

缝隙连接蛋白 $\beta 2$ 对肺腺癌患者预后及肺腺癌A549细胞生物学行为的影响

王 繁¹, 温 馨^{2,3}, 王艺璇², 王 远^{2,3}

(1. 锦州医科大学基础医学院生物人类学研究所, 辽宁 锦州 121001; 2. 锦州医科大学基础医学院病理学教研室, 辽宁 锦州 121001; 3. 锦州医科大学附属第一医院病理科, 辽宁 锦州 121001)

[摘要] **目的:** 探讨缝隙连接蛋白 $\beta 2$ (GJB2) 在肺腺癌 (LUAD) A549细胞中的表达情况和生物学功能, 为LUAD治疗提供参考。**方法:** 利用TIMER数据库分析多种肿瘤中GJB2基因表达差异, GEPIA数据库检测LUAD中GJB2 mRNA表达情况, 分析GJB2基因与LUAD不同临床分期的相关性, 采用Kaplan-Meier plotter数据库分析GJB2蛋白与LUAD患者预后的相关性。收集111例LUAD患者癌组织及癌旁正常肺组织样本, 采用免疫组织化学染色法观察LUAD患者癌组织和癌旁正常肺组织中GJB2蛋白表达情况。体外培养人肺腺癌A549细胞, 将A549细胞分为GJB2过表达组 (OE-GJB2组, 转染GJB2过表达质粒) 及其阴性对照组 (OE-NC组, 转染GJB2空载质粒)、小干扰RNA (si-RNA)-GJB2组 (si-GJB2组, 转染GJB2-siRNA) 及其阴性对照组 (si-NC组, 转染对照si-RNA), 采用Western blotting法验证细胞转染效率。采用细胞计数试剂盒8 (CCK-8) 法检测各组A549细胞增殖活性, 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (EdU) 染色法检测各组A549细胞阳性表达率, 克隆形成实验检测各组A549细胞克隆形成数, 细胞划痕实验检测各组A549细胞迁移率, Transwell小室实验检测各组A549细胞中侵袭细胞数, Western blotting法检测各组A549细胞中GJB2蛋白和上皮-间质转化 (EMT) 相关蛋白表达水平。**结果:** GJB2基因在多种肿瘤中均存在异常表达; 与癌旁正常肺组织比较, LUAD患者癌组织中GJB2 mRNA表达水平明显升高 ($P < 0.05$), 且GJB2的高表达与LUAD患者癌的临床病理分期具有关联性 ($P < 0.05$); 与GJB2低表达LUAD患者比较, GJB2高表达LUAD患者的总生存期明显减少 [风险比 (HR) = 1.71, 95%CI: 1.34~2.18, $P < 0.05$]; GJB2蛋白在癌旁正常肺泡和支气管上皮细胞中均阴性表达, 与癌旁正常肺组织比较, LUAD患者癌组织中GJB2蛋白表达明显增强; LUAD患者癌组织中GJB2蛋白阳性表达与淋巴结转移具有明显关联性 ($P < 0.05$), 但与患者性别 ($P = 0.626$)、年龄 ($P = 0.639$) 和TNM分期 ($P = 0.837$) 无关联性 ($P > 0.05$)。CCK-8法, 与OE-NC组比较, OE-GJB2组A549细胞增殖活性明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与si-NC组比较, si-GJB2组A549细胞增殖活性明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。EdU染色法, 与OE-NC组比较, OE-GJB2组A549细胞中EdU阳性表达率明显升高 ($P < 0.01$); 与si-NC组比较, si-GJB2组A549细胞中EdU阳性表达率明显降低 ($P < 0.01$)。克隆形成实验, 与OE-NC组比较, OE-GJB2组A549细胞克隆形成数明显增加 ($P < 0.01$); 与si-NC组比较, si-GJB2组A549细胞克隆形成数明显减少 ($P < 0.01$)。Transwell小室实验, 与OE-NC组比较, OE-GJB2组A549细胞侵袭细胞数明显增加 ($P < 0.01$); 与si-NC组比较, si-GJB2组A549细胞侵袭细胞数明显减少 ($P < 0.01$)。细胞划痕实验, 细胞划痕24 h后, 与OE-NC组比较, OE-GJB2组A549细胞迁移率明显升高 ($P < 0.01$); 与si-NC组比较, si-GJB2组A549细胞迁移率明显降低 ($P < 0.01$)。Western blotting法, 与OE-NC组

[收稿日期] 2024-07-18 [录用日期] 2024-09-29

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82103624)

[作者简介] 王 繁 (1997—), 女, 陕西省榆林市人, 助理实验师, 医学硕士, 主要从事肺癌及相关分子机制方面的研究。

[通信作者] 王 远, 副教授, 硕士研究生导师 (E-mail: wyxf880720@163.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

比较, OE-GJB2 组 A549 细胞中 GJB2 和 N 钙黏蛋白 (N-cadherin) 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.01$), E 钙黏蛋白 (E-cadherin) 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 与 si-NC 组比较, OE-GJB2 组 A549 细胞中 GJB2 和 N-cadherin 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.01$), E-cadherin 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$)。结论: GJB2 在 LUAD 患者癌组织中高表达, 并与 LUAD 患者的不良预后有关。GJB2 可促进 A549 细胞的增殖、侵袭、迁移和 EMT。

[关键词] 缝隙连接蛋白 $\beta 2$; 肺腺癌; 细胞增殖; 细胞侵袭; 细胞迁移; 上皮-间质转化

[中图分类号] R730.5 [文献标志码] A

Effect of gap junction $\beta 2$ on prognosis of patients with lung adenocarcinoma and biological behavior of lung adenocarcinoma A549 cells

