

消化系统疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001419

BCL6B抑制结直肠癌细胞 HCT116 增殖、迁移及其可能机制研究

谷 月, 李爱芳, 赵佳丽, 谢佳卿, 彭 棋, 陈 露, 黄 茂, 周 兰

(重庆医科大学检验医学院、临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨 B 细胞淋巴瘤 6 成员 B(B cell lymphoma 6 member B, BCL6B)对人结直肠癌细胞 HCT116 增殖、迁移的影响及机制。**方法:**采用定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)和 Western blot 检测和比较人正常肠上皮细胞 FHC 及人结直肠癌细胞 HCT116 中 BCL6B 的内源性表达;用脂质体法将 pcDNA3.1-BCL6B 转入 HCT116 细胞,同时设转入空载体的对照组;运用 MTT 法、流式细胞术、划痕愈合及 Transwell 试验检测 BCL6B 对癌细胞增殖、周期及迁移能力的影响;采用 Western blot 检测细胞中 β -连环蛋白(β -catenin)、磷酸化的糖原合成酶激酶-3 β (p-GSK3 β)、细胞周期蛋白(CyclinD1)、基质金属蛋白酶-7(matrix metalloproteinase-7, MMP-7)和 E-钙黏蛋白(E-cadherin)的表达。**结果:**qPCR 和 Western blot 结果显示,与正常肠上皮细胞 FHC 相比, BCL6B 在结直肠癌细胞 HCT116 中呈明显低表达($P=0.017$);转染 pcDNA3.1-BCL6B 后,细胞内 BCL6B 表达水平明显升高($P=0.000$)。与阴性对照组相比, BCL6B 组 HCT116 细胞 4 d 时的增殖活性降低 41.79%($P=0.040$),且 G1 期细胞百分比增加 62.09%($P=0.001$);同时, BCL6B 组 HCT116 细胞 48 h 划痕愈合率及穿膜细胞数均明显减少($P=0.001$)。Western blot 结果表明, BCL6B 组 HCT116 细胞内 β -catenin、p-GSK3 β 、CyclinD1 和 MMP-7 的表达水平较阴性对照组分别降低 65.66%($P=0.028$)、62.03%($P=0.001$)、60.87%($P=0.021$)和 50.88%($P=0.030$), E-钙黏蛋白的表达升高 63.64%($P=0.018$)。**结论:** BCL6B 可抑制结直肠癌细胞 HCT116 的增殖及迁移,其机制可能涉及 Wnt/ β -catenin 通路的抑制。

【关键词】结直肠癌; BCL6B; Wnt/ β -catenin 信号通路**【中图分类号】**R735.3⁴**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-05-16

Inhibition of B cell lymphoma 6 member B on proliferation and migration of colorectal carcinoma cell line HCT116 and study of its possible mechanism

Gu Yue, Li Aifang, Zhao Jiali, Xie Jiaqing, Peng Qi, Chen Lu, Huang Mao, Zhou Lan

(Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics Established by Ministry of Education,
School of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of B cell lymphoma 6 member B(BCL6B) on the proliferation and migration of human colorectal cancer cell line HCT116, and to explore its possible mechanism. **Methods:** Quantitative polymerase chain reaction(qPCR) and Western blot were used to detect and compare the endogenous expression of BCL6B in FHC and HCT116 cells. Liposome method was used to transfer the pcDNA3.1-BCL6B to HCT116 and the control group with empty vector was set. MTT assay, flow cytometry, wound healing assay and transwell chamber assay were used to detect the influence on proliferation, cycle and migration ability of cancer cell. Western blot was adopted to detect the expression of β -catenin, p-GSK3 β , CyclinD1, MMP-7 and E-cadherin. **Results:** According to qPCR and Western blot, BCL6B expression was notably repressed in HCT116 cells as compared with FHC cells($P=0.017$), and expression of BCL6B was significantly increased in HCT116 cells after transfection with pcDNA3.1-BCL6B for 48 h($P=0.000$). Compared with those in the control group, the OD492 value of HCT116 cells at the 4d time-point was decreased by 41.79%($P=0.040$), and the percentage of cells in G1 phase was increased by 62.09%($P=0.001$), 48 h wound healing rate and transmembrane cells of HCT116 cells in the BCL6B group were significantly reduced($P=0.001$). The protein levels of β -catenin, p-GSK3 β , CyclinD1 and MMP-7 of HCT116 cells in the BCL6B group were dropped by 65.66%($P=0.028$), 62.03%($P=0.001$), 60.87%($P=0.021$) and 50.88%($P=0.030$), respectively. E-cadherin was increased by 63.64%($P=0.018$). **Conclusion:** BCL6B inhibits the proliferation

