

Biglycan 及 VEGF 对结肠癌细胞增殖、凋亡能力的影响及分子机制

邢晓静,谷小虎,马天飞

(辽宁省肿瘤医院,辽宁 沈阳 110042)

摘要:[目的] 观察 Biglycan 及 VEGF 对结肠癌细胞系 HCT116 增殖、凋亡的影响并探讨其可能机制。[方法] 向转染 Biglycan 的细胞系 HCT116 中转染 VEGF siRNA, 设对照组(Mock)、空载和干扰对照组(Vector+siRNA-NC)、Biglycan cDNA 和干扰对照组(Biglycan+siRNA-NC) 及 Biglycan cDNA 和 VEGF 干扰组 (Biglycan+siRNA-VEGF)。Western Blot 检测 Biglycan、VEGF 及 Ki67、PCNA、P21 的表达;MTT 检测细胞增殖情况;流式细胞术检测细胞凋亡及周期。[结果] 过表达 Biglycan 后,Ki67、PCNA 和 VEGF 显著上调,P21 显著下调。干扰 VEGF 后,上述 3 种周期蛋白的表达正好相反;Biglycan 上调后,细胞增殖能力显著提高,下调 VEGF 后增殖能力又显著降低 ($P<0.05$);Biglycan 过表达后 S 期细胞总数 ($44.39\% \pm 1.80\%$) 较 Mock 组 ($31.41\% \pm 1.81\%$) 和 Vector+siRNA-NC 组 ($32.56\% \pm 1.07\%$) 显著提高 ($P<0.01$), 凋亡率 ($0.12\% \pm 0.01\%$) 较 Mock 组 ($1.75\% \pm 0.17\%$) 和 Vector+siRNA-NC 组 ($1.83\% \pm 0.16\%$) 显著下降 ($P<0.01$);下调 VEGF 后 S 期细胞 ($20.76\% \pm 1.23\%$) 显著降低 ($P<0.01$), 凋亡率 ($8.30\% \pm 0.71\%$) 显著上升 ($P<0.01$)。[结论] Biglycan 通过促进 VEGF 的表达来促进结肠癌细胞的增殖并抑制其凋亡。

关键词: Biglycan; VEGF; 结肠肿瘤; 增殖; 凋亡

中图分类号: R735.3⁵ **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)06-0471-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.06.B008

Effect of Biglycan and VEGF on Proliferation, Apoptosis of Colon Cancer Cells and Its Mechanism

XING Xiao-jing, GU Xiao-hu, MA Tian-fei

(Liaoning Tumor Hospital, Shenyang 110042, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of Biglycan and VEGF on proliferation, apoptosis of HCT116 cells in vitro and its possible mechanisms. [Methods] VEGF siRNA was transfected into HCT116 cells which had stably transfected with Biglycan. Control group (Mock), empty plasmid and non-specific interference plasmid control group (Vector+siRNA-NC), Biglycan cDNA and non-specific interference plasmid group (Biglycan+siRNA-NC), Biglycan cDNA and VEGF siRNA cotransfection group (Biglycan+siRNA-VEGF) were set. The expressions of Biglycan, VEGF and Ki67, PCNA, P21 were detected by Western Blot. The proliferations of cells were detected by MTT. The apoptosis was determined by AV/PI staining and the cell cycle was determined by PI staining. [Results] Western Blot showed that compared with the control group, overexpression Biglycan significantly up-regulated Ki67, PCNA, VEGF and down-regulated p21 ($P<0.05$). However, the expression of the three proliferation marker proteins were significantly opposed after reduction of VEGF ($P<0.05$). MTT showed that overexpression Biglycan significantly improved the proliferation ability and down-regulation of VEGF reduced this ability ($P<0.01$). Compared with Mock ($31.41\% \pm 1.81\%$) and Vector+siRNA-NC ($32.56\% \pm 1.07\%$), the number of cells in S phase ($44.39\% \pm 1.80\%$) significantly increased after overexpression Biglycan ($P<0.01$) and decreased ($20.76\% \pm 1.23\%$) after cotransfected with VEGF siRNA ($P<0.01$). Compared with Mock ($1.75\% \pm 0.17\%$) and Vector+siRNA-NC ($1.83\% \pm 0.16\%$), the apoptosis rate ($0.12\% \pm 0.01\%$) significantly decreased after overexpression biglycan ($P<0.01$) and increased after cotransfected with VEGF siRNA ($8.30\% \pm 0.71\%$) ($P<0.01$). [Conclusion] Biglycan promotes the proliferation and inhibit apoptosis of colon cancer cells by increasing the expression of VEGF.

