

NGAL 蛋白诱导食管癌细胞发生自噬*

张丕显^{1)**} 方王楷^{1)**} 许丽艳^{2)**} 蒋纪恺^{1)***} 沈忠英²⁾ 杜则澎¹⁾ 陆晓峰²⁾
周飞¹⁾ 谢剑君¹⁾ 吴炳礼¹⁾ 崔有宏³⁾ 谢东^{1, 4)***} 李恩民^{1)***}

¹⁾汕头大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 汕头 515041; ²⁾汕头大学医学院肿瘤病理研究室, 汕头 515041;

³⁾汕头大学医学院病理生理教研室, 汕头 515041; ⁴⁾中国科学院上海生命科学院营养科学研究所, 上海 200031)

摘要 以往研究证明, 中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白 NGAL(neutrophil gelatinase-associated lipocalin)与食管癌密切相关, 改变 NGAL 表达能够对癌细胞的形态结构产生明显影响, 但确切的作用机制不明. 在酵母细胞中表达 NGAL 蛋白, 柱层析分离纯化. 筛选 NGALR(NGAL receptor)高表达与弱表达的人食管癌细胞系 EC1.71 和 EC109 作为实验细胞模型. 5-FAM 标记 NGAL 蛋白, 加入到细胞培养上清中, 对比研究 NGAL 蛋白入胞情况、细胞形态学改变、细胞自噬体产生、自噬相关基因表达、细胞内铁离子与铁蛋白水平以及相关细胞信号转导激酶的活性等. 结果表明, NGAL 蛋白可经由内吞途径进入食管癌细胞发挥作用, 致使细胞发生典型的自噬性形态结构变化, 自噬体大量产生, 自噬相关基因的表达发生相应变化, ERK 被激活, 但细胞内的铁离子与铁蛋白未受明显影响. 上述结果提示, 诱导细胞发生自噬是外源性 NGAL 蛋白经由内吞途径进入食管癌细胞发挥作用的机制之一, 与 NGAL 蛋白跨膜转铁未见直接关联, 而 ERK 信号转导途径可能参与了这一过程.

关键词 NGAL, NGALR, 自噬, 细胞周期, 蛋白质内吞, 食管癌细胞

学科分类号 Q781, R735

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00857

中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL), 一种 25 ku 的糖蛋白, 由 Kjeldsen 等^[1]于 1993 年在人中性粒细胞中首先发现, 是脂质运载蛋白(lipocalin)家族成员. 有研究证明, NGAL 具有多种功能表现形式, 既可以通过二硫键结合基质金属蛋白酶 9 (matrix metallo proteinase 9, MMP9), 调节保护 MMP9 酶活性^[2], 同时还可以结合肠杆菌素等有机小分子与三价铁离子的二元配合物, 参与抑菌等先天免疫炎症反应, 参与相关细胞的膜受体介导的铁离子跨膜转运^[3, 4]. 我们以往的研究证明, NGAL 在食管癌组织细胞中显著异常过表达, 与癌细胞的移动、侵袭以及不良分化关系密切, 是重要的食管癌相关基因^[5, 6]. 反义封闭 NGAL 基因表达不但可明显抑制食管癌裸鼠成瘤细胞的侵袭行为^[6], 且癌细胞的骨架形态结构也受到了明显影响, 与其前体细胞——永生化食管上皮细胞的特征趋于一致^[7], 但具体的作用机制不清楚.

在本文中, 我们首先在酵母细胞中分泌表达了 NGAL 蛋白, 并进行了柱层析分离纯化和鉴定. 其

次, 筛选 NGAL 蛋白受体高表达与弱表达人食管癌细胞系 EC1.71 和 EC109 作为实验细胞模型. 再次, 以 5-FAM 标记 NGAL 蛋白, 加入到细胞培养上清中, 通过荧光显微镜与相差显微镜观察 NGAL 蛋白进入食管癌细胞的情形以及相应的细胞形态学变化特征. 最后, 通过联合运用免疫荧光染色、免疫印迹和 RT-PCR 等实验技术手段, 研究确定 NGAL 蛋白作用所诱发的食管癌细胞自噬体产生、自噬相关基因表达、细胞内铁离子与铁蛋白水平以及相关细胞信号转导激酶的活性等. 证明诱导细胞

* 国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2006AA02A403), 国家自然科学基金资助项目(30370641, 30570829, 30672376), 广东省自然科学基金重点项目(5104541, 7118419)和教育部高等学校博士点重点学科专项基金项目(20050560002, 20050560003).

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人. Tel: 0754-88900413

李恩民. E-mail: nmli@stu.edu.cn

谢东. E-mail: dxie@sibs.ac.cn

蒋纪恺. E-mail: jkjiang@stu.edu.cn

收稿日期: 2008-12-17, 接受日期: 2009-03-02

发生自噬是外源性 NGAL 蛋白经由内吞途径进入食管癌细胞发挥作用的机制之一。

1 材料与amp;方法

1.1 细胞与细胞培养

食管癌细胞系 EC1.71 和 EC109, 在含 10% 小牛血清的 199 培养基或 DMEM 培养基中贴壁生长, 5% CO₂, 37℃, 湿度 95%。用含 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 的消化液消化, 进行细胞传代。

1.2 NGAL 蛋白的表达与分离纯化

在毕赤酵母中分泌性表达 NGAL 蛋白的方法系本实验室建立^[8]。在此基础上, 选取 NGAL 蛋白高表达的酵母细胞克隆, 在含 1% 甲醇的 BMMY 培养液(1% 酵母提取物、2% 蛋白胨、1.34% 酵母氮源和 4×10⁻⁵% 生物素)中诱导 NGAL 蛋白表达, 时间 5 天。培养液上清依次经硫酸铵盐析、Bio-gel P-30 凝胶过滤层析、High Q Support 阴离子交换层析和 SP-Sepharose fast flow 阳离子交换层析等多个步骤进行分离纯化。在 SDS-PAGE 基础上, 通过考马斯亮蓝染色和特异性免疫印迹监控 NGAL 蛋白的上述各分离纯化步骤的效果。另外, 通过等电聚焦电泳对最后经 SP-Sepharose fast flow 阳离子交换层析得到的 NGAL 蛋白样品进行进一步精细鉴定。

