

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2022. 11. 011

论著 • 基础

干扰脊椎蛋白 2 表达抑制肺腺癌细胞增殖和转移能力的研究

李艳光, 任明明, 牛洁婷, 唐国杰, 孙震, 孔繁义, 宋翔

基金项目: 河北省医学科学研究课题计划项目(20211362)

作者单位: 061000 河北省沧州市中心医院胸外科(李艳光、任明明、唐国杰、孙震、孔繁义、宋翔) 老年内科(牛洁婷)

通信作者: 宋翔, E-mail: yoursx@126.com

【摘要】 目的 分析脊椎蛋白 2 (SPON2) 在肺腺癌细胞中的表达及其对肺腺癌细胞增殖和转移的影响。方法 2021 年 1 月—2022 年 4 月于沧州市中心医院进行实验, 收集 2015 年 1 月—2016 年 12 月医院胸外科行手术切除的肺腺癌组织及其配对的癌旁组织样本各 86 份, 采用免疫组织化学法(IHC) 检测肺腺癌组织和配对的癌旁组织中 SPON2 表达水平, 并分析 SPON2 的表达与肺腺癌患者临床病理参数和预后的关系。培养肺腺癌细胞 A549, 分为 si-NC 组(转染 NC siRNA) 和 si-SPON2 组(转染 SPON2 siRNA), Western-blot 检测 2 组细胞中 SPON2、细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1)、细胞周期蛋白依赖激酶 4 (CDK4)、基质金属蛋白酶 7 (MMP-7)、MMP-9 的表达; CCK8 实验和集落形成实验检测 2 组细胞的增殖能力; 流式细胞仪检测 2 组细胞周期; Transwell 实验检测 2 组细胞的转移能力。结果 与癌旁组织比较, 肺腺癌组织中 SPON2 阳性表达率显著上调 ($\chi^2 = 5.821, P = 0.016$)。在肺腺癌 T 分期 T3~4 期、N 分期 N1~2 期、TNM 分期 III~IV 期患者中 SPON2 表达分别高于 T1~2 期、N0 期、I~II 期 ($\chi^2/P = 7.481/0.006, 5.331/0.021, 9.139/0.003$)。与低表达 SPON2 的肺腺癌患者比较, 高表达 SPON2 的肺腺癌患者预后较差, 差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 4.877, P = 0.027$)。si-SPON2 组细胞中 SPON2 的表达明显高于 si-NC 组 ($t = 28.343, P < 0.001$)。与 si-NC 组比较, si-SPON2 组 A549 细胞的增殖和转移能力降低, 细胞周期阻滞在 G0/G1 期, cyclinD1、CDK4、MMP-7、MMP-9 表达减少, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 SPON2 在肺腺癌中表达上调, 可能通过调控细胞周期相关蛋白及转移相关蛋白促进肺腺癌的增殖和转移能力, 可能是治疗肺腺癌的潜在靶点。

【关键词】 肺腺癌; 脊椎蛋白 2; 增殖; 转移; 作用机制**【中图分类号】** R734.2**【文献标识码】** A

Inhibition of proliferation and metastasis of lung adenocarcinoma cells by interfering with the expression of spinal protein 2 Li Yanguang*, Ren Mingming, Niu Jieting, Tang Guojie, Sun Zhen, Kong Fanyi, Song Xiang. * Department of Thoracic Surgery, Cangzhou Central Hospital, Hebei Province, Cangzhou 061000, China

Corresponding author: Song Xiang, E-mail: yoursx@126.com

Funding program: Hebei Medical Science Research Project Plan (20211362)

【Abstract】 Objective To analyze the expression of spinal protein 2 (SPON2) in lung adenocarcinoma cells and its effect on the proliferation and metastasis of lung adenocarcinoma cells. **Methods** From January 2021 to April 2022, the experiment was carried out in Cangzhou Central Hospital. 86 lung adenocarcinoma tissues and their paired adjacent tissue samples were collected from January 2015 to December 2016, respectively. Immunohistochemical method (IHC) was used to detect the expression level of SPON2 in lung adenocarcinoma tissues and paired adjacent tissues, and analyze the relationship between the expression of SPON2 and clinical pathological parameters and prognosis of lung adenocarcinoma patients. Lung adenocarcinoma cells A549 were cultured and divided into si-NC group (transfected with NC siRNA) and si-SPON2 group (transfected with SPON2 siRNA). Western blot was used to detect the expression of SPON2, cyclin D1, cyclin dependent kinase 4 (CDK4), matrix metalloproteinase 7 (MMP-7), and MMP-9 in the two groups; CCK8 test and colony formation test were used to detect the proliferation ability of the two groups of cells; The cell cycle was detected by flow cytometry; Transwell test was used to detect the metastatic ability of the two groups of cells. **Results** Compared with the adjacent tissues, the positive expression rate of SPON2 in lung adenocarcinoma tissues was significantly increased ($\chi^2 = 5.821, P = 0.016$). The expression of SPON2 in lung adenocarcinoma patients with T stage T3-4, N stage N1-2, TNM stage III-IV was higher than that of T1-2,

