

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.08.005

· 基础研究 ·

## DNAJ热激蛋白家族B8基因对肺腺癌侵袭转移的作用及其可能的机制

于瑞莲, 罗树春, 陈琳, 李宏敏, 安宁, 曾铭(四川省医学科学院暨四川省人民医院 肿瘤中心, 四川 成都 610072)

**[摘要]** **目的:**探讨DNAJ热激蛋白家族B8基因(DNAJ heat shock protein family member B8, *DNAJB8*)在肺腺癌组织中的表达及其对肺腺癌细胞侵袭转移的作用和可能机制。**方法:**收集四川省人民医院2006年至2008年的肺腺癌手术切除标本102例,通过免疫组织化学(IHC)实验检测DNAJB8在肺腺癌组织中的表达情况,并分析其与临床病理参数及预后的关系。构建DNAJB8稳定敲低的肺腺癌A549细胞和DNAJB8稳定过表达的肺腺癌H1299细胞,CCK-8实验检测DNAJB8敲降或过表达对肺腺癌细胞增殖的影响,Transwell法检测其对肺腺癌细胞侵袭能力的影响,Western blotting检测其对肺腺癌细胞内侵袭相关蛋白MMP-2、MMP-9和ERK表达及活性的影响。裸鼠尾静脉注射DNAJB8稳定敲低的A549细胞构建肺腺癌转移模型,观察DNAJB8对A549细胞体内转移能力的影响。**结果:**DNAJB8在肺腺癌组织中的表达明显高于正常肺组织,其高表达与患者的淋巴结转移及TNM分期呈正相关,并且预示着患者有较差的预后(均 $P<0.01$ )。DNAJB8在A549细胞中的表达量高于H1299细胞,下调DNAJB8表达能够抑制A549细胞的侵袭[(41±3) vs (192±11)个, $P<0.01$ ],而上调DNAJB8的表达能够促进H1299细胞的侵袭[(235±14) vs (25±4)个, $P<0.01$ ]。实验组肺腺癌转移模型裸鼠肺脏肿瘤结节数显著低于对照组[(5±1) vs (17±3)个, $P<0.01$ ]。A549细胞中DNAJB8敲降后,MMP-2、MMP-9表达量和p-ERK水平均显著下降(均 $P<0.01$ );而H1299细胞高表达DNAJB8后,MMP-2、MMP-9表达量和p-ERK水平均显著升高(均 $P<0.01$ )。**结论:**DNAJB8能够促进肺腺癌的侵袭和转移,其机制可能与MEK/Erk信号通路有关。

**[关键词]** DNAJ热激蛋白家族B8;肺腺癌;侵袭;转移

**[中图分类号]** R734.2; R730.59 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)08-0845-06

## The effect of DNAJ heat shock protein family member B8 gene on lung adenocarcinoma invasion and metastasis and its possible mechanism

YU Ruilian, LUO Shuchun, CHEN Lin, LI Hongmin, AN Ning, ZENG Ming (Cancer Center, Academy of Medical Sciences & People's Hospital of Sichuan Province, Chengdu 610072, Sichuan, China)

**[Abstract] Objective:** To explore the expression of DNAJB8 (DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B8) in lung adenocarcinoma tissues and its effect on the invasion and migration of lung adenocarcinoma cells. **Methods:** 102 surgical specimens resected from lung adenocarcinoma surgeries from 2006 to 2008 were collected at Sichuan Provincial People's Hospital, the expression of DNAJB8 in lung adenocarcinoma tissues was determined by immunohistochemistry (IHC), and its relationships with clinical pathological parameters and prognosis were analyzed. A549 cells with stable DNAJB8 knock down and H1299 cells with stable DNAJB8 overexpression were established; the effect of knockdown or overexpression of DNAJB8 on the proliferation of lung adenocarcinoma cells was evaluated by CCK-8 assay, the effect on the invasion ability of lung adenocarcinoma cells was determined using Transwell assay, and the expression of invasion related proteins including MMP-2, MMP-9 and ERK were determined by Western blotting; A xenograft model of lung adenocarcinoma was constructed on nude mice by injecting A549 cells with DNAJB8 knockdown via the tail vein to observe the effect of DNAJB8 on the migration of A549 cells *in vivo*. **Results:** The level of DNAJB8 expression in lung adenocarcinoma tissues was significantly higher than that in normal lung tissues, the high expression was positively correlated with lymph node metastasis and TNM