1.3 免疫荧光染色检测 NGAL 受体定位表达

兔抗 NGAL 受体(NGAL receptor, NGALR)抗体的制备及其抗原肽的合成参见文献[9]。将上述各种细胞接种到预先放置 7 mm×22 mm 盖玻片的培养皿中, 4% 多聚甲醛室温下固定 15 min, 0.1% 的 Triton X-100 处理 15 min, 10% 血清封闭 30 min。滴加适当稀释的 NGALR 一抗 4℃ 孵育过夜, 荧光素标记二抗 37℃ 保温 30 min。50% 缓冲甘油封片, 荧光显微镜下观察, 拍照分析。

1.4 NGAL 蛋白的荧光标记及其细胞内吞实验

按照 ANASPEC 公司的 AnaTag 5-FAM(一种荧光素)蛋白标记试剂盒说明书, 对 NGAL 蛋白进行荧光标记。分别取处于对数生长期的 EC1.71 和 EC109 细胞接种到盖玻片上, 在 DMEM 或 199 培养基中(含 10% FBS)培养 24 h。细胞用无血清培养基洗涤 3 次, 在上述培养细胞中分别加入无血清培养基、50 mg/L 的 FAM-NGAL, 而对照组同时加入 5 g/L 的 NGAL 作为竞争性抑制剂。37℃ 孵育 1 h, 冷的 PBS 洗涤细胞 3 次, 洗脱缓冲液(50 mmol/L 甘氨酸, 150 mmol/L NaCl, pH3.0)处

理 1 min, 去除没有进入细胞的、结合在细胞表面的 NGAL 蛋白。冷的 PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 荧光显微镜下观察, 拍照。

1.5 细胞形态学观察

将 EC1.71 和 EC109 细胞分别接种到 24 孔板, 培养 24 h。弃细胞培养液上清, PBS 洗涤 3 次, 参考相关文献[10], 分别加入含不同浓度 NGAL 蛋白(0、0.05、0.5、5、50 mg/L)的无血清培养基, 孵育 24 h, 相差显微镜观察细胞形态变化, 拍照。

1.6 细胞自噬体的特异性标记与观察

遵照 Biederbick 等^[11]报道的方法, 将上述各种细胞用 0.05 mmol/L 的单丹磺酰戊二胺(mono-dansylcadaverin, MDC)于 37℃ 孵育 30 min, 标记细胞自噬体, PBS 漂洗后于荧光显微镜下观察, 拍照。

1.7 细胞自噬特异性蛋白 LC3 的表达分布检测

应用 Qiagen 公司的转染试剂(SuperFect)分别转染 pLC3-GFP 重组质粒(美国密西根大学谭立军博士惠赠)到 EC1.71 和 EC109 细胞中, 培养 24 h 后, 细胞上清中分别加入 50 mg/L NGAL 蛋白, 继续培养 24 h, 荧光显微镜下观察细胞自噬特异性蛋白 LC3 的表达分布情况, 拍照。

1.8 检测细胞内铁离子浓度

根据 Riemer 等^[12]所报道的方法, 将上述各种细胞接种于 24 孔板, 加入 200 μl 50 mmol/L 的 NaOH 裂解 2 h。在 1.5 ml 离心管中分别加入 100 μl 细胞裂解液, 100 μl 10 mmol/L HCl 以及 100 μl 铁释放试剂(1.4 mol/L HCl 和 4.5% KMnO₄ 同等体积混合, 即用即配), 混合均匀。混合液于 60℃ 水浴孵育 2 h, 每管加入 30 μl 铁检测试剂(6.5 mmol/L ferrozine、6.5 mmol/L 新亚铜树碱、2.5 mol/L 乙酸铵、1 mol/L 抗坏血酸), 室温放置 30 min, 分别取 280 μl 转移到 96 孔板中, 于酶标仪中测量 550 nm 波长处的吸收峰, 计算铁离子浓度。

1.9 免疫印迹检测相关蛋白表达水平

收集上述各种细胞, RIPA 裂解液(150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 50 mmol/L Tris-HCl, 0.5% DOC, 0.1% SDS, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L Na₃VO₄, 1 mmol/L PMSF 和全蛋白酶抑制剂)冰上裂解 30 min, 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min。取上清, Bradford 法测定蛋白质含量。细胞总蛋白经 12% SDS-PAGE 分离, 电转移至 PVDF 膜上。用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 对 PVDF 膜进行封闭, 经与相应的一抗和二抗孵育后, 采用化学发光法对目的蛋白

条带进行检测, FluorChem 8900 凝胶成像系统照相分析.

1.10 RT-PCR 检测细胞自噬相关基因转录水平

参照 Invitrogen 公司的 TRIzol 试剂盒说明书, 提取上述细胞的总 RNA. 使用 Promega 公司的反转录系统(Reverse Transcription System Kit)获得 cDNA. PCR 反应使用 Promega 公司的 PCR Master Mix 试剂盒. beclin-1(GenBank Accession #AF139131): 上游引物 5' TGG ATC ACC CAC TCT GTG AG 3', 下游引物 5' TTA TTG GCC AGA GCA TGG AG 3', 产物 565 bp. apg-5(GenBank Accession #BC002699): 上游引物 5' TTT GGC TTT GGT TGA AAT AAG 3', 下游引物 5' TGT CAT TTT GCA ATC CCA TC 3', 产物 539 bp. DAPK(GenBank Accession #X76104): 上游引物 5' CCC CTA CTG CCT ATA TCG AC 3', 下游引物 5' AAT GAT ACG GGT GCT CTG AG 3', 产物 626 bp. 对照, GAPDH: 上游引物 5' GAA GGT GAA GGT CGG AGT C 3', 下游引物 5' GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC 3', 产物 226 bp. PCR 反应条件: 95°C 2 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min, 35 个循环; 72°C 10 min. 1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 凝胶图像处理系统照相分析.

