

Msp 对人非小细胞肺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力影响的实验研究

刘霞^{1,2}, 魏诗航^{1,2}, 施雪旒^{1,2}, 左忆楠^{1,2}, 何学令², 尹海林²△

1. 四川大学生命科学院(成都 610064); 2. 四川大学实验动物中心(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨巨噬细胞刺激蛋白(macrophage stimulating protein, Msp)对人非小细胞肺癌细胞株 PC14 增殖、迁移和侵袭能力影响的研究。方法 构建 Msp 编码基因 *Mst1* 真核表达载体,将 *Mst1* 导入 Msp(-)和 RON(-)人非小细胞肺癌细胞株 PC14,并用 G418 筛选出稳定表达的细胞株。通过 RT-PCR 方法检测已转染 *Mst1* 载体 PC14 细胞中 *Mst1* 的表达,用 Western blot 检测 Msp 在 PC14、PC14-*Mst1*-pEGFP-N1、PC14-pEGFP-N1 中的表达水平,同时检测 RON 在 PC14 和 RON(+)细胞 SKBR-3 中的表达情况。通过计算 RAW 264.7(小鼠单核巨噬细胞)和 SKBR-3 细胞在各转染组细胞培养上清液的刺激下穿过 Transwell 微孔膜的细胞数来评价 Msp 的生物学活性。利用 MTT 法检测 Msp 对 PC14 细胞增殖力的影响,采用 Transwell 小室和基质胶侵袭实验观察 Msp 对 PC14 细胞迁移和侵袭能力的影响。结果 转染 *Mst1* 基因后,形成 PC14-*Mst1*-pEGFP-N1,稳定表达 *Mst1* mRNA 及蛋白,其本身的增殖能力被明显抑制,迁移能力和侵袭能力均较 PC14 和 PC14-pEGFP-N1 降低。它还通过旁分泌的方式对 RON (+)阳性的癌细胞 RAW264.7 和 SKBR-3 的迁移起促进作用。结论 Msp 表达可降低人非小细胞肺癌细胞 PC14 的增殖、迁移和侵袭能力,但对 RON (+)阳性的癌细胞迁移通过旁分泌的方式有促进作用。

【关键词】 巨噬细胞刺激蛋白 人非小细胞肺癌 肿瘤转移 细胞增殖

Effects of Msp on the Proliferation, Migration and Invasion of Human Non-small Cell Lung Cancer Cells LIU Xia^{1,2}, WEI Shi-hang^{1,2}, SHI Xue-lin^{1,2}, ZUO Yi-nan^{1,2}, HE Xue-ling², YIN Hai-lin²△. 1. School of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 2. Laboratory Animal Center of Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: yin37143@163.com

【Abstract】 **Objective** To determine the effects of macrophage stimulating protein (Msp) on the proliferation, migration and invasion of human non-small cell lung cancer cells PC14. **Methods** The eukaryotic expression vector for *Mst1* was constructed and transfected into Msp (-) and RON (-) human non-small cell lung cancer cells PC14. The expression of *Mst1* mRNA in PC14 cells was observed by RT-PCR. The expression levels of Msp protein in PC14, PC14-*Mst1*-pEGFP-N1 and PC14-pEGFP-N1 groups as well as the expression of RON in PC14 and SKBR-3 cells were detected by Western blot. RAW264.7 (mouse monocyte macrophage) and SKBR-3 cells were cultured in the supernatant of cells (PC14, PC14-*Mst1*-pEGFP-N1 and PC14-pEGFP-N1 groups) and tested with Transwell microporous membrane, through which the biologic activity of Msp was evaluated by calculating the cell number migrated. The proliferation of PC14 was measured by MTT assay. The capabilities of PC14 to migrate and invade were measured by Transwell chamber and Matrigel invasion tests, respectively. **Results** The expressions of mRNA and protein of *Mst1* in PC14 were stable after transfection with *Mst1*. Msp (PC14-*Mst1*-pEGFP-N1 group) promoted the migration of RON (+) cells (SKBR-3 and RAW264.7). Compared with PC14 and PC14-pEGFP-N1 groups, the proliferation, migration and invasion of PC14 cells in PC14-*Mst1*-pEGFP-N1 group were inhibited significantly. **Conclusion** Msp can promote the migration of RON (+) cancer cells in paracrine secretion manner and inhibit the proliferation, migration and invasion of human non-small cell lung cancer cells PC14 in an unknown way.