WANG Fan¹, WEN Xin^{2,3}, WANG Yixuan², WANG Yuan^{2,3}

(1. Institute of Biological Anthropology, School of Basic Medical Sciences, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China; 2. Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China; 3. Department of Pathology, First Affiliated Hospital, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the expression and biological function of gap junction protein $\beta 2$ (GJB2) in the lung adenocarcinoma (LUAD) A549 cells, and to provide the basis for the treatment of LUAD. **Methods:** The TIMER database was used to analyze the differential expression of *GJB2* gene in various tumors; the GEPIA database was used to detect the mRNA expression of *GJB2* in LUAD and analyze its correlation with different clinical stages of LUAD; the Kaplan-Meier plotter database was used to analyze the correlation between GJB2 protein and the prognosis of the LUAD patients. A total of 111 pairs of cancer tissues and adjacent normal lung tissues of LUAD patients were collected, and immunohistochemical staining was used to observe the expression of GJB2 protein in LUAD tissues and adjacent normal lung tissues. The human LUAD A549 cells were cultured *in vitro* and divided into GJB2 overexpression group (OE-GJB2 group, transfected with GJB2 overexpression plasmid) and its negative control group (OE-NC group, transfected with GJB2 empty vector plasmid), small interfering RNA (siRNA)-GJB2 group (si-GJB2 group, transfected with GJB2-siRNA) and its negative control group (si-NC group, transfected with control siRNA). Western blotting method was used to verify the transfection efficiency of the cells; cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to detect the proliferation activities of the A549 cells in various groups; 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) staining was used to detect the positive expression rates of the A549 cells in various groups; colony formation assay was used to detect the number of colony formation of the A549 cells in various groups; cell scratch assay was used to detect the migration rate of the A549 cells in various groups; Transwell chamber assay was used to detect the number of the invasion A549 cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of GJB2 protein and epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related proteins in the A549 cells in various groups. **Results:** The RT-PCR results showed that *GJB2* gene was abnormally expressed in various tumors; compared with adjacent normal lung tissue, the mRNA expression level of *GJB2* in cancer tissue of LUAD patients was significantly increased ($P < 0.05$), and the high expression of *GJB2* was correlated with the clinicopathological stage of LUAD ($P < 0.05$). The Kaplan-Meier plotter results showed that compared with patients with low GJB2 expression, the overall survival of the patients with high GJB2 expression was significantly decreased [hazard ratio (HR) = 1.71, 95% CI: 1.34–2.18, $P < 0.05$].

GJB2 protein was negatively expressed in adjacent normal alveolar and bronchial epithelial cells; compared with adjacent normal lung tissue, the expression of GJB2 protein in cancer tissue of LUAD patients was significantly enhanced. In LUAD, the positive expression of GJB2 protein was significantly associated with lymphnode metastasis ($P < 0.05$) but not with gender ($P = 0.626$), age ($P = 0.639$), or TNM stage ($P = 0.837$) ($P > 0.05$). The CCK-8 results showed that compared with OE-NC group, the proliferation activity of the A549 cells in OE-GJB2 group was significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); compared with si-NC group, the proliferation activity of the A549 cells in si-GJB2 group was significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The EdU staining results showed that compared with OE-NC group, the positive expression rate of EdU in the A549 cells in OE-GJB2 group was significantly increased ($P < 0.01$); compared with si-NC group, the positive expression rate of EdU in the A549 cells in si-GJB2 group was significantly decreased ($P < 0.01$). The colony formation assay results showed that compared with OE-NC group, the number of colony formation of the A549 cells in OE-GJB2 group was significantly increased ($P < 0.01$); compared with si-NC group, the number of colony formation of the A549 cells in si-GJB2 group was significantly decreased ($P < 0.01$). The Transwell chamber assay results showed that compared with OE-NC group, the number of invasion A549 cells in OE-GJB2 group was significantly increased ($P < 0.01$); compared with si-NC group, the number of invasion A549 cells in si-GJB2 group was significantly decreased ($P < 0.01$). The cell scratch assay results showed that 24 h after scratching, compared with OE-NC group, the migration rate of the A549 cells in OE-GJB2 group was significantly increased ($P < 0.01$); compared with si-NC group, the migration rate of the A549 cells in si-GJB2 group was significantly decreased ($P < 0.01$). The Western blotting results showed that compared with OE-NC group, the expression levels of GJB2 and N-cadherin proteins in the A549 cells in OE-GJB2 group were significantly increased ($P < 0.01$), while the expression level of E-cadherin protein was significantly decreased ($P < 0.05$); compared with si-NC group, the expression levels of GJB2 and N-cadherin proteins in the A549 cells in si-GJB2 group were significantly decreased ($P < 0.01$), while the expression level of E-cadherin protein was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** GJB2 is highly expressed in cancer tissue of LUAD patients and is associated with the poor prognosis in LUAD patients. GJB2 promotes the proliferation, invasion, migration, and EMT of the A549 cells.

KEYWORDS Gap junction protein $\beta 2$; Lung adenocarcinoma; Cell proliferation; Cell invasion; Cell migration; Epithelial-mesenchymal transition

肺癌是全球范围内最常见的癌症类型^[1]。在肺癌组织病理学分类中非小细胞肺癌(non-small cell lung carcinoma, NSCLC)占绝大多数,而肺腺癌(lung adenocarcinoma, LUAD)则是NSCLC中最常见的病理类型,约占所有肺癌患者的40%^[2]。

缝隙连接蛋白 $\beta 2$ (gap junction $\beta 2$, GJB2)是缝隙连接蛋白家族的重要成员,也被称为连接蛋白26(connexin 26, Cx26),其为缝隙连接的一个组成部分,能够与邻近细胞的其他缝隙连接蛋白形成功能性通道,该通道在细胞间信息、能量、物质交流和信息传递中发挥关键作用,也可调节细胞增殖、分化和凋亡^[3]。因此GJB2蛋白表达水平可对细胞、组织及器官功能有直接影响,其功能的异常也会破坏周围正常细胞之间的信息传递,导致正常调控功能丧失,从而影响细胞的发育,使正常细胞

