

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20160908001

杨丹, 周伟强, 杨彪, 等. PM_{2.5} 对人肺癌细胞 A549 迁移、侵袭能力的增强作用[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(5): 243-250

Yang D, Zhou W Q, Yang B, et al. Enhancement effect of PM_{2.5} on migration and invasion abilities of human lung carcinoma cell line (A549) [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(5): 243-250 (in Chinese)

PM_{2.5} 对人肺癌细胞 A549 迁移、侵袭能力的增强作用

杨丹¹, 周伟强², 杨彪², 肖纯凌^{2,*}

1. 沈阳医学院 药理学教研室, 沈阳 110034

2. 沈阳医学院 辽宁省环境污染与微生态重点实验室, 沈阳 110034

收稿日期: 2016-09-08 录用日期: 2016-11-18

摘要: 为探讨 PM_{2.5}(particulate matter 2.5)对人肺癌细胞 A549 迁移、侵袭能力的影响并探讨相关机制,采用含有不同浓度 PM_{2.5} 的无血清及抗生素培养液对 A549 细胞培养 72 h,利用 MTT 法检测 A549 细胞的增殖抑制率。根据 MTT 实验结果,选择适当的 PM_{2.5} 暴露浓度用于后续实验,以细胞划痕实验检测细胞迁移能力,transwell 小室实验检测细胞迁移、侵袭能力,Western Blotting 法检测细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)、转录因子 snail 和 slug、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)及胞核内 β -链蛋白(β -catenin)的蛋白表达水平。结果显示:细胞划痕实验结果显示 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PM_{2.5} 组 A549 细胞划痕创面愈合率为(46.34% $\pm$ 5.19%),与对照组比较显著增高($P<0.05$);transwell 小室法迁移和侵袭实验结果显示 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PM_{2.5} 组穿膜细胞数平均为(165.67 $\pm$ 6.62) 个和(47.83 $\pm$ 2.04) 个,与对照组比较显著增多($P<0.05$);Western Blotting 实验结果显示 PM_{2.5}(10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)可显著上调 A549 细胞 cyclin D1、snail、slug、MMP-2、MMP-9 和胞核内 β -catenin 蛋白表达水平。因此,PM_{2.5} 可通过提高 Wnt/ β -catenin 通路活性及其下游 cyclin D1、snail、slug、MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达而增强 A549 细胞的迁移、侵袭能力。

关键词: PM_{2.5}; 人肺癌细胞; A549; β -catenin; snail; slug; 金属蛋白酶-2; 金属蛋白酶-9; 细胞周期蛋白 D1

文章编号: 1673-5897(2017)5-243-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Enhancement Effect of PM_{2.5} on Migration and Invasion Abilities of Human Lung Carcinoma Cell Line (A549)

Yang Dan¹, Zhou Weiqiang², Yang Biao², Xiao Chunling^{2,*}

1. Department of Pharmacology, Shenyang Medical College, Shenyang, 110034, China

2. Key Laboratory of Environmental Pollution and Microecology of Liaoning Province, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, China

Received 8 September 2016 accepted 18 November 2016

Abstract: To investigate the effects and mechanisms of PM_{2.5} on migration and invasion abilities in human lung cell line (A549), the A549 cells were cultured for 72 hours in the medium containing different concentrations of PM_{2.5} without serum and antibiotics. The proliferation inhibition rate of A549 cells was detected by MTT assay. According to the experimental results of MTT, the appropriate concentration of PM_{2.5} exposure was selected for subsequent experiments. The wound-healing assay was performed to observe the cell migration ability and the transwell assay was performed to observe the cell migration and invasion abilities. The protein expression levels of β -catenin

基金项目: 沈阳市科技局计划项目(No.F14-181-1-00); 辽宁省自然科学基金计划重点项目(No.20170520037)

作者简介: 杨丹(1978-), 女, 博士, 讲师, 研究方向为肿瘤学, E-mail: Ld_love415@163.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: xiaochunling2000@163.com

in the nucleus, cyclin D1, snail, slug, MMP-2 and MMP-9 were detected by Western Blotting method. The wound-healing assay showed that the wound-healing rate of group treated by $\text{PM}_{2.5}$ at the concentration of $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ was $(46.34\% \pm 5.19\%)$, which was increased significantly compared with the control group ($P < 0.05$). The transwell assay showed that the transwell cell numbers of group treated by $\text{PM}_{2.5}$ at the concentration of $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ were 165.67 ± 6.62 and 47.83 ± 2.04 for migration and invasion experiments respectively, which were increased significantly compared with the control group ($P < 0.05$). The Western Blotting assay showed that $\text{PM}_{2.5}$ ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) can significantly up-regulated the expression levels of β -catenin in the nucleus, cyclin D1, snail, slug, MMP-2 and MMP-9 in A549 cells. Thus, $\text{PM}_{2.5}$ can enhance the migration and invasion abilities of A549 cells through up-regulating the activity of Wnt/ β -catenin pathway and the protein expression levels of its downstream proteins such as cyclin D1, snail, slug, MMP-2 and MMP-9.

