

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.10.006

MBP-1 在人食管癌细胞株 Ec109 细胞增殖、凋亡和侵袭中的作用

陈家骅,李元明,王磊,叶力波,伊斯拉木江,木沙由夫,哈里木,齐海[△]

(新疆医科大学第二附属医院心胸外科,乌鲁木齐 830063)

[摘要] **目的** 探讨癌症-MYC 基因(C-myc)启动子结合蛋白 1(MBP-1)在人食管癌细胞株 Ec109 细胞增殖、凋亡和侵袭中的作用。**方法** 培养人食管癌细胞系 Ec109,分为 MBP-1 模拟物组、siRNA-MBP-1 组、阴性对照组和空白对照组,采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)检测各组细胞增殖,流式细胞仪检测细胞凋亡及细胞周期,Transwell 检测细胞侵袭能力,Western blot 检测与细胞周期相关的 C-myc、周期蛋白 D1(Cyclin D1)和周期蛋白 E(Cyclin E)。**结果** 与阴性对照组和空白对照组相比,转染 MBP-1 模拟物可使食管癌细胞 Ec109 中 MBP-1 表达上调($P<0.05$),食管癌细胞增殖能力降低,凋亡比例升高, G_0/G_1 期细胞比例降低,侵袭细胞数减少,细胞中 C-myc、Cyclin D1 和 Cyclin E 蛋白表达被抑制;沉默 MBP-1 后,siRNA-MBP-1 组食管癌细胞 Ec109 中 MBP-1 表达下调,食管癌细胞增殖能力增加,凋亡比例下降, G_0/G_1 期细胞比例升高,侵袭细胞数增加,细胞中 C-myc、Cyclin D1 和 Cyclin E 蛋白表达上调。**结论** MBP-1 与人食管癌细胞株 Ec109 细胞增殖、凋亡、侵袭能力密切相关,其机制可能与细胞周期异常有关。

[关键词] 人食管癌 Ec109 细胞;MBP-1;生物学功能;细胞周期**[中图分类号]** R735.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)10-1318-04**Role of MBP-1 in proliferation, apoptosis and invasion of human esophageal cancer cells Ec109**CHEN Jiahua, LI Yuanming, WANG Lei, YE Libo, YI Silamujiang, MU Shayoufu, HA Limu, QI Hai[△]

(Department of Cardiothoracic Surgery, Second Affiliated Hospital of Xinjiang

Medical University, Urumchi, the Xinjiang Uygur Autonomous Region 830063, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of MBP-1 in proliferation, apoptosis and invasion of human esophageal cancer cells Ec109. **Methods** The human esophageal cancer cells Ec109 were cultured, and divided into the MBP-1 mimics group, siRNA-MBP-1 group, negative control group and blank control group. The cell proliferation activity of each group was detected by tetrazolium blue (MTT) method; flow cytometry was used to detect cell apoptosis and cell cycle; Transwell assay was used to detect the invasion ability and the expressions of cellular cycle related C-myc, Cyclin D1 and Cyclin E were detected by western blot. **Results** Compared with the negative control group and blank control group, the expression of MBP-1 in esophageal cancer cells Ec109 of the MBP-1 mimics group was up-regulated ($P<0.05$), the proliferation ability of esophageal cancer cells was decreased, increased the proportion of apoptosis, decreased the proportion of G_0/G_1 phase cells, inhibited the number of invasive cells was decreased and the expressions of C-myc, Cyclin D1 and Cyclin E proteins. After silencing MBP-1, the expression of MBP-1 in esophageal cancer cells Ec109 in the siRNA-MBP-1 group was down-regulated, the proliferation ability of esophageal cancer cells was increased, the proportion of apoptosis was decreased, the proportion of G_0/G_1 phase cells was increased, the number of invasive cells was increased and the expressions of C-myc, Cyclin D1 and Cyclin E proteins were up-regulated. **Conclusion** MBP-1 is closely correlated with the cell proliferation, cell apoptosis and invasion ability of human esophageal cancer cell line Ec109, and its mechanism might be related to cell cycle abnormality.

