

• 基础研究 •

沉默 *GTPBP4* 基因表达对食管癌细胞增殖、侵袭和化疗敏感性影响^{*}

张翠红, 吕欣, 侯春立, 张建军, 马博敬, 范才[△]

050082 石家庄, 解放军联勤保障部队第九八〇医院 放疗科(张翠红、张建军、马博敬、范才), 肿瘤科(侯春立); 055450 河北 邢台, 柏乡县中心医院 医务科(吕欣)

[摘要] 目的: 探讨沉默 *GTPBP4* 基因表达对人食管癌 EC109 细胞生长、侵袭及化疗药物敏感性的影响。方法: 通过 GEO 数据库, 分析食管癌患者组织中 *GTPBP4* mRNA 的表达水平; 利用慢病毒 (LV-*GTPBP4*-siRNA 组) 及阴性慢病毒 (LV-NC 组) 转染食管癌 EC109 细胞后, 采用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 和蛋白质印迹法 (Western blot) 检测 *GTPBP4* 基因表达沉默效果, 然后采用 CCK8 法、流式细胞法、Transwell 小室实验分别检测 *GTPBP4* 基因表达沉默后 EC109 细胞增殖、周期分布、侵袭能力及化疗敏感性变化。结果: GEO 数据库分析表明 *GTPBP4* mRNA 在人食管癌组织中的表达明显高于正常邻近食管组织 ($P < 0.001$)。EC9706、EC109 和 KYSE-150 细胞 *GTPBP4* mRNA 相对表达水平分别为 2.66 ± 0.32 、 4.62 ± 0.06 、 3.38 ± 0.17 , 明显高于 HEEC 细胞 (均 $P < 0.001$); EC9706、EC109 和 KYSE-150 细胞 *GTPBP4* 蛋白相对表达水平分别为 2.46 ± 0.56 、 3.95 ± 0.36 、 3.18 ± 0.10 , 明显高于 HEEC 细胞 ($P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.001$)。LV-*GTPBP4*-siRNA 病毒转染后 EC109 细胞中 *GTPBP4* mRNA 及蛋白表达水平明显下降 ($P < 0.05$, $P < 0.001$)。沉默 *GTPBP4* 基因表达后, EC109 细胞的生长受到明显抑制 ($P < 0.001$), 且加入不同浓度顺铂和 5-氟尿嘧啶处理细胞后, 细胞的存活率和药物半数抑制浓度 (50% inhibiting concentration, IC_{50}) 均降低 (均 $P < 0.05$); 同时 G_0/G_1 期细胞所占比例明显升高, S 期细胞所占比例降低 (均 $P < 0.001$); 并且 *GTPBP4* 基因表达沉默及联合化疗药物顺铂处理使 EC109 细胞的穿膜细胞数量明显减少, 侵袭能力降低 ($P < 0.001$, $P = 0.001$)。结论: 人食管癌组织中 *GTPBP4* mRNA 的表达明显高于正常邻近食管组织。LV-*GTPBP4*-siRNA 慢病毒载体可有效抑制食管癌 EC109 细胞中 *GTPBP4* 基因的表达, 从而抑制细胞增殖及侵袭能力, 增强人食管鳞癌细胞对化疗药物的敏感性。

[关键词] 食管癌; 人类 GTP 结合蛋白 4; RNA 干扰; 慢病毒; 增殖; 化疗敏感性

[中图分类号] R735.1; R730.231 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2021.03.002

引文格式: Zhang CH, LV X, Hou CL, et al. Effects of *GTPBP4* gene silencing on proliferation, invasion and chemosensitivity of human esophageal carcinoma cells[J]. J Cancer Control Treat, 2021, 34(3): 190–198. [张翠红, 吕欣, 侯春立, 等. 沉默 *GTPBP4* 基因表达对食管癌细胞增殖、侵袭和化疗敏感性影响[J]. 肿瘤预防与治疗, 2021, 34(3): 190–198.]

Effects of *GTPBP4* Gene Silencing on Proliferation, Invasion and Chemosensitivity of Human Esophageal Carcinoma Cells

Zhang Cuihong, Lv Xin, Hou Chunli, Zhang Jianjun, Ma Bojing, Fan Cai

Department of Radiation Oncology, the 980th Hospital of PLA Joint Logistics Support Force, Shijiazhuang 050082, Hebei, China (Zhang Cuihong, Zhang Jianjun, Ma Bojing, Fan Cai); Department of Oncology, the 980th Hospital of PLA Joint Logistics Support Force, Shijiazhuang 050082, Hebei, China (Hou Chunli); Department of Medical Services, Central Hospital of Baixiang County, Xingtai 055450, Hebei, China (Lv Xin)

Corresponding author: Fan Cai, E-mail: fanc2010@sina.com

This study was supported by grants from Department of Health of Hebei Province (No. 20150382).

[收稿日期] 2020-06-14 **[修回日期]** 2020-08-09

[基金项目] * 河北省卫生厅青年科技课题 (编号: 20150382)

[通讯作者] [△]范才, E-mail: fanc2010@sina.com

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of *GTPBP4* gene silencing on growth, invasion and chemosensitivity.

