

文章编号 1006-8147(2021)05-0477-05

论 著

NFATc1 对非小细胞肺癌细胞增殖、迁移和上皮间质转化的影响

李智慧,姚菲菲,王富霞

(郑州人民医院呼吸内科,郑州 450000)

摘要 目的:检测活化 T 细胞 c1 核因子(NFATc1)对非小细胞肺癌(NSCLC)细胞增殖、迁移和上皮间充质转化(EMT)的影响。方法:qRT-PCR 检测 NSCLC 细胞 H1650、H460、H1299 及正常人支气管上皮细胞 BEAS-2B 中 NFATc1 表达水平,将 si-NFATc1 质粒转染至 H1650 细胞中,通过 CCK-8 增殖及集落形成实验、划痕和 Western 印迹实验分别检测转染后 H1650 细胞增殖、迁移及 EMT 的影响。结果:NFATc1 mRNA 在 H1650、H460、H1299 细胞中的相对表达水平高于 BEAS-2B 细胞($t=10.732$, $P<0.001$; $t=4.705$, $P=0.009$; $t=4.792$, $P=0.009$),且 H1650 细胞中 NFATc1 mRNA 表达水平高于 H460、H1299 细胞($t=3.593$, $P=0.023$; $t=7.505$, $P=0.002$);转染 si-NFATc1 组 NFATc1 mRNA ($t=9.325$, $P<0.001$),NFATc1 蛋白($t=10.254$, $P<0.001$),细胞的 OD 值($t=7.954$, $P<0.001$)均低于 si-NC 组,细胞集落形成数($t=12.210$, $P<0.001$),迁移率($t=8.951$, $P<0.001$)低于 si-NC 组;si-NFATc1 组 E-cadherin 蛋白表达水平高于 si-NC 组($t=6.352$, $P<0.001$),Vimentin 和 N-cadherin 蛋白的表达($t=6.012$, $P<0.001$; $t=10.241$, $P<0.001$)低于 si-NC 组。结论:NFATc1 在 H1650 细胞中表达水平增加,敲低其表达水平后可减弱细胞增殖、迁移和 EMT。

关键词 活化 T 细胞 c1 的核因子;增殖;上皮间质转化

中图分类号 R734.2

文献标志码 A

Effects of NFATc1 on the proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition of non-small cell lung cancer

LI Zhi-hui, YAO Fei-fei, WANG Fu-xia

(Department of Respiratory Medicine, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450000, China)

Abstract Objective: To detect the effect of activated T cell c1 nuclear factor(NFATc1) on the proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. **Methods:** qRT-PCR was used to detect the expression level of NFATc1 in NSCLC cells H1650, H460, H1299 and normal human bronchial epithelial cells BEAS-2B. The si-NFATc1 plasmid was transfected into H1650 cells, and the effects of H1650 cell proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition (EMT) were detected by CCK-8 proliferation, colony formation experiments, scratch and Western blotting. **Results:** The relative expression level of NFATc1 mRNA in H1650, H460, and H1299 cells were higher than those in BEAS-2B cells($t=10.732$, $P<0.001$; $t=4.705$, $P=0.009$; $t=4.792$, $P=0.009$), and the expression level of NFATc1 mRNA of H1650 cells was higher than that of H460 and H1299 cells($t=3.593$, $P=0.023$; $t=7.505$, $P=0.002$). The NFATc1 mRNA($t=9.325$, $P<0.001$), and the gray value of NFATc1 protein ($t=10.254$, $P<0.001$), the OD value of cells ($t=7.954$, $P<0.001$) in the si-NFATc1 group were lower than those of the si-NC group, the number of colony formation ($t=12.210$, $P<0.001$), and the migration rate in the si-NFATc1 group were lower than those of the si-NC group($t=8.951$, $P<0.001$). The expression of E-cadherin protein in the si-NFATc1 group was higher ($t=6.352$, $P<0.001$), and the expression of Vimentin and N-cadherin protein were lower than those in the si-NC group($t=6.012$, $P<0.001$; $t=10.241$, $P<0.001$). **Conclusion:** The expression level of NFATc1 increases in H1650 cells, knocking down its expression level can attenuate cell proliferation, migration and EMT.

