

PKM2 基因沉默对人肺癌细胞生物学特性的影响

张海红 陈虹宇 王亚南

摘要 目的 探讨 M2 型丙酮酸激酶(pyruvate kinase M2, PKM2)下调对人肺癌 A549 细胞生物学特性的影响。**方法** 采用免疫荧光技术检测 A549 细胞中 PKM2 蛋白的表达;将构建有 PKM2 - shRNA 的重组质粒转入 A549 细胞;分别采用实时荧光定量 PCR 法和蛋白质印迹法检测 PKM2 mRNA 和蛋白表达水平;CCK - 8 法检测 PKM2 基因沉默对 A549 细胞增殖能力的影响;采用葡萄糖测定试剂盒测定细胞对葡萄糖的消耗量;Transwell 实验检测细胞穿过人工基膜的能力。**结果** 肺癌 A549 细胞的细胞质及细胞核中均有 PKM2 表达;PKM2 - shRNA 质粒转染 A549 细胞 48h 后,可明显下调 A549 细胞中 PKM2 mRNA 及蛋白的表达水平,并且明显抑制 A549 细胞增殖;PKM2 shRNA 可减少 A549 细胞葡萄糖的消耗,还可抑制细胞侵袭能力。**结论** 在肺癌细胞 A549 中,抑制 PKM2 表达可显著抑制细胞增殖、侵袭和糖代谢能力。

关键词 肺癌 M2 型丙酮酸激酶 shRNA 干扰 生物学功能

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.09.015

Influence of PKM2 Gene Silencing on Biological Characteristics of Lung Cancer Cells. Zhang Haihong, Chen Hongyu, Wang Yanan. Department of Physiology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China

Abstract Objective To investigate the effect of pyruvate kinase M2 (PKM2) down - regulation on the biological characteristics of human lung cancer A549 cells. **Methods** The expression of PKM2 in A549 cells was detected by immunofluorescence. The recombinant plasmids of PKM2 - shRNA were transferred into A549 cells. The expression levels of PKM2 mRNA and protein were test by real - time PCR and Western blotting respectively. CCK - 8 was used to detect the effect of PKM2 gene silencing on the proliferation of A549 cells. The glucose consumption was measured by glucose assay kit; Transwell test was used to detect the ability of cells to pass through the artificial basement membrane. **Results** The expression of PKM2 was found in cytoplasm and nucleus of lung cancer A549 cells. 48 hours after PKM2 - shRNA plasmid transfection, PKM2 mRNA level and protein expression in A549 cells were significantly down - regulated, and the cell proliferation ability of A549 cells was significantly inhibited. PKM2 shRNA can reduce the consumption of glucose and invasion ability in A549 cells. **Conclusion** In lung cancer A549 cells, inhibition of PKM2 expression can significantly inhibit cell proliferation, metabolic capacity and invasion ability.

Key words Lung cancer; Pyruvate kinase M2; shRNA interference; Biological function

肺癌是全球癌症死亡的主要原因之一^[1]。它的两种主要类型是小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)和非小细胞肺癌(non - small cell lung cancer, NSCLC)。NSCLC 占有肺癌病例的 85%,其中约 40%是不可切除的^[1-3]。在我国,随着工业化进程速度加快、环境污染日益严重、人口老龄化加剧,肺癌的风险也越来越大^[4]。肺癌的病因至今仍不完全明确,大量的资料表明,肺癌有许多危险因素,包括吸烟、环境污染、食物和遗传学因素等^[5]。

与正常细胞比较,肿瘤细胞独特的代谢方式为有

氧糖酵解,即在氧气充足的条件下仍以糖酵解的方式供能^[6]。肿瘤的这种特殊生物学特征被称为“Warburg 效应”,被认为是肿瘤的第 7 个特征^[7]。丙酮酸激酶是糖酵解反应最后一步的关键酶,将磷酸烯醇式丙酮酸分解为丙酮酸^[8]。在哺乳动物体内,丙酮酸激酶有 4 种亚型:L、R、M1、M2。其中 PKM2 主要存在于早期胚胎细胞,处于高度增殖状态的细胞,随着组织分化,PKM2 逐渐被其他同工酶替代;PKM2 在肿瘤的形成过程中高度表达^[9-11]。越来越多的研究表明,PKM2 在肿瘤的发生、发展中有重要作用,有望成为抗肿瘤药物的新靶点,具有重要的潜在价值^[12]。本实验通过慢病毒介导技术降低人 NSCLC 细胞 A549 中 PKM2 的表达,探讨 PKM2 对肺癌细胞增殖,侵袭及代谢能力等生物学功能的影响。

