

消化系统肿瘤

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.000390

过表达 *Beclin 1* 对食管癌 Eca109 细胞生物学行为的影响洪斌¹, 吴庆琛², 张诚², 李强², 陈丹², 张敏²

(1 重庆医科大学附属永川医院胸心外科, 重庆 402160; 2 重庆医科大学附属第一医院胸心外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨自噬基因 *Beclin 1* 对食管癌细胞 Eca109 生物学行为的影响。**方法:**运用 *Beclin 1* 过表达质粒 pIRES2-ZsGreen1-h *Beclin 1* 转染食管癌 Eca109 细胞株, RT-PCR 和 Western blot 检测 *Beclin 1* 的 mRNA 和蛋白的表达; 电子显微镜观察转染后自噬体的形成情况; MTT 法检测转染前后各组细胞生长曲线的变化; 血管形成实验检测其对 Eca109 细胞株血管形成能力的影响; Transwell 小室实验检测其对 Eca109 细胞株迁移和侵袭能力影响; 流式细胞技术检测目的基因组和对照组细胞周期的变化。**结果:**pIRES2-ZsGreen1-h*Beclin 1* 质粒成功转染食管癌 Eca109 细胞株。目的基因组 Eca109 细胞较空载体组和未转染组生长明显抑制 ($P=0.000$, $P=0.000$); 目的基因组 Eca109 细胞迁移、侵袭及血管形成能力明显低于对照组 (P 值均 <0.05); *Beclin 1* 稳定表达后, S 期细胞明显减少, 细胞增殖受到抑制。**结论:***Beclin 1* 基因可以作为食管癌生长及转移的一种抑制基因。

【关键词】食管癌; Eca109; *Beclin 1*; 生物学行为**【中图分类号】**R735.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-04-01Effect of *Beclin 1* overexpression on biological behavior of esophageal cancer cell line Eca109Hong Bin¹, Wu Qingchen², Zhang Cheng², Li Qiang², Chen Dan², Zhang Min²

(1. Department of Cardiothoracic Surgery, Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University;

2. Department of Cardiothoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of *Beclin 1* overexpression on the biological behavior of esophageal cancer cell line Eca109. **Methods:** The recombinant eukaryotic expression vector pIRES2-ZsGreen-h *Beclin 1* was transfected into Eca109 cell line. The mRNA and protein expressions of *Beclin 1* were determined by RT-PCR and Western blot. Autophagosome was observed by electron microscopy. Changes in cell growth curve were determined by MTT assay and cell cycle was evaluated by flow cytometry. The effects of *Beclin 1* overexpression on the migration and invasion of esophageal cancer cell line Eca109 were detected by Transwell chamber experiment. Vascular formation experiment in vitro was applied to determine the angiogenesis capability of Eca109. **Results:** The proliferation of Eca109 cells was obviously inhibited in *Beclin 1* group than in empty vector group and control group. The cell invasion, angiogenesis and migration abilities were reduced *Beclin 1* group than in control group (all $P<0.05$). The proportion of cells at S stage was decreased significantly and the cell proliferation was inhibited obviously after steady expression of *Beclin 1*. **Conclusion:** *Beclin 1* may be used as one of suppressor genes for esophageal cancer growth and metastasis.

【Key words】esophageal; Eca109; *Beclin 1*; biological behaviour

食管癌是我国最为高发的恶性肿瘤之一, 2008 年度全世界 67 亿人口新发食管癌 48.2 万例, 发病率为 7.0/10 万, 居全部恶性肿瘤第 9 位; 死亡 40.7 万例, 死亡率 5.8/10 万, 居第 8 位。中国大陆 13.4 亿人

口食管癌新发 25.9 万例, 发病率为 16.7/10 万, 居全国各类恶性肿瘤第 5 位; 死亡 21.1 万例, 死亡率为 13.4/10 万, 居第 4 位^[1-2]。早期易发生浸润转移是食管癌生存率较低和预后不良的主要原因。自噬是一种高度保守的细胞现象, 主要参与细胞内大分子物质的循环再利用和受损细胞器的清除, 是完整细胞器和大分子蛋白降解的主要途径, 在维护细胞内环境稳态方面起重要作用, 与细胞的生长、增殖和肿瘤的发生过程关系密切^[3-4]。近年来自噬基因 *Beclin 1*

