

# stomatin 蛋白表达对肺癌细胞增殖和凋亡的影响

安华英<sup>1</sup> 李威<sup>1</sup> 马媛原<sup>2</sup> 袁伟<sup>1</sup> 马洁<sup>2</sup>

<sup>1</sup>国家癌症中心 国家肿瘤临床医学研究中心 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院 分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021; <sup>2</sup>北京医院生物治疗中心 国家老年医学中心 中国医学科学院老年医学研究院, 北京 100730

通信作者: 马洁, Email: majie4685@bjhmoh.cn

**【摘要】** 目的 探讨 stomatin 蛋白表达对肺癌细胞增殖和凋亡的影响。方法 采用实时定量 PCR 检测人支气管肺上皮细胞(HBE)和人肺癌细胞(H520、A549、95D、H460、Glc-82、973 和 H1299) stomatin mRNA 表达水平。采用免疫组织化学染色检测 4 张肺癌组织芯片(含 259 份人肺癌及其癌旁组织)stomatin 蛋白表达情况。敲降 A549 细胞 stomatin 基因表达后, 噻唑蓝比色法检测细胞增殖, 流式细胞仪检测细胞凋亡, Western 印迹法检测细胞中总蛋白激酶 B(AKT)和丝氨酸 473 位点磷酸化 AKT 的表达水平。采用 BALB/c 裸鼠皮下成瘤实验检测敲降 stomatin 蛋白表达对 A549 细胞成瘤能力的影响, 采用组织芯片染色检测肿瘤组织中 stomatin 蛋白、核增殖抗原(Ki67)及血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)表达情况。**结果** H520、A549、95D、H460、Glc-82、973、H1299 和 HBE 细胞 stomatin mRNA 表达水平  $M$ (极差)分别为 2.71(2.66)、3.55(3.16)、0.26(0.22)、2.08(1.98)、0.87(0.35)、1.72(2.53)、1.10(1.82)和 0.01(0.02), H520、A549 和 H460 细胞高于 HBE 细胞( $P$ 值均 $<0.05$ ), 95D、Glc-82、973、H1299 与 HBE 细胞差异无统计学意义( $P$ 值均 $>0.05$ )。stomatin 蛋白在人肺癌组织的表达阳性率为 34.7%(90/259), 高于正常组织[1.9%(5/259)]( $P<0.05$ )。stomatin 表达阳性肺癌组织中, 低表达组(67 例)肿瘤大小  $M$ ( $Q$ R)为[41.22(2 761.50)] cm, 小于高表达组[23 例, 57.98(1 333.50)cm] ( $P<0.05$ )。敲降 stomatin 基因表达的 A549 细胞第 4 天的吸光度值为  $0.55\pm 0.07$ , 低于对照细胞( $0.79\pm 0.16$ ) ( $P=0.012$ ); 早期凋亡细胞占比 [ $M$ ( $Q$ R)]为 8.83(53.00), 高于对照细胞[4.17(25.00)] ( $P=0.026$ ); 丝氨酸 473 位点磷酸化 AKT 蛋白表达水平为  $0.68\pm 0.16$ , 低于对照细胞 ( $1.16\pm 0.39$ ) ( $P<0.05$ ), AKT 总蛋白表达水平  $M$ ( $Q$ R)为 4.25(17.00), 与对照细胞[4.75(19.00)]差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 将敲降 stomatin 基因表达的 A549 细胞接种裸鼠腋下 43 d 后, 肿瘤体积为  $(37.93\pm 3.12)\text{mm}^3$ , 小于对照组 [ $(454.04\pm 32.39)\text{mm}^3$ ] ( $P<0.001$ ), 肿瘤组织 stomatin、Ki67 和 CD31 表达水平分别为  $1.78\pm 0.69$ 、 $5.19\pm 3.84$  和  $10.77\pm 1.67$ , 均低于对照组(分别为  $17.52\pm 8.76$ 、 $54.14\pm 41.02$  和  $19.72\pm 6.97$ ) ( $P$ 值均 $<0.05$ )。**结论** stomatin 可通过调控 AKT 信号通路促进肺癌细胞增殖并抑制细胞早期凋亡。

**【关键词】** 肺肿瘤; 细胞增殖; 细胞凋亡; 红细胞膜整合蛋白

**基金项目:** 国家自然科学基金(81602576); 国家重点研发计划(2016YFA0201503)

DOI:10.3760/cma.j.cn112137-20200426-01325

## Effects of stomatin protein expression on proliferation and apoptosis of lung cancer cells

An Huaying<sup>1</sup>, Li Wei<sup>1</sup>, Ma Yuanyuan<sup>2</sup>, Yuan Wei<sup>1</sup>, Ma Jie<sup>2</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Molecular Oncology, National Cancer Center/National Clinical Research Center for Cancer/Cancer Hospital Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China; Department of Biotherapy, Beijing Hospital/National Center of Gerontology/Chinese Academy of Medical Sciences Institute of Gerontology, Beijing 100730, China

