论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201411117

GPC5基因在肺腺癌细胞系中的功能研究

聂 欢[1],袁 帅[1],刘庆云[1],向 颖[1],吴 龙[1],邬 娜[1],张梦轩[1],余祖滨[2],白 莉[3],李亚斐[1] (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院军队流行病学教研室[1];400037 重庆,第三军医大学新桥医院:胸外科[2],全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室[3])

[摘要] **目的** 研究GPC5基因在肺腺癌细胞系中的表达情况及其对肺腺癌细胞系生物学行为的影响。**方法** 采用逆转录PCR(RT-PCR)、实时定量PCR(qRT-PCR)以及Western blot分析肺腺癌细胞系中GPC5基因mRNA及蛋白表达情况;构建GPC5过表达载体及干扰载体,通过转染构建GPC5过表达细胞系及GPC5沉默细胞系;利用CCK-8法分析肺腺癌细胞系生长情况;通过流式细胞术检测肺腺癌细胞系的周期及凋亡变化。**结果** 检测了GPC5基因在4株肺腺癌细胞系(A549、H1299、H358和H1975)和1株肺正常上皮细胞系(HBE)中的mRNA表达情况,发现与HBE细胞系相比,GPC5基因在A549细胞系中呈低表达,在H1299细胞系中高表达,同时蛋白检测结果与mRNA水平一致;A549细胞中过表达GPC5基因可抑制细胞生长,引起细胞周期阻滞;在H1299细胞中干扰GPC5基因表达促进细胞生长,促进细胞周期;在过表达和干扰细胞模型中均未发现GPC5基因对细胞凋亡的显著影响。**结论** GPC5基因可以对肺腺癌细胞系的生物学行为产生影响,可能是肺腺癌的抑癌基因。

[关键词] GPC5;肺腺癌;细胞增殖;细胞周期;细胞凋亡

[中图法分类号] R394.2; R730.23; R734.2 [文献标志码] A

Functions of glypican-5 gene in lung adenocarcinoma cell lines

Nie Huan[1], Yuan Shuai[1], Liu Qingyun[1], Xiang Ying[1], Wu Long[1], Wu Na[1], Zhang Mengxuan[1], Yu Zubin[2], Bai Li[3], Li Yafei[1] ([1]Department of Epidemiology, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Thoracic Surgery, [3]Institute of Respiratory Diseases, Key Laboratory of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 40037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the expression pattern of glypican-5 (GPC5) gene in the lung adenocarcinoma cell lines and the effects of its over-expression or silencing on the biological behaviors in lung adenocarcinoma cell lines. **Methods** The expression of GPC5 gene at mRNA and the protein levels in 4 lung adenocarcinoma cell lines (A549, H1299, H358 and H1975) and 1 strain of normal lung epithelial cell line (HBE) was determined by reverse transcription PCR (RT-PCR), real-time quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blotting. Over-expression vectors of GPC5 gene and its interference plasmids were constructed, and then transfected respectively into A549 cells (lower expression of the gene) or H1299 cells (higher expression) to over-express or silence the gene. Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was performed to measure the proliferation of the lung adenocarcinoma cell lines. Cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry. **Results** Compared with the expression level of GPC5 in normal cells (HBE), the level was lower in A549 cells and highly in H1299 cells, with its protein level consistent with the mRNA level. Over-expression of GPC5 in A549 cells gene resulted in inhibition of cell growth and arrest of cells at G_1/S phase.

[基金项目] 国家自然科学基金(81171903,81472190);重庆市自然科学基金(CSTC 2011BB5024)

[通信作者] 李亚斐,电话:(023)68752293, E-mail: liyafei2008@hotmail.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150121.1032.006.html(2015-01-21)

On the other hand, interference of GPC5 in H1299 cells promoted cell growth and improved cell cycle. Over-expression and interference of GPC5 gene significantly affected the cell apoptosis in the lung adenocarcinoma cell lines. **Conclusion** GPC5 gene affects the biological behaviors of lung adenocarcinoma cell lines. It may be a tumor suppressor gene, and its specific molecular mechanism is worth of further research.

