

·转化医学·

肺癌细胞株中层粘连蛋白5多态性 与其表达水平的关系

安社娟¹, 陈志红¹, 朱建权^{1,2}, 严红虹¹, 杨素清¹, 陈世良¹, 孟薇¹,
苏健¹, 黄迎¹, 谢至¹, 郭伟滨¹, 吴一龙¹

(1. 广东省人民医院医学研究中心、广东省医学科学院、广东省肺癌研究所, 广州 510080;
2. 天津医科大学附属肿瘤医院肺部肿瘤科, 天津 300060)

[摘要] 目的 探讨肺癌细胞株中层粘连蛋白5(LN5)5'非翻译区多态性与其表达水平的关系。方法 应用测序及实时定量PCR方法检测12株肺癌细胞株中LN5 5'非翻译区多态性和LN5基因mRNA表达水平,分析相互之间的关系。结果 LN5 5'非翻译区-183G/A中GA基因型的LN5 mRNA表达水平明显高于GG基因型($t=7.136, P<0.001$)。本研究中尚未发现LN5基因-6C/A和-89A/G多态性位点与其mRNA表达的相关性。结论 本研究提示LN5启动子区-183G/A多态性位点具有转录调控功能,为进一步的机制探讨提供了依据。

[关键词] 肺癌; 层粘连蛋白5; 多态性

[中图分类号] R734.2 [文献标识码] A [文章编号] 1671-5144(2012)04-0248-05

Relationships between Polymorphisms of Laminin 5 and Expression Level in Lung Cancer Cell Lines

AN She-juan¹, CHEN Zhi-hong¹, ZHU Jian-quan^{1,2}, YAN Hong-hong¹, YANG Su-qing¹, CHEN Shi-liang¹,
MENG Wei¹, SU Jian¹, HUANG Ying¹, XIE Zhi¹, GUO Wei-bang¹, WU Yi-long¹

(1. Medical Research Center, Guangdong General Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangdong Lung Cancer Institute, Guangzhou 510080, China; 2. Lung Cancer Department, Tianjin Cancer Hospital and Institute, Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China)

Abstract: **Objective** To explore the relationships between the polymorphisms in the 5'-UTR region of laminin 5 (LN5) and the expression level in lung cancer cell lines. **Methods** The polymorphisms of LN5 and the mRNA expression levels in 12 lung cancer cell lines were detected, using sequencing and real-time PCR methods, respectively, the relationships between them were analyzed. **Results** Cell lines with GA genotype of -183G/A polymorphisms have a higher mRNA expression level of LN5 than the cell lines with GG genotype ($t=7.136, P<0.001$). No relationships of -6C/A and -89A/G polymorphisms and the mRNA expression levels were found in this study. **Conclusions** This study suggests that -183G/A polymorphisms of LN5 gene maybe regulate the transcriptional level, and these results provide the basic evidence for the further mechanism study.

Key words: lung cancer; laminin 5; polymorphisms

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81101549);广东省自然科学基金资助项目(S2011010000792)

[作者简介] 安社娟与陈志红并列第一作者。安社娟(1971-),女,河南嵩县人,医学博士,副研究员,主要研究方向为肿瘤的转化医学;陈志红(1969-),女,广东台山人,医学硕士,副主任技师,主要研究方向为肿瘤的分子生物学。

[通讯作者] 吴一龙, Tel: 020-83827812-21187; E-mail: syylwu@live.cn

肺癌是当今全球最常见的恶性肿瘤之一,居我国城市恶性肿瘤死亡率和发病率之首,其5年生存率低于15%。大部分的肺癌患者发现时已属晚期,失去手术机会,尽管新的放疗方案及化疗药物改善了肺癌的治疗状况,但总体来看效果欠佳,且毒性大。近几年发展较快的靶向药物也仅对某些具有特殊基因变化的患者有效^[1-2]。因此,对肺癌的发生发展机制,包括遗传机制特别是在肺癌的发生发展中具有重要作用的基因多态性的研究可能对肺癌的早期诊断和个体化治疗具有重要意义。

层粘连蛋白(Laminins, LNs)是含有一条 α 重链和两条 β 和 γ 轻链的糖蛋白家族,是基底膜的重要组成部分,在细胞分化、粘附和迁移中起重要作用。LN5 $\gamma 2$ 链是基质金属蛋白酶2的特异靶分子,其降解对肿瘤侵袭和组织重构期间的细胞迁移起关键作用^[3-4]。本课题组的一项研究发现:LN5 $\gamma 2$ 链基因5'-UTR区多态性可能与抗血管药物Avastin的毒性相关^[5]。因此,我们推测,这些多态性可能具有某种功能,但这方面的研究尚未见报道。因此本研究拟利用肺癌细胞株,分析这些不同的肺癌细胞株LN5 $\gamma 2$ 链基因5'-UTR区多态性与LN5基因表达水平的关系,为进一步的机制探讨和肺癌的个体化靶向治疗方法提供依据。

