

论著·基础研究

沉默 EZH2 基因抑制胃癌细胞增殖及促凋亡研究*

杨必伟¹, 赵二川², 石 祥³, 刘 强^{1△}

(1. 贵州省人民医院检验科, 贵州贵阳 550002; 2. 运城市第一医院检验科, 山西运城 044000;

3. 潜江市中心医院病理科, 湖北潜江 433100)

摘要:目的 探讨沉默胃癌细胞株 MGC803 中 EZH2 基因对细胞增殖及凋亡的影响。方法 采用小干扰 RNA(siRNA)沉默胃癌细胞中的 EZH2 基因并用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)及蛋白质印迹(Western blot)验证沉默效率, MTT 法评估细胞增殖情况, 运用 Western blot 分析凋亡相关蛋白——Bcl-2 及 Bax, 流式细胞仪检测细胞的凋亡变化。结果 胃癌细胞中的 EZH2 基因被成功沉默; 沉默组细胞的增殖情况相较于正常组和阴性对照组明显降低, 而凋亡率相较于正常组和阴性对照组则明显升高, 同时, 沉默组中的 Bcl-2 蛋白表达量降低而 Bax 蛋白表达则显著升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 沉默胃癌细胞中的 EZH2 基因能抑制该肿瘤细胞的增殖并促进其凋亡。

关键词: 胃肿瘤; 细胞增殖; 细胞凋亡; EZH2

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.10.001

中图法分类号: R735.2; R392.11

文章编号: 1673-4130(2019)10-1153-04

文献标识码: A

Silencing EZH2 gene inhibits proliferation of gastric cancer cell and promotes its apoptosis*

YANG Biwei¹, ZHAO Erchuan², SHI Xiang³, LIU Qiang^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou

550002, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Yuncheng First Hospital, Yuncheng, Shanxi

044000, China; 3. Department of Pathology, Qianjiang Central Hospital, Qianjiang, Hubei 433100, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of silencing EZH2 on proliferation and apoptosis in gastric cancer cell line MGC803. **Methods** Silencing EZH2 was performed by siRNA transfection, qRT-PCR and Western blot were used to verify the efficiency of silence. The effect of proliferation and apoptosis were detected by MTT assay and flow cytometry, respectively. Western blot was used to indicate the expression of Bcl-2 and Bax. **Results** EZH2 gene was successfully silenced in gastric cancer cells. The proliferation of silencing group was significantly lower than that of normal group and negative control group, the apoptosis rate was significantly increased compared with the normal group and negative control group, while the protein expression of Bcl-2 in siRNA group was significantly down-regulated compared with the control and negative control group but Bax was the opposite with statistically significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion** Silencing EZH2 gene can inhibit proliferation and promotes apoptosis in gastric cancer cells.

Key words: stomach neoplasms; cell proliferation; apoptosis; EZH2

随着当前世界各地的自然生态环境的不断恶化, 加之如今社会生活中随处可见的各种有害致病添加剂, 同时, 当下快节奏的生活、工作状态等因素共同造就了如今各种疾病的高发状态, 在这些长期致病因素的刺激下, 加之人口老龄化的加剧导致恶性肿瘤同样处于一个高发阶段, 其中胃癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一, 全球每年有超过 100 万人死于该疾病^[1]; 有研究表明, 胃腺癌占新发癌症病例的 6.8%,

占癌症死亡人数的 8.8%^[2]; 即使不断改进在围手术期的治疗手段, 其远期 5 年生存率仍低于 40.0%^[3]。正是由于这种高危性及不良预后, 胃癌一直倍受相关学者的关注, 在改善传统手术治疗方案的同时, 随着基因分子水平研究的不断突破, 积极寻找部分相关癌基因作为靶点已成为一种治疗突破点。EZH2 是一个进化的保守基因, 在果蝇、人类等不同物种间含有相似的结构基序及结构域^[4]; 其是一类组蛋白甲基转移

* 基金项目: 贵州省科学技术厅项目(黔科合 LH 字[2014]7008)。

作者简介: 杨必伟, 男, 检验技师, 主要从事肿瘤/免疫相关方向的研究。△ 通信作者, E-mail: 570690023@qq.com。

本文引用格式: 杨必伟, 赵二川, 石祥, 等. 沉默 EZH2 基因抑制胃癌细胞增殖及促凋亡研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(10): 1153-

