

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.10.019

胰岛素样生长因子结合蛋白相关蛋白 1 表达对鼻咽癌细胞系 CNE1 发生发展的研究

郑富春¹, 祁晓倩²

(陕西省安康市人民医院:1. 耳鼻咽喉科;2. 检验科 725000)

摘要:目的 探讨胰岛素样生长因子结合蛋白相关蛋白 1(IGFBP-rP1)对鼻咽癌细胞系 CNE1 细胞的增殖、侵袭、迁移能力的影响。方法 构建 2 条特异性针对 IGFBP-rP1 基因的小干扰 RNA(siRNA32、siRNA34)及其阴性对照 siRNA,将 CNE1 细胞分为 4 个转染组:siRNA32 组(siRNA32 转染)、siRNA34 组(siRNA34 转染)、阴性对照组(阴性对照 siRNA 转染)、空白组(不做任何处理),分别培养 24 h 或 48 h 后检测相关指标。结果 siRNA32 组和 siRNA34 组 IGFBP-rP1 mRNA 及蛋白表达水平显著低于阴性对照组和空白组($P < 0.05$); siRNA32 组和 siRNA34 组 CNE1 细胞迁移数、穿过 PVP-F 膜的 CNE1 细胞数显著低于阴性对照组和空白组($P < 0.05$);培养 24、48 h 后,siRNA32 组和 siRNA34 组 CNE1 细胞增殖 OD 值显著低于阴性对照组和空白组($P < 0.05$);培养 48 h 后,siRNA32 组和 siRNA34 组 G₀/G₁ 期、G₂/M 期细胞所占比例显著高于阴性对照组和空白组($P < 0.05$);siRNA32 组和 siRNA34 组 S 期细胞所占比例显著低于阴性对照组和空白组($P < 0.05$)。结论 抑制 IGFBP-rP1 表达能降低鼻咽癌 CNE1 细胞的增殖、侵袭、迁移能力,为临床治疗鼻咽癌提供一种新的思路。

关键词:胰岛素样生长因子结合蛋白相关蛋白 1; 鼻咽癌; CNE1 细胞

中图分类号:R765

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)10-1434-04

Inhibitory effect of IGFBP-rP1 expression on proliferation, invasion and migration of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE1

ZHENG Fuchun¹, QI Xiaolian²

(1. Department of Otorhinolaryngology; 2. Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Ankang, Ankang, Shangxi 725000, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of insulin-like growth factor binding protein related protein 1 (IGFBP-rP1) on proliferation, invasion and migration of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE1. **Methods** The construction of two small interfering RNA specific for IGFBP-rP1 gene (siRNA32, siRNA34) and negative control siRNA, CNE1 cells were divided into four groups: siRNA32 group (transfected with siRNA32 transfection), siRNA34 group (transfected with siRNA34), negative control group (negative control siRNA transfection) and blank group (no treatment). After training 24 h or 48 h, the related indexes were detected. **Results** The expression of IGFBP-rP1 mRNA and protein in siRNA32 group and siRNA34 group was significantly lower than that in negative control group and blank group ($P < 0.05$). The number of CNE1 cells in siRNA32 group and siRNA34 group was higher than that in PVE-F membrane ($P < 0.05$). The OD value of CNE1 cells in siRNA32 group and siRNA34 group was significantly lower than that in negative control group and blank group ($P < 0.05$). The OD value of CNE1 cells in siRNA32 group and siRNA34 group was significantly lower than that in negative control group and blank group ($P < 0.05$). The percentage of G₀/G₁ phase and G₂/M phase cells in siRNA32 group and siRNA34 group was significantly higher than that in negative control group and blank group ($P < 0.05$) was lower than the negative control group and the blank group ($P < 0.05$). **Conclusion** Inhibition of IGFBP-rP1 expression can reduce the proliferation, invasion and migration of nasopharyngeal carcinoma CNE1 cells, and provide a new idea for the clinical treatment of nasopharyngeal carcinoma.