tivity of human esophageal carcinoma cells. **Methods:** The expression of *GTPBP4* mRNA in esophageal cancer was analyzed using Bioinformatics analysis of microarray data in GEO database. The effect of *GTPBP4* gene silencing was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blot after esophageal carcinoma cells were transfected with lentivirus (the LV-*GTPBP4*-siRNA group) and negative virus (the LV-NC group), respectively. The changes in proliferation ability, cell cycle distribution, invasion and chemosensitivity of esophageal carcinoma EC109 cells after *GTPBP4* gene silencing were detected by CCK8, flow cytometry (FCM) assay and Transwell invasion assay, respectively. **Results:** The expression level of *GTPBP4* mRNA in esophageal cancer tissues were significantly higher than that in adjacent normal esophageal tissues ($P < 0.001$). The relative expression levels of *GTPBP4* mRNA in EC9706, EC109 and KYSE-150 cells were 2.66 ± 0.32 , 4.62 ± 0.06 and 3.38 ± 0.17 , respectively, which were significantly higher than those in human esophageal epithelial cells (HEEC) (all $P < 0.001$); the relative expression levels of *GTPBP4* protein in EC9706, EC109 and KYSE-150 cells were 2.46 ± 0.56 , 3.95 ± 0.36 and 3.18 ± 0.10 , respectively, which were significantly higher than those in HEEC ($P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.001$). The expressions of *GTPBP4* mRNA and *GTPBP4* protein in EC109 cells significantly decreased after *GTPBP4* gene silencing ($P < 0.05$, $P < 0.001$). After *GTPBP4* gene silencing, the proliferation ability of EC109 cells significantly decreased, the proportion of cells in G_0/G_1 phase significantly increased, and the proportion of cells in S phase significantly decreased (all $P < 0.001$); and survival rates and 50% inhibiting concentration (IC_{50}) of EC109 cells both significantly decreased after different concentrations of cisplatin or 5-FU were further added (all $P < 0.05$). Meanwhile, the number of invasion cells significantly decreased both after *GTPBP4* gene silencing only and *GTPBP4* gene silencing plus the treatment with cisplatin ($P < 0.001$, $P = 0.001$). **Conclusion:** *GTPBP4* gene is highly expressed in human esophageal cancer. The lentiviral vector, LV-*GTPBP4*-siRNA, can effectively inhibit the expression of *GTPBP4* gene in esophageal cancer EC109 cells, thus inhibiting cell proliferation and cell invasion ability, and enhancing the chemosensitivity of human esophageal squamous cancer cells.

[**Key words**] Esophageal carcinoma; *GTPBP4*; RNA interference; Lentivirus; Proliferation; Chemosensitivity

癌症是目前人类最致命的疾病之一,而食管癌在癌症导致的死亡中排名第 8,并且大约一半的病例发生在中国,食管鳞状细胞癌占食管癌病例的 90%^[1-2]。手术辅以放化疗的综合治疗手段是目前临床绝大多数中晚期食管癌患者的主要治疗措施,并且新辅助化疗改善了食管癌患者的预后,大大提高了患者术后 5 年的生存率^[3-4]。因此,如何有效提高肿瘤对化疗药物的敏感性已经成为当前食管癌研究的一个新方向。

GTP 结合蛋白 4(GTP binding protein 4, *GTPBP4*) 是一种定位于核仁的新型 G 蛋白,参与核糖体 60S 亚基合成和成熟的鸟苷三磷酸酶(guanosine triphosphatase, *GTPase*)的一个新成员,与细胞增殖和生长密切相关,是近年发现的凋亡抑制基因^[5-6]。目前仅少部分研究发现 *GTPBP4* 可能对结肠癌^[7]、神经胶质瘤^[8]的生物学行为有一定影响,但有关 *GTPBP4* 在食管癌中的研究相对较少,有关其在食管癌化疗敏感性方面的研究更是鲜见。本研究首先通过 GEO 数据库,分析食管癌患者组织中 *GTPBP4* 的表达情况,然后将 LV-*GTPBP4*-siRNA 干扰慢病毒转染至食管癌 EC109 细胞,观察沉默 *GTPBP4* 基因后对细胞增殖、细胞周期、侵袭能力及化疗敏感性的影响,为食管癌基础和临床研究提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人食管黏膜上皮细胞系(human esophageal epithelial cell, HEEC)及食管癌细胞系 EC109、EC9706 和 KYSE-150 均购自中国细胞资源库(北京),液氮中保存。DMEM 培养基及胎牛血清 FBS 购自中国 Gibco 公司;pGCSIL-GFP/LV-*GTPBP4*-siRNA 慢病毒载体购自上海吉凯基因科技有限公司;氟尿嘧啶(5-Fu, 每支 250 mg, 批号:1236),为天津金耀氨基酸有限公司产品;顺铂(100 mg, 货号:J-SD8810-100),为上海研谨生物有限公司产品。CCK8 试剂购自武汉默沙克生物科技有限公司;TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;PCR 引物序列购自上海生工生物股份有限公司;cDNA 反转录反应试剂盒和 SYBY Green PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡试剂盒购自美国 BD 公司;兔多克隆抗体 *GTPBP4* 和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔二抗购自中国武汉 proteintech 公司;细胞裂解及蛋白抽提试剂、蛋白浓度检测试剂考马斯亮蓝、Western blot 配胶试剂盒购自江苏碧云天生物技术有限公司;PVDF 膜、ECL 发光液购自美国 Millipore 公司。Transwell 小室购自美国 Millipore 公司;Matrigel 购自美国 BD 公司。

流式细胞仪购自美国 BD 公司;PCR 扩增仪购自美国 MJ Research Inc 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人食管黏膜上皮细胞系 HEEC 及食管癌细胞系 EC109、EC9706 和 KYSE-150 均在含 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基中培养,于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱培养,用含 0.25% 的胰蛋白酶进行消化传代。

1.2.2 实时荧光定量 PCR(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测 *GTPBP4* mRNA 的表达 收集对数生长期的 4 种细胞,按 Trizol 操作说明书提取细胞总 RNA,检测及确定核糖核酸浓度,使用逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录为 cDNA。*GTPBP4* 基因的上游引物序列为 5'-GATGAAGTATGGCG-ACTCTCTCT-3',下游引物序列为 5'-GTATTCCGATCAATGGTTGGCA-3';内参照 β -actin 的上游引物序列为 5'-CATGTACGTTGCTATC-CAGGC-3',下游引物序列为 5'-CTCCTTAATGT-CACGCACGAT-3'(引物购自上海生工生物股份有限公司)。PCR 反应条件:95℃ 2 min;95℃ 15 s,60℃ 1 min;共 40 个循环。实验中每个样品重复检测 3 次,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值表示目的基因的相对表达量。

1.2.3 Western blot 检测 *GTPBP4* 蛋白的表达 收集对数生长期的 4 种细胞,根据蛋白提取试剂盒操作说明提取细胞总蛋白,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,SDS-PAGE 凝胶电泳分离,转膜,封闭,加入一抗(*GTPBP4*:1:1 000),4℃ 摇床孵育过夜,加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗 IgG(1:2 000),室温下孵育 1.5 h,化学发光仪上进行显色, β -actin 作为内参,利用 Image J 图像分析系统测定各条带灰度值,以目的蛋白条带灰度值与内参照 β -actin 条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达水平。