发展为肿瘤细胞^[4-5]。GJB2蛋白的异常上调或下调在肿瘤的发生发展过程中发挥重要作用。然而,关于GJB2在LUAD中的作用尚未完全阐明。本研究旨在探讨GJB2对LUAD A549细胞生物学行为的影响,为深入了解LUAD的发展和治理提供新的切入点。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 人LUAD细胞株A549细胞购自中国科学院上海细胞库。RPMI-1640培养基和胎牛血清(美国Gibco公司),pCMV6-GJB2过表达质粒和空载质粒pCMV6(美国Origene公司),GJB2-小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)和阴性对照siRNA(si-NC)(广州锐博生物科技有限公司),Lipofectamine 3000(美国

Invitrogen 公司), Matrigel 基底胶 (美国 Corning 公司), Transwell 小室 (美国 Thermo 公司), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) (北京索莱宝科技有限公司), 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 试剂盒 (广州锐博生物科技有限公司), 免疫组织化学染色试剂盒和 DAB 试剂盒 (福州迈新生物技术开发有限公司), 柠檬酸缓冲液 (美国 Sigma 公司)。细胞 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo 公司), 酶标仪 (德国 Eppendorf 公司), 蛋白电泳仪 (美国 BIO-RAD 公司), 凝胶成像系统 (上海天能生命科学有限公司), 荧光倒置显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.2 组织标本来源 获取锦州医科大学附属第一医院 LUAD 患者癌组织和癌旁正常肺组织术后标本共 111 对, 分析 GJB2 蛋白表达情况与 LUAD 患者临床病理参数 (包括年龄、性别、TNM 分期和淋巴结转移情况等) 之间的关联性。本研究经锦州医科大学伦理审查委员会全面批准 (批准号: JZMULL2024007), 同时豁免了患者知情同意的要求。

1.3 生物信息学分析 利用 TIMER 数据库 (<http://timer.cistrome.org/>) 检索了 33 类肿瘤组织及其癌旁正常组织中 GJB2 基因的表达水平, 并进行差异性分析。采用 GEPIA 数据库 (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) 检索来自于癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库的 483 例 LUAD 患者癌组织样本及 59 例正常肺组织样本, 分析 LUAD 组织与正常肺组织间 GJB2 基因表达差异及不同临床分期 LUAD 患者癌组织中 GJB2 基因表达情况。采用 Kaplan-Meier plotter 数据库 (<https://kmplot.com/analysis/>) 分析在 LUAD 患者癌组织中 GJB2 蛋白表达水平与患者预后的相关性。

1.4 细胞培养 将 A549 细胞置于无菌皿中, 采用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液培养细胞, 于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中孵育, 间隔 1~2 d 换液 1 次。细胞密度达到 90% 以上时采用含 EDTA 的胰蛋白酶消化并传代。

1.5 质粒转染及细胞分组 Lipofectamine 3000 试剂盒用于质粒转染实验。将 GJB2 过表达质粒和 siRNA 及相应的阴性对照分别转染至 A549 细胞, 将其分为 GJB2 过表达组 (OE-GJB2 组, 转染

GJB2 过表达质粒) 及其阴性对照组 (OE-NC 组, 转染 GJB2 空载质粒)、si-GJB2 组 (转染 GJB2-siRNA) 及其阴性对照组 (si-NC 组, 转染对照 siRNA)。实验开始前, 于 6 孔细胞培养板上均匀接种细胞, 细胞密度达 70%~80% 时进行过表达转染, 细胞密度为 40%~50% 时进行干扰。采用无血清培养基对质粒及转染试剂进行稀释, 向质粒稀释液中添加转染剂稀释液, 轻轻混匀, 室温静置 30 min, 再转入细胞培养基中, 轻摇培养皿, 混匀, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中持续培养 48~72 h。采用 Western blotting 法检测各组 A549 细胞转染效率。

1.6 CCK-8 法检测各组 A549 细胞增殖活性 将 A549 细胞转染或干扰 24 h 后, 以每孔 3 000 个细胞的密度均匀铺于 96 孔细胞培养板上。每组设置 5 个重复孔。细胞培养板每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 避免产生气泡, 避光置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 2 h, 采用酶标仪于波长 450 nm 处测定吸光度 (A) 值, 以 A 值代表细胞增殖活性。

1.7 EdU 染色法检测各组 A549 细胞 EdU 阳性表达率 A549 细胞均匀接种于 6 孔细胞培养板上, 待细胞密度达到约 70% 后, 加入用完全培养基按 1:1 000 稀释的 EdU 溶液, 制备 50 μ mol·L⁻¹ EdU 培养基, 每孔加入 100 μ L 50 μ mol·L⁻¹ EdU 培养基孵育 2 h, 弃培养基, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 清洗细胞 1~2 次, 固定、染色, 显微镜下观察并记录阳性细胞数, 计算 EdU 阳性表达率。EdU 阳性表达率 = EdU 阳性细胞数 / 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 阳性细胞数 \times 100%。

1.8 克隆形成实验检测各组 A549 细胞克隆形成数 A549 细胞在转染或干扰 24 h 后, 采用胰酶进行消化, 细胞计数, 以每孔 500 个细胞的密度接种于 6 孔细胞培养板中进行培养, 单个集落中细胞数 > 50 个时停止培养。PBS 缓冲液洗涤 3 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 苏木素染色 15 min, 流水洗去染色液, 晾干。采用照相机对 6 孔细胞培养板进行拍照记录, Image J 软件计数各组 A549 细胞克隆形成数。

1.9 Transwell 小室实验检测各组 A549 细胞中侵袭细胞数 选用 8.0 μ m 孔径的 Transwell 小室将其放入 24 孔细胞培养板中, 在冰上用无血清细胞培养基按 1:8 比例稀释基质胶, 加入 Transwell 小

室。将含有 1×10^6 个细胞的200 μL 细胞悬液精确接种至上室,无血清的RPMI-1640培养基培养。将含有10%胎牛血清的500 μL 培养基置于24孔细胞培养板下层,培养24 h。用4%多聚甲醛固定细胞30 min,苏木精染色15 min, PBS缓冲液洗涤3次,倒置显微镜下观察并拍照,采用Image J软件计数各组侵袭细胞数。