Corresponding author: Ma Jie, Email: majie4685@bjhmoh.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of stomatin protein expression on the proliferation and apoptosis of lung cancer cells. **Methods** The expressions of stomatin mRNA in human bronchial epithelial cells (HBE) and lung cancer cells (H520, A549, 95D, H460, Glc-82, 973 and H1299) were detected by Real-time PCR. Immunohistochemistry (IHC) was used to detect stomatin protein

expression in 4 lung cancer tissue microarrays with 259 cases of lung cancer and adjacent normal tissues. After knocking down the expression of stomatin in A549 cells, the proliferation was detected by 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) assay, the apoptosis was detected by flow cytometry, the expression levels of total protein kinase B (AKT) and phosphorylated AKT at Ser473 were detected by Western blot. BALB/c nude mice were used to detect the tumorigenic ability of stomatin downregulated A549 cells (3 mice) and control cells (3 mice), and the protein expressions of stomatin, Ki67 and CD31 in tumor tissues were detected by IHC. **Results** The *M* (range) of stomatin mRNA expression level in H520, A549, 95D, H460, Glc-82, 973, H1299 and HBE cells were 2.71 (2.66), 3.55 (3.16), 0.26 (0.22), 2.08 (1.98), 0.87 (0.35), 1.72 (2.53), 1.10 (1.82) and 0.01 (0.02), respectively. The mRNA expression levels of stomatin in H520, A549 and H460 cells were higher than that of HBE cells (all  $P < 0.05$ ), whereas there was no statistical difference among 95D, Glc-82, 973, H1299 and HBE cells (all  $P > 0.05$ ). IHC of lung tissue microarrays showed that the positive rate of stomatin expression in human lung cancer tissues was 34.7% (90/259), which was significantly higher than that in adjacent normal tissues [1.9% (5/259)] ( $P < 0.05$ ). In stomatin positive lung cancer tissues, the *M* (IQR) of tumor size for lower stomatin expression tissues (67 cases) was [41.22 (2 761.50) cm], which was smaller than that of higher stomatin expression tissues [ (23 cases, 57.98(1 333.50) cm) ( $P < 0.05$ ). After knocking down stomatin expression, the fourth day absorbance value of stomatin-downregulated A549 cells was  $0.55 \pm 0.07$ , which was lower than that of control cells ( $0.79 \pm 0.16$ ) ( $P = 0.012$ ). The proportion of early apoptotic cells of stomatin-downregulated A549 cells [8.83 (53.00)] was higher than that of control cells [4.17 (25.00)] ( $P = 0.026$ ). The Ser473 phosphorylated AKT protein expression level in stomatin-downregulated A549 cells was  $0.68 \pm 0.16$ , which was decreased compared with control cells ( $1.16 \pm 0.39$ ) ( $P < 0.05$ ). The *M* (IQR) of total AKT expression level in stomatin-downregulated A549 cells was 4.25 (17.00), without statistically significant difference from control cells [4.75 (19.00)] ( $P > 0.05$ ). After inoculation of stomatin-downregulated A549 cells in nude mice for 43 days, the tumor volume was  $(37.93 \pm 3.12) \text{ mm}^3$ , which was significantly smaller than that of the control group [  $(454.04 \pm 32.39) \text{ mm}^3$ ] ( $P < 0.001$ ). And the expression levels of stomatin, nuclear proliferation antigen Ki67, and platelet-endothelial cell adhesion molecule CD31 were  $1.78 \pm 0.69$ ,  $5.19 \pm 3.84$ , and  $10.77 \pm 1.67$ , respectively, which were all decreased compared with control group ( $17.52 \pm 8.76$ ,  $54.14 \pm 41.02$ , and  $19.72 \pm 6.97$ , respectively) (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Stomatin promotes lung cancer cell proliferation and inhibits cell early apoptosis by regulating AKT signaling pathway.

**【 Key words 】** Lung neoplasms; Cell proliferation; Apoptosis; Stomatin

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China(81602576); National Key R&D Program of China (2016YFA0201503)

DOI:10.3760/cma.j.cn112137-20200426-01325

肺癌是全球癌症相关死亡的最常见原因,尽管其早期诊断和综合治疗技术取得了极大进展,但肺癌患者总生存率并未明显上升<sup>[1]</sup>。确定新的肺癌关键基因及其功能对探索肺癌诊治新方法具有积极意义。stomatin 蛋白又称人红细胞整合膜蛋白<sup>[2]</sup>,其主要功能为调控离子通道<sup>[3-4]</sup>、葡萄糖转运蛋白(GLUT1)活性<sup>[5-6]</sup>和细胞骨架蛋白重组<sup>[7-8]</sup>。2017年发现 stomatin 蛋白还可通过蛋白质折叠或外泌体运输等方式释放至胞外,募集融合组件并通过肌动蛋白聚合促进细胞融合,释放膜弯曲应力<sup>[9]</sup>。现有研究对肿瘤组织 stomatin 表达水平的结论不一<sup>[10-14]</sup>,stomatin 蛋白在肿瘤组织的功能和作用机制亦不明确。本研究检测肺癌细胞和人肺癌组织 stomatin 蛋白表达情况,并敲降人肺癌细胞(A549)stomatin 基因表达,探讨 stomatin 蛋白对肺癌细胞增殖、凋亡及成瘤能力的影响。

