文章编号:1000-5404(2010)15-1609-04

论著

PKD3 促进非小细胞肺癌 A549 细胞迁移的作用和机制

邹志鹏[1],曾方银[2],冯 丽[1],柯志勇[1],Wang Q Jane[3],邓 凡[1] (510515 广州,南方医科大学:细胞生物学教研室[1],南方医院检验科[2];15260,USA,Pennsylvania,Pittsburgh, University of Pittsburgh School of Medicine, Department of Pharmacology and Chemical Biology[3])

【摘要】 目的 探讨 PKD3 在非小细胞肺癌细胞迁移和侵袭中的作用及机制。方法 以人非小细胞肺癌 A549 细胞为研究对象,通过重组腺病毒感染和 siRNA 转染的策略,采用 HEK293 细胞测定病毒滴度;荧光定量 RT-PCR 和 Western blot 检测转染对照 siRNA 与 PKD3 siRNA 的 A549 细胞中 PKD3、MT1-MMP、MMP-2 的 mRNA 和蛋白表达水平差异;创伤愈合实验检测 PKD3 过表达或 siRNA 转染后不同时间点各组细胞的迁移能力。结果 经 HEK293 细胞病毒滴度测定,3 种重组腺病毒 Ade-LacZ、Ade-PKD3 和 Ade-PKD3-DN 滴度分别达 2.4×10^9、3.0×10^9、3.2×10^9 PFU/ml;免疫印迹证实 Ade-PKD3 和 Ade-PKD3-DN 在 A549 中高效过表达;在感染细胞 24 h 后和细胞划痕后 4、20 h,与 Ade-LacZ 感染的对照细胞相比,感染 Ade-PKD3 的 A549 迁移能力显著增强($P<0.01$),而细胞划痕后 8 h 和 20 h 后,与 Ade-LacZ 感染细胞相比,Ade-PKD3-DN 的 A549 迁移能力显著减弱($P<0.01$);同时,siRNA 敲低 A549 细胞中内源性 PKD3 的表达不仅在细胞划痕后的 16、24、36 h 明显抑制细胞的迁移,而且在 mRNA 和蛋白水平下调肿瘤细胞迁移和侵袭相关基因 MT1-MMP、MMP-2 的表达。结论 PKD3 的表达可显著增强 A549 的迁移能力,这种作用可能通过上调 MT1-MMP、MMP-2 的表达实现。

【关键词】 非小细胞肺癌;蛋白激酶 D3;腺病毒;siRNA;细胞迁移
【中图法分类号】 R345.557;R730.23;R734.2 **【文献标志码】** A

Role and mechanism of protein kinase D3 in promoting migration of non-small cell lung cancer A549 cells

Zou Zhipeng[1], Zeng Fangyin[2], Feng Li[1], Ke Zhiyong[1], Wang Q Jane[3], Deng Fan[1] ([1]Department of Cell Biology, [2]Department of Clinical Laboratory, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, 510515, Guangdong Province, China; [3]Department of Pharmacology and Chemical Biology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania, 15260, USA)

【Abstract】 Objective To study the role and mechanism of protein kinase D3 (PKD3) in promoting migration and invasion of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. Methods Human NSCLC A549 cells were infected with a high titer of Ade-LacZ, Ade-PKD3 or Ade-PKD3-DN adenovirus or transfected with siRNA of non-specific control (si-CTL) and siRNA of PKD3 (si-PKD3), respectively. Expression of PKD3, MT1-MMP, MMP-2 mRNAs and proteins in NSCLC A549 cells was detected by real-time RT-PCR and Western blot analysis, respectively. Migration of A549 cells infected with adenovirus or transfected with siRNA was detected at different time points by wound healing assay. Results The titer of Ade-LacZ, Ade-PKD3 or Ade-PKD3-DN adenovirus reached 2.4×10^9, 3.0×10^9, and 3.2×10^9 PFU/ml, respectively. Western blotting showed that the PKD3 or dominant negative mutant PKD3 (PKD3-DN) was over-expressed. The migration level of A549 cells infected with Ade-PKD3 was significantly higher than that of those infected with Ade-LacZ in 4 and 20 h after cell scratching ($P<0.01$), whereas dramatically reduced after infection with Ade-PKD3-DN in 8 and 20 h after cell scratching ($P<0.01$). Furthermore, PKD3 knocked down by siRNA transfection not only inhibited the migration of A549 cells in 16, 24 and 36 h after cell scratch, but also down-regulated the expression of MT1-MMP, MMP-2 at mRNA and protein levels. Conclusion Expression of PKD3 can significantly increase the migration of NSCLC A549 cells by up-regulating the expressions of MT1-MMP and MMP-2.

