

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.16.008

文章编号: 1005-8982(2017)16-0040-04

胃癌中高表达的 CBX7 对细胞迁移、侵袭的影响

宗华, 秦杰, 李红春, 朱立元

(广东省深圳市第三人民医院 普外科, 广东 深圳 518000)

摘要:目的 探究人胃癌组织中染色盒同源物 7(CBX7)的表达及对胃癌细胞侵袭能力的影响。**方法** 收集 2013 年 1 月 1 日 - 2015 年 1 月 1 日间于该院普通外科行手术切除的 45 例胃癌及对应癌旁组织,免疫组织化学染色观察 CBX7 蛋白表达,分析胃癌组织中 CBX7 蛋白表达高低与肿瘤临床特征的关系。通过重组质粒在胃癌 SGC-7901 细胞中过表达 CBX7,经 Transwell 小室实验确定 CBX7 过表达对胃癌细胞迁移侵袭的作用。**结果** CBX7 在胃癌组织中表达较癌旁组织下降($t=3.517, P=0.000$),胃癌组织低表达 CBX7 与肿瘤淋巴结转移($\chi^2=5.829, P=0.022$)及高 TNM 分期(III+IV 期, $\chi^2=4.465, P=0.047$)相关。过表达 CBX7 对 SGC-7901 的迁移($t=42.040, P=0.000$)及侵袭($t=40.119, P=0.000$)具有显著的削弱作用。**结论** CBX7 在胃癌组织中表达降低,过表达 CBX7 能够通过抑制胃癌细胞迁移及侵袭发挥抗肿瘤作用。

关键词: CBX7;胃癌;迁移;侵袭

中图分类号: R735.2;

文献标识码: A

CBX7 expression in human gastric cancer and its role in cell migration and invasion

Hua Zong, Jie Qin, Hong-chun Li, Li-yuan Zhu

(Department of General Surgery, the Third People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518000, China)

Abstract: Objective To study the expression of chromobox homolog 7 (CBX7) in human gastric carcinoma and its role in cell migration and invasion. **Methods** Immunohistochemical method was applied to detect the expression of CBX7 in gastric cancer and matched tumor-adjacent tissues of 45 patients. The correlations between CBX7 expression and clinical features were analyzed by Pearson chi-square test. Recombinant CBX7 plasmid was used to over-express CBX7 in SGC-7901 cells. The effect of CBX7 on cell migration and invasion was measured by Transwell assay. **Results** The expression of CBX7 was significantly down-regulated in the gastric cancer tissues, and the low expression of CBX7 was associated with lymphatic metastasis and advanced TNM stage (stage III and IV) ($P < 0.05$). Over-expression of CBX7 inhibited the migration and invasion of SGC-7901 cells ($P < 0.05$). **Conclusions** CBX7 expression is decreased in gastric cancer tissues. Up-regulation of CBX7 expression could play an anti-cancer role through inhibition of cell migration and invasion.

Keywords: CBX7; gastric cancer; migration; invasion

胃癌是我国常见的消化系统恶性疾病,幽门螺杆菌感染是胃癌发生的主要危险因素之一^[1]。由于胃癌早期仅有腹痛、纳差等非特异性表现,许多患者就诊时已失去根治性手术机会。目前,生物靶向诊断及治疗被认为是改善胃癌患者预后的重要方法之一。

染色盒同源物 7(chromobox homolog 7, CBX7)是黑腹果蝇的异染色质蛋白在人类细胞中的同源物,定位于人染色体 22q13.1 上,共有 6 个外显子,其编码的蛋白质主要分布于细胞核的染色质当中,通过与染色质的结合而发挥其调节功能^[2]。但 CBX7 在胃癌中的表达及其生物学功能尚不完全清楚。

收稿日期:2016-11-21

本研究在胃癌组织中检测了 CBX7 的表达,并探究 CBX7 表达与肿瘤临床特征间的相关性。利用基因重组技术过表达胃癌 SGC-7901 细胞中的 CBX7,检测过表达 CBX7 后细胞迁移与侵袭的变化。旨在为 CBX7 成为胃癌诊断生物学标志物及治疗靶点提供一定的研究依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料和试剂