## 材料与方法

1. 主要试剂与仪器:人永生支气管上皮细胞 HBE、肺癌细胞 H520、95C、95D、H460、Glc-82、973 和 H1299 等细胞均购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心;肺癌细胞 A549 细胞购自美国典型培养物保藏中心;胎牛血清和 RPMI-1640 培养基均购自美国 Sigma-Aldrich 公司;F12K 培养基购自美国赛默飞世尔科技公司;青链霉素购自北京索莱宝科技有限公司;TRIzol 总 RNA 提取试剂购自美国 Life Technologies 公司;反转录试剂盒[PrimeScript RT Reagent Kit(Perfect Real Time)]和聚合酶链式反应试剂盒(SYBR Premix Ex Taq)均购自日本 Takara 公司;stomatin 实时定量 PCR 引物由美国 Life Technologies 公司合成,序列信息:5'-CACACACGGGACTCCGAAG-3' (正向),5'-ATGAGAACGCCACCAAATCC-3' (反向);肺癌

组织芯片购自上海芯超生物技术有限公司; Stomatin 抗体购自美国 Proteintech 公司; Stomatin RNA 干扰及其对照质粒购自广州锐博生物科技有限公司(分别记为 *sistom* 和 *sinc*); 由上海吉凯基因科技有限公司提供技术服务, 构建 *stomatin* RNA 干扰慢病毒(载体类型为 hU6-MCS-UbiquitinEGFP-IRES-puromycin); 锐博小 RNA 转染试剂盒购自广州市锐博生物科技有限公司; 钙依赖性磷脂结合蛋白(Annexin V / PI) 凋亡检测试剂盒购自杭州联科生物技术股份有限公司; 核增殖抗原(Ki67) 抗体和血小板-内皮细胞黏附分子(CD31) 抗体均购自英国 abcam 公司; 总蛋白激酶 B(t-AKT) 抗体和丝氨酸 473 位点磷酸化蛋白激酶 B[p-AKT(S473)] 抗体均购自美国 CST 公司;  $\beta$  肌动蛋白( $\beta$ -actin) 抗体购自美国 Sigma-Aldrich 公司; ViiA™7 实时 PCR 系统购自美国 Applied Biosystems 公司; ImageQuant™ LAS 4000 数字成像系统购自美国 GE 公司。

2. 细胞培养与转染: H520、HBE、H1299、95C、95D、H460、Glc-82 和 973 等细胞采用 RPMI-1640 培养液, A549 细胞采用 F12K 培养液。所有培养液均含 10% 胎牛血清和 100 U/ml 青链霉素, 置于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的孵箱中培养。利用 *stomatin* RNA 干扰质粒转染 A549 细胞, 记为 A549-*sistom*, 转染空载体质粒的 A549 细胞记为 A549-*sinc*。利用 *stomatin* RNA 干扰慢病毒感染 A549 细胞, 记为 A549-*shstom*; 感染空载体病毒的 A549 细胞记为 A549-*shnc*。

3. *stomatin* 蛋白免疫组织化学染色与评价: 4 张肺癌组织芯片(共包含 315 份肺癌及其癌旁组织) 购自上海芯超生物技术有限公司, 剔除免疫组织化学染色过程中脱点及临床信息记录不完整组织样本 56 份, 对 4 张组织芯片的 259 份样本进行 *stomatin* 蛋白免疫组织化学染色并依据着色细胞数

量及强度进行染色评分(0~3 分), 评分标准如图 1 示, 分别为不表达(0 分)、低表达(1 分) 和高表达( $\geq 2$  分)。评分由两名病理医生独立进行, 评分不一致者经讨论后给出最终评分。

4. 实时定量 PCR 检测 *stomatin* 基因表达水平: 采用 Trizol 法提取 H520、A549、95D、H460、Glc-82、973、H1299、HBE 细胞、A549-*sinc* 和 A549-*sistom* 细胞总 RNA 并逆转录为 cDNA。各组细胞取等量 cDNA, 利用 SYBR Green 法检测各细胞中 *stomatin* 基因表达水平, 以  $\beta$ -actin 作为内参基因, 计算各组细胞相对于对应对照细胞的 *stomatin* mRNA 表达量的相对变化倍数  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

5. 噻唑蓝比色法检测细胞增殖: 以 *sistom* 和 *sinc* 质粒转染 A549 细胞 48 h 后, 将 A549-*sinc* 和 A549-*sistom* 细胞以  $3 \times 10^3$  个细胞/孔的密度接种于 96 孔板, 待细胞贴壁后每孔加 100  $\mu$ l 噻唑蓝, 孵育 4 h 后每孔加 150  $\mu$ l 二甲基亚砷, 振荡 10 min 后于 490 nm 波长下测定吸光度值。

6. 流式细胞术检测细胞凋亡: *sistom* 和 *sinc* 载体转染 A549 细胞 48 h 后, 检测 A549-*sinc* 和 A549-*sistom* 细胞凋亡情况。具体操作如下: 以预冷 PBS 洗涤细胞 2 次, 加适量预冷结合缓冲液重悬细胞沉淀, 调节细胞浓度为  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  个细胞/ml, 取 100  $\mu$ l 细胞悬液于流式管中, 分别加入 5  $\mu$ l Annexin V 和 10  $\mu$ l 碘化丙锭溶液, 混匀后室温避光孵育 15 min, 随后每管加入 380  $\mu$ l 预冷结合缓冲液, 流式细胞仪上机分析。

