



研究报告

Research Report

结晶型硫化镍通过自噬途径诱导 16HBE 细胞恶性转化癌变

张岚¹, 杨磊², 吕嘉春²

1 广州医学院医学遗传与细胞生物学教研室, 广州, 510182;

2 广州医学院化学致癌研究所, 广州, 510182

✉通讯作者: jiachunlu@163.com; ✉作者

癌症与分子诊断研究, 2012 年, 第 1 卷, 第 3 篇 doi: 10.5376/cmdr.cn.2012.01.0003

收稿日期: 2012 年 03 月 12 日

接受日期: 2012 年 06 月 28 日

发表日期: 2012 年 07 月 12 日

本文首次发表在《基因组学与应用生物学》(2012 年第 31 卷第 3 期 222-225 页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

张岚等, 2012, 结晶型硫化镍通过自噬途径诱导 16HBE 细胞恶性转化癌变, 癌症与分子诊断研究(online) Vol.1 No.3 pp.12-16 (doi: 10.5376/cmdr.cn.2012.01.0003)

引用格式(英文):

Zhang et al., 2012, Crystalline Nickel Sulfide Induced Malignant Transformation of 16HBE Cells through Autophagic Pathway, Aizheng Yu Fenzi Zhenduan Yanjiu (Online) Vol.1 No.3 pp.12-16 (doi: 10.5376/cmdr.cn.2012.01.0003)

摘要 镍化合物广泛存在于人类职业环境中, 是人类发生肺癌的主要危险因素。我们前期研究已证实金属毒物结晶型硫化镍(NiS)的暴露是发生肺癌的重要病因, 但具体的致癌机制仍未明了。本研究利用前期建立的结晶型 NiS 恶性转化人支气管上皮细胞的细胞模型, 首次采用激光共聚焦扫描显微镜成像技术, 在无损伤状态下, 实时观测恶性转化细胞(16HBE-T)和正常细胞(16HBE-N)中自噬体标记蛋白 GFP-LC3 的荧光强度及定位, 并利用 Western Blotting 技术检测细胞内自噬信号通路关键效应分子的表达。共聚焦实验结果表明: 16HBE-T 细胞与 16HBE-N 细胞相比, GFP-LC3 蛋白的点状聚集明显减少, 经测量只有 16HBE-N 细胞的 1/3 左右, 表明自噬水平下降; Western Blotting 检测发现: mTOR 激酶活性上升, Beclin 1 表达下降。上述结果证明, 结晶型 NiS 可通过多个自噬途径参与诱导 16HBE 细胞恶性转化的癌变过程, 将为预防和治疗肺癌提供重要信息。

关键词 结晶型硫化镍; 人支气管上皮细胞; 肺癌; 自噬; 自噬体标记蛋白 GFP-LC3; mTOR 激酶; Beclin 1

Crystalline Nickel Sulfide Induced Malignant Transformation of 16HBE Cells through Autophagic Pathway

Zhang Lan¹, Yang Lei², Lv Jiachun²

1 Department of Medical Genetics and Cell Biology, School of Basic Science, Guangzhou Medical College, Guangzhou, 510182;

2 Institute for Chemical Carcinogenesis, Guangzhou Medical College, Guangzhou, 510182

✉Corresponding author: jiachunlu@163.com; ✉Authors

Abstract Nickel compounds, which widely exist in the environment of human occupation, are the major risk factor for human lung cancer. Our previous studies had confirmed that exposure to toxic, metallic crystalline nickel sulfide (NiS) was an important cause of lung cancer, but the concrete carcinogenic mechanism is still unclear. In this study, we used the previously established human bronchial epithelial (16HBE-T) cells malignant transformation model, which was induced by crystalline NiS. For the first time, fluorescence intensity and position of the GFP-LC3 protein in malignant transformed (16HBE-T) cells and normal cell (16HBE-N), were real-time monitored with the technique of confocal laser scanning microscopy imaging without damaging the condition. Moreover, we used Western Blotting to detect the intracellular autophagic signal which is expressed by key effective molecule pathway. Confocal experimental results showed that: Compared with that of 16HBE-N-cells, the GFP-LC3 protein punctate aggregation of 16HBE-T cells significantly reduced to the merely 1/3 amount of 16HBE-N-cells, suggesting that autophagy levels declined. At the same time, it was found that the mTOR kinase activity increased, and that Beclin 1 expression decreased. The above research result demonstrated that the mechanism of crystalline NiS induced 16HBE cell malignant transformation was through multiple autophagic pathway and it will provide an important message in the prevention and treatment of lung cancer.