【Key words】 Macrophage stimulating protein Human non-small cell lung cancer cells line Tumor metastasis Cell proliferation

巨噬细胞刺激蛋白(macrophage-stimulating

protein, Msp), 又称肝细胞生长因子样蛋白, 是一种具有免疫调节活性的糖蛋白, 其受体酪氨酸激酶 RON 是潜在的原癌基因^[1]。研究发现, Msp 能通

过 RON 调节肿瘤细胞黏附、迁移、增殖和凋亡^[2-3],同时, Msp 是 RON 体内唯一配体^[4-5],但对于其在 RON 表达阴性的细胞中单独的生物学功能或 Msp 是否能够通过其他途径影响肿瘤细胞的迁移、增殖和侵袭,目前并没有相关报道。因此,本实验通过构建 Msp 编码基因 *Mst1* 真核表达载体,将 *Mst1* 导入 Msp(-)和 RON(-)的人非小细胞肺癌(NSCLC)PC14 细胞株,建立一种 RON 表达阴性的 NSCLC 稳定高表达 Msp 的细胞株,旨在初步探讨 Msp 对 NSCLC 细胞的增殖、迁移、侵袭作用的影响。

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 Trizol (Ambion 公司), Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen 公司), 抗鼠 *Mst1* 抗体(上海爱柏生物科技有限公司), 抗人 RON-β 抗体(Santa 公司), 胰蛋白酶(HyClone 公司), 胎牛血清(Invitrogen 公司), Matrix 基质胶(BD 公司)。

1.1.2 细胞株和重组载体质粒 NSCLC 细胞株 PC14 购于上海生博生物医药科技有限公司, 小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 及人乳腺癌细胞株 SKBR-3 由四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室惠赠; 重组载体质粒 *Mst1*-pEGFP-N1、空载体 pEGFP-N1 由广州捷瑞生物科技有限公司按设计要求所构建、扩增和纯化。

1.2 实验方法

1.2.1 *Mst1* 转染及筛选 取对数生长期状态良好的 PC14 细胞, 采用阳离子脂质体 Lipofectamine™ 2000 介导法, 将 *Mst1*-pEGFP-N1 和空载体 pEGFP-N1 分别转染入对数生长期的 PC14 细胞, 按试剂盒说明书操作。在含有 800 μg/mL 的 G418 培养基中筛选, 出现阳性克隆继续在 400 μg/mL G418 培养基中培养, 筛选稳定表达株。G418 筛选 30 d 后, 荧光显微镜下观察转染空载体和 *Mst1* 的细胞有绿色荧光蛋白表达的细胞占细胞总数的 90% 以上, 即建立了稳定表达 Msp 的非小细胞肺癌细胞株和空载体细胞株。

1.2.2 RT-PCR 检测 *Msp* 基因表达 用 RT-PCR 法检测小鼠 *Msp* mRNA 的表达, 总 RNA 用 RevertAid First Strand cDNA 试剂盒反转录合成 cDNA 链。小鼠 *Msp* 和 β-actin 引物为: *Msp*, 5'-GTACCCACTGCTCCTTCACT-3' (R) 和 5'-TGA TGATGACCAGCCACCAT-3' (F); β-actin, 5'-

CCTGCTTGCTGATCCACATC-3' (R) 和 5'-CCT CTATGCCAACACAGTGC-3' (F)。用 Deam Taq PCR Master Mix (2×) 进行 PCR。反应条件为: 95 °C, 3 min; 95 °C, 30 s; 40 °C, 30 s; 72 °C, 1 min; 30 个循环; 72 °C, 10 min。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后, 用凝胶成像仪观察。

