

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.09.010

· 临床研究 ·

## Testin在非小细胞肺癌组织和细胞株中的表达及其对癌细胞恶性生物习行为的影响

王玲<sup>1</sup>, 邹潇<sup>1</sup>, 刘辉国<sup>2</sup> (1. 武汉大学医院 内科, 湖北 武汉 430071; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 呼吸内科, 湖北 武汉 430030)

**[摘要]** **目的:** 探讨 Testin 基因(*TES*)在非小细胞肺癌(NSCLC)组织和细胞株中的表达及其对人肺癌 A549 细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响。**方法:** 收集 2015 年 1 月至 2015 年 12 月在华中科技大学同济医学院附属同济医院手术切除的 27 例 NSCLC 患者的癌组织及癌旁组织标本,用 Western blotting 法检测癌组织和癌旁组织,以及正常人胚肺成纤维细胞株 MRC5 和肺癌细胞株 A427、A549、H1299、LK2、PC9 和 SW900 中 TES 蛋白的表达水平。应用短发卡 RNA(shRNA)瞬时转染肺癌细胞株 A549 干扰 *TES* 基因的表达,并进一步检测 *TES* 低表达对 A549 细胞增殖、迁移、侵袭以及凋亡的影响,同时检测凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 的表达。**结果:** 在 NSCLC 组织和细胞株中 TES 蛋白的表达明显下降(均  $P < 0.05$ )。shTES 干扰 A549 细胞后,*TES* mRNA 和蛋白表达水平均显著下降(均  $P < 0.05$ )。抑制 *TES* 表达显著增强 A549 细胞的增殖[(2.75±0.04) vs (1.79±0.06),  $P < 0.05$ ]、迁移[(52.3±2.6)% vs (19.7±1.4)%,  $P < 0.05$ ]和侵袭能力[(31.2±3.9)% vs (14.5±4.1)%,  $P < 0.05$ ],同时降低了细胞凋亡率[(8.2±1.1)% vs (23.1±1.7)%,  $P < 0.05$ ]。*TES* 低表达使 A549 细胞 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达明显下降( $P < 0.05$ )、Bcl-2 蛋白表达明显升高( $P < 0.05$ )。**结论:** *TES* 在 NSCLC 组织中呈低表达,*TES* 表达下调具有促进肺癌细胞的增殖、迁移、侵袭并抑制凋亡等生物学效应,其有可能成为肺癌治疗一个新靶点。

**[关键词]** 非小细胞肺癌; A549 细胞系; Testin(*TES*)基因; RNA 干扰

**[中图分类号]** R730.2; R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)09-0984-06

## Effect of expression of Testin gene in non-small cell lung cancer tissues and cell lines on the malignant biological behavior of cancer cells

WANG Ling<sup>1</sup>, ZOU Xiao<sup>1</sup>, LIU Huiguo<sup>2</sup> (1. Internal Medicine, Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China; 2. Respiratory Medicine, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of Testin (*TES*) gene in non-small lung cancer cell (NSCLC) lines, and also to investigate its effect on cell proliferation, migration, invasion and apoptosis of human lung cancer cell line A549. **Methods:** Twenty-seven cases of cancer tissues and corresponding para-cancerous tissues from non-small lung cancer patients that treated in Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology between January 2015 and December 2015 were collected for this study; and the expression of TES protein in collected tissues was examined by Western blotting. In the meanwhile, TES protein expressions in six human lung cancer cell lines (A427, A549, H1299, LK2, PC9 and SW900) and lung fibroblast cell line MRC5 were also detected. shTES was transiently transfected into A549 cells to interfere the expression of *TES* gene; the effect of low *TES* expression on proliferation, migration, invasion and apoptosis of A549 were further assessed, and its effect on the expressions of apoptosis related proteins (Bax, Bcl-2 and Caspase-3) were also tested by Western blotting. **Results:** The expression of TES protein in lung cancer tissues and lung cancer cell lines was significantly decreased (all  $P < 0.05$ ). After shTES transfection in A549 cells, the expressions of *TES* mRNA and protein

