

LASS2/TMSG1 过表达抑制人肺癌 A549 细胞增殖和促进 A549 细胞凋亡:基于上调神经酰胺和 p38 MAPK 进而启动级联信号传导通路

刘峥璐¹, 宣成睿¹, 韩希然^{1,2}, 郑泽泽¹, 肖 瑞¹, 宝鲁日¹, 徐晓艳¹

¹内蒙古医科大学基础医学院, 内蒙古 呼和浩特 010059; ²山东省青岛黄海学院大学生科技园形态学教研室, 山东 青岛 266400

摘要:目的 探究人源性长寿保障基因 2/肿瘤转移抑制相关基因 1(LASS2/TMSG1)过表达对人肺癌 A549 细胞增殖、凋亡的影响并探讨相关机制。方法 对课题组先前构建好的人肺癌 A549 细胞阴性对照组和 LASS2/TMSG1 基因过表达组进行如下实验: Western blot 检测 LASS2/TMSG1 蛋白表达水平, 平板克隆形成实验、CCK-8 法、Hoechst/PI 双染、流式细胞术检测 A549 细胞体外增殖能力及凋亡情况。将 14 只裸鼠随机分为阴性对照组和 LASS2/TMSG1 基因过表达组, 7 只/组, 分别向对应组别的裸鼠颈部皮下注射 A549 细胞阴性对照组和 LASS2/TMSG1 过表达组细胞悬液, 构建裸鼠移植瘤模型, 检测 LASS2/TMSG1 基因过表达对 A549 细胞体内增殖能力的影响。Western blot 检测 A549 细胞及裸鼠移植瘤中 p38 MAPK、p-p38 MAPK 蛋白表达水平。ELISA 法分析 A549 细胞上清液及裸鼠移植瘤组织匀浆中神经酰胺和 p38 MAPK 蛋白含量。结果 与阴性对照组相比, LASS2/TMSG1 基因过表达组 A549 细胞 LASS2/TMSG1 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.05$), 体外增殖能力下降 ($P < 0.05$), 早期凋亡率上升 ($P < 0.05$), 移植瘤细胞体内增殖受到抑制 ($P < 0.05$), A549 细胞及裸鼠移植瘤中 p38 MAPK、p-p38 MAPK 蛋白表达量均显著升高 ($P < 0.05$), A549 细胞上清液及裸鼠移植瘤组织匀浆中神经酰胺和 p38 MAPK 含量显著增加 ($P < 0.05$)。结论 LASS2/TMSG1 基因过表达能显著抑制人肺癌 A549 细胞的体内、外增殖能力, 促进肿瘤细胞早期凋亡, 这可能与 LASS2/TMSG1 基因过表达后上调了神经酰胺及其下游的效应分子 p38 MAPK 蛋白进而启动级联信号传导通路有关。

关键词: LASS2/TMSG1, 肺癌, 增殖, 凋亡, 神经酰胺, p38 MAPK

LASS2/TMSG1 overexpression inhibits proliferation and promotes apoptosis of human lung cancer A549 cells possibly by upregulating ceramide and p38 MAPK to activate a signaling cascade

LIU Zhenglu¹, XUAN Chengrui¹, HAN Xiran^{1,2}, ZHENG Zeze¹, XIAO Ru¹, BAO Luri¹, XU Xiaoyan¹

¹College of Basic Medical Sciences, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China; ²Department of Morphology, Science and Technology Park for College Students of Qingdao Huanghai University, Qingdao 266400, China

Abstract: Objective To investigate the effects of LASS2/TMSG1 gene overexpression on proliferation and apoptosis of human lung cancer A549 cells and explore the possible mechanism. **Methods** We examined LASS2/TMSG1 expression level in a previously constructed A549 cell line overexpressing LASS2/TMSG1 using Western blotting. The proliferation and apoptosis of the cells were detected using colony-forming assay, CCK-8 assay, Hoechst/PI double staining and flow cytometry. Fourteen nude mice were randomized into 2 groups ($n=7$) to receive subcutaneous injection of A549 cells with or without LASS2/TMSG1 overexpression on the back of the neck, and the cell proliferation *in vivo* was observed. The expression levels of p38 MAPK protein and p-p38 MAPK protein in the xenografts were detected with Western blotting. ELISA was used to detect the levels of ceramide and p38 MAPK protein in cultured A549 cell supernatants and the xenografts in nude mice. **Results** Compared with the negative control cells, A549 cells with LASS2/TMSG1 overexpression had significantly lowered proliferation ability *in vitro* with increased early apoptosis rate ($P < 0.05$), and showed obvious growth inhibition after inoculation in nude mice ($P < 0.05$). Western blotting showed that in both cultured A549 cells and the xenografts in nude mice, LASS2/TMSG1 gene overexpression significantly increased the expression levels of p38 MAPK protein and p-p38 MAPK protein ($P < 0.05$); the results of ELISA also revealed significantly increased levels of ceramide and p38 MAPK protein in the cell supernatant and xenografts as well ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression of LASS2/TMSG1 gene can significantly inhibit the proliferation and promote early apoptosis of human lung cancer A549 cells both *in vitro* and *in vivo* possibly by upregulating the expressions of ceramide and p38 MAPK protein to activate a signal transduction cascade.

Keywords: LASS2/TMSG1; lung cancer; proliferation; apoptosis; ceramide; p38 MAPK

收稿日期: 2022-06-07

基金项目: 国家自然科学基金(81660393); 内蒙古自治区自然科学基金(2019MS08115); 内蒙古自治区医疗卫生科技计划项目(202202137)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81660393).