基金项目:中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016 - 12M - 1 - 002)

作者单位:100005 北京,中国医学科学院基础医学研究所

通讯作者:王亚南,电子信箱:shlwangyanan@gmail.com

材料方法

1. 实验材料:DMEM 培养基、胎牛血清、青链霉素和胰蛋白酶(均购自美国 Hyclone 公司),DMSO、引物合成(上海生工公司),TRIzol(美国 Invitrogen 公司),兔抗人 PKM2 抗体(美国 CST 公司),小鼠抗人 β -actin 抗体(美国 Santa Cruz 公司)。CCK-8 购自日本同仁生物科技有限公司。8.0 μ m 的 Transwell 小室、PVDF 膜(美国 Millipore 公司)。293T、A549 细胞由本实验室保存。

2. 方法:(1)细胞培养:A549 细胞培养于含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 完全培养基中,在含 5% CO₂ 的 37℃ 恒温培养箱培养。用胰蛋白酶消化,取状态良好的对数生长期的细胞进行实验。(2)免疫荧光法检测 A549 细胞中 PKM2 表达:取状态良好的对数生长期的 A549 细胞,消化后接种于预先放置玻片的六孔板中,待细胞融合度达 60%~75% 时,吸去培养液,用 PBS 洗 3 遍,每次 10min。固定细胞时用 4% 的多聚甲醛溶液在室温固定 15min,0.1% Triton X-100 作用 20min,再用含 10% 血清的封闭液封闭 10min,加 PKM2 抗体(稀释比例 1:100),4℃ 孵育过夜,加入带红色荧光的羊抗兔 IgG 二抗(稀释比例 1:400),37℃ 避光孵育 1h,90% 甘油封片,在奥林巴斯荧光显微镜下(放大倍数为 400 倍)观察 PKM2 表达。

3. PKM2 基因干扰重组质粒的构建:从 Invitrogen 网站得到 PKM2-shRNA 序列,序列为 PKM2-shRNA:5'-GCACAGCCACGAAAGCTTTG-3',阴性对照组:5'-GTACTGCAGCCACATTCTC-3'。

4. 慢病毒的包装及感染:将阴性对照组质粒 pLL3.7-shv-shRNA、实验组质粒 pLL3.7-PKM2-shRNA 分别与包装质粒 VSVG、REV、PMDL 组合,用钙转法转染 293T 细胞,48~72h 后收取阴性对照组和实验组的病毒上清液。取 50%~70% 融合的状态良好的 A549 细胞,加入 1ml 病毒液和 1ml 培养基,再加入 polybrene(8mg/L)2 μ l。48h 后观察绿色荧光情况,获得 A549-shV、A549-PKM2-shRNA 细胞。

5. 蛋白质印迹法检测 PKM2 蛋白表达水平:转染 48h 后收取细胞样,BCA 法测蛋白浓度,用 10% 预先配置的 SDS-PAGE 胶分离蛋白,然后将分离的蛋白转移 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 室温封闭 1h,加入兔抗人 PKM2 及鼠抗人 β -actin 抗体(稀释比例分别为 1:1000 和 1:4000),4℃ 孵育过夜,PBS

洗膜后二抗(稀释比例为 1:4000)孵育 2h,再用 PBS 洗膜后显影。

6. qRT-PCR 检测 PKM2 mRNA 的表达:用 Trizol 试剂裂解并提取 3 组细胞总 RNA 并反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板,特异性引物进行 qRT-PCR,扩增目的基因 mRNA。PKM2 基因引物的上游引物:5'-CGCCTGGACATTGATTCA-3',下游引物:5'-GTTCAGACGAGCCACATT-3'; β -actin 基因的上游引物:5'-CCTTCCTGGGCATGGAGTC-3',下游引物:5'-GGAGCAATGATCTTGATCTTC-3'。扩增条件为 95℃ 变性 15s,60℃ 退火 30s,72℃ 延伸 30s,重复 40 个循环。每组 3 个重复,将所得结果绘图。

7. CCK-8 检测细胞增殖能力:实验分 3 组:空白对照组(CTL),阴性对照组(shV)和实验组(shP-KM2)。接种每孔 3000 个细胞于 96 孔板,24h 后给予病毒悬液,空白对照组用 PBS 代替,每组设 5 个复孔;病毒感染后 48h 后每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液,在 5% CO₂ 的 37℃ 恒温培养箱孵育 4h,荧光酶标仪测定各组细胞在 450nm 处的 A 值。分别于 24、48、72h 3 个时间点测定细胞吸光值,将所得结果绘制成图。

