

研究论文

敲低鞘氨醇激酶-1对非小细胞肺癌细胞增殖及线粒体凋亡途径的影响及机制

曹宇华^{1,*}, 殷舞², 吕艳茹³

广西壮族自治区人民医院¹临床肿瘤中心; ²病理科; ³科研部, 南宁 530021

摘要: 本文旨在探讨敲低鞘氨醇激酶-1 (sphingosine kinase-1, SPHK1)对非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)细胞增殖、周期和凋亡的影响,并探讨其可能机制。用定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测人胚肺成纤维细胞系(MRC-5)和4种NSCLC细胞中SPHK1 mRNA表达水平。利用SPHK1-shRNA和相应的阴性对照转染A549和H1299细胞。用CCK8法测定细胞增殖,用Annexin V-FITC/PI双重染色试剂盒评价细胞凋亡,用细胞周期检测试剂盒测定细胞周期分布,用JC-1线粒体膜电位测定试剂盒检测线粒体膜电位,用蛋白质印迹法检测细胞周期和线粒体凋亡途径相关蛋白、MEK/ERK信号通路的蛋白表达水平。结果显示,NSCLC细胞SPHK1 mRNA表达水平高于MRC-5细胞。SPHK1-shRNA显著抑制A549和H1299细胞的增殖,并促进线粒体途径的细胞凋亡,将细胞周期阻滞在G0/G1期;与对照组相比,SPHK1-shRNA组MEK和ERK蛋白磷酸化水平显著下调。MEK/ERK抑制剂可抑制A549和H1299细胞增殖,并促进细胞凋亡。上述结果提示,SPHK1敲低可能通过抑制MEK/ERK信号通路来抑制NSCLC的增殖和促进线粒体途径的细胞凋亡。

关键词: 非小细胞肺癌; 鞘氨醇激酶-1; 线粒体凋亡途径; 细胞周期

中图分类号: R734.2; R363

The effect and mechanism of sphingosine kinase-1 knockdown on non-small cell lung cancer cell proliferation and mitochondrial apoptotic pathway

CAO Yu-Hua^{1,*}, YIN Wu², LYU Yan-Ru³

¹Clinical Tumor Center; ²Department of Pathology; ³Ministry of Scientific Research, People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

Abstract: The purpose of the present study was to investigate the effect and potential mechanism of knockdown of sphingosine kinase-1 (SPHK1) on the proliferation, cell cycle and apoptosis of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect SPHK1 mRNA expression in human healthy lung fibroblasts (MRC-5 cells) and four NSCLC cell lines. Then, A549 and H1299 cells were transfected with SPHK1-shRNA and corresponding negative control. CCK-8, Annexin V-FITC/PI dual staining and cell cycle assay were performed to evaluate cell proliferation, apoptosis and cell cycle distribution, respectively. JC-1 mitochondrial membrane potential measurement kit was adopted to measure mitochondrial membrane potential. Western blot was used to detect the protein expression levels of cell cycle and mitochondrial apoptotic pathway-related proteins, as well as MEK/ERK signaling pathway. The results showed that the mRNA expression of SPHK1 in NSCLC cells was higher than that in MRC-5 cells. SPHK1-shRNA significantly inhibited the proliferation of A549 and H1299 cells, blocked the cell cycle in G0/G1 phase, and promoted cell apoptosis through the mitochondrial pathway. Compared with the control group, the

Received 2020-11-18 Accepted 2021-03-11

This work was supported by the Guangxi Medical and Health Appropriate Technology Development and Application Project (No. S2019075) and the Guangxi Zhuang Autonomous Region Health and Family Planning Commission Self-Financing Research Project (No. Z20180748).

*Corresponding author. E-mail: 2357064200@qq.com

expression of p-MEK and p-ERK proteins in the SPHK1-shRNA group was significantly down-regulated. Moreover, MEK/ERK inhibitor could dramatically suppress cell proliferation and promote cell apoptosis. These results suggest that SPHK1 knockdown can inhibit the proliferation of NSCLC cells and might promote mitochondrial apoptotic pathway by inhibiting MEK/ERK signaling pathway.

Key words: non-small cell lung cancer; sphingosine kinase-1; mitochondrial apoptotic pathway; cell cycle

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 是一种发病率和死亡率高的恶性肿瘤, 目前最有效的治疗包括手术切除辅以放疗和化疗^[1]。NSCLC 的发生和发展通常是一个多阶段的过程, 其预后差, 5 年总生存率极低^[1,2]。因此, 目前迫切需要有助于早期诊断和改善预后的新治疗策略。鞘氨醇激酶-1 (sphingosine kinase-1, SPHK1) 已被证明在肿瘤发生中起重要作用, 其生物学功能与维持细胞存活和凋亡信号之间的平衡有关^[3]。研究表明, SPHK1 在包括肺癌在内的多种癌症中过表达^[4], 越来越多的证据提示 SPHK1 的上调与各种癌症恶性表型的发展有关, 例如 Dai 等^[5]的研究结果显示, SPHK1 水平上调伴随着卵巢癌组织中微血管密度的增加, 在卵巢癌血管生成中起关键作用。而 Ma 等^[6]在 NSCLC 细胞中过表达 SPHK1 可诱导抗凋亡和迁移相关基因的表达, 增强细胞增殖、抗凋亡和迁移能力。Lyn 等研究显示, 敲低 SPHK1 可抑制 NSCLC 细胞的侵袭和迁移能力^[7]。以上这些研究结果提示, SPHK1 可能在促进 NSCLC 发展中起重要作用。然而, SPHK1 参与 NSCLC 进展的确切分子机制尚未明确。本研究旨在研究敲低 SPHK1 对 NSCLC 细胞增殖、周期和凋亡的影响, 并探讨敲低 SPHK1 对 MEK/ERK 信号通路的影响, 以期揭示 NSCLC 分子机制和开发用于诊断和治疗 NSCLC 的新生物标记物提供重要证据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 所有细胞系均购自中国科学院上海细胞库。4 种人 NSCLC 细胞 (PC-9、A549、H1299 和 SPC-A1) 培养在 Dulbecco 改良 Eagle 培养液 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) 中, 人胚肺成纤维细胞系 (MRC-5) 保持在最低必需培养液 (minimum essential medium, MEM) 中, 均补充有 10% 胎牛血清 (Gibco) 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素及 100 U/mL 青霉素, 在含有 5% CO_2 和 37 $^\circ\text{C}$ 的培养箱中培养。