Subject words: Biglycan; VEGF; colon neoplasms; proliferation; apoptosis

结肠癌是全球常见的恶性肿瘤,致死率在恶性

肿瘤中位居第 4 位,在我国发病率也呈现逐渐上升的趋势^[1,2]。Biglycan 是一种细胞外基质蛋白,近来许多研究报道表明 Biglycan 基因可在多种肿瘤组织中高表达,例如肝癌、卵巢癌、牙源性腺样癌,并且与肿

基金项目: 辽宁省科技攻关项目(2012225016);辽宁省自然科学基金(201102111);国家自然科学基金(81201968)

通讯作者: 邢晓静,博士;辽宁省肿瘤医院肿瘤防治办公室,辽宁省沈阳市大东区小河沿路 44 号(110042);E-mail: drfeifei@126.com

收稿日期: 2014-01-24; **修回日期:** 2014-03-18

瘤的发生、发展密切相关^[3,4]。本实验室前期研究发现 Biglycan 在结肠癌中高表达,并且与肿瘤的低分化、淋巴结转移和远处转移呈正相关^[5]。而淋巴结转移和血行转移是肿瘤的主要转移途径,新生血管的形成又是肿瘤血行转移的基础。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是重要的促血管形成因子,在血管形成过程中发挥重要作用。所以我们推测 Biglycan 与 VEGF 在结肠癌的发生、发展中共同发挥了重要作用。为证明该推测并明确其机制本实验将在结肠癌细胞系 HCT116 中共转染 Biglycan cDNA 和 VEGF siRNA,从增殖、凋亡的角度探讨 Biglycan 及 VEGF 对结肠癌细胞的影响及分子机制,以期对结肠癌的治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株与试剂

结肠癌细胞系 HCT116 购自上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所,VEGF siRNA 购于吉玛公司,转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司,细胞周期检测试剂盒及凋亡检测试剂盒购自南京凯基,Biglycan、VEGF、Ki67、PCNA、P21 抗体及山羊抗兔 IgG-HRP 购自万类生物科技有限公司;DMEM 培养基购自 Invitrogen 公司,其他试剂为国产分析纯。

1.2 细胞培养

将实验中各组细胞接种于含 10%胎牛血清、100U/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素的低糖 DMEM 培养液中,在 37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下培养。每 2~3d 更换一次培养液,待细胞生长至 80%~90%融合时进行传代。

1.3 实验分组和细胞转染

实验设置未转染对照组(Mock)、空载质粒和非特异性干扰对照组(Vector+siRNA-NC)、Biglycan cDNA 和非特异性干扰转染组(Biglycan+siRNA-NC)以及 Biglycan cDNA 和 VEGF siRNA 共转染组(Biglycan+siRNA-VEGF)。实验室前期已经构建完成 Biglycan 稳定转染 HCT116 细胞系。VEGF siRNA 由吉玛公司设计并合成,反义链:5'-AAAGUAGUGCUUCAC-CACUUC-3',正义链:5'-UCAUCACGAAGUGGU-GAAGAA-3',阴性对照由该公司提供。转染前 24h,

将对数生长期细胞用 0.25%胰蛋白酶消化成单细胞悬液,并接种至 6 孔培养板,之后按 Lipofectamine 2000 说明书操作将 siRNA-NC 及 siRNA-VEGF 按实验分组转染到对应细胞。干扰片段转染量为 160pmol/孔。

1.4 Western Blot 检测

转染后 48h 用 RIPA 裂解液作用于细胞,提取总蛋白质,BCA 法测定蛋白质浓度。取 40μg 总蛋白经 10%分离胶、5%浓缩胶的聚丙烯酰胺凝胶电泳后,电转移至 PVDF 膜。用含 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭 1h,分别加入含 Biglycan、VEGF、Ki67、PCNA、P21 的一抗封闭液,4℃孵育过夜。室温孵育二抗 1h 后,将膜与 ECL 发光液静置反应 5min,转入暗盒中,在暗室进行曝光。