1.10 细胞划痕实验检测各组A549细胞迁移率

A549细胞均匀接种于6孔细胞培养板中培养。当细胞密度达90%时,用透明枪头于6孔细胞培养板底表面垂直划线。PBS缓冲液洗涤细胞2次,加入无血清培养基。分别于0和24 h采用显微镜观察并拍摄图像。采用Image J软件计算细胞划痕面积,计算各组细胞迁移率。细胞迁移率=(0 h划痕面积-24 h划痕面积)/0 h划痕面积 $\times 100\%$ 。

1.11 免疫组织化学染色法观察LUAD患者癌组织和癌旁正常肺组织中GJB2蛋白表达情况

将组织蜡块切成厚度为5 μm 的组织切片,采用二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱苯水合,柠檬酸缓冲液对抗原进行修复,加一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。加二抗孵育10 min, DAB显色,苏木素染核。切片常规脱水,嵌入中性树脂中,显微镜下观察拍照。每个切片随机选取5个高倍镜视野,每个视野计数100个细胞,计算阳性细胞染色强度和细胞阳性百分率。免疫组织化学染色法检测结果判定标准:GJB2阳性表达主要定位于细胞质,以细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性。根据染色强度将其表达分为0~3级:0级(无染色,细胞无显色),1级(弱染色,细胞呈浅黄色),2级(中染色,细胞呈棕黄色),3级(强染色,细胞呈棕褐色);细胞阳性百分率:1分(1%~25%),2分(26%~50%),3分(51%~75%),4分(76%~100%)。GJB2阳性表达情况为由2项评分相乘的结果,结果范围为0~12分,得分 ≥ 6 分为过表达阳性。

1.12 Western blotting法检测各组A549细胞中GJB2和上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关蛋白表达水平 A549细胞常规培养, PBS缓冲液冲洗细胞3次,加入细胞裂解液。将混合物置于冰上孵育20 min,离心取上清液。采用BCA法检测试剂盒测定蛋白浓度。将蛋白质样品和Marker逐个加入泳道进行SDS-PAGE凝胶电泳,然后在适宜的条件下,将其转移至PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭2 h。加入

GJB2抗体(1:1 000)、N钙黏蛋白(N-cadherin抗体)(1:1 000)、E钙黏蛋白(E-cadherin)抗体(1:1 000)和GAPDH抗体(1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育一夜,二抗室温孵育2 h。TBST溶液洗膜3次,每次10 min,加入ECL显色剂,显影仪显影。采用Image J软件分析目的蛋白条带灰度值,以GAPDH为内参,计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

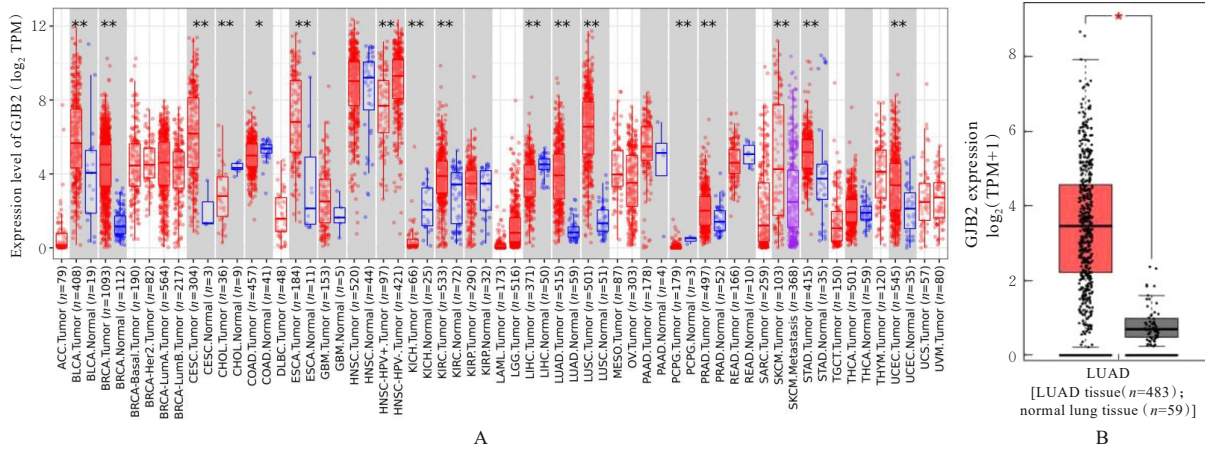
1.13 统计学分析 采用SPSS 25.0和GraphPad Prism 9.0统计软件进行统计学分析。GJB2蛋白表达情况与LUAD患者临床病理参数之间的关联性分析采用 χ^2 检验。各组A549细胞的细胞增殖活性、EdU阳性表达率、克隆形成数、细胞迁移率、侵袭细胞数、细胞中GJB2蛋白和EMT相关蛋白表达水平均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用SNK- q 检验。所有实验均至少重复3次,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组织中GJB2基因表达情况及GJB2表达与LUAD患者总生存期的相关性 TIMER数据库分析结果显示:GJB2基因在多种肿瘤中均存在异常表达(图1A)。GEPIA数据库分析结果显示:与癌旁正常肺组织比较,LUAD患者癌组织中GJB2 mRNA表达水平明显升高($P < 0.05$),且GJB2的高表达与LUAD患者的临床病理分期具有相关性($P < 0.05$)(图1B和图2A)。Kaplan-Meier生存分析结果显示:与GJB2低表达患者比较,GJB2高表达患者的总生存期明显减少[风险比(hazard ratio, HR)=1.71, 95%CI: 1.34~2.18, $P < 0.05$],提示GJB2高表达癌症患者的预后更差(图2B)。

2.2 LUAD患者癌组织和癌旁正常肺组织中GJB2蛋白表达情况 GJB2在癌旁正常肺泡和支气管上皮细胞中均呈阴性表达,与癌旁正常肺组织比较,LUAD患者癌组织中GJB2蛋白表达明显增强。见图3。LUAD患者癌组织中GJB2蛋白阳性表达与淋巴结转移有明显关联性($P < 0.05$),但与患者性别($P = 0.626$)、年龄($P = 0.639$)和TNM分期($P = 0.837$)无关联性($P > 0.05$)。见表1。