1.2.3 Western blot 检测 Msp 和 RON 蛋白表达 用 Western blot 检测 RON 在 PC14 和 SKBR-3 中的表达情况, 检测 Msp 在 PC14、PC14-*Mst1*-pEGFP-N1、PC14-pEGFP-N1 中的表达水平。收获培养的 PC14-*Mst1*-pEGFP-N1、PC14-pEGFP-N1、PC14 以及 SKBR-3 细胞后, 裂解缓冲液抽提蛋白, 4 °C, 12 000×g, 离心 15 min, 取上清液定量。蛋白加上样缓冲液后煮沸 5 min。用 100 g/L 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 转至 PVDF 膜, 封闭, 先后加入一抗、二抗孵育, 显色, X 光片曝光, GAPDH 为内参照。扫描仪扫描 X 光片。

1.2.4 检测 PC14-*Mst1*-pEGFP-N1 上清液对 RON 表达阳性细胞的迁移作用的影响 将 PC14-*Mst1*-pEGFP-N1、PC14-pEGFP-N1、PC14 在含 10% FBS 的 DMEM 中培养 24 h, 用含 0.1% FBS 的 DMEM 培养 48 h。收集细胞上清液, 加入到 Transwell 小室的下室, 将生长状态良好的 RAW264.7 细胞和 SKBR-3 细胞消化, 用含 0.1% BSA 的 DMEM 培养基制成细胞悬浮液, 接种 1×10^5 (200 μL) 个细胞到 24 孔小室的上室, 培养 24 h 后取出小室固定细胞, 进行结晶紫染色, 显微镜下计数视野中穿膜细胞数, 每个平行孔从上至下选取 5 个视野计算每个视野的平均迁移细胞数。

1.2.5 检测 Msp 对 PC14 细胞迁移能力的影响 无需 Matrigel 包被, 其余操作同 1.2.6 侵袭实验。

1.2.6 检测 Msp 对 PC14 细胞体外侵袭能力的影响 用 Matrigel 基质胶包被 Transwell 小室, 上室接种浓度为 1×10^5 mL⁻¹ 的无血清培养基培养过夜的 PC14-*Mst1*-pEGFP-N1、PC14-pEGFP-N1、PC14 细胞, 200 μL/孔, 下室每室加 10% FBS 培养液 500 μL, 每组设 3 个平行孔, 培养 24 h, 取出小室固定细胞, 用结晶紫染色计算平均迁移细胞数。

1.2.7 检测 Msp 对 PC14 细胞增殖力的影响 取生长良好的 PC14-*Mst1*-pEGFP-N1、PC14-pEGFP-N1、PC14 细胞, 以 2×10^4 mL⁻¹ 的细胞浓度接种于 96 孔培养板, 每孔 200 μL。置 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱培养, 分别在 6、24、48、72、96、120、144、

168 和 192 h 后,每孔加入 MTT(5 mg/mL) 20 μ L 继续培养 4 h,吸出原培养液后,再每孔加入 DMSO 150 μ L,室温下充分溶解,于酶标仪 490 nm 测定 OD 值。

1.3 统计学方法

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Mst1 转染及筛选

用 *Mst1*-pEGFP-N1 和 pEGFP-N1 转染 PC14 细胞后,经 G418 筛选。对其转染效率进行评估,转染了 *Mst1*-pEGFP-N1 和 pEGFP-N1 的 PC14 细胞均有 95% 以上表达绿色荧光蛋白。

2.2 RT-PCR 检测 Msp 基因表达

由图 1 可见,在 PC14-*Mst1*-pEGFP-N1 细胞中检测到 200 bp 左右的 *Msp* 条带的表达,但是在 PC14 和 PC14-pEGFP-N1 细胞中未检测到该条带。