7. Western 印迹法检测 *stomatin* 蛋白表达水平: 提取 A549-*sinc* 和 A549-*sistom* 细胞总蛋白, 以二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白浓度, 取等量蛋白质进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳, 70 V 恒压转移至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂牛奶 4℃ 封闭过夜, 随后分别加入 1:1 000 稀释的 *stomatin*、t-AKT、p-AKT(S473) 抗体和 1:3 000 稀释的  $\beta$ -actin 抗体(参照蛋白) 室温孵育 2 h, 以 Tris-HCl-Tween 缓冲盐溶液(TBST)洗膜, 加入 1:3 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠或羊抗兔二抗, 室温孵育 1 h, 化学发光法显色并采集图像, 采用 ImageJ 图像处理软件测定蛋白表达灰度值。

8. 裸鼠成瘤实验: 6 只 SPF 级 3~5 周龄雌性 BALB/c 裸鼠(18~22 g)

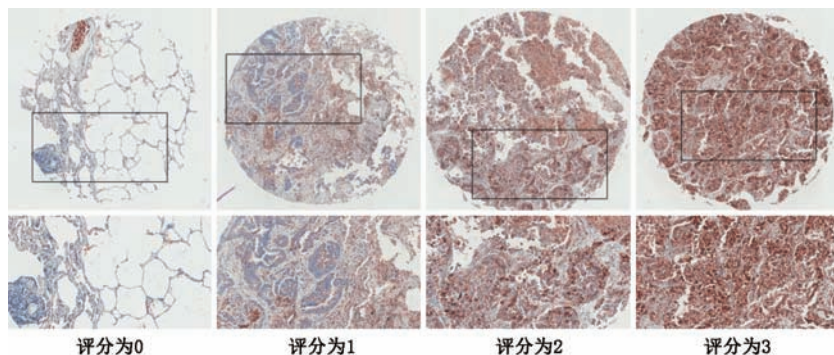


图1 肺癌组织芯片 *stomatin* 蛋白免疫组织化学染色评分例图



购自北京华阜康生物科技有限公司。采用抽签法将裸鼠随机分为 2 组, 每组 3 只, 分别于其右侧腋下脂肪垫接种  $3 \times 10^6$  个 A549-shnc 或 A549-shstom 细胞。7 d 以后, 每隔 3 d 测量裸鼠腋下肿瘤的长(短)径并计算肿瘤体积。第 43 天处死小鼠, 剥离腋下肿瘤并以福尔马林固定, 石蜡包埋切片, 对肿瘤组织 stomatin、Ki67 和 CD31 蛋白进行免疫组织化学染色, 采用 ImageJ 图像处理软件测定蛋白表达水平。

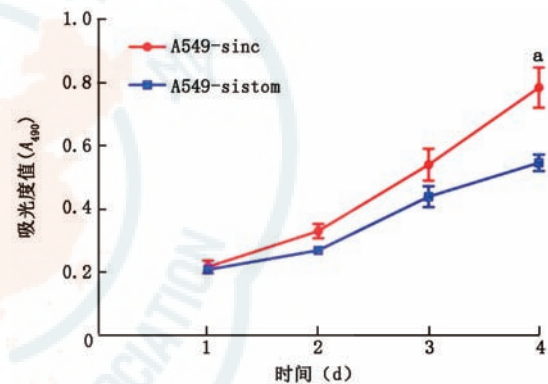
9. 统计学分析: 采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析。A549-sistom 和 A549-sinc 细胞 stomatin mRNA 表达水平、吸光度值、细胞晚期凋亡占比、裸鼠成瘤实验肿瘤体积、stomatin 和 AKT 丝氨酸 473 位点磷酸化蛋白灰度值、裸鼠腋下肿瘤免疫组织化学染色 stomatin、Ki67 和 CD31 蛋白表达水平等变量均符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用 *t* 检验; 人肺癌组织体积、细胞早期凋亡占比和总 AKT 蛋白灰度值数据不符合正态分布, 以  $M(IQR)$  表示, 组间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验; 分类资料以百分比表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验; H520、A549、95D、H460、Glc-82、973、H1299 和 HBE 细胞中 stomatin mRNA 表达量不符合正态分布, 以  $M$ (极差) 表示, 采用多组独立样本比较的秩和检验 (Kruskal-Wallis *H*)。双侧检验, 检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 结 果

1. 肺癌细胞和肺癌组织 stomatin 蛋白表达情况: H520、A549、95D、H460、Glc-82、973、H1299 和 HBE 细胞 stomatin mRNA 表达水平  $M$ (极差) 分别为 2.71 (2.66)、3.55 (3.16)、0.26 (0.22)、2.08 (1.98)、0.87 (0.35)、1.72 (2.53)、1.10 (1.82) 和 0.01 (0.02), 其中 H520、A549 和 H460 细胞 stomatin mRNA 表达水平高于 HBE 细胞 ( $\chi^2$  值分别为 27.80、31.30、24.00,  $P$  值均  $<0.05$ ), 95D、Glc-82、973 和 H1299 细胞 stomatin mRNA 表达水平  $M$ (极差) 与 HBE 细胞差异无统计学意义 ( $\chi^2$  值分别为 5.00, 17.60, 22.90, 11.40,  $P$  值均  $>0.05$ )。肺癌组织 stomatin 蛋白表达阳性率为 34.7% (90/259), 高于癌旁组织 [1.9% (5/259)] ( $\chi^2=93.13, P<0.05$ ), 肺鳞癌和肺腺癌 stomatin 蛋白表达阳性率分别为 33.8% (24/71) 和 36.5% (66/181), 差异无统计学意义 ( $\chi^2=0.16, P>0.05$ )。stomatin 蛋白表达阳性肺癌组织中, 低表达组 (67 例) 肿瘤体积 ( $\text{cm}^3$ )  $M(IQR)$  为 41.22 (2 761.50), 小于高表达组 [23 例, 57.98 (1 333.50)] ( $U=483.50,$