8. 葡萄糖水平检测:取 3 组对数生长期细胞进行计数,调整至每毫升 3×10^4 个细胞接种于 6 孔板。每组实验 3 个复孔。培养 48h 后收集上清液,检测葡萄糖消耗水平。同时用 PBS 清洗孔里的细胞 2 次,消化、计数。用培养基基底值减去测定的葡萄糖值,再除以每孔相应的细胞数,得到单个细胞的葡萄糖消耗量。

9. 细胞侵袭能力检测:将 3 组细胞消化、计数,用无血清的 DMEM 培养基调整细胞数为每毫升 1×10^6 个细胞,将 Transwell 小室放入 24 孔板中,下室加入 650 μ l 含 10% 胎牛血清的培养基,上室中加入 200 μ l 无血清细胞悬液。置于含 5% CO₂ 的 37℃ 恒温培养箱培养 24h,然后取出小室,PBS 冲洗 3 次,用棉签擦去基质胶和上室内的细胞,晾干后用结晶紫染色 10min,PBS 冲洗 3 次,把 Transwell 小室反过来底朝上,显微镜下观察拍照,计数进入下室的细胞量。

10. 统计学方法:应用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计分析,所有数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间用方差分析进行比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 免疫荧光检测 A549 细胞中 PKM2 的表达:如

图 1 显示,红色荧光标记的 PKM2 蛋白在细胞质和细胞核中均有分布。PKM2 在 A549 细胞的细胞核及

胞质中均有表达,为下调 PKM2 的后续实验提供了实验依据。

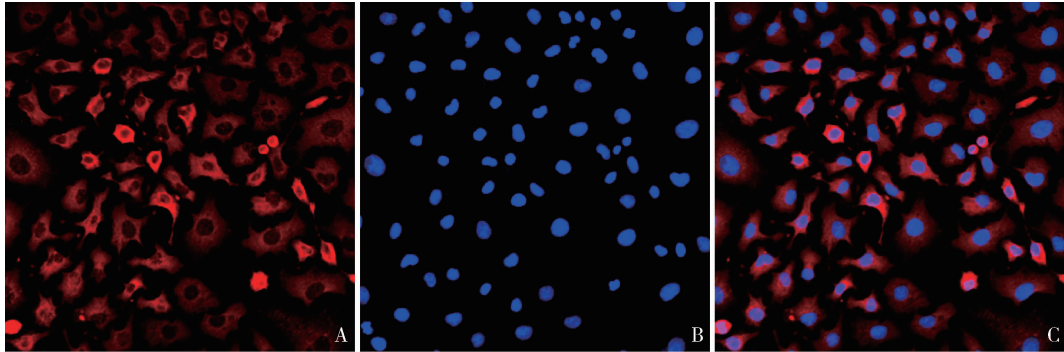


图 1 免疫荧光法检测 PKM2 在 A549 细胞中的表达 (×400)
A. PKM2;B. DAPI;C. Merged

2. 蛋白印迹法检测 PKM2 蛋白表达:蛋白印迹法结果(图 2)显示,与空白对照组和阴性对照组比较,实验组的 PKM2 蛋白表达水平明显降低 ($P = 0.000$)。

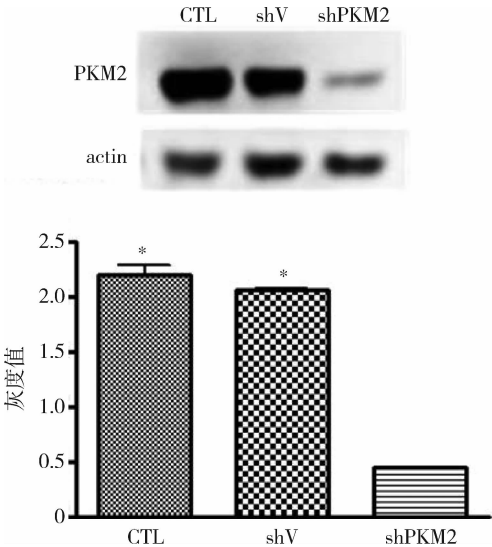


图 2 蛋白印迹法检测 PKM2 蛋白表达
与 shPKM2 比较, * $P = 0.000$

3. 实时定量 PCR 检测 PKM2 mRNA 的表达:慢病毒感染的 A549 细胞 PKM2 mRNA 表达明显低于另外两个对照组 ($P = 0.000$),且空白对照组与阴性对照组之间 PKM2 mRNA 表达无明显差异(图 3)。