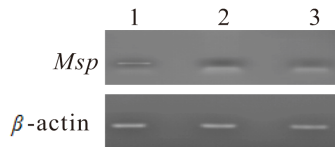


图 1 RT-PCR 检测转染后细胞 mRNA 表达

Fig 1 mRNA expression detected by RT-PCR in transfected cells

1: PC14-*Mst1*-pEGFP-N1; 2: PC14-pEGFP-N1; 3: PC14

2.3 Western blot 检测 Msp 和 RON 的表达

PC14-*Mst1*-pEGFP-N1 的细胞裂解物在相对分子质量 70×10^3 左右检测到明显特异性条带,而在 PC14-pEGFP-N1 和 PC14 细胞中没有检测到该目的条带。RON 在 PC14 细胞中没有目的条带,在 SKBR-3 细胞中检测到 150×10^3 左右的目的条带(图 2)。

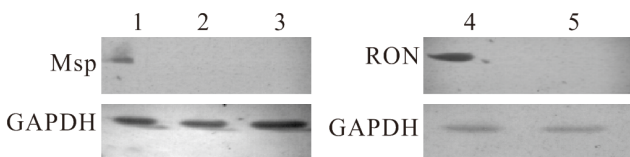


图 2 Western blot 检测不同细胞中 Msp 和 RON 的表达

Fig 2 Expressions of Msp and RON detected by Western blot in different cell lines

1: PC14-*Mst1*-pEGFP-N1; 2: PC14-pEGFP-N1; 3, 5: PC14; 4: SKBR-3

2.4 PC14-*Mst1*-pEGFP-N1 上清液对 RON 表达阳性细胞的迁移作用的影响

本实验通过计算 RAW264.7(小鼠单核巨噬细

胞)和 SKBR-3 细胞在个转染组细胞培养上清液中的刺激下穿过 Transwell 微孔膜的细胞个数来评价 Msp 的生物学活性,结果显示 RAW264.7 和 SKBR-3 在 PC14-*Mst1*-pEGFP-N1 组中迁移细胞个数分别为 (39.8 ± 3.5) 和 (95.4 ± 15.8) ;在 PC14-pEGFP-N1 组中迁移细胞个数分别为 (4.6 ± 1.5) 和 (12.2 ± 2.7) ;在 PC14 组中迁移细胞个数分别为 (2.2 ± 3.1) 和 (9 ± 3.7) ,前两种细胞在 PC14-*Mst1*-pEGFP-N1 组中迁移细胞个数均明显高于其余两组,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 3 和图 4)。

2.5 Msp 对 PC14 细胞体外侵袭能力的影响

由图 5 可见,PC14-*Mst1*-pEGFP-N1、PC14-pEGFP-N1、PC14 穿过基底膜的细胞个数分别为 (92.0 ± 6.4) 、 (165.0 ± 18.7) 、 (160.8 ± 21.3) 。PC14-*Mst1*-pEGFP-N1 穿过基底膜的细胞数量低于其余两组细胞,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.6 Msp 对 PC14 细胞迁移能力的影响

由图 6 可见,PC14-*Mst1*-pEGFP-N1、PC14-pEGFP-N1、PC14 穿膜细胞个数分别为 (30.0 ± 8.6) 、 (71.0 ± 18.4) 、 (63.8 ± 8.4) 。PC14-*Mst1*-pEGFP-N1 穿膜的细胞数量低于其余两组细胞,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.7 Msp 对 PC14 细胞增殖力的影响

结果(图 7)显示从培养第 6 d 开始,PC14-*Mst1*-pEGFP-N1 细胞增殖力低于其余两组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

