引用本文:马永红,同娟.敲低Ⅰ型胶原α1链基因抑制鼻咽癌细胞增殖、迁移和侵袭的研究[J].安徽医药,2021,25(4):744-747.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.04.027.

◇临床医学◇

敲低Ⅰ型胶原α1链基因抑制鼻咽癌细胞增殖、迁移和侵袭的研究

马永红,同娟

作者单位:宝鸡市中心医院耳鼻喉科,陕西 宝鸡721000

摘要: 目的 研究Ⅰ型胶原α1链(COL1A1)基因对鼻咽癌细胞增殖、侵袭、迁移的影响。**方法** 该研究于2017年9月至2018年12月完成,实时定量PCR(qPCR)和蛋白质印迹法(Western blotting)检测COL1A1在鼻咽癌(C666-1、CNE1、CNE2)细胞系中的表达量;CNE1细胞分m为对照组、阴性对照(si-NC组)、敲低COL1A1(si-COL1A1)组,通过Lipofectamine 2000将siRNA COL1A1质粒转染至鼻咽癌CNE1细胞中,对照组细胞正常培养,si-NC组细胞转染阴性对照;qPCR和Western blotting检测转染效果,噻唑蓝(MTT)、Transwell实验分别检测细胞增殖、侵袭、迁移;Western blotting检测钙黏蛋白E(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、钙黏蛋白N(N-cadherin)水平。**结果** COL1A1 mRNA[(3.565±0.341)(4.253±0.410)(3.968±0.378)]和蛋白表达量[(2.214±0.216)(3.152±0.305)(2.519±0.221)]在鼻咽癌(C666-1、CNE1、CNE2)细胞系中表达量增加(P<0.05);CNE1细胞转染siRNA COL1A1质粒能显著下调COL1A1 mRNA(0.352±0.045)和蛋白表达量(0.245±0.232)(P<0.05);敲低COL1A1的表达量抑制CNE1细胞增殖(0.536±0.059)(0.665±0.067)(0.893±0.081)(P<0.05),降低其侵袭(52.895±5.635)、迁移(113.254±13.279)能力(P<0.05),上调E-cadherin蛋白水平(2.152±0.223)(P<0.05),下调Vimentin(0.362±0.045)、N-cadherin(0.423±0.043)蛋白水平(P<0.05)。**结论** COL1A1可能通过抑制上皮细胞间充质化(EMT)促进鼻咽癌细胞增殖、侵袭、迁移。

关键词: 鼻咽肿瘤; 胶原Ⅰ型; 增殖; 钙黏蛋白; 波形蛋白

Inhibition of proliferation, migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells by knocking down COL1A1 gene

MA Yonghong,TONG Juan

Author Affiliation:Department of Otolaryngology, Baoji City Central Hospital, Baoji, Shaanxi 721000, *China*

Abstract: Objective To investigate the effect of collagen type l alphα 1 (COL1A1) gene on proliferation, invasion and migration of nasopharyngeal carcinoma cells.**Methods** The study was completed from September 2017 to December 2018. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and Western blotting were used to detect the expression of COL1A1 in nasopharyngeal cancer cell lines (C666-1, CNE1, CNE2). CNE1 cells were randomly assigned into control group, negative control (si-NC) group and knockdown COL1A1 (si-COL1A1) group. The siRNA COL1A1 plasmid was transfected into CNE1 cells by Lipofectamine 2000, and the control group were cultured normally, while those in si-NC group were transfected into negative control group. The transfection effect was detected by qRT-PCR and Western blotting. The cells proliferation, invasion and migration were detected by MTT and Transwell assay. Western blotting was used to detect the expression of E-cadherin, Vimentin, N-cadherin.**Results** The expression of COL1A1 mRNA [(3.565±0.341),(4.253±0.410),(3.968±0.378)] and protein expressions [(2.214±0.216),(3.152±0.305),(2.519±0.221)]was significantly increased in nasopharyngeal cancer cell lines (C666-1, CNE1, CNE2) (P<0.05). The siRNA COL1A1 plasmid could down-regulate the expression of COL1A1 (0.352±0.045) gene and (0.245±0.232) protein (P<0.05). Knocking down the expression of COL1A1 inhibited the proliferation [(0.536±0.059),(0.665±0.067),(0.893±0.081)] of CNE1 cells (P<0.05), decreased the invasion (52.895±5.635) and migration (113.254±13.279) ability (P<0.05), increased the level of E-cadherin (2.152±0.223) protein (P<0.05), and decreased the levels of Vimentin (0.362±0.045) and N-cadherin (0.423±0.043) protein (P<0.05).**Conclusion** COL1A1 may promote the proliferation, invasion and migration of nasopharyngeal carcinoma cells by inhibiting epithelial- mesenchymal transition (EMT).

