

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.06.007

DAPK 在人食管鳞癌组织及食管癌 EC9706 细胞中的表达及其对食管鳞癌转移侵袭的影响*

贾敬周¹, 孙继伟¹, 袁五营¹, 侯智亮¹, 王文波¹, 赵正国²

(1. 河南省胸科医院微创外科, 郑州 450000; 2. 河南省郑州市第七人民医院普外科 450002)

[摘要] **目的** 探讨死亡相关蛋白激酶 1(DAPK)在人食管鳞癌组织及 EC9706 细胞中的表达及其对食管鳞癌转移侵袭的作用。**方法** 采用免疫组织化学法检测人食管鳞癌组织及癌旁正常组织中 DAPK 的表达。培养人食管癌 EC9706 细胞,分别用 pReceiver-M29-DAPK 质粒和 pReceiver-M29 转染细胞,以未转染的细胞作为对照组,各组细胞培养 48 h。应用蛋白印迹法(Western blot)检测各组细胞中 DAPK 蛋白表达的变化,划痕修复实验检测细胞迁移能力,Transwell 小室侵袭实验检测细胞侵袭能力。**结果** 人食管鳞癌组织 DAPK 的阳性率及 DAPK 的阳性区域面积明显高于癌旁正常组织($P < 0.05$)。在未转染的 EC9706 细胞中和空载脂质体转染的 EC9706 细胞中未见明显 DAPK 蛋白表达,DAPK 蛋白在转染后的 EC9706 细胞中高表达($P < 0.05$)。与未转染的 EC9706 细胞比较,pReceiverM29-DAPK 转染的 EC9706 细胞迁移率及细胞侵袭数目明显升高($P < 0.01$),未转染的 EC9706 细胞与空载脂质体转染的 EC9706 细胞迁移率及细胞侵袭数目差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** DAPK 在人食管鳞癌组织中高表达,DAPK 高表达后促进了 EC9706 细胞转移和侵袭。

[关键词] 关蛋白激酶 1;食管肿瘤;癌,鳞状细胞;EC9706 细胞;肿瘤转移;肿瘤浸润

[中图分类号] R735.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)06-0925-04

Expression of DAPK in human esophageal squamous carcinoma tissue and EC9706 cells and its effect on metastasis and invasion of esophageal squamous carcinoma*

JIA Jingzhou¹, SUN Jiwei¹, YUAN Wuying¹, HOU Zhiliang¹, WANG Wenbo¹, ZHAO Zhengguo²

(1. Department of Minimally Invasive Surgery, Henan Provincial Thoracic Hospital, Zhengzhou, Henan 450000, China; 2. Department of General Surgery, Zhengzhou Municipal Seventh People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450002, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of death-associated protein kinase (DAPK) in human esophageal squamous carcinoma tissue and EC9706 cells and its role on the metastasis and invasion of esophageal squamous carcinoma. **Methods** The immunohistochemistry was used to detect the expression of DAPK in human esophageal squamous carcinoma tissue and paracancerous normal tissues. Human esophageal carcinoma EC9706 cells were cultured and transfected with pReceiver-M29-DAPK plasmid and negative control (pReceiver-M29) respectively. The untransfected cells were used as the control group, and the cells in each group were cultured for 48 h. Western blot was used to detect the changes of DAPK protein expression in the cells of each group. The scratch repair test was used to detect the migration ability of EC9706 cells. The Transwell chamber invasion was used to detect the invasion ability of EC9706 cells. **Results** The positive rate of DAPK and the area of DAPK positive region in human esophageal squamous carcinoma tissue were significantly higher than those in paracancerous normal tissues ($P < 0.05$). In untransfected EC9706 cells and in EC9706 cells transfected with empty liposomes, no significant DAPK expression was observed, and DAPK protein showed significantly high expression in EC9706 cells after transfection ($P < 0.05$). Compared with non-transfected EC9706 cells, EC9706 cells transfected with pReceiverM29-DAPK significantly increased the migration rate of EC9706 cells and the number of cell invasion ($P < 0.01$), and the cellular migration rate and cellular invasive number had no statistically significant difference between non-transfected EC9706 cells and EC9706 cells transfected with empty liposomes ($P > 0.05$). **Conclusion** DAPK is highly expressed in human esophageal

* 基金项目:河南省科技发展计划项目(162102310219)。 作者简介:贾敬周(1977—),副主任医师,本科,主要从事心胸外科及消化道疑难病症研究。

squamous carcinoma, and the high expression of DAPK promotes the migration and invasion of EC9706 cells.