【Key words】 non-small cell lung cancer; protein kinase D3; adenovirus; siRNA; cell migration

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30973014), and the Starting Funds of Scientific Research for the Returned Overseas of Ministry Education (K1010353). Corresponding author: Deng Fan, Tel: 86-20-61647073, E-mail: fandeng@smu.edu.cn

【基金项目】 国家自然科学基金(30973014);教育部留学回国人员科研启动基金(K1010353)
【通信作者】 邓 凡,电话:(020)61647073,E-mail:fandeng@smu.edu.cn

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)的侵袭转移是造成患者死亡的主要原因。非小细胞肺癌化疗可显著提高3期和4期非小细胞癌患者的存活率。在众多化疗药物中,信号通路抑制剂是当前研究的焦点,表皮生长因子受体抑制剂和抗血管生成药物已广泛应用于临床并取得了一定疗效[1-4]。非小细胞肺癌的增殖、迁移和转移过程往往包括多条信号通路的协同作用,单用某一药物(抑制单一的信号通路)很可能导致其他信号通路的代偿性激活而难以达到预期疗效。因此,发现并研究调控非小细胞肺癌增殖、迁移和转移的关键信号分子将有助于开发更多高效、特异的信号通路抑制剂[2]。

蛋白激酶D3(protein kinase D3,PKD3)作为蛋白激酶D家族的新成员,不仅可由二酰基甘油(diacylglycerol, DAG)激活,也可为新型PKC(如PKC episilon)所激活,其在肿瘤增殖、存活、侵袭和转移的关键作用成为当前研究的热点。我们的前期研究显示,PKD3通过调节前列腺癌细胞中Akt和EKR1/2信号通路而促进细胞的增殖和存活[5]。但PKD3是否参与肿瘤的侵袭和转移尚不清楚。本研究以人非小细胞肺癌A549细胞为研究对象,通过重组腺病毒感染和siRNA转染的策略,探讨过表达野生型PKD3、显隐性突变体PKD3(PKD3-DN)以及siRNA敲低内源性PKD3的表达对A549细胞的迁移作用及可能的下游调节机制,旨在为评价PKD3作为前列腺癌新的标记分子和或治疗靶分子的可能性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人NSCLC细胞株A549引自美国ATCC,HEK293细胞由本室保存。细胞培养用胎牛血清、双抗及高糖DMEM培养基购自HyClone公司,转染试剂Lipofectamine2000购自Invitrogen公司,腺病毒载体Ade-LacZ、野生型PKD3的腺病毒载体Ade-PKD3和显隐性突变体PKD3的腺病毒载体Ade-PKD3-DN由美国匹兹堡大学医学院Dr. Jane Wang惠赠,聚丙烯酰胺凝胶电泳所需之丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、SDS、Tris及甘氨酸等超纯生化试剂均购自美国Promega公司,β-actin抗体(C4):sc-47778购自Santa Cruz,PKD3(A300-319A)抗体购自Bethyl Laboratories,PKD3 Validated Stealth™ RNAi DuoPak由Invitrogen公司设计和合成。Real time RT-PCR相关基因的引物由上海英骏公司设计和合成,其序列如下:PKD3正义链:5′-ACCCGTCCCACGATATGTCAGTA-3′,反义链:5′-CAGCGTTTATGGCAGTTGAATTTG-3′;MT1-MMP正义链:5′-CCTTGGACTGTCAGGAATGAG-3′,反义链:5′-GAGGGGTCACTGGAATGCT-3′;MMP-2正义链:5′-GGAGGAGAAGGCTGTGTTCTT-3′,反义链:5′-ATCCACTCGCTGGACATCA-3′。内参照基因Beta 2-Mcrotubulin(B2M)的引物序列,正义链:5′-TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT-3′,反义链:5′-TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT-3′。

1.2 细胞培养

A549细胞及HEK293细胞均培养于DMEM完全培养基(10% 胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 ng/ml链霉素)中,培养条件为37 ℃,5% CO_2。