肺癌是常见的恶性肿瘤之一,我国肺癌的发病率居恶性肿瘤第一位,并呈上升趋势。肺癌的发生是一个复杂的过程,涉及不同分子、细胞因子以及基因改变,比如肿瘤抑制基因的失活和癌基因的活化等。Msp 是目前研究的热点之一。Msp 又称类肝细胞生长因子,是由肝脏合成的一种具有免疫调节活性的糖蛋白,其通过调节巨噬细胞内多条信号传导通路发挥其生物学功能,包括促进皮肤损伤后的组织愈合,激活巨噬细胞突发性吞噬、黏附、变形、迁移等功能^[6-8]。最近研究发现 Msp 是 RON 的唯一配体,而 RON 是与 c-met 同源的酪氨酸激酶,是潜在的原癌基因,在肿瘤的发展和转移中起重要作用, Msp 通过刺激其体内受体 RON 能诱导细胞扩散、浸润和增殖^[9-12]。杜卫东等^[13]发现 RON 高表达可降低钙粘蛋白表达,降低肿瘤细胞间的黏附性,增加结肠癌细胞株 RKO 的侵袭能力。但对于其在

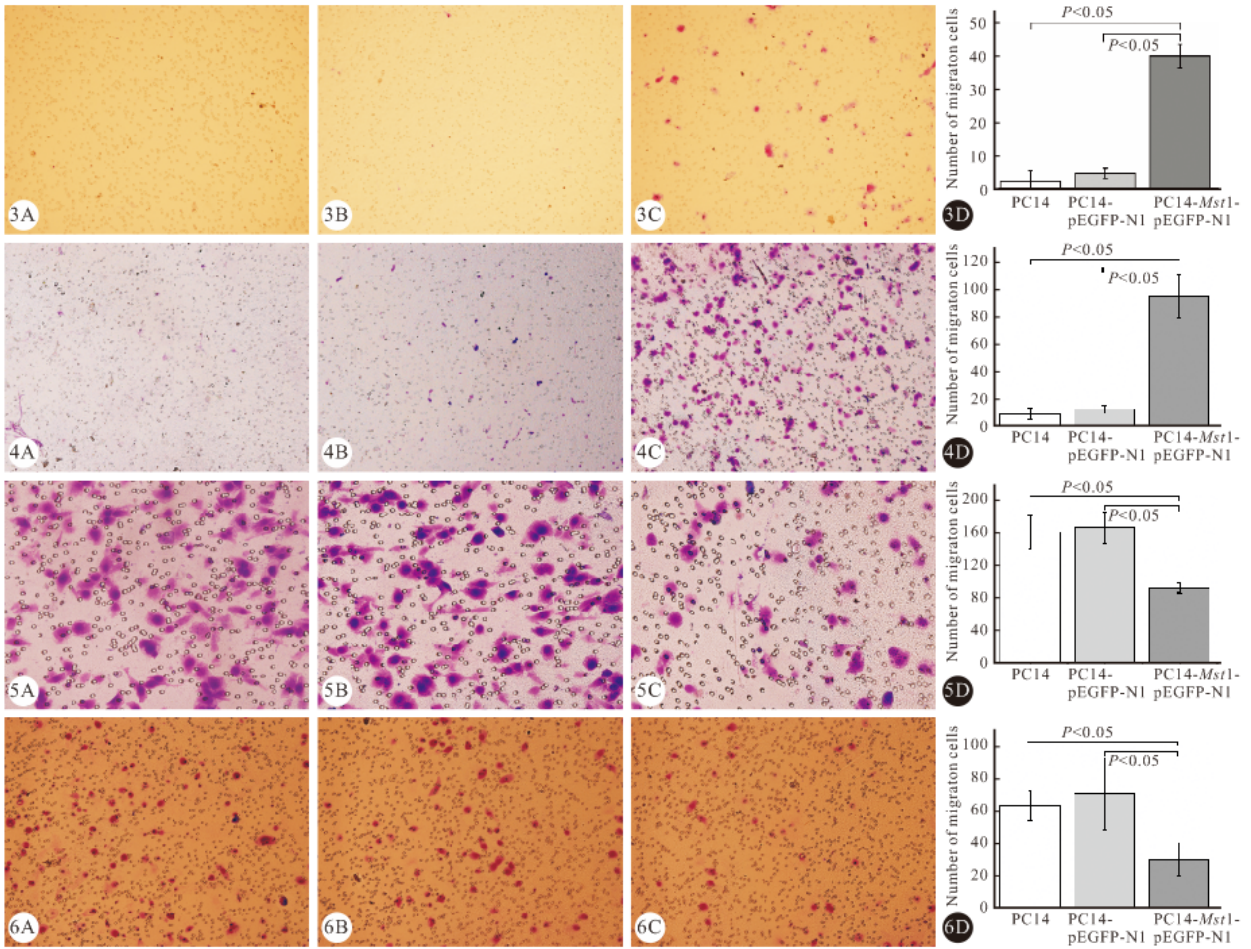


图 3 PC14-*Mst1*-pEGFP-N1 上清液对 RAW264.7 迁移的影响 (A~C, 结晶紫染色 ×100) 图 4 PC14-*Mst1*-pEGFP-N1 上清液对 SKBR-3 迁移的影响 (A~C, 结晶紫染色 ×100) 图 5 Msp 对 PC14 细胞体外侵袭能力的影响 (A~C, 结晶紫染色 ×200) 图 6 Msp 对 PC14 细胞迁移能力的影响 (A~C, 结晶紫染色 ×100)

Fig 3 Effects of the supernatant of PC14-*Mst1*-pEGFP-N1 on the migration of RAW264.7 cells (A-C, crystal violet staining ×100) Fig 4 Effects of the supernatant of PC14-*Mst1*-pEGFP-N1 on the migration