Key words: Nasopharyngeal neoplasms; Collagen type I; Proliferation; Cadherin; Vimentin

鼻咽癌是一种发病率较高的常见头颈部肿瘤,其死亡率居于头颈部恶性肿瘤的前列[1]。在我国,南方鼻咽癌的发病率高于北方,每年新增病人占全世界鼻咽癌新增病例的一半以上[2]。鼻咽癌具有发病隐匿、转移性强等临床特点[3-4]。目前,临床常采用放化疗结合治疗鼻咽癌,但由于病人的放化疗抵抗性极大限制了治疗效果,严重影响鼻咽癌病人的5年生存率[5-6]。近年来,发现分子靶向治疗具有特异性强、副作用小等特点,成为临床探究鼻咽癌治疗的重点。近年来的研究证实,属于胶原蛋白家族的Ⅰ型胶原α1链

(COL1A1)基因在乳腺癌[7]、结肠癌[8]等多种肿瘤组织中表达量显著增加,下调COL1A1抑制细胞的增殖,促进细胞的凋亡,表明在肿瘤的病理演进过程中其发挥促进作用。但COL1A1在鼻咽癌中的作用尚不十分清楚,因此2017年9月至2018年12月,本研究通过小干扰RNA(Small interference RNA)下调鼻咽癌细胞中COL1A1的表达量,研究其对鼻咽癌细胞生物学特性的影响,为鼻咽癌的临床治疗提供分子靶位点。

1 材料与方法

1.1 实验材料 鼻咽癌各细胞系(C666-1、CNE1、CNE2)以及人鼻咽上皮细胞(NP69)均购自北纳生物,DMEM培养基、胎牛血清、Lipofectamine 2000、RNA试剂提取试剂盒购自美国Thermo公司,反转录试剂盒、实时定量PCR(qPCR)购自美国Sigma公司,噻唑蓝(MTT)购自美国Bio Basic Inc公司;siRNA COL1A1以及阴性对照购自上海吉玛公司,COL1A1抗体、钙黏蛋白E(E-cadherin)抗体、波形蛋白(Vimentin)抗体、钙黏蛋白N(N-cadherin)抗体购自美国Sigma公司。酶标仪、qPCR仪购自美国Thermo公司。

1.2 细胞的培养 鼻咽癌各细胞系(C666-1、CNE1、CNE2)培养于含10%胎牛血清DMEM培养基,5%二氧化碳、37 ℃培养箱孵育,每2~3天加入胰酶消化、传代。

1.3 细胞的转染 选取生长良好的CNE1细胞,随机分为对照组(常规培养)、si-NC组(转染阴性对照)、si-COL1A1组(转染siRNA COL1A1)。在Lipofectamine 2000说明书指示将转染质粒和Lipofectamine 2000分别进行稀释、混合,加入每孔细胞中培养4~6 h,更换培养基,置于5%二氧化碳、37 ℃培养箱中继续培养。