1.2 主要试剂和抗体 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒、细胞周期检测试剂盒、TUNEL 比色试剂盒、

线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1) 分别购自杭州联科生物技术股份有限公司、南京凯基科技发展有限公司、Promega 和 Beyotime。抗活性半胱天冬酶-3 (active caspase-3)、活性半胱天冬酶-9 (active caspase-9)、BAX、Bcl-2、CDK4、CDK6、Cyclin D1、Cytochrome C、PARP 和 cleaved-PARP 抗体购自 Abcam。抗 ERK1/2、p-ERK1/2、MEK1/2、p-MEK1/2 抗体和辣根过氧化物酶标记的二抗购自 Cell Signaling Technology。MEK 通路抑制剂 PD0325901 购自 Med-ChemExpress。

1.3 SPHK1 的基因表达测定 定量实时逆转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 用于检测细胞中 SPHK1 基因的表达。在指数生长期收集 NSCLC 细胞, 用 Trizol 提取总 RNA。逆转录试剂盒 PrimeScript RT 试剂盒 (TaKaRa) 用于 SPHK1 基因的逆转录, 然后利用 ABI 7900HT Sequence 检测系统检测 SPHK1 的表达。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成, 序列如下: SPHK1: 上游引物: 5'-GCTCTGGTG-GTCATGTCTGG-3', 下游引物: 5'-CACAGCAATAGC-GTGCAGT-3'; GAPDH: 上游引物: 5'-CTGGGC-TACTGAGCACC-3', 下游引物: 5'-AAGTGGTCG-TTGAGGGCAATG-3'。实时 PCR 反应条件如下: 95 $^\circ\text{C}$ 10 min, 95 $^\circ\text{C}$ 15 s, 60 $^\circ\text{C}$ 1 min, 40 个循环。GAPDH mRNA 表达水平为内参照, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行定量。

1.4 细胞转染与药物处理 A549 和 H1299 细胞用于 SPHK1 敲低实验, SPHK1-shRNA 或阴性对照由基因化学公司设计合成。SPHK1 表达构建体是通过将聚合酶链反应扩增的全长人 SPHK1 基因亚克隆到 pMSCV 质粒中而产生的, 将 SPHK1 靶向 siRNA 序列 (GGCTGAAATCTCCTTACAG) 克隆到 pSuper-retro-puro 中, 生成 pSuper-retro-SPHK1-RNAi。然后根据制造商的说明, 使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 将含有 SPHK1-shRNA 或对照 shRNA (乱序) 的载体稳定转染到细胞中, 用 5 mg/mL 嘌呤霉素稳定转染的细胞。

另外, 为了验证 MEK 通路在 NSCLC 细胞中的作用, 将 A549 和 H1299 细胞分别用 0.1% 二甲

基亚砷(对照组 control)和 10 $\mu\text{mol/L}$ PD0325901 处理 24 h, 进行细胞凋亡和增殖检测。

1.5 细胞凋亡检测 细胞转染处理后用冷 PBS 洗涤, 并以 1×10^6 /mL 细胞密度重悬于 1 mL 结合缓冲液中, 加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI, 并在黑暗中室温下孵育 15 min, 用 FACStar 流式细胞仪 (BD Biosciences) 检测细胞, 并使用 FCS express version 6 软件进行分析, 所有实验重复 3 次。另外, 本研究也采用 TUNEL 比色试剂盒来分析 TUNEL 阳性细胞 (凋亡细胞) 比例。

1.6 细胞增殖测定 使用 CCK-8 测定试剂盒按照说明书步骤进行细胞增殖测定。细胞在 96 孔板中以 2×10^3 /孔的细胞密度培养, 每孔 200 μL 。用 20 mL CCK-8 试剂孵育 2 h 后, 用分光光度计 (BioTek) 测量 450 nm 处的吸光度。

1.7 细胞周期检测 采用细胞周期检测试剂盒测量细胞周期分布。用胰蛋白酶溶液分离细胞, PBS 洗涤两次, 并以 1 000 r/min 离心 3 min, 收集细胞用 70% 冷乙醇在 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜, 然后用 500 μL PI/RNase (9:1) 工作溶液孵育。细胞含量通过流式细胞仪 (Sysmex) 测定, 并使用 FCS express version 6 软件分析。

1.8 线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP) 测定 采用 JC-1 线粒体膜电位测定试剂盒检测 MMP^[8]。使用羧基氰化物间氯苯胺 (CCCP) 处理的细胞作为阳性对照, 处理的细胞加入到 JC-1/培养基 (1:1) 中, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, 用 JC-1 洗涤缓冲液洗涤细胞两次。随后, 使用荧光显微镜 (Olympus) 观察 MMP 情况。红色荧光表示正常细胞线粒体的 MMP 较高, 绿色荧光表示凋亡细胞线粒体的 MMP 较低, 采用 ImageJ 进行荧光定量, 以红色荧光和绿色荧光的比值表示 MMP。