酶并作为 PRC2 的催化亚基,自研究发现 EZH2 在前列腺癌中呈过表达以来^[5],经许多学者的不断努力,目前,已知其通过 SET 催化 Lys27(H3K27me3)处的组蛋白 H3 的三甲基化 C 端,从而导致沉默其参与细胞周期调控、细胞增殖、细胞分化和癌症进展的相关靶基因,诱导肿瘤的发生及发展。在多种肿瘤中 EZH2 发生过表达,EZH2 基因的敲低或干扰能显著降低和抑制肿瘤细胞的生长和成瘤过程,因此,EZH2 被认为是一个治疗相关肿瘤的新药物靶点,而 EZH2 也被认为是多种细胞信号通路的调节因子,已发现的 EZH2 调控下游基因的机制有 DNA 甲基化、组蛋白甲基化、组蛋白去乙酰化、泛素化、磷酸化等,其中 DNA 甲基化是非常重要的机制,EZH2 能募集 DNA 甲基转移酶导致 DNA 发生异常甲基化和下游基因沉默。而 EZH2 基因在胃癌中的研究尚未见更多的文献报道,因此,本研究希望通过沉默胃癌细胞中的 EZH2 基因探讨其对胃癌细胞增殖及凋亡方面的影响,为临床基因治疗提供部分实验参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人胃癌细胞 MGC803 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,RMPI1640 细胞培养基购自美国 Hyclon 公司,胎牛血清购自杭州四季青生物公司,SDS-PAGE 凝胶试剂盒及 MTT 相关试剂购自碧云天生物技术公司,超敏 ECL 化学发光试剂盒购自美国 MILLIPORE 公司,SYBR Green PCR Master Mix 购自美国 Biosystems 公司,Trizol、逆转录试剂盒购自 TianGEN 公司,兔抗 β -actin 购自博奥森兔抗物公司,兔抗 EZH2、Bcl-2 及 Bax 购自武汉三鹰生物技术有限公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗购自北京中山金桥生物技术有限公司,凋亡试剂盒购自南京凯基生物公司,其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库购入人胃癌细胞 MGC803 细胞后用含有 10% 的胎牛血清、1% L-谷氨酰胺及 1% 青霉素-链霉素双抗混合液的 RPMI 1640 培养液于 37℃、含有 5% 二氧化碳(CO₂)的细胞培养箱中培养,并每 2~3 天更换 1 次培养液,取适量细胞冻存及传代。

1.2.2 小干扰 RNA(siRNA)转染沉默 EZH2 基因 siRNA 片段设计合成由上海吉满公司设计完成,根据试剂盒说明书采用脂质体法将目的 siRNA 序列转染至 MGC803 细胞中并筛选出沉默效率最高的一组用于后续实验。

1.2.3 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 将沉默后的细胞分为正常细胞组(MGC803)、阴性对照组(NC-MGC803)及阳性沉默组(siRNA-MGC803)。取对数期的上述 3 组细胞,根据说明书采用 Trizol 试剂盒提取总

RNA 并逆转录为 cDNA,采用 SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒进行 qRT-PCR 扩增目的片段。引物如下, β -actin 正义链:5'-GCACAGAGCCTCGCCTT-3',反义链:5'-GTTGTGTCGACGACGAGCG-3';EZH2 正义链:5'-AGTGTGACCCTGACCTCTGT-3',反义链:5'-AGATGGTGCCAGCAATAGAT-3'。qRT-PCR 反应条件设为 95℃ 预变性 2 min,95℃、10 s,60℃、30 s,循环 40 次。重复 3 次实验,结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 统计分析。

1.2.4 MTT 细胞增殖实验 取对数生长期的各组细胞经胰酶消化后计数,调整细胞浓度为 5×10^4 个/mL,接种至 96 孔板,每孔 200 μ L,每组设 6 个复孔,于 37℃、5% CO₂ 培养箱内分别培养 12、24、48 h 后加入 5 mg/mL MTT 溶液每孔 10 μ L,于 37℃、5% CO₂ 条件下继续培养 4 h 后吸出各孔原液,加入 DM-SO 每孔 150 μ L。于自动酶标仪上以 490 nm 波长测定各孔吸光度(OD)值(OD₄₉₀)。以上实验重复 3 次,取平均值。