1.4 qPCR实验 采用RNA提取试剂盒提取各组细胞中总RNA,在反转录试剂盒说明书指示下合成cDNA。以鼠抗人三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参,进行qPCR实验,反应条件为95 ℃ 5 min,95 ℃ 30 s,62 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,35个循环,72 ℃ 10 min,目的基因的表达量采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法进行计算。其中,COL1A1引物(正向引物为5'-GTTGTGCGATGACGTGATCT-GT-3',反向引物为5'-TTGGTCGGTGGGT-GACTCTG-3')以及GAPDH引物(正向引物为5'-CTG GGCTAC ACTGAGCACC-3',反向引物为5'-AAG TGG TCG TTG AGGGCA ATG-3')由上海生工合成。实验重复3次。

1.5 MTT实验 收集各组CNE1细胞,将5×10^3个CNE1细胞接种至96孔板,分别培养24 h、48 h、72 h,每孔CNE1细胞中加入20 μL MTT,37 ℃孵育4 h,每孔CNE1细胞中加入150 μL二甲基亚砜(DMSO),振荡10 min,酶标仪检测490 nm吸光值,记为A值。

1.6 Transwell实验 在侵袭实验前,Transwell上室膜中提前覆盖Matrigel胶稀释液,而迁移实验无须此过程。收集各组CNE1细胞,将5×10^4个CNE1细胞加入Transwell上室,将600 μL含15%胎牛血清的培养基加入下室,培养24 h;PBS清洗、弃去残留细胞,甲醛固定、结晶紫染色各30 min,显微镜取5个区域拍照、计数,取平均值。

1.7 蛋白质印迹法(Western blotting) 收集各组CNE1细胞,RIAP裂解液提取CNE1细胞总蛋白,10% SDS-PAGE凝胶为介质,进行电泳,挑选目的条带转移至PVDF膜。置于5%封闭液孵育2 h,TBST清洗3次,加入COL1A1(1∶200)、E-cadherin一抗(1∶5 000)、Vimentin一抗(1∶5 000)、N-cadherin一抗(1∶2 000)、GAPDH一抗(1∶10 000),辣根过氧化物酶标记二抗(1∶1 000)孵育,加入ECL发光液,曝光、显影、定影,检测目的蛋白灰度值/GAPDH蛋白灰度值。

1.8 统计学方法 本研究数据通过SPSS 20.0进行统计分析,结果以$\bar{x}\pm s$表示,两组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较使用SNK-q检验,$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结果

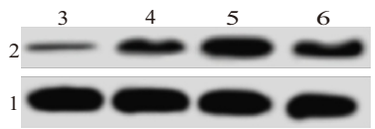
2.1 COL1A1在细胞系中的表达量 与人鼻咽上皮细胞(NP69)相比,COL1A1 mRNA和蛋白表达量在鼻咽癌各细胞系(C666-1、CNE1、CNE2)中表达量增加($P<0.05$),其中在CNE1细胞中的表达量最高。结果如表1、图1所示,

表1 各组细胞中COL1A1的表达量($\bar{x}\pm s$)

细胞	重复次数	COL1A1蛋白相对表达量	COL1A1 mRNA相对表达量
NP69	9	1.000±0.069	1.000±0.075
C666-1	9	2.214±0.216①	3.565±0.341①
CNE1	9	3.152±0.305①	4.253±0.410①
CNE2	9	2.519±0.221①	3.968±0.378①
F值		151.889	184.947
P值		0.000	0.000

注:COL1A1为Ⅰ型胶原α1链,COL1A1 mRNA为COL1A1 mRNA相对表达量,NP69为人鼻咽上皮细胞,C666-1、CNE1、CNE2均为鼻咽癌细胞系。

①与NP69细胞相比,$P<0.05$。

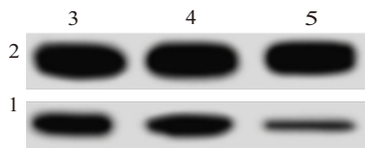


注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶;2—COL1A1为COL1A1蛋白相对表达量;3—NP69为人鼻咽上皮细胞;4—鼻咽癌细胞系C666-1;5—鼻咽癌细胞系CNE1;6—鼻咽癌细胞系CNE2。

