

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.09.007

# 慢病毒介导 ITGB4 shRNA 对 H460SM 细胞增殖的抑制作用

陈 艳,周永春\*,金从国,伍治平,刘 馨,陈晓群,李 佳,王熙才

## Inhibition of Lentivirus-mediated ITGB4 shRNA on H460SM Cell Proliferation

Chen Yan, Zhou Yongchun\*, Jin Congguo, Wu Zhiping, Liu Xin, Chen Xiaoqun, Li Jia, Wang Xicai

Yunnan Tumor Institute, The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University (Tumor Hospital of Yunnan Province), Kunming 650118, China (\* : Tied of The First Author)

Corresponding Author: Wang Xicai, E-mail: wangxc2005323@126.com

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of  $\beta 4$  integrin gene silencing on the proliferation of human lung carcinoma variant cell line H460SM was investigated *in vitro* to further provide new targets for early diagnosis and treatment of non-small cell lung cancer. **Methods**  $\beta 4$  integrin gene expression was detected by quantitative reverse transcriptase PCR, and the cellular morphology was identified by microscope. Tumor cells growth was detected by MTS assay *in vitro*. Furthermore, the changes of cell cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry. **Results** Compared with negative control of shRNA-transduced H460SM cells (H460SM-NS),  $\beta 4$  integrin gene expressions in two different H460SM cells with integrin  $\beta 4$ -specific shRNA (H460SM68 and H460SM71) were statistically down-regulated ( $P < 0.01$ ). The growth rates of H460SM cells with stably expressing integrin  $\beta 4$ -specific shRNA significantly were decreased compared with negative control ( $P < 0.05$ ). Knockdown of  $\beta 4$  integrin by two different shRNAs led to significantly increase in apoptotic rate as compared with negative control ( $P < 0.01$ ). The proportion of H460SM cells with integrin  $\beta 4$ -specific shRNA in the  $G_0/G_1$  phase was significantly higher than that of negative control, suggesting that the cell proliferation was inhibited as blocking at  $G_1/S$  phase ( $P < 0.05$ ). PI value of H460SM cells with integrin  $\beta 4$ -specific shRNA was also lower than that of negative control ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Knockdown of  $\beta 4$  integrin expression in non-small cell lung cancer cells could inhibit *in vitro* cell proliferation. Furthermore,  $\beta 4$  integrin shRNA could induce cell apoptosis in H460SM cells. The possible mechanism of H460SM cell growth inhibition resulted from  $\beta 4$  integrin might be related to cell cycle arrest.

**Key words:** Non-small cell lung cancer;  $\beta 4$  integrin; Cell proliferation; Cell apoptosis; Cell cycle

**摘要:** 目的 体外实验研究  $\beta 4$  整合素 shRNA 对非小细胞肺癌 H460SM 细胞增殖的抑制作用,为非小细胞肺癌早期诊断和治疗提供新的靶点。方法 实时定量 RT-PCR 验证  $\beta 4$  整合素表达水平的变化,显微镜下观察细胞形态的变化。通过细胞计数和 MTS 实验分析抑制  $\beta 4$  整合素表达对 H460SM 细胞增殖的影响;流式细胞术分析抑制  $\beta 4$  整合素表达对 H460SM 细胞凋亡和细胞周期的影响。结果 与阴性对照组(H460SM-NS)比较,稳定表达  $\beta 4$  整合素 shRNA 的实验组(H460SM-68、H460SM-71)细胞  $\beta 4$  整合素表达水平明显降低( $P < 0.01$ );与阴性对照组比较,实验组细胞的增殖受到明显抑制( $P < 0.05$ );实验组细胞凋亡率明显高于阴性对照组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );实验组细胞增殖指数 PI 明显低于阴性对照组( $P < 0.05$ ), $G_0/G_1$  期细胞数明显高于阴性对照组( $P < 0.05$ ),提示抑制  $\beta 4$  整合素的表达,细胞周期可能被阻滞在  $G_1/S$  检测点,导致细胞增殖受到抑制。结论 抑制  $\beta 4$  整合素的表达,可以抑制非小细胞肺癌 H460SM 细胞增殖,并可能诱导 H460SM 细胞凋亡。癌细胞增殖受到抑制可能与细胞周期调控有关。抑制  $\beta 4$  整合素的表达,可能