1.9 蛋白质印迹分析 细胞裂解物在含 PMSF 的 RIPA 缓冲液中裂解后获得, 使用细胞线粒体分离试剂盒 (C3601, 碧云天) 进行线粒体和无线粒体蛋白的提取。使用 BCA 蛋白检测试剂盒 (Thermo) 定量, 蛋白 (约 30 μg) 用 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 并电转移到聚偏二氟乙烯膜上 (Invitrogen)。用 Tris-缓冲液 (pH 7.5)/5% 脱脂奶粉封闭, 与抗 active caspase-3 (1:500)、active caspase-9 (1:1 000)、BAX (1:1 000)、Bcl-2 (1:1 000)、CDK4 (1:1 000)、CDK6 (1:1 000)、Cyclin D1 (1:200)、Cytochrome C (1:5 000)、PARP (1:1 000)、Cleaved-PARP (1:1 000)、

ERK1/2 (1:1 000)、p-ERK1/2 (Thy202/Tyr204) (1:2 000)、MEK1/2 (1:1 000)、p-MEK1/2 (Ser217/221) (1:2 000) 以及 β -actin (1:5 000) 抗体在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜, 随后与辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:2 000) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2 h。用增强化学发光试剂 (Merck Millipore) 显色并采集数据, 应用 ImageJ 软件进行蛋白定量分析, 以 β -actin 作为内参, 用目标蛋白灰度值与内参灰度值的比值表示蛋白相对表达量。

1.10 统计分析 所有数据以 mean \pm SD 表示, 采用 SPSS 20.0 软件进行分析。*t* 检验用于两个独立样本的比较, 单因素方差分析用于检验多组间的差异, 两两比较采用 LSD 比较检验。*P* < 0.05 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC细胞中SPHK1的基因表达

用 qRT-PCR 检测四种人 NSCLC 细胞 (包括 PC9、A549、H1299 和 SPC-A1) 中 SPHK1 mRNA 表达水平, 结果显示, 与人胚肺成纤维细胞 (MRC-5) 相比, 四种人 NSCLC 细胞系 SPHK1 mRNA 表达水平均显著上调 (*P* < 0.01, 图 1), 其中 A549 和 H1299 两种细胞 SPHK1 mRNA 表达水平上调比较明显, 因此选择 A549 和 H1299 进行后续相关实验。

2.2 SPHK1-shRNA对A549和H1299细胞增殖和凋亡的影响

SPHK1-shRNA 载体转染在 A549 和 H1299 细胞中下调了 SPHK1 的表达 (*P* < 0.01, 图 2A)。CCK-8 法结果显示, 在转染后第 4、5 天, 与对照组相比,

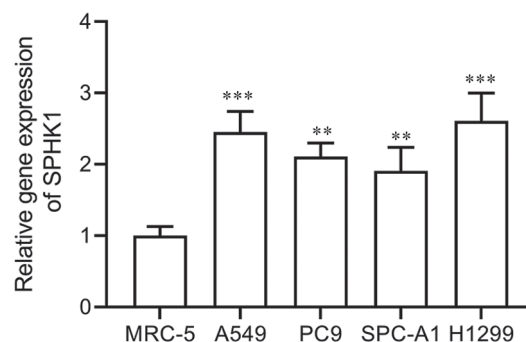


图 1. NSCLC细胞和人胚肺成纤维细胞(MRC-5)中SPHK1 mRNA表达

Fig. 1. SPHK1 mRNA expression levels in NSCLC cells and human healthy lung fibroblasts (MRC-5) detected by qRT-PCR. Mean \pm SD, *n* = 3. ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs MRC-5.

SPHK1-shRNA 显著抑制了肺癌细胞 A549 和 H1299 增殖 ($P < 0.01$, 图 2B)。流式细胞术结果显示, 与对照组相比, SPHK1-shRNA 组 A549 和 H1299 细胞中凋亡细胞的百分比显著提高 ($P < 0.001$, 图 2C)。TUNEL 实验结果显示, SPHK1-shRNA 转染显著提高 TUNEL 阳性细胞率 ($P < 0.001$, 图 2D)。以上这些结果表明 SPHK1-shRNA 在体外抑制肺癌细胞生长, 并促进细胞凋亡。

2.3 SPHK1-shRNA对A549和H1299细胞线粒体凋亡途径的影响

和对照组相比, SPHK1-shRNA 组 A549 和 H1299 细胞红 / 绿荧光比值明显降低, 表明 SPHK1-shRNA 可以下调 MMP 和促进线粒体膜去极化 (图 3)。为了进一步阐明 SPHK1-shRNA 促凋亡机制, 本研究通过蛋白质印迹法研究了线粒体凋亡途径相关蛋白的表达, 结果显示, 和对照组相比, SPHK1-shRNA