**[作者简介]** 王玲(1970-),女,硕士,副主任医师,主要从事呼吸系统疾病的基础与临床研究,E-mail:wangling012345678@126.com

**[通信作者]** 刘辉国(LIU Huiguo, corresponding author),博士,主任医师,教授,博士生导师,主要从事呼吸系统疾病的临床和基础工作研究,E-mail:huigl@163.com

**[优先发表]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170914.0934.014.html>

were significantly down-regulated ( $P<0.05$ ). Additionally, shTES significantly increased cell proliferation ( $[2.75\pm 0.04]$  vs  $[1.79\pm 0.06]$ ,  $P<0.05$ ), migration ( $[52.3\pm 2.6\%]$  vs  $[19.7\pm 1.4\%]$ ,  $P<0.05$ ), and invasion ( $[31.2\pm 3.89\%]$  vs  $[14.5\pm 4.1\%]$ ,  $P<0.05$ ), while inhibited cell apoptosis ( $[8.2\pm 1.1\%]$  vs  $[23.1\pm 1.7\%]$ ,  $P<0.05$ ) of A549 cells. Moreover, TES low expression significantly decreased the expressions of Bax and Caspase-3 ( $P<0.05$ ) but increased the expression of Bcl-2 ( $P<0.05$ ) in A549 cells. **Conclusion:** TES was low expressed in NSCLC tissues, and down-regulation of TES could promote cell proliferation, migration, invasion and inhibit the apoptosis of lung cancer cells, which may serve as a new target for lung cancer treatment.

**[Key words]** non-small cell lung cancer; A549 cell line; Testin gene (TES); RNA interference

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(9): 984-989. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.09.010]

近年来,肺癌的发病率在全球范围内呈持续上升趋势,严重威胁着人们的健康和生命<sup>[1,2]</sup>。Testin基因(TES)是Tatarelli等<sup>[3]</sup>从人7号染色体克隆得到的一种抑癌基因,定位于染色体7q31.2脆性部位FRA7G,在正常组织中广泛表达,而在多种原发肿瘤和肿瘤细胞系中表达缺失,表明TES是参与肿瘤发生、发展的重要分子,并可能成为癌症恶性程度及预后的预测因子<sup>[4-6]</sup>。有研究证实, TES参与胃癌<sup>[7]</sup>、乳腺癌<sup>[8]</sup>、结直肠癌<sup>[9]</sup>、头颈部实体恶性肿瘤<sup>[10]</sup>以及血液系统肿瘤<sup>[7,11]</sup>等多种肿瘤的发生发展,但其在肺癌中的表达尚未见文献报道, TES能否影响肺癌的生物学行为也没有相关研究。本课题通过检测TES基因在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)组织和肺癌A549细胞株中的表达水平,同时用shRNA干扰A549细胞TES基因的表达,检测对A549细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡能力的影响,分析TES在肺癌发生发展中的作用及其机制,旨在为肺癌分子靶向治疗提供实验依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

收集华中科技大学同济医学院附属同济医院2015年1月至2015年12月在胸外科因肺癌行手术切除的27例NSCLC患者癌组织及癌旁组织(远离肿瘤浸润部位5 cm以上的肺组织)。所有患者在术前均未接受过化疗和放疗,术后经病理学确诊为NSCLC。手术标本在提取RNA及蛋白质前均放入液氮保存,部分组织标本经10%甲醛固定、石蜡包埋后做免疫组化染色。

### 1.2 细胞株及主要试剂

肺癌A549细胞株从ATCC细胞库获得,人胚肺成纤维细胞MRC5和肺癌A427、H1299、LK2、PC9、SW900细胞株购于中国科学院上海细胞库。RPMI 1640培养液、胎牛血清及0.05%胰酶/EDTA购自美国Gibco公司,蛋白裂解液、BCA蛋白定量试剂盒以及蛋白质电泳Maker购于Thermo公司,抗TES、

GAPDH单克隆抗体购于Santa Cruz,抗Bax、Bcl-2及Caspase-3抗体购于CST公司, FuGENE HD转染试剂、RT试剂盒、SYBR Green I Master购于Roche公司, TRIzol购于Invitrogen公司, 四甲基偶氮唑盐(MTT)购于Sigma公司, Transwell小室购自美国Corning公司。

