

· 临床研究 ·

# 磷酸化小窝蛋白-1 在食管癌细胞中的表达及意义

黄潮添<sup>1</sup>, 刘朝晖<sup>2</sup>, 吴瑞暖<sup>2</sup>, 陈素钻<sup>2</sup>

1. 潮阳区大峰医院消化内科, 广东 汕头 515154; 2. 汕头大学医学院第一附属医院, 广东 汕头 515041

**摘要:** **目的** 检测磷酸化小窝蛋白-1(PY14Cav-1)在食管癌细胞中的表达,探讨其表达的意义。**方法** 体外培养人食管癌株 TE1 细胞,检测 TE1 细胞中 PY14Cav-1 的表达水平,通过细胞转染技术以 Cav-1 小干扰 RNA 转染 TE1 细胞,使细胞中 PY14Cav-1 表达水平降低,用 Transwell 细胞体外侵袭实验观察细胞侵袭情况。**结果** 转染 Cav-1 siRNA 后,食管癌细胞 TE1 中 Cav-1 和 PY14Cav-1 表达水平均较转染前明显下降 ( $P < 0.05$ ),而 Transwell 结果显示,转染 Cav-1 siRNA 后,细胞侵袭数目为  $(7.4 \pm 1.2)$  个,较转染前  $[(49.2 \pm 3.6)$  个]明显减少 ( $P < 0.01$ )。**结论** Cav-1 在食管癌的发生发展过程中扮演着促癌基因的角色,其机制可能与调节 PY14Cav-1 的表达有关。

**关键词:** 食管癌; 小窝蛋白-1; 磷酸化; 体外培养; 细胞转染; 细胞侵袭

**中图分类号:** R 73-3 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2015)10-1363-02

我们前期研究发现,小窝蛋白-1(Cav-1)在食管癌中扮演着促癌基因的角色,Cav-1 的高表达能促进食管癌细胞的侵袭及转移能力,但是其促癌基因的机制尚不明确。磷酸化及甲基化可以活化生物体内多种生物活性物质,目前有关食管癌细胞中 Cav-1 的磷酸化研究未见报道,本研究通过检测食管癌细胞中的磷酸化的 Cav-1 来了解磷酸化 Cav-1(PY14Cav-1)是否是食管癌中 Cav-1 的活化形式,从而更进一步地了解 Cav-1 在食管癌中扮演的促癌基因的具体机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 人食管癌细胞系 TE1 由本实验室提供, RPMI1640 培养液、胎牛血清(杭州四季青),二甲基亚砷(DMSO)(美国 MPBIO 公司),Cav-1 多克隆抗体(CST),胰蛋白酶(碧云天生物技术有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞转染** 食管癌细胞 TE1 用含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基在 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱湿条件下培养,细胞呈贴壁生长。选择指数期生长的食管癌细胞接种于培养皿中 18 h,细胞融合度约为 70% 时进行转染。在 500 μl Opti-MEM 培养基中加入 10 μl (200 pmol) siRNA 并轻柔混匀;在 500 μl Opti-MEM 培养基中加入 10 μl lipofectamin 试剂,混匀后室温放置 5 min;稀释好的 siRNA 和 RNAi-Mate 试剂混合,室温放置 20 min 后将混合物加到培养皿中。细胞在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 5 h 后进行下一步研究。

**1.2.2 Transwell 细胞体外侵袭实验** 食管癌细胞 TE1 用含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基在 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱湿条件下培养,细胞呈贴壁生长。取 25 μl 1:8 倍稀释好的 matrigel 均匀涂于小室底部膜的上室面,室温风干 1 h,置 37 °C 温箱过夜使 matrigel 聚合成凝胶。上室加入 300 μl 预温的无血清培养基,室温下静置 15 ~ 30 min,使基质胶再水化,吸去剩余培养基。取 100 μl 含  $1 \times 10^5$  个细胞的无血清培养基接种于 Transwell 小室(Corning,3234)上层,小室下层加入 600 μl 含 10% 胎牛血清培养基,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h。取出小室用冰 PBS 淋洗一遍,冰甲醇固定 10 min,冰 PBS 再次淋洗一遍后 HE 染色,棉签刮下上层细胞,刀片切下膜,置于载玻片上中性树脂封片固定。Cav-1 siRNA 转染后的侵袭试验则在转染后 14 h 将细胞接种于小室中。