不影响非小细胞肺癌细胞凋亡。

**关键词:** 非小细胞肺癌;  $\beta 4$  整合素; 细胞增殖; 细胞凋亡; 细胞周期

**中图分类号:** R734.2; R73-35; R73-37

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-8578(2012)09-1070-06

## 0 引言

肺癌已成为发病率和死亡率最高、严重威胁人

收稿日期:2011-11-11;修回日期:2012-03-28

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81060177);云南省应用基础研究基金资助项目(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(人社厅[2010]412号);云南省卫生科技资助项目(2009NS079)

作者单位:650118 昆明,昆明医科大学第三附属医院 云南省肿瘤医院肿瘤研究所

通信作者:王熙才,E-mail: wangxc2005323@126.com

作者简介:陈艳(1973-),女,硕士,副研究员,主要从事肿瘤分子生物治疗、肿瘤复发转移机制的研究;周永春(1976-),女,硕士,主治医师,主要从事肺癌的基础与临床研究(\*:并列第一作者)

们生命和健康的重大疾病之一。非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 大约占肺癌 80%~85%。NSCLC 首选的治疗方法是外科治疗或以外科治疗为主的综合治疗,但大约 80% 的患者就诊时已丧失外科手术和多学科根治的机会。导致肺癌治疗失败和患者死亡的主要原因是侵袭和转移<sup>[1]</sup>。整合素属于跨膜蛋白细胞黏附分子家族,主要介导细胞-细胞、细胞-细胞外基质之间的黏附,通过信号转导通路影响肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭、血管生成等恶性生物学行为,在肿瘤侵袭和转移中发挥着重要作用<sup>[2]</sup>。 $\beta_4$  整合素,即 CD104,与  $\alpha_6$  整合素(CD49f)形成  $\alpha_6\beta_4$  整合素,主要以层黏连蛋白 5 为配体,参与形成半桥粒。与其他整合素  $\beta$  亚单位不同, $\beta_4$  整合素结构上具有 III 型纤维黏连蛋白 (fibronectin, FN) 重复序列形成的非典型细胞质结构域(约 1 000 个氨基酸),最初被认为是一种肿瘤特异性蛋白 (TSP180),在多种肿瘤如乳腺癌<sup>[3]</sup>、胰腺癌<sup>[4]</sup>、乳头状甲状腺癌<sup>[5]</sup>、大肠癌<sup>[6]</sup>组织中表达上调,而在前列腺癌<sup>[7]</sup>组织中表达则下调,这种表达的异质性可能受  $\beta_4$  整合素启动子甲基化和组蛋白修饰的调控<sup>[8]</sup>。 $\beta_4$  整合素表达异常与肿瘤细胞增殖、凋亡、血管生成、侵袭和转移密切相关<sup>[3,9-10]</sup>。目前,关于  $\beta_4$  整合素在非小细胞肺癌进展中的作用及其机制的研究报道较少。我们研究结果显示,早期非小细胞肺癌组织和多数非小细胞肺癌细胞株中, $\beta_4$  整合素在转录水平和蛋白水平上表达异常。本研究通过应用慢病毒介导的 shRNA 干扰技术,沉默 H460SM 中  $\beta_4$  整合素的表达,研究抑制  $\beta_4$  整合素表达对非小细胞肺癌 H460SM 细胞增殖的影响,为进一步研究  $\beta_4$  整合素在非小细胞肺癌发生发展中的作用机制奠定基础,为非小细胞肺癌早期诊断和治疗新靶标确定提供客观依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

非小细胞肺癌细胞株 H460SM 由加拿大安大略癌症研究所 Dr Ming-sound Tsao 实验室惠赠;稳定表达  $\beta_4$  整合素 shRNA 的非小细胞肺癌细胞株 (H460SM-68、H460SM-71) 和阴性对照细胞株 H460SM-NS 由本实验室人员在加拿大安大略癌症研究所构建,并在本实验室保存;Trizol 试剂购自 Ambion 公司;cDNA 合成和定量 PCR 试剂盒购自 Bio-Rad 公司; $\beta_4$  整合素单抗购自 R&D 公司;GAPDH 单抗购自 Cell Signaling 公司;protease inhibitor cocktail 购自 Roche 公司;Bio-Rad 蛋白质定量分析试剂盒和预染蛋白质分子量标准购自 Bio-Rad 公司;ECL Plus 购自 Amersham 公司;RP-

MI1640 培养液和胎牛血清为 Gibco 公司产品;嘌呤霉素 (puromycin) 购自 Sigma 公司;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 Coulter 公司;选择性琼脂购自 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 方法