Keywords: $\text{PM}_{2.5}$; A549; β -catenin; snail; slug; MMP-2; MMP-9; cyclin D1

$\text{PM}_{2.5}$ 是指空气动力学直径 $\leq 2.5 \mu\text{m}$ 的颗粒物,是构成可吸入颗粒物的主要部分^[1]。众多流行病学调查均显示 $\text{PM}_{2.5}$ 与包括肺癌在内的呼吸系统疾病关系密切^[2]。长期的 $\text{PM}_{2.5}$ 暴露能明显增加肺癌患者的死亡率,同时可致确诊后的肺癌患者的生存期缩短,说明 $\text{PM}_{2.5}$ 能够促进肺癌的进展^[3-4]。肺癌的进展与其转移密切相关,有研究表明: $\text{PM}_{2.5}$ 可能通过促进肿瘤新生血管形成、诱发炎症反应等促进肺癌转移,但其促进肺癌转移的具体机制仍不清楚^[5-7]。以往对于 $\text{PM}_{2.5}$ 致呼吸系统损伤的分子机制的研究多集中于以较高浓度 $\text{PM}_{2.5}$ 所致的细胞损伤作用,而关于 $\text{PM}_{2.5}$ 对肿瘤细胞迁移及侵袭能力影响的实验研究仍较少,因此有必要进行更多及更深入的研究^[8-11]。

本研究采用细胞划痕实验和 transwell 小室法检测 $\text{PM}_{2.5}$ 对人肺癌细胞 A549 迁移、侵袭能力的影响,以期进一步证实 $\text{PM}_{2.5}$ 具有促肺癌转移的作用。同时本研究采用 Western Blotting 法检测同细胞迁移、侵袭能力密切相关的 Wnt/ β catenin 通路活性及其下游 cyclin D1、MMP-2、MMP-9 和转录因子 snail、slug 蛋白表达水平的变化,分析该信号通路在 $\text{PM}_{2.5}$ 影响肺癌细胞 A549 迁移、侵袭能力中的作用,为今后深入研究 $\text{PM}_{2.5}$ 促肺癌转移的机制提供实验依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 细胞株和主要试剂

人肺癌细胞 A549 购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库。胰酶及 RPMI 1640 培养基 (Gibco 公司); Matrigel 基质胶 (BD 公司); transwell 小室 (Costar 公司); snail 和 slug 抗体 (CST 公司);

MMP-2、MMP-9、 β -catenin 及 cyclin D1 抗体 (Santa Cruz 公司);细胞核蛋白抽提试剂盒 (碧云天公司)。

1.2 $\text{PM}_{2.5}$ 采集和处理

选择辽宁省沈阳市为采样地区,采样地点为城市中心。雾霾天气时运用高流量样品颗粒采集器采集 $\text{PM}_{2.5}$ 样品于滤膜上,采样高度为距离地面约 1.5 m。连续自动采样 6 个月,以 $1.13 \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ 流速每 48 小时采集 1 份。采样后的滤膜用铝箔纸包裹后于 -20°C 冰箱中保存。制备 $\text{PM}_{2.5}$ 悬液时将采样后的滤膜剪成约 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 大小,浸泡在 50 mL 去离子水中。超声震荡收集 $\text{PM}_{2.5}$ 颗粒物,用多层纱布过滤震荡液后制成 $\text{PM}_{2.5}$ 悬液。收集 $\text{PM}_{2.5}$ 悬液在 $13\ 000 \times g$ 、 4°C 的条件下离心 10 min 后的底层颗粒物,高压灭菌后真空冷冻干燥, -80°C 保存。染毒前用无菌生理盐水配制成所需的 $\text{PM}_{2.5}$ 混悬液并超声处理^[12-13]。

1.3 细胞培养及处理

人肺癌 A549 细胞株用 RPMI 1640 培养基(含 10% 新生牛血清、1% L-谷氨酰胺及 1% 青链霉素)培养于 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱中,细胞长满约 90%时传代。取对数生长期的 A549 细胞,接种于培养皿或培养板内,于 37°C 、5% CO_2 条件下培养 24 h 后更换不含血清及抗生素的 RPMI 1640 培养基。次日向培养基中加入不同浓度 $\text{PM}_{2.5}$ 或 $\text{TGF-}\beta_1$ ($10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)后持续培养 72 h。

1.4 MTT 比色法检测细胞增殖

设立实验组($\text{PM}_{2.5}$ 终浓度为 2.5、10、40 和 $160 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、对照组(只加细胞,不加 $\text{PM}_{2.5}$)和空白组(不加细胞,只加 RPMI 1640 培养基及 $\text{PM}_{2.5}$)。体外培养 72 h 后,每孔加入 $20 \mu\text{L}$ MTT (终浓度 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 37°C 继续孵育 4 h,弃上清,每孔加入 $150 \mu\text{L}$

DMSO 振荡 10 min,用酶标仪在 490 nm 处测定吸光度(A)值,实验重复 3 次。按公式计算:

$$\text{细胞生长抑制率} = (A_{\text{处理组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

