

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.06.001

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.06.001>

· 论著 ·

HIP1 基因沉默对人食管癌 EC109 细胞迁移侵袭能力的影响

冯征, 王雪娇, 文苗苗, 夏靖华, 张晏宁, 张娇, 张志培, 孙盈

(空军军医大学第二附属医院胸外科, 西安 710038)

[摘要] 目的: 研究亨廷顿蛋白相互作用蛋白1(Huntingtin interacting protein 1, *HIP1*)基因沉默对人食管癌 EC109细胞迁移侵袭的影响。方法: 构建慢病毒干扰*HIP1*的食管癌细胞系, 定量PCR和蛋白质印迹法检测*HIP1*基因沉默效果。通过细胞划痕实验和Transwell迁移侵袭试验研究*HIP1*基因沉默对人食管癌细胞迁移侵袭能力的影响。结果: 慢病毒转染EC109食管癌细胞后, *HIP1*基因沉默效率达到80%以上。qRT-PCR和蛋白质印迹法证实此次慢病毒干扰*HIP1*效果显著。细胞划痕试验和Transwell迁移侵袭试验显示*HIP1*基因沉默后可抑制EC109食管癌细胞的迁移和侵袭。结论: 构建的*HIP1*干涉慢病毒表达载体可抑制*HIP1*基因和蛋白的表达, 并可有效抑制EC109食管癌细胞迁移和侵袭, 提示*HIP1*作为食管癌的差异蛋白, 可能通过促进食管癌细胞的转移参与食管癌的发生发展。

[关键词] 亨廷顿蛋白相互作用蛋白1; 慢病毒干扰; 迁移与侵袭; 食管癌

Effect of *HIP1* gene silencing on migration and invasion of EC109 cells in human esophagus cancer

FENG Zheng, WANG Xuejiao, WEN Miaomiao, XIA Jinghua, ZHANG Yanning,
ZHANG Jiao, ZHANG Zhipei, SUN Ying

(Department of Thoracic Surgery, Second Affiliated Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect of Huntingtin-interacting protein 1 (*HIP1*) gene silencing on the migration and invasion of human esophagus cancer EC109 cells. **Methods:** Lentivirus interference of target *HIP1* was structured and used to transfect into EC109 cells. Quantitative PCR (qPCR) and Western blotting were adopted to detect the *HIP1* gene silencing effect. Moreover, the wound healing assay and transwell migration and invasion were performed to analyze the effect of *HIP1* on the migration and invasion of EC109 cells. **Results:** The efficiency of *HIP1* gene silencing was about 80% after EC109 cell transfection. qPCR and Western blot proved the significant effect of lentivirus interference. The wound healing, transwell migration and invasion assay showed that the migration and invasion of EC109 cells were inhibited by shRNA-*HIP1*. **Conclusion:** Lentivirus interference of target *HIP1* can specifically suppress the gene and protein expression

收稿日期 (Date of reception): 2018-12-02

通信作者 (Corresponding author): 张志培, Email: zpzpyy@fmmu.edu.cn; 孙盈, Email: suny_an1314@163.com

基金项目 (Foundation item): 空军军医大学唐都医院创新发展基金 (2016JCYJ009)。This work was supported by Air Force Medical University Tangdu Hospital Innovation and development Foundation, China (2016JCYJ009).

of HIP1. In addition, *HIP1* gene silencing can inhibit the migration and invasion of EC109 cells. Therefore, we suggest that HIP1 may affect the prognosis of esophageal cancer by promoting the metastasis.

Keywords Huntingtin interacting protein 1; lentivirus interference; migration and invasion; esophagus cancer

食管癌在国内外均属于一种高发生率、高病死率的实体肿瘤,其临床治疗效果不容乐观^[1]。分子靶向治疗是近几年逐渐趋向成熟的针对肿瘤基因靶点的治疗方式,尤其在非小细胞肺癌、乳腺癌某些靶点应用比较成功^[2-3],且具有不良反应小、靶向性高、治疗效果明显等优点。但是,目前临床上鲜有针对食管癌患者的靶向药物,因而缺乏有效的靶向治疗手段。为提高食管癌的治疗效果,亟待探索出针对食管癌的分子治疗靶点。