Key words: insulin-like growth factor binding protein-associated protein 1; nasopharyngeal carcinoma;

CNE1 cells

鼻咽癌是耳鼻咽喉科较为常见的癌症之一,发病因素可能与当地湿热的环境气候及饮食偏辛辣有关^[1]。鼻咽癌病死率较高,目前临床多采用放射治疗,原发性鼻咽癌在提高患者生存率等方面取得了显著成效,但手术时间较长,预后不佳且易造成患者面容改变^[2]。通过抑制胰岛素样生长因子结合蛋白相关蛋白 1(IGFBP-rP1)的表达对鼻咽癌细胞系 CNE1 细胞的增殖、侵袭、迁移能力的影响,检测 CNE1 细胞半衰期变化情况和相关蛋白变异后性质的表达^[3]。现探讨在此蛋白基础上构建 2 条特异性针对 IGFBP-rP1 基因的小干扰 RNA(siRNA32、siRNA34),并采用各种临床检测技术对 IGFBP-rP1 基因和 CNE1 细胞的相关指标进行检测,分析抑制 IGFBP-rP1 基因的表达能有效治疗鼻咽癌且术后患者不易发生并发症。报道如下。

1 材料与方法

1.1 一般材料 本研究所用 CNE1 细胞购买自中南大学高等研究中心细胞实验室,转染质粒购买自上海吉玛公司。

1.2 仪器与试剂 (1)材料:鼻咽癌细胞系 CNE1 细胞,空白载体,2 条特异性针对 IGFBP-rP1 基因的小干扰 RNA(siRNA32、siRNA34),转录酶和逆转录酶。(2)试剂:Trizol 试剂,秋水仙素,龙胆紫溶液,无酶 RNA 冲洗液,SYBR Green 1 染料,上游引物,下游引物,dNTP。(3)RT-PCR、Western blot 检测试剂:30 g 丙烯酰胺和 0.8 g N,N'-亚甲丙烯酰胺、4 × Tris · Cl/SDS, pH 8.8、4 × SDS 电泳缓冲液,TEMED(N,N,N',N'-四甲基乙二胺),10%过硫酸铵。(4)四甲基偶氮唑蓝(MTT)检测试剂:MTT 0.5 g,100 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)或无酚红培养基。(5)肿瘤细胞重组基底膜侵袭实验试剂:无血清 DMEM,1%胎牛血清 DMEM,1640 完全培养基(也可加到 20%血清),无菌 PBS,胰酶,4%多聚甲醛固定液或甲醇,结晶紫染液[0.1%(g/mL)PBS 结晶紫]。(6)细胞运动实验:等渗盐水,细胞运动导板。(7)流式细胞仪技术实验试剂:秋水仙素。

1.3 siRNA 设计与构建 将 IGFBP-rP1 基因的 DNA 双螺旋结构通过解螺旋酶进行催化裂解打开成单链后,对其中之一的单链进行逆转录获得 RNA,将此 RNA 进行 PCR 扩增后得到多条单链 RNA,向这些多条 RNA 中加入 rRNA 进行蛋白质翻译后,再利用 mRNA 进行核糖体加成,然后形成 siRNA^[4]。

1.4 细胞培养及转染 将 CNE1 细胞置入琼脂培养基中放入细胞保温箱进行传代培养,将培养后的细胞随机分为 4 组即阴性对照组、空白组、siRNA32 组

(siRNA32 转染)、siRNA32 组(siRNA34 转染)。其中空白组不做任何处理;阴性对照 siRNA 转染;siRNA32 组与 siRNA32 组分别转染 siRNA32 转染和 siRNA34 转染。分别采用 RT-PCR、Western blot 检测各组 IGFBP-rP1 mRNA 及蛋白的表达水平,使用细胞运动实验检测 CNE1 细胞的迁移能力,应用肿瘤细胞重组基底膜侵袭实验检测 CNE1 细胞的侵袭能力、MTT 法检测 CNE1 细胞的增殖能力、流式细胞仪技术检测细胞周期。8~10 周期后分别对 4 组实验结果进行统计,分析数据结果。

1.5 检测方法

1.5.1 RT-PCR 检测方法 4 组细胞分别进行 RT-PCR 法检测,取冻存 CNE1 细胞,5 000 r/min 离心 40 min 后放入无酶 RNA,应用无酶 RNA 对各组细胞进行加速繁殖后,只去除较多的传代培养的各组细胞进行观察。

1.5.2 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测方法 4 组细胞分别进行 Western blot 法检测,将培养的 CNE1 细胞放在 2 块干净的玻璃平板之间离心后备用,配制好的甲基丙烯酸酯分离胶液体并脱气,然后放入 13%的过硫酸铵和 TEMED,轻轻搅拌,混匀。按所需分离的蛋白质分子大小选择合适的甲基丙烯百分比浓度,以上 2 种材料进行充分混合后将分离的 CNE1 细胞与混合液一起 37 °C 温水中孵育 40 min,充分清洗,再将硝酸纤维素膜与 CNE1 细胞混合显色。

