

# ECRG4 对人喉鳞癌细胞 Hep-2 侵袭转移的影响及其分子机制\*

贾建平, 孙晓慧

(中国人民解放军北部战区空军医院, 辽宁 沈阳 110042)

**[摘要]** **目的:** 探讨 ECRG4 对人喉鳞癌细胞 Hep-2 侵袭转移能力的影响及机制。**方法:** 设计并构建 ECRG4 过表达载体,并转染 Hep-2 细胞,Real-time PCR 及 Western Blot 检测 Hep-2 细胞中 ECRG4 mRNA 和蛋白的表达;通过细胞划痕实验检测细胞迁移能力,Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭能力,应用 Western Blot 检测 NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白 NF- $\kappa$ B p65 在胞浆和胞核中的表达及转录因子 Snail、EMT 标志性分子 E-cadherin、N-cadherin、Vinmentin 蛋白表达。**结果:** 在 Hep-2 细胞中过表达 ECRG4 后,ECRG4 mRNA 与蛋白表达水平显著升高,划痕和 Tranwell 实验表明过表达 ECRG4 可抑制细胞的迁移和侵袭;同时过表达 ECRG4 可下调细胞核中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达,上调细胞浆中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达;过表达 ECRG4 可上调 EMT 上皮标志物 E-cadherin 蛋白,下调转录因子 Snail 及 EMT 间质标记物 Vimentin 和 N-cadherin 蛋白表达。**结论:** ECRG4 可能通过抑制 NF- $\kappa$ B/Snail 信号通路来抑制 EMT 的发生,进而抑制 Hep-2 细胞的侵袭转移。

**[关键词]** ECRG4; 喉肿瘤; 癌,鳞状细胞; 上皮间质转化; 细胞迁移; 细胞侵袭; 核因子  $\kappa$ B  
**[中图分类号]** R739.65    **[文献标识码]** A    **[文章编号]** 1000-2707(2019)02-0178-06  
**DOI:**10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.02.011

## Effects of ECRG4 on Invasion and Metastasis of Hep-2 cells and Its Molecular Mechanism

JIA Jianping, SUN Xiaohui

(PLA Air Force Hospital in the Northern War Zone, Shenyang 110042, Liaoning, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate effects of ECRG4 on invasion and metastasis of human laryngeal squamous cell carcinoma Hep-2 and its molecular mechanism. **Methods:** ECRG4 overexpression vectors were designed and constructed, and transfected into Hep-2 cells. Then the expression of ECRG4 mRNA and protein by Real-time PCR and Western blot were detected. The cell migration through the scratched wound healing assay were detected; the cell migration and invasion were detected by Transwell assay. In addition, the western blot was used to detect the protein expression of NF- $\kappa$ B signaling pathway associated protein NF- $\kappa$ B p65 in cytoplasm and nuclei. The protein expression of transcription factor Snail and EMT(epithelial to mesenchymal transition) molecule markers E-cadherin, N-cadherin, and Vinmentin were also detected. **Results:** The mRNA and protein expression level of ECRG4 increased significantly after overexpression of ECRG4 in Hep-2 cells. The results of Scratched wound healing assay and Tranwell assay showed that the overexpression of ECRG4 inhibited the cell migration and invasion. At the same time, overexpression of ECRG4 could down-regulate the protein expression of NF- $\kappa$ B p65 in nucleus and up-regulate the protein expression of NF- $\kappa$ B p65 in cytoplasm. In addition, overexpression of ECRG4 could up-regulate the expression of E-cadherin protein of EMT epitheli-

\*[基金项目] 辽宁省自然科学基金指导计划(201602757)  
网络出版时间:2019-02-28    网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190228.2130.011.html>

al marker and down-regulate the expression of Vimentin and N-cadherin protein of Snail and EMT interstitial markers. **Conclusion:** ECRG4 may inhibit the EMT occurrence by inhibiting the activation of NF- $\kappa$ B/Snail signaling pathway, thereby inhibiting the invasion and metastasis of Hep-2 cell.

