

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.18.008

TN-C 在小细胞肺癌中的表达及 STAT3 对 TN-C 表达的影响

陈永锋 王海晶 刘丁媛 周向东[△]

(第三军医大学西南医院呼吸科 重庆 400038)

摘要 目的:探讨小细胞肺癌(SCLC)组织和小细胞肺癌细胞(H446)中肌糖蛋白 -C(TN-C)的表达及 STAT3 对 TN-C 表达的影响。**方法:**应用免疫组化法检测 58 例小细胞肺癌和 17 例癌旁正常组织中 TN-C 的表达水平,应用 RT-PCR 和 Western blotting 法检测 STAT-siRNA 和 STAT3 过表达的 H446 细胞中 TN-C 的表达水平。**结果:**(1)小细胞肺癌组织中 TN-C 的表达水平显著高于癌旁正常组织($P<0.05$);(2)在 H446 细胞中,TN-C 和 STAT3 均呈现高表达;(3)STAT3-siRNA 处理的 H446 细胞中 STAT3 和 TN-C 的表达均显著降低($P<0.05$),而 STAT3 过表达的 H446 细胞中 STAT3 和 TN-C 的表达均显著上调($P<0.05$)。**结论:**TN-C 在小细胞肺癌中的表达上调,可能受到 STAT3 的调控。

关键词:小细胞肺癌;信号传导与转录激活因子 3;肌糖蛋白 -C

中图分类号:R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)18-3429-04

Expression of TN-C in small cell lung cancer and the effect of STAT3 on TN-C Expression

CHEN Yong-feng, WANG Hai-jing, LIU Ding-yuan, ZHOU Xiang-dong[△]

(Department of respiration, Southwest hospital of the third military medical university, Chongqing, 400038, China)

ABSTRACT Objective: To explore the expression of TN-C in small cell lung cancer tissues and the influence of STAT3 on TN-C expression in H446 cells. **Methods:** The level of TN-C in 58 cases of SCLC tissues and 17 cases of adjacent normal lung tissue were determined by immunohistochemistry, and the TN-C expression were also detected by RT-PCR and western blotting in STAT3-siRNA or STAT3 overexpression H446 cells. **Results:** Significant up-regulation of TN-C in SCLC tissues was observed comparing with normal adjacent tissues. Both the TN-C and STAT3 expression were up-regulated in H446 cells. The STAT3 and TN-C expression were both decreased in STAT3-siRNA H446 cells but increased in STAT3 overexpressed H446 cells ($P<0.05$). **Conclusion:** Expression of TN-C was up-regulated in SCLC, which may be mediated by STAT3.

Key words: Small cell lung cancer; STAT3; TN-C

Chinese Library Classification(CLC): R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)18-3429-04

前言

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,其生物学特性、组织病理类型和临床特征多样^[1]。半个世纪以来,世界各国肺癌的发病率和死亡率都呈明显增高趋势,全球每年约有 130 万新增病例,对人类生存和健康构成极大威胁^[2-4]。小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 是肺癌的一种未分化癌,由 kulchitsky 细胞恶变而来,约占肺癌总数的 20%~25%,恶性程度高,对化学治疗及放射治疗敏感,较早即出现淋巴道转移和血行转移,在各种类型的肺癌中预后最差^[5-7]。研究表明,肌糖蛋白 -C(TN-C)在多种肿瘤组织或细胞中均呈现高表达状态^[8],如恶性胶质瘤细胞^[9]、骨巨细胞瘤^[10]等,且其能够促进肿瘤细胞的迁移^[11]。信号转导和转录活化因子 (signal transducers and activators of transcription, STATs) 家族蛋白广泛参与细胞生长、分化、凋亡等多

种生理功能的调控,并与炎症、肿瘤和免疫反应密切相关^[12]。研究发现,STAT3 在多种肿瘤组织中异常表达和激活,并与肿瘤的增殖、分化、细胞凋亡、血管生成、浸润转移和免疫逃避密切相关^[13]。胥文春^[14]等发现,在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)组织中,STAT3 的阳性表达率明显高于癌旁正常肺组织。但 TN-C 和 STAT3 在小细胞肺癌中的表达尚不清楚。本研究旨在探讨小细胞肺癌组织中 TN-C 的表达,以及 STAT3 对 TN-C 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 样本来源