### 1.3 细胞培养及转染

细胞置于含10%胎牛血清的RPMI 1640完全培养基中,在37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的恒温培养箱中培养、传代。将A549细胞接种于6孔培养板(2×10<sup>5</sup>/孔),培养24 h,待细胞汇合度达到60%~75%时,利用FuGENE HD转染试剂盒分别转染短发卡RNA(shRNA)及shTES,转染6 h后更换含血清培养基继续培养用于后续实验。

### 1.4 shTES重组质粒的构建与鉴定

根据TES mRNA的已知序列,针对TES基因设计的shTES序列5'-GAATGTCTCCATCAATACAG-3'。引物退火后,在T4 DNA连接酶作用下连接到Hpa I/Xho I双酶切的pSicoR载体上。shTES重组质粒通过测序,用实时定量PCR(qPCR)及Western blotting法鉴定。

### 1.5 Western blotting检测肺癌组织和细胞株TES蛋白以及凋亡相关蛋白的表达

提取ESCC组织或细胞总蛋白,进行蛋白浓度测定后,取50 μg上样。以12%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转移至硝酸纤维素膜上。以TBST配制的5%脱脂奶粉室温封闭1 h,然后分别加入相应稀释比例后的一抗(TES 1:500, GAPDH 1:2 000, Bax 1:1 000, Bcl-2 1:1 000, Caspase-3 1:1 000), 4℃孵育过夜。TBST漂洗3次,再加入1:2 000稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育1 h。采用化学发光法显色,用Quantity One软件分析图像,以GAPDH为内参,以目的蛋白条带灰度值与内参蛋白条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达水平。实验重复3次。

### 1.6 qPCR检测A549细胞中TES mRNA表达水平

肺癌A549细胞分别转染shRNA和shTES后培

养 24 h, 用 TRIzol 法提取各组细胞中总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 使用 SYBR Green I Master 进行 qPCR 检测, 每个样本均设 3 个复孔。TES 上游引物为 GC-CAAGAAGAATGTCTCCA, TES 下游引物为 TTGAAGGGTCCTGGTCAT; GAPDH 上游引物为 CCACTCCTCCACCTTTGAC, 下游引物为 ACCCTGTTGCTGTAGCCA。反应体系如下: 模板 1  $\mu$ l, SYBR Green I Master 10  $\mu$ l, primer mix 2  $\mu$ l, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu$ l。在 PCR 仪按如下条件进行反应: 预变性: 95  $^{\circ}$ C 30 s; PCR 反应: 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 60 s, 共 40 个循环; 60~95  $^{\circ}$ C 溶解曲线, 以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  进行相对定量分析。实验重复 3 次。

### 1.7 MTT 法检测 TES 低表达对 A549 细胞增殖能力的影响

肺癌 A549 细胞分别转染 shRNA 和 shTES 后培养 48 h, 按  $3 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔板, 分别于培养 1、2、3、4 和 5 d 时各取 6 个复孔, 避光下将 20  $\mu$ l MTT 溶液加入到各孔, 孵育 4 h 后将上清弃去, 加入 150  $\mu$ l 二甲亚砜摇匀, 待 15 min 后用酶标仪记录波长 490 nm 处各样品的光密度(D)值, 以 D 值表示细胞的增殖能力, 每次设 6 个重复孔, 最后取其平均值。按照  $D_{490}$  值大小绘制细胞增殖曲线。实验重复 3 次。

### 1.8 划痕实验检测 TES 低表达对 A549 细胞迁移能力的影响

肺癌 A549 细胞分别转染 shRNA 和 shTES 后分组接种于 6 孔板。培养至约 70% 汇合时, 用移液枪头沿培养板底部呈一字型划痕, 分别于培养 1 h 和 24 h 时倒置显微镜下测量划痕的宽度。细胞迁移率(%) = (1 - 测量时划痕宽度/初始时划痕宽度)  $\times$  100%。实验重复 3 次。