**[基金项目]** 四川省科技发展基金资助(No.2014JY0136)。Project supported by Science and Technology Department Foundation of Sichuan Province (No.2014SZ0055)

**[作者简介]** 于瑞莲(1981-),女,硕士,主治医师,主要从事肿瘤综合治疗,E-mail:19986720@qq.com

**[通信作者]** 曾铭(ZENG Ming, corresponding author),男,博士,主任医师,主要研究方向为恶性肿瘤的治疗及其分子机制,E-mail:miller2002@yahoo.com

**[优先发表]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170731.1054.020.html>

staging, and predicted poor prognosis ( $P < 0.01$ ). The expression of DNAJB8 in A549 cells was higher than that in H1299 cells, and down-regulation of DNAJB8 expression inhibited the invasion of A549 cells ( $[41 \pm 3]$  vs  $[192 \pm 11]$ ,  $P < 0.01$ ), while up-regulation of DNAJB8 promoted the invasion of H1299 cells ( $[235 \pm 14]$  vs  $[25 \pm 4]$ ,  $P < 0.01$ ). The number of lung tumors in the mice of experimental group was significantly lower than that in the control group ( $[5 \pm 1]$  vs  $[17 \pm 3]$ ,  $P < 0.01$ ). After DNAJB8 knockdown in A549 cells, the expressions of MMP-2, MMP-9 and p-ERK were decreased significantly ( $P < 0.01$ ); however, after the overexpression of DNAJB8 in H1299 cells, the expression of MMP-2, MMP-9 and p-ERK were significantly increased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** DNAJB8 could promote the invasion and metastasis of lung adenocarcinoma cells, which is likely related with the MEK/Erk signaling pathway.

**[Key words]** DNAJ heat shock protein family member B8 (DNAJB8); lung adenocarcinoma; invasion; metastasis  
[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(8): 845-850. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.08.005]

近年来随着环境污染问题的严峻化,肺癌发病率和病死率呈现出逐年递增的趋势,已成为目前世界上最为常见的恶性肿瘤之一。非小细胞肺癌占肺癌总数的80%左右,而其中肺腺癌患者预后差,5年生存率低<sup>[1]</sup>。高转移性是肺腺癌高病死率的一个重要的原因,一般在患者就诊时,多数已经发生不同程度的癌细胞转移<sup>[2]</sup>,部分患者即使能够早期诊断并及时进行外科手术切除,但仍有极大比例在数月后复发,并且伴随发生癌细胞淋巴结转移、脑转移和骨的转移等<sup>[3]</sup>。为了对抗肺腺癌侵袭转移,有必要研究肺腺癌高侵袭转移的分子机制。

DNAJ热激蛋白家族B8(DNAJ heat shock protein family member B8, DNAJB8)属于热激蛋白40家族同系亚家族主要成员之一,热激蛋白40家族蛋白是跨物种存在的高度保守的蛋白质家族,其在人类许多肿瘤包括肺癌中呈异常表达,报道<sup>[4-7]</sup>称DNAJB8与肿瘤的增殖以及干细胞特性有着密切的关系。本课题通过免疫组织化学的手段检测发现DNAJB8在肺腺癌患者中异常高表达,且与肺腺癌的淋巴转移和Stage分期呈正相关。另外,高表达的DNAJB8预示着患者较差的预后,所以进一步在肺腺癌细胞株中敲降或过表达DNAJB8基因,以Transwell方法、裸鼠肺转移模型及Western blotting等手段探讨DNAJB8与肺腺癌侵袭转移的关系及其内在分子机制。

## 1 资料与方法

### 1.1 标本、主要材料与试剂

收集四川省人民医院2006年至2008年的肺癌手术标本102例,经鉴定所有标本均为肺腺癌,根据世界卫生组织(WHO)2004年的肺癌组织学分型标准进行分型,根据国际抗癌联盟2009年发布的第7版肺癌TNM分期系统进行分期。有关这些病例的各项临床病理指标,包括性别、年龄、分化程度、淋巴结转移、远处转移、临床分期及大体分型等情况详见表1,其中的临床病理指标判断均由临床专家和病理专家