[ **Key words** ] ECRG4; laryngeal neoplasm; carcinoma, squamous cell; epithelial to mesenchymal transition; cell migration, cell invasion; nuclear factor- $\kappa$ B

喉鳞状细胞癌源于喉部黏膜上皮,是第二常见的头颈部鳞状细胞癌<sup>[1]</sup>。目前,世界喉鳞状细胞癌发病率逐渐增加,尤其在年轻人中呈上升趋势<sup>[2]</sup>。喉部的特殊解剖结构使得喉鳞状细胞癌极易发生局部侵袭和颈淋巴结转移<sup>[3]</sup>,导致患者疾病复发和预后不良。食管癌相关基因4((ECRG4)是一种肿瘤候选抑制基因,在食管鳞癌、乳腺癌、结肠直肠癌和神经胶质细胞瘤中表达下调<sup>[4-6]</sup>,有报道其并可抑制头颈鳞癌<sup>[7]</sup>、肝癌<sup>[8]</sup>的增殖、迁移和侵袭,还可抑制喉鳞癌细胞的增殖、促进细胞凋亡<sup>[9]</sup>,但其机制尚不清楚。上皮间质转化(EMT)是上皮细胞从有极性不能移动的上皮细胞转化为间质细胞过程,细胞发生 EMT 后上皮标志物 E-cadherin 表达下调、EMT 间质标志物 N-cadherin、Vinmentin 表达上调,迁移和侵袭能力增加。本实验通过体外实验探究 ECRG4 对 Hep-2 细胞 EMT 发生、迁移和侵袭的影响及分子机制,以期阐明喉癌侵袭和转移的分子机制,提高喉癌的生存期和治愈率。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

胎牛血清购自以色列 Biological Industries( BI)公司,DMEM 培养基购自美国 Gibco,胰酶购自江苏碧云天生物技术研究,转染试剂 Lipofectamine® 2000 购自美国 Invitrogen,TRIpure 总 RNA 提取试剂、Super M-MLV 反转录酶均购自北京百泰克生物技术有限公司,SYBR Green 购自北京索莱宝科技有限公司,结晶紫购自美国 Amresco 公司,Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司,BCA 蛋白浓度测定试剂盒、ECRG4 抗体、E-cadherin 抗体、N-cadherin D1 抗体、Vinmentin 抗体、Snail 抗体、NF- $\kappa$ B p65 抗体均购自沈阳万类生物科技有限公司。

1.2 细胞培养及转染

人喉癌细胞 Hep-2 及 pcDNA3.1 载体均购自

万类生物科技有限公司。Hep-2 细胞用含 10 % 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37 ℃,5 % CO<sub>2</sub> 的培养箱内培养。将全长野生型 ECRG4 CDS 序列克隆入 pcDNA3.1 载体,构建 ECRG4 过表达载体( ECRG4-pcDNA3.1),基因测序证明载体构建成功。根据 Lipofectamine® 2000 操作说明转染 ECRG4-pcDNA3.1 质粒( ECRG4 组)或空载体质粒( Vector 组),并设立未转染 Hep-2 细胞组( Control 组)。

1.3 实时荧光定量 PCR 检测 ECRG4 的表达

利用总 RNA 提取试剂及 cDNA 合成试剂提取细胞总 RNA 并反转录至 cDNA,放入 Exicycler™ 96 荧光定量仪( BIONEER,韩国)进行荧光定量反应,采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup>法对 ECRG4 mRNA 进行定量分析。ECRG4 基因引物序列如下, ECRG4-F 为 5'-TGA-CATCACCTATTGGCTTA-3', ECRG4-R 为 5'-GAATCGCTATTTGCTTCTTG-3'; 内参基因  $\beta$ -actin-F 为 5'-CTTAGTTGCGTTACACCCTTCTTG-3',  $\beta$ -actin-R 为 5'-CTGTCACCTTCACCGTTCCAGTTT-3。

1.4 划痕实验检测细胞迁移能力

实验前将培养基换为无血清培养基并加入 1 mg/L 的丝裂霉素 C 处理 1 h,利用 200  $\mu$ L pipette tip 造成细胞划痕,用无血清培养基清洗细胞表面 1 次,显微镜下观察并按组拍照,记录照片中细胞的位置,记为 0 h,并换用无血清培养基于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中分别培养 24 h 进行再次拍照记录,记为 24 h,计算细胞迁移距离。

1.5 Transwell 实验检测细胞迁移能力

胰酶消化收集细胞,分别将 200  $\mu$ L 细胞悬液加入 Transwell 上室(细胞量 5  $\times$  10<sup>3</sup>/孔),下室加入含 20% 胎牛血清的培养液 800  $\mu$ L,置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养 24 h。甲醛固定,结晶紫染色,在倒置显微镜下计数迁移至微孔膜下层 5 个视野的细胞,取均数。