1.5.3 细胞运动实验 4 组细胞分别进行细胞运动实验,取冻存 CNE1 细胞,12 000 r/min 离心 30 min 后应用等渗盐水制作等渗液细胞运动导板,CNE1 细胞悬液滴在导板的同一高度,观察各组细胞的运动情况^[5]。

1.5.4 肿瘤细胞重组基底膜侵袭实验 4 组细胞分别进行肿瘤细胞重组基底膜侵袭实验,取冻存 CNE1 细胞 10 000 r/min 离心 40 min,应用基质胶铺板制备 CNE1 细胞悬液,检测各组细胞侵袭情况^[6]。

1.5.5 MTT 法 4 组细胞分别进行 MTT 法检测,取冻存 CNE1 细胞 15 000 r/min 离心 40 min,每 0.2 mL Trizol 试剂裂解样本中加入 0.15 mL 氯仿进行裂解操作,26 °C 水浴加热采用无酶 RNA 冲洗液进行洗涤,再次 15 000 r/min 离心 10 min,获得 RNA,将此 RNA 进行逆转录后培养,检测各组细胞增殖情况^[7]。

1.5.6 流式细胞仪技术 4 组细胞分别进行流式细胞仪技术实验,取冻存 CNE1 细胞 5 000 r/min 离心 45 min,向各组细胞中加入秋水仙素溶液,使细胞增殖的速度减缓从而使细胞固定在特定的细胞周期上,

检测各组细胞的细胞周期。

1.6 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较使用单因素方差分析法, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

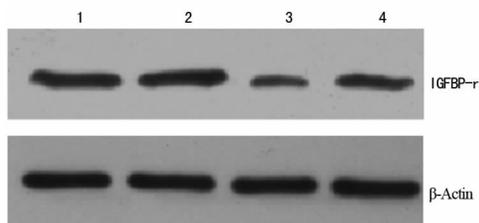
2 结 果

2.1 各组细胞 IGFBP-rP1 mRNA 及蛋白表达水平结果比较 阴性对照组和空白组 IGFBP-rP1 mRNA 及蛋白表达水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); siRNA32 组和 siRNA34 组 IGFBP-rP1 mRNA 及蛋白表达水平显著低于阴性对照组和空白组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1 和图 1。

表 1 各组 IGFBP-rP1 mRNA 及蛋白表达水平结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IGFBP-rP1 mRNA	IGFBP-rP1 蛋白
空白组	1.000 ± 0.054	1.000 ± 0.036
阴性对照组	0.986 ± 0.116	0.991 ± 0.101
siRNA32 组	0.182 ± 0.101 ^{ab}	0.204 ± 0.133 ^{ab}
siRNA34 组	0.191 ± 0.122 ^{ab}	0.230 ± 0.119 ^{ab}
<i>F</i>	117.629	98.675
<i>P</i>	<0.001	<0.001

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



注: 1 表示空白组; 2 表示阴性对照组; 3 表示 siRNA34 组; 4 表示 siRNA32 组

图 1 Western blot 法检测各组 IGFBP-rP1 蛋白表达水平

2.2 各组细胞 CNE1 细胞迁移能力结果比较 阴性对照组和空白组 CNE1 细胞迁移数目比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); siRNA32 组和 siRNA34 组 CNE1 细胞迁移数目显著低于阴性对照组和空白组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组细胞 CNE1 细胞迁移能力结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	CNE1 迁移细胞数目(个)	<i>F</i>	<i>P</i>
空白组	87.64 ± 7.11	87.628	<0.001
阴性对照组	85.10 ± 8.24		
siRNA32 组	34.16 ± 7.05 ^{ab}		
siRNA34 组	32.57 ± 6.90 ^{ab}		

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

2.3 各组细胞 CNE1 细胞侵袭能力结果比较 阴性对照组和空白组穿过 PVP-F 膜的 CNE1 细胞数目比

较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); siRNA32 组和 siRNA34 组穿过 PVP-F 膜的 CNE1 细胞数目显著低于阴性对照组和空白组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组细胞 CNE1 细胞侵袭能力结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	CNE1 细胞侵袭数目(个)	<i>F</i>	<i>P</i>
空白组	138.64 ± 16.87	61.044	<0.001
阴性对照组	135.20 ± 21.43		
siRNA32 组	51.61 ± 9.58 ^{ab}		
siRNA34 组	50.38 ± 10.32 ^{ab}		

