

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.14.006

SPARCL1 通过 MEK/ERK 信号通路调节非小细胞肺癌细胞的增殖、凋亡和侵袭 *

李永杰 李 富[△] 周 源 卜晓鹏 廖仲恺

(海南医学院第二附属医院胸外科 海南 海口 570100)

摘要 目的:分析富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白类似蛋白 1(SPARCL1)对非小细胞肺癌(NSCLC)细胞增殖、凋亡、侵袭的影响,并探讨分裂原活化抑制剂(MEK)/细胞外调节蛋白激酶(ERK)通路在其中发挥的作用。**方法:**收集 2019 年 9 月~2021 年 6 月期间本院接受手术治疗的 84 例 NSCLC 患者癌组织与相应癌旁组织,实时定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)法测定并比较各组织以及正常肺上皮细胞 HBEpC、NSCLC 细胞 A549、HCC827、H1299、H292 中 SPARCL1 信使 RNA(mRNA)表达水平,选取 A549、HCC827 培养并分组,分为对照组、NC siRNA 组、SPARCL1 siRNA 组、U0126 组(MEK/ERK 特异性抑制剂)、SPARCL1 siRNA 加 U0126 组,细胞计数法(CCK8)以及平板克隆法测定 A549、HCC827 细胞增殖,流式细胞仪测定 A549、HCC827 细胞凋亡,Transwell 小室法测定 A549、HCC827 细胞侵袭能力,蛋白质印迹法(western blot)检测 SPARCL1、p-MEK、MEK、p-ERK1/2、ERK1/2 蛋白表达。**结果:**SPARCL1 在 NSCLC 组织中 mRNA 表达水平低于癌旁组织($P<0.05$);与 HBEpC 细胞相比,NSCLC 细胞 A549、HCC827、H1299、H292 细胞中 SPARCL1 mRNA 表达水平降低($P<0.05$);与对照组相比,SPARCL1 siRNA 组 A549、HCC827 细胞 SPARCL1 mRNA 表达水平与蛋白表达、凋亡率降低($P<0.05$),OD₄₅₀、克隆形成数、侵袭细胞数、p-MEK/MEK、p-ERK1/2/ERK1/2 蛋白表达升高($P<0.05$),U0126 组 A549、HCC827 细胞 SPARCL1 mRNA 表达水平与蛋白表达、凋亡率升高($P<0.05$),OD₄₅₀、克隆形成数、侵袭细胞数、p-MEK/MEK、p-ERK1/2/ERK1/2 蛋白表达降低($P<0.05$);与 SPARCL1 siRNA 组相比,SPARCL1 siRNA 加 U0126 组 A549、HCC827 细胞 SPARCL1 mRNA 表达水平与蛋白表达、凋亡率升高($P<0.05$),OD₄₅₀、克隆形成数、侵袭细胞数、p-MEK/MEK、p-ERK1/2/ERK1/2 蛋白表达降低($P<0.05$)。**结论:**SPARCL1 可能通过调控 MEK/ERK 通路影响 NSCLC A549、HCC827 细胞增殖、侵袭与凋亡。

关键词:SPARCL1;MEK/ERK 信号通路;非小细胞肺癌;增殖;凋亡;侵袭

中图分类号:R-33;R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)14-2632-07

SPARCL1 Regulates Proliferation, Apoptosis and Invasion of Non-Small Cell Lung Cancer Cells through MEK/ERK Signaling Pathway*

LI Yong-jie, LI Fu[△], ZHOU Yuan, BU Xiao-peng, LIAO Zhong-kai

(Department of Thoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan, 570100, China)

ABSTRACT Objective: To analyze the influences of secreted protein acidic and rich in cysteines-like protein 1 (SPARCL1) on the proliferation, apoptosis and invasion of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells, and to explore the role of Mitogen activation inhibitor (MEK) / Extracellular regulated protein kinase (ERK) pathway in it. **Methods:** From September 2019 to June 2021, the cancer tissues and corresponding adjacent tissues of 84 NSCLC patients who received surgical treatment in our hospital were collected, real time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) method was applied to measure and compare the expression level of SPARCL1 messenger RNA (mRNA) in tissues and normal lung epithelial cells HBEpC and NSCLC cells A549, HCC827, H1299 and H292. A549 and HCC827 were selected for culture and grouping, they were divided into control group, NC siRNA group, SPARCL1 siRNA group, U0126 group (MEK/ERK specific inhibitor), and SPARCL1 siRNA plus U0126 group. Cell counting kit 8 (CCK8) method and the plate cloning method were used to measure the proliferation of A549 and HCC827 cells, flow cytometry was applied to determine the apoptosis of A549 and HCC827 cells, Transwell chamber method was applied to determine the invasive ability of A549 and HCC827 cells, Western blot was applied to detect the protein expression of SPARCL1, p-MEK, MEK, p-ERK1/2, ERK1/2. **Results:** The SPARCL1 mRNA expression level in NSCLC tissues was lower than that in adjacent tissues ($P<0.05$). Compared with HBEpC cells, the SPARCL1 mRNA expression level in NSCLC cells A549, HCC827, H1299 and H292 cells decreased ($P<0.05$). Compared with the control group, the SPARCL1 mRNA expression level, protein expression and apoptosis rate of A549 and HCC827 cells in SPARCL1 siRNA group decreased ($P<0.05$), the OD₄₅₀, number of colonies formed, number of invasive cells, p-MEK/MEK, and p-ERK1/2/ERK1/2 protein