1.6 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

胰酶消化收集细胞,分别将 200  $\mu$ L 细胞悬液加入预先铺有 Matrigel 基质胶的 Transwell 上室(细胞量 2  $\times$  10<sup>4</sup>/孔),下室加入含 20 % 胎牛血清的培

养液 800  $\mu\text{L}$ 。置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度条件下培养 24 h, 甲醛固定, 结晶紫染色, 在倒置显微镜下计数侵袭至微孔膜下层 5 个视野的细胞, 取均数。

### 1.7 Western Blot 检测 ECRG4、Snail、E-cadherin、N-cadherin、Vinmentin 及胞浆和胞核蛋白中 NF- $\kappa\text{B}$ p65 蛋白表达

RIPA 裂解法提取样本总蛋白及细胞浆和细胞核蛋白, 采用 BCA 法对蛋白进行定量, 取 20 ~ 40  $\mu\text{g}$  蛋白上样, 行 SDS-PAGE 并转印至 PVDF 膜, 经 5% (M/V) 脱脂奶粉封闭 1 h 后, 加入适当稀释的 ECRG4、Snail、E-cadherin、N-cadherin、Vinmentin、NF- $\kappa\text{B}$  p65 抗体 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜孵育, TBST 缓冲液清洗 PVDF 膜, 放入二抗羊抗小鼠 IgG-HRP (1:5 000) 工作液中 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 45 min, ECL 底物发光, 采用凝胶图象处理系统 (Gel-Pro-Analyzer 软件) 分析目标条带光密度值。

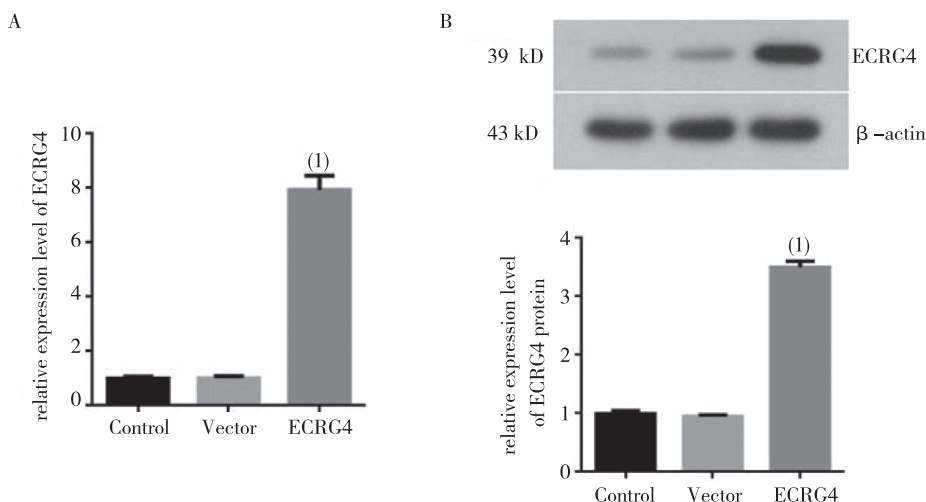
### 1.8 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析, 实验数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用独立样本  $t$  检验,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ECRG4 表达

ECRG4 组 Hep-2 细胞中 *ECRG4* mRNA 的表达较 Control 组及 Vector 组显著上调 ( $P < 0.01$ ), 见图 1A; ECRG4 蛋白在 Control 组及 Vector 组 Hep-2 细胞中呈现低表达, ECRG4 组 Hep-2 细胞中 ECRG4 蛋白表达较 Control 组及 Vector 组显著上调 ( $P < 0.01$ ), 与 mRNA 表达趋势基本一致, 见图 1B。



注: A 为 *ECRG4* mRNA 相对表达水平, B 为 ECRG4 蛋白表达水平; <sup>(1)</sup> 与 Control 组及 Vector 组比较,  $P < 0.01$

