

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.06.005

· 基础研究 ·

## BCSC-1 过表达抑制肝癌 Bel-7402 细胞的增殖、侵袭、黏附和迁移

田俊芳, 邸大琳, 王洪伟, 巩方, 郇雪洁, 鞠吉雨(山东省高校免疫学重点实验室, 潍坊医学院免疫学教研室, 山东潍坊 261053)

**[摘要]** **目的:** 研究人乳腺癌候选抑癌蛋白 1 基因(breast cancer suppressor candidate 1, *BCSC-1*)过表达对肝癌 Bel-7402 细胞的增殖、侵袭、黏附和迁移的影响, 并探讨其可能的机制。 **方法:** 将 pcDNA3.1/v5-HisB-*BCSC-1* 和空质粒 pcDNA3.1/v5-HisB 转染的 Bel-7402 细胞作为 *BCSC-1* 组和空载体组, Bel-7402 细胞为野生型组。MTT 法、Transwell 实验、体外黏附实验和划痕实验分别检测 *BCSC-1* 过表达对 Bel-7402 细胞增殖、侵袭、黏附和迁移的影响, Real-time PCR 检测 *BCSC-1* 过表达对 Bel-7402 细胞中与细胞增殖、黏附相关的 *ICAM-1*、*PTTG*、骨桥蛋白(osteopontin, *OPN*) mRNA 表达的影响。 **结果:** 转染 pcDNA3.1/v5-HisB-*BCSC-1* 后 Bel-7402 细胞中 *BCSC-1* mRNA 的表达水平显著高于空载体组和野生型细胞 [ $(10.58 \pm 0.56)$  vs  $(1.10 \pm 0.22)$ 、 $(1.00 \pm 0.01)$ ], 均  $P < 0.01$ ], 成功制备 *BCSC-1* 稳定过表达的 Bel-7402 细胞株。与空载体组和野生型组相比, *BCSC-1* 组 Bel-7402 细胞生长速度明显减慢 [72 h:  $(0.29 \pm 0.003)$  vs  $(0.34 \pm 0.014)$ 、 $(0.35 \pm 0.013)$ ], 均  $P < 0.05$ ]; 侵袭率 [ $(76.20 \pm 1.85)\%$  vs  $(93.42 \pm 3.24)\%$ 、 $(100.00 \pm 1.05)\%$ ], 均  $P < 0.01$ ]; 黏附率 [ $(58.57 \pm 0.84)\%$  vs  $(97.14 \pm 0.84)\%$ 、 $(100.00 \pm 1.30)\%$ ], 均  $P < 0.01$ ] 显著降低, 迁移距离显著降低 [ $(116.60 \pm 10.58)$  vs  $(231.33 \pm 10.26)$ 、 $(237.96 \pm 11.58)$  μm], 均  $P < 0.01$ ]; 同时过表达 *BCSC-1* 的 Bel-7402 细胞的 *OPN* mRNA 表达量明显降低 [ $(0.12 \pm 0.06)$  vs  $(0.95 \pm 0.14)$ 、 $(1.00 \pm 0.08)$ ], 均  $P < 0.01$ ], *ICAM-1*、*PTTG* mRNA 表达无明显变化。 **结论:** *BCSC-1* 过表达能够抑制 Bel-7402 细胞的增殖、侵袭、黏附和迁移能力, 其机制可能与 *OPN* 基因表达下降有关。

**[关键词]** 乳腺癌候选抑癌蛋白 1 基因(*BCSC-1* 基因); 肝癌; Bel-7402 细胞; 骨桥蛋白; 增殖; 侵袭; 黏附; 迁移

**[中图分类号]** R735.7; R730.54 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2013)06-0661-06

## BCSC-1 overexpression inhibited the proliferation, invasion, adhesion and migration of hepatocellular carcinoma Bel-7402 cells

Tian Junfang, Di Dalin, Wang Hongwei, Gong Fang, Huan Xuejie, Ju Jiyu (Key laboratory of Immunology in Universities of Shandong, Department of Immunology, Weifang Medical College, Weifang 261053, Shandong, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effects of overexpression of *BCSC-1* gene on the proliferation, invasion, adherence and migration abilities of hepatoma carcinoma Bel-7402 cells, and to investigate the possible mechanism. **Methods:** Bel-7402 cells were transfected by pcDNA3.1/v5-HisB-*BCSC-1* and pcDNA3.1/v5-HisB respectively as *BCSC-1* group and empty vector group, and the wild-type Bel-7402 cells as a wild group. Proliferation, invasion, adherence and migration abilities of the Bel-7402 cells were detected by MTT assay, Transwell assay, adhesion experiment in vitro and scratch test, respectively. Real-time PCR was performed to detect the expression of *BCSC-1* and osteopontin (*OPN*), *ICAM-1*, *PTTG* mRNA, which were correlated with the cell growth and adhesion in Bel-7402 cells. **Results:** After transfected by pcDNA3.1/v5-HisB-*BCSC-1*, the expression of *BCSC-1* mRNA in Bel-7402 cells was significantly raised compared with that of empty vector group and the wild-type group ( $[10.58 \pm 0.56]$  vs  $[1.10 \pm 0.22]$ ,  $[1.00 \pm 0.01]$ ; all  $P < 0.01$ ). The Bel-7402 cell line stably overexpressing *BCSC-1* was successfully established. Compared with the empty vector group

