

# TGF- $\beta$ 1/Smad7 信号通路在哈萨克族食管癌上皮间质转化中的作用

高向朋<sup>1</sup>, 刘清<sup>2</sup>, 刘涛<sup>2</sup>, 郑树涛<sup>2</sup>, 杨晨晨<sup>1</sup>, 鲁芒<sup>1</sup>, 戴芳<sup>1</sup>, 林仁勇<sup>2</sup>, 卢晓梅<sup>2</sup>  
(新疆医科大学 1. 基础医学院, 新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐 830011; 2. 临床医学研究院, 新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐 830054)

**摘要:**【目的】探讨 TGF- $\beta$ 1/Smad7 信号通路在哈萨克族食管鳞癌上皮间质转化(EMT)中的作用及其机制。【方法】运用免疫组织化学方法检测 50 例哈萨克族食管鳞癌组织及远端对应癌旁组织中 TGF- $\beta$ 1 与 Smad7 蛋白的表达。进一步在细胞水平, 针对食管鳞癌细胞系 Ec9706, 基于 RNA 干扰技术, 使用 Lipofectamine™2000 试剂转染 TGF- $\beta$ 1 siRNA。采用 qRT-PCR 技术检测 TGF- $\beta$ 1 及 Smad7 mRNA 表达水平; Western blot 技术检测转染后各组 TGF- $\beta$ 1、Smad7 以及 EMT 相关蛋白表达水平; MTT、划痕及流式细胞术等方法检测各组细胞转染后的增殖、迁移、凋亡及周期的变化。【结果】免疫组化检测结果显示, 哈萨克族食管鳞癌组织中 TGF- $\beta$ 1 蛋白表达明显高于癌旁组织( $P < 0.05$ ); Smad7 蛋白在食管鳞癌组织中的表达低于癌旁组织( $P < 0.05$ )。转染 TGF- $\beta$ 1 siRNA 后, Ec9706 细胞中 TGF- $\beta$ 1 mRNA 和蛋白表达量均降低, Smad7 mRNA 和蛋白表达量增加; 上皮标志物 E-cadherin 表达量增加, 间质标志物 Vimentin 表达量降低, 同时 Ec9706 细胞增殖、迁移受到抑制, 细胞凋亡增加, 细胞周期发生 G0/G1 期阻滞。【结论】哈萨克族食管鳞癌中存在 TGF- $\beta$ 1/Smad7 信号通路的激活, 食管癌中 TGF- $\beta$ 1 高表达, 抑制了 Smad7 的表达, 从而促进了上皮间质转化过程, 进一步促进了食管癌细胞的增殖和迁移, 并抑制细胞凋亡, 影响细胞周期中的 G0/G1 期。

**关键词:** 食管鳞癌; TGF- $\beta$ 1; Smad7; RNA 干扰; 上皮间质转化

**中图分类号:** R      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2015)01-0078-10

## Activation of TGF- $\beta$ 1/Smad7 Signaling in Kazakh's ESCC through Epithelial-Mesenchymal Transition

GAO Xiang-peng<sup>1</sup>, LIU Qing<sup>2</sup>, LIU Tao<sup>2</sup>, ZHENG Shu-tao<sup>2</sup>, YANG Chen-chen<sup>1</sup>, LU Mang<sup>1</sup>, Dai Fang<sup>1</sup>,  
LIN Ren-yong<sup>2</sup>, LU Xiao-mei<sup>2\*</sup>

