

• 论 著 •

TIGAR 调节肺癌细胞的增殖和侵袭能力研究

赵 明,冯 婧,刘 勇,杨玲麟[△]
(泸州医学院附属医院肿瘤科,四川泸州 646000)

摘 要:目的 探讨 P53 下游基因 TIGAR 在肺癌细胞 A549 增殖、迁移及侵袭中的作用。方法 采用 siRNA 技术在 A549 细胞中干扰 TIGAR 的表达,细胞计数试剂盒 (CCK-8)检测细胞增殖,小室法检测细胞迁移,肿瘤细胞侵袭实验检测细胞侵袭,免疫印迹杂交检测相关蛋白水平变化。结果 在 A549 细胞中成功干扰 TIGAR 后,细胞增殖显著降低($P<0.05$),细胞迁移和侵袭能力显著减弱,侵袭相关蛋白基质金属蛋白酶 2(MMP-2)和基质金属蛋白酶 9(MMP-9)的表达量均下调。结论 TIGAR 促进肺癌细胞 A549 的增殖,并促进细胞的迁移和侵袭能力。

关键词:TIGAR; A549; 增殖; 迁移; 侵袭
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.06.014 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2016)06-0754-02

TIGAR promotes proliferation and invasiveness of lung cancer cells
Zhao Ming, Feng Jing, Liu Yong, Yang Linglin[△]
(Department of Oncology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)
Abstract: **Objective** To study the role of P53 target gene TIGAR on proliferation, migration and invasion of lung cancer cells. **Methods** siRNA was introduced to knock down TIGAR in A549 cells. Proliferation was detected by CCK-8. The ability of migration and invasion was measured by and, respectively, was used to evaluate the expression levels of related proteins. **Results** Knock-down of TIGAR reduced the proliferation rate ($P<0.05$), inhibited the ability of migration and invasion, decreased expression levels of MMP-2 and MMP-9. **Conclusion** TIGAR promotes proliferation, migration and invasiveness of lung cancer cells.
Key words: TIGAR; A549; proliferation; migration; invasion

TIGAR 是 2006 年发现的 p53 下游的一个直接靶基因^[1],在许多肿瘤中均呈现出异常表达。在乳腺癌细胞系(MCF-7)细胞中,TIGAR 通过调控细胞周期相关蛋白 RB 的去磷酸化来影响 RB-E2F1 的结合能力,从而调节细胞增殖^[2]。TIGAR 的表达在肠上皮再生,小肠及结肠肿瘤的发生和发展中也起着关键作用,在 TIGAR 表达缺失的小鼠模型中肠上皮的增生能力明显降低,小肠腺瘤的增殖能力也明显下降^[3]。因此,TIGAR 作为一个潜在的具有应用前景的肿瘤治疗靶点日益受到研究者的关注。本文选取肺癌细胞 A549 作为研究对象,探讨干扰 TIGAR 对肺癌细胞增殖的影响,以及细胞迁移和侵袭能力的变化。

1 材料与方法

1.1 细胞来源 肺癌细胞 A549,购买于中国科学院细胞库。
1.2 仪器与试剂 蛋白电泳及转膜装置购买于 Bio-Rad(伯乐公司);lipofectimine 2000(脂质体)阳离子脂质体购买于美国 Invitrogen 公司;CCK-8 购买于碧云天公司;transwell 小室、基质胶 matrigel 购买于美国 BD Bioscience 公司;抗体 TIGAR 购买于英国 abcam 公司,MMP-2 抗体、MMP-9 抗体购买于武汉三鹰公司,GAPDH 抗体购买于美国 Cell signaling technology 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与转染 人肺癌细胞 A549 培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640,培养条件为 5%CO₂,37 °C 恒温培养箱。siRNA 由上海 GeneChem 公司合成。Si-TIGAR 序列为 GCC AGC TTT ACT GGA GAA CTT, Si-Control 序列为 TTA CCG AGA CCG TAC GTA T。细胞分两组,按照说明书分别转染 Si-TIGAR 和 Si-Control,5 h 后换液继续培养。