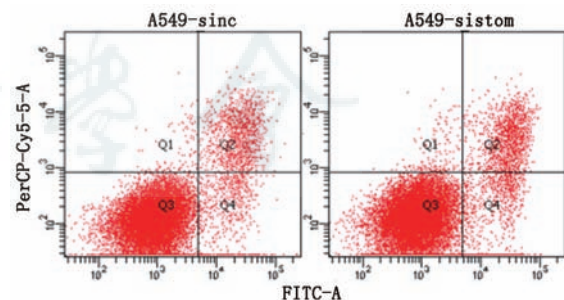
$P<0.05$ )。

2. 敲降 stomatin 基因表达抑制 A549 细胞增殖并诱导凋亡: A549-sistom 细胞 stomatin mRNA 相对表达水平为  $0.09 \pm 0.01$ , 低于 A549-sinc 细胞 ( $0.88 \pm 0.06$ ) ( $t=16.23, P=0.004$ )。噻唑蓝比色法检测显示: A549-sinc 和 A549-sistom 细胞孵育第 4 天吸光度值分别为  $0.79 \pm 0.16$  和  $0.55 \pm 0.07$ , 差异有统计学意义 ( $t=3.45, P=0.012$ ) (图 2)。A549-sistom 细胞早期凋亡细胞占比  $M(IQR)$  为 8.83 (53.00), 高于 A549-sinc 细胞 [4.17 (25.00)] ( $U=4.00, P=0.026$ ); A549-sinc 和 A549-sistom 晚期凋亡细胞占比分别为  $(4.44 \pm 0.49)\%$  和  $(4.87 \pm 0.52)\%$ , 差异无统计学意义 ( $t=0.61, P=0.557$ ) (图 3)。



注: A549-sinc: 转染空载体质粒的 A549 细胞; A549-sistom: 利用 stomatin RNA 干扰质粒转染的 A549 细胞; 各时点的垂直线段为标准误差;  $*P<0.05$

图 2 噻唑蓝比色法检测敲降 stomatin 基因表达对 A549 细胞增殖的影响

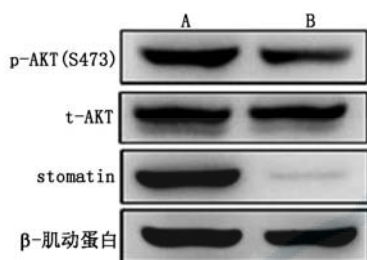


注: A549-sinc: 转染空载体质粒的 A549 细胞; A549-sistom: 利用 stomatin RNA 干扰质粒转染的 A549 细胞; Q2 和 Q4 象限分别为晚期和早期凋亡细胞; Q1 象限为坏死细胞 (包含机械损伤细胞), Q3 象限为活细胞

图 3 流式细胞仪检测 stomatin 基因敲降对 A549 细胞凋亡的影响

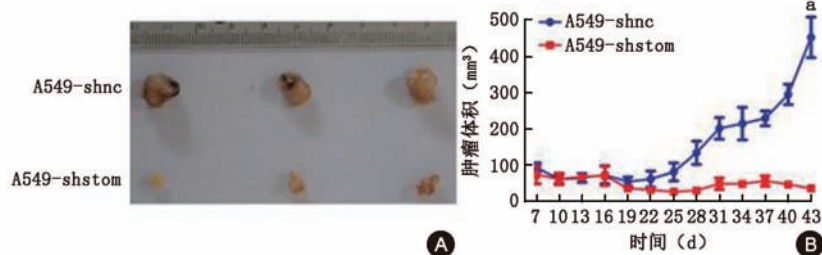
3. stomatin 蛋白对 A549 细胞丝氨酸 473 位点磷酸化 AKT 蛋白表达的影响: Western 印迹显示: A549-sistom 细胞 stomatin 蛋白表达水平为  $(0.40 \pm$

0.02), 低于 A549-sinc 细胞 ( $1.01 \pm 0.22$ ) ( $t=6.03, P < 0.05$ )。A549-sistom 细胞丝氨酸 473 位点磷酸化 AKT 蛋白表达水平为  $0.68 \pm 0.16$ , 低于 A549-sinc 细胞 ( $1.16 \pm 0.39$ ) ( $t=2.57, P < 0.05$ ), A549-sinc 细胞和 A549-sistom 细胞 t-AKT 表达水平  $M(IQR)$  分别为 4.75 (19.00) 和 4.25 (17.00), 差异无统计学意义 ( $U=7.00, P > 0.05$ ) (图 4)。