1997年亨廷顿蛋白相互作用蛋白1(huntingtin interacting protein 1, HIP1)作为与Huntington病Huntingtin突变相互作用蛋白首次被克隆出来^[4]。随后的研究^[5-7]发现:HIP1可能参与多种肿瘤的发生发展过程。前期研究^[8]发现HIP1蛋白可能是食管癌组织和癌旁组织中的差异蛋白,但HIP1在食管癌中的作用及其机制并不清楚。本研究将对HIP1基因进行沉默,并检测沉默前后人食管癌细胞迁移侵袭的变化,拟从细胞水平上探究HIP1对人食管癌细胞的转移是否有一定的调控作用。

1 材料与方法

1.1 细胞

人食管癌细胞系EC109, Kyse30, T10, T11由空军军医大学唐都医院胸外科实验室保存。

1.2 细胞培养

人食管癌细胞系(EC109, Kyse30, T10, T11)用含10%胎牛血清和1%双抗(青链霉素)的RPMI1640培养液于37℃, 5% CO₂培养箱中进行培养。

1.3 慢病毒干扰 RNA 包装及 shRNA 转染

1.3.1 慢病毒包装

包装有干扰HIP1的慢病毒(HIP1-lentivirus)购自上海吉凯基因化学技术公司,总共设计了3条RNA干扰靶点序列,1条阴性对照序列:shRNA-HIP1 #1序列5'-AAGCTATTTCAGGTGCTCAT-3'; shRNA-HIP1 #2序列5'-TTCAATTTCACAGTCAA-3'; shRNA-HIP1 #3序列5'-TCTTCCAAACAGTATTCAA-3';以及shRNA阴性对照序列5'-TTCTCC-

GAACGTGTCACGT-3'。

1.3.2 shRNA 转染

将慢病毒干扰目的EC109细胞消化后计数,铺96孔板,每孔加入4×10³个细胞,常规培养过夜;待细胞融合率达80%~90%时,分别将3种干扰病毒、阴性对照病毒及空白组按照操作说明进行转染细胞,并分别命名为shRNA-HIP1, shRNA-Control, Control组。

1.4 荧光定量 PCR 法检测基因 mRNA 水平

HIP1正向引物5'-GTTGTGGCCTCAACCAT-T-3';反向引物5'-ACCACTTCTTGTCAGTGTA-G-3'。β-actin正向引物5'-CTCCATCCTGGCCTCG-CTGT-3';反向引物5'-GCTGTCACCTTCACCGT-TCC-3'。通过Trizol法提取细胞中总RNA,紫外分光光度计测定RNA浓度及纯度(2.0>A₂₆₀/A₂₈₀>1.8)。取总RNA 3 μg,按逆转录反应试剂说明完成cDNA的合成。制备20 μL的PCR反应体系:2×SYBR混合缓冲液10 μL、正向引物1 μL、反向引物1 μL、模板cDNA 2 μL、水6 μL。每个样本重复3个复孔。上机检测并设置反应条件:95℃ 10 min; 95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 72℃ 50 s循环35次。结果通过2^{-ΔΔCt}相对定量法进行分析。

1.5 蛋白质印迹法

用RIPA蛋白裂解液裂解细胞,取上清制备蛋白样品,按BCA蛋白检测试剂盒步骤用酶标仪测定蛋白浓度。30 μg蛋白/泳道行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳并电转膜,封闭,洗膜,加目的蛋白一抗(稀释浓度HIP1 1:1 000; β-actin 1:2 500),4℃过夜孵育,加含辣根过氧化物酶标记的兔IgG二抗(稀释浓度1:5 000),37℃孵育40 min。加ECL试剂,于暗室中自显影。

1.6 细胞划痕试验

将shRNA-HIP1及对照组转染48 h后的细胞进行细胞计数,按1×10⁵个细胞/孔接种于6孔板,用完全培养液培养过夜。12~18 h后当6孔板中细胞融合度达到70%~80%时画线,并用PBS轻轻冲洗画线处数次,洗去刮掉的细胞。加入无血清培养液

进行培养, 对同一视野分别在0, 24, 48 h进行拍照, 保存图像。

1.7 Transwell 迁移试验

将不含Matrigel胶的小室置入24孔板上室中, 下室加入500 μ L含10%血清的RPMI 1640培养液, 上室加入100 μ L提前饥饿处理的、细胞浓度为 1×10^5 /mL的shRNA-HIP1及对照组细胞悬液, 常规培养细胞24 h后固定染色, 显微镜下随机挑选5个视野进行拍照计数。试验重复3次, 并进行统计分析。