**[基金项目]** 山东省自然科学基金资助项目(No. 2009CM019); 潍坊医学院大学生科技创新基金资助项目(No. KX2012009)。Project supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province(No. 2009CM019), and the Students Research Foundation of Weifang Medical College(No. KX2012009)

**[作者简介]** 田俊芳(1991-), 女, 山东省青州市人, 本科生, 主要从事肿瘤基因治疗的研究。E-mail: tianjunfang@126.com

**[通信作者]** 鞠吉雨(Ju Jiyu, Corresponding author), E-mail: jujiyu@163.com

**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20131202.1522.005.html>

and wild group, the growth rate of Bel-7402 cells in the BCSC-1 group was obviously slower (72 h: [0.29 ± 0.003] vs [0.34 ± 0.014], [0.35 ± 0.013]; all  $P < 0.05$ ), the invasion rate ([76.20 ± 1.85]% vs [93.42 ± 3.24]%, [100.00 ± 1.05]%; all  $P < 0.01$ ) and the adhesion rate ([58.57 ± 0.84]% vs [97.14 ± 0.84]%, [100.00 ± 1.30]%; all  $P < 0.01$ ) were obviously decreased, the migratory distance was significantly reduced ([116.60 ± 10.58] vs [231.33 ± 10.26], [237.96 ± 11.58]  $\mu\text{m}$ ; all  $P < 0.01$ ). The expression of *OPN* mRNA in the Bel-7402 cells which the *BCSC-1* was up-regulated was significantly decreased ([0.12 ± 0.06] vs [0.95 ± 0.14], [1.00 ± 0.08]; all  $P < 0.01$ ). No significant changes were observed in the expression of *ICAM-1* and *PTTG* mRNA. **Conclusion:** Overexpression of *BCSC-1* can inhibit the proliferation, invasion, adherence and migration abilities of Bel-7402 cells, which may be related to the decreased expression of *OPN*.

[ **Key words** ] breast cancer suppressor candidate 1 gene (*BCSC-1*); hepatoma; Bel-7402 cells; osteopontin; proliferation; invasion; adhesion; migration

[ Chin J Cancer Biother, 2013, 20(6): 661-666 ]

肿瘤的恶性生物学行为受众多基因的调控, 抑癌基因是在肿瘤中缺失、突变或低表达的一类分子, 它们的失活常引起肿瘤细胞恶性增殖、转移、侵袭等生物学效应<sup>[1-2]</sup>。人乳腺癌候选抑癌蛋白 1 基因 (breast cancer suppressor candidate 1, *BCSC-1*) 位于人类染色体 11q23-q24。Martin 等<sup>[3]</sup>认为 *BCSC-1* 是一种候选抑癌基因, 发现其在多种实体瘤 (如乳腺癌、肺癌等) 细胞中存在缺失现象, 80% 肿瘤细胞株 (33/41) 中 *BCSC-1* mRNA 表达明显缺失; 将 *BCSC-1* 基因导入肿瘤 (如乳腺癌、肺癌、卵巢癌等) 细胞中, 在一定程度上可抑制细胞的恶性生物学行为以及在裸鼠体内的成瘤性生长。本课题组前期利用 PCR 方法检测了 Bel-7402、Hela、HepG-2 和 THP1 细胞中 *BCSC-1* 基因的表达量, 发现 *BCSC-1* 在肝癌 Bel-7402 细胞中存在低表达现象。因此, 本研究将重组质粒 pcDNA3.1/v5-HisB-*BCSC-1* 转入 Bel-7402 细胞, 观察 *BCSC-1* 基因过表达对 Bel-7402 细胞恶性生物学行为的影响, 检测与细胞增殖、黏附、侵袭有关的 *PTTG*、*ICAM-1* 和骨桥蛋白 (osteopontin, *OPN*) 等基因表达的变化, 对 *BCSC-1* 的作用机制进行初步探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