作者介绍: 谷 月, Email: 103181488@qq.com,

研究方向: 肿瘤分子诊断。

通信作者: 周 兰, Email: zhoulan0111@foxmail.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20171128.1659.022.html>

(2017-11-28)

and migration of HCT116 cells, and its mechanism may involve in the inhibition of Wnt/ β -catenin pathway.**【Key words】**colorectal cancer; BCL6B; Wnt/ β -catenin signaling pathway

结直肠癌(colorectal cancer,CRC)为常见的消化道恶性肿瘤,在全球每年约有 100 万的新增病例及 50 万的死亡病例^[1]。在我国,随人口老龄化等患癌因素的增加,CRC 发病率呈逐年上升趋势,形势十分严峻^[2]。如今,CRC 难于早期诊断,其治疗以手术切除为主,转移和复发仍是导致 CRC 患者低生存率的主要原因。因此,阐明 CRC 发病的分子机制尤为重要,可为其早期诊断、治疗及预后等提供新的线索。

B 细胞淋巴瘤 6B(B cell lymphoma 6 member B,BCL6B)基因位于 17p13.1,属于 B 细胞淋巴瘤 6(B cell lymphoma 6,BCL6)超家族成员^[3-5],广泛表达于人体正常组织,然而在多种肿瘤中则发生不同位点的缺失或突变^[6-7];因启动子区 CpG 岛高甲基化导致的 BCL6B 转录沉默或下调普遍存在于胃癌^[8-10]、肝癌^[11]及 CRC^[12]中,且 BCL6B 的低表达与肿瘤的恶性程度及患者不良预后呈正相关^[8,10-12];上调 RKO 和 HT-29 细胞中 BCL6B 的表达可激活 p53 通路发挥抗 CRC 的作用^[12]。这些均提示 BCL6B 可能是一个抑癌基因。目前,关于 BCL6B 在肿瘤中的作用及机制的报道尚少。

本文通过检测 BCL6B 在正常肠上皮细胞 FHC 及 CRC 细胞 HCT116 中的相对表达量,及过表达 BCL6B 后细胞增殖、周期及迁移能力的变化情况,并进一步探讨 BCL6B 发挥作用的可能分子机制,为阐明 BCL6B 在 CRC 发生发展中的作用和 CRC 发病的机制积累了实验依据,也为 CRC 的诊治提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系和质粒 FHC 和 HCT116 细胞购自美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection,ATCC),BCL6B 重组质粒由重庆医科大学附属第一医院表观遗传学实验室馈赠。

1.1.2 主要试剂和仪器 胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)及 DMEM 培养基购自 Gibco 公司;脂质体 Lipofectamine2000 和 TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司;反转录和荧光定量 PCR 试剂盒购自 Takara 公司;蛋白提取试剂盒购自上海碧云天生物有限公司;BCL6B 兔源多克隆抗体购自 Abgent 公司;细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)兔源多克隆抗体及 β -actin、 β -catenin

和基质金属蛋白酶-7(matrix metalloproteinase-7,MMP-7)鼠源单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;p-GSK3 β (磷酸化的糖原合成酶激酶-3 β)及 GSK3 β (总的糖原合成酶激酶-3 β)兔源单克隆抗体购自美国 CST 公司;E-cadherin 兔源多克隆抗体购自 Immuno Way 公司;HRP 标记的山羊抗鼠和山羊抗兔二抗购自中杉金桥生物技术有限公司;MTT 试剂购于凯基生物;Transwell 小室购于 Millipore 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、转染与分组 HCT116 细胞接种于含 10% 胎牛血清和 1%青链霉素的 DMEM 高糖培养基中,于 37℃、5%CO₂ 条件下培养。当融合度为 70%~80%时,参照 Lipofectamine2000 说明书,将空载质粒 pcDNA3.1(设为阴性对照组)和含有人 BCL6B 基因编码序列的重组质粒 pcDNA3.1-BCL6B(设为 BCL6B 组)分别转染对数生长期的 HCT116 细胞,同时设未做处理的空白组。转染后 48 h 行 Western blot 验证转染效果。

