

Gab2 基因在肺癌细胞表达及对癌细胞凋亡及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响

范亚峰, 崔晓燕, 虞中平, 李海燕, 张开明
(山西省肿瘤医院, 山西 太原 030013)

摘要: [目的] 探讨 Gab2 结合蛋白 2 (Gab2) 基因在肺癌细胞表达及对癌细胞凋亡及 Wnt 信号/ β -连环蛋白 (β -catenin) 信号通路的影响。 [方法] 以人胚肺成纤维细胞 MRC5 作为对照细胞, 通过 Western blotting 检测肺癌 H322、A549、PC9、H1299、SPC-A-1 细胞中 Gab2 的蛋白表达; 转染 48h 后 Western blotting 检测 Gab2、Cleaved Caspase-3、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、 β -连环蛋白 (β -catenin)、细胞周期素 D1 (cyclin D1)、c-myc 蛋白表达; 流式细胞术检测各组细胞的凋亡情况。 [结果] 与 MRC5 细胞比较, Gab2 在肺癌细胞中的表达显著性升高 ($P < 0.05$)。与对照组比较, Gab2-siRNA 组 Gab2 的蛋白表达降低, 细胞凋亡率升高, Cleaved caspase3 和 Bax 蛋白上调表达, Bcl-2、 β -catenin、cyclin D1、c-myc 蛋白表达下调, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。 [结论] 抑制肺癌细胞 Gab2 表达能诱导细胞凋亡, 机制是下调 Wnt/ β -catenin 信号通路。

关键词: Gab2 基因; 肺癌; 凋亡; Wnt/ β -catenin 信号通路

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)03-0213-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.03.B008

Expression of Gab2 Binding Protein 2 in Lung Cancer Cells and Its Relation to Apoptosis and Wnt/ β -catenin Signaling Pathway

FAN Ya-feng, CUI Xiao-yan, YU Zhong-ping, LI Hai-yan, ZHANG Kai-ming
(Shanxi Provincial Cancer Hospital, Taiyuan 030013, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of Gab2 gene in lung cancer cells and its relation to apoptosis and Wnt/ β -catenin signaling pathway. [Methods] The expression of Gab2 protein in lung cancer H322, A549, PC9, H1299, SPC-A-1 cells and human embryonic lung fibroblast MRC5 cells was detected by Western blotting. The expression of Gab2, cleaved caspase3, Bcl-2, Bax, β -catenin, cyclin D1, c-myc protein were detected by Western blotting cells, cell apoptosis was detected by flow cytometry 48h after cells transfected with Gab2-siRNA. [Results] Compared with MRC5 cells, the expression of Gab2 in lung cancer cells increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression of Gab2 protein in Gab2-siRNA group was decreased, apoptosis rate increased, the expressions of cleaved caspase3 and Bax protein were up-regulated, and the expression of Bcl-2, β -catenin, cyclin D1 and c-myc protein was down-regulated (all $P < 0.05$). [Conclusion] The expression of Gab2 in lung cancer cells is increased, inhibition of Gab2 expression induces apoptosis of lung cancer cells, which is associated with the down-regulated Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Subject words: Gab2 gene; lung cancer; apoptosis; Wnt/ β -catenin signaling pathway

近些年来,我国肺癌发病率呈上升趋势,肺癌5年生存率仍然很低^[1,2]。肺癌的发生及发展与癌基因的激活、抑癌基因的失活等密切相关,寻找用于肺

癌诊断及分子靶向治疗的靶点对于肺癌治疗有重要意义。Gab2 结合蛋白 2 (Gab2 binding protein 2, Gab2) 是 Gab 家族中的一员,多项研究发现,Gab2 可通过多种胞内外因素调控细胞的增殖、凋亡、侵袭迁移等过程^[3]。目前 Gab2 被认为是一个与肿瘤相关的蛋白,已有研究发现其在多种肿瘤有高表达,

通信作者: 范亚峰,副主任医师,博士;山西省肿瘤医院疼痛科,山西省太原市职工新街3号(030013);E-mail:exposure_alex66@163.com