* 基金项目:海南省卫生健康行业科研项目(21A200264)

作者简介:李永杰(1985-),男,硕士,主治医师,从事肺癌的临床及基础研究工作,E-mail: lyj3698521@126.com

[△] 通讯作者:李富(1979-),男,本科,副主任医师,从事肺癌的临床及基础研究工作,E-mail: 492437003@qq.com

(收稿日期:2023-01-28 接受日期:2023-02-23)

expression increased ($P<0.05$), the SPARCL1 mRNA expression level, protein expression and apoptosis rate of A549 and HCC827 cells in the U0126 group increased ($P<0.05$), the OD₄₅₀, number of colonies formed, number of invasive cells, p-MEK/MEK, and p-ERK1/2/ERK1/2 protein expression decreased($P<0.05$). Compared with the SPARCL1 siRNA group, the SPARCL1 mRNA expression level, protein expression and apoptosis rate of A549 and HCC827 cells in SPARCL1 siRNA plus U0126 group increased ($P<0.05$), the OD₄₅₀, number of colonies formed, number of invasive cells, p-MEK/MEK, and p-ERK1/2/ERK1/2 protein expression decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** SPARCL1 may affect the proliferation, invasion and apoptosis of A549 and HCC827 cells by regulating MEK/ERK pathway.

Key words: PARCL1; MEK/ERK signaling pathway; Non-small cell lung cancer; Proliferation; Qpoptosis; Invasion

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)14-2632-07

前言

非小细胞肺癌(NSCLC)约占肺癌的 80%,与吸烟、环境、辐射等因素有关,约四分之三左右患者发现时即为中晚期,5年内预后较差^[1-3]。随着医学的发展,分子靶向治疗使患者受益的可能性增加,分子靶向药物为患者生存期的延长提供了可能^[4]。因此,从分子层面分析 NSCLC 生物学特性并寻找 NSCLC 治疗靶向药物成为研究重点。富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白类似蛋白 1(SPARCL1)是可分泌至细胞外基质的功能蛋白,在多种恶性肿瘤中发挥抑癌作用^[5],在 NSCLC 中 SPARCL1 表达下降^[6],但关于其在 NSCLC 中下调的机制尚不清楚。分裂原活化抑制剂(MEK)/细胞外调节蛋白激酶(ERK)是经典肿瘤发展通路,在多种恶性肿瘤中均可见此通路激活^[7,8]。Liang Y^[9]等人的实验研究指出人参皂苷 Rg3 通过对 MEK/ERK 通路进行调控抑制肺癌细胞的恶性化生物进程。SPARCL1 能否通过影响 MEK/ERK 通路的激活情况改善 NSCLC 的恶性化进程将是本实验的研究重点,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

MEK/ERK 选择性抑制剂 U0126 购自 MCE 公司;

HBEPiC、A549、HCC827、H1299、H292 细胞购自南京科佰生物科技有限公司;ECL 化学发光试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;SPARCL1、p-MEK、MEK、p-ERK1/2、ERK1/2、GAPDH 兔抗、羊抗兔二抗购自美国 abcam 公司。PCR 仪购自赛默飞世尔科技公司;流式细胞仪购自上海优宁维生物科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 临床 NSCLC 癌组织与癌旁组织 SPARCL1 信使 RNA (mRNA) 测定 收集 2019 年 9 月~2021 年 6 月期间我院接受手术治疗的 84 例 NSCLC 患者癌组织与相应癌旁组织,石蜡包埋。纳入标准:① 均符合《原发性肺癌诊疗规范》(2015 年版)中关于 NSCLC 诊断标准^[10];② TNM 分期为 I 期~III 期;③ 首次确诊;④ 预计生存时间>6 个月;⑤ 临床资料完整。排除标准:① 术前曾接受放、化疗患者;② 合并其它恶性肿瘤家族遗传史;③ 合并其它恶性肿瘤疾病;④ 昏迷或意识不清晰患者。本研究患者或家属知情并同意,本研究经我院伦理委员会审核并批准。通过 TRIzol 试剂提取癌组织与癌旁组织石蜡标本总 RNA,取一定量 RNA 进行逆转录为 cDNA,通过试剂盒进行扩增,程序设定为 95℃ 预处理 2 min, (95℃ 10 s, 55℃ 15 s, 72℃ 10 s) × 40 次,通过 2^{-ΔΔCt} 法来评估 SPARCL1 mRNA 表达量。引物见表 1。

表 1 SPARCL1 及内参引物序列

Table 1 SPARCL1 and internal reference primer sequence

Gene	Forward primer 5'-- 3'	Reverse primer 5'-- 3'
SPARCL1 mRNA	CAACTGCTGAAACGGTAGCA	GAAGTCTTGCCCTGTTCTGC
GAPDH	CCTGCCGTCTAGAAAAACCTG	AGTGGGTGTCGCTGTTGAAAGT