1 材料和方法

1.1 肺癌细胞株培养

12株肺癌细胞株均为本实验室保存的细胞株,相关信息如下:A549、H1299、SPCA-1为肺腺癌细胞株,PCL3、H460为大细胞肺癌细胞株,L78为肺鳞癌细胞株,GLC1 001来自于肺腺癌患者腹水,GLC1 002、GLC1 003、GLC1 004、GLC1 005、GLC1 006细胞株来自于肺腺癌患者胸水。细胞株置常规RPMI-1640(Gibco,美国)培养基、10%胎牛血清、1%青链霉素、37℃、5% CO₂培养箱培养。

1.2 细胞株DNA和总RNA的提取以及cDNA的合成

细胞株DNA提取采用通用DNA提取试剂盒(TaKaRa, Dalian, China),操作均按试剂盒说明书进行。应用Gibco BRL公司Trizol试剂按试剂盒说明书提取RNA。用核酸蛋白定量仪定量、分析纯度,1%琼脂糖凝胶电泳分析完整性。取1 μ g 检验合格的RNA以AMV反转录酶(TaKaRa公司)20 μ L体系进行cDNA的合成,按试剂盒说明书操作。合成的cDNA存于-80℃冰箱以进行下一步

的定量PCR反应。

1.3 基因多态性检测

LN5启动子区基因多态性检测按课题组以前建立的PCR和测序的方法进行^[5],简述如下:PCR扩增应用2 \times Taq Platinum PCR Master Mix(天根公司,北京)进行,LN5启动子区扩增引物据GenBank(Accession No.NM_005562)序列设计,序列如下:正向引物5'-AGTGCCTATGATGTTGCCATTG-3',反向引物5'-CAGGGCTGAGATGTTTCCTTGTGG-3'。扩增产物长度899 bp。PCR反应条件:94℃、3 min,94℃、30 s,69℃、30 s,72℃、1 min,30个循环;72℃、5 min,所有PCR产物均经1%琼脂糖凝胶电泳检测特异性并经凝胶纯化。纯化产物经BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems公司)反应,以ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer(Applied Biosystems公司)测序。

1.4 定量PCR反应

引物和探针的设计和合成,定量PCR标准品的制作,定量PCR反应等方法按课题组以前建立的方法^[6],简述如下:从GenBank下载LN5 $\gamma 2$ 链基因序列(登录号:NM_005562),按AB公司TaqMan分析建议的50~150 bp最佳扩增长度设计引物,为排除DNA污染对研究的干扰作用,上下游引物序列设计位于不同的外显子内。以 β -actin为内参,同样设计引物和探针。定量PCR标准品的制作:取以上步骤合成的1 μ L的cDNA分别用LN5 $\gamma 2$ 链基因和内参 β -actin特异性引物以Taq酶体系合成目标片段,将目标片段克隆入TA载体,转化感受态菌,提质粒,进行PCR和测序验证为目标片段,将验证为目标片段的质粒作为标准品,定量后分装存于-20℃冰箱备用。每次定量PCR时新鲜倍比稀释用于标准曲线的制备。定量PCR:应用Applied Biosystems公司的TaqMan Universal PCR Master试剂盒20 μ L体系:10 μ L master mix,0.3 μ M上、下游PCR引物,0.2 μ M探针,超纯水补充体积至20 μ L。仪器为Applied Biosystems公司的ABI Prism 7000 Sequence Detection System。PCR条件如下:50℃、2 min,95℃、10 min,40个循环;95℃、15秒,60℃、1分钟。每一次反应包括没有模板的阴性对照。目标基因以每10⁷的 β -actin内参校准。实验至少重复一次,取均值用于统计分析。

1.5 统计分析

为使定量PCR数值服从正态分布,将定量

PCR数值进行对数转换。LN5多态性和LN5表达水平的关系,三组间差异分析采用单因素方差分析,两组之间采用 t 检验, $P < 0.05$ 为统计学检验水准。

2 结果

2.1 总RNA纯度及完整性分析、定量PCR分析

所提总RNA的A260/A280介于1.8~2.1之间,1%琼脂糖凝胶电泳可见清晰的28S及18S条

带,比值约为1.5~2.5:1,说明其纯度及完整性良好。实时定量PCR标准品均经测序验证并经GenBank BLASTn比较为正确序列,标准曲线R2大于0.99,最低检出限为每反应10个拷贝。