2 结 果

2.1 毕赤酵母表达的 NGAL 蛋白的分离纯化

选取 NGAL 蛋白高表达的毕赤酵母细胞克隆, 在含 1%甲醇的 BMMY 液中诱导培养 5 天. 免疫印迹检测结果见图 1a. 从图 1a 中可见, 128 倍稀释的酵母培养上清液依然能够检测到特异性 NGAL 蛋白阳性带. 与阳性对照比较(7、8 和 9 泳道), 酵母培养上清液中 NGAL 蛋白的浓度至少大于 128 mg/L, 说明表达水平很高.

甲醇诱导的毕赤酵母培养上清液, 依次经硫酸铵盐析、Bio-gel P-30 凝胶过滤层析、High Q Support 阴离子交换层析和 SP- Sepharose fast flow 阳离子交换层析等多个步骤分离纯化. 考马斯亮蓝染色和特异性免疫印迹的监控结果分别见图 1b 和图 1c. 经上述多个步骤, NGAL 蛋白已被分离纯化成凝胶电泳上的单一条带. 而进一步的等电聚焦电泳检测实验结果主要呈现 pH 8.2 和 pH 7.8 两种组分, 详见图 1d. 综合以上结果, 说明本文所制备的 NGAL 蛋白的纯度已很高, 但与此同时, NGAL 蛋白本身仍存在着一定程度上的异质性. 推测这可能是由细微的糖基化修饰不同造成的.

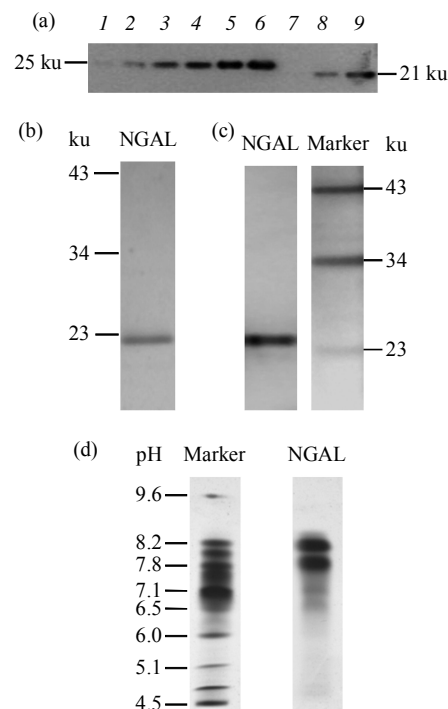


Fig. 1 Purification of NGAL protein from yeast supernatant

(a) Evaluation of NGAL protein expression level in yeast supernatant by Western blot analysis. Yeast supernatant were diluted to 128 times, 64 times, 32 times, 16 times, 8 times and 4 times (Land 1~6) respectively. Land 7~9 represent 1, 2 and 4 mg/L NGAL protein purified from *E. coli* respectively. Molecular mass of NGAL protein expressed in yeast is about 25 ku, while that in *E. coli* is about 21 ku, due to absent of glycosylation modification. Identify of NGAL protein expression: (b) Coomassie blue staining of the gel. (c) Western blot analysis. (d) Ampholine electrophoresis.

2.2 食管癌细胞表达 NGALR 及其 NGAL 蛋白内吞

免疫印迹和免疫荧光染色检测 EC1.71 和 EC109 细胞中 NGALR 蛋白表达情况的结果见图 2a 和图 2b. 两种食管癌细胞系相比, EC1.71 表达 NGALR 蛋白较强, 而 EC109 表达 NGALR 蛋白较弱. 这恰可为本文深入认识 NGAL 蛋白借助于 NGALR 跨膜途径入胞发挥相应的生物学作用提供了一对难得的食管癌细胞模型.

在上述实验基础上, 进一步检测两种食管癌细胞系 EC1.71 和 EC109 内吞 NGAL 蛋白的情况, 从图 3a、b、c 和 d 可见, EC1.71 和 EC109 皆可以内吞 NGAL 蛋白到细胞内, 但 EC1.71 内吞 NGAL 蛋白的能力明显比 EC109 强. 这可能与 EC1.71 表达 NGALR 较强有关.

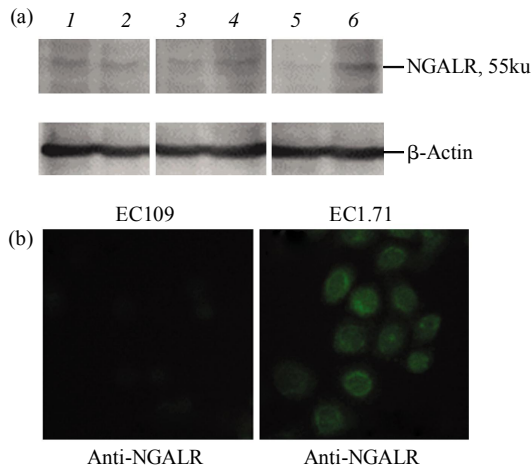


Fig. 2 Analysis of NGALR expression in EC1.71 and EC109 cells

(a) Western blot analysis of NGALR expression in EC1.71 (land 2, 4, 6) and EC109 (land 1, 3, 5) cells. Lands 5 and 6 incubated with an anti-human NGALR antibody as probes and developed with goat anti-rabbit IgG HRP, whereas land 1 and 2 using PBS as control. Land 3 and 4 incubated with an anti-human NGALR antibody plus with ten fold concentration of NGALR peptides. (b) Immunofluorescence staining analysis of NGALR expression.

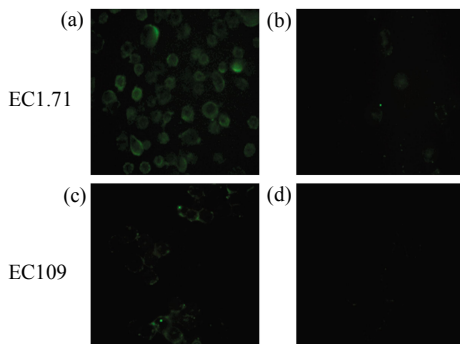


Fig. 3 Binding and internalization of NGAL protein into the EC1.71 and EC109 cells

EC1.71 and EC109 cells were incubated with FAM-NGAL protein (50 mg/L) in the presence (b or d) or absence (a or c) of NGAL (5 g/L) for 1 h. Cells were washed with PBS and washing buffer (50 mmol/L glycine, 150 mmol/L NaCl, pH 3.0) for 1 min and observed under fluorescence microscopy and the magnification was 400 \times .