1.8 Transwell 侵袭试验

上室中每孔加入50 μ L用无血清RMPI 1640培养液按1:8稀释的Matrige胶, 置于37 $^{\circ}$ C细胞培养箱内约1 h后, 下室加入500 μ L含10%血清的RPMI 1640培养液, 上室加入100 μ L提前饥饿处理的、细胞浓度为 1×10^5 /mL的shRNA-HIP1及对照组细胞悬液, 常规培养细胞24 h后固定染色, 显微镜下随机挑选5个视野进行拍照计数。试验重复3次, 并进行统计分析。

1.9 统计学处理

采用SPSS 18.0统计软件进行数据分析。数据比较采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HIP1 基因和蛋白高表达食管癌细胞系的筛选

选取实验室保存的食管癌细胞系(EC109, Kyse30, T10, T11), 采用qPCR及蛋白质印迹法检测不同食管癌细胞系中HIP1基因和蛋白的表达, 挑选HIP1基因和蛋白均高表达的食管癌细胞系为目的细胞系。图1为不同食管癌细胞系中HIP1的基因检测结果; 图2为不同食管癌细胞系中HIP1的蛋白检测结果。HIP1基因和蛋白的表达水平在EC109细胞系中均较高, 因此筛选EC109细胞系为本次研究的目的细胞。

2.2 慢病毒干扰 HIP1(shRNA-HIP1) 细胞系的构建

按照操作流程将已经包装好的慢病毒转染至食管癌EC109细胞系中(图3)。选择显微镜下观察的荧光表达丰度较高, 感染效率达到80%以上, 且细胞生长良好的shRNA-HIP1-3细胞作为shRNA-

HIP1细胞系。

2.3 HIP1 沉默细胞系 qPCR 鉴定结果

shRNA-HIP1-1, shRNA-HIP1-2, shRNA-HIP1-3细胞中HIP1基因表达均降低, 其中shRNA-HIP1-3最为显著。由此, 从基因水平上确定HIP1沉默细胞系构建成功(图4)。

2.4 HIP1 沉默细胞系蛋白质印迹法鉴定结果

与Control组和shRNA-Control组比较, shRNA-HIP1-3组细胞中HIP1蛋白表达显著降低。因此, 从蛋白水平上确定HIP1沉默细胞系构建成功(图5)。

2.5 HIP1 基因沉默对人食管癌细胞迁移能力的影响

图6为EC109细胞shRNA-Control组和shRNA-HIP1组划痕后0和48 h的迁移情况。沉默HIP1基因表达可以明显抑制食管癌EC109细胞的体外迁移能力($P < 0.05$)。图7为EC109细胞shRNA-Control组和shRNA-HIP1组穿过Transwell小室的能力, 结果同样证实沉默HIP1基因表达可以明显抑制食管癌EC109细胞的体外迁移能力($P < 0.05$)。

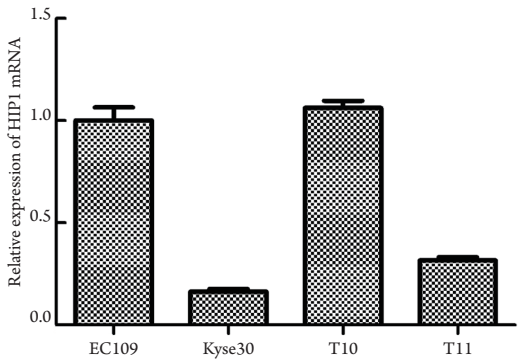


图1 不同食管癌细胞系中HIP1的基因表达
Figure 1 HIP1 gene expression in different ESCC cell lines

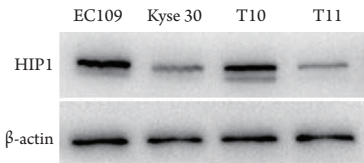


图2 不同食管癌细胞系中HIP1的蛋白表达
Figure 2 HIP1 protein expression in different ESCC cell lines