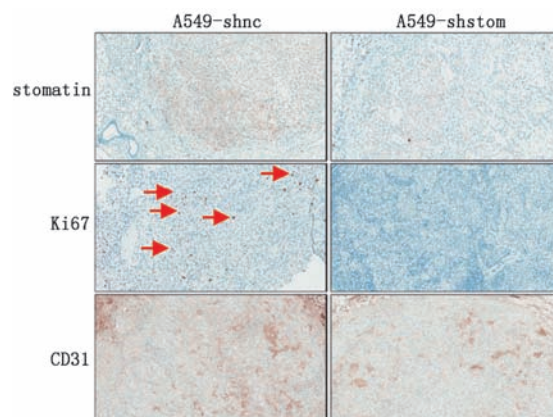


注: t-AKT: 总 AKT 蛋白; p-AKT(S473): 丝氨酸 473 位点磷酸化 AKT 蛋白;  $\beta$ -actin:  $\beta$  肌动蛋白 (参照蛋白); A (A549-sinc): 转染空载体质粒的 A549 细胞; B (A549-sistom): 转染 stomatin RNA 干扰质粒的 A549 细胞  
图 4 敲降 stomatin 基因表达对 A549 细胞 t-AKT 和 p-AKT(S473) 蛋白表达的影响

4. 敲降 stomatin 基因表达抑制 A549 细胞裸鼠皮下成瘤: 腋下接种 A549-shstom 细胞裸鼠第 43 天肿瘤体积为 ( $37.93 \pm 3.12$ )  $\text{mm}^3$ , 明显小于接种 A549-shnc 细胞组 [ $(454.04 \pm 32.39) \text{mm}^3$ ] ( $t=12.79, P < 0.001$ ) (图 5)。免疫组织化学染色显示: A549-shstom 组肿瘤组织 stomatin、Ki67 和 CD31 蛋白表达水平分别为  $1.78 \pm 0.69$ 、 $5.19 \pm 3.84$  和  $10.77 \pm 1.67$ , 均低于 A549-shnc 组 (分别为  $17.52 \pm 8.76$ 、 $54.14 \pm 41.02$  和  $19.72 \pm 6.97$ ) ( $t$  值分别为 4.74、3.75 和 2.79,  $P$  值均  $< 0.05$ , 图 6)。



注: A549-shnc: 感染空载体病毒的 A549 细胞; A549-shstom: 利用 stomatin RNA 干扰慢病毒感染的 A549 细胞;  $^a P < 0.05$   
图 5 敲降 stomatin 基因表达对 A549 细胞裸鼠皮下成瘤的影响 A: 小鼠腋下肿瘤组织; B: 裸鼠皮下肿瘤生长曲线



注: 红色箭头指示为 Ki67 染色阳性; A549-shnc: 感染空载体病毒的 A549 细胞; A549-shstom: 利用 stomatin RNA 干扰慢病毒感染的 A549 细胞; stomatin: stomatin 蛋白; Ki67: 核增殖抗原; CD31: 血小板-内皮细胞黏附分子

图 6 敲降 stomatin 基因表达对小鼠腋下肿瘤组织蛋白表达的影响 (二氨基联苯胺染色  $\times 100$  倍)

## 讨 论

stomatin 蛋白家族成员包括 stomatin、stomatin 样蛋白 1-3 (SLP-1, SLP-2, SLP-3) 和 podocin<sup>[15]</sup>。其中, SLP-2 在多种肿瘤中表达升高, 与不良预后及远端转移密切相关<sup>[16-20]</sup>, 提示其他家族成员 (如 stomatin 蛋白) 也可能在肿瘤形成及进展过程中发挥作用。本研究发现 stomatin 蛋白在肺癌组织中表达升高, 与 Arkhipova 等<sup>[13]</sup>的结果不一致, 推测原因在于样本量及检测方法存在差异。Arkhipova 检测了 48 份肺癌组织 stomatin mRNA 的表达情况, 本研究检测了 259 例肺癌 stomatin 蛋白质的表达。本研究利用较大的样本量和多项体、内外实验从不同角度证实了 stomatin 蛋白对肺癌发生具有促进作用, 结论真实性较好。

磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3K)/AKT 在肺癌发生早期即被激活<sup>[21]</sup>。PI3K 激活后可磷酸化其磷脂底物, 产生第二种信使。第二种信使积累会产生接头位点, 募集下游效应蛋白并与之结合。磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 使 AKT T308 位点磷酸化, 雷帕霉素复合物 2 使 AKT S473 位点磷酸化, 从而激活 AKT 信号通路<sup>[22-24]</sup>, 活化的 AKT 磷酸化下游多种底物, 影响细胞增殖、存活及代谢<sup>[25]</sup>。本研究发现 stomatin 蛋白可提高丝氨酸 473 位



点磷酸化 AKT 蛋白表达水平,提示 stomatin 蛋白可能通过激活 AKT 通路影响肺癌细胞的增殖和凋亡。前期研究发现,PI3K/AKT 信号通路能调节多种营养转运蛋白、代谢通路蛋白及其转录因子的表达<sup>[26]</sup>;抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路可有效抑制表皮生长因子受体突变肺腺癌细胞的 GLUT1 膜定位,影响细胞的有氧糖酵解<sup>[27]</sup>。此外,PI3K/AKT 还可通过调控硫氧还蛋白相互作用蛋白促进细胞葡萄糖吸收<sup>[28]</sup>。以上研究提示 AKT 通路参与肿瘤细胞葡萄糖代谢过程,推测 stomatin 蛋白可能是调控细胞增殖和葡萄糖转运的重要因素,有必要对 stomatin 蛋白是否通过调控 AKT 通路影响 GLUT1 膜定位,从而调控细胞代谢及增殖做深入研究,以期探索肺癌诊疗新方法提供新的靶点和研究思路。