[**Key words**] glypican-5; lung adenocarcinoma; cell proliferation; cell cycle; cell apoptosis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81171903, 81472190) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011BB5024). Corresponding author: Li Yafei, Tel: 86-23-68752293, E-mail: liyafei2008@hotmail.com

肺癌是发病率和死亡率都极高的恶性肿瘤,肺癌中约85%是非小细胞肺癌。非小细胞肺癌包括肺腺癌和肺鳞癌等,其中以肺腺癌患者占大多数。关于肺癌的遗传易感性,已有大量报道,一项多中心的全基因组关联研究(GWAS)发现位于13q31.3位点的磷脂酰肌醇蛋白聚糖5(glypican-5,GPC5)基因可能与肺腺癌的发生密切相关[1]。GPC5属于磷脂酰肌醇蛋白聚糖类(heparan sulphate proteoglycans, HSPGs),HSPGs通过糖基-磷脂酰肌醇锚定在细胞膜表面,在细胞生长及分化中发挥重要作用[2]。目前研究发现GPC5参与淋巴瘤、横纹肌肉瘤及结肠癌的发生、发展,同时与炎性脱髓鞘疾病、肾病综合征相关[3-7]。而对于GPC5基因在肺癌中是否为抑癌基因或者癌基因目前研究尚存在争议[8-10],因此有必要对GPC5基因在肺癌中的作用进行探索验证。本研究通过同时构建过表达及干扰载体使肺腺癌细胞系中GPC5过表达及沉默,探究其对肺腺癌细胞生长和细胞周期及细胞凋亡的影响,为GPC5基因在肺癌中的作用及其分子机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及主要检测试剂盒

人肺腺癌细胞系H1299、A549、H1975、H358及人正常肺上皮细胞系HBE均购自中科院上海细胞生物学研究所细胞库。总RNA提取试剂盒RNAiso plus购自TaKaRa公司,逆转录试剂盒GoScript™ Reverse Transcription System购自Promega公司,PCR引物由Invitrogen公司合成,转染试剂包括Invitrogen的脂质体2000及Promega的ViaFect™试剂,CCK-8购自DOJINDO,碘化丙啶(PI)试剂购自碧云天,APC、PI双染细胞凋亡检测试剂盒购自BD生物,其他试剂均为进口超纯级或国产分析纯以上级产品。

1.2 逆转录PCR、实时定量PCR和Western blot检测

1.2.1 RNA提取 运用RNAiso plus试剂盒抽提生长状态良好的肺癌细胞系总RNA,采用分光光度仪定量及检测纯度,并取2 μL总RNA进行琼脂糖凝胶电泳,检查RNA是否降解。

1.2.2 逆转录PCR GPC5特异性引物设计根据GenBank中GPC5的mRNA序列采用Primer Premier 5.0进行引物设计,最终确定引物序列为上游:5′-TACAGGCTCACCTCAATGGACAAA-3′,下游:5′-TGTTGGCAAGCGTCTCTTCA-3′,逆转录扩增产物大小为146 bp,根据GPC5逆转录扩增产物大小选择内参基因POLR2A,其引物序列为上游:5′-GCAGAGAAGCTGGTGCTCCGTA-3′,下游:5′-CAGCATGTTGGACTCGATGCAG-3′,逆转录扩增产物大小为126 bp。引物合成由Invitrogen公司完成。

采用逆转录试剂盒将提取的细胞中总RNA合成cDNA,再分别取1 μL cDNA进行PCR扩增,反应体系参照说明书,反应条件为95 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,40个循环;72 ℃ 15 min。同时,PCR扩增看家基因POLR2A作为检验反转录是否成功的标准。反应结束后,取5 μL产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳,确认PCR产物,同时通过不同组之间的电泳条带的光密度差异进行GPC5基因相对表达量的初步分析。