1.2.2 qRT-PCR 用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,测定浓度后取 1 μ g 于 10 μ L 反应体系反转录生成 cDNA。采用 SYBR 法行 qRT-PCR,10 μ L PCR 反应体系为:5 μ L PCR SYBR Green Master Mix,1.0 μ L cDNA 模板,正反向引物各 0.5 μ L,加双蒸水 3 μ L 后混匀上机。PCR 反应条件为:94℃预变性 3 min;94℃变性 40 s,55℃退火 40 s,72℃延伸 40 s;36 个循环;最后,65℃,5 s,每次升高 0.5℃,直至 95℃。采用 GAPDH 为内参基因。Bio Rad 软件进行分析。BCL6B 正向引物 BCL6B-F:5'-AAGCCGTATAAGTGTGAGACG-3',反向引物 BCL6B-R:5'-AGAATGTGGTAGTCAC-3';GAPDH 正向引物 GAPDH-F:5'-CAGCGACACCCACTCCTC-3',反向引物 GAPDH-R:5'-TGAGGTCCACCACCCTGT-3'。

1.2.3 Western blot 转染后 48 h,收集各组细胞,提取总蛋白,分光光度法进行定量。取 75 μ g 蛋白样品加入适量 SDS 缓冲液,经煮沸变性后,行 10% SDS-PAGE,再湿转至 PVDF 膜。5% BSA 封闭 2 h,分别加入一抗(BCL6B 以 1:3 000 稀释, β -actin、 β -catenin、p-GSK3 β 、GSK3 β 、CyclinD1、MMP-7 及 E-cadherin 以 1:1 000 稀释),4℃孵育过夜;TBST 洗膜后加二抗(均为 1:5 000 稀释),37℃孵育 1 h;洗膜后用 ECL 化学发光法检测目的蛋白,以 β -actin 作为内参,Quantity One 4.6.2 软件分析蛋白条带灰度值。

1.2.4 MTT 法 取对数生长期的 HCT116 细胞,接种于 96 孔板中(3 $\times$ 10³ 个/孔),待细胞贴壁后进行转染,于转染后 1、2、3、4 d 时避光加入 500 μ g/mL MTT 试剂(10 μ L/孔),37℃孵育 4 h,弃去培养液,加入 DMSO(150 μ L/孔),避光震荡 10 min 至结晶物溶解,于光吸收酶标仪上检测 492 nm 处吸光度(absorbance,A)值,以 A_{492 nm} 值表示细胞的增殖能力。

1.2.5 流式细胞术 取对数生长期的 HCT116 细胞制成单细胞悬液,以 5 $\times$ 10⁵ 个/孔的密度接种于 6 孔板进行转染,转染后 48 h,胰酶消化,离心获得各组细胞,预冷 PBS 充分洗涤

2次后,用预冷的70%的酒精固定细胞于4℃放置过夜;按照碧云天PI染色试剂盒说明进行操作,于流式细胞仪上检测细胞周期。

1.2.6 划痕愈合试验 以 1×10^6 个/孔的密度接种HCT116细胞于6孔板中,细胞贴壁后进行转染,分组同前,8 h后用无菌小枪头行“十”字划痕,PBS洗2次后换成4% FBS的DMEM培养基(2 mL/孔),于倒置显微镜下观察拍照并记0 h划痕宽度,将细胞放入孵箱,48 h和56 h后取出,在相同位置观察并记录划痕宽度。每组取3处计算划痕宽度平均值,并计算划痕愈合率。划痕愈合率=(0 h划痕宽度-48 h划痕宽度)/0 h划痕宽度 $\times 100\%$ 。

1.2.7 Transwell 小室试验 收集转染后24 h的各组细胞,调整细胞密度为 5×10^5 个/mL,取400 μ L单细胞悬液加入上室(Transwell小室),下室(24孔板)加入600 μ L含20% FBS的DMEM培养液;于37℃、5%CO₂孵育48 h后,取出小室,拭去上室细胞,PBS洗涤3次后,甲醇固定15 min,0.1%结晶紫染色20 min,清洗晾干后于倒置显微镜下计数穿膜细胞数。

1.3 统计学分析

所有实验均独立重复3次,实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并采用SPSS 17.0软件进行统计学分析。两组间比较采用两独立样本 t 检验;多组间均数比较采用单因素方差分析,进一步采用Bonferroni校正的 t 检验进行组内两两比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 正常肠上皮细胞FHC和结直肠癌细胞HCT116中BCL6B内源性表达的检测