作出。癌旁组织均为相应患者距癌肿病灶 $\geq 2$  cm的组织。所有患者术前均未接受过物理治疗或化学药物治疗。获取所有标本前均取得患者或其家属知情同意并签署知情同意书,研究程序获医院委员会审查批准。

BALB/c(nu/nu)裸鼠购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司,SPF级环境中饲养,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2013-0016。肺腺癌A549、H1299细胞株购自中科院上海细胞所。细胞用含10%胎牛血清的1640培养基,37℃、5% CO<sub>2</sub>的恒温培养箱中培养,细胞呈单层贴壁生长,后续所有实验均取状态良好的同批次对数生长期细胞进行。免疫组织化学(IHC)试剂购自上海易色医疗科技有限公司,24孔、孔径8.0 μm的Transwell板购自北京乐博生物科技有限公司,一抗兔抗MMP-2多克隆抗体、兔抗MMP-9多克隆抗体、兔抗ERK多克隆抗体、兔抗p-ERK多克隆抗体、鼠抗β-actin单克隆抗体购自CST公司,二抗辣根过氧化物酶标记的羊抗兔、羊抗鼠抗体购自北京中杉金桥。倒置显微镜购自德国Leica公司。

### 1.2 免疫组织化学法检测DNAJB8在肺腺癌组织中的表达

按免疫组织化学染色及显色试剂盒说明书操作,切片脱蜡至水,过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,微波抗原修复,加入一抗(1:200)4℃过夜,DAB显色,苏木精复染,PBS代替一抗作为阴性对照。

染色评判标准以肿瘤细胞膜和胞质着色为基准,在低倍率对染色的强度和染色细胞百分比进行评估,计数20个高倍视野的免疫组化反应着色的细胞。免疫染色强度评分为:无染色0分,弱染色1分,中等染色2分,强染色3分;染色面积评分为:着色范围 $\leq 10\%$ 为0分, $>10\% \sim 25\%$ 为1分, $>25\% \sim 50\%$ 为2分, $>50\% \sim 75\%$ 为3分, $>75\%$ 为4分。若两者评分之和 $\geq 3$ 分则为阳性,低于3分则为阴性。由本院病理科两位资深医师各自单独评分,对有差异的评分经复核商讨后得到最终一致结果。

### 1.3 构建稳定干扰或过表达 *DNAJB8* 的肺腺癌细胞株

1.3.1 A549 细胞稳定敲降 *DNAJB8* 构建针对 *DNAJB8* 基因的慢病毒敲降载体 siRNA 序列: AUG-GAAUCCACUGCGCAGCUAGCGA, 对照组 siRNA 序列: AUAGCAUAACAUCUAGACACCAAC。取对数期 A549 肺癌细胞铺 6 孔板, 每孔  $1 \times 10^6$  个细胞, 感染慢病毒 12 h 后换成新鲜培养基, 继续培养。Western blotting 验证干扰效果。

1.3.2 H1299 细胞稳定过表达 *DNAJB8* 取对数生长期 H1299 肺癌细胞铺 6 孔板, 每孔  $1 \times 10^6$  个细胞, 实验前用无血清培养基饥饿处理 4 h, 将 *DNAJB8* 高表达质粒和对照组空白质粒与转染试剂混匀后室温放置 5 min, 将混合质粒的转染试剂加入 6 孔板细胞中, 摇匀后置孵箱中孵育 4 h, 换新鲜培养基继续培养。Western blotting 验证过表达效果。

### 1.4 CCK-8 实验检测 *DNAJB8* 表达水平对肺腺癌细胞增殖的影响

将转染后细胞以每孔  $2 \times 10^3$  个  $100 \mu\text{l}$  接种于 96 孔板中, 设 5 个复孔。细胞贴壁记为 0 h, 开始每孔加入  $10 \mu\text{l}$  的 CCK-8 后放置  $37^\circ\text{C}$  恒温培养箱中孵育 1 h, 用酶标仪检测 450 nm 处的光密度 ( $D$ ) 值。依次检测 24 和 48 h 细胞的  $D$  值。记录每次结果, 去掉最大和最小的检测值, 求平均值后减去空白孔的  $D$  值即为最终  $D$  值, 绘制生长曲线图。