(1. Basic Medicine School of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Clinical Medical Research Institute, Urumqi, Xinjiang 830054, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the effects and mechanism of TGF- $\beta$ 1/Smad7 signaling pathway in Kazakh's esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) through epithelial-mesenchymal transition (EMT). 【Methods】 Expression of TGF- $\beta$ 1 and Smad7 protein in carcinoma tissues and adjacent normal tissues of 50 Kazakh's ESCC patients was detected by immunohistochemistry (IHC). Based on RNA interference technology, Ec9706 cell was transfected with TGF- $\beta$ 1 siRNA, using Lipofectamine™2000. The mRNA expression level of TGF- $\beta$ 1 and Smad7 were detected by qRT-PCR. Expression of TGF- $\beta$ 1, Smad7 and EMT-associated proteins were measured by Western blot after transfection. Then MTT, Wound-healing assay and flow cytometry were performed to detect cell's proliferation, migration, apoptosis and cell cycle after transfection. 【Results】 The positive rate of TGF- $\beta$ 1 expression in carcinoma tissues of patients with ESCC was significantly higher than non-cancerous adjacent tissue ( $P < 0.05$ ), while the positive expression

收稿日期: 2014-10-21

基金项目: 国家自然科学基金(81160303, 81260359, 81201891, U1303321); 新疆医学动物模型研究重点实验室开放课题(XJDX1103-2013-08); 新疆医科大学第一附属医院科研奖励基金(2011YFY17, 2012YFY15, 2012YFY16, 2012YFY31, 2012QN01)

作者简介: 高向朋, 硕士研究生, 研究方向为肿瘤转移的分子病理学, E-mail: g.olden\_sky@163.com, 联系电话: 15009015226; \* 通信作者: 卢晓梅, E-mail: luxiaomei88@163.com

rates of Smad7 in ESCC tissues was significantly lower than the non-cancerous adjacent tissues ( $P < 0.05$ ). After transfected with TGF- $\beta$ 1 siRNA, expression of TGF- $\beta$ 1 and Vimentin were significantly decreased, meanwhile, expression of Smad7 and E-cadherin were increased. Furthermore, transfected with TGF- $\beta$ 1 siRNA inhibited cell proliferation, migration and promoted cell apoptosis. 【Conclusion】 TGF- $\beta$ 1/Smad7 signaling activated in Kazakh's ESCC. TGF- $\beta$ 1 could promote EMT through inhibition of Smad7, consequently promote cell proliferation and migration, influence cell cycle at G0/G1 phase and inhibit the apoptosis of ESCC.

**Key words:** ESCC; TGF- $\beta$ 1; Smad7; RNAi; EMT

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2015, 36(1): 78-87

食管癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,在中国 90%以上的食管癌为鳞状细胞癌 (ESCC)<sup>[1]</sup>。新疆是食管癌高发区之一,13 个世居民族中哈萨克族人群发病率最高,为 90.75/10 万,远高于全国平均水平的 14.95/10 万<sup>[2]</sup>,导致食管癌病人死亡的主要原因是由于癌的浸润转移<sup>[3]</sup>。上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)最早发现于发育生态学<sup>[4]</sup>,于 1982 年由 Garry Greenburg 和 Elisabeth Hay 正式提出其概念<sup>[5]</sup>,它以上皮细胞极性的丧失及间质特性的获得为主要特征,并且与肿瘤的原位侵袭和远处转移有着密切的关系,在肿瘤的浸润转移中起着关键作用<sup>[6]</sup>。EMT 是个极其复杂的动态过程,涉及多个信号途径,如 TGF- $\beta$ 、Wnt、非 Wnt 等,其中 TGF- $\beta$  介导的 Smad 信号通路在 EMT 促进肿瘤的浸润转移中起着重要作用<sup>[7]</sup>。抑制性 Smad 信号通路 TGF- $\beta$ 1/Smad7 介导的 EMT 能够抑制多种肿瘤的浸润转移。Shimul<sup>[8]</sup>等报道,Smad7 作为 TGF- $\beta$  信号通路的关键性负调控因子,当表达量高时可以抑制乳腺癌的浸润转移,起抑癌基因的作用。关于 TGF- $\beta$ 1/Smad7 在各肿瘤尤其是哈萨克族食管鳞癌 EMT 中所起的作用鲜见报道。因此,探讨 Smad7 在哈萨克族食管鳞癌 EMT 发生发展过程中的作用及可能的机制,进一步揭示食管鳞癌浸润转移的分子调控机制具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