4. PKM2 下调可抑制细胞增殖能力:CCK - 8 实验结果(图 4)显示,与其他两组对照组比较,PKM2 的表达被干扰后,细胞的增殖能力受到明显抑制 ($P = 0.000$)。

5. PKM2 下调对糖代谢的影响:如图 5 结果显

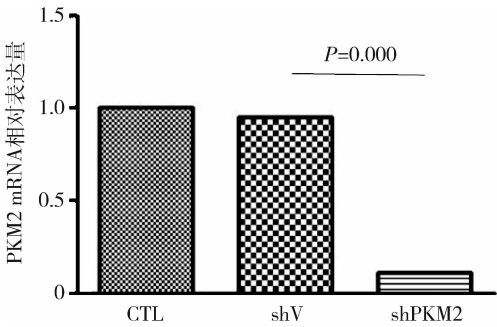


图 3 实时定量 PCR 检测 PKM2 mRNA 的表达

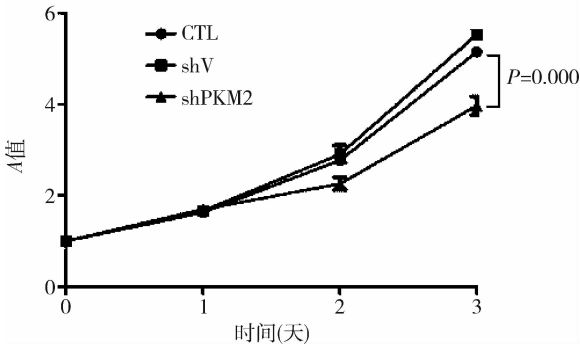


图 4 细胞增殖能力检测

示,PKM2 - shRNA 组细胞葡萄糖消耗量明显降低,与另外两组比较,差异有统计学意义。表明降低 PKM2 表达,能有效抑制 A549 细胞的糖代谢能力。

6. PKM2 下调抑制细胞的侵袭能力:如图 6 显示,与空白对照组(图 6A)和阴性对照组(图 6B)比较,可见实验组(图 6C)穿过人工基膜的细胞数量明显减少。PKM2 下调后可降低 A549 细胞的侵袭能力 ($P = 0.000$)。

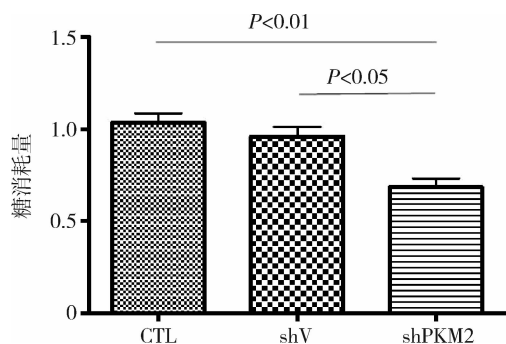


图5 糖消耗量检测

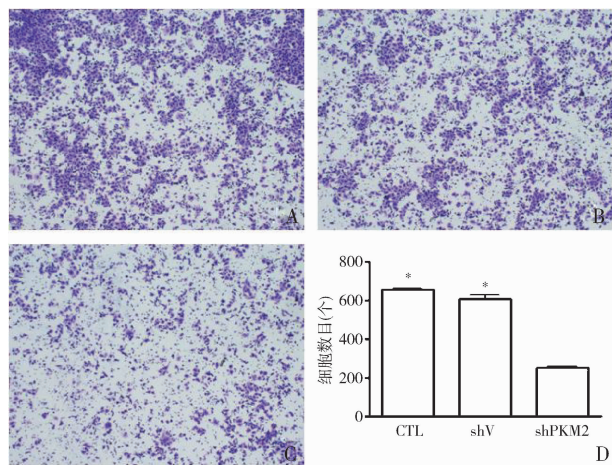


图6 PKM2下调后细胞侵袭能力降低(×100)