1.2.4 慢病毒感染 EC109 细胞 取处于对数生长期的 EC109 细胞,胰酶消化,制成细胞悬液,以 1.5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,37℃、5% CO₂ 培养箱中培养至细胞融合度达到约 30%;根据制造商的指南进行感染,感染复数值(multiplicity of infection, MOI)为 10,加入适宜量 LV-*GTPBP4*-siRNA 病毒,设为干扰组(LV-*GTPBP4*-siRNA 组);阴性对照组转染含有非特异性干扰序列的阴性病毒(LV-NC 组);未做任何处理的细胞为空白对照组(NC 组)。感染 72 h 后显微镜下观察细胞荧光表达情况,荧光率大于 80%,收集各组细胞提取 RNA 和蛋白,以实时 PCR 和 Western blot 检测沉默效率;感染效率低于 80%

的实验组,重新进行感染实验。

1.2.5 CCK-8 检测细胞增殖能力 取慢病毒感染 72 h 后的 3 组 EC109 细胞,经胰蛋白酶消化成细胞悬液,以每孔 1×10^5 个细胞接种于 96 孔板中,每孔接种 100 μ L,每组设 5 个复孔,96 孔板放入孵箱内继续培养 24、48、72 h 后,更换新鲜无血清培养基 100 μ L,各孔加入 CCK-8 溶液 10 μ L,放入 37℃ 孵箱继续培养 4 h,用酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度(optical density, OD),使用 GraphPad Prism 7.0 软件绘制细胞生长抑制曲线。

1.2.6 流式细胞法检测细胞周期分布 慢病毒感染后 72 h 的 3 组 EC109 细胞,胰酶消化并收集 3 组细胞,用 PBS 洗涤并重悬细胞,细胞密度为 2×10^5 个/mL,取 1 mL 单细胞悬液,离心去上清,加入 1 mL 70% 的预冷乙醇,4℃ 固定过夜。染色前用 PBS 洗涤 2 次,加入 100 mg/L 的 RNaseA,37℃ 水浴 30 min。再加入 500 μ L(50 mg/L)的碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色液混匀,4℃ 避光反应 30 min 后,转移至流式细胞仪进行检测,每组重复 3 次。

1.2.7 CCK8 检测 EC109 细胞对化疗药物的敏感性 慢病毒感染 72 h 后收集 NC 组、LV-NC 组和 LV-*GTPBP4*-siRNA 组细胞,接种于 96 孔板中,每孔约 2×10^3 个细胞,继续培养 24 h 细胞贴壁后,分别加入 0、12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 μ mol 的顺铂,或 0、25、50、100、200、400 μ mol 的 5-氟尿嘧啶,其中 0 μ mol 为对照组,同时设立空白组(只含培养基不含药物和细胞)进行校正,每组样品 5 个复孔。继续培养 48 h 后,每孔加入 CCK8 溶液 10 μ L,继续培养 4 h,用酶标仪检测 450 nm 波长处的 OD 值,细胞存活率(cell survival rate, CSR) = $(OD_{LV-GTPBP4-siRNA组} - OD_{空白组}) / (OD_{NC组} - OD_{空白组}) \times 100\%$,细胞抑制率(cell inhibition, CI) = 1 - 细胞存活率。使用 GraphPad Prism 7.0 软件计算细胞的半数抑制浓度(50% inhibiting concentration, IC₅₀)及绘制细胞存活率曲线。

1.2.8 Transwell 小室实验检测细胞侵袭能力 用 DMEM 培养液将预包被基质胶 Matrigel 稀释(1:6),取 80 μ L 加入至 Transwell 上室,37℃ 放置过夜。慢病毒感染 72 h 后收集 NC 组、LV-NC 组和 LV-*GTPBP4*-siRNA 组细胞,接种于 6 孔板中,每孔约 5×10^4 个细胞,继续培养 24 h,分别加入终浓度为 3 μ g/mL 的顺铂,继续培养 48 h 后,胰酶消化制备成每孔 4×10^4 个细胞悬液,接种至 Transwell 上室铺匀(已铺基质胶),下室加入 600 μ L 含 20% FBS 的

DMEM 培养液,在 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养 24 h,取出 Transwell 小室,用棉签拭去聚碳酸酯膜表面的 Matrigel 胶,PBS 冲洗,4% 的多聚甲醛固定 20 min,0.1% 结晶紫染色 30 min,PBS 冲洗晾干,在荧光显微镜下计数穿过基质胶的细胞,以此反映细胞的侵袭能力。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 7.0 对实验数据进行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 Shapiro-Wilk (S-W) 检验进行正态分布检验, $P > 0.05$ 时,数据服从正态分布。Levene 检测进行方差齐性检验, $P > 0.05$, 方差齐性。本研究数据符合正态分布,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间

两两多重比较采用最小显著性差异法。沉默 *GT-PBP4* 基因对细胞的生长抑制作用数据,采用双因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 GEO 数据库分析 *GTPBP4* 在人食管癌组织中的表达

GEO 数据库中分析 16 例人正常食管组织及配对 16 例食管癌组织中 *GTPBP4* 的表达情况。结果表明,人食管癌组织中 *GTPBP4* 明显高于正常食管组织($P < 0.001$) (图 1)。以上结果提示,*GTPBP4* 基因作为癌基因,可能与食管癌的发生和发展相关。