2.2 细胞株LN5启动子区多态性检测结果

我们成功地检测到了所研究的12株肺癌细胞株中LN5启动子区的-6C/A、-89A/G、-183G/A、-260C/A等位点多态性。-260C/A均为CC,其他各位点结果见表1。

表1 肺癌细胞株中LN5启动子区多态性检测结果及mRNA表达水平

细胞株	类型	-6C/A	-89A/G	-183G/A	-260C/A	mRNA表达水平
A549	腺癌	CA	AG	GG	CC	1.01
H1299	腺癌	AA	AA	GA	CC	4.07
PCL3	大细胞癌	AA	AA	GG	CC	1.31
H460	大细胞癌	CC	AA	GG	CC	1.48
L78	鳞癌	CA	AA	GA	CC	5.13
GLCI 001	腺癌	CA	AG	GG	CC	2.12
SPCA-1	腺癌	CA	AG	GG	CC	1.49
GLCI 002	腺癌	AA	AA	GG	CC	1.17
GLCI 003	腺癌	CA	AG	GG	CC	1.20
GLCI 004	腺癌	CA	AG	GG	CC	0.47
GLCI 005	腺癌	AA	AG	GG	CC	0.00
GLCI 006	腺癌	CA	AG	GG	CC	0.36

2.3 细胞株LN5基因mRNA表达水平结果

在检测的12株肺癌细胞株中,除1株GLCI 005为阴性表达外,其余均有不同程度的表达(表1)。我们采用单因素方差分析方法分析了腺癌、鳞癌、大细胞肺癌三组之间的表达水平,差异具有明显的统计学意义($F=5.054, P=0.034$,见表2)。

表2 不同病理类型肺癌细胞株LN5基因的mRNA表达水平

病理类型	N	均数±标准差	F值	P值
腺癌	9	1.32±1.21	5.054	0.034
鳞癌	1	5.13±0.00		
大细胞癌	2	1.40±0.12		

2.4 细胞株LN5基因启动子区多态性与mRNA表达水平的关系

我们分析了不同细胞株中LN5启动子区的-6C/A、-89A/G以及-183G/A等位点多态性与其mRNA表达水平的关系。-183G/A的GA基因型

mRNA表达水平明显高于GG基因型($t=7.136, P < 0.001$,独立样本 t 检验)。本研究尚未发现-89A/G和-6C/A多态性位点基因型与mRNA表达水平的相关性,见表3。

表3 肺癌细胞株中LN5多态性位点基因型与mRNA表达水平的关系

多态性位点	N	均数±标准差	F*/t#值	P值
-6C/A*			0.006	0.994
CC	1	1.48±0.00		
CA	7	1.68±1.63		
AA	4	1.64±1.73		
-89A/G#			1.941	0.111
AA	5	2.64±1.84		
AG	7	0.95±0.73		
-183G/A#			7.136	<0.001
GG	10	1.06±0.63		
GA	2	4.60±0.75		

*单因素方差分析, #独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

3 讨论

对在肿瘤的发生发展中起重要作用的基因单核苷酸多态性在人群中分布特征的研究分析是研究肺癌易感性和药物敏感性的有力工具,对肺癌易感人群的筛检、肺癌的预防和治疗均具有重要意义。目前国内外对与肺癌有关的基因多态性的研究很多,多集中在癌基因、代谢相关基因和DNA修复基因方面,如P53基因、CYP2A6基因和ERCC1基因等^[7-9]。对于在肿瘤侵袭和转移中具有重要作用的LN5基因的多态性与肺癌关系的研究尚未见报道。

本研究表明LN5启动子区-183G/A多态性位点与LN5基因mRNA表达水平相关。增强子(enhancer)是一段DNA序列,其中含有多个能被反式作用因子识别与结合的顺式作用元件。反式作用因子与这些元件结合后能够调控(通常为增强)临近基因的转录。增强子一般位于转录起始点上游-100~-300 bp处^[10]。因此推测-183G/A位点可能位于LN5基因增强子内,属于功能性多态性,可能与其调控转录有关而导致转录水平变化。我们在含激酶插入区受体(KDR)基因的研究中也发现^[11],位于基因5'-UTR区的多态性(SNP)与基因的转录调控作用相关。