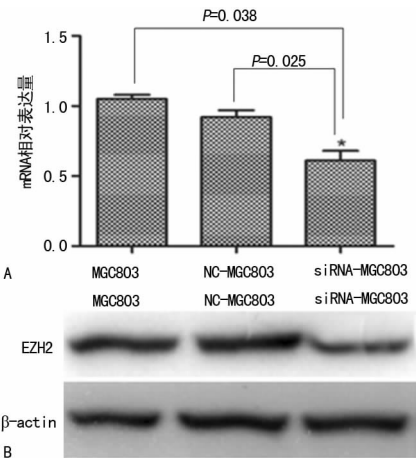
1.2.5 蛋白质印迹(Western blot) 收集各组细胞于冰上用含有 1% PMSF 的 RIPA 裂解液裂解并于 4℃ 离心机上以 12 000 r/min 离心(离心半径 6.0 cm)20 min 后收集上清液于 -80℃ 保存备用,并留取部分蛋白液用 BCA 法测定蛋白浓度。采用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离目的蛋白条带,并转入 PVDF 膜,用 5% 脱脂奶粉封闭液孵育 2 h。然后 4℃ 过夜孵育兔抗 β -actin (1:5 000)、兔抗 EZH2 (1:500)、兔抗 Bcl-2 (1:500)、兔抗 Bax (1:500),用 TBST 洗 3 次,将 PVDF 膜在山羊抗兔二抗 (1:5 000) 中室温孵育 1 h。ECL 发光液显影并曝光。用 Image J 软件统计分析各组灰度值。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡 取对数生长期各组胃癌细胞制成浓度为 5×10^4 个/mL 的细胞悬液,接种于 6 孔培养板中于 37℃、5% CO₂ 条件下分别培养 24 h,之后用不含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化收集细胞,取 5×10^5 个细胞,加入 500 μ L Binding Buffer 悬浮细胞;再加入 5 μ L Annexin APC 和 5 μ L 碘化丙啶避光处理 15 min,用流式细胞仪检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS23.0 统计软件对数据进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

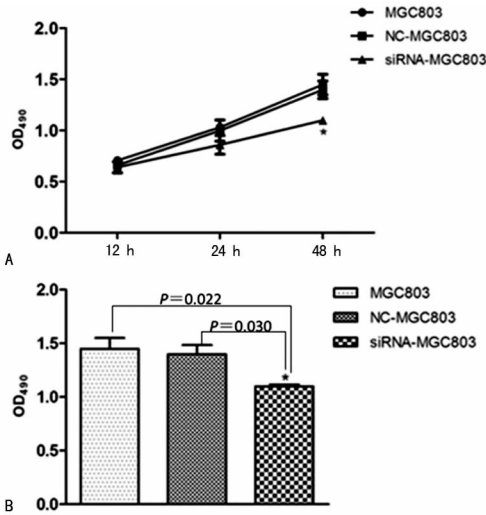
2.1 EZH2-siRNA 沉默效率验证 阳性沉默组 EZH2 mRNA 及蛋白表达水平均明显降低,与正常细胞组、阴性对照组比较,差异均有统计学意义($P = 0.038, 0.025, 0.031, 0.026$)。表明胃癌 MGC803 细胞中的 EZH2 已被成功沉默。见图 1。



注:A 代表 EZH2 mRNA 表达,B 代表 EZH2 蛋白表达,阳性沉默组 (siRNA-MGC803) 与正常细胞组 (MGC803)、阴性对照组 (NC-MGC803) 比较, * $P<0.05$

图 1 各组 EZH2 的 mRNA 及蛋白表达水平比较

2.2 沉默 EZH2 抑制胃癌细胞 MGC803 的增殖 阳性沉默组细胞增殖变化明显低于正常细胞组、阴性对照组,48 h 时间点增殖变化比较,差异均有统计学意义 ($P=0.022,0.030$)。见图 2。

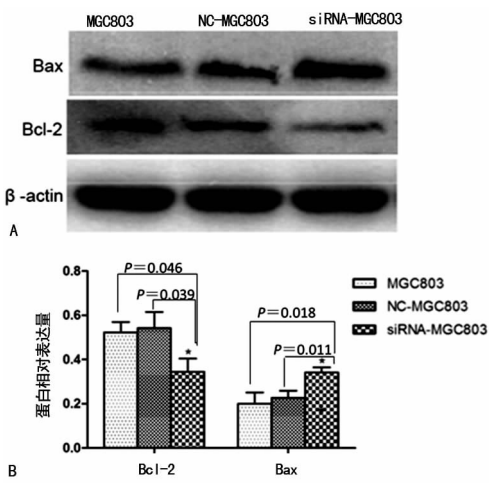


注:A 为各组不同时点 MGC803 增殖变化,B 为各组 48 h MGC803 增殖情况比较,阳性沉默组 (siRNA-MGC803) 与正常细胞组 (MGC803)、阴性对照组 (NC-MGC803) 比较, * $P<0.05$