图 1 各组 Hep-2 细胞中 ECRG4 基因和蛋白表达水平

Fig. 1 Expression of ECRG4 gene and protein in Hep-2 cells

### 2.2 ECRG4 对 Hep-2 细胞迁移能力影响

细胞划痕检测 Hep-2 细胞迁移能力, 结果显示 ECRG4 组细胞迁移率较 Control 组及 Vector 组显著下降 ( $P < 0.01$ ), 见图 2A; Tanswell 实验检测 Hep-2 细胞迁移, 结果显示 ECRG4 组与 Control 组及 Vector 组相比细胞迁移数显著减少 ( $P < 0.01$ ), 见图 2B。

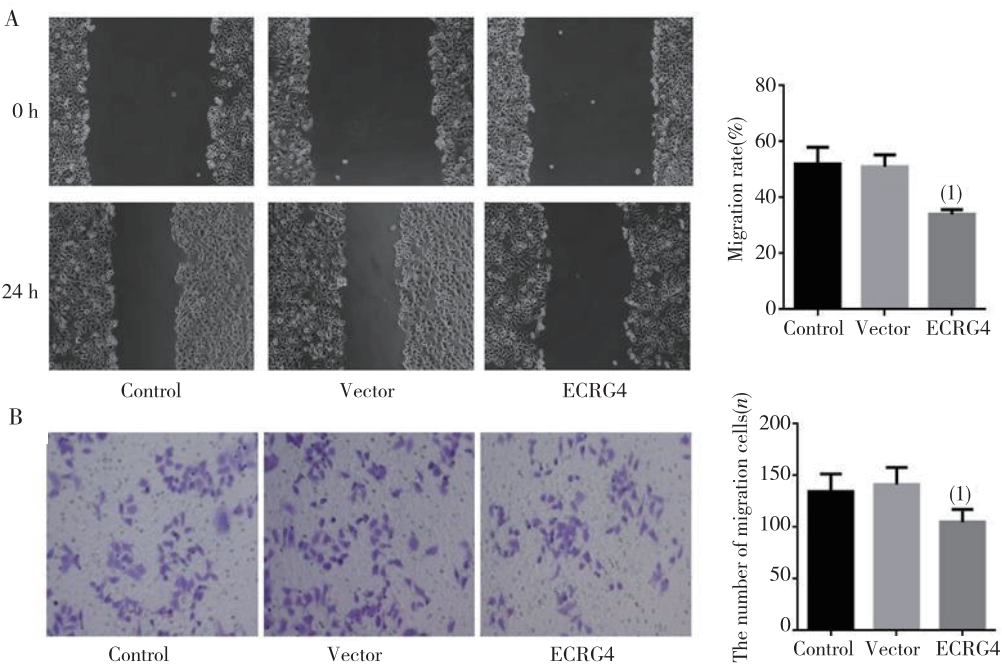
### 2.3 ECRG4 对 Hep-2 细胞侵袭能力影响

Tanswell 实验检测 Hep-2 细胞侵袭能力, 结果显示 ECRG4 组 Hep-2 细胞侵袭数较 Control 组及

Vector 组显著减少 ( $P < 0.01$ ), 见图 3。

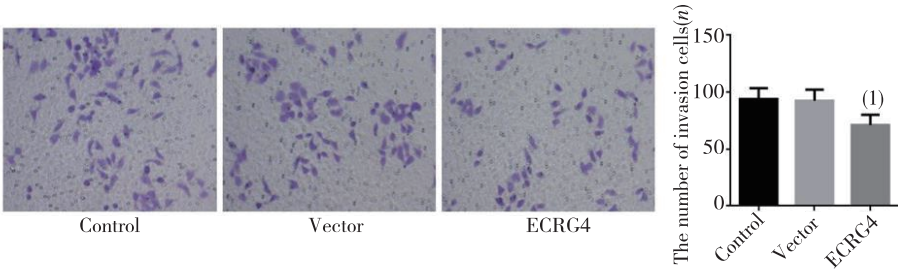
### 2.4 ECRG4 对 Hep-2 细胞 NF- $\kappa\text{B}$ 信号通路的影响

为了观察 ECRG4 对 NF- $\kappa\text{B}$  信号通路的影响, 通过 Western Blot 检测各组 Hep-2 细胞细胞核与胞浆中 NF- $\kappa\text{B}$  p65 蛋白表达变化。结果显示 ECRG4 组 Hep-2 细胞胞核中 NF- $\kappa\text{B}$  p65 蛋白表达水平较 Control 组及 Vector 组显著下调 ( $P < 0.01$ ), 见图 4A; ECRG4 组 Hep-2 细胞胞浆中 NF- $\kappa\text{B}$  p65 蛋白表达水平较 Control 组及 Vector 组显著上调, 见图 4B。