本研究共收集在 2013 年 1 月 1 日 -2015 年 1 月 1 日行手术切除的胃癌及对应癌旁组织 45 例。其中男性 31 例,女性 14 例;年龄在 47~65 岁之间,中位年龄 53 岁。所有入组患者均签署研究知情同意书。切取组织标本于 4%多聚甲醛溶液中保存。Trizol 试剂及转染试剂均购自美国英威捷公司。逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒购自北京天根生物科技有限公司。CBX7 正向引物(5'-CCTGCTTCCTGGTCAC TTTC-3';反向引物 5'-CAG GGAGCTGGCTCACTA CA-3')及 β -actin 正向引物(5'-CTCCATCCTGGCC TCGCTGT-3';反向引物 5'-GCTGTCACCTTACCGT TCC-3')引物由北京天根生物科技有限公司合成。SP 免疫组织化学检测试剂盒由北京中杉金桥公司提供。基于 pEX-1(pGCMV/MCS/EGFP/Neo)真核表达载体(货号:C05001)的 CBX7 过表达质粒由上海吉玛生物科技有限公司合成提供,以空载体质粒为对照质粒。CBX7 及 β -actin 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司,人胃癌 SGC-7901 细胞由广东省深圳市第三人民医院实验室保存,Transwell 小室购自美国康宁公司,基质胶购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 石蜡包埋的组织切片首先脱蜡、水化,进而行高压抗原修复。通过 3%双氧水 H_2O_2 灭活内源性氧化物酶,10%血清封闭;以 1×PBS 溶液配制 1:100 兔抗人 CBX7 抗体工作液充分覆盖组织切片;4℃孵育一抗过夜,次日洗去多余一抗,并滴加相应物种二抗工作液;洗净多余二抗后用 HRP-BIO 复合物,反应后使用 DAB 进行显色。每张切片在 ×400 放大下随机选取 10 个视野观察阳性表达细胞数量,按 0 分, <5%;1 分, 6%~25%;2

分, 26%~50%;3 分, 51%~75%及 4 分, >75%的方法计分^[9]。以每张切片的平均得分为最终得分。

1.2.2 qRT-PCR 检测 按试剂说明书采用氯仿-苯酚抽提法提取 SGC-7901 细胞总 RNA。定量 500 ng 细胞总 RNA,按逆转录说明书配置逆转录体系,采用 42℃孵育 15 min 后 95℃孵育 30 min 之步骤合成 cDNA。取 2 μ l cDNA 为模板,按说明书配制 qPCR 反应体系,使用 Bio-Rad Real-time PCR 扩增仪进行 PCR 扩增 CBX7 及 β -actin。

1.2.3 质粒转染 SGC-7901 细胞在含 10%FBS 的 1×DMEM 培养基中培养至稳定传代 2、3 代。按过夜增殖至愈合度达 70%之密度接种 6 孔细胞培养板。达到预定培养密度后移除培养基,1×PBS 溶液充分洗涤细胞。转染分组:CBX7 组加入 2 500 ng/孔 CBX7 质粒及 5 μ l 转染试剂;对照组加入 2 500 ng/孔阴性对照质粒及 5 μ l 转染试剂。添加 DMEM 培养液至终体积 2 ml/孔。6 h 后更换正常培养基继续培养。

1.2.4 Western blot 检测 提取转染 72 h 后的 SGC-7901 细胞总蛋白。垂直电泳分离蛋白后以 70V 恒压转膜 120 min,5%脱脂牛奶室温封闭 1 h;以 1:1 000 稀释的 CBX7 抗体及 β -actin 抗体 4℃下孵育相应条带过夜。洗去残余一抗后采用 1:5 000 稀释的 HRP 标记山羊抗兔或抗鼠二抗室温孵育条带 1 h。于暗室内,ECL 法发光观察蛋白表达。

1.2.5 Transwell 小室检测 按 1:8 比例采用 DMEM 培养液稀释基质胶后,100 μ l/孔包被 Transwell 小室膜的上室面制成包胶小室来检测细胞侵袭;采用未包胶小室来检测细胞迁移。取转染 72 h 后的 SGC-7901 细胞,使用无血清培养基重悬细胞至 5×10⁵个/ml,上层小室每室加入 250 μ l 细胞悬液,培养室中加入含 10%胎牛血清的培养基,置于 37℃、5%二氧化碳 CO₂ 孵箱中培养 12 h。用棉签擦净上室面细胞,4%多聚甲醛固定下室面细胞,Giemsa 染液染色。100 倍光镜下随机选择 10 个视野计数下室面的细胞个数。以每个小室的平均细胞数为最终计数。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料以均数±标准差(\bar{x} ±s)表示,配对 *t* 检验分析 CBX7 在患者标本中的表达,成组 *t* 检验分析其余计量资料。 χ^2 检验分析计数资料。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌中 CBX7 的表达