**1.2.1 细胞培养** H460SM 细胞用含 10% 胎牛血清 RPMI 培养液培养。阴性对照细胞株 (H460SM-NS)、实验组细胞株 (H460SM-68 和 H460SM-71) 均用含 10% 胎牛血清、0.6  $\mu$ g/ml 嘌呤霉素的 RPMI1640 培养液,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下培养,待细胞培养至 80% 融合,显微镜下观察细胞,比较细胞形态学上的差异,并拍照。

**1.2.2 实时定量 RT-PCR 和 Western blot 检测  $\beta_4$  整合素 mRNA 表达水平** 按 Trizol 试剂操作说明书提取总 RNA,加无 RNA 酶、DEPC 处理过的去离子水溶解 RNA。核酸蛋白检测仪 (Bio-Rad 公司) 检测 RNA 纯度, RNA 电泳检测 RNA 的完整性。按试剂盒说明书合成 cDNA,同时设空白对照、阴性对照及阳性对照。引物序列,由 Invitrogen 公司合成,见表 1。按 SYBGreen 试剂盒 (Bio-Rad) 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℃ 预变性 5 min, 95℃ 15 s, 60℃ 15 s, 40 个循环。实验重复三次。以 H460SM-NS 作为校正组,将各样本 Ct 值代入公式: mRNA 相对表达量 =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , 其中  $\Delta\Delta Ct = [\text{目的基因的平均 Ct 值(样本组)} - \text{内参的平均 Ct 值(样本组)}] - [\text{目的基因的平均 Ct 值(校正组)} - \text{内参的平均 Ct 值(校正组)}]$ 。

使用蛋白裂解液,裂解贴壁细胞,测定蛋白样品浓度。配制 SDS-PAGE 凝胶后,在蛋白样品中加入适量 5×上样缓冲液,沸水浴加热 3~5 min,冷却到室温后,把蛋白样品直接上样到 SDS-PAGE 胶加样孔内即可。同时使用预染蛋白质分子量标准。当溴酚蓝到达胶的底端处附近停止电泳。选用 PVDF 膜,使用 Bio-Rad 公司标准湿式转膜装置转膜,转膜时间为 30~60 min。丽春红染色液对膜进行染色,观察转膜效果。加入封闭液,在摇床上缓慢摇动,室温封闭 60 min。参考一抗的说明书,按照适当比例用一抗稀释液稀释一抗。4℃ 在侧摆摇床上缓慢摇动孵育过夜。洗涤 3 次,参考二抗的说明书,按照适当比例用二抗稀释液稀释二抗,在侧摆摇床上缓慢摇动室温孵育 1 h。洗涤 3 次,使用 ECL Plus 试剂来检测蛋白,用显影定影试剂盒自行配制显影液和定影液进行手工洗片。

表 1 RT-PCR 扩增引物序列

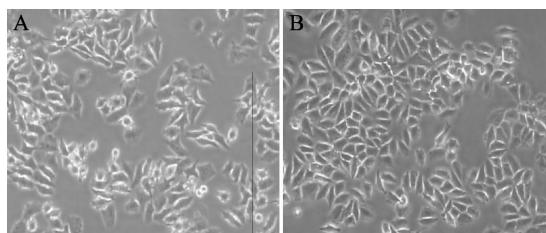
Table 1 Sequences of primers of RT-PCR

Gene	Sequence
h-RPS13-F	5'-GTTGCTGTCGAAAGCATCTTG-3'
h-RPS13-R	5'-AATATCGAGCCAAACGGTGAA-3'
h-ITGA6-F	5'-CACCGGGATCGAGTTGAT-3'
h-ITGA6-R	5'-TATCGGTGAGCACATGTCACG-3'
h-ITGB4-F	5'-CTACGAGGGTCAGTTCTGCG-3'
h-ITGB4-R	5'-GGTGGATCGCCGAGTAGTT-3'

1.2.3 细胞计数法测定细胞增殖 细胞以  $1.0 \times 10^4$  个/孔接种于 24 孔培养板中, 置  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  浓度的细胞培养箱中培养, 每天计数 1 次, 锥虫蓝染色后, 在显微镜下直接计数。每组计数 3 孔, 取平均值, 连续计数 8 天。以横轴为天数, 纵轴为细胞数, 绘制出生长曲线。