**1.2.3 Western blot 实验** 将对数生长期的 TE1 细胞传代并置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内培养,待细胞长至皿底的 80% ~ 90% 时进行转染处理,培养 5 h 后收集细胞,预冷 PBS 洗涤细胞 3 次,加细胞裂解液,超声破碎细胞,BCA 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶电泳分离细胞总蛋白,将蛋白通过电转移印迹到 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉/TBST 液封闭 PVDF 膜;蛋白上样量分别为 30 μg,Cav-1 工作浓度为 1:500,β-actin 工作液浓度为 1:1 000,二抗工作浓度为 1:10 000,ECL 试剂发光,X 胶片曝光,显影,定影,将条带扫描后灰度分析。

**1.3 统计学方法** 采用 SPSS 19.0 软件处理数据。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 *t* 检验进行统计分析。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2015.10.032

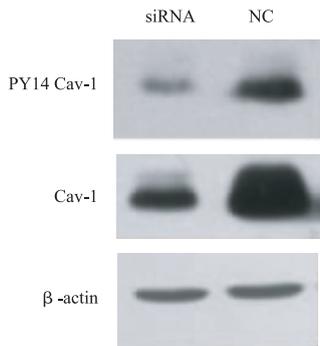
基金项目: 广东省自然科学基金项目(S2012010008593)

通讯作者: 陈素钻, E-mail: schen7338@126.com

## 2 结果

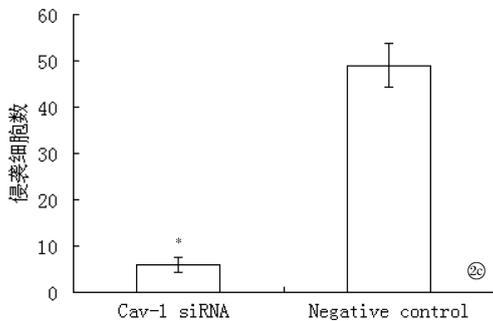
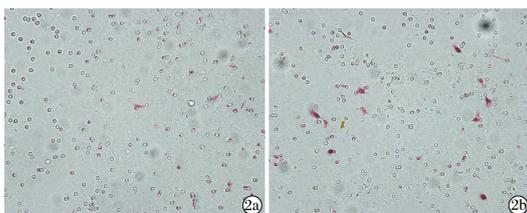
2.1 Western blot 实验结果 转染 Cav-1 siRNA 后,食管癌细胞 TE1 中 Cav-1/ $\beta$ -actin 比值为  $1.8934 \pm 0.4301$ , 较转染前 ( $4.1104 \pm 0.4331$ ) 明显下降 ( $P < 0.05$ ); PY14Cav-1/ $\beta$ -actin 比值为  $0.3285 \pm 0.0174$ , 较转染前 ( $1.2842 \pm 0.2387$ ) 明显下降 ( $P < 0.05$ )。见图 1。

2.2 细胞侵袭实验结果 Transwell 结果显示,转染 Cav-1 siRNA 后,细胞侵袭数目为  $(7.4 \pm 1.2)$  个,较转染前 [ $(49.2 \pm 3.6)$  个] 明显减少 ( $P < 0.01$ )。见图 2。