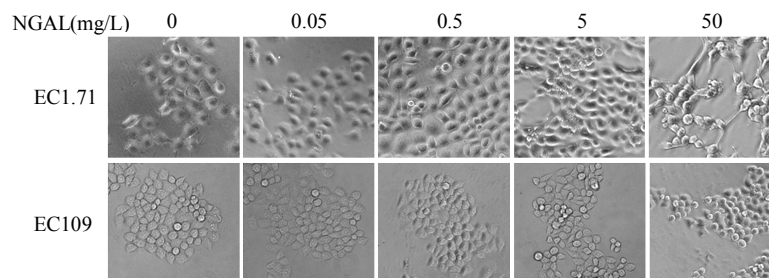


Fig. 4 The effect of NGAL protein on the cellular morphology

EC1.71 and EC109 cells were incubated in medium in the presence of indicated concentration of NGAL protein for 24 h. The morphology of cells was observed under phase contrast microscopy and the magnification was 200 \times .

2.3 NGAL 蛋白诱导食管癌细胞形态改变

相差显微镜观察, 加入不同浓度的 NGAL 蛋白, 孵育 24 h, 诱导 EC1.71 和 EC109 细胞形态改变情况, 结果见图 4. 与对照组相比, NGAL 蛋白浓度较低时, 两种食管癌细胞 EC1.71 和 EC109 的形态均未见明显改变, 细胞伸展良好, 胞质均匀透明, 同时细胞数目也相对较多. 而随着 NGAL 蛋白浓度逐渐由低到高, 特别是当浓度升高到 50 mg/L 时, 两种食管癌细胞的形态均发生了显著变化, 细胞明显收缩变小、形态变圆、同时细胞数目也明显减少、贴壁能力显著下降, 提示可能发生了细胞自噬或凋亡. 而两种食管癌细胞 EC1.71 和 EC109 相比, 应对 NGAL 蛋白的诱导作用, EC1.71 似乎更敏感一些, 形态变化更显著, 细胞收缩更明显. 这可能与两种细胞的 NGALR 表达以及其他相关分子的差异性本质有关.

2.4 NGAL 蛋白诱导食管癌细胞发生自噬

细胞发生自噬所形成的自噬体呈酸性, 单丹磺酰戊二胺(monodansylcadaverine, MDC)是一种弱碱性绿色荧光物质, 能够与自噬体结合, 因此用 MDC 标记发生自噬的细胞通常会显示较强的绿色荧光. 本文的相关实验结果见图 5. 与对照组相比, 随着 NGAL 蛋白浓度逐渐由低到高, 特别是当浓度升高达到 5~50 mg/L 时, 两种食管癌细胞 EC1.71 和 EC109 的绿色荧光显色均显著变强, 表明有明显的细胞自噬发生. 而两种食管癌细胞 EC1.71 和 EC109 相比, 在 NGAL 蛋白浓度相同条件下, 似乎前者的绿色荧光显色更强一些. 这可能同样与两种细胞的 NGALR 表达以及其他相关分子的差异性本质有关.

LC3 与酵母的 ATG8(autophagy-related protein 8)同源. 在正常细胞中, LC3 通常弥散分布于细胞浆中. 然而, 当细胞在某种 / 某些因素作用下发生自噬时, LC3 就会发生易位分布变化, 大量聚集在前

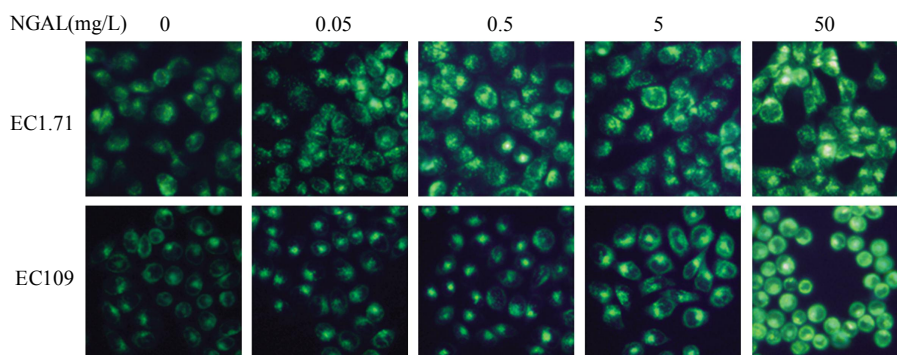


Fig. 5 Identification of NGAL protein inducing autophagy by MDC staining

EC1.71 and EC109 cells were incubated in medium in the presence of NGAL protein for 24 h. MDC was used to label the autophagic vacuoles. Cells were observed under fluorescence microscopy and the magnification was 400 ×.

自噬体或自噬体膜表面，因此检测 LC3 的分布变化被认定为评价细胞是否发生自噬的特异性标签。本文预先把 pLC3-GFP 融合质粒分别转染 EC1.71 和 EC109，然后在荧光显微镜下观察 50 mg/L 的 NGAL 蛋白作用后，细胞中的绿色荧光，即 LC3 的分布变化情况，结果见图 6。无论是 EC1.71，还是 EC109，两者均发生了明显的 LC3 易位分布变化，显现典型的膜性易位聚集特征，表明细胞确实发生了自噬。

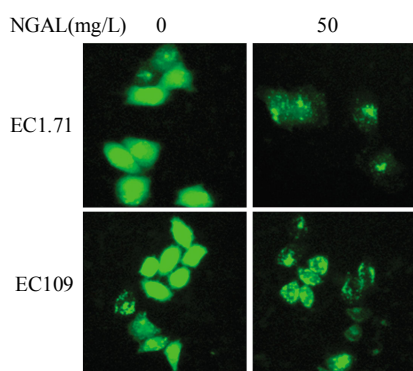


Fig. 6 Alteration of LC3-GFP distribution induced by NGAL in EC1.71 and EC109 esophageal carcinoma cells

EC1.71 and EC109 esophageal carcinoma cells transfected with LC3-GFP were subjected to NGAL protein (50 mg/L) treatments and analyzed by fluorescence microscopy and the magnification was 400 ×.