1.2.2 细胞培养及分组 将 HBEPiC、A549、HCC827、H1299、H292 细胞常规培养于培养箱内,参照 1.2.1 方法测定细胞 SPARCL1 mRNA 表达情况。选取 A549、HCC827 细胞作为研究细胞,分为对照组、NC siRNA 组(转染 NC siRNA)、SPARCL1 siRNA 组(转染 SPARCL1 siRNA)、U0126 组(培养基内添加 2 μmol/L U0126)、SPARCL1 siRNA 加 U0126 组(转染 SPARCL1 siRNA,并于培养基内添加 2 μmol/L U0126)。

1.2.3 实时定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)法测定 A549、HCC827 细胞 SPARCL1 mRNA 表达情况 提取各组 A549、HCC827 细胞总 RNA,参照 1.2.1 方法测定 A549、HCC827 细胞中 SPARCL1 mRNA 表达。

1.2.4 细胞计数法(CCK8)法以及平板克隆法测定细胞增殖 按照 1.2.2 分组情况,将各组 A549、HCC827 细胞接种于 96 孔板(2×10⁴/孔),培养 48 h 后加入 10 μL CCK-8/孔,继续培养 2 h 后,测定 450 nm 处吸光度,即 OD₄₅₀。将对数期细胞悬浮培养并梯度稀释,按照每皿 200 个细胞接种,均匀分散细胞。培养 2~3 周,待当培养皿中出现肉眼可见的克隆时,终止培养。弃去上清液,甲醛固定细胞 5 mL 固定 15 分钟。然后去固定液,加适量 GIEMSA 应用染色液染 10~30 分钟,然后用流水缓慢洗去染色液,空气干燥。将平皿倒置并叠加一张带网格的透明胶片,在显微镜(低倍镜)计数大于 10 个细胞的克隆数。

1.2.5 流式细胞仪测定细胞凋亡 将细胞重悬至浓度为 5.0×

10^5 个/mL,取 100 μ L 细胞添加 5 μ L V-FITC 和 10 μ L PI,上流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.6 细胞侵袭能力检测 Transwell 小室预先加入 Matrigel, 固化 3 h 后, 添加 5×10^4 孔 A549、HCC827 细胞。下室加入 500 μ L DMEM 培养基, 孵育 48 h, 多聚甲醛固定(4%)A549、HCC827 细胞, 结晶紫(0.1%)染色, 挑选 5 个视野光学显微镜观察。

1.2.7 蛋白质印迹法(western blot)检测蛋白表达 裂解各组细胞, 提取细胞中内总蛋白。蛋白定量后上样蛋白, SDS-PAGE 凝胶电泳分离。转至 PVDF 膜, 5%脱脂牛奶封闭 2 h。添加一抗 SPARCL1 (1:1000)、p-MEK (1:2000)、MEK (1:2000)、p-ERK1/2(1:1000)、ERK1/2(1:1000)、GAPDH(内参, 1:5000) 4℃孵育过夜, 添加二抗(1:5000)并室温孵育 1 h。使用 ECL 化学发光试剂盒对膜进行显影。使用 ImageJ 软件分析蛋白条带的灰度值。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 25.0 进行统计分析, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较使用 t 检验, 单因素方差分析用于多组间的比较, 进一步两两比较则采用 snk-q 检验。 $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC 组织以及细胞中的 SPARCL1 表达

SPARCL1 在 NSCLC 组织中 mRNA 表达水平低于癌旁组织 ($P < 0.05$); 与 HBEpiC 细胞相比, NSCLC 细胞 A549、HCC827、H1299、H292 细胞中 SPARCL1 mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$), 选择 SPARCL1 mRNA 表达相对低的 A549 与 HCC827 细胞作为后续研究细胞。见表 2、表 3。

2.2 各组细胞 SPARCL1 表达情况

与对照组相比, NC siRNA 组 A549、HCC827 细胞 SPARCL1 mRNA 表达水平与蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), SPARCL1 siRNA 组 A549、HCC827 细胞 SPARCL1 mRNA

表达水平与蛋白表达降低 ($P < 0.05$), U0126 组 A549、HCC827 细胞 SPARCL1 mRNA 表达水平与蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 与 SPARCL1 siRNA 组相比, SPARCL1 siRNA 加 U0126 组 A549、HCC827 细胞 SPARCL1 mRNA 表达水平与蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。见表 4、图 1。

表 2 NSCLC 组织与癌旁组织中 SPARCL1 mRNA 表达水平表达 ($\bar{x} \pm s, n=84$)

Table 2 The expression level of SPARCL1 mRNA in NSCLC tissues and adjacent tissues ($\bar{x} \pm s, n=84$)

Groups	SPARCL1
Paracancerous tissue	1.00 $\pm$ 0.00
NSCLC tissue	0.28 $\pm$ 0.04
t	164.973
P	0.000

表 3 SPARCL1 mRNA 在正常细胞系与不同 NSCLC 细胞系中的表达 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Expression of SPARCL1 mRNA in normal cell lines and different NSCLC cell lines($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	SPARCL1 mRNA
HBEpiC cells	1.00 $\pm$ 0.00
A549 cells	0.25 $\pm$ 0.01 ^a
HCC827 cells	0.27 $\pm$ 0.02 ^a
H1299 cells	0.43 $\pm$ 0.03 ^a
H292 cells	0.51 $\pm$ 0.05 ^a
F	711.692
P	<0.001

Note: compared with HBEpiC cells, ^a $P < 0.05$.