[Key words] human esophageal cancer Ec109 cells; MBP-1; biological function; cell cycle

研究表明,食管癌是多种因素、多基因、多步骤相互作用的结果^[1]。癌症-MYC 基因(cancer-MYC, C-myc)作为 myc 家族重要成员,具有癌基因功能,在调控肿瘤细胞增殖、转移、侵袭及凋亡等过程中发挥重要作用^[2]。有研究指出,C-myc 启动子结合蛋白 1(C-myc

promoter binding protein 1, MBP-1)可特异性结合到 C-myc 基因 P2 启动子上而从转录水平上抑制 C-myc 基因表达,从而特异性阻断肿瘤发生及进展过程^[3]。本研究分别上调和特异性沉默人食管癌 Ec109 细胞中 MBP-1 基因,观察其对细胞生物学特性的影响。

作者简介:陈家骅(1979—),主治医师,硕士,主要从事食管疾病、肺疾病、先天性心脏病、冠心病方面研究。 [△] **通信作者,** E-mail: 3111850050@qq.com。

1 材料与方 法

1.1 材料 人食管癌 Ec109 细胞株购自通派生物公司, RPMI-1640 培养基、胎牛血清、二甲基亚砷(DMSO)、胰酶购自美国 Gibco 公司, Trizol 总 RNA 提取试剂盒、脂质体 Lipofection™ 2000 转染试剂盒购自美国 Invitrogen 公司, 逆转录试剂盒和 PCR 试剂盒购自大连 TaKaRa 公司, MBP-1 引物、内参引物、干扰序列、模拟序列、阴性对照序列由上海生工生物公司设计合成, 四甲基偶氮唑蓝(MTT)液购自北京碧云天公司, 细胞周期和凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物公司, 兔抗人 MBP-1、C-myc、细胞周期素(Cyclin)D1 多克隆抗体均购自美国 Abcam 公司, 兔抗人 Cyclin E 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 化学发光液购自长沙艾佳生物公司, 实时定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司, Transwell 小室、流式细胞仪均购自美国 BD 公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养及分组 将 Ec109 细胞株置于含胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 37 °C、5%CO₂ 恒温培养箱中培养。胰酶消化后传代。取对数生长期细胞, 利用脂质体 Lipofection™ 2000 转染试剂盒转染, 将细胞分为 4 组。(1)MBP-1 模拟物组: 转染 MBP-1 模拟序列为正义链 5'-TGGATGTGGAATGTGTGCGA-3', 反义链 5'-TTTGTACACCCTAAGCCTCC-3'; (2)siRNA-MBP-1 组: 转染 siRNA-MBP-1 序列为正义链 5'-GAAGTATGACCTGGACTTC-3', 反义链 5'-GGAGACTGAAGATACCTTC-3'; (3)阴性对照组: 转染空白质粒; (4)空白对照组: 不做任何处理。各组转染后培养 48 h, 完成后续实验。

1.2.2 实时定量 PCR 检测各组细胞中 MBP-1 表达 取各组转染培养 48 h 细胞, 加入细胞裂解液, 提取总 RNA, 用紫外分光光度计检测纯度, 以 $A_{260}/A_{280} \geq 1.80$ 为合格。将总 RNA 逆转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR。引物序列如下, MBP-1: 上游 5'-AAGTAAGCTGTGGGCAG-3', 下游 5'-AGTATTCTCATGGGTCAC-3'; GAPDH: 上游 5'-AAATCCATCACCATCTTCC-3', 下游 5'-TCACACCCATGACGAACA-3'。反应条件: 92 °C 1 min, 92 °C 45 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s, 连续循环 40 次, 每个样品均设置 3 个平行反应复孔。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法获得各组细胞中 MBP-1 相对表达量^[4]。

1.2.3 MTT 法检测不同转染组细胞增殖情况 取各组对数生长期细胞, 接种于 96 孔板, 调整浓度为 1×10^4 /孔, 分别于培养 24、48、72、96 h 时, 加入 MTT 液, 培养 3 h, 取出培养板, 去除培养液, 加入二甲基亚砷(DMSO), 室温下振荡摇匀 10 min。酶标仪检测 450 nm 处各孔吸光度(A)值, 每孔检测 3 次, 取均值^[5]。