### 1.5 Transwell 法检测 *DNAJB8* 表达水平对肺腺癌细胞侵袭能力的影响

Transwell 上室先加  $50 \mu\text{l}$  1:33 稀释的 Matrigel, 于  $37^\circ\text{C}$  孵箱中孵育 30 min, 小心吸去上清液, 待用。用胰酶消化敲低 *DNAJB8* 的 A549 细胞和过表达 *DNAJB8* 的 H1299 细胞, 每个样品孔按  $200 \mu\text{l}$  无血清 1640 培养基重悬  $2 \times 10^4$  个细胞的量收集细胞, 小心加到 Transwell 上室中央, 下室添加含 20% FBS 的 1640 培养基  $900 \mu\text{l}$ , 加好样品后恒温培养箱中孵育 24 h, 棉签小心擦去上室残留的细胞, 用 PBS 清洗 3 次, 用 1 ml 甲醇固定细胞 20 min, 室温吹干, 用 0.5% 的结晶紫染色 1 min, PBS 清洗, 将上室薄膜用小刀切下, 置于载玻片上, 固定、封片, 显微镜下观察计数。

### 1.6 建立裸鼠肺转移模型观察 *DNAJB8* 敲降对肿瘤生长的影响

将对照组和 *DNAJB8* 敲降组 A549 细胞进行精确计数, 取  $5 \times 10^7$  个细胞, 用  $100 \mu\text{l}$  无血清 1640 培养基重悬, 对裸鼠尾静脉进行注射, 饲养 7 周后将裸鼠断髓处死, 取出其完整肺组织, 观察肺组织表面是否有瘤块形成, 将肺组织经固定、石蜡包埋、切片后用 H-E 染色观察肺组织中瘤块生长情况。

### 1.7 Western blotting 检测 *DNAJB8* 表达对肺腺癌细胞

### 内侵袭相关蛋白表达的影响

收集同批次稳定敲降 *DNAJB8* 的 A549 细胞和稳定过表达 *DNAJB8* 的 H1299 细胞, 冰上裂解细胞, 提取总蛋白, BCA 染色法测定蛋白质浓度。按每孔  $50 \mu\text{g}$  的蛋白样品量上样, SDS-PAGE 分离蛋白后转印到 PVDF 膜上, 用 5% 的脱脂奶粉封闭, 加一抗 (1:1 000)  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜, 清洗后二抗 (1:5 000) 室温孵育, 2 h 后清洗, 用 ECL 显色法显色, 将蛋白条带做灰度分析, 计算蛋白相对表达量。

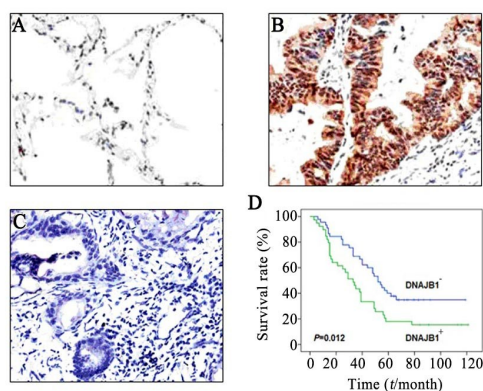
### 1.8 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件进行统计学处理和 Graphpad prism 5 软件作图。计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 计数数据以百分率表示。DNAJB8 蛋白表达与其他指标及临床特征之间的关系分析采用  $\chi^2$  检验, DNAJB8 蛋白的表达与患者的年龄、肿瘤大小、淋巴结转移、生存情况等用 Spearman 相关分析, 以  $P \leq 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肺腺癌组织中 DNAJB8 高表达

免疫组织化学结果 (图 1) 显示, 肺腺癌组织中 DNAJB8 的表达为强阳性, 癌旁组织中 DNAJB8 的表达为阴性。DNAJB8 的表达与淋巴结转移、肿瘤 Stage 分期呈正相关 (均  $P < 0.01$ , 表 1)。高表达 DNAJB8 与肺腺癌患者较差预后显著相关 ( $P < 0.01$ , 图 1)。



A: Low DNAJB8 expression in para-carcinoma tissue;

B: High DNAJB8 expression in carcinoma tissue;

C: Low DNAJB8 expression in carcinoma tissue;

