ALX1 基因过表达促进非小细胞肺癌细胞系 PC-9 上皮间质转化*

王琴容[1,2]，宋科伟[3]，吴昌学[1,2]，赵 艳[1,2]，谢 渊[1,2]，周建奖[1,2]**
（1. 贵州医科大学 地方病与少数民族性疾病教育部重点实验室；2. 贵州医科大学 贵州省医学分子生物学重点实验室，贵州 贵阳 550004；
3. 贵州医科大学 运动与健康学院，贵州 贵阳 550004）

［摘 要］**目的：**探讨 *ALX1*（aristaless-like homeobox 1）基因过表达对非小细胞肺癌细胞系 PC-9 上皮间质转化（EMT）能力的影响。**方法：**构建 pcDNA3.1-*ALX1* 过表达重组载体，将 pcDNA3.1-*ALX1* 和 pcDNA3.1 分别转染 PC-9 细胞；采用细胞划痕实验和 Transwell 实验分析 PC-9 细胞迁移及侵袭能力的改变，用 qRT-PCR 和 Western 印迹法检测 EMT 过程相关标志物 N-钙黏蛋白（N-cadherin）、紧密连接蛋白（ZO-1）以及转录因子 slug 和 snail 表达水平的改变。**结果：**与对照组相比，*ALX1* 过表达组中 PC-9 细胞的迁移和侵袭能力明显增强（$P<0.001$），ZO-1 表达量明显降低（$P<0.05$），N-cadherin、slug 和 snail 表达量明显增高（$P<0.001$）。**结论：***ALX1* 基因过表达能够促进非小细胞肺癌细胞 PC-9 的 EMT 转化，其机制可能与 ZO-1 表达量下调和 N-cadherin、slug 和 snail 表达量上调有关。

［关键词］癌，非小细胞肺；*ALX1*；上皮间质转化；侵袭；迁移
［中图分类号］R349.6；R734.2 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707（2017）04-0416-05
DOI：10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.04.009

ALX1 Overexpression Promotes the Epithelial-mesenchymal Transformation of Non-small Cell Lung Cancer Cell Line PC-9

WANG Qinrong[1,2], SONG Kewei[3], WU Changxue[1,2], ZHAO Yan[1,2], XIE Yuan[1,2], ZHOU Jianjiang[1,2]
(*1. Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. College of Sport and Health, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China*)

［**Abstract**］**Objective**: To explore the effects of ALX1 (Aristaless-like homeobox 1) overexpression on the EMT capability of non-small cell lung cancer cell line PC-9. **Methods**: The ALX1 overexpression vector (pcDNA3.1-ALX1) was constructed. Then pcDNA3.1-ALX1 and pcDNA3.1 were transfected into PC-9 cells using transfection reagent. The migration and invasion abilities of PC-9 cells were analyzed by wound healing assay and invasion assay, respectively. The expression changes of EMT hallmarks, including N-cadherin, ZO-1, slug and snail, were detected by qRT-PCR and Western blotting. **Results**: Compared with the control group, the migration and invasion abilities of PC-9 cells in ALX1 overexpression group significantly increased ($P<0.001$). The expression of ZO-1 was decreased but the expression of N-cadherin, slug and snail increased after ALX1 overexpression ($P<0.001$). **Conclusion**: ALX1 overexpression could promote the EMT of PC-9 cells, and the mechanism may be related to the down-regulation of ZO-1 and up-regulation of N-cadherin, slug and snail.

［**Key words**］ALX1; epithelial-mesenchymal transformation; non-small cell lung cancer; invasion; migration

*［基金项目］国家自然科学基金（No. 81660474）；贵州省科技合作计划项目［黔科合 LH 字（2016）7347］；贵州医科大学博士启动基金（院博合 J 字 004）
**通信作者 E-mail：851827202@qq.com
网络出版时间：2017－04－19 网络出版地址：http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170419.1515.011.html