H520、A549 和 H460 细胞 stomatin mRNA 表达水平高于 HBE 细胞,其他 4 株肺癌细胞 stomatin mRNA 表达水平与 HBE 细胞相比,差异无统计学意义。这与组织芯片染色结果相符,在 259 份肿瘤组织中 stomatin 表达阳性率为 30% 左右,即 stomatin 蛋白仅表达于部分肿瘤组织,这也证实了肺癌组织具有高度异质性。

本研究的局限性在于:本研究选取的 4 张肺癌组织芯片主要包括肺腺癌及肺鳞状细胞癌组织样本,缺乏其他非小细胞癌(如大细胞癌、肉瘤样癌)及小细胞癌的组织样本,因而,本研究无法确定 stomatin 蛋白在非肺腺癌及肺鳞状细胞癌组织中的表达情况。此外,本研究仅对 stomatin 蛋白促进肺癌细胞增殖的作用机制做了初步探索,后续有必要对其调控 AKT 信号通路的作用机制进行深入研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参 考 文 献

- [1] Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments[J]. *Lancet*, 2017, 389(10066): 299-311. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)30958-8.
- [2] Stewart GW, Hepworth-Jones BE, Keen JN, et al. Isolation of cDNA coding for an ubiquitous membrane protein deficient in high Na<sup>+</sup>, low K<sup>+</sup> stomatocytic erythrocytes[J]. *Blood*, 1992, 79(6):1593-1601.
- [3] Genetet S, Desrames A, Chouali Y, et al. Stomatin modulates the activity of the Anion Exchanger 1 (AE1, SLC4A1)[J]. *Sci Rep*, 2017,7:46170. DOI: 10.1038/srep46170
- [4] Moshourab RA, Wetzel C, Martinez-Salgado C, et al. Stomatin-domain protein interactions with acid-sensing ion channels modulate nociceptor mechanosensitivity[J]. *J Physiol*, 2013, 591(22): 5555-5574. DOI: 10.1113/jphysiol.2013.261180.
- [5] Montel-Hagen A, Kinet S, Manel N, et al. Erythrocyte Glut1 triggers dehydroascorbic acid uptake in mammals unable to synthesize vitamin C[J]. *Cell*, 2008, 132(6): 1039-1048. DOI: 10.1016/j.cell.2008.01.042.
- [6] Rungaldier S, Oberwagner W, Salzer U, et al. Stomatin interacts with GLUT1 / SLC2A1, band 3 / SLC4A1, and aquaporin-1 in human erythrocyte membrane domains[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013,1828(3):956-966. DOI: 10.1016/j.bbame.2012.11.030.
- [7] Chen JC, Cai HY, Wang Y, et al. Up-regulation of stomatin expression by hypoxia and glucocorticoid stabilizes membrane-associated actin in alveolar epithelial cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2013, 17(7): 863-872. DOI: 10.1111/jcmm.12069.
- [8] Rungaldier S, Umlauf E, Mairhofer M, et al. Structure-function analysis of human stomatin: A mutation study[J]. *PLoS One*, 2017,12(6):e0178646. DOI: 10.1371/journal.pone.0178646.
- [9] Lee JH, Hsieh CF, Liu HW, et al. Lipid raft-associated stomatin enhances cell fusion[J]. *FASEB J*, 2017, 31(1):47-59. DOI: 10.1096/fj.201600643R.
- [10] Subramanian S, West RB, Corless CL, et al. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) with KIT and PDGFRA mutations have distinct gene expression profiles[J]. *Oncogene*, 2004, 23(47):7780-7790. DOI: 10.1038/sj.onc.1208056.
- [11] Jinawath N, Furukawa Y, Nakamura Y. Identification of NOL8, a nucleolar protein containing an RNA recognition motif (RRM), which was overexpressed in diffuse-type gastric cancer[J]. *Cancer Sci*, 2004, 95(5): 430-435. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2004.tb03227.x.
- [12] Kwon HC, Kim SH, Roh MS, et al. Gene expression profiling in lymph node-positive and lymph node-negative colorectal cancer[J]. *Dis Colon Rectum*, 2004, 47(2): 141-152. DOI: 10.1007/s10350-003-0032-7.
- [13] Arkhipova KA, Sheyderman AN, Laktionov KK, et al. Simultaneous expression of flotillin-1, flotillin-2, stomatin and caveolin-1 in non-small cell lung cancer and soft tissue sarcomas[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 100. DOI: 10.1186/1471-2407-14-100.
- [14] Chen CY, Yang CY, Chen YC, et al. Decreased expression of stomatin predicts poor prognosis in HER2-positive breast cancer[J]. *BMC Cancer*, 2016, 16(1): 697. DOI: 10.1186/s12885-016-2681-7.
- [15] Lapatsina L, Brand J, Poole K, et al. Stomatin-domain proteins [J]. *Eur J Cell Biol*, 2012, 91(4): 240-245. DOI: 10.1016/j.ejcb.2011.01.018.
- [16] Wang WX, Lin QF, Shen D, et al. Clinicopathological significance of SLP-2 overexpression in human gallbladder cancer[J]. *Tumour Biol*, 2014,35(1):419-423. DOI: 10.1007/s13277-013-1058-7.
- [17] Liu D, Zhang L, Shen Z, et al. Increased levels of SLP-2 correlate with poor prognosis in gastric cancer[J]. *Gastric Cancer*, 2013, 16(4): 498-504. DOI: 10.1007/s10120-013-0232-3.
- [18] Li XH, He F, Yan SM, et al. Increased expression of stomatin-like protein 2 (STOML2) predicts decreased survival in gastric adenocarcinoma: a retrospective study[J]. *Med Oncol*, 2014, 31(1):763. DOI: 10.1007/s12032-013-0763-9.