1.2.3 实时定量PCR反应 qRT-PCR的cDNA合成同RT-PCR第一步,获得cDNA后取1 μL cDNA作为模板。采用荧光定量试剂盒SYBR® Premix Ex *Taq*™进行实时定量PCR反应,以POLR2A作为内参,反应体系参照说明书,反应条件为95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,39个循环。每个待测基因设3个复孔,反应结束后,观察扩增曲线及熔解曲线,记录反应管中的荧光信号到达所设定的阈值时所经历的循环数即Ct值,根据Ct值计算目的基因的相对表达量:$\triangle Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{POLR2A}$,$\triangle\triangle Ct = \triangle Ct_{实验组} - \triangle Ct_{对照组}$。实验组目的基因mRNA的表达量即为对照组的$2^{-\triangle\triangle Ct}$倍。

1.2.4 Western blot 采用碧云天Radio Immunoprecipitation Assay(RIPA)蛋白裂解液提取各细胞总蛋白,并采用Bicinchoninic acid (BCA)法测定蛋白浓

度。取40 μg总蛋白进行10% SDS-PAGE凝胶电泳，转膜，5%脱脂奶粉溶液封闭1 h，分别加入GPC5多克隆抗体(1∶500稀释)、内参GAPDH(1∶2 000稀释)，4 ℃孵育过夜，洗膜3次，加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育1 h，洗膜3次后使用凝胶成像分析系统扫描结果。

1.3 GPC5基因表达载体和miRNA干扰载体构建及鉴定

1.3.1 GPC5基因表达载体的构建和鉴定 在NCBI数据库中(http://www.ncbi.nlm.nih.gov)中查找并下载GPC5基因mRNA的序列，对需要合成的cDNA区域序列进行分析，检查基因内部有无特别复杂的二级结构和重复序列连接。根据基因序列分析的结果，分别进行寡核苷酸(oligo DNA)的设计及合成，利用PCR将合成的oligo拼接成完整的GPC5基因序列，并将合成好的序列TA克隆入pMD-18T载体，测序验证。最后将目的基因克隆装入载体pIRES2-EGFP，测序验证，构建GPC5基因表达载体。

1.3.2 miRNA表达载体的构建与鉴定 通过BLOCK-iT™ RNAi Express数据库(http://rnaidesigner.lifetechnologies.com/rnaiexpress/rnaiExpress.jsp)提交GPC5基因信息选择4个干扰位点(干扰位点序列均经过Blast检验靶基因的特异性)，针对每一个干扰位点设计并合成两段寡核苷酸(oligo DNA)退火形成表达miRNA的双链DNA，然后连接装载于线性质粒pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR。转化至感受态大肠杆菌，挑选阳性克隆，摇菌抽提质粒后进行测序验证。4对oligo DNA序列信息见表1。

1.3.3 GPC5基因表达载体和miRNA干扰载体的转染 载体构建正确后，表达载体及干扰载体的转染根据Lipofectamine® 2000/ViaFect™转染试剂说明书进行，转染的效率通过倒置荧光显微镜进行观察，转染的效果通过RT-PCR、qRT-PCR及Western blot进行验证。

1.4 CCK-8法检测细胞增殖

细胞均以2×10^4/孔细胞接种到96孔板，每组设置6个重复，24 h后转染。转染后继续培养，分别在第1、2、3、4、5天加入10 μL CCK-8试剂染色，37 ℃孵育2 h，在酶联免疫检测仪下测定450 nm波长处的光密度值$D[450]$。实验重复3次。

1.5 细胞周期检测

细胞均以2×10^5/孔接种于6孔板中，24 h后转染。转染后72 h胰酶消化收集细胞，预冷的PBS清洗2次，加入预冷的75%的乙醇4 ℃固定超过12 h。离心收集固定后细胞，预冷的PBS清洗，加RnaseA(终浓度100 μg/mL)，37 ℃水浴消化30 min。加碘化丙啶(PI)至终浓度50 μg/mL，冰浴避光染色30 min。24 h内进行流式细胞术检测，488 nm激发光激发检测。实验重复3次。

1.6 细胞凋亡检测

细胞均以2×10^5/孔接种于6孔板中，24 h后转染。转染后72 h胰酶消化收集细胞，PBS重悬计数。取5~10万重悬的细胞，1 000×g离心5 min，弃上清，加入100 μL的Binding Buffer悬浮细胞，再加入2 μL Annexin V-APC染液及2 μL PI染液，混匀，室温、避光、反应5~15 min，1 h内进行流式细胞术检测。实验重复3次。