图 2 沉默 EZH2 后各组细胞增殖水平比较

2.3 沉默 EZH2 影响凋亡相关蛋白 Bcl-2 及 Bax 的改变 阳性沉默组 Bcl-2 蛋白表达明显受到抑制,与正常细胞组、阴性对照组比较,差异均有统计学意义 ($P=0.046,0.039$),而 Bax 蛋白表达水平则有所增加,与正常细胞组、阴性对照组比较,差异均有统计学意义 ($P=0.018,0.011$)。见图 3。

2.4 沉默胃癌中 EZH2 促进肿瘤细胞的凋亡 与正常细胞组、阴性对照组比较,阳性沉默组细胞凋亡率明显增加,差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。而正常细胞组与阴性对照组比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 4、表 1。



注:阳性沉默组 (siRNA-MGC803) 与正常细胞组 (MGC803)、阴性对照组 (NC-MGC803) 比较, * $P<0.05$

图 3 Bcl-2 及 Bax 的相对蛋白表达量

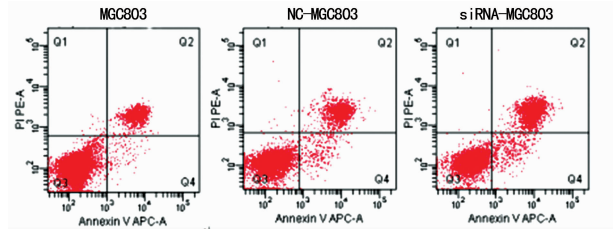


图 4 各组细胞凋亡变化比较

表 1 各组细胞相对凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	凋亡率
正常细胞组 (MGC803)	3	12.85 $\pm$ 0.51
阴性对照组 (NC-MGC803)	3	13.27 $\pm$ 0.76
阳性沉默组 (siRNA-MGC803)	3	19.81 $\pm$ 0.82 *

注:与正常细胞组、阴性对照组比较, * $P<0.05$

3 讨论

随着现代环境和各种有害物质的增加,以及社会的快节奏、生活方式改变致使近年来各类肿瘤的发病率均逐渐增加,这其中就包括了胃癌,其对全世界来说仍是相当大的健康负担^[6]。虽然循证医学策略的推进使胃癌患者能在术前与术后获得最大限度的效益并优化放化疗方案,但总体死亡率仍是居高不下。目前,随着生物疗法及基因治疗技术的引入,似乎在一定程度上找到了治疗肿瘤的一个突破口。与胃癌相关的基因研究也有诸多文献报道,而 EZH2 基因与胃癌的相关性鲜有提及,因此,希望通过本研究证实 EZH2 与胃癌在增殖及凋亡方面的相关性。

EZH2 是果蝇 zeste 基因增强子的人类同源基因,PRC2 的重要成员之一,EZH2 作为一种组蛋白修饰剂,参与构成了 PRC2 的催化复合物^[7],EZH2 与肿瘤的形成和生长密切相关,能促进肿瘤增殖、侵袭和转移,且其过度表达往往与肿瘤的不良预后相关;另一方面,EZH2 的失活可抑制肿瘤细胞的生长。有研究表明,高表达的 EZH2 能通过抑制 p16 蛋白及增加

细胞周期蛋白 D1 的形成从而促进原发性黑色素瘤的发生、发展^[8]。同时, EZH2 与部分淋巴瘤也存在相关性, 目前, EZH2 抑制剂已被开发并进入了淋巴瘤 I / II 期试验^[9]。据文献报道, 近年来, 陆续有研究发现 EZH2 在人造血干细胞和实体恶性肿瘤如乳腺癌、膀胱癌、胃癌、肺癌、肝细胞癌、皮肤黑色素瘤、霍奇金淋巴瘤中呈过度表达^[4-5]。作为基因表达调节剂的 EZH2 也受到了来自 miR-214 的调控, 而 miR-214 参与了包括胃癌在内的众多恶性肿瘤的调控, 因此, EZH2 可能也会参与胃癌的形成过程^[10]。而这些结论均与本研究结果一致, 进一步证明了 EZH2 确实参与了胃癌的发生、发展。