Key words nuclear factor of activated T cell c1; proliferation; epithelial-mesenchymal transition

肺癌是癌症相关死亡的主要原因,非小细胞肺癌(NSCLC)占肺癌类型的 80%^[1-2]。经过积极的手术切除、化学和放射治疗后,局部未转移患者的 5 年生存率约为 55%,区域性疾病患者约为 27%,远期转移患者约为 4%^[3]。这主要由于早期就诊率低且确诊时大多处于晚期阶段^[4]。因此,寻找灵敏的肿瘤标

志物和有效的治疗策略是亟待解决的问题。近年来,研究表明活化 T 细胞核因子(NFAT)参与肿瘤的发生、发展^[5]。在前列腺癌中,活化 T 细胞 c1 核因子1(activated T cell c1 nuclear factor1, NFATc1)的表达水平增加,降低 NFATc1 的表达水平后,对膀胱癌细胞的增殖和转移有一定的抑制作用,可能是膀胱癌治疗的有效靶点之一^[6]。在卵巢癌中, NFATc1 可促

作者简介 李智慧(1987-),女,主治医师,硕士,研究方向:肺癌、肺部感染。

进癌细胞增殖,发挥致癌作用^[7]。而在 NSCLC 中,对 NFATc1 的表达水平及可能发挥的作用机制研究较少,本研究主要检测 NFATc1 在 NSCLC 细胞中的表达水平,利用转染技术敲低 NFATc1 的表达,进一步分析 NFATc1 对 NSCLC 细胞增殖、迁移和上皮间充质转化(EMT)的影响,为 NSCLC 的靶向治疗提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 NSCLC 细胞 H1650、H460、H1299 及正常人支气管上皮细胞 BEAS-2B(上海细胞生物研究所);RPMI1640 培养基(北京鼎国有限公司);总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司);NFATc1、Vimentin、N-cadherin、E-cadherin、 β -actin 一抗和二抗(美国 Cell Signaling Technology 公司);阴性对照质粒(si-NC)、NFATc1 干扰质粒(si-NFATc1)和 NFATc1 mimic 质粒由北京华大基因合成。

1.2 实验方法

1.2.1 逆转录定量 PCR(qRT-PCR) 提取 H1650、H460、H1299 和 BEAS-2B 细胞中的总 RNA,反转录为 cDNA,按照 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒说明进行实时定量 PCR。以管家基因 GAPDH 的 mRNA 水平作为内参照。引物设计如下: NFATc1 上游引物序列 5'-CACCGCATCACAGGAAGAC-3',下游引物序列 5'-GCACAGTCAATGACGGCTC-3',GAPDH 上游引物序列 5'-AGAAAAACCTGCCAAATATGATGAC-3',下游引物序列 5'-TGGGTGTCGCTGTTGAAGTC-3'。反应条件:95℃ 5 min,95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,42 个循环,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 相对表达水平。

1.2.2 转染实验 取对数生长期的 H1650 细胞进行转染实验,以 10^4 个/孔的密度接种于 6 孔细胞板,常规培养 24 h,分为 si-NC 组和 si-NFATc1 组,按照脂质体 lipofectamine 2000 说明书步骤操作,转染 6 h 后,更换新鲜培养基,放置恒温箱中继续培养 48 h,收集各组细胞利用 qRT-PCR 和 Western 印迹检测转染效果,qRT-PCR 具体实验操作见 1.2.1,Western 印迹具体实验操作见 1.2.3。

1.2.3 Western 印迹实验 收集 si-NC 组、si-NFATc1 组细胞加入适量蛋白裂解液,放置冰块上裂解 30 min。收集上清,利用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。取 30 μ g 蛋白,行聚丙烯酰胺凝胶电泳,将凝胶上的蛋白湿转至 PVDF 膜上。配置 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,滴加 anti-NFATc1(1:1 000)在 4℃冰箱中过夜孵育。采用 TBST 溶液清洗 3 遍,每次 10 min。之后滴加二抗(1:4 000)室温孵育 1 h,采用 TBST 溶

