

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.04.003

· 研究快报 ·

ITGA6 shRNA 抑制非小细胞肺癌 H460SM 细胞锚定非依赖生长和侵袭

陈艳, 王熙才[▲], 伍治平, 金从国, 周永春, 黄云超(昆明医科大学第三附属医院暨云南省肿瘤医院, 云南省肿瘤研究所, 云南昆明, 650118)

[摘要] **目的:**探讨慢病毒介导 $\alpha 6$ 整合素(integrin $\alpha 6$, *ITGA6*)shRNA 对人非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)H460SM 细胞生长和侵袭的影响。**方法:**实时定量 PCR 和 Western blotting 检测 *ITGA6* 在 9 种 NSCLC 细胞中的表达。慢病毒介导 *ITGA6* shRNA 感染 H460SM 细胞后,实时定量 PCR 和 Western blotting 检测 H460SM 中 *ITGA6* 的表达,显微镜下观察 H460SM 细胞形态的变化,MTS 法检测细胞增殖,软琼脂实验检测 H460SM 细胞锚定非依赖性生长,流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期,迁移和侵袭实验检测 H460SM 细胞体外迁移和侵袭能力。**结果:***ITGA6* 在 7 种人 NSCLC 细胞中均有表达,H460SM 细胞中 *ITGA6* 表达水平明显高于亲本 H460 细胞[(8.75 ± 0.09) vs (5.78 ± 0.26), $P < 0.01$]。慢病毒介导 *ITGA6* shRNA 稳定感染 H460SM 细胞后的 H460SM-75、H460SM-76 细胞中,*ITGA6* 表达水平明显低于阴性对照组 H460SM-NS 细胞[(0.11 ± 0.04)、(0.22 ± 0.04) vs (1.00 ± 0.01), $P < 0.01$]。H460SM-75、H460SM-76 细胞增殖活性与 H460SM-NS 细胞无差异($P > 0.05$),且凋亡率、细胞增殖指数、 G_0/G_1 期细胞的比例也无差异($P > 0.05$)。H460SM-75、H460SM-76 细胞的克隆形成率明显低于 H460SM-NS 细胞[(18.87 ± 1.47)%、(18.85 ± 1.11)% vs (20.81 ± 1.38)% , $P < 0.05$],迁移率[(43.92 ± 0.41)%、(24.10 ± 0.33)% vs (100.00 ± 0.50)% , $P < 0.01$]和侵袭率[(7.04 ± 2.96)%、(4.68 ± 0.27)% vs (100.00 ± 6.74)% , $P < 0.01$]也明显低于 H460SM-NS 细胞。**结论:**抑制 *ITGA6* 的表达可以抑制 NSCLC 细胞锚定非依赖性生长、迁移和侵袭,但不影响 NSCLC 细胞增殖和凋亡。

[关键词] 非小细胞肺癌; $\alpha 6$ 整合素; 锚定非依赖生长; 侵袭; 迁移

[中图分类号] R734.2; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)04-0355-08

ITGA6 shRNA inhibits anchorage independent growth and invasion of human non-small cell lung cancer cell line H460SM

CHEN Yan, WANG Xi-cai[▲], WU Zhi-ping, JIN Cong-guo, ZHOU Yong-chun, HUANG Yun-chao (Tumor Institute of Yunnan Province, Tumor Hospital of Yunnan Province, Affiliated Third Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650118, Yunnan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of lentivirus-mediated integrin $\alpha 6$ (*ITGA6*) shRNA on growth and invasion of human non-small cell lung cancer (NSCLC) H460SM cells. **Methods:** The expression levels of *ITGA6* in 9 human NSCLC cell lines were evaluated by quantitative-PCR (Q-PCR) and Western blotting. Lentiviral *ITGA6* shRNA were transfected into H460SM cells and *ITGA6* expression was detected by Q-PCR and Western blotting; the cellular morphology change was observed under a microscope; cell proliferation was detected by MTS assay; anchorage-independent growth

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81060177);云南省应用基础研究基金资助项目(No. 2009CD181);中国人事部留学人员科技活动项目择优资助启动基金资助项目(No. 人社厅[2010]412号);云南省卫生科技基金资助项目(No. 2009NS079)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81060177), the Applied and Basic Research Foundation of Yunnan Province (No. 2009CD181), the Scientific Research Foundation for Returned Overseas Chinese Scholars of State Personnel Ministry (No. 412-2010), and the Science and Technology Medical Research Foundation of Yunnan Province (No. 2009NS079)

[作者简介] 陈艳(1973-),女,云南省昆明市人,硕士生,助理研究员,主要从事肿瘤生物治疗、肿瘤复发转移机制的研究。E-mail: chenyankm@yahoo.com.cn。王熙才(1962-),男,云南省昭通市人,医学博士,教授,硕士研究生导师,主要从事肿瘤生物免疫治疗的基础和临床研究。E-mail: wangxc2005323@126.com。[▲]为共同第一作者

[通信作者] 黄云超(HUANG Yun-chao, corresponding author), E-mail: huangych2001@yahoo.com.cn