[Key words] DAPK; esophageal neoplasms; carcinoma, squamous cell; EC9706 cells; neoplasm metastasis; neoplasm invasiveness

食管鳞癌是我国居民消化系统最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和病死率仅次于肝癌、胃癌、肺癌,以侵袭性强、致死性高为临床特点,对居民健康造成严重危害^[1]。虽然近年来食管癌的诊治技术有了明显提高,但依然存在生存率低、预后差等特点,因此深入研究食管鳞癌的具体转移、迁移机制尤为重要^[2]。

死亡相关蛋白激酶 1(DAPK)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,广泛参与机体多种病理生理过程,并在多种癌组织中异常表达,研究发现 DAPK 在非小细胞肺癌肺组织中的阳性表达率为 34.7%,明显低于癌旁正常肺组织的 82.6%^[3]。近年来不断有研究发现 DAPK 在一系列癌细胞迁移中具有重要调节作用,可促进细胞凋亡,并已被证实在多种实体瘤及其细胞系中 DAPK 的表达缺失与肿瘤侵袭有关^[4],但未见 DAPK 在人食管鳞癌组织及食管癌 EC9706 细胞中表达的相关报道。因此,本研究通过人食管鳞癌组织样本及人食管癌 EC9706 细胞检测 DAPK 的表达,探讨其与食管癌的关系,进一步研究 DAPK 过表达对食管鳞癌细胞转移侵袭的作用,旨在为食管癌的临床治疗及预后提供新的思路和寻找新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本与细胞 人食管鳞癌组织及癌旁正常组织(距癌变组织 3 cm 以上并经组织病理学诊断无癌变)标本各 20 例,均为河南省胸科医院微创外科及胸外科 2016 年 5 月至 2017 年 6 月的手术病理切除冻存标本,其组织学类型均为食管鳞癌。其中男 12 例,女 8 例,年龄 45~72 岁,平均(55.26±10.28)岁,患者术前均未行放疗及化疗。人食管癌细胞株 EC9706 细胞由中国医科大学细胞生物研究中心提供。

1.1.2 仪器与试剂 10%胎牛血清、胰蛋白酶、青链霉素、IMDM 培养液均购自美国 Gibco 公司;Transwell 小室购自美国 Corning 公司;鼠抗人 DAPK 单克隆抗体、鼠抗人 β -actin 单克隆抗体及兔抗小鼠二抗购自美国 Sigma Aldrich 公司;脂质体 LipofectamineTM2000 购自美国 Invitrogen 公司,pReceiver-M29-DAPK 质粒和 pReceiver-M29 质粒购自广州复能生物技术有限公司;BCA 蛋白分析试剂盒购自美国 Pierce 公司;RT-PCR 试剂盒和逆转录试剂盒均购自日本 Takara 公司;倒置荧光显微镜购自日本 Nikon 公司;MK3 型酶标仪和 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公

司;HER Acell 型 CO₂ 细胞培养箱购自美国 Sim 公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学法检测人食管鳞癌组织及癌旁正常组织中 DAPK 的表达 所有组织标本均由病理科经 10%福尔马林固定,石蜡包埋后保存。每组随机选取 10 个标本,每个标本取 3 张切片,按照免疫组织化学 S-P 法染色^[5],采用柠檬酸盐缓冲液(0.01 mol/L)高温高压抗原修复,常规透膜,5% BSA 室温封闭 1 h,滴加 DAPK 鼠抗人多克隆抗体(1:250)4℃过夜,生物素标记的二抗(1:1 000)37℃孵育 1 h,DAB 显色,自来水冲洗终止,苏木精复染后脱水、封片。每张切片随机选取 3 个视野,用光学显微镜测定观察区域阳性细胞数,并分级计算阳性率。阳性标准:细胞质或细胞核出现棕褐色颗粒。分级标准:阴性(-),阳性细胞少于 10%;弱阳性(+),阳性细胞 11%~50%;强阳性(++),阳性细胞超过 50%。阳性率=(弱阳性数+强阳性数)/总数×100%。