表 4 各组 A549、HCC827 细胞 SPARCL1 表达情况($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 SPARCL1 expression of A549 and HCC827 cells in each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	A549		HCC827	
	SPARCL1 mRNA	SPARCL1 protein	SPARCL1 mRNA	SPARCL1 protein
Control group	1.01 $\pm$ 0.02	0.62 $\pm$ 0.06	1.02 $\pm$ 0.12	0.91 $\pm$ 0.11
NC siRNA group	0.99 $\pm$ 0.02	0.59 $\pm$ 0.05	1.01 $\pm$ 0.12	0.92 $\pm$ 0.11
SPARCL1 siRNA group	0.25 $\pm$ 0.02 ^a	0.30 $\pm$ 0.02 ^a	0.37 $\pm$ 0.04 ^a	0.28 $\pm$ 0.03 ^a
U0126 group	1.24 $\pm$ 0.11 ^a	0.97 $\pm$ 0.09 ^a	1.31 $\pm$ 0.12 ^a	1.26 $\pm$ 0.11 ^a
SPARCL1 siRNA plus U0126 group	0.43 $\pm$ 0.03 ^b	0.52 $\pm$ 0.09 ^b	0.59 $\pm$ 0.07 ^b	0.49 $\pm$ 0.06 ^b
F	376.014	77.246	85.050	110.419
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Note: Compared with the control group, ^a $P < 0.05$; compared with SPARCL1 siRNA group, ^b $P < 0.05$.

2.3 各组细胞增殖能力比较

与对照组相比, A549、HCC827 细胞 NC siRNA 组 OD₄₅₀、克隆形成数差异无统计学意义 ($P > 0.05$), SPARCL1 siRNA 组

OD₄₅₀、克隆形成数升高 ($P < 0.05$), U0126 组 OD₄₅₀、克隆形成数降低 ($P < 0.05$); 与 SPARCL1 siRNA 组相比, SPARCL1 siRNA 加 U0126 组 OD₄₅₀、克隆形成数降低 ($P < 0.05$)。见表 5、图 2。

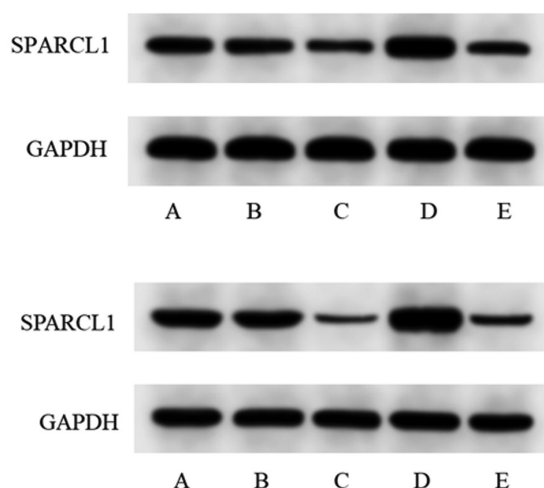


图1 各组 A549 细胞(上图)、HCC827 细胞(下图)SPARCL1 蛋白表达 Western blot 图

Fig.1 Western blot of SPARCL1 protein expression in A549 cells (upper) and HCC827 cells (lower) in each group

Note: A: control group; B:NC siRNA group; C: SPARCL1 siRNA group; D: U0126 group; E: SPARCL1 siRNA plus U0126 group.

2.4 各组细胞凋亡能力比较

与对照组相比,A549、HCC827 细胞 NC siRNA 组凋亡率差异无统计学意义($P>0.05$),SPARCL1 siRNA 组凋亡率降低($P<0.05$),U0126 组凋亡率升高($P<0.05$);与 SPARCL1 siRNA 组相比,SPARCL1 siRNA 加 U0126 组凋亡率升高($P<0.05$)。见表 6、图 3。

2.5 各组细胞侵袭能力比较

与对照组相比,A549、HCC827 细胞 NC siRNA 组侵袭细胞数差异无统计学意义($P>0.05$),SPARCL1 siRNA 组侵袭细胞数升高($P<0.05$),U0126 组侵袭细胞数降低($P<0.05$);与 SPARCL1 siRNA 组相比,SPARCL1 siRNA 加 U0126 组侵袭细胞数降低($P<0.05$)。见表 7、图 4。

2.6 各组细胞 MEK/ERK 通路相关蛋白表达比较

与对照组相比,A549、HCC827 细胞 NC siRNA 组 p-MEK/MEK、p-ERK1/2/ERK1/2 蛋白表达比较差异无统计学意义($P>0.05$),SPARCL1 siRNA 组 p-MEK/MEK、p-ERK1/2/ERK1/2 蛋白表达升高($P<0.05$),U0126 组 p-MEK/MEK、p-ERK1/2/ERK1/2 蛋白表达降低($P<0.05$);与 SPARCL1 siRNA 组相比,SPARCL1 siRNA 加 U0126 组 p-MEK/MEK、p-ERK1/2/ERK1/2 蛋白表达降低($P<0.05$)。见表 8、图 5。