作者介绍: 洪斌, Email: 568282438@qq.com,

研究方向: 食管癌的基础与临床。

通信作者: 吴庆琛, Email: wuqc6@hotmail.com。

基金项目: 重庆市卫生局重点课题资助项目 (编号: 20121015); 国家临床重点专科资助项目。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000390.html>

作为抑癌基因而备受关注。本研究通过运用 *Beclin 1* 过表达质粒 pIRES2-ZsGreen1-h *Beclin 1* 转染食管癌 Eca109 细胞株,探讨自噬关键基因 *Beclin 1* 过表达对食管癌 Eca109 细胞株生物学行为的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

食管癌 Eca109 细胞株购自中科院上海生命科学院;脂质体 2000 购自美国 invitrogen 公司。Matrigel 胶、MTT 购自美国 BD 公司,兔抗 *Beclin 1*、B 淋巴细胞瘤基因-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)多克隆抗体购自武汉三鹰公司,兔抗 β -actin、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(二抗)、蛋白提取试剂盒、凝胶配制试剂盒、ECL 显影剂均购自碧云天生物技术有限公司。RNA 提取试剂 Trizol、逆转录试剂盒以及扩增试剂盒均购自日本 Takara 公司。

1.2 Eca109 细胞的质粒转染及鉴定

pIRES2-ZsGreen1-h *Beclin 1* 质粒内含有 NEO 抗性和绿色荧光蛋白基因,由本课题组在前期实验中构建并测序鉴定保存。食管癌 Eca109 细胞株按 4×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,待融合度 90%左右开始转染。转染时以脂质体 6 μ l/孔,质粒 4 μ g/孔的剂量进行,分为目的基因组、空载体组和未转染组。转染完成 5 h 后,更换有血清培养基,24 h 后,以 1:10 的比例将细胞稀释到 6 孔板中,加入 G418 筛选。荧光显微镜下观察待荧光蛋白表达在 80%以上时在透射电子显微镜下观察自噬体的形成情况。

1.3 RT-PCR 检测转染前后各组细胞 *Beclin 1* mRNA 的转录水平

Beclin 1 及 β -actin 引物由深圳百恩微设计合成。*Beclin 1* 上游引物为:5'-TATTGAACTCTCTGCCAGGA-3',下游为:5'-GGCATAACGCATCTGCTTTT-3',扩增片段 565 bp; β -actin 上游引物为:5'-TTTGAGACCTTCAACACCCCA-3',下游为:5'-AAGGCTGGAAGAGTGCCTCA-3',扩增片段 424 bp;*Beclin 1*、 β -actin PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min、94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、57 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min、35 个循环。琼脂糖凝胶电泳,重复 3 次。

1.4 倍增时间和生长曲线

倍增时间:调整初浓度细胞数 2×10^5 ,每组重复 3 瓶,培养 7 d 后,分别计数细胞数平均值并计算出各组倍增时间。生长曲线:以细胞数 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中,每组设 5 个复孔。分别培养 12、24、48、72 h 后,加入 5 mg/ml 的 MTT 20 μ l/孔,4 h 后弃上清,每孔加入 DMSO 150 μ l,震荡溶解结晶,测量 570 nm 处吸光度(absorbance, A)值。

1.5 Transwell 小室实验检测转染前后 Eca109 细胞迁移和侵袭能力的变化

迁移试验:实验前用 30 μ l 培养基 37 $^{\circ}$ C 30 min 水化基底膜,小室放在 24 孔板内。取 3 组细胞各 2×10^5 (400 μ l)个/

孔加入上室,下室加培养液 600 μ l,培养 24 h 后,棉签擦去上室面细胞,甲醛固定 30 min,HE 染色,切膜并封片。显微镜下随机选取上、下、左、右、中 5 个视野计算穿膜细胞数并拍照(200 $\times$),计算均数进行比较。细胞侵袭实验,将 Matrigel 胶用无血清的 1640 稀释(1:8)后取 40 μ l 均匀铺在小室的上室,小室内加入 20 μ l 无血清的 1640,其余操作同迁移实验,实验重复 3 次。