N0, I-II, respectively ($\chi^2/P = 7.481/0.006, 5.331/0.021, 9.139/0.003$). Compared with lung adenocarcinoma patients with low expression of SPON2, lung adenocarcinoma patients with high expression of SPON2 have a poor prognosis, and the difference is statistically significant ($\chi^2 = 4.877, P = 0.027$). The expression of SPON2 in si-SPON2 group was significantly higher than that in si-NC group ($t = 28.343, P < 0.001$). Compared with the si-NC group, the proliferation and metastasis of A549 cells in the si-SPON2 group decreased, the cell cycle was blocked in G0/G1 phase, and the expression of cyclinD1, CDK4, MMP-7, and MMP-9 decreased, with significant differences ($P < 0.05$). **Conclusion** The up-regulated expression of SPON2 in lung adenocarcinoma may promote the proliferation and metastasis of lung adenocarcinoma by regulating cell cycle related proteins and metastasis related proteins, which may be a potential target for the treatment of lung adenocarcinoma.

【Key words】 Lung adenocarcinoma; Spinal protein 2; Proliferation; Metastasis; Mechanism

肺癌是全球癌症相关死亡的主要原因之一,发病率也较高。肺癌主要有 2 个亚型:小细胞肺癌和非小细胞肺癌(NSCLC),肺腺癌是最普遍的 NSCLC 类型。尽管近几十年来,包括免疫疗法、放疗和手术切除治疗在内的多种治疗手段已使疗效大大提高,但肺腺癌的临床治疗效果仍然不满意,其总体 5 年生存率 < 15%^[1]。目前肺腺癌的发病机制尚未完全明确,因此了解肺腺癌的发病机制并确定 NSCLC 患者有效疗法的潜在机制具有重要意义。脊椎蛋白 2 (spondin2, SPON2), 也称为 Mindin、Dil1 或 M-Spondin, 是一种细胞外基质蛋白, 已知与整合蛋白受体结合, 可调节免疫功能^[2]。最近研究表明, 在包括结直肠癌、肝细胞癌和胃癌等各种恶性肿瘤中, SPON2 表达上调^[3-5]。在结直肠癌中, SPON2 可通过激活整合蛋白 $\beta 1$ /PYK2 轴来促进单核细胞的细胞骨架重塑和细胞迁移, 以促进结直肠癌的恶性进展。在胃癌中 Notch 信号通路激活通过增加 SPON2 表达促进肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力。SPON2 具有抗肿瘤治疗分子靶点的潜力。Yuan 等^[6]报道 SPON2 在肺腺癌组织中表达上调, 其高表达与肺腺癌患者不良临床病理参数相关, 但是 SPON2 在肺腺癌中发挥的具体作用和分子机制尚不清楚。因此, 本研究旨在获得 SPON2 作为肺腺癌治疗的潜在分子靶点提供实验室依据, 报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1) 研究对象: 病理组织: 收集 2015 年 1 月—2016 年 12 月河北省沧州市中心医院胸外科行手术切除的肺腺癌组织及其配对的癌旁组织样本各 86 份, 用于免疫组织化学法检测。细胞系: 肺腺癌细胞系 A549 购自美国 ATCC 细胞库。(2) 试剂、试剂: 甲苯及乙醇购自天津风船试剂公司; IHC DAKO 试剂盒购自丹麦; DMEM-F12 培养基、胎牛血清、青霉素/链霉素和 BCA 蛋白浓度检测试剂盒均购自美国 Thermo 公司; SPON2 siRNA 购自上海吉凯基因有限公司; Lip2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司; CCK8 试剂购自美国 sigma 公司; 细胞周期检测试剂盒购自上海碧云天

试剂有限公司; PARP 蛋白裂解试剂和 ECL 化学发光试剂盒购自北京索莱宝试剂公司; Transwell 小室购自美国 Corning 公司; PVDF 膜购自美国 millipore 试剂公司; SPON2 一抗 (IHC: ab215451)、SPON2 一抗 (western blotting: ab171955) 和 GAPDH 一抗 (ab171955) 抗体购自英国 Abcam 公司。(3) 仪器设备: Transwell 小室购自美国 Corning 公司; 酶标仪 (型号 Varioskan LUX) 购自美国 Thermo 公司; 加湿培养箱 (型号 BIC-100 型) 购自上海儒一恒温公司; 显微镜 (型号 DM2700M) 购自德国 Leica 公司; 流式细胞仪 (型号 FACSVia) 购自美国 BD 公司。本实验严格遵守赫尔辛基宣言及人体临床组织的使用, 经医院人体实验机构伦理委员会批准 (201402104), 患者及家属均知情同意并签署知情同意书。

1.2 实验方法 2021 年 1 月—2022 年 4 月于河北省沧州市中心医院进行实验。

1.2.1 细胞培养: 采用 DMEM-F12 培养基培养肺腺癌细胞系 A549, 并添加 10% 胎牛血清和青霉素/链霉素 100 U/ml, 放置在含有 5% CO₂ 的 37℃ 加湿培养箱中培养。细胞融合度为 90% 时, 采用胰酶消化收集细胞, 进行细胞传代, 用于后续实验。