作者简介: 刘峥璐, 在读硕士研究生, E-mail: 741890103@qq.com; 宣成睿, 硕士, E-mail: xuanchengruihl@163.com。刘峥璐、宣成睿共同为第一作者

通信作者: 徐晓艳, 博士, 教授, E-mail: xxy_patho@163.com

目前肺癌对于全球来说仍是一个严峻的挑战, 其发病率和病死率都位居癌症前列^[1], 远超其他癌症类型。肺癌的发病机制尚未完全明确, 近年来科研工作者在肺癌的分子生物方面取得了突破性的研究进展^[2], 出现了“分子诊断”、“分子预后”、“分子治疗”等一系列的新理论、新概念。肿瘤标志物及分子靶向治疗成为了当前研

究热点,从分子和基因水平研究肺癌的发病机制,设计和研制针对特定分子和基因靶点的药物,特异性地杀伤肺癌细胞,对于肺癌的诊断及治疗至关重要^[3]。通过目的基因来调控肿瘤细胞的增殖分化及凋亡过程已经成为现阶段攻破癌症的新思路、新方向。

LASS2 也被称作 TMSG1、神经酰胺合成酶 2 (CerS2),它可以影响多种癌细胞(如膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌和肝癌)的增殖、侵袭、转移及凋亡,并与脑膜瘤和膀胱癌的不良预后相关^[4]。以往研究主要关注于 LASS2/TMSG1 基因对于肿瘤微环境的调节作用,揭示其能够通过调节 V-ATP 酶活性和细胞外 H⁺ 浓度来抑制肿瘤的侵袭和转移^[4-6]。近年来研究发现, LASS2/TMSG1 基因过表达对甲状腺癌^[4]、乳腺癌^[7]、肝癌^[8]等肿瘤细胞具有抑制增殖、促进凋亡的作用,并且还可抑制肿瘤细胞异体移植瘤的生长^[9,10]。然而,目前关于 LASS2/TMSG1 基因过表达对于肺癌细胞增殖、凋亡的影响及相关机制尚不清楚。

神经酰胺是鞘脂的主要成员之一^[11,12],也是鞘脂代谢的中心分子,具有抗增殖、促凋亡的重要生物学功能^[11,13]。LASS2/TMSG1 基因的 TLC 功能域对于神经酰胺的合成至关重要,可催化神经酰胺的特异性合成^[11,14]。研究表明 LASS2/TMSG1 基因能够通过上调细胞中神经酰胺的含量来促进细胞凋亡^[6,11,12],并且介导 G0/G1 细胞周期阻滞从而抑制细胞增殖^[14,15]。p38 MAPK 信号转导通路是神经酰胺的下游通路^[16],p38 MAPK 是具有促细胞凋亡作用的重要信号分子^[17,18]。所以我们推测,LASS2/TMSG1 基因过表达可能会上调肿瘤细胞内神经酰胺的含量并影响 p38 MAPK 蛋白的合成与分泌,进而发挥肿瘤抑制作用,目前尚无文献报道,相关机制有待验证。

因此,本课题通过体内、体外实验探究 LASS2/TMSG1 基因过表达对于肺癌增殖、凋亡的影响,检测 LASS2/TMSG1 基因过表达后神经酰胺、p38 MAPK 等蛋白的表达情况,以初步探讨 LASS2/TMSG1 基因对人肺癌 A549 细胞增殖、凋亡影响的相关机制,为新型抗肿瘤靶向基因的后续研究提供必要的理论基础和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

14 只 Balb/c 雄性裸鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号:1016448636975860373),4~5 周,体质量为 15~20 g。人非小细胞肺癌 A549 细胞(上海复祥生物科技有限公司)。脂质体 Lipofectamine 2000 (Invitrogen);胎牛血清、DMEM、青-链霉素、DMSO (Gibco),DPBS (HyClone),6 孔板 (Corning);

Annexin V-FITC/PI Cell Apoptosis Detection Kit(北京全式金生物);CCK-8 试剂盒(C0037)、Hoechst 染色试剂盒(C0003)、细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒(C1052)(上海碧云天),快速姬母萨染液(北京酷来博科技);Ki67 核抗原(MAB-0672)、鼠抗人单克隆抗体(MAB-0014)(福州迈新);SP 超敏试剂盒、DAB 显色试剂盒、兔抗 p38 MAPK 多克隆抗体、兔抗 p-p38 MAPK 多克隆抗体(北京博奥森);HE 染色试剂盒、中性树胶、4% 多聚甲醛 (Solarbio);Human p38 protein (p38) ELISA KIT (CK-EN16514)、Human ceramide (ceramide) ELISA KIT(CK-EN1268)(睿信生物科技)。

1.2 细胞培养

DMEM、胎牛血清、青-链霉素按照 8.9:1:0.1 的比例配制成完全培养基,将课题组先前构建好的 2 组 A549 细胞模型分别接种于 25 cm² 的培养瓶中,置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱。密切关注细胞生长状态,细胞融合度达到 80%~90% 时进行传代。

1.3 Western blot 检测

提取细胞和组织匀浆总蛋白,经 10% SDS-PAGE 分离后,转移至硝酸纤维素膜上,5% 封闭奶粉封闭 1 h,将膜分别置于 I 抗 β-actin (1:1000),LASS2/TMSG1 (1:400),p38 MAPK (1:1000),p-p38 MAPK (1:800) 稀释液中 4 °C 孵育过夜;TBST 洗膜 3 次,室温下孵育 II 抗 1 h;TBST 洗膜 3 次,避光条件下 Odessey CLX 红外激光成像系统进行扫描,观察结果,记录灰度值。以目的条带和 β-actin 的比值作为结果行统计学分析。

1.4 平板克隆形成实验

取处于对数生长期的阴性对照组 (NC 组) 和 LASS2/TMSG1 基因过表达组 (LASS2/TMSG1 overexpression) A549 细胞,以 200/孔的密度接种于 6 孔板中,每孔加入完全培养基至 2 mL,摇匀,37 °C、5% CO₂ 恒温细胞培养箱中静置培养 2~3 周。期间严密观察并定期更换培养基,当肉眼观察到有明显克隆集落形成时终止培养。弃上清,DPBS 浸洗 2 次,2 min/次;每孔加入 4% 多聚甲醛 2 mL,固定 20 min;DPBS 浸洗 2 次,10 s/次;姬母萨染液染色 15~20 min,DPBS 洗涤 2 次,静置干燥。观察细胞克隆形成情况,显微镜下计数大于 50 个细胞的克隆数(低倍镜),计算克隆形成率,克隆形成率(%)=细胞克隆数/接种细胞数×100%。

1.5 CCK-8 细胞增殖检测

取对数生长期的 NC 组与 LASS2/TMSG1 基因过表达组 A549 细胞,以 5×10³/孔种于 96 孔板,分别在 24、48、72、96 h 时加入 CCK-8 溶液,37 °C 孵育 2 h,酶标仪检测吸光度值 A_{450nm}。

1.6 Hoechst/PI 双染检测

将 24 mm×24 mm 盖玻片浸泡于 75% 酒精中 5 min,

DPBS洗涤3次,DMEM洗涤1次,置于6孔板中,以 1×10^5 个细胞/孔接种细胞。24 h后加顺铂(10 mg/L)刺激细胞凋亡,继续培养24 h后按试剂盒说明进行Hoechst 33258和PI染色,载玻片滴加抗淬灭封片液15 μ L,将盖玻片细胞面向下轻覆于载玻片上进行封片,荧光显微镜下拍照并计算凋亡细胞百分比。