肺癌是当今世界最常见的恶性肿瘤之一,其中非小细胞肺癌约占肺癌总数的 80%[1]。近年来,随着科学研究的发展,在肺癌的早期临床诊断以及治疗方面取得了较大的进步,但其 5 年生存率仍保持在 15% 左右[2]。因此,研究肺癌发生和发展的分子机制、寻找肺癌早期诊断和治疗新方法仍十分迫切[1,3]。肿瘤转移是癌症高死亡率的主要原因之一,而上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transformation,EMT)在肿瘤侵袭和转移过程中发挥着重要的作用。EMT 是胚胎发育和肿瘤形成过程中的一个多步骤的复杂生物学过程。在 EMT 发生时,上皮细胞会逐渐丢失其特性,获得间充质细胞的特性,如迁移和侵袭能力增强等,细胞发生 EMT 转化的过程往往伴随着基因表达的改变,*N-cadherin*、*ZO*-1、*Slug* 以及 *Snail* 等基因已成为衡量 EMT 转化发生的标志物[4-5]。*ALX*1(aristaless-like homeobox 1)在调节肿瘤细胞迁移、侵袭、增殖以及 EMT 方面起着重要的作用[6-8]。研究显示,在人骨肉瘤细胞中,敲除 *ALX*1 能抑制细胞迁移,诱导细胞凋亡[6]。在乳腺癌细胞中,*ALX*1 下调可诱导细胞 S 期阻滞,并抑制细胞的迁移和侵袭[8]。在卵巢癌细胞中,*ALX*1 可通过诱导 snail 表达来调节细胞的 EMT 转化以及侵袭[7]。2013 年,*Sandoval J* 等人[9]发现 *ALX*1 的甲基化与 I 期非小细胞肺癌患者的预后密切相关。鉴于此,本研究通过非小细胞肺癌细胞 PC-9 中过表达 *ALX*1,观察 *ALX*1 对 PC-9 细胞迁移、侵袭以及 EMT 的影响。

1　材料和方法

1.1　材料

RPMI-1640 培养基、Transwell 小室购自美国 Corning 公司,0.25% 胰蛋白酶、胎牛血清购自 Gibco 公司;Trizol、反转录 PCR 试剂盒、SYBR® Green qPCR SuperMix 试剂均购自 Invitrogen 公司,DNA 转染试剂购自 Roche 公司,引物和测序均由 Invitrogen 公司完成。N-cadherin、ZO-1、Slug、Snail、β-actin 多克隆抗体以及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗均购自 Cell Signaling Technology(CST)生物公司,基质胶购自 sigma 公司,PC-9 细胞由本实验室保存。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养与转染　PC-9 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,置于37 ℃、5% CO_2 的细胞培养箱中培养,0.25% 胰蛋白酶用于细胞的消化和传代,DNA 质粒转染 PC-9 细胞步骤按照 Roche 公司 X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent 说明书进行。

1.2.2　*ALX*1 过表达载体的构建　设计扩增 *ALX*1 开放阅读框引物 *ALX*1 For 和 *ALX*1 Rev,引物序列见表 1。以 PC-9 细胞 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增出 *ALX*1 开放阅读框序列,并进行 *Hin*d III 和 *Xba* I 双酶切,酶切后的片段与同样双酶切过的 pcDNA3.1(+)载体进行连接,构建 pcDNA3.1-*ALX*1 过表达重组载体。

1.2.3　实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)　PC-9 细胞总 RNA 的提取和逆转录按照 Invitrogen 公司说明书操作。细胞总 RNA 经逆转录酶逆转成 cDNA 后进行荧光定量 PCR 反应,PCR 反应引物序列见表 1。扩增条件为:95 ℃预变性 15 min,95 ℃变性 15 s,55 ~ 60 ℃不等退火 30 s,共 40 个循环。实验独立重复 3 次,每个样本独立 3 个复孔,实验数据统计分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

表 1　引物序列

Tab. 1　Primer sequences

引物名称	引物序列(5'-3')
*ALX*1 For	CCCAAGCTTATTATGGAGTTTCTGAGC
*ALX*1 Rev	GCTCTAGAGCACATGGTAAACCTATT
ZO-1 For	CAACATACAGTGACGCTTCACA
ZO-1 Rev	CACTATTGACGTTTCCCCACTC
N-cadherin For	TCAGGCGTCTGTAGAGGCTT
N-cadherin Rev	ATGCACATCCTTCGATAAGACTG
Snail For	TCGGAAGCCTAACTACAGCGA
Snail Rev	AGATGAGCATTGGCAGCGAG
Slug For	CGAACTGGACACACATACAGTG
Slug Rev	CTGAGGATCTCTGGTTGTGGT
β-actin For	AAACTGGAACGGTGAAGGTG
β-actin Rev	AGTGGGGTGGCTTTTAGGAT