真核表达载体 pcDNA3.1/v5-HisB、真核重组质粒 pcDNA3.1/v5-HisB-*BCSC-1*、人肝癌 Bel-7402 细胞均由本实验室保存, Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司, Transwell 小室购自美国 Corning Constar 公司, Lipotap 脂质体转染试剂购自碧云天生物技术研究, Real-time PCR 试剂盒购自大连宝生物公司。

### 1.2 稳定过表达 *BCSC-1* 的 Bel-7402 细胞的构建

Bel-7402 细胞以  $4 \times 10^5$  个/孔的密度接种于六

孔板, 待第 2 天细胞长至 70% ~ 80% 汇合时, 按 Lipotap 脂质体转染试剂说明书操作, *BCSC-1* 组转染重组质粒 pcDNA3.1/v5-HisB-*BCSC-1*, 空载体组转染对照质粒 pcDNA3.1/v5-HisB, 野生型组 Bel-7402 细胞组作为空白对照。3 组细胞在 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^{\circ}\text{C}$  温箱培养 24 h 后, 在培养基中加入终质量浓度为 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 G418 进行抗性筛选, 待第 7 天野生型细胞全部死亡后将空载体组和 *BCSC-1* 组细胞的 G418 调整为 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 稳定培养 2 周后得到 G418 阳性克隆。Real-time PCR 测定 *BCSC-1* 的表达。

### 1.3 MTT 法检测 *BCSC-1* 过表达对 Bel-7402 细胞增殖能力的影响

胰酶消化对数生长期的 *BCSC-1* 组、空载体组和野生型组细胞, 离心后用 DMEM 悬浮细胞, 调整细胞密度为  $2.5 \times 10^3$  个/ml, 96 孔板内每孔接种 200  $\mu\text{l}$  细胞悬液, 连续培养 7 d, 每隔 24 h 进行 MTT 检测。每孔加入 20  $\mu\text{l}$  MTT 溶液后, 于 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^{\circ}\text{C}$  温箱培养 4 h, 每孔加入 100  $\mu\text{l}$  三联液 [10% SDS, 5% (V/V) 异丁醇, 0.01 mol/L HCl], 隔夜后用酶标仪测定 492 nm 处光密度 ( $D$ ) 值, 每组细胞设 3 个复孔。细胞增殖抑制率 (%) =  $(D_{\text{空白组}} - D_{\text{实验组}}) / D_{\text{空白组}} \times 100\%$ 。

### 1.4 Transwell 实验检测 *BCSC-1* 过表达对 Bel-7402 细胞的侵袭能力的影响

Matrigel 胶用含 1% 胎牛血清的 DMEM 按 1:8 稀释, 取 60  $\mu\text{l}$  铺于 Transwell 小室中, 放入 37  $^{\circ}\text{C}$  温箱 4 h 使其凝固。取饥饿 12 h 的 *BCSC-1* 组、空载体组和野生型组细胞, 胰酶消化, 离心后用含 1% 胎牛血清的 DMEM 重悬, 调整密度至  $5 \times 10^5$  个/ml。每个小室中加入 100  $\mu\text{l}$  的细胞悬液, 下室加入 600  $\mu\text{l}$  含 20% 胎牛血清的 DMEM, 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^{\circ}\text{C}$  温箱培养 24 h 后弃去小室内的培养基, 用棉签轻轻擦掉

上层未迁移的细胞, PBS 洗 2 遍后用预冷的甲醇固定 10 min, 去掉甲醇, 用 0.1% 结晶紫染色 20 min, PBS 洗 3 次, 显微镜下观察细胞。用蘸有 33% 醋酸的棉签将上室壁上的染色擦干净后, 每室加入 100  $\mu\text{l}$  33% 醋酸溶解颜色, 酶标仪测定 570 nm 波长处光密度( $D$ )值。每组细胞设 3 个复孔, 取平均值计算细胞侵袭率。细胞侵袭率(%) =  $D_{\text{实验组}}/D_{\text{空白组}} \times 100\%$ 。

### 1.5 体外黏附实验检测 BCSC-1 过表达对 Bel-7402 细胞黏附能力的影响

96 孔板中每孔加 25  $\mu\text{l}$  Matrigel 胶, 37  $^{\circ}\text{C}$  温箱过夜, 每孔加入 20  $\mu\text{l}$  含 2% BSA 的无血清 DMEM, 37  $^{\circ}\text{C}$  封阻 1 h, PBS 洗两遍备用。将处于对数生长期的 BCSC-1 组、空载体组和野生型组细胞制成密度为  $5 \times 10^5$  个/ml 的细胞悬液, 每孔 100  $\mu\text{l}$  接种于上述 96 孔板, 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^{\circ}\text{C}$  温箱培养 1 h 后弃培养基及未贴壁细胞, 每孔加入 20  $\mu\text{l}$  MTT 溶液, 连续培养 4 h 后每孔加入 100  $\mu\text{l}$  三联液过夜, 酶标仪测定 492 nm 波长处光密度( $D$ )值。每组细胞设 3 个复孔。细胞黏附率(%) =  $D_{\text{实验组}}/D_{\text{空白组}} \times 100\%$ 。