1.5 MTT 检测细胞增殖情况

按照上述分组及转染方法,于 96 孔板中对细胞进行转染。分别于转染并培养 24、48、72、96h 后,向每孔加入 5mg/ml MTT 20μl,每组 5 个平行,置 37℃培养箱中孵育 4h。小心吸去上清,加入 200μl DMSO 以溶解细胞形成的结晶,在酶标仪上测定其在 490nm 处 OD 值,进行数据分析。

1.6 AV/PI 检测细胞凋亡情况

各组细胞转染并培养 48h 后分别收集 3×10⁶ 个细胞,悬于 500μl Binding Buffer 中。加入 5μl Annexin V-FITC,避光室温反应 15min,加入 5μl Propidium Iodide,混匀,室温避光孵育 10min,随即进行流式检测。

1.7 PI 流式检测细胞周期

各组细胞转染并培养 48h 后收集细胞,800rpm 离心 5min,吸弃上清,加入预冷的 70%乙醇,于 4℃固定 2h。离心弃去固定液后,加入 500μl 染色缓冲液重悬细胞。加入 25μl 碘化丙啶染色液及 10μl RNase A,混匀。37℃避光孵育 30min,随即进行流式检测。

1.8 统计学处理

所有数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间采用 *t* 检验分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Biglycan、VEGF 以及细胞增殖相关蛋白 Ki67、PCNA、P21 的表达

Western Blot 检测 Biglycan、VEGF、Ki67、PCNA、

P21 的表达, Gelpro4.0 软件对结果进行灰度分析, 经 β -actin 校正后, 结果显示, Biglycan+siRNA-NC 组 Biglycan、VEGF、Ki67、PCNA 蛋白的表达均高于 Mock 组及 Vector+siRNA-NC 组, 具有显著差异 ($P<0.01$), 而 P21 的表达则显著降低 ($P<0.01$); Biglycan+siRNA-VEGF 组 Biglycan 高表达, VEGF、Ki67、PCNA 低于 Biglycan+siRNA-NC 组, P21 的表达反而升高, 各组差异比较均具有统计学意义 ($P<0.01$) (Figure 1, 2)。

2.2 细胞增殖能力

MTT 法检测细胞增殖能力结果显示, 检测时间点 24、48、72、96h 的结果均显示 Biglycan+siRNA-NC 组细胞增殖能力显著高于 Mock 组及 Vector+siRNA-NC 组 ($P<0.05$), Biglycan+siRNA-VEGF 组细胞增殖能力显著低于 Biglycan+siRNA-NC 组 ($P<0.01$),