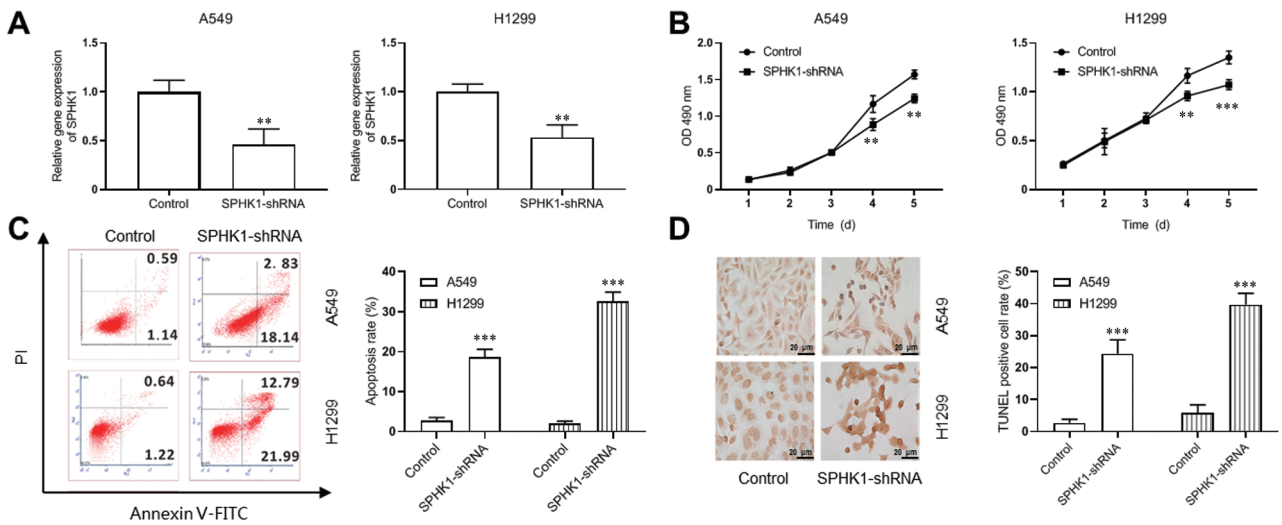


图 2. SPHK1-shRNA对肺癌细胞A549和H1299增殖和凋亡的影响

Fig. 2. The effect of SPHK1-shRNA on the proliferation and apoptosis of lung cancer A549 and H1299 cells. A: SPHK1 mRNA expression detected by qRT-PCR. B: Proliferation of A549 and H1299 cells detected by CCK-8 test. C: A549 and H1299 cell apoptosis detected by flow cytometry. D: A549 and H1299 cell apoptosis detected by TUNEL staining. Scale bar, 20 μ m. Mean \pm SD, $n = 3$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control.

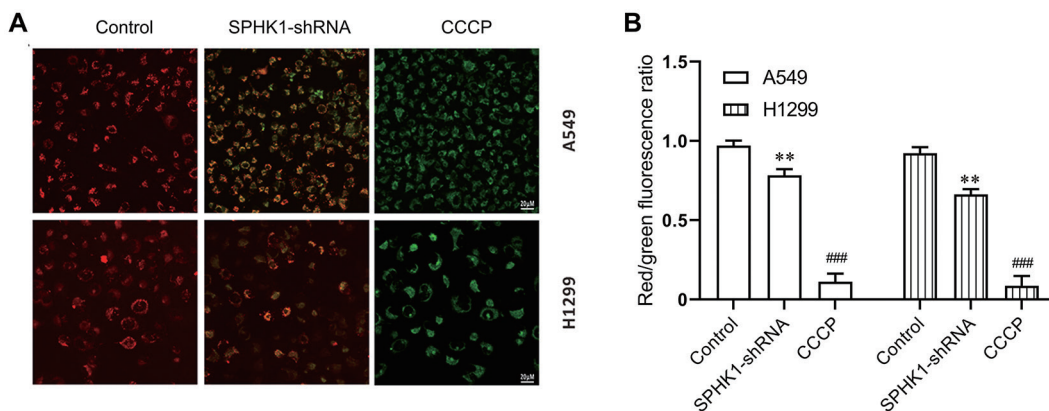


图 3. SPHK1-shRNA对肺癌细胞A549和H1299线粒体膜电位的影响

Fig. 3. Effects of SPHK1-shRNA on mitochondrial membrane potential (MMP) of lung cancer A549 and H1299 cells. A: Confocal fluorescence microscope image of JC-1 staining to detect MMP. B: Statistical histogram of red/green fluorescence ratio. Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) treated cells were used as positive control. Scale bar, 20 μ m. Mean \pm SD, $n = 3$. ** $P < 0.01$ vs control; ### $P < 0.001$ vs SPHK1-shRNA.

组 Bcl-2 蛋白表达水平显著下调, 细胞质中 BAX 和线粒体中 Cytochrome C 蛋白表达水平下调, 而线粒体中 BAX 和细胞质中 Cytochrome C 蛋白表达水平上调 (图 4A、B), active caspase-9、active caspase-3 和 cleaved-PARP 的蛋白表达水平显著上调 (图 4C)。这些结果提示, SPHK1-shRNA 依赖于半胱天冬酶级联诱导 NSCLC 细胞线粒体凋亡途径。

2.4 SPHK1-shRNA对A549和H1299细胞周期的影响

流式细胞术结果显示, 与对照组相比, SPHK1-shRNA 组在 G0/G1 期细胞数量显著增加, 同时在 S 期和 G2/M 期细胞数量减少 (图 5A)。蛋白质印迹分析结果进一步证实了 SPHK1-shRNA 的细胞周期阻滞作用, 和对照组相比, SPHK1-shRNA 组细胞周期相关蛋白 CDK4、CDK6 和 Cyclin D1 蛋白表

达显著下调 (图 5B)。以上结果表明, SPHK1-shRNA 可以使 A549 和 H1299 细胞周期阻滞在 G0/G1 期。

2.5 SPHK1-shRNA通过MEK/ERK信号通路诱导NSCLC细胞凋亡

蛋白质印迹结果显示, SPHK1-shRNA 显著下调 A549 和 H1299 细胞 MEK1/2 和 ERK1/2 的磷酸化水平 (图 6A)。为了验证 MEK 通路在 NSCLC 细胞中的作用, 使用 PD0325901 (MEK 抑制剂) 来阐明它们对 NSCLC 细胞存活和细胞凋亡的潜在影响。CCK8 分析结果显示, MEK 抑制剂显著抑制细胞增殖 (图 6B)。细胞凋亡检测结果显示, MEK 抑制剂促进细胞凋亡 (图 6C)。上述结果提示, SPHK1-shRNA 可能通过 MEK/ERK 信号轴的抑制增强了细胞毒性和细胞凋亡。

