

CPT1A 促进肺癌转移的调控作用

贾建博¹, 王涛¹, 辛向兵¹, 卢强¹, 韩勇¹, 田磊²

1. 空军军医大学第二附属医院胸腔外科, 陕西 西安 710038;

2. 空军军医大学第一附属医院心血管外科, 陕西 西安 710032

【摘要】 目的 研究肉毒碱棕榈酰基转移酶 1A (CPT1A) 在肺癌转移中的调控作用。方法 首先, 利用实时定量 PCR (qRT-PCR) 与 Western blot 实验检测 11 对肺癌原发灶与转移灶组织中 CPT1A 分子的 mRNA 与蛋白表达, 以明确 CPT1A 在肺癌转移过程中的表达是否发生改变; 其次, 用细胞划痕实验检测下调 CPT1A 表达对肺癌 A549 细胞迁移能力的影响; 最后, 用 Transwell 侵袭实验检测下调 CPT1A 表达对肺癌 A549 细胞侵袭能力的影响。结果 肺癌转移灶组织中 CPT1A 表达在 mRNA 与蛋白水平均明显高于原发灶组织 [mRNA 水平: (1.00±0.14) vs (1.83±0.75); 蛋白水平: (1.00±0.26) vs (2.25±0.63)], 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 与对照组细胞相比, 下调 CPT1A 表达可显著抑制肺癌细胞的迁移能力 [siCtrl vs siCPT1A-1 vs siCPT1A-2 = (1.00±0.12) vs (0.39±0.04) vs (0.38±0.03)], 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 与对照组相比, 下调 CPT1A 表达可显著抑制肺癌细胞的侵袭能力 [siCtrl vs siCPT1A vs siCPT1A-2 = (23.00±3.00) vs (12.00±2.00) vs (13.00±1.00)], 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。结论 CPT1A 在肺癌转移过程中表达显著上调; CPT1A 可同时促进肺癌细胞的迁移与侵袭能力, 提示 CPT1A 是肺癌治疗潜在的分子靶标。

【关键词】 肉毒碱棕榈酰基转移酶 1A; 脂肪酸氧化; 迁移; 侵袭; 肺癌

【中图分类号】 R734.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2019)01-0005-04

Roles of CPT1A promoting lung cancer metastasis. JIA Jian-bo¹, WANG Tao¹, XIN Xiang-bing¹, LU Qiang¹, HAN Yong¹, TIAN Lei². 1. Department of Thoracic Surgery, the Second Affiliated Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi, CHINA; 2. Department of Cardiovascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the regulation of carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A) in lung cancer metastasis. **Methods** Firstly, real-time quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blot were used to detect the expression of CPT1A mRNA and protein in 11 pairs of primary and metastatic tissues of lung cancer, and to determine whether the expression of CPT1A in lung cancer metastasis changed. Secondly, scratch wound healing assay was used to detect the effect of down-regulation of CPT1A expression on the migration ability of lung cancer cells (A549 cell line). Finally, Transwell invasion assay was used to evaluate the effect of down-regulating CPT1A expression on the invasion ability of lung cancer A549 cells. **Results** The expression level of CPT1A in lung cancer metastatic tissues was significantly higher than that in primary tissues: mRNA level: (1.00±0.14) vs (1.83±0.75); protein level: (1.00±0.26) vs (2.25±0.63); $P<0.05$. Compared with the control cells, down-regulation of CPT1A expression significantly suppressed the migration ability of lung cancer cells: siCtrl vs siCPT1A-1 vs siCPT1A-2 = (1.00±0.12) vs (0.39±0.04) vs (0.38±0.03), $P<0.05$. Down-regulation of CPT1A expression also significantly inhibited the invasion abilities of lung cancer cells compared with the control group: siCtrl vs siCPT1A-1 vs siCPT1A-2 = (23.00±3.00) vs (12.00±2.00) vs (13.00±1.00), $P<0.05$. **Conclusion** The expression levels of CPT1A is significantly up-regulated during the metastasis of lung cancer. CPT1A can simultaneously promote the migration and invasion of lung cancer cells, suggesting that CPT1A is a potential molecular target for the treatment of lung cancer.

