

香烟提取物对人非小细胞肺癌细胞系侵袭力及 MTA1 表达的影响

杨雪飞¹, 毛晓韵², 范垂锋³, 黄挺¹

(1. 杭州市中医院, 浙江 杭州 310007; 2. 中国医科大学附属第一医院, 辽宁 沈阳 110001;

3. 中国医科大学基础医学院, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: [目的] 研究香烟提取物(CSE)对人非小细胞肺癌(NSCLC)细胞生物学行为的影响及可能机制。[方法] CSE处理 NSCLC 细胞系 A549、LH7 与 BE1, 对照组正常培养。Transwell 实验检测两组细胞的侵袭能力, RT-PCR 法和 Western blot 法检测两组细胞 MTA1 mRNA 及蛋白表达情况。[结果] CSE 处理各 CSE 组细胞侵袭能力增加, 穿过膜细胞数明显高于对照组; 且各 CSE 组中 MTA1 mRNA 和蛋白表达水平也明显高于对照组 ($P < 0.05$)。[结论] 香烟提取物导致 NSCLC 细胞系侵袭能力增加与其促进 NSCLC 细胞系中 MTA1 mRNA 及蛋白表达有关。

关键词: 癌, 非小细胞肺; 肿瘤转移相关基因 1; 香烟提取物

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)11-0801-05

The Effect of Cigarette Smoke Extract on Cell Invasion and MTA1 Expression in Non-small Lung Cancer Cell Lines

YANG Xue-fei¹, MAO Xiao-yun², FAN Chui-feng³, et al.

(1. Hangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China; 2. The First Hospital of China Medical University, Shengyang 110001, China; 3. Basic Medical College of China Medical University, Shengyang 110001, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of cigarette smoke extract (CSE) on the biological behaviour of non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines and the possible mechanism. [Methods] NSCLC cell lines A549, LH7 and BE1 were treated with CSE, and the control group was not treated. Cell invasive ability was examined by Transwell method. The MTA1 mRNA and protein expression were detected by RT-PCR and Western blot assay. [Results] CSE up-regulated the cell invasive ability, the number of migration cells of hypoxia in CSE group was higher than that in control group ($P < 0.05$). The MTA1 mRNA and protein expression was up-regulated in the NSCLC cell lines with the treatment of CSE. The level was higher than that in control group ($P < 0.05$). [Conclusion] The CSE can up-regulate the invasive ability of NSCLC cell lines, which correlates to MTA1 mRNA and its protein expression.

Subject words: carcinoma, non-small cell lung; metastasis tumor antigen 1; cigarette smoke extract

肿瘤转移相关基因 1 (metastasis tumor antigen 1, MTA1) 是近年来新发现的一个与肿瘤浸润转移密切相关的基因, 研究表明其编码的 MTA1 蛋白在乳腺癌、食管癌、喉癌及卵巢癌等多种恶性肿瘤中高表达, 与肿瘤浸润与转移相关^[1-5]。本实验研究用香烟提取物(cigarette smoke extract, CSE)处理不同转移能力的人非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,

NSCLC) 细胞系后细胞侵袭能力及处理前后各细胞系 MTA1 mRNA 和蛋白表达水平的变化, 探讨香烟提取物对人 NSCLC 细胞生物学行为的影响及可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及细胞培养和分组

高转移能力的肺巨细胞肺癌 PG 细胞系亚系 BE1、低转移能力的肺巨细胞肺癌 PG 细胞系亚系

通讯作者: 黄挺, 主任, 教授, 硕士生导师, 博士; 杭州市中医院肿瘤科, 浙江省杭州市体育场路 453 号(310007); E-mail: bobo_770905@163.com。

收稿日期: 2012-07-16; **修回日期:** 2012-08-15

LH7、人肺腺癌细胞系 A549 均由中国医科大学病理学教研室保存, MTA1 鼠抗人单克隆抗体(SC-17779)和 β -actin 单克隆抗体(SC-47778)均购自美国 Santa cruz 公司。引物合成于上海生工生物有限公司, Taq 酶购自大连宝生物有限公司, Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司, 逆转录试剂盒购自美国 Fermentas 公司。细胞培养于含 15%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 37°C、5%CO₂ 和 95%O₂ 的培养箱中传代培养。本实验分为 CSE 组及对照组, CSE 组即为 CSE 处理 NSCLC 细胞系 BE1、LH7 与 A549 组, 对照组则为正常培养未处理组。