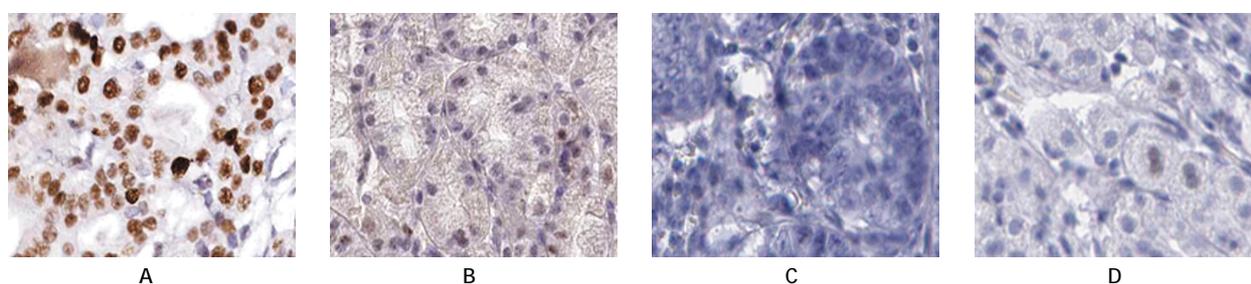
通过免疫组织化学染色发现 CBX7 蛋白主要定位于胃癌细胞及正常胃腺细胞的细胞核中 (见图 1), 以胃癌组织中 CBX7 免疫组织化学染色评分的均值为界, 45 例胃癌组织可划分为 CBX7 低表达组 ($n=33$) 及高表达组 ($n=12$)。对两类组织中 CBX7 免疫组织化学评分进行统计学分析表明胃癌组织中 CBX7 蛋白的表达低于癌旁组织 (1.24 ± 0.31) vs (3.52 ± 0.47), 差异有统计学意义 ($t=3.517, P=0.000$)。

2.2 CBX7 在胃癌的临床意义

针对不同 CBX7 表达量的两组患者进行统计分析表明, 淋巴结转移 ($\chi^2=5.829, P=0.022$) 及高 TNM 分期 (III+IV 期, $\chi^2=4.465, P=0.047$) 等显示肿瘤恶性程度较高的病理特征较多出现在 CBX7 低表达的胃癌组织中。见附表。

2.3 过表达 CBX7 抑制 SGC-7901 细胞迁移及侵袭

向 SGC-7901 细胞内转染入重组 CBX7 过表达质粒后, 过表达 CBX7 后胃癌细胞内 CBX7 mRNA ($t=37.028, P=0.000$, 见图 2A) 和蛋白 ($t=39.156, P=0.000$, 见图 2B) 的表达都明显提高。过表达 CBX7 后



A: 胃癌组织中 CBX7 高表达, B: 癌旁组织中 CBX7 高表达, C: 胃癌组织中 CBX7 低表达, D: 癌旁组织中 CBX7 低表达

图 1 CBX7 在胃癌及癌旁组织中的表达 (×400)