1.3.2 CCK-8 接种细胞于 96 孔板,转染 48 h 后加入 CCK-8 10 μL 于每孔,37 °C 继续培养 2 h 后,酶标仪测定 450 nm 吸光值。

1.3.3 小室法和肿瘤细胞侵袭实验 对于小室法无血清培养基重悬细胞至 3×10⁵/mL,接种 100 μL 于 transwell 小室上室,下室加入 600 μL 完全培养基,培养 20 h 后,棉球擦去上室细胞,结晶紫染色,显微镜观察拍照。对于肿瘤细胞侵袭实验,上室需提前加入 50 μL 基质胶 matrigel,48 h 后棉球擦去上室细胞,结晶紫染色,显微镜观察拍照。

1.3.4 免疫印迹杂交 转染后 72 h 收集细胞,提取总蛋白,10%聚丙烯酰胺凝胶中电泳,蛋白转印至 PVDF 纤维素膜上后,3%脱脂牛奶封闭 1 h 后,加入一抗,4 °C 摇床过夜,TBST 洗涤后,二抗孵育 1 h,洗脱液 TBST 洗涤后显色试剂 ECL 化学发光检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件进行数据处理及统计分析,组间比较使用配对 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 干扰 TIGAR 效率检测 转染 Si-TIGAR 和 Si-Control 72 h 后,免疫印迹杂交检测干扰组 TIGAR 表达量显著低于对照组,具有较高的干扰效率,见图 1。

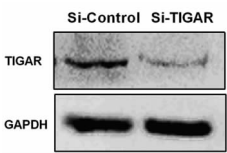


图 1 TIGAR 表达水平

2.2 干扰 TIGAR 后细胞增殖检测 转染 48 h 后,加入 CCK-8 检测增殖发现,干扰组细胞数量显著低于对照组,干扰 TIGAR 后,细胞增殖速率降低,见图 2。

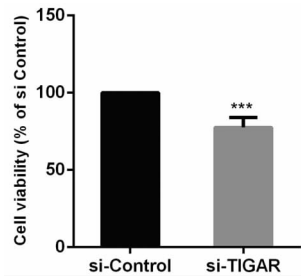


图 2 细胞增殖检测

2.3 干扰 TIGAR 后细胞迁移和侵袭检测 接种后 20 h,结晶紫染色迁移组细胞,观察到干扰组细胞比对照组显著减少,证明细胞迁移能力降低;接种后 48 h,结晶紫染色侵袭组细胞,观察到干扰组细胞比对照组显著减少,证明细胞侵袭能力降低,见图 3。

