

TNKS2 促进肺鳞癌恶性表型的机制研究

曾晖 章浙伟 洪凤鸣

[摘要] 目的 探讨端锚聚合酶2(TNKS2)促进肺鳞癌恶性表型的作用及机制。方法 采用shTNKS2转染H647细胞制备TNKS2的低表达细胞模型,采用慢病毒载体转染A549细胞制备TNKS2的高表达细胞模型,并采用RT-PCR和免疫印迹分析对两种细胞模型进行验证。采用流式细胞术、Transwell法检测细胞凋亡、增殖、侵袭能力。结果 经过shTNKS2干扰后,H647细胞中TNKS2 mRNA表达下降,蛋白表达同步下降(t 分别=51.98、70.23, P 均 <0.05);经过TNKS2基因高表达后,A549细胞中TNKS2 mRNA表达上升,同时蛋白表达升高(t 分别=54.64、16.84, P 均 <0.05)。流式细胞仪检测结果显示,H647细胞经过TNKS2干扰后细胞凋亡百分比相较于对照组明显升高($t=35.10$, $P<0.05$),A549细胞经过TNKS2高表达后细胞凋亡百分比相较于对照组明显降低($t=58.09$, $P<0.05$)。H647细胞经过TNKS2基因干扰后,细胞增殖能力在24 h、48 h均呈下降趋势(t 分别=5.77、6.92, P 均 <0.05),细胞侵袭能力呈同步下降($t=6.75$, $P<0.05$);A549细胞在经过TNKS2基因高表达后,细胞增殖能力在24 h、48 h均呈上升趋势(t 分别=452.90、96.45, P 均 <0.05),同时细胞侵袭能力也增强($t=12.87$, $P<0.05$)。结论 TNKS2在肺鳞癌恶性表型中发挥重要作用,而这一作用可能是通过TNKS2/ β -catenin途径促进肺鳞癌细胞的增殖和侵袭。

[关键词] 端锚聚合酶2; 肺鳞癌; β -catenin; 恶性表型

Mechanism research about TNKS2 promoting lung squamous cell carcinoma malignant ZENG Hui, ZHANG Zhewei, HONG Fengming. Department of Intervention, The Cancer Hospital of the University of Chinese Academy of Sciences (Zhejiang Cancer Hospital), Institute of Basic Medicine and Cancer (IBMC), Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310022, China.

[Abstract] **Objective** To investigate the role and mechanism of Tankyrase 2 (TNKS2) in promoting malignant behavior of lung squamous cell carcinoma. **Methods** The TNKS2 low expression cell model was replicated in H647 cells by shTNKS2 transfected, and the TNKS2 high expression cell model was replicated in A549 cells via transfected with lentiviral vector. The two cell models were verified by RT-PCR and Western blotting analysis. The abilities of apoptosis, proliferation and invasion were detected by flow cytometry and Transwell. **Results** After shTNKS2 interference, the expression of TNKS2 mRNA and protein decreased synchronously in H647 cells ($t=51.98, 70.23, P<0.05$), while the expression of TNKS2 mRNA and protein in A549 cells increased after overexpression of TNKS2 gene ($t=54.64, 16.84, P<0.05$). Flow cytometry showed that the apoptosis increased in H647 cells after interference with TNKS2 when compared with the control group ($t=35.10, P<0.05$), whereas in A549 cells, apoptosis decreased after overexpression of TNKS2 compared with the control group ($t=58.09, P<0.05$). After TNKS2 gene interference, the proliferation ability of H647 cells decreased at 24h and 48h ($t=5.77, 6.92, P<0.05$), and the invasiveness of H647 cells decreased synchronously ($t=6.75, P<0.05$). After overexpression of TNKS2 gene, the proliferation ability of A549 cells increased at 24h and 48h ($t=452.90, 96.45, P<0.05$), and the invasive ability of A549 cells was also enhanced ($t=12.87, P<0.05$). **Conclusion** The TNKS2 plays an important role in the malignant phenotype of lung squamous cell carcinoma, and this role may be through TNKS2/ β -

catenin pathway to promote the proliferation and invasion of lung squamous cell carcinoma.