液清洗 3 遍,每次 10 min。配置一定量的显影液,均匀滴加在膜上,曝光拍照。

1.2.4 CCK-8 增殖实验 CCK-8 试剂检测细胞增殖情况,将 si-NC 组和 si-NFATc1 组细胞以每孔 2×10^3 的密度接种于 96 孔板中,每组细胞 6 个平行孔。饥饿过夜,然后更换含有 10%胎牛血清的培养基。放置 37℃、5%CO₂ 条件的恒温箱中培养,分别在更换培养基的 12、24、36、48、60、72 h 时,至于酶标仪 450 nm 处检测细胞光密度(optical density,OD)值。

1.2.5 集落形成实验 将 si-NC 组和 si-NFATc1 组细胞悬液,反复吹打使细胞分散,按照每皿 200 个细胞的密度接种至培养皿中,以十字方向轻轻混匀,放置操作台中静置 10 min,移至恒温箱中培养,根据培养液 pH 值变化情况更换培养液,培养至肉眼可见的克隆形成,终止培养。弃去培养基,PBS 溶液清洗 1 遍,加入 3 mL 甲醇固定 15 min,然后用 DAPI 染料染色 10 min,终止染色后 PBS 溶液清洗 1 遍,拍照并统计集落形成数量。

1.2.6 划痕实验 si-NC 组和 si-NFATc1 组细胞以 30 万每孔的密度接种至 6 孔板中,放置恒温箱中孵育 24 h,用 10 μ L 的枪头至上从下划一道伤痕,在显微镜下拍照。划痕宽度为 a 值。更换培养基,以免划掉的细胞再次脱落贴壁生长。继续培养 24 h,放置显微镜下拍照,划痕宽度为 b 值。细胞迁移率=(a-b)/a \times 100%。

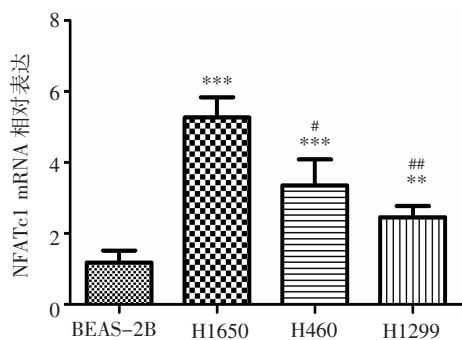
1.2.7 Western 印迹实验 收集 si-NC 组、si-NFATc1 组细胞加入适量蛋白裂解液,放置冰块上裂解 30 min。收集上清,利用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。取 30 μ g 蛋白,行聚丙烯酰胺凝胶电泳,将凝胶上的蛋白湿转至 PVDF 膜上。配置 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,滴加 anti-Vimentin、anti-N-cadherin、anti-E-cadherin 抗体(1:1 000),后续操作见 1.2.3。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计分析,正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *LSD-t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NFATc1 在 3 种 NSCLC 细胞中高表达 H1650、H460、H1299 细胞中 NFATc1 mRNA 的相对表达水平平均高于 BEAS-2B 细胞($t=10.732, P < 0.001; t=4.705, P=0.009; t=4.792, P=0.009$),且 H1650 细胞中 NFATc1 mRNA 表达水平高于 H460、H1299 细胞($t=3.593, P=0.023; t=7.505, P=0.002$),见图 1。

2.2 验证 si-NFATc1 对 H1650 的敲低效率 将



注:与 BEAS-2B 细胞相比,*** $P<0.001$,** $P<0.01$;与 H1650 细胞相比,* $P<0.5$,# $P<0.01$;NFATc1:活化 T 细胞 c1 核因子