提取常规培养的FHC和HCT116细胞的总mRNA及总蛋白分别行qRT-PCR和Western blot试验,结果如图1所示。FHC和HCT116细胞中BCL6B的mRNA相对表达量分别为 0.91 ± 0.29 和 0.21 ± 0.11 ($F=3.047, P=0.017$),BCL6B蛋白的校正灰度值分别为 0.76 ± 0.16 和 0.20 ± 0.06 ($F=1.346, P=0.004$);即与正常肠上皮细胞系FHC相比,BCL6B在结直肠癌细胞系HCT116中呈明显低表达。提示BCL6B可能参与CRC的发生发展。因此,后续实验中以HCT116细胞作为过表达BCL6B的研究对象,观察BCL6B对细胞增殖和迁移的影响。

2.2 重组质粒pcDNA3.1-HA-BCL6B转染后,HCT116细胞内BCL6B表达增加

pcDNA3.1-HA-BCL6B转染HCT116细胞后48 h,提取细胞总蛋白行Western blot试验。结果显示HCT116细胞中BCL6B蛋白的相对表达量是阴性对照组的4.81倍($F=40.257, P=0.000$),参见图2。提示:pcDNA3.1-HA-BCL6B转染效率高,能使目的基因BCL6B在HCT116细胞中成功过表达,可用于后续研究。

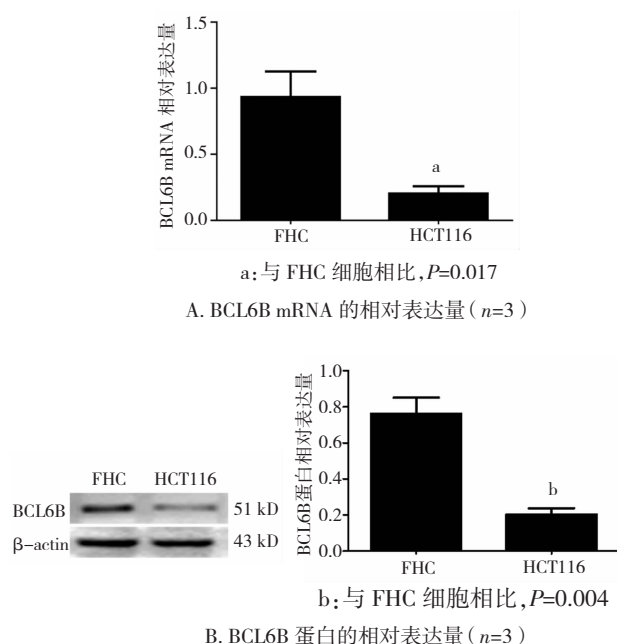


图1 人正常肠上皮细胞FHC和人结直肠癌细胞HCT116中BCL6B的内源性表达

Fig.1 Endogenous expression of BCL6B in FHC and HCT116 cells

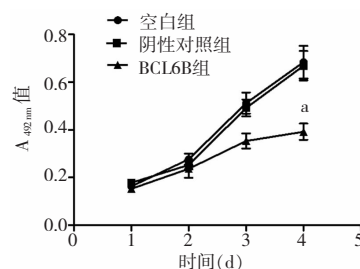


图2 Western blot法进行BCL6B的过表达验证

Fig.2 Over-expression verification of BCL6B via Western blot

2.3 BCL6B抑制HCT116细胞的增殖能力

MTT检测结果如图3、表1所示。BCL6B组HCT116细胞的A值在1、2及3 d时与各自对照组的A值之间差异无统计学意义。在第4天时,空白组、阴性对照组和BCL6B组HCT116细胞的A值分别为 0.68 ± 0.12 、 0.67 ± 0.11 和 0.39 ± 0.06 ;其中,BCL6B组与阴性对照组相比,细胞的增殖活性降低41.79%($F=8.439, P=0.040$);而阴性对照组与空白组之间的差异无统计学意义($P=1.000$)。提示BCL6B抑制HCT116细胞的增殖能力。



a: 在第4天,与阴性对照组相比,BCL6B致HCT116细胞增殖减弱, $P=0.040$

图3 BCL6B对HCT116细胞增殖能力的影响

Fig.3 Effect of BCL6B on the proliferation of HCT116 cells

表 1 不同处理组 HCT116 细胞 A_{492nm} 值 ($n=3$)
Tab.1 A_{492nm} value of HCT116 cells in different groups ($n=3$)