【Key words】 Carnitine palmitoyltransferase 1A; Fatty acid oxidation; Migration; Invasion; Lung cancer

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划重点项目(编号: 2015JZ024)

通讯作者: 田磊, E-mail: tianlei19820410@163.com

- [5] WILL EA, LIU X, PELUSO JJ et al. AG 205, a progesterone receptor membrane component 1 antagonist, ablates progesterone's ability to block oxidative stress-induced apoptosis of human granulosa/luteal cells [J]. Biol Reprod, 2017, 96(4): 843-854.
- [6] PELUSO JJ, PRU JK. Non-canonical progesterone signaling in granulosa cell function [J]. Reproduction, 2014, 147(5): R169-178.
- [7] SETTY SL, MILLS TM. THE Effects of progesterone on follicular growth in the rabbit ovary [J]. Biol Reprod, 1987, 36(5): 1247-1252.
- [8] YUAN XH, LU CL, YAO N, et al. Arsenic induced progesterone pro-

duction in a caspase-3-dependent manner and changed redox status in preovulatory granulosa cells [J]. J Cell Physiol, 2012, 227(1): 194-203.

- [9] PELUSO JJ. Progesterone receptor membrane component 1 and its role in ovarian follicle growth [J]. Front Neurosci, 2013, 7: 99.
- [10] PELUSO JJ, LIU X, ULIASZ T, et al. PGRMC1/2 promotes luteal vascularization and maintains the primordial follicles of mice [J]. Reproduction, 2018, 156(4): 365-373.

(收稿日期: 2018-08-29)

代谢重编程是肿瘤细胞最显著的特征之一,主要体现在葡萄糖、脂肪酸及氨基酸“三大营养物质”代谢的异常^[1-4]。与糖代谢与氨基酸代谢相比,肿瘤细胞脂肪酸代谢异常的研究相对较少,并未受到足够重视。但近年来的大量研究证实,脂肪酸代谢异常与肿瘤的发生发展均显著相关。一方面,磷脂和胆固醇可通过直接参与细胞膜组成而影响肿瘤细胞的增殖。另一方面,脂类及其中间代谢产物是细胞生理过程中重要的活性分子^[5]。因此,探讨肿瘤细胞脂肪代谢异常的发生机制具有重要的理论与实用价值。

肉毒碱棕榈酰基转移酶 1A (Carnitine Palmitoyl-transferase 1A, CPT1A) 是调控细胞脂肪酸氧化的关键酶,定位于线粒体内膜,主要负责将游离脂肪酸由胞浆转运至线粒体进行氧化^[6]。有研究表明,CPT1A 介导的脂肪酸氧化与结直肠癌的侵袭与转移相关^[7]。然而目前,CPT1A 在肺癌转移中的作用尚不清楚,有待进一步阐明。本研究首次分析了 CPT1A 在肺癌转移过程中的表达变化及其在促进肺癌转移中的调控作用。

1 材料与方法

1.1 肺癌细胞与组织

1.1.1 肺癌细胞 人肺癌细胞系 A549 购买于中科院上海细胞中心,细胞培养采用 RPMI-1 640 培养基(含 10% 胎牛血清),细胞置于温度为 37℃,CO₂ 浓度为 5% 的孵箱中培养。

1.1.2 肺癌组织样本 共收集 11 对肺癌患者的原发灶与转移灶组织,术中获取组织后即放入液氮保存,随后在冷冻状态下进行研磨与总 RNA 与蛋白的提取,所有肺癌患者均未在术前进行过放疗或化疗,并于术前签订了知情同意书。

1.2 实验方法与步骤

1.2.1 Western blot 首先,裂解细胞并离心获得细胞内总蛋白(组织需在裂解前一步进行充分研磨),之后加入 2×loading buffer 并于沸水中水浴 5 min,自然冷却后用上样针将各组蛋白样品加入 10% 浓度的凝胶孔内即可进行电泳分离。电泳过程共分两步,第一步用 80 V 恒压电泳约 30 min,待蛋白进入下层分离胶后即采用 120 V 恒压继续电泳,待溴酚蓝被电泳至胶底部时停止电泳。随后,将凝胶中被电泳分离的蛋白转移至 PVDF 膜上,5% 的 BSA 室温封闭 1 h 后,分别加入 CPT1A(武汉三鹰生物公司,货号为 17090-1-AP)与内参 β-actin 抗体(武汉三鹰生物公司,货号为 60008-1-ig),于 4℃ 冰箱中反应过夜,随后用 PBST 洗 3 次×5 min,加入二抗(武汉三鹰公司,货号为 SA00001-2)并于室温反应 2 h,PBST 洗 3 次×5 min。最后,用 ECL 发光成像系统对条带进行分析。