1.2.4　蛋白质印迹(Western blotting)　pcDNA3.1 载体或 pcDNA3.1-*ALX*1 重组载体转染 PC-9 细胞,48 h 后用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白质,BCA 法检测蛋白质浓度并制备样品。配制 SDS-PAGE 胶,每孔上样蛋白质样品 25 μg,电泳后将蛋白质从凝胶转移至硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉封闭1 h 后,加入稀释的一抗,4 ℃孵育过夜,用含 0.05% Tween20 的 TBS(TBST)漂洗 3 次,每次 10 min,加入二抗,37 ℃孵育 1 h,TBST 漂洗 3 次,每次 10 min,化学发光液显色,β-actin 为内参。

1.2.5 细胞划痕实验　将 PC-9 细胞以适当密度接种至 12 孔板中，待细胞贴壁24 h后进行细胞转染，转染 24 h 后，用 200 μL 吸头在融合细胞层上划痕线；用 PBS 洗细胞两次，去掉游离细胞后，用含 4% 胎牛血清的培养基培养细胞，此时记为 T0，记录 T0 和 T24（24 h 时）同一个位置的划痕宽度，计算划痕愈合度（%）=【划痕宽度（T0-T24）/划痕宽度 T0】×100%。实验独立重复 3 次，在倒置显微镜下每孔随机选取 3 个视野计数细胞，每孔取均值进行统计学分析。

1.2.6 Matrigel 侵袭实验　用无血清预冷的 RPMI-1640 培养基和 Matrigel 按 8∶1 稀释混匀，取 100 μL均匀铺在 Transwell 上室，放入 37 ℃温箱孵育1 h。用无血清 RPMI-1640 培养基将 PC-9 细胞的密度配制成 1×10^9 个细胞/L，在 Transweil 上室接种 200 μL 细胞悬液，在 Transwell 下室加入 RPMI-1640 完全培养基 600 μL，在细胞培养箱中培养 48 h 后，取出小室，用棉签拭去 Transwell 上室细胞，然后将 transwell 小室置于甲醇中固定 30 min，5 g/L结晶紫染细胞 15 min，用 PBS 洗去残余的结晶紫染色液。实验重复 3 次，在倒置显微镜下每孔随机选取 3 个视野计数细胞，并取均数进行统计分析。

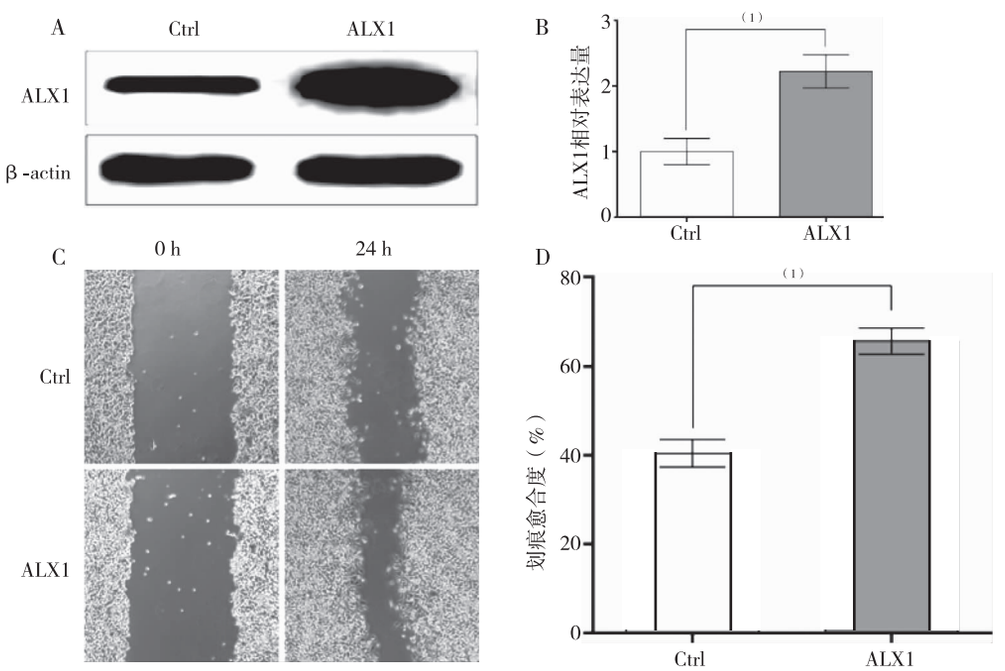
1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 6.01 软件进行统计分析，实验数据以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，两组间比较采用独立样本 t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *ALX1* 过表达促进 PC-9 细胞的迁移

pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-*ALX1* 载体分别转染 PC-9 细胞，48 h 后，Western blotting 检测 *ALX1* 表达情况。结果显示，转染 pcDNA3.1-*ALX1* 组中（*ALX1* 过表达组）*ALX1* 表达明显高于转染 pcDNA3.1 组（对照组），见图 1A。划痕实验显示，24 h 后，对照组划痕愈合度为（40.46 ± 1.779）%，*ALX1* 过表达组划痕愈合度为（65.64 ± 1.665）%，见 1B 和 C。以上结果表明 *ALX1* 过表达明显促进的 PC-9 细胞的迁移能力，差异有统计学意义（$P<0.001$）。



注：A 为 Western blotting 检测 *ALX1* 表达，B 为 *ALX1* 表达柱状图，C 为细胞划痕图片，D 为划痕愈合度（%）计算柱状图，Ctrl 为转染 pcDNA3.1 空白载体的对照组，*ALX1* 为转染 pcDNA3.1-*ALX1* 过表达载体的实验组；(1) 与 Ctrl 组比较，$P<0.001$

图 1　*ALX1* 过表达对 PC-9 细胞株迁移能力的影响

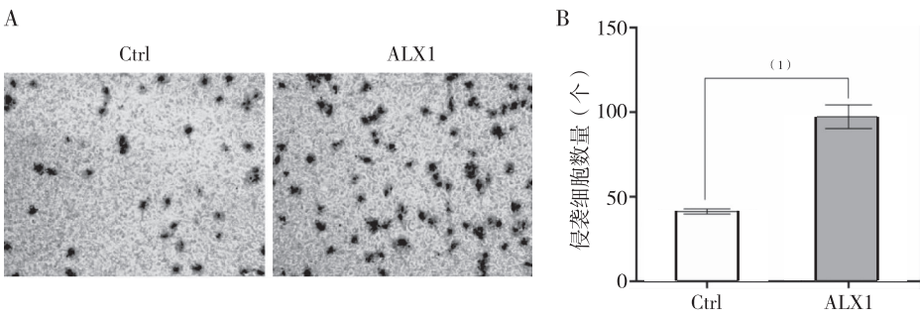
Fig. 1　Effects of ALX1 overexpression on the migration ability of PC-9

2.2　*ALX1* 过表达促进 PC-9 细胞的侵袭

Transwell 侵袭实验结果显示，对照组中穿过基质胶的 PC-9 细胞数为（41.33 ± 0.882）个，*ALX1* 过表达实验组 PC-9 细胞穿过基质胶的细胞数为（97.33 ± 4.05）个，提示 *ALX1* 过表达的 PC-9 细胞的侵袭能力明显增强，差异有统计学意义（$P < 0.001$）。