本研究 58 例小细胞肺癌组织及 17 例癌旁正常组织均取自第三军医大学西南医院呼吸科 2008 年 3 月至 2012 年 7 月接受手术治疗的患者,术前均未接受放疗和化疗,经术后病理诊断确诊。年龄 42-73 岁,中位年龄 59 岁。人小细胞肺癌细胞系 H446 细胞和人正常肺上皮细胞系 BEAS-2B 细胞购自美国培养物保存中心(ATCC)。

1.2 主要试剂

鼠抗人 STAT3 单克隆抗体购自 Epigentek 公司;辣根过氧

作者简介:陈永锋(1972-),男,博士,主治医师,主要研究方向:肺癌的耐药的临床与基础,E-mail: submission029@gmail.com

△通讯作者:周向东,E-mail: submission029@gmail.com

(收稿日期:2013-12-15 接受日期:2014-01-12)

化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 二抗购自 Cell Signaling Technology;DAB 试剂盒购自 Vector Laboratories, Inc 公司;鼠抗人 TN-C 单克隆抗体、RIPA 裂解液、PVDF 膜购自 Sigma 公司;RPMI-1640 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司;LipofectamineTM 2000、TRIZOL 试剂购自 Invitrogen 公司;pyrobest DNA 聚合酶购自 Takara Biotechnology 公司;ECL 购自 Thermo Pierce 公司;pEGFP 载体购自 Novagen 公司。

1.3 免疫组化检测 TN-C 在小细胞肺癌组织中的表达

小细胞肺癌组织和正常癌旁组织于 30 %福尔马林溶液中固定,石蜡切片厚度为 5 μ m,常规脱蜡至水化,PBS 清洗切片后,以 5 %山羊血清进行封闭,与鼠抗人 TN-C 单克隆抗体(稀释比 1:200)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 清洗切片,与辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 二抗(稀释比 1:2000)孵育后,以 DAB 试剂盒进行显色,阳性染色为棕黄色。

1.4 细胞培养

H446 和 BEAS-2B 细胞培养于含 100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素及 10 %胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,并在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 及水饱和条件下进行培养,每隔 3 天更换一次培养基。待细胞汇片达到 90 %后,以 0.25 %胰蛋白酶-EDTA 溶液进行消化,待用。

1.5 RT-PCR 检测 H446 细胞中 TN-C 和 STAT3 mRNA 的表达

按照 TRIZOL 试剂说明书提取 H446 和 BEAS-2B 细胞中的总 RNA。TN-C 基因上游引物序列为:5'-GGTACAGTGGACAGCAGGTG-3',下游引物序列为:5'-GAGAAGGATCTGCCATTGTGG-3';STAT3 基因上游引物序列为:5'-GTCA-GATGCCAAATGC-3',下游引物序列为:5'-CCTGGAGGCTTAGTGC-3';内参 β -actin 的上游引物序列为 5'-CTC CAT CCT GGC CTC GCT GT-3',下游引物序列为 5'-GCT GTC ACC TTC ACC GTT CC-3',均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,56 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,循环 40 次。

1.6 Western blotting 检测 H446 细胞中 TN-C 和 STAT3 蛋白的表达

以 RIPA 裂解液分别裂解 H446 和 BEAS-2B 细胞,提取细胞总蛋白,并以 BCA 法定量。进行 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳(40 μ g/泳道)后,转至 PVDF 膜上进行抗原抗体反应,一抗分别为鼠抗人 TN-C 单克隆抗体和鼠抗人 STAT3 单克隆抗体(稀释度 1:200),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。二抗为辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 二抗(稀释度 1:2000),ECL 显色、X 线片曝光后,Image J 软件扫描灰度定量。