1.7 统计学处理

采用SPSS 13.0统计分析软件，计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，两组间差异比较采用t检验，多组间差异比较采用单因素方差分析。

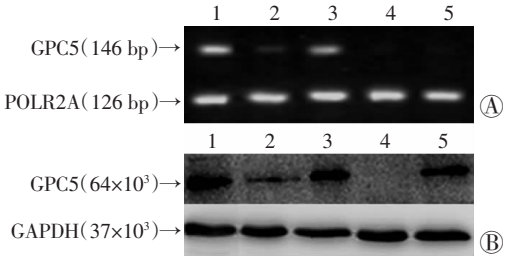
表1 miRNA表达载体oligo DNA序列

oligo名称	oligo DNA序列5′-3′
干扰序列-1	上游：TGCTGTTCAGGAGGGCTCTGCTGCACGTTTTGGCCACTGACTGACGTGCAGCAGCCCTCCTGAA
	下游：CCTGTTCAGGAGGGCTGCTGCACGTCAGTCAGTGGCCAAAACGTGCAGCAGAGCCCTCCTGAAC
干扰序列-2	上游：TGCTGTTCATTAGCACAAAGCTGATCGTTTTGGCCACTGACTGACGATCAGCTGTGCTAATGAA
	下游：CCTGTTCATTAGCACAGCTGATCGTCAGTCAGTGGCCAAAACGATCAGCTTTGTGCTAATGAAC
干扰序列-3	上游：TGCTGTAGAGCTGGACGTTTGAAGAAGTTTTGGCCACTGACTGACTTCTTCAAGTCCAGCTCTA
	下游：CCTGTAGAGCTGGACTTGAAGAAGTCAGTCAGTGGCCAAAACTTCTTCAAACGTCCAGCTCTAC
干扰序列-4	上游：TGCTGACCAAATGGACTCACATCCCGGTTTTGGCCACTGACTGACCGGGATGTGTCCATTTGGT
	下游：CCTGACCAAATGGACACATCCCGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCGGGATGTGAGTCCATTTGGTC
阴性对照	上游：tgctgAAATGTACTGCGCGTGGAGACGTTTTGGCCACTGACTGACGTCTCCACGCAGTACATTT
	下游：cctgAAATGTACTGCGTGGAGACGTCAGTCAGTGGCCAAAACGTCTCCACGCGCAGTACATTTc

2 结果

2.1 肺腺癌细胞系中GPC5基因mRNA及蛋白的表达

RT-PCR检测4株肺癌细胞系A549、H1299、H358、H1975及人正常肺上皮细胞系HBE细胞中GPC5基因mRNA的表达，结果表明GPC5基因的mRNA在H1299、H358细胞中相对高表达，而在A549、H1975中相对低表达(图1A)。同时以正常肺上皮细胞系HBE作对照，对4株肺癌细胞系进行GPC5基因mRNA表达量qRT-PCR分析，GPC5基因mRNA在H1299、H358细胞系中表达水平明显升高($P<0.05$)，$2^{-\triangle\triangle Ct}$值分别为20.1、16.9；在H1975细胞系中表达水平略高，$2^{-\triangle\triangle Ct}$值为1.58，与HBE细胞相比差异无统计学意义($P>0.05$)；而在A549细胞株中表达水平明显降低，$2^{-\triangle\triangle Ct}$值为0.29，差异具有统计学意义($P<0.05$)。在蛋白表达水平，Western blot的结果与mRNA水平的结果一致(图1B)。