1.6 血管形成实验

检测空载体组细胞和未转染组细胞倍增时间和生长曲线差异无统计学意义后,分别取目的基因组和空载体组细胞培养 48 h 后,更换无血清 1640 继续培养 24 h,收集培养上清液过滤后作为条件培养基。用无血清 1640 按 1:4 稀释 Matrigel 胶,按 100 μ l/孔铺于 24 孔板,孵育 30 min;取生长状态良好的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC),按 5×10^4 个/孔细胞数接种至预先铺好 Matrigel 胶的 24 孔板,分别加入上述 2 组条件培养基 1 ml,孵育 24 h,各设 3 个复孔,倒置显微镜采集图像。

1.7 流式细胞仪检测转染前后各组细胞周期的变化

收集 3 组细胞各 1×10^6 ,常规处理后用 70%冰酒精固定 24 h。检测前于 PBS 中重悬 30 min,500 $\times$ g 离心 10 min,弃上清后 PBS 漂洗 2 次,加入 RNase A 80 μ l/组,4 $^{\circ}$ C 冰箱静置 30 min 后,用流式细胞仪对 DNA 进行定量分析,并计算出细胞周期分布情况,流式细胞检测在第三军医大学中心实验室进行。

1.8 Western blot 法检测转染前后各组细胞的 *Beclin 1*、Bcl-2、MMP-9 蛋白的表达情况

提取蛋白 40 μ g 进行定量分析,凝胶电泳分离,电转到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h 后,孵育一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜,复温 1 h 后 TBST 室温摇床洗膜 3×15 min。加入二抗 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h, TBST 室温摇床洗膜 3×15 min,加 ECL 显色液后凝胶成像系统显色,以 β -actin 为内参照,计算各蛋白条带的相对表达量,统计分析,实验重复 3 次。

1.9 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计学软件处理,计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。RT-PCR、Western blot 以及迁移、侵袭实验结果组间差异用单因素方差分析,两两比较使用 LSD- t 法;倍增时间和生长曲线检测结果采用重复测量方差分析;血管形成实验采用两独立样本 t 检验。检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 质粒转染和透射电镜观察结果

成功将 pIRES2-ZsGreen1-h *Beclin 1* 质粒转染到 Eca109 细胞,转染 24 h 后目的基因组和空载体组绿色荧光表达效率约为 40%,经 G418 筛选后荧光表达效率在 80%左右时(图 1),置于透射电镜下 17 500 倍放大观察可见有广泛的自噬体形成,进一步放大至 65 000 倍可见典型的自噬体结构:双层或多层膜囊泡结构,囊泡内有吞噬的蛋白质和细胞器(图 2)。

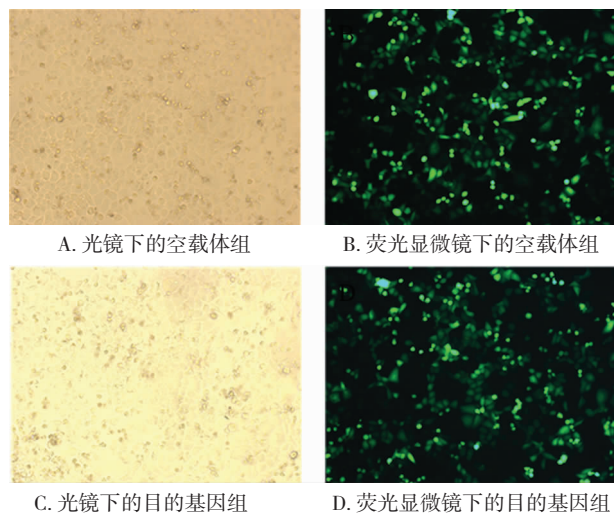


图 1 Eca109 细胞转染结果 (200 ×)

Fig.1 Plasmid transfection into Eca109 cells (200 ×)

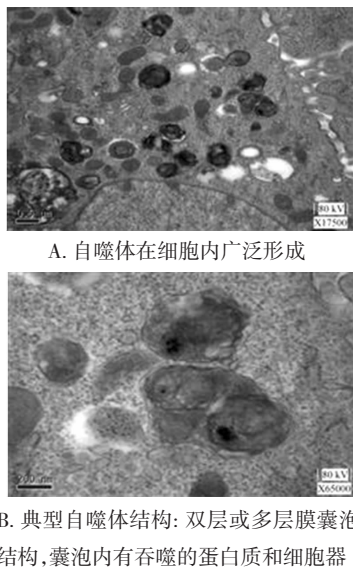


图 2 透射电子显微镜观察 *Beclin 1* 过表达后 Eca109 细胞中自噬体形成

Fig.2 Overexpression of *Beclin 1* leading to autophagy in Eca109 cells under electron microscopy