图 1 不同细胞系中 NFATc1 mRNA 的相对表达水平

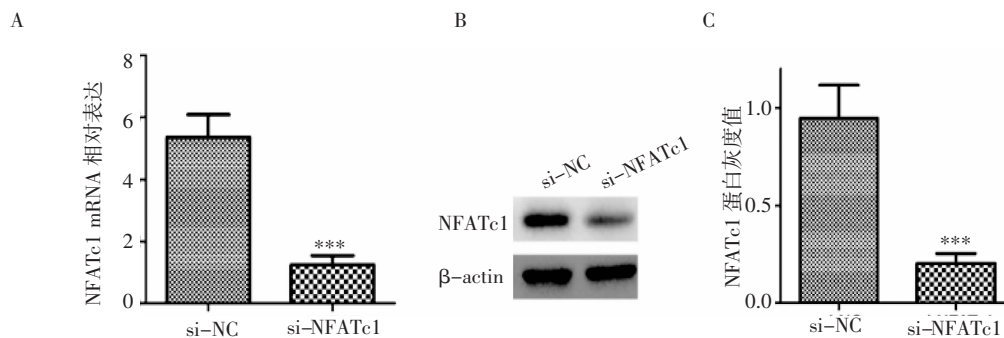
Fig 1 Relative expression of NFATc1 mRNA in different cell lines

si-NC、si-NFATc1 转染至 H1650 细胞后,在 mRNA

和蛋白质水平分别检测敲低效率,结果显示转染 si-NFATc1 组 NFATc1 mRNA 低于 si-NC 组($t=9.325$, $P<0.001$),NFATc1 蛋白灰度值低于 si-NC 组($t=10.254$, $P<0.001$),见图 2。

2.3 敲低 NFATc1 后可有效抑制 H1650 细胞的增殖 采用 CCK8 和集落形成实验检测转染质粒后细胞的增殖能力,培养 72 h si-NFATc1 组细胞的 OD 值低于 si-NC 组($t=7.954$, $P<0.001$),细胞集落形成数低于 si-NC 组($t=12.210$, $P<0.001$),见图 3。

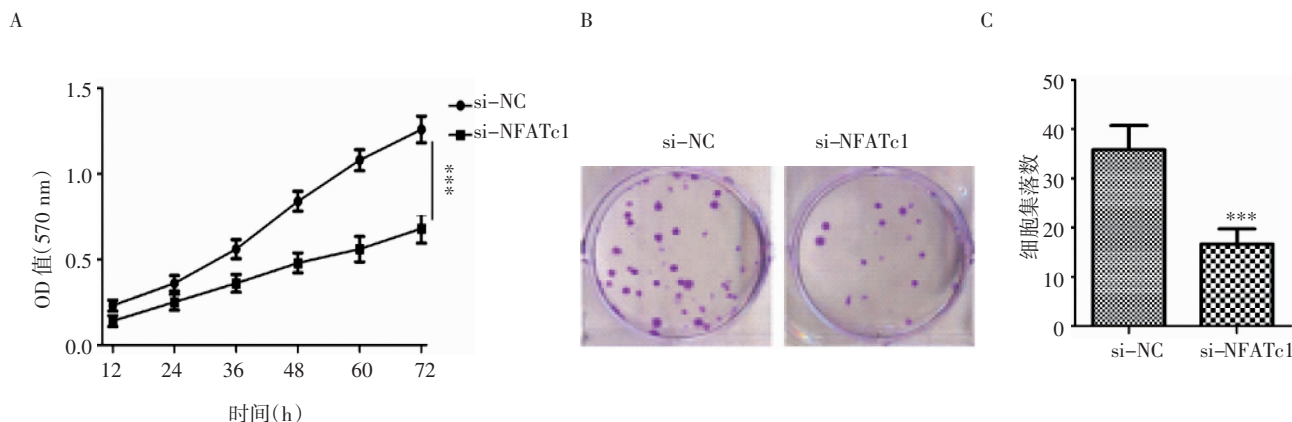
2.4 敲低 NFATc1 后可有效抑制 H1650 细胞的迁移 利用迁移实验检测转染后细胞的迁移率,结果显示 si-NFATc1 组细胞的迁移率低于 si-NC 组($t=8.951$, $P<0.001$),见图 4。



注: A:转染 si-NFATc1 后 NFATc1 mRNA 相对表达;B:转染 si-NFATc1 后 NFATc1 蛋白表达情况;C:转染 si-NFATc1 后 NFATc1 蛋白灰度值;与 si-NC 组相比,*** $P<0.001$;NFATc1:活化 T 细胞 c1 核因子;si-NC 组:转染对照质粒组;si-NFATc1 组:转染 si-NFATc1 组