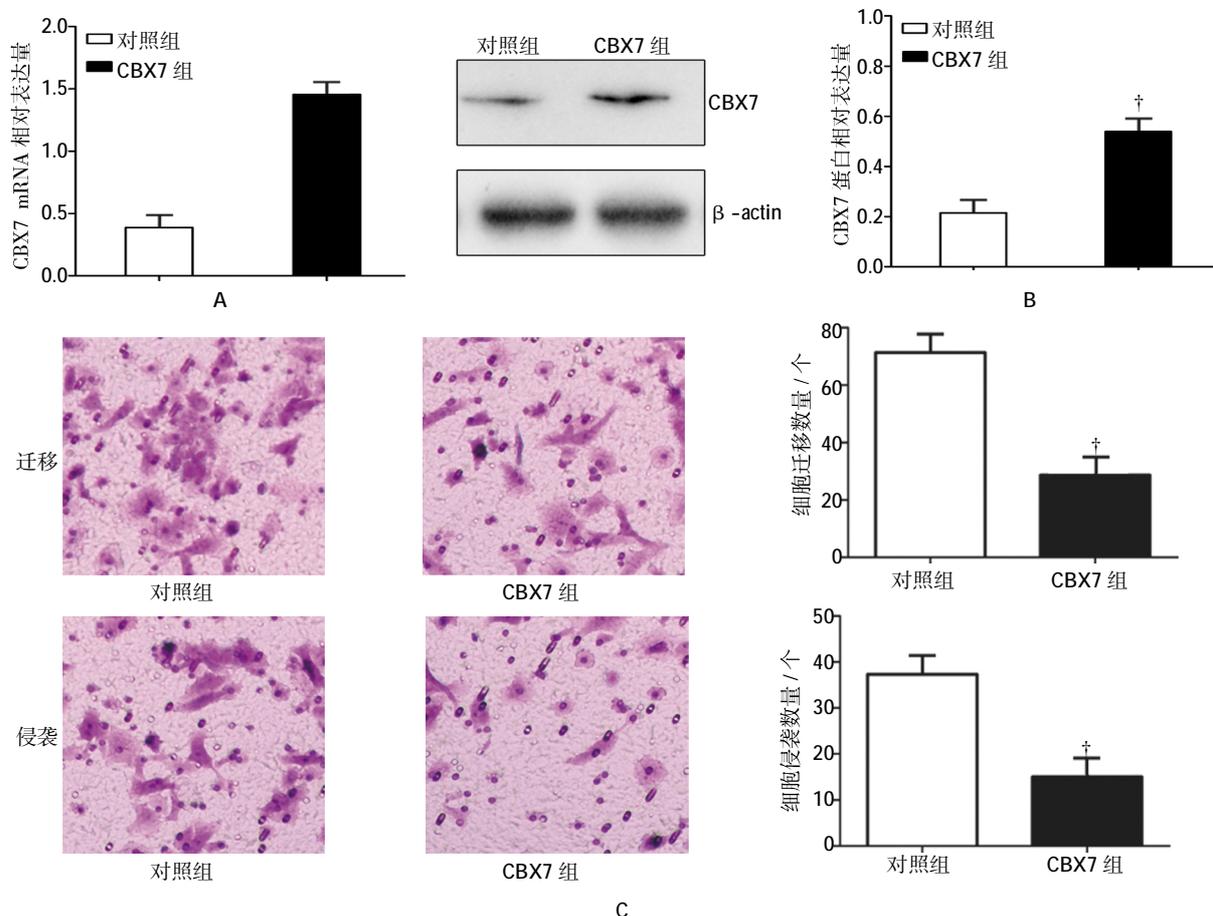


图 2 过表达 CBX7 对 SGC-7901 迁移及侵袭的影响

采用 Transwell 小室检测发现 CBX7 组迁移细胞数量 (74.201 ± 5.592 vs 35.374 ± 5.217), 差异有统计学意义 ($t=42.040, P=0.000$), 侵袭细胞数量 ($38.188 \pm$

7.171 vs 16.224 ± 3.113), 差异有统计学意义 ($t = 40.119, P=0.000$), 说明 CBX7 对细胞迁移及侵袭能力具有负向调控作用(见图 2C)。

附表 CBX7 表达与 GC 患者临床病理特征的关系 例

| 组别 | 年龄 | | 性别 | | 幽门螺杆菌感染 | | 肿瘤直径 | | 淋巴结转移 | | TNM 分期 | |
|--------------------|-------|-------|-------|----|---------|----|-------|-------|-------|----|--------|--------|
| | <50 岁 | ≥50 岁 | 男 | 女 | 有 | 无 | <3 cm | ≥3 cm | 无 | 有 | I、II | III、IV |
| CBX7 低表达($n=33$) | 20 | 13 | 22 | 11 | 15 | 18 | 15 | 18 | 10 | 23 | 13 | 20 |
| CBX7 高表达($n=12$) | 6 | 6 | 9 | 3 | 4 | 8 | 7 | 5 | 9 | 4 | 9 | 3 |
| χ^2 值 | 0.406 | | 0.029 | | 0.530 | | 0.584 | | 5.829 | | 4.465 | |
| P 值 | 0.734 | | 0.725 | | 0.517 | | 0.514 | | 0.022 | | 0.047 | |