D: Expression of DNAJB8 was associated with the prognosis

图 1 DNAJB8 高表达预示着肺腺癌患者较差的预后 ( $\times 400$ )

Fig. 1 High expression of DNAJB8 indicated the poor prognosis ( $\times 400$ )

### 2.2 成功构建 *DNAJB8* 稳定敲降或高表达细胞株

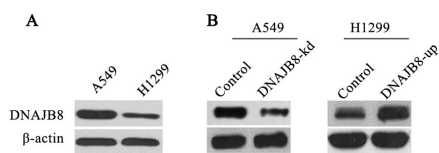
Western blotting 检测 A549 细胞和 H1299 细胞中 DNAJB8 的表达发现, A549 细胞中 DNAJB8 的表达



明显高于H1299细胞中的表达,所以选择在A549细胞中针对DNAJB8设计并转染siRNA进行基因干扰表达。Western blotting检测结果(图2)显示,转染敲降载体后,A549细胞中DNAJB8表达量明显下调;相反转染高表达质粒后H1299细胞中DNAJB8表达明显上调。

表1 DNAJB8在肺腺癌组织中的表达及其与临床病理特征的关系  
Tab. 1 Correlations between DNAJB8 expression in lung adenocarcinoma tissues and clinical pathological features

Clinical feature	N	High		Low		P
		n	%	n	%	
Age (t/a)						0.431
<60	51	25	49.02	26	50.98	
≥60	51	21	41.18	28	54.90	
Gender						0.838
Female	42	19	45.24	23	54.76	
Male	60	27	45	33	55	
Grade						0.950
Low	44	20	45.45	24	54.55	
High	58	26	44.83	32	55.17	
TNM stage						0.001
I + II	57	15	26.32	42	73.68	
III+IV	45	31	68.89	14	31.11	
Tumor classification						0.079
T1+T2	67	26	38.81	41	61.19	
T3+T4	35	20	57.14	15	42.87	
Lymph node status						0.001
N0	42	11	26.19	31	73.81	
N1-N3	60	35	58.33	25	41.67	
Metastasis classification						0.980
M0	91	41	45.05	50	54.95	
M1	11	5	45.45	6	54.55	
Gross pathology						0.313
Central type	61	25	40.98	36	59.02	
Peripheral type	41	21	51.22	20	48.78	



A: DNAJB8 protein expression in A549 and H1299 cells;  
B: The expression of DNAJB8 was stably down-regulation in A549 cells; C: The expression of DNAJB8 was stably over-expression in H1299 cells

图2 成功构建DNAJB8稳定敲降或高表达细胞株  
Fig. 2 Establishment of cell lines with stable DNAJB8 knock down or over-expression

2.3 DNAJB8表达对肺腺癌细胞增殖和侵袭的影响

Transwell侵袭实验、CCK-8实验检测结果(图3)显示,与对照组相比,DNAJB8敲降后的A549细胞的穿膜细胞数有明显下降[(41±3) vs (192±11)个, P<0.01],但并不抑制A549细胞的增殖。DNAJB8高表达的H1299细胞的穿膜细胞数有明显增加[(235±14) vs (25±4)个, P<0.01],但并不能促进H1299细胞的增殖。

2.4 敲降DNAJB8表达抑制A549细胞肺转移能力

裸鼠肺转移实验检测发现,与对照组相比,在A549细胞中敲降DNAJB8表达后,细胞的肺转移能力有明显下降(图4A),实验组裸鼠肺脏瘤结节数显著低于对照组[(5±1) vs (17±3)个, P<0.01](图4B)。

2.5 DNAJB8影响肺腺癌细胞内侵袭相关蛋白的表达和活化

Western blotting检测发现(图5),侵袭相关蛋白MMP-2和MMP-9表达在DNAJB8敲降的A549细胞中显著下调,ERK活化受到抑制(均P<0.01);而在H1299细胞,DNAJB8高表达后MMP-2和MMP-9均显著上调,ERK活化程度也显著提高(均P<0.01)。