注:A 为细胞划痕检测细胞迁移能力,B 为 Transwell 检测细胞迁移能力;<sup>(1)</sup>与 Control 组及 Vector 组比较, $P<0.01$

图 2 各组 Hep-2 细胞迁移能力  
Fig.2 Migration ability of Hep-2 cells in each group



<sup>(1)</sup>与 Control 组及 Vector 组比较, $P<0.01$

图 3 各组 Hep-2 细胞侵袭能力  
Fig.3 Invasion ability of Hep-2 cells in each group

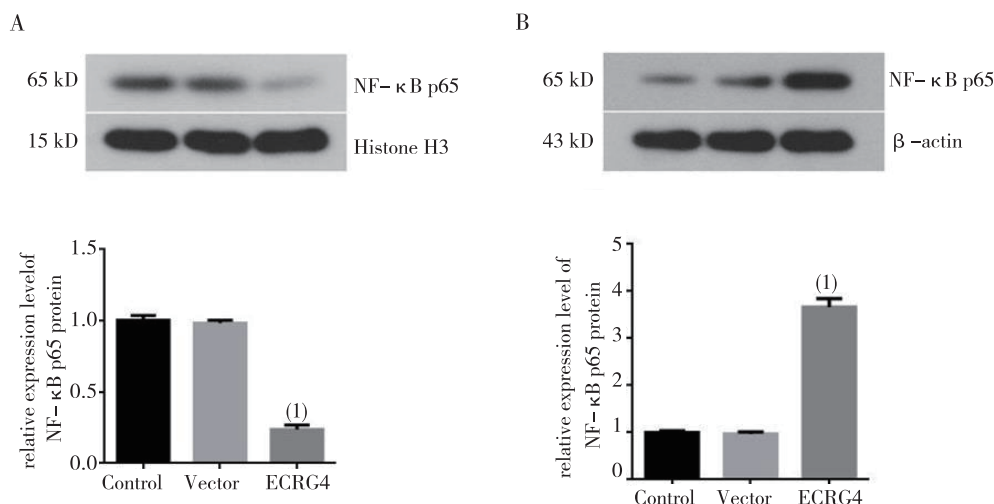
2.5 ECRG4 对 Hep-2 细胞 EMT 的影响

将 ECRG4 过表达质粒及空载体对照质粒转染 Hep-2 细胞,Western Blot 检测转录因子 Snail、EMT 上皮标志物 E-cadherin、EMT 间质标志物 N-cadherin、Vinmentin 蛋白水平。结果显示,与 Control 组及 Vector 组相比,ECRG4 组转录因子 Snail 蛋白表达显著下调( $P<0.01$ ),见图 5A;上皮标志物 E-cadherin 蛋白显著上调( $P<0.01$ ),见图 5B;EMT 间质标志物 N-cadherin、Vinmentin 蛋白表达显著下调,见图 6A 和图 6B。

3 讨论

恶性喉鳞癌是一类具有高度侵袭性、预后状况差的头颈部肿瘤,ECRG4 在喉癌组织及细胞中呈现低表达。在本课题组前期研究中,ECRG4 在喉癌组织及癌旁组织样本中均表达,但喉癌组织中 ECRG4 表达水平较癌旁组织显著降低;同时检测喉癌上皮细胞系 Hep-2 与 LSC-1 中 ECRG4 的表达,发现 Hep-2 细胞中 ECRG4 的表达水平显著低