1.2.2 细胞培养 将 EC9706 细胞复苏后转移至 IMDM 培养基中,置于 37℃、5%CO₂ 环境中培养并进行传代,取 2~3 次传代后的细胞用于实验。将处于对数生长期的细胞转移至 6 孔板中,密度为 8×10^5 个/孔,保证转染时细胞密度为 80%~90%。

1.2.3 细胞转染及转染复合物的制备 将培养好的 EC9706 细胞接种于 6 孔板内,每孔 1 500 μ L 细胞悬液;取 250 μ L Opti-MEMI 无血清培养基用于稀释 4.0 μ g pReceiver-M29-DAPK 质粒(转染组);另取 250 μ L Opti-MEMI 无血清培养基用于稀释 10 μ L 的 LipofectamineTM2000;将以上两种稀释的液体混匀并于室温放置 20 min,取 500 μ L 依次加入培养好的 EC9706 细胞内。置于 37℃培养箱中继续培养 48 h 后收集细胞用于后续实验。空载脂质体 pReceiver-M29(空白转染组)转染条件同转染组,并以未转染的 EC9706 细胞为对照组。

1.2.4 Western blot 检测 DAPK 蛋白的表达 提取上述各组转染前后的 EC9706 细胞总蛋白,变性后每孔 50 μ g 进行 SDS-PAGE 电泳,然后电转移至 PVDF 膜上,用含有 5%脱脂牛奶的 0.1%TBS-T 室温封闭 2 h,加一抗 4℃孵育过夜,TBS-T 洗膜 10 min×5 次,加 HRP 连接的兔抗鼠 IgG 4℃振荡孵育 1 h,TBS-T 洗膜 10 min×5 次,用新鲜配制的 DAB 显色液显色,成像^[6]。

1.2.5 划痕修复实验检测 EC9706 细胞迁移能力

取 100 μ L 上述培养好的 EC9706 细胞接种于 6 孔板中,待各组细胞单层生长铺满板底时,用移液枪头沿培养板底部划“—”字型划痕。各组 EC9706 细胞于 37 $^{\circ}$ C、饱和湿度及 5% CO_2 环境下培养 24 h。光学显微镜下观察各组 EC9706 细胞向致伤区迁移的相对距离并拍照,随后计算 EC9706 细胞迁移率^[7],细胞迁移率=转染组细胞迁移面积/空白组细胞迁移面积 \times 100%。

1.2.6 Transwell 小室侵袭实验检测 EC9706 细胞侵袭能力 Transwell 小室使用前铺上 10 μ L 的 0.5% Matrigel 膜基质并于 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜。分别取 200 μ L 上述培养好的 EC9706 细胞悬液接种于 Transwell 小室上室,并在 Transwell 小室下室加入 600 μ L 含有 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液。随后各组 EC9706 细胞于 37 $^{\circ}$ C、饱和湿度及 5% CO_2 环境下孵育培养 24 h 后取出 Transwell 小室,擦去上室内细胞,用 0.1% 结晶紫染色,转用 33% 醋酸溶液洗脱,在 Leica DC300F 显微镜下随机选取 3 个视野观察并拍照,计算细胞计数^[8]。同样的步骤重复 3 次并取其均值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间采用单因素方差分析,两组间采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 人食管鳞癌组织及癌旁组织中 DAPK 的表达

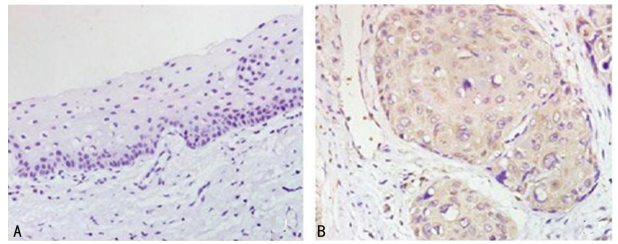
人食管鳞癌组织 DAPK 的阳性率为 90.0%,明显高于癌旁正常组织的 13.3% ($P < 0.05$),见表 1;在人食管鳞癌组织中 DAPK 的阳性区域面积明显高于癌旁正常组织 ($P < 0.05$),见图 1。