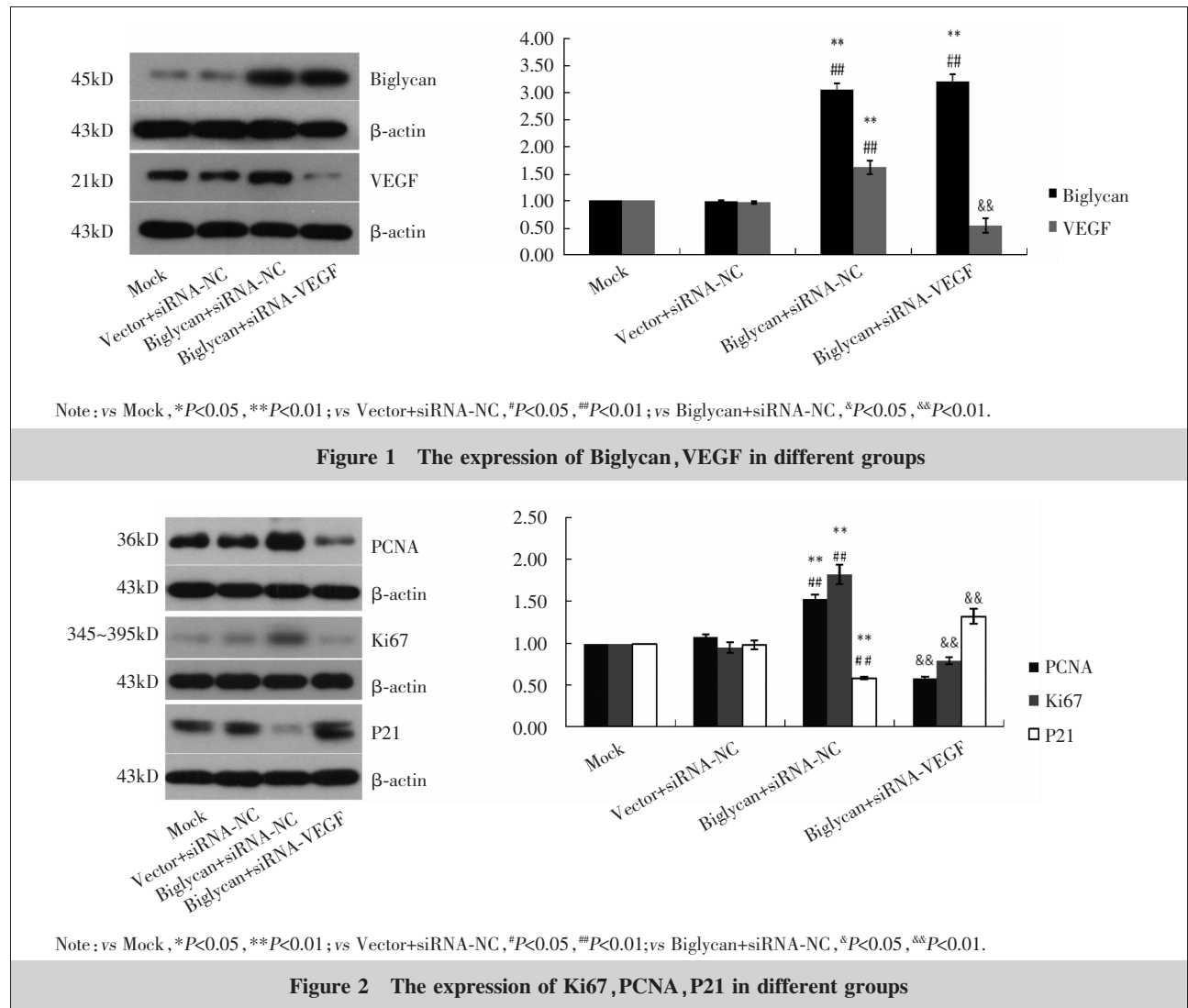
Mock 组及 Vector+siRNA-NC 细胞增殖能力无显著差异 ($P>0.05$) (Figure 3)。