1.2.4 MTS 法测定细胞增殖 将处于对数生长期的各组细胞, 通过细胞计数, 使每孔细胞数为  $1.0 \times 10^2$  个, 分别接种于 96 孔培养板上, 每组细胞设 5 个重复孔, 放在  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  浓度的细胞培养箱中孵育 4 h、2 天、5 天、7 天。按 MTS 细胞增殖检测试剂盒操作说明书进行 MTS 比色法, 培养结束后, 每孔加入  $20 \mu\text{l}$  MTS/PMS 混合液, 反应 1 h 后, 用酶标仪(Bio-Rad 公司)测定  $490 \text{ nm}$  处吸光度值。实验重复 3 次。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期 参考试剂盒说明书, 收集对数生长期细胞, 制备单细胞悬液, 调整细胞数为  $1 \times 10^6 / \text{ml}$ , PBS 洗涤 2 次, 室温 1500 r/min 离心 5 min, 加入 70% 酒精 1 ml 固定细胞, 保存于  $4^\circ\text{C}$ 。24~72 h 内用 PBS 洗涤 1 次, 室温 1500 r/min 离心 5 min。采用碘化丙啶(PI)一步插入性 DNA 定量荧光染色法, 染色液中含  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  PI、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  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:  $\text{PI}(\%) = (\text{S} + \text{G}_2/\text{M})/(\text{G}_0/\text{G}_1 + \text{S} + \text{G}_2/\text{M}) \times 100\%$  计算细胞增殖指数。实验重复 3 次。



A: H460SM(negative control group); B: H460SM-NS(negative control group);

C: H460SM-68(test group); D: H460SM-71(test group)

图 1 倒置显微镜下稳定表达  $\beta 4$  整合素 shRNA 的 H460SM 细胞形态( $\times 100$ )Figure 1 The cellular morphology of integrin  $\beta 4$  shRNA stably transduced H460SM cells by microscope( $\times 100$ )

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。数据以均数  $\pm$  标准差表示, 组间资料比较用单因素方差分析(One Way ANOVA)和  $t$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

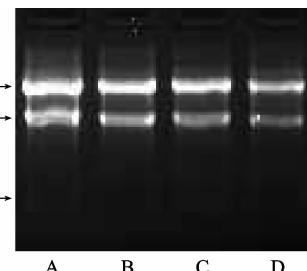
## 2 结果

### 2.1 稳定表达 $\beta 4$ 整合素 shRNA 的 H460SM 细胞形态

倒置显微镜下观察稳定表达  $\beta 4$  整合素 shRNA 的 H460SM 细胞的形态, 实验组和对照组的细胞在形态学上没有明显差异, 见图 1。

### 2.2 实时定量 RT-PCR 和 Western blot 检测 $\beta 4$ 整合素表达水平的变化

2.2.1 总 RNA 提取 共提取 4 株细胞的总 RNA, 即亲本细胞株 H460SM、稳定表达非特异 shRNA 细胞株 H460SM-NS、稳定表达  $\beta 4$  整合素 shRNA 细胞株 H460SM-68 和 H460SM-71。总 RNA 的  $A_{260}/A_{280}$  在 1.9~2.1 之间, 提示所提取的 RNA 纯度较高。经 1% RNA 琼脂糖凝胶电泳检测, 提示所提取的 RNA 完整性好, 见图 2。

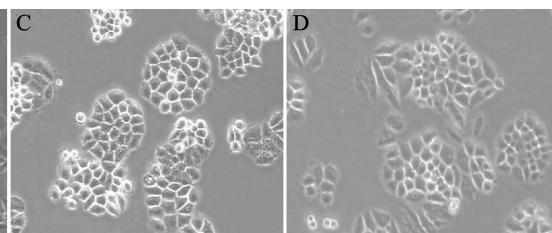


A: H460SM; B: H460SM-NS; C: H460SM-68; D: H460SM-71

图 2 稳定转染 IFGB4 shRNA 后 H460SM 细胞总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of total RNA from lentiviral integrin sh $\beta 4$ -H460SM transduced stable cell lines