### 1.9 Transwell 侵袭实验检测 TES 低表达对 A549 细胞侵袭能力的影响

将 Matrigel 胶稀释后, 每个 Transwell 小室加入 50  $\mu$ l, 37  $^{\circ}$ C 孵育 3 h 凝固。分组转染后的细胞接种入 Transwell 小室上室, 并加入无血清培养基, 将含 10% 胎牛血清的培养基加入下层小室。常规培养 24 h 后取出小室, 将小室内细胞擦除后, 染色固定, 于显微镜下随机选取 10 个视野进行观察, 通过比较各组穿膜细胞数量来判断细胞的侵袭性。细胞侵袭率(%) = 穿膜细胞数/细胞总数  $\times$  100%。实验重复 3 次。

### 1.10 TUNEL 法检测 TES 低表达对 A549 细胞凋亡率的影响

分别转染 shRNA 和 shTES 的 A549 细胞培养 48 h 后, 4% 的多聚甲醛固定后 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 常温作用 10 min, 加入 0.1% TritonX-100 柠檬酸钠缓冲液, 4  $^{\circ}$ C 作用 20 min 后加 50  $\mu$ l TUNEL 反应混合液, 湿盒中 37  $^{\circ}$ C 作用 1

h, 用 3% 的小牛血清白蛋白(BSA) 37  $^{\circ}$ C 封闭 20 min, 加 50  $\mu$ l 转换 POD 溶液, 湿盒中 37  $^{\circ}$ C 作用 30 min 后加 50  $\mu$ l DAB 底物, 室温避光显色 10 min。封片, 在光镜下分析结果。细胞核内出现棕褐色沉淀为凋亡细胞, 高倍镜下数 1 000 个细胞, 计算凋亡率(%) = (凋亡细胞数/计数细胞总数)  $\times$  100%。每个样本均设 3 个复孔, 实验重复 3 次。

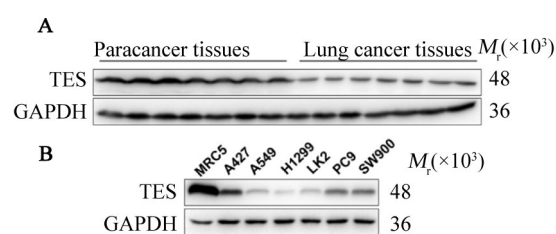
### 1.11 统计学处理

应用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验和单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TES 蛋白在肺癌组织和细胞株中低表达

Western blotting 法检测结果(图 1)显示, ES-CLC 组织中 TES 蛋白的表达水平明显低于癌旁组织 [(0.256  $\pm$  0.037) vs (0.931  $\pm$  0.342),  $t = 6.742$ ;  $P < 0.05$ ; 图 1A]; 在肺癌 A427、A549、H1299、LK2、PC9 和 SW900 细胞株中 TES 蛋白的表达水平也明显低于人胚肺成纤维细胞 MRC5 细胞 [(0.324  $\pm$  0.021)、(0.156  $\pm$  0.013)、(0.122  $\pm$  0.015)、(0.192  $\pm$  0.021)、(0.235  $\pm$  0.017)、(0.246  $\pm$  0.028) vs (0.927  $\pm$  0.158),  $F = 4.315$ ,  $P < 0.05$ ; 图 1B]。



A: Expression of TES protein in NSCLC tissues;

B: Expression of TES protein in lung cancer cell lines

图 1 NSCLC 组织和细胞株中的 TES 蛋白的表达

Fig.1 Expression of TES protein in the NSCLC tissues and lung cancer cell lines

### 2.2 shTES 转染后肺癌 A549 细胞中 TES 蛋白和 TES mRNA 低表达

Western blotting 检测结果(图 2)显示, shTES 转染组肺癌 A549 细胞中 TES 蛋白的表达水平显著低于 shRNA 组 [(0.297  $\pm$  0.107) vs (0.876  $\pm$  0.131);  $t = 6.732$ ,  $P < 0.05$ ]. qPCR 结果显示, shTES 转染组肺癌 A549 细胞中 TES mRNA 相对表达水平显著低于 shRNA 组 [(0.185  $\pm$  0.049) vs (1.000  $\pm$  0.217);  $t = 4.298$ ,  $P < 0.05$ ]. 结果表明, shTES 能够抑制 TES mRNA 和蛋白表达, 说明 shTES 的构建和转染的成功。

2.3 TES低表达显著增强肺癌A549细胞的增殖能力

MTT法检测结果(图3)显示,shTES组转染1、2、3、4、5 d时肺癌A549细胞的增殖能力均高于shRNA对照组( $F=2.764, P<0.05$ ),结果提示TES表达下调能够显著增强细胞的增殖能力。

