

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.10.003  
文章编号: 1005-8982(2020)10-0014-04

## P62 基因对恶性黑色素瘤细胞侵袭的影响及机制研究

易娟娟<sup>1</sup>, 招玉玲<sup>1</sup>, 谢蒲辉<sup>1</sup>, 唐妍<sup>1</sup>, 黄惠珍<sup>1</sup>, 郑丽<sup>1</sup>,  
蔡艳桃<sup>1</sup>, 杨竞<sup>1</sup>, 张晶<sup>1</sup>, 毛越苹<sup>2</sup>

(1. 佛山市妇幼保健院 皮肤科, 广东 佛山 528000; 2. 中山大学孙逸仙纪念医院 皮肤科, 广东 广州 510120)

**摘要: 目的** 探讨 P62 基因在恶性黑色素瘤 A375 细胞迁移、侵袭中的作用及其机制。**方法** 取对数生长长期的恶性黑色素瘤 A375 细胞, 采用干扰 P62 基因表达的 siRNA 及阴性对照 siRNA 分别转染 A375 细胞。采用 Transwell 法检测干扰组及对照组的细胞迁移、侵袭能力, Western blotting 检测干扰组及对照组 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的表达。**结果** 干扰组细胞 Transwell 迁移、侵袭能力较对照组下降 ( $P < 0.05$ ); 且干扰组 Wnt/ $\beta$ -catenin 及下游通路因子 (P62、ZEB1、 $\beta$ -catenin、TCF4、c-Myc、c-Jun 及 CCND1) 均受抑制 ( $P < 0.05$ )。**结论** P62 可能通过调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 及下游通路促进黑色素瘤细胞的迁移、侵袭。

**关键词:** 黑色素瘤, 实验性; 癌基因; 肿瘤浸润

**中图分类号:** R739.5

**文献标识码:** A

## Effect and mechanism study of P62 in malignant melanoma A375 cells invasion

Juan-juan Yi<sup>1</sup>, Yu-ling Zhao<sup>1</sup>, Pu-hui Xie<sup>1</sup>, Yan Tang<sup>1</sup>, Hui-zhen Huang<sup>1</sup>, Li Zheng<sup>1</sup>,  
Yan-tao Cai<sup>1</sup>, Jing Yang<sup>1</sup>, Jing Zhang<sup>1</sup>, Yue-ping Mao<sup>2</sup>

(1. Department of Dermatology, Foshan Women and Children Hospital, Foshan, Guangdong 528000, China; 2. Department of Dermatology, the Memorial Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

**Abstracts: Objectives** To explore the role and mechanism of P62 in malignant melanoma A375 cells invasion. **Methods** Malignant melanoma A375 cells were cultured at logarithmic growth phase, then they were transfected with siRNA-P62 and siNC, respectively. Transwell assays were both performed to detect the cell migration and invasion in interfering group and negative control group, respectively; Western Blot were both used to detect the expression of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways in two groups, respectively. **Results** The ability of cell migration and invasion decreased in interfering group compared with that in negative control group using Transwell ( $P < 0.05$ ), meanwhile, Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and downstream factors (including  $\beta$ -catenin, TCF4, ZEB1, c-Myc, c-Jun, CCND1, and so on) were all inhibited in interfering group compared with that in negative control group (all  $P < 0.05$ ). **Conclusions** P62 may promote A375 cell migration and invasion via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways.