表 1 DAPK 在人食管鳞癌组织及癌旁正常组织中的表达

组织	n	DAPK		阳性率(%)
		-(n)	+~++(n)	
食管鳞癌组织	30	3	27	90.0
癌旁正常组织	30	26	4	13.3

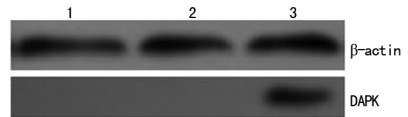
2.2 DAPK 在 EC9706 细胞中的表达 蛋白印迹法(Western blot)显示,在对照组和空白转染组中未见明显 DAPK 蛋白表达,DAPK 蛋白在转染 pReceiver-M29-DAPK 的 EC9706 细胞中高表达,见图 2。

2.3 DAPK 对 EC9706 细胞迁移能力的影响 与对照组细胞迁移率(36.42 \pm 8.52)%比较,转染组细胞迁移率(83.26 \pm 8.42)%明显升高($P < 0.01$),空白转染组细胞迁移率(43.45 \pm 11.56)%无明显变化($P > 0.05$),见图 3。



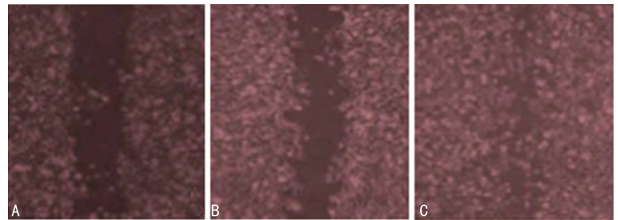
A:癌旁正常组织;B:食管鳞癌组织

图 1 DAPK 在人食管鳞癌组织及癌旁正常组织中的表达($\times 400$)



1:对照组;2:空白转染组;3:转染组

图 2 转染前后 EC9706 细胞 DAPK 蛋白的表达



A:对照组;B:空白转染组;C:转染组

图 3 DAPK 对 EC9706 细胞划痕修复的影响($\times 100$)

2.4 DAPK 对 EC9706 细胞侵袭能力的影响 与对照组侵袭细胞数(50.2 \pm 4.3)个比较,转染组侵袭细胞数(162.6 \pm 4.8)个明显升高($P < 0.01$),空白转染组侵袭细胞数(46.45 \pm 7.5)个无明显变化($P > 0.05$),见图 4。



A:对照组;B:空白转染组;C:转染组

图 4 DAPK 对 EC9706 细胞体外侵袭的影响($\times 100$)

3 讨 论

食管癌是世界上第八大常见癌症,也是导致因癌症死亡的第六大诱因,近年来估计每年有 456 000 例新发病例和 400 000 例死亡病例^[9]。根据中国最新的癌症统计数据,食管癌的病死率在男性中位居第三,女性中位居第五,呈逐年升高趋势。食管癌可分为食管鳞癌和食管腺癌,它们是组织病理学、流行病学和分子学完全不同的两种亚型^[10]。食管鳞癌占全球食管癌病例的 90%左右,而食管鳞癌患者的 5 年生存率尽管在过去 10 年有所改善,但仍然普遍较差。许多患者在诊断时表现出淋巴结转移和肿瘤侵袭邻近器官,缺乏有效的化疗方法用于治疗食管鳞癌患者^[11]。因此,对食管癌致病机制需要进一步研究探讨,以便

为患者寻求更佳的治疗手段。

DAPK 是一类丝氨酸/苏氨酸激酶,广泛参与调节多种细胞生命过程,如凋亡、自噬、细胞迁移等。DAPK 在 Ser308 上磷酸化从而抑制了其在位点的催化活性和去磷酸化,这也是 DAPK 被活化的重要标志。DAPK 及其相关信号通路广泛参与多种疾病,如癌症、中风、炎症和动脉粥样硬化等^[12]。

DAPK 的功能在多种疾病中均受不同程度的影响。与 p53 等基因不同,DAPK 在癌症中的功能障碍通常是由于表达丧失而不是突变。DAPK 表达缺失主要是由 DAPK 基因 50UTR 处的高甲基化引起的,尽管频率不高也可能是纯合缺失的结果^[13]。在 30 多种癌症中发现了 DAPK 基因甲基化,非小细胞肺癌的原发组织及细胞系中 DAPK 蛋白仍然可以在高甲基化存在下表达。在其他如肾细胞癌和慢性淋巴细胞白血病中这种甲基化状态也与蛋白质表达的错误相关,这表明 DAPK 的翻译后调节在某些癌症类型中尤为重要^[14]。