1.3 重组腺病毒Ade-LacZ、Ade-PKD3和Ade-PKD3-DN转染及腺病毒扩增

用Lipofectamine2000分别将腺病毒载体Ade-LacZ、野生型PKD3的腺病毒载体Ade-PKD3和显隐性突变体PKD3的腺病毒载体Ade-PKD3-DN转染入指数生长的HEK293细胞中,产生复制缺陷型腺病毒。在倒置显微镜下观察细胞病变效应(CPE),待细胞全部病变后,收集上清和细胞,反复冻融3次,至细胞完全裂解。置4 ℃ 3 000 r/min离心5 min,收集上清,0.22 μm微孔滤膜过滤除菌,于-70 ℃保存备用。

1.4 重组腺病毒滴度测定和人NSCLC细胞A549的感染

按每孔10^4加入HEK293细胞到96孔板中,37 ℃培养箱培养6 h。分别将Ade-LacZ、Ade-PKD3和Ade-PKD3-DN 3种病毒原液按10^{-9}~10^{-2}稀释度稀释,将每个稀释度的病毒液加入96孔板,每孔100 μl,37 ℃、5% CO_2的培养箱中培养10 d后,倒置显微镜下观察CPE,根据Karber方法计算获得的病毒滴度。

按0.7×10^5/ml将处于指数生长期的人NSCLC细胞株A549接种入12孔培养板中(同时接种2块12孔板,一块用于免疫印迹实验,另一块用于创伤愈合实验),37 ℃培养箱生长过夜。按照MOI=10.0,分别将扩增的Ade-LacZ、Ade-PKD3和Ade-PKD3-DN 3种重组腺病毒感染培养的A549肺癌细胞,混匀后37 ℃、5% CO_2的培养箱中孵育24 h。

1.5 siRNA转染人NSCLC细胞株A549

PKD3 siRNA是由Invitrogen公司设计并证实具有抑制作用的PKD3 Validated Stealth™ RNAi DuoPak(Part No./Catalog No. 45-1814),其序列为:siRNA-PKD3-1:5′-GCUGCUUCUCCGUGUUCAAGUCCUA-3′,siRNA-PKD3-2:5′-GCAGAGUGAAAGUUCCACACACAUU-3′,转染时将siRNA-PKD3-1与siRNA-PKD3-2 1∶1混合,具体转染方法按Lipofectamine2000的说明书进行。

1.6 细胞创伤愈合实验

重组腺病毒感染24 h后或siRNA转染40 h后,用10 μl Tip头于各组细胞的对应孔内各划3条平行划痕,重组腺病毒感染的A549细胞分别于划痕后的4、8 h和20 h拍照,siRNA转染的A549细胞于划痕后的16、24 h和36 h拍照,分别计算3条平行划痕的平均距离(每条划痕各取3个固定位置计算距离)。创伤愈合距离计算方法:创伤愈合百分比=(初始划痕宽度-指定时间的划痕宽度)/初始划痕宽度×100%。

1.7 免疫印迹实验

收集细胞,加入细胞裂解液于冰上裂解30 min,于4 ℃ 12 000 r/min离心20 min,取上清Bradford法测定蛋白浓度。取等量的蛋白进行SDS-PAGE电泳并转位到PVDF膜上,最后采用化学发光法检测。具体步骤及试剂配方参见文献[6]。

1.8 荧光定量 RT-PCR 检测

细胞总 RNA 提取按照 Trizol 试剂(Invitrogen)的说明书进行。逆转录和荧光定量 PCR 按照复能基因公司(FULGENE)试剂盒的说明书进行。PCR 反应：95 ℃ 预变性 10 min，95 ℃ 10 s，58 ℃ 15 s，72 ℃ 20 s，40 个循环，72 ℃ 延伸 10 min，72 ℃ 采集荧光信号。以 B2M 作为内参照基因，并采用相对定量法进行定量。相对表达量 $=2^{-\triangle\triangle Ct}$[7]，△Ct = 目的基因平均 Ct 值 − 内参照基因平均 Ct 值，△△Ct = 实验组△Ct − 对照组△Ct。

1.9 统计学分析

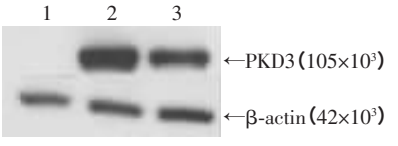
数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，条图的制作和统计均使用 Graphpad Prism 5.0 软件，使用双因素方差分析各组 A549 在不同时间段的迁移能力差异，多重比较行 Bonferroni 检验。