1.7 流式细胞术检测

取对数生长期的NC组与LASS2/TMSG1基因过表达组A549细胞,以 1×10^5 /瓶的密度接种于25 cm^2 的培养瓶中,细胞融合度均达到80%时常规处理,收集各组细胞,4 $^\circ\text{C}$ 离心机 $500 \times g$ 离心5 min,留沉淀,加预冷的DPBS清洗2次,4 $^\circ\text{C}$ 离心机 $500 \times g$ 离心5 min,留沉淀,1 mL Binding Buffer重悬,4 $^\circ\text{C}$ 离心机 $300 \times g$ 离心10 min,留沉淀,1 mL Binding Buffer再次重悬,制备细胞密度为 1×10^6 /mL的悬液。按照Annexin V-FITC/PI试剂盒说明书进行流式细胞术检测。

1.8 裸鼠模型构建

将14只Balb/c雄性裸鼠随机分为两组,7只/组,常规培养2组A549细胞(NC组和LASS2/TMSG1过表达组),待细胞融合度至80%~90%左右时收集细胞,提沉淀,1 mL DPBS重悬,将细胞密度调整为 5×10^6 /mL。向对照组每只裸鼠颈背部皮下注射0.2 mL A549细胞NC组细胞悬液,向实验组每只裸鼠颈背部皮下注射0.2 mL A549细胞LASS2/TMSG1基因过表达组细胞悬液,每周观察两次,观察内容:每周测量裸鼠移植瘤的大小,根据公式(体积=长径 \times 短径 $\times 0.52$)计算移植瘤体积,并绘制裸鼠移植瘤体积增长曲线。8周后处死裸鼠,完整剥取肿瘤组织,测量肿瘤组织的体积及质量。将肿瘤组织一分为二,一部分与各组淋巴结及内脏组织(肝、肾、脾)用4%甲醛溶液固定,预备行HE染色及免疫组织化学染色;另一部分肿瘤组织置于 -80°C 超低温冰箱中保存,后期用于检测肿瘤组织匀浆中神经酰胺及p38 MAPK蛋白的表达情况。

1.9 HE染色及免疫组织化学染色

肿瘤组织取材后用中性福尔马林固定,石蜡包埋,切片。脱蜡,至水后使用HE染色试剂盒染色。使用Ki67核抗原(MAB-0672)抗体对切片进行免疫组织化学染色,具体步骤参考该抗体说明书。

1.10 ELISA检测

收集NC组与LASS2/TMSG1基因过表达组A549细胞上清液,3000 r/min,离心10 min,取上清。分别在2组裸鼠移植瘤组织中加入适量生理盐水后充分捣碎,3000 r/min,离心10 min,取上清。提前将所需板条在室温下平衡1 h左右。按说明书设置标准品孔和样本孔,在所有孔中均加入100 μ L用辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测抗体,用封板膜严格密封,置于37 $^\circ\text{C}$ 恒温培养

箱中避光孵育60 min。洗板5次,所有孔中加入底物各50 μ L,封闭反应孔,37 $^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中避光孵育15 min。加入50 μ L的终止液,可观察到孔中液体由蓝色迅速变为黄色,立即用酶标仪测量各孔的光密度 $A_{450\text{nm}}$,为保证实验结果,测量时间应控制在15 min以内。用Excel绘制标准品线性回归曲线,并计算各样本浓度值。

1.11 统计学处理

运用统计学软件SPSS22.0进行数据分析,实验结果用均数 \pm 标准差表示,采用 t 检验对两样本进行比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LASS2/TMSG1基因过表达细胞模型的验证

与NC组比较,LASS2/TMSG1基因过表达组中蛋白表达量显著升高($P < 0.05$,图1),前期构建的细胞模型有效可用。

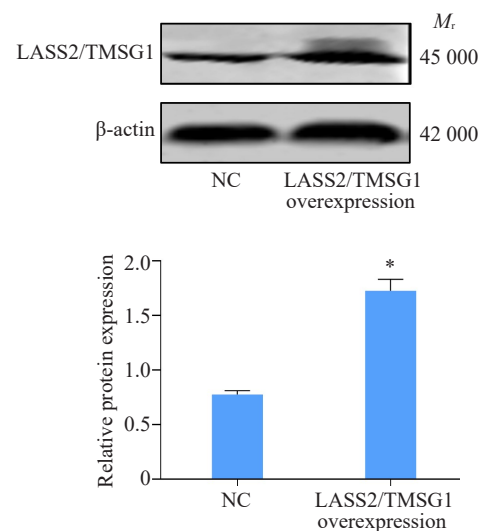


图1 Western blot分析LASS2/TMSG1蛋白表达
Fig.1 Protein expression levels of LASS2/TMSG1 in two A549 cell lines detected by Western blotting. * $P < 0.05$ vs negative control (NC) group.

2.2 LASS2/TMSG1基因过表达对人肺癌A549细胞体外增殖能力的影响

与NC组相比,LASS2/TMSG1基因过表达组人肺癌A549细胞的克隆形成百分比(%)显著降低($P < 0.05$,图2A、B),细胞生长速度明显下降($P < 0.05$,图2C)。

2.3 LASS2/TMSG1基因过表达对人肺癌A549细胞凋亡的影响

Hoechst/PI双染观察细胞形态和凋亡率改变: Hoechst 33258染色后正常细胞核呈均匀蓝色,凋亡细胞因胞核染色质固缩或碎裂而呈致密浓染,颜色偏白,LASS2/TMSG1基因过表达组较NC组细胞凋亡率明显