1.7 人 STAT3 siRNA(short hairpin RNA)表达载体的构建

从 GenBank 中查找人 STAT3 基因的全长序列,根据 siRNA 的设计原则,设计 STAT3 特异寡核苷酸序列:STAT3 正义链 5'-CCG GTG GAG ACA TGC AGG ATC TGA TTC AAG AGA TCA GAT CCT GCA TGT CTC CTT TTT TG-3',反义链 5'-AAT TCA AAA AAG GAG ACA TGC AGG ATC TGA TCT CTT GAA TCA GAT CCT GCA TGT CTC CA-3'。同时建立无同源性序列的 non-target siRNA 为阴性对照,正义链 5'-CCG GTA CGT GAC ACG TTC GGA GAA TTC TCG AGA ATT CTC CGA ACG TGT CAC GTT TTT TG-3',反义链 5'-AAT

TCA AAA AAC GTG ACA CGT TCG GAG AAT TCT CGA GAA TTC TCC GAA CGT GTC ACG TA-3'(由上海生工生物工程技术服务有限公司合成)。将处于对数生长期的人小细胞肺癌细胞 H446 经 0.25 %胰蛋白酶消化后制成细胞悬液,以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板,于 37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ 培养箱内培养,保证转染时细胞汇合达 70 %~80 %;分别将稀释的 STAT3-siRNA,scramble siRNA 与无血清培养液稀释的 LipofectamineTM2000 轻轻混合至均匀,缓慢加至 H446 细胞中,同时设置对照组,37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ 培养箱内培养 24 h 后,吸去无血清培养液,加入含 10 %FBS 的细胞培养基继续培养。提取细胞总蛋白,Western blotting 检测 STAT3 和 TN-C 蛋白的表达,以 β -actin 为内参。

1.8 STST3 过表达载体的构建

利用 pyrobest DNA 聚合酶对 STAT3 基因的 cDNA 进行 RCR 扩增,STAT3 基因上游引物序列为:5'-GTCAGATGCCAAATGC-3',下游引物序列为:5'-CCTGGAGGCTTAGTGC-3';将扩增的 STAT3 cDNA 插入 pEGFP 载体中,以脂质体法将 cDNA-pEGFP 载体转染至 H446 细胞中,同时设置 pEGFP 空载体作为阴性对照,37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ 培养箱内培养 24 h 后,吸去无血清培养液,加入含 10 %FBS 的细胞培养基继续培养。提取细胞总蛋白,Western blotting 检测 STAT3 和 TN-C 蛋白的表达,以 β -actin 为内参。

1.9 图像分析及统计学方法

本研究所有实验均重复 3 次进行。利用 Image-Pro Plus6.0 图像分析软件,检测阳性信号的积分光密度(Integrated Optical Density, IOD)和相应面积(Area),将每张切片选取 3 个视野,取平均值来计算免疫组化阳性信号的平均光密度值(Mean Optical Density);采用独立样本 t 检验法(Student's t test)对免疫组化图像分析结果和 RT-PCR 结果进行分析比较,其中 P < 0.05 被认为具有统计学意义;利用 Gel-pro4.0 软件对 western blotting 条带进行积分光密度 IOD 分析,根据各条带的 IOD 值,绘制相应的光密度直方图。

2 结果

2.1 小细胞肺癌中 TN-C 的表达

采用免疫组织化学染色法检测人小细胞肺癌组织和癌旁正常肺组织中 TN-C 的表达,棕色代表阳性信号。结果显示,与癌旁正常肺组织(图 1B)相比,人小细胞肺癌组织(图 1A)中 TN-C 广泛分布,且着色加深;采用 Image-Pro Plus6.0 图像分析免疫组化图片,结果显示 SCLC 组织中 TN-C 的阳性信号(Mean Optical Density)显著高于正常肺组织(图 1C),表明人小细胞肺癌组织与癌旁正常肺组织相比 TN-C 呈高表达。

2.2 H446 细胞中 TN-C 和 STAT3 的表达

通过 RT-PCR 和 Western blotting 分析发现,TN-C 和 STAT3 在 H446 细胞中均有表达,与人正常肺上皮细胞中的 TN-C 和 STAT3 表达相比,H446 细胞中 TN-C 和 STAT3 的 mRNA(图 2A)和蛋白表达量(图 2B-D)均显著上调(图 2),差异具有统计学意义(P < 0.05)。其中,图 2C 和图 2D 分别为 western blotting 条带的光密度分析结果。