表 5 A549、HCC827 细胞各组 OD₄₅₀ 和克隆形成数比较($\bar{x} \pm s$, n=6)

Table 5 Comparison of OD₄₅₀ and clonogenic number of A549 and HCC827 cells in each group($\bar{x} \pm s$, n=6)

Groups	OD ₄₅₀		Number of clones	
	A549	HCC827	A549	HCC827
Control group	1.19± 0.13	0.94± 0.11	42.81± 5.35	77.86± 9.73
NC siRNA group	1.21± 0.10	0.95± 0.02	44.76± 5.59	76.94± 9.61
SPARCL1 siRNA group	1.94± 0.18 ^a	1.59± 0.19 ^a	94.85± 11.95 ^a	128.59± 16.07 ^a
U0126 group	0.82± 0.08 ^a	0.38± 0.04 ^a	21.39± 2.66 ^a	39.76± 4.95 ^a
SPARCL1 siRNA plus U0126 group	1.51± 0.15 ^b	1.03± 0.12 ^b	55.82± 6.97 ^b	99.82± 12.47 ^b
F	59.397	85.574	84.907	51.355
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Note: Compared with the control group, ^a $P<0.05$; compared with SPARCL1 siRNA group, ^b $P<0.05$.

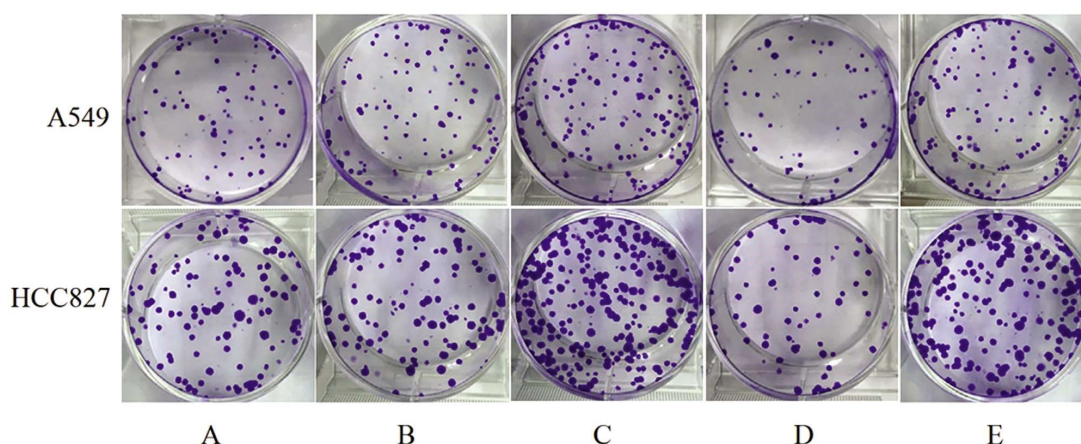


图2 A549、HCC827 细胞各组平板克隆图

Fig.2 Plate cloning of A549 and HCC827 cells in each group

Note: A: control group; B:NC siRNA group; C: SPARCL1 siRNA group; D: U0126 group; E: SPARCL1 siRNA plus U0126 group.

表 6 A549、HCC827 细胞各组凋亡率比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Comparison of apoptosis rates of A549 and HCC827 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	Apoptosis rate(%)	
	A549	HCC827
Control group	21.35± 2.66	16.57± 2.07
NC siRNA group	20.76± 2.59	17.21± 2.15
SPARCL1 siRNA group	8.72± 1.09 ^a	9.17± 1.14 ^a
U0126 group	25.82± 3.22 ^a	22.39± 2.79 ^a
SPARCL1 siRNA plus U0126 group	14.91± 1.86 ^b	12.86± 1.60 ^b
F	45.618	35.940
P	<0.001	<0.001

Note: Compared with the control group, ^a $P<0.05$ compared with SPARCL1 siRNA group, ^b $P<0.05$.

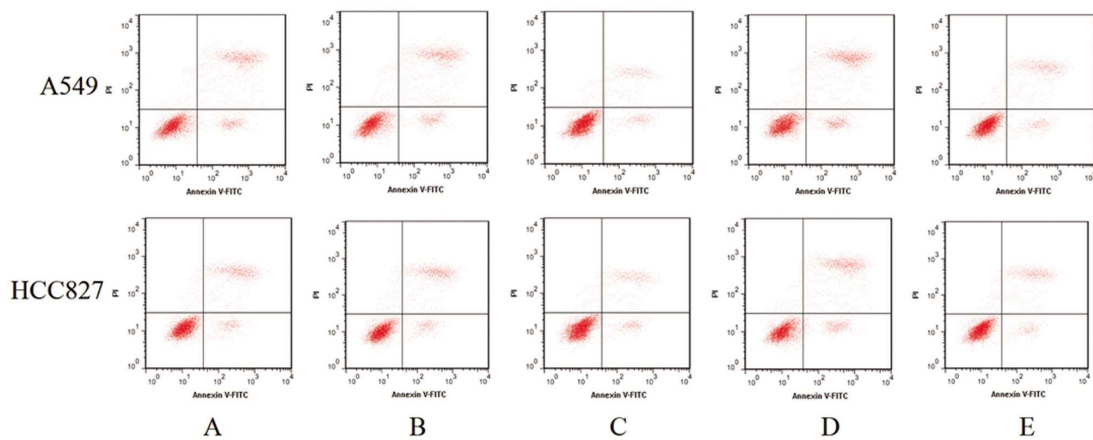


图 3 A549、HCC827 细胞各组流式细胞图

Fig.3 Flow cytometry of A549 and HCC827 cells in each group

Note: A: control group; B:NC siRNA group; C: SPARCL1 siRNA group; D: U0126 group; E: SPARCL1 siRNA plus U0126 group.