1.2.2 SPON2 siRNA 转染细胞: 处于对数期生长的肺腺癌细胞系 A549 消化后, 以 2.0×10^5 个细胞铺至 6 孔板中, 分为 si-NC 组和 si-SPON2 组, 放置在含有 5% CO₂ 的 37℃ 加湿培养箱中培养。各组细胞贴壁更换为无血清培养基待转染, 采用 lip2000 转染试剂按照说明书分别将 5 μ g NC siRNA 转染至 si-NC 组, 5 μ g SPON2 siRNA 转染至 si-SPON2 组。放置在含有 5% CO₂ 的 37℃ 加湿培养箱中培养, 12 h 后更换培养基继续培养。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 免疫组织化学法 (IHC) 检测 SPON2 蛋白表达: 采用 4% 聚氧甲基固定待检测的肺腺癌组织及其配对的癌旁组织样本 1 h, 通过乙醇梯度脱水并浸润石蜡制成 5 μ m 的石蜡切片。石蜡切片经烤片 1 h 后浸入二甲苯中脱蜡 30 min, 然后经乙醇梯度水化 20 min。

在枸橼酸钠抗原修复液中高温煮沸 3 min, 冷却后放置内源性过氧化物酶液中孵育 30 min 封闭非特异性抗原, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min, 后将切片在 4℃ 下与 SPON2 一抗抗体 (1:100) 孵育过夜, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min, 后经二抗 37℃ 孵育 30 min, 然后经显色及苏木精复染后封片。2 位病理学医生采用以下标准评估 IHC 结果: 包括染色强度 0 分 (阴性), 1 分 (弱阳性), 2 分 (中度阳性) 和 3 分 (强阳性)。染色面积: 0 分 (<5%), 1 分 (5%~25%), 2 分 (>25%~50%), 3 分 (>50%~75%) 和 4 分 (>75%)。将染色强度得分乘以染色面积得分来计算 SPON2 蛋白的最终表达评分。染色得分定义如下: 得分 ≥ 3 分为高表达, ≤ 2 分为低表达。

1.3.2 CCK8 实验和集落形成实验检测 A549 细胞增殖能力: (1) CCK8 实验: 将 si-NC 组和 si-SPON2 组 A549 细胞以每孔 2 000 个细胞、培养基 150 μl 铺至 96 孔板中, 每组设置 6 个平行复孔。在 24、48、72 和 96 h 时分别加入 CCK8 溶液 10 μl , 放置在含有 5% CO_2 的 37℃ 加湿培养箱中继续培养 2 h。震荡混匀后采用酶标仪测量 0、24、48、72、96 h 时各孔细胞 450 nm 处的吸光度值 (OD 值)。(2) 集落形成实验: 将 si-NC 组和 si-SPON2 组 A549 细胞以每孔 300 个细胞、2 ml 铺至 6 孔板中, 每组设置 3 个平行复孔, 放置在含有 5% CO_2 的 37℃ 加湿培养箱中继续培养, 每 2 d 更换 1 次新鲜培养基。肉眼观察到细胞克隆团后, 终止培养, PBS 洗 3 次, 无水乙醇固定 30 min, 并用 1% 结晶紫染色 10 min, 计数细胞克隆团数目。

1.3.3 流式细胞术检测细胞周期分布率: 收集 si-NC 组和 si-SPON2 组 A549 细胞, 采用 4℃ 的 PBS 洗涤 2 次后, 以每管 5×10^5 个细胞收集至流式细胞管中, 每组设置 3 个平行复孔。采用缓冲液 500 μl 重新悬浮细胞后, 加入碘化丙啶染色液 (PI) 25 μl 和 RNase A 10 μl 混匀, 常温避光孵育 30 min, 流式细胞仪测定细胞周期分布率。

1.3.4 Transwell 实验检测穿膜细胞数目: 收集 si-NC 组和 si-SPON2 组 A549 细胞, PBS 洗涤 2 次后, 以每孔 1.0×10^6 个细胞重悬至无血清培养基 100 μl 中, 并均匀加至 Transwell 小室上室的膜中, 再放入含有 500 μl 完全培养基的 Transwell 小室下室中, 放置在含有 5% CO_2 的 37℃ 加湿培养箱中。培养 12 h 后终止培养, 擦掉 Transwell 小室上室中未穿过膜的细胞, PBS 将下室的细胞洗 3 次后, 放入甲醇溶液中 15 min 以固定细胞, 结晶紫染色 15 min。PBS 洗 3 次后, 显微镜下计数穿膜细胞数目。

1.3.5 Western-blot 检测蛋白表达: 收集 si-NC 组和 si-SPON2 组 A549 细胞, PBS 洗涤 2 次后, 加入 PARP 蛋白裂解液, 充分裂解细胞。低温高速离心, 吸取上清液。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测得细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1)、细胞周期蛋白依赖激酶 4 (CDK4)、基质金属蛋白酶 7 (MMP-7)、MMP-9 浓度, 加入蛋白上样缓冲液煮沸使蛋白变性。采用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质, 采用湿转将蛋白转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上。PVDF 与 5% 封闭液室温孵育 2 h 后, 分别与一抗稀释液 4℃ 孵育过夜、二抗稀释液室温孵育 1 h。最终采用 ECL 试剂盒显示曝光蛋白条带。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行数据统计学分析。计数资料以频数或率 (%) 表示, 组间比较采用 χ^2 检验; 符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验; Kaplan-Meier 法绘制生存曲线, Log-Rank 分析 SPON2 表达对患者预后的影响。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺腺癌组织及其癌旁组织中 SPON2 表达比较 IHC 结果显示, 肺腺癌组织中 SPON2 的阳性表达率为 59.30% (51/86), 高于癌旁组织中的阳性表达率 43.02% (37/86), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 5.821$, $P = 0.016$), 见图 1。