图1 各组细胞中COL1A1蛋白的表达量

2.2 转染siRNA COL1A1对细胞中COL1A1表达量的影响及敲低COL1A1对CNE1细胞增殖的影响 将siRNA COL1A1以及阴性对照转染入CNE1细胞系中,从而敲低COL1A1的表达量,与对照组相比,

COL1A1在si-NC组细胞中表达量变化差异无统计学意义，但在si-COL1A1组细胞中表达量下降（$P<0.05$）。与对照组相比，转染阴性CNE1细胞增殖活性差异无统计学意义，但敲低COL1A1的表达量降低CNE1细胞增殖活性（$P<0.05$）。见表2、图2。



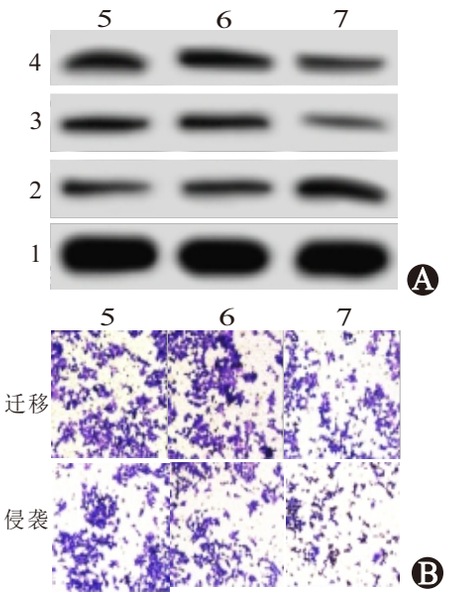
注：1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶；2—COL1A1为COL1A1蛋白相对表达量；3—对照组；4—阴性对照；5—敲低COL1A1。

图2 转染siRNA COL1A1对细胞中COL1A1蛋白表达量的影响

2.3 敲低COL1A1对CNE1细胞迁移、侵袭及上皮细胞间充质化（EMT）相关蛋白水平的影响 与对照组相比，转染阴性对照的CNE1细胞侵袭、迁移细胞数无显著变化，但敲低COL1A1的表达量降低CNE1细胞侵袭、迁移数目（$P<0.05$）。与对照组相比，转染阴性对照的CNE1细胞中E-cadherin、N-cadherin、Vimentin蛋白表达量差异无统计学意义，但敲低COL1A1的表达量增加E-cadherin蛋白水平、降低N-cadherin、Vimentin蛋白水平，差异有统计学意义（$P<0.05$）。见表3，图3。

3 讨论

肿瘤组织的形成过程是癌基因以及抑癌基因相互调控的过程[9]。因此，探究肿瘤病理演进过程中的基因表达量变化对探究肿瘤发生发展机制具有重要的作用。COL1A1基因长约17 537 bp，位于人染色体17q21.33，包含51个外显子，编码Ⅰ型胶原纤维前体α2链，是细胞外基质的重要组成部分。研究发现，COL1A1在多种肿瘤组织中异常表达，参与肿瘤的发生发展。在乳腺癌中，COL1A1表达量异常，且与乳腺癌细胞增殖、迁移等过程有关，参与肿瘤的预后[10]。在宫颈癌中，COL1A1的表达量显著增加，敲低COL1A1的表达量可通过调节细胞的凋亡率进而影响其放疗敏感性，参与宫颈癌的放射治疗过程[11]。分析显示，COL1A1在肝癌中表达量明显异常，是肝癌病人



注：1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶；2—钙黏蛋白E；3—钙黏蛋白N；4—波形蛋白；5—对照组；6—阴性对照；7—敲低COL1A1。

图3 敲低COL1A1对CNE1细胞的影响：A为EMT相关蛋白水平的影响；B为迁移和侵袭的影响

表2 转染siRNA COL1A1对细胞中COL1A1表达量的影响及敲低COL1A1对CNE1细胞增殖的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	重复次数	COL1A1蛋白相对表达量	COL1A1 mRNA相对表达量	$A_{24\,h}$值	$A_{48\,h}$值	$A_{72\,h}$值
对照组	9	1.000±0.072	1.000±0.063	0.545±0.057	0.879±0.085	1.214±0.113
si-NC组	9	0.989±0.096	1.027±0.089	0.564±0.069	0.889±0.073	1.245±0.117
si-COL1A1组	9	0.245±0.232①	0.352±0.045①	0.536±0.059	0.665±0.067①	0.893±0.081①
F值		74.117	283.375	0.480	25.367	31.060
P值		0.000	0.000	0.625	0.000	0.000