2.3　*ALX1* 过表达调控 EMT 相关标志物表达

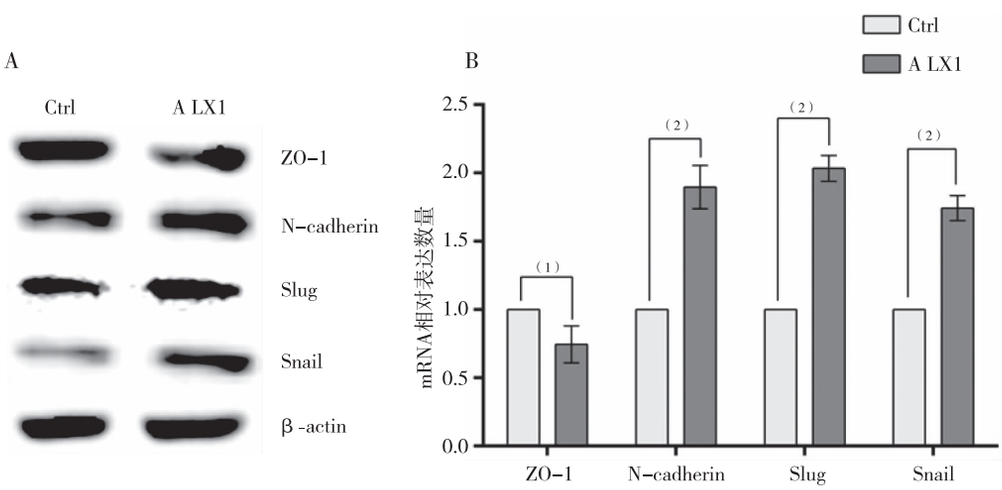
pcDNA3.1-*ALX1* 过表达重组载体转染 PC-9 细胞，48 h后通过 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 EMT 相关标志物 ZO-1、N-cadherin、Slug 和 Snail 的表达。如图 3 所示，与对照组相比，*ALX1* 过表达明显降低了 ZO-1 的表达（$P < 0.05$），增加了 N-cadherin、slug 和 snail 的表达（$P < 0.001$），提示 *ALX1* 过表达通过降低 ZO-1 的表达和增加 N-cadherin、slug 和 snail 的表达而促进 PC-9 细胞的 EMT 转化。



注：A 为细胞侵袭图片，B 为穿过 Transwell 基质胶的细胞计数柱状图；(1) 与 Ctrl 组比较，$P < 0.05$

图 2　*ALX1* 过表达对 PC-9 细胞株侵袭能力的影响

Fig. 2　Effects of ALX1 overexpression on the invasion ability of PC-9



注：A 为 Western blotting 检测 ZO-1、N-cadherin、Slug 和 Snail 的表达，B 为 qRT-PCR 检测 ZO-1、N-cadherin、Slug 和 Snail 的表达；与 Ctrl 组比较，(1) $P < 0.05$，(2) $P < 0.01$

图 3　*ALX1* 过表达对 EMT 相关标志物表达的影响

Fig. 3　Effect of ALX1 overexpression on the expressions of EMT related markers

3　讨论

ALX1 基因作为一个转录因子，参与调控神经元以及颅面软骨发育，同时在调节细胞上皮－间质转化过程中发挥重要的作用，目前已被证实是一个疾病相关的基因，与肿瘤 EMT 转化以及预后密切相关[6-8,10-14]。肺癌是发病率和死亡率增长最快，对人群健康和生命威胁最大的恶性肿瘤之一[2]。造成肺癌高死亡率的主要原因是患者确诊时已处于癌症晚期阶段，肿瘤细胞已发生了侵袭和转移，缺乏有效的治疗措施。因此，为提高肺癌患者的生存率，改善肺癌患者整体治疗水平，寻找有效的早期诊断及预后标志物和有效治疗策略是关键[1,3]。

*ALX*1 在卵巢癌中高表达,该基因可通过上调 Snail 表达,调节卵巢癌细胞 EMT 转换,促进细胞的侵袭和转移,同时其表达量与卵巢癌预后不良正相关[7]。研究显示 *ALX*1 的甲基化与 I 期非小细胞肺癌患者的预后密切相关,这说明 *ALX*1 在肺癌发生发展过程中可能发挥着重要的作用[9]。