1.5 细胞划痕实验

将细胞分为正常对照组、TGF- β_1 (10 ng·mL⁻¹)组和 PM_{2.5} (2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组。将处理后的细胞接种于 6 孔板中,每孔 3 mL。待细胞生长至 90%融合后用 200 μL 吸头在 6 孔板内垂直划痕,用 PBS 清洗细胞 3 次,加入无血清培养基继续培养 24 h。实验分别于 0 h 和 24 h 时在倒置光学显微镜下观察并测量划痕伤口的宽度,计算创面愈合率 = (1-24 h 创面宽度/0 h 创面宽度)×100% 后进行统计分析($\bar{x}\pm s$, $n=6$),以此判断细胞迁移能力。

1.6 Transwell 小室侵袭、迁移实验

细胞分组同划痕实验。侵袭实验取 200 μL 细胞悬液种于铺好 Matrigel 胶的 Transwell 上室中,下室加入 600 μL 含 10% 血清的培养基,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 24 h,移出 transwell 小室,棉签擦去上室的非迁移细胞,4% 甲醛固定 30 min 后用 0.1% 结晶紫染色 15 min,冲洗干净后倒置风干。在倒置显微镜下观察并拍照,每个小室随机取 6 个视野拍照,计数穿膜细胞个数。细胞迁移试验不需要铺 Matrigel 胶,其余操作同侵袭实验。

1.7 胞核蛋白的抽提

按照细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒说明进行。用 PBS 洗一遍,刮下细胞,每 20 μL 细胞沉淀加入 200 μL 细胞浆蛋白抽提试剂 A。最高速剧烈涡旋 5 s,冰浴 10~15 min。加入细胞浆蛋白抽提试剂 B 10 μL ,最高速剧烈涡旋 5 s,冰浴 1 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000×g 离心 5 min。收集沉淀,加入 50 μL 细胞核蛋白抽提试剂。最高速剧烈涡旋 30 s,把细胞沉淀完全悬浮并分散开。然后放回冰浴中,每隔 1~2 min 再高速剧烈涡旋 30 s,共 30 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000×g 离心 10 min,立即吸取上清,即为抽提得到的细胞核蛋白。

1.8 Western Blotting

收集细胞总蛋白,SDS - PAGE 电泳后转印到 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的封闭液常温封闭 1 h,加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜,再用辣根过氧化物酶标记的二抗室温下反应 0.5 h,化学发光法显影;利用 Image J 软件对目的条带进行灰度值检测,以 β -actin 为内参照分析蛋白相对表达量。

1.9 统计学处理

计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析,多组比较采用单因素方差分析;不同组间的两两比较采用 LSD-t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果 (Results)

2.1 PM_{2.5} 对 A549 细胞增殖抑制作用

PM_{2.5} 处理 A549 细胞 72 h 后采用 MTT 法检测各组吸光度,计算 PM_{2.5} 对 A549 细胞的增殖抑制率。如图 1 和表 1 所示,与对照组比较,2.5、10、40 和 160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PM_{2.5} 组对 A549 细胞的增殖抑制率随浓度升高而增加,分别为 (3.08% ± 3.73%)、(10.37% ± 5.97%)、(34.00% ± 6.39%) 和 (51.01% ± 8.37%)。选取对 A549 细胞增殖抑制作用较弱的 2 个浓度 (2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 进行后续实验。

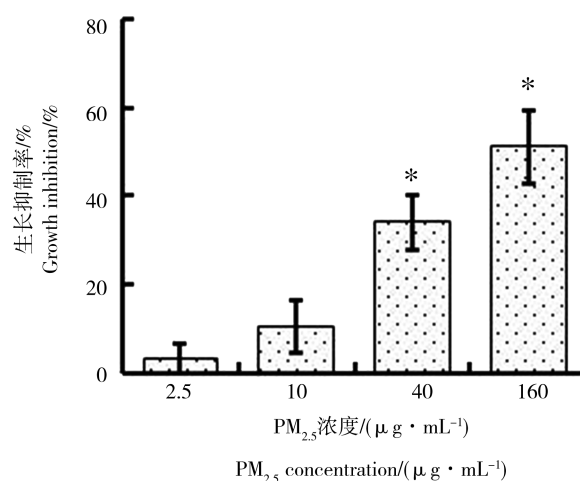


图 1 PM_{2.5} 对 A549 细胞的生长抑制作用

Fig. 1 Inhibition of PM_{2.5} on growth of A549

表 1 PM_{2.5} 对 A549 细胞的生长抑制作用

Table 1 Inhibition of PM_{2.5} on growth of A549

PM _{2.5} /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	<i>n</i>	生长抑制率($\bar{x}\pm s$)/% Growth inhibition ($\bar{x}\pm s$)/%
对照组 Control group	6	0
2.5	6	3.08 ± 3.73
10	6	10.37 ± 5.97*
40	6	34.00 ± 6.39*
160	6	51.01 ± 8.37*
<i>F</i> 值 <i>F</i> value		45.23

注:与对照组比较,* 为 $P<0.05$ 。

Note: compared with control group,* $P<0.05$.