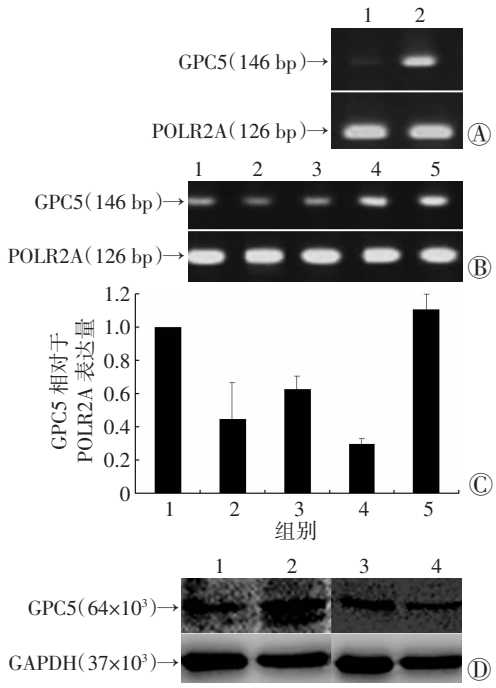
1：H358；2：H1975；3：H1299；4：A549；5：HBE

A：RT-PCR检测GPC5基因mRNA的表达；B：Western blot检测GPC5蛋白的表达

图1 4株肺腺癌细胞系及正常肺上皮细胞系HBE细胞中GPC5基因mRNA及蛋白表达

2.2 GPC5过表达及沉默细胞株的建立及鉴定

成功构建GPC5过表达载体GPC5-pIRES2-EGFP及干扰载体系列pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-GPC5-1/2/3/4载体。根据前期GPC5基因mRNA表达量检测结果，对GPC5低表达肺腺癌A549细胞进行GPC5-pIRES2-EGFP载体转染，对GPC5高表达肺腺癌H1299细胞进行pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-GPC5-1/2/3/4载体转染，对转染前后细胞系中GPC5基因mRNA表达量进行RT-PCR分析(图2A)，qRT-PCR结果表明，A549细胞转染GPC5-pIRES2-EGFP载体后GPC5基因mRNA表达量较空载体组明显增高，$2^{-\triangle\triangle Ct}$值为12 000($P<0.05$)，GPC5过表达细胞系构建成功。对于pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-GPC5-1/2/3/4载体系列，pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-GPC5-3干扰效果最高(图2B、C)，与空载体组相比GPC5表达量降低到30%，差异具有统计学意义($P<0.05$)，后续实验均以pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-GPC5-3载体进行GPC5干扰试验，GPC5低表达细胞系构建成功。此外，在蛋白水平对过表达载体和干扰载体的效果进行验证(图2D)，与mRNA水平结果一致。

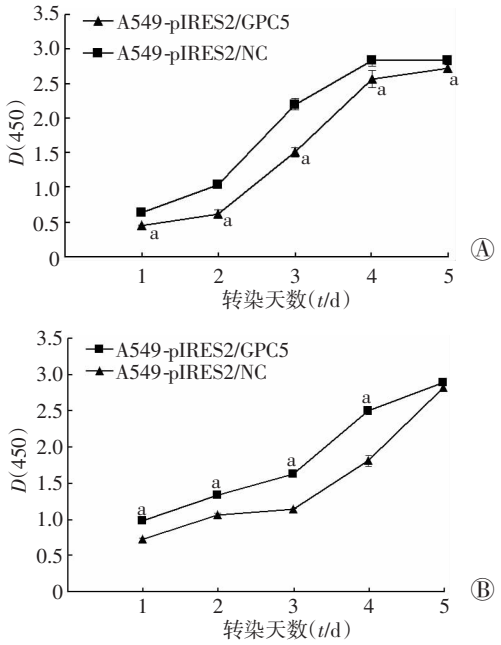


A：RT-PCR分别检测A549细胞过表达GPC5基因前后GPC5基因mRNA的表达 1：pIRES2/NC；2：pIRES2/GPC5；B、C：RT-PCR及qRT-PCR分别检测H1299细胞GPC5基因干扰前后GPC5基因mRNA的表达 1：pcDNA6.2-miR-GPC5-1；2：pcDNA6.2-miR-GPC5-2；3：pcDNA6.2-miR-GPC5-3；4：pcDNA6.2-miR-GPC5-4；5：pcDNA6.2-miR-GPC5-NC；a：$P<0.05$，与空载体组比较；D：Western blot检测表达载体及沉默载体转染效果 1：pIRES2/NC；2：pIRES2/GPC5；3：pcDNA6.2-miR-GPC5-NC；4：pcDNA6.2-miR-GPC5-3