2.5 NGAL 蛋白对食管癌细胞内铁离子与铁蛋白水平的影响

有人研究报道，NGAL 能够结合肠杆菌素等有机小分子与三价铁离子的二元配合物，是一种特殊的铁结合蛋白，通过 NGALR，参与铁离子的跨膜

转运以及细胞内铁代谢^[3,4]。然而在本文的细胞模型实验条件下，外源性 NGAL 蛋白的作用并未引起细胞内的铁离子浓度明显改变，而细胞内铁蛋白的表达水平也未受到明显影响，详见图 7。这提示，

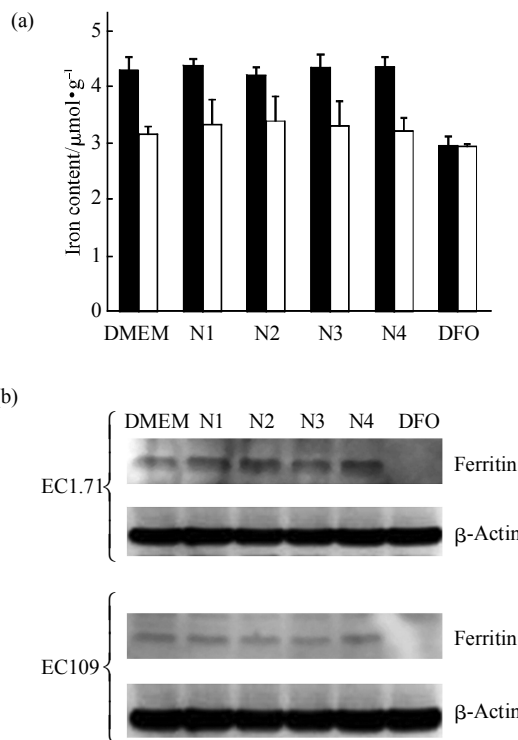


Fig. 7 The effect of internalized NGAL protein on the concentration of intracellular iron and ferritin in EC1.71 and EC109 cells

(a) The concentration of intracellular iron was analyzed by ferrozine assays. ■: EC1.71; □: EC109. (b) Analysis of intracellular ferritin protein levels by Western blot. β-actin level was monitored as loading control. Cells were treated with NGAL (N1/0.05 mg/L, N2/0.5 mg/L, N3/5 mg/L, N4/50 mg/L), DMEM as negative control or DFO (1 mmol/L) as positive control for 24 h.

NGAL 蛋白参与铁离子的跨膜转运以及细胞内铁代谢可能还有其他因素的辅助. 本文在体外细胞模型条件下直接将外源性 NGAL 蛋白加入到细胞培养液中, 也许所缺乏的正是这些辅助因素, 即并未把外源性 NGAL 蛋白的作用与细胞内铁代谢系统有机连接在一起, 构建成一个真正的由 NGAL 蛋白始动的功能性铁运转体系.

2.6 NGAL 蛋白激活食管癌细胞的 ERK1/2 及其对自噬相关基因表达的影响

外源性 NGAL 蛋白在诱导细胞自噬中究竟会激活食管癌细胞的哪一条细胞信号转导途径, 有关实验结果见图 8. 50 mg/L NGAL 蛋白仅分别作用 5 min, 两种食管癌细胞均出现了 p-ERK1/2 水平的明显升高, 而且在接续下来的 0.5~24 h 时间范围内一直保持着这种水平, 而在此之前, 至少 NGAL 蛋白作用 6 h, 模型细胞尚未发生明显自噬现象. 这表明 ERK1/2 激活是细胞自噬前的生物化学反应事件, 可能是 NGAL 蛋白诱导食管癌细胞发生自噬的分子机制关键环节所在.

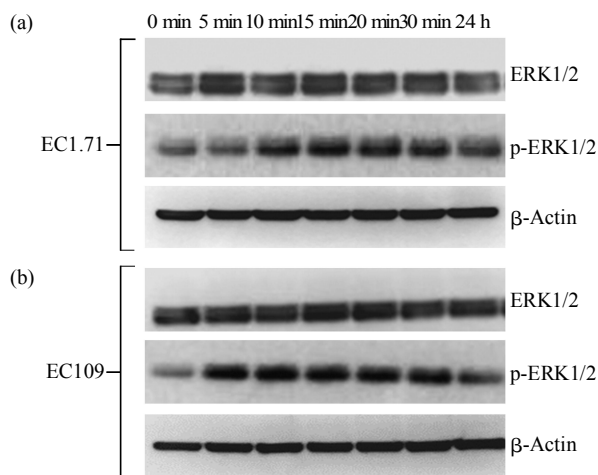


Fig. 8 Internalization of NGAL stimulates ERK1/2 activation in EC1.71 and EC109 cells

Cells were treated with NGAL (50 mg/L) for indicated number of times. Western blot was used to evaluate the expression of associated proteins. β -Actin level was monitored as loading control.

为了进一步寻找实验证据, 通过查阅文献, 同时结合生物信息学分析, 发现 ERK1/2 激酶可能通过磷酸化 SP-1 等转录因子激活 *apg5*、*beclin1* 和 *DAPK* 等自噬相关基因的转录, 参与细胞自噬过程^[13~17]. 而实验结果表明, NGAL 蛋白的作用也的确能够使 EC1.71 和 EC109 在前期激活 ERK1/2 之后, 进而导致上述自噬相关基因的转录增强, 见

图 9. 这是有力的支持实验的证据, 说明 ERK1/2 细胞信号转导途径可能介导了 NGAL 蛋白诱导的食管癌细胞自噬的发生. 但更详尽的机制还需要通过诸如针对 ERK1/2 的 RNA 干扰或特异性药物抑制等实验进一步证实.

