, 2018, 433: 76-85.
- [11] Kawakami K, Fujita Y, Kato T, et al. Integrin $\beta 4$ and vinculin contained in exosomes are potential markers for progression of prostate cancer associated with taxane-resistance [J]. Int J Oncol, 2015, 47(1): 384-390.
- [12] Li T, Guo HQ, Song Y, et al. Loss of vinculin and membrane-bound β -catenin promotes metastasis and predicts poor prognosis in colorectal cancer [J]. Mol Cancer, 2014, 13: 263.
- [13] Gao Y, Wang ZW, Hao Q, et al. Loss of ER α induces amoeboid-like migration of breast cancer cells by downregulating vinculin [J]. Nat Commun, 2017, 8: 14483.
- [14] Ai J, Jin T, Yang L, et al. Vinculin and filamin-C are two potential prognostic biomarkers and therapeutic targets for prostate cancer cell migration [J]. Oncotarget, 2017, 8(47): 82430-82436.
- [15] Wang F, Fang MX, Kong M, et al. Vinculin presents unfavorable prediction in ovarian cancer and prevents proliferation and migration of ovarian cancer cells [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2020; e22525.