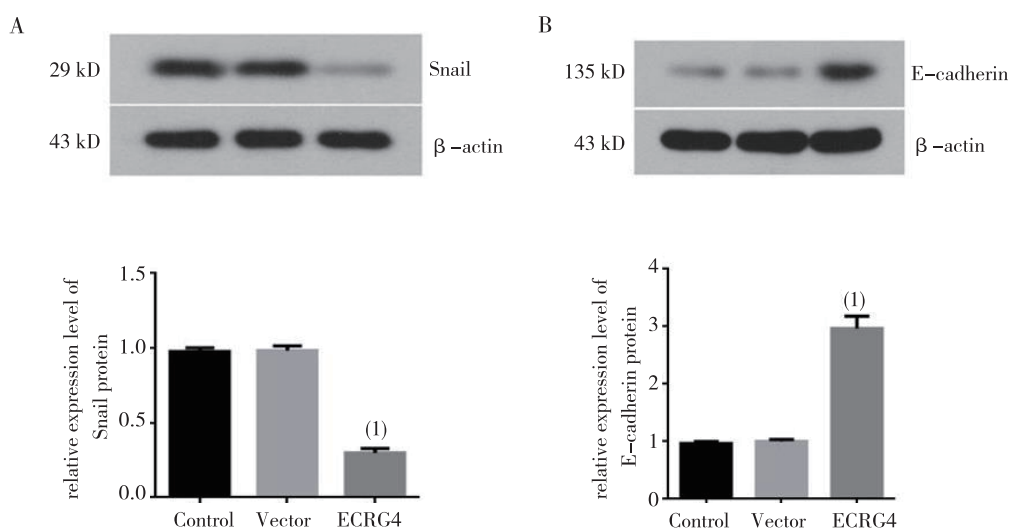




注:A 为 细胞核中 NF-κB p65 蛋白表达,B 为细胞浆中 NF-κB p65 蛋白表达;<sup>(1)</sup>与 Control 组及 Vector 组比较, $P < 0.01$

图 4 ECRG4 对各组 Hep-2 细胞核与胞浆中 NF-κB p65 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effects of ECRG4 on the expression of NF-κB p65 protein in nucleus and cytoplasm



<sup>(1)</sup>与 Control 组及 Vector 组比较, $P < 0.01$

图 5 ECRG4 对各组 Hep-2 细胞 Snail 与 E-cadherin 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of ECRG4 on the expression of Snail and E-cadherin protein in Hep-2 cells

于 LSC-1 细胞<sup>[10]</sup>,故本实验选用 ECRG4 本底水平较低的 Hep-2 细胞系作为转染细胞进行后续研究,保障了实验的进行。

为了确定 ECRG4 对喉鳞癌 Hep-2 细胞侵袭转移的作用,将 ECRG4 过表达质粒转染 Hep-2 细胞,细胞划痕和 Transwell 检测细胞迁移和侵袭能力,结果表明 ECRG4 可明显抑制 Hep-2 细胞的迁移和侵袭,进一步验证 ECRG4 是潜在的肿瘤候选抑制基因。

上皮间质转化(EMT)是上皮细胞从有极性不

能移动的上皮细胞通过极性改变和细胞黏附力丧失等一系列变化转化为间质细胞,增加细胞迁移和侵袭能力的过程。EMT 在 Wnt、Notch 等相关信号通路的作用下激活下游相关转录因子 Snail、Twist 或者 ZEB,抑制上皮标志基因 E-钙黏蛋白(E-cadherin)的转录,促进间质标记基因 Vimentin 与 N-cadherin 的表达<sup>[11-12]</sup>。有研究表明激活 NF-κB 信号通路可上调转录因子 Snail 的表达,抑制 EMT 上皮标志基因 E-cadherin 的表达进而促进肝胆管癌细胞的迁移和侵袭<sup>[13]</sup>;在肺癌细胞 A549 中,大黄