Keywords Crystalline NiS; 16HBE; Lung cancer; Autophagy; GFP-LC3; mTOR; Beclin 1



肺癌是最常见的恶性肿瘤, 在男性中其发病率和死亡率都已跃居各种恶性肿瘤之首(Jemal et al., 2011)。大量研究表明: 镍化合物是经过人类呼吸道的重要致癌物, 广泛存在于人类职业环境中。国际癌症研究机构(IARC)早在 1987 年就将镍及其化合物确认为第一类致癌物(刘林华等, 2010), 但其致癌的分子机制仍不清楚。我们前期研究已证实金属毒物镍的暴露是发生肺癌的重要病因, 并建立了结晶型硫化镍(NiS)诱导人支气管上皮细胞(16HBE)发生恶性转化的动态模型, 但具体的致癌机制仍未明了(纪卫东等, 2002; Ji et al., 2008)。

自噬(autophagy)是细胞利用溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质的过程, 被称为 II 型程序性死亡, 是真核细胞特有的生命现象(Edinger and Thompson, 2004)。近年来, 随着对自噬研究的不断深入, 其在肿瘤中的作用日渐引起广泛关注。有报道称在肺癌临床样本中检测到自噬相关基因 Beclin 1 表达的下调(Liu et al., 2008), 但由于采取的研究手段有限, 自噬途径具体的作用机制还很不清楚。目前文献报道调控哺乳动物自噬主要的信号通路有两大类: 第一类为依赖 mTOR (mammalian target of rapamycin)激酶途径: mTOR 激酶调节细胞生长, 可抑制自噬的发生, 是自噬的负调控分子(Yang et al., 2005)。mTOR 激活后会磷酸化 Atg13, 使得 Atg13/Atg1/Atg7 复合体解体, 消弱 Atg1 激酶的活性从而阻止自噬的启动(Maiuri et al., 2007)。第二类为不依赖 mTOR 激酶途径: 酵母 Atg6 同源蛋白 Beclin 1 是细胞自噬过程中最重要的正调节因子, 通常结合 Class III PI3K 形成复合体诱导自噬(Kihara et al., 2001)。

为了研究自噬途径在肺上皮细胞癌变中的作用机制, 本研究拟利用前期建立的细胞恶性转化模型, 主要采用激光共聚焦扫描显微镜成像技术, 在无损伤状态下, 实时观测活细胞中自噬体标记蛋白 GFP-LC3 的荧光强度及定位, 并利用 Western Blotting 技术检测细胞内自噬信号通路关键效应分子的表达。以期初步从细胞自噬现象的发生、发展的角度研究肺细胞癌变的分子机制, 为肺癌的预防和治疗提供科学依据。

1 结果与分析

1.1 实时检测自噬在活细胞 16HBE-N 和 16HBE-T 中的产生

为了确定自噬途径参与了肺上皮细胞的癌变, 可以通过检测正常细胞和恶性转化细胞中自噬体

的数目来判断。本研究利用激光共聚焦扫描显微镜在单个活细胞中实时观测 LC3 蛋白的时空动态变化, 发现在 GFP-LC3 转染 24 h 的时候, 只有少量的荧光细胞, 继续培养到 48 h 后荧光细胞开始增多, 通过观测发现 16HBE-T 细胞中成点状聚集的 GFP-LC3 的数量比 16HBE-N 细胞中的数量明显减少, 培养至 72 h 后结果类似(图 1)。经过显微镜下随机选择多个细胞进行统计测量, 发现 16HBE-N 细胞的点状聚集个数远远多于 16HBE-T 细胞(图 2)。这个结果证明 16HBE 细胞恶性转化后自噬水平会明显降低, 说明在肺细胞癌变过程中自噬水平会发生改变, 因此可以推测自噬是肺细胞癌变的重要机制。

1.2 16HBE-N 和 16HBE-T 细胞中 mTOR 激酶的磷酸化水平及 Beclin 1 的表达水平

哺乳动物自噬主要的信号通路有依赖 mTOR 激酶和不依赖 mTOR 激酶两大途径。本研究通过检测 GFP-LC3 的定位情况已经知道 16HBE-T 细胞的自噬水平比 16HBE-N 细胞的自噬水平要明显降低, 因此下一步希望可以明确自噬水平降低经过的是