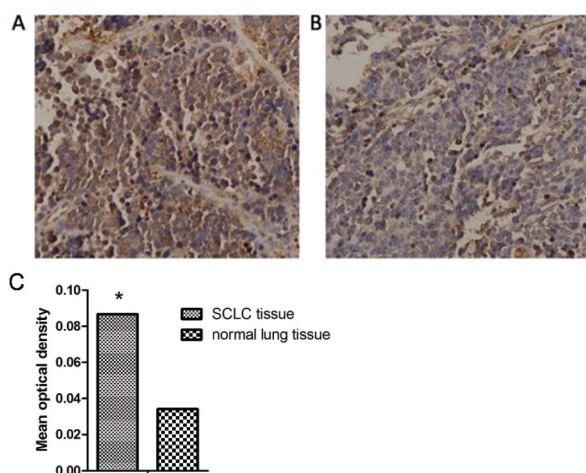


图1 免疫组化法检测人小细胞肺癌组织(A)和癌旁正常肺组织(B)中 TN-C 的表达(放大倍数 $\times 40$)

Fig. 1 TN-C expression in SCLC (A) and adjacent normal lung tissues (B) detected by immunohistochemistry. (Magnification, $\times 40$)

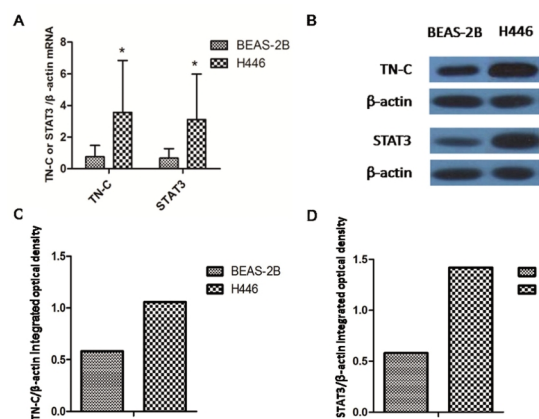


图2 H446 细胞中 TN-C 和 STAT1 的表达

Fig. 2 Expression of TN-C and STAT1 in H446 cells

2.3 STAT3-siRNA 和 STAT3 过表达处理的 H446 细胞中 STAT3 的表达

为了探讨 STAT3 对 TN-C 表达的影响,本研究分别构建了 STAT3-siRNA 和 STAT3 过表达的 H446 细胞模型。通过 RT-PCR 和 Western blotting 分析,验证了 STAT3-siRNA 和 STAT3 过表达 H446 细胞模型的成功构建。图 3A 显示, STAT3-siRNA 处理的 H446 细胞中 STAT3 mRNA 水平与对照和 Scramble siRNA 组相比均显著降低 ($P<0.05$),而 STAT3 过表达的 H446 细胞中 STAT3 mRNA 水平与对照和空载体组相比均显著增加 ($P<0.05$)。Western blotting 的结果与 RT-PCR 结果相一致(图 3B 和图 3C),表明本研究成功构建 STAT3-siRNA 和 STAT3 过表达的 H446 细胞模型。

2.4 STAT3-siRNA 和 STAT3 过表达的 H446 细胞中 TN-C 的表达

通过 RT-PCR 和 Western blotting 的方法,检测 H446 细胞中 STAT3 基因沉默或过表达对 TN-C 表达的影响。如图 4 中所示,在 STAT3-siRNA 处理的 H446 细胞中,TN-C 的 mRNA 表达较对照组显著下调,而在 STAT3 过表达组中表达上调;在 TN-C mRNA 水平上,两组同对照组相比,均呈现出显著差异