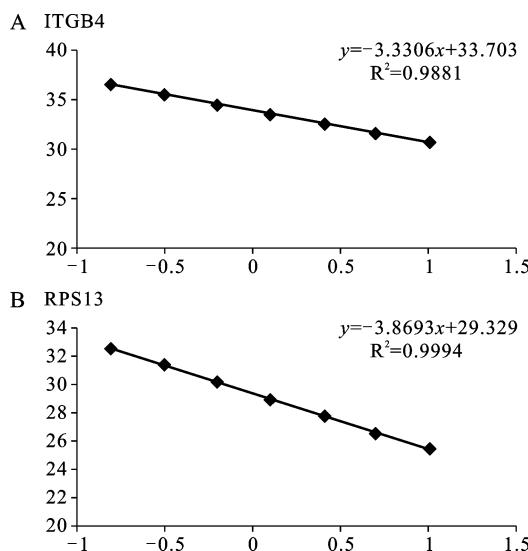
2.2.2  $\beta 4$  整合素的表达水平 将阳性标准品 cDNA 从 10 ng 开始倍比稀释, 进行实时定量 RT-PCR 扩增效率评价, 结果显示,  $\beta 4$  整合素和内参基因 RPS13 扩增曲线相关系数( $R^2$ )大于 0.98, 符合使用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  的方法分析 mRNA 相对表达量的前提条件, 见图 3。



A: H460SM(negative control group); B: H460SM-NS(negative control group);

C: H460SM-68(test group); D: H460SM-71(test group)

图 1 倒置显微镜下稳定表达  $\beta 4$  整合素 shRNA 的 H460SM 细胞形态( $\times 100$ )Figure 1 The cellular morphology of integrin  $\beta 4$  shRNA stably transduced H460SM cells by microscope( $\times 100$ )



A: amplification curve of ITGB4; B: amplification curve of RPS13

图 3 ITGB4 和 RPS13 实时定量 RT-PCR 扩增效率

Figure 3 qRT-PCR amplification efficiency of ITGB4 and RPS13

与阴性对照组(H460SM 和 H460SM-NS)比较,实验组细胞(H460SM-68 和 H460SM-71)中 $\beta 4$ 整合素的表达明显下调,差异有统计学意义( $P$ 均=0.000),见图 4、5。

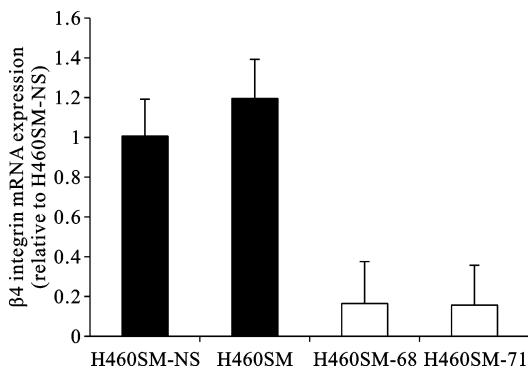


图 4 实时定量 RT-PCR 检测 $\beta 4$ 整合素 mRNA 表达水平

Figure 4 mRNA expression levels of  $\beta 4$  integrin detected by qRT-PCR

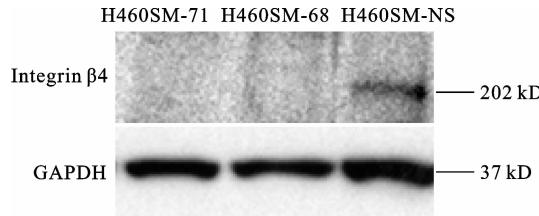


图 5 Western blot 检测 $\beta 4$ 整合素蛋白表达水平

Figure 5 Protein expression levels of  $\beta 4$  integrin detected by Western blot

## 2.3 稳定表达 $\beta 4$ 整合素 shRNA 对 H460SM 细胞增殖的影响

**2.3.1 细胞计数法分析稳定表达 $\beta 4$ 整合素 shRNA 对 H460SM 细胞增殖的影响** 从第 4 天计数开始,实验组细胞数分别 $[(2.95 \pm 0.06) \times 10^4$  个,  $(2.30 \pm 0.35) \times 10^4$  个]与阴性对照组 $[(3.67 \pm 0.29) \times 10^4$  个]比较,增殖速度明显受到抑制,差异有统计学意义( $P = 0.015, P = 0.001$ ),见图 6。

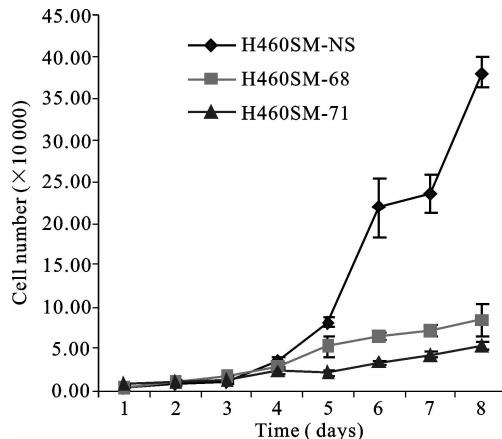


图 6 细胞计数法分析稳定表达 $\beta 4$ 整合素 shRNA 对 H460SM 细胞增殖的影响

Figure 6 Effects of lentiviral  $\beta 4$  integrin shRNA on H460SM cell proliferation detected by cell counting

