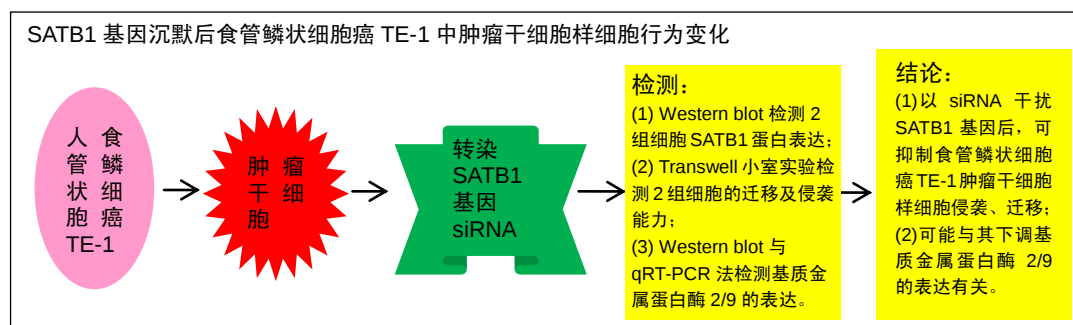


SATB1基因沉默抑制食管鳞状细胞癌TE-1中肿瘤干细胞样细胞侵袭及迁移能力

李晓雷¹, 徐俊¹, 胡欣², 何文武¹, 郑银彬¹ (南充市中心医院·川北医学院第二临床医学院, ¹胸外科, ²肿瘤科, 四川省南充市 637000)
DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0529 ORCID: 0000-0001-7049-7882(李晓雷)

文章快速阅读:



李晓雷, 男, 1971 年生, 重庆市人, 汉族, 副主任医师, 主要从事普胸外科研究。

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
稿件接受: 2018-03-13



文题释义:

SATB1: 是一种组织特异性的核基质结合蛋白, 高表达于胸腺细胞, 参与组织特异性基因的表达调控, 在染色体构建、免疫调节、肿瘤发展转移和细胞凋亡方面有重要作用。目前在乳腺癌、肝癌、结直肠癌、膀胱癌、肾透明细胞癌及卵巢黏液腺癌等肿瘤组织中检测到 SATB1 高表达。

RNA 干扰技术: 是将外源性或内源性双链 RNA 导入生物体细胞中, 抑制相应基因表达的一种技术。目前的 RNA 干扰技术主要是将外源性的 siRNA 基因引入生物体细胞, 介导基因沉默。

摘要

背景: 近来有研究证实 SATB1 与肿瘤的发生及发展有关, 但其在肿瘤转移中的机制尚不明确。

目的: 观察特异性干扰 SATB1 基因表达对食管鳞状细胞癌 TE-1 中肿瘤干细胞样细胞侵袭、迁移的影响。

方法: 采用免疫磁珠分选法从人食管鳞状细胞癌 TE-1 中分选 p75^{NTR} 阳性细胞与 p75^{NTR} 阴性细胞, 检测 p75^{NTR} 阳性细胞的体外增殖能力及克隆形成能力。取对数生长期的 p75^{NTR} 阳性肿瘤干细胞样细胞, 转染组利用 Lipofectamine 2000 脂质体法将 SATB1 基因 siRNA 转染至细胞中, 同时设置空载体转染的 p75^{NTR} 阳性细胞为对照, 转染后 72 h, 采用 Western blot 法检测 2 组细胞 SATB1 蛋白表达, Transwell 小室实验检测 2 组细胞的迁移及侵袭能力, Western blot 与 qRT-PCR 法检测基质金属蛋白酶 2/9 的表达。

结果与结论: ①与 p75^{NTR} 阴性细胞比较, p75^{NTR} 阳性细胞培养 3, 5, 7 d 的细胞增殖明显加快 ($P < 0.05$); ②p75^{NTR} 阳性细胞的克隆形成率明显高于 p75^{NTR} 阴性细胞 ($P < 0.05$); ③转染后 72 h 后, 转染组 SATB1 基因蛋白表达明显低于对照组 ($P < 0.05$), 迁移能力与侵袭能力明显低于对照组 ($P < 0.05$), 基质金属蛋白酶 2/9 的基因及蛋白表达明显低于对照组 ($P < 0.05$); ④结果提示, 以 siRNA 干扰 SATB1 基因后, 可抑制食管鳞状细胞癌 TE-1 肿瘤干细胞样细胞侵袭、迁移, 可能与其下调基质金属蛋白酶 2/9 的表达有关。

关键词:

食管鳞状癌; SATB1 基因; 肿瘤干细胞; 细胞侵袭; 细胞迁移; 基质金属蛋白酶; 基因沉默; Transwell 小室; 细胞转染; 克隆形成; p75^{NTR}

主题词:

食管肿瘤; 肿瘤干细胞; RNA 干扰; 淋巴细胞, 肿瘤浸润; 组织工程

基金资助:

四川省卫生和计划生育委员会科研课题(16PJ210), 课题名称: SATB1 靶向调控 FN1 基因对食管癌 TE-1 细胞侵袭迁移的影响及其分子机制研究。

Silencing of SATB1 inhibits the invasion and migration of tumor stem cells in TE-1 cell line of esophageal squamous cell carcinoma

Li Xiao-lei¹, Xu Jun¹, Hu Xin², He Wen-wu¹, Zheng Yin-bin¹ (¹Department of Thoracic Surgery, ²Department of Oncology, Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, Sichuan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Recent studies have confirmed that SATB1 is related to the occurrence and development of tumors, but its mechanism in tumor metastasis is unclear.