1.2.2 siRNA 转染 将处于对数生长期的 2×10⁵ 个 A549 细胞接种至 6 孔板中,次日进行 siRNA 转染,方

法为:首先,分别用无血清的 RPMI-1 640 培养基稀释脂质体 lip2000 与 siRNA 片段,分别将两种稀释液静置 5 min 后混合到一起,随后继续静置 30 min。用移液器将 100 μL 上述混合液加入 6 孔板细胞中,培养 6 h 后更换含血清培养基继续培养至 24 h。用胰蛋白酶消化并收集细胞后即可用于后续 qRT-PCR、Western blot、细胞划痕与侵袭实验。

1.2.3 实时定量 PCR 组织与细胞 RNA 提取采用商品化试剂盒(OMEGA 公司,货号为 R6834),随后将提取的 RNA 用反转录试剂盒(Takara 公司,货号为 RR047A)合成 cDNA。PCR 所用 CPT1A 引物序列为:F-ACTGAAGGCATTAGTCAGCGA, R-TCCTGCTA-CAACAATCCTCTCC。内参 GAPDH 引物序列为:F-ACAACCTTGGTATCGTGGAAG,G,R-GCCATCACGCCACAGTTTC。最后,用 2^{-ΔΔCt} 相对定量法对各组相对表达水平进行计算。

1.2.4 细胞划痕实验 首先,对 A549 细胞中 CPT1A 表达进行干涉处理,待 6 孔板中细胞长至约 90% 汇合度时用枪头比着直尺在各组细胞中划线,用 PBS 轻柔冲去脱落细胞后加入不含血清的 RPMI-1640 培养液进行培养,分别于划线后 0 h 与 24 h 用显微镜对划线处进行观察并拍照,最后对各组细胞的相对迁移能力进行分析。

1.2.5 Transwell 侵袭实验 首先,对 A549 细胞中 CPT1A 表达进行干涉处理,同样需提前对 Transwell 小室进行基质胶包被,随后将 500 μL 含血清的培养基加入小室底部,小室上部则加入 50 μL 含 10 g/L BSA 的培养液。将 CPT1A 干涉处理过的细胞以 5×10⁴ 个/室的密度加入小室中并培养 48 h。培养完毕后,细胞用 4% 的多聚甲醛固定 15 min,随后用结晶紫染色 20 min,PBS 洗 3 次后置于通风橱晾干,最后于显微镜下对侵袭至小室底部细胞进行观察与拍照。

1.3 统计学方法 应用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x}±s$)表示,组间两两比较采用配对或非配对 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CPT1A 表达在肺癌转移灶组织中显著上调 首先,用 qPCR 与 Western blot 实验对 11 对肺癌原发灶与转移灶组织中 CPT1A 的表达水平进行分析,以明确 CPT1A 在肺癌转移过程中的表达是否发生了改变,结果如图 1 所示:所有 11 对原发灶与转移灶组织中有 10 对转移灶组织中 CPT1A 表达显著高于原发灶,仅有 1 对呈相反趋势。利用配对样本 *t* 检验分析进一步表明,肺癌转移灶组织中 CPT1A 表达在 mRNA 与蛋白水平均发生了显著上调[(mRNA 水平:原发灶 vs 转移灶=(1.00±0.14) vs (1.83±0.75);蛋白水平:原发灶 vs 转移灶=(1.00±0.26) vs (2.25±0.63)],差异均有统计学意义(*P*<0.05)。