表 7 A549、HCC827 细胞各组侵袭细胞数比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 7 Comparison of invasive cell numbers of A549 and HCC827 cells in each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	Number of invasive cells	
	A549	HCC827
Control group	195.77± 24.47	217.52± 27.19
NC siRNA group	184.39± 23.04	220.80± 27.60
SPARCL1 siRNA group	249.83± 31.22 ^a	332.55± 41.56 ^a
U0126 group	118.59± 14.82 ^a	104.38± 13.06 ^a
SPARCL1 siRNA plus U0126 group	200.94± 25.12 ^b	195.72± 24.46 ^b
F	22.496	49.654
P	<0.001	<0.001

Note: Compared with the control group, ^a $P<0.05$; compared with SPARCL1 siRNA group, ^b $P<0.05$.

3 讨论

NSCLC 属于肺癌的主要类型,患者预后较差。随着分子靶向治疗的发展,为 NSCLC 患者延长生存期提供了可能^[11]。从分子层面探究 NSCLC 相关因子对 NSCLC 的预后改善有重要意义。SPARCL1 属于 SPARC 家族成员,基因定位于人染色体 4q

22-25,此区域在多种癌症中表达缺失^[12]。SPARCL1 基因可广泛表达于人体各种组织,在表观遗传修饰下在多种癌症中表达下调。Bawazeer 等^[13]通过分析 SPARCL 位点 rs3210714 以及 rs7719521 基因多态性与 VEGF 的相关性,发现 SPARCL 基因多态性在乳腺癌中发挥重要作用;Regensburger 等^[14]研究通过体内与体外实验验证了 SPARCL 可对抗结肠炎模型血管通

透性与炎症。王进等^[15]通过数据库收集肺组织 DNA 甲基化情况分析得知 SPARCL1 在肺腺癌中有高度甲基化的 CPG 位点,

认为该基因可能作为肿瘤抑制因子发挥作用,但其是否可作为肺腺癌治疗药物的靶点或诊断标志物,有待进一步研究。

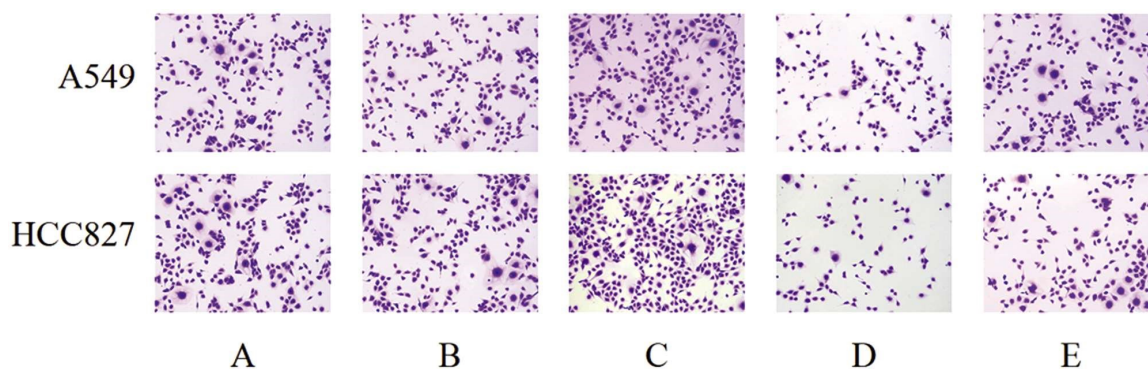


图4 A549、HCC827 细胞各组侵袭细胞图

Fig.4 Invasive cell diagram of A549 and HCC827 cells in each group

Note: A: control group; B: NC siRNA group; C: SPARCL1 siRNA group; D: U0126 group; E: SPARCL1 siRNA plus U0126 group.

表 8 A549、HCC827 细胞各组 MEK/ERK 通路相关蛋白比较($\bar{x} \pm s$, n=6)

Table 8 Comparison of MEK/ERK pathway related proteins in A549 and HCC827 cells($\bar{x} \pm s$, n=6)

Groups	A549 HCC827			
	p-MEK/MEK	p-ERK1/2/ERK1/2	p-MEK/MEK	p-ERK1/2/ERK1/2
Control group	0.85± 0.11	1.12± 0.14	0.62± 0.07	0.57± 0.07
NC siRNA group	0.86± 0.10	1.11± 0.13	0.61± 0.07	0.59± 0.07
SPARCL1 siRNA group	1.59± 0.19 ^a	1.78± 0.22 ^a	1.32± 0.16 ^a	0.98± 0.12 ^a
U0126 group	0.35± 0.04 ^a	0.42± 0.05 ^a	0.33± 0.04 ^a	0.24± 0.03 ^a
SPARCL1 siRNA plus U0126 group	1.14± 0.14 ^b	1.32± 0.16 ^b	0.95± 0.11 ^b	0.70± 0.08 ^b
F	7.784	63.796	88.063	67.552
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Note: Compared with the control group, ^a $P < 0.05$; compared with SPARCL1 siRNA group, ^b $P < 0.05$.