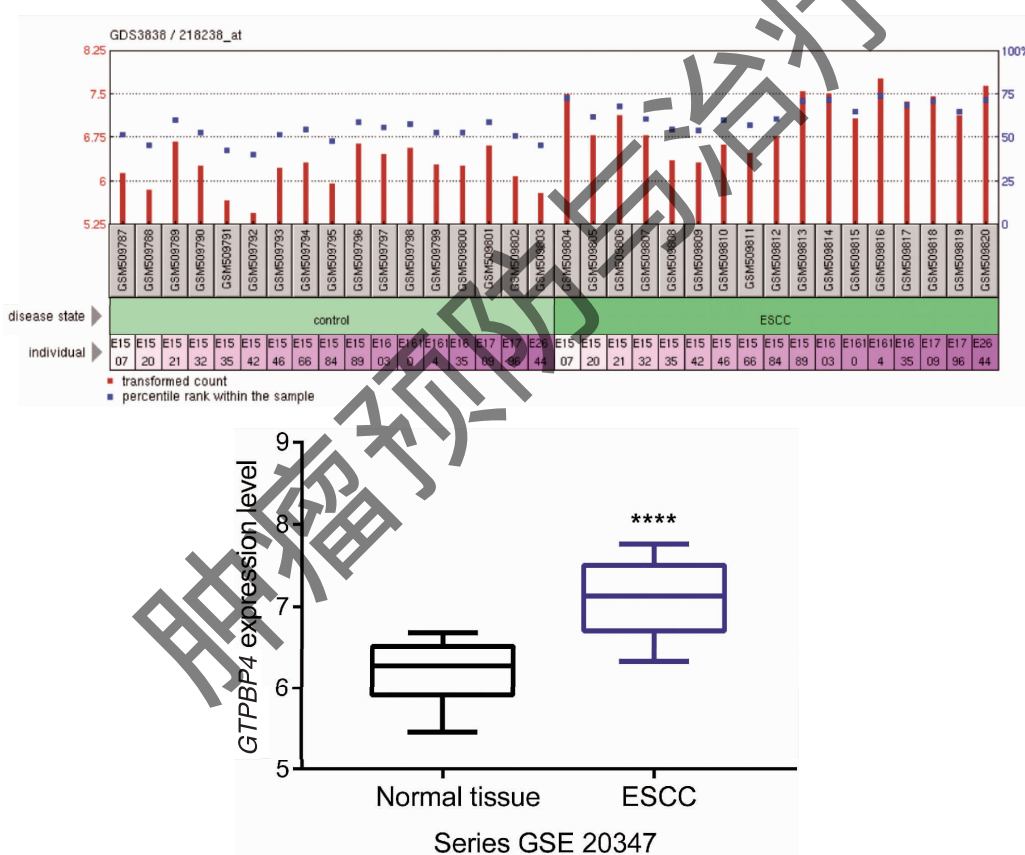


图1 GEO数据库分析 *GTPBP4* 在人食管癌组织中的表达(**** $P < 0.001$)

Figure 1. Expression of *GTPBP4* in Human Esophageal Carcinoma Based on GEO Database (**** $P < 0.001$)

2.2 人食管黏膜上皮细胞和食管鳞癌细胞系 GT-PBP4 的表达

RT-qPCR 和 Western blot 法检测人食管黏膜上皮细胞系 HEEC 及食管癌细胞系 EC9706、EC109 和 KYSE-150 细胞 *GTPBP4* mRNA 和蛋白表达水平。EC9706、EC109 和 KYSE-150 细胞 *GTPBP4* mRNA 相对表达水平分别为 2.66 ± 0.32 、 4.62 ± 0.06 、

3.38 ± 0.17, 明显高于 HEEC 细胞 (均 $P < 0.001$) (图 2A); EC9706、EC109 和 KYSE-150 细胞 *GTPBP4* 蛋白相对表达水平分别为 2.46 ± 0.56、3.95 ± 0.36、3.18 ± 0.10, 明显高于 HEEC 细胞 ($P < 0.01, P < 0.001, P < 0.001$) (图 2B、C), 其中 EC109 细胞 *GTPBP4* mRNA 和蛋白表达水平较 EC9706 和 KYSE-150 细胞升高更为明显, 故以 EC109 细胞系

作为进一步研究的对象。

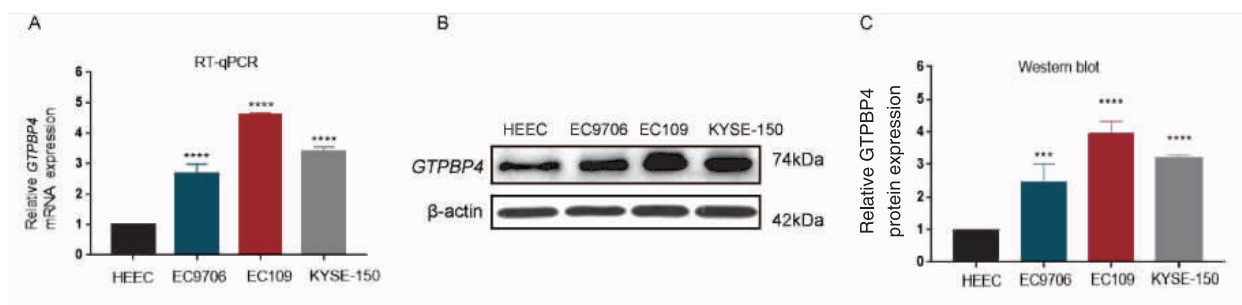


图2 人食管黏膜上皮细胞和食管鳞癌细胞系 *GTPBP4* 的表达 (*** $P < 0.01$, **** $P < 0.001$)

Figure 2. Levels of *GTPBP4* in HEEC and Three Esophageal Squamous Cells (*** $P < 0.01$, **** $P < 0.001$)

A. The expression of *GTPBP4* mRNA was detected by RT-qPCR; B. The expression of *GTPBP4* protein was detected by Western blot; C. Relative expression of *GTPBP4* protein.

HEEC: Human esophageal epithelial cells; RT-qPCR: Real-time quantitative polymerase chain reaction.