**2.3.2 MTS 分析稳定表达 $\beta 4$ 整合素 shRNA 对 H460SM 细胞增殖的影响** MTS 测定结果显示,从第 2 天起实验组 490 nm 吸光度值分别 $(0.29 \pm 0.04, 0.22 \pm 0.02)$ 与阴性对照组 $(0.35 \pm 0.04)$ 比较,增殖速度明显受到抑制,差异有统计学意义( $P = 0.006, P = 0.000$ ),见图 7。

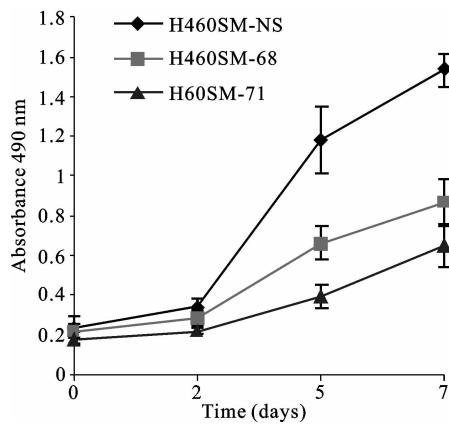


图 7 MTS 分析稳定表达 $\beta 4$ 整合素 shRNA 对 H460SM 细胞增殖的影响

Figure 7 Effects of lentiviral  $\beta 4$  integrin shRNA on H460SM cell proliferation analyzed by MTS assay

## 2.4 稳定表达 $\beta 4$ 整合素 shRNA 对 H460SM 细胞凋亡和细胞周期分布的影响

**2.4.1 流式细胞术检测细胞凋亡** 实验组(H460SM-68 和 H460SM-71)细胞凋亡率与对照组(H460SM-NS)比较,差异有统计学意义 $[(1.00 \pm$

0.10% vs. (1.34 ± 0.01%)、(2.44 ± 0.10%)] (P = 0.007, P = 0.000)。

**2.4.2 流式细胞术分析细胞周期** 实验组(H460SM-68 和 H460SM-71) 细胞增殖指数 PI 明显低于对照组(H460SM-NS) (P = 0.017, P = 0.01), G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞的比例明显高于对照组 (P = 0.012, P = 0.011), 见表 2。

**表 2 稳定表达  $\beta 4$  整合素 shRNA 对 H460SM 细胞周期分布的影响** ( $n = 3, \bar{x} \pm s, \%$ )

**Table 2 Effects of lentiviral  $\beta 4$  integrin shRNA on H460SM cell cycle** ( $n = 3, \bar{x} \pm s, \%$ )

Groups	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> (%)	G <sub>2</sub> /M(%)	S(%)	PI(%)
H460SM-NS	52.03 ± 9.69	16.50 ± 5.48	31.50 ± 14.81	46.53 ± 6.54
H460SM-68	73.56 ± 5.63*	15.90 ± 4.68	12.53 ± 7.15	27.40 ± 9.20*
H460SM-71	74.83 ± 7.84*	12.67 ± 2.38	12.47 ± 6.23	24.87 ± 5.16*

Note: \* :  $P < 0.05$ , H460SM-68 group or H460SM-71 group vs. H460SM-NS negative control group

### 3 讨论

我国第三次全国死因调查结果显示,肺癌已成为肿瘤死因的首位<sup>[1]</sup>。非小细胞肺癌中 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%,仍有约 1/3~1/4 的患者最终死于复发和转移。近年来,由于分子靶向治疗可以特异地作用于特定位点,而这些位点在正常细胞通常不表达或很少表达,其安全性和耐受性极好,不良反应轻微,临床应用具有较大的优势,引起了广泛的关注,寻找新的分子靶向治疗药物、方案和策略成为了关注的热点。整合素在肿瘤发生发展过程中起着重要作用,将整合素作为肿瘤治疗靶点的研究也已经取得了显著的进展。目前常采用针对整合素单克隆抗体、抑制剂、靶向调节整合素基因表达、整合素介导溶细胞作用以及整合素疫苗等策略,促进肿瘤细胞凋亡,阻断肿瘤细胞侵袭转移,抑制肿瘤血管的生成,从而达到治疗肿瘤的目的。随着整合素的结构和作用机制日益明确,针对整合素靶向作用成为了肿瘤诊断和治疗的新方向。