组别	1 d	2 d	3 d	4 d
空白组	0.16 ± 0.01	0.28 ± 0.04	0.51 ± 0.08	0.68 ± 0.12
阴性对照组	0.18 ± 0.01	0.25 ± 0.03	0.49 ± 0.06	0.67 ± 0.11
BCL6B组	0.15 ± 0.02	0.24 ± 0.06	0.35 ± 0.06	0.39 ± 0.06
<i>F</i> 值	3.652	0.535	5.291	8.439
<i>P</i> 值	0.092	0.611	0.047	0.018
阴性对照组与空白组 <i>P</i> 值	0.480	1.000	1.000	1.000
BCL6B 组与阴性对照组 <i>P</i> 值	0.109	1.000	0.121	0.040

2.4 BCL6B 导致 HCT116 细胞周期阻滞

流式细胞术检测结果如图 4、表 2 所示。3 组细胞 G1 期细胞百分比依次为 $(37.56 \pm 3.55)\%$ 、 $(37.80 \pm 1.35)\%$ 和 $(61.27 \pm 5.11)\%$, S 期细胞百分比依次为 $(42.10 \pm 3.92)\%$ 、 $(47.20 \pm 0.83)\%$ 和 $(32.05 \pm 2.00)\%$; 其中, BCL6B 组与阴性对照组相比, G1 期细胞百分比增加 62.09% ($P=0.001$), S 期细胞百分比减少 32.10% ($P=0.001$); 而空白组与阴性对照组相比, 细胞周期无明显变化。说明 BCL6B 致 HCT116 细胞的细胞周期发生 G1 期阻滞。

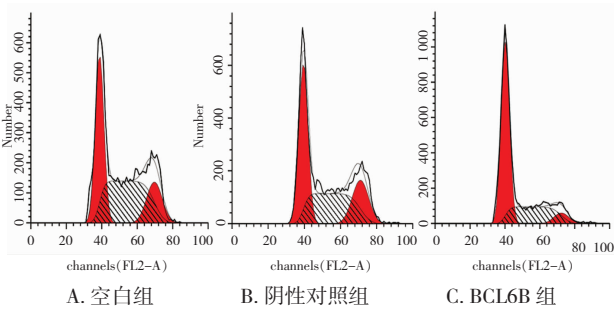


图 4 BCL6B 对 HCT116 细胞周期的影响

Fig.4 Effect of BCL6B on the cell cycle of HCT116 cells

表 2 不同处理组 HCT116 细胞周期中各期细胞百分比的测定结果($n=3, \%$)

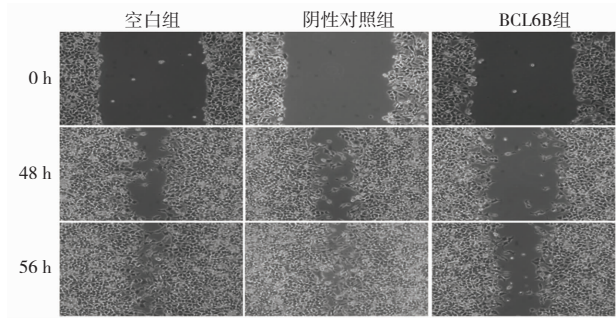
Tab.2 Results of HCT116 cell cycles in different groups($n=3, \%$)

组别	G0/G1期	S期	G2/M期
空白组	37.56 ± 3.55	42.10 ± 3.92	20.20 ± 0.73
阴性对照组	37.80 ± 1.35	47.20 ± 0.83	16.57 ± 4.25
BCL6B组	61.27 ± 5.11	32.05 ± 2.00	6.69 ± 3.25
<i>F</i> 值	41.227	26.658	15.101
<i>P</i> 值	0.000	0.001	0.005
阴性对照组与空白组 <i>P</i> 值	1.000	0.156	0.613
BCL6B 组与阴性对照组 <i>P</i> 值	0.001	0.001	0.024