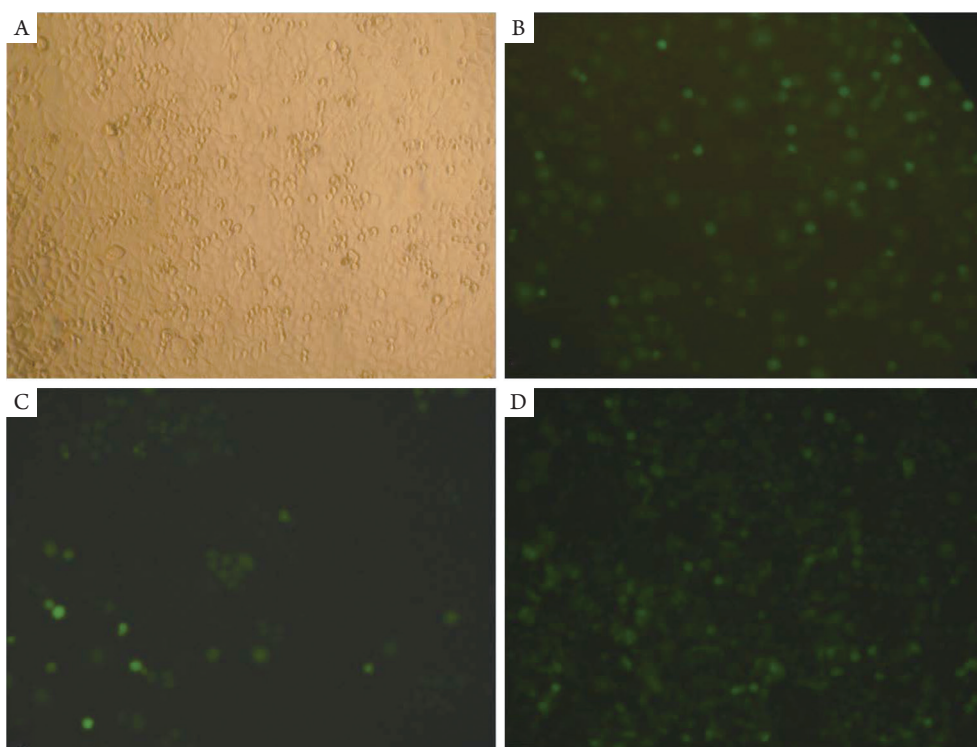


图3 慢病毒感染EC109细胞($\times 100$)

Figure 3 EC109 cells were transfected with shRNA-HIP1 ($\times 100$)

(A) 明视野下慢病毒干扰处理的EC109细胞; (B) shRNA-HIP1-1处理的EC109细胞; (C) shRNA-HIP1-2处理的EC109细胞; (D) shRNA-HIP1-3处理的EC109细胞。

(A) Micrograph of EC109 cells infected with shRNA-HIP1 in bright field; (B) Micrograph of EC109 cells infected with shRNA-HIP1-1 in fluorescent field; (C) Micrograph of EC109 cells infected with shRNA-HIP1-2 in fluorescent field; (D) Micrograph of EC109 cells infected with shRNA-HIP1-3 in fluorescent field.

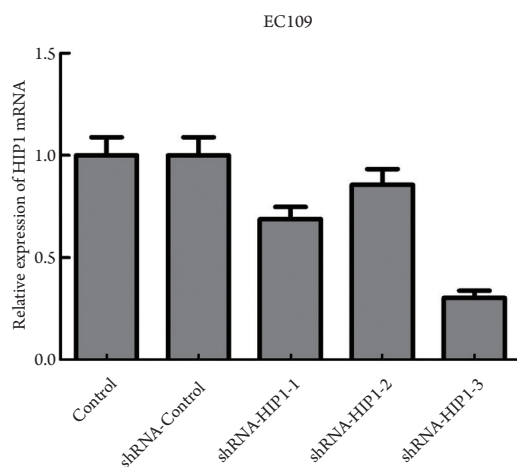


图4 慢病毒干扰EC109细胞中HIP1基因表达

Figure 4 HIP1 gene expressions before and after shRNA-HIP1 in EC109 cells

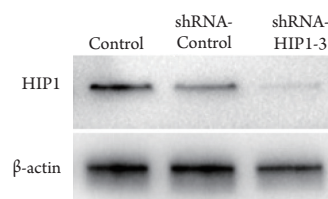


图5 慢病毒干扰EC109细胞中HIP1蛋白表达

Figure 5 HIP1 protein expressions before and after shRNA-HIP1 in EC109 cells

2.6 HIP1 基因沉默对人食管癌细胞侵袭能力的影响

图8为EC109细胞shRNA-Control组及shRNA-HIP1组的穿膜情况。与shRNA-Control组相比, shRNA-HIP1组细胞的体外侵袭能力明显降低($P < 0.05$)。