1.2.4 流式细胞仪检测各转染组细胞凋亡情况 取

各组培养 48 h 细胞, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次, 调整细胞密度为 1×10^6 /mL, 取 1 mL, 1 000 r/min 离心 6 min, 取细胞, 用预冷 PBS 液重悬, 再次离心, 取细胞重悬于 100 μ L 缓冲液中, 加入 Annexin V 和碘化丙啶(PI)各 5 μ L, 摇匀, 室温下避光放置 10 min, 加入缓冲液 400 μ L, 1 h 内上机检测^[6]。

1.2.5 流式细胞仪检测各转染组细胞周期情况 取各组培养 48 h 细胞, PBS 洗涤 3 次, 各样品细胞总数为 2×10^6 , 于 1 000 r/min 进行离心 6 min, 预冷 PBS 洗涤, 加入预冷的 70%乙醇 1 mL, 摇匀, 4 °C 过夜固定。1 200 r/min 离心 5 min, 取细胞沉淀, 加入预冷 PBS, RNaseA 40 μ L, 避光温育 25 min, 加入 PI 200 μ L, 避光染色 15 min, 60 min 内上机检测^[7]。

1.2.6 Transwell 检测细胞侵袭能力 取各组培养 48 h 细胞, 胰酶消化, 取细胞 1×10^5 , 置于 Transwell 小室上室, 将含 10%胎牛血清 RPMI-1640 培养基置于下室, 于 37 °C、5%CO₂ 恒温培养箱中培养 12 h, 取出小室, 多聚甲醛固定, 吉姆萨(Giemsa)染色, 于显微镜下观察穿孔细胞数, 并拍照计数, 重复检测 3 次。

1.2.7 Western blot 法检测 各组细胞中 MBP-1、C-myc、Cyclin D1 和 Cyclin E 蛋白表达取各组培养 48 h 细胞, 加入细胞裂解液, 提取总蛋白, 用聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白浓度检测试剂盒对检测总蛋白纯度, 金属浴 100 °C 变性 10 min。取 25 μ g 蛋白, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳, 电转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上, 用 5%脱脂奶粉封闭 120 min, TBST 冲洗 3 次, 分别将一抗 MBP-1、C-myc、Cyclin D1、Cyclin E 抗体加入(稀释比例 1:200、1:800、1:500 和 1:800), 4 °C 过夜孵育, 加入二抗, 室温孵育 1 h, TBST 冲洗 3 次, 加入 ECL 发光液, 显影, 利用 Quantity-One 图像分析软件分析, 获得各组细胞中蛋白相对表达量^[8]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计分析软件对数据进行分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-t 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

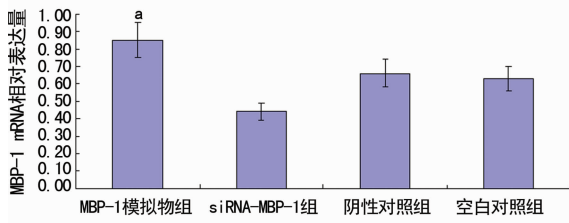
2 结 果

2.1 各组细胞中 MBP-1 基因表达比较 siRNA-MBP-1 组、MBP-1 模拟物组、阴性对照组及空白对照组细胞中 MBP-1 mRNA 相对表达量分别为 0.44 ± 0.05 、 0.85 ± 0.10 、 0.66 ± 0.08 和 0.63 ± 0.07 , siRNA-MBP-1 组细胞中 MBP-1 基因表达被抑制, 而 MBP-1 模拟物组则表达增加($P < 0.05$), 见图 1。

2.2 各组细胞增殖情况比较 与空白对照组及阴性对照组相比, MBP-1 模拟物组细胞 48、72、96 h 时 A 值均降低, 而 siRNA-MBP-1 组 A 值均升高($P < 0.05$), 见图 2。

2.3 各组细胞凋亡率比较 siRNA-MBP-1 组、MBP-1 模拟物组、阴性对照组、空白对照组细胞凋亡

率分别为(14.7±3.3)、(39.5±6.2)、(25.6±5.1)、(24.5±4.9)%, 相比于空白对照组及阴性对照组, siRNA-MBP-1 组细胞凋亡率降低, MBP-1 模拟物组则升高($P<0.05$), 见图 3。



