

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2020.01.07

◆ 论著 ◆

siRNA 沉默 CathepsinB 对人食管鳞状细胞癌增殖的影响

阳一鸣,何琳莉,王小林

(川北医学院病理学教研室,四川南充 637000)

【摘要】目的:评估人类食管鳞癌组织中 CathepsinB 在体内的表达水平和功能。**方法:**收集 53 例术中食管鳞癌标本,通过免疫组织化学染色、免疫印迹分析和逆转录-定量聚合酶链式反应检测人食管鳞癌组织、癌旁组织中 CathepsinB 的 mRNA 和蛋白表达。构建能有效抑制人食管癌 EC9706 细胞 CathepsinB 表达的 siRNA 序列,用 Western blotting 从蛋白水平证实沉默效果。靶向沉默 CathepsinB 基因后用 CCK8 法检测细胞增殖水平。**结果:**免疫组化结果显示,CathepsinB 在食管癌组织中表达增高,且 CathepsinB 阳性表达者与肿瘤组织的分化程度、淋巴结转移明显相关性 ($P < 0.05$),但其表达与患者的性别、肿瘤浸润深度、肿块最大径、远处转移、临床分期无明显相关性 ($P > 0.05$)。WB 和 RT-PCR 检测结果显示,在食管癌组织中 CathepsinB 的蛋白和 mRNA 表达量均高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。**结论:**相对于癌旁组织,CathepsinB 在食管癌组织中表达上调;靶向沉默 CathepsinB 基因后能有效抑制人食管癌细胞 EC9706 的体外增殖能力;CathepsinB 在食管癌发生发展及细胞增殖过程中起着重要的作用,可能为食管癌早期诊断及分子靶向治疗提供研究切入点。

【关键词】 食管癌;CathepsinB;免疫印迹;逆转录-定量聚合酶链式反应

【中图分类号】 R735.1 **【文献标志码】** A

Effect of siRNA silencing Cathepsin B on proliferation of human esophageal squamous cell carcinoma

YANG Yi-ming, HE Lin-li, WANG Xiao-lin

(Department of Pathology, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】 Objective: To evaluate the expression level and function of CathepsinB in human esophageal squamous cell carcinoma. **Methods:** 53 cases of intraoperative esophageal squamous cell carcinoma were collected. Immunohistochemical staining, immunoblotting analysis and reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction were used to detect the expression of CathepsinB mRNA and protein in human esophageal squamous cell carcinoma and adjacent tissues. The siRNA sequence which can effectively inhibit the expression of CathepsinB in human esophageal cancer EC9706 cells was constructed, and the silencing effect was confirmed from the protein level by Western-blot (WB). The cell proliferation level was detected by CCK8 method after targeting the silencing CathepsinB gene. **Results:** The results of immunohistochemistry showed that CathepsinB was highly expressed in esophageal carcinoma tissues, and CathepsinB positive expression was significantly correlated with tumor differentiation and lymph node metastasis ($P < 0.05$). There was no significant correlation between the expression and patient's gender, tumor infiltration depth, maximal diameter, distant metastasis and clinical stage ($P > 0.05$). The results of WB and RT-PCR showed that the expression of CathepsinB protein and mRNA in esophageal cancer tissues was higher than that in adjacent tissues ($P < 0.05$). **Conclusion:** This study showed that CathepsinB is up-regulated in esophageal carcinoma tissues compared with adjacent tissues. Targeting silencing CathepsinB gene significantly inhibits the proliferation of human esophageal cancer cell line EC9706 in vitro. CathepsinB plays an important role in the development and cell proliferation of esophageal carcinoma. Provide research entry points and references for early diagnosis and molecular targeted therapy of esophageal cancer.