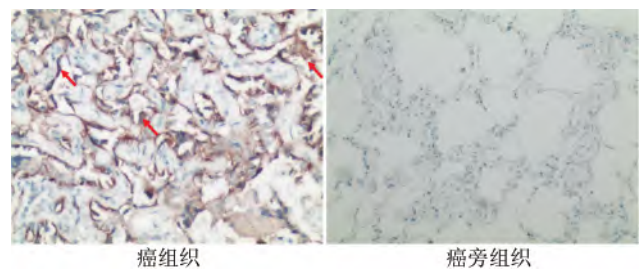


图 1 肺腺癌组织、癌旁组织中 SPON2 的表达比较 (免疫组织化学染色, $\times 200$)

Fig. 1 Comparison of SPON2 expression in lung adenocarcinoma tissues and adjacent tissues (immunohistochemical staining, $\times 200$)

2.2 2 组肺腺癌细胞 SPON2 表达比较 qRT-PCR 结果显示, si-SPON2 组细胞中 SPON2 的表达量为 (1.00 ± 0.03) , 明显高于 si-NC 组的 (0.41 ± 0.02) ($t = 28.343$, $P < 0.001$)。

2.3 SPON2 对肺腺癌细胞增殖能力的影响 CCK8 实验检测结果显示, 与 si-NC 组比较, si-SPON2 组细胞增殖活性在不同时间 (24、48、72、96 h) 显著降低 ($P <$

0.05) ,见表 1; 集落形成实验检测结果显示 ,si-SPON2 组肺腺癌细胞的克隆形成数目为(50. 67 ± 8. 75) 个 , 低于 si-NC 组的(117. 33 ± 14. 09) 个 , 差异有统计学意义 ($t = 6. 961$, $P < 0. 001$) ,见图 2。

表 1 si-NC 组和 si-SPON2 组不同时点肺腺癌细胞 450 nm OD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of 450 nm OD values of lung adenocarcinoma cells in si NC group and si SPON2 group at different time points

时间(h)	si-NC 组 (n = 6)	si-SPON2 组 (n = 6)	t 值	P 值
0	0. 18 ± 0. 01	0. 18 ± 0. 01	0. 000	1. 000
24	0. 41 ± 0. 04	0. 34 ± 0. 05	2. 678	0. 021
48	0. 67 ± 0. 04	0. 54 ± 0. 09	3. 127	0. 014
72	0. 92 ± 0. 07	0. 61 ± 0. 08	6. 006	< 0. 001
96	1. 28 ± 0. 05	0. 68 ± 0. 10	12. 453	< 0. 001

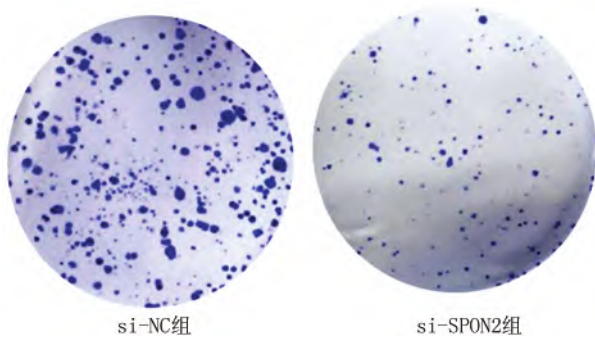


图 2 2 组肺腺癌细胞的克隆形成数目比较

Fig.2 Comparison of the number of clones of lung adenocarcinoma cells in two groups

2.4 SPON2 对肺腺癌细胞周期的影响 流式细胞仪检测结果显示 ,与 si-NC 组比较 ,si-SPON2 组 G0/G1 期的细胞分布增加($P < 0. 01$) ,G2/M 期的细胞分布增加($P < 0. 05$) ,S 期的细胞分布减少($P < 0. 01$) ,见表 2。

表 2 si-NC 组和 si-SPON2 组肺腺癌细胞各个细胞周期细胞比率比较 ($\bar{x} \pm s$, %)

Tab.2 Comparison of cell cycle cell ratios of lung adenocarcinoma cells in si NC group and si SPON2 group

细胞周期	si-NC 组 (n = 3)	si-SPON2 组 (n = 3)	t 值	P 值
G0/G1 期	44. 82 ± 3. 52	68. 29 ± 2. 88	8. 938	< 0. 001
G2/M 期	8. 83 ± 3. 01	15. 22 ± 2. 09	3. 020	0. 029
S 期	46. 35 ± 4. 32	16. 49 ± 3. 67	9. 124	< 0. 001

2.5 抑制 SPON2 对肺腺癌细胞转移能力的影响

Transwell 实验检测结果显示 ,si-SPON2 组肺腺癌细胞的穿膜数目为(20. 33 ± 4. 87) 个 ,少于 si-NC 组的(58. 67 ± 9. 63) 个 , 差异有统计学意义($t = 6. 154$, $P = 0. 002$) ,见图 3。