除启动子以外,在几乎所有基因的上游区域中都还存在着激活基因所需的一段特定的DNA序列(转录因子结合位点,transcription factor binding site,TFBS)。这些序列本身并不执行任何功能,只有当其被调控蛋白(转录因子)识别、结合后才能发挥作用,它们共同控制着基因的转录。转录因子即反式作用因子在转录调控中可以直接或间接识别或结合在顺式作用元件8~112 bp核心序列上,参与调控靶基因的转录效率。转录因子与其结合位点的结合具有高度的专一性。因此,启动子序列或者转录因子结合位点任何一个碱基的变化,都可能影响基因的表达水平。研究表明5'-UTR区的碱基变化可通过影响启动子活性而调节转录活性^[12]。不同的基因型可能导致个体之间转录和表达的差异。因此,靶基因中特定转录因子结合位点的序列变化直接关系到转录因子是否可以结合以及结合的特异性,有时候即使此序列中心区域一个碱基的变化就可能影响转录因子结合区域的消失,从而影响基因的转录和翻译,进而影响相关的一系列生物学变化。

本研究结果亦表明LN5基因mRNA表达水平与细胞株的病理类型相关,但由于细胞株的样本量较小,此结果尚需进一步研究。在人群中的研究表明,LN5经常表达在一些肿瘤的侵袭前线,包括结肠癌、胃癌、胰腺癌、乳腺癌、子宫颈癌和口腔鳞癌,恶性黑色素瘤以及较小的肺腺癌(最大直径2 cm或以下),LN5 $\gamma 2$ 链高表达与患者的不良预后相关^[13-16]。在肝细胞癌的体外研究中表明,LN5通过Akt而降低了吉非替尼(抗表皮生长因子受体的小分子拮抗剂)的细胞生长抑制作用^[17]。另一项在研究血管内皮生长因子受体抑制剂ZD6474的作用中发现,LN5可反转ZD6474引起的抑制肝癌细胞的增殖作用^[18]。本课题组的一项研究也发现,晚期肺癌患者应用吉非替尼治疗的疾病控制率与LN5 $\gamma 2$ 链mRNA表达水平相关^[19]。由于LN5在肿瘤进展以及药物治疗中可能发挥着重要作用,因此对其在肺癌中的较为全面和彻底的研究包括基因多态性的研究不仅对阐明肺癌的发生发展机制有重要意义,也可能为肺癌的个体化治疗提供有益的启示。

综上所述,本研究提示LN5启动子区-183G/A多态性位点与LN5基因转录调控相关,其转录调控的机制尚需进一步探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Politi K, Fan PD, Shen R, et al. Erlotinib resistance in mouse models of epidermal growth factor receptor-induced lung adenocarcinoma [J]. *Dis Model Mech*, 2010,3(1-2):111-119.
- [2] 汪小沅,石远凯. 厄洛替尼一线治疗晚期非小细胞肺癌的研究进展[J]. *癌症进展*, 2010,8(1):29-33.
- [3] Miyazaki K. Laminin-5 (laminin-332): Unique biological activity and role in tumor growth and invasion [J]. *Cancer Sci*, 2006,97(2):91-98.
- [4] Fukai Y, Masuda N, Kato H, et al. Correlation between laminin-5 gamma2 chain and epidermal growth factor receptor expression in esophageal squamous cell carcinomas [J]. *Oncology*, 2005,69(1):71-80.
- [5] An SJ, Huang YS, Chen ZH, et al. Posttreatment plasma VEGF levels may be associated with the overall survival of patients with advanced non-small cell lung cancer treated with bevacizumab plus chemotherapy [J]. *Med Oncol*, 2012,29(2):627-632.
- [6] 安社娟,陈志红,王震,等. 层粘连蛋白5和表皮生长因子受体在肺癌患者肿瘤组织中的表达关系[J]. *循证医学*, 2007,7(2):121-124.
- [7] Schabath MB, Wu X, Wei Q, et al. Combined effects of the