of SKBR-3 cells (A-C, crystal violet staining ×100) Fig 5 Effects of Msp on the invasion of PC14 (A-C, crystal violet staining ×200) Fig 6 Effects of Msp on the migration of PC14 (A-C, crystal violet staining ×100)

A: PC14; B: PC14-pEGFP-N1; C: PC14-*Mst1*-pEGFP-N1; D: Histogram

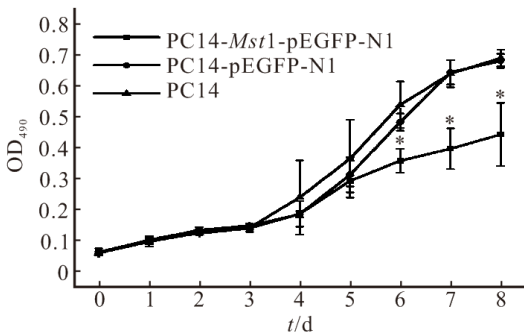


图 7 Msp 对 PC14 细胞增殖力的影响

Fig 7 Effects of Msp on the growth of PC14

* $P < 0.05$, vs. other groups at the same time point

RON 表达阴性的细胞中单独的生物学功能和 Msp

通过其他信号途径影响肿瘤细胞的迁移、增殖和凋亡,目前并没有相关报道。因此,本实验通过构建 *Mst1* 基因真核表达载体,将 Msp 编码基因 *Mst1* 导入 Msp(-) 和 RON(-) 的人非小细胞肺癌 PC14 细胞株,建立了一种 RON 表达阴性的人非小细胞肺癌稳定高表达 Msp 的细胞株,探讨了 Msp 对人非小细胞肺癌细胞 PC14 的增殖、迁移、侵袭作用的影响。

在肿瘤的发病机制中,由于 Msp 及其受体 RON 的表达体现为一种自分泌或旁分泌型系统^[14]。因此,为了验证所建立的稳定高表达 Msp 的细胞具有相应的 Msp 生物学活性,我们利用其培

养上清液培养 RON 阳性表达人乳腺癌细胞株 SKBR-3, 结果发现 SKBR-3 迁移能力明显增强, 从而进一步说明筛选得到的细胞为稳定表达 Msp 的细胞株。