细胞系:食管鳞癌细胞系 Ec9706 购自武汉大学细胞保藏中心。组织标本:收集新疆医科大学第一附属医院胸外科 2003 年 3 月至 2010 年 11 月经手术切除的哈萨克族食管鳞癌患者 50 例,其中男 38 例,女 12 例,年龄为 38~74 岁,平均为 (58.6 $\pm$ 8.6)岁。选取患者食管鳞癌组织及距肿瘤

组织边缘  $\geq 5$  cm 处的癌旁组织的石蜡包埋样本,所有样本均经 HE 染色确诊为鳞状细胞癌。所有患者术前均未经放疗和化疗,均签署知情同意书,并且通过医院伦理委员会审核批准。

### 1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学 (Immunohistochemistry, IHC) 检测组织水平 TGF- $\beta$ 1 和 Smad7 蛋白的表达 采用免疫组织化学检测 50 对哈萨克族食管鳞癌组织及癌旁组织中的 TGF- $\beta$ 1 及 Smad7 的表达。免疫组织化学染色方法按说明书进行,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。TGF- $\beta$ 1 和 Smad7 工作液浓度分别为 1:100 和 1:50。每张切片随机选取 5 个高倍视野,按阳性细胞数占同类细胞的百分比进行分类,阳性细胞数  $\geq 10\%$  定义为阳性,  $< 10\%$  定义为阴性。

1.2.2 细胞培养 食管鳞癌细胞系 Ec9706 用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液在 37 $^{\circ}$ C 体积分数 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。用 0.25%胰蛋白酶消化液消化处于对数生长期的细胞。

1.2.3 TGF- $\beta$ 1 siRNA 转染 Ec9706 细胞 将细胞按  $3 \times 10^5$  个每孔接种于 6 孔板,每孔 2 mL 细胞悬液,分为 3 组:实验组(转染 TGF- $\beta$ 1 siRNA)、阴性对照组(转染随机序列)、空白对照组,每组设 3 个复孔。当细胞生长达到 80%~90%融合面积时,按照说明书分别给予转染 TGF- $\beta$ 1 siRNA<sup>[9]</sup> (正义链:5'-gcaacaauuccuggcgau-3'; 反义链:5'-uauccgaggaauuguugc-3')、转染随机序列(正义链:5'-uucuccgaacgugucagutt-3'; 反义链:5'-acgugacagguccgagaatt-3')、不予转染等处理,并继续置于 37 $^{\circ}$ C,体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。转染序列均由上海吉玛生物制药技术有限公司合成。

1.2.4 实时荧光定量聚合酶链反应 (Real-time fluorescent quantitative PCR, qRT-PCR) 检测 TGF- $\beta$ 1 siRNA 转染后 TGF- $\beta$ 1 及 Smad7 mRNA 的表达 将转染后 48 h 的 3 组细胞分别收集到相应的

EP管中,提取 RNA 并分装置于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存备用。然后按试剂盒说明逆转录合成 cDNA,再以获得的 cDNA 为模板,TGF- $\beta$ 1、Smad7 和  $\beta$ -actin 分别为引物进行 qRT-PCR。TGF- $\beta$ 1 引物序列(5'-3')F-CAGATCCTGTCCAAGCTA,R-CCTTGGCGTAGTAGT CG;Smad7 引物序列(5'-3')F-TGCAACCCCAATCACCTTAG,R-GACAGTTTGCAGTTGGTTGAGT; $\beta$ -actin 引物序列(5'-3')F-TGGCACCCAGACAATGAG,R-CTAAGTCATAGTCCGCTAG。应参数如下:1、TGF- $\beta$ 1: $95^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, $95^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, $58^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s;2、Smad7: $95^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, $95^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, $57^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s;3、 $\beta$ -actin: $95^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, $95^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, $55^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s;反应 40 个循环,荧光检测,并绘制溶解曲线。采用标准曲线法进行相对定量,比较三组 TGF- $\beta$ 1 和 Smad7 mRNA 表达差异,每组实验重复 3 次。