图2 GPC5基因过表达/干扰载体转染效果验证

2.3 GPC5对肺腺癌细胞增殖的影响

采用CCK-8法对转染细胞系进行生长曲线分析，结果表明，过表达GPC5在转染后1、2、3、4、5 d时相点均抑制A549细胞的生长(与转染空载体的对照组相比，各时相点分析均为$P<0.05$)；沉默GPC5基因，在各时相点均促进H1299细胞生长(与空载体组相比较，除第5天之外，其余各时相点均有统计学意义，$P<0.05$)。转染后第3、4天抑制或促进效果最佳(图3)。



A:GPC5 基因过表达抑制 A549 细胞生长 a:$P<0.05$,与空载体组比较;B:GPC5 基因沉默对促进 H1299 细胞生长 a:$P<0.05$,与空载体组比较

图3 CCK-8 检测 GPC5 基因过表达/沉默对肺癌细胞系生长的影响

2.4 GPC5 对肺腺癌细胞周期的影响

采用流式细胞术对转染细胞进行周期检测分析,结果表明,转染后 72 h,过表达 GPC5 基因使 A549 细胞 G_1期比率增高,S 期比率降低、G_2期比率降低,与空载体组相比,G_1期增高及 S 期降低具有统计学差异($P<0.05$,表2);GPC5 基因沉默可使 H1299 细胞 G_1期比率降低、G_2期比率降低,而 S 期比率增高,与空载体组相比,G_1期、S 期变化具有统计学差异($P<0.05$,表2)。

表2 GPC5 基因过表达/沉默对肺癌细胞系周期的影响 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

组别	G_1期(%)	S 期(%)	G_2期(%)
A549-pIRES2/GPC5	80.05 ±0.45[a]	7.79 ±0.29[a]	13.64 ±0.89
A549-pIRES2/NC	66.62 ±1.50	15.32 ±0.76	18.56 ±0.33
H1299-pcDNA6.2-miR-GPC5-3	63.50 ±4.66[a]	23.29 ±3.88[a]	12.18 ±3.96
H1299-pcDNA6.2-miR-GPC5-NC	74.76 ±0.53	11.29 ±1.34	13.82 ±1.21

a:$P<0.05$,与空载体组比较

2.5 GPC5 对肺腺癌细胞凋亡的影响

采用 APC/PI 双染法对转染前后细胞凋亡情况进行流式分析。实验结果表明,GPC5 过表达细胞总凋亡率由 10.03% 降到 8.99%,但差异不具有统计学意义($P>0.05$),同样在沉默细胞系 H1299 中也未观察到细胞凋亡差异(表3)。

表3 GPC5 过表达/沉默对细胞凋亡的影响 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

组别	早期凋亡率(%)	晚期凋亡率(%)	总凋亡率(%)
A549-pIRES2/GPC5	7.66 ±0.56	1.34 ±0.52	8.99 ±1.07
A549-pIRES2/NC	8.71 ±0.79	1.32 ±0.24	10.03 ±0.71
H1299-pcDNA6.2-miR-GPC5-3	5.71 ±1.56	0.64 ±0.14	6.35 ±1.56
H1299-pcDNA6.2-miR-GPC5-NC	6.16 ±0.63	0.67 ±0.09	6.84 ±0.66

3 讨论

GPC5 是磷脂酰肌醇蛋白聚糖(glypican)基因家族成员之一,磷脂酰肌醇蛋白聚糖属于硫酸类肝素蛋白多糖类(heparan sulphate proteoglycans,HSPGs),目前在哺乳类基因组中共发现 GPC1 到 GPC6 的 6 个磷脂酰肌醇蛋白聚糖成员,其中 GPC3 与 GPC5 具有较高同源性[11]。HSPGs 广泛分布于哺乳动物组织内,与生长因子、趋化因子和细胞外基质结构蛋白等相互作用,在细胞的生长、分化和反应中起重要作用[12]。研究表明 GPC5 参与了淋巴瘤、横纹肌肉瘤及结肠癌的发生、发展,同时与多发性硬化、肾病综合征相关,且在不同的疾病中可能发挥不同的作用。一项多中心合作的全基因组关联研究(GWAS)发现,GPC5 基因可能与非吸烟肺腺癌的发生密切相关,使 GPC5 与肺癌关系的研究成为一个热点。