### 1.6 划痕实验检测 BCSC-1 过表达对 Bel-7402 细胞迁移能力的影响

取对数生长期 BCSC-1 组、空载体组和野生型组细胞, 胰酶消化、离心后, 用完全 DMEM 重悬, 制成密度为  $2 \times 10^5$  个/ml 的细胞悬液。按每孔 2 ml 接种于 6 孔板, 待细胞长至 80% 左右汇合时将原培养基换为无血清 DMEM, 培养 24 h 后用 200  $\mu\text{l}$  无菌 Tip 头在单层细胞上划痕, 分别于划痕后 0、24 h 光镜下观察细胞迁移情况, 并使用 NIS-Elements D3.2 电子显微镜拍照系统测量迁移距离。

### 1.7 Real-time PCR 检测 BCSC-1 过表达对 Bel-7402 细胞中 PTTG、ICAM-1 和 OPN 表达的影响

提取细胞总 RNA, 测定 RNA 浓度及纯度并进行反转录合成 cDNA, 反转录体系为: 总 RNA 3  $\mu\text{l}$ , Oligo(DT) 18 引物 1  $\mu\text{l}$ , dNTP 2  $\mu\text{l}$ ,  $5 \times$  反应缓冲液 4  $\mu\text{l}$ , RNase 抑制剂 1  $\mu\text{l}$ , 逆转录酶 1  $\mu\text{l}$ , 加 DEPC 处理水补足反应体系为 20  $\mu\text{l}$ , 反应条件为 42  $^{\circ}\text{C}$ 、60 min 使反应完全, 70  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min 终止反应。

利用上述逆转录产物 cDNA 进行 PCR 扩增, 各基因引物见表 1。反应体系如下: 预混液( $2 \times$ ) 12.5  $\mu\text{l}$ , 上游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{l}$ , 下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{l}$ , DNA 模板(cDNA) 2  $\mu\text{l}$ , 加  $\text{dH}_2\text{O}$  8.5  $\mu\text{l}$ , 补足反应体系为 25  $\mu\text{l}$ 。按三步法进行 DNA 扩增, 反应条件如下: 94  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 94  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$ 、45 s; 40 次循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。各基因

mRNA 水平采用相对定量法计算, 即将待测基因以及  $\beta$ -actin 的 Ct 值代入公式  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  计算。以野生组基因表达水平为 1, 计算其他组基因 mRNA 相对水平。实验设 2 个复管, 重复 3 次。

表 1 扩增用基因引物序列与产物长度  
Tab.1 Sequence of the primers and size of the product for amplification

Gene	Primer sequence(5'-3')	Product size(bp)
PTTG	F:ACCCGTGTGGTTGCTAAGG	90
	R:ACGTGGTGTGAACTTGAGAT	
ICAM-1	F:ATGCCAGACATCTGTGTCC	112
	R:GGGTCTCTATGCCCAACAA	
OPN	F:CTCCATTGACTCGAACGACTC	230
	R:CAGGTCTGCGAACTTCTTAGAT	
BCSC-1	F:TGCTTCTGCCCCATTGAAGA	175
	R:ACTGTGCTGGTCTTGTGAC	
$\beta$ -actin	F:CCTAGAAGCATTTCGGGTGG	416
	R:GAGCTACGAGCTGCCTGACG	

### 1.8 统计学处理

计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS17.0 统计学软件, 组间比较采用独立样本  $t$  检验, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功构建稳定过表达 BCSC-1 的 Bel-7402 细胞

提取 BCSC-1 组细胞总 RNA, 反转录合成 cDNA, Real-time PCR 检测细胞内 BCSC-1 mRNA 的表达水平。结果(图 1)显示, BCSC-1 mRNA 在野生型组和空载体组 Bel-7402 细胞中的表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 与空载体组和野生组相比, BCSC-1 组 Bel-7402 细胞的 BCSC-1 mRNA 表达显著升高[(10.58  $\pm$  0.56) vs (1.10  $\pm$  0.22)、(1.00  $\pm$  0.11)], 均  $P < 0.01$ 。

### 2.2 BCSC-1 过表达抑制 Bel-7402 细胞的增殖

细胞生长曲线(图 2)显示, 空载体组与野生型组的细胞增殖始终无显著差异( $P > 0.05$ )。第 3 天起, BCSC-1 组细胞的生长速度明显慢于空载体组及野生型组细胞[(0.29  $\pm$  0.003) vs (0.34  $\pm$  0.014)、(0.35  $\pm$  0.013)], 均  $P < 0.05$ , 随培养时间的延长差别越来越明显, 第 7 天差异达到最大