- p53 and p73 polymorphisms on lung cancer risk [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006, 15(1):158-161.
- [8] Wang J, Pitarque M, Ingelman-Sundberg M. 3'-UTR polymorphism in the human CYP2A6 gene affects mRNA stability and enzyme expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340(2):491-497.
- [9] Yin J, Vogel U, Guo L, et al. Lack of association between DNA repair gene ERCC1 polymorphism and risk of lung cancer in a Chinese population [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2006, 164(1):66-70.
- [10] 冯作化. 医学分子生物学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001:42.
- [11] An SJ, Chen ZH, Lin QX, et al. The -271 G>A polymorphism of kinase insert domain-containing receptor gene regulates its transcription level in patients with non-small cell lung cancer [J]. *BMC Cancer*, 2009, 9:144.
- [12] Bayerer B, Stamer U, Hoefl A, et al. Genomic variations and transcriptional regulation of the human mu-opioid receptor gene [J]. *Eur J Pain*, 2007, 11(4):421-427.
- [13] Yamamoto H, Kitadai Y, Yamamoto H, et al. Laminin gamma 2 mediates Wnt5a-induced invasion of gastric cancer cells [J]. *Gastroenterology*, 2009, 137(1):242-252.
- [14] Moriya Y, Niki T, Yamada T, et al. Increased expression of laminin-5 and its prognostic significance in lung adenocarcinomas of small size. An immunohistochemical analysis of 102 cases [J]. *Cancer*, 2001, 91(6):1129-1141.
- [15] Kim BG, An HJ, Kang S, et al. Laminin-332-rich tumor microenvironment for tumor invasion in the interface zone of breast cancer [J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(1):373-381.
- [16] Zargarani M, Eshghyar N, Vaziri PB, et al. Immunohistochemical evaluation of type collagen and laminin-332 γ 2 chain expression in well-differentiated oral squamous cell carcinoma and oral verrucous carcinoma: A new recommended cut-off [J]. *J Oral Pathol Med*, 2011, 40(2):167-173.
- [17] Giannelli G, Azzariti A, Fransvea E, et al. Laminin-5 offsets the efficacy of Gefitinib ('Iressa') in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Br J Cancer*, 2004, 91(11):1964-1969.
- [18] Gianluigi G, Amalia A, Sgarra C, et al. ZD6474 inhibits proliferation and invasion of human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 71(4):479-485.
- [19] An SJ, Zhu JQ, Chen ZH, et al. Elevated expression level of laminin 5 may be a negative predictive factor for the response to Gefitinib in lung cancer patients [J]. *Chin Ger J Clin Oncol*, 2008, 7(12):677-681.

[收稿日期] 2012-07-24

《循证医学》杂志征稿、征订通知

《循证医学》杂志是经国家新闻出版署批准,广东省卫生厅主管,由广东省循证医学研究中心、广东省人民医院和中山大学附属第三医院主办的医学学术期刊。2003年被评为“《CNKI中国期刊全文数据库》”、“万方数据—数字化期刊群”、“中华首席医学网”全文收录期刊,“中国学术期刊综合评价数据库”统计源期刊,《中国科学引文数据库》、《中国生物医学文献数据库》、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中文生物医学期刊文献数据库》、《中国生物医学期刊引文数据库》、《中文科技期刊数据库》来源期刊,2004年3月被中国科学技术信息研究所评定为“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”。2005年5月荣获首届《CAJ-CD规范》执行优秀期刊奖。

主编吴一龙(广东省人民医院副院长、广东省人民医院肿瘤中心主任、广东省肺癌研究所所长、广东省循证医学研究中心主任,中山大学、南方医科大学、汕头大学、广东省心血管病研究所肿瘤学教授,博士生导师)。本刊以广大医药卫生技术人员和医疗、教学、科研管理者为读者对象,立足临床医学,介绍循证医学的理念、方法及相关知识,探讨符合中国国情的循证医学实践,促进国内外医学学术交流和医学科学发展。

本刊以临床实践指导性为特色,设置的主要栏目有:先睹为快、述评、特别报告、循证评价、论著(包括诊断性研究、疗效研究、病因学研究、疾病的预后研究等)、证据的寻求与评价、循证医学中的医学统计学问题、临床试验、循证医学理论与方法研究、综述与讲座、循证医学在线、临床指引与共识、教育与争鸣、转化医学、循证病例讨论等。诚挚欢迎投稿。

全国各地邮政局发行,邮发代号 46-326。国际标准刊号 ISSN 1671-5144,国内统一刊号 CN 44-1548/R。《循证医学》杂志为双月刊、大16开本、64页,国内定价每期10元,全年60元。欲订者请从全国各地邮局订购,也可直接从本刊编辑部邮购。欢迎新老朋友订阅本刊。

地址:广州市中山二路106号广东省人民医院内《循证医学》编辑部(510080)

电话:020-83844620,020-83827812-51482

传真:020-83844620

E-mail: xzyxzz@163.net

本刊网站: <http://www.jebm.cn>

投稿网站: <http://mc03.manuscriptcentral.com/jebm>

jebm

循证医学编辑部