图 2 特异性 si-NFATc1 对 H1650 的敲低效率

Fig 2 Knockdown efficiency of specific si-NFATc1 on H1650



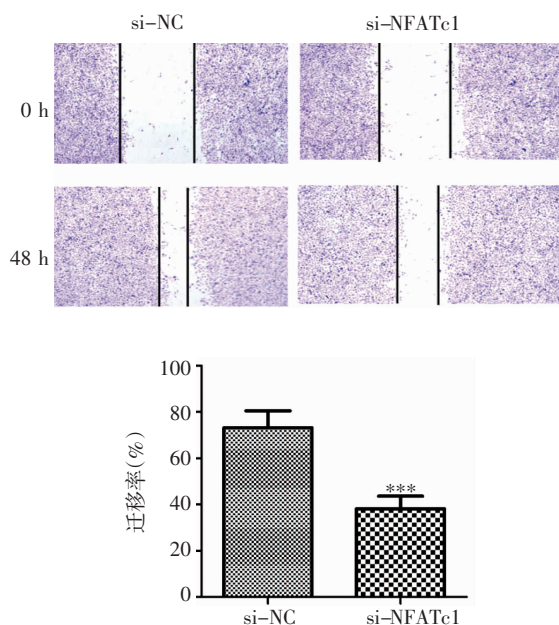
注: A:CCK8 实验检测细胞增殖能力;B:集落形成实验的直观图;C:细胞集落数的比较;与 si-NC 组相比,*** $P<0.001$;OD 值:吸光度值;si-NC 组:转染对照质粒组;si-NFATc1 组:转染 si-NFATc1 组

图 3 敲低 NFATc1 后对 H1650 细胞增殖的影响

Fig 3 The effect of knocking down NFATc1 on the proliferation of H1650 cells

2.5 敲低 NFATc1 后可减弱 H1650 细胞的 EMT 能力 选择 Vimentin、N-cadherin 和 E-cadherin 蛋白水平评估 EMT 能力,Western 印迹实验显示 si-NFATc1

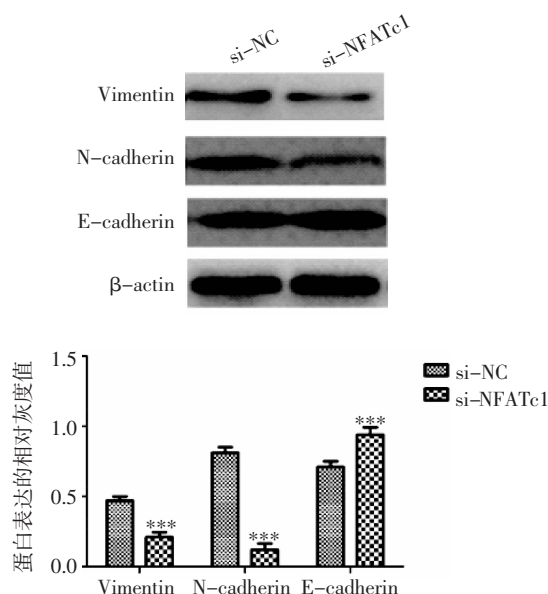
组 E-cadherin 蛋白水平高于 si-NC 组($t=6.352$, $P<0.001$),Vimentin 和 N-cadherin 蛋白的表达水平低于 si-NC 组($t=6.012$, $P<0.001$; $t=10.241$, $P<0.001$),见图 5。



注:与 si-NC 组相比,*** $P < 0.001$; si-NC 组:转染对照质粒组; si-NFATc1 组:转染 si-NFATc1 组

图 4 敲低 NFATc1 后对 H1650 细胞迁移的影响

Fig 4 The effect of knocking down NFATc1 on the migration of H1650 cell



注:与 si-NC 组相比,*** $P < 0.001$; si-NC 组:转染对照质粒组; si-NFATc1 组:转染 si-NFATc1 组; Vimentin:波形蛋白; N-cadherin: N-钙黏蛋白; E-cadherin: E-钙黏蛋白; β-actin:内参蛋白