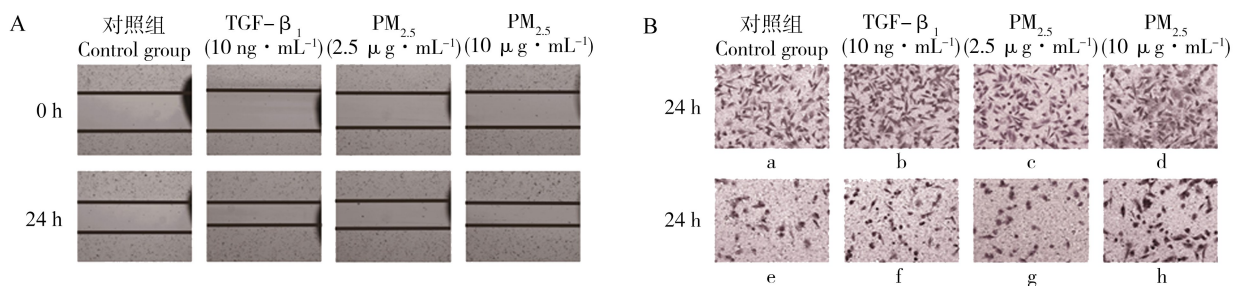


图 2 $\text{PM}_{2.5}$ 促进 A549 细胞的迁移和侵袭

注: A 为细胞划痕实验检测 A549 细胞迁移能力($\times 50$);2B 为 Transwell 法检测 A549 细胞迁移能力(a~d)和侵袭能力(e~h)($\times 200$)。

Fig. 2 $\text{PM}_{2.5}$ promotes migration and invasion of A549 cells

Note: A showed the migration ability of A549 cells detected by wound healing assay ($\times 50$); B showed the migration ability (a-d) and invasion ability (e-h) of A549 cells detected by transwell assay ($\times 200$).

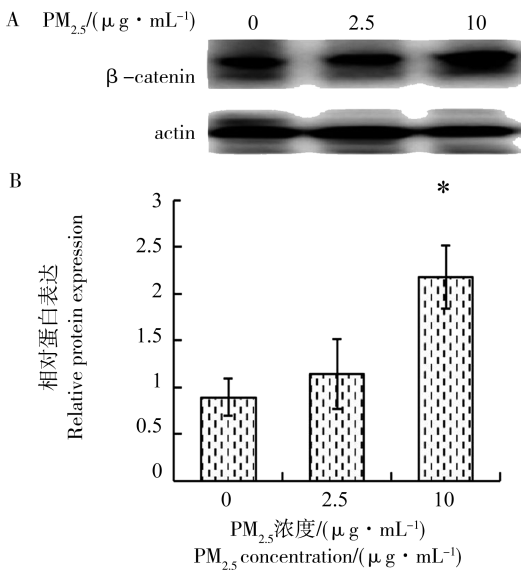


图 3 Western Blotting 法检测 $\text{PM}_{2.5}$ 处理 72 h 后细胞核内 β -catenin 蛋白表达的变化

注:与对照组比较,* 为 $P<0.05$ 。

Fig. 3 The expression levels of β -catenin proteins after exposure to $\text{PM}_{2.5}$ for 72 h were analyzed by Western Blotting

Note: compared with control group, * $P<0.05$.

2.2 $\text{PM}_{2.5}$ 可增强 A549 细胞的迁移、侵袭能力

划痕实验结果如图 2A 和表 2 所示:划痕后 24 h,对照组创面愈合率为($31.97\% \pm 1.80\%$)、 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ $\text{PM}_{2.5}$ 组创面愈合率分别为($37.59\% \pm 3.08\%$)和($46.34\% \pm 5.19\%$)。与对照组相比, $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ $\text{PM}_{2.5}$ 组 A549 细胞的创面愈合率明显增加($P<0.05$)。Transwell 小室法迁移和侵袭实验结果如图 2B 和表 2 所示:对照组、 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ $\text{PM}_{2.5}$ 组中穿过基膜的细胞数分别为(118.67 ± 4.5) 个和(32.33 ± 2.73) 个, (122.50 ± 6.53) 个和(35.5 ± 5.17) 个, (165.67 ± 6.62) 个和(47.83 ± 2.04) 个。与对照组相比, $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ $\text{PM}_{2.5}$ 组小室滤膜下表面的细胞个数明显增多($P<0.05$)。上述结果表明 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ $\text{PM}_{2.5}$ 可使 A549 细胞的迁移、侵袭能力增高。

2.3 $\text{PM}_{2.5}$ 增强 A549 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路活性

$\text{PM}_{2.5}$ 处理 A549 细胞后, Western Blotting 法检测细胞核内 β -catenin 蛋白表达的变化。结果如图 3 和表 3 所示:给予 A549 细胞 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 $\text{PM}_{2.5}$ 处理 72 h 后,与对照组相比, $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

表 2 $\text{PM}_{2.5}$ 促进 A549 细胞的迁移和侵袭

Table 2 $\text{PM}_{2.5}$ promotes migration and invasion of A549 cells

	<i>n</i>	愈合率($\bar{x} \pm s$)/%	迁移细胞数($\bar{x} \pm s$)	侵袭细胞数($\bar{x} \pm s$)
		Rate of wound healing ($\bar{x} \pm s$)/%	Number of migrated cells ($\bar{x} \pm s$)	Number of invaded cells ($\bar{x} \pm s$)
对照组 Control group	6	32.58 ± 0.47	118.67 ± 4.5	32.33 ± 2.73
TGF- β_1 ($10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	6	$44.15 \pm 1.76^*$	$171.17 \pm 8.35^*$	$49.83 \pm 5.84^*$
$\text{PM}_{2.5}$ ($2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	6	33.53 ± 1.66	122.50 ± 6.53	35.50 ± 5.17
$\text{PM}_{2.5}$ ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	6	$42.81 \pm 1.86^*$	$165.67 \pm 6.62^*$	$47.83 \pm 2.04^*$

注:与对照组比较,* 为 $P<0.05$ 。

Note: compared with control group, * $P<0.05$.