[Key words] tankyrase 2; lung squamous cell carcinoma; β -catenin; malignant phenotype

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2022.006.007

基金项目: 浙江医药科技计划(2019KY043)

作者单位: 310022 浙江杭州, 中国科学院大学附属肿瘤医院(浙江省肿瘤医院)介入科, 中国科学院基础医学与肿瘤研究所

肺癌目前是世界上恶性程度最高的肿瘤之一,发病率和死亡率位居恶性肿瘤的第一位^[1]。非小细胞肺癌约占所有肺癌的80%,而腺癌及鳞癌是非小细胞肺癌病理类型中最常见的两种类型^[2]。随着对腺癌研究的深入,各种靶向药物被发现并应用于临床,使肺腺癌患者的生存期逐渐延长。但目前对肺鳞癌研究相对较少,预后仍无明显改善。因此,更精确地了解肺鳞癌侵袭与恶化机制,发现有效的靶点,研发针对性的药物,对肺鳞癌的治疗具有重要的意义。前期研究中发现端锚聚合酶2(tankyrase2, TNKS2)基因多态性与女性肺鳞癌高风险密切相关^[3]。本次研究旨在探讨TNKS2促进肺鳞癌恶性表型的作用及机制。现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养 本次研究于2019年3月至2020年3月在浙江省肿瘤医院开展。H647细胞株及A549细胞株由中国科学院基础医学与肿瘤研究所惠赠。使用含10%胎牛血清的完全培养基进行培养,待培养一个周期后分瓶,收集各细胞株其中一瓶细胞,提取总RNA,通过反转录酶-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测各株细胞内TNKS2基因表达,留取验证TNKS2基因高表达和低表达细胞各一株,作为体外实验模型。

1.2 慢病毒构建 利用RT-PCR技术扩增TNKS2基因,并将PCR扩增产物通过酶切、酶连技术整合进入慢病毒载体质粒内,构建慢病毒载体质粒。将载体质粒与骨架质粒共同整合进入293T细胞内,培养48h后,收集上清液,通过超速离心收集病毒。检测病毒滴度并调整适当的病毒滴度感染肺癌细胞,通过嘌呤霉素筛选稳定高表达A549细胞株。

1.3 荧光定量PCR 细胞用磷酸盐缓冲液洗涤、离心3次,再次离心收集细胞沉淀。组织使用MP磁珠匀浆设备进行研磨,收集分离物。采用酚-氯仿法提取细胞总RNA,紫外分光光度法测定其浓度。采用primer premier 5.0软件设计基因特异性RT-PCR引物。以细胞总RNA为模板,采用SYBR Premix Ex-Taq™荧光定量试剂盒(由日本TaKaRa公司生产)及上述RT-PCR引物逆转录为互补脱氧核糖核酸,然后用实时荧光定量PCR仪(由美国Bio-Rad公司生产)扩增,采用^{ΔΔ}Ct模型及GraphPad软件对RT-PCR结果进行分析。实验中以3-磷酸甘油

醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)编码基因为内参。过表达慢病毒构建稳定A549细胞系引物:Homo TNKS2 Forward: 5'-GCTGAGCCAACCATCCGAAAT-3'; Homa TNKS2 Reverse: 5'-ACTTGCGTGCCAGTTGACA-3'; Homa GAPDH Forward: 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'; Homa GAPDH Reverse: 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。干扰病毒构建稳定H647细胞系引物:Homo TNKS2 Forward: 5'-GCTGAGCCAACCATCCGAAAT-3'; Homa TNKS2 Reverse: 5'-ACTTGCGTGCCAGTTGACA-3'; Homa GAPDH Forward: 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'; Homa GAPDH Reverse: 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。