1.2 CSE 的制备

CSE 参照 Carp 与 Janoff 提供的方法^[6]: 两支去滤嘴的香烟, 每支尼古丁含量 1.3mg, 焦油含量 15mg, 将其完全燃烧产生的烟雾溶于 50ml 无血清 RPMI 1640 培养基中, 调整 pH 值后用 0.22 μ m 微孔滤器(Milipore, 美国)过滤去除细菌和大颗粒备用, 此培养基为 100% CSE, CSE 浓度用终容积中此培养基的所占百分比来表示。

1.3 CSE 毒性试验

选取对数生长期的 3 种 NSCLC 细胞, 接种于 96 孔培养板待其贴壁后, 分为 CSE 组和对照组(无 CSE 的 1640 培养液), CSE 组按每孔 CSE 的终浓度分设 5 个浓度亚组(CSE 浓度分别为 10%、20%、40%、60%与 100%), 每组设 6 个复孔, 对照组加入等量无 CSE 的 1640 培养液。37°C、5%CO₂ 的培养箱连续培养 16h 后每孔加入 20 μ l (5mg/ml) 的 MTT 溶液, 继续培养 4h 后弃上清加入 DMSO, 用酶标仪测定 490nm 处各孔的吸光度值(A)。CSE 作用浓度选择非常重要, 我们采用 MTT 法筛选 CSE 对于所选择 NSCLC 细胞系作用浓度, 其浓度选取标准为与阴性对照相比其生存率无明显统计学差异的最大浓度。

1.4 用 CSE 处理不同转移能力的 NSCLC 细胞系

取对数生长期 NSCLC 细胞系接种于培养皿中, 待其贴壁后弃培养液, CSE 组加入 CSE 的 1640 培养基, 对照组加入无血清 1640 培养基, 均在 37°C、5%CO₂ 的培养箱连续培养 16h。处理结束后, 弃培养液, 并用温 PBS 冲洗 2 次。

1.5 NSCLC 细胞系侵袭能力的检测

采用 Transwell 小室实验, CSE 处理组与对照组

细胞系用无血清培养基饥饿后, 将细胞浓度调整为 1 \times 10⁶/ml, 取 200 μ l 细胞悬液接种于铺满 Matrigel 胶的 Transwell 趋化小室上室。对照组于 37°C、5%CO₂ 的培养箱中培养, 实验组于 7.5%CO₂、2.5%O₂ 和 90%N₂ 的缺氧培养箱中培养, 均培养 24h。乙醇固定后结晶紫染色, 显微镜下计数并拍照。以视野下穿过滤膜的细胞了解细胞侵袭能力。

1.6 RT-PCR 检测 NSCLC 细胞系 MTA1 mRNA 表达情况

用 0.25%胰蛋白酶消化 CSE 处理组细胞与对照组细胞, Trizol 试剂提取总 RNA, 逆转录、行 MTA1 及内参 GADPH 扩增, MTA1 引物: 正向 5'-AGC TACGAGCAGCACAACGGGGT-3', 反向 5'-CACGCT-TGGTTTCCGAGGAT-3', GADPH 引物: 正向 5'-CCGAGG-GCCCACTAAAGG-3', 5'-GCTGT-TGAAGTCACAGGA-GACAA-3'。扩增条件: 94°C 变性 30s, 58°C 退火 30s, 72°C 延伸 30s, 进行 28 个循环, 最后 72°C 延伸 10min。将 PCR 产物在含有 0.1g/L 溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 用凝胶图像分析系统分析电泳结果, 计算 MTA1 产物与 GADPH 产物的光密度积分的比值, 定量分析 CSE 处理组细胞与对照组细胞 MTA1 mRNA 表达情况。

1.7 Western blot 检测 NSCLC 细胞系 MTA1 蛋白表达情况

CSE 处理组细胞与对照组细胞离心弃上清后提取蛋白并定量。蛋白变性后行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 并转膜(湿转), 脱脂奶粉室温封闭后分别与 MTA1 鼠抗人单克隆抗体(1:200)和 β -actin 单克隆抗体(1:500)室温作用 3h, 与辣根过氧化物酶标记的二抗室温作用 1h, 采用化学发光法显示蛋白质条带, 用 Bio-Rad 图像分析系统照相, 以 MTA1 蛋白条带积分灰度值(IDV)与 β -actin 蛋白条带 IDV 比值为 MTA1 相对蛋白含量。