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20120727.1120.006.html>

was determined by colony formation assay in soft agar; apoptosis and cell cycle were analyzed by flow cytometry; and cell invasion and migration were determined by invasion and migration assay. **Results:** *ITGA6* was expressed in 7 NSCLC cell lines. A significantly higher level of *ITGA6* expression was seen in H460SM cells compared with the parental H460 cells ($[8.75 \pm 0.09]$ vs $[5.78 \pm 0.26]$, $P < 0.01$). After H460SM cells were stably transfected with lentiviral *ITGA6* shRNA (H460SM-75, H460SM-76 cells), a significant down-regulation of *ITGA6* expression was observed in H460SM-75 and H460SM-76 cells compared with negative control H460SM-NS cells ($[1.00 \pm 0.01]$ vs $[0.11 \pm 0.04]$, $[0.22 \pm 0.04]$, $P < 0.01$). The cell viability of H460SM-75 and H460SM-76 cells had no difference with H460SM-NS cells ($P > 0.05$), as well as the apoptotic rate, cell proliferative index and proportion of G_0/G_1 phase cells as compared with the negative control ($P > 0.05$). The colony formation rate of H460SM-75 and H460SM-76 cells was significantly decreased as compared with H460SM-NS cells ($[20.81 \pm 1.38]\%$ vs $[18.87 \pm 1.47]\%$, $[18.85 \pm 1.11]\%$, $P < 0.05$), and the migration rate ($[100.00 \pm 0.50]\%$ vs $[43.92 \pm 0.41]\%$, $[24.10 \pm 0.33]\%$, $P < 0.01$) and invasion rate ($[100.00 \pm 6.74]\%$ vs $[7.04 \pm 2.96]\%$, $[4.68 \pm 0.27]\%$, $P < 0.01$) were also significantly decreased. **Conclusion:** Knock-down of *ITGA6* expression can inhibit anchorage-independent cell growth, migration and invasion of NSCLC cells, but have no effect on cell proliferation and apoptosis.

[**Key words**] non-small cell lung cancer; integrin $\alpha 6$; anchorage independent growth; invasion; migration

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(4): 355-362]

我国恶性肿瘤流行病学分析结果显示,肺癌的发病率及死亡率均居恶性肿瘤首位^[1]。云南省宣威地区是世界上非吸烟女性肺癌发病率和死亡率最高的地区之一,呈现农村高发、非吸烟女性高发、发病年轻化、性别比值低、死亡年龄高峰提前、死亡率快速增长等趋势^[2]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占肺癌的80%~85%,约80%的患者就诊时已丧失外科手术和根治的机会。导致肺癌治疗失败和患者死亡的主要原因是肿瘤的侵袭和转移^[3]。 $\alpha 6$ 整合素(integrin $\alpha 6$, ITGA6)属细胞表面黏附分子类,是层粘连蛋白(laminin, LN)(细胞外基质主要成分)的特异性受体,除了介导上皮细胞与细胞外基质、细胞与细胞黏附外,还可通过独特的信号转导途径,影响细胞的增殖、分化、迁移、血管生成、凋亡等细胞生物学行为,与肿瘤的发生、发展密切相关。研究^[4-8]表明,ITGA6在乳腺癌、大肠癌、肝癌、前列腺癌等肿瘤中表达异常,与肿瘤的侵袭转移、血管生成等密切相关。然而,肿瘤细胞是过表达还是低表达ITGA6,文献报道不一致。有研究^[9]认为,ITGA6高表达与肿瘤侵袭转移密切相关;但也有研究^[10]结果显示,ITGA6低表达与肿瘤侵袭转移密切相关。关于ITGA6在NSCLC生长和转移中的作用及其机制的研究较少。有学者^[11]发现,NSCLC细胞(A549细胞、H1650细胞)和小细胞肺癌细胞(DMS53细胞)中均有ITGA6表达,且三株细胞中ITGA6表达差异没有统计学意义。本课题第一阶段研究结果显示,多数NSCLC细胞株中,ITGA6在转录水平和蛋白水平上表达异常,ITGA6在H460SM

细胞(与NCI-H460细胞同源、具有高侵袭和转移潜力)中呈高表达。在此基础上,本研究再应用慢病毒介导的shRNA干扰技术,抑制H460SM细胞中ITGA6的表达,观察ITGA6在H460SM细胞生长和侵袭中的作用,为进一步研究ITGA6在NSCLC生长和转移中的作用机制奠定基础,也为NSCLC早期诊断和治疗新靶标的确定提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

NCI-H520、NCI-H157、NCI-H125、NCI-H1264、NCI-H661、NCI-H460、H460SM、MGH-24、A549、297T细胞株由加拿大安大略癌症研究所 Dr Ming-Sound Tsao 实验室提供。其中,H520、H157细胞为人肺鳞状上皮细胞癌细胞株,H125细胞为人肺腺癌癌细胞株,H1264、A549、MGH-24细胞为人肺腺癌癌细胞株,H661、H460细胞为人大细胞肺癌细胞株,H460SM细胞是将H460细胞原位连续接种于裸大鼠筛选出来的、具有相同遗传背景和高转移潜能的细胞株^[13]。人NSCLC细胞均培养于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液中,297T细胞培养于含10%胎牛血清的高糖DMEM培养液中,于37℃、5%CO₂培养箱培养传代。

TRIzol试剂购自Ambion公司,cDNA合成和定量PCR试剂盒购自Bio-Rad公司,ITGA6单抗购自Santa Cruz公司,GAPDH单抗购自Ambion公司,ECL Plus购自Amersham公司,磷酸钙细胞转染盒购自BD Clontech公司,RPMI 1640培养基和胎牛血

清为 Gibco 公司产品, Polybrene 和嘌呤霉素购自 Sigma 公司。针对 *ITGA6* 基因中两个不同位点的慢病毒 pLKO.1-puro shRNA 质粒购自 Open Biosystem 公司, Lentiviral pLKO.1-puro 慢病毒系统以及阴性对照慢病毒 shRNA 质粒由 Dr Ming-Sound Tsao 实验室提供。MTS 细胞增殖检测试剂盒购自 Promega 公司, 流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期 COULTER[®] DNA PREP[™] 试剂盒购自 Beckman 公司, 选择性琼脂(selected agar)购自 Invitrogen 公司, Matrigel 胶、IV型胶原和人纤维连接蛋白购自 BD 公司, Transwell 细胞培养小室购自 Costar 公司。