1.4 蛋白免疫印迹检测 采用0.05%磷酸盐缓冲液裂解细胞,8 000 r/min、4℃离心收集蛋白上清,采用二喹啉甲酸法测定其浓度。将上述细胞蛋白样本经聚丙烯酰胺凝胶电泳后电转至聚偏二氟乙烯尼龙膜上,以商品化抗鼠或抗人抗体蛋白为一抗(由英国Abcam公司生产)、辣根过氧化物酶标记抗体蛋白为二抗(由美国Licor公司生产),采用蛋白免疫印迹法检测上述细胞蛋白样本中TNKS2蛋白表达情况。实验中以β-actin蛋白表达为内参。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 收集细胞悬液及贴壁细胞,用磷酸盐缓冲液进行清洗3次,加入凋亡染色试剂Annexin V/PI染色进行孵育,15 min后用磷酸盐缓冲液进行清洗,去除参与的染色试剂,并在30 min内采用流式细胞仪[由诺海生物科学仪器(上海)有限公司生产]检测细胞凋亡情况。

1.6 侵袭实验 使用侵袭小室(Transwell)细胞专用培养板及Transwell小室(由美国Corning公司生产),在细胞上室进行铺板,待细胞稳定生长,在细胞上室加入不含血清的培养基,在细胞下室加入含血清的细胞培养基,待24 h后,用棉签剔除上室细胞,再使用染色试剂对下室细胞进行染色,观察记录细胞团数量。

1.7 统计学方法 采用SPSS 19.0对数据进行统计分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间计量资料比较采用 t 检验;计数资料比较采用 χ^2 检验。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染shTNKS2后,H647细胞中TNKS2 mRNA及蛋白表达结果见图1

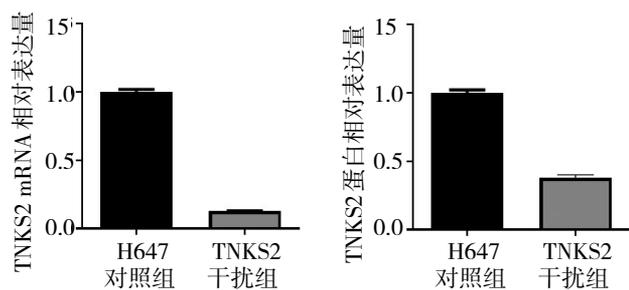


图1 转染shTNKS2后,H647细胞中TNKS2 mRNA及蛋白表达
由图1可见,RT-PCR检测结果显示,TNKS2干扰组TNKS2 mRNA表达相较于对照组表达降低($t=51.98, P<0.05$);Western blot检测结果显示,TNKS2干扰组TNKS2蛋白表达相较于对照组表达降低($t=70.23, P<0.05$)。

2.2 TNKS2高表达后,A549细胞中TNKS2mRNA及蛋白表达见图2

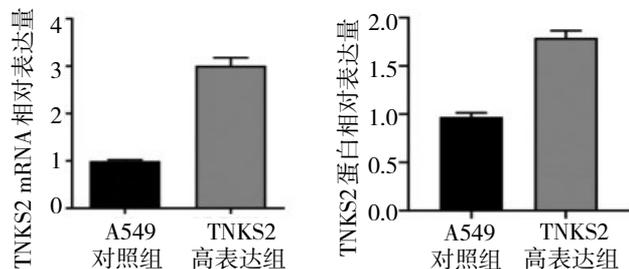


图2 TNKS2高表达后A549细胞中TNKS2 mRNA及蛋白表达

由图2可见,RT-PCR检测结果显示,TNKS2高表达组TNKS2 mRNA表达相较于对照组表达升高($t=54.64, P<0.05$);Western blot检测结果显示,TNKS2高表达组TNKS2蛋白表达相较于对照组表达升高($t=16.84, P<0.05$)。