2.2 RT-PCR 检测 *Beclin 1* mRNA 表达结果

3 组细胞 mRNA 分析结果见表 1,RT-PCR 检测结果显示目的基因组 *Beclin 1* mRNA 表达水平明显高于空载体组和未转染组,结果差异有统计学意义 ($P=0.000$ 、 $P=0.000$),空

载体组和未转染组细胞内 *Beclin 1* mRNA 比较差异无统计学差异 ($P=0.949$) (图 3、表 1)。

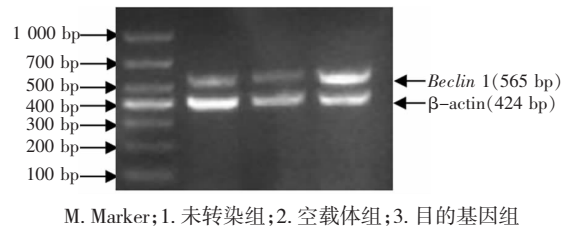


图 3 *Beclin 1* 在 3 组细胞中的转录水平

Fig.3 *Beclin 1* transcriptional levels in the three groups

2.3 倍增时间和生长曲线检测结果

倍增时间,细胞培养 7 d 后各组细胞数平均值分别为:目的基因组 25.69×10^4 ,空载体组 56.47×10^4 ,未转染组 53.50×10^4 。按照倍增时间(h)公式 $h=7 \times [\lg 2/(\lg N7-\lg N0)] \times 24$,计算出 3 组细胞倍增时间分别为:目的基因组 45.61 h,空载体组 34.86 h,未转染组 35.43 h。可得目的基因组细胞增殖时间明显延长,增殖速度较后 2 组细胞慢 ($P=0.000$ 、 $P=0.000$),而未转染组和空载体组增殖时间没有明显差异 ($P=0.753$)。(时间因素 $F=29\ 254.575$ 、分组因素 $F=4\ 792.09$ 、时间×分组 $F=4\ 280.91$)。MTT 检测 3 组细胞生长曲线:从生长曲线可以看出,转染 *Beclin 1* 能使 Eca109 细胞的增殖速度减慢,而转染空质粒对其生长曲线影响不大(图 4)。

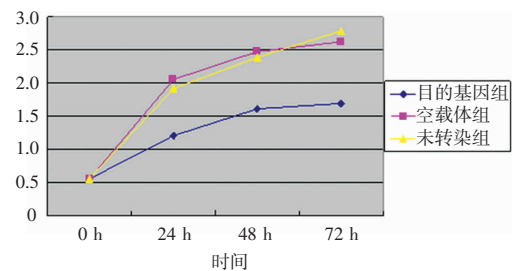


图 4 3 组细胞的生长曲线

Fig.4 Growth curve of the three groups

2.4 血管形成实验结果

检测结果显示,2 组不同的肿瘤细胞条件培养基作用 24 h 后 HUVEC 在 Matrigel 上被诱导成管腔结构,目的基因组和空载体组相比,HUVEC 细胞形成血管管腔样结构数量明显减少,分别是 (23.33 ± 4.73) 个和 (9.67 ± 3.51) 个,差异有统计学意义 ($t=4.834$, $P=0.005$,图 5)。

表 1 转染前后 3 组细胞间的 mRNA 和蛋白质水平比较 ($RI=\bar{x} \pm s$)

Tab.1 mRNA and protein expressions in the three groups ($RI=\bar{x} \pm s$)

组别	<i>Beclin 1</i> mRNA	<i>Beclin 1</i> 蛋白	Bcl-2 蛋白	MMP-9 蛋白
目的基因组	1.538 1 ± 0.111 0	1.534 8 ± 0.037 8	0.542 3 ± 0.010 6	0.681 4 ± 0.014 2
空载体组	0.694 5 ± 0.039 4	0.745 1 ± 0.057 5	1.211 8 ± 0.045 3	1.139 0 ± 0.012 7
未转染组	0.690 7 ± 0.036 8	0.690 5 ± 0.015 8	1.231 4 ± 0.014 3	1.167 2 ± 0.017 3
<i>F</i> 值	104.847	403.398	583.951	1 008.430
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000