(图 4A, $P<0.05$)。

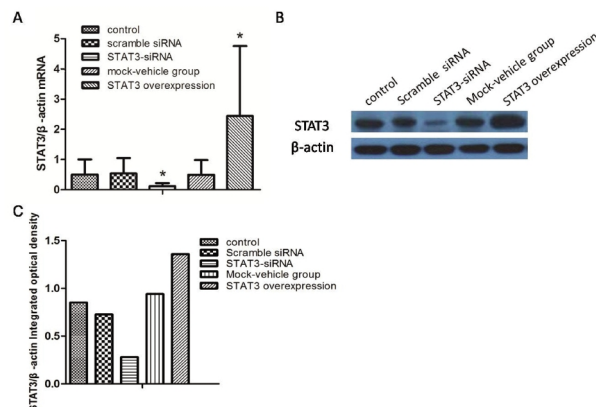


图3 STAT3-siRNA 和 STAT3 过表达的 H446 细胞中 STAT3 的表达

Fig. 3 Expression of STAT3 in STAT3-siRNA and STAT3 overexpressed H446 cells

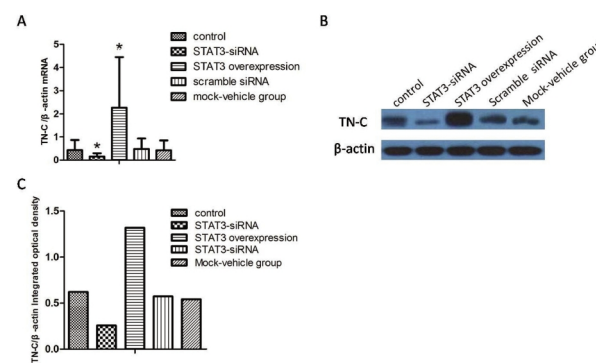


图4 STAT3-siRNA 和 STAT3 过表达 H446 细胞中 TN-C 的表达

Fig. 4 Expression of TN-C in STAT3-siRNA and STAT3 overexpression H446 cells

3 讨论

小细胞肺癌(SCLC)因增长快、恶性度高、转移早,确诊时多有淋巴结转移或远处转移,被认为是一种全身性疾病。此外,其分期较为特殊,分为局限期和广泛期,大多数小细胞肺癌患者确诊时已属广泛期,局限期所占比例仅为 1/3^[9]。

肌糖蛋白 C(Tenascin-C, TN-C)是一种细胞外基质糖蛋白,其特异性表达于损伤组织中。在组织发生损伤时,肌糖蛋白 C 扮演多种不同的角色来调节炎性和纤维化过程以确保组织修复。近年来,研究发现肌糖蛋白 C 在心脏和动脉损伤、肿瘤血管发生和转移以及调节干细胞活动中具有关键作用^[15]。肌糖蛋白 C 在许多人类肿瘤组织中均呈现高表达,能够刺激细胞增殖,促进肿瘤细胞迁移^[8,11]。本研究首先在组织水平检测了小细胞肺癌组织中 TN-C 的表达情况,发现 TN-C 在 SCLC 组织中的表达明显高于癌旁正常肺组织,提示 TN-C 可能在小细胞肺癌的发生中发挥了重要作用。已有研究推测 TN-C 在小细胞肺癌中的作用,提出 TN-C 有可能作为未来检测小细胞肺癌的指标及治疗的潜在靶点。进一步检测 TN-C 高表达的原因,我们发现 TN-C 和 STAT3 在 H446 细胞中均呈现高表达,我们构建了 STAT3 基因沉默和过表达的 H446 细胞模型,结果显示 TN-C

在 H446 细胞中的表达与 STST3 的水平呈正相关, 表明 STAT3 可促进 H446 细胞中 TN-C 的表达, 进而可能促进小细胞肺癌的发生和发展。

STATs 家族是一种存在于胞浆且在激活后能够转入细胞核内与 DNA 结合的蛋白质家族, 具有信号转导和转录调控的双重作用。其中, STAT3 蛋白参与调节了多种细胞因子的信号转导过程, 包括 IFN 受体家族、gp130 受体家族。STAT3 活化后, 在胞浆内形成同源或异源二聚体, 该二聚体可迅速转入细胞核中, 并能结合在特定基因的启动子上, 诱导相应基因的表达^[10]。据此推测, STAT3 有可能通过其转录调控作用, 来调节 TN-C 基因的启动, 但有关 TN-C 随着小细胞肺癌病程进展的表达情况以及 STAT3 促进 TN-C 表达的分子机制仍有待于深入研究。小细胞肺癌中 TN-C 表达的上升, 表明 TN-C 有可能为小细胞肺癌的治疗提供潜在的靶点。此外, TN-C 表达机制的研究将有助于更好的研究 TN-C 在小细胞肺癌中的作用。