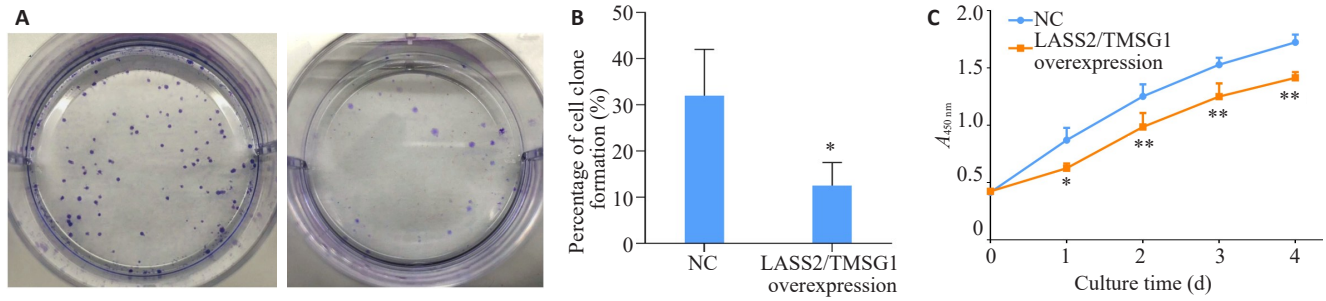


图2 LASS2/TMSG1基因过表达对人肺癌A549细胞体外增殖能力的影响

Fig.2 Effect of LASS2/TMSG1 overexpression on proliferation of A549 cells *in vitro*. **A:** Proliferation of A549 cells detected by plate colony-forming assay in NC group and LASS2/TMSG1 overexpression group. **B:** Quantitative analysis of colony-forming assay in the two groups (* $P<0.05$ vs NC). **C:** Proliferation curves in the 2 groups of cells detected by CCK-8 assay (* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs NC).

升高($P<0.01$,图3A、B);PI染色后晚期凋亡细胞核呈均匀淡红色,但2组细胞凋亡率无明显差异(图3C、D)。流式细胞术检测发现,与NC组相比,LASS2/TMSG1基因过表达组人肺癌A549细胞中晚期凋亡率差异不显

著,而早期凋亡率明显升高($P<0.05$,图3E、F)。

2.4 裸鼠体内成瘤实验

所有裸鼠在构建移植瘤模型后2周左右皮下可见肿瘤形成,观察发现LASS2/TMSG1基因过表达组裸

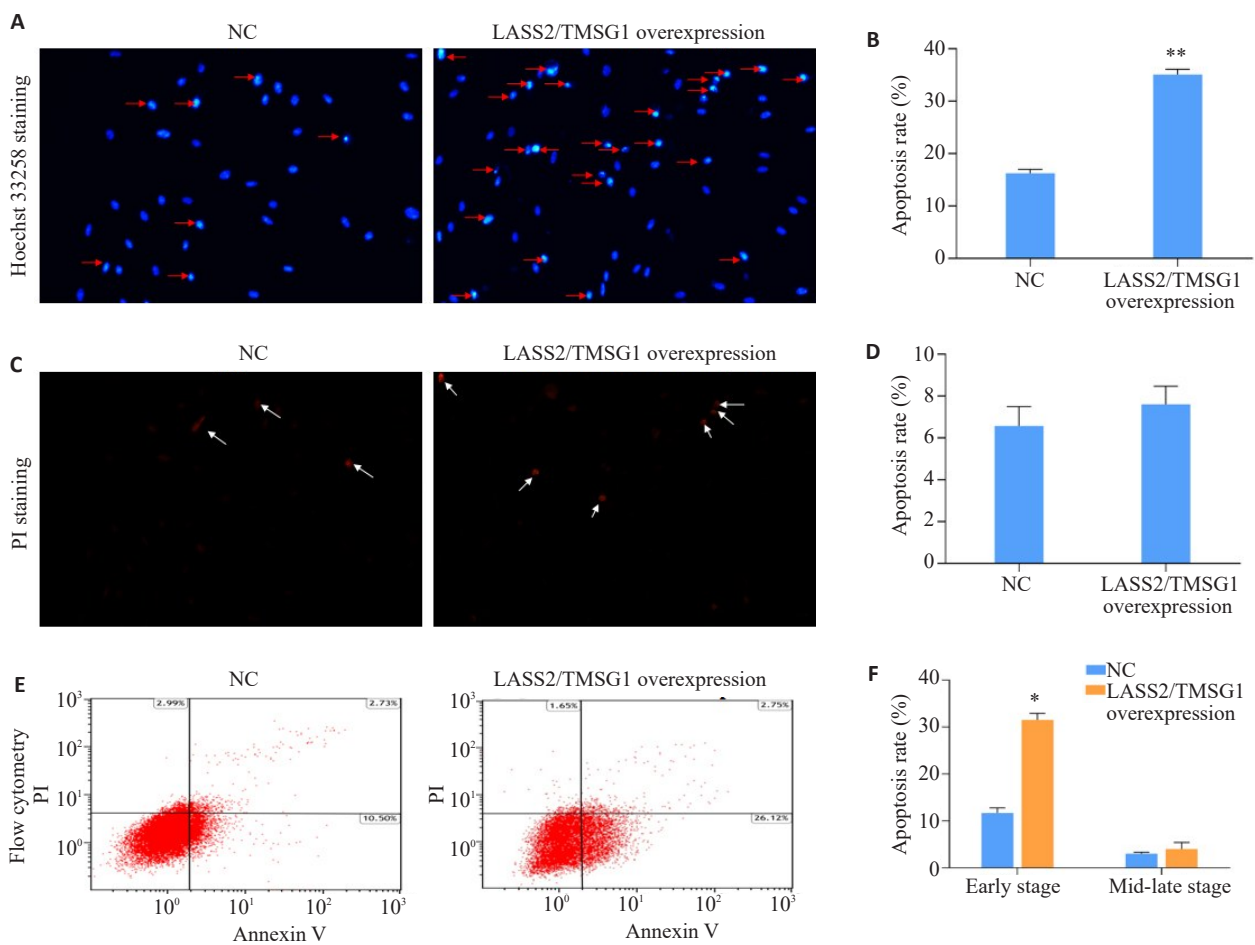


图3 LASS2/TMSG1基因过表达对人肺癌A549细胞凋亡的影响

Fig.3 Effect of LASS2/TMSG1 gene overexpression on apoptosis rate of A549 cells. **A, B:** Morphological changes of the cell nuclei and apoptosis rates of A549 cells detected by Hoechst staining (Original magnification: $\times 200$, ** $P<0.01$ vs NC). **C, D:** Morphological changes of the cell nuclei and apoptosis rates of A549 cells detected by PI staining ($\times 200$). **E, F:** Apoptosis rate of the cells detected by flow cytometry (* $P<0.05$ vs NC).