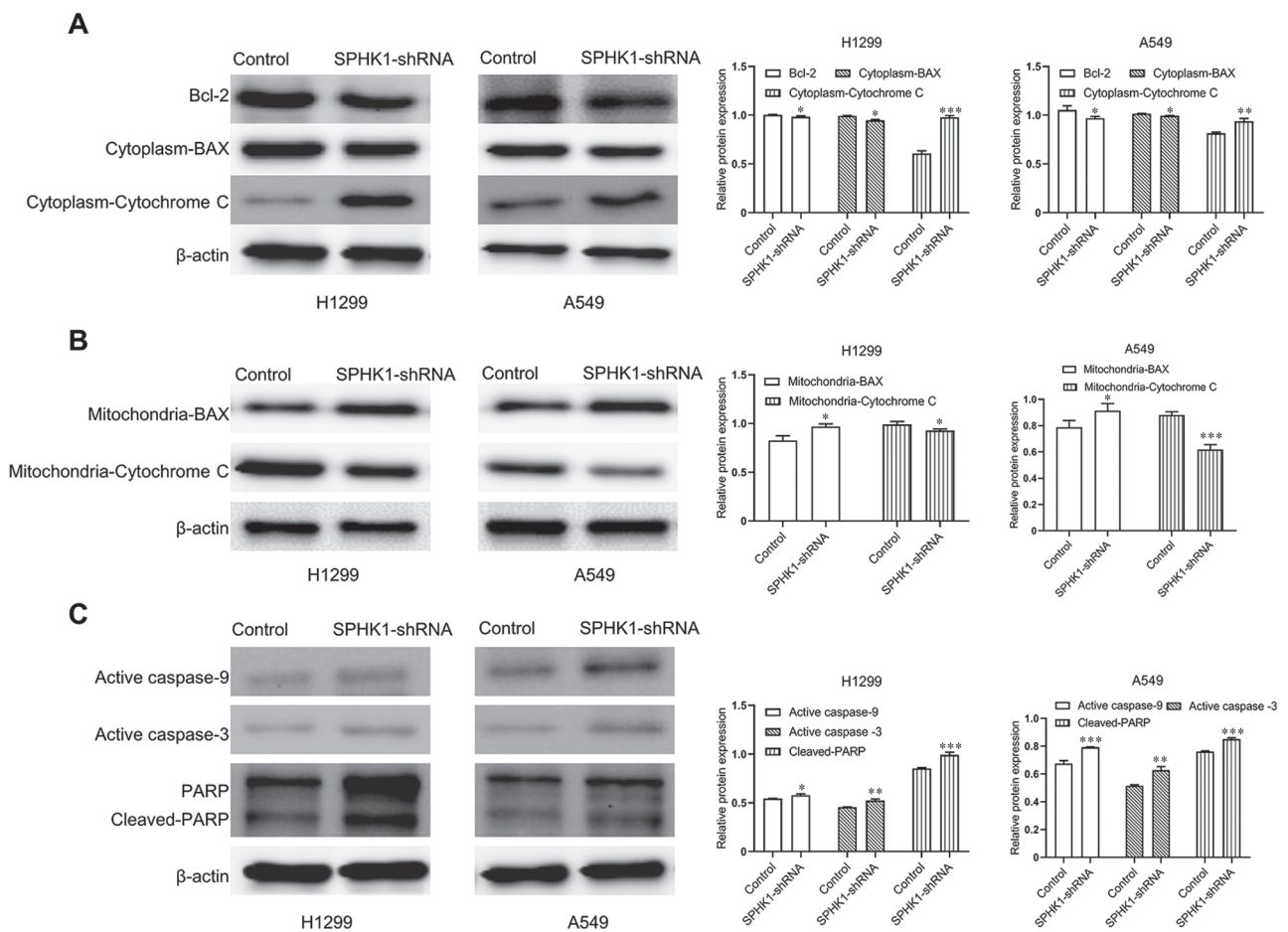


图 4. SPHK1-shRNA对肺癌细胞A549和H1299线粒体凋亡途径相关蛋白表达的影响

Fig. 4. The effect of SPHK1-shRNA on the expression of mitochondrial apoptotic pathway-related proteins in lung cancer A549 and H1299 cells detected by Western blot. A, B: Protein expression of Bcl-2, BAX and Cytochrome C in cytoplasm (A) and mitochondria (B). C: The protein expression levels of active caspase-9, active caspase-3 and cleaved-PARP. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control.