为研究 *ALX*1 在肺癌中的作用,本实验通过外源过表达方式,研究 *ALX*1 过表达对非小细胞肺癌细胞 PC-9 迁移、侵袭以及 EMT 影响。采用划痕实验和 Transwell 实验模拟人体肿瘤细胞迁移和侵袭过程,实验结果显示 *ALX*1 基因过表达之后,PC-9 细胞的迁移和侵袭能力均增强,该结果暗示 *ALX*1 可能参与调控肺癌细胞 PC-9 的 EMT 转化。因此,本研究进一步检测了 EMT 标志物 N-cadherin、ZO-1、Slug 以及 Snail 表达量的变化,结果发现 *ALX*1 过表达下调了 ZO-1 的表达,同时上调了 N-cadherin、slug 和 snail 的表达,这说明 *ALX*1 基因过表达促进了 PC-9 细胞的 EMT 转化。

本实验初步证实 *ALX*1 在肺癌 EMT 转化中发挥重要作用,*ALX*1 过表达能明显促进肺癌细胞 PC-9 的 EMT 转化能力。该结果为将来寻找有效的肺癌早期诊断标志物以及临床靶向治疗提供了实验依据。

4　参考文献

[1] Shtivelman E, Hensing T, Simon GR, et al. Molecular pathways and therapeutic targets in lung cancer[J]. Oncotarget, 2014 (6):1392 – 1433.

[2] Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention[J]. Clinics in chest medicine, 2011 (4):605 – 644.

[3] Larsen JE, Minna JD. Molecular biology of lung cancer: clinical implications[J]. Clinics in chest medicine, 2011 (4):703 – 740.

[4] Ding W, You H, Dang H, et al. Epithelial – to – mesenchymal transition of murine liver tumor cells promotes invasion[J]. Hepatology (Baltimore, Md), 2010 (3):945 – 953.

[5] Li J, Wang Q, Wen R, et al. MiR – 138 inhibits cell proliferation and reverses epithelial – mesenchymal transition in non – small cell lung cancer cells by targeting GIT1 and SEMA4C[J]. Journal of cellular and molecular medicine, 2015 (12):2793 – 2805.

[6] Yang M, Pan Y, Zhou Y. Depletion of *ALX*1 causes inhibition of migration and induction of apoptosis in human osteosarcoma[J]. Tumour biology, 2015 (8): 5965 – 5970.

[7] Yuan H, Kajiyama H, Ito S, et al. *ALX*1 induces snail expression to promote epithelial – to – mesenchymal transition and invasion of ovarian cancer cells[J]. Cancer research, 2013 (5):1581 – 1590.

[8] 管停宏, 苏琳茜, 易永芬, 等. 软骨同源蛋白 1 (CART1)敲低诱导 MDA – MB – 231 乳腺癌细胞 S 期阻滞并抑制其侵袭和迁移[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016 (4):474 – 478.

[9] Sandoval J, Mendez – Gonzalez J, Nadal E, et al. A prognostic DNA methylation signature for stage I non – small – cell lung cancer[J]. Journal of clinical oncology, 2013 (32):4140 – 4147.

[10] Cai RL. Human CART1, a paired – class homeodomain protein, activates transcription through palindromic binding sites[J]. Biochemical and biophysical research communications, 1998 (2):305 – 311.

[11] Regnier CH, Tomasetto C, Moog – Lutz C, et al. Presence of a new conserved domain in CART1, a novel member of the tumor necrosis factor receptor – associated protein family, which is expressed in breast carcinoma [J]. The Journal of biological chemistry, 1995 (43): 25715 – 25721.

[12] Uz E, Alanay Y, Aktas D, et al. Disruption of *ALX*1 causes extreme microphthalmia and severe facial clefting: expanding the spectrum of autosomal – recessive ALX – related frontonasal dysplasia[J]. American journal of human genetics, 2010 (5):789 – 796.

[13] Zhao GQ, Zhou X, Eberspaecher H, et al. Cartilage homeoprotein 1, a homeoprotein selectively expressed in chondrocytes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993 (18): 8633 – 8637.

[14] Zhao Q, Behringer RR, de Crombrugghe B. Prenatal folic acid treatment suppresses acrania and meroanencephaly in mice mutant for the Cart1 homeobox gene[J]. Nature genetics, 1996 (3):275 – 283.

(2017-02-08 收稿,2017-03-15 修回)
中文编辑: 刘　平; 英文编辑: 刘　华