- [19] Yang CT, Li JM, Li LF, et al. Stomatin-like protein 2 regulates survivin expression in non-small cell lung cancer cells through  $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(4): 425. DOI: 10.1038/s41419-018-0461-9.
- [20] Zhang J, Song X, Li C, et al. Expression and clinical significance of SLP-2 in ovarian tumors[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(5):4626-4632. DOI: 10.3892/ol.2019.10116.
- [21] West KA, Linnoila IR, Belinsky SA, et al. Tobacco carcinogen-induced cellular transformation increases activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway in vitro and in vivo[J]. *Cancer Res*, 2004,64(2):446-451. DOI: 10.1158/0008-5472.can-03-3241.
- [22] Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1[J]. *EMBO J*, 1996,15(23):6541-6551.
- [23] Alessi DR, James SR, Downes CP, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B $\alpha$ [J]. *Curr Biol*, 1997, 7(4): 261-269. DOI: 10.1016 / s0960-9822(06)00122-9.
- [24] Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, et al. Phosphorylation and regulation of Akt / PKB by the rictor-mTOR complex[J]. *Science*, 2005, 307(5712): 1098-1101. DOI: 10.1126 / science.1106148.
- [25] Manning BD and Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network[J]. *Cell*, 2017, 169(3):381-405. DOI: 10.1016/j.cell.2017.04.001
- [26] Hoxhaj G, Manning BD. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism[J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(2): 74-88. DOI: 10.1038 / s41568-019-0216-7.
- [27] Makinoshima H, Takita M, Saruwatari K, et al. Signaling through the Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Axis Is Responsible for Aerobic Glycolysis mediated by Glucose Transporter in Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-mutated Lung Adenocarcinoma[J]. *J Biol Chem*, 2015,290(28):17495-17504. DOI: 10.1074/jbc.M115.660498.
- [28] Hong SY, Yu FX, Luo Y, et al. Oncogenic activation of the PI3K / Akt pathway promotes cellular glucose uptake by downregulating the expression of thioredoxin-interacting protein[J]. *Cell Signal*, 2016, 28(5):377-383. DOI: 10.1016/j.cellsig.2016.01.011.

(收稿日期:2020-04-26)

(本文编辑:吕相征)

## ·文献速览·

## 二甲双胍通过沉默 MATE1 表达富集在细胞内选择性抑制 KRAS 突变转移性结肠癌

Xie J, Xia L, Xiang W, et al. Metformin selectively inhibits metastatic colorectal cancer with the KRAS mutation by intracellular accumulation through silencing MATE1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020, 117(23):13012-13022. DOI: 10.1073/pnas.1918845117.

结肠癌(CRC)是常见癌症之一,转移是导致死亡的主要原因。近期研究发现一线化疗药物伊立替康或奥沙利铂联合表皮生长因子受体(EGFR)靶向药物可将转移性结直肠癌(mCRC)患者中位总体生存期提高2年以上。然而, KRAS 突变的结肠癌患者(约30%~50%)表现对 EGFR 靶向药物的耐药性。因此,EGFR 靶向药物不能用于 KRAS 突变的 mCRC 患者治疗。前期多项研究指出二甲双胍具有抗肿瘤作用,且服用二甲双胍与患者良好预后密切相关。然而,多项回顾性研究发现二甲双胍与癌症患者预后不相关,关于二甲双胍对肿瘤的治疗作用及分子机制尚存在诸多问题和分歧。

本研究首先通过回顾性分析发现接受二甲双胍治疗的 KRAS 突变型 mCRC 糖尿病患者的中位生存时间比其他降

糖药联合标准系统疗法的患者长 37.8 个月,表明二甲双胍与结肠癌患者总体生存之间的关联,仅限于有 KRAS 突变的患者中。患者来源的 KRAS 突变型和 KRAS 野生型原代细胞接种小鼠实验中发现,二甲双胍优先积累在 KRAS 突变的 mCRC 细胞中。通过机制研究发现, KRAS 突变通过甲基化沉默多种药物和有毒化合物排出 1(MATE1)蛋白的表达,从而使 KRAS 突变肿瘤细胞内富集二甲双胍,富集的二甲双胍通过抑制 RAS/ERK 和 AKT/mTOR 通路抑制 KRAS 突变肿瘤细胞增殖。本研究表明 KRAS 突变 mCRC 患者将受益于二甲双胍治疗,靶向 MATE1 可能改善二甲双胍治疗效果,揭示二甲双胍治疗 mCRC 的分子机制。

(安华英编译 北京协和医学院中国医学科学院肿瘤医院)