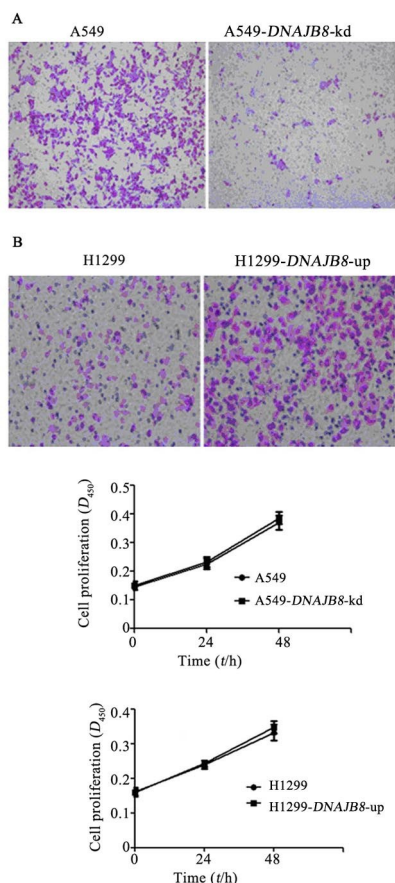
3 讨论

肿瘤治疗的最大障碍就是肿瘤细胞容易发生侵袭转移,肿瘤细胞侵袭转移的发生是一个非常复杂的过程,是多基因、多因素、多步骤的生物学行为,肿瘤细胞的黏附能力下降,从原发灶脱离、细胞分泌基质金属蛋白酶等蛋白降解胞外基质从而通过浸润进入血管,进而转移到全身,肿瘤细胞的侵袭涉及到的迁移和侵袭与细胞内基因的突变有着密切的关系。降低癌细胞的侵袭能力能够有效抑制癌细胞的转移<sup>[8-10]</sup>。本研究通过基因干扰手段下调DNAJB8在A549细胞中的表达来检测细胞侵袭能力的改变,发现DNAJB8敲降后能够明显抑制肺腺癌细胞系A549的侵袭转移能力。Torigoe等<sup>[9]</sup>研究发现,肺腺癌肿瘤细胞的干性与DNAJB8的表达密切相关,siRNA干扰DNAJB8的表达可以明显减弱肿瘤细胞形成干细胞的能力,从而降低肿瘤细胞的增殖、转移能力,本研究结果与其一致。

本研究前期通过免疫组织化学的手段检测了102例肺腺癌患者癌组织,发现在肺腺癌组织中DNAJB8为强阳性表达且其表达与肺腺癌T分期和淋巴转移呈正相关,推测DNAJB8可能与肺腺癌的侵袭转移关系。肿瘤细胞要发生浸润侵袭其胞外基质的改变是的重要环节<sup>[11-12]</sup>。金属蛋白酶家族中的MMP-2和MMP-9蛋白能有效地降解胞外的基质、参与肿瘤黏附、血管的侵入等而使肿瘤细胞发生侵袭,在多种具有侵袭性和高转移肿瘤中都发现有MMP-2和MMP-9的表达增高<sup>[13-15]</sup>;癌细胞转移黏附后,分泌MMP-2、MMP-9等多种蛋白水解酶,降解、侵袭基底

膜,使细胞穿越破损的基底膜脱离原发灶,进而随血液或淋巴循环发生肿瘤转移<sup>[16-17]</sup>;因此,降低癌细胞侵袭和迁移能力是抑制肿瘤转移的关键<sup>[18-20]</sup>。

通过 MEK/ERK 信号通路来影响肺腺癌的侵袭转移。



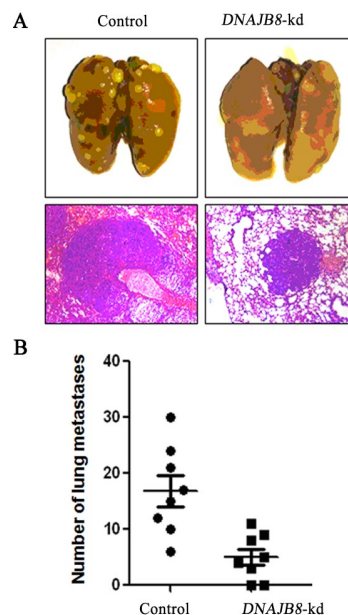
A: The invasion ability of A549 cells was inhibited after *DNAJB8* knockdown, but the proliferation of A549 cells was not affected;

B: The invasion ability of H1299 cells was facilitated after *DNAJB8* over-expression, but the proliferation ability of H1299 was not affected