**Keywords:** melanoma; oncogenes; invasion

恶性黑色素瘤发病率较低, 但病死率非常高, 主要是由于细胞生物恶性程度高, 且极易侵袭、转移。

因而探索恶性黑色素瘤的侵袭、转移机制显得尤为重要, 有助于为临床靶点治疗提供新的理论依据。

收稿日期: 2019-11-30

[通信作者] 毛越苹: E-mail: mao\_yp@163.com

P62 是一个经典的自噬标志基因, 其在调控细胞生长、凋亡等生理过程中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。胰腺癌中, P62 与核转录因子 NRF2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2, NRF2) 的激活可以诱导肿瘤细胞化疗耐受<sup>[2]</sup>。卵巢癌中, P62 的聚集可以激活含半胱氨酸的天冬氨酸特异水解酶 (cystine containing aspartate specific protease-8, Caspase-8), 从而促进卵巢癌的进展<sup>[3]</sup>。食管癌中, P62 蛋白受 microRNA-487a 的靶击, 从而促进食管癌细胞的增殖<sup>[4]</sup>。此外, P62 在乳腺癌中可以通过稳定癌基因 MYC 的信使 RNA 从而维持肿瘤的干性特征, 且 P62 通过与波形蛋白 Vimentin 相互作用促进乳腺癌转移<sup>[5-6]</sup>。另有报道, III 型磷脂酰肌醇激酶 VPS34 通过刺激 P62 磷酸化参与乳腺癌的发生、发展<sup>[7]</sup>。上述报道表明, P62 在多种肿瘤的发生发展、生理功能中发挥着重要的作用。尽管如此, P62 在恶性黑色素瘤中的生理作用及机制尚未见报道。本课题组前期研究发现, P62 可以发挥促进黑色素瘤细胞增殖及诱导细胞周期转化的作用, P62 也参与黑色素瘤侵袭、转移的过程<sup>[8]</sup>。因此, 本实验探讨 P62 在黑色素瘤细胞迁移、侵袭中的作用及其具体机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

人恶性黑色素瘤细胞株 A375 细胞 (购自上海生命科学研究院细胞资源中心, 本实验室永久保存), DMEM 培养基 (美国 Hyclone 公司), 胎牛血清 (澳大利亚 Gibco 公司), 0.25% 胰蛋白酶 (澳大利亚 Gibco 公司), Transwell 小室 (美国 Corning 公司), 结晶紫染色液 (上海碧云天生物技术有限公司), 二甲苯和中性树胶 (广州鑫邦有限公司), OPTI-MEMI 培养液 (澳大利亚 Gibco 公司), 日本尼康 Ti-S 显微镜, 干扰 P62 表达的 siRNA (其序列为 GCACAAAUUGGUAAGUCA) 及阴性对照 siRNA (广州锐博有限公司)。Western blotting 抗体如下: 兔抗  $\beta$ -catenin、兔抗 c-Jun, 鼠抗 ZEB1, 兔抗 Axin、兔抗 TCF4、兔抗 c-Myc、兔抗 P62、兔抗 GAPDH、兔抗 CCND1、兔二抗、鼠二抗均购自美国 Proteintech 公司。

### 1.2 方 法

**1.2.1 细胞培养** 人恶性黑色素瘤 A375 细胞在含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基, 37℃、5% 二氧化碳 CO<sub>2</sub> 条件下传代培养。取处于 70% 对数生长期的细胞用于实验。

**1.2.2 siRNA 转染** 转染前 1 d, 分别将细胞按

1.0 × 10<sup>5</sup> 个 / 孔接种于 6 孔板中, 加入 2 ml 含血清的高糖 DMEM 培养基, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养至 ≥ 55% 融合。将干扰 P62 基因表达的 siRNA 和阴性对照 siRNA 转染 A375 细胞, 分别作为干扰组和对照组。①分别取 10 μl / 孔 siRNA 溶液与无血清 OPTI-MEMI 培养基 250 μl / 孔在 2 ml EP 管中轻轻混匀 (干扰组与对照组均设 3 个复孔, 干扰组: siRNA-P62 溶液 30 μl + 无血清 OPTI-MEMI 培养基 750 μl; 对照组: 阴性对照溶液 30 μl + 无血清 OPTI-MEMI 培养基 750 μl)。分别取阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 转染试剂 5 μl / 孔, 与无血清 OPTI-MEMI 培养基 250 μl / 孔在另一个 2 ml EP 管中轻轻混匀 (干扰组与对照组均设 3 个复孔, 干扰组: Lipofectamine 2000 转染试剂 15 μl + 无血清 OPTI-MEMI 培养基 750 μl; 对照组: Lipofectamine 2000 转染试剂 15 μl + 无血清 OPTI-MEMI 培养基 750 μl), 两组分别置于室温下孵育 5 min。②将上述孵育后的 siRNA 混合液分别与孵育后的 Lipofectamine 2000 混合液 (即上述 Lipofectamine 2000 转染试剂 + 无血清 OPTI-MEMI 培养基) 轻轻混合, 室温条件下孵育 20 min 以形成转染混合物。③吸弃原 6 孔板中的培养基, 用 PBS 洗 2 遍, 分别在每个孔中加入 1.5 ml 新鲜含血清的高糖 DMEM 培养基, 将上述孵育后的混合液分别加入新 DMEM 培养基的 6 孔板中。每组 3 个复孔。④将 6 孔板置于孵箱 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养, 6 h 后弃旧培养基, 用无菌 PBS 洗 2 遍, 换 2 ml 含 10% 血清的 DMEM 培养基。24 h 后行 Transwell 实验, 48 h 后行 Western blotting 检测。