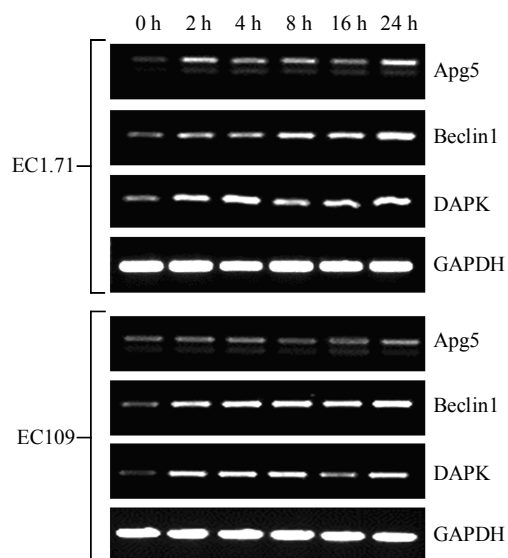


Fig. 9 Internalization of NGAL induces the expression of autophagy associated genes in EC1.71 and EC109 cells

Cells were treated with NGAL (50 mg/L) for 0~24 h. RT-PCR analysis was used to evaluate the mRNA expression of associated proteins. GAPDH level was monitored as a control.

另外, 本文还同时检测了 p38 和 JNK 细胞信号转导激酶在 NGAL 蛋白诱导食管癌细胞自噬中活性变化情况(相关数据未在实验结果部分提供). 发现在 NGAL 蛋白作用下, 细胞中 p38 和 JNK 等 MAPK 的活性有一定变化, 但不如 ERK 明显. 这说明 ERK1/2 细胞信号转导途径是介导 NGAL 蛋白诱导食管癌细胞发生自噬的主要机制.

3 讨 论

近年来, 越来越多的研究证明, 除了食管癌外^[18], NGAL 基因的表达还与甲状腺癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、结肠癌和白血病等其他诸多恶性肿瘤的发生发展及其预后关系密切^[19~24], 提示该基因可能是一种十分重要的肿瘤相关基因, 具有广谱肿瘤生物学作用特征.

在 NGAL 与食管癌的以往系列研究中, 我们的实验结果表明, NGAL 基因在人食管上皮细胞癌变中显著异常过表达, 具有促进癌细胞侵袭的功

能,同时还在癌细胞的不良分化中,可能主要通过影响癌细胞骨架 F-actin 的重组,影响癌细胞的形态结构而发挥作用,但确切的作用机制尚不清楚^[5-7].为了进一步探明 NGAL 在食管癌细胞中确切的肿瘤生物学作用机制,我们把在酵母中表达纯化的不同浓度的 NGAL 蛋白,分别加入到 EC1.71 和 EC109 两种不同的食管癌细胞的培养上清中孵育 24 h,发现随着 NGAL 蛋白浓度逐渐由低到高,特别是当浓度升高达到 50 mg/L 时,两种食管癌细胞的形态均发生了显著变化,可能是发生了细胞自噬或细胞凋亡.而根据包括流式细胞亚二倍体峰、DNA 梯形条带和特异性 Caspases 活化等特异性凋亡细胞检测指标均呈现阴性结果(未在实验结果部分显示),以及针对细胞自噬的特异性 MDC 荧光标记、LC3 膜性异位和 *apg5*、*beclin1* 与 DAPK 等自噬相关基因表达检测均呈现阳性结果等系列实验事实提示,一定浓度的外源性 NGAL 蛋白作用一定时间确可诱导食管癌细胞发生自噬,而不是凋亡.

我们的研究曾发现,食管癌细胞膜上存在着 NGALR,而且还可能存在着一种新的截短形式的选择性剪接突变体^[25].然而不同的食管癌细胞表达 NGALR 存在着明显的异质性,而且基因表达本身还受 DNA 低甲基化修饰调控^[9],这预示着食管癌中涉及到 NGALR 的分子事件可能是一种非常复杂的生物学过程. Goetz 等^[9]曾研究证明,NGAL 是一种有别于 Transferrin 的特殊的转铁蛋白,借助于某种独特的有机小分子配体的中介辅助作用,特异性结合三价铁离子,经细胞膜上相应受体 NGALR,发挥跨膜转铁功能.然而,在本文的两种食管癌细胞中,无论是 EC1.71 还是 EC109,在细胞培养液中直接加入外源性 NGAL 蛋白,均未见对细胞内铁离子的代谢产生明显影响.推测这可能是由于在本文的实验模型系统中不存在或缺乏某种独特的有机小分子配体造成的,即并未把外源性 NGAL 蛋白的作用与细胞内的铁离子代谢系统有机连接在一起,构建一个真正的由外源性 NGAL 蛋白始动的功能性铁离子运转体系. Devireddy 等^[9]研究证明,24p3 蛋白(NGAL 的小鼠同源物)跨膜转铁与细胞增殖或凋亡密切相关.借助于某种有机小分子配体的辅助作用,24p3 蛋白跨膜转铁可能是双向的,既可以把细胞外的铁离子转运到细胞内,也可以把细胞内的铁离子转运到细胞外.当把细胞外的铁离子转运到细胞内时,细胞发生增殖;相反,当把细胞

内的铁离子转运到细胞外时,细胞则发生凋亡^[26].在这种情形下,如果把本文相应的实验结果联系在一起考虑,很显然,在本文实验系统中,NGAL 蛋白借助于 NGALR 的跨膜转运,虽然能够进入到食管癌细胞内,但因为与铁离子的代谢处于一种失偶联状态,所以实验细胞既不会发生增殖,也不会发生凋亡,相反却被诱导导致使细胞发生自噬.由此推断,诱导食管癌细胞发生自噬,可能是 NGAL 蛋白的一种新的独立于铁离子转运之外的功能表现形式.