鼠肿瘤体积增长较NC组稍慢(表1、图4A)。8周后处死所有裸鼠,剥取移植瘤,测量肿瘤组织体积并称重,结果发现,无论是从肿瘤质量还是体积来看,

LASS2/TMSG1基因过表达后均具有抑制肿瘤生长的趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$,图4B)。

光镜下观察,两组裸鼠的移植瘤组织均呈现出低分

表1 裸鼠移植瘤的体积变化

Tab.1 Volume changes of transplanted tumors in 2 groups of nude mice (Mean±SD, n=7, mm³)

Group	Time of observation (week)					
	3	4	5	6	7	8
NC	9.16±3.86	16.16±5.22	31.65±17.41	41.96±22.83	73.15±49.69	142.5±90.92
LASS2/TMSG1overexpression	6.16±2.74	10.96±4.67	22.12±15.17	31.31±15.69	48.54±34.38	90.60±45.26

$P>0.05$ vs NC.

化腺癌形态,主要表现为两种生长模式:一种呈团巢状或片状分布,似有腺样结构,细胞有明显的异型性,可见核分裂象以及明显大而规则的核仁;另一种呈实片状分布,细胞呈印戒样改变(图4C)。与NC组相比,LASS2/TMSG1基因过表达组形成的平均克隆个数明显降低($P<0.05$,图4D),且肿瘤组织坏死灶更大更彻底(图4E)。两组裸鼠的肝、脾、肾及淋巴结中均未见明确的肿瘤细胞转移(图4F)。免疫组织化学结果显示,与NC组相比,LASS2/TMSG1基因过表达组裸鼠移植瘤组织中Ki67阳性表达率显著降低($P<0.05$,图4G)。

2.5 Western blot分析人肺癌A549细胞及裸鼠移植瘤中p38 MAPK、p-p38 MAPK蛋白的表达

结果显示,相比NC组,LASS2/TMSG1基因过表达后,A549细胞及裸鼠移植瘤中p38 MAPK及p-p38 MAPK蛋白的表达均显著升高($P<0.05$,图5A~F)。

2.6 ELISA方法检测人肺癌A549细胞及裸鼠移植瘤组织中神经酰胺、p38 MAPK蛋白的表达

结果显示,相比NC组,LASS2/TMSG1基因过表达后,A549细胞上清液及裸鼠移植瘤匀浆中神经酰胺含量和p38 MAPK蛋白浓度均显著升高($P<0.05$,图6A~D)。

3 讨论

肺癌的高发病率和死亡率严重威胁人类健康,早期及时有效的诊疗是抗击肺癌的关键,因而从分子及基因水平研究肺癌的发病机制,寻找新的分子标记物,探索新的治疗靶点,对于肺癌的诊疗具有重要意义。

LASS2/TMSG1基因作为一种新近发现的肿瘤转移抑制基因,对多种肿瘤具有抑制作用,并取得了一定的研究进展^[19,20]。以往研究发现,LASS2/TMSG1基因敲低后人前列腺癌PC-3M-2B4细胞的体外增殖能力明显增强,凋亡能力显著降低^[5],上调后可显著抑制人肝癌HCCLM3细胞的增殖转移能力^[21],在耐药的乳腺癌细

胞中过表达LASS2/TMSG1基因可以增加其化疗敏感性,促进乳腺癌细胞凋亡^[7],LASS2/TMSG1基因表达的下调能够增强膀胱癌EJ-M3细胞异种移植瘤的异质性,并促进体内肿瘤细胞的致瘤性和生长能力^[10]。本课题组前期研究发现LASS2/TMSG1基因在非小细胞肺癌组织中的表达与肿瘤分化和淋巴结转移呈负相关,且阳性表达患者的总生存期及无瘤生存期均明显长于其阴性表达患者;多因素Cox回归分析显示,LASS2/TMSG1基因是非小细胞肺癌患者的独立预后因素^[22]。另有学者表明,LASS2/TMSG1 mRNA的高表达与非小细胞肺癌患者的总生存期改善显著相关^[23]。但既往研究均未提及LASS2/TMSG1基因对人肺癌细胞增殖、凋亡的影响。因此,本实验着重研究LASS2/TMSG1基因过表达对人肺癌A549细胞体内、外增殖、凋亡的影响及相关机制。

通过平板克隆和CCK-8实验发现,LASS2/TMSG1基因过表达后人肺癌A549细胞体外生长增殖能力明显降低;采用Hoechst/PI双染和流式细胞术检测发现LASS2/TMSG1基因过表达后A549细胞的早期凋亡率显著增高。上述结果提示,LASS2/TMSG1基因在一定程度上可能影响了人肺癌A549细胞体外增殖及凋亡情况。进一步通过裸鼠体内成瘤实验,发现LASS2/TMSG1基因过表达对裸鼠移植瘤的生长具有一定的抑制作用,统计学结果不显著,可能与样本量较少、机体内致瘤机制复杂等因素相关。但LASS2/TMSG1基因过表达后裸鼠移植瘤组织的克隆形成数目显著降低,并且出现了更大更彻底的组织坏死灶,同时,移植瘤组织Ki67的阳性表达率也明显降低。由此我们认为LASS2/TMSG1基因可能具有降低肺癌细胞体内增殖能力和抑制肺癌恶性进程的作用。上述研究结果表明LASS2/TMSG1基因过表达后抑制了人肺癌A549细胞体内、外增殖能力,促进了肿瘤细胞凋亡,这与以往研究结果相符^[4,8]。