PM_{2.5}组细胞核内 β-catenin 蛋白表达水平明显增高 ($P<0.05$)。

2.4 PM_{2.5}上调 A549 细胞中 cyclin D1、snail、slug、MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达

PM_{2.5}处理 A549 细胞后, Western Blotting 法检测细胞内 cyclin D1、snail、slug、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的变化。结果如图 4 和表 4 所示:给予 A549 细胞 2.5 μg·mL⁻¹和 10 μg·mL⁻¹的 PM_{2.5}处理 72 h 后,与对照组相比,10 μg·mL⁻¹ PM_{2.5}组细胞内 cyclin D1、snail、slug、MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达明显增高($P<0.05$)。

3 讨论 (Discussion)

肿瘤细胞的转移是肺癌患者复发以及治疗失败的重要原因。以往关于 PM_{2.5}对肺癌影响的研究多集中其致癌细胞损伤或者死亡的作用方面^[10, 14-16], 而关于 PM_{2.5}是否可促进肺癌的早期转移的研究尚

少见报道。本研究通过 transwell 迁移、侵袭实验和细胞划痕实验检测 PM_{2.5}对肺癌 A549 细胞迁移、侵袭能力的影响,结果显示在无血清条件下较低浓度 (10 μg·mL⁻¹)的 PM_{2.5}作用 72 h 即可明显增强肺癌细胞迁移、侵袭能力,说明 PM_{2.5}可能具有促进肺癌

表 3 PM_{2.5}对肺癌 A549 细胞核内 β-catenin 蛋白相对表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 The effect of PM _{2.5} on the expression of β-catenin protein in A549 cells nucleus ($\bar{x}\pm s, n=6$)		
PM _{2.5} /(μg·mL ⁻¹)	<i>n</i>	β-catenin
对照组 Control group	6	0.90 ± 0.20
2.5	6	1.14 ± 0.37
10	6	2.17 ± 0.33*
<i>F</i> 值 <i>F</i> value		12.50

注:与对照组比较, * 为 $P<0.05$ 。
Note: compared with control group, * $P<0.05$.

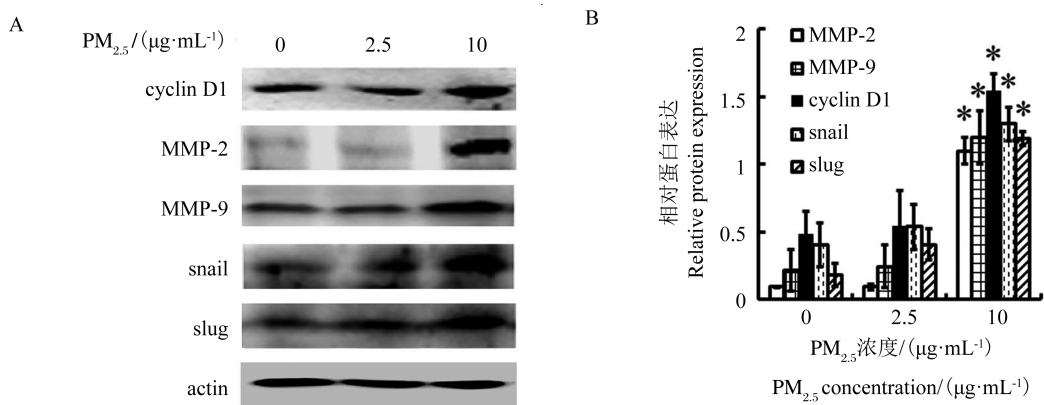


图 4 Western Blotting 法检测加入 PM_{2.5} 72 h 后细胞内 cyclin D1、snail、slug、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的变化
注:与对照组比较, * 为 $P<0.05$ 。

Fig. 4 The expression levels of cyclin D1, snail, slug, MMP-2 and MMP-9 proteins after treated with PM_{2.5} for 72 h were analyzed by Western Blotting
Note: compared with control group, * $P<0.05$.

表 4 PM_{2.5}对肺癌 A549 细胞 cyclin D1、snail、slug、MMP-2 和 MMP-9 蛋白相对表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 4 The effects of PM_{2.5} on the expression of cyclin D1, snail, slug, MMP-2 and MMP-9 protein in A549 cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

PM _{2.5} /(μg·mL ⁻¹)	<i>n</i>	cyclin D1	snail	slug	MMP-2	MMP-9
对照组 Control group	6	0.48 ± 0.17	0.40 ± 0.16	0.18 ± 0.09	0.09 ± 0.01	0.21 ± 0.16
2.5	6	0.54 ± 0.26	0.54 ± 0.17	0.41 ± 0.11	0.09 ± 0.02	0.24 ± 0.16
10	6	1.54 ± 0.13*	1.30 ± 0.12*	1.19 ± 0.05*	1.10 ± 0.10*	1.20 ± 0.20*
<i>F</i> 值 <i>F</i> value		28.28	39.63	108.92	209.92	31.09

注:与对照组比较, * 为 $P<0.05$ 。
Note: compared with control group, * $P<0.05$.