【Key words】 Esophageal cancer; CathepsinB; Western blotting; RT-PCR

食管癌 (esophageal cancer, EC) 起源于食管上皮的肿瘤^[1],可分为食管鳞癌和食管腺癌两种主要的组织学类型^[2]。因早期缺乏显著症状,致患者错

过最佳治疗时机^[3],使致死率增高。目前,食管癌常用治疗方法是手术及放疗,其中手术是最有效的选择。尽管现代外科手术、放疗相结合的治疗

基金项目:四川省南充市应用技术与开发资金项目(15A0037)

作者简介:阳一鸣(1993-),男,硕士研究生。E-mail:453883838@qq.com

通讯作者:何琳莉。E-mail:151443387@qq.com

手段已广泛应用,但局部复发仍很常见^[4]。近年来,随着治疗手段的不断进步,食管癌的治疗效果有所改善,但大多数晚期食管癌患者预后仍不理想,5年生存率仅为17%^[5]。因此,与食管癌侵袭和转移相关的分子机制的研究日益受到重视。

CathepsinB 由 25-26 kDa 的重链和 5 kDa 的轻链组成,是一类溶酶体半胱氨酸蛋白酶,在细胞蛋白水解中发挥重要功能^[6]。已知 CathepsinB 的活性对于肿瘤发生、血管生成、侵袭和转移密切相关^[7-8]。有研究^[9-14]显示,CathepsinB 在前列腺癌、结肠直肠癌、神经胶质瘤、黑色素瘤、乳腺癌中表达水平均升高。但其表达与食管鳞状细胞癌的相关性却鲜有报道。本研究以 CathepsinB 蛋白为切入点,探讨 CathepsinB 在食管癌组织中发生发展中的作用以及对食管癌细胞株的体外增殖的影响,为食管癌的诊断、治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 组织标本

收取日期为 2018 年 1 月至 2018 年 6 月川北医学院附属医院食管癌术后癌组织、癌旁组织(距肿块 > 5 cm)各 53 例。其中,男性标本 38 例,女性标本 15 例;年龄 50 ~ 80 岁,平均 60.51 岁。一半经福尔马林固定,常规进行病理诊断。一半在离体 0.5 h 内,切取约 100 ~ 200 mg 小块,经 PBS 液清洗,迅速置于液氮速冻,并于 -80 °C 冰柜冻存。所有病例术前均未接受放化疗。所有新鲜标本经病理诊断均为原发性食管鳞状细胞癌;癌旁食管组织经组织学检查均未发现癌累及。本实验标本采集前经医学伦理学委员会批准。

EC9706 细胞系由四川大学华西医院提供。将所有细胞系在补充有 10% 胎牛血清,100 μg/μL 链霉素和 100 μg/μL 青霉素(pH 值 7.2 ~ 7.4)在含有 5% CO₂ 的 37 °C 潮湿培养箱中培养。

1.2 逆转录-定量聚合酶链式反应(RT-PCR)

用 Trizol 试剂提取组织中的 RNA,通过逆转录试剂盒逆转录 cDNA。根据 CathepsinB 基因的 cDNA 序列设计 qRT-PCR 引物。Cathepsin B 正向 5'-GCTACAGCCCGACCTACAAACAG-反向 5'-GAG-CAGGAAGTCCGAATACACAGA-3'。内参 GAPDH:正向 5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3 反向 5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3'。使用 ABI7500FastRealTimePCRSytem 进行 PCR 反应,并采用 2-ΔΔCt 进行计算。

1.3 Western blotting 检测

使用裂解缓冲液和蛋白酶抑制剂提取总蛋白。

用 SDS 样品缓冲液将等量蛋白质量变性,然后用 10% SDS-PAGE 分离并转移到聚偏二氟乙烯膜上。在含有 0.1% Tween-20(pH 值 7.6)的 Tris 缓冲盐水中的 5% 脱脂牛奶在室温下封闭 1 h 后,将膜与一抗在室温下与 CathepsinB 一起孵育 1 h,然后用小鼠抗兔 IgG-辣根过氧化物酶(HRP)二抗在室温下孵育 1 h。使用增强的化学发光显色底物来显现条带,并且通过光密度测定法对条带的强度进行定量。