收稿日期: 2018-01-30; **修回日期:** 2018-05-03

如卵巢癌、结直肠癌等,其表达与肿瘤的侵袭转移密切相关^[4,5]。肺癌细胞中通过 RNA 干扰抑制 Gab2 的表达可显著性降低癌细胞的侵袭能力^[6],但关于 Gab2 表达对肺癌细胞凋亡的影响尚未明确。本研究通过 Western blotting 检测不同肺癌细胞 Gab2 的表达,通过 RNA 干扰技术抑制其表达,检测细胞凋亡情况,并进一步检测对凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase-3、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax) 及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响,为肺癌分子靶向治疗提供新参考依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂和仪器

人胚肺成纤维细胞 MRC5 及肺癌 H322、A549、PC9、H1299、SPC-A-1 细胞均购自中国科学院上海细胞库;胎牛血清、RPMI1640 培养基购自美国 Sigma 公司;Gab2、Cleaved Caspase-3、Bcl-2、Bax、 β -连环蛋白(β -catenin)、细胞周期素 D1 (cyclin D1)、c-myc 抗体均购自美国 Abcam 公司;膜联蛋白 V(Annexin V)-异硫/碘化丙锭(PI)细胞凋亡试剂盒及流式细胞仪均购自美国 BD 公司。

1.2 细胞培养

人胚肺成纤维细胞 MRC5 及肺癌 H322、A549、PC9、H1299、SPC-A-1 细胞置于 37℃、5%CO₂ 饱和湿度条件下用含有 10%胎牛血清的 PRMI1640 培养基培养。

1.3 肺癌细胞中 Gab2 表达检测

按照细胞蛋白提取试剂盒的步骤提取细胞中的蛋白,BCA 法对蛋白定量,每孔取 50 μ g 总蛋白,加上样缓冲液 100℃煮沸变性 5min,行 10%SDS-PAGE 电泳分离,电泳后转移至硝酸纤维素膜,5%脱脂奶粉溶液封闭过夜,洗膜,4℃孵育皆按照 1:1000 稀释的 Gab2 和 GAPDH 抗体过夜,洗膜,加入二抗,室温孵育 1h,洗膜,增强型 ECL 化学发光显色试剂盒检测,Quantity One 软件对图像进行分析,以目的蛋白条带与内参 GAPDH 蛋白条带的灰度值比值作为目的蛋白的蛋白相对表达量。实验重复 3 次。

1.4 细胞 siRNA 转染

转染前 1d 将生长至对数期的 SPC-A-1 细胞以

2 \times 10⁵/ml 接种于 6 孔板,每孔 2ml,细胞生长达到 80%~90%汇合度时进行转染。细胞转染分为对照组、NC-siRNA 组和 Gab2-siRNA 组,对照组转染空脂质体,NC-siRNA 组和 Gab2-siRNA 组分别转染 100nmol/L 合成的阴性 siRNA 及 Gab2 的 siRNA。转染参照脂质体 LipofectamineTM2000 转染说明进行操作。每组设置 5 个复孔。6h 后更换新的培养基继续培养用于实验研究。

1.5 转染后的细胞中 Gab2、Cleaved caspase3、Bcl-2、Bax、 β -catenin、cyclin D1、c-myc 蛋白表达检测

收集转染 48h 的细胞,按照 1.3 方法检测各组细胞中蛋白的表达。实验重复 3 次。

1.6 细胞凋亡实验

收集转染 48h 的细胞,预冷的磷酸盐缓冲液洗涤细胞,收集细胞沉淀,结合缓冲液重悬细胞,Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒检测各组细胞的凋亡情况。

1.7 统计学处理

数据采用 SPSS21.0 软件进行分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组差异比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺癌细胞 Gab2 表达

以人胚肺成纤维细胞 MRC5 作为对照细胞,通过 Western blotting 检测肺癌 H322、A549、PC9、H1299、SPC-A-1 细胞中 Gab2 的蛋白表达,结果如图 Figure 1 和 Table 1 所示。与 MRC5 对照细胞比较,Gab2 在肺癌细胞中的表达显著性升高(*P*<0.05)。选择 SPC-A-1 细胞作为研究对象。

2.2 转染效果

Gab2 siRNA 转染 SPC-A-1 细胞 48h 后,Gab2

Table 1 Relative expression of Gab2 protein in lung cancer cells

Cell	Relative expression of Gab2 protein
MRC5	0.118 \pm 0.015
H322	0.262 \pm 0.021*
A549	0.468 \pm 0.039*
PC9	0.382 \pm 0.032*
H1299	0.394 \pm 0.036*
SPC-A-1	0.756 \pm 0.053*

*:Compared with MRC5 cells,*P*<0.05.