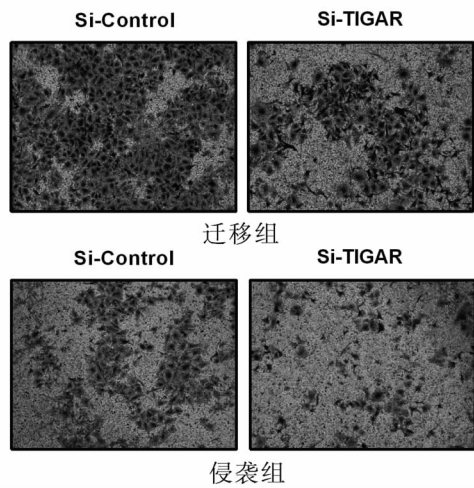


图 3 细胞迁移、侵袭检测

2.4 干扰 TIGAR 后侵袭相关蛋白检测 免疫印迹杂交检测侵袭相关蛋白 MMP-2, MMP-9 表达,发现在干扰组中表达量显著低于对照组,见图 4。

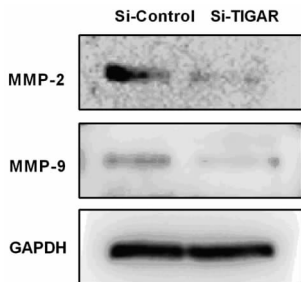


图 4 MMP-2, MMP-9 表达量

3 讨 论

肿瘤的转移是一个极其复杂的过程,首先需要突破细胞外基质(ECM)的屏障才能向周围组织侵袭,进入循环系统。基质金属蛋白酶(MMPs)是降解 ECM 最重要的蛋白酶。已有文献报道在食管癌、胃癌、结肠癌等肿瘤中 MMPs 均呈现出过表达。因此,研究 MMPs 在肺癌中的表达及其调控机制具有重要意义^[4-9]。

TIGAR 是 P53 下游的靶基因,在 TIGAR 表达缺失的小

鼠结肠肿瘤模型中,结肠肿瘤细胞转移到肺等器官的能力降低^[10-12],证明了 TIGAR 在肿瘤转移的过程中起到非常重要的作用^[3]。通过此研究,发现通过 siRNA 技术干扰 TIGAR 可降低 MMP-2、MMP-9 的表达^[13-14],从而减弱肺癌细胞的迁移和侵袭能力,加深了对于肺癌转移分子机制的认识,具有重要的指导意义。

参考文献

[1] Karim B, Atsushi T, Mary A, et al. TIGAR, a p53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis[J]. Cell, 2006, 14 (126): 107-120.

[2] Madan E, Gogna R, Kuppusamy P, et al. TIGAR induces p53-mediated cell-cycle arrest by regulation of RB-E2F1 complex[J]. British J Cancer, 2012, 107(2): 516-526.

[3] Cheung EC, Athineos D, Lee P, et al. TIGAR is required for efficient intestinal regeneration and tumorigenesis[J]. Dev Cell, 2013, 25(5): 463-477.

[4] 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.

[5] 曾益新. 肿瘤学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999.

[6] 周清华. 肺癌基础研究与临床治疗进展[M]. 北京: 科学出版社, 1999.

[7] Christina W, Steinbach JP, Johannes R, et al. Tp53-induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR) protects glioma cells from starvation-induced cell death by up-regulating respiration and improving cellular redox homeostasis[J]. J Biolog Chem, 2012, 287 (40): 33436-33446.

[8] Zhang M, Chai YD, Brumbaugh J, et al. Oral cancer cells may rewire alternative metabolic pathways to survive from siRNA silencing of metabolic enzymes[J]. BMC Cancer, 2014, 14 (1): 1736-1742.

[9] Zhang H, Gu C, Yu J, et al. Radiosensitization of glioma cells by TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator knockdown is dependent on thioredoxin-1 nuclear translocation[J]. Free Rad Bio Med, 2014, 69(7): 239-248.

[10] Wong EY, Wong SC, Chan CM, et al. TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator promotes proliferation and invasiveness of nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Oncology Letters, 2015, 9(2): 569-574.

[11] Peia-Rico MA, Calvo-Vidal MN, Villalonga-Planells R, et al. TP53 induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR) knockdown results in radiosensitization of glioma cells[J]. Radioth Onc, 2011, 101(1): 132-139.

[12] Sarachana T, Zhou R, Chen G, et al. Investigation of post-transcriptional gene regulatory networks associated with autism spectrum disorders by microRNA expression profiling of lymphoblastoid cell lines[J]. Genome Medicine, 2010, 2(2): 1-18.

[13] Li Y, Michio K, Donald K. Inhibition of the MUC1-C oncoprotein induces multiple myeloma cell death by down-regulating TIGAR expression and depleting NADPHs[J]. Blood, 2012, 119(3): 810-816.

[14] Hasegawa M, Sinha RK, Kumar M, et al. Intracellular Targeting of the Oncogenic MUC1-C Protein with a Novel GO-203 Nanoparticle Formulation[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21 (10): 2338-2347.