1.4 免疫组织化学染色分析

对手术中获得的原发性 ESCC 组织和相邻的正常组织进行免疫组化分析。按照试剂盒说明进行免疫组织化学染色处理,具体操作方法:取石蜡切片行脱蜡、水化处理,采取微波法对切片进行 5 min 抗原修复,采用 3% 过氧化氢溶液将内源性过氧化物酶去除,以煮沸热修复法行抗原修复,7.5% 牛血清白蛋白封闭处理,向其中滴加 CathepsinB 兔抗人单克隆抗体(1:100),在 4 °C 环境下静置过夜,向底物加入 DAB 显色处理,苏木精复染,脱水、透明、封片。免疫组化判定标准^[16]:CathepsinB 主要存在于癌细胞胞浆内,少部分存在于细胞核中,采用 DAB 行显色系统染色处理,若观察到细胞浆内弥漫分布染色呈现为明显的棕黄色颗粒,即可判定为阳性。放置于光学显微镜下进行观察,随机选取 5 个高倍视野,结合阳性细胞的染色强度与百分率来进行计分。(1)4 分:染色阳性细胞百分率 > 75%;(2)3 分:染色阳性细胞百分率为 50% ~ 75%;(3)2 分:染色阳性细胞百分率为 26% ~ 49%;(4)1 分:染色阳性细胞百分率为 5% ~ 25%;(5)0 分:染色阳性细胞百分率 < 5%。另根据细胞基着色评分:(1)3 分:细胞呈现为棕色;(2)2 分:细胞呈现为棕黄色;(3)1 分:细胞呈现为浅黄色;(4)0 分:细胞基无着色。根据上述两项评分乘积结果进行阳性程度判定:(1)强阳性(+++):9 ~ 12 分;(2)中度阳性(++):5 ~ 8 分;(3)弱阳性(+):1 ~ 4 分;(4)阴性(-):0 分。EC 分化程度:低分化为 2,高一中分化为 0;浸润深度达到浆膜层为 2,浸润黏膜层之外未达到浆膜层为 1,浸润深度在黏膜内为 0;出现淋巴结转移即为 1,无转移即为 0;男为 1,女为 0;远处脏器转移为 1,无转移为 0;癌旁正常组织为 1,EC 组织为 0。

1.5 小干扰 RNA(siRNA)转染

靶向人 CathepsinB 基因(5'-GGUCCUGGACAAUGAAUTT-3')和阴性对照(NC;5'-UAACAAUGAGAGCACGGCTT-3')的双链 RNA 购自 Invitrogen。根据制造商的方案用 Lipofectamine 2000 试剂转染细胞。

1.6 CCK8 方法检测细胞增殖

收集转染后的各组细胞,制成细胞悬液,按每孔 1×10^3 个细胞 (200 μL) 接种于 96 孔板,每组设 6 个复孔。常规培养 24、36、48、和 72 h 后,加入 CCK10 μL ;继续培养 4 h 后;检测 450 nm 波长处各孔的吸光度 (D450 nm 值),以此反映细胞增殖活性。绘制细胞增殖曲线。

1.7 统计学分析

使用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。免疫组化统计结果采用 χ^2 检验;余数据表示为 $(\bar{x} \pm s)$,并分析 3 个独立实验。使用标准单向方差分析方法进行数据比较,以进行重复评估,然后进行 Student-Newman-Keuls 试验。

2 结果

2.1 比较对 ESCC 组织与配对的癌旁组织 (距离肿块 >5 cm) 中 CathepsinB 的表达水平

CathepsinB mRNA 的表达水平在食管癌组织中 与配对的癌旁组织相比明显增高 (图 1, $P < 0.01$)。western-blot 的结果显示,在食管癌组织中 与配对的癌旁组织相比明显增高 (图 2)。另将 53 对石蜡包埋的食管癌和相邻的癌旁组织通过免疫组织化学染色进行分析,结果显示:CathepsinB 的阳性表达水平在食管癌组织中 (34/53, 64.15%) 与相邻的癌旁组织相比 (0/53, 0%; $P < 0.01$) 明显增加 (图 3)。如图所示,CathepsinB 阳性染色主要在细胞质中,少部

分表达于细胞膜上。收集患者临床资料,进行统计分析发现:CathepsinB 蛋白的表达与仅与 EC 的分化程度、淋巴结转移有关 ($P < 0.05$),但与肿块浸润深度、最大径、性别、远处转移以及临床分期无关 ($P > 0.05$,表 1)。