3 讨论

CBX7 属于多梳蛋白家族,其在哺乳动物大脑、心脏、肾脏及骨骼肌中均有表达以维持正常组织的生长发育^[4]。近年来的研究发现 CBX7 在肿瘤中具有多种生物学功能,可以通过下调 INK4 α /ARF 信号通路而抑制肿瘤细胞增殖^[5],作为 MIR-9^[6]及 MIR-375^[7]等多种 microRNA 的靶基因而对细胞侵袭发挥调控作用,还能够促进肿瘤干细胞增殖和自我更新^[8]。本研究发现,CBX7 低表达于胃癌组织中。淋巴结转移及高 TNM 分期也较多的出现在 CBX7 低表达患者中,提示 CBX7 可能通过下调胃癌细胞侵袭而促进肿瘤发展。陈敏等^[9]在甲状腺乳头样癌中的研究也表明 CBX7 在肿瘤中的表达下调,说明 CBX7 的异常表达可能对肿瘤早期诊断具有一定的指导意义。

本研究通过基因重组技术提高了胃癌 SGC-7901 细胞中 CBX7 的表达,同时 SGC-7901 细胞的迁移及侵袭在过表达 CBX7 后也明显下调。上皮细胞间质化改变是影响细胞迁移及侵袭能力的重要机制之一^[10],KARAMITOPOULOU 等^[11]在胰腺癌中的研究发现,在组织学分化越差的胰腺癌组织中 CBX7 表达量越低,在胰腺癌细胞中过表达 CBX7 也可以提高 E-cadherin 的表达。预后分析还提示,低 CBX7 表达的胰腺癌患者生存期明显缩短。

综上所述,CBX7 的低表达在人类恶性肿瘤中具有一定的普遍性,且 CBX7 能够抑制多种肿瘤细胞的侵袭能力,是一种潜在的生物治疗靶点。

参 考 文 献:

[1] MARKAR S R, MIKHAIL S, MALIETZIS G, et al. Influence of

surgical resection of hepatic metastases from gastric adenocarcinoma on long-term survival: systematic review and pooled analysis[J]. Ann Surg, 2016, 263(6): 1092-1101.

[2] PALLANTE P, FORZATI F, FEDERICO A, et al. Polycomb protein family member CBX7 plays a critical role in cancer progression[J]. Am J Cancer Res, 2015, 5(5): 1594-1601.

[3] LI C, YANG W, ZHANG J, et al. SREBP-1 has a prognostic role and contributes to invasion and metastasis in human hepatocellular carcinoma[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(5): 7124-7138.

[4] GIL J, BERNARD D, MARTINEZ D, et al. Polycomb CBX7 has a unifying role in cellular lifespan[J]. Nat Cell Biol, 2004, 6(1): 67-72.

[5] MESEURE D, VACHER S, ALSIBAI K D, et al. Expression of ANRIL-polycomb complexes-CDKN2A/B/ARF genes in breast tumors: identification of a two-gene (EZH2/CBX7) signature with independent prognostic value[J]. Mol Cancer Res, 2016, 14(7): 623-633.

[6] XIE D, SHANG C, ZHANG H, et al. Up-regulation of miR-9 target CBX7 to regulate invasion ability of bladder transitional cell carcinoma[J]. Med Sci Monit, 2015, 21: 225-30.

[7] PICKL J M, TICHY D, KURYSHEV V Y, et al. Ago-RIP-Seq identifies polycomb repressive complex 1 member CBX7 as a major target of miR-375 in prostate cancer progression[J]. Oncotarget, 2016, 7(37): 59589-59603.

[8] 赵丽琴,郭伟剑,张晓伟,等. CBX7 在胃癌干细胞样细胞中的表达及其功能研究[J]. 中国癌症杂志, 2013, 23(2): 114-119.

[9] 陈敏. CBX7 蛋白在甲状腺乳头状癌中的表达及意义[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2015, 24(2): 185-188.

[10] TANG H, ZHAO J, ZHANG L, et al. SRPX2 enhances the epithelial-mesenchymal transition and temozolomide resistance in glioblastoma Cells[J]. Cell Mol Neurobiol, 2016, 36(7): 1067-1076.

[11] KARAMITOPOULOU E, PALLANTE P, ZLOBEC I, et al. Loss of the CBX7 protein expression correlates with a more aggressive phenotype in pancreatic cancer[J]. Eur J Cancer, 2010, 46(8): 1438-1444.

(张蕾 编辑)