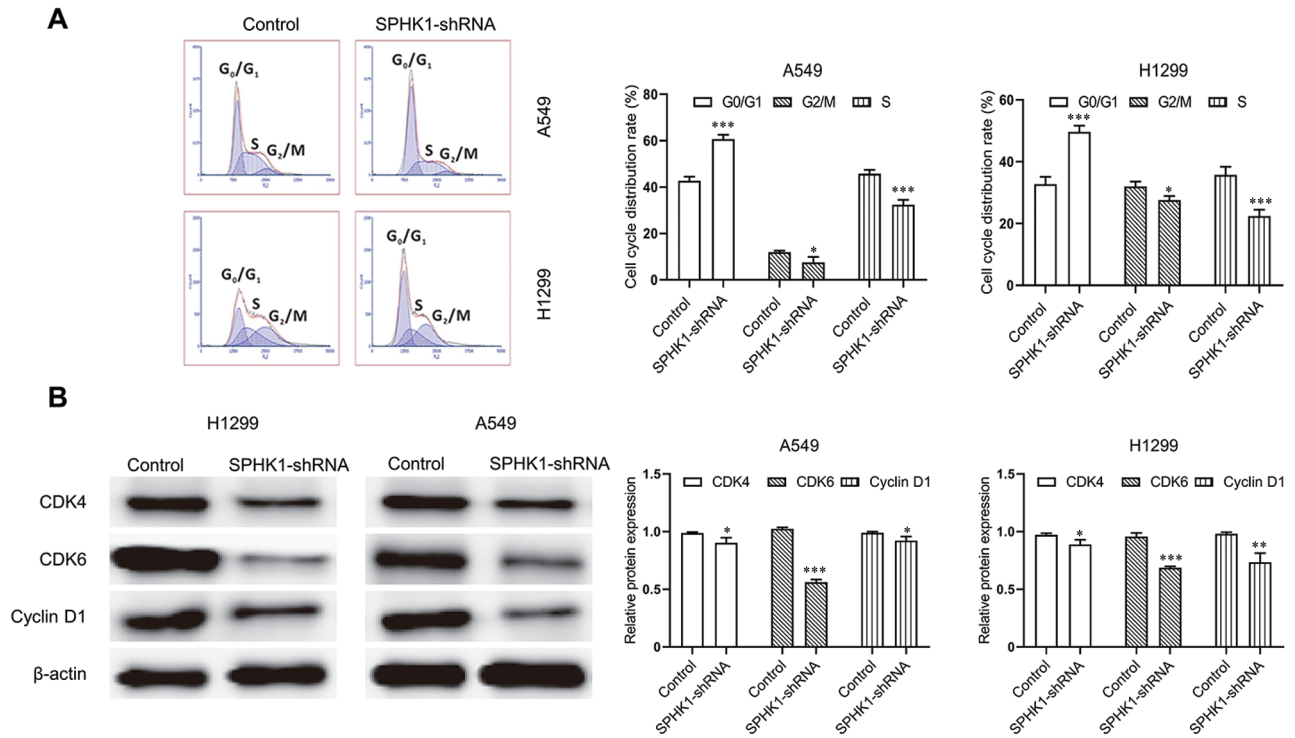


图 5. SPHK1-shRNA对肺癌细胞A549和H1299细胞周期的影响

Fig. 5. The effect of SPHK1-shRNA on the cell cycle of lung cancer A549 and H1299 cells. *A*: Cell cycle distribution detected by flow cytometry. *B*: The protein expression levels of cell cycle related proteins CDK4, CDK6 and Cyclin D1 detected by Western blot. Mean ± SD, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control.

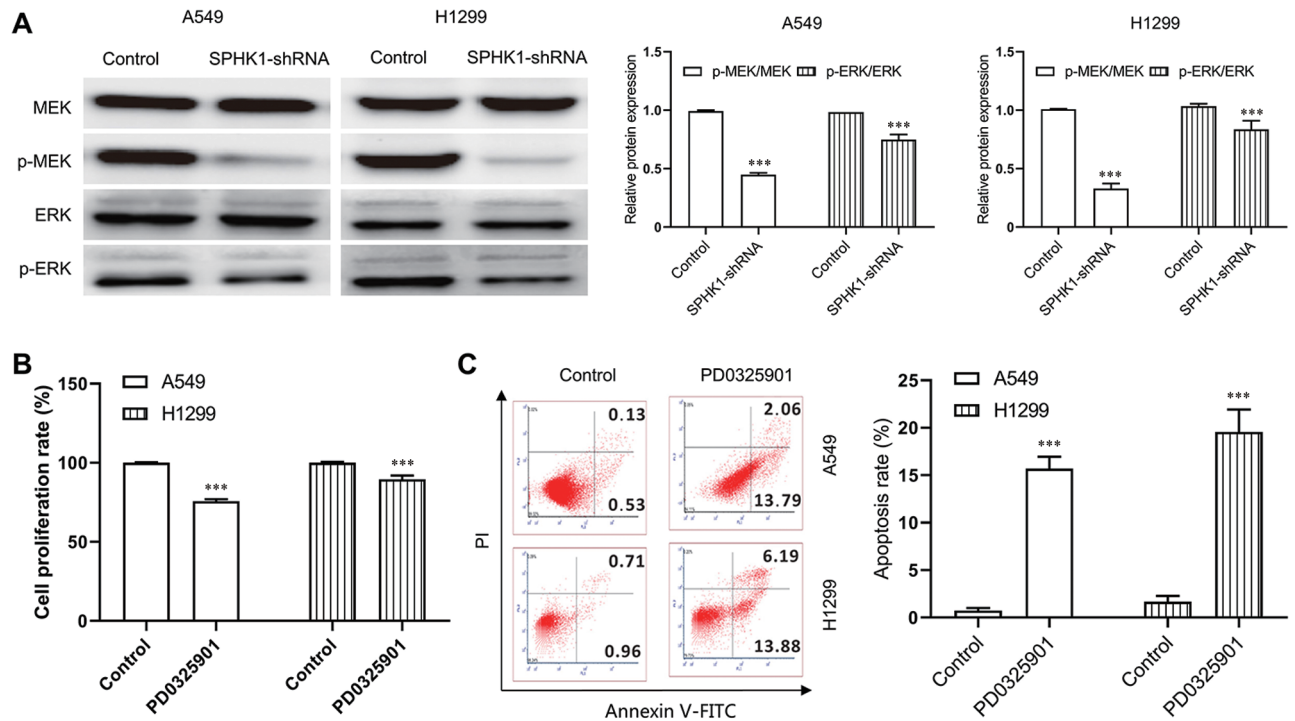


图 6. SPHK1-shRNA可能通过MEK/ERK信号通路诱导NSCLC细胞凋亡

Fig. 6. SPHK1-shRNA might induce NSCLC cell apoptosis through MEK/ERK signaling pathway. *A*: The phosphorylation level of MEK1/2 and ERK1/2 detected by Western blot. *B*: The effect of MEK inhibitor PD0325901 on cell proliferation detected by CCK-8 test. *C*: The effect of MEK inhibitor PD0325901 on cell apoptosis detected by flow cytometry. Mean ± SD, $n = 3$. *** $P < 0.001$ vs control.