2 结果

2.1 PKD3 的表达和活性对 A549 细胞迁移的影响

3 种病毒液 Ade-LacZ、Ade-PKD3 和 Ade-PKD3-DN 经扩增后的滴度均达 10^9 PFU/ml，分别为 2.4×10^9、3.0×10^9、3.2×10^9 PFU/ml，其滴度已达感染靶细胞的要求。

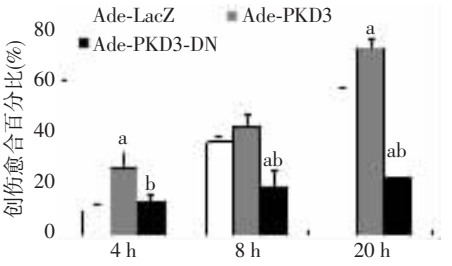
Western blot 检测 PKD3 蛋白的表达，结果显示：相对于 Ade-LacZ 对照，腺病毒 Ade-PKD3 和 Ade-PKD3-DN 感染 A549 细胞后，PKD3 及 PKD3-DN 在 A549 中均显著过表达。由于曝光时间较短(10 s)，故而未能检测出 A549 细胞内的内源性 PKD3 表达(图 1)。



1：Ade-LacZ；2：Ade-PKD3；3：Ade-PKD3-DN

图 1　Western blot 检测腺病毒感染 A549 细胞后 PKD3 蛋白的表达

在细胞划痕后的 4 h 和 20 h，过表达 PKD3 的 A549(Ade-PKD3)的愈合百分比均显著高于 Ade-LacZ($P<0.01$)，而过表达 PKD3-DN(Ade-PKD3-DN)的 A549 愈合百分比不仅远低于 PKD3 过表达(Ade-PKD3)，而且在细胞划痕后的 8 h 和 20 h 明显低于 Ade-LacZ($P<0.01$)，4 h 时则与 Ade-LacZ 无显著差异($P>0.05$，图 2)。表明野生型的 PKD3 的表达促进 A549 的迁移，而显隐性突变体 PKD3(PKD3-DN)则抑制细胞的迁移。

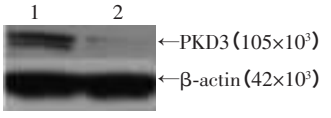


a：$P<0.01$，与 Ade-LacZ 比较；b：$P<0.01$，与 Ade-PKD3 比较

图 2　创伤愈合实验检测腺病毒感染 A549 细胞后的细胞迁移变化

2.2 敲低内源性 PKD3 的表达对 A549 细胞迁移的影响

转染 A549 细胞 48 h 后，Western blot 检测结果表明：与对照 siRNA(si-CTL)相比，siRNA-PKD3(si-PKD3)明显敲低 PKD3 的表达(图 3)。同时，在细胞划痕后的 16($P<0.01$)、24 h($P<0.05$)和 36 h($P<0.01$)，siRNA-PKD3 转染的 A549 细胞愈合百分比分别为[(4.10 ± 3.17)%(16 h)、(26.55 ± 8.89)%(24 h)和(30.39 ± 8.11)%(36 h)]，均显著低于 si-CTL 转染对照[分别为(34.16 ± 4.98)%、(41.07 ± 5.43)%和(54.38 ± 3.75)%](图 4)，提示 si-PKD3 特异性地抑制 A549 细胞的迁移。