1.8 统计学处理分析

采用 SPSS13.0 统计软件包处理数据。计数资料采用 χ^2 检验, 相关分析采用 Spearman 相关分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CSE 对各组 NSCLC 细胞系生存率的影响

结果见表 1, 发现 CSE 浓度为 10% 或 20% 时各

组细胞 A₄₉₀ 与对照组相比,无明显统计学差异,其他浓度时 A₄₉₀ 有统计学差异。故取 20% 为 CSE 作用浓度。

表 1 不同浓度 CSE 对各组 NSCLC 细胞系生存率的影响

组别	A ₄₉₀		
	A549	LH7	BE1
对照组	0.875±0.138	0.627±0.078	0.725±0.103
CSE 10%	0.823±0.097	0.609±0.095	0.720±0.189
CSE 20%	0.761±0.123	0.601±0.111	0.711±0.082
CSE 40%	0.647±0.155*	0.499±0.033*	0.645±0.063
CSE 60%	0.432±0.093*	0.487±0.062*	0.598±0.081*
CSE 100%	0.372±0.278*	0.406±0.083*	0.591±0.076*

*: 与对照组相比,有统计学差异(P<0.05)。

2.2 CSE 对各组 NSCLC 细胞侵袭能力的影响

Transwell 侵袭实验表明高转移能力的肺巨细胞肺癌 PG 细胞系亚系 BE1、低转移能力的肺巨细胞肺癌 PG 细胞系亚系 LH7、人肺腺癌细胞系 A549 的每高倍视野下穿膜细胞数依次减少,侵袭能力依次下降,CSE 处理后 3 个 NSCLC 细胞系每高倍视野下穿膜细胞数明显高于对照组(P<0.05),侵袭能力均有不同程度增加(图 1)。

2.3 CSE 对各组细胞 MTA1 mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示 MTA1 mRNA 在不同 NSCLC 细胞系中表达情况(图 2),其在高转移能力的 BE1 细胞系中表达最高,其次为低转移能力的 LH7,其在 A549 中表达最弱。经过 CSE 处理后,3 组细胞系 MTA1 mRNA 表达明显高于各系细胞对照组

(P<0.05)。且 Spearman 相关分析示各组细胞系 MTA1 mRNA 表达与其细胞侵袭能力明显相关($r=0.927, P<0.01$),结果见表 2。

2.4 CSE 对各组细胞 MTA1 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示 MTA1 蛋白在不同 NSCLC 细胞系中表达情况(图 2),其在高转移能力的 BE1 细胞系中表达最高,其次为低转移能力的 LH7,其在 A549 中表达最弱。经过 CSE 处理后,3 组细胞系 MTA1 蛋白表达明显高于各系细胞对照组(P<0.05)。Spearman 相关分析示各组细胞系 MTA1 蛋白表达与其细胞侵袭能力明显相关($r=0.946, P<0.01$),结果见表 2。