3 讨论

研究表明, 在胃癌^[4]、卵巢癌^[5]、结直肠癌^[9]和口腔癌^[10]等类型的癌症中 SPHK1 存在过表达现象。Zheng 等报道 SPHK1 在癌细胞的生长、进展、转化和转移等许多重要过程中起着重要作用^[3]。本研究探讨了 SPHK1 在肺癌中的可能作用及其潜在机制, 结果显示 SPHK1 在肺癌细胞中表达上调。这与 Lyn 等人的研究一致, 他们的结果显示 SPHK1 在 NSCLC 细胞中上调^[7]。Yue 等^[10]在舌鳞状细胞癌组织中也发现了 SPHK1 上调, 并影响肿瘤的发展。本研究探讨了转染 SPHK1-shRNA 对肺癌细胞增殖和凋亡的影响, 发现 A549 和 H1299 中转染 SPHK1-shRNA 后抑制了细胞增殖, 并促进细胞凋亡。Li 等研究显示, SPHK1 上调可明显抑制阿霉素或多西紫杉醇诱导的细胞凋亡, 抑制 SPHK1 的表达可显著提高 NSCLC 细胞对化疗药物诱导的细胞凋亡的敏感性^[11]。结直肠癌中细胞的增殖和迁移被证明是由 SPHK1 水平的上调所促进的^[9]。此外, 本研究结果提示 SPHK1-shRNA 可能通过抑制 MEK/ERK 途径来增强肺癌细胞毒性和凋亡的潜在分子机制。越来越多的研究证实, MEK/ERK 信号轴在各种肿瘤中高度激活, 使其成为新抗癌药物的潜在靶点^[12-14]。Li 等报道营养细胞因子瘦素通过激活 NSCLC 细胞 PI3K/AKT 和 MAPK/ERK 途径促进 NSCLC 的发展^[14]。在肝细胞癌中, STYK1 作为癌基因通过 MEK/ERK 和 PI3K/AKT 信号通路诱导细胞侵袭和上皮-间质转化, 提示其可能是肝细胞癌潜在的治疗靶点^[12]。

对凋亡的抵抗增强是大多数癌症的标志改变, 促凋亡已被证明是肿瘤发生、展过程中的关键事件之一^[15]。在本研究中, Annexin V-FITC/PI 凋亡检测和 TUNEL 染色结果都显示, SPHK1-shRNA 转染 NSCLC 细胞后显著诱导细胞凋亡。细胞凋亡主要有两种类型, 一种是外源性凋亡, 即死亡受体途径, 另一种是由于细胞内环境稳定的破坏而发生的内源性凋亡, 即线粒体途径。已经证实, MMP 的下调是线粒体凋亡途径的第一步, 其导致线粒体膜通透化, Cytochrome C 从线粒体释放到细胞质中^[16]。本研究为了确定 NSCLC 细胞中 SPHK1-shRNA 转染的促凋亡是否由线粒体途径引发, 采用 JC-1 染色法检测 MMP^[8]。虽然内源性和外源性的细胞凋亡都有独特的起始步骤, 但都集中在一系列半胱天冬酶的级联激活。起始半胱天冬酶(如 caspase-8/9)开始一

系列蛋白水解步骤来激活半胱天冬酶(caspase-3/7)。本研究结果显示, SPHK1-shRNA 转染可促进线粒体膜去极化和下调线粒体膜电位。免疫印迹结果显示, SPHK1-shRNA 转染下调 Bcl-2 表达水平, 同时上调线粒体中 BAX 和细胞质中 Cytochrome C 的水平, 下调细胞质中 BAX 和线粒体中 Cytochrome C 的水平。线粒体和胞质的蛋白表达水平变化相反可能是由于线粒体蛋白的释放机制, 提示 SPHK1 下调后促凋亡蛋白 BAX 从细胞质易位至线粒体中, 而线粒体凋亡蛋白 Cytochrome C 从线粒体释放到细胞质, 线粒体在程序性细胞死亡过程中发挥着关键作用, Cytochrome C 释放水平可以作为线粒体损伤的生物标志物, 在许多细胞凋亡模型中都存在其从线粒体膜间隙到细胞质的易位^[17]。BAX 是 Bcl2 家族的一个成员, 可促进 Cytochrome C 释放到细胞质中, 也可以反映线粒体功能^[18]。此外, BAX/Bcl-2 比率的增加可进一步增加 Cytochrome C 从线粒体到细胞质的释放, 并激活 caspase-9 和 caspase-3, 导致细胞凋亡^[19]。本研究结果显示, SPHK1-shRNA 转染后, NSCLC 细胞中 active caspase-9、active caspase-3 和 cleaved-PARP 的表达水平显著上调。上述研究结果提示, 在 NSCLC 细胞中, SPHK1-shRNA 转染可能以半胱天冬酶依赖性方式诱导线粒体途径的细胞凋亡。

此外, 另一个有助于化疗药物抗肿瘤活性的关键机制是细胞周期停滞, 其抑制癌细胞生长和诱导细胞凋亡并停止细胞周期的进展^[20]。CDK4、CDK6 和 Cyclin D1 是控制真核细胞能否从 G1 期进入 S 期的主要 G1/S 细胞周期检查点蛋白^[21, 22]。本研究结果显示, SPHK1-shRNA 转染可使细胞阻滞在 G0/G1 期, 且可能是由于 CDK4、CDK6 和细胞周期蛋白水平降低所致, 这与以前的文献报道一致^[22]。

综上, 本研究结果显示, SPHK1 基因表达在 NSCLC 细胞系中上调, SPHK1-shRNA 转染可抑制 A549 和 H1299 细胞的增殖、使细胞阻滞在 G0/G1 期, 并促进线粒体内源性凋亡, 其机制可能是对 MEK/ERK 信号通路的抑制。本研究没有评估 SPHK1 对与肿瘤发生相关的其他信号通路的影响, 且没有在动物模型中评估 SPHK1 在 NSCLC 发展中的机制, 这将在后续的研究中进一步探讨。

参考文献

- 1 Deng M, Liu B, Zhang Z, Chen Y, Wang Y, Wang X, Lv Q, Yang X, Hou K, Che X, Qu X, Liu Y, Zhang Y, Hu X.