本实验采用 MTT 法检测 PC14-Mst1-pEGFP-N1 细胞株的增殖力, 结果显示 Msp 对人非小细胞肺癌 PC14 细胞增殖起抑制作用。采用 Transwell 小室对细胞的迁移和侵袭能力研究结果发现, Msp 对人非小细胞肺癌 PC14 细胞迁移和侵袭能力具有明显的抑制能力。以上实验结果表明 Msp 对人非小细胞肺癌 PC14 细胞的增殖、迁移和侵袭能力有一定抑制作用。但 Msp 是通过怎样的机制影响增殖、迁移和侵袭能力, 是单独的生物学功能或是通过其他信号途径发挥作用, 这将是我们的下一步研究的重点。

参 考 文 献

- [1] RONSIN C, MUSCATELLI F, MATTEI MG, *et al.* A novel putative receptor protein tyrosine kinase of the met family. *Oncogene*, 1993, 8(5): 1195-1202.
- [2] IWAMA A, YAMAGUCHI N, SUDA T. STK/RON receptor tyrosine kinase mediates both apoptotic and growth signals via the multifunctional docking site conserved among the HGF receptor family. *EMBO J*, 1996, 15(21): 5866-5875.
- [3] PEACE BE, HUGHES MJ, DEGEN SJ, *et al.* Point mutations and overexpression of Ron induce transformation, tumor formation, and metastasis. *Oncogene*, 2001, 20(43): 6142-6151.
- [4] WANG MH, SKEEL A, LEONARD EJ. Proteolytic cleavage and activation of pro-macrophage-stimulating protein by resident peritoneal macrophage membrane proteases. *Clin Invest*, 1996, 97(3): 720-727.
- [5] GAUDINO G, FOLLENZI A, NALDINI L, *et al.* RON is a heterodimeric tyrosine kinase receptor activated by the HGF homologue MSP. *EMBO J*, 1994, 13(15): 3524-3532.
- [6] SCHMIDT O, DOXAKIS E, DAVIES AM. Macrophage-stimulating protein is a neurotrophic factor for embryonic chicken hypoglossal motoneurons. *Eur J Neurosci*, 2002, 15(1): 101-108.
- [7] BRUNELLESCHI S, PENENGO L, LAVAGNO L, *et al.* Macrophage-stimulating protein (MSP) evokes superoxide anion production by human macrophages of different origin. *Br J Pharmacol*, 2001, 134(6): 1285-1295.
- [8] LEONARD EJ, SKEEL A. A serum protein that stimulates macrophage movement, chemotaxis and spreading. *Exp Cell Res*, 1976, 102(2): 434-438.
- [9] MEDICO E, MONGIOV AM, HUFF J, *et al.* The tyrosine kinase receptor RON and Sea control "scattering" and morphogenesis of liver progenitor cells *in vitro*. *Mol Biol Cell*, 1996, 7(4): 495-504.
- [10] KRETSCHMANN KL, EYOB H, BUYS SS, *et al.* The macrophage stimulating protein/Ron pathway as a potential therapeutic target to impede multiple mechanisms involved in breast cancer progression. *Curr Drug Targets*, 2010, 11(9): 1157-1168.
- [11] WELM AL, SNEDDON JB, TAYLOR C, *et al.* The macrophage-stimulating protein pathway promotes metastasis in a mouse model for breast cancer and predicts poor prognosis in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(18): 7570-7575.
- [12] KAKIUCHI S, DAIGO Y, TSUNODA T, *et al.* Genome-wide analysis of organ-preferential metastasis of human small cell lung cancer in mice. *Mol Cancer Res*, 2003, 1(7): 485-499.
- [13] 杜卫东, 何超, 王达, 等. 巨噬细胞刺激蛋白受体过表达对癌细胞侵袭能力的初步研究. *中华消化杂志*, 2006, 26(5): 304-307.
- [14] WILLETT CG, WANG MH, EMANUEL RL, *et al.* Macrophage-stimulating protein and its receptor in non-small-cell lung tumors: induction of receptor tyrosine phosphorylation and cell migration. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998, 18(4): 489-496.

(2016-03-28 收稿, 2016-07-13 修回)

编辑 汤洁