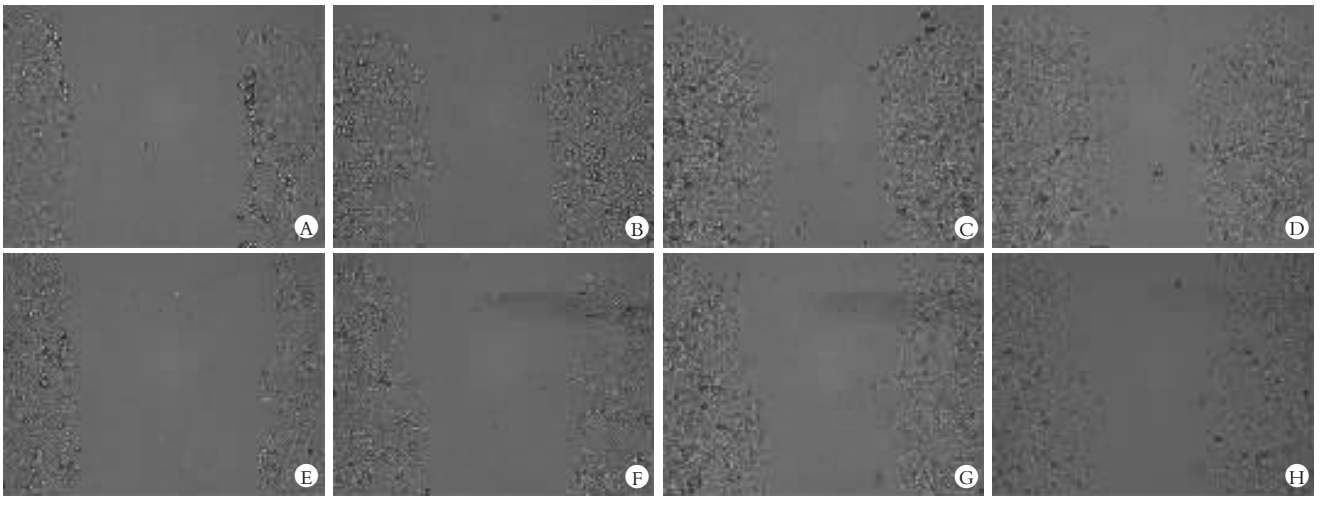


1：si-CTL；2：si-PKD3

图 3　Western blot 检测 si-CTL、si-PKD3 转染的 A549 细胞中 PKD3 蛋白的表达

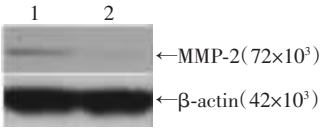
2.3 PKD3 通过调节 MT1-MMP 和 MMP-2 的表达对 A549 细胞迁移的影响

与 si-CTL 相比，敲低内源性 PKD3 的表达使 MT1-MMP 和 MMP-2 在 mRNA 水平的相对表达分别下降了约 53%(0.53 ± 0.01)和 73%(0.73 ± 0.01)($P<0.05$)。进一步 Western blot 检测 MMP-2 的表达较对照细胞也明显下调(图 5)。上述结果提示，PKD3 可能通过上调 MT1-MMP 和 MMP-2 的表达而促进 A549 细胞的侵袭和迁移。



A ~ D：si-CTL；E ~ H：si-PKD3；A、E：0 h；B、F：16 h；C、G：24 h；D、H：36 h

图 4　si-CTL、si-PKD3 转染的 A549 细胞在划痕后不同时间点迁移能力的变化　(倒置相差显微镜 ×100)



1:si-CTL 2:si-PKD3

图5 Western blot检测si-CTL、si-PKD3转染的A549细胞中MMP-2蛋白的表达

3 讨论

腺病毒载体具备高效传递和表达基因的能力,其宿主范围广,对人致病性低;在增殖和非增殖细胞中均可同时感染和表达多个基因;可有效增殖,滴度高;不整合到染色体中,无插入致突变性,安全性高。PKD3及PKD3-DN的高效表达是顺利观察到A549创伤愈合能力差异的有效保证,我们曾在A549中过表达pEGFP-PKD3及pEGFP-PKD3-DN(以质粒pEGFP-C2为载体),但据荧光显微镜观察,未获得满意的转染效率。而我们在HEK293细胞中扩增的3种腺病毒均达到了较高的滴度,在转染A549时PKD3及PKD3-DN均获得了很高的表达水平。

显隐性突变体PKD3-DN(D720A)是将PKD3的催化结构域720位点进行了D720A的定点突变,因而不能结合ATP,与野生型PKD3相比,显隐性突变体PKD3-DN(D720A)的激酶活性较低[8]。本研究中,在细胞划痕后的4 h和20 h,过表达PKD3的A549(Ade-PKD3)的愈合百分比均显著高于对照Ade-LacZ,而过表达PKD3-DN的A549(Ade-PKD3-DN)愈合百分比远低于PKD3过表达(Ade-PKD3);同时,在细胞划痕后的8 h和20 h,Ade-PKD3-DN的A549愈合百分比明显低于对照Ade-LacZ。上述结果提示,PKD3对A549细胞的迁移能力的增强作用依赖于PKD3的激酶活性,PKD3-DN可部分竞争内源性PKD3的激酶活性,并部分降低A549的迁移能力。

siRNA的靶向特异性是抑制或敲低内源性基因表达的关键。为此,我们利用了Invitrogen公司设计并证实具有抑制作用的PKD3 Validated Stealth™ RNAi DuoPak转染A549细胞,结果表明siRNA-PKD3(si-PKD3)明显敲低A549细胞中内源性PKD3的表达。同时,敲低了内源性PKD3表达的细胞与对照相比,在细胞划痕后的16、24、36 h测定的细胞愈合率均显著低于si-CTL转染对照,表明si-PKD3特异性地抑制A549细胞的迁移。