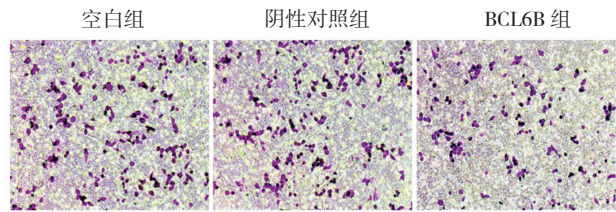
2.5 BCL6B 抑制 HCT116 细胞的迁移能力

划痕试验结果如图 5A 所示, BCL6B 组 HCT116 细胞 48 h 及 56 h 的划痕愈合率分别为阴性对照组的 45.64% ($P=$

0.004) 和 51.01% ($P=0.002$), 差异明显。Transwell 结果如图 5B 所示, 质粒转染后 48 h, BCL6B 组 HCT116 细胞的穿膜细胞数为 53.67 ± 12.22 , 明显低于阴性对照组的 141.67 ± 12.67 , 差异具统计学意义 ($F=34.698, P=0.001$)。提示 BCL6B 抑制 HCT116 细胞的迁移能力(表 3)。



A. 划痕愈合实验



B. Transwell 小室实验

图 5 BCL6B 对 HCT116 细胞迁移的影响

Fig.5 Effect of BCL6B on the migration of HCT116 cells

表 3 不同处理组 HCT116 细胞的划痕愈合率 ($n=3, \%$)

Tab.3 Wound healing rates of HCT116 cells in different groups ($n=3, \%$)

组别	48 h	56 h
空白组	66.76 ± 9.26	86.12 ± 8.94
阴性对照组	67.95 ± 8.89	86.52 ± 7.72
BCL6B组	31.01 ± 5.46	44.13 ± 6.71
<i>F</i> 值	20.389	30.076
<i>P</i> 值	0.002	0.001
阴性对照组与空白组 <i>P</i> 值	1.000	1.000
BCL6B 组与阴性对照组 <i>P</i> 值	0.004	0.002

表 4 不同处理组 HCT116 细胞中 β -catenin、p-GSK3 β 、CyclinD1、MMP-7 及 E-cadherin 的相对表达量 ($n=3, \%$)

Tab.4 Relative protein levels of β -catenin、p-GSK3 β 、CyclinD1、MMP-7 and E-cadherin of HCT116 cells in different groups ($n=3, \%$)

组别	β -catenin	p-GSK3 β	CyclinD1	MMP-7	E-cadherin
空白组	0.92 ± 0.34	0.65 ± 0.08	0.86 ± 0.25	0.56 ± 0.13	0.79 ± 0.13
阴性对照组	0.99 ± 0.30	0.79 ± 0.11	0.92 ± 0.26	0.57 ± 0.14	0.77 ± 0.14
BCL6B组	0.34 ± 0.14	0.30 ± 0.08	0.36 ± 0.14	0.28 ± 0.11	1.24 ± 0.25
<i>F</i> 值	5.006	23.400	5.784	5.064	6.595
<i>P</i> 值	0.053	0.001	0.040	0.051	0.031
阴性对照组与空白组 <i>P</i> 值	0.787	0.107	0.751	0.901	0.897
BCL6B 组与阴性对照组 <i>P</i> 值	0.028	0.001	0.021	0.030	0.018

2.6 BCL6B 对 HCT116 细胞中 Wnt/ β -catenin 通路活性及其下游靶基因表达的影响

采用 Western blot 检测过表达 BCL6B 后 HCT116 细胞内 Wnt/ β -catenin 信号通路相关分子表达的变化。结果显示,与阴性对照组相比,HCT116 细胞内 β -catenin 的蛋白水平下调 65.66%($P=0.028$)且 p-GSK3 β 表达下调 62.03%($P=0.001$),而总的 GSK3 β 的表达无明显变化;同时,Wnt/ β -catenin 通路下游与细胞增殖和迁移相关靶基因的表达随之有不同程度的降低和升高:CyclinD1 和 MMP-7 的表达较阴性对照组分别降低 60.87%($P=0.021$)和 50.88%($P=0.030$),而 E-cadherin 的表达升高 63.64%($P=0.018$),参见图 6、表 4。说明 BCL6B 可抑制 HCT116 细胞中 Wnt/ β -catenin 通路活性,并下调 CyclinD1 和 MMP-7 及上调 E-cadherin 的表达。提示 Wnt/ β -catenin 通路的抑制可能参与介导 BCL6B 对 HCT116 细胞增殖和迁移的抑制。