A. 空白对照组; B. 阳性对照组; C. 实验组;
与 shPKM2 比较, * $P = 0.000$

讨 论

肺癌是全球癌症相关死亡的主要原因之一。在中国,肺癌的发生率迅速增加,是社会和经济的沉重负担^[5]。肺癌的预后很差,是绝大多数患者死亡的原因^[13]。患者5年生存率直接与其肺癌发展阶段相关^[14]。75%的肺癌患者出现疾病转移,无法治愈。目前肺癌的治疗方法是化疗和放疗,然而治疗效果仍然不尽如人意。因此寻找新的治疗方法十分有必要。

肿瘤细胞的代谢性质与正常细胞不同,它的增殖更多依赖于有氧糖酵解(即瓦伯格效应)。糖酵解过程产生的许多中间产物被肿瘤细胞用来合成蛋白质、脂类及核酸等大分子,以满足肿瘤细胞快速增殖的需求^[15,16]。瓦伯格效应伴随着一系列糖酵解途径代谢酶的表达及活性变化,其中丙酮酸激酶(PK)是催化糖酵解最后一步反应的关键酶,它将底物磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)的磷酸基团转移到ADP,生成丙酮酸和ATP^[8]。哺乳动物体内有4种PK同工酶,L和R主

要在肝脏和红细胞中表达^[17]。PKM1和PKM2来自于PKM基因的选择性剪切^[18]。PKM1主要在能量需求高的组织中表达,如心脏、脑和肌肉^[19]。而PKM2主要在胚胎发育期表达,胚胎成熟后被其他亚型取代,此外,PKM2在几乎所有肿瘤和肿瘤细胞系中都是高表达的。越来越多证据表明,PKM2活性与肿瘤的发生和发展密切相关。

本实验以A549细胞为研究对象,发现干扰PKM2的表达可有效抑制肺癌A549细胞的增殖、侵袭和糖代谢能力。这些结果不仅与目前为止大量的体外实验结果一致,而且与本实验室同期进行的PKM2过表达小鼠肿瘤模型结果是一致的。PKM2受多种因素变构调节,拥有二聚体、四聚体两种结构,PKM2作为四聚体是最活跃的,当PKM2为二聚体时可以进入细胞核调节多个肿瘤相关转录因子的活性参与调节转录^[20]。因此抑制PKM2的表达有可能抑制肿瘤细胞所依赖的代谢途径和信号通路,从而抑制肿瘤细胞的生长和存活。

尽管许多研究都已经指出PKM2在肿瘤发生、发展中的重要性,但是针对PKM2展开的临床试验屈指可数,笔者推测是由于肿瘤细胞对PKM2活性的差异需求使PKM2靶向治疗策略的研究变得复杂。细胞实验结果虽然显示PKM2敲低抑制肿瘤细胞体外生长,但同时异种移植瘤的结果显示,通过药理学抑制或者PKM2治疗性敲除不能有效地抑制肿瘤生长,然而使用小分子激活剂增加PKM2活性可以抑制肿瘤细胞生长。但是肿瘤具有异质性,依据笔者的推论,PKM2激活剂可能对非增殖性肿瘤细胞亚群没有影响,至少一些可以耐受PKM2敲除和突变的肿瘤研究可以为临床试验中肿瘤对于PKM2激活剂的抗性给出一些机制研究方面的提示,例如,有效地抑制PKM2可以破坏非增殖肿瘤部分的代谢,并可能导致细胞死亡或者使细胞对于细胞毒性治疗致敏。因此激活或抑制PKM2,作为一线治疗或者辅助治疗方案治疗肿瘤,仍有广阔的应用前景。

参考文献

- 1 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30
- 2 Chen Y, Han S, Zheng MJ, et al. Clinical characteristics of 274 non-small cell lung cancer patients in China [J]. Onkologie, 2013, 36(5): 248-254
- 3 Parsons A, Daley A, Begh R, et al. Influence of smoking cessation after diagnosis of early stage lung cancer on prognosis: systematic review of observational studies with meta-analysis [J]. BMJ, 2010,

340; b5569

4 姚晓军,刘伦旭. 肺癌的流行病学及治疗现状[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 8:1982 - 1986

5 Hong QY, Wu GM, Qian GS, *et al.* Prevention and Management of Lung Cancer in China[J]. Cancer, 2015, 121 Suppl 17:3080 - 3088

6 Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation[J]. Science, 2009, 324(5930):1029 - 1033

7 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell 2011, 144(5):646 - 674

8 Ferguson EC, Rathmell JC. New roles for pyruvate kinase M2: Working out the Warburg effect[J]. Trends BiochemSci, 2008, 33(8): 359 - 362