自噬是一种特殊的细胞程序性死亡形式,在生物学功能以及相关细胞信号转导调控层面,与细胞凋亡既有明显区别,又有密切关联^[27].有大量文献报道,在肿瘤组织细胞中细胞自噬与细胞凋亡有时相互抑制,有时相互转变,彼此之间的关系十分复杂.一种观点认为,借助于细胞自噬把癌细胞中那些严重受损的线粒体等细胞器及时清除,一方面可以有效抑制因坏损线粒体漏导致的细胞凋亡发生,避免出现群体性溃解,而另一方面还可以协调营养与能量的重新分配,使癌细胞能够及时获得营养与能量的循环利用,保持较强生命力,以利于继续生存下去^[28,29].而以上所述也许正是本文中外源性 NGAL 蛋白诱导食管癌细胞发生自噬的分子机制的本质.当然这一推测还需要在整体实验模型上加以研究证实.

最近,有文献报道,ERK 激酶细胞信号转导途径介导了 TNF- α 诱导的 MCF-7 乳腺癌细胞发生的自噬^[30].而本文的实验结果表明(图 8,图 9),外源性 NGAL 蛋白被跨膜转运进入食管癌细胞后,不但能够使 ERK 等激酶显著活化,而且相继还能够使 *apg5*、*beclin1* 与 DAPK 等细胞自噬相关基因的转录水平明显增强.这提示,ERK 细胞信号转导途径也可能在 NGAL 蛋白诱导食管癌细胞发生自噬中发挥介导作用.而十分有趣的是,我们在其他实验研究中证明,食管癌细胞中 ERK 激酶细胞信号转导途径同时还介导着内源性 NGAL 基因的转录(实验结果另文发表).这预示着,在食管癌等肿瘤细胞中可能存在着一个以 ERK 激酶为关键节点的调节环路,控制着 NGAL 诱导细胞发生自噬等生物学功能的发挥.

另外,需要特别补充说明的是,相同剂量的外源性 NGAL 蛋白,借助于 NGALR 等受体的作用,最终进入 EC1.71 和 EC109 两种不同的食管癌细胞中的量是明显不同的,进入 EC1.71 中的量相对较

多, 而进入 EC109 中的量相对较少. 很显然, 这主要是由两种不同的食管癌细胞表达 NGALR 的差异性决定的. 然而, 在细胞信号转导层面, 两种不同的食管癌细胞, 在 ERK 的磷酸化活化以及相继的 beclin1 与 DAPK 等自噬相关基因的表达等方面并未表现出明显的不同. 这提示, 在不同的食管癌细胞内, NGAL 蛋白作用的敏感性是有差别的. 在激活 ERK 信号转导途径上, EC109 细胞对进入细胞内的 NGAL 蛋白作用的应答可能相对更敏感一些.

最近, 我们通过基因表达载体转染的方法研究证明, 在食管癌细胞中使 NGAL 基因过表达可以导致癌细胞的侵袭移动性显著增强(实验结果另文发表). 这与以往我们所发现的反义封闭 NGAL 基因表达可明显抑制食管癌细胞侵袭移动性的实验结果是一致的^[6]. 把上述情况与本文研究发现的源性 NGAL 蛋白诱导食管癌细胞发生自噬的现象结合在一起考虑, 很显然, 源性 NGAL 蛋白与内源性 NGAL 蛋白的生物学功效有本质上的差别. 我们推测, 这可能主要由 NGAL 蛋白作用机制的不同所导致. 提示在诱导食管癌细胞发生自噬的过程中, 源性 NGAL 蛋白的作用机制具有某种独特性.

综上所述, 本文研究发现的源性 NGAL 蛋白诱导食管癌细胞发生自噬可能代表着 NGAL 蛋白生物学作用的一个新的方面. 这不仅有非常重要的理论意义, 而且也可望为在临床上针对食管癌等肿瘤的细胞自噬相关特异性基因治疗开辟一条新的途径.

参 考 文 献

- Kjeldsen L, Johnsen A H, Sengelov H, *et al.* Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem*, 1993, **268** (14): 10425~10432
- Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, *et al.* The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *J Biol Chem*, 2001, **276** (40):37258~37265
- Goetz D H, Holmes M A, Borregaard N, *et al.* The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell*, 2002, **10** (5): 1033~1043
- Devireddy L R, Gazin C, Zhu X, *et al.* A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell*, 2005, **123**(7): 1293~1305
- 许丽艳, 李恩民, 熊华淇, 等. NGAL 基因在永生食管上皮细胞恶性转化中过表达的研究. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28** (6): 839~843
- Xu L Y, Li E M, Xiong H Q, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28** (6): 839~843
- 李恩民, 许丽艳, 蔡唯佳, 等. SHEEC 食管癌细胞中 NGAL 基因的功能. *生物化学与生物物理学报*, 2003, **35**(3): 247~254
- Li E M, Xu L Y, Cai W J, *et al.* *Acta Biochim Biophys Sin*, 2003, **35** (3): 247~254
- 林珏龙, 许丽艳, 李恩民, 等. 反义封闭 NGAL 基因表达对 SHEEC 食管癌细胞微丝骨架的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2004, **31**(5): 409~415
- Lin J L, Xu L Y, Li E M, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2004, **31**(5): 409~415
- Wu B, Cha L, Du Z, *et al.* Construction of mathematical model for high-level expression of foreign genes in pPIC9 vector and its verification. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **354** (2): 498~504
- Cui L, Xu LY, Shen ZY, *et al.* NGALR is overexpressed and regulated by hypomethylation in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2008, **14**(23): 7674~7681
- Devireddy L R, Gazin C, Zhu X, *et al.* A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell*, 2005, **123**(7): 1293~1305
- Biederbick A, Kern H F, Elsasser H P. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific *in vivo* marker for autophagic vacuoles. *Eur J Cell Biol*, 1995, **66**(1): 3~14
- Riemer J, Hoepken H H, Czerwinska H, *et al.* Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Anal Biochem*, 2004, **331**(2): 370~375
- Cheng Y, Qiu F, Tashiro S, *et al.* ERK and JNK mediate TNF α -induced p53 activation in apoptotic and autophagic L929 cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **376**(3): 483~488
- Chen C H, Wang W J, Kuo J C, *et al.* Bidirectional signals transduced by DAPK-ERK interaction promote the apoptotic effect of DAPK. *EMBO J*, 2005, **24**(2): 294~304
- Grand R J, Milner A E, Mustoe T, *et al.* A novel protein expressed in mammalian cells undergoing apoptosis. *Exp Cell Res*, 1995, **218** (2): 439~451
- Aita V M, Liang X H, Murty V V, *et al.* Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics*, 1999, **59**(1): 59~65
- Deiss L P, Feinstein E, Berissi H, *et al.* Identification of a novel serine/threonine kinase and a novel 15-kD protein as potential mediators of the gamma interferon-induced cell death. *Genes Dev*, 1995, **9**(1): 15~30
- Zhang H, Xu L, Xiao D, *et al.* Upregulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in oesophageal squamous cell carcinoma: significant correlation with cell differentiation and tumour invasion. *J Clin Pathol*, 2007, **60**(5): 555~561
- Iannetti A, Pacifico F, Acquaviva R, *et al.* The neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), a NF-kappaB-regulated gene, is a survival factor for thyroid neoplastic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(37): 14058~14063
- Roy R, Louis G, Loughlin K R, *et al.* Tumor-specific urinary matrix metalloproteinase fingerprinting: identification of high molecular weight urinary matrix metalloproteinase species. *Clin Cancer Res*, 2008, **14**(20): 6610~6617