Li Xiao-lei, Associate chief physician, Department of Thoracic Surgery, Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, Sichuan Province, China

OBJECTIVE: To observe the effects of specific interference of SATB1 gene expression on esophageal carcinoma cell line TE-1 stem cell invasion and migration.

METHODS: p75^{NTR} positive cells and p75^{NTR} negative cells were isolated from human esophageal carcinoma TE-1 cell lines by immunomagnetic beads. The characteristics of p75^{NTR} positive cells were verified by *in vitro* proliferation and clone formation experiments. The p75^{NTR} positive tumor stem cells in logarithmic growth period were taken. In the transfection group, SATB1 gene siRNA was transfected into the cells by Lipofectamine 2000 liposome method. At the same time, the p75^{NTR} positive cells transfected with empty vector were used as control. After 72 hours of transfection, the expression of SATB1 in the cells was detected by western blot. Cell migration and invasion abilities were detected by Transwell assay. Expressions of matrix metalloproteinase 2/9 at mRNA and protein levels were detected by western blot and semi-quantitative RT-PCR, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with p75^{NTR} negative cells, the proliferation of p75^{NTR} positive cells increased significantly after 3, 5, 7 days of culture ($P < 0.05$). The clone formation rate of p75^{NTR} positive cells was significantly higher than that of p75^{NTR} negative cells ($P < 0.05$). After 72 hours of transfection, the expression of SATB1 in the transfection group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). The ability of migration and invasion in the transfection group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). Expressions of matrix metalloproteinase 2/9 mRNA and protein in the transfection group were significantly lower than those of the control group ($P < 0.05$). In conclusion, siRNA interference with SATB1 gene can reduce the invasion and migration ability of TE-1 tumor stem cells in esophageal carcinoma cell line through down-regulating the expression of matrix metalloproteinase 2/9.

Subject headings: Esophageal Neoplasms; Neoplastic Stem Cells; RNA Interference; Lymphocytes; Tumor-Infiltrating; Tissue Engineering

Funding: the Scientific Research Project of the Sichuan Provincial Health and Family Planning Commission, No. 16PJ210

0 引言 Introduction

在食管癌中,鳞状细胞癌是侵袭性极强且预后较差的病理类型,约占所有食管癌的90%,侵袭转移是恶性肿瘤主要的致死原因,目前尚不清楚其侵袭转移的分子机制^[1-3]。近年来有研究表明,肿瘤干细胞是肿瘤治疗后复发转移的起源细胞^[4]。肿瘤干细胞是一类具有极强自我更新、增殖及侵袭能力的一小群细胞,由体内正常干细胞发生突变而来^[5]。目前已在多种肿瘤细胞中成功分离出肿瘤干细胞,如白血病、乳腺癌、结肠癌、肝癌、肺癌等,并证实肿瘤干细胞也表达相应正常干细胞的表面标志物^[6-10]。

神经营养因子受体p75^{NTR}属于I型跨膜肿瘤坏死因子受体超家族成员,有研究证实p75^{NTR}阳性细胞具有干细胞特征,其也是食管鳞状细胞癌干细胞标志物之一^[11-12]。王峰^[13]发现p75^{NTR}主要表达于幼稚的食管鳞癌细胞中,而且p75^{NTR}阳性细胞在食管鳞癌组织中的表达与p63阳性细胞高度一致,而p63阳性细胞在皮肤鳞癌和宫颈癌中具有肿瘤干细胞性质,说明p75^{NTR}也可以作为食管鳞癌干细胞的膜蛋白标志;通过生物学特性研究和基因表达谱差异分析发现,与p75^{NTR}阴性食管鳞癌细胞比较,p75^{NTR}阳性食管鳞癌细胞具有较强的增殖能力及自我更新和分化能力,高表达干细胞特性相关基因,具有肿瘤干细胞特征。孙志刚等^[14]应用流式细胞仪检测p75^{NTR}在人食管癌标本癌细胞及食管癌细胞株TE-1、Eca109中的表达,在6个食管肿瘤细胞系(株)SHEC-4、SHEC-6、SHEC-7、SHEC-8、Eca109、TE-1中均检测到p75^{NTR}阳性细胞;随后应用磁珠分选法分选p75^{NTR}阳性与阴性食管肿瘤细胞,通过细胞增殖、分化、软琼脂克隆形成能力及动物体内成瘤实验发现,与阴性及未分选细胞相比,p75^{NTR}阳性细胞具有较强的增殖能力、分化产生其他表型细胞的能力、较强的克隆形成能力及较强的致瘤性,具有肿瘤干细胞的特性。基于以上研究,当前实验从人食管鳞状细胞癌TE-1中分离培养了p75^{NTR}阳性细胞,并通过体外增殖能力、克隆形成能力再一次验证p75^{NTR}阳性细胞的干细胞特性。