1.2 实时定量 PCR 和 Western blotting 检测人 NSCLC 细胞中 *ITGA6* 的表达

实时定量 PCR 检测 9 株人 NSCLC 细胞中 *ITGA6* mRNA 的表达水平。参考 TRIzol 试剂说明书抽提总 RNA, 核酸蛋白检测仪检测 RNA 纯度, RNA 电泳检测 RNA 完整性。将 1 μ g 总 RNA 逆转成 cDNA。引物序列见表 1, 由 Invitrogen 公司合成。按 SYBGreen 试剂盒说明书进行实时荧光定量 PCR 扩增, 以 *RPS13* 基因为内参。反应条件是 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 共 40 个循环。实验重复 3 次。将各样本 Ct 值代入公式: mRNA 相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 其中 $\Delta\Delta Ct = [\text{目的基因的平均 Ct 值(样本组)} - \text{内参的平均 Ct 值(样本组)}] - [\text{目的基因的平均 Ct 值(校正组)} - \text{内参的平均 Ct 值(校正组)}]$ 。

Western blotting 检测 9 株人 NSCLC 中 *ITGA6* 蛋白的表达。用蛋白裂解液裂解各组贴壁细胞, 离心收集蛋白上清液, Bio-Rad 测定蛋白样品浓度。每组样品取 30 μ g 总蛋白进行 15% SDS-PAGE 分离蛋白, 用湿转法将分离后的蛋白质转移到 PVDF 膜上, 室温下用 5% 脱脂奶粉封闭非特异抗原 1 h。分别加入一抗[(*ITGA6* (1:200)、GAPDH (1:2000)], 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗涤 3 次后, 加入二抗(HRP 标记抗鼠 IgG, 1:2000), 室温孵育 1 h。洗涤 3 次后, 使用 ECL Plus 试剂进行显色。

1.3 筛选稳定表达 *ITGA6* shRNA 的 H460SM 细胞

采用 Lentiviral pLKO.1-puro 慢病毒系统, 以磷酸钙细胞转染技术和 297T 细胞包装病毒颗粒。取 *ITGA6* 慢病毒 shRNA 质粒各 10 μ g 与慢病毒系统包装质粒各 5 μ g 共转染 297T 细胞 48 h 后, 收集含慢病毒颗粒的细胞上清, 1000 \times g 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 取上清, -80 $^{\circ}$ C 储存病毒。同时设立阴性对照组和空白对照组。测定病毒滴度。取对数生长期的 H460SM 细胞接种于 100 mm 培养皿中, 培养至细胞

70% ~ 80% 融合时, 以 MOI 值为 5 转染靶细胞, 分别加入 3 ml 慢病毒颗粒上清、5 μ l Polybrene(终质量浓度 5 μ g/ml)、2 ml 不含抗生素的培养基, 轻轻混匀, 37 $^{\circ}$ C 培养。转染 18 h 后换液, 48 h 后换成含 600 ng/ml 嘌呤霉素的培养基进行筛选, 以后每隔 3 d 换液, 15 d 后筛选出稳定表达 *ITGA6* shRNA 的非小细胞肺癌 H460SM 细胞。实时定量 RT-PCR 检测 *ITGA6* mRNA 表达水平, Western blotting 检测蛋白质表达水平, 评价基因沉默效率。

表 1 引物序列

Tab.1 Sequence of primers

Gene	Sequence
<i>hRPS13</i> -F	5'-GTTGCTGTTTCGAAAGCATCTTG-3'
<i>hRPS13</i> -R	5'-AATATCGAGCCAAACGGTGAA-3'
<i>hITGA6</i> -F	5'-CACGCGGATCGAGTTTGAT-3'
<i>hITGA6</i> -R	5'-TATCGGTGAGCACATGTCACG-3'

1.4 MTS 法检测慢病毒介导 *ITGA6* shRNA 对 H460SM 细胞增殖的影响

将处于对数生长期的各组细胞, 通过细胞计数, 使每孔细胞数确定为 2000 个, 分别接种于 96 孔培养板上, 每组细胞设 5 个重复孔, 放在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 浓度的细胞培养箱中孵育 4 h 和 2、5、7 d。按 MTS 细胞增殖检测试剂盒操作说明书进行 MTS 检测, 培养结束后, 每孔加入 20 μ l MTS/PMS 混合液, 反应 1 h 后, 用酶标仪(Bio-Rad 公司)测定 490 nm 处光密度值(*D*)。实验重复 3 次。

1.5 软琼脂实验测定慢病毒介导 *ITGA6* shRNA 对 H460SM 细胞锚定非依赖生长(anchorage independent growth)的影响

使用 6 孔培养板, 每孔底层加入 2 ml 含 1% 琼脂、10% FBS 的 RPMI 1640, 待凝固后, 顶层加上 2 ml 含 1×10^4 个待测细胞、0.4% 琼脂、10% FBS 的 RPMI 1640, 每组细胞设 6 个平行孔, 待凝固后加入 2 ml 含 10% FBS 的 RPMI 1640, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 培养 14 d 后, 将含有 50 个以上细胞的集落判定为一个克隆, 计算细胞克隆形成率。实验重复 3 次。

1.6 流式细胞术检测慢病毒介导 *ITGA6* shRNA 对 H460SM 细胞凋亡和细胞周期的影响

收集对数生长期细胞, 制备单细胞悬液, 调整细

胞密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, PBS 洗涤 2 次, 室温 $800 \times g$ 离心 5 min, 加入 70% 酒精 1 ml 固定细胞, 保存于 4°C 。24 ~ 72 h 内用 PBS 洗涤 1 次, 室温 $800 \times g$ 离心 5 min。采用碘化丙锭一步插入性 DNA 定量荧光染色法, 染色液中含 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 碘化丙锭、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ RNase。每份样品中加入染色液 1.0 ml, 避光处染色 30 min, 以 500 目筛网过滤, 上机检测。按公式计算细胞增殖指数 (PI), $\text{PI}(\%) = (\text{S} + \text{G}_2/\text{M}) / (\text{G}_0 \sim \text{G}_1 + \text{S} + \text{G}_2/\text{M}) \times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.7 体外侵袭实验检测慢病毒介导 *ITGA6* shRNA 对 H460SM 细胞侵袭和迁移的影响