本研究结果显示, 沉默 EZH2 能抑制胃癌细胞的增殖并促进其凋亡, 而 Bcl-2 及 Bax 两种蛋白是调控细胞凋亡变化的重要蛋白之一^[11]。Bcl 家族在功能上分为抑制细胞凋亡的蛋白, 如 Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-w 等, 以及促进细胞凋亡的蛋白, 如 Bax/Bax 亚家族、BH3-onl、y 亚家族等^[12-13]。有研究表明, 由于肿瘤抑制因子 p53 的突变导致 BH3 结构域中相关蛋白的信号传导通路受损, 导致 Bcl-2 过表达而触发肿瘤或非肿瘤细胞的凋亡发生。Bax 主要通过调控 DNA 损伤、蛋白质错误折叠等方式从而触发线粒体内细胞色素 C 的释放, 进而激活半胱天冬酶级联反应诱导细胞凋亡。Bcl-2/Bax 也已被证明参与调控了许多肿瘤的凋亡变化, 其在诸如淋巴瘤、结肠癌、乳腺癌及肺癌等^[14-16]方面均存在调控凋亡而影响肿瘤发展的现象。本研究也在胃癌中证明了这一点, 沉默 EZH2 后抑制细胞凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低, 而促进细胞凋亡蛋白 Bax 表达增加, 说明 EZH2 可能是通过 Bcl-2 及 Bax 来影响细胞的凋亡变化, 同时, 结合流式细胞仪检测的结果, 进一步说明 EZH2 可影响胃癌细胞的凋亡。

4 结 论

通过本研究结果了解到 EZH2 基因可能参与调控细胞增殖, 并通过 Bcl-2 及 Bax 调节胃癌细胞凋亡, 从而促进胃癌的发生、发展。可能为临床对胃癌的基因治疗提供相关的实验依据并提供出可能的治疗方向。未来通过更多学者对 EZH2 基因的进一步研究将会对胃癌的演变进程具有更多的了解, 为胃癌的基因治疗创造更多可能。

参考文献

- [1] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. Int J Cancer, 2015, 136(5):E359-86.
- [2] COBURN N, COSBY R, KLEIN L, et al. Staging and surgical approaches in gastric cancer: a systematic review[J].

- Cancer Treat Rev, 2017, 63:104-115.
- [3] NIENHÜSER H, SCHMIDT T. Angiogenesis and anti-angiogenic therapy in gastric cancer[J]. Int J Mol Sci, 2017, 19(1):E43.
- [4] YAN K S, LIN C Y, LIAO T W, et al. EZH2 in cancer progression and potential application in cancer therapy: a friend or foe? [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(6):E1172.
- [5] GALL TROŠELJ K, NOVAK KUJUNDZIC R, UGARKOVIC D. Polycomb repressive complex' s evolutionary conserved function: the role of EZH2 status and cellular background[J]. Clin Epigenetics, 2016, 8:55.
- [6] CHARALAMPAKIS N, ECONOMOPOULOU P, KOTSANTIS I, et al. Medical management of gastric cancer: a 2017 update[J]. Cancer Med, 2018, 7(1):123-133.
- [7] MARGUERON R, REINBERG D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life[J]. Nature, 2011, 469(7330):343-349.
- [8] BACHMANN I M, HALVORSEN O J, COLLETT K, et al. EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(2):268-273.
- [9] MCCABE M T, GRAVES A P, GANJI G, et al. Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27(H3K27)[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(8):2989-2994.
- [10] PENNA E, ORSO F, TAVERNA D. miR-214 as a key hub that controls cancer networks: small player, multiple functions[J]. J Invest Dermatol, 2015, 135(4):960-969.
- [11] BROWN L M, HANNA D T, KHAW S L, et al. Dysregulation of BCL-2 family proteins by leukemia fusion genes[J]. J Biol Chem, 2017, 292(35):14325-14333.
- [12] CORY S, HUANG D C, ADAMS J M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis[J]. Oncogene, 2003, 22(53):8590-8607.
- [13] DELBRIDGE A R, STRASSER A. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy[J]. Cell Death Differ, 2015, 22(7):1071-1080.
- [14] SOUERS A J, LEVERSON J D, BOGHAERT E R, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets[J]. Nat Med, 2013, 19(2):202-208.
- [15] BEROUKHIM R, MERMEL C H, PORTER D, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers[J]. Nature, 2010, 463(7283):899-905.
- [16] TONON G, WONG K K, MAULIK G, et al. High-resolution genomic profiles of human lung cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(27):9625-9630.