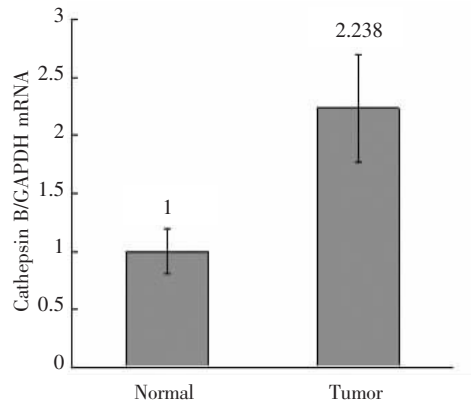


图 1 食管癌与相应癌旁 CathepsinB mRNA 表达相对水平

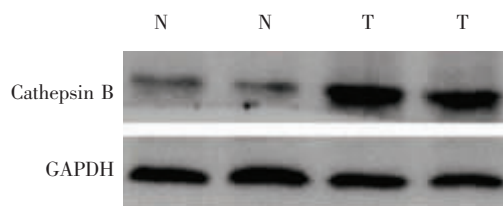


图 2 食管癌与相应癌旁 CathepsinB 蛋白表达水平

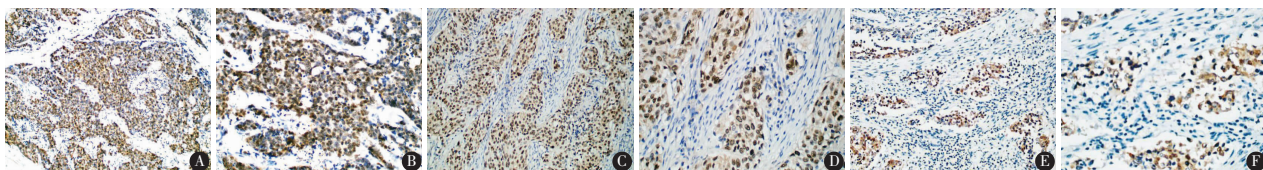


图 3 免疫组化染色检测 CathepsinB 在食管癌中的表达

A. 强阳性表达 ($\times 200$); B. 强阳性表达 ($\times 400$); C. 中阳性表达 ($\times 200$); D. 中阳性表达 ($\times 400$); E. 弱阳性表达 ($\times 200$); F. 弱阳性表达 ($\times 400$)。

2.2 EC9706 中沉默效果验证

为了观察 CathepsinB 基因在人食管癌细胞中的表达,将 EC9706 细胞分别为用 CathepsinB siRNA 进行瞬时转染。通过 Western blotting 加以验证。见图 4。

2.3 CCK8 细胞增殖实验

为了确定沉默 CathepsinB 基因后对食管癌细胞 (EC9706) 增殖水平的影响,通过 CCK8 细胞增殖实验来验证。CCK8 细胞增殖实验显示, CathepsinB-siRNA 转染细胞组在 24、36、48、72 h 4 个相应时间段与空白对照组、阴性对照组相比均出现增殖降低的现象,但仅在 48 h 和 72 h 两者相比,差异才具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 5。

表 1 CathepsinB 蛋白表达与临床病理特征的关系

病理因素	阳性 (n = 24)	阴性 (n = 29)	P 值
分化程度			$P < 0.05^*$
高-中	17	28	
低	7	1	
浸润深度			$P > 0.05$
黏膜层-黏膜下层	3	5	
肌层	6	5	
浆膜层	15	19	
淋巴结转移			$P < 0.05$
无	6	20	
有	18	9	

续表 1

病理因素	阳性 (n = 24)	阴性 (n = 29)	P 值
肿块最大径 (cm)			$P > 0.05$
>5	6	8	
≤5	18	21	
性别			$P > 0.05$
男性	17	21	
女性	7	8	
远处转移			$P > 0.05^*$
有	4	1	
无	20	28	
临床分期			$P > 0.05^*$
早	2	5	
中晚期	22	24	