参考文献(References)

- [1] 刘红雨, 陈军. 肺癌转移进展 [J]. 中国肺癌杂志, 2008, 11(1): 40-42
Liu Hong-yu, Chen Jun. Advances on lung cancer metastasis [J]. Chin J Lung Cancer, 2008, 11(1): 40-42
- [2] Pirozynski M. RETRACTED: 100 years of lung cancer [J]. Respiratory medicine, 2006, 100(12): 2073-2084
- [3] Ferlay J, Autier P, Boniol M, et al. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006 [J]. Annals of oncology, 2007, 18(3): 581-592
- [4] Ferlay J, Parkin D, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008 [J]. European Journal of Cancer, 2010, 46(4): 765-781
- [5] 苏景伟. 小细胞肺癌综合治疗疗效分析及相关肿瘤标记物的研究 [D]. 河北: 河北医科大学, 2012
Su Jing-wei. Investigate the effect of combined therapy and study of tumor marker associated with small-cell lung cancer[D]. Hebei: Hebei Medical University, 2012
- [6] 王波, 杨欢, 黄玉政, 等. 人小细胞肺癌细胞株 H446 侧群细胞的生物学特征 [J]. 癌症, 2010, 29(3): 272-278
Wang Bo, Yang Huan, Huang Yu-zheng, et al. Biologic characteristics of the side population of human small cell lung cancer cell line H446[J]. Chinese Journal of Cancer, 2010, 29(3): 272-278
- [7] 邹龑, 李佩, 唐卓. 小细胞肺癌诊断与化疗药物组合研究进展 [J]. 四川医学, 2011, 32(8): 1302-1304
Zou Yan, Li Pei, Tang Zhuo. Progress in the diagnosis of small cell lung cancer with chemotherapy drug combination studies [J]. Sichuan Medical Journal, 2011, 32(8): 1302-1304
- [8] Alves TR, Fonseca ACC, Nunes SS, et al. Tenascin-C in the extracellular matrix promotes the selection of highly proliferative and tubulogenesis-defective endothelial cells [J]. Experimental Cell Research, 2011, 317(15): 2073-2085
- [9] Leins A, Riva P, Lindstedt R, et al. Expression of tenascin-C in various human brain tumors and its relevance for survival in patients with astrocytoma [J]. Cancer, 2003, 98(11): 2430-2439
- [10] Pazzaglia L, Conti A, Chiechi A, et al. Differential gene expression in classic giant cell tumours of bone: Tenascin C as biological risk factor for local relapses and metastases [J]. Histopathology, 2010, 57(1): 59-72
- [11] Murphy-Ullrich JE. The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state [J]. Journal of Clinical Investigation, 2001, 107(7): 785-790
- [12] 吴民华, 陈小毅. STAT3 表达与肿瘤关系的研究进展 [J]. 广东医学院学报, 2007, 25(5): 567
Wu Min-hua, Chen Xiao-yi. Research progress of the relationship between STAT3 expression and tumor [J]. Journal of Guangdong Medical college, 2007, 25(5): 567
- [13] 杨光, 袁正军. 信号传导通路肿瘤侵袭和转移机制的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2009, 17(2): 362-364
Yang Guang, Qiu Zheng-jun. Advances in signal transduction pathway and the mechanism of invasion and metastasis of tumor [J]. Modern Oncology, 2009, 17(2): 362-364
- [14] 胥文春, 罗春丽, 冯文莉, 等. 非小细胞肺癌组织中 STAT3 的表达及临床意义 [J]. 临床检验杂志, 2003, 21(Suppl): 23-34
Xu Wen-chun, Luo Chun-li, Feng Wen-li, et al. Expression of STAT3 in non small cell lung cancer and its clinical significance [J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2003, 21(Suppl): 23-24
- [15] Midwood KS, Hussenet T, Langlois B, et al. Advances in tenascin-C biology [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2011, 68(19): 3175-3199
- [16] Niu G, Wright KL, Huang M, et al. Constitutive STAT Activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis [J]. Oncogene, 2002, 21(13): 2000-2008