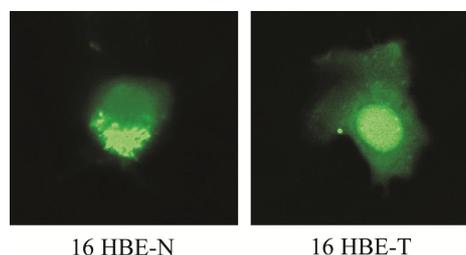


图 1 激光共聚焦扫描显微镜下观测正常细胞和恶性转化细胞 GFP-LC3 的定位

Figure 1 Confocal laser scanning microscopy for the GFP-LC3 location of normal (16HBE-N) and malignant transformed cells (16HBE-T)

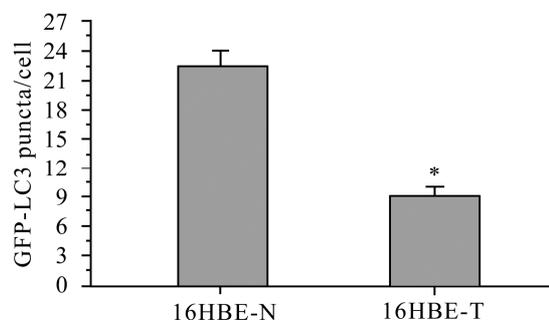


图 2 细胞中 GFP-LC3 点状聚集的个数

注: 16HBE-T 细胞组与 16HBE-N 细胞组比较: * $P < 0.001$, (n=10)
Figure 2 The number of punctate protein aggregation in the cell
Note: Comparison of 16HBE-T cells group and 16HBE-N cells group: * $P < 0.001$, (n=10)



哪条途径? 通过利用 Western Blotting 技术检测 mTOR 激酶的磷酸化水平及 Beclin 1 的表达水平, 发现 16HBE-T 细胞比 16HBE-N 细胞 mTOR 激酶的磷酸化水平高, 而 Beclin 1 的表达水平是降低的(图 3), 证明恶性转化 16HBE 细胞过程中两个自噬调控的主要通路均被激活, 提示自噬可能通过多条途径参与了肺细胞癌变的过程。

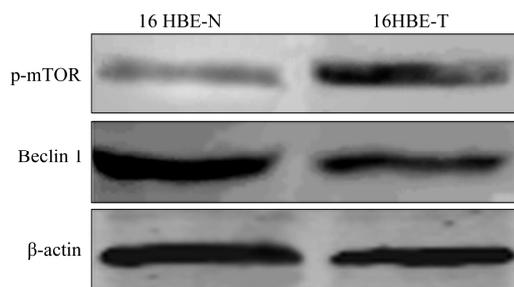


图 3 mTOR 激酶的磷酸化及 Beclin 1 的表达水平
Figure 3 The phosphorylation of mTOR kinase and expression level of Beclin 1

2 讨论

职业暴露镍化合物人群的暴露途径主要是呼吸道。由于永生化的支气管上皮细胞株 16HBE 与人支气管上皮细胞的生物学特性基本相似, 因此本研究采用的结晶型 NiS 恶性转化人永生化的支气管上皮细胞株 16HBE, 作为研究肺癌发生模型具有良好的代表性(刘林华等, 2010)。我们前期研究已经建立了结晶型 NiS 诱导人支气管上皮细胞(16HBE)发生恶性转化的动态模型, 利用该模型已经证明肺癌细胞的生物学发生是一个十分复杂的过程, 但其具体的致癌机制仍需进一步研究。据目前报道的研究发现, 自噬在多种人类肿瘤中均存在活性的改变, 且在肿瘤发生、发展的过程中扮演了双重角色, 既能抑制肿瘤又能促进肿瘤细胞的生存, 因此正确调控自噬途径可能成为预防和治疗肿瘤的新方法(Chen and Karantza, 2011)。Pandit 等(2011)最新报道称自噬途径也可能参与了肺细胞的癌变。

为此, 本研究利用前期研究建立的结晶型 NiS 诱导 16HBE 发生恶性转化的动态模型, 首先采用激光共聚焦扫描显微镜成像技术, 在无损伤状态下, 实时观测活细胞中 LC3 蛋白的荧光强度及定位, 结果发现 16HBE 细胞恶性转化后自噬水平会明显降低(图 1), 几乎只有未转化细胞的 1/3 水平, 充分证明了自噬途径参与了结晶型 NiS 诱导肺细胞癌变的过程。Western Blotting 技术检测 mTOR 激酶的磷酸化水平及 Beclin 1 的表达水平, 结果发现 16HBE-T

细胞比 16HBE-N 细胞 mTOR 激酶的磷酸化水平高, 而 Beclin 1 的表达水平降低(图 2), 证明结晶型 NiS 恶性转化 16HBE 细胞过程中两个自噬调控的主要通路均被激活。