SATB1是首先在T细胞中被发现的富含AT序列的一种结合蛋白,参与调控几百种编码蛋白的基因^[15-16]。近来有研究证实SATB1与肿瘤的发生及发展有关,但其在肿瘤转移中的机制尚不明确^[17]。有关SATB1在食管癌中的作用鲜见报道,因此实验采用si-RNA干扰沉默食管鳞状细胞癌TE-1肿瘤干细胞样细胞中的SATB1基因,观察细胞迁移及侵袭能力的变化。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学对比观察实验。

1.2 时间及地点 于2017年1月至7月在南充市中心医院完成。

1.3 材料 食管鳞状细胞癌TE-1(上海富衡生物科技有限公司,品牌:ATCC);免疫磁珠(赛默飞世尔科技(中国)有限公司);鼠抗人p75^{NTR}(武汉艾美捷科技有限公司);总蛋白提取试剂盒、DMEM培养基(索莱宝科技有限公司);0.25%胰蛋白酶、胎牛血清(上海酶联生物);Transwell小室、CCK-8试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司);Transwell小室、流式细胞仪、倒置显微镜(北京瑞科中仪科技有限公司);脂质体Lipofectamine 2000(上海浩然生物技术有限公司);SATB1兔抗人多克隆抗体、基质金属蛋白酶2兔抗人多克隆抗体(批号:ab37150)、基质金属蛋白酶9兔抗人多克隆抗体(批号:ab73734,美国Abcam公司);反转录试剂盒(上海慧颖生物科技有限公司);重组人碱性成纤维细胞生长因子、重组人表皮细胞生长因子(北京博尔西科技有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 食管鳞状细胞癌TE-1的培养 常规复苏食管鳞状细胞癌TE-1,加入含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养基培养,置于37℃、体积分数5%CO₂培养箱中,观察细胞生长情况。培养48 h后换液1次,以后每周换液二三次,观察细胞生长至70%-80%融合后,以胰酶消化,以1:2或1:3传代。

1.4.2 食管鳞状细胞癌TE-1肿瘤干细胞样细胞的培养 取对数生长期的食管鳞状细胞癌TE-1, 加入鼠抗人p75^{NTR}, 4℃孵育30 min; 用PBS洗细胞2次, 1 500 r/min离心5 min, 去上清液; 再加PBS充分混悬细胞后, 加入羊抗小鼠IgG(二抗)的免疫磁珠混匀; 4℃孵育30 min; 利用磁极分别选出p75^{NTR}阳性细胞和p75^{NTR}阴性细胞^[19]。将分选后的细胞加入到含10 μg/L重组人碱性成纤维细胞生长因子和20 μg/L重组人表皮细胞生长因子的DMEM培养基中, 置于37℃、体积分数为5%CO₂条件下培养。

1.4.3 肿瘤干细胞样细胞相关检测

体外增殖能力: 采用CCK-8法检测细胞增殖能力。取分选的p75^{NTR}阳性细胞和p75^{NTR}阴性细胞, 分别以含10 μg/L重组人碱性成纤维细胞生长因子和20 μg/L重组人表皮细胞生长因子的DMEM培养基重悬, 调整细胞浓度为 $2 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 。将2种细胞悬液加入96孔板, 每孔200 μL, 设置无细胞的空白对照孔。培养1, 3, 5, 7, 9 d时, 每孔加入CCK-8液孵育4 h, 采用酶联免疫检测仪在490 nm处检测吸光度A值, 每种细胞每个时间点各取3孔, 取平均值。

克隆形成能力: ①制作底层琼脂: 将1.2%低熔点琼脂糖和2×DMEM培养基按1:1比例(含有2×抗生素和体积分数20%胎牛血清)混合, 加入6孔板中, 每孔2 mL, 冷却凝固; ②取分选的p75^{NTR}阳性细胞和p75^{NTR}阴性细胞, 用0.25%胰蛋白酶消化并制备单细胞, 以含体积分数20%胎牛血清的DMEM培养液重悬细胞, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$; ③制作上层琼脂: 将0.7%低熔点琼脂糖和2×DMEM培养基按1:1比例混合于无菌试管中, 再向管中加入0.2 mL细胞悬液, 充分混匀后注入铺有1.2%低熔点琼脂糖底层的平皿中, 冷却凝固。置入37℃、体积分数5%CO₂温箱中培养。2周后, 采用结晶紫染色细胞克隆, 在倒置显微镜下计数含50个细胞以上的克隆, 计算克隆形成率, 克隆形成率=克隆数/接种细胞数×100%。