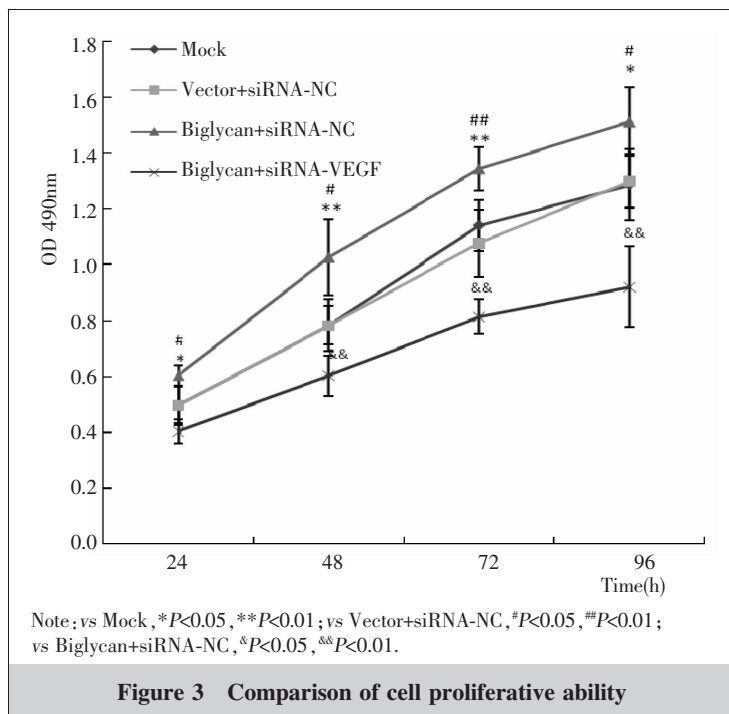
2.3 细胞凋亡情况

AV/PI 检测细胞凋亡情况结果显示, Biglycan+siRNA-NC 组细胞凋亡率为 $0.12\% \pm 0.01\%$, 低于 Mock 组 ($1.75\% \pm 0.17\%$) 和 Vector+siRNA-NC 组 ($1.83\% \pm 0.16\%$), 结果具有统计学差异 ($P<0.01$)。而 Biglycan+siRNA-VEGF 组凋亡率 ($8.30\% \pm 0.71\%$) 显著高于 Biglycan+siRNA-NC 组 ($P<0.01$) (Figure 4)。

2.4 细胞周期

以 S 期细胞所占比例反应细胞的增殖情况。Biglycan+siRNA-NC 组 S 期细胞所占比例为 $44.39\% \pm 1.80\%$, 显著高于 Mock 组 ($31.41\% \pm 1.81\%$) 和 Vector+siRNA-NC 组 ($32.56\% \pm 1.07\%$) ($P<0.01$)。Biglycan+siRNA-VEGF 组 S 期所占细胞比例 ($20.76\% \pm$