采用 Transwell 培养板, 其小室上室底部分别包被 $60 \mu\text{l}$ matrigel ($14 \mu\text{g}/\text{孔}$) 和 VI 型胶原 ($7.5 \mu\text{g}/\text{孔}$), 下室加入含 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ fibronectin 的 10% 胎牛血清的培养基 $800 \mu\text{l}$, 风干过夜。取对数生长期细胞, 调整各组细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{ml}$, 取 $100 \mu\text{l}$ 加入已包被有 matrigel 或 VI 型胶原的 Transwell 小室上室内。每组细胞设 3 个平行孔。置 37°C 、5% CO_2 孵箱培养 24 h 后, 取出 Transwell, 弃上室液体, 将 Transwell 小室用 2.5 ml 0.1% 戊二醛固定 20 min, PBS 洗 2 遍, 2.5 ml 0.2% 结晶紫染液染色 1 h, 水洗, 棉签擦去膜上未穿过的细胞。将膜切取下来, 细胞面朝下, 置于载玻片上, 中性树胶封片, 拍照, 显微镜下计数穿膜细胞数。侵袭率 ($\%$) = (实验组侵袭细胞数/阴性对照组细胞数) $\times 100\%$; 迁移率 ($\%$) = (实验组迁移细胞数/阴性对照组细胞数) $\times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS17.0 软件包, 组间资料应用单因素方差分析 (One Way ANOVA) 和 *t* 检验。对非正态分布或方差不齐的数据, 则改用秩和检验进行统计分析。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *ITGA6* 在 9 株人 NSCLC 细胞中的表达

将阳性标准品 cDNA 从 10 ng 开始倍比稀释, 以实时定量 RT-PCR 检测 *ITGA6* mRNA 表达有效率。结果显示, *ITGA6* 和内参基因 *RPS13* 扩增曲线相关系数 (R^2) 大于 0.99, 符合使用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法分析 mRNA 相对表达量的前提条件, 见图 1。

实时定量 PCR 检测 9 株人 NSCLC 细胞中 *ITGA6* mRNA 的表达水平, 结果显示: *ITGA6* 在肺鳞癌细胞 (H520、H157)、肺腺癌细胞 (MGH-24、H1264、

A549)、大细胞肺癌细胞 (H460SM、H460) 中均有表达。致瘤性较高的 H460SM、H460 细胞中 *ITGA6* mRNA 的表达水平明显高于致瘤性较低的 H661 细胞 (分别 $P < 0.01$)。具高转移潜力的 H460SM 细胞中 *ITGA6* mRNA 的表达水平明显高于亲本 H460 细胞 [(8.75 ± 0.09) vs (5.78 ± 0.26) , $P < 0.01$]。Western blotting 检测结果与实时定量 PCR 检测基本一致, 见图 2。结果提示, *ITGA6* 表达上调可能与人 NSCLC 细胞致瘤、侵袭转移的表型有关。因此, 后续研究中选用 H460SM 细胞作为靶细胞, 研究慢病毒介导 shRNA 抑制细胞中 *ITGA6* 表达对 H460SM 细胞生长和侵袭的影响。

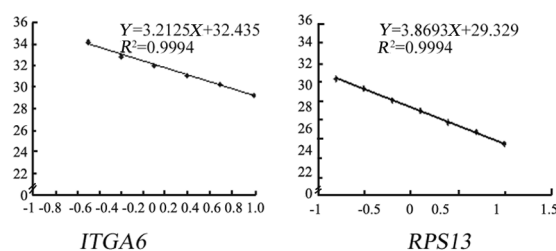


图 1 实时定量 PCR 检测 *ITGA6* mRNA 表达的有效性
Fig. 1 Amplification efficiency for *ITGA6* mRNA expression detected by Q-PCR

2.2 筛选稳定表达 *ITGA6* shRNA 的 H460SM 细胞

为了避免只选择一个序列可能出现无效或低效的情况, 本研究选择了 *ITGA6* 基因编码序列中两个可能的干扰位点。倒置显微镜下观察慢病毒介导 *ITGA6* shRNA 对 H460SM 细胞形态的影响, 实验组细胞 (H460SM-75 和 H460SM-76) 与对照组 H460SM-NS 细胞在形态学上没有明显差异, 见图 3。

实时定量 PCR 检测结果显示: 与阴性对照组 (H460SM-NS) 比较, 稳定表达 *ITGA6* shRNA 的实验组 H460SM 细胞 (H460SM-75 和 H460SM-76) 中 *ITGA6* mRNA 表达水平明显下调 [(1.00 ± 0.01) vs (0.11 ± 0.04) , (0.22 ± 0.04) , $P < 0.01$]。Western blotting 检测结果与实时定量 PCR 检测基本一致 (图 4)。以上结果说明, 慢病毒介导 *ITGA6* shRNA 能明显抑制 H460SM 细胞中 *ITGA6* 的表达, 成功获得了稳定表达 *ITGA6* shRNA 的 H460SM 细胞。

2.3 慢病毒介导 *ITGA6* shRNA 对 H460SM 细胞增殖的影响

MTS 测定结果 (图 5) 显示, H460SM 细胞接种后第 7 天, 实验组 (H460SM-75、H460SM-76) 细胞增

殖活性与阴性对照组(H460SM-NS)比较差异无统计学意义 [(1.53 ± 0.08) vs (1.57 ± 0.26)、(1.61 ± 0.16), $P > 0.05$]。由此可见,慢病毒介导 *ITGA6* shRNA 并不能抑制 H460SM 细胞的增殖。

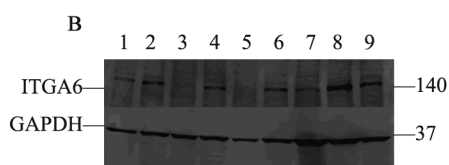
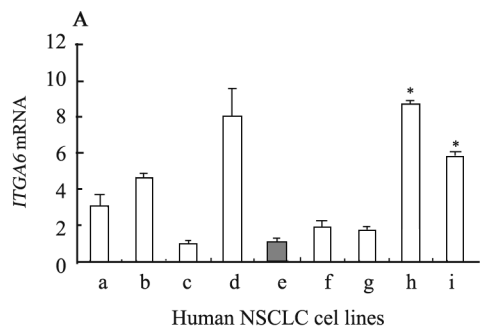