3 讨论

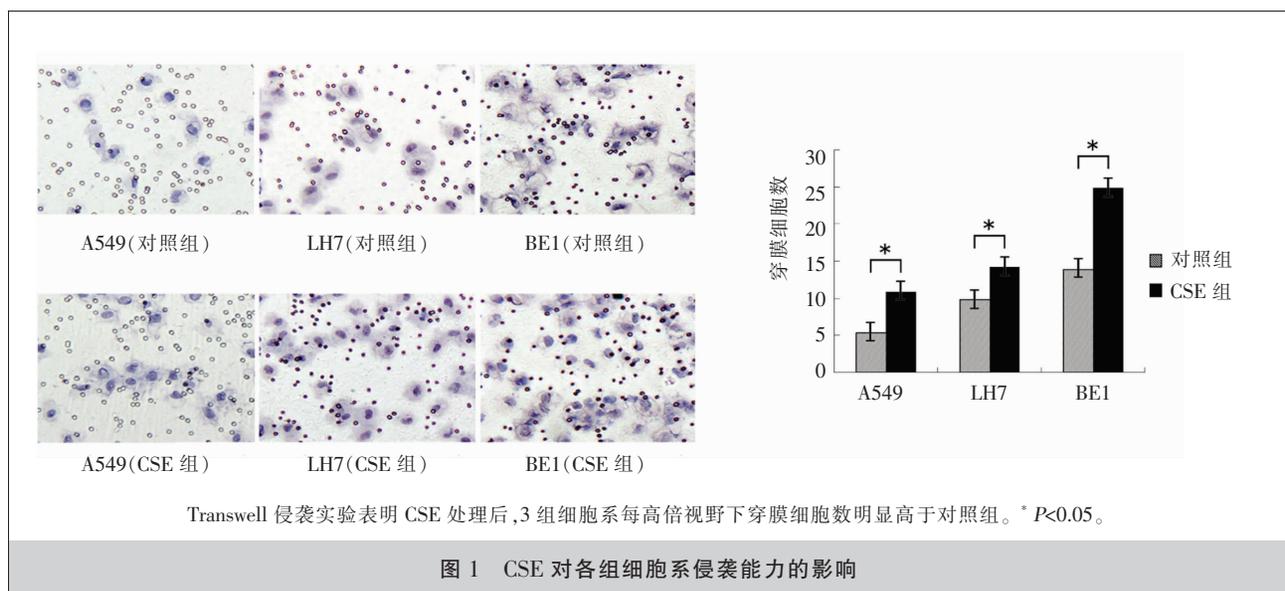
NSCLC 是肺癌最常见的病理类型,其早期诊断困难,发现时部分肿瘤已出现转移,5 年生存率低^[7,8]。MTA1 是一个肿瘤转移相关基因,由 Toh 等^[9]运用差异 cDNA 杂交技术从大鼠的高转移乳腺癌细胞系 13672NF 中筛选出的一个与肿瘤细胞浸润转

表 2 不同 NSCLC 细胞系 MTA1 mRNA 和蛋白表达与侵袭能力的相关分析

项目	A549		LH7		BE1	
	对照组	CSE 组	对照组	CSE 组	对照组	CSE 组
侵袭能力(穿膜细胞数)	5.32	10.78	9.77	14.09	13.89	24.85
MTA1 mRNA 表达*	0.383	0.501	0.484	0.838	0.765	1.001
MTA1 蛋白表达 [△]	0.477	0.622	0.516	1.030	0.739	1.380

*: MTA1 mRNA 表达与细胞侵袭能力明显相关, $r=0.927, P<0.01$;