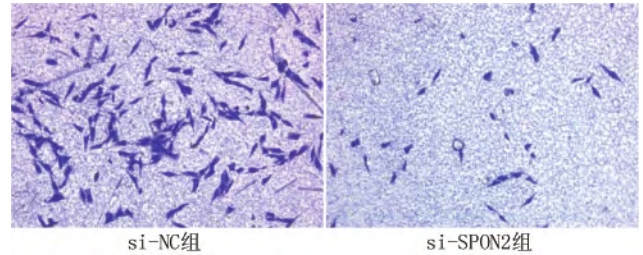


图 3 抑制 SPON2 对肺腺癌细胞转移能力的影响

Fig.3 Inhibiting the influence of SPON2 on the metastatic ability of lung adenocarcinoma cells

2.6 抑制 SPON2 对肺腺癌细胞中细胞周期相关蛋白和转移相关蛋白的影响 Western-blot 实验检测结果显示 ,与 si-NC 组比较 ,si-SPON2 组肺腺癌细胞 CyclinD1、CDK4、MMP-7、MMP-9 表达均减少 , 差异有统计学意义($P < 0. 01$) ,见图 4、表 3。

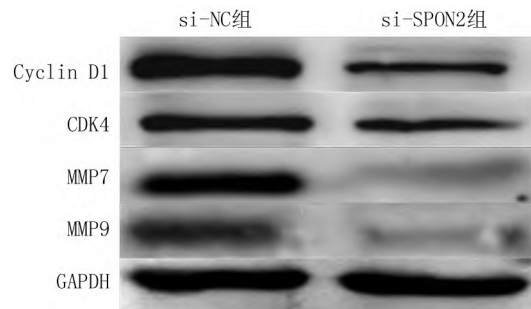


图 4 抑制 SPON2 对肺腺癌细胞周期相关蛋白和转移相关蛋白表达的影响

Fig.4 the effect of inhibiting SPON2 on the expression of cell cycle related proteins and metastasis related proteins in lung adenocarcinoma cells

表 3 si-NC 组和 si-SPON2 组肺腺癌细胞周期相关蛋白和转移相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Comparison of cell cycle related proteins and metastasis related proteins in lung adenocarcinoma between si NC group and si SPON2 group

蛋白	si-NC 组 (n = 3)	si-SPON2 组 (n = 3)	t 值	P 值
Cyclin D1	1. 02 ± 0. 21	0. 21 ± 0. 08	6. 243	0. 002
CDK4	0. 43 ± 0. 09	0. 18 ± 0. 05	4. 206	0. 008
MMP-7	0. 79 ± 0. 10	0. 09 ± 0. 03	11. 613	< 0. 001
MMP-9	0. 63 ± 0. 15	0. 11 ± 0. 04	5. 802	0. 002

2.7 SPON2 表达在肺腺癌患者不同临床病理参数间比较 在肺腺癌 T 分期 T3 ~ 4 期、N 分期 N1 ~ 2 期、TNM 分期 III ~ IV 期患者中 SPON2 表达高于 T1 ~ 2 期、N0 期、I ~ II 期,差异具有统计学意义($P < 0.05$) ,在不同性别、年龄患者中的表达差异无统计学意义($P > 0.05$) ,见表 4。

表 4 SPON2 在肺腺癌组织中的表达水平与临床病理参数之间的关系 [例(%)]

Tab. 4 The relationship between the expression level of SPON2 in lung adenocarcinoma tissue and clinical pathological parameters

项 目	例数	SPON2	χ^2 值	P 值	
性别	男	41	22(53.66)	1.034	0.309
	女	45	29(64.44)		
年龄	≤60 岁	36	19(52.78)	1.092	0.296
	>60 岁	50	32(64.00)		
T 分期	T1 ~ 2	54	26(48.15)	7.481	0.006
	T3 ~ 4	32	25(78.13)		
N 分期	N0	58	29(50.00)	5.331	0.021
	N1 ~ 2	28	22(78.57)		
TNM 分期	I ~ II 期	52	25(48.08)	9.139	0.003
	III ~ IV 期	34	26(76.47)		

2.8 SPON2 表达与肺腺癌患者预后的关系 与低表达 SPON2 的肺腺癌患者比较,高表达 SPON2 的肺腺癌患者预后较差,差异有统计学意义($\chi^2 = 4.877, P = 0.027$) ,见图 5。

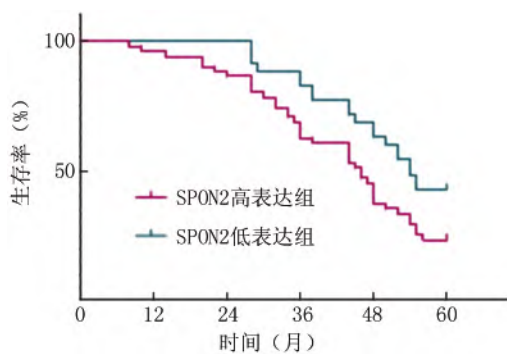


图 5 不同 SPON2 表达的肺腺癌患者预后生存曲线比较

Fig. 5 Comparison of prognosis and survival curves of lung adenocarcinoma patients with different SPON2 expressions