**1.2.3 Transwell 实验** 转染 24 h 后取 6 孔板干扰组和对照组细胞 (选取生长状态良好的转染后黑色素瘤 A375 细胞)。0.25% 胰酶消化细胞, 终止消化后离心, 用无血清培养基调整细胞密度至 1 × 10<sup>6</sup> 个 / ml (即每 100 μl 含 1 × 10<sup>5</sup> 个细胞)。在配套的 24 孔板加入 500 μl 含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基, 将 Transwell 小室放进 24 孔中, 确保没有气泡 (每组设 3 个复孔)。取无血清细胞悬液 100 μl 加入 Transwell 小室的上室中, 常规培养 12 h (观察 5 ~ 10 个细胞穿膜), 终止培养。取出上室, 将未穿膜的上室内细胞用湿棉签擦去, 甲醇固定细胞 30 min。移到 500 μl 结晶紫染液的孔中染色 15 min。蒸馏水冲洗, 将小室风干, 剪下小室膜, 晾干, 二甲苯和中性树胶 (比例 1 : 1) 封片。干燥后于正显微镜下随机选择 5 个高倍视野拍照, 计算穿过 Transwell 小室膜的平均细胞数。

**1.2.4 Western blotting** 取处于对数生长期转染后 48 h 的干扰组及对照组细胞, 用 PBS 溶液洗涤细胞 3 次, 在冰上加入放射免疫沉淀测定裂解液 + 蛋白酶抑制剂 + 磷酸酶抑制剂(比例 100 : 1 : 1)裂解细胞, 孵育 30 min, 使细胞完全裂解、离心。留取适量上清测蛋白浓度, 以蛋白含量为横坐标, 吸光值为纵坐标, 绘制标准曲线。取相同浓度的样品加入 Loading buffer 金属浴变性。配制 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶。在电泳槽中加入变性后的样品进行 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (80 V, 30 min; 100 V, 120 min), 之后电转移 (350 mA, 3 h) 把目的蛋白从凝胶中转移到硝酸纤维素膜上, 洗膜, 孵育一抗 (浓度 1 : 1 000) 过夜。第 2 天, 洗膜, 孵育鼠二抗或兔二抗 (浓度 1 : 5 000), 加入显色 ECL 增强型化学发光酶反应底物, 在化学发光仪上显示目的蛋白条带。

**1.3 统计学方法**

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 P62 对黑色素瘤细胞穿膜的影响**

两组 Transwell 实验结果见图 1。干扰组的穿膜细胞数为  $(54.33 \pm 4.16) \times 10^9$  个; 对照组穿膜细胞数为  $(126.70 \pm 4.04) \times 10^9$  个 (见图 2)。两组穿膜细胞数比较, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 (*t* = 21.620,

*P* = 0.000), 干扰组穿膜细胞数低于对照组。

**2.2 P62 对黑色素瘤 A375 细胞 Wnt/β-catenin 及下游通路的影响**

两组 P62、ZEB1、β-catenin、TCF4、c-Myc、c-Jun 及 CCND1 蛋白相对表达量比较, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05), 干扰组低于对照组。见表 1 和图 3。