图2 实时定量 PCR(A)和 Western blotting(B)检测 9 株人 NSCLC 细胞株中 *ITGA6* mRNA 和蛋白的表达

Fig. 2 Expression levels of *ITGA6* mRNA and protein in 9 human NSCLC cell lines detected by Q-PCR (A) and Western blotting (B), respectively ($n = 3$)

A, a: H520; b: H157; c: H125; d: MGH24; e: H661; f: H12640; g: A549; h: H460 SM; i: H460
B, 1: H520; 2: H157; 3: H125; 4: MGH24; 5: H661; 6: H12640; 7: A549; 8: H460 SM; 9: H460

* $P < 0.01$ vs H661 cells

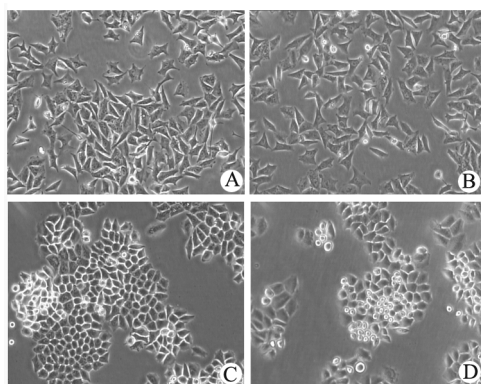


图3 慢病毒介导 *ITGA6* shRNA 对 H460SM 细胞形态的影响(×100)

Fig. 3 Effect of lentiviral *ITGA6* shRNA on cellular morphology of H460SM cells (×100)

A: H460SM (blank control group);
B: H460SM-NS (negative control group);
C: H460SM-75; D: H460SM-76

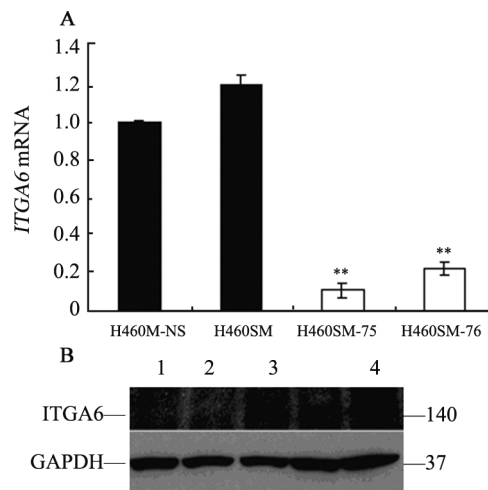


图4 实时定量 PCR(A)和 Western blotting(B)检测稳定表达 *ITGA6* shRNA 的 H460SM 细胞中 *ITGA6* mRNA 和蛋白的表达

Fig. 4 Expressions of *ITGA6* mRNA and protein in lentiviral *ITGA6* shRNA stably transduced H460SM cells detected by Q-PCR(A) and Western blotting (B), respectively

1: H460SM-75; 2: H460SM-76;
3: H460SM; 4: H460SM-NS

** $P < 0.01$ vs H460SM-NS cells

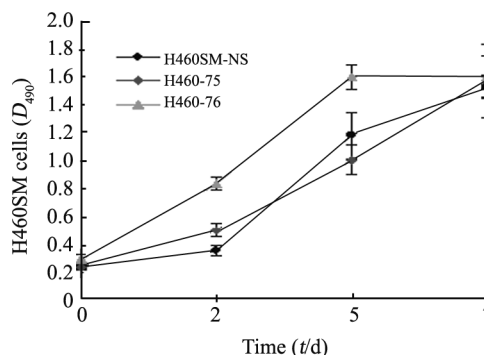


图5 慢病毒介导 *ITGA6* shRNA 对 H460SM 细胞增殖的影响

Fig. 5 Effect of lentiviral *ITGA6* shRNA on proliferation of H460SM cells

2.4 慢病毒介导 *ITGA6* shRNA 对 H460SM 细胞锚定非依赖性生长的影响

细胞接种后第 1 天,细胞悬浮其中,还未发生分裂增殖,为单个细胞,密度适中,分散良好。第 14 天,软琼脂中单细胞已长成包含很多细胞的集落,实验组 H460SM-75 和 H460SM-76 细胞与对照组 H460SM-NS 细胞集落间形态存在差异。H460SM-75 和 H460SM-

76 细胞多为圆形或椭圆形, 边界较光滑, 而阴性对照组 H460SM-NS 细胞多数细胞克隆轮廓较粗糙, 边缘处可见到游离的单细胞, 有的细胞克隆边缘有大片细胞伸出, 轮廓极为不规则。因此, 抑制 *ITGA6* 表达可抑制 H460SM 细胞琼脂集落的形成, 与阴性对照组比较差异有统计学意义 [(20.81 ± 1.38)% vs (18.87 ± 1.47)% (18.85 ± 1.11)% , $P < 0.05$, 图 6]。由此可见, 慢病毒介导 *ITGA6* shRNA 可抑制 H460SM 细胞锚定非依赖性生长。

2.5 慢病毒介导 *ITGA6* shRNA 对 H460SM 细胞凋亡和细胞周期的影响

实验组 H460SM-75 和 H460SM-76 细胞凋亡率与阴性对照组 H460SM-NS 细胞比较, 差异无统计学意义 [(1.00 ± 0.11)% vs (1.10 ± 0.13)% (0.77 ± 0.12)% , $P > 0.05$]。由此可见, 慢病毒介导 *ITGA6* shRNA 并不能诱导 H460SM 细胞的凋亡。

实验组 H460SM-75 和 H460SM-76 细胞增殖指数、 G_0/G_1 期细胞的比例 (表 2) 与阴性对照组 H460SM-NS 细胞之间差异无统计学意义 [(46.53 ± 6.54)% vs (45.65 ± 11.86)% (44.31 ± 7.02)% ,