3 讨论

SPON2 通过直接与细菌和病毒病原体结合,引发先天免疫反应,是一种宿主先天免疫调节剂,是编码细胞外基质蛋白的 F-Spondin 超家族成员^[7]。研究表明其表达异常在肿瘤进展中发挥重要作用,既往研究报道,在肾透明细胞癌和肝细胞肝癌中 SPON2 过表达,

其中在肾透明细胞癌中 SPON2 表达与患者分期、组织分级和复发均显著相关^[8],在肝细胞肝癌组织中 SPON2 的高表达与患者肿瘤较大及患者预后较差相关^[4],可作为肾透明细胞癌和肝细胞肝癌预后生物标志物。同时 Yuan 等^[6]研究发现,在肺腺癌中 SPON2 蛋白的过表达与肿瘤分化、阳性淋巴结转移、较高的血清癌胚抗原(CEA)水平和整体存活率不佳相关。本研究结果显示,SPON2 在肺腺癌组织中的表达显著高于其配对的癌旁组织,SPON2 在 T 分期、N 分期、TNM 分期较高及预后较差的肺腺癌组织中表达相对较高,并是肺腺癌患者预后不良的独立危险因素,与已有的报道具有一致性^[6,9],均提示 SPON2 可以用作监测肺腺癌预后的生物标志物,但对于某个临床病理特征的不一致,可能是由样本量及样本来源的区域不同而导致的,后续本研究会继续扩大样本量进行验证。

SPON2 具有驱动肺腺癌发生发展的生物学功能,而不仅仅是显示患者预后不良的生物标志物。查阅文献显示,SPON2 在结直肠癌、胃癌等恶性肿瘤中促进肿瘤的进展,其中在胃癌中 SPON2 与 Cyclin D1 的启动子区结合,促进其转录水平增加,促进胃癌细胞的增殖^[3,9]。结合 Yuan 等^[6]的研究及本研究结果,SPON2 在 T 分期和 TNM 分期晚期的肺腺癌患者中表达升高,提示 SPON2 可能促进肺腺癌细胞的增殖。本研究 CCK8 实验和集落形成实验结果均显示,抑制 SPON2 的表达可抑制肺腺癌细胞的增殖能力。在正常生理过程中,细胞周期具有严密的调控机制,当细胞周期调控失调时,细胞增殖能力增加,是肿瘤发生发展的重要机制之一^[10-12]。本研究结果显示,抑制 SPON2 的表达后,肺腺癌细胞周期阻滞在 G0/G1 期,表明 SPON2 促进肺腺癌的周期进展进而促进细胞增殖。细胞周期相关蛋白 Cyclin D1、CDK4 是调控 G0/G1 期转换的关键蛋白,CDK4 与 Cyclin D1 结合形成复合物,并表现出激酶活性,促进下游蛋白磷酸化,驱动细胞周期进展^[13-15]。本研究抑制 SPON2 的表达后,肺腺癌细胞中 Cyclin D1 和 CDK4 蛋白表达降低,表明 SPON2 通过增加 Cyclin D1 和 CDK4 蛋白的表达促进细胞周期的进展,导致细胞增殖能力增加。与徐正磊等^[9]报道的 SPON2 促进胃癌细胞中 Cyclin D1 的表达一致,但是本研究未对 SPON2 和 cyclinD1 直接结合进行相关研究。

研究发现,SPON2 对于募集淋巴细胞和引发免疫反应至关重要,尤其是在肿瘤相关的巨噬细胞(TAM)浸润中。TAM 是肿瘤与免疫微环境之间复杂相互作用的关键调节剂,包括肿瘤的迁移调控^[16],提示

SPON2 与肿瘤迁移相关。新近研究表明,SPON2 在细胞迁移和肿瘤进展中具有复杂的作用,在肝细胞癌(HCC)的肿瘤微环境中,SPON2- α 4 β 1 整合素信号传导激活增加 F-肌动蛋白的重组并促进 M1 样表型巨噬细胞的浸润,而 SPON2- α 5 β 1 整合素信号传导失活并防止 F-肌动蛋白组装,抑制 HCC 细胞迁移能力,研究结果表明,在肝细胞癌中 SPON2 充当抑癌因子,并利用不同的信号通路在肝细胞肝癌的微环境中执行双重功能^[4]。但是在结直肠癌中 SPON2 通过促进 M2 样表型巨噬细胞的浸润,以促进肿瘤细胞的转移。此外 SPON2 可促进胃癌和肾透明细胞癌的侵袭转移能力^[3]。而在本研究中干扰 SPON2 的表达,肺腺癌细胞的转移能力显著降低,与在结直肠癌和胃癌中的报道一致,也与肺腺癌 N 分期较高的患者癌组织中 SPON2 表达较高一致。细胞外基质的降解是细胞入侵和转移开始的信号,基质金属蛋白酶(MMP)是参与细胞外基质降解和转移的重要分子^[17],在胃癌组织中 SPON2 与 MMP-9 表达呈正比^[18],本研究结果显示抑制 SPON2 的表达,肺腺癌细胞中 MMP-7、MMP-9 蛋白表达降低,提示 SPON2 通过调控基质金属蛋白酶 MMP-7、MMP-9 蛋白促进肺腺癌细胞转移能力。

综上所述,SPON2 在肺腺癌组织中表达升高,与肺腺癌患者不良病理参数和预后相关,SPON2 通过调控细胞周期相关蛋白和基质金属蛋白酶促进肺腺癌细胞增殖和转移能力。SPON2 具有作为肺腺癌患者预后不良生物标志物和分子靶点的重要意义。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

李艳光:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;任明明:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;牛洁婷:进行统计学分析;唐国杰:课题设计,论文审核;孙震:实施研究过程,分析试验数据;孔繁义:资料搜集整理,论文修改;宋翔:提出研究思路,分析试验数据

参考文献

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68 (6): 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492.