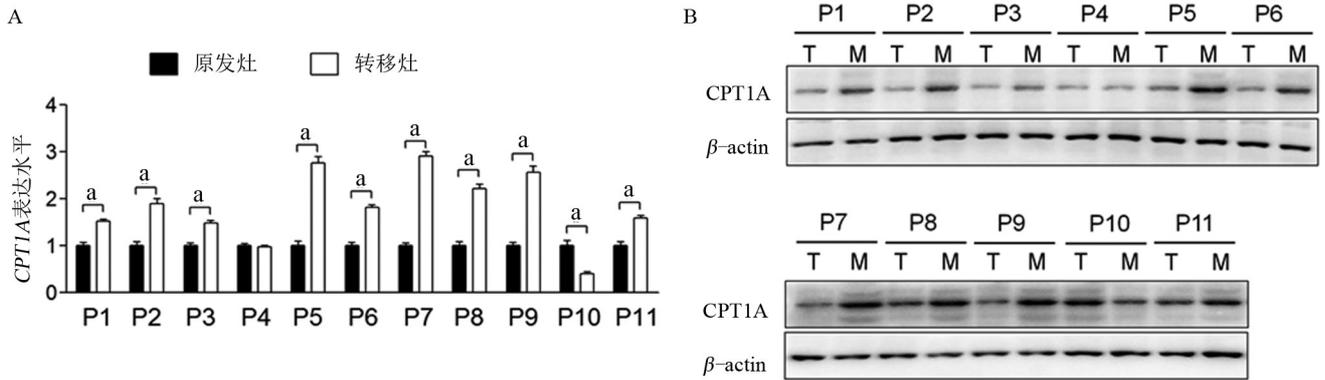


图 1 qPCR 与 Western blot 分析 11 对肺癌原发灶与转移灶组织中 CPT1A 的表达

注:A, qRT-PCR 检测 CPT1A mRNA 表达; B, Western Blot 检测 CPT1A 的蛋白表达, * $P < 0.05$ 。

2.2 下调 CPT1A 可显著抑制肺癌细胞的迁移能力 进一步合成两条靶向 CPT1A 不同部位的 siRNA 干扰片段并将其转染 A549 细胞,以探讨 CPT1A 在肺癌转移中的调控作用, qRT-PCR 与 Western blot 实验检测 CPT1A 表达后发现(图 2): 两条 siRNA 片段均可显著下调肺癌 A549 细胞中 CPT1A 的表达。

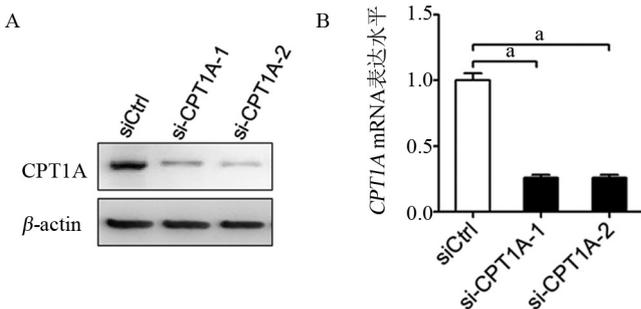


图 2 siRNA 下调 A549 细胞中 CPT1A 表达的 qRT-PCR 与 Western Blot 验证注: A, qRT-PCR 检测 CPT1A 的 mRNA 表达; B, Western Blot 检测 CPT1A 的蛋白表达, * $P < 0.05$ 。

明确所合成的两条 siRNA 均可显著下调 A549 细胞中 CPT1A 表达后,进一步用划痕实验对 CPT1A 在肺癌细胞迁移能力中的调控作用进行了分析,结果如图 3 所示: siRNA 下调 CPT1A 表达可显著抑制 A549 细胞的迁移能力 [siCtrl vs siCPT1A-1 vs siCPT1A-2=(1.00±0.12) vs (0.39±0.04) vs (0.38±0.03)], 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

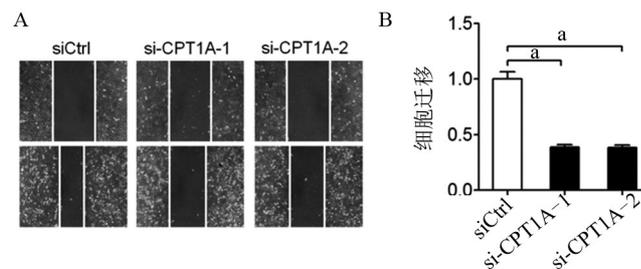


图 3 下调 CPT1A 对 A549 细胞迁移影响的细胞划痕实验分析注: *, * $P < 0.05$ 。

2.3 下调 CPT1A 可显著抑制肺癌细胞的侵袭 此外, Transwell 侵袭实验进一步被用以探讨 CPT1A 在肺

癌细胞侵袭能力中的调控作用,结果如图 4 所示: 用 siRNA 下调 CPT1A 表达后 A549 细胞的侵袭能力显著降低 [siCtrl vs siCPT1A vs siCPT1A-2=(23.00±3.00) vs (12.00±2.00) vs (13.00±1.00)], 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