2.3 *GTPBP4* 基因沉默效果的测定

实时荧光定量 PCR 检测结果显示,与 NC 组 (1.00 ± 0.00) 比较, LV-*GTPBP4*-siRNA 组 (0.62 ± 0.06) EC109 细胞中 *GTPBP4* mRNA 相对表达量明显下降,差异有统计学意义 ($P = 0.030$), NC 组与 LV-NC 组之间的差异无统计学意义 ($P = 0.930$) (图 3A)。

Western blot 法检测结果显示,与空白对照组 (101.30 ± 4.00) 比较, LV-*GTPBP4*-siRNA 组 (48.22 ± 2.84) EC109 细胞中 *GTPBP4* 蛋白的相对表达量明显下调,差异有统计学意义 ($P < 0.001$), NC 组与 LV-NC 组之间的差异无统计学意义 ($P = 0.550$) (图 3B、C)。

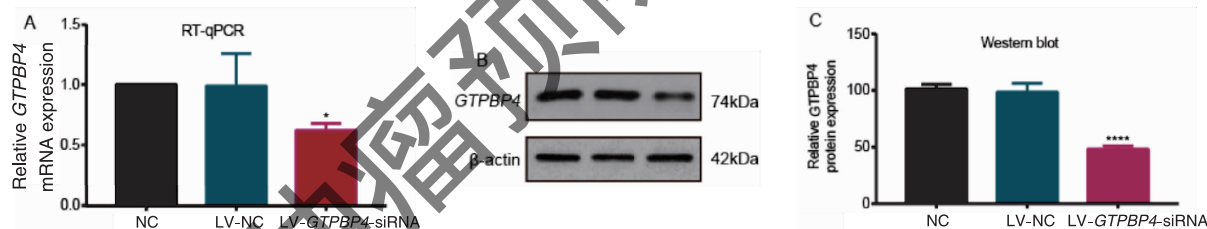


图3 实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法分别检测沉默 *GTPBP4* 表达后 EC109 细胞中 *GTPBP4* mRNA 和蛋白的表达水平变化 (* $P < 0.05$, **** $P < 0.001$)

Figure 3. Changes in *GTPBP4* mRNA and Protein Expression Levels in EC109 Cells after Silencing *GTPBP4* Gene Detected by RT-qPCR and Western Blot (* $P < 0.05$, **** $P < 0.001$)

A. *GTPBP4* mRNA expression was detected by RT-qPCR; B. *GTPBP4* protein expression was detected by Western blot; C. Relative expression of *GTPBP4* protein.

Abbreviations as indicated in Figure 2.

2.4 CCK8 实验检测细胞增殖能力及流式细胞法检测细胞周期

CCK8 法分别比较 24、48 和 72 h 时 3 组细胞生长抑制率, 双因素方差分析, $F_{\text{组间}} = 366.500$, $P < 0.001$, $F_{\text{时间}} = 8097.000$, $P < 0.001$, $F_{\text{组间} \times \text{时间}} = 98.410$, $P < 0.001$, 差异有统计学意义。分别比较各时间点 3 组细胞生长抑制率, 24 h 时 3 组细胞的生长抑制率差异无统计学意义 ($P = 0.094$); 与 NC 组比较, LV-*GTPBP4*-siRNA 组 EC109 细胞在 48 h、

72 h 生长抑制明显, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.001$), 而 NC 组与 LV-NC 组之间的差异无统计学意义 ($P = 0.063$, $P = 0.063$)。组间比较: 与 NC 组相比, LV-*GTPBP4*-siRNA 组细胞生长受到明显抑制 ($P < 0.001$) (图 4A)。以上结果提示, 沉默 *GTPBP4* 基因表达可使食管癌 EC109 细胞的增殖能力降低。

流式细胞法检测结果显示: 与 NC 组比较 (55.31 ± 0.43)%, LV-*GTPBP4*-siRNA 组 EC109 细胞周期 G_0/G_1 期的细胞数增多 (70.62 ± 1.21)%, 而 S 期细

胞数减少, 分别为 $(26.10 \pm 0.76)\%$, $(19.27 \pm 1.17)\%$, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$) (图

4B、C)。上述结果表明, 沉默 *GTPBP4* 基因表达可诱导细胞出现 G_1 期阻滞, 从而抑制细胞的增殖。

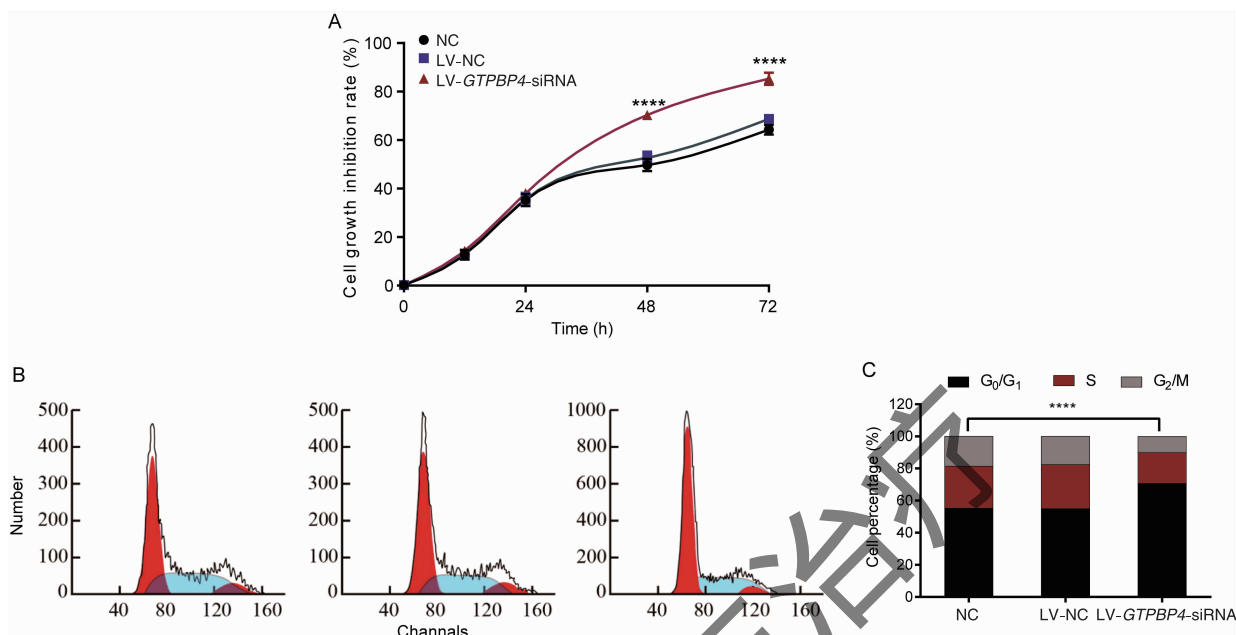


图4 CCK8 法和流式细胞法检测沉默 *GTPBP4* 基因对 EC109 细胞生长抑制和细胞周期的影响 (**** $P < 0.001$)

Figure 4. Growth Inhibition and Cell Cycle of EC109 Cells after Silencing *GTPBP4* Gene Detected by CCK8 and FCM Assay (**** $P < 0.001$)

A. Cell growth; B. Cell cycle; C. Cell percentage.

CCK8: Cell Counting Kit-8; FCM: Flow cytometric.