$P > 0.05$; (52.03 ± 9.69)% vs (54.33 ± 9.37)% (54.70 ± 12.20)% , $P > 0.05$]。由此可见, 慢病毒介导 *ITGA6* shRNA 并不能诱导 H460SM 细胞发生 G_1 期阻滞, 也不能影响 H460SM 细胞增殖。此结果与 MTS 法检测细胞活力结果基本一致。

2.6 慢病毒介导 *ITGA6* shRNA 对 H460SM 细胞侵袭和迁移的影响

体外侵袭实验结果 (图 7) 显示, 抑制 *ITGA6* 表达可显著降低 H460SM 细胞侵袭的能力。实验组 H460SM-75 和 H460SM-76 细胞具有侵袭能力, 能穿过人工基底膜细胞, 其侵袭率与阴性对照组 H460SM-NS 细胞比较, 差异有统计学意义 [(100.00 ± 6.74)% vs (7.04 ± 2.96)% (4.68 ± 0.27)% , $P < 0.01$]。

抑制 *ITGA6* 表达还可以显著降低 H460SM 细胞的迁移能力。实验组 H460SM-75 和 H460SM-76 细胞具有运动能力, 能穿过纤粘连蛋白的细胞迁移率与阴性对照组 H460SM-NS 细胞比较, 差异有统计学意义 [(100.00 ± 0.50)% vs (43.92 ± 0.41)% (24.10 ± 0.33)% , $P < 0.01$] (图 8)。

表 2 慢病毒介导 *ITGA6* shRNA 对 H460SM 细胞周期分布的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

Tab. 2 Effect of lentiviral *ITGA6* shRNA on cell cycle of H460SM cells ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

Group	G_0/G_1	G_2/M	S	PI
H460SM-NS	52.03 ± 9.69	16.50 ± 5.48	31.50 ± 14.81	46.53 ± 6.54
H460SM-75	54.33 ± 9.37	20.63 ± 10.37	25.00 ± 16.11	45.65 ± 11.86
H460SM-76	54.70 ± 12.20	12.26 ± 6.34	31.27 ± 14.18	44.31 ± 7.02

3 讨论

患者确诊为 NSCLC 时, 85% 以上属中晚期肺癌而失去根治性手术治疗的机会, 即使是早期肺癌, 其 5 年生存率也只有 60% ~ 70% , 仍有 1/4 ~ 1/3 的患者最终死于肿瘤复发和转移^[3]。肿瘤的侵袭和转移是一个多阶段复杂的过程, 整合素信号通路在这一过程中发挥着重要作用^[12-13]。编码人 *ITGA6* 的基因位于第 2 号染色体上, cDNA 全长 3 150 个碱基。作为一种穿膜糖蛋白, 其膜外区为 991 个氨基酸残基, 23 个氨基酸残基构成疏水性单穿膜区, 羧基端 36 个氨基酸残基形成短的胞内区。 *ITGA6* 主要与 *ITGB1*、*ITGB4* 结合, 组成层粘连蛋白的特异性受体, 介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 间的识别与结合, 并进一步激活细胞内信号系统和 (或) 引起细胞骨架成分的重

新组装, 从而影响细胞的基因表达和各种生物学行为^[14]。 *ITGA6* 的表达模式在肿瘤的发生^[4, 15]、发展和转移^[8-9]中起着重要的作用。肿瘤常伴有 *ITGA6* 表达异常, 包括表达水平的升高、降低或极性分布的变化。近年来对乳腺癌、大肠癌、肝癌、胃癌等肿瘤研究表明, *ITGA6* 主要通过激活 FAK、MAPK^[16]、Rac^[17] 等通路, 或与 Met^[18]、ErbB2^[19]、SOX2^[20]、EGFR^[21]、CD151^[22] 等协同作用调节相关基因的表达, 参与调控细胞外基质的降解以及肿瘤细胞^[23]的增殖、迁移和凋亡等恶性生物学行为。然而, 对 *ITGA6* 在肺癌生长和转移中的作用及其机制的研究, 目前鲜有文献报道。

张帆等^[11]应用基因芯片技术, 发现 NSCLC 细胞和小细胞肺癌细胞中均有 *ITGA6* 表达, 但二者间 *ITGA6* 表达差异没有统计学意义, 提示 *ITGA6* 表达模式并不能用于鉴别 NSCLC 和小细胞肺癌。

H460SM 来源于人大细胞肺癌细胞株 NCI-H460, 具有相同的遗传背景, 但 H460SM 转移潜能比 H460 更高^[24]。H460SM 作为 H460 的同源细胞株, 它们之间的可比性较高, 是研究 NSCLC 侵袭、转移较理想的模型。本课题研究结果显示, 多数 NSCLC 细胞株均有 *ITGA6* 表达, 与张帆等^[11] 研究结果一致。本课题研究结果还显示, 致瘤性较高的 H460SM 细胞和 H460 细胞中 *ITGA6* 的表达水平明显高于致瘤性较低的 H661 细胞, 并且在高转移潜力的 H460SM 细胞中呈高表达, 提示 *ITGA6* 表达上调可能与 NSCLC 细胞致瘤、侵袭转移有关。

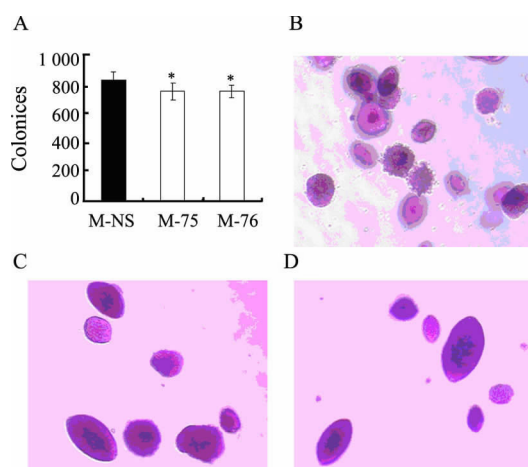


图6 慢病毒介导 *ITGA6* shRNA 对 H460SM 细胞锚定非依赖性生长的影响

Fig. 6 Effect of lentiviral *ITGA6* shRNA on anchorage-independent growth of H460SM cells