[2] Li N, Liu S, Zhang Y, et al. Transcriptional activation of matricellular protein spondin2 (SPON2) by brg1 in vascular endothelial cells promotes macrophage chemotaxis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 794. DOI: 10.3389/fcell.2020.00794.

[3] Jiang H, Guo W, Huang K, et al. Screening of radiotracer for diagnosis of colorectal cancer liver metastasis based on MACC1-SPON2 [J]. *Abdom Radiol (NY)*, 2021, 46 (7): 3227-3237. DOI: 10.1007/s00261-021-03015-w.

[4] Zhang YL, Li Q, Yang XM, et al. SPON2 promotes M1-like macrophage recruitment and inhibits hepatocellular carcinoma metastasis by distinct Integrin-Rho GTPase-Hippo pathways [J]. *Cancer Res*, 2018, 78 (9): 2305-2317. DOI: 10.1158/0008-5472.CCR-17-2867.

[5] Kang HG, Kim WJ, Noh MG, et al. SPON2 is upregulated through notch signaling pathway and promotes tumor progression in gastric cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12 (6): 1439. DOI: 10.3390/cancers12061439.

[6] Yuan X, Bian T, Liu J, et al. Spondin2 is a new prognostic biomarker for lung adenocarcinoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (35): 59324-59332. DOI: 10.18632/oncotarget.19577.

[7] Kahvecioglu S, Ersoy A, Üstündag Y, et al. The comparison spondin 2 levels in primary glomerular diseases [J]. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 2020, 31 (5): 1014-1024. DOI: 10.4103/1319-2442.301166.

[8] Ma HM, Yu M, Wu C, et al. Overexpression of spondin-2 is associated with recurrence-free survival in patients with localized clear cell renal cell carcinoma [J]. *Dis Markers*, 2020, 2020: 5074239. DOI: 10.1155/2020/5074239.

[9] 徐正磊,王立生,洪英财,等. SPON2 上调 Cyclin D1 表达对胃癌细胞影响的研究 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2022, 29 (7): 481-487. DOI: 10.16073/j.cnki.cjcp.2022.07.06.

Xu ZL, Wang LS, Hong YC, et al. SPON2 promotes the growth of gastric cancer by up-regulating Cyclin D1 expression [J]. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment*, 2022, 29 (7): 481-487. DOI: 10.16073/j.cnki.cjcp.2022.07.06.

[10] Liu J, Peng Y, Wei W. Cell cycle on the crossroad of tumorigenesis and cancer therapy [J]. *Trends Cell Biol*, 2022, 32 (1): 30-44. DOI: 10.1016/j.tcb.2021.07.001.

[11] 祝巧良,卢春来,古杰,等. 高表达 CXCR4 可通过乳酸脱氢酶 A 磷酸化诱导肺腺癌细胞产生吉非替尼耐药 [J]. *中国临床医学*, 2021, 28 (3): 408-415. DOI: 10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20210068.

Zhu QL, Lu CL, Gu J, et al. Overexpression of CXCR4 induces resistance to gefitinib in lung adenocarcinoma cells via enhancing lactate dehydrogenase A phosphorylation [J]. *Chinese Journal of Clinical Medicine*, 2021, 28 (3): 408-415. DOI: 10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20210068.

[12] 陈珑,王翠英,王琳,等. 奥希替尼治疗不同中性粒细胞/淋巴细胞比值的 T790 M 基因突变肺腺癌骨转移患者的疗效比较 [J]. *临床内科杂志*, 2021, 38 (1): 59-61. DOI: 10.3969/j.issn.1001-9057.2021.01.016.

[13] 贾春丽,路鹏霏,邱萍,等. 肺腺癌中核黄素转运体 2 基因和蛋白表达及功能的生物信息学分析 [J]. *疑难病杂志*, 2021, 20 (6): 579-583. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2021.06.009.

Jia CL, Lu PF, Qiu P, et al. Bioinformatics analysis of the expression and function of riboflavin transporter 2 in lung adenocarcinoma [J]. *Chin J Diffic and Compl Cas*, 2021, 20 (6): 579-583. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2021.06.009.

(下转 1185 页)

1071/RD14326.

[11] 尹燕,金志春,杨雅琴,等. 补肾益气活血方对大鼠卵巢储备功能的影响与作用机制[J]. 中国计划生育学杂志, 2021, 29(2): 221-225, 423. DOI: 10.3969/j.issn.1004-8189.2021.02.002.
Yin Y, Jin ZC, Yang YQ, et al. Effect and mechanism of BSYQHX prescription on ovarian reserve function of rats[J]. Chinese Journal of Family Plannin, 2021, 29(2): 221-225, 423. DOI: 10.3969/j.issn.1004-8189.2021.02.002.