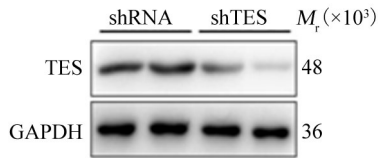
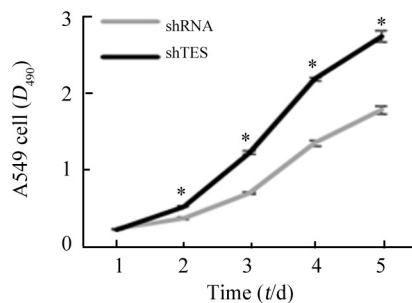


图2 shTES转染后A549细胞中TES的蛋白水平  
Fig. 2 TES protein level in A549 cells after shTES transfection



\* $P<0.05$  vs shRNA group

图3 shTES转染对肺癌A549细胞增殖能力的影响  
Fig. 3 Effect of shTES transfection on proliferation of A549 cells

2.5 TES低表达显著增强肺癌A549细胞的迁移能力

划痕实验检测结果(图4)显示,shTES组肺癌A549细胞的迁移率显著低于shRNA组[(52.3±2.6)% vs (19.7±1.4)%], $t=-4.627, P<0.05$ 。结果表明TES表达下调能够显著增强A549细胞的迁移能力。

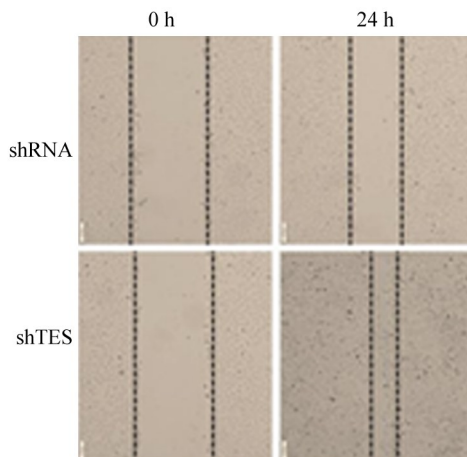


图4 shTES转染对A549细胞迁移能力的影响  
Fig. 4 Effect of shTES transfection on migration of A549 cells

2.6 TES低表达显著增强肺癌A549细胞的侵袭能力

Transwell侵袭实验结果(图5)显示,shTES组肺癌A549细胞的穿膜细胞率明显高于shRNA对照组细胞[(31.2±3.8)% vs (14.5±4.1)%], $t=-8.623, P<0.05$ 。结果表明TES表达下调会增强肺癌A549细胞的侵袭能力。

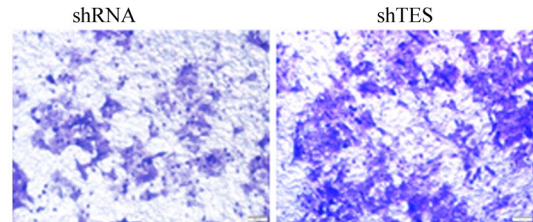


图5 shTES转染对A549细胞侵袭能力的影响  
(结晶紫染色,×100)

Fig. 5 Effect of shTES transfection on invasive ability of A549 cells (crystal violet staining, ×100)

2.7 TES低表达显著抑制肺癌A549细胞的凋亡率

Tunel法检测结果(图6)显示,shTES转染组肺癌A549细胞的凋亡率明显低于shRNA对照组细胞[(8.2±1.1)% vs (23.1±1.7)%], $t=6.279, P<0.05$ 。结果表明TES表达下调会减少肺癌A549细胞的凋亡。