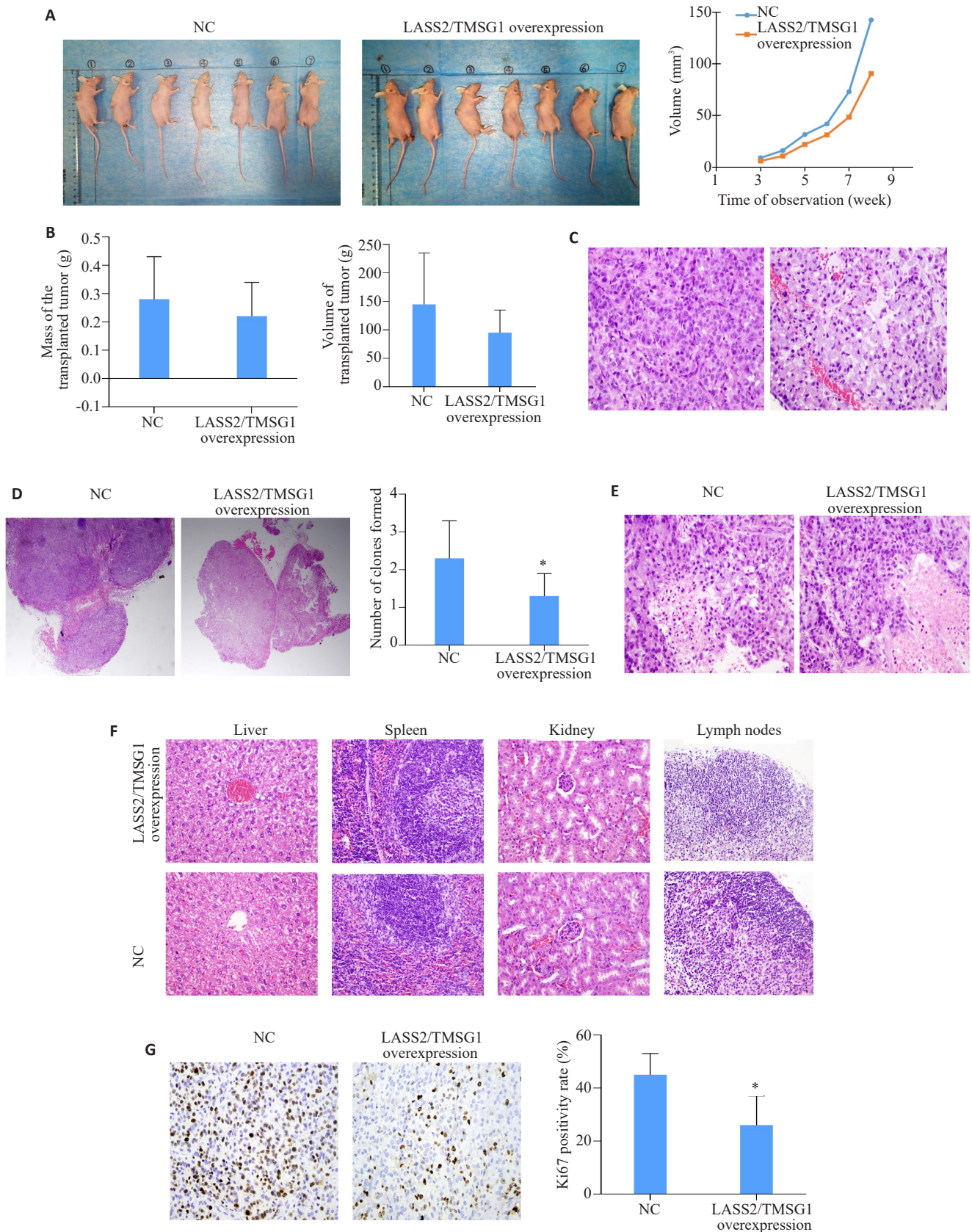


图4 LASS2/TMSG1 基因过表达对裸鼠移植瘤的影响

Fig.4 Effect of LASS2/TMSG1 gene overexpression on A549 cell-derived xenografts in nude mice. **A:** Morphology and volume growth of the transplanted tumors in nude mice ($n=7$). **B:** Comparison of mass and volume of the transplanted tumors between the 2 groups at 8 weeks ($n=7$, $*P<0.05$ vs NC). **C:** Pathological examination of the transplanted tumor (HE staining, $\times 400$). **D:** Pathological examination (HE staining, $\times 400$) and clone formation number in the transplanted tumors in the 2 groups ($n=7$, $*P<0.05$ vs NC). **E:** Microscopic observation of the necrotic foci in the transplanted tumor tissues in the 2 groups (HE staining, $\times 400$). **F:** Pathological examination of the liver, spleen, kidney and lymph nodes in the 2 groups of nude mice (HE staining, $\times 400$). **G:** Expression of Ki67 in the transplanted tumor tissues in the 2 groups ($n=7$, $*P<0.05$ vs NC, HE staining, $\times 400$).

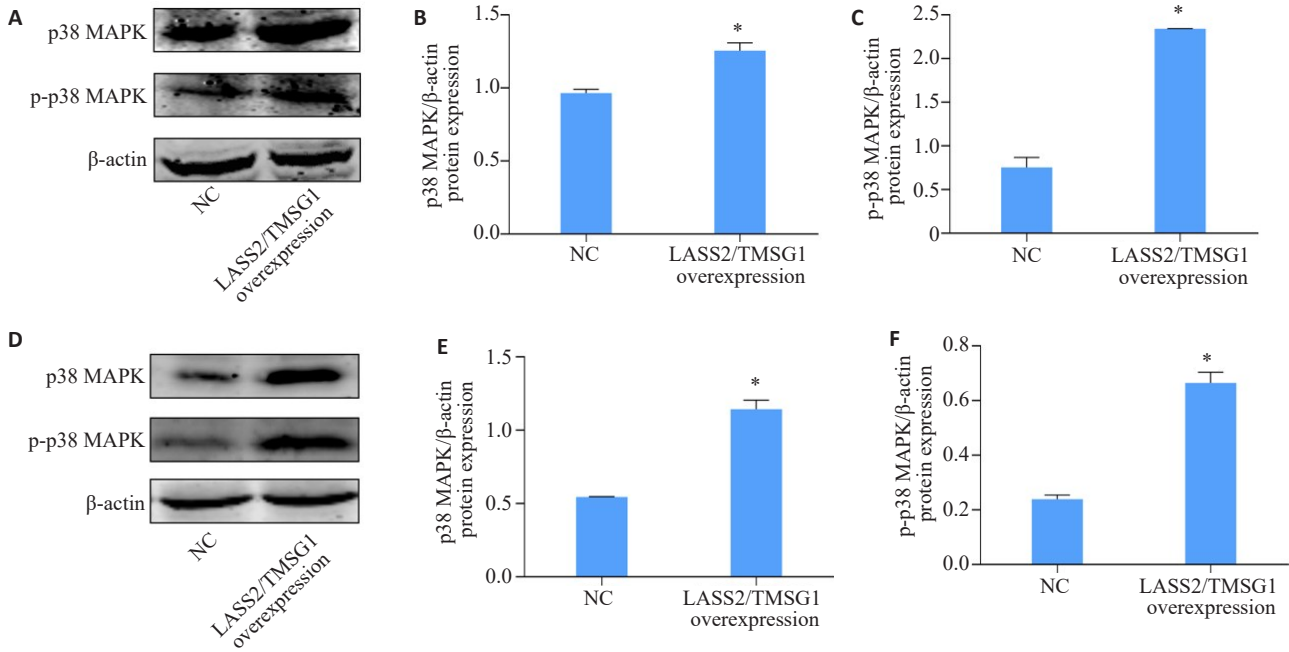


图5 LASS2/TMSG1 基因过表达对 A549 细胞及裸鼠移植瘤中 p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白表达的影响
 Fig.5 Effects of LASS2/TMSG1 gene overexpression on expression of p38 MAPK and p-p38 MAPK proteins in A549 cells and xenografts from nude mice. A-C: Overexpression of LASS2/TMSG1 increases expressions of p38 MAPK and p-p38 MAPK proteins in A549 cells (* P <0.05 vs NC). D-F: Overexpression of LASS2/TMSG1 in A549 cells increases expressions of p38 MAPK and p-p38 MAPK proteins in the xenografts in nude mice (n =7, * P <0.05 vs NC).