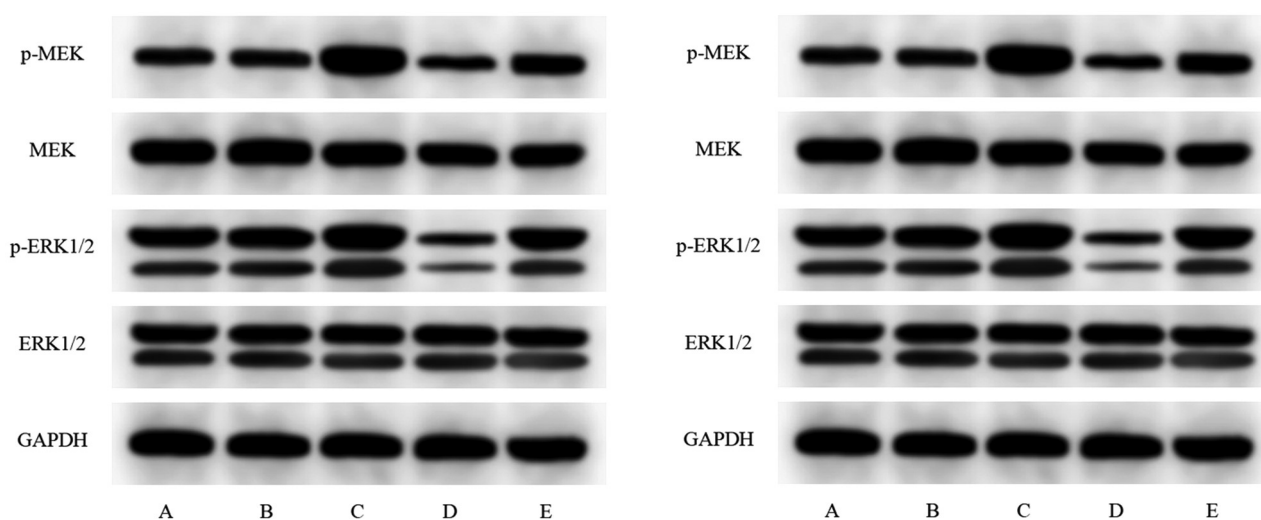


图5 A549 细胞(上图)、HCC827(下图)细胞各组 MEK/ERK 通路相关蛋白表达 Western blot 图

Fig.5 Western blot of MEK/ERK pathway related protein expression in A549 cells (upper) and HCC827 cells (lower)

Note: A: control group; B: NC siRNA group; C: SPARCL1 siRNA group; D: U0126 group; E: SPARCL1 siRNA plus U0126 group.

本研究中 NSCLC 患者癌组织 SPARCL1 mRNA 表达水平显著较癌旁组织中降低。在癌细胞中 SPARCL1 mRNA 表达亦低于正常细胞,与 Isler 等^[16]研究一致,证实了 SPARCL1 在

NSCLC 中低表达,是 NSCLC 的抑癌基因。本研究通过转染成功沉默 SPARCL1 表达,发现 A549、HCC827 细胞 OD₄₅₀ 水平升高、克隆形成数升高,侵袭细胞数升高,而凋亡率下降;提示沉

默 SPARCL1 表达可提升 A549、HCC827 细胞的增殖、侵袭能力,并降低 A549、HCC827 细胞的凋亡能力,但沉默 SPARCL1 表达促进 A549、HCC827 细胞恶性化生长的机制需要进一步探究。

MEK/ERK 是一条经典肿瘤相关信号传导通路,MEK 可与上游 RAF 结合被激活,激活的 MEK 进一步激活其下游底物 ERK,活化后的 ERK 进入细胞核,引发细胞的增殖不受控^[17,18]。据报道,MEK/ERK 可调控 miR-21 参与对 EGFR 突变型 NSCLC 细胞奥西美替尼耐药性的调控^[19];人参皂苷 Rg3 通过靶向 EGFR 介导的 MEK/ERK 信号通路抑制肺癌细胞增殖^[9],MEK/ERK 通路在 NSCLC 恶性增殖中处于激活状态^[20]。本研究显示,MEK/ERK 选择性抑制剂 U0126 的加入,可显著降低 A549、HCC827 细胞 OD₄₅₀、克隆形成数、侵袭细胞数,并提高凋亡率,提示抑制 MEK/ERK 通路的激活有利于 A549、HCC827 细胞的增殖控制,MEK/ERK 通路在 A549、HCC827 的恶性化增殖中发挥关键作用。沉默 SPARCL1 表达后,p-MEK/MEK、p-ERK1/2/ERK1/2 增加,即 SPARCL1 沉默可能是通过激活 MEK/ERK 通路实现对 A549、HCC827 细胞的增殖、侵袭促进与凋亡抑制。为进行验证,本研究在对 A549、HCC827 细胞沉默 SPARCL1 基础上添加 U0126,发现促增殖、侵袭以及抑制凋亡作用被减弱。因此,沉默 SPARCL1 可能是通过激活 MEK/ERK 通路发挥促进 A549、HCC827 恶性化增殖的作用,为 SPARCL1 在 NSCLC 中的作用提供了理论基础。综上所述,NSCLC 患者癌组织 SPARCL1 低表达,沉默 SPARCL1 可能通过激活 MEK/ERK 通路促进 NSCLC A549、HCC827 细胞增殖与侵袭,并抑制细胞凋亡。