注:NC 表示阴性对照组,代表转染前。

图 1 Western blot 检测 TE1 细胞转染前后 Cav-1 及 PY14Cav-1 的表达水平比较



注:2a:转染 Cav-1 siRNA 后;2b:转染前;2c:与 Negative control(代表转染前)比较, \*  $P < 0.01$ 。

图 2 细胞侵袭实验显示转染 Cav-1 siRNA 前后细胞侵袭能力比较

## 3 讨论

近来,Cav-1 在肿瘤中的表达水平及其扮演的角色已在大量的肿瘤标本及肿瘤细胞中被广泛研究。在胰腺癌<sup>[1]</sup>、膀胱癌<sup>[2]</sup>、胃癌<sup>[3]</sup>中,Cav-1 的表达水平和肿瘤发生淋巴结转移、脉管侵袭以及根治术后肿瘤

的局部复发率呈正相关。在食管癌中,Kato 和 Ando 等研究者也有相似的报告。因而,Cav-1 似乎可作为有效的肿瘤分子标志物。

我们前期的研究结果显示,Cav-1 在食管癌细胞中呈高表达<sup>[4-5]</sup>,Cav-1 水平的降低可以抑制人食管癌细胞的侵袭及迁移能力,这些结果均提示 Cav-1 在食管癌的发展过程中扮演着促癌的角色,但是截至目前,尚没有有关 Cav-1 在促癌作用过程中的机制研究。磷酸化是细胞内许多分子的一种活化形式,如 AKT 的磷酸化(活化)就与肿瘤的发生密切相关<sup>[6-7]</sup>。因此本研究通过检测食管癌细胞中 PY14Cav-1 的表达水平来了解 PY14Cav-1 是否是食管癌细胞中 Cav-1 的活化形式。结果显示,食管癌细胞 TE1 中 PY14Cav-1 呈高表达,进行 Cav-1 siRNA 转染干扰后,TE1 细胞中 Cav-1 与 PY14Cav-1 表达均明显下降,并且细胞的侵袭能力也随之降低,这提示,PY14Cav-1 可能直接参与食管癌侵袭,PY14Cav-1 可能是 Cav-1 促癌作用中的活化形式。但我们同时发现,在转染 Cav-1 siRNA 后,细胞的 Cav-1 总的蛋白水平降低了,在 Cav-1 总的蛋白水平降低的情况下有可能导致 PY14Cav-1 随之降低,PY14Cav-1 降低只是 Cav-1 表达降低的一种伴随反应。因此,我们课题组准备在之后的研究中进行有关 PY14Cav-1 独立的研究,即找到一种 PY14Cav-1 的特异性磷酸化抑制剂,从而更进一步明确探讨 PY14Cav-1 在食管癌发生中的作用。

## 参考文献

- [1] Liu L, Xu HX, Wang WQ, et al. Caveolin-1 is essential for the tumor-promoting effect of caveolin-1 and enhances its prognostic potency in pancreatic cancer[J]. *Oncogene*, 2013, 33(21): 2728-2736.
- [2] Thomas S, Overvest JB, Nitz MD, et al. Src and caveolin-1 reciprocally regulate metastasis via a common downstream signaling pathway in bladder cancer[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(3): 832-841.
- [3] Nam KH, Lee BL, Park JH, et al. Caveolin 1 expression correlates with poor prognosis and focal adhesion kinase expression in gastric cancer[J]. *Pathobiology*, 2012, 80(2): 87-94.
- [4] 吴端暖,陈素钻,俞晶,等. ROCK 抑制剂对 TE1 细胞生长及迁移能力的影响[J]. *中国临床研究*, 2014, 27(1): 5-8.
- [5] 章昱,俞晶,刘朝晖,等. ROCK 抑制剂对人食管癌 EC9706 细胞迁移能力的影响[J]. *中国临床研究*, 2014, 27(2): 129-131.
- [6] Cokakli M, Erdal E, Nart D, et al. Differential expression of Caveolin-1 in hepatocellular carcinoma: correlation with differentiation state, motility and invasion[J]. *BMC Cancer*, 2009, 9: 65.
- [7] Tanase CP, Dima S, Mihai M, et al. Caveolin-1 overexpression correlates with tumour progression markers in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *J Mol Histol* 2009, 40(1): 23-29.