的早期转移的作用。

肿瘤细胞的转移过程非常复杂,涉及多条信号通路、转录因子及酶的活化。Wnt/ β -catenin 信号传导通路在肿瘤细胞转移过程中起着重要作用,该通路激活时,过量的 β -catenin 从胞质中转移入细胞核,在核内与转录因子 T 细胞因子/淋巴增强因子(T cell factor, TCF/lymphoid enhancer factor, LEF)相互作用,激活下游大量具有促进肿瘤细胞转移功能的基因转录,如基质金属蛋白酶、cyclin D1、slug、snail 等,进而增强肿瘤细胞转移能力^[17-20]。本研究通过检测细胞核内 β -catenin 的表达水平证明在无血清条件下较低浓度的 $\text{PM}_{2.5}$ ($10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)作用 72 h 即可明显激活肺癌 A549 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路。

基质金属蛋白酶家族是降解细胞外基质的重要酶类。肿瘤细胞周围细胞外基质的降解是肿瘤侵袭和转移的必要条件,因此金属蛋白酶家族在肿瘤细胞迁移和侵袭过程中发挥重要作用。多种肿瘤(包括非小细胞肺癌)中均可见金属蛋白酶家族过表达。基质金属蛋白酶-2 和基质金属蛋白酶-9 是基质金属蛋白酶家族内的重要成员,同属于 IV 型明胶酶,主要降解细胞间基质及基底膜主要成分 IV 型胶原,促进肿瘤细胞侵袭和扩散,因此其在肿瘤转移过程中具有重要作用^[20-21]。研究表明:Wnt/ β -catenin 信号通路的激活能够使 MMP-2 和 MMP-9 的表达水平增高^[18]。如 Dong 等^[22]的研究表明:电离辐射可通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路使其下游包括 MMP-2 和 MMP-9 在内的多种基因表达上调,增强胶质瘤细胞 U87 侵袭能力。本研究中 Western Blotting 实验结果表明:在无血清条件下较低浓度($10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的 $\text{PM}_{2.5}$ 作用 72 h 即可使 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平的上调,说明 $\text{PM}_{2.5}$ 增强肺癌 A549 细胞迁移、侵袭能力作用与其激活 Wnt/ β -catenin 信号通路并通过上调其下游 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达相关。

cyclin D1 是细胞周期蛋白家族的一个成员,在调控细胞周期进展过程中发挥重要作用,此外 cyclin D1 还是一个癌基因,在多种肿瘤包括肺癌中呈高表达^[23-24]。越来越多的研究表明,cyclin D1 与肿瘤的转移关系密切^[25]。如 Li 等^[26]的报道称,cyclin D1 通过抑制 ROCK 信号和转移抑制因子 TSP-1 而增强细胞的运动能力。此外,细胞周期蛋白 D1 提高 MMPs 的表达和活性,从而提高侵袭性。如 Arita-Ohshima 等^[27]的研究表明 cyclin D1 蛋白的过度

表达可增加 MMP-2 和 MMP-9 的活性并增强脑胶质瘤细胞的侵袭性。

锌指蛋白转录因子 snail 超家族包括 snail(snail 1)和 slug (snail 2)2 个成员,二者作为转录因子,调控某些基因的表达,如下调细胞间的紧密连接成分如 ZO-1 及上调肿瘤细胞的金属蛋白酶类的表达,这些均有助于增加细胞的迁徙转移力,尤其常见于各种肿瘤的癌性细胞向远处转移机制中^[28-32]。如 Wang 等^[33]的研究表明:snail 促进 MMP-9 表达,并且二者均与甲状腺乳头状癌的淋巴结转移有关。Li 等^[34]报道 snail 介导的 MMP-2 上调与细胞侵袭性增强有关。Qiao 等^[35]关于口腔鳞状细胞癌的研究证明:snail 通过上调 MMP-2 和 MMP-9 促进细胞发生上皮间质转化,转移能力增强。Bolos 等^[36]和 Chandler^[37]研究发现,slug 通过调控靶基因 MMP-2 影响细胞 IV 型胶原和明胶的降解,进而参与肿瘤细胞的侵袭与转移。Qiao 等^[35]和 Yue 等^[38]报道 slug 能够上调 MMP-9 的表达。Wnt/ β -catenin 信号转导途径可调控 snail 和 slug 表达水平,当 Wnt 信号被激活,稳定的 β -catenin 进入细胞核内与 TCF/LEF 相互作用,形成的复合物可使 snail 和 slug 转录,核内水平增加^[39]。

本研究中较低浓度的 $\text{PM}_{2.5}$ ($10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)作用 72 h 即可明显上调 cyclin D1、snail 和 slug 的蛋白表达水平,说明 Wnt/ β -catenin 信号通路激活同时上调了某些其下游蛋白的表达,而这些蛋白的高表达又可进一步上调 MMP-2 和 MMP-9 的表达,促进肿瘤细胞的转移和侵袭。

