

# HES<sub>1</sub> 对胃癌细胞株增殖、凋亡及迁移能力的影响

陈加顺<sup>1</sup>, 束永前<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 仪征市人民医院肿瘤科, 江苏 仪征 211400; <sup>2</sup> 南京医科大学第一附属医院肿瘤科, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探讨 siRNA 靶向 HES<sub>1</sub> 对胃癌细胞株 BGC-823 和 SGC-7901 增殖、凋亡及迁移能力的影响。方法:采用荧光实时定量 PCR (qPCR) 法检测胃癌组织及胃癌细胞株 BGC-823 和 SGC-7901 的 HES<sub>1</sub> 水平, 采用脂质体法将 2 条靶向 HES<sub>1</sub> 的 siRNA 片段 (siHES1-1 和 siHES1-2) 高效转染至 BGC-823 和 SGC-7901 细胞, 经 qPCR 法检测后选取抑制效率最高的 siRNA 进行后续功能学研究; 分别采用 MTT、流式细胞术及 Transwell 法检测转染后 BGC-823 和 SGC-7901 细胞的增殖、凋亡及迁移能力的改变。结果:71 例胃癌组织的 HES<sub>1</sub> mRNA 水平高于 59 例癌旁组织, BGC-823 和 SGC-7901 细胞的 HES<sub>1</sub> mRNA 水平明显高于正常胃黏膜细胞株 GES-1 ( $P < 0.05$ ); 转染 HES<sub>1</sub> siRNA 可降低 BGC-823 和 SGC-7901 细胞的 HES<sub>1</sub> 水平, 此外, 较转染对照组细胞, 其存活率及穿膜细胞数目明显降低, 凋亡率明显升高 ( $P < 0.05$ )。结论:胃癌组织及细胞株中的 HES<sub>1</sub> 高表达, 靶向沉默 HES<sub>1</sub> 可抑制胃癌细胞增殖及迁移并诱导细胞凋亡。

**[关键词]** siRNA; HES<sub>1</sub>; 胃癌; 凋亡; 迁移

**[中图分类号]** R735.2

**[文献标志码]** B

**[文章编号]** 1007-4368(2016)12-1440-03

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20161207

胃癌的发生发展涉及多基因多环节的调控异常, 故从分子水平上深入阐明胃癌的发病机制十分重要<sup>[1]</sup>。HES<sub>1</sub> 基因是一种在哺乳动物中广泛存在的基因, 具有高度保守的特点, 是 Notch 信号通路的重要效应分子之一<sup>[2]</sup>。以往研究发现, HES<sub>1</sub> 可负性调控人体干细胞的分化<sup>[3]</sup>, 近年来的研究发现该基因参与恶性肿瘤的发生发展。在结直肠癌的研究中, 过表达 HES<sub>1</sub> 可促进细胞增殖并提高成瘤能力<sup>[4]</sup>, 但 HES<sub>1</sub> 与胃癌关系的研究鲜有报道。本研究采用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 技术靶向抑制人胃癌细胞中 HES<sub>1</sub> 的表达, 在体外水平研究靶向抑制 HES<sub>1</sub> 基因对胃癌恶性行为的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

选取本院 2015 年 1 月—2016 年 6 月经病理确诊的 71 例胃癌组织及 59 例对应癌旁组织, 其中男 42 例, 女 29 例; 年龄范围 34~68 岁, 中位年龄 63.0 岁,  $\leq 60$  岁 41 例,  $> 60$  岁 30 例; ECOG 评分; 分化程度: 低分化 33 例, 中高分化 39 例。纳入标准: ①取材前均未行放疗化疗等抗肿瘤治疗; ②无重要脏器功能障碍; ③ ECOG 评分 0~2 分; ④血常规及肝肾功能基本正常。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞和主要试剂

胃癌细胞株 BGC-823 和 SGC-7901 及正常胃黏膜细胞株 GES-1 (中科院上海细胞生物研究所), RPMI 1640 细胞培养基、胰蛋白酶 (Gibco 公司, 美国), 优质胎牛血清 (杭州四季青生物工程公司), TRIzol 试剂、四甲基偶氮唑盐 (MTT) (Sigma 公司, 美国), 转染脂质体 LipofectAmine™ 2000 (Invitrogen 公司, 美国), 细胞凋亡检测 (Annexin-V-FITC/PI) 试剂盒 (南京凯基公司), 2 条靶向 HES<sub>1</sub> 的 siRNA 片段及随机序列对照由上海生工生物工程技术有限公司设计并合成。