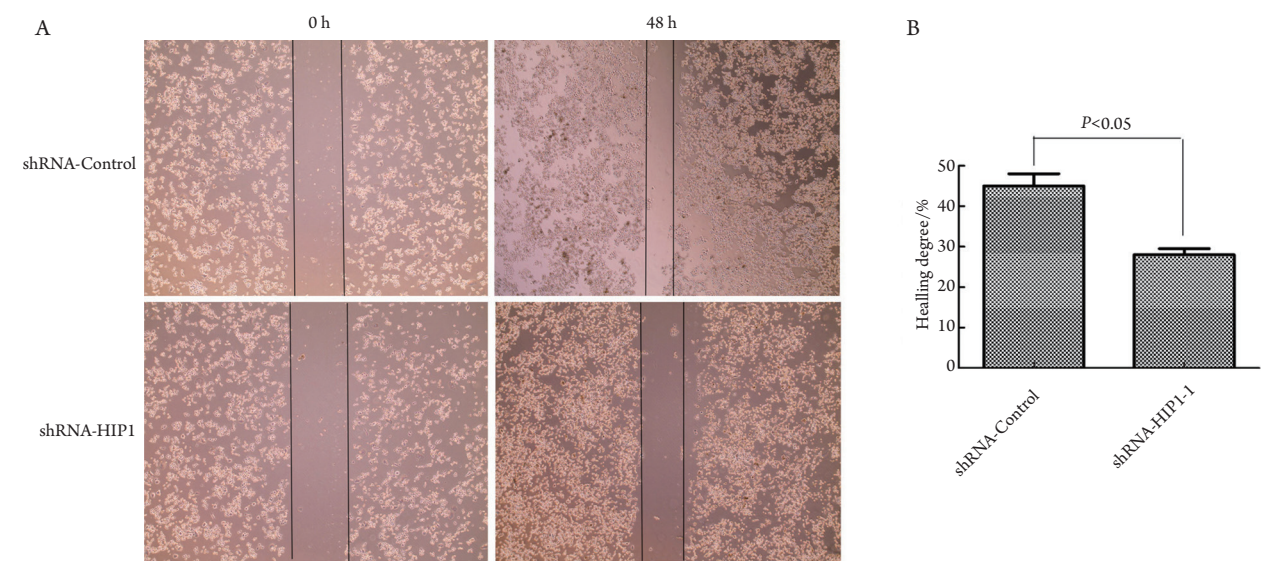


图6 划痕试验观察*HIP1*基因沉默对人食管癌细胞迁移能力的影响

Figure 6 Scratch wound healing assay showed that knockdown of *HIP1* inhibited the migration of EC109 cell lines

(A)*HIP1*基因沉默前后EC109细胞0 h和48 h的迁移差异(× 200); (B)*HIP1*基因沉默前后EC109细胞迁移的距离。

(A) Migration differences of EC109 cells at 0 and 48 h before and after *HIP1* gene silencing (× 200); (B) Migration distance of EC109 cell before and after *HIP1* gene silencing.