综上所述,本研究发现将人肺癌 A549 细胞在无血清条件下暴露于较低浓度的 $\text{PM}_{2.5}$ ($10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 72 h,能够使细胞的侵袭、转移能力增强,此作用与 $\text{PM}_{2.5}$ 活化 Wnt/ β -catenin 信号传导通路,上调细胞 cyclin D1、MMP-2、MMP-9 及转录因子 snail 和 slug 的蛋白表达水平有关。

通讯作者简介:肖纯凌(1964-),女,博士,教授,博士生导师,研究方向为大气污染对呼吸道的的影响机制及微生态。

参考文献 (References):

- [1] 李娟,杨维超,洪丽娟,等. $\text{PM}_{2.5}$ 对 BEAS-2B 细胞脂质过氧化损伤作用[J]. 中国公共卫生, 2014, 30(11): 1389-1391
- Li J, Yang W C, Hong L J, et al. Lipid peroxidation induced by $\text{PM}_{2.5}$ in human bronchial epithelial cells [J].

- Chinese Journal of Public Health, 2014, 30(11): 1389-1391 (in Chinese)
- [2] Kim J Y, Lee E Y, Choi I, et al. Effects of the particulate matter 2.5 (PM_{2.5}) on lipoprotein metabolism, uptake and degradation, and embryo toxicity [J]. *Molecules and Cells*, 2015, 38(12): 1096-1104
- [3] Eckel S P, Cockburn M, Shu Y H, et al. Air pollution affects lung cancer survival [J]. *Thorax*, 2016, 71(10): 891-898
- [4] Xu X, Ha S, Kan H, et al. Health effects of air pollution on length of respiratory cancer survival [J]. *BMC Public Health*, 2013, 13: 800
- [5] Yue H, Yun Y, Gao R, et al. Winter polycyclic aromatic hydrocarbon-bound particulate matter from peri-urban north China promotes lung cancer cell metastasis [J]. *Environmental Science and Technology*, 2015, 49 (24): 14484-14493
- [6] Li X, Lv Y, Gao N, et al. microRNA-802/Rnd3 pathway imposes on carcinogenesis and metastasis of fine particulate matter exposure [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(23): 35026-35043
- [7] 孟梅, 周泉生. PM_{2.5}引起的肿瘤新生血管形成和转移的研究进展[J]. *科技导报*, 2014, 32(26): 52-57
Meng M, Zhou Q S. Progress in PM_{2.5}-caused tumor neovascularization and metastasis [J]. *Science Technology Review*, 2014, 32(26): 52-57 (in Chinese)
- [8] Xing Y F, Xu Y H, Shi M H, et al. The impact of PM_{2.5} on the human respiratory system [J]. *Journal of Thoracic Disease*, 2016, 8(1): E69-E74
- [9] Zhou W, Tian D, He J, et al. Repeated PM_{2.5} exposure inhibits BEAS-2B cell P53 expression through ROS-Akt-DNMT3B pathway-mediated promoter hypermethylation [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(15): 20691-20703
- [10] Deng X, Zhang F, Rui W, et al. PM_{2.5}-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells [J]. *Toxicology In Vitro*, 2013, 27(6): 1762-1770
- [11] Vattanasit U, Navasumrit P, Khadka M B, et al. Oxidative DNA damage and inflammatory responses in cultured human cells and in humans exposed to traffic-related particles [J]. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2014, 217(1): 23-33
- [12] 牛佳玉, 肖纯凌, 陈冬梅, 等. PM_{2.5}对高血压(SHR/NCrl)大鼠呼吸道菌群的影响[J]. *卫生研究*, 2016, 45(4): 648-652
Niu J Y, Xiao C L, Chen D M, et al. Effect of PM_{2.5} on respiratory tract flora in SHR/NCrl rats [J]. *Journal of Hygiene Research*, 2016, 45(4): 648-652 (in Chinese)
- [13] 杨彪, 李新鸣, 严思远, 等. PM_{2.5}暴露对鸡胆子油乳治疗荷瘤肺癌小鼠腹腔巨噬细胞的作用[J]. *中国当代医药*, 2016, 23(6): 15-21
Yang B, Li X M, Yan S Y, et al. Effect of PM_{2.5} exposure for peritoneal macrophages of tumor-bearing mice with lung cancer treated by bruceolic oil emulsion [J]. *China Modern Medicine*, 2016, 23(6): 15-21 (in Chinese)
- [14] Zou Y, Jin C, Su Y, et al. Water soluble and insoluble components of urban PM_{2.5} and their cytotoxic effects on epithelial cells (A549) *in vitro* [J]. *Environmental Pollution*, 2016, 212: 627-635
- [15] Wang H, Guo Y, Liu L, et al. DDAH1 plays dual roles in PM_{2.5} induced cell death in A549 cells [J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 2016, 1860(12): 2793-2801
- [16] Li X, Ding Z, Zhang C, et al. MicroRNA-1228(*) inhibit apoptosis in A549 cells exposed to fine particulate matter [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(10): 10103-10113
- [17] Ben-Josef E, George A, Regine W F, et al. Glycogen synthase kinase 3 beta predicts survival in resected adenocarcinoma of the pancreas [J]. *Clinical Cancer Research*, 2015, 21(24): 5612-5618
- [18] Park B B, Yoon J, Kim E, et al. Inhibitory effects of eupatilin on tumor invasion of human gastric cancer MKN-1 cells [J]. *Tumor Biology*, 2013, 34(2): 875-885
- [19] 杨丹, 王丽, 李珠, 等. 棉酚通过 Akt/ β -catenin 通路抑制胃癌细胞迁移[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(6): 860-864
Yang D, Wang L, Li Z, et al. Inhibitory effect of gossypol on migration of gastric carcinoma cell lines through Akt / β -catenin passway [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2015, 31(6): 860-864 (in Chinese)
- [20] Pei S, Yang X, Wang H, et al. Plantamajoside, a potential anti-tumor herbal medicine inhibits breast cancer growth and pulmonary metastasis by decreasing the activity of matrix metalloproteinase-9 and -2 [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 965
- [21] Lu X, Duan L, Xie H, et al. Evaluation of MMP-9 and MMP-2 and their suppressor TIMP-1 and TIMP-2 in adenocarcinoma of esophagogastric junction [J]. *Journal of Oncotargets and Therapy*, 2016, 9: 4343-4349
- [22] Dong Z, Zhou L, Han N, et al. Wnt/ β -catenin pathway involvement in ionizing radiation-induced invasion of U87 glioblastoma cells [J]. *Strahlentherapie und Onkologie*, 2015, 191(8): 672-680
- [23] Hwang S J, Lee H W, Kim H R, et al. Overexpression of microRNA-95-3p suppresses brain metastasis of lung adenocarcinoma through downregulation of cyclin D1 [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(24): 20434-20448