a: $P<0.05$, 与 siRNA-MBP-1 组比较

图 1 各组细胞中 MBP-1 基因表达比较

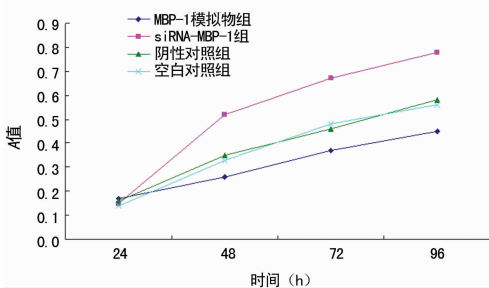
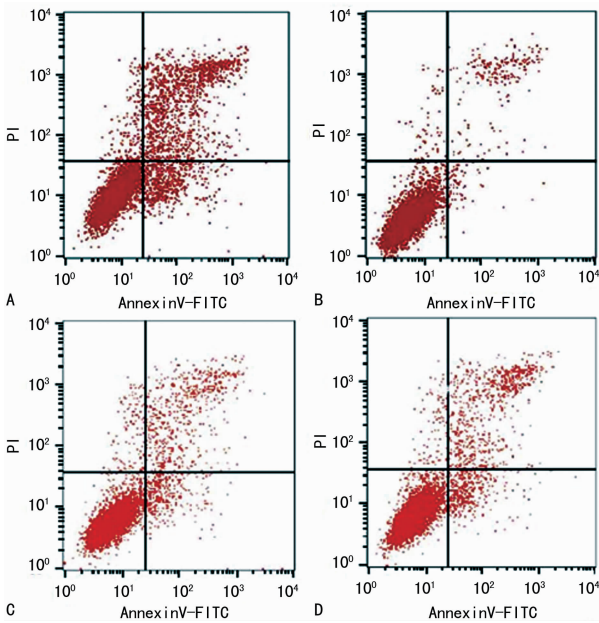


图 2 各组细胞增殖情况



A: MBP-1 模拟物组; B: siRNA-MBP-1 组; C: 阴性对照组; D: 空白对照组

图 3 各组细胞凋亡情况

2.4 各组细胞周期比较 与空白对照组及阴性对照组相比, MBP-1 模拟物组细胞 G_0/G_1 期比例均降低, 而 S 期和 G_2/M 期细胞比例均增加; siRNA-MBP-1 组细胞 G_0/G_1 期比例均升高, 而 S 期和 G_2/M 期细胞比例均降低($P<0.05$), 见表 1。

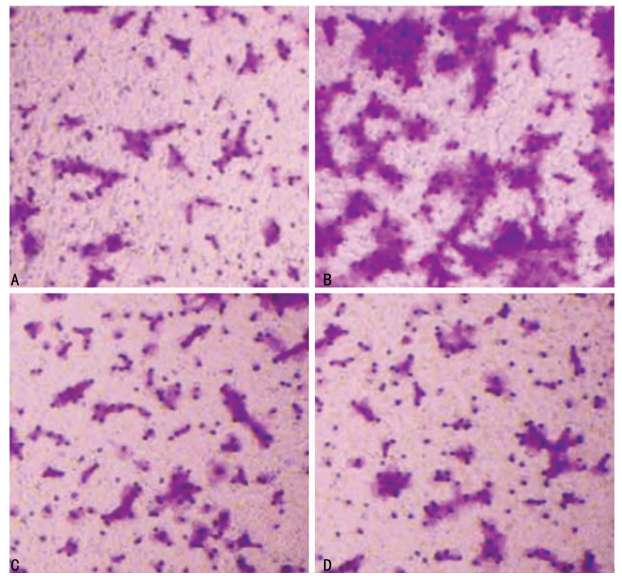
2.5 各组细胞侵袭能力比较 siRNA-MBP-1 组、MBP-1 模拟物组、阴性对照组和空白对照组侵袭细胞数分别为(144.3±10.1)、(64.0±8.1)、(86.5±7.6)、(88.2±8.4)个。与空白对照组及阴性对照组

相比, siRNA-MBP-1 组侵袭细胞数增加, 而 MBP-1 模拟物组则减少($P<0.05$), 见图 4。

表 1 不同转染组细胞周期情况比较($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
MBP-1 模拟物组	26.8±3.5 ^{ab}	42.3±2.6 ^{ab}	30.9±3.3 ^{ab}
siRNA-MBP-1 组	64.2±2.1 ^{ab}	21.3±1.8 ^{ab}	14.5±1.9 ^{ab}
阴性对照组	43.8±2.5	34.5±3.1	21.7±2.7
空白对照组	45.3±2.9	36.7±3.3	18.0±2.3
F	19.672	25.381	17.262
P	<0.01	<0.01	<0.01