[ ( 0.35 ± 0.004 ) vs ( 0.53 ± 0.004 )、( 0.58 ± 0.009 ), 均  $P < 0.01$  ], 且 BCSC-1 组细胞的增殖抑制率显著高于空载体组和野生型组 [ ( 40.24 ± 0.79 )% vs ( 8.46 ± 0.75 )%、( 0.00 ± 1.47 )%, 均  $P < 0.01$  ]。

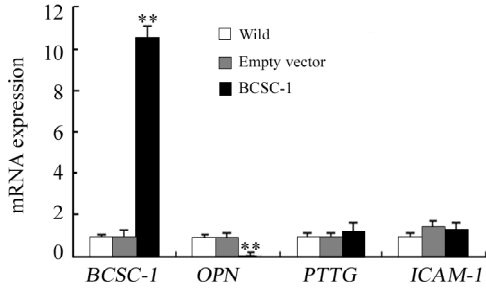


图 1 重组质粒 pcDNA3.1/v5-HisB-BCSC-1 转染对 Bel-7402 细胞 BCSC-1、PTTG、ICAM-1 和 OPN mRNA 表达的影响

Fig. 1 Effect of recombinant plasmid pcDNA3.1/v5-HisB-BCSC-1 transfection on the expressions of BCSC-1, PTTG, ICAM-1 and OPN mRNA in Bel-7402 cells  
\*\*  $P < 0.01$  vs empty vector group and wild-type group

### 2.3 BCSC-1 过表达抑制 Bel-7402 细胞的侵袭能力

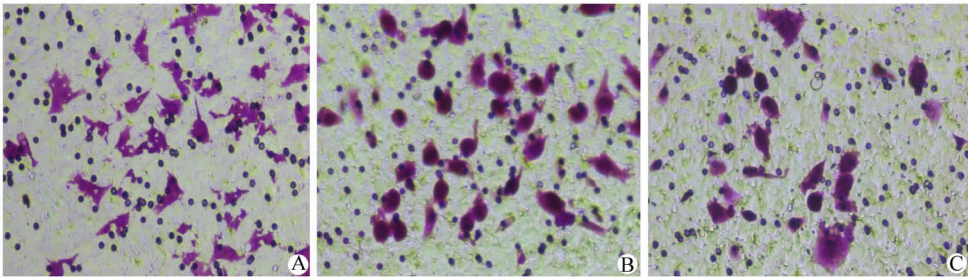


图 3 BCSC-1 过表达抑制 Bel-7402 细胞的侵袭能力 ( × 200 )

Fig. 3 Invasion ability of Bel-7402 cells inhibited by the overexpression of BCSC-1 ( × 200 )

A: Wild group; B: Empty vector group; C: BCSC-1 group

2.4 BCSC-1 过表达抑制 Bel-7402 细胞的黏附能力  
MTT 法检测结果显示, 与空载体组和野生型组细胞相比, BCSC-1 组 Bel-7402 细胞的黏附能力明显降低 [ 0.45 ± 0.02 vs 0.75 ± 0.03、0.77 ± 0.05, 均  $P < 0.01$  ] 且 BCSC-1 组细胞的黏附率明显低于空载体组和野生型组细胞的黏附率 [ ( 58.57 ± 0.84 )% vs ( 97.14 ± 0.84 )%、( 100.00 ± 1.30 )%, 均  $P < 0.01$  ]。

### 2.5 BCSC-1 过表达抑制 Bel-7402 细胞的迁移

划痕 24h 后显微镜观察结果(图 4)显示, 各组

Transwell 实验结果(图 3)显示, BCSC-1 组 Bel-7402 细胞的侵袭细胞数明显少于空载体组和野生型组细胞 [ ( 1.55 ± 0.04 ) vs ( 1.91 ± 0.07 )、( 2.04 ± 0.02 ) 个, 均  $P < 0.01$  ], 且 BCSC-1 组细胞的侵袭率明显低于空载体组和野生型组 [ ( 76.20 ± 1.85 )% vs ( 93.42 ± 3.24 )%、( 100.00 ± 1.05 )%, 均  $P < 0.01$  ]。