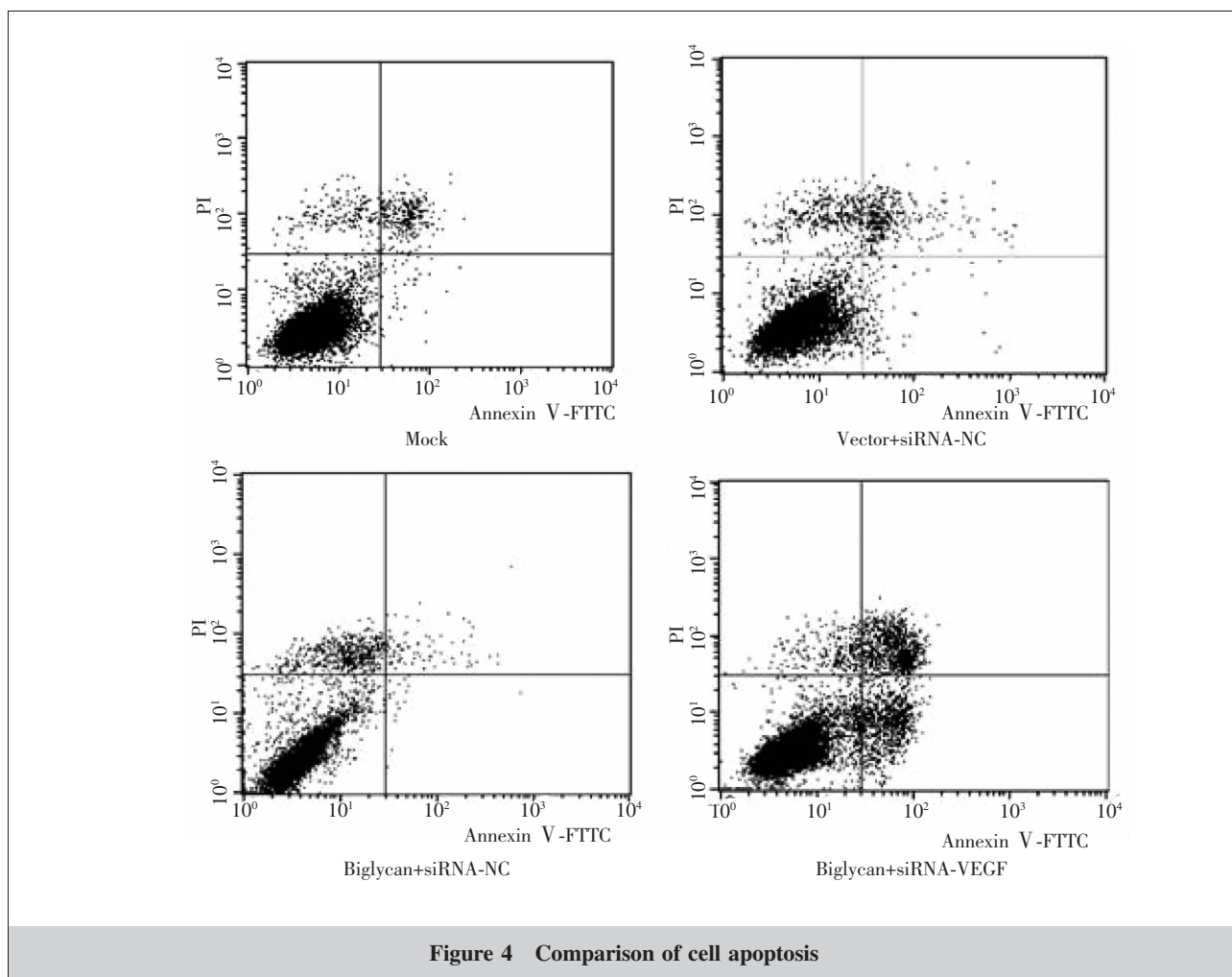




1.23%), 显著低于 Biglycan+siRNA-NC 组 ($P < 0.01$) (Figure 5)。

3 讨论

Biglycan 是一种重要的细胞外基质组成成分,是 SLRP (small leucine-rich proteoglycan) 家族成员之一。它可以和转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、胶原分子以及其他基质因子相结合^[6],参与细胞外基质的聚集、细胞迁移与细胞粘附。研究显示 Biglycan 可通过 ERK 和 p38 途径来影响成骨细胞分化和参与炎症反应过程,同时 ERK 信号通路与细胞的增殖、分化、血管形成和肿瘤侵袭调控联系紧密, P38 通路参与了细胞受到紫外线等刺激后引起的细胞凋亡过程^[7]。Biglycan 能促