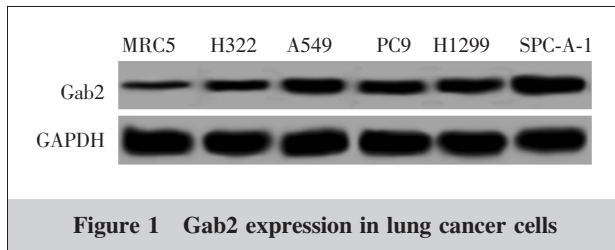


Figure 1 Gab2 expression in lung cancer cells

蛋白表达检测结果如 Figure 2 和 Table 2 所示, Gab2-siRNA 组 Gab2 蛋白表达显著性低于对照组 ($P<0.05$), NC-siRNA 组 Gab2 蛋白表达与对照组差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.3 转染 Gab2 siRNA 诱导 SPC-A-1 细胞凋亡

与对照组比较, Gab2-siRNA 组细胞凋亡率显著性升高 ($P<0.05$), Cleaved caspase3、Bax 蛋白表达显著性升高 ($P<0.05$), Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$) (Figure 3, 4, Table 3)。

2.4 转染 Gab2 siRNA 抑制 SPC-A-1 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路

与对照组比较, Gab2-siRNA 组 cyclin D1、c-myc 蛋白表达均显著性降低 ($P<0.05$) (Figure 5, Table 4)。

3 讨论

Gab2 是 Gab 家族的一个重要成员, 编码基因定位于 11q14.1 染色体, 在心、脑、肺、卵巢、肾和睾丸组织中有高表达, 淋巴结组织有低表达^[7,8]。近些年来, 已有大量研究发现在多种肿瘤中 Gab2 异常表达。结肠癌中 Gab2 高表达患者生存期明显降低^[9]; 神经胶质瘤中 Gab2 有高表达, 其表达随着临床病理级别增高而增加, 通过 RNA 干扰其表达后细胞的趋化能力、侵袭能力和迁移能力均显著性降低^[10,11]; 胃腺癌中通过 RNA 干扰抑制 Gab2 的表达后癌细胞的增殖明显受到抑制, 凋亡增加^[12]。提示 Gab2 可能是一个重要的致癌基因, 可能对肺

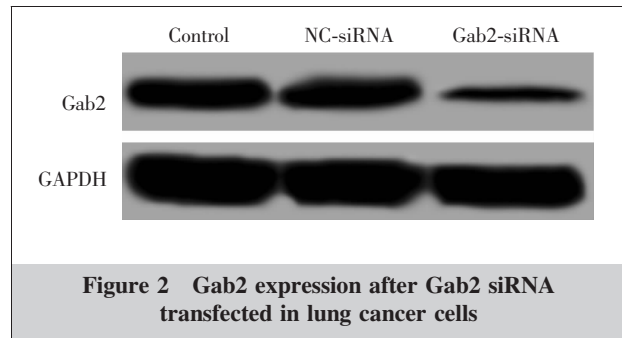


Figure 2 Gab2 expression after Gab2 siRNA transfected in lung cancer cells

Table 2 Gab2 expression after Gab2 siRNA transfected in lung cancer cells

Group	Relative expression of Gab2 protein
Control group	0.452±0.040
NC-siRNA group	0.423±0.038
Gab2-siRNA group	0.123±0.014*