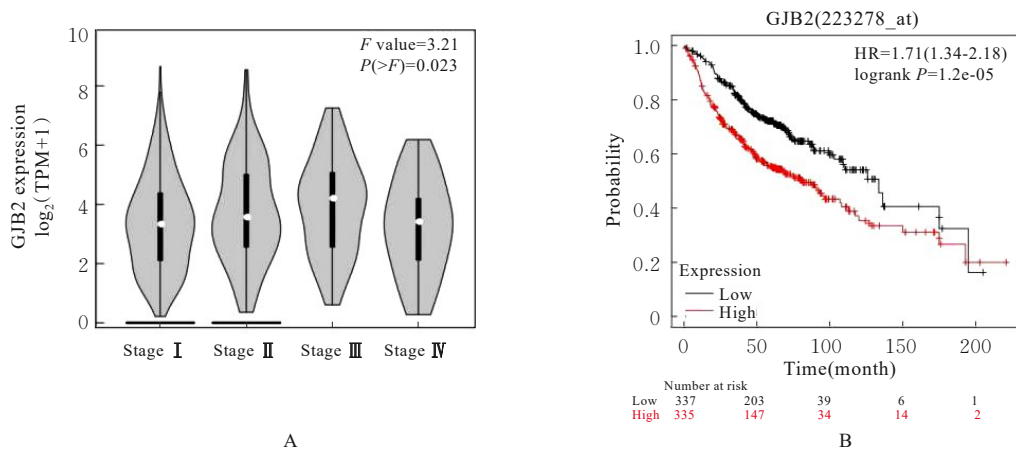
2.3 各组A549细胞增殖活性 与OE-NC组比较,OE-GJB2组A549细胞增殖活性明显升高($P < 0.05$ 或



A: Expression of GJB2 mRNA in various tumor tissues and adjacent normal tissues; B: Expression of GJB2 mRNA in LUAD tissue and adjacent normal lung tissue. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal lung tissue.

图 1 不同肿瘤组织中 GJB2 mRNA 表达情况

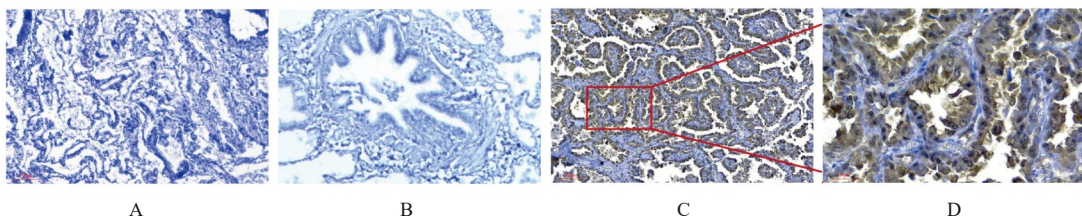
Fig. 1 Expressions of GJB2 mRNA in various tumor tissues



A: Relationship between GJB2 and clinical pathological stage of LUAD; B: Relationship between GJB2 expression and overall survival time in LUAD patients.

图 2 GJB2 mRNA 表达与 LUAD 患者临床分期和总生存期的相关性

Fig. 2 Correlation between expression of GJB2 mRNA and clinical stage and overall survival of LUAD patients



A: Normal alveolar tissue ($\times 100$); B: Normal bronchial epithelium ($\times 100$); C: LUAD tissue ($\times 100$); D: LUAD tissue ($\times 400$).

图 3 LUAD 患者癌组织和癌旁正常肺组织中 GJB2 蛋白表达情况

Fig. 3 Expressions of GJB2 in adjacent normal lung tissue and cancer tissue of LUAD patients

$P < 0.01$); 干扰 GJB2 的表达之后, 与 si-NC 组比较, si-GJB2 组 A549 细胞增殖活性明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图 4。

2.4 各组 A549 细胞中 EdU 阳性表达率 过表达

GJB2 后, 与 OE-NC 组 ($34.24\% \pm 1.90\%$) 比较, OE-GJB2 组 A549 细胞中 EdU 阳性表达率 ($55.59\% \pm 1.54\%$) 明显升高 ($P < 0.01$); 干扰 GJB2 的表达之后, 与 si-NC 组 ($41.30\% \pm 1.70\%$)

表1 GJB2表达情况与LUAD患者临床病理参数之间关联性
Tab.1 Relationship between GJB2 expression and clinicopathological indexes of LUAD patients

Clinicopathological index	<i>n</i>	GJB2 -negative	GJB2 -positive	<i>P</i>
Tissue				0.007
Normal	111	90	21	
LUAD	111	72	39	
Age				0.639
<60	46	31	15	
≥60	65	41	24	
Gender				0.626
Male	62	39	23	
Female	49	33	16	
TNM stage				0.837
I - II	81	53	28	
III - IV	30	19	11	
Lymphnode metastasis				0.036
Yes	45	24	21	
No	66	48	18	

比较, si-GJB2组A549细胞中EdU阳性表达率(31.92%±3.28%)明显降低($P<0.01$)。见图5。

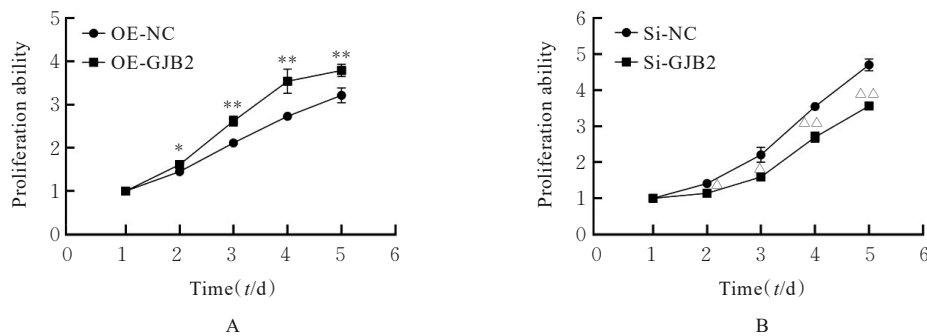


图4 CCK-8法检测各组A549细胞增殖活性
Fig. 4 Proliferation abilities of A549 cells in various groups detected by CCK-8 assay