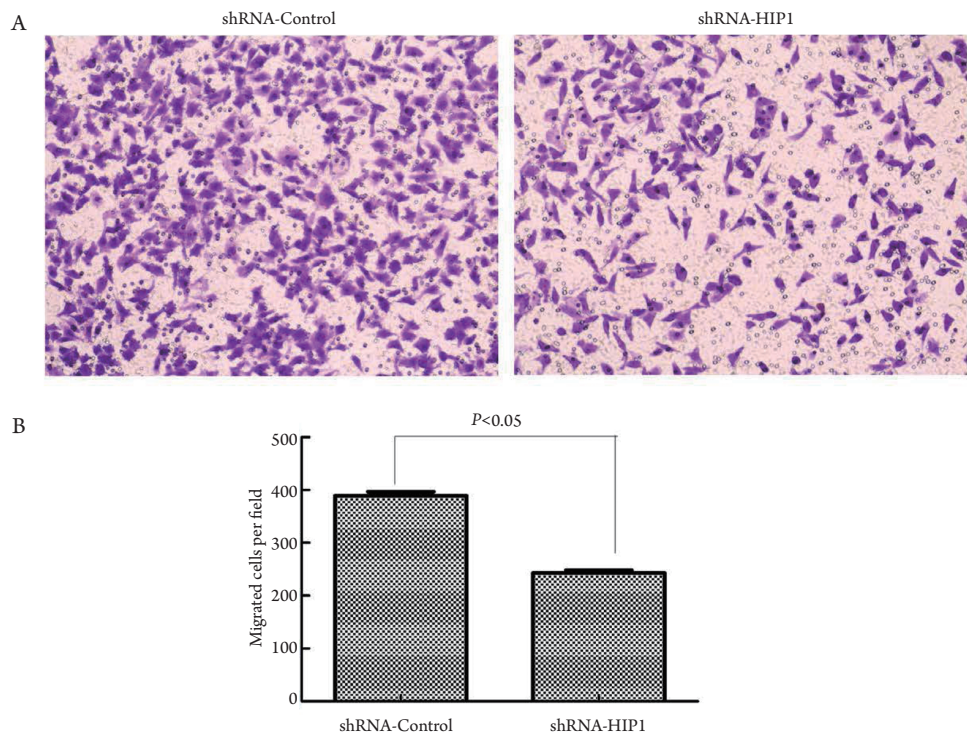


图7 Transwell迁移试验观察*HIP1*基因沉默对人食管癌细胞迁移能力的影响

Figure 7 Transwell migration assay showed that knockdown of *HIP1* inhibited the migration of EC109 cell lines

(A)*HIP1*基因沉默前后EC109细胞穿过Transwell小室的差异(结晶紫染色, × 200); (B)*HIP1*基因沉默前后EC109细胞穿过Transwell小室的细胞数。

(A) Differences of EC109 cells passing through transwell compartment before and after *HIP1* gene silencing (crystal violet staining, × 200); (B) Number of EC109 cell passing through transwell compartment before and after *HIP1* gene silencing.