目前关于 GPC5 基因在肺癌中的作用研究仍存在争议。Li 等[8]通过对 GPC5 基因在肺腺癌细胞系中迁移能力的研究并结合临床数据分析提出 GPC5 高表达促进肺癌细胞的迁移、增加预后的风险。而 Yang 等[9]通过对 GPC5 基因在肺腺癌及肺鳞癌细胞系中细胞生长、周期、迁移的研究及更大样本的临床数据分析提出 GPC5 低表达促进细胞的迁移、增加预后的风险。本研究通过探索验证更支持 Yang 等[9]的结果。

本研究通过 RT-PCR、qRT-PCR 以及 Western blot 对不同细胞系 GPC5 基因表达情况进行筛选,发现 GPC5 基因在 A549 细胞中相对低表达,而在 H1299、H358 细胞中相对高表达。我们选择了 A549 细胞系进行 GPC5 基因过表达处理,通过 CCK-8 实验证实 GPC5 过表达能够抑制细胞的生长,这一结果与 Yang 等[9]的研究结果一致,但 Yang 等[9]的研究未证明 GPC5 沉默能够促进细胞生长,分析其原因可能为 GPC5 沉默细胞系 A549、H1975 细胞系中 GPC5 表达量相对较低,而本研究通过对 GPC5 基因高表达的 H1299 细胞系进行 miRNA 干扰研究,结果发现 GPC5 基因沉默能够促进细胞生长,与 Yang 等[9]对 A549、H1975 进行 GPC5 基因过表达后再进行 GPC5 沉默的结果一致。另一方面,Yang 等[9]的干扰研究采用

siRNA 系统,本研究选用 miRNA 干扰载体系统,这种 RNAi 其本质与 shRNA 一致,区别在于 shRNA 靶点序列两端延伸了一段 pri-miRNA 序列的侧翼序列,当 miRNA 载体进入细胞后,可以模拟体内 miRNA 的成熟过程,不容易被细胞识别为"非我",同时又具有 shRNA 的特异性,因此可能产生更好的干扰效果[13-14]。

为了进一步探索 GPC5 基因对肺癌细胞系增殖作用,我们利用流式细胞术对转染前后肺癌细胞系进行细胞周期分析。结果表明 GPC5 过表达肺癌细胞系 A549 的 G_1 期增高,S 期降低;GPC5 沉默细胞系 H1299 的 G_1 期降低,S 期增高,细胞周期的结果分析与细胞增殖 CCK-8 结果分析一致。通过 GPC5 过表达细胞系及 GPC5 沉默细胞系的细胞周期实验结果共同验证了 GPC5 可以通过影响细胞周期进而影响细胞增殖能力。在磷脂酰肌醇蛋白聚糖(glypican)基因家族中,GPC5 基因与 GPC3 基因具有较强的同源性,Valsechi 等[15]研究发现过表达 GPC3 基因能够引起肾癌细胞 G_1 期增高,S 期降低,说明磷脂酰肌醇蛋白聚糖(glypican)基因家族可以通过影响细胞周期进而影响细胞增殖能力。

为了进一步探讨 GPC5 基因对肺癌细胞系功能的影响,本研究探讨了 GPC5 基因对细胞凋亡的影响。结果发现 GPC5 过表达及沉默细胞系细胞凋亡均未产生影响,说明 GPC5 可能不通过凋亡通路影响细胞的生长增殖。Valsechi 等[15]研究表明 GPC3 在肾癌中为抑癌基因,上调或者下调 GPC3 基因对肾癌细胞凋亡没有影响。而另一项研究表明 GPC3 基因在肝癌中为癌基因,下调 GPC3 基因能够通过抑制 Wnt 通路上调 CASPASE-3 表达水平,从而促进肝癌细胞凋亡[16]。由此可见,磷脂酰肌醇蛋白聚糖(glypican)基因家族对不同肿瘤细胞中凋亡影响可能不一样,GPC5 基因主要通过对细胞生长及增殖的影响进而对肺癌细胞产生影响,而 GPC5 基因对肺癌细胞凋亡的影响需要进一步的研究证明。