#### 1.2.2 细胞培养

将液氮保存的胃癌细胞常规复苏重悬后, 用 RPMI 1640 培养基培养, 加入 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素, 置于 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中 37°C 培养, 次日更换培养基 1 次, 之后每隔 48 h 更换完全培养液。待细胞融合度达到 70%~80% 时按常规方法传代, 取 3 代以后状态好的细胞用于转染实验。

#### 1.2.3 细胞转染条件优化及 siRNA 转染

根据不同 LipofectAmine™ 2000 剂量与 siRNA 载体量的配比结果, 转染的最优条件为 siRNA: Lipofectamine™ 2000 为 50 pmol: 1.5  $\mu$ L。预先将 2 条

靶向抑制 HES<sub>1</sub> 基因的 siRNA 载体片段(siHES<sub>1</sub>-1、siHES<sub>1</sub>-2)分别高效转染胃癌细胞 BGC-823 和 SGC-7901。转染 72 h 后采用实时定量 PCR 检测 HES<sub>1</sub> mRNA 水平以筛选最佳沉默效果的 siRNA 用于后续试验。

#### 1.2.4 细胞增殖活性检测

取各组转染后的 BGC-823 和 SGC-7901 细胞, 以  $1 \times 10^4$  个/孔的细胞量接种于 96 孔培养板中, 常规条件培养后分别于转染 24、48、72 h 后(每组设 3 个复孔), 向每孔加入 20  $\mu$ L 0.5% MTT 溶液(5 mg/mL), 4 h 后加入 DMSO 溶液以终止反应, 采用酶标仪检测 492 nm 波长下各组的吸光度值。根据公式计算存活率: 存活率(%)=(对照组吸光度值-实验组吸光度值/对照组吸光度值)  $\times$  100%。实验重复 3 次。

#### 1.2.5 流式细胞术

采用 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术定量检测各组转染 48 h 的凋亡情况, 冲洗 2 次后将细胞重悬并调整浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL, 每组取 100  $\mu$ L 于培养管中, Annexin V-FITC/PI 染色后上流式细胞仪检测凋亡率。实验重复 3 次。

#### 1.2.6 Transwell 法

采用 Transwell 法检测各组转染 48 h 后的侵袭水平, 每组取  $5 \times 10^4$  个细胞接种于预先铺设 Matrigel 胶的无血清培养基上室, 下室均为含 10% 胎牛血清的培养基, 24 h 后取出小室, 依次经甲醛固定及结晶紫染色, 采用倒置显微镜计算侵袭或迁移细胞数。实验重复 3 次。

#### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 版统计软件进行数据分析。计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 两组以上样本资料比较采用单因素方差分析(one way ANOVA), 其中两两比较采用 Bonferroni 法。 $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HES<sub>1</sub> 在胃癌组织中的表达

qPCR 检测的结果显示, 71 例胃癌组织的 HES<sub>1</sub> mRNA 水平明显高于 59 例癌旁组织, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 图 1A)。

### 2.2 HES<sub>1</sub> 在胃癌细胞株中的表达

qPCR 检测的结果显示, 与正常胃黏膜细胞株 GES-1 相比, BGC-823 和 SGC-7901 细胞的 HES<sub>1</sub> mRNA 水平明显高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 图 1B)。

### 2.3 HES<sub>1</sub> siRNA 转染对胃癌细胞 HES<sub>1</sub> 表达的影响

采用 qPCR 法检测 HES<sub>1</sub> siRNA 转染 72 h 的 HES<sub>1</sub> mRNA 水平发现, 与对照组相比, siHES<sub>1</sub>-1 和 siHES<sub>1</sub>-2 均可降低 BGC-823 和 SGC-7901 细胞株中 HES<sub>1</sub> mRNA 水平, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 图 2)。转染 siHES<sub>1</sub>-1 的 BGC-823 细胞沉默率为  $(81.25 \pm 3.57)\%$ , 高于 siHES<sub>1</sub>-2 细胞的  $(62.83 \pm 4.05)\%$ , 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 而转染 siHES<sub>1</sub>-1 的 SGC-7901 细胞沉默率为  $(75.61 \pm 4.11)\%$ , 高于 siHES<sub>1</sub>-2 细胞的  $(45.26 \pm 4.63)\%$ , 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。后续试验选取 siHES<sub>1</sub>-1 片段进行研究。

### 2.4 HES<sub>1</sub> siRNA 转染对胃癌细胞增殖的影响

采用 MTT 法检测 HES<sub>1</sub> siRNA 转染 24~72 h 的增殖水平发现, 与对照组相比, BGC-823 和 SGC-7901 两株细胞转染 siHES<sub>1</sub> 后的存活率均显著降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 图 3)。