A. 目的基因组

B. 空载体组

图 5 HUVECs 血管形成实验 (100×)

Fig.5 Formation assay of HUVECs (100×)

2.5 迁移、侵袭实验结果

Transwell 小室实验检测结果显示,目的基因组变形迁移和侵袭破坏能力与对照组相比明显减弱,迁移实验中,目的基因组细胞与空载体组和未转染组细胞相比,穿膜细胞数明显降低,分别是 (31.00 ± 3.94) 个、 (57.80 ± 3.27) 个和 (56.40 ± 4.22) 个,差异有统计学意义($P=0.000$ 、 $P=0.000$),空载体组和未转染组差异无统计学意义($P=0.574$);在细胞侵袭实验中,目的基因组细胞与空载体组和未转染组细胞相比,穿膜细胞数

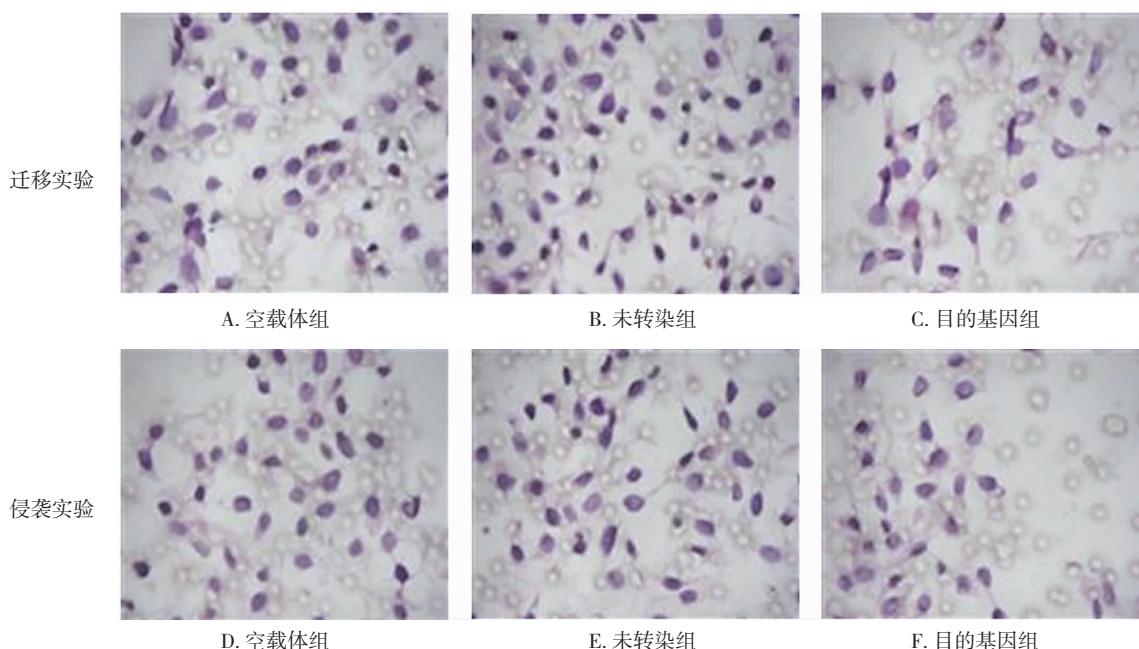
明显降低,分别是 (14.60 ± 1.52) 个、 (24.40 ± 1.95) 个和 (24.80 ± 2.59) 个,差异有统计学意义($P=0.000$ 、 $P=0.000$),空载体组和未转染组差异无统计学意义($P=0.765$);提示过表达 *Beclin 1* 能明显抑制食管癌 Eca109 细胞的迁移和侵袭能力(图 6)。