^a: $P<0.05$, 与阴性对照组比较; ^b: $P<0.05$, 与空白对照组比较



A: MBP-1 模拟物组; B: siRNA-MBP-1 组; C: 阴性对照组; D: 空白对照组

图 4 各组细胞侵袭能力(Giemsa 染色, ×200)

2.6 各组细胞中 MBP-1、Cyclin D1 和 Cyclin E 蛋白表达比较 与空白对照组及阴性对照组相比, MBP-1 模拟物组细胞中 MBP-1 蛋白相对表达量升高, 而 siRNA-MBP-1 组降低; MBP-1 模拟物组细胞中 C-myc、Cyclin D1 和 Cyclin E 蛋白相对表达量降低, 而 siRNA-MBP-1 组均升高, 比较差异均有统计学意义($P<0.05$), 见表 2、图 5。

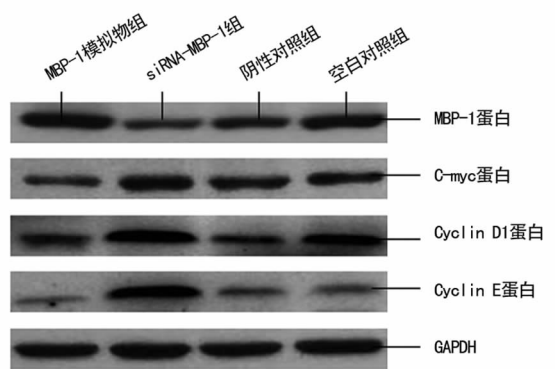


图 5 各组细胞中 MBP-1、C-myc、Cyclin D1 和 Cyclin E 蛋白表达

表 2 各组细胞中 MBP-1、Cyclin D1 和 Cyclin E 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	MBP-1 蛋白	C-myc 蛋白	Cyclin D1 蛋白	Cyclin E 蛋白
MBP-1 模拟物组	1.05 ± 0.17 ^{ab}	0.41 ± 0.11 ^{ab}	0.32 ± 0.06 ^{ab}	0.29 ± 0.05 ^{ab}
siRNA-MBP-1 组	0.57 ± 0.13 ^{ab}	0.87 ± 0.13 ^{ab}	0.79 ± 0.08 ^{ab}	0.75 ± 0.10 ^{ab}
阴性对照组	0.73 ± 0.11	0.60 ± 0.12	0.49 ± 0.06	0.44 ± 0.09
空白对照组	0.75 ± 0.14	0.59 ± 0.10	0.51 ± 0.07	0.43 ± 0.08
F	49.683	40.829	51.472	47.926
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

^a: $P < 0.05$, 与阴性对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与空白对照组比较

3 讨 论

细胞周期紊乱、细胞侵袭能力增强是导致食管癌转移的重要因素^[9]。研究表明,癌基因 C-myc 过表达可加速细胞增殖,且可引起细胞 DNA 损伤及中心体数量异常而导致染色体破坏^[10]。C-myc 在多种恶性肿瘤细胞中呈过表达^[11],在肿瘤恶性增殖、侵袭、转移中发挥重要作用^[12]。MBP-1 作为特异性 C-myc 抑制基因,可在转录水平上抑制其表达,从而在肿瘤发生、进展过程中发挥类似于抑癌基因的功能^[13]。

本研究结果显示,MBP-1 模拟物组细胞中 MBP-1 基因和蛋白表达量均上调,而 siRNA-MBP-1 组细胞中 MBP-1 基因和蛋白表达量均抑制,说明采用转染模拟物和抑制物的方式可成功地将人食管癌 Ec109 细胞中 MBP-1 基因上调或抑制。MTT 结果显示,上调 MBP-1 基因可抑制细胞增殖,而抑制 MBP-1 基因则可促进细胞增殖,提示 MBP-1 基因与细胞增殖密切相关,是调控细胞增殖过程的重要基因。本研究结果显示,MBP-1 模拟物组细胞凋亡率显著增加,且 G₀/G₁ 期细胞比例降低,S 期和 G₂/M 期细胞比例升高,而 siRNA-MBP-1 组细胞凋亡率则降低,且 G₀/G₁ 期细胞比例升高,S 期和 G₂/M 期细胞比例降低,说明 MBP-1 基因可通过影响细胞周期,而参与细胞凋亡的发生。同时,Western blot 结果显示,MBP-1 模拟物组细胞中 C-myc 蛋白表达被抑制,而 siRNA-MBP-1 组则表达上调,说明 MBP-1 作为 C-myc 基因的抑制基因,可能通过抑制 C-myc 表达而达到减少细胞增殖、促进细胞凋亡的作用。本研究结果说明 MBP-1 基因与 Ec109 细胞侵袭能力密切相关。