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

2.4 各组细胞 CNE1 细胞增殖能力结果比较 培养 24、48 h 后, 阴性对照组和空白组 CNE1 细胞增殖 OD 值比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); siRNA32 组和 siRNA34 组 CNE1 细胞增殖 OD 值显著低于阴性对照组和空白组 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 各组细胞 CNE1 细胞增殖能力 OD 值结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h
空白组	0.544 ± 0.046	1.142 ± 0.163
阴性对照组	0.537 ± 0.059	1.126 ± 0.154
siRNA32 组	0.316 ± 0.074 ^{ab}	0.652 ± 0.177 ^{ab}
siRNA34 组	0.308 ± 0.091 ^{ab}	0.637 ± 0.147 ^{ab}
<i>F</i>	41.558	59.310
<i>P</i>	<0.001	<0.001

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

2.5 各组细胞 CNE1 细胞增殖周期结果比较 培养 48 h 后, siRNA32 组和 siRNA34 组 G₀/G₁ 期、G₂/M 期细胞所占比例显著高于阴性对照组和空白组 ($P < 0.05$); siRNA32 组和 siRNA34 组 S 期细胞所占比例显著低于阴性对照组和空白组 ($P < 0.05$)。见表 5。

表 5 各组细胞 CNE1 细胞增殖周期结果比较 [$\bar{x} \pm s, \%$]

组别	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
空白组	53.20 ± 2.69	43.50 ± 3.11	4.18 ± 0.77
阴性对照组	53.69 ± 2.84	43.18 ± 2.67	4.02 ± 0.91
siRNA32 组	71.15 ± 1.95 ^{ab}	18.43 ± 2.00 ^{ab}	11.76 ± 1.05 ^{ab}
siRNA34 组	72.03 ± 2.15 ^{ab}	18.16 ± 1.85 ^{ab}	11.51 ± 0.97 ^{ab}
<i>F</i>	42.056	78.294	71.042
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

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

3 讨 论

鼻咽癌病理病因目前认为与 3 种因素有关, 即遗传因素、病毒因素 (主要为 EB 病毒感染)、环境因素, 临床对鼻咽癌的治疗方法很多, 但治疗效果都不确

切,现抑制鼻咽癌相关基因的表达对鼻咽癌进行靶向治疗^[8]。

IGFBP-rP1 是一种近年来被发现的胰岛素样生长因子泛素偶联蛋白,该蛋白翻译携带的鼻咽癌基因的独特高表达性与鼻咽癌的发生、发展密切相关^[9]。IGFBP-rP1 通过 CNE1 细胞上皮间充质胚胎转化后在鼻咽癌疾病进程中起癌基因作用,IGFBP-rP1 能通过促鼻咽癌原癌基因表达而促进鼻咽癌细胞的增殖、转移、侵袭^[10-11]。本研究结果证实,IGFBP-rP1 对鼻咽癌细胞的干细胞特性具有调控作用,且证明 IGFBP-rP1 能经特异性 siRNA 载体而调控鼻咽癌相关基因的表达,实现其增强鼻咽癌干细胞特性的作用。本研究结果显示,可以通过抑制 IGFBP-rP1 表达而抑制鼻咽癌 CNE1 细胞的增殖、侵袭、转移。IGFBP-rP1 培养数天后细胞迁移能力较强,说明 IGFBP-rP1 表达后有较多 CNE1 细胞进行迁移,提示鼻咽癌在该基因的调控下可发生较快迁移至其他组织器官,甚至会累及到较多的淋巴细胞。