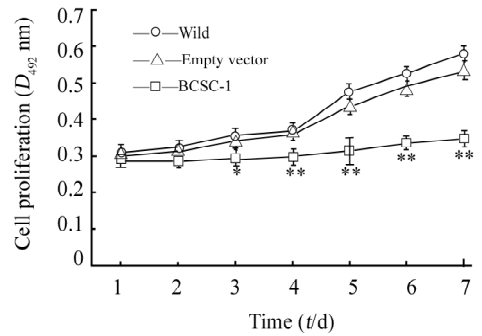


图 2 BCSC-1 过表达抑制 Bel-7402 细胞的增殖  
Fig. 2 Proliferation of Bel-7402 cells inhibited by BCSC-1 overexpression in vitro

\*\*  $P < 0.01$  vs wild group and empty vector group

细胞均有不同程度的迁移。过表达 BCSC-1 基因的 Bel-7402 细胞的迁移距离明显小于空载体组和野生型组 [ ( 116.60 ± 10.58 ) vs ( 231.33 ± 10.26 )、( 237.96 ± 11.58 ) μm, 均  $P < 0.01$  ]。

### 2.6 BCSC-1 过表达对 Bel-7402 细胞 PTTG、ICAM-1 和 OPN mRNA 表达的影响

Real-time PCR 结果(图 1)显示, OPN mRNA 在野生型和转染空质粒的 Bel-7402 细胞中表达量无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 与空载体组和野生组相比, BCSC-1 组 Bel-7402 细胞的 OPN mRNA 的表达量则

明显降低[ $(0.12 \pm 0.06)$  vs  $(0.95 \pm 0.14)$ 、 $(1.00 \pm 0.08)$ ], 均  $P < 0.01$  ], *PTTG* 与 *ICAM-1* mRNA 的表达没有显著差异[ *PTTG*: $(1.48 \pm 0.43)$

vs  $(0.91 \pm 0.21)$ 、 $(1.00 \pm 0.15)$ ], 均  $P > 0.05$ ; *ICAM-1*: $(1.32 \pm 0.32)$  vs  $(1.21 \pm 0.28)$ 、 $(1.00 \pm 0.13)$ ], 均  $P > 0.05$  ]。

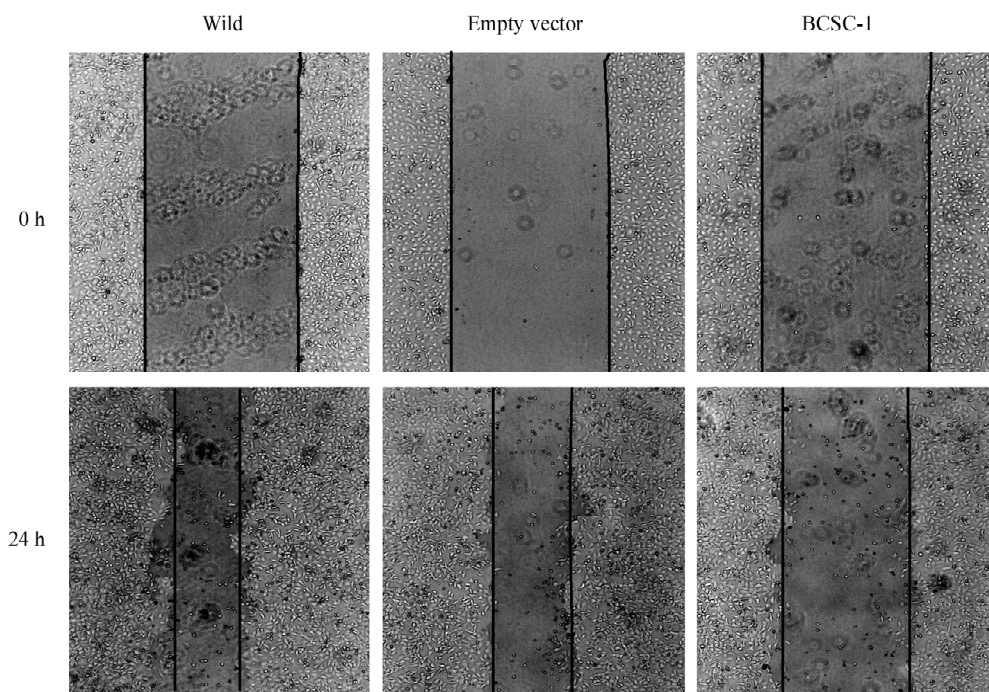


图4 *BCSC-1* 过表达抑制 Bel-7402 细胞的迁移(  $\times 40$  )

Fig.4 Migratory ability of Bel-7402 cells was inhibited by the overexpression of *BCSC-1* (  $\times 40$  )

### 3 讨论

*BCSC-1* 基因是近年发现的一种抑癌基因,可以编码 786 个氨基酸的蛋白质。将 *BCSC-1* 基因导入内源性低表达此基因的鼻咽癌细胞 CNE-2L2 及小细胞肺癌细胞 NCI-H446 中,可抑制其恶性增殖等生物学行为<sup>[46]</sup>,但 *BCSC-1* 基因是否对大多数内源性低表达此基因的肿瘤细胞均有抑制作用仍有待研究。