- 21 Villalva C, Sorel N, Bonnet M L, *et al.* Neutrophil gelatinase-associated lipocalin expression in chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, 2008, **49**(5): 984~988
- 22 Moniaux N, Chakraborty S, Yalniz M, *et al.* Early diagnosis of pancreatic cancer: neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer*, 2008, **98** (9): 1540~1547
- 23 Bauer M, Eickhoff J C, Gould M N, *et al.* Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is a predictor of poor prognosis in human primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2008, **108** (3): 389~397
- 24 Lim R, Ahmed N, Borregaard N, *et al.* Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) an early-screening biomarker for ovarian cancer: NGAL is associated with epidermal growth factor-induced epithelio-mesenchymal transition. *Int J Cancer*, 2007, **120**(11): 2426~2434
- 25 Fang W K, Xu L Y, Lu X F, *et al.* A novel alternative spliced variant of neutrophil gelatinase-associated lipocalin receptor in oesophageal carcinoma cells. *Biochem J*, 2007, **403**(2): 297~303
- 26 Richardson D R. 24p3 and its receptor: dawn of a new iron age?. *Cell*, **123**(7): 1175~1177
- 27 Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy*, 2008, **4** (5): 600~606
- 28 Shintani T, Klionsky D J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 2004, **306** (5698): 990~995
- 29 Bauvy C, Gane P, Arico S, *et al.* Autophagy delays sulindac sulfide-induced apoptosis in the human intestinal colon cancer cell line HT-29. *Exp Cell Res*, 2001, **268**(2): 139~149
- 30 Sivaprasad U, Basu A. Inhibition of ERK attenuates autophagy and potentiates tumour necrosis factor-alpha-induced cell death in MCF-7 cells. *J Cell Mol Med*, 2008, **12**(4): 1265~1271

Autophagy Induced by NGAL Protein in Esophageal Carcinoma Cells*

ZHANG Pi-Xian^{1**}, FANG Wang-Kai^{1**}, XU Li-Yan^{2**}, JIANG Ji-Kai^{1***}, SHEN Zhong-Ying², DU Ze-Peng¹, LU Xiao-Feng², ZHOU Fei¹, XIE Jian-Jun¹, WU Bing-Li¹, CUI You-Hong³, XIE Dong^{1,4***}, LI En-Min^{1***}

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical College of Shantou University, Shantou 515041, China;

²Department of Pathology, The Key Immunopathology Laboratory of Guangdong Province,

Medical College of Shantou University, Shantou 515041, China;

³Department of Pathology and Physiology, Medical College of Shantou University, Shantou 515041, China;

⁴Institute for Nutritional Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Previous studies suggest that NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) is involved in the transformation and development of esophageal carcinoma. Alteration of NGAL expression can trigger the change of cellular morphology in esophageal carcinoma cells. However, the mechanisms remain unclear. To get a better understanding of NGAL function in esophageal carcinoma, NGAL protein was expressed in methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, and purified by chromatography. EC1.71 cells expressed high levels of NGALR (NGAL receptor) and EC109 cells expressed low levels of NGALR were used as cells model. The trafficking and the possible function of NGAL protein were then analyzed in the esophageal carcinoma cells. The results showed that 5-FAM-labeled recombinant NGAL protein could internalize into the EC1.71 and EC109 cells. Furthermore, the internalized NGAL protein could induce the alteration of cellular morphology, resulting in generation of autophagosome, transcriptional up-regulation of genes associated with autophagy and increase of phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2). Interestingly, the treatment with the NGAL protein did not affect the intracellular iron level. These data indicate that induced autophagy by exogenous NGAL protein is a mechanism that internalized NGAL plays important roles in esophageal carcinoma cells, independent with NGAL-mediated iron transport process, while ERK1/2 signal pathway is involved in activation of autophagy by exogenous NGAL protein.

Key words NGAL, NGALR, autophagy, iron, protein internalization, esophageal carcinoma cells

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00857

*This work was supported by grants from Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA02A403), The National Natural Science Foundation of China (30370641, 30570829, 30672376), Guangdong Scientific Fund Key Items(5104541, 7118419) and Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (20050560002, 20050560003).

**ZHANG Pi-Xian, FANG Wang-Kai and XU Li-Yan contributed equally to this work.

***Corresponding author. Tel: 86-754-88900413

LI En-Min. E-mail: nmli@stu.edu.cn; XIE Dong. E-mail: dxie@sibs.ac.cn; JIANG Ji-Kai. E-mail: jkjiang@stu.edu.cn

Received: December 17, 2008 Accepted: March 2, 2009