2.5 CCK8 检测 EC109 细胞对化疗药物的敏感性

慢病毒感染 EC109 细胞后加入不同浓度顺铂或 5-氟尿嘧啶, 结果表明, 随着药物浓度增加, 细胞的存活率逐渐下降。顺铂处理后 NC 组 IC_{50} 为 $185.60 \mu\text{mol/L}$, LV-*GTPBP4*-siRNA 组 IC_{50} 为 $150.10 \mu\text{mol/L}$;

5-氟尿嘧啶处理后 NC 组 IC_{50} 为 $402.20 \mu\text{mol/L}$, LV-*GTPBP4*-siRNA 组 IC_{50} 为 $203.10 \mu\text{mol/L}$, 两者差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 5)。结果表明, 沉默 *GTPBP4* 基因表达后细胞对两种化疗药物更加敏感。

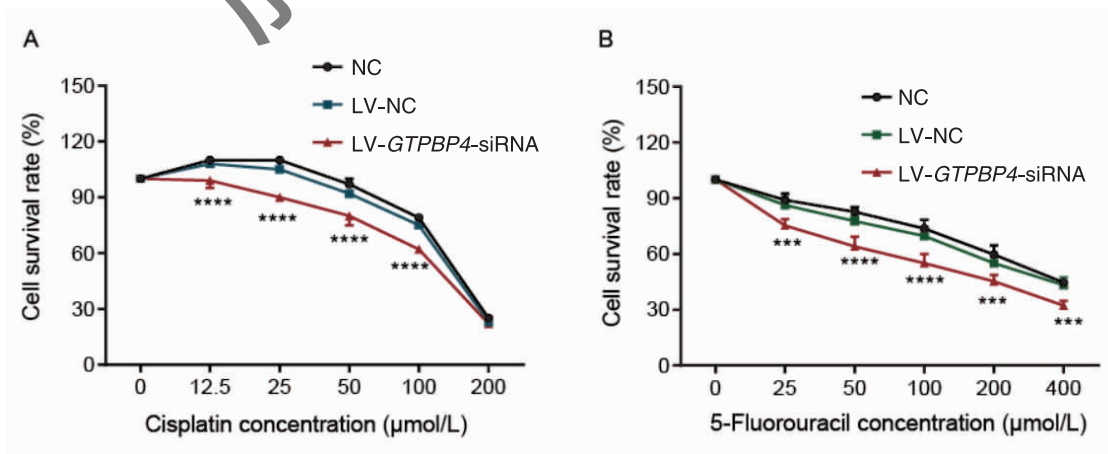


图5 CCK8 法检测沉默 *GTPBP4* 基因后 EC109 细胞的化疗敏感性 (**** $P < 0.001$, *** $P < 0.01$)

Figure 5. Chemosensitivity of EC109 Cells after Silencing *GTPBP4* Gene Detected by CCK8 (**** $P < 0.001$, *** $P < 0.01$)

A. Cell survival rate after being treated with different concentrations of cisplatin; B. Cell survival rate after being treated with different concentrations of 5-FU.

2.6 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

Transwell 小室侵袭实验检测结果显示,慢病毒感染 EC109 细胞后,细胞的侵袭能力发生了改变,与 NC 组(976.00 ± 17.58)相比,LV-*GTPBP4*-siRNA 组的穿膜细胞数量(518.00 ± 54.49)明显减少,差异有统计学意义($P < 0.001$)(图 6A、B)。慢病毒感

染 EC109 细胞联合化疗药物顺铂处理后,与 NC 组(701.00 ± 84.66)相比,LV-*GTPBP4*-siRNA 组的穿膜细胞数量(354.30 ± 49.69)明显减少,差异有统计学意义($P = 0.001$)(图 6C、D)。以上结果提示沉默 *GTPBP4* 基因表达,可明显增加顺铂抑制食管癌细胞侵袭的能力,提高药物敏感性。

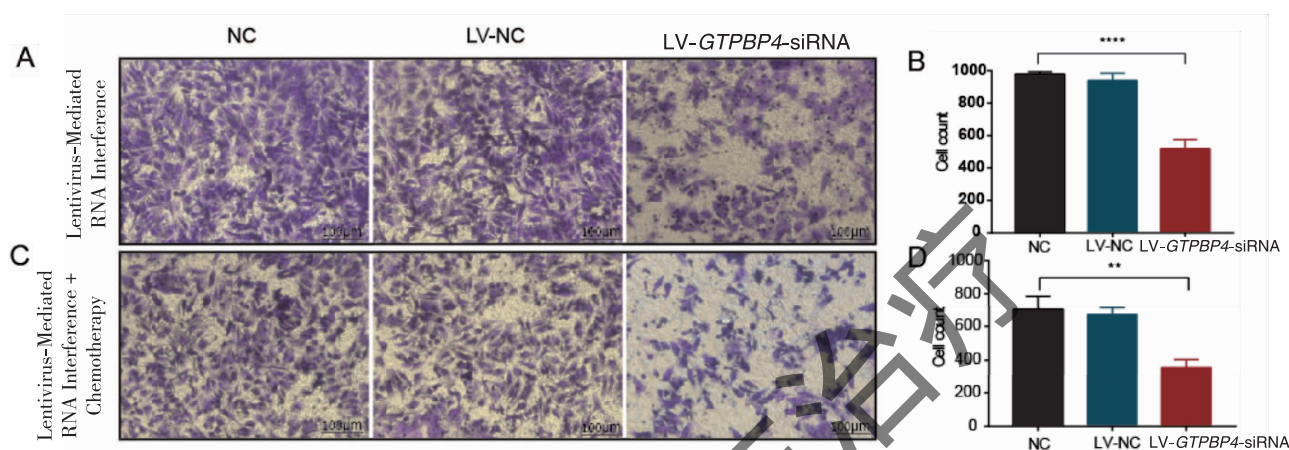


图 6 Transwell 侵袭实验检测沉默 *GTPBP4* 基因表达联合顺铂对 EC109 细胞体外侵袭能力变化 (**** $P < 0.001$, ** $P = 0.001$)