综上所述, 我们证明了结晶型 NiS 可通过依赖 mTOR 激酶和不依赖 mTOR 激酶自噬途径参与诱导 16HBE 细胞恶性转化的癌变过程, 这个结果不但可以确定自噬途径在参与癌变过程中的重要性, 还说明其复杂性, 由于调控这两个途径的上下游信号分子比较多, 因此要明确自噬在肺细胞癌变过程中的分子机制从而达到预防和治疗肺癌的目标, 需要我们进一步的研究。

3 材料与方法

3.1 实验材料和仪器

细胞系为结晶型 NiS 恶性转化细胞 16HBE-T。经形态学观察、软琼脂培养及裸鼠成瘤试验证实已经恶性转化; 非转化对照细胞 16HBE-N, 均由本实验室建立(纪卫东等, 2002)。MEM 培养基购自 GIBCO 公司, p-mTOR 和 Beclin1 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司, β -actin 抗体购自 santa 公司, LipofectamineTM 2000 Reagent 购自 Invitrogen 公司, 其它所有试剂均为国产分析纯。质粒 GFP-LC3 惠赠于 Professor Marja Jäättelä (Rammer et al., 2010)。

激光共聚焦扫描显微镜(LSM 510/ConfoCor2)及双色红外荧光系统 ODYSSEY[®] Infrared Imaging System 是德国 Zeiss 公司和美国莱卡公司产品。

3.2 细胞培养

16HBE-N 和 16HBE-T 细胞置于含 10% 小牛血清的 MEM 培养基中培养, 根据实验要求接种不同密度的细胞于培养皿或者培养瓶中, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的培养箱中培养, 每隔 48 h 换一次液。

3.3 细胞转染

取对数生长期的 16HBE-N 和 16HBE-T 细胞接种在 35 mm 直径的特制细胞培养皿内(由本实验室自制), 待细胞达到 70%~80% 融合时, 用 LipofectamineTM 2000 转染试剂按说明将 GFP-LC3 质粒转染至 16HBE-N 和 16HBE-T 细胞, 转染 4 h 后换液, 分别于培养 24 h、48 h 和 72 h 后置于激光共聚焦扫描显微镜下观察 GFP-LC3 的表达情况(Yang et al., 2007)。

3.4 激光共聚焦扫描显微镜检测

转染后的 16HBE-N 和 16HBE-T 细胞均在 Zeiss 公司 LSM 510 型激光共聚焦扫描显微镜上采用 100



倍油镜检测, 记录的图像和数据采用 Zeiss ReI3.2 软件系统进行分析。在本实验中, 采用 488 nm 的氩离子激光作为 GFP 的激发光源, GFP 的吸收滤色镜选用 BP5002550。

3.5 Western Blotting 检测

分别收集对数生长期的 16HBE-N 和 16HBE-T 细胞, 用预冷的 PBS 清洗两次, 采用 PMSF 裂解液并添加 1×protease inhibitor cocktail set I 在冰上振荡裂解细胞后, 用 Bradford 法进行蛋白定量。取相同含量的蛋白, 在 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳中进行蛋白分离 2 h, 电泳后采用 100 V 恒压 1 h 将蛋白电转膜至硝酸纤维素膜; 印迹膜在含有 5%封闭蛋白的 TBS-T 缓冲液中封闭 1 h; 在 p-mTOR、Beclin 1 和 β -actin 的一抗溶液(抗体用 5%封闭蛋白的 TBS-T 缓冲液 1: 1 000 稀释)中 4°C 过夜孵育。次日加入耦联有 IRDye800 和 Alexa Fluor 680 的荧光二抗, 通过双色红外荧光系统进行 mTOR 激酶的磷酸化水平及 Beclin 1 的表达水平检测(张岚和邢达, 2010)。

3.6 统计学处理

每种实验至少重复 3 次, 实验数据以 mean±SEM 表示, 采用 t 检验确定处理组和对照组之间的差异。* $P < 0.001$ 为显著性差异有统计学意义。

作者贡献

张岚为实验完成人和文章写作者; 吕嘉春为实验和文章写作指导人; 杨磊协助完成整体实验。

致谢

本研究由国家自然科学基金项目(81102159, 81072366, 30872178); 广东省自然科学基金博士启动项目(S2011040003622); 广东省高层次人才项目(2010-79)、广东高校优秀青年创新人才培养计划项目(2009-7)和广州市科技和信息化局应用基础研究计划项目(12C22021629)共同资助。