[△]: MTA1 蛋白与细胞侵袭能力明显相关, $r=0.946, P<0.01$ 。



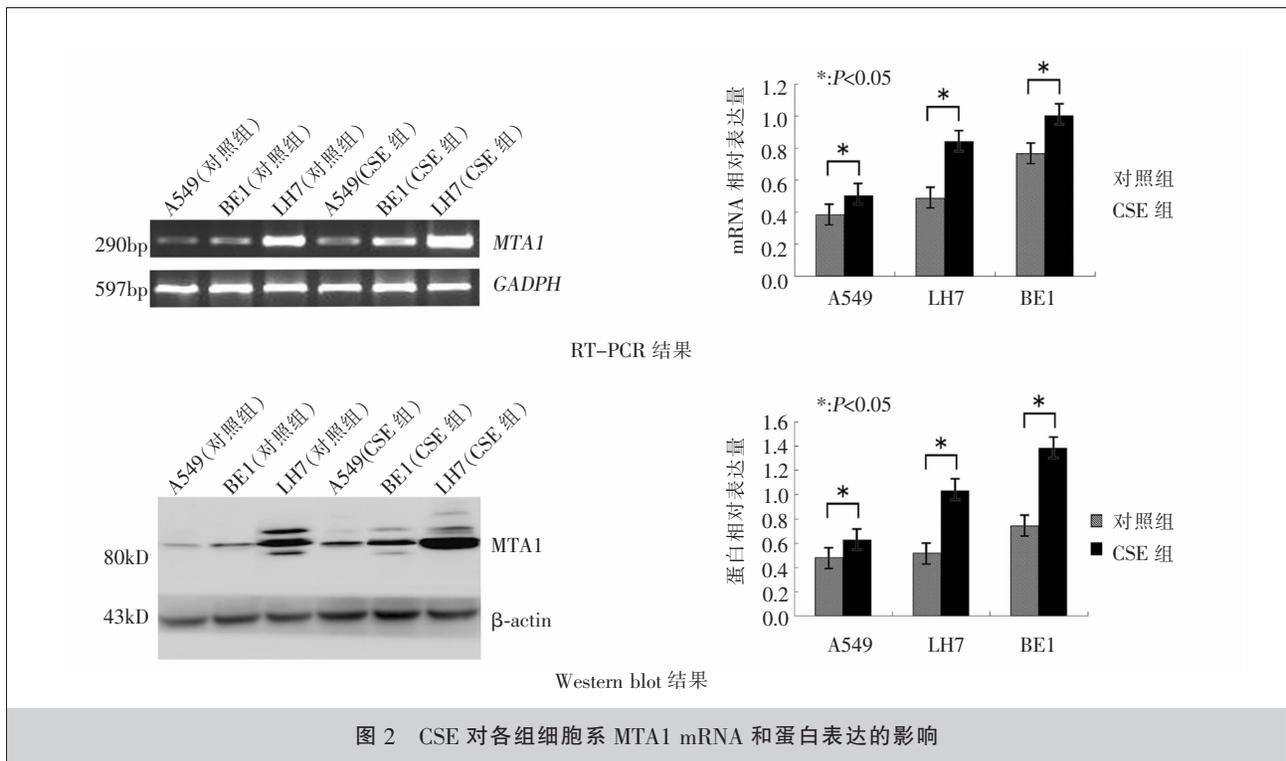


图 2 CSE 对各组细胞系 MTA1 mRNA 和蛋白表达的影响

移密切相关的基因，随后在人的高转移乳腺癌细胞株中发现与其对应的人类同源 *MTA* 基因。人类 *MTA1* 位于 14q32.3 上，全长 2.2kb，cDNA 全长 2 756bp，其编码蛋白含 715 个氨基酸残基。近年来发现 *MTA1* 与人类一些恶性肿瘤的侵袭转移过程紧密相关，如胃癌、食管癌、肝癌及卵巢癌等，细胞实验表明 *MTA1* 是核小体重构及组蛋白脱乙酰基酶复合物 (nucleosome remodeling and histone deacetylase, NuRD) 的一个亚单位，其通过对靶基因的去乙酰化作用，使一些癌细胞向更具有侵袭性表型转化^[10-12]。众所周知吸烟是 NSCLC 发生发展的危险因素，我们在前期研究中发现 *MTA1* 蛋白表达在 NSCLC 组织中表达水平显著高于癌旁正常组织，与患者淋巴结转移及高临床分期显著相关，且与 NSCLC 吸烟史有关^[13]，目前尚无其他研究提示在有吸烟史的 NSCLC *MTA1* 表达高的原因，值得进一步研究。本研究进一步发现 *MTA1* mRNA 和蛋白表达与 NSCLC 细胞系转移能力呈正相关，为了了解吸烟在 NSCLC 发展中的作用，我们进一步用 CSE 处理不同转移能力细胞系发现，CSE 可以增加 NSCLC 细胞系侵袭能力和 *MTA1* mRNA 和蛋白表达水平，但关于其作用机制不明确。现有的研究表明 *MTA1* 蛋白的作用可能

主要是其与组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs) 结合形成 NuRD 复合物，促进核小体重构与组蛋白脱乙酰活性，从而抑制某些肿瘤抑制基因的转录表达^[14]。Moon 等^[15]研究发现 HDAC1/*MTA1* 复合物能使 HIF-1 α 去乙酰化，增加了 HIF-1 α 的转录活性与蛋白稳定性，且认为 *MTA1* 与 HIF-1 α 诱导的肿瘤血管形成密切相关。Zhang 等^[16]用 Western blot 与 ELISA 研究 NSCLC 细胞系 A549 与 H157，发现用尼古丁处理其可以导致细胞中 HIF-1 α 与其下游靶基因 *VEGF* 表达上调，而沉默 HIF-1 α 对尼古丁导致的细胞侵袭性增加有一定的对抗作用。Takeuchi 等^[17]报道用 CSE 处理 Wistar 雄性大鼠 12 周，其血中 HIF-1 α 水平增加。我们用 CSE 处理 NSCLC 细胞系后，发现明显增加了 NSCLC 细胞系侵袭能力，且 *MTA1* mRNA 表达水平明显上调，其转录增加导致蛋白表达增加，推论可能影响 HIF-1 α 的表达，进而与 NSCLC 的发生发展有关。