- Knockdown of G-protein-signaling modulator 2 promotes metastasis of non-small-cell lung cancer by inducing the expression of Snail. *Cancer Sci* 2020; 111(9): 3210–3221.
- 2 Yue DS (岳东升), Wang CL. Advances in adjuvant targeted therapy for non-small cell lung cancer. *Chin J Clin Oncol (中国肿瘤临床)* 2018; 45(23): 1225–1229 (in Chinese).
 - 3 Zheng X, Li W, Ren L, Liu J, Pang X, Chen X, Kang, Wang J, Du G. The sphingosine kinase-1/sphingosine-1-phosphate axis in cancer: Potential target for anticancer therapy. *Pharmacol Ther* 2019; 195(3): 85–99.
 - 4 Sukocheva O, Furuya H, Ng M, Friedemann M, Menschikowski M, Tarasov V, Chubarev V, Klochkov S, Neganova M, Mangoni A, Aliev G, Bishayee A. Sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate receptor signaling pathway in inflammatory gastrointestinal disease and cancers: A novel therapeutic target. *Pharmacol Ther* 2020; 207(3): 107464.
 - 5 Dai L, Liu Y, Xie L, Wu X, Qiu L, Di W. Sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate (S1P)/S1P receptor axis is involved in ovarian cancer angiogenesis. *Oncotarget* 2017; 8(43): 74947–74961.
 - 6 Ma Y, Xing X, Kong R, Cheng C, Li S, Yang X, Li S, Zhao F, Sun L, Cao G. SphK1 promotes development of non-small cell lung cancer through activation of STAT3. *Int J Mol Med* 2021; 47(1): 374–386.
 - 7 Lyn BJ (吕冰洁), An C, Hao D, Wang T, Wang XZ, Li HB, Yang Y. Sphingosine kinase 1 enhances invasion and migration of non-small-cell lung cancer cells by ERK1/2 signaling pathway. *Chin J Pathophysiol (中国病理生理杂志)* 2020; 2020(7): 1224–1229 (in Chinese).
 - 8 Xie H, Li X, Chen Y, Lang M, Shen Z, Shi L. Ethanolic extract of *Cordyceps cicadae* exerts antitumor effect on human gastric cancer SGC-7901 cells by inducing apoptosis, cell cycle arrest and endoplasmic reticulum stress. *J Ethnopharmacol* 2019; 231(3): 230–240.
 - 9 Bao Y, Guo Y, Zhang C, Fan F, Yang W. Sphingosine kinase 1 and sphingosine-1-phosphate signaling in colorectal cancer. *Int J Mol Sci* 2017; 18(10): 2109–2120.
 - 10 Yue ZW (岳增文), Cao XP, Wang SB, Zhang K. Expression of sphingosine kinase-1 in tongue squamous cell carcinoma and its downregulation on Tca8113 cell migration. *J Pract Stomatol (实用口腔医学杂志)* 2012; 28(6): 735–739 (in Chinese).
 - 11 Song L, Xiong H, Li J, Liao W, Wang L, Wu J, Li M. Sphingosine kinase-1 enhances resistance to apoptosis through activation of PI3K/Akt/NF- κ B pathway in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17(7): 1839–1849.
 - 12 Wang Z, Qu L, Deng B, Sun X, Wu S, Liao J, Fan J, Peng Z. STYK1 promotes epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis in human hepatocellular carcinoma through MEK/ERK and PI3K/AKT signaling. *Sci Rep* 2016; 6(9): 33205.
 - 13 Wang XM (王希明), Zhang Y, Liu YP, Mu XD, Qu XJ, Hou KZ, Kang J, Hu XJ. Icotinib inhibits proliferation and induces apoptosis via inactivation of the c-Cbl dependent MAPK/ERK pathway in human HCC827 lung cancer cells. *J Mod Oncol (现代肿瘤医学)* 2014; (5): 1024–1027 (in Chinese).
 - 14 Li F, Zhao S, Guo T, Li J, Gu C. The nutritional cytokine leptin promotes NSCLC by activating the PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways in NSCLC cells in a paracrine manner. *BioMed Res Int* 2019; 2019(4): 1–8.
 - 15 Zhang MR (张梦然), Liu JM, Gong JH, Liu XJ. Necrotic apoptosis and tumor therapy. *Chin Med Biotechnol (中国医药生物技术)* 2019; 14(2): 174–177 (in Chinese).
 - 16 Chen X, Liu R, Liu X, Xu C, Wang X. L-ascorbic acid-2-glucoside inhibits *Helicobacter pylori*-induced apoptosis through mitochondrial pathway in gastric epithelial cells. *Biomed Pharmacother* 2018; 97(2): 75–81.
 - 17 Santucci R, Sinibaldi F, Cozza P, Polticelli F, Fiorucci L. Cytochrome c: An extreme multifunctional protein with a key role in cell fate. *Int J Biol Macromol* 2019; 136(9): 1237–1246.
 - 18 Zhang M, Zheng J, Nussinov R, Ma B. Release of cytochrome C from Bax pores at the mitochondrial membrane. *Sci Rep* 2017; 7(1): 2635.
 - 19 Zhang X, Xu X, Lu L, Wan X, Qin Y, Ruan W, Lv C, He L, Guo X. A new Mfn-2 related synthetic peptide promotes vascular smooth muscle cell apoptosis via regulating the mitochondrial apoptotic pathway by inhibiting Akt signaling. *J Transl Med* 2021; 19(1): 395.
 - 20 Lin YC, Su JH, Lin SC, Chang CC, Hsia TC, Tung YT, Lin CC. A soft coral-derived compound, 11-dehydrosinulariolide, induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in small cell lung cancer. *Mar Drugs* 2018; 16(12): 479.
 - 21 VanArsdale T, Boshoff C, Arndt KT, Abraham RT. Molecular pathways: Targeting the cyclin D-CDK4/6 axis for cancer treatment. *Clin Cancer Res* 2015; 21(13): 2905–2910.
 - 22 Deng L (邓龙), Xu M, Fu L, Du GQ, Wang L. Effects of CDK4/6 inhibitor palbociclib on proliferation, cell cycle and apoptosis of human melanoma cells. *Tumor (肿瘤)* 2020; 40(8): 521–530 (in Chinese).