A: Number of colonies; B: H460SM-NS ($\times 40$);
C: H460SM-75 ($\times 40$); D: H460SM-76 ($\times 40$)

* $P < 0.05$ vs H460SM-NS

慢病毒介导 shRNA 技术已被广泛应用于肿瘤基因治疗的研究^[25]。通过慢病毒介导 shRNA 技术可抑制 H460SM 细胞中 *ITGA6* 表达, 从而抑制肿瘤进展, 为 NSCLC 早期诊断和治疗新的分子靶点研发提供实验依据。为了避免只选择一个序列可能出现无效或低效的情况, 本研究选择了 *ITGA6* 基因编码序列中两个可能的干扰位点, 同时通过设置阴性对照, 对可能出现的假阳性结果进行了排除。实时定量 PCR 和 Western blotting 结果显示, 相对于阴性对照组, 实验组 H460SM-75 和 H460SM-76 细胞中 *ITGA6* mRNA 的表达明显下调, 说明这两个可能的干扰位点沉默效率均有效, 成功获得了稳定表达 *ITGA6* shRNA 的非小细胞肺癌 H460SM 细胞。本研

究结果显示, 抑制 *ITGA6* 表达, 能抑制 H460SM 细胞锚定非依赖性生长, 降低了 H460SM 细胞的致瘤性, 但具体分子机制有待于进一步研究。

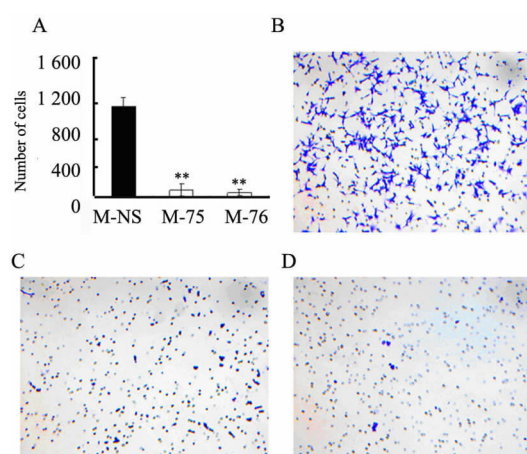


图7 慢病毒介导 *ITGA6* shRNA 对 H460SM 细胞侵袭的影响

Fig. 7 Effect of lentiviral *ITGA6* shRNA on invasion of H460SM cells

A: Invasion of H460SM cells in different groups;
B: H460SM-NS ($\times 40$); C: H460SM-75 ($\times 40$);
D: H460SM-76 ($\times 40$)

** $P < 0.01$ vs H460SM-NS

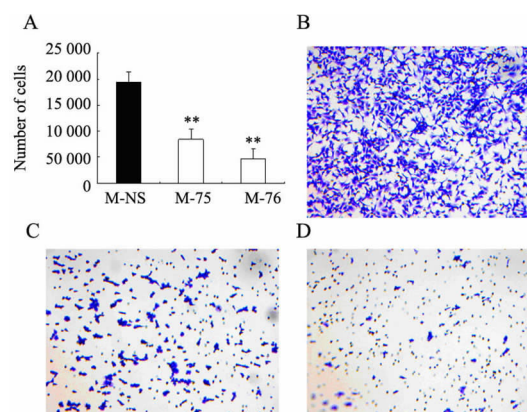


图8 慢病毒介导 *ITGA6* shRNA 对 H460SM 细胞迁移的影响

Fig. 8 Effect of lentiviral *ITGA6* shRNA on migration of H460SM cells

A: Migration capacity of H460SM cells in different groups; B: H460SM-NS ($\times 40$);
C: H460SM-75 ($\times 40$); D: H460SM-76 ($\times 40$);

** $P < 0.01$ vs H460SM-NS

周期检测点是细胞完成其细胞周期或走向凋亡的“分子开关”, 周期检测点的异常与肿瘤的发生、发展有着密切联系^[26]。本研究结果显示, 慢病毒介导 *ITGA6* shRNA 并不能抑制 H460SM 细胞增殖, 也

不能诱导 H460SM 细胞凋亡和发生 G₁ 期阻滞, 提示 *ITGA6* 可能并不参与调控 H460SM 细胞增殖和凋亡。本研究结果与 Yamakawa 等^[8] 在白血病细胞中、Wang 等^[9] 在乳腺癌细胞中的研究报道不一致, 提示 *ITGA6* 在不同类型恶性肿瘤中的作用及机制可能不同, 这有待于进一步研究证实。

基底膜是阻止肿瘤细胞侵袭转移的机械屏障, 其主要功能性成分层粘连蛋白在调节肿瘤细胞的迁移、侵袭和增殖过程中起重要促进作用。Matrigel 是一种人工基膜, 主要成分为层粘连蛋白、IV 型胶原、硫酸乙酰肝素等, 肿瘤细胞穿过铺板的 matrigel 的能力, 可代表细胞侵袭的能力。本研究结果显示, 抑制 *ITGA6* 表达, 可以降低 H460SM 细胞的穿膜能力和侵袭能力, 提示 *ITGA6* 与 H460SM 细胞侵袭转移表型密切相关, 但其分子机制有待于进一步研究。