9 Chaneton B, Hillmann P, Zheng L, *et al.* Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2[J]. Nature, 2012, 491: 458 - 462

10 Mazurek S. Pyruvate kinase type M2: A key regulator of the metabolic budget system in tumor cells[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2011, 43(7):969 - 980

11 Vander Heiden MG, Locasale JW, Swanson KD, *et al.* Evidence for an alternative glycolytic pathway in rapidly proliferating cells[J]. Science, 2010, 329(5998):1492 - 1499

12 Warner SL, Carpenter KJ, Bearss DJ. Activators of PKM2 in cancer metabolism[J]. Future Med Chem, 2014, 6(10):1167 - 1178

13 Jett JR. Current treatment of unresectable lung cancer[J]. Mayo Clin Proc, 1993, 68(6):603 - 611

14 Mountain CF. Revisions in the international system for staging lung cancer[J]. Chest, 1997, 111(6):1710 - 1717

15 Warburg O. On the origin of cancer cells[J]. Science, 1956, 123(3191):309 - 314

16 Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(5):325 - 337

17 Dombrackas JD, Santarsiero BD, Mesecar AD. Structural basis for tumor pyruvate kinase M2 allosteric regulation and catalysis [J]. Biochemistry, 2005, 44(27): 9417 - 9429

18 Noguchi T, Inoue H, Tanaka T. The M1 - and M2 - type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing[J]. Biol Chem, 1986, 261(29):13807 - 13812

19 Susor WA, Rutter WJ. Some distinctive properties of pyruvate kinase purified from rat liver [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1968, 30(1): 14 - 20

20 Ashizawa K, McPhie P, Lin KH, *et al.* An in vitro novel mechanism of regulating the activity of pyruvate kinase M2 by thyroid hormone and fructose 1, 6 - biphosphate [J]. Biochemistry 1991, 30:7105 - 7111

(收稿日期:2017-04-16)

(修回日期:2017-05-31)

Coronin3 促进食管癌 Eca - 109 细胞的迁移和侵袭

林 宇 陈俊强 周智峰 何 诚 郑 飞 刘萍萍 陈元美 李建成 朱坤寿

摘 要 **目的** 探讨 Coronin3 基因促进食管癌 Eca - 109 细胞株迁移和侵袭的可能机制。**方法** 用慢病毒稳转的方式构建过表达和敲减 Coronin3 的 Eca - 109 食管癌细胞株,通过划痕和 Transwell 实验分别检测 Coronin3 基因对 Eca - 109 食管癌细胞的迁移和侵袭的影响。Western blot 法实验检测 Coronin3 对 CDH11 及 E - cadherin、N - cadherin 等 EMT 标志分子蛋白表达的影响。实时荧光定量 PCR 实验检测 Coronin3 对 CDH11 及 E - cadherin、N - cadherin 等 EMT 标志分子 mRNA 表达的影响。**结果** 笔者成功构建了 Coronin3 过表达和敲减的 Eca - 109 细胞株。Coronin3 过表达能够促进细胞迁移和侵袭。与之相反,Coronin3 敲减能够显著抑制细胞迁移和侵袭。Coronin3 过表达能够提高 CDH11 的蛋白和 mRNA 水平,提高 α - SMA、N - cadherin 的蛋白和 mRNA 水平,降低 E - cadherin 的蛋白和 mRNA 水平。与之相反,Coronin3 敲减能显著降低 CDH11 的蛋白和 mRNA 水平,降低 α - SMA、N - cadherin 的蛋白和 mRNA 水平,提高 E - cadherin 的蛋白和 mRNA 水平。**结论** Coronin3 可以通过促进上皮 - 间质转换 (EMT) 来调控食管癌的转移和侵袭,为治疗食管癌提供了潜在的新靶标。

关键词 Coronin3 食管癌 转移 侵袭 上皮 - 间质转换

中图分类号 R73 - 37

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.09.016

Impact of Coronin3 Gene on Migration and Invasion of Esophagus Carcinoma Cell Line Eca - 109. Lin Yu, Chen Junqiang, Zhou Zhifeng, *et al.* Fujian Cancer Hospital & Fujian Medical University Cancer Hospital, Fujian 350014, China

基金项目:福建省自然科学基金资助项目(2015J01377);福建省科技厅重点项目(2011Y0014);福建省临床重点专科建设项目(2012)

作者单位:350014 福州,福建省肿瘤医院放疗科、福建医科大学附属肿瘤医院

通讯作者:陈俊强,电子邮箱:junqiangc@163.com