1.4.4 细胞转染 取对数生长期的p75^{NTR}阳性细胞, PBS洗涤3遍, 加入0.25%胰蛋白酶消化并离心, 弃上清, 采用含10 μg/L重组人碱性成纤维细胞生长因子和20 μg/L重组人表皮细胞生长因子的DMEM培养基重悬细胞, 制成单细胞悬液, 将细胞以 2×10^5 /孔的浓度接种于6孔板中, 培养于37℃、体积分数5%CO₂饱和湿度培养箱中, 观察细胞融合达70%左右时弃去培养液, 依据说明书操作, 转染组利用Lipofectamine 2000脂质体法将100 nmol/L SATB1基因siRNA转染至细胞中, 同时设置空载体转染的p75^{NTR}阳性细胞为对照, 每组细胞3个复孔。SATB1基因的siRNA序列由美国Santa Cruz公司合成。SATB1基因siRNA序列(FAM荧光标记): 正义序列, 5'-GAG GUG UCU UCC GAA AUC UTT-3', 反义序列, 5'-AGA UUU CGG AAG ACA CCU CTT-3'。细胞转染6 h, 采用流式细胞仪检测转染效率为(68.25±4.93)%。

1.4.5 Western blot检测SATB1蛋白表达 转染72 h后收

集细胞, 采用裂解液提取可溶性蛋白, 在收集的蛋白样品中加入SDS-PAGE蛋白上样缓冲液, 转入PVDF膜, 2.5%脱脂奶粉室温封闭1 h, 加入一抗-SATB1兔抗人多克隆抗体(1:200稀释), 4℃轻摇孵育过夜。PBST洗膜3次, 加入HRP标记的羊抗兔二抗室温轻摇孵育1 h。蛋白条带用增强型化学发光显色系统进行显色, 设置上样内参蛋白为GAPDH。采用Biomad western分析仪自动分析蛋白表达含量。

1.4.6 Transwell小室实验 转染72 h后, 以0.25%胰蛋白酶消化并收集细胞, 制备细胞悬液。将转染后的p75^{NTR}阳性细胞, 采用无血清DMEM培养基调整细胞浓度, 以 2×10^5 /孔的密度铺于Transwell小室上层腔室。然后, 将含体积分数20%胎牛血清的DMEM培养基加入Transwell小室下层腔室。培养24 h后, 用棉签从Transwell小室上层腔室移走非迁移或非侵袭的细胞, 取Transwell小室, 以PBS洗涤3遍, 甲醇固定30 min, 采用0.1%结晶紫染色30 min(37℃), 在冰浴乙酸中震荡孵育染色细胞10 min, 检测570 nm处的A值, 计算细胞侵袭数。每个实验独立重复3次, 与空载体转染的p75^{NTR}阳性细胞比较, 计算迁移或侵袭的细胞数相对值。

1.4.7 Western blot检测侵袭蛋白基质金属蛋白酶2/9的表达 转染72 h后收集细胞, 采用裂解液提取可溶性蛋白, 在蛋白样品中加入SDS-PAGE蛋白上样缓冲液, 转入PVDF膜, 2.5%脱脂奶粉室温封闭1 h, 加入一抗(基质金属蛋白酶2/9兔抗人多克隆抗体), 4℃轻摇孵育过夜。PBST洗膜3次, 加入HRP标记的羊抗兔二抗室温孵育1 h。蛋白条带用增强型化学发光显色系统进行显色, 设置上样内参蛋白为GAPDH。采用Biomad western分析仪自动分析蛋白表达含量。

1.4.8 qRT-PCR法检测基质金属蛋白酶2/9基因的表达 转染72 h后收集细胞, 提取RNA, 取1 μL RNA溶液, 采用紫外分光光度计在260 nm和280 nm处检测A值, 计算RNA浓度。进行反转录操作, 合成cDNA, 配置实时定量PCR反应体系, 进行PCR扩增反应, 设置U6为内参, 反应条件为: 按95℃30 s, 95℃5 s, 60℃30 s, 共40个循环。采用2^{-ΔΔCt}方法分析基质金属蛋白酶2、9在两种细胞中的相对表达水平。基质金属蛋白酶2的正向引物为: 5'-TGA TCT TGA CCA GAA TAC CAT CGA-3', 反向引物为: 5'-GGC TTG CGA GGG AAG AAG TT-3'; 基质金属蛋白酶9的正向引物为: 5'-CCT GGA GAC CTG AGA ACC AAT C-3', 反向引物为: 5'-CCA CCC GAG TGT AAC CAT AGC-3'; U6 snRNA的正向引物为: 5'-ATT GGA ACG ATA CAG AGA AGA TT-3', 反向引物为: 5'-GGA ACG CTT CAC GAA TTT G-3'。