$\beta 4$  整合素相对分子质量为 190 kD, 只与  $\alpha 6$  整合素结合形成层黏连蛋白-5 的受体, 参与半桥粒形成, 维持上皮的完整性。作为跨膜糖蛋白受体, 其胞外域参与和细胞外基质配体分子的结合, 胞内域则与细胞内的信号系统和骨架成分等连接, 介导细胞信号的外传和细胞外信号的内传。 $\beta 4$  整合素基因敲除鼠因上皮缺陷而死亡, 基因突变与遗传性大疱性表皮松解症密切相关<sup>[12]</sup>。 $\beta 4$  整合素的表达模式

在肿瘤的发生、发展和转移中起着重要的作用。近年来的实验表明, 肿瘤常伴有  $\beta 4$  整合素表达异常, 包括表达水平的升高、降低或极性分布的变化。肿瘤发生常常和细胞极性丢失有关, 而  $\beta 4$  整合素在维持细胞极性中起到重要作用, 因此推测在肿瘤进展过程中,  $\beta 4$  整合素的表达量会下调。然而, 结果却发现在某些肿瘤中,  $\beta 4$  整合素表达上调, 而在某些肿瘤中却下调。某些恶性度高、转移能力强、预后差的肿瘤, 已有报道在胰腺癌<sup>[4]</sup>、骨肉瘤<sup>[10]</sup>组织中的表达与预后呈负相关, 而在某些肿瘤比如前列腺癌组织中表达下调<sup>[7]</sup>, 参与肿瘤细胞增殖、血管生成、凋亡、侵袭和转移等恶性表型<sup>[3,9-10]</sup>。有研究表明,  $\beta 4$  整合素对肿瘤侵袭性生长可能起着促进或抑制作用。 $\beta 4$  整合素能促进 p53 基因缺失的肿瘤细胞的存活, 而在具有野生型 p53 基因的细胞中, 却可以诱导细胞凋亡或自噬<sup>[13]</sup>。上述结果提示,  $\beta 4$  整合素与肿瘤发生发展的关系比较复杂, 在不同组织来源的肿瘤细胞中的作用及其机制可能存在差异。然而, 目前对于  $\beta 4$  整合素在非小细胞肺癌细胞增殖中的作用及其机制还不是很清楚。

H460SM 是从具有野生型 p53 基因的人大细胞肺癌细胞株 NCI-H460 筛选来的, 具有相同的遗传背景和不同生物学特性, H460SM 转移潜能比 NCI-H460 更高<sup>[14-15]</sup>。我们在以往的研究中发现, 早期非小细胞肺癌患者癌组织和多数非小细胞肺癌细胞株中  $\beta 4$  整合素表达上调, 而且在 H460SM 中呈高表达。shRNA 技术已被广泛应用于肿瘤基因治疗的研究<sup>[16]</sup>。我们能否通过慢病毒介导 shRNA 技术抑制 H460SM 中  $\beta 4$  整合素表达从而抑制肿瘤进展, 为非小细胞肺癌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  $\beta 4$  整合素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 RT-PCR、Western blot 检测结果提示, 相对于阴性对照组, 实验组细胞 (H460SM-68 和 H460SM-71) 中  $\beta 4$  整合素 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。通过倒置显微镜观察, 发现抑制  $\beta 4$  整合素表达对 H460SM 细胞形态影响不大。本研究还发现, 抑制  $\beta 4$  整合素表达可抑制 H460SM 细胞增殖, 但具体的分子机制有待于进一步研究。

周期检测点是细胞完成其周期或走向凋亡的“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<sup>[17]</sup>。本研究结果显示, 抑制  $\beta 4$  整合素在 H460SM 中的表达, 可以抑制癌细胞增殖。

癌细胞增殖受到抑制,可能是由于细胞周期阻滞在 G<sub>1</sub>/S 检测点所导致,有必要进一步深入研究具体作用机制。本研究结果还显示,抑制 β4 整合素的表达,可能诱导 H460SM 细胞凋亡,这与 Raymond 等<sup>[13]</sup>研究结果一致,但由于本研究仅仅采用碘化丙啶(PI)单染法流式细胞术检测细胞凋亡<sup>[18]</sup>,还有必要进一步深入研究,明确 β4 整合素 shRNA 对 H460SM 细胞凋亡的作用及其分子机制。