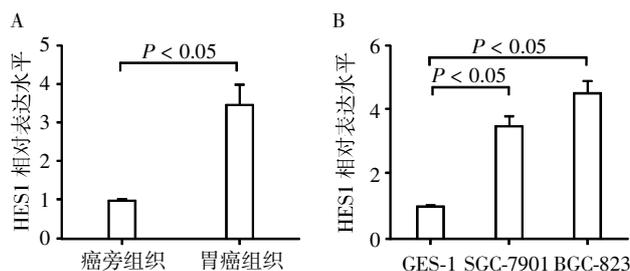


图 1 胃癌组织(A)及细胞株(B)中的 HES<sub>1</sub> mRNA 水平

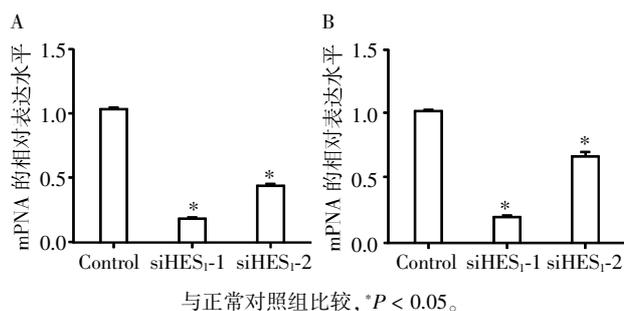


图 2 经 siRNA 转染后胃癌细胞株 BGC-823 (A) 和 SGC-7901(B) 的 HES<sub>1</sub> 表达水平

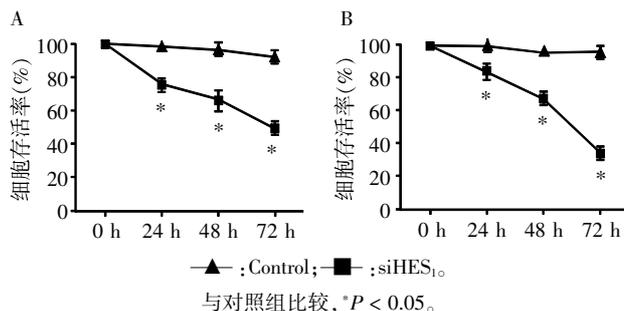


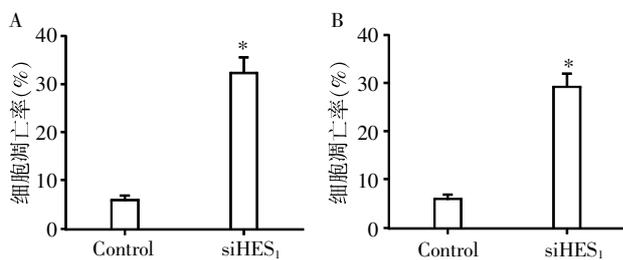
图 3 经 siRNA 转染后胃癌细胞株 BGC-823 (A) 和 SGC-7901(B) 的存活率

### 2.5 HES<sub>1</sub> siRNA 转染对胃癌细胞凋亡的影响

采用流式细胞仪检测 HES<sub>1</sub> siRNA 转染 48 h 的凋亡水平发现,与对照组相比,BGC-823 和 SGC-7901 两株细胞转染 siHES<sub>1</sub> 后的凋亡率均显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 4)。

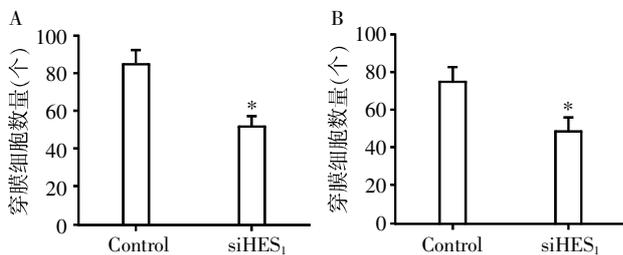
### 2.5 HES<sub>1</sub> siRNA 转染对胃癌细胞侵袭能力的影响

采用 Transwell 法检测 HES<sub>1</sub> siRNA 转染 24~72 h 的侵袭能力发现,与对照组相比,BGC-823 和 SGC-7901 两株细胞转染 siHES<sub>1</sub> 后的穿膜细胞数显著减少,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 5)。