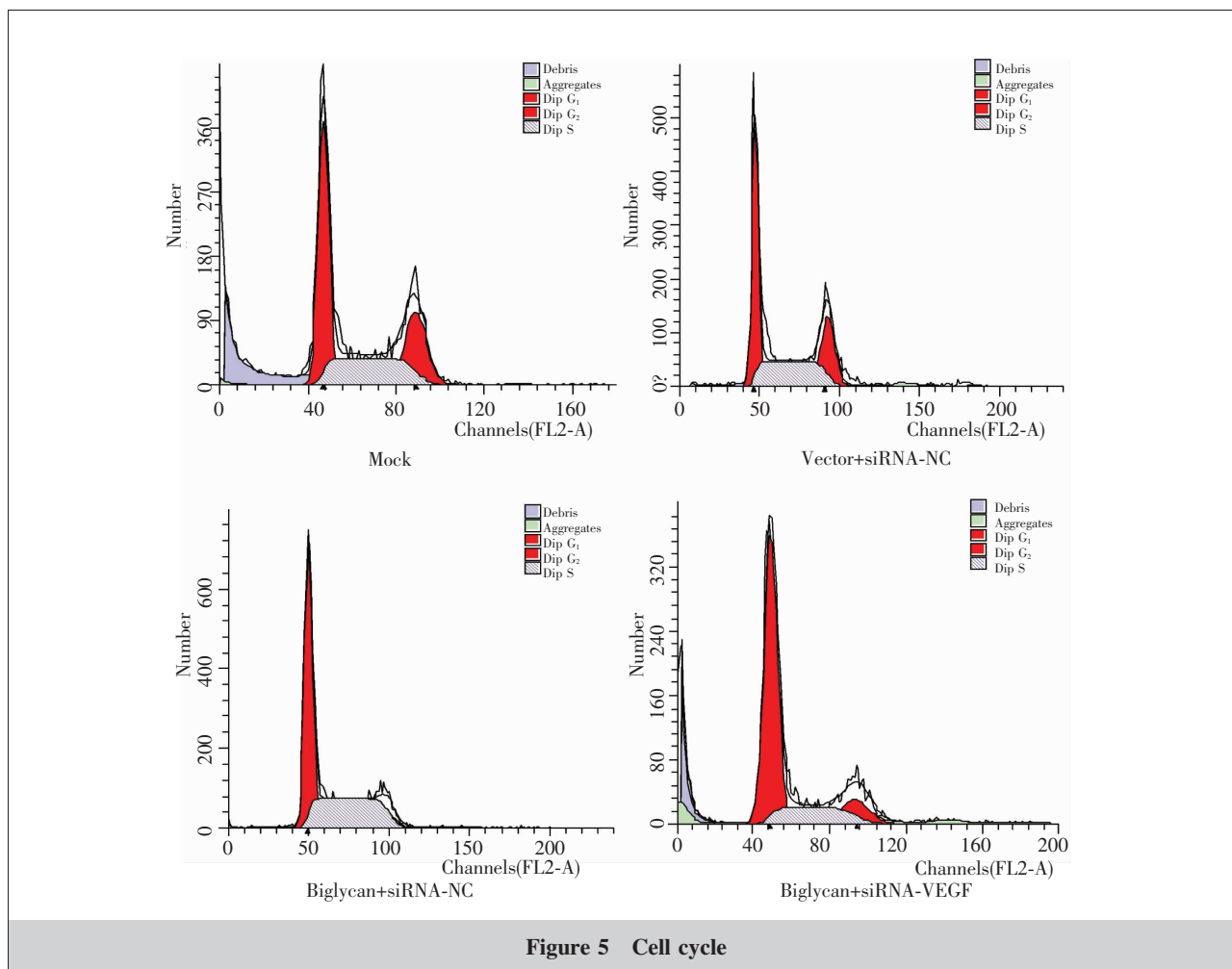


Figure 5 Cell cycle

进血管平滑肌细胞的迁移增殖并抑制其凋亡^[8],能通过降低 caspase-3 的活性来抑制肾小球系膜细胞的凋亡并促进其生长^[9]。而近年的研究表明 Biglycan 与肿瘤的发生、发展有着重要的关系,已经成为多种肿瘤的标志物^[10,11]。Biglycan 高表达的肿瘤血管内皮细胞比 Biglycan 低表达的正常组织血管内皮细胞增殖得更快^[12],可见 Biglycan 在肿瘤的增殖、血行转移方面发挥重要作用。VEGF 在许多恶性肿瘤组织中高水平表达,并且与微血管密度(MVD)相关,其在诱导和调节肿瘤血管形成中起有关键性作用^[13],所以 Biglycan 很可能与 VEGF 共同促进肿瘤的发展,但其机制尚不明确。本研究 MTT 实验显示仅表达 Biglycan 时,结肠癌细胞的增殖能力明显增强,而在此基础上干扰 VEGF 后,细胞的增殖能力却明显下降。这与其他研究中显示的 Biglycan 具有促进肿瘤细胞增殖作用结果一致。凋亡检测结果显示过表达 Biglycan 时,细胞的凋亡水平下降,而 VEGF 下调后

显著增加了细胞的凋亡率。

进一步从分子水平探讨 Biglycan 的促进增殖机制:PCNA 是一个只在 G₁ 期末和 S 期表达的细胞增殖标志物,直接参与 DNA 的合成。Ki-67 抗原也是一种与细胞增殖相关的核蛋白,进行核分裂的细胞会高水平表达该蛋白。P21 是细胞周期抑制因子,具有 GTP 酶的活性,P21 蛋白的活性下降时会导致细胞过度增殖^[14]。本研究结果显示在结肠癌细胞中当 Biglycan 表达量升高时,PCNA 和 Ki-67 水平均升高,而 P21 水平则下降,说明 Biglycan 的过表达促进了细胞的增殖;而在过表达 Biglycan 的同时下调表达 VEGF 后,PCNA 和 Ki-67 表达量下降,P21 的表达反而上升。这表明 Biglycan 具有促进结肠癌细胞增殖、抑制其凋亡的作用,但是 VEGF 低水平表达时,即使 Biglycan 的表达量上升它也不能发挥这些作用。所以,Biglycan 是通过促进 VEGF 的表达来促进结肠癌细胞的增殖并抑制其凋亡,下调结肠癌中 VEGF

的表达可逆转 Biglycan 在结肠癌中所发挥的这些作用。

参考文献:

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2007 [J]. CA Cancer J Clin, 2007, 57(1): 43-66.
- [2] Nishino R, Honda M, Yamashita T, et al. Identification of novel candidate tumour marker genes for intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. J Hepatol, 2008, 49(2): 207-216.
- [3] Pan S, Cheng L, White JT, et al. Quantitative proteomics analysis integrated with microarray data reveals that extracellular matrix proteins, catenins, and p53 binding protein 1 are important for chemotherapy response in ovarian cancers [J]. OMICS, 2009, 13(4): 345-354.
- [4] Modolo F, Biz MT, Martins MT, et al. Expression of extracellular matrix proteins in adenomatoid odontogenic tumor [J]. J Oral Pathol Med, 2010, 39(3): 230-235.
- [5] Gu X, Ma Y, Xiao J, et al. Up-regulated biglycan expression correlates with the malignancy in human colorectal cancers [J]. Clin Exp Med, 2012, 12(3): 195-199.
- [6] Hocking AM, Shinomura T, McQuillan DJ. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix [J]. Matrix Biol, 1998, 17(1): 1-19.
- [7] Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death [J]. Nat Cell Biol, 2002, 4(5): e131-e136.
- [8] Shimizu-Hirota R, Sasamura H, Kuroda M, et al. Extracellular matrix glycoprotein biglycan enhances vascular smooth muscle cell proliferation and migration [J]. Circ Res, 2004, 94(8): 1067-1074.
- [9] Schaefer L, Beck KF, Raslik I. Biglycan, a nitric oxide-regulated gene, affects adhesion, growth, and survival of mesangial cells [J]. J Biol Chem, 2003, 278(28): 26227-26237.
- [10] Bischof AG, Yüksel D, Mammoto T, et al. Breast cancer normalization induced by embryonic mesenchyme is mediated by extracellular matrix biglycan [J]. Integr Biol, 2013, 5(8): 1045-1056.
- [11] Zhu YH, Yang F, Zhang SS, et al. High expression of biglycan is associated with poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(11): 2497-2505.
- [12] Matsuda K, Ohga N, Hida Y, et al. Isolated tumor endothelial cells maintain specific character during long-term culture [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(4): 947-954.
- [13] Zhou RH, Yao M, Lee TS, et al. Vascular endothelial growth factor activation of sterol regulatory element binding protein: a potential role in angiogenesis [J]. Circ Res, 2004, 95(5): 471-478.
- [14] Korgun ET, Celik-Ozenci L, Acar N, et al. Location of cell cycle regulators cyclin B1, cyclin A, PCNA, Ki67 and cell cycle inhibitors p21, p27 and p57 in human first trimester placenta and deciduas [J]. Histochem Cell Biol, 2006, 125(6): 615-624.

《胸部肿瘤放射治疗策略》出版启事

由毛伟敏教授和许亚萍教授组织浙江省肿瘤医院/浙江省胸部肿瘤研究指导中心的中青年骨干编写的《胸部肿瘤放射治疗策略》，是一本系统介绍胸部恶性肿瘤诊断以及放射治疗规范和进展的学术专著。

全书内容主要针对临床一线的放射治疗工作者，以循证医学为基础，并结合目前国内外的临床指南，重点介绍了肺癌、食管癌、乳腺癌等常见胸部恶性肿瘤近年来的放射治疗新技术、新进展，放射治疗与化疗、靶向治疗、内分泌治疗、手术治疗等手段的联合应用，并对肿瘤的疗效评价、放射治疗并发症的处理作了较为详细的阐述。大量引用了近年来国内外的最新资料，并参考了美国国立综合癌症网络(NCCN)发布的2013指南中的诊治规范。

体现综合治疗的原则是该书的另一特点。在胸部恶性肿瘤中有较多争议的部分，如局部晚期非小细胞肺癌的多学科综合治疗，由多个科室的专家联合执笔，以两个章节的篇幅详细阐述；在以手术为基础的食管癌多学科综合治疗部分，全面地讨论了手术与术前新辅助放化疗联合以及术后辅助放化疗联合的意义。

该书由中国抗癌协会副理事长、山东省肿瘤医院院长、中国工程院院士于金明教授作序，由美国 Georgia Regents University 的 Feng-Ming (Spring) Kong 教授和浙江省肿瘤医院陈明教授担任主审，由军事医学科学出版社出版发行。