2.8 各组A549细胞中GJB2和EMT相关蛋白表达水平 与OE-NC组比较, OE-GJB2组A549细胞中GJB2和N-cadherin蛋白表达水平均明显升高($P<0.01$), E-cadherin蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。见图9。与si-NC组比较, OE-GJB2组A549细胞中GJB2和N-cadherin蛋白表达水平均明显降低($P<0.01$), E-cadherin蛋白表达水平明显升高($P<0.01$)。见图10。

2.5 各组A549细胞克隆形成数 与OE-NC组(152.30个±22.15个)比较, OE-GJB2组A549细胞克隆形成数(200.30个±15.31个)明显增加($P<0.01$); 干扰GJB2表达后, 与si-NC组(186.00个±22.00个)比较, si-GJB2组A549细胞的克隆形成数(127.30个±4.04个)明显减少($P<0.01$)。见图6。

2.6 各组A549细胞中侵袭细胞数 与OE-NC组(245.7个±18.5个)比较, OE-GJB2组A549细胞中侵袭细胞数(400.0个±13.5个)明显增加($P<0.01$); 干扰GJB2表达后, 与si-NC组(351.7个±17.2个)比较, si-GJB2组A549细胞中侵袭细胞数(259.3个±17.2个)明显减少($P<0.01$)。见图7。

2.7 各组A549细胞的细胞迁移率 细胞划痕24h后, 与OE-NC组(20.77%±1.66%)比较, OE-GJB2组A549细胞的细胞迁移率(50.71%±1.11%)明显升高($P<0.01$); 与si-NC组(26.80%±1.65%)比较, si-GJB2组A549细胞的细胞迁移率(12.19%±0.93%)明显降低($P<0.01$)。见图8。

3 讨论

在全球范围内肺癌的患病率和死亡率均较高, 且发病率还在逐年上升。此外, 肺癌是男性癌症相关死亡的第一大原因, 也是女性癌症相关死亡的第二大原因, 仅次于乳腺癌^[6]。近年来, 肺癌的早期诊断和治疗已取得长足进步, 但其预后仍然不佳^[7]。因此, 寻找新的肿瘤标志物或药物新靶点具有重要的临床意义。本研究结果显示: GJB2在

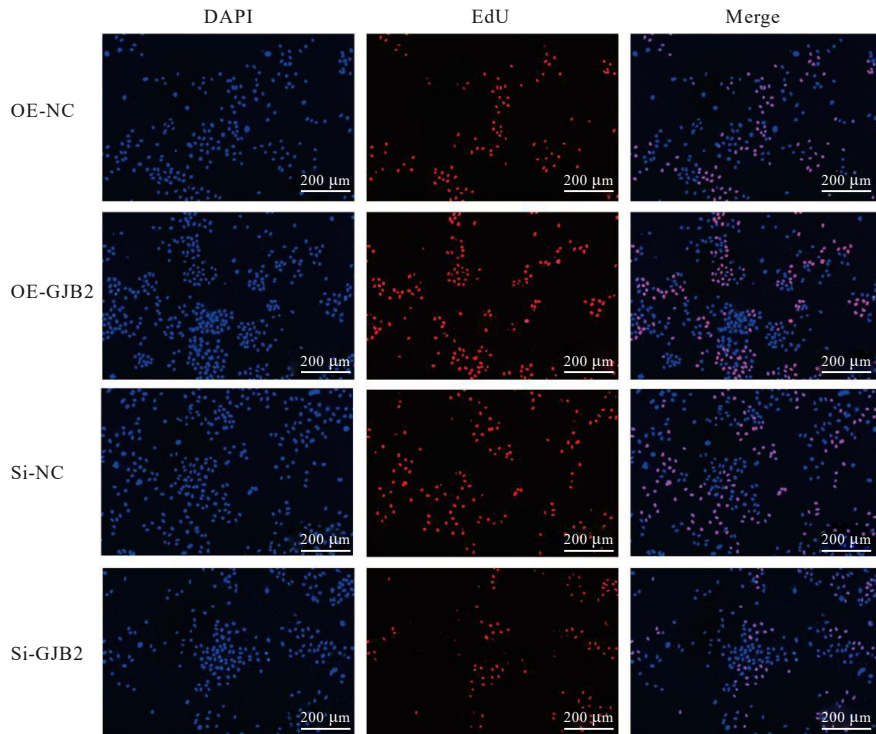
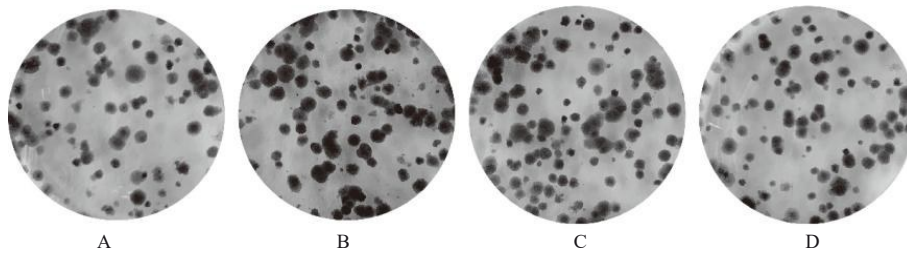


图 5 EdU 染色法检测各组细胞 EdU 阳性表达情况

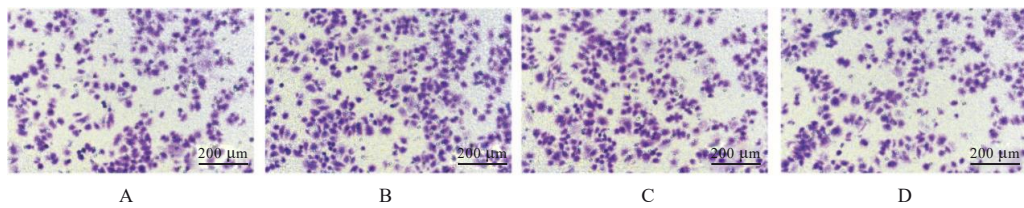
Fig. 5 Positive expression of EdU in cells in various groups detected by EdU staining method



A: OE-NC group; B: OE-GJB2 group; C: Si-NC group; D: Si-GJB2 group.