- [24] Gautschi O, Ratschiller D, Gugger M, et al. Cyclin D1 in non-small cell lung cancer: A key driver of malignant transformation [J]. *Lung Cancer*, 2007, 55: 1-14
- [25] Drobnjak M, Osman I, Scher H I, et al. Overexpression of cyclin D1 is associated with metastatic prostate cancer to bone [J]. *Clinical Cancer Research*, 2000, 6: 1891-1895
- [26] Li Z, Wang C, Jiao X, et al. Cyclin D1 regulates cellular migration through the inhibition of thrombospondin 1 and ROCK signaling [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2006, 26: 4240-4256
- [27] Arato-Ohshima T, Sawa H. Over-expression of cyclin D1 induces glioma invasion by increasing matrix metalloproteinase activity and cell motility [J]. *International Journal of Cancer*, 1999, 83: 387-392
- [28] Miyoshi A. Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma [J]. *British Journal of Cancer*, 2005, 92(2): 252-258
- [29] Li D, Sun H, Sun W J, et al. Role of RbBP5 and H3K4me3 in the vicinity of snail transcription start site during epithelial- mesenchymal- transition in prostate cancer cell [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(40): 65553-65567
- [30] Ito K, Park S H, Nayak A, et al. PTK6 inhibition suppresses metastases of triple-negative breast cancer via Snail-dependent E-cadherin regulation [J]. *Cancer Research*, 2016, 76(15): 4406-4417
- [31] Yin S, Wang P, Yang L, et al. Wip1 suppresses ovarian cancer metastasis through the ATM/AKT/Snail mediated signaling [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(20): 29359-29370
- [32] Zhang J, Liu Y, Zhang J, et al. FOXQ1 promotes gastric cancer metastasis through upregulation of snail [J]. *Oncology Reports*, 2016, 35(6): 3607-3613
- [33] Wang N, Jiang R, Yang J Y, et al. Expression of TGF- β 1, SNAIL and MMP-9 is associated with lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma [J]. *Journal of Molecular Histology*, 2014, 45(4): 391-399
- [34] Li Y, Klausen C, Zhu H, et al. Activin A increases human trophoblast invasion by inducing Snail-mediated MMP2 up-regulation through ALK4 [J]. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2015, 100(11): E1415-E1427
- [35] Qiao B, Johnson NW, Gao J. Epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma triggered by transforming growth factor-beta1 is Snail family-dependent and correlates with matrix metalloproteinase-2 and -9 expressions [J]. *International Journal of Oncology*, 2010, 37(3): 663-668
- [36] Bolos V, Peinado H, Pérez-Moreno M A, et al. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: A comparison with Snail and E47 repressors [J]. *Journal of Cell Science*, 2003, 116 (Pt3): 499-511
- [37] Chandler H L, Kusewitt D F, Colitz C M. Modulation of matrix metalloproteinases by ultraviolet radiation in the canine cornea [J]. *Veterinary Ophthalmology*, 2008, 11(3): 135-144
- [38] Yue B, Ren Q X, Su T, et al. ERK5 silencing inhibits invasion of human osteosarcoma cell via modulating the Slug/MMP-9 pathway [J]. *European Review for Medical Pharmacological Sciences*, 2014, 18(18): 2640-2647
- [39] 刘锦华, 唐旭东. Slug 的分子调控机制 [J]. *生命的化学*, 2013, 33(5): 554-562
- Liu J H, Tang X D. Molecular mechanisms of regulation of Slug [J]. *Chemistry of Life*, 2013, 33(5): 554-562 (in Chinese) ◆