Figure 6. Effects of *GTPBP4* Gene Silencing and Cisplatin on the Invasion Ability of EC109 Cells Detected by Transwell Invasion Assay (**** $P < 0.001$, ** $P = 0.001$)

Panel A and C show results observed under an inverted microscope; panel B and D show the number of invasion cells.

3 讨论

GTPBP4,也称为慢性肾功能衰竭蛋白(chronic renal failure gene protein, CRFG),是由 10 号染色体长臂 14-15 区(10q15-14)编码、由 633 个氨基酸组成的重要功能蛋白,是一种定位于核仁的新型 G 蛋白,故也称作核仁 GTP 结合蛋白 1(nucleolar GTP-binding protein 1, NOG1)^[9-10]。当前,对于该基因的研究较少,许多机制功能需要进一步探究,目前研究显示该蛋白主要参与核糖体 60S 亚基的合成和成熟,还和肾病末期的发展有密切关系^[11-12]。但是对于该基因和肿瘤的关系研究较少。有研究发现,在神经胶质瘤细胞株中,*GTPBP4* 表达水平下调,转染 *GTPBP4* 过表达质粒后,可明显降低雪旺氏细胞生长、DNA 合成及裸鼠成瘤的能力,进一步研究发现,*GTPBP4* 抑制细胞增殖的能力是通过调节 Merlin 蛋白、CyclinD1 蛋白实现的,从而扮演抑癌基因角色^[8]。但也有研究和上述结果不一致,在乳腺癌中,*GTPBP4* 呈高表达,且与预后差、生存期短呈正

相关^[13-14]。另有研究发现:在胃癌组织、多种胃癌细胞株中 *GTPBP4* 表达均升高,*GTPBP4* 高表达与胃癌患者的临床分期、肿瘤侵袭、淋巴结转移和远处转移密切相关,下调 *GTPBP4* 表达后,胃癌细胞株 MKN-45 及 AGS 的增殖能力及克隆形成减低、凋亡增加^[15],提示该蛋白可能在肿瘤中承担潜在癌基因角色。

基于以上研究发现,*GTPBP4* 在恶性肿瘤中的表达水平不同(下调或上调),提示 *GTPBP4* 可能是一种癌基因或抑制基因,主要依赖于特定的肿瘤类型。而到目前为止,*GTPBP4* 与食管癌关系及食管癌化疗药物敏感性方面的探讨尚未被研究。所以,综合以上研究,我们首先利用 GEO 数据库^[16],发现食管癌组织中 *GTPBP4* 表达水平明显高于正常对照组。为了证实这一现象,我们利用人食管黏膜上皮细胞系 HEEC 及食管癌细胞系 EC9706、EC109 和 KYSE-150 细胞系,检测 *GTPBP4* mRNA 和蛋白表达水平,结果发现与正常食管黏膜上皮细胞 HEEC 相比,*GTPBP4* 在食管鳞癌细胞系 EC9706、EC109 和

KYSE-150 中的表达明显升高,并且 EC109 细胞中 *GTPBP4* 表达水平升高更为明显,故以 EC109 细胞系作为下一步研究的对象。进一步,我们利用慢病毒载体 LV-*GTPBP4*-siRNA 感染 EC109 细胞,从而靶向沉默 *GTPBP4* 基因表达,采用 RT-qPCR 及 Western blot 实验检测基因沉默效果,结果发现沉默 *GTPBP4* 基因后,EC109 细胞的中 *GTPBP4* mRNA 及蛋白表达水平均明显下降,证实重组慢病毒可以有效沉默 *GTPBP4* 基因的表达。CCK8 法及流式细胞术检测结果显示,沉默 *GTPBP4* 基因表达可有效抑制 EC109 细胞的生长,诱导细胞出现 G₁ 期阻滞, S 期细胞明显减少,从而抑制细胞的增殖,与文献报道结果一致^[17]。

化疗是食管癌重要的辅助治疗手段,然而在化疗过程中,往往会出现化疗不敏感或者化疗缓解后复发^[18-19]。因此,寻找化疗抵抗时的生物学标志物和化疗增敏剂、恢复耐药肿瘤细胞的化疗敏感性具有重要意义。目前临床常用于食管癌化疗的药物是顺铂或氟尿嘧啶,本研究通过慢病毒感染食管癌 EC109 细胞并经化疗药物顺铂作用后观察细胞生长和侵袭能力变化。CCK8 法检测细胞增殖及 Transwell 侵袭实验结果显示,沉默 *GTPBP4* 基因联合顺铂或氟尿嘧啶使细胞的存活率及 IC₅₀ 显著降低,明显增加顺铂抑制食管癌细胞侵袭的能力,提示靶向沉默 *GTPBP4* 基因的 siRNA 和顺铂或氟尿嘧啶具有协同效应,能够大大改善食管癌细胞 EC109 对化疗药物的敏感性。

既往研究发现,核糖体生物合成受损会影响细胞功能,导致细胞应激反应,而这种应激反应是通过核糖体-Mdm2-p53 (ribosomal protein-Mdm2-p53, RP-Mdm2-p53) 途径,阻碍了 Mdm2 与 p53 结合,致使 p53 泛素化降解障碍,p53 通路激活,细胞周期停滞、损伤修复、自噬等,在肿瘤发生过程中有重要作用^[20-22]。另有研究发现,在具有野生型 p53 的乳腺癌个体中,*GTPBP4* 蛋白表达增加与患者生存率降低相关,提示 *GTPBP4* 可能是促癌基因,且可能是通过抑制 p53 信号通路发挥抑制肿瘤细胞增殖的作用^[17]。以上研究报道提示,*GTPBP4* 可能是促癌基因,且可能是通过调节 p53 信号途径来调节细胞周期,从而促进肿瘤细胞增殖、抑制凋亡而导致肿瘤的