*表示用 Fisher 精确检验。

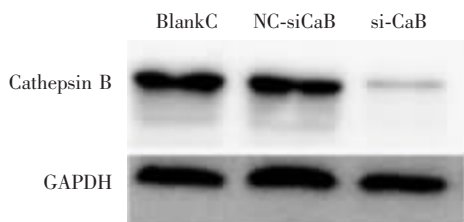


图 4 Western blotting 验证癌株 EC9706 中 CathepsinB 的沉默效果

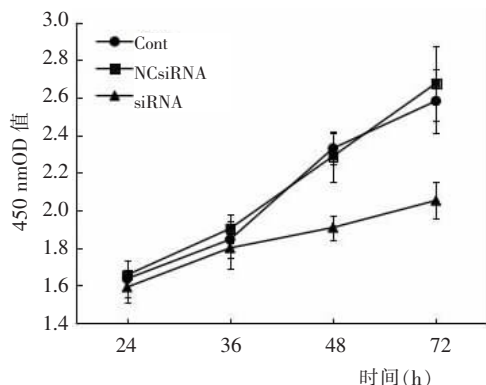


图 5 CCK8 检测沉默后癌株相对增殖情况

3 讨论

大多数食管癌患者被确诊时已是晚期,传统治疗方案中细胞毒剂或放疗反应会引起严重副作用,进展期食管癌的预后仍然很差,与其他类型的癌症类似,食管癌的发展被认为是一个由致癌基因活化的积累诱导的多步骤过程^[17]。因此,了解食管癌发生中的分子机制对改善患者生存有着重要意义。

组织蛋白酶 B (CathepsinB) 是溶酶体半胱氨酸蛋白酶的一员,其结构类似于木瓜蛋白酶,与溶酶体中一般蛋白质的转换相关^[18]。目前,已经在多种类

型的原发性或转移性肿瘤组织中观察到 CathepsinB 蛋白水平升高。甲状腺组织中蛋白质的双向电泳分析显示,与非肿瘤性相关疾病对比,CathepsinB 在肿瘤疾病中显著上调^[19];CathepsinB 在一半以上的胃癌患者的癌组织中表达上调,而在晚期胃癌患者的血清中,CathepsinB 的表达水平显著高于相应的健康对照者^[18]。此外,CathepsinB 表达与淋巴结转移、分化程度和远处转移呈正相关。Tan 等^[20]发现,鼻咽癌患者血清 CathepsinB 水平明显高于对照组,且与 TNM 评分相关。此外,Yan 等^[21]观察到食管癌患者血清中 CathepsinB 水平与健康对照组相比显著增加,CathepsinB 水平与肿瘤浸润深度增加呈正相关。本研究发现,食管癌患者肿瘤组织中 CathepsinB 水平与癌旁对照组相比显著增加。此外,CathepsinB 水平与肿瘤的分化程度、淋巴结转移呈正相关,而与肿块浸润深度、最大径、性别、远处转移以及临床分期无关。在临床数据与上述结果存在差异,这可能与标本构成相关。本次实验为了保证标本的随机性,导致低分化标本数目较低(8 例),但两者实验均能表明 CathepsinB 可能参与了食管癌的发生和发展,推测 CathepsinB 可能作为食管癌的候选生物标志物。同时,本研究用特异 siRNA 沉默 EC9706 细胞系中 CathepsinB 基因的表达,并在 mRNA 水平及蛋白水平得到了验证。CathepsinB 蛋白在细胞株内的表达结果与肿瘤实体结果相一致。选用特异 siRNA 沉默 CathepsinB 基因后,通过 CCK8 细胞增殖实验显示沉默后的 EC9706 增殖明显受到抑制。另外,Yan 等观察到,血清中 CathepsinB 水平较低的患者比 CathepsinB 水平高的患者生存期更长,但差异无统计学意义;Kim^[22]等通过对食管癌患者作生存分析发现,尽管不能排除肿瘤分期、远处转移等因素的干扰,CathepsinB 低表达的患者的 5 年生存率为 53.4%,而高表达的患者的 5 年生存率为 59.3%,两者生存率的差异有统计学意义,这说明 CathepsinB 的表达水平和预后呈正相关。而 Liu 等^[23]认为 CathepsinB 与食管癌患者的预后无明显相关性。

综上所述,沉默 CathepsinB 能抑制食管癌细胞株增殖,其异常表达与食管癌的恶性进展密切相关,在食管癌早期诊断及分子靶向治疗中均有重要意义。

参考文献

[1] Huang FL, Yu SJ. Esophageal cancer: Risk factors, genetic association, and treatment [J]. Asian Journal of Surgery, 2018, 41 (3): 210 - 215.
 [2] Ajani JA. Gastroesophageal cancers: progress and problems [J].