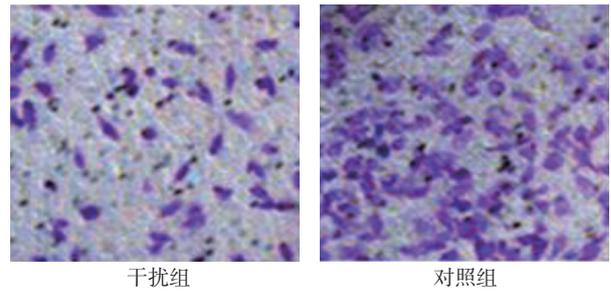


图 1 两组 Transwell 实验结果 (× 200)

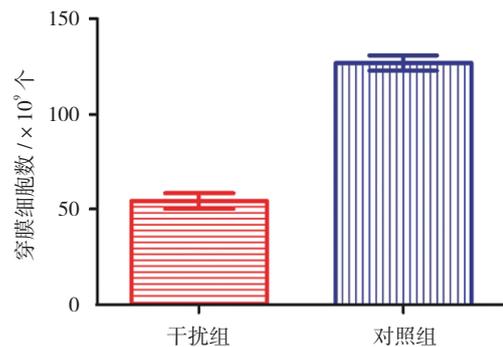


图 2 两组 Transwell 穿膜细胞数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

表 1 两组 Wnt/β-catenin 及下游通路的蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	P62	ZEB1	β-catenin	TCF4	c-Myc	c-Jun	CCND1
干扰组	0.085 ± 0.008	0.422 ± 0.072	0.265 ± 0.091	0.119 ± 0.004	0.128 ± 0.053	0.271 ± 0.095	0.101 ± 0.078
对照组	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
<i>t</i> 值	198.103	13.905	13.990	381.484	28.497	13.291	19.963
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000



图 3 P62 对 Wnt/β-catenin 及下游通路的影响

**3 讨论**

恶性黑色素瘤就诊时往往已处于晚期, 其生物恶性程度高, 易侵袭、转移, 病情进展迅速, 预后极差。关于恶性黑色素瘤的发生、发展机制报道较多, 但仍不足以阐明其具体的发病进展过程。因此, 探讨黑色素瘤的发病机制意义重大, 有助于临床开发靶向治疗药物, 改善黑色素瘤患者的总体预后。

P62 是一种经典的自噬标志物, 参与多种细胞信号传导调控及自噬过程<sup>[1]</sup>, 在细胞生长、凋亡等过程中发挥重要的生理功能。Wnt/ $\beta$ -catenin 通路在动物胚胎的早期发育、器官形成、组织再生及其他生理过程中具有至关重要的作用; 同时与肿瘤细胞的侵袭、转移密切相关。如果这条信号通路被异常激活, 就可能诱导癌症的发生、发展。P62 与 Wnt/ $\beta$ -catenin 相关通路在神经胶质瘤<sup>[9]</sup>、肝癌<sup>[10]</sup>、舌鳞癌<sup>[11]</sup>及卵巢癌<sup>[12]</sup>中的作用已有报道, 然而在黑色素瘤中报道较少。

本课题组前期研究发现, P62 可以促进恶性黑色素瘤细胞增殖及周期转化, 表明 P62 在黑色素瘤中发挥癌基因的作用<sup>[8]</sup>。本研究结果显示, 干扰 P62 表达后黑色素瘤细胞的迁移、侵袭数目减少, 与前期报道<sup>[9-12]</sup>一致, 进一步支持 P62 在黑色素瘤中发挥促癌因子的作用。