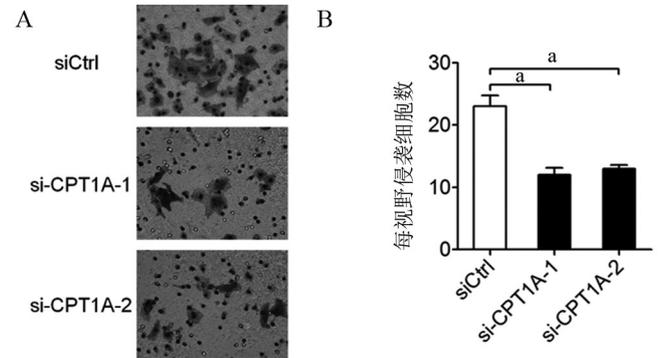


图 4 下调 CPT1A 对 A549 细胞侵袭影响的 Transwell 实验分析注: *, * $P < 0.05$ 。

3 讨论

肿瘤不只是一种基因病,同时也是一种代谢性疾病^[8-10]。早在 20 世纪 20 年代,著名的德国科学家瓦博格便提出:即使在氧气充足时,肿瘤细胞仍表现出活跃的糖酵解活性并产生大量乳酸,这即是著名的“瓦博格效应”^[11]。随着近年来对肿瘤代谢的研究深入,人们逐渐发现,除表现出异常活跃的糖酵解外,肿瘤细胞的脂代谢也发生了显著改变^[15, 12-14]。肿瘤细胞脂肪酸代谢主要表现为异常增强的脂肪酸合成,肿瘤细胞通过合成大量的脂肪酸而用于其分裂增殖时细胞膜等结构性成分的合成,靶向脂肪酸合成关键酶具有良好的抗肿瘤活性^[14]。与脂肪酸合成相比,脂肪酸氧化在肿瘤中的作用直到近几年才逐步被人们所认识^[15]。近几年研究发现,某些类型肿瘤细胞的增殖、生存、抗药性及转移都十分依赖脂肪酸的氧化^[15-16],表明脂肪酸氧化在肿瘤发生发展中发挥重要作用。

CPT1A 是调控细胞脂肪酸氧化的关键酶,主要定位于线粒体内膜,负责转运细胞浆中的游离脂肪酸至

线粒体内,进而促进脂肪酸后续的酸氧化^[6,17]。近年来研究发现,CPT1A 与肿瘤的发生发展密切相关^[18]。Shi 等^[19]研究证实,急性白血病细胞中 CPT1A 的表达发生了显著上调,生存分析发现 CPT1A 高表达组患者的预后显著差于 CPT1A 低表达组患者。Ricciardi 等^[20]在白血病中研究证实,CPT1A 的小分子抑制剂可降低体外肿瘤细胞的脂肪酸氧化,通过抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡而发挥抗癌作用。此外,Shao 等^[21]在卵巢癌中的发现,CPT1A 可通过调控周期蛋白 p21 介导的细胞周期进程而促进肿瘤细胞增殖。研究还发现,CPT1A 与肿瘤的放疗敏感性显著相关,如 Tan 等^[22]在鼻咽癌中研究证实,降低 CPT1A 表达可提高鼻咽癌的放疗疗效。转移是肿瘤难以彻底治愈与治疗失败的最主要原因。最近,Wang 等^[7]研究发现结直肠癌中 CPT1A 表达显著上调,上调的 CPT1A 通过激活脂肪酸氧化进而促进结直肠癌的转移,表明 CPT1A 与肿瘤的转移密切相关。然而,CPT1A 是否参与包括肺癌在内其他肿瘤的转移却尚不清楚。

本研究首次在肺癌中证实,肺癌转移过程中 CPT1A 表达显著升高,细胞功能实验进一步证实 CPT1A 可促进肺癌细胞的迁移与侵袭,提示 CPT1A 是重要肿瘤促肺癌转移因子,有望成为抑制肺癌转移的潜在分子靶标。