综上所述, 本研究成功构建了稳定表达 *ITGA6* shRNA 的 H460SM 细胞。体外实验证实, 抑制 *ITGA6* 表达不影响 NSCLC 细胞的增殖和凋亡, 但可抑制 NSCLC 细胞锚定非依赖性生长、迁移和侵袭。本研究为研究 *ITGA6* 在 NSCLC 生长和转移中的作用机制和下一步动物实验奠定了基础, 为以 $\alpha 6$ 整合素信号通路为靶点的 NSCLC 诊治提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] 邹小农. 中国肺癌流行病学 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2007, 14 (12): 881-883.
- [2] 黄云超, 赵光强, 肖义泽, 等. 云南肺癌高发地区肺癌死亡趋势分析 [J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38 (1): 98-103.
- [3] Zhu CQ, Pintilie M, John T, et al. Understanding prognostic gene expression signatures in lung cancer [J]. Clin Lung Cancer, 2009, 10 (5): 331-340.
- [4] Cariati M, Naderi A, Brown JP, et al. Alpha-6 integrin is necessary for the tumorigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line [J]. Int J Cancer, 2008, 122 (2): 298-304.
- [5] Ports MO, Nagle RB, Pond GD, et al. Extracellular engagement of alpha6 integrin inhibited urokinase-type plasminogen activator-mediated cleavage and delayed human prostate bone metastasis [J]. Cancer Res, 2009, 69 (12): 5007-5014.
- [6] Kalogeropoulou M, Voulgari A, Kostourou V, et al. TAF4b and Jun/activating protein-1 collaborate to regulate the expression of integrin alpha 6 and cancer cell migration properties [J]. Mol Cancer Res, 2010, 8 (4): 554-568.
- [7] Germain M, De Arcangelis A, Robinson SD, et al. Genetic ablation of the alpha 6-integrin subunit in Tie1Cre mice enhances tumour angiogenesis [J]. J Pathol, 2010, 220 (3): 370-381.
- [8] Yamakawa N, Kaneda K, Saito Y, et al. The increased expression of integrin alpha 6 (*ITGA6*) enhances drug resistance in EVII (high) leukemia [J]. PLoS One, 2012, 7 (1): e30706.
- [9] Wang Y, Shenouda S, Baranwal S, et al. Integrin subunits alpha 5 and alpha6 regulate cell cycle by modulating the chk1 and Rb/E2F pathways to affect breast cancer metastasis [J]. Mol Cancer, 2011, 10: 84.
- [10] Natali PG, Nicotra MR, Botti C, et al. Changes in expression of alpha 6/beta 4 integrin heterodimer in primary and metastatic breast cancer [J]. Br J Cancer, 1992, 66 (2): 318-322.
- [11] 张帆, 郭琳琅, 米向斌. 整合素在肺癌细胞中的差异表达 [J]. 肿瘤防治研究, 2009, 36 (9): 734-736.
- [12] Schneider JG, Amend SR, Weillbaecher KN. Integrins and bone metastasis: Integrating tumor cell and stromal cell interactions [J]. Bone, 2011, 48 (1): 54-65.
- [13] Kim SH, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: The dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor [J]. J Endocrinol, 2011, 209 (2): 139-151.
- [14] Lowell CA, Mayadas TN. Overview: Studying integrins *in vivo* [J]. Methods Mol Biol, 2012, 757: 369-397.
- [15] Wang L, Gu Y, Shu Y, et al. Integrin alpha 6 high cell population functions as an initiator in tumorigenesis and relapse of human liposarcoma [J]. Mol Cancer Ther, 2011, 10 (12): 2276-2286.
- [16] Carloni V, Mazzocca A, Pantaleo P, et al. The integrin, alpha 6 beta 1, is necessary for the matrix-dependent activation of FAK and MAP kinase and the migration of human hepatocarcinoma cells [J]. Hepatology, 2001, 34 (1): 42-49.
- [17] Cruz-Monserrate Z, O'Connor KL. Integrin alpha 6 beta 4 promotes migration, invasion through Tiam1 upregulation, and subsequent Rac activation [J]. Neoplasia, 2008, 10 (5): 408-417.
- [18] Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. A signaling adapter function for alpha 6 beta 4 integrin in the control of HGF-dependent invasive growth [J]. Cell, 2001, 107 (5): 643-654.
- [19] Yoon SO, Shin S, Lipscomb EA. A novel mechanism for integrin-mediated ras activation in breast carcinoma cells: The alpha 6 beta 4 integrin regulates ErbB2 translation and transactivates epidermal growth factor receptor/ErbB2 signaling [J]. Cancer Res, 2006, 66 (5): 2732-2739.
- [20] Yu KR, Yang SR, Jung JW, et al. CD49f enhances multipotency and maintains stemness through the direct regulation of OCT4 and SOX2 [J]. Stem Cells, 2012, 30 (5): 876-887.
- [21] Soung YH, Chung J. Curcumin inhibition of the functional interaction between integrin alpha 6 beta 4 and the epidermal growth factor receptor [J]. Mol Cancer Ther, 2011, 10 (5): 883-891.
- [22] Ke AW, Shi GM, Zhou J, et al. CD151 amplifies signaling by integrin alpha 6 beta 1 to PI3K and induces the epithelial-mesenchymal transition in HCC cells [J]. Gastroenterology, 2011, 140 (5): 1629-1641.
- [23] Lathia JD, Gallagher J, Heddleston JM, et al. Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells [J]. Cell Stem Cell, 2010, 6 (5): 421-432.
- [24] Liu J, Blackhall F, Seiden-Long I, et al. Modeling of lung cancer by an orthotopically growing H460SM variant cell line reveals novel candidate genes for systemic metastasis [J]. Oncogene, 2004, 23 (37): 6316-6324.
- [25] 陈榆生, 李鸿茹, 林明, 等. 慢病毒介导 shRNA 特异性沉默 livin 基因促进 SPC2A1 细胞凋亡 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2009, 16 (5): 469-473.
- [26] Lopergolo A, Tavecchio M, Lisanti S, et al. Chk2 phosphorylation of survivin-(Delta) Ex3 contributes to a DNA damage-sensing checkpoint in cancer [J]. Cancer Res, 2012, 72 (13): 3251-3259.

[收稿日期] 2012-05-12 [修回日期] 2012-06-26

[本文编辑] 王莹