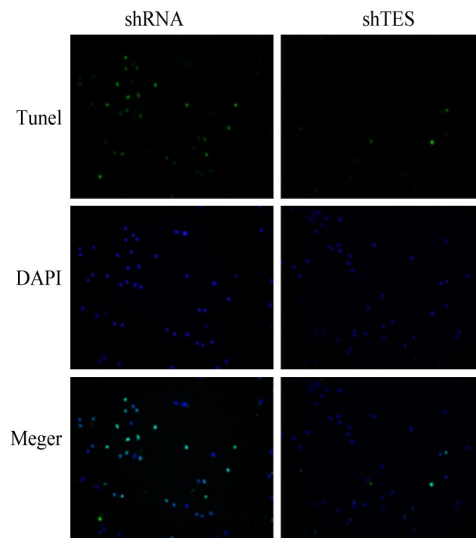


图6 shTES转染对肺癌A549细胞凋亡的影响(×200)  
Fig.6 Effect of shTES transfection on apoptosis of A549 cells(×200)

2.8 TES低表达对A549细胞中Bax、Bcl-2和Caspase-3蛋白表达水平的影响

Western blotting法检测结果(图7)显示,与shRNA组比较,shTES转染组A549细胞:(1)Bax蛋白的表达水平明显降低[(0.364±0.104) vs

( $1.342 \pm 0.216$ ),  $t=7.213$ ,  $P<0.05$ ]; (2) Bcl-2 蛋白的表达水平明显升高[( $0.937 \pm 0.152$ ) vs ( $0.276 \pm 0.098$ ),  $t=-6.375$ ,  $P<0.05$ ]; (3) Caspase-3 蛋白的表达水平明显降低[( $0.197 \pm 0.069$ ) vs ( $1.183 \pm 0.145$ ),  $t=5.029$ ,  $P<0.05$ ]. 结果表明, 转染 shTES 导致的 TES 低表达可降低促凋亡因子 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达水平, 升高抑制凋亡因子 Bcl-2 蛋白的表达水平。

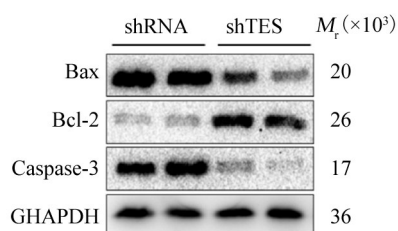


图7 shTES 转染对 A549 细胞凋亡相关蛋白表达的影响  
Fig. 7 Effect of shTES transfection on apoptosis related proteins in A549 cells

### 3 讨论

肺癌是人类最常见的恶性肿瘤之一,也是全球恶性肿瘤致死的重要因素。近年来,肺癌因其发病率和病死率的不断攀升而越发受到关注。虽然人们已经在肺癌的诊断和治疗方面做出了极大的努力,但肺癌患者的总体预后仍然不佳,即使是早期肺癌也存在高病死率和易复发现象<sup>[12]</sup>。研究人员已经认识到原癌基因及抑癌基因的异常变化在人类肿瘤发生发展中起着重要作用,尤其是抑癌基因功能的丧失得到越来越多的重视。因此,新的抑癌基因研究对肺癌发病机制的阐明以及寻找有效的治疗靶点具有重要意义。

TES 基因是一种抑癌基因, TES 编码一个含有 421 个氨基酸残基的蛋白质序列,蛋白相对分子质量为 48 000。TES 蛋白的 NH<sub>2</sub> 端含有一个 PET 结构域, COOH 端含有 3 个串联的富含半胱氨酸的区域 (LIM), 这种特殊的串联 LIM 结构域与 TES 蛋白在细胞中的定位和调控细胞生物学行为如细胞分化、细胞骨架构成、细胞成瘤的功能密切相关<sup>[13-14]</sup>。TES 基因广泛表达于许多正常组织中(包括卵巢、乳腺、前列腺、食管、头颈部、血液系统等), 尤其睾丸和卵巢的表达水平最高<sup>[15]</sup>。自发现并确定了人类 TES 基因, 研究人员通过对 26 种实体肿瘤细胞株和 18 组造血系统肿瘤的研究, 发现 22% 的实体肿瘤细胞株和 44% 的造血系统肿瘤细胞株中 TES 表达缺失, 从而确定了 TES 是新的候选抑癌基因<sup>[4]</sup>。有研究<sup>[7-11]</sup>发现, TES 基因在人类多种肿瘤组织如胃癌、乳腺癌、卵巢癌、前