1.5 主要观察指标 ① p75^{NTR}阳性细胞的体外增殖能力和克隆形成能力; ②SATB1蛋白表达; ③食管癌肿瘤干细胞样细胞迁移能力; ④基质金属蛋白酶2/9基因及蛋白的表达。

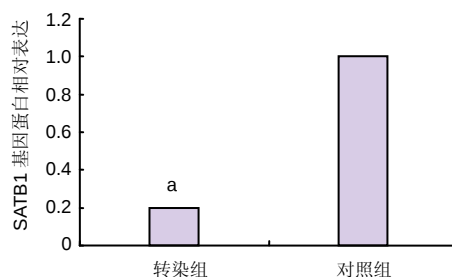
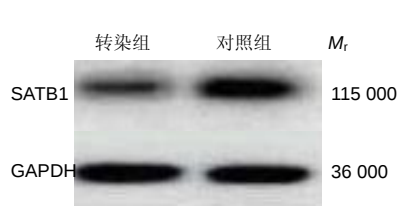


图2 转染组与对照组 SATB1 基因蛋白表达

Figure 2 Expression of SATB1 in transfection and control groups

图注: 与对照组相比, $^aP < 0.05$ 。

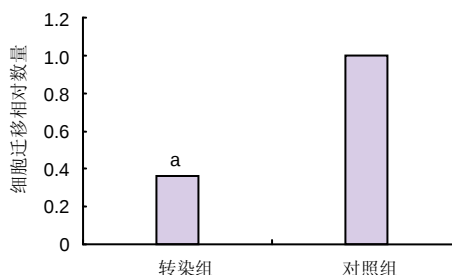
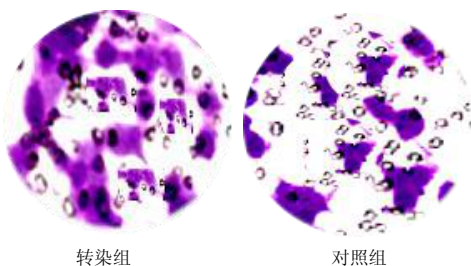


图3 转染组与对照组食管鳞状细胞癌 TE-1 肿瘤干细胞样细胞的迁移能力

Figure 3 Migration of TE-1 tumor stem cells in esophageal carcinoma cell line in the transfection and control groups

图注: 与对照组相比, $^aP < 0.05$ 。

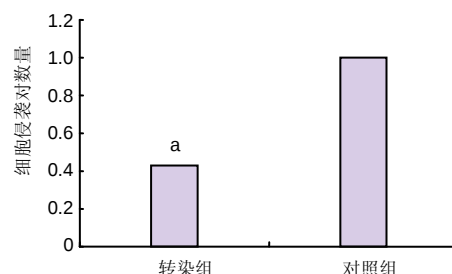
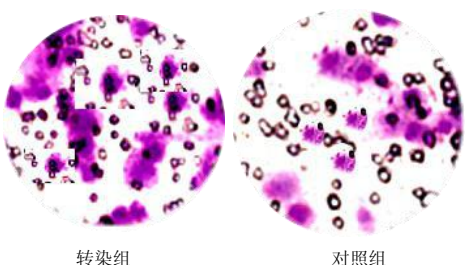


图4 转染组与对照组食管鳞状细胞癌 TE-1 肿瘤干细胞样细胞的侵袭能力

Figure 4 Invasion of TE-1 tumor stem cells in esophageal carcinoma cell line in the transfection and control groups

图注: 与对照组相比, $^aP < 0.05$ 。

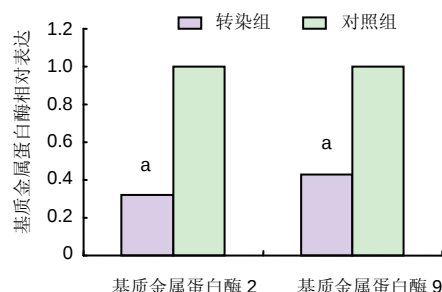


图5 Western blot 检测转染组与对照组食管鳞状细胞癌 TE-1 肿瘤干细胞样细胞基质金属蛋白酶的表达

Figure 5 Western blot detection of the expression of matrix metalloproteinases in TE-1 tumor stem cells in esophageal carcinoma cell line in the transfection and control groups

图注: 与对照组相比, $^aP < 0.05$ 。

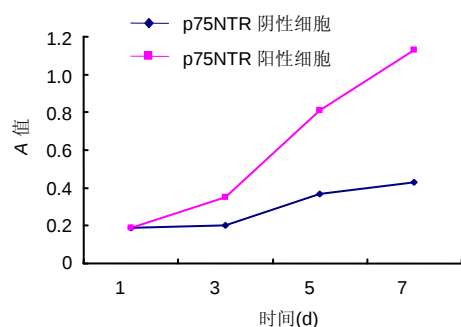


图1 p75^{NTR} 阴性细胞与 p75^{NTR} 阳性细胞培养不同时间点的增殖情况

Figure 1 Proliferation of p75^{NTR} positive cells and p75^{NTR} negative cells at different time of culture