图3 *DNAJB8* 影响肺腺癌的侵袭能力( $\times 100$ )

Fig. 3 The invasion ability of lung adenocarcinoma cells was affected by *DNAJB8*( $\times 100$ )

为了研究 *DNAJB8* 在肺腺癌侵袭转移过程中的作用以及相关的分子机制,课题组针对 *DNAJB8* 设计了相应的 siRNA 干扰序列和高表达质粒,发现 *DNAJB8* 干扰表达后能够明显抑制肺腺癌细胞系 A549 的侵袭转移能力,*DNAJB8* 高表达后能够明显促进肺腺癌细胞系 H1299 的侵袭转移能力;通过 Western blotting 检测侵袭相关蛋白发现金属蛋白酶家族成员 MMP-2、MMP-9 在 *DNAJB8* 敲降后均有明显的下调,*DNAJB8* 高表达后均有明显的上调;同时还检测了 ERK、p-ERK 的表达,发现 *DNAJB8* 敲降后 p-ERK 的表达也有明显的下调,*DNAJB8* 高表达后 p-ERK 的表达也有明显的上调,说明 *DNAJB8* 可能主要

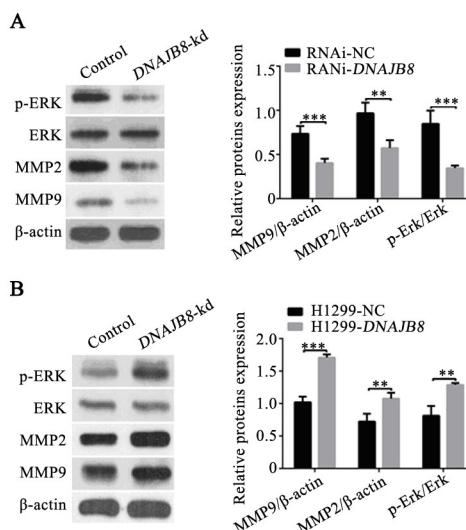


A: Bouin's fixed lung tissue and H-E dyeing( $\times 100$ );

B: The number of lung metastases in the rat lung after intravenous injection

图4 抑制 *DNAJB8* 表达降低大鼠肺腺癌的体内转移能力

Fig. 4 Inhibiting the expression of *DNAJB8* reduced the lung adenocarcinoma metastatic ability *in vivo*



A: *DNAJB8* downregulation inhibited the activation of ERK and MMP-2, MMP-9 expression in A549 cells;

B: *DNAJB8* upregulation facilitated the activation of ERK and MMP2,MMP9 expression in H1299 cells

图5 *DNAJB8* 影响肺腺癌细胞中侵袭相关蛋白的表达

Fig. 5 *DNAJB8* affected the expression of invasion related proteins in lung adenocarcinoma cells

综上所述,本研究发现 *DNAJB8* 主要通过 MEK/

ERK 信号通路调节其下游分子 MMP-2、MMP-9 等侵袭相关分子而影响肺腺癌的侵袭转移, 本研究的结果可为肺腺癌的基因治疗以及临床基因联合诊断提供一定的理论依据。