恶性增殖、黏附、侵袭、转移是恶性肿瘤的生物学特性,也是导致患者死亡的重要机制<sup>[79]</sup>。本实验将 *BCSC-1* 基因转染入内源性低表达此基因的肝癌 Bel-7402 细胞中,探讨 *BCSC-1* 基因过表达对肝癌 Bel-7402 细胞体外增殖、迁移、侵袭和黏附能力的影响。结果证实,与转染空载体和未做任何处理的野生型 Bel-7402 细胞相比较,过表达 *BCSC-1* 的 Bel-7402 细胞体外增殖能力、与细胞外基质的黏附能力、侵袭能力和转移能力均受到不同程度的抑制( $P < 0.01$ )。说明外源性 *BCSC-1* 在肝癌中也可能发挥抑制肿瘤的作用。

*BCSC-1* 蛋白发挥抑制肿瘤作用的机制目前尚知之甚少。Zhou 等<sup>[5]</sup>证实,*BCSC-1* 基因在鼻咽癌细胞 CNE-2L2 中过表达后,可引起该细胞成瘤性和转移性下降、细胞黏附性增强,并引起细胞周期阻滞。Anghel 等<sup>[10]</sup>最近的研究证实,*BCSC-1* 也可以抑制黑素瘤细胞的体外增殖,在 Mewo 细胞中 *BCSC-1* 可以与 SOX10 直接作用,从而下调小眼相关转录因子 (microphthalmia-associated transcription factor, MITF) 的表达,被认为是 *BCSC-1* 抑制黑素瘤细胞增殖原因之一;但有趣的是,Anghel 等<sup>[10]</sup>还认为 *BCSC-1* 可以促进黑素瘤细胞的迁移。本研究对 *BCSC-1* 抑制肿瘤细胞的作用机制进行了初步的探讨,结果表明,转染 *BCSC-1* 基因的 Bel-7402 细胞与空载组和野生组细胞相比,在 *BCSC-1* 基因表达增高的同时,*OPN* 基因表达下降( $P < 0.01$ ),*PTTG* 和 *ICAM-1* 的表达没有显著变化( $P > 0.05$ )。这说明 *BCSC-1* 的过表达直接或间接抑制了 *OPN* 的表达。*OPN* 是一种具有多种生物学活性的分泌性钙结合磷酸化糖蛋白,是人体重要的黏附分子。研究<sup>[11]</sup>证实,肝癌、胃癌、前列腺癌等肿瘤细胞能大量合成

OPN,后者通过细胞黏附相关的 RGD 序列与细胞外基质及细胞膜分子相互作用,促进细胞的趋化、黏附和迁移。低侵袭性、不转移的人肝癌细胞株,在转染 *OPN* 基因后,细胞培养上清中 *OPN*、*MMP-2*、*uPA* 水平明显升高,细胞黏附、运动和侵袭能力明显增强<sup>[12-14]</sup>。最近的一些研究表明,*OPN* 可以作为重要的标志物来预测肝癌病人的转移<sup>[15-17]</sup>、预后<sup>[18]</sup>、药物疗效<sup>[19]</sup>以及复发<sup>[20]</sup>,故有人认为其作为肝癌的早期诊断指标优于甲胎蛋白<sup>[21]</sup>。因此推测,*BCSC-1* 基因过表达可能通过下调 *OPN* 的表达来抑制 Bel-7402 细胞的侵袭、黏附和迁移。