肿瘤细胞的迁移和对周围组织和血管的侵袭是肿瘤细胞转移的关键步骤,其发生与进展受肿瘤和肿瘤微环境的多种因素的共同作用[9],其中MMP参与了肿瘤的进展与转移等多种病理、生理过程[10]。多项研究已证实,MT1-MMP和MMP-2的高水平表达与肺癌的转移密切相关,而且在在易发生转移的非小细胞肺癌中,MT1-MMP的高表达更易促进MMP-2的酶活性[11,12]。本研究中,敲低A549细胞中内源性PKD3的表达明显降低细胞中MT1-MMP和MMP-2的mRNA的表达。由于MMP-2的前体(Pro-MMP-2)的激活受MT1-MMP的调节,我们进一步检测了siRNA转染的A549细胞中MMP-2的蛋白表达水平,结果表明敲低A549细胞中内源性PKD3的表达明显降低MMP-2的表达。提示,PKD3可能通过上调MT1-MMP和MMP-2的表达而促进A549细胞的侵袭和迁移。关于PKD3是否调节MMP-2的活性及其与肿瘤转移的相关性,还需体内实验的进一步证实。

本研究表明,PKD3的表达和激活可以促进人类肺腺癌A549细胞的迁移,具有潜在的促进肿瘤转移的功能,这一功能作用可能通过上调MT1-MMP、MMP-2的表达实现。

参考文献:

[1] 张明慧,胡义德,仲晨. 含顺铂的4组联合化疗方案治疗晚期非小细胞肺癌的临床疗效比较[J]. 第三军医大学学报,2009,31(8):744-747.

[2] Pallis A G, Serfass L, Dziadziusko R, *et al*. Targeted therapies in the treatment of advanced/metastatic NSCLC[J]. Eur J Cancer, 2009, 45(14):2473-2487.

[3] Gettinger S. Targeted therapy in advanced non-small-cell lung cancer[J]. Semin Respir Crit Care Med, 2008, 29(3):291-301.

[4] Ardizzoni A, Tiseo M. Novel targeted approaches in non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. Ann Oncol, 2006, 17(Suppl 5):v91-v93.

[5] Chen J, Deng F, Singh S V, *et al*. Protein kinase D3 (PKD3) contributes to prostate cancer cell growth and survival through a PKCepsilon/PKD3 pathway downstream of Akt and ERK 1/2[J]. Cancer Res, 2008, 68(10):3844-3853.

[6] Lu G, Chen J, Espinoza L A, *et al*. Protein kinase D 3 is localized in vesicular structures and interacts with vesicle-associated membrane protein 2[J]. Cell Signal, 2007, 19(4):867-879.

[7] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(t)) method[J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.

[8] Anderson G, Chen J, Wang Q J. Individual C1 domains of PKD3 in phorbol ester-induced plasma membrane translocation of PKD3 in intact cells[J]. Cell Signal, 2005, 17(11):1397-1411.

[9] Sahai E. Mechanisms of cancer cell invasion[J]. Curr Opin Genet Dev, 2005, 15(1):87-96.

[10] Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment[J]. Cell, 2010, 141(1):52-67.

[11] Yamamura T, Nakanishi K, Hiroi S, *et al*. Expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase and metalloproteinase-2 in nonsmall cell lung carcinomas[J]. Lung Cancer, 2002, 35(3):249-255.

[12] Atkinson J M, Pennington C J, Martin S W, *et al*. Membrane type matrix metalloproteinases (MMPs) show differential expression in non-small cell lung cancer (NSCLC) compared to normal lung: correlation of MMP-14 mRNA expression and proteolytic activity[J]. Eur J Cancer, 2007, 43(11):1764-1771.

(收稿:2010-03-10 修回:2010-04-26)

(编辑 张 维)