CNE1 细胞 RNA 中的琥珀酸还原酶,能使外源性 MTT 氧化还原为不溶性的甲瓚并沉积细胞,但死细胞无此功能^[12]。当细胞增殖时并不影响甲瓚在 CNE1 细胞中的数量,会随着细胞增殖而分裂增多,伴随细胞质中不断裂解为更小的粒子,当 CNE1 细胞增殖趋向最大化完成时,二甲基亚砜(DMSO)能溶解细胞中的甲瓚,用酶联免疫检测仪在 700 nm 波长处测定其光吸收值,可间接反映活 CNE1 细胞增殖的数量^[13-15]。本研究结果显示,IGFBP-rP1 相对表达量均值较低,说明表达基因产物与鼻咽癌的特异性较高。而 IGFBP-rP1 增殖较多 CNE1 细胞,说明该蛋白表达后鼻咽癌相关细胞会出现高增殖效率。不同细胞周期进行抑制 IGFBP-rP1 时所产增殖的细胞数量、迁移、侵袭性不同,表明在特定时期对该蛋白进行抑制能有效治疗鼻咽癌。

本研究创新性在于通过抑制 IGFBP-rP1 基因表达对鼻咽癌系细胞进行靶向定位治疗,可避免临床其他手术治疗的不确定性。该手术利用基因抑制法可增强患者预后,鼻咽癌系细胞增殖率、转移率、侵袭周围其他组织的概率极大地降低,值得临床其他难治性手术的借鉴。

综上所述,探讨抑制 IGFBP-rP1 可有效抑制鼻咽癌细胞系 CNE1 细胞的增殖、侵袭、迁移能力,安全可靠,值得临床推广使用。

参考文献

[1] 黄国森,胡学锋.鼻咽癌颅底骨质破坏放疗后的修复[J].

中国现代医学杂志,2015,25(4):102-106.

- [2] 陈宇翰,李先明.以乏氧诱导因子-1 α 及其信号通路为鼻咽癌治疗靶点的相关研究进展[J].广东医学,2015,36(15):2436-2438.
- [3] 刘炎霖,陈钰辉,刘富中,等.水茄泛素结合酶 E2 基因 StUBC ϵ 的克隆及黄萎病菌诱导表达分析[J].园艺学报,2015,42(6):1185-1194.
- [4] 陈学昭,张雷,于珊珊,等.松江鲈(*Trachidermus fasciatus*)泛素结合酶 E2-D2 基因的分子克隆及组织表达分析[J].海洋学报(中文版),2015,37(10):133-140.
- [5] 杨雨桦,何融泉,张昌文,等.表皮生长因子受体靶向治疗鼻咽癌的研究进展[J].广东医学,2015,36(18):2929-2931.
- [6] CHAUGULE V K, WALDEN H. Specificity and disease in the ubiquitin system[J]. Biochem Soc Trans, 2016, 44(1):212-227.
- [7] MILES J A, FROST M G, CARROLL E, et al. The fanconi anemia DNA repair pathway is regulated by an interaction between ubiquitin and the E2-like fold domain of FANCL[J]. J Biol Chem, 2015, 290(34):20995-21006.
- [8] HIRA A, YOSHIDA K, SATO K, et al. Mutations in the gene encoding the E2 conjugating enzyme UBE2T cause Fanconi anemia[J]. Am J Hum Genet, 2015, 96(6):1001-1007.
- [9] 贾招閃,申红妙,李正楠,等.基于 MTT 染色法对葡萄生单轴霉孢子囊存活力的检测[J].菌物学报,2016,35(8):939-945.
- [10] 周权明,杨小鹏,钱章林,等.机械吹打法、胰酶消化法分离新生大鼠脑组织神经干细胞效果观察[J].山东医药,2016,56(20):18-20.
- [11] 李红梅,李静,靳伟,等.新木脂素的酶法糖基化及抗肿瘤活性[J].南方医科大学学报,2015,35(11):1570-1574.
- [12] 林少雄,张永,鲁娟,等.干扰内皮素-1 可抑制鼻咽癌细胞增殖、迁移和侵袭[J].南方医科大学学报,2016,36(7):915-920.
- [13] 孙仕晨,董腾哲,黄昕,等. Transwell 共培养条件下诱导脂肪干细胞成骨能力的改变[J].中国组织工程研究,2016,20(28):4155-4161.
- [14] 纪晓方,李丽英,常娜.高内涵分析及 Western blotting 法在蛋白质核质分布研究中的应用及比较研究[J].首都医科大学学报,2016,37(5):616-620.
- [15] 唐广义,韩涛,殷东风,等.益气健脾抗癌法对结肠癌组织 PKC 及亚型 PKC δ 、PKC ϵ 蛋白表达的影响[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2016,23(3):366-370.

(收稿日期:2017-11-22 修回日期:2018-01-14)