与对照组比较, \* $P < 0.05$ 。

图 4 经 siRNA 转染 HES<sub>1</sub> 后胃癌细胞株 BGC-823 (A) 和 SGC-7901 (B) 的凋亡率



与对照组比较, \* $P < 0.05$ 。

图 5 经 siRNA 转染 HES<sub>1</sub> 后胃癌细胞株 BGC-823 (A) 和 SGC-7901 (B) 的迁移能力改变

## 3 讨论

Notch 信号在肿瘤发生发展中起重要作用,其不仅可以促进肿瘤细胞的自我更新<sup>[5]</sup>,促进肠祖细胞的分化及抑制正常结肠上皮细胞分化<sup>[6]</sup>,HES 家族是 Notch 信号通路的重要靶点之一,可对胃肠肿瘤细胞分化起诱导作用<sup>[7]</sup>。HES<sub>1</sub> 过表达与胰腺癌、乳腺癌及卵巢癌的发生有关<sup>[8]</sup>,在多种肿瘤模型中发现,下调 HES<sub>1</sub> 水平可引起肿瘤细胞加速分化及细胞增殖抑制,抑制 HES<sub>1</sub> 可导致肠肿瘤细胞分化成肠上皮细胞<sup>[9]</sup>。HES<sub>1</sub> 在恶性肿瘤的发生发展过程中发挥重要作用,它可以通过结合抑癌基因 HATH1 的启动子来抑制其表达,继而影响其对恶性肿瘤的负性调控过程<sup>[10]</sup>。本研究发现胃癌组织 HES<sub>1</sub> 的 mRNA 水平明显高于癌旁组织,与其他肿瘤的研究

结果一致,且 BGC-823 和 SGC-7901 的 HES<sub>1</sub> 表达亦显著强于胃黏膜细胞,表明该基因与胃癌的发生发展有关。此外,本研究发现低分化的 BGC-823 细胞中 HES<sub>1</sub> mRNA 水平明显高于高分化 SGC-7901 细胞,提示 HES<sub>1</sub> 水平可能与细胞分化程度有关。为进一步研究 HES<sub>1</sub> 对胃癌防治中的价值,本研究采用 siRNA 技术下调其表达,进而观察对增殖、凋亡及迁移能力的影响。过度增殖是胃癌不易控制的主要原因之一<sup>[11]</sup>,本研究发现,转染 siRNA 后 BGC-823 和 SGC-7901 细胞的存活率均显著降低,且随观察时间的延长呈降低趋势,表明沉默 HES<sub>1</sub> 可抑制胃癌细胞的增殖。细胞凋亡受到机体的精确调控,介导肿瘤发生发展及耐药过程<sup>[12]</sup>,鉴于 HES<sub>1</sub> 在多种肿瘤中发挥癌基因的作用,故抑制其表达可能会影响胃癌细胞的凋亡过程。本研究发现,HES<sub>1</sub> siRNA 转染后胃癌细胞株凋亡率升高,表明抑制 HES<sub>1</sub> 的表达可诱导胃癌细胞的凋亡。

细胞侵袭能力不仅是肿瘤的恶性体现,也是肿瘤复发的主要原因<sup>[13]</sup>。Weng 等<sup>[14]</sup>的研究发现,HES<sub>1</sub> 可增强结直肠癌细胞的侵袭能力,而抑制 HES<sub>1</sub> 表达后,侵袭能力受到显著抑制。本研究发现,HES<sub>1</sub> siRNA 转染后,无论在低分化的 BGC-823 细胞还是高分化 SGC-7901 细胞,穿膜细胞数均显著降低,表明 HES<sub>1</sub> 参与胃癌细胞迁移的调控。

综上所述,胃癌组织及细胞株中的 HES<sub>1</sub> 高表达,且靶向沉默 HES<sub>1</sub> 可抑制胃癌细胞增殖及迁移,并诱导细胞凋亡。

### 【参考文献】

- [1] Murray-Stewart T, Sierra JC, Piazuelo MB, et al. Epigenetic silencing of miR-124 prevents spermine oxidase regulation; implications for *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer[J]. *Oncogene*, 2016, 35(42): 5480-5488
- [2] Liu C, Duan P, Li B, et al. miR-29a activates Hes1 by targeting Nfia in esophageal carcinoma cell line TE-1 [J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(1): 96-102
- [3] Zhou XL, Zhao Y, Fang YH, et al. Hes1 is upregulated by ischemic postconditioning and contributes to cardioprotection[J]. *Cell Biochem Funct*, 2014, 32(8): 730-736
- [4] 杨妙龄, 高飞. HES<sub>1</sub> 在结肠癌组织中的表达及对 SW620 细胞成瘤能力的影响[J]. *中国癌症杂志*, 2014, 24(9): 646-651
- [5] Murta D, Batista M, Trindade A, et al. In vivo notch signaling blockade induces abnormal spermatogenesis in the mouse[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e113365

(下转第 1483 页)