综上所述,*BCSC-1* 在肝癌 Bel-7402 细胞中过表达抑制了该细胞增殖、侵袭、迁移和与细胞外基质黏附能力,这种抑制作用可能与其下调 *OPN* 表达有关。进一步研究肝癌患者 *BCSC-1* 表达与患者肿瘤转移、预后的关系以及 *BCSC-1* 调控 *OPN* 表达的机制,为理解 *BCSC-1* 的生理功能以及应用于临床肿瘤治疗提供实验基础。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Yokota J. Tumor progression and metastasis [ J ]. *Carcinogenesis*, 2000, 21 ( 3 ): 497-503.
- [ 2 ] Cairns RA, Khokha R, Hill RP. Molecular mechanisms of tumor or invasion and metastasis: An integrated view [ J ]. *Curr Mol Med*, 2003, 3( 7 ): 659-671.
- [ 3 ] Martin ES, Cesari R, Pentimalli F, et al. The BCSC-1 locus at chromosome 11q23-q24 is a candidate tumor suppressor gene [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100( 20 ): 11517-11522.
- [ 4 ] 袁芳,鞠吉雨,唐媛媛,等. *BCSC-1* 基因异位表达对人小细胞肺癌细胞增殖的抑制效应 [ J ]. *中国癌症杂志*, 2012, 22 ( 5 ): 336-341.
- [ 5 ] Zhou YQ, Chen SL, Ju JY, et al. Tumor suppressor function of BCSC-1 in nasopharyngeal carcinoma [ J ]. *Cancer Sci*, 2009, 100( 10 ): 1817-1822.
- [ 6 ] 周异群,鞠吉雨,田云,等. 腺病毒介导 *BCSC-1* 基因实验性治疗鼻咽癌 [ J ]. *中国医学科学院学报*, 2007, 29( 5 ): 626-630.
- [ 7 ] 陈海霞,杨耀琴,陶惠红,等. 白芦藜醇对肺腺癌 A549 细胞增殖、黏附与侵袭的影响 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2012, 19( 2 ): 138-142.
- [ 8 ] 胡剑江,雷洪涛,侯燕鸣,等. 肿瘤细胞迁移过程的动态评估方法 [ J ]. *中国药理学通报*, 2010, 26( 1 ): 128-131.
- [ 9 ] Thompson CC, Ashcroft FJ, Patel S, et al. Pancreatic cancer cells overexpress gelsolin family-capping proteins, which contribute to their cell motility [ J ]. *Gut*, 2007, 56( 1 ): 95-106.
- [ 10 ] Anghel SI, Correa-Rocha R, Budinska E, et al. Breast cancer suppressor candidate-1 ( BCSC-1 ) is a melanoma tumor suppressor that down regulates MITF [ J ]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2012, 25( 4 ): 482-487.
- [ 11 ] 林帆,夏金堂,温敏杰,等. *OPN* 在不同转移潜能肝癌中的表达及意义的初步研究 [ J ]. *中华肝胆外科杂志*, 2007, 13 ( 10 ): 675-677.
- [ 12 ] 沈蔚,张家敏,毛根军,等. *OPN* 和 *MMP-2* 在肝癌的表达及临床意义 [ J ]. *实用肿瘤学杂志*, 2008, 22( 5 ): 437-438.
- [ 13 ] 陈荣新,薛同春,叶胜龙,等. 骨桥蛋白促进人肝癌细胞株 SMMC-7721 恶性表型的实验研究 [ J ]. *中华肝脏病杂志*, 2007, 15( 1 ): 37-40.
- [ 14 ] Pan HW, Qu YH, Peng SY, et al. Overexpression of osteopontin is associated with intrahepatic metastasis, early recurrence, and poorer prognosis of resected hepatocellular carcinoma [ J ]. *Cancer*, 2003, 98( 1 ): 119-127.
- [ 15 ] Bhattacharya SD, Mi Z, Talbot LJ, et al. Human mesenchymal stem cell and epithelial hepatic carcinoma cell lines in admixture: Concurrent stimulation of cancer-associated fibroblasts and epithelial-to-mesenchymal transition markers [ J ]. *Surgery*, 2012, 152 ( 3 ): 449-454.
- [ 16 ] Bertino G, Ardiri A, Malaguarnera M, et al. Hepatocellular carcinoma serum markers [ J ]. *Semin Oncol*, 2012, 39( 4 ): 410-433.
- [ 17 ] 孙海艳,李岩,郭坤,等. 肝癌转移相关的骨桥蛋白表达及其糖基化的改变 [ J ]. *中华肝脏病杂志*, 2011, 19( 12 ): 904-907.
- [ 18 ] Tsai WC, Tsai WC, Lee HS, et al. Association between osteopontin and EGFR expression with clinicopathological parameters in hepatocellular carcinoma [ J ]. *Chin J Physiol*, 2012, 55( 6 ): 412-420.
- [ 19 ] Lin F, Cao J, Huang Z, et al. Effect of thalidomide on the proliferation of hepatoma cells assessed by osteopontin levels in nude mice [ J ]. *Exp Ther Med*, 2013, 5( 5 ): 1403-1407.
- [ 20 ] Zhou C, Zhou HJ, Zhang XF, et al. Postoperative serum osteopontin level is a novel monitor for treatment response and tumor recurrence after resection of hepatitis B-related hepatocellular carcinoma [ J ]. *Ann Surg Oncol*, 2013, 20( 3 ): 929-937.
- [ 21 ] Shang S, Plymoth A, Ge S, et al. Identification of osteopontin as a novel marker for early hepatocellular carcinoma [ J ]. *Hepatology*, 2012, 55( 2 ): 483-490.

[ 收稿日期 ] 2013-04-18

[ 修回日期 ] 2013-09-10

[ 本文编辑 ] 黄静怡