注：COL1A1为COL1A1蛋白相对表达量，COL1A1 mRNA为COL1A1 mRNA相对表达量，si-NC为阴性对照，si-COL1A1为敲低COL1A1。①与对照组相比，$P<0.05$。

表3 敲低COL1A1对CNE1细胞迁移、侵袭及EMT相关蛋白水平的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	重复次数	迁移细胞数目	侵袭细胞数目	E-cadherin蛋白相对表达量	N-cadherin蛋白相对表达量	Vimentin蛋白相对表达量
对照组	9	232.158±25.325	123.541±14.589	1.000±0.073	1.000±0.066	1.000±0.079
si-NC组	9	215.387±23.016	115.323±12.487	0.992±0.084	0.998±0.092	1.027±0.095
si-COL1A1组	9	113.254±13.279①	52.895±5.635①	2.152±0.223①	0.362±0.045①	0.423±0.043①
F值		82.994	100.621	193.635	246.005	183.648
P值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注：si-NC为阴性对照，si-COL1A1为敲低COL1A1，E-cadherin为钙黏蛋白E，Vimentin为波形蛋白，N-cadherin为钙黏蛋白N。①与对照组相比，$P<0.05$。

预后的潜在靶基因[12]。另外,研究发现,COL1A1在前列腺癌[13]、喉癌[14]等多种肿瘤病理进展过程中发挥重要的调控作用。

为探究COL1A1在鼻咽癌中的调控作用,本研究通过qPCR检测发现,COL1A1在鼻咽癌细胞系C666-1、CNE1、CNE2中的表达量明显增加,表明COL1A1参与鼻咽癌的病理进程,其中在CNE1细胞中的表达量较高,因此作为后续研究对象。在Lipofectamine 2000介导下将siRNA COL1A1转染入CNE1细胞中,qPCR和Western blotting检测转染效果,结果显示,siRNA COL1A1显著降低CNE1细胞中COL1A1 mRNA和蛋白的表达量,表明siRNA COL1A1质粒可稳定下调COL1A1 的表达量。MTT和Transwell法检测敲低COL1A1对细胞增殖、侵袭、迁移的影响,结果显示,COL1A1表达量降低抑制CNE1细胞增殖,降低其侵袭、迁移能力,表明COL1A1可通过调节鼻咽癌细胞的生物学特性,进而调控其肿瘤组织的生长。

肿瘤细胞的侵袭、迁移特性受多种基因、信号通路的调控,与肿瘤病人的预后紧密相关。研究表明,肿瘤组织发生转移的过程不仅与基因水平相关,还与上皮细胞转变形成间质细胞有关[15-16]。在生理或病理状态下,EMT的形成过程主要与上皮性标志物(E-cadherin)、间质性标志物(Vimentin、N-cadherin)的水平显著相关,在肿瘤发生发展、细胞迁移过程中发挥重要作用[17-20]。为探究COL1A1调控CNE1细胞增殖、侵袭、迁移的作用机制,本实验通过Western blotting检测细胞中EMT相关蛋白的表达量,结果发现,敲低COL1A1的表达量促进E-cadherin蛋白表达,抑制Vimentin、N-cadherin蛋白表达,表明敲低COL1A1可通过抑制EMT过程,从而影响细胞的增殖、侵袭、迁移。

综上所述,COL1A1在鼻咽癌细胞中的表达量增加;敲低COL1A1表达量抑制鼻咽癌CNE1细胞增殖、侵袭、迁移,可能通过影响EMT过程。本实验只在鼻咽癌CNE1细胞中探究了COL1A1的作用以及可能分子机制,未来会在鼻咽癌多株细胞系以及动物、临床样本中进一步探究COL1A1参与鼻咽癌发生发展的具体作用以及与相关信号通路的调控作用。

参考文献

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2018[J]. Ca A Cancer Journal for Clinicians, 2018, 68(suppl 12): 277-300.