参考文献(References)

- [1] Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, et al. NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, Version 2.2021 [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2021, 19(3): 254-266
- [2] Liang WH, Cai KC, Chen C, et al. Expert consensus on neoadjuvant immunotherapy for non-small cell lung cancer[J]. Transl Lung Cancer Res, 2020, 9(6): 2696-2715
- [3] 邢力刚, 马晓林. 2021 版《中华医学会肿瘤学分会肺癌临床诊疗指南》非小细胞肺癌诊疗更新专家解读[J]. 疑难病杂志, 2022, 21(6): 557-560
- [4] 王文逸, 李道明, 曾斌, 等. PD-1 抑制剂 Pembrolizumab 联合培美曲塞和卡铂对 NSCLC 患者 T 淋巴细胞亚群及血清肿瘤标志物的影响[J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(23): 4509-4513
- [5] 蔡香雪. 抑癌基因 SPARCL1 低表达对卵巢癌耐药和临床预后的影响[J]. 现代妇产科进展, 2020, 29(4): 256-262
- [6] Zhou Y, Zhang Q. Association of Tumor Suppressor Sparcl1 with Clinical Staging and Prognosis of NSCLC[J]. Ann Clin Lab Sci, 2021, 51(6): 756-765
- [7] Liu W, Xie A, Tu C, et al. REX-1 Represses RASSF1a and Activates the MEK/ERK Pathway to Promote Tumorigenesis in Prostate Cancer [J]. Mol Cancer Res, 2021, 19(10): 1666-1675
- [8] Ullah R, Yin Q, Snell AH, et al. RAF-MEK-ERK pathway in cancer evolution and treatment[J]. Semin Cancer Biol, 2021, (21): 00138-3
- [9] Liang Y, Zhang T, Jing S, et al. 20 (S)-Ginsenoside Rg3 Inhibits Lung Cancer Cell Proliferation by Targeting EGFR-Mediated Ras/Raf/MEK/ERK Pathway [J]. Am J Chin Med, 2021, 49 (3): 753-765
- [10] 支修益, 石远凯, 于金明. 中国原发性肺癌诊疗规范(2015 年版)[J]. 中国肿瘤杂志, 2015, 37(1): 67-68
- [11] 邱发凯, 余国政, 张琴阳, 等. 化疗与靶向治疗顺序对晚期进展性非小细胞肺癌患者进展及生存期的影响研究 [J]. 贵州医药, 2022, 46(5): 763-764
- [12] Hu H, Cai W, Zheng S, et al. SPARCL1, a Novel Prognostic Predictive Factor for GI Malignancies: a Meta-Analysis [J]. Cell physiol biochem, 2017, 44(4): 1485-1496
- [13] Bawazeer S, Sabry D, Mahmoud R, et al. Association of SPARC gene polymorphisms rs3210714 and rs7719521 with VEGF expression and utility of Nottingham Prognostic Index scoring in breast cancer in a sample of Egyptian women[J]. Mol Biol Rep, 2018, 45(6): 2313-2324
- [14] Regensburger D, Tenkerian C, Pü rzer V, et al. Matricellular Protein SPARCL1 Regulates Blood Vessel Integrity and Antagonizes Inflammatory Bowel Disease [J]. Inflamm Bowel Dis, 2021, 27(9): 1491-1502
- [15] 王进, 余晓凡, 欧阳楠, 等. 甲基化调控 SLIT3 和 SPARCL1 基因在吸烟致肺癌中的表达及其对患者预后的影响[J]. 中华医学杂志, 2019, 99(20): 1553-1557
- [16] Isler SG, Ludwig CU, Chiquet-Ehrismann R, et al. Evidence for transcriptional repression of SPARC-like 1, a gene downregulated in human lung tumors[J]. Int J Oncol, 2004, 25(4): 1073-1079
- [17] Zhong R, Miao R, Meng J, et al. Acetoacetate promotes muscle cell proliferation via the miR-133b/SRF axis through the Mek-Erk-MEF2 pathway[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2021, 53(8): 1009-1016
- [18] Karthikeyan G, Pervaje R, Pervaje SK, et al. Prevention of MEK-ERK-1/2 hyper-activation underlines the neuroprotective effect of Glycyrrhiza glabra L. (Yashtimadhu) against rotenone-induced cellular and molecular aberrations [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 274: 114025
- [19] Huang WC, Yadav VK, Cheng WH, et al. The MEK/ERK/miR-21 Signaling Is Critical in Osimertinib Resistance in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer Cells[J]. Cancers, 2021, 13(23): 6005
- [20] Yuan J, Ju Q, Zhu J, et al. RASSF9 promotes NSCLC cell proliferation by activating the MEK/ERK axis [J]. Cell Death Discov, 2021, 7(1): 199