从目前研究结果来看,GPC5 基因在肺腺癌中可能为抑癌基因,进一步针对 GPC5 基因在肺腺癌细胞侵袭能力、体内致瘤性方面的影响可补充验证文章结果。另一方面关于 GPC5 基因抑癌作用的产生机制及与其他通路的相互作用关系还十分复杂,有待于进一步深入研究。全面深入地研究 GPC5 基因可为肺癌的诊断、治疗提供新的策略和靶点。

参考文献:

[1] Li Y, Sheu C C, Ye Y, *et al*. Genetic variants and risk of lung cancer in never smokers: a genome-wide association study[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(4): 321-330.

[2] Saunders S, Paine-Saunders S, Lander A D. Expression of the cell surface proteoglycan glypican-5 is developmentally regulated in kidney, limb, and brain[J]. Dev Biol, 1997, 190(1): 78-93.

[3] Okamoto K, Tokunaga K, Doi K, *et al*. Common variation in GPC5 is associated with acquired nephrotic syndrome[J]. Nat Genet, 2011, 43(5): 459-463.

[4] Kim J C, Kim S Y, Cho D H, *et al*. Genome-wide identification of chemosensitive single nucleotide polymorphism markers in colorectal cancers[J]. Cancer Sci, 2010, 101(4): 1007-1013.

[5] Williamson D, Selfe J, Gordon T, *et al*. Role for amplification and expression of glypican-5 in rhabdomyosarcoma[J]. Cancer Res, 2007, 67(1): 57-65.

[6] Schraders M, Pfundt R, Straatman H M, *et al*. Novel chromosomal imbalances in mantle cell lymphoma detected by genome-wide array-based comparative genomic hybridization [J]. Blood, 2005, 105(4): 1686-1693.

[7] Shin J G, Kim H J, Park B L, *et al*. Putative association of GPC5 polymorphism with the risk of inflammatory demyelinating diseases[J]. J Neurol Sci, 2013, 335(1/2): 82-88.

[8] Li Y, Miao L, Cai H, *et al*. The overexpression of glypican-5 promotes cancer cell migration and is associated with shorter overall survival in non-small cell lung cancer[J]. Oncol Lett, 2013, 6(6): 1565-1572.

[9] Yang X, Zhang Z, Qiu M, *et al*. Glypican-5 is a novel metastasis suppressor gene in non-small cell lung cancer[J]. Cancer Lett, 2013, 341(2): 265-273.

[10] 饶文, 余祖滨, 向颖, 等. GPC5 基因在肺腺癌组织中差异表达和突变分析[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(11): 1153-1157.

[11] De-Cat B, David G. Developmental roles of the glypicans [J]. Semin Cell Dev Biol, 2001, 12(2): 117-125.

[12] Filmus J, Capurro M, Rast J. Glypicans[J]. Genome Biol, 2008, 9(5): 224.

[13] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004, 431(7006): 350-355.

[14] Zeringue H C, Constantine-Paton M. Post-transcriptional gene silencing in neurons[J]. Curr Opin Neurobiol, 2004, 14(5): 654-659.

[15] Valsechi M C, Oliveira A B, Conceicao A L, *et al*. GPC3 reduces cell proliferation in renal carcinoma cell lines[J]. BMC Cancer, 2014, 14: 631.

[16] 郑大勇, 阮健, 刘斐烨, 等. RNA 干扰 GPC3 基因表达影响肝癌细胞 Huh-7 凋亡的机制研究[J]. 热带医学杂志, 2011, 11(5): 516-519.

(**收稿**:2014-11-12;**修回**:2014-12-01)

(编辑 汪勤俭)