发生发展。但对于本实验,该理论还需要我们进一步研究。

综上所述,本研究结果表明 *GTPBP4* 基因在食管鳞癌组织中高表达,LV-*GTPBP4*-siRNA 慢病毒载体可有效沉默食管癌 EC109 细胞中 *GTPBP4* 基因的表达,从而抑制细胞增殖,降低其侵袭能力,增强人食管鳞癌细胞对化疗药物的敏感性。虽然其作用机制还不是很明确,但该结果为 *GTPBP4* 在食管癌发生发展中的作用研究奠定了基础,提供了假设,为探索 *GTPBP4* 在食管癌化疗增敏及靶向治疗方面提供了新思路。

作者声明:本文全部作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任;并承诺论文中涉及的原始图片、数据资料等已按照有关规定保存,可接受核查。

学术不端:本文在初审、返修及出版前均通过中国知网(CNKI)科技期刊学术不端文献检测系统的学术不端检测。

同行评议:经同行专家双盲外审,达到刊发要求。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

文章版权:本文出版前已与全体作者签署了论文授权书等协议。

[参考文献]

- [1] Wang Z, Li C, Li Y, et al. DpdtbA-induced growth inhibition in human esophageal cancer cells involved inactivation of the p53/EGFR/AKT pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 7 (1): 1-15.
- [2] Wang SM, Abnet CC, Qiao YL. What have we learned from Linxian esophageal cancer etiological studies? [J]. Thorac Cancer, 2019, 10 (5): 1036-1042.
- [3] Chi YK, Chen Y, Li XT, et al. Prognostic significance of the size and number of lymph nodes on pre and post neoadjuvant chemotherapy CT in patients with pN0 esophageal squamous cell carcinoma: A 5-year follow-up study [J]. Oncotarget, 2017, 8 (37): 61662-61673.
- [4] Guo P, Wang S, Liang W, et al. Salvianolic acid B reverses multi-drug resistance in HCT-8/VCR human colorectal cancer cells by increasing ROS levels[J]. Mol Med Rep, 2017, 15 (2): 724-730.
- [5] Liu WB, Jia WD, Ma JL, et al. Knockdown of GTPBP4 inhibits cell growth and survival in human hepatocellular carcinoma and its

- prognostic significance [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (55) : 93984-93997.
- [6] Chouchana L, Fernández-Ramos AA, Dumont F, *et al.* Molecular insight into thiopurine resistance: Transcriptomic signature in lymphoblastoid cell lines[J]. *Genome Med*, 2015, 7 (1) :37-42.
- [7] 刘茂生,郑燕,吴水梅,等. GTP 结合蛋白 4 在肝癌中的表达及作用的初步研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2016, 43 (24) : 1083-1087.
- [8] Lee H, Kim D, Dan HC, *et al.* Identification and characterization of putative tumor suppressor NGB, a GTP-binding protein that interacts with the neurofibromatosis 2 protein[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27 (6) :2103-2119.
- [9] Yu H, Jin S, Zhang N, *et al.* Up-regulation of GTPBP4 in colorectal carcinoma is responsible for tumor metastasis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 480 (1) :48-54.
- [10] Lee S, Senthil-Kumar M, Kang M, *et al.* The small GTPase, nucleolar GTP-binding protein 1 (NOG1), has a novel role in plant innate immunity[J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1) :9260-9268.
- [11] Laping NJ, Olson BA, Zhu Y. Identification of a novel nuclear guanosine triphosphate-binding protein differentially expressed in renal disease[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2001, 12 (5) :883-890.
- [12] Currie D, McKnight AJ, Patterson CC, *et al.* Association of microsatellite markers on chromosomes 6q27 region and 10p15 region with end-stage renal disease in a UK renal transplant population [J]. *J Hum Genet*, 2009, 54 (8) :497-498.
- [13] Van de Vijver MJ, He YD, Van't V L, *et al.* A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2002, 347 (25) :1999-2009.
- [14] Pinto JA, Araujo J, Cardenas NK, *et al.* A 3-gene expression score as prognostic factor in triple negative and basal breast tumors with residual disease[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 32 (15) :S1097
- [15] Li L, Pang X, Zhu Z, *et al.* GTPBP4 promotes gastric cancer progression via regulating P53 activity [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45 (2) :667-676.
- [16] 郭亚,马红兵,王中卫,等. 基于 GEO 数据库及生物信息学方法筛选食管癌放射抗拒关键基因及通路[J]. *肿瘤预防与治疗*, 2018, 31 (4) :242-247.
- [17] Lunardi A, Di Minin G, Provero P, *et al.* A genome-scale protein interaction profile of Drosophila p53 uncovers additional nodes of the human p53 network[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107 (14) :6322-6327.
- [18] Hejleh TA, Abushahin L, Keech J, *et al.* Screening patients with esophageal cancer to determine eligibility for adjuvant treatment trials[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38 (9) :5247-5251.
- [19] Zhu G, Zhang L, Dan J, *et al.* Differential effects and mechanisms of local anesthetics on esophageal carcinoma cell migration, growth, survival and chemosensitivity [J]. *BMC Anesthesiol*, 2020, 20 (1) :126-134.
- [20] Stepinski D. Nucleolus-derived mediators in oncogenic stress response and activation of p53-dependent pathways[J]. *Histochem Cell Biol*, 2016, 146 (2) :119-139.
- [21] Sagar V, Caldarola S, Aria V, *et al.* PIM1 destabilization activates a p53-dependent response to ribosomal stress in cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (17) :23837-23849.
- [22] Scala F, Brighenti E, Govoni M, *et al.* Direct relationship between the level of p53 stabilization induced by rRNA synthesisinhibiting drugs and the cell ribosome biogenesis rate[J]. *Oncogene*, 2016, 35 (8) :977-989.