*: Compared with control group, $P<0.05$

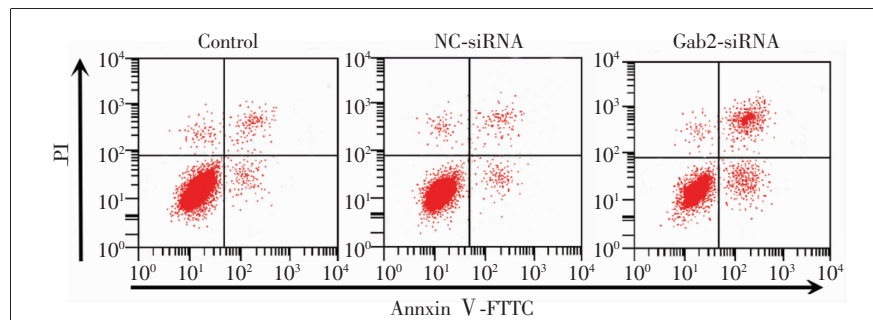


Figure 3 Effect of Gab2 siRNA on apoptosis of SPC-A-1 cell

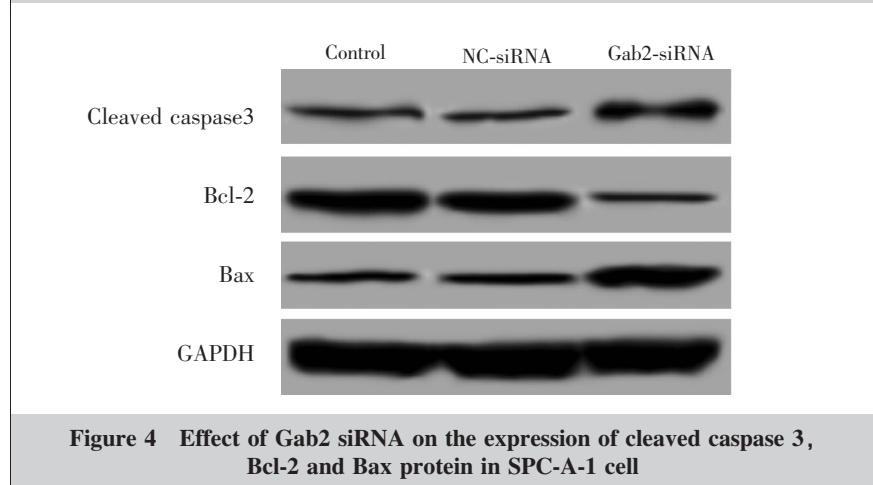


Figure 4 Effect of Gab2 siRNA on the expression of cleaved caspase 3, Bcl-2 and Bax protein in SPC-A-1 cell

Table 3 Effect of Gab2 siRNA on apoptosis of SPC-A-1 cells

Group	Apoptosis rate(%)	Cleaved caspase3	Bcl-2	Bax
Control group	1.78±0.35	0.109±0.010	0.549±0.048	0.128±0.014
NC-siRNA group	1.72±0.34	0.106±0.010	0.531±0.046	0.139±0.015
Gab2-siRNA group	12.63±0.61*	0.263±0.018*	0.103±0.009*	0.525±0.042*

*: Compared with control group, $P<0.05$.

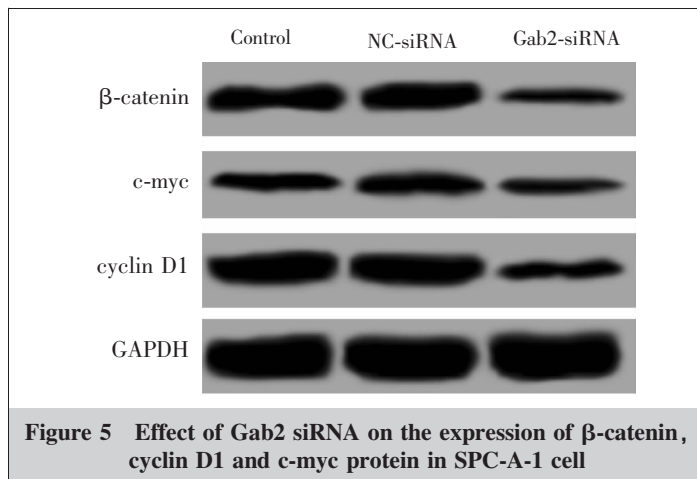


Table 4 Effect of Gab2 siRNA on the expression of β -catenin, cyclin D1 and c-myc protein in SPC-A-1 cell