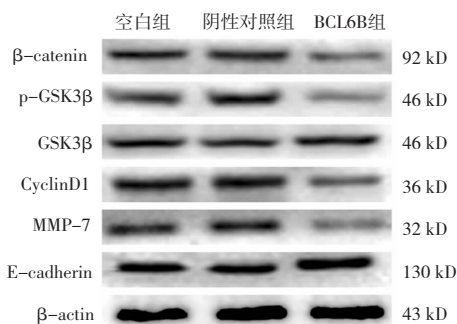


图 6 BCL6B 对 HCT116 细胞中 Wnt/ β -catenin 通路活性及其下游靶基因表达的影响

Fig.6 Effect of BCL6B on the activity of Wnt/ β -catenin signaling pathway and the expression of downstream target genes of Wnt/ β -catenin pathway in HCT116 cells

3 讨论

随着分子遗传学的发展,存在于肿瘤中异常表

达的基因事件逐渐被认识,其中由表观遗传变化导致的基因表达失活,越来越多地被证明在肿瘤的发生发展中起重要作用。BCL6B 是一个筛查出来的表达于人体正常组织、在肿瘤中却存在表达缺失的基因^[6-7],提示 BCL6B 在肿瘤发生发展中可能发挥重要作用。

近几年 Hu 等^[8-12]相继研究证实 BCL6B 在胃癌、肝癌及结直肠癌中呈异常低表达,且其表达受启动子区 DNA 甲基化调控。本研究中 qPCR 和 Western blot 检测结果显示,BCL6B 在正常肠上皮细胞系 FHC 中高表达,而在结直肠癌细胞系 HCT116 中呈明显低表达,与前述报道一致,提示 BCL6B 可能参与结直肠癌的发生发展。

本研究以携带 BCL6B 编码序列的重组质粒为干预工具,经 MTT 试验发现 BCL6B 抑制 HCT116 细胞的增殖。而细胞增殖减弱与细胞周期阻滞密切相关^[13]。进而,流式细胞术检测发现,BCL6B 致 HCT116 细胞周期发生 G0/G1 期阻滞,揭示 BCL6B 抑制结直肠癌细胞增殖的原因,同时与文献报道的上调胃癌细胞系 AGS 和 BGC823 中 BCL6B 表达,细胞增殖减慢的结果一致^[8]。

原位肿瘤发生侵袭与转移是影响其预后的关键因素。Wang 等^[11]在检测不同临床分期的肝癌组织中 BCL6B 的表达时发现,与癌旁组织相比,BCL6B 表达下调显著存在于晚期(3、4 期)肝癌组织中,过表达 BCL6B 致肝癌细胞 HepG2 和 Huh7 迁移、侵袭及血管形成能力减弱;Hu 等^[12]在分析 BCL6B 与结直肠癌患者临床病理参数间的关系时发现,BCL6B 的低表达与肿瘤恶性程度及淋巴转移呈正相关,上调 RKO 和 HT29 细胞中 BCL6B 的表达,细胞迁移及侵袭能力减弱;以上均提示 BCL6B 与肿瘤发展密

切相关。本研究采用低表达 BCL6B 的 HCT116 细胞,过表达 BCL6B 后,细胞划痕愈合力及穿膜能力明显减弱,与前述的研究报道一致。但 BCL6B 抑制结直肠癌生长和转移的机制,目前尚未阐明。众所周知,Wnt/ β -catenin 通路与结直肠癌发生发展的关系密切,参与调控细胞增殖、粘附及侵袭等多种进程^[14-16]。大量研究证实,Wnt/ β -catenin 通路在结直肠癌中呈异常激活状态,激活的 Wnt/ β -catenin 通路可通过磷酸化其下游信号分子 GSK3 β 使其活性降低,这样一方面导致核转录因子 β -catenin 在胞浆内的降解减少,细胞内 β -catenin 聚集增多且入核增加,与 TCF4/LEF 结合促进下游靶基因如 c-Myc、CyclinD1 和 MMP-7 等的转录^[14]。另外,导致 Snail 和 Slug 转出细胞核及在胞浆内的降解减少,核内 Snail 及 Slug 水平增加,E-cadherin 等的转录受抑^[17-20],从而促进结直肠癌的发生发展。那 Wnt/ β -catenin 通路是否参与介导 BCL6B 对结直肠癌细胞增殖和迁移的抑制? 本研究中 Western blot 结果显示,BCL6B 致 HCT116 细胞内 Wnt 通路中 β -catenin 降解复合体的重要组成成分 GSK3 β 的磷酸化水平降低及 β -catenin 的表达下调。同时,Wnt/ β -catenin 通路下游靶基因的表达也出现相应变化:CyclinD1 和 MMP-7 的表达下调,而 E-cadherin 的表达上调。提示,Wnt/ β -catenin 通路的抑制可能参与介导 BCL6B 对 HCT116 细胞增殖和迁移的抑制。