2.6 细胞周期检测结果

未转染组(G1 期 40.7%,G2 期 23.2,S 期 36.1%)和空载体组细胞周期(G1 期 42.4%,G2 期 23.5,S 期 34.1%)相比,细胞周期变化不明显;目的基因组(G1 期 50.0%,G2 期 23.6,S 期 26.4%)较空载体组和未转染组相比,G1 期延长,S 期变短;说明 *Beclin 1* 对 Eca109 细胞增殖有很好的抑制作用(图 7)。

2.7 Western blot 检测结果

空载体组和未转染组细胞 *Beclin 1*、*Bcl-2*、*MMP-9* 蛋白表达无明显差异(P 值分别是 0.152、0.472、0.059),目的基因组 *Beclin 1* 蛋白表达量明显高于空载体组和未转染组($P=0.000$ 、 $P=0.000$),而 *Bcl-2* 和 *MMP-9* 低于空载体组和未转染组($P=0.000$ 、 $P=0.000$)($P=0.000$ 、 $P=0.000$),差异具有统计学意义(图 8 和表 1)。



D. 空载体组

E. 未转染组

F. 目的基因组

图 6 Transwell 小室检测 3 组 Eca109 细胞体外迁移、侵袭能力 (HE,200×)

Fig.6 Migration and invasion of Eca109 cells in the three groups detected by Transwell assay (HE,200×)

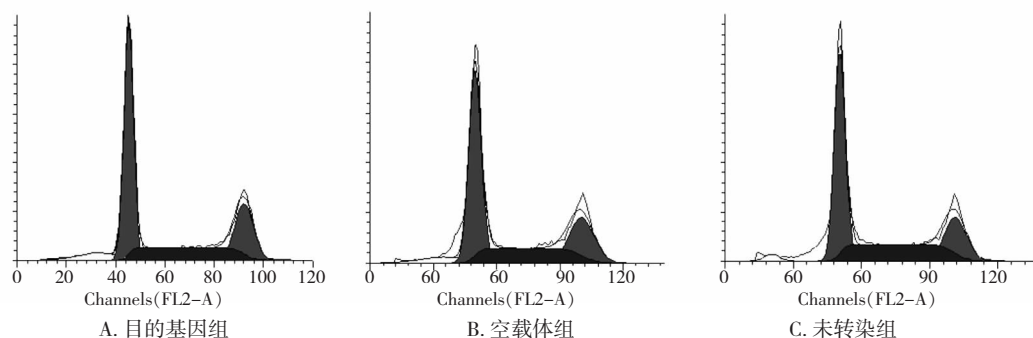
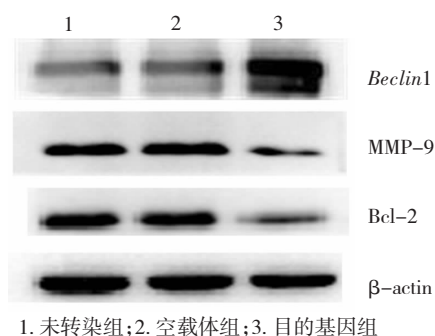


图 7 3 组细胞周期检测结果

Fig.7 Cell cycle examination of the three groups

图 8 *Beclin 1*, *MMP-9*, *Bcl-2* 蛋白在 3 组细胞表达情况Fig.8 Expressions of *Beclin 1*, *MMP-9*, *Bcl-2* in the three groups

3 讨论

食管癌是严重影响我国居民健康的疾病,国际癌症研究机构公布的全球 50 个国家和地区癌症数据显示我国是世界上食管癌发病率最高的国家,全球每年新发食管癌 40 万例,其中约 30 万在中国^[9]。远处转移是影响食管癌预后和长期生存的关键,因此确定有效的抑制食管癌转移的基因是食管癌防治的关键。自噬是真核细胞内一种普遍存在的现象,是将细胞内变性坏死的蛋白质和受损细胞器进行降解,随后经溶酶体系统消化,回收氨基酸、核苷酸维持细胞代谢平衡的过程,也参与细胞正常生长分化过程,而且是细胞面临饥饿、缺氧等应激环境的应对策略。*Beclin 1* 是哺乳动物高度保守的自噬相关蛋白,与酵母自噬基因 *Atg6* 同源,是 20 世纪 90 年代后期发现的一个 60 kD 蛋白^[6-7]。*Beclin 1* 作为自噬关键基因一直是肿瘤自噬研究的热点基因,但是在食管癌中的研究相对较少,本研究通过体外实验验证了过表达 *Beclin 1* 对食管癌细胞生长、迁移和侵袭能力的影响。