综上所述,本研究通过体外实验证实,抑制 β4 整合素的表达,可以抑制非小细胞肺癌 H460SM 细胞增殖,癌细胞增殖受到抑制可能与细胞周期调控有关。抑制 β4 整合素表达还可能诱导非小细胞肺癌细胞凋亡。本研究结果为进一步研究 β4 整合素在非小细胞肺癌细胞增殖和凋亡中的作用机制和动物实验奠定了基础,为针对 β4 整合素的肿瘤诊断和治疗提供依据。

#### 参考文献:

- [1] Zhu CQ, Pintilie M, John T, et al. Understanding prognostic gene expression signatures in lung cancer [J]. Clin Lung Cancer, 2009, 10(5):331-40.
- [2] Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004, 5(10):816-26.
- [3] Bon G, Folgiero V, Bossi G, et al. Loss of beta4 integrin subunit reduces the tumorigenicity of MCF7 mammary cells and causes apoptosis upon hormone deprivation [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(11 Pt 1):3280-7.
- [4] 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):408-17.
- [5] Kitajiri S, Hosaka N, Hiraumi H, et al. Increased expression of integrin beta-4 in papillary thyroid carcinoma with gross lymph node metastasis [J]. Pathol Int, 2002, 52(7):438-41.
- [6] Ni H, Dydensborg AB, Herring FE, et al. Upregulation of a functional form of the beta4 integrin subunit in colorectal cancers correlates with c-Myc expression [J]. Oncogene, 2005, 24(45):6820-9.
- [7] Davis TL, Cress AE, Dalkin BL, et al. Unique expression pattern of the alpha6beta4 integrin and laminin-5 in human prostate carcinoma [J]. Prostate, 2001, 46(3):240-8.
- [8] Yang X, Pursell B, Lu S, et al. Regulation of beta 4-integrin expression by epigenetic modifications in the mammary gland and during the epithelial-to-mesenchymal transition [J]. J Cell Sci, 2009, 122(Pt 14):2473-80.
- [9] Giancotti FG. Targeting integrin beta4 for cancer and anti-angiogenic therapy [J]. Trends Pharmacol Sci, 2007, 28(10):506-11.
- [10] Wan X, Kim SY, Guenther LM, et al. Beta4 integrin promotes osteosarcoma metastasis and interacts with ezrin [J]. Oncogene, 2009, 28(38):3401-11.
- [11] Chen Z. The cause of death in China: the third survey report [M]. Beijing: Peking Union Medical College Press, 2008: 76-84. [陈竺. 全国第三次死因回顾抽样调查报告 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2008: 76-84.]
- [12] Micheloni A, De Luca N, Tadini G, et al. Intracellular degradation of beta4 integrin in lethal junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia [J]. Br J Dermatol, 2004, 151(4):796-802.
- [13] Raymond K, Kreft M, Song JY, et al. Dual Role of alpha6beta4 integrin in epidermal tumor growth: tumor-suppressive versus tumor-promoting function [J]. Mol Biol Cell, 2007, 18(11):4210-21.
- [14] 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):6316-24.
- [15] Lai SL, Perng RP, Hwang J. p53 gene status modulates the chemosensitivity of non-small cell lung cancer cells [J]. J Biomed Sci, 2000, 7(1):64-70.
- [16] Dong L, Ge RM, Qi N, et al. JNK1 knockdown via adenovirus-mediated shRNA inhibited cell proliferation in U87MG glioblastoma cells [J]. Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu, 2011, 38(7):767-9. [董林, 葛瑞民, 邱楠, 等. shRNA 腺病毒介导的 JNK1 RNAi 抑制 U87MG 人胶质瘤细胞的增殖 [J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38(7):767-9.]
- [17] Hui Xiao WJ, Gong JP, Cao XL, et al. Influence of CDK1 and CDK2 siRNA interference on tumor cell cycle and cell apoptosis [J]. Chinese-German J Clin Oncol, 2009, 8(7):371-4.
- [18] Cheng J, Xie HY, Xu X, et al. NDRG1 as a biomarker for metastasis, recurrence and of poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Lett, 2011, 310(1):35-45.

[编辑校对:周永红]