[2] CHEN W , ZHENG R , BAADE PD , et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(2):115-132.

[3] NAKANISHI Y, WAKISAKA N, KONDO S, et al. Progression of understanding for the role of Epstein-Barr virus and management of nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Metastasis Rev, 2017,36(3):435-447.

[4] 刘晓雪, 张志将, 宇传华. 中国居民1987—2015年鼻咽癌死亡趋势[J]. 中南大学学报(医学版), 2018, 43(7): 760-766.

[5] RIBASSIN-MAJED L, MARGUET S, LEE A, et al. What is the best treatment of locally advanced nasopharyngeal carcinoma? an individual patient data network meta-analysis[J]. J Clin Oncol, 2017,35(5):498-505.

[6] 陈洪, 陈婉清, 阙慧卿, 等. 鼻咽癌的治疗药物研究进展[J]. 现代药物与临床, 2017, 32(4):747-751.

[7] 余海浪, 刘安玲, 周珏宇, 等. 靶向COL1A1基因的shRNA对人乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖与凋亡的影响[J]. 中国病理生理杂志,2012,28(12):2182-2186.

[8] 李鹏, 马艳娇, 李建华, 等. COL1A1基因干扰对人结肠癌HCT-8细胞增殖的影响[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(4): 418-421.

[9] 邓洪新, 魏于全. 肿瘤基因治疗的研究现状和展望[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2015, 22(2):170-176.

[10] MENG C, HE Y, WEI Z, et al. MRTF-A mediates the activation of COL1A1 expression stimulated by multiple signaling pathways in human breast cancer cells[J]. Biomed Pharmacother, 2018,104: 718-728.

[11] LIU S, LIAO G, LI G. Regulatory effects of COL1A1 on apoptosis induced by radiation in cervical cancer cells[J]. Cancer Cell Int, 2017,17:73.

[12] HAYASHI M, NOMOTO S, HISHIDA M, et al. Identification of the collagen type 1 α 1 gene (COL1A1) as a candidate survival-related factor associated with hepatocellular carcinoma[J]. BMC Cancer, 2014,14:108.

[13] JEDINAK A, VUICHOUD C, EL-HAYEK A, et al. Mechanistic implications of COL1A1 as a prostate cancer biomarker[J]. 2017, 77(13 Suppl):711.

[14] 黄非, 王建洪, 毛贺娟, 等. miR-29 a-3 p调控COL1 A1参与喉癌Hep-2细胞增殖及凋亡过程研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2017, 16(19): 1911-1914.

[15] BRABLETZ T, KALLURI R, NIETO MA, et al. EMT in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2018,18(2):128-134.

[16] KREBS AM, MITSCHKE J, LASIERRA LOSADA M, et al. The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer[J]. Nat Cell Biol, 2017, 19(5): 518-529.

[17] HEERBOTH S, HOUSMAN G, LEARY M, et al. EMT and tumor metastasis[J]. Clin Transl Med, 2015,4:6.

[18] 肖磊, 黄昌浩, 袁伟杰, 等. 胃癌组织YAP1, E-cadherin, N-cadherin表达及临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2018, 27(4): 442-448.

[19] 苑锋, 易立, 李涛. 胶质母细胞瘤中上皮-间质样转化机制研究进展[J]. 中国肿瘤临床,2018,45(12):643-647.

[20] YAMASHITA N, TOKUNAGA E, IIMORI M, et al. Epithelial paradox: clinical significance of coexpression of e-cadherin and vimentin with regard to invasion and metastasis of breast cancer[J/OL]. Clin Breast Cancer, 2018, 18(5): e1003-e1009. DOI: 10.1016/j.clbc.2018.02.002.

(收稿日期:2019-10-22,修回日期:2019-12-10)