综上所述,BCL6B 可抑制结直肠癌 HCT116 细胞的增殖和迁移,其机制可能与其抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路有关,有待体内实验进一步验证。本研究为阐明 BCL6B 对结直肠癌的作用和机制积累了实验依据,也为结直肠癌的诊治提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] Siegel R,Naishadham D,Jemal A. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin,2013,63(1):11-30.
- [2] 李道娟,李倩,贺宇彤. 结直肠癌流行病学趋势[J]. 肿瘤防治研究,2015,42(3):305-310.
- [3] Siegel R,DeSantis C,Virgo K,et al. Cancer treatment and survivorship statistics[J]. CA Cancer J Clin,2012,62(4):220-241.
- [4] Meyerhardt JA,Li L,Sanoff HK,et al. Effectiveness of bevacizumab with first-line combination chemotherapy for Medicare patients with stage IV colorectal cancer[J]. J Clin Oncol,2012,30(6):608-615.
- [5] Okabe S,Fukuda T,Ishibashi K,et al. BAZF,a novel Bcl6 homolog,functions as a transcriptional repressor[J]. Mol Cell Bio,1998,18(7):4235-4244.
- [6] Greipp PT,Smoley SA,Viswanatha DS,et al. Patients with chronic lymphocytic leukaemia and clonal deletion of both 17p13.1 and 11q22.3 have a very poor prognosis[J]. Br J Haematol,2013,16(3):326-333.
- [7] Ying J,Srivastava G,Hsieh WS,et al. The stress-responsive gene GADD45G is a functional tumor suppressor,with its response to environmental stresses frequently disrupted epigenetically in multiple tumors[J]. Clin Cancer Res,2005,11(18):6442-6449.
- [8] Xu L,Li X,Chu ES,et al. Epigenetic inactivation of BCL6B,a novel functional tumor suppressor for gastric cancer,is associated with poor survival[J]. Gut,2012,61(7):977-985.
- [9] Yang Q,Gao J,Xu L,et al. Promoter hypermethylation of BCL6B gene is a potential plasma DNA biomarker for gastric cancer[J]. Biomarkers,2013,18(8):721-725.
- [10] Deng J,Liang H,Dong Q,et al. The survival decrease in gastric cancer is associated with the methylation of B-cell CLL/lymphoma 6 member B promoter[J]. Open Biol,2014,4(7):140067.
- [11] Wang J,Dong L,Xu LX,et al. B cell CLL/lymphoma 6 member B inhibits hepatocellular carcinoma metastases in vitro and in mice[J]. Cancer Lett,2014,355(2):192-200.
- [12] Hu S,Cao BP,Zhang MY,et al. Epigenetic silencing BCL6B induced colorectal cancer proliferation and metastasis by inhibiting P53 signaling[J]. Am J Cancer Res,2015,5(2):651-662.
- [13] Viallard JF,Lacombe F,Belloc F,et al. Molecular mechanisms controlling the cell cycle:fundamental aspects and implications for oncology[J]. Cancer Radiother,2001,5(2):109-129.
- [14] Bienz M,Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling[J]. Cell,2000,103(2):311-320.
- [15] Elzagheid A,Buhmeida A,Korkeila E,et al. Nuclear beta-catenin expression as a prognostic factor in advanced colorectal carcinoma[J]. World J Gastroenterol,2008,14(24):3866-3871.
- [16] Basu S,Haase G,Ben-ze'ev A. Wnt signaling in cancer stem cells and colon cancer metastasis[J]. F1000 Res,2016,5:699.
- [17] Conacci-Sorrell M,Simcha I,Ben-Yedidia T,et al. Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions:the roles of beta-catenin signaling,Slug,and MAPK[J]. J Cell Biol,2003,163(4):847-857.
- [18] Zhou BP,Deng J,Xia W,et al. Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition[J]. Nat Cell Biol,2004,6(10):931-940.
- [19] Nelson WJ,Nusse R. Convergence of Wnt,beta-catenin,and cadherin pathways[J]. Science,2004,303(5663):1483-1487.
- [20] Huber MA,Kraut N,Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression[J]. Curr Opin Cell Biol,2005,17(5):548-558.

(责任编辑:冉明会)