图注: p75^{NTR} 阳性细胞培养 3, 5, 7 d 的细胞增殖明显快于 p75^{NTR} 阴性细胞。

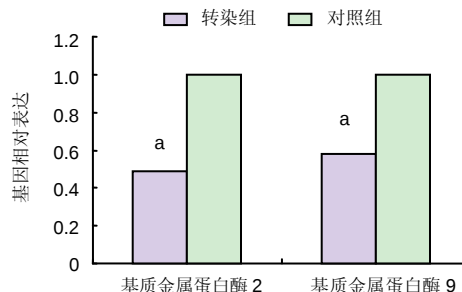


图6 qRT-PCR 检测转染组与对照组食管鳞状细胞癌 TE-1 肿瘤干细胞样细胞基质金属蛋白酶的表达

Figure 6 qRT-PCR detection of the expression of matrix metalloproteinases in TE-1 tumor stem cells in esophageal carcinoma cell line in the transfection and control groups

图注: 与对照组相比, $^aP < 0.05$ 。

1.6 统计学分析 采用SPSS 16.0统计学软件,所有实验均重复3次,数据资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本均数比较采用组间t检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 p75^{NTR}阳性细胞的体外增殖能力和克隆形成能力与p75^{NTR}阴性细胞比较, p75^{NTR}阳性细胞培养3, 5, 7 d的细胞增殖明显加快($P < 0.05$), 见图1。培养2周后, p75^{NTR}阳性细胞的克隆形成率明显高于p75^{NTR}阴性细胞[(42.63±5.98)%, (5.23±2.53)%, $P < 0.05$]。

2.2 Western blot检测SATB1蛋白表达 转染后72 h后, 转染组SATB1基因蛋白表达明显低于对照组($P < 0.05$), 见图2。

2.3 Transwell小室实验结果 Transwell实验检测干扰SATB1的表达对细胞迁移能力的影响, 结果表明, 干扰SATB1的表达可降低食管癌肿瘤干细胞样细胞的迁移能力, 与对照组比较差异有显著性意义(图3)。利用Transwell实验进一步检测了干扰SATB1表达对细胞侵袭能力的影响, 结果发现与对照组相比, 干扰SATB1的表达可降低食管癌肿瘤干细胞样细胞的侵袭能力, 与对照组比较差异有显著性意义(图4)。

2.4 基质金属蛋白酶2/9基因及蛋白的表达检测结果 Western blot检测显示与对照组比较, 转染组基质金属蛋白酶2/9蛋白的表达明显下降($P < 0.05$), 见图5。qRT-PCR检测显示, 与对照组比较, 转染组基质金属蛋白酶2/9基因的表达明显下降($P < 0.05$), 见图6。

3 讨论 Discussion

肿瘤的发生、发展过程极其复杂, 在此过程中涉及很多相关基因的调控。研究肿瘤的发生机制、转移机制, 对肿瘤的诊断、治疗及预后估计等有重要作用。SATB1是一种组织特异性的核基质结合蛋白, 高表达于胸腺细胞, 参与组织特异性基因的表达调控, 在染色体构建、免疫调节、肿瘤发展转移和细胞凋亡方面有重要作用。目前研究多集中于SATB1与临床疾病的关系, 已在乳腺癌、肝癌、结直肠癌、膀胱癌、肾透明细胞癌及卵巢黏液腺癌等肿瘤组织中检测到SATB1高表达^[21-24]。也有研究检测了SATB1在食管癌肿瘤组织中的表达, 刘康等^[25]应用免疫组织化学S-P法和荧光定量PCR方法分别检测食管癌和癌旁组织中SATB1蛋白和mRNA的表达, 研究发现SATB1蛋白在食管癌中的表达与癌组织肿瘤细胞分化程度、病理学分期和淋巴结转移等呈正相关, 而与患者年龄、性别等无明显相关, 并且SATB1 mRNA在食管癌组织中的表达显著高于癌旁组织, 证实SATB1的表达与食管癌的发生发展及转移密切相关。因此当前实验进一步研究SATB1在食管癌肿瘤发展与转移中的作用。

RNA干扰技术是将外源性或内源性双链RNA导入生

物体细胞中, 抑制相应基因表达的一种技术。目前的RNA干扰技术主要是将外源性的siRNA基因引入生物体细胞, 介导基因沉默。当前实验将SATB1基因的siRNA序列引入食管鳞状细胞癌TE-1肿瘤干细胞样细胞中, 首先, 实验从食管鳞状细胞癌TE-1中分离出p75^{NTR}阳性细胞与p75^{NTR}阴性细胞, 结果显示p75^{NTR}阳性细胞培养3, 5, 7 d的细胞增殖快于p75^{NTR}阴性细胞, 培养2周后的克隆形成率明显高于p75^{NTR}阴性细胞, 结果验证了p75^{NTR}阳性细胞具有更强的增殖与克隆形成能力, 其具有肿瘤干细胞样特性。然后, 将SATB1基因的siRNA序列引入p75^{NTR}阳性细胞中, 进行SATB1基因沉默。为了验证转染效果, 实验采用流式细胞仪检测转染效率, 结果显示转染效率为(68.25±4.93)%; 同时采用Western blot检测转染后细胞的SATB1基因表达, 发现转染SATB1基因siRNA后, p75^{NTR}阳性细胞SATB1基因蛋白表达明显低于空质粒转染组, 说明基因沉默成功。