图 6 克隆形成实验检测各组细胞的克隆形成能力(结晶紫)

Fig. 6 Clone formation ability of cells in various groups detected by clone formation assay (Crystal violet)



A: OE-NC group; B: OE-GJB2 group; C: Si-NC group; D: Si-GJB2 group.

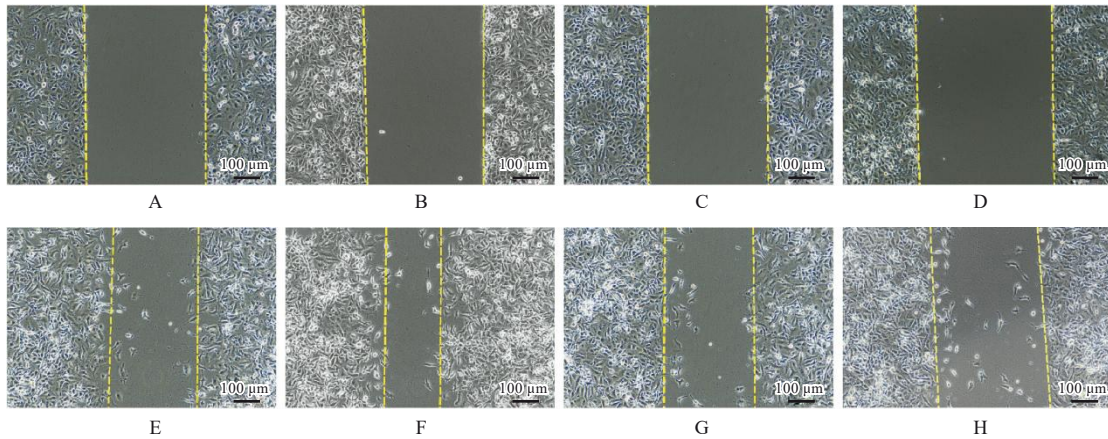
图 7 Transwell 小室实验检测各组细胞的侵袭能力(结晶紫)

Fig. 7 Invasion ability of cells in various groups detected by Transwell chamber assay (Crystal violet)

A549 细胞中高表达, 能够促进细胞的增殖、侵袭和迁移, 并可能是通过 EMT 途径促进细胞的侵袭和迁移。

研究^[8]表明: GJB2 在不同的肿瘤组织中均存

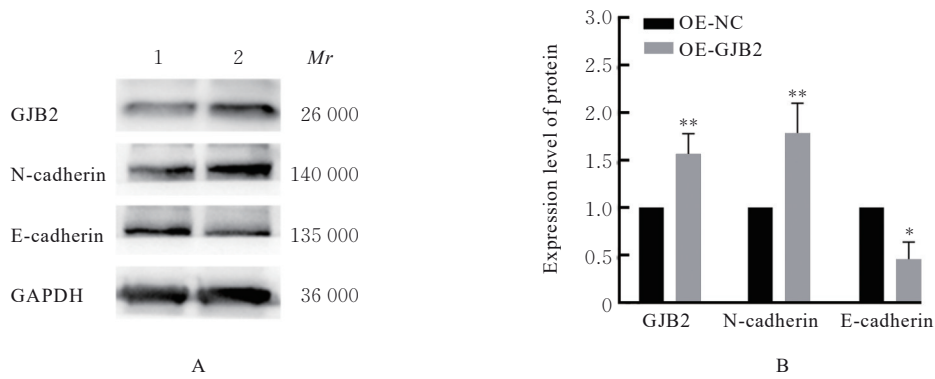
在异常表达, 其表达和功能在不同类型的癌症进展阶段中均存在差异。在某些癌症的早期阶段, GJB2 常在肿瘤细胞中表达缺失或低表达, 表明其在肿瘤发生发展中可能起到抑制作用^[9-10]。但在—



A—D: 0 h; E—H: 24 h; A, E: OE-NC group; B, F: OE-GJB2 group; C, G: Si-NC group; D, H: Si-GJB2 group.

图8 细胞划痕实验检测各组细胞的迁移能力

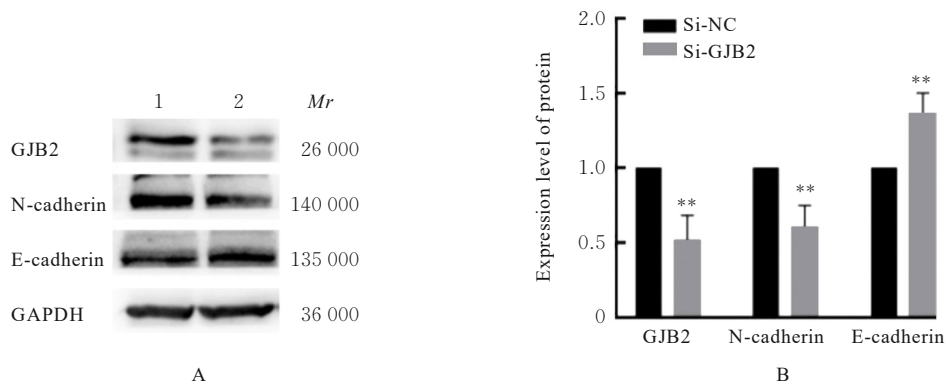
Fig. 8 Migration ability of cells in various groups detected was by cell scratch assay



Lane 1: OE-NC group; Lane 2: OE-GJB2 group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs OE-NC group.

图9 过表达GJB2后各组A549细胞中GJB2及EMT相关蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 9 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of EMT-related proteins in LUAD A549 cells after over-expression of GJB2



Lane 1: Si-NC group; Lane 2: Si-GJB2 group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs si-NC group.