2.3 TNKS2低表达对肺鳞癌细胞凋亡的影响见图3

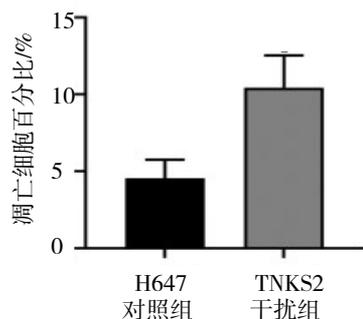


图3 TNKS2低表达对肺鳞癌细胞凋亡的影响

由图3可见,流式细胞仪检测结果显示,H647细胞经过TNKS2干扰后细胞凋亡百分比相较于对照组明显升高($t=35.10, P<0.05$)。

2.4 TNKS2高表达对肺鳞癌细胞凋亡的影响见图4

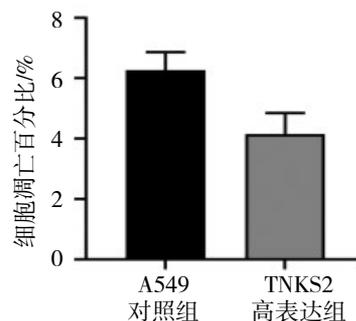


图4 TNKS2高表达对肺鳞癌细胞凋亡的影响

由图4可见,流式细胞仪检测结果显示,A549细胞经过TNKS2高表达后细胞凋亡百分比相较于对照组明显降低($t=58.09, P<0.05$)。

2.5 TNKS2高表达与肺鳞癌细胞增殖的关系见图1

由封二图1可见,H647细胞系经过TNKS2干扰后在24 h、48 h细胞增殖速率略有降低(t 分别=5.77、6.92, P 均 <0.05)。A549细胞系经过TNKS2高表达后,在24 h细胞增殖速率明显高于对照组A549细胞系,经过48 h后,绝大部分A549细胞系均经过一次分裂,发生扩增(t 分别=452.90、96.45, P 均 <0.05)。

2.6 转染shTNKS2后测定H647、A549细胞的相对侵袭率见图5

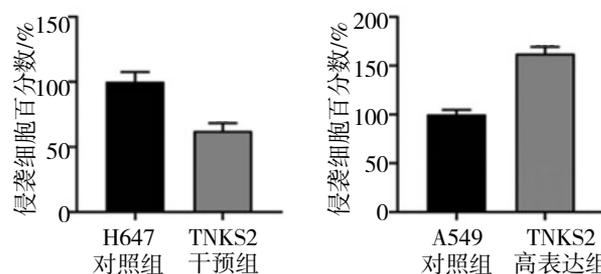


图5 转染shTNKS2后测定H647、A549细胞的相对侵袭率

由图5可见,H647细胞经过TNKS2基因干扰后,细胞侵袭能力明显下降,侵袭细胞数目相对于正常H647细胞减少($t=6.75, P<0.05$);A549细胞经过TNKS2基因高表达后,细胞侵袭能力明显升高,细胞侵袭数目增多($t=12.87, P<0.05$)。

2.7 TNKS2低表达对肺鳞癌细胞侵袭能力的影响见图3图2

由封三图2可见,与对照组相比,经TNKS2干预后,侵袭的肺鳞癌细胞数减少。

2.8 TNKS2高表达对肺鳞癌细胞侵袭能力的影响见图3图3

由封三图3可见,与对照组相比,TNKS2高表达

后,侵袭的肺鳞癌细胞数增加。

3 讨论

TNKS 是人端粒复合物中的一个重要成分,其基因定位于人第8号染色体,含有1 327个氨基酸残基。TNKS是具有聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶活性的蛋白质,能够促使端粒DNA结合蛋白因子核糖基化而从端粒脱落,使端粒酶能够接近端粒并使端粒延长,起到正向调节端粒长度的作用。由于TNKS2分布广泛,参与调节多种生理病理过程,包括细胞生长^[4]、增殖、凋亡^[5]、信号转导^[6]。此外,它还与包括癌症在内的多种疾病的发生发展密切相关。