1995 年首次发现 DAPK 是干扰素- γ (IFN- γ)诱导人宫颈癌细胞凋亡的介质^[15]。后来研究表明,DAPK^{-/-}小鼠的胚胎成纤维细胞(MEF)由于 p19ARF-p53 途径无法被激活而显示出无法对癌基因如 c-myc 和 E2F 的过度表达的凋亡响应;同时在 Lewis 肺癌细胞中,高度分化转移的细胞增加了 DAPK 的表达,并且在这些细胞减少了 DAPK 的表达后便抑制了它们在小鼠肺部转移迁移的能力^[16]。以上研究结果均表明 DAPK 对于抑制早期癌症发展中的细胞转化和晚期癌症转移是非常重要的。本研究证明,人食管鳞癌组织 DAPK 的阳性率及阳性区域面积明显高于癌旁正常组织,同时在转染后的 EC9706 细胞中同样高表达,并且转染后的 EC9706 细胞细胞迁移率及细胞侵袭数目明显升高,这与上述文献研究结果一致并表明在食管鳞癌组织中 DAPK 亦呈现高表达。

综上所述,本实验证实了人食管鳞癌组织中 DAPK 的高表达,DAPK 能促进食管鳞癌细胞的转移和侵袭。这表明 DAPK 同样参与食管癌组织的病理生理过程,同时调节 DAPK 的异常表达将可能为食管癌的临床治疗及预后提供新的思路和寻找新的靶点。

参考文献

[1] 白剑,杜振宗,宋剑非. DNA 甲基化与食管癌的研究进展[J]. 重庆医学,2016,45(24):3436-3438.
[2] MORISHITA A, MASAKI T. Targeting receptor tyrosine kinases in gastric cancer[J]. World J Gastroenterol,

2014,17(16):4536-4545.

- [3] LIN D C, HAO J J, NAGATA Y, et al. Genomic and molecular characterization of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Nat Genet, 2014, 46(5):467-473.
[4] WINNIE W K. Brassiere wearing and breast cancer risk: A systematic review and meta-analysis[J]. PLoS One, 2015, 11(4):193-205.
[5] 赵勇. HLA-G 在人食管鳞癌中的表达及意义[D]. 西安:第四军医大学,2009.
[6] 赵卫华,孟凡义,赖永榕,等. DAPK 过表达对 HL-60 细胞生物学功能及 caspase-3 表达的影响[J]. 南方医科大学学报,2016,51(5):729-732.
[7] 孙艳,张华,封青川,等. Spink8 基因对 EC9706 细胞增殖、凋亡及迁移能力的影响[J]. 郑州大学学报(医学版),2016,59(5):568-571.
[8] CHEN G Z, ZHU H C, DAI W S, et al. The mechanisms of radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma and current strategies in radiosensitivity[J]. J Thorac Dis, 2017, 9(3):849-859.
[9] KANG X, CHEN K, LI Y, et al. Personalized targeted therapy for esophageal squamous cell carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2015, 19(25):7648-7658.
[10] GAYRAL M, JO S, HANOUN N, et al. MicroRNAs as emerging biomarkers and therapeutic targets for pancreatic cancer[J]. World J Gastroenterol, 2014, 19(32):11199-11209.
[11] WANG B G, YI D H, LIU Y F, et al. TLR3 gene polymorphisms in cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. Chin J Cancer, 2015, 95(6):272-284.
[12] GAO H X, GAO X F, WANG G Q, et al. In vitro study of nucleostemin gene as a potential therapeutic target for human lung carcinoma[J]. Biomed Environ Sci, 2012, 19(1):91-97.
[13] SHILOH R, BIALIK S, KIMCHI A. The DAPK family: a structure-function analysis[J]. Apoptosis, 2014, 19(2):286-297.
[14] LIU X F, KONG F M, XU Z, et al. New insights into the functions and localization of the homeotic gene CDX2 in gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2014, 19(14):3960-3966.
[15] LIN Y, HUPP T R, STEVENS C. Promoter hypermethylation of death-associated protein kinase gene in cholangiocarcinoma[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2007, 277(4):407-411.
[16] CHEN Y S, QIU X B. Transcription-Coupled replacement of histones: degradation or recycling? [J]. J Genet Genomics, 2012, 19(11):575-580.