### [参 考 文 献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66 (1):7-30. DOI: 10.3322/caac.21332.
- [2] JOHNSON D H, SCHILLER J H, BUNN P A Jr. Recent clinical advances in lung cancer management[J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(10): 973-982. DOI: 10.1200/JCO.2013.53.1228.
- [3] RAO J S, GONDI C, CHETTY C, et al. Inhibition of invasion, angiogenesis, tumor growth and metastasis by adenovirus-mediated transfer of antisense uPAR and MMP-9 in non-small cell lung cancer cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(9): 1399-1408. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0082.
- [4] TORIGOE T, HIROHASHI Y, MORITA R, et al. Abstract LB-195: Immune responses against cancer stem cell-specific tumor antigens and tumor microenvironment[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(8): LB-195. DOI: 10.1158/1538-7445.
- [5] YAMADA R, TAKAHASHI A, TORIGOE T, et al. Preferential expression of cancer/testis genes in cancer stem-like cells: proposal of a novel sub-category, cancer/testis/stem gene[J]. *Tissue Antigens*, 2013, 81(6): 428-434. DOI: 10.1111/tan.12113.
- [6] HIROHASHI Y, TORIGOE T, TSUKAHARA T, et al. Immune responses to human cancer stem-like cells/cancer-initiating cells[J]. *Cancer Sci*, 2016,107(1):12-17.DOI: 10.1111/cas.12830.
- [7] KUPPUSAMY P, GOVINDAN N, YUSOFF M M, et al. Proteins are potent biomarkers to detect colon cancer progression[J/OL]. *Saudi J Biol Sci*, 2014, 5:31-47[2017-02-25]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X14001247/pdf?md5=72c172b41a7f550e05a9844d9d46bb9c&pid=1-s2.0-S1319562X14001247-main.pdf>. DOI: 10.1016/j.sjbs.2014.09.017.
- [8] ZHAO B, HAN H, CHEN J, et al. MicroRNA let-7c inhibits migration and invasion of human non-small cell lung cancer by targeting ITGB3 and MAP4K3[J]. *Cancer Lett*, 2014, 342(1):43- 51. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.08.030.
- [9] LIN X, YANG Z, ZHANG P, et al. miR-154 inhibits migration and invasion of human non-small cell lung cancer by targeting ZEB2[J]. *Oncol Lett*, 2016,12(1):301-306. DOI: 10.3892/ol.2016.4577.
- [10] 唐健, 李捷, 李少军, 等. 沉默 NGAL 基因对肺癌细胞迁移及侵袭的影响[J]. *中国肺癌杂志*, 2015, 18(4): 187-192. DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.
- [11] 杨大运, 齐战, 金普乐, 等. 肺腺癌组织中 MMP-2 及 TIMP-2 的表达与转移、预后相关性研究[J]. *河北医科大学学报*, 2009, 30(8): 761-764. DOI: 10.3969/j.issn.1007-3205.
- [12] 薛洋, 周清华, 张尚福, 等. MMP-2、MMP-9 在肺癌中的表达及其与肺癌转移和预后关系的研究[J]. *华西医学*, 2008, 23(2): 225-227.
- [13] JUNG O, LEE J, YU J L, et al. Timosaponin AIII inhibits migration and invasion of A549 human non-small-cell lung cancer cells via attenuations of MMP-2 and MMP-9 by inhibitions of ERK1/2, Src/FAK and  $\beta$ -catenin signaling pathways[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26(16): 3963-3967. DOI: 10.1016/j.bmcl.
- [14] QIN C, HE B, DAI W, et al. The impact of a chlorotoxin-modified liposome system on receptor MMP-2 and the receptor-associated protein CIC-3[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(22): 5908- 5920. DOI: 10.1016/j.biomaterials.
- [15] LEE M M, CHEN Y Y, LIU P Y, et al. Pipoxolan inhibits CL1-5 lung cancer cells migration and invasion through inhibition of MMP-9 and MMP-2[J]. *Chem-Biol Interact*, 2015,236(5):19- 30. DOI: 10.1016/j.cbi.
- [16] CAO S. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis[J]. *China Modern Medicine*, 2011, 25(1): 9- 34. DOI: 10.1007/s10555-006-7886-9.
- [17] SALGIA R. Mutation testing for directing upfront targeted therapy and post-progression combination therapy strategies in lung adenocarcinoma[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2016,16(7):737- 749. DOI: 10.1080/14737159.
- [18] DING Y, LI X, HONG D, et al. Silence of MACC1 decreases cell migration and invasion in human malignant melanoma through inhibiting the EMT[J]. *Biosci Trends*, 2016, 10(4): 258- 264. DOI: 10.5582/bst.2016.01091.
- [19] WU S H, HSIAO Y T, KUO C L, et al. Bufalin inhibits NCI-H460 human lung cancer cell metastasis in vitro by inhibiting MAPKs, MMPs, and NF- $\kappa$ B pathways[J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43(6): 1247-1264. DOI: 10.1142/S0192415.
- [20] WENG M, SONG F, CHEN J, et al. The high-mobility group nucleosome-binding domain 5 is highly expressed in breast cancer and promotes the proliferation and invasion of breast cancer cells [J]. *Tumor Biol*, 2015, 36(2): 959-966. DOI: 10.1007/s13277-014-2715-1.

[收稿日期] 2017-05-20

[修回日期] 2017-07-13

[本文编辑] 黄静怡