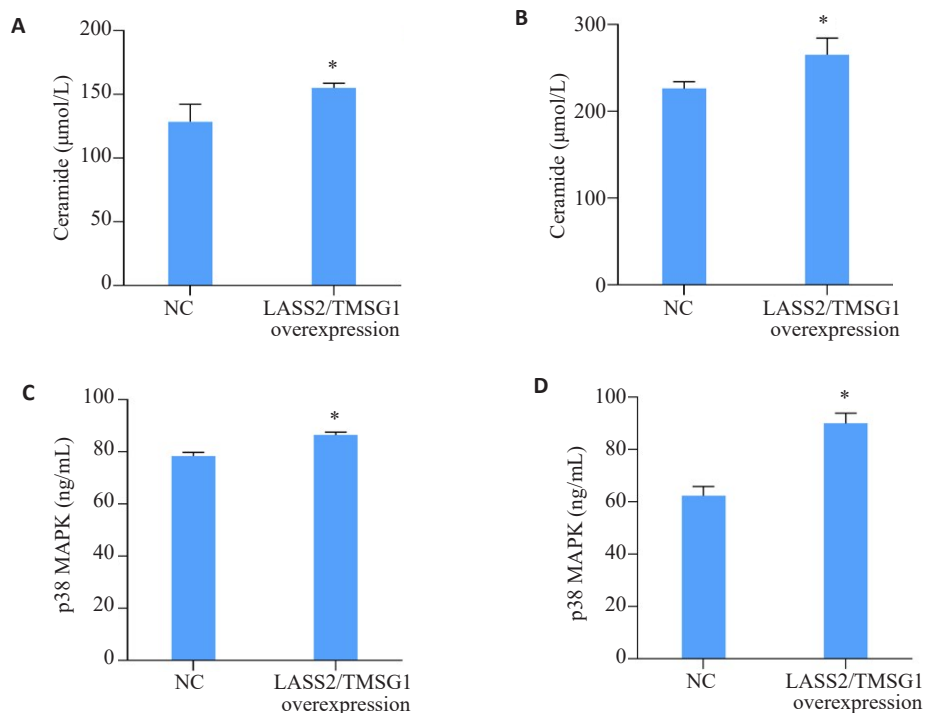


图6 LASS2/TMSG1 基因过表达对 A549 细胞及裸鼠移植瘤中神经酰胺、p38 MAPK 蛋白的影响
 Fig.6 Effects of LASS2/TMSG1 overexpression on expressions of ceramide and p38 MAPK protein in A549 cells and xenografts from nude mice. A: Overexpression of LASS2/TMSG1 gene increases ceramide content in A549 cell supernatant (* P <0.05 vs NC). B: Overexpression of LASS2/TMSG1 increases ceramide level in A549 cell-derived xenografts in nude mice (n =7, * P <0.05 vs NC). C: Overexpression of LASS2/TMSG1 gene increases p38 MAPK protein level in A549 cell supernatant (* P <0.05 vs NC). D: Overexpression of LASS2/TMSG1 increases p38 MAPK protein level in the xenografts in nude mice (n =7, * P <0.05 vs NC).

肿瘤的发生和发展是一个复杂的过程,往往涉及多种途径及信号通路的失衡,同样,抑癌基因发挥肿瘤抑制作用也是通过多种途径及信号通路来实现的。现有研究认为,LASS2/TMSG1基因主要有HOX和TLC两个保守功能域,其中HOX功能域通过与V-ATPase的C亚基直接结合来降低细胞外氢离子浓度,调节肿瘤微环境而发挥肿瘤抑制作用^[24,25];TLC功能域主要催化神经酰胺的特异性合成,通过调节神经酰胺的合成而发挥生物学功能^[26]。肿瘤细胞中神经酰胺的积累能够诱发细胞凋亡、阻滞细胞周期进而抑制细胞增殖^[11]。本研究结果表明,LASS2/TMSG1基因过表达后A549细胞上清液和裸鼠移植瘤组织中神经酰胺的浓度均显著升高,因此,上调神经酰胺的合成可能是LASS2/TMSG1基因发挥促凋亡、抑增殖的作用途径之一。作为第二信使,神经酰胺可以通过多种途径在细胞的分化、增殖、凋亡、衰老等过程中产生影响,其中一条重要的途径就是它可以抑制细胞内的增生信号,通过丝裂原活化蛋白激酶家族(MAPKs)来影响细胞的生存情况。MAPKs家族主要包括3个成员:ERK、JNK和p38 MAPK。神经酰胺可引起ERK去磷酸化,诱导p38 MAPK和JNK磷酸化^[16]。韦小彤等^[27]发现激活MAPKs信号通路中的p38 MAPK信号分子,可抑制SMMC-7721细胞增殖,并启动细胞内caspase信号级联最终诱发凋亡。相反,王子谦等^[28]发现阻断了p38 MAPK通路后能够部分逆转胃癌细胞的凋亡。而刘惠莉等^[17]应用骨膜素抑制p38 MAPK信号通路的激活后,发现人牙周膜成纤维细胞凋亡受到明显抑制,并且促进了细胞的增殖。这启示我们,p38 MAPK信号分子对于细胞增殖和凋亡具有重要影响,那么LASS2/TMSG1基因是否也通过调节p38 MAPK蛋白而发挥肿瘤抑制作用呢?本研究中经Western blot检测发现LASS2/TMSG1基因过表达后,A549细胞、裸鼠移植瘤组织中p38 MAPK和p-p38 MAPK蛋白表达均显著升高,且ELISA法分析发现A549细胞上清液和裸鼠移植瘤组织中p38 MAPK蛋白含量也显著增高,共同说明LASS2/TMSG1基因过表达后上调了p38 MAPK的合成与分泌。总而言之,结合前期研究结果,我们推测LASS2/TMSG1基因过表达后上调了神经酰胺的表达水平,在神经酰胺积累的基础上可能增加了p38 MAPK的合成与分泌,进而启动级联信号传导通路而诱发肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖。