Group	β -catenin	c-myc	cyclin D1
Control group	0.425±0.045	0.256±0.023	0.725±0.059
NC-siRNA group	0.448±0.047	0.283±0.027	0.741±0.063
Gab2-siRNA group	0.136±0.016*	0.141±0.015*	0.238±0.029*

*: Compared with control group, $P < 0.05$

癌生物学特性也有一定的影响。

通过 Western blotting 检测不同肺癌细胞 Gab2 的表达,发现其在肺癌细胞中均有高表达。SPC-A-1 细胞表达最高。RNA 干扰是研究基因功能有效的途径,目前已得到广泛的应用^[13]。通过 RNA 干扰技术抑制 SPC-A-1 细胞 Gab2 表达,检测细胞的凋亡情况,结果发现细胞的凋亡率明显增加。凋亡是细胞的一种程序性死亡方法,受到 Bcl-2 家族和 Caspase 家族的调控。Bcl-2 是 Bcl-2 家族的凋亡抑制基因,可阻断细胞发生凋亡,Bax 是 Bcl-2 家族的凋亡促进基因,可遏制 Bcl-2 对细胞凋亡的抑制作用。大量研究显示 Bax 和 Bcl-2 在肺癌、肝癌等多种肿瘤中均有表达^[14,15]。Caspase 3 是 Caspase 家族的关键酶,与细胞凋亡的关系最密切,处在 Caspase 级联反应的下游,激活后可活化 Caspase 级联反应,最终引起细胞凋亡^[16]。RNA 干扰抑制 Gab2 表达诱导肺癌细胞凋亡的方式是否通过调控 Bax、Bcl-2 和 Cleaved caspase3 表达还未清楚。本研究发现, RNA 干扰抑制 Gab2 表达后 Bax 和 Cleaved caspase3 表达上调, Bcl-2 表达下调,这提示 Gab2 可通过影响 Bcl-2 家族和 Caspase 族基因表达诱导肺癌细胞凋亡。

Wnt/ β -catenin 信号通路参与多种生命活动过程,在多种肿瘤中,如肺癌、胃癌等, β -catenin 表达

可通过 Wnt/ β -catenin 对下游的 cyclinD1、c-myc 等基因转录进行调控,进而影响肿瘤发生发展^[17,18]。作为支架蛋白,Gab2 可与多种受体结合,参与 PI3K/AKT、JAK/STAT 等多种信号转导途径,影响肿瘤的生物特性^[19,20]。Gab2 对 Wnt/ β -catenin 影响还未可知。本研究发现, RNA 干扰抑制 Gab2 表达后 Wnt/ β -catenin 信号通路关键分子 β -catenin 及下游靶基因 c-myc、Cyclin D1 蛋白表达均显著性降低,说明抑制肺癌细胞 Gab2 表达可下调 Wnt/ β -catenin 信号通路。

综上所述,抑制肺癌细胞 Gab2 表达可诱导细胞凋亡,机制是下调 Wnt/ β -catenin 信号通路,其诱导凋亡的方式是上调 Bax 和 Cleaved caspase3 表达及下调 Bcl-2 表达。

参考文献:

- [1] An Q, Han C, Zhou Y, et al. Matrine induces cell cycle arrest and apoptosis with recovery of the expression of miR-126 in the A549 non-small cell lung cancer cell line [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(5):4042-4048.
- [2] Garofalo M, Jeon YJ, Nuovo GJ, et al. Correction: MiR-34a/c-dependent PDGFR- α/β downregulation inhibits tumorigenesis and enhances TRAIL-induced apoptosis in lung cancer [J]. PLoS One, 2015, 10(6):e0131729.
- [3] Park YR, Bae SH, Ji W, et al. Gab2 amplification in squamous cell lung cancer of non-smokers [J]. J Korean Med Sci, 2017, 32(11):1784-1791.
- [4] Duckworth C, Zhang L, Carroll SL, et al. Overexpression of Gab2 in ovarian cancer cells promotes tumor growth and angiogenesis by upregulating chemokine expression [J]. Oncogene, 2016, 35(31):4036-4047.
- [5] Ding C, Luo J, Yu W, et al. Gab2 is a novel prognostic factor for colorectal cancer patients [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(3):2779-2786.
- [6] Xu LJ, Wang YC, Lan HW, et al. Gab2-associated binder-2 gene promotes migration of non-small cell lung cancer cells via Akt signaling pathway [J]. Am J Transl Res, 2016, 8(2):1208-1217.
- [7] Tian HY, Li HL, Liu YQ, et al. Gab2 enhances migration ability of breast cancer MCF-7 cells cultured in vitro [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2016, 32(1):80-84. [田红艳, 李洪利, 刘雨清, 等. Gab2 提高体外培养的乳腺癌 MCF-7 细胞迁移能力 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016,

- 32(1):80–84.]
- [8] Gu DH, Mao JH, Pan XD, et al. microRNA-302c-3p inhibits renal cell carcinoma cell proliferation by targeting Grb2-associated binding 2 (Gab2)[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(16):26334–26343.
- [9] Cheng J, Zhong Y, Shuai C, et al. Gab2 mediates hepatocellular carcinogenesis by integrating multiple signaling pathways[J]. *FASEB J*, 2017, 31(12):5530–5542.
- [10] Ma J, Yu J, Liu J, et al. MicroRNA-302 α targets Gab2 to suppress cell proliferation, migration and invasion of glioma[J]. *Oncology Reports*, 2017, 37(2):1159–1167.
- [11] Tian LQ, Liu EQ, Zhu XD, et al. MicroRNA-197 inhibits cell proliferation by targeting Gab2 in glioblastoma[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(5):4279–4288.
- [12] Ding CB, Yu WN, Feng JH, et al. Structure and function of Gab2 and its role in cancer[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(3):4007–4014.
- [13] Park JB, Chang DG, Oh SY, et al. Effect of RNA interference-mediated suppression of p75 on the viability of rat notochordal cells[J]. *Asian Spine J*, 2016, 10(6):985–992.
- [14] Zhao YM, Li YX, Zhu XF, et al. The effect of miR-21 on the proliferation and apoptosis of lung cancer cells[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2017, 37(8):1869–1871. [赵玉明, 李艳星, 朱晓锋, 等. MiR-21 对肺癌细胞增殖与凋亡的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(8):1869–1871.]
- [15] Al-Fatlawi AA, Al-Fatlawi AA, Irshad M, et al. Rice bran phytyc acid induced apoptosis through regulation of Bel-2/Bax and p53 genes in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(8):3731–3736.
- [16] Wu R, Tang S, Wang M, et al. MicroRNA-497 induces apoptosis and suppresses proliferation via the Bel-2/Bax-Caspase9-caspase3 pathway and cyclin D2 protein in HUVECs[J]. *PLoS One*, 2016, 11(12):e0167052.
- [17] Zhang X, Hao J. Development of anticancer agents targeting the Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 74(15):2773–2782.
- [18] Su J, Zhao XH, Liu F, et al. Overexpression of ROR α inhibits target gene expression of Wnt/ β -catenin signaling pathway in human gastric cancer MGC803 cells [J]. *Chin J Cell Bio*, 2016, 38(11):1358–1365. [苏坚, 赵晓红, 刘芳, 等. ROR α 高表达抑制人胃癌 MGC803 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路靶基因表达 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2016, 38(11):1358–1365.]
- [19] Wang C, Gu C, Jeong K J, et al. YAP/TAZ-mediated up-regulation of GAB2 leads to increased sensitivity to growth factor - induced activation of the PI3K pathway[J]. *Cancer res*, 2017, 77(7):1637–1648.
- [20] Zhou Y, Wu PW, Yuan XW, et al. Interleukin-17A inhibits cell autophagy under starvation and promotes cell migration via TAB2/TAB3-p38 mitogen-activated protein kinase pathways in hepatocellular carcinoma [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(2):250–263.