本次研究构建改变TNKS2基因表达的shRNA和过表达载体,建立并验证TNKS2稳定敲减或过表达的肺鳞癌细胞系,并进一步研究TNKS2表达与肺鳞癌细胞生物学行为的相关性。结果显示在H647细胞内经过TNKS2干扰后,细胞内TNKS2 mRNA、蛋白表达同步降低;而在TNKS2低表达的A549细胞内,通过慢病毒构建TNKS2高表达稳定细胞系后,A549细胞内TNKS2 mRNA、蛋白表达同步升高。

细胞凋亡是细胞在基因表达控制下,为维持内部环境稳定而有序自主死亡的过程^[7-9]。与细胞坏死不同,细胞凋亡不是一个被动的过程,而是一个涉及一系列基因的激活、表达和调节的主动过程。它不是一种病理条件下的自体损伤现象,而是一种以诱导死亡来更积极地更好地适应生存环境的过程。从细胞凋亡的角度来看,肿瘤的发生是由于细胞凋亡机制受到抑制,无法通过凋亡正常清除肿瘤细胞,从而促进增殖^[10]。本次研究结果显示,在TNKS2基因高表达的A549细胞内,细胞凋亡百分比明显低于TNKS2基因低表达的细胞。表明TNKS2具有促进肺鳞癌进展的可能。

恶性肿瘤易通过淋巴管、血液循环等多种途径转移^[11-13]。迁移和侵袭是肿瘤转移的关键过程^[14,15]。本次研究采用Transwell实验确定TNKS2如何影响肿瘤细胞的侵袭。结果显示,经过TNKS2干扰的H647细胞增殖能力、侵袭能力同步降低;而经过TNKS2基因高表达后的A549细胞增殖、侵袭能力均提升。表明TNKS2高表达增强了肺鳞癌细胞的侵袭和迁移能力,而TNKS2低表达则相反。与既往研究Yu等^[16]、Kang等^[17]结果一致。

综上所述,TNKS2在肺鳞癌细胞恶性表型中发挥重要作用,而这一作用可能是通过TNKS2/ β -catenin途径促进肺鳞癌细胞的增殖、凋亡和侵袭。

这些发现为开发以TNKS2为靶点治疗肺鳞癌的治疗方法提供理论基础。但本次研究仅进行了体外细胞实验。由于肺是人体主要的呼吸器官,体外培养的肺癌细胞的生长环境和氧浓度与体内肺组织不同。因此,本次研究结果并不能反映TNKS2在细胞体内的具体影响。此外,未来的研究需要包括更详细和深入地分析,以探索TNKS2/ β -catenin或其他途径的机制。

参考文献

- 1 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3):209-249.
- 2 Dietel M, Bubendorf L, Dingemans AM, et al. Diagnostic procedures for non-small-cell lung cancer (NSCLC): Recommendations of the European expert group[J]. Thorax, 2016, 71(2):177-184.
- 3 Wang Y, Jiang W, Liu X, et al. Tankyrase 2 (TNKS2) polymorphism associated with risk in developing non-small cell lung cancer in a Chinese population[J]. Pathol Res Pract, 2015, 211(10):766-771.
- 4 Jia Z, Liu Y, Gao Q, et al. miR-490-3p inhibits the growth and invasiveness in triple-negative breast cancer by repressing the expression of TNKS2[J]. Gene, 2016, 593(1):41-47.
- 5 Lu ML, Zhang Y, Li J, et al. MicroRNA-124 inhibits colorectal cancer cell proliferation and suppresses tumor growth by interacting with PLCB1 and regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(1):121-136.
- 6 Wang H, Lu B, Castillo J, et al. Tankyrase inhibitor sensitizes lung cancer cells to endothelial growth factor receptor (EGFR) inhibition via stabilizing angiomotins and inhibiting YAP signaling[J]. J Biol Chem, 2016, 291(29):15256-15266.
- 7 Guo Y, Tan J, Miao Y, et al. Effects of microvesicles on cell apoptosis under hypoxia[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019(2):5972152.
- 8 Pistrutto G, Trisciuglio D, Ceci C, et al. Apoptosis as anti-cancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies[J]. Aging (Albany NY), 2016, 8(4):603-619.
- 9 Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials[J]. Biosci Rep, 2019, 39(1):BSR20180992.
- 10 Liu G, Pei F, Yang F, et al. Role of autophagy and apop-