为进一步研究SATB1在食管癌肿瘤发展与转移中的作用, 进行了Transwell小室实验。Transwell小室可用于研究肿瘤细胞的迁移与侵袭: ①迁移实验: 可研究肿瘤细胞的迁移能力或特定情况下肿瘤细胞的迁移能力。在上室种肿瘤细胞, 下室加入胎牛血清或某些特定的趋化因子, 肿瘤细胞会跑向营养成分高的下室, 进入下室的细胞量可反映肿瘤细胞的迁移能力; ②侵袭实验: 可研究肿瘤细胞的侵袭能力或特定情况下肿瘤细胞的侵袭能力。在聚碳酸酯膜上涂上一层基质胶, 模仿细胞外基质, 上室种肿瘤细胞, 下室加入胎牛血清或某些特定的趋化因子, 细胞要把基质消化后才可从上室迁移到下室, 计数进入下室的细胞量, 测定细胞的侵袭能力。当前实验采用Transwell小室进行了细胞迁移与细胞侵袭能力检测, 实验结果显示转染SATB1基因siRNA后, 食管鳞状细胞癌TE-1肿瘤干细胞样细胞的迁移细胞比例与侵袭细胞比例较对照组明显下降, 且有显著性差异, 说明沉默SATB1基因可抑制食管鳞状细胞癌TE-1肿瘤干细胞样细胞的迁移能力与侵袭能力。也从另一方面提示SATB1基因增强了食管鳞状细胞癌TE-1肿瘤干细胞样细胞的迁移能力与侵袭能力。那么SATB1基因是通过哪些途径调控食管鳞状细胞癌TE-1肿瘤干细胞样细胞的迁移能力与侵袭能力的? 对于此问题, 进行了肿瘤侵袭标志蛋白——基质金属蛋白酶检测。

为探讨SATB1基因是通过哪些途径调控食管鳞状细胞癌TE-1肿瘤干细胞样细胞的迁移能力与侵袭能力的, 实验检测了转染后食管鳞状细胞癌TE-1肿瘤干细胞样细胞中基质金属蛋白酶2/9的表达水平。基质金属蛋白酶可降解细胞外基质中的各种蛋白成分, 破坏肿瘤细胞侵袭的组织学屏障, 在肿瘤侵袭转移中扮演了重要角色, 其中基质金属蛋白酶2/9被证实是在食管癌肿瘤侵袭转移中有重要作用^[26-27]。Western blot检测与qRT-PCR检测结果显示转染SATB1基因siRNA后, 食管鳞状细胞癌TE-1肿瘤干细胞样细胞的基质金属蛋白酶2的基因及蛋白表达明显低于空质粒转染组, 基质金属

蛋白酶9的基因及蛋白表达也明显低于空质粒转染组,推测SATB1基因可能通过上调基质金属蛋白酶2/9的表达促进食管鳞状细胞癌TE-1肿瘤干细胞样细胞的侵袭迁移,有效沉默SATB1基因后,可通过下调基质金属蛋白酶2/9的表达抑制食管鳞状细胞癌TE-1肿瘤干细胞样细胞的侵袭迁移。但是对于SATB1基因通过哪些通路调控基质金属蛋白酶2/9的表达,而影响食管鳞状细胞癌TE-1肿瘤干细胞样细胞的基的迁移,还需要跟进一步的实验研究。

综上所述, SATB1基因表达可影响食管鳞状细胞癌TE-1肿瘤干细胞样细胞的迁移与侵袭,可为目前食管癌的干预提供相应的理论依据与支持,探索可用于靶向治疗的药物靶标,以更好地实现个体化治疗。

作者贡献: 李晓雷、徐俊、胡欣进行实验设计,实验实施为李晓雷、胡欣、何文武,实验评估为郑银彬,李晓雷成文。

经费支持: 该文章接受了“四川省卫生和计划生育委员会科研课题(16PJ210)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