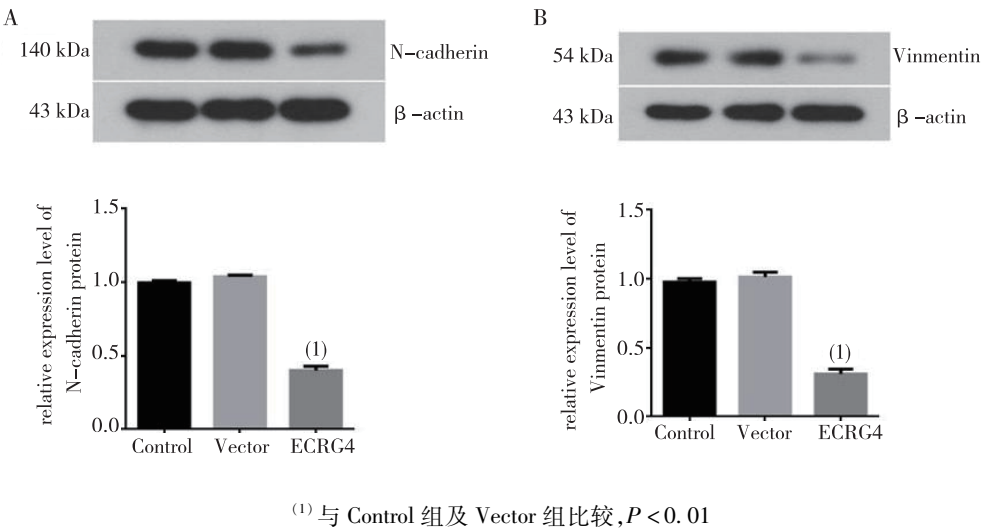


图 6 ECRG4 对各组 Hep-2 细胞 N-cadherin 与 Vinmentin 蛋白表达的影响

Fig. 6 Effects of ECRG4 on the expression of N-cadherin and Vinmentin protein in Hep-2 cells

素通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路进而抑制 ATP 诱发的细胞的 EMT、迁移和侵袭<sup>[14]</sup>;有报道指出,抑制 EMT 可抑制喉鳞癌细胞的迁移和侵袭<sup>[15]</sup>。为了验证 ECRG4 是否通过 NF- $\kappa$ B/Snail 信号通路影响 EMT 的发生,本研究通过 Western blot 方法检测了 NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白 NF- $\kappa$ B p65 在胞浆和胞核中的表达以及转录因子 Snail、EMT 上皮标志基因 E-cadherin、EMT 间质标志基因 Vinmentin 与 N-cadherin 的表达。结果显示,过表达 ECRG4 可明显下调胞核中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达,上调胞浆中 NF- $\kappa$ B p65 的表达,说明 ECRG4 可显著抑制 NF- $\kappa$ B p65 转位入核而抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路;过表达 ECRG4 可明显下调转录因子 Snail,并可下调 EMT 间质标志基因 Vinmentin 与 N-cadherin 的蛋白表达、上调 EMT 上皮标志基因 E-cadherin 的蛋白表达,显著抑制 EMT 发生。

综合以上结果表明,ECRG4 可能通过抑制 NF- $\kappa$ B/Snail 信号通路活性阻滞 EMT 的发生进而抑制 Hep-2 细胞的侵袭转移。本研究明确了 ECRG4 对喉鳞癌侵袭转移的影响及其相关分子作用机制,为 ECRG4 在喉鳞癌发生发展中的作用及相关分子机制提供了新的有力证据,揭示 ECRG4 可能成为喉鳞癌基因治疗的潜在新靶点。

4 参考文献

[1] CHU E A, KIM Y J. Laryngeal cancer: diagnosis and preoperative work-up[J]. Otolaryngol Clin North Am, 2008,41(4):673-695.

[2] SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. Cancer statistics, 2013 [J]. Ca A Cancer Journal for Clinicians, 2013,63(1):11-15.

[3] HERMANS R. Staging of laryngeal and hypopharyngeal cancer: value of imaging studies[J]. European Radiology, 2007,31(2):2386-2400.

[4] SABATIER R, FINETTI P, ADELAIDE J, et al. Down-regulation of ECRG4, a candidate tumor suppressor gene, in human breast cancer[J]. PloS One, 2011,6(11):e27656.

[5] WANG Y B, BA C F. Promoter methylation of esophageal cancer-related gene 4 in gastric cancer tissue and its clinical significance [J]. Hepato-gastroenterology, 2012,59(118):1696-1698.

[6] GOTZE S, FELDHAUS V, TRASKA T, et al. ECRG4 is a candidate tumor suppressor gene frequently hypermethylated in colorectal carcinoma and glioma[J]. BMC Cancer, 2009,9:447.

[7] XU T, XIAO D, ZHANG X. ECRG4 inhibits growth and invasiveness of squamous cell carcinoma of the head and neck in vitro and in vivo[J]. Oncology Letters, 2013,5(6):1921-1926.

[8] GE S, XU Y, WANG H, et al. Downregulation of esophageal cancer-related gene 4 promotes proliferation and migration of hepatocellular carcinoma[J]. Oncology Letters, 2017,14(3):3689-3696.

[9] JIA J, DAI S, SUN X, et al. A preliminary study of the effect of ECRG4 overexpression on the proliferation and apoptosis of human laryngeal cancer cells and the underlying mechanisms [J]. Molecular Medicine Reports, 2015,12(4):5058-5064.

(下转第 189 页)