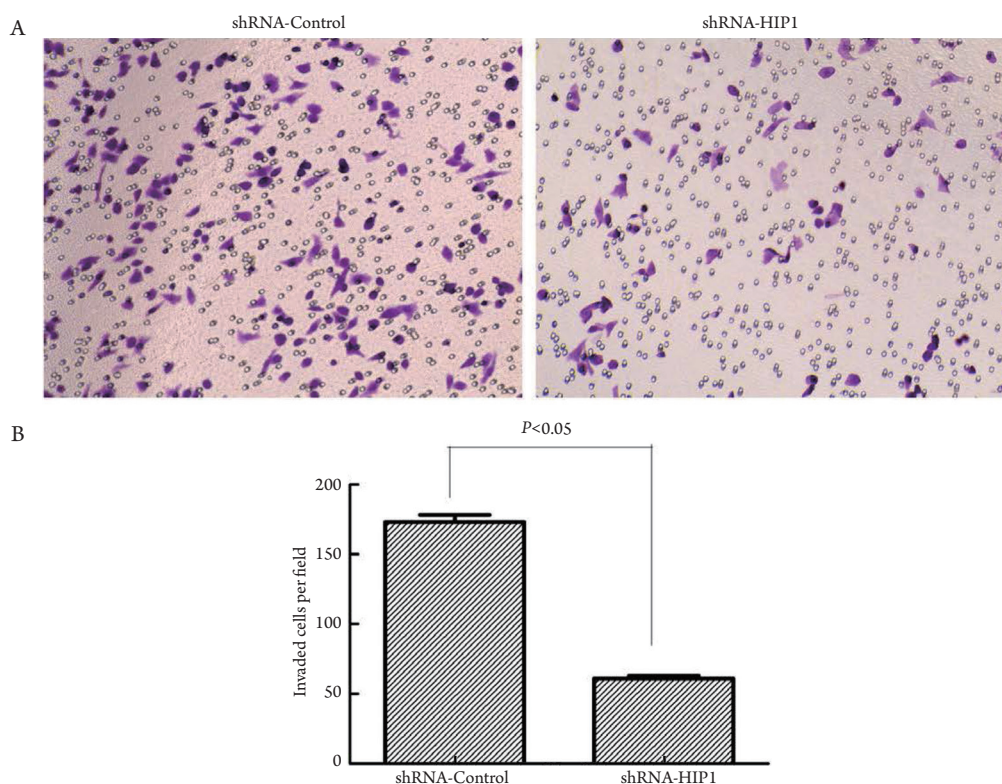


图8 *HIP1*基因沉默对人食管癌细胞侵袭能力的影响

Figure 8 Transewell invasion assay showed that knockdown of *HIP1* inhibited the invasion of EC109 cell lines

(A)*HIP1*基因沉默前后EC109细胞的穿膜差异(结晶紫染色, $\times 200$); (B)*HIP1*基因沉默前后EC109细胞穿膜的细胞数。

(A) Differences of EC109 cells passing through Matrigel before and after *HIP1* gene silencing (Crystal violet staining, $\times 200$); (B) Number of EC109 cell passing through Matrigel before and after *HIP1* gene silencing.

3 讨论

食管癌是全球发病率和病死率较高的恶性肿瘤, 其发生、发展和转移均涉及极其复杂的多基因调控过程^[9-11]。因此, 研究食管癌的发病病因及发病机制具有重要的临床意义。

*HIP1*首次被克隆出来^[4]后, Ross等^[12]在1998年发现慢性髓单核白血病患者中*HIP1*能与PDGF β R基因形成融合基因而导致造血干细胞的恶性转化。由此, 开启了*HIP1*在肿瘤中作用的研究。Rao等^[13]在前列腺癌和结肠癌中检出*HIP1*的表达, 并通过组织芯片发现*HIP1*的表达与前列腺癌的进展和恶性程度有关。在此基础上有学者^[14]在前列腺癌模型小鼠和前列腺癌患者血清中均检出抗*HIP1*抗体, 初步证明*HIP1*可以作为前列腺癌血清学标志物。Marghalani等^[15]在梅克尔细胞癌组织中也检出*HIP1*高表达。随着对*HIP1*与肿瘤关系研究的深入, 学者^[5-7]发现*HIP1*在人类多种肿瘤(尤其人类上皮性肿瘤)中都过度表达, 提示*HIP1*可能在肿瘤的

发生发展过程中发挥重要的作用。但*HIP1*在食管癌中的作用及其机制并不清楚。

前期研究^[8]发现*HIP1*蛋白在食管癌中的阳性表达率远高于癌旁组织, 由此说明*HIP1*可能是食管癌组织和癌旁组织中的差异蛋白, 与食管癌发生发展存在一定的关联。目前尚无*HIP1*在食管癌相关方面的研究报道, 但在其他肿瘤组织中检出*HIP1*高表达^[6,15-17]。

本研究采用慢病毒干扰技术沉默*HIP1*基因, 成功设计了针对*HIP1*的3条RNA干扰靶点序列和一条阴性对照序列, 在相同条件下感染相同细胞, 产生的干扰效果有差异, 其中以shRNA-*HIP1*-3干扰效果最好, 其沉默效率达到80%以上。划痕试验和Transwell迁移侵袭试验结果显示: 构建的慢病毒表达载体可特异性地抑制*HIP1*基因和蛋白的表达, 沉默*HIP1*基因可明显抑制EC109食管癌细胞体外迁移和侵袭能力, 提示*HIP1*作为食管癌的差异蛋白, 很大程度上可能作为转移的促进因子, 通过促进食管癌细胞的转移参与食管癌的发生发展。

综上所述, 本研究初步证实慢病毒干扰沉默 *HIP1* 基因可有效抑制 EC109 细胞中 *HIP1* 基因表达, 降低 EC109 细胞的侵袭及迁移能力, 但其在食管癌发生发展中的机制和意义还有待进一步研究。