参考文献

- Chen N., and Karantza V., 2011, Autophagy as a therapeutic target in cancer, *Cancer Biol. Ther.*, 11(2): 157-168 <http://dx.doi.org/10.4161/cbt.11.2.14622>
- Edinger A.L., and Thompson C.B., 2004, Death by design: Apoptosis, necrosis and autophagy, *Curr. Opin Cell Biol.*, 16(6): 663-669 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2004.09.011> PMID: 15530778
- Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., and Forman D., 2011, Global cancer statistics, *CA: A cancer*

journal for clinicians, 61(2): 69-90 <http://dx.doi.org/10.3322/caac.20107> PMID:21296855

- Ji W.D., Wu Z.L., and Chen J.K., 2002, Malignant transformation of human bronchial epithelial cell line induced by crystalline nickel sulfide, *Aibian•Jibian•Tubian (Carcinogenesis, Teratogenesis and Mutagenesis)*, 14(1): 15-18 (纪卫东, 吴中亮, 陈家堃, 2002, 结晶型 NiS 诱发人支气管上皮细胞系恶性转化, *癌变•畸变•突变*, 14(1): 15-18)
- Ji W.D., Yang L.Q., Yu L., Yuan J.H., Hu D.L., Zhang W.J., Yang J.P., Pang Y.Q., Li W.X., Lu J.C., Fu J., Chen J.K., Lin Z.N., Chen W., and Zhuang Z.X., 2008, Epigenetic silencing of O₆-methylguanine DNA methyltransferase gene in Nis-transformed cells, *Carcinogenesis*, 29(6): 1267-1275 <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgn012> PMID: 18204074
- Kihara A., Kabeya Y., Ohsumi Y., and Yoshimori T., 2001, Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network, *EMBO Rep.*, 2(4): 330-335 <http://dx.doi.org/10.1093/embo-reports/kve061> PMID:11306555 PMID:1083858
- Liu L.H., Jiang Y.G., Ji W.D., and Yang Q.Y., 2010, Effects of crystalline nickel sulfide on expression of *P TEN* gene and miR-22 in human bronchial epithelial cells, *Huanjing Yu Jiankang Zazhi (Journal of Environment and Health)*, 27(5): 393-395 (刘林华, 蒋义国, 纪卫东, 杨巧媛, 2010, 结晶型硫化镍对人支气管上皮细胞 *P TEN* 基因和 miR-22 表达的影响, *环境与健康杂志*, 27(5): 393-395)
- Liu Q., Wang J.J., Pan Y.C., Meng L.F., and Zhan X., 2008, Expression of Beclin1 in non small cell lung cancer and its clinical significance, *Journal of Nanjing Medical University*, 22(2): 121-124 [http://dx.doi.org/10.1016/S1007-4376\(08\)60025-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1007-4376(08)60025-8)
- Maiuri M.C., Zalckvar E., Kimchi A., and Kroemer G., 2007, Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8(9): 741-752 <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2239> PMID:17717517
- Pandit L., Bonilla D.L., and Eissa N.T., 2011, Autophagy: A new frontier in research in lung diseases, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 183(5): 566-568 <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201011-1848ED> PMID:21471054
- Rammer P., Groth-Pedersen L., Kirkegaard T., Daugaard M., Rytter A., Szyniarowski P., Høyer-Hansen M., Povlsen



- L.K., Nylandsted J., Larsen J.E., and Jäätelä M., 2010, BAMLET activates a lysosomal cell death program in cancer cells, *Mol. Cancer Ther.*, 9(1): 24-32 <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0559> PMID:20053771
- Yang S., Xing D., Zhou Q., Xiang L., and Lao Y., 2007, Functional imaging of cerebrovascular activities in small animals using high-resolution photoacoustic tomography, *Med. Phys.*, 34(8): 3294-3301 <http://dx.doi.org/10.1118/1.2757088> PMID:17879793
- Yang Y.P., Liang Z.Q., Gu Z.L., and Qin Z.H., 2005, Molecular mechanism and regulation of autophagy, *Acta Pharmacol. Sin.*, 26(12): 1421-1434 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00235.x> PMID:16297339
- Zhang L., and Xing D., 2010, Molecular mechanism of JNK/Bim/Bax apoptotic pathway induced by TNF- α in differentiated PC12 cells, *Shengwuhuaxue Yu Shengwuwuli Jinzhan (Progress in Biochemistry and Biophysics)*, 37(4): 370-380 (张岚, 邢达, 2010, JNK/Bim/Bax 途径在 TNF- α 诱导分化 PC12 细胞凋亡过程中的作用机制, *生物化学与生物物理进展*, 37(4): 370-380)