Beclin 1 已经被确立为肿瘤抑制蛋白,Liang 等^[7]发现 *Beclin 1* 在乳腺癌组织中表达水平降低,*Beclin 1* 转染 MCF7 细胞系后,诱导了自噬,抑制 MCF7 细胞株在体外的增殖。之后的研究发现了 *Beclin 1* 在人类前列腺癌、卵巢癌、肺癌等表达水平的降低^[8]。在乳腺癌中的研究发现低水平的 *Beclin 1* 是乳腺癌远处转移的风险因素之一,其 5 年生存率较 *Beclin 1* 表达相对高组低^[9]。在胃癌中研究发现 *Beclin 1* 的表达水平与胃癌的远处转移和预后不良呈负相关^[10]。本实验通过 pIRES2-ZsGreen1-h *Beclin 1* 转染食管癌 Eca109 细胞株,经 RT-PCR 和 Western blot 检测证明了 *Beclin 1* 的高表达,并通过透射电镜观察

到广泛的自噬体形成,经倍增时间、生长曲线和细胞周期的测定发现过表达 *Beclin 1* 能抑制食管癌 Eca109 细胞增殖,使细胞周期 S 期缩短, G1 期延长。*Beclin 1* 含有 Bcl-2 蛋白同源结构域(BH3),一个卷曲螺旋结构域(CCD)和一个进化上保守的域(ECD)。基线附近的 *Beclin 1* 不能引起自噬和抑制肿瘤,*Beclin 1* 过表达后通过进化上保守的结构域(ECD)结合 PI3K III/Vps34 形成自噬启动阶段,通过提高自噬水平抑制肿瘤细胞生长,缺乏 ECD 的 *Beclin 1* 突变体是无法提高自噬的,也失去了其肿瘤抑制功能。本研究发现过表达 *Beclin 1* 后食管癌细胞 Eca109 中 Bcl-2 的表达降低,*Beclin 1* 通过 BH3 结构域与 Bcl-2 结合减少其表达,这可能是抑制其生长的一个重要原因。

转移是恶性肿瘤预后判断的重要标志,与原发肿瘤的黏附和肿瘤细胞运动能力以及侵袭能力密切相关,其过程包括细胞黏附、迁移、血管生成、免疫逃逸到靶器官归巢等,细胞外基质的降解是其中的关键步骤之一。*MMP-9* 属于明胶酶类,能够降解 IV 型胶原,从而解除肿瘤细胞转移的组织屏障。本实验通过对食管癌细胞株 Eca109 的研究,检测了过表达 *Beclin 1* 对食管癌细胞迁移和侵袭能力的影响。通过 Transwell 小室实验,发现目的基因组细胞通过微膜孔细胞数显著降低;通过基底膜涂覆 Transwell 小室测定,发现过表达 *Beclin 1* 组食管癌 Eca109 细胞通过基底膜入侵的细胞数均显著低于空载体组和未转染组;同时 Western blot 检测显示 *MMP-9* 在目的基因的表达量低于空载体组和未转染组。提示 *Beclin 1* 能够抑制食管癌细胞的迁移和侵袭,这与 *Beclin 1* 在其他组织肿瘤如胃癌和乳腺癌中的研究报告一致^[9-10]。

血管生成是肿瘤发展及转移所必须的,快速增长的肿瘤需要提供营养支持的血管,以应对缺乏氧气和营养物质。肿瘤快速增长导致的缺氧是驱动实体肿瘤新生血管形成的力量,自噬应对缺氧的反应正日益被视为在关键生理和病理过程中起着非常重要的角色。在小鼠和在黑色素瘤上的研究显示自噬基因 *Beclin 1* 等位基因的缺乏与低血管活性相关^[11-12],在血管抑素和纤溶酶原结构域 Kringle 抑制血管形成的研究中也发现自噬基因 *Beclin 1* 表达的上调^[13]。本研究通过血管形成实验发现过表达 *Beclin 1* 后 Eca109 细胞血管形成能力较空载体组明显降低,这为食管癌的抗血管生成提供了一个有价值的方向。

以上结果表明,过度表达 *Beclin 1* 抑制食管癌