综上，*MTA1* 的高表达已显示与多种恶性肿瘤的侵袭力密切相关。我们前期研究发现 *MTA1* 蛋白表达与 NSCLC 患者吸烟史相关，进一步地在 NSCLC 细胞系实验上也证实 CSE 可以导致细胞系 *MTA1* mRNA 表达增加，尼古丁可能通过 *MTA1* 起

作用,引起其下游基因改变,导致肿瘤侵袭能力增加,使 NSCLC 发生发展。所以进一步研究吸烟与 NSCLC *MTA1* 及其下游基因表达间的相互作用,对于了解 NSCLC 发生发展机制有重要作用。

参考文献:

- [1] Kai L, Wang J, Ivanovic M, et al. Targeting prostate cancer angiogenesis through metastasis-associated protein 1 (MTA1)[J]. *Prostate*, 2011, 71(3):268–280.
- [2] Hofer MD, Chang MC, Hirko KA, et al. Immunohistochemical and clinicopathological correlation of the metastasis-associated gene 1 (MTA1) expression in benign and malignant pancreatic endocrine tumors[J]. *Mod Pathol*, 22(7):933–939.
- [3] Kawasaki G, Yanamoto S, Yoshitomi I, et al. Overexpression of metastasis-associated MTA1 in oral squamous cell carcinomas: correlation with metastasis and invasion[J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2008, 37(11):1039–1046.
- [4] Sharma G, Mirza S, Parshad R, et al. Clinical significance of Maspin promoter methylation and loss of its protein expression in invasive ductal breast carcinoma: correlation with VEGF-A and MTA1 expression[J]. *Tumour Biol*, 2011, 32(1):23–32.
- [5] Prisco MG, Zannoni GF, De Stefano I, et al. Prognostic role of metastasis tumor antigen 1 in patients with ovarian cancer: a clinical study[J]. *Hum Pathol*, 2012, 43(2):282–288.
- [6] Carp H, Janoff A. Possible mechanisms of emphysema in smokers. In vitro suppression of serum elastase-inhibitory capacity by fresh cigarette smoke and its prevention by antioxidants[J]. *Am Rev Respir Dis*, 1978, 118(3):617–621.
- [7] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009[J]. *CA Cancer J Clin*, 2009, 59(4):225–249.
- [8] Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International association for the study of lung cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma[J]. *J Thorac Oncol*, 2011, 6(2):244–285.
- [9] Toh Y, Pencil SD, Nicolson GL. A novel candidate metastasis-associated gene, *mta1*, differentially expressed in highly metastatic mammary adenocarcinoma cell lines. cDNA cloning, expression, and protein analyses[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(37):22958–22963.
- [10] Marzook H, Li DQ, Nair VS, et al. Metastasis-associated protein 1 drives tumor cell migration and invasion through transcriptional repression of RING finger protein 144A[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(8):5615–5626.
- [11] Ghanta KS, Pakala SB, Reddy SD, et al. MTA1 coregulation of transglutaminase 2 expression and function during inflammatory response[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(9):7132–7138.
- [12] Cong L, Pakala SB, Ohshiro K, et al. SUMOylation and SUMO-interacting motif (SIM) of metastasis tumor antigen 1 (MTA1) synergistically regulate its transcriptional repressor function[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(51):43793–43808.
- [13] 范垂锋, 毛晓韵, 王恩华. 非小细胞肺癌 MTA1 的表达及临床意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2012, 20(3):459–462.
- [14] Higashijima J, Kurita N, Miyatani T, et al. Expression of histone deacetylase 1 and metastasis-associated protein 1 as prognostic factors in colon cancer [J]. *Oncol Rep*, 2011, 26(2):343–348.
- [15] Moon HE, Cheon H, Chun KH, et al. Metastasis-associated protein 1 enhances angiogenesis by stabilization of HIF-1alpha[J]. *Oncol Rep*, 2006, 16(4):929–935.
- [16] Zhang Q, Tang X, Zhang ZF, et al. Nicotine induces hypoxia-inducible factor-1alpha expression in human lung cancer cells via nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling pathways[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(16):4686–4694.
- [17] Takeuchi Y, Takahashi M, Fuchikami J. Vulnerability of gastric mucosa to prednisolone in rats chronically exposed to cigarette smoke[J]. *J Pharmacol Sci*, 2008, 106(4):585–592.