- Journal of the National Comprehensive Cancer Network Jncn, 2008,6(9):813-814.
- [3] Torre LA, Bray F, Siegel RL, *et al.* Global cancer statistics, 2012. [J]. *Ca A Cancer Journal for Clinicians*, 2015, 65(2):87-108.
- [4] Arnold M, Soerjomataram I, Ferlay J, *et al.* Global incidence of oesophageal cancer by histological subtype in 2012 [J]. *Gut*, 2015, 64(3):381-387.
- [5] Almhanna K, Shridhar R, Meredith KL. Neoadjuvant or adjuvant therapy for resectable esophageal cancer: is there a standard of care? [J]. *Cancer Control Journal of the Moffitt Cancer Center*, 2013, 20(2):89-96.
- [6] Gobec S, Frlan R. Inhibitors of CathepsinB [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2006, 13(19):2309-2327.
- [7] Bengsch F, Buck A, Günther, SC, *et al.* Cell type - dependent pathogenic functions of overexpressed human cathepsin B in murine breast cancer progression [J]. *Oncogene*, 2014, 33(36):4474-4484.
- [8] Lim IT, Meroueh SO, Lee M, *et al.* Strategy in inhibition of cathepsinB, a target in tumor invasion and metastasis [J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(33):10271-10277.
- [9] Sinha AA, Gleason DF, Deleon OF, *et al.* Localization of a biotinylated cathepsin B oligonucleotide probe in human prostate including invasive cells and invasive edges by in situ hybridization [J]. *Anat Rec*, 1993, 235(2):233-240.
- [10] Murnane MJ, Sheahan K, Ozdemirli M, *et al.* Stage-specific increases in cathepsin B messenger RNA content in human colorectal carcinoma [J]. *Cancer Res*, 1991, 51(4):1137-1142.
- [11] Rempel SA, Rosenblum ML, Mikkelsen T, *et al.* Cathepsin B expression and localization in glioma progression and invasion [J]. *Cancer Res*, 1994, 54(23):6027-6031.
- [12] Matarrese P, Ascione B, Ciarlo L, *et al.* Cathepsin B inhibition interferes with metastatic potential of human melanoma: an in vitro and in vivo study [J]. *Mol Cancer*, 2010, 9:207.
- [13] Sevenich L, Schurig U, Sachse K, *et al.* Synergistic antitumor effects of combined cathepsin B and cathepsin Z deficiencies on breast cancer progression and metastasis in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(6):2497-2502.
- [14] Sevenich L, Werner F, Gajda M, *et al.* Transgenic expression of human cathepsin B promotes progression and metastasis of polyoma-mid-T-induced breast cancer in mice [J]. *Oncogene*, 2011, 30:54-64.
- [15] Yan Y, Zhou K, Wang L, *et al.* Expression of cystatin C and its effect on EC9706 cells in esophageal carcinoma [J]. *International journal of clinical and experimental pathology*, 2015, 8(9):10102-10111.
- [16] Bao W, Fan Q, Luo X, *et al.* Silencing f Cathepsin B suppresses the proliferation and invasion of endometrial cancer [J]. *Oncol Rep*, 2013, 3(2):723-730.
- [17] Laoukili J, Stahl M, René H. FoxM1: At the crossroads of ageing and cancer [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1775(1):92-102.
- [18] Ebert MP, Krüger S, Fogeron ML, *et al.* Overexpression of cathepsinB in gastric cancer identified by proteome analysis [J]. *Proteomics*, 2005, 5(6):1693-1704.
- [19] Srisomsap C, Subhasitanont P, Otto A, *et al.* Detection of cathepsinB up-regulation in neoplastic thyroid tissues by proteomic analysis [J]. *Proteomics*. 2002, 2(6):706-712.
- [20] Tan G, Liu Q, Tang X, *et al.* Diagnostic values of serum cathepsin B and D in patients with nasopharyngeal carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2016, 16(1):1-7.
- [21] Yan Y, Zhou K, Wang L, *et al.* Clinical significance of serum cathepsin B and cystatin C levels and their ratio in the prognosis of patients with esophageal cancer [J]. *OncoTargets and Therapy*, 2017, 10:1947-1954.
- [22] Kim T, Grobmyer SR, Smith R, *et al.* Esophageal cancer—the five year survivors [J]. *Journal of surgical oncology*, 2011, 103(2):179-183.
- [23] Liu S, Dai JY, Yao L, *et al.* Esophageal Adenocarcinoma and Its Rare Association with Barrett's Esophagus in Henan, China [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10):e110348.

(收稿日期:2019-01-13)

学术编辑:刘曙光