[12] 王月娇,徐莲薇,刘小菲,等. 卵巢储备功能下降的中医研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(6): 1047-1050.
Wang YJ, Xu LW, Liu XF, et al. Advances in Research on the Etiology of Decline in Ovarian Reserve[J]. Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine, 2021, 27(6): 1047-1050.

[13] Pena-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, Bak and beyond-mitochondrial performance in apoptosis [J]. The FEBS Journal, 2018, 285(3): 416-431. DOI: 10.1111/febs.14186.

[14] 汪倩,卢鹤,李红晓,等. 基于 Nrf2/HO-1 信号通路探讨艾灸对卵巢储备功能减退大鼠的炎症调控机制[J]. 北京中医药大学学报, 2021, 44(3): 280-288. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2021.03.014.
Jiang Q, Lu G, Li XH, et al. Inflammatory regulation mechanism of moxibustion on rats with diminished ovarian reserve based on Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2021, 44(3): 280-288. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2021.03.014.

[15] 安东,刘丽敏. 补肾类中成药治疗卵巢储备功能下降的 Meta 分析[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(20): 4425-4431. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2021.20.029.

[16] Ling L, Feng X, Wei T, et al. Human amnion-derived mesenchymal stem cell (hAD-MSC) transplantation improves ovarian function in rats with premature ovarian insufficiency (POI) at least partly through a paracrine mechanism[J]. Stem Cell Research & Therapy,

2019, 10(1): 46. DOI: 10.1186/s13287-019-1136-x.

[17] FAN Xingyan, 于莎, 汪云, 等. 高孕激素促排卵与克罗米芬微刺激方案在卵巢低储备患者取卵周期的可控性比较[J]. 中国临床医学, 2021, 28(4): 539-543. DOI: 10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20210409.
FAN XY, Yu S, Wang Y, et al. Controllability comparison between progestin-primed ovarian stimulation and mild stimulation protocols in patients with diminished ovarian reserve in oocytes retrieval cycle [J]. Chinese Journal of Clinical Medicine, 2021, 28(4): 539-543. DOI: 10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20210409.

[18] 徐海霞,朱春兰,唐虹. 艾灸联合中药对多囊卵巢综合征不孕症患者卵巢储备功能的影响[J]. 上海针灸杂志, 2021, 40(5): 571-575. DOI: 10.13460/j.issn.1005-0957.2021.05.0571.
Xu HX, Zhu CL, Tang H. Effect of Moxibustion Combined with Chinese Medication on Ovarian Reserve Function in Patients with Infertility Due to Polycystic Ovary Syndrome [J]. Shanghai Journal of Acupuncture and Moxibustion, 2021, 40(5): 571-575. DOI: 10.13460/j.issn.1005-0957.2021.05.0571.

[19] Regan SLP, Knight PG, Yovich JL, et al. Granulosa cell apoptosis in the ovarian follicle—a changing view [J]. Frontiers In Endocrinology, 2018, 9: 61. DOI: 10.3389/fendo.2018.00061.

[20] Peng H, Zeng L, Zhu L, et al. Zuogui Pills inhibit mitochondria-dependent apoptosis of follicles in a rat model of premature ovarian failure [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2019, 238: 111855. DOI: 10.1016/j.jep.2019.111855.

[21] Pallavi N, Nalabolu GRK, Hiremath SKS. Bcl-2 and c-Myc expression in oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study to assess tumor progression [J]. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP, 2018, 22(3): 325-331. DOI: 10.4103/jomfp.JOMFP_197_18.

(收稿日期: 2022-05-08)

(上接 1179 页)

[14] Sun F, Li N, Tong X, et al. Ara-c induces cell cycle G1/S arrest by inducing upregulation of the INK4 family gene or directly inhibiting the formation of the cell cycle-dependent complex CDK4/cyclin D1 [J]. Cell Cycle, 2019, 18(18): 2293-2306. DOI: 10.1080/15384101.2019.1644913.

[15] 付茂月,雷开键,贾钰铭,等. 多西他赛联合顺铂治疗晚期肺腺癌患者的临床疗效及其对免疫功能的影响[J]. 实用心脑血管病杂志, 2021, 29(8): 48-53. DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2021.00.164.
Fu MY, Lei KJ, Jia YM, et al. Clinical Efficacy of Docetaxel Combined with Cisplatin in the Treatment of Advanced Lung Adenocarcinoma and the Impact on Immune Function of Patients[J]. Practical

Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2021, 29(8): 48-53. DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2021.00.164.

[16] Pan Y, Yu Y, Wang X, et al. Tumor-associated macrophages in tumor immunity [J]. Front Immunol, 2020, 11: 583084. DOI: 10.3389/fimmu.2020.583084.

[17] Abdel-Hamid NM, Abass SA. Matrix metalloproteinase contribution in management of cancer proliferation, metastasis and drug targeting [J]. Mol Biol Rep, 2021, 48(9): 6525-6538. DOI: 10.1007/s11033-021-06635-z.

[18] Jin C, Lin JR, Ma L, et al. Elevated spondin-2 expression correlates with progression and prognosis in gastric cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(6): 10416-10424. DOI: 10.18632/oncotarget.14423.

(收稿日期: 2022-06-20)