综上所述,我们的研究表明,作为一种肿瘤转移抑制基因,LASS2/TMSG1基因过表达后可以显著抑制人肺癌A549细胞体内、外的增殖能力,抑制肿瘤恶性进程,促进肿瘤细胞早期凋亡,这可能与LASS2/TMSG1基因过表达后上调了神经酰胺的表达水平有关;并且,在神经酰胺积累的基础上可能进一步促进了p38

MAPK的合成与分泌,最终起到抑增殖、促凋亡的肿瘤抑制作用。该研究结果提示LASS2/TMSG1基因有望成为肺癌的一个新的作用靶点,对肺癌的临床诊治及预后可能具有积极指导作用。

参考文献:

- [1] Jacob, Sands, MD, et al. Lung screening benefits and challenges: a review of the data and outline for implementation [J]. *J Thorac Oncol*, 2021, 16(1): 37-53.
- [2] Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer [J]. *Nature*, 2018, 553(7689): 446-54.
- [3] Li MY, Liu LZ, Dong M. Progress on pivotal role and application of exosome in lung cancer carcinogenesis, diagnosis, therapy and prognosis [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 22.
- [4] Zeng F, Huang LL, Cheng XM, et al. Overexpression of LASS2 inhibits proliferation and causes G0/G1 cell cycle arrest in papillary thyroid cancer [J]. *Cancer Cell Int*, 2018, 18(7): 151.
- [5] Xu XY, Liu BY, Zou PC, et al. Silencing of LASS2/TMSG1 enhances invasion and metastasis capacity of prostate cancer cell [J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115(4): 731-43.
- [6] Wang HF, Zuo YG, Ding MX, et al. LASS2 inhibits growth and invasion of bladder cancer by regulating ATPase activity [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(2): 661-8.
- [7] Fan S, Niu Y, Tan N, et al. LASS2 enhances chemosensitivity of breast cancer by counteracting acidic tumor microenvironment through inhibiting activity of V-ATPase proton pump [J]. *Oncogene*, 2013, 32(13): 1682-90.
- [8] Yang Y, Yang XL, Li L, et al. LASS2 inhibits proliferation and induces apoptosis in HepG2 cells by affecting mitochondrial dynamics, the cell cycle and the nuclear factor- κ B pathways [J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(5): 3005-14.
- [9] Zhao WJ, Fan YP, Ou GY, et al. LASS2 impairs proliferation of glioma stem cells and migration and invasion of glioma cells mainly via inhibition of EMT and apoptosis promotion [J]. *J Cancer*, 2022, 13(7): 2281-92.
- [10] Chen YJ, Wang HF, Xiong T, et al. The role of LASS2 in regulating bladder cancer cell tumorigenicity in a nude mouse model [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(5): 5149-56.
- [11] Ponnusamy S, Meyers-Needham M, Senkal CE, et al. Sphingolipids and cancer: ceramide and sphingosine-1-phosphate in the regulation of cell death and drug resistance [J]. *Future Oncol*, 2010, 6(10): 1603-24.
- [12] Ogretmen B. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(1): 33-50.
- [13] Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(8): 604-16.
- [14] Zhang KG, Wu R, Mei F, et al. Phosphorylated LASS2 inhibits prostate carcinogenesis via negative regulation of Wnt/ β -catenin signaling [J]. *J Cell Biochem*, 2021, 86(7): 740-7.
- [15] Su J, Yu WJ, Gong MZ, et al. Overexpression of a novel tumor metastasis suppressor gene TMSG1/LASS2 induces apoptosis via a caspase-dependent mitochondrial pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(7): 1310-7.

- [16] Chen CL, Lin CF, Chang WT, et al. Ceramide induces p38 MAPK and JNK activation through a mechanism involving a thioredoxin-interacting protein-mediated pathway[J]. *Blood*, 2008, 111(8): 4365-74.
- [17] 刘惠莉, 王一丹, 岳阳丽, 等. 骨膜素通过p38 MAPK信号通路抑制缺氧诱导的人牙周膜成纤维细胞的氧化应激和细胞凋亡[J]. *南方医科大学学报*, 2020, 40(7): 942-8.
- [18] Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(8): 537-49.
- [19] 张宽根, 周雨禾, 邵雅昆, 等. 肿瘤转移抑制基因 LASS2/TMSG1 S248A 突变体通过增加 ATP6V0C 表达促进前列腺癌的侵袭[J]. *北京大学学报: 医学版*, 2019, 51(2): 210-20.
- [20] 王 侨, 栾 婷, 王剑松, 等. LASS2 基因对恶性肿瘤作用机制研究进展[J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(12): 2020-4.
- [21] 唐 宁, 金 洁, 邓 云, 等. 人源性长寿保障基因 2 通过与 V-ATPase 作用抑制肝癌细胞的生长[J]. *生理学报*, 2010, 62(3): 196-202.
- [22] 赵挺祺, 李时荣, 王静媛, 等. 非小细胞肺癌中 LASS2/TMSG1 的表达及其临床意义[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2020, 36(3): 323-5.
- [23] Qian HJ, Deng JJ, Lu C, et al. Ceramide synthases: insights into the expression and prognosis of lung cancer[J]. *Exp Lung Res*, 2021, 47(1): 37-53.
- [24] Wang YM, Li SR, Weng LX, et al. LASS2 overexpression enhances early apoptosis of lung cancer cells through the caspase-dependent pathway[J]. *Oncol Rep*, 2022, 48(6): 220.
- [25] Yu WJ, Wang LM, Wang YW, et al. A novel tumor metastasis suppressor gene LASS2/TMSG1 interacts with vacuolar ATPase through its homeodomain[J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(3): 570-83.
- [26] 毕会娥. 神经酰胺—内质网应激-AMPK 在视网膜色素上皮细胞凋亡中的作用及机制研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2014.
- [27] 韦小彤, 彭文蕊, 姜 琦, 等. 白杨素通过调控 MAPKs 信号通路促进 SMMC-7721 细胞凋亡[J]. *南方医科大学学报*, 2018, 38(10): 1187-94.
- [28] 王子谦, 陶 红, 马云飞, 等. 芦荟苷通过调控 MAPKs 信号通路诱导胃癌细胞凋亡[J]. *南方医科大学学报*, 2018, 38(9): 1025-31.

(编辑:孙昌朋)