本研究进一步探讨 P62 在黑色素瘤侵袭、转移过程中的具体机制。Western blotting 检测结果证实, 干扰 P62 表达后的 Wnt/ $\beta$ -catenin 经典通路及下游相关因子 (P62、 $\beta$ -catenin、TCF4、ZEB1、c-Myc、c-Jun 及 CCND1) 的表达均受抑制。TCF4 核转录因子是 Wnt/ $\beta$ -catenin 经典通路的关键下游因子。当 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路被异常激活后, GSK3 $\beta$ /Axin/APC 复合体降解  $\beta$ -catenin 受阻, 导致胞浆内  $\beta$ -catenin 大量蓄积, 引起  $\beta$ -catenin 穿核与 TCF4 结合, 诱导下游因子 ZEB1、c-Myc、c-Jun 及 CCND1 等的大量表达, 进而促进肿瘤细胞侵袭、转移。因而本研究提示 P62 在促进黑色素瘤侵袭、转移过程中发挥重要作用, 其可能通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 相关通路及下游因子的表达促进细胞侵袭、转移。下一步的研究需要继续探索 P62 调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路及下游相关因子表达的具体机制。

综上所述, P62 可能通过调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 相关通路及下游因子发挥促进黑色素瘤细胞侵袭、转移的作用。将来需要进一步研究 P62 调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 相关通路的具体机制。

#### 参 考 文 献:

- [1] 赵萍萍, 要乐, 蔚丹丹, 等. p62 蛋白功能及相关信号通路研究 [J]. 生命科学, 2018, 30(1): 100-106.
- [2] GILARDINI MONTANI M S, CECERE N, GRANATO M, et al. Mutant p53, stabilized by its interplay with hsp90, activates a positive feed-back loop between NRF2 and p62 that induces chemo-resistance to apigenin in pancreatic cancer cells[J]. Cancers (Basel), 2019, 11(5): E703.
- [3] YAN X Y, ZHONG X R, YU S H, et al. P62 aggregates mediated Caspase 8 activation is responsible for progression of ovarian cancer[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(6): 4030-4042.
- [4] MA J B, HU S L, ZANG R K, et al. MicroRNA-487a promotes proliferation of esophageal cancer cells by inhibiting p62 expression[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(4): 1502-1512.
- [5] XU L Z, LI S S, ZHOU W, et al. P62/SQSTM1 enhances breast cancer stem-like properties by stabilizing MYC mRNA[J]. Oncogene, 2017, 36(3): 304-317.
- [6] LI S S, XU L Z, ZHOU W, et al. P62/SQSTM1 interacts with vimentin to enhance breast cancer metastasis[J]. Carcinogenesis, 2017, 38(11): 1092-1103.
- [7] JIANG X, BAO Y, LIU H, et al. VPS34 stimulation of p62 phosphorylation for cancer progression[J]. Oncogene, 2017, 36(50): 6850-6862.
- [8] 易娟娟, 刘龙阳, 黄慧珍, 等. P62 基因对黑素瘤 A375 细胞生物学特性的影响 [J]. 中国皮肤性病杂志, 2015, 29(1): 9-11.
- [9] CHU C W, KO H J, CHOU C H, et al. Thioridazine enhances p62-mediated autophagy and apoptosis through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in glioma cells[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(3): E473.
- [10] MA Z Z, LI F, CHEN L Y, et al. Autophagy promotes hepatic differentiation of hepatic progenitor cells by regulating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. J Mol Histol, 2019, 50(1): 75-90.
- [11] ZHAO Z, WANG H, ZHANG L, et al. Receptor for advanced glycation end product blockade enhances the chemotherapeutic effect of cisplatin in tongue squamous cell carcinoma by reducing autophagy and modulating the Wnt pathway[J]. Anticancer Drugs, 2017, 28(2): 187-196.
- [12] LI R N, LIU B, LI X M, et al. DACT1 Overexpression in type I ovarian cancer inhibits malignant expansion and cisplatin resistance by modulating canonical Wnt signalling and autophagy[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 9285.

(唐勇 编辑)

本文引用格式: 易娟娟, 招玉玲, 谢蒲辉, 等. P62 基因对恶性黑色素瘤细胞侵袭的影响及机制研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(10): 14-17.