伦理问题: 研究用细胞的实验方案符合相关伦理学要求,文章的撰写与编辑修改后文章遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者和通讯作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Sun H, Zou S, Zhang S, et al. Elevated DNA polymerase iota (Poli) is involved in the acquisition of aggressive phenotypes of human esophageal squamous cell cancer. *Int J Clin Exp Pathol*.2015;8(4):3591-601.
- [2] Chen P, Fang M, Wan Q, et al. High-sensitivity modified Glasgow prognostic score (HS-mGPS) is superior to the mGPS in esophageal cancer patients treated with chemoradiotherapy. *Oncotarget*.2017;8(59):99861-99870.
- [3] 刘盈君,刘守钦,王家林,等.济南市2011-2015年食管癌流行特征分析[J].中华肿瘤防治杂志,2017,24(3):147-150.
- [4] 艾军华,时军.肿瘤干细胞和上皮-间质转化之间的关系及其在肿瘤侵袭转移中的作用[J].医学综述,2015,21(12):2180-2183.
- [5] 李远强,张坤,孙丽丹.肿瘤干细胞靶向给药系统的研究进展[J].海南医学,2017,28(2):260-262.
- [6] Tabe Y, Konopleva M. Leukemia stem cells microenvironment. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1041:19-32.
- [7] Wang T, Fahrman JF, Lee H, et al. JAK/STAT3-regulated fatty acid β -Oxidation is critical for breast cancer stem cell self-renewal and chemoresistance. *Cell Metab*. 2018;27(1):136-150.
- [8] 李安.艾迪注射液联合FOLFOX4化疗对晚期结肠癌患者肿瘤干细胞特性及抗肿瘤免疫应答的影响[J].海南医学院学报,2017,23(8):1113-1116.
- [9] 廖星芸,汪洋,孙建国,等. IR-780联合阿霉素对肝癌干细胞样细胞的杀伤效应研究[J].第三军医大学学报,2017,39(12):1206-1212.
- [10] 朱海振,耿涛,李雪涛,等.利用分子信标检测microRNA并成像肺癌干细胞的实验研究[J].重庆医学,2016,45(15):2036-2039.
- [11] 佟冬冬,张风河,姚瑶,等. p75神经营养蛋白受体阳性舌鳞状细胞癌细胞的生物学特性研究[J].华西口腔医学杂志,2014,(1):18-22.
- [12] 佟冬冬. p75神经营养因子受体作为舌鳞癌干细胞表面标志物的实验研究[J].山东大学,2012.
- [13] 王峰. p75<NTR>作为食管鳞癌干细胞膜蛋白标志的实验研究[D].第二军医大学,2009.
- [14] 孙志刚,黄盛东,张宝仁,等.应用p75NTR分选食管肿瘤干细胞并鉴定其生物学特性[J].第二军医大学学报,2009,30(5):481-486.
- [15] Wang Q, Hu SC, Yang CS, et al. Inhibition of prostate cancer cell growth in vivo with short hairpin RNA targeting SATB1. *Oncol Lett*.2017;14(6):6592-6596.
- [16] Tanaka Y, Sotome T, Inoue A, et al. SATB1 conditional knockout results in sjögren's syndrome in mice. *J Immunol*. 2017;199(12):4016-4022.
- [17] Choudhary D, Clement JM, Choudhary S, et al. SATB1 and bladder cancer: Is there a functional link? *Urol Oncol*. 2018;36(3):93.e13-93.e21
- [18] Lee JJ, Kim M, Kim HP. Epigenetic regulation of long noncoding RNA UCA1 by SATB1 in breast cancer. *BMB Rep*. 2016;49(10):578-583.
- [19] 黄盛东,刘晓红,袁扬,等.食管癌中p75NTR阳性细胞池的变化与顺铂耐药机制的研究[J].中华实验外科杂志,2007,24(12):1560-1562.
- [20] 瞿丛新,吴莹莹. SATB1和E-cad在乳腺癌中的表达及其与淋巴结转移的关系[J].检验医学与临床,2017,14(8):1116-1118.
- [21] 吴冬梅. SATB1表达调控肝癌转移能力的临床病理学意义[D].南昌大学,2015.
- [22] 高超,朱艳卿,刘颖,等. SATB1基因在结直肠癌中的表达及其临床意义[J].肿瘤防治研究,2013,40(2):159-163.
- [23] 吴晓飞,朱朝辉,万锋,等. AT富集序列特异性结合蛋白1在人膀胱移行细胞癌组织中的表达及其与上皮间质转化的关系[J].中华实验外科杂志,2013,30(6):1145-1148.
- [24] 王坤,颜克强,刘承,等. SATB1在肾透明细胞癌中的表达及临床意义[J].中国现代医学杂志,2011,21(25):3106-3109,3115.
- [25] 刘康,李杰,王兰,等. SATB1基因在食管癌中的表达及临床意义[J].川北医学院学报, 2015,30(4):447-450.
- [26] Shi ZM, Liu YN, Fu B, et al. Expression profile of eukaryotic translation initiation factor and matrix metalloproteinase 9 in endometrial cancer tissue. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2017;31(4):1053-1059.
- [27] Weng H, Zeng XT, Wang XH, et al. Genetic association between matrix metalloproteinases gene polymorphisms and risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Front Physiol*.2017;8:975.