图 5 敲低 NFATc1 后对 H1650 细胞 EMT 的影响

Fig 5 The effect of knocking down NFATc1 on EMT of H1650 cells

3 讨论

NSCLC 是最常见的肺癌,尽管其诊治水平在不断提高,但死亡率仍居高不下。因此,最重要的是研究肺癌发生、发展的潜在机制,并确定其诊断和治疗的基因靶标。NFAT 蛋白属于炎症转录因子家族,主要在 T 细胞活化的背景下参与炎症反应。NFAT

活性不仅限于免疫系统,还与几种恶性肿瘤的发生、发展有关。最近有多项研究显示, NFATc1 具有致癌性, NFATc1 在前列腺癌的治疗中具有一定的临床价值,与卵巢癌的不良预后相关,可促进胶质母细胞瘤侵袭^[8-10]。但 NFATc1 在 NSCLC 中的作用机制目前研究还较少见,在本研究中发现 NFATc1 mRNA 水平在 3 种 NSCLC 细胞系中的表达水平均上调,并对 EMT 有影响。EMT 是细胞失去上皮特征并获得间质特征的过程,通常由上皮标志物 E-cadherin 的丢失和间充质标志物 Vimentin 的表达增加来定义。上皮细胞失去了细胞极性,失去与基底膜的连接,获得了较高的迁移与侵袭、抗凋亡和降解细胞外基质的能力^[11]。EMT 与多种肿瘤功能有关,包括肿瘤发生、恶性进展、肿瘤细胞迁移和对治疗的抵抗性^[12]。本研究中,敲低 NFATc1 表达水平后,增强了上皮标志物 E-cadherin 的表达,减弱 N-cadherin 和 Vimentin 的表达,表明 NFATc1 表达降低后可减弱 NSCLC 细胞 EMT 作用,以及肿瘤细胞的迁移和侵袭能力。

NFATc1 在 NSCLC 细胞系中的表达水平增加,推断其在 NSCLC 中发挥促癌基因作用。LI 等^[13]研究显示,在卵巢癌中 NFATc1 的表达水平增加,降低其表达水平后可显著降低卵巢癌细胞在裸鼠中的增殖、迁移和侵袭能力,并减少卵巢癌的肿瘤发生。此外,在膀胱癌中亦观察到 NFATc1 的高表达, NFATc1 与根治性前列腺切除术后的复发风险之间存在相关性,表明 NFATc1 在膀胱癌发展过程中至关重要^[14]。本研究中敲低 NFATc1 的表达后可明显抑制 NSCLC 细胞的增殖和迁移,与以上的研究结果相一致。HE 等^[15]研究显示,叉头框蛋白 C2 可增强 NSCLC 细胞的增殖和 EMT,有可能成为治疗 NSCLC 的有效靶点。WANG 等^[16]研究显示, Wnt5a 可促进 NSCLC 细胞 EMT 和细胞的转移,有望成为治疗 NSCLC 的有效靶点。FBXW7 可抑制 NSCLC 细胞 EMT 和顺铂耐药,增加 FBXW7 的表达水平有可能成为治疗 NSCLC 的方法之一^[17]。本研究中 NFATc1 在 NSCLC 中的表达水平增加,降低其表达水平后可显著抑制细胞的增殖、迁移和 EMT。

综上所述, NFATc1 在 NSCLC 中表达水平增加,发挥促癌基因的作用,降低 NFATc1 的表达水平后可抑制 NSCLC 细胞增殖和 EMT。因此, NFATc1 有望成为 NSCLC 治疗的有效靶点。

参考文献:

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87

- [2] NASIM F, SABATH B F, EAPEN G A. Lung Cancer[J]. Med Clin North Am, 2019, 103(3):463
- [3] MILLER K D, SIEGEL R L, LIN C C, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(4):271
- [4] HERBST R S, MORGENSZTERN D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer[J]. Nature, 2018, 553(7689):446
- [5] BUCHER P, ERDMANN T, GRONDONA P, et al. Targeting chronic NFAT activation with calcineurin inhibitors in diffuse large B-cell lymphoma[J]. Blood, 2020, 135(2):121
- [6] LIU Y, LIANG T, QIU X, et al. Down-regulation of NFATc1 suppresses proliferation, migration, invasion, and warburg effect in prostate cancer cells[J]. Med Sci Monit, 2019, 25:1572
- [7] XU W, GU J, REN Q, et al. NFATc1 promotes cell growth and tumorigenesis in ovarian cancer up-regulating c-Myc through ERK1/2/p38 MAPK signal pathway[J]. Tumour Biol, 2016, 37(4):4493
- [8] MANDA K R, TRIPATHI P, HSI A C, et al. NFATc1 promotes prostate tumorigenesis and overcomes PTEN loss-induced senescence[J]. Oncogene, 2016, 35(25):3282
- [9] XIN B, JI K Q, LIU Y S, et al. NFAT Overexpression correlates with CA72-4 and poor prognosis of ovarian clear-cell carcinoma subtype[J]. Reprod Sci, 2020, 10.1007/s43032-020-00368-3
- [10] WANG L, WANG Z, LI J, et al. NFATc1 activation promotes the invasion of U251 human glioblastoma multiforme cells through COX-2[J]. Int J Mol Med, 2015, 35(5):1333
- [11] 朱婷婷. ZIP4 与肿瘤生物学行为的研究进展[J]. 天津医科大学学报, 2020, 26(2):183
- [12] DONG Y, SUN Y, HUANG Y, et al. Depletion of MLKL inhibits invasion of radioresistant nasopharyngeal carcinoma cells by suppressing epithelial-mesenchymal transition [J]. Ann Transl Med, 2019, 7(23):741
- [13] LI L, DUAN Z, YU J. NFATc1 regulates cell proliferation, migration, and invasion of ovarian cancer SKOV3 cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Oncol Rep, 2016, 36:918
- [14] KAWAHARA T, KASHIWAGI E, IDE H, et al. The role of NFATc1 in prostate cancer progression: cyclosporine A and tacrolimus inhibit cell proliferation, migration, and invasion [J]. Prostate, 2015, 75:573
- [15] HE Y, XIE H, YU P, et al. FOXC2 promotes epithelial-mesenchymal transition and cisplatin resistance of non-small cell lung cancer cells [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2018, 82(6):1049
- [16] WANG B, TANG Z, GONG H, et al. Wnt5a promotes epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis in non-small-cell lung cancer[J]. Biosci Rep, 2017, 37(6):BSR20171092
- [17] XIAO G, LI Y, WANG M, et al. FBXW7 suppresses epithelial-mesenchymal transition and chemo-resistance of non-small-cell lung cancer cells by targeting snail for ubiquitin-dependent degradation[J]. Cell Prolif, 2018, 51(5):e12473

(2020-11-18 收稿)

(上接第 445 页)

- nase activity but not in protein levels of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 β in ventral prefrontal cortex of depressed suicide victims[J]. Biol Psychiatry, 2007, 61(2):240
- [15] POLTER A M, YANG S F, JOPE R S, et al. Functional significance of glycogen synthase kinase-3 regulation by serotonin[J]. Cell Signal, 2012, 24(1):265
- [16] 蔡莉. 视黄酸信号调控下丘脑室旁核促肾上腺皮质激素释放因子及其在抑郁症发病中的可能作用[D]. 中国科学技术大学, 2011
- [17] 易志凯, 李娜. PI3K/AKT 信号通路 with 抑郁障碍相关性的研究进

展[J]. 云南医药, 2018, 39(2):179

- [18] ZENG B Q, LI Y W, NIU B, et al. Involvement of PI3K/Akt/FoxO3a and PKA/CREB signaling pathways in the protective effect of fluoxetine against corticosterone-induced cytotoxicity in PC12 cells[J]. J Mol Neurosci, 2016, 59(4):567
- [19] 菊轩. 睡眠剥夺快速抗抑郁机制中腺苷及其受体对 PKA 和 CaMKIV 的影响[D]. 汕头大学, 2011

(2021-01-25 收稿)