参考文献

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013[J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.
2. Ma Y, Zheng X, Zhao H, et al. First-in-human phase I study of AC0010, a mutant-selective EGFR inhibitor in non-small cell lung cancer: safety, efficacy, and potential mechanism of resistance[J]. J Thorac Oncol, 2018, 13(7): 968-977.
3. Escrivá-de-Romani S, Arumí M, Bellet M, et al. HER2-positive breast cancer: current and new therapeutic strategies[J]. Breast, 2018, 39: 80-88.
4. Wanker EE, Rovira C, Scherzinger E, et al. HIP-1: a huntingtin interacting protein isolated by the yeast two-hybrid system[J]. Hum Mol Genet, 1997, 6(3): 487-495.
5. Li D, Chen F, Ding J, et al. Knockdown of HIP1 expression promotes ligand-induced endocytosis of EGFR in HeLa cells[J]. Oncol Rep, 2017, 38(6): 3387-3391.
6. Wang J, Yu M, Guo Q, et al. Prognostic significance of huntingtin interacting protein 1 expression on patients with acute myeloid leukemia[J]. Sci Rep, 2017, 7: 45960.
7. Hsu CY, Lin CH, Jan YH, et al. Huntingtin-interacting protein-1 is an early-stage prognostic biomarker of lung adenocarcinoma and suppresses metastasis via Akt-mediated epithelial-mesenchymal transition[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2016, 193(8): 869-880.
8. 张亚斌, 孙盈, 孙蕾, 等. HIP1 在食管癌中的表达及其临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(21): 3401-3404.
9. ZHANG Yabin, SUN Ying, SUN Lei, et al. Expression of HIP1 in esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance[J]. Journal of Modern Oncology, 2018, 26(21): 3401-3404.
10. Shah MA, Jhawer M, Ilson DH, et al. Phase II study of modified docetaxel, cisplatin, and fluorouracil with bevacizumab in patients with metastatic gastroesophageal adenocarcinoma[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(7): 868-874.
11. Uronis HE, Bendell JC, Altomare I, et al. A phase II study of capecitabine, oxaliplatin, and bevacizumab in the treatment of metastatic esophagogastric adenocarcinomas[J]. Oncologist, 2013, 18(3): 271-272.
12. Kang YK, Rha SY, Tassone P, et al. A phase IIa dose-finding and safety study of first-line pertuzumab in combination with trastuzumab, capecitabine and cisplatin in patients with HER2-positive advanced gastric cancer[J]. Br J Cancer, 2014, 111(4): 660-666.
13. Ross TS, Bernard OA, Berger R, et al. Fusion of Huntingtin interacting protein 1 to platelet-derived growth factor beta receptor (PDGFBetaR) in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;7)(q33;q11.2)[J]. Blood, 1998, 91(12): 4419-4426.
14. Rao DS, Hyun TS, Kumar PD, et al. Huntingtin-interacting protein 1 is overexpressed in prostate and colon cancer and is critical for cellular survival[J]. J Clin Invest, 2002, 110(3): 351-360.
15. Bradley SV, Oravec-Wilson KI, Bougeard G, et al. Serum antibodies to huntingtin interacting protein-1: a new blood test for prostate cancer[J]. Cancer Res, 2005, 65(10): 4126-4133.
16. Marghalani S, Feller JK, Mahalingam M, et al. Huntingtin interacting protein 1 as a histopathologic adjunct in the diagnosis of Merkel cell carcinoma[J]. Int J Dermatol, 2015, 54(6): 640-647.
17. Rice MA, Ishteiwy RA, Magani F, et al. The microRNA-23b/-27b cluster suppresses prostate cancer metastasis via Huntingtin-interacting protein 1-related[J]. Oncogene, 2016, 35(36): 4752-4761.
18. Marghalani S, Feller JK, Mahalingam M, et al. Huntingtin interacting protein 1 as a histopathologic adjunct in the diagnosis of Merkel cell carcinoma[J]. Int J Dermatol, 2015, 54(6): 640-647.

本文引用: 冯征, 王雪娇, 文苗苗, 夏靖华, 张晏宁, 张娇, 张志培, 孙盈. *HIP1* 基因沉默对人食管癌 EC109 细胞迁移侵袭能力的影响[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(6): 1159-1165. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.06.001

Cite this article as: FENG Zheng, WANG Xuejiao, WEN Miaomiao, XIA Jinghua, ZHANG Yanning, ZHANG Jiao, ZHANG Zhipei, SUN Ying. Effect of *HIP1* gene silencing on migration and invasion of EC109 cells in human esophagus cancer[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2019, 39(6): 1159-1165. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.06.001