- toxis in non-small-cell lung cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(2):367.
- 11 Liu Z, Liang H, Lin J, et al. The incidence of lymph node metastasis in patients with different oncogenic driver mutations among T1 non-small-cell lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2019, 134(8):218-224.
 - 12 Yang J, Peng A, Wang B, et al. The prognostic impact of lymph node metastasis in patients with non-small cell lung cancer and distant organ metastasis[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2019, 36(5):457-466.
 - 13 Yang XY, Liao JJ, Xue WR. FMNL1 down-regulation suppresses bone metastasis through reducing TGF- β 1 expression in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117(9):109126.
 - 14 Gong R, Lin W, Gao A, et al. Forkhead box C1 promotes metastasis and invasion of non-small cell lung cancer by binding directly to the lysyl oxidase promoter[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(12):3663-3676.
 - 15 He W, Zhang H, Wang Y, et al. CTHRC1 induces non-small cell lung cancer (NSCLC) invasion through upregulating MMP-7/MMP-9[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1):400.
 - 16 Yu M, Chen Y, Li X, et al. YAP1 contributes to NSCLC invasion and migration by promoting slug transcription via the transcription co-factor TEAD[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5):464.
 - 17 Kang HW, Wang F, Wei Q, et al. miR-20a promotes migration and invasion by regulating TNKS2 in human cervical cancer cells[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(6):897-904.
- (收稿日期 2022-02-07)
(本文编辑 高金莲)

(上接第488页)

- 11 Ghoshal UC, Srivastava D. Irritable bowel syndrome and small intestinal bacterial overgrowth: Meaningful association or unnecessary hype[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(10):2482-2491.
 - 12 方金, 江桂华, 许鸣, 等. 肠易激综合征患者的灰质体积改变: VBM方法研究[J]. *临床放射学*, 2013, 32(12):1702-1705.
 - 13 崔立红, 王晓辉, 闫志辉, 等. 小肠细菌过度生长与肠易激综合征的关系[J]. *解放军医学院学报*, 2015, 36(10):979-982.
 - 14 Pimentel M. Evaluating a bacteria l hypothesis in IBS using a modification of Koch's postulates: part1[J]. *Am J Gastroenterol*, 2010, 105(4):718-721.
 - 15 Doty RL. Olfaction in Parkinson's disease and related disorders[J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 46(3):527-552.
 - 16 Doty RL, Shaman P, Dann M. Development of the university of pennsylvania smell identification test: A standardized microencapsulated test of olfactory function[J]. *Physiol Behav*, 1984, 32:489-502.
 - 17 谢忱, 汤玉蓉, 林琳. 氢呼气试验在肠易激综合征中的应用[J]. *中华消化杂志*, 2015, 35(1):62-64.
 - 18 钟良, 剂伟, 戎兰, 等. 慢性肝病与小肠细菌过度生长氢呼气试验的结果[J]. *胃肠病学*, 2006, 11:96-98.
 - 19 Ning Y, Lou C, Huang ZK, et al. Clinical value of radio-nuclide small intestine transit time measurement combined with lactulose hydrogen breath test for the diagnosis of bacterial overgrowth in irritable bowel syndrome[J]. *Hell J Nucl Med*, 2016, 19(2):124-129.
 - 20 侯妮, 宁艳丽, 陈东方, 等. 核素示踪果糖氢呼气试验诊断小肠细菌过度生长[J]. *中华医学与分子医学杂志*, 2017, 37(8):478-481.
 - 21 Babu J, Kumar S, Babu P, et al. Frequency of lactose mal-absorption among healthy southern and northern Indian populations by genetic analysis and lactose hydrogen breath and tolerance tests[J]. *Am J Clin Nutr*, 2010, 91(1):140-146.
- (收稿日期 2022-01-29)
(本文编辑 葛芳君)