参考文献

- [1] LI ZY, ZHANG HF. Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2016, 73(2): 377-392.
- [2] VAZQUEZ A, KAMPHORST JJ, MARKERT E, et al. Cancer metabolism at a glance [J]. Journal of Cell Science, 2016, 129(18): 3367-3373.
- [3] HIRSCHHEY MD, DEBERARDINIS RJ, DIEHL AME, et al. Dysregulated metabolism contributes to oncogenesis [J]. Semin Cancer Biol, 2015, 35: S129-S50.
- [4] MUNOZ-PINEDO C, EL MJIYAD N, RICCI JE. Cancer metabolism: current perspectives and future directions [J]. Cell Death Dis, 2012, 3: e248.
- [5] CURRIE E, SCHULZE A, ZECHNER R, et al. Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer [J]. Cell Metab, 2013, 18(2): 153-161.
- [6] BONNEFONT JP, DJOUADI F, PRIP-BUUS C, et al. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects [J]. Molecular Aspects of Medicine, 2004, 25(5-6): 495-520.
- [7] WANG YN, ZENG ZL, LU J, et al. CPT1A-mediated fatty acid oxidation promotes colorectal cancer cell metastasis by inhibiting anoikis [J]. Oncogene, 2018. doi: 10.1038/s41388-018-0384-z.
- [8] PAVLOVA NN, THOMPSON CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism [J]. Cell Metab, 2016, 23(1): 27-47.
- [9] SINGH SR, TAN M, RAMESHWAR P. Cancer metabolism: targeting metabolic pathways in cancer therapy [J]. Cancer Lett, 2015, 356(2): 147-148.
- [10] DONOHOE CL, LYSAGHT J, O'SULLIVAN J, et al. Emerging concepts linking obesity with the hallmarks of cancer [J]. Trends Endocrin Met, 2017, 28(1): 46-62.
- [11] MUNKLEY J, ELLIOTT DJ. Hallmarks of glycosylation in cancer [J]. Oncotarget, 2016, 7(23): 35478-35489.
- [12] CORBET C, FERON O. Emerging roles of lipid metabolism in cancer progression [J]. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 2017, 20(4): 254-260.
- [13] HASHMI S, WANG Y, SUMAN DS, et al. Human cancer: is it linked to dysfunctional lipid metabolism? [J]. Bba-Gen Subjects, 2015, 1850(2): 352-364.
- [14] ANGELES TS, HUDKINS RL. Recent advances in targeting the fatty acid biosynthetic pathway using fatty acid synthase inhibitors [J]. Expert Opin Drug Dis, 2016, 11(12): 1187-1199.
- [15] MA Y, TEMKIN SM, HAWKRIDGE AM, et al. Fatty acid oxidation: An emerging facet of metabolic transformation in cancer [J]. Cancer Lett, 2018, 435: 92-100.
- [16] CARO P, KISHAN AU, NORBERG E, et al. Metabolic signatures uncover distinct targets in molecular subsets of diffuse large B cell lymphoma [J]. Cancer Cell, 2012, 22(4): 547-360.
- [17] YATES DW, GARLAND PB. Carnitine palmitoyltransferase activities (EC 2.3.1.-) of rat liver mitochondria [J]. The Biochemical Journal, 1970, 119(3): 547-552.
- [18] QU Q, ZENG F, LIU X, et al. Fatty acid oxidation and carnitine palmitoyltransferase I: emerging therapeutic targets in cancer [J]. Cell Death Dis, 2016, 7: e2226.
- [19] SHI JL, FU HP, JIA ZL, et al. High expression of CPT1A predicts adverse outcomes: a potential therapeutic target for acute myeloid leukemia [J]. EBio Medicine, 2016, 14: 55-64.
- [20] RICCIARDI MR, MIRABILII S, ALLEGRETTI M, et al. Targeting the leukemia cell metabolism by the CPT1a inhibition: functional pre-clinical effects in leukemias [J]. Blood, 2015, 126(16): 1925-9.
- [21] SHAO HJ, MOHAMED EM, XU GYG, et al. Carnitine palmitoyltransferase 1A functions to repress FoxO transcription factors to allow cell cycle progression in ovarian cancer [J]. Oncotarget, 2016, 7(4): 3832-3846.
- [22] TAN ZQ, XIAO LB, TANG M, et al. Targeting CPT1A-mediated fatty acid oxidation sensitizes nasopharyngeal carcinoma to radiation therapy [J]. Theranostics, 2018, 8(9): 2329-2347.

(收稿日期:2018-10-09)