研究显示,Cyclin D1 和 Cyclin E 作为重要的细胞周期蛋白激酶复合物,在调控细胞周期进程中发挥重要作用^[14]。本研究显示,MBP-1 模拟物组细胞中 C-myc、Cyclin D1 和 Cyclin E 蛋白相对表达量均降低,而 siRNA-MBP-1 组均升高,说明 MBP-1 基因可通过促进或抑制细胞中 Cyclin D1 和 Cyclin E 蛋白表达,从而在调控细胞周期及细胞增殖、凋亡中发挥作用。

综上所述,MBP-1 与人食管癌细胞株 Ec109 细胞增殖、凋亡、侵袭能力密切相关,其机制可能与细胞周期异常有关。

参考文献

[1] ALSOP B R, SHARMA P. Esophageal Cancer[J]. Gas-

troenterol Clin North Am, 2016, 45(3):399-412.

- [2] TANAKA S, NAGATA N, MINE S, et al. Endoscopic appearance of AIDS-related gastrointestinal lymphoma with C-myc rearrangements: case report and literature review[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(29):4827-4831.
- [3] TROJANOWICZ B, WINKLER A, HAMMJE K, et al. Retinoic acid-mediated down-regulation of ENO1/MBP-1 gene products caused decreased invasiveness of the follicular thyroid carcinoma cell lines[J]. J Mol Endocrinol, 2009, 42(3):249-260.
- [4] 宋佳伦, 杨琦. 转录因子扭曲基因表达异常在早期子宫颈癌发病中的意义及对预后的影响[J]. 中国妇幼健康研究, 2016, 27(9):1066-1068.
- [5] 林博川. 兔骨折合并脑外伤模型血清对鼠骨折愈合影响的实验研究[D]. 广州: 广州医学院, 2011.
- [6] 许静. miR-21 对人宫颈鳞癌的体内外分子调控机制初探[D]. 广州: 暨南大学, 2011.
- [7] 范才文, 向秋, 田晶, 等. Stathmin 沉默抑制鼻咽癌 5-8F 细胞的恶性表型[J]. 天津医药, 2013, 41(5):462-464.
- [8] 袁金, 康佳丽, 廖花, 等. 靶向融合肽 TAT-OSBP-MKK6 (E) 对卵巢癌裸鼠移植瘤的抑制作用[J]. 肿瘤, 2015, 35(2):161-167.
- [9] XU X, XIONG X, SUN Y. The role of ribosomal proteins in the regulation of cell proliferation, tumorigenesis, and genomic integrity[J]. Sci China Life Sci, 2016, 59(7):656-672.
- [10] SUN X X, SEARS R C, DAI M S. Deubiquitinating C-myc: USP36 steps up in the nucleolus[J]. Cell Cycle, 2015, 14(24):3786-3793.
- [11] CHAE H, RYU H, CHA K, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of renal impairment in patients with multiple myeloma[J]. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2015, 15(1):35-40.
- [12] 时汀, 张建淮. IWR-1 对人肝癌细胞株 Hep3B 的增殖及 Wnt/ β -catenin 信号通路的抑制作用[J]. 肿瘤防治研究, 2016, 43(3):207-210.
- [13] ZEMPLIENI J, LIU D, CAMARA D T, et al. Novel roles of holocarboxylase synthetase in gene regulation and intermediary metabolism[J]. Nutr Rev, 2014, 72(6):369-376.
- [14] WU M, WU Y, LAN T, et al. Type II cGMP-dependent protein kinase inhibits EGF-induced JAK/STAT signaling in gastric cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(2):1849-1856.

(收稿日期:2017-09-19 修回日期:2017-12-17)