列腺癌、结肠癌、头颈部实体恶性肿瘤、血液系统肿瘤、脑胶质细胞瘤、子宫内膜癌等中的表达水平明显降低, 而相关研究表明, TES 高表达可以明显抑制恶性肿瘤细胞的增殖并促进其凋亡。目前有关 TES 在肿瘤中的表达及其作用机制的研究仍然较少, 主要集中在胃癌、乳腺癌、卵巢癌等肿瘤中, 而在肺癌的研究极少。

在对多种肿瘤的研究中, 研究者发现过表达 TES 能够抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭, 并促进肿瘤细胞的凋亡, 而降低 TES 的表达会得到相反的结果。Li 等<sup>[9]</sup>研究发现, 在细胞中高表达 TES 基因能够抑制肠癌细胞株 HCT116 和 DLD-1 的增殖、迁移及侵袭能力, 并促进细胞凋亡的发生; 而在细胞中干扰 TES 的表达后则会促进肿瘤细胞的增殖、迁移及侵袭, 并抑制细胞凋亡。Zhong 等<sup>[10]</sup>的研究果显示, 高表达 TES 基因能过抑制人鼻咽癌细胞株 5-8F 的增殖、侵袭能力; 而 Gu 等<sup>[16]</sup>通过高表达或者干预 TES 的表达, 同样证明 TES 可以抑制子宫内膜癌细胞的增殖。Qiu 等<sup>[17]</sup>同样通过实验证明了 TES 基因的高表达可以抑制卵巢癌细胞的增殖。本研究结果显示, TES 在肺癌组织及肺癌细胞株中的表达水平均明显低于癌旁组织及肺成纤维细胞, 提示 TES 表达下调或缺失可能参与肺癌的发生发展, 这与有关学者在其他肿瘤中的对 TES 的研究结果是一致的。为了进一步研究 TES 对肺癌发生的作用, 本研究利用 shRNA 技术沉默 TES 基因的表达, 并用 Western blotting 和实时荧光定量 PCR 法检测基因沉默效果, 结果显示 shTES 能有效降解肺癌 A549 细胞中的 TES mRNA, 并使 TES 蛋白表达明显减少。所以, 利用 shRNA 干扰技术降低 A549 细胞 TES 蛋白表达的效果是明显的。随后的体外实验结果验证了笔者的假设。MTT 实验干扰 TES 表达会促进肿瘤细胞的增殖、细胞划痕实验证实 shTES 能够加强肺癌细胞的迁移能力、Transwell 侵袭试验结果提示肺癌细胞的侵袭能力随着 TES 蛋白表达水平的降低而增强。Tunel 法结果提示, TES 表达水平降低会抑制肿瘤细胞的凋亡能力; 进一步对凋亡相关蛋白检测发现, 降低 TES 的表达会下调促凋亡因子 Bax 和 Caspase-3 蛋白的表达, 而使凋亡抑制因子 Bcl-2 蛋白表达上调。由此可见, 本研究结果与 TES 在多种肿瘤中的研究结果是一致的, 进一步证实了 TES 是一多肿瘤的抑癌基因, 提示 TES 可能会抑制肺癌细胞的进展, 此为深入了解肺癌发生发展的机制及靶向肺癌的基因治疗提供了实验依据。