图10 沉默GJB2后各组A549细胞中GJB2及EMT相关蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 10 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of EMT-related proteins in A549 cells in various groups after silencing GJB2

些癌症中也存在过GJB2表达, 且与肿瘤侵袭和转移关系密切^[11-12]。KANCZUGA-KODA等^[13]证实: GJB2在乳腺癌中过表达, 且与乳腺癌的侵袭和转移具有密切关联, 与NAOI等^[14]的研究结果一致。本研究结果显示: GJB2在LUAD患者癌组织中高表达, 与TANG等^[15]的研究结果一致。本研究中Transwell小室实验和细胞划痕实验检测结果显示: 过表达GJB2促进A549细胞的侵袭和迁移, 而干扰GJB2的表达则抑制A549细胞的侵袭和迁移。

EMT是一种进化保守但复杂的分子和细胞程序, 其中细胞经历由上皮状态到间充质状态的转化^[16]。E-cadherin是上皮黏附连接的主要成分, 介导细胞间黏附和紧密连接, 形成黏连带。E-cadherin蛋白丢失后, N-cadherin蛋白等间充质标志物的表达活性增加^[17-18]。研究^[19]显示: 在EMT过程中, 上皮分化特征丧失后, 细胞极性发生改变, 导致上皮细胞与周围细胞间黏附作用减弱, 而细胞的间充质特征被短暂获得, 如细胞的迁移和侵袭能力均会增强。鉴于N-cadherin蛋白与细胞侵袭性和转移形成能力有密切关联, 与多种癌症预后有关联性^[20]。如甲状腺癌的进展与由E-cadherin蛋白至N-cadherin蛋白表达的转变有关, 结直肠癌肝转移与EMT的逆转有关^[21-22]。本研究结果显示: 过表达GJB2导致上皮细胞标志物E-cadherin蛋白表达下调, 间充质细胞标志物N-cadherin蛋白表达上调, 提示GJB2可促进A549细胞的EMT。

综上所述, GJB2蛋白在A549细胞中通过激活EMT途径促进了A549细胞迁移和侵袭, 在LUAD的发生发展及预后中发挥了重要的作用, 有望成为LUAD患者药物治疗和预后监测的新靶点。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

王繁参与实验设计、论文撰写和修改, 温馨和王艺璇参与数据处理及分析, 王远参与课题指导和论文修订。

[参考文献]

- [1] THAI A A, SOLOMON B J, SEQUIST L V, et al. Lung cancer[J]. *Lancet*, 2021, 398(10299): 535-554.
- [2] RUDIN C M, BRAMBILLA E, FAIVRE-FINN C, et al. Small-cell lung cancer[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7(1): 3.
- [3] PENG B, XU C P, WANG S W, et al. The role of connexin hemichannels in inflammatory diseases [J]. *Biology (Basel)*, 2022, 11(2): 237.
- [4] WINGARD J C, ZHAO H B. Cellular and deafness mechanisms underlying connexin mutation-induced hearing loss-A common hereditary deafness [J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 202.
- [5] DBOUK H A, MROUE R M, EL-SABBAN M E, et al. Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels [J]. *Cell Commun Signal*, 2009, 7: 4.
- [6] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [7] XIA C F, DONG X S, LI H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2022, 135(5): 584-590.
- [8] NALEWAJSKA M, MARCHELEK-MYŚLIWIEC M, OPARA-BAJEROWICZ M, et al. Connexins-therapeutic targets in cancers[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): 9119.
- [9] LEROY K, SILVA COSTA C J, PIETERS A, et al. Expression and functionality of connexin-based channels in human liver cancer cell lines[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22): 12187.
- [10] BROCKMEYER P, HEMMERLEIN B, JUNG K, et al. Connexin subtype expression during oral carcinogenesis: a pilot study in patients with oral squamous cell carcinoma[J]. *Mol Clin Oncol*, 2016, 4(2): 298-302.
- [11] MENG S L, LIU Y H, WANG X Y, et al. The prognostic value and biological significance of gap junction beta protein 2 (GJB2 or Cx26) in cervical cancer[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 907960.
- [12] LI Y M, WANG L B, TIAN J H, et al. The role of Connexin26 regulated by miR-2114-3p in the pathogenesis of ovarian cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 640: 105-116.
- [13] KANCZUGA-KODA L, SULKOWSKI S, LENCZEWSKI A, et al. Increased expression of connexins 26 and 43 in lymph node metastases of breast cancer[J]. *J Clin Pathol*, 2006, 59(4): 429-433.
- [14] NAOI Y, MIYOSHI Y, TAGUCHI T, et al. Connexin26 expression is associated with lymphatic vessel invasion and poor prognosis in human breast

- cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2007, 106(1): 11-17.
- [15] TANG Y, ZHANG Y J, WU Z H. High GJB2 mRNA expression and its prognostic significance in lung adenocarcinoma: a study based on the TCGA database[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(14): e19054.
- [16] DONGRE A, WEINBERG R A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(2): 69-84.
- [17] FONTANA R, MESTRE-FARRERA A, YANG J. Update on epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression[J]. *Annu Rev Pathol*, 2024, 19: 133-156.
- [18] KASZAK I, WITKOWSKA-PILASZEWICZ O, NIEWIADOMSKA Z, et al. Role of cadherins in cancer- a review[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7624.
- [19] QIN K, YU M, FAN J M, et al. Canonical and noncanonical Wnt signaling: multilayered mediators, signaling mechanisms and major signaling crosstalk[J]. *Genes Dis*, 2023, 11(1): 103-134.
- [20] JONCKHEERE S, ADAMS J, DE GROOTE D, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) as a therapeutic target [J]. *Cells Tissues Organs*, 2022, 211(2): 157-182.
- [21] PRATHEESHKUMAR P, SIRAJ A K, DIVYA S P, et al. CHD4 predicts aggressiveness in PTC patients and promotes cancer stemness and EMT in PTC cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2): 504.
- [22] LONG L, XIONG W, LIN F W, et al. Regulating lactate-related immunometabolism and EMT reversal for colorectal cancer liver metastases using shikonin targeted delivery[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2023, 42(1): 117.