总之, TES 在肺癌组织及细胞株中表达下调, 特异性沉默 TES 基因会促进肺癌细胞的增殖、侵袭和迁移, 并抑制肿瘤细胞的凋亡。TES 可能在肺癌细胞的

增殖、迁移、侵袭及凋亡过程中发挥重要调控作用,并有可能成为肺癌治疗的新靶点,为肺癌的基因治疗提供了新的思路。

### [参考文献]

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J/OL]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108[2017-04-10]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21262/>. DOI:10.3322/caac.21262.
- [2] ZAKOWSKI M F. Analytic inquiry: molecular testing in lung cancer [J]. *Cancer*, 2017, 125(S6): 470-476. DOI:10.1002/cncy.21866.
- [3] TATARELLI C, LINNENBACH A, MIMORI K, et al. Characterization of the human TESTIN gene localized in the FRA7G region at 7q31.2[J/OL]. *Genomics*, 2000, 68(1): 1-12 [2017-04-10]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888754300962724>. DOI: 10.1006/geno.2000.6272.
- [4] MRUK D D, CHENG C Y. Testin and actin are key molecular targets of adjuvin, an anti-spermatogenic agent, in the testis[J/OL]. *Spermatogenesis*, 2011, 1(2): 137-146[2017-04-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3271656/>. DOI:10.4161/spmg.1.2.16449.
- [5] MAGNO A L, INGLEEY E, BROWN S J, et al. Testin, a novel binding partner of the calcium-sensing receptor, enhances receptor-mediated Rho-kinase signalling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 412(4): 584-589. DOI:10.1016/j.bbrc.2011.07.132.
- [6] DRUSCO A, ZANESI N, ROLDO C, et al. Knockout mice reveal a tumor suppressor function for Testin[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(31): 10947-10951[2017-04-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/2/>. DOI:10.1073/pnas.0504934102.
- [7] MA H, WENG D, CHEN Y, et al. Extensive analysis of D7S486 in primary gastric cancer supports TESTIN as a candidate tumor suppressor gene[J/OL]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 190[2017-04-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/117/>. DOI:10.1186/1476-4598-9-190.
- [8] SARTI M, PINTON S, LIMONI C, et al. Differential expression of testin and survivin in breast cancer subtypes[J/OL]. *Oncol Rep*, 2013, 30(2): 824-832 [2017-04-10]. <https://www.spandidos-publications.com/or/30/2/824>. DOI: 10.3892/or.2013.2502.
- [9] LI H, HUANG K, GAO L, et al. TES inhibits colorectal cancer progression through activation of p38[J/OL]. *Oncotarget*, 2016, 7 (29): 45819-45836 [2017-04-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5216763/>. DOI: 10.18632/oncotarget.9961.
- [10] ZHONG Z, ZHANG F, YIN S C. Effects of TESTIN gene expression on proliferation and migration of the 5-8F nasopharyngeal carcinoma cell line[J/OL]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(6): 2555-2559 [2017-04-10]. <http://www.koreascience.or.kr/journal/About-Journal.jsp?kojic=POCPA9>. DOI: 10.7314/APJCO.2015.16.6.2555.
- [11] WEEKS R J, LUDGATE J L, LEMEE G, et al. TESTIN induces rapid death and suppresses proliferation in childhood B acute lymphoblastic leukaemia cells[J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11(3):e0151341 [2017-04-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4795691/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0151341.
- [12] PENG T R, TSAI F P, WU T W. Indirect comparison between pembrolizumab and nivolumab for the treatment of non-small cell lung cancer: a meta-analysis of randomized clinical trials[J/OL]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 49:85-94[2017-04-10]. <http://sciencedirect.com/science/journal/15675769>. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.05.019.
- [13] CHENG C K, CHEUNG C H, LEE W M. Mouse testin: complementary DNA cloning, genomic organization, and characterization of its proximal promoter region[J]. *Biol Reprod*, 2003, 68(4): 1376-1386. DOI:10.1095/biolreprod.102.011205.
- [14] GRIMA J, ZHU L, CHENG C Y. Testin is tightly associated with testicular cell membrane upon its secretion by sertoli cells whose steady-state mRNA level in the testis correlates with the turnover and integrity of inter-testicular cell junctions[J/OL]. *J Biol Chem*, 1997, 272(10): 6499-6509 [2017-04-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/567/>.
- [15] GRIMA J, ZHU L J, ZONG S D, et al. Rat testin is a newly identified component of the junctional complexes in various tissues whose mRNA is predominantly expressed in the testis and ovary[J]. *Biol Reprod*, 1995, 52(2): 340-355. PMID:7711203.
- [16] GU Z, DING G, LIANG K, et al. TESTIN suppresses tumor growth and invasion via manipulating cell cycle progression in endometrial carcinoma[J/OL]. *Med Sci Monit*, 2014, 20: 980-987[2017-04-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4067424/>. DOI:10.12659/MSM.890544.
- [17] QIU H, ZHU J, YUAN C, et al. Frequent hypermethylation and loss of heterozygosity of the testin derived transcript gene in ovarian cancer[J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(5): 1255-1260. DOI:10.1111/j.1349-7006.2010.01497.x.

[收稿日期] 2017-04-12

[修回日期] 2017-06-21

[本文编辑] 党瑞山

欢迎订阅《中国肿瘤生物治疗杂志》