**1.2.5 Western blot 检测 TGF- $\beta$ 1 siRNA 转染后 TGF- $\beta$ 1、Smad7 及 EMT 相关蛋白在 Ec9706 细胞中的表达** 将转染后 72 h 的 3 组细胞分别收集到相应的 EP 管中,提取蛋白并分装置于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存备用。BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳并转膜后,用事先配好的封闭液室温封闭 1 h。加入 TGF- $\beta$ 1 抗体(Santa Cruz)、Smad7 抗体(Santa Cruz)、E-cadherin 抗体(CST)、Vimentin 抗体(CST)及 GAPDH 抗体(Santa Cruz)。室温孵育 1 h,转至 $4^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜。抗体洗液洗膜后,加入二抗,室温避光孵育 2 h,DAB 显色。将 PVDF 膜上的条带利用凝胶成像处理系统进行灰度扫描。用目的蛋白对内参 GAPDH 蛋白的表达进行半定量分析。每组实验重复 3 次。

**1.2.6 MTT 实验检测 TGF- $\beta$ 1 siRNA 转染后细胞增殖能力** 将处于对数生长期的细胞按 $2 \times 10^3$ 个每孔接种于 96 孔板,每孔 200  $\mu\text{L}$  细胞悬液,分为 3 组:实验组、阴性对照组、空白对照组,每组设 4 个复孔。分别于转染后 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h,加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20  $\mu\text{L}$ ,置于 $37^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养箱 4 h,弃去上清液,加入 150  $\mu\text{L}$  的 DMSO(二甲基亚砷),充分震荡后,用酶标仪测其 490nm 处吸光度值。生长抑制率(%)=(1-D 实验组/D 对照组) $\times 100\%$ 。

**1.2.7 划痕实验检测 TGF- $\beta$ 1 siRNA 转染后细胞迁移能力** 转染后 0 h 用 10  $\mu\text{L}$  无菌枪头在每孔底部轻划一条直线,确保每条直线粗细均匀,力度

和角度一致。倒置显微镜下分别于 0 h、24 h、48 h、72 h 同一视野观察划痕宽度并拍照,以此观察不同组别细胞划痕的愈合速度。实验分组同前,每组设 3 个复孔,重复 3 次。

**1.2.8 流式细胞术检测 TGF- $\beta$ 1 siRNA 转染后细胞凋亡的改变** 转染后 48 h,将各组待测细胞经 2.5 g/L 胰酶消化、收集,PBS 洗涤 1-2 次,将收集的细胞中加入 $1 \times$  Binding buffer 重悬再分别加入 PI 和 Annexin V 染色,避光置于冰上,30 min 内上机检测。

**1.2.9 流式细胞术检测 TGF- $\beta$ 1 siRNA 转染对细胞周期的影响** 转染后 48 h,将各组待测细胞经 2.5 g/L 胰酶消化后收集,预冷的 PBS 洗涤并用 70%乙醇固定, $4^{\circ}\text{C}$ 过夜。待测前加入 RNaseA, $37^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,取出置于冰上,终止 RNaseA 的作用,加入 PI, $4^{\circ}\text{C}$ 避光 30 min,流式细胞仪检测 DNA-PI 的荧光强度。

### 1.3 统计学处理

所得数据用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组之间比较采用单因素方差分析,当分析涉及时间与处理措施两个因素时,采用两因素的方差分析;计数资料采用 McNemar 检验和卡方检验,等级资料用 Spearman 相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 免疫组织化学检测及临床病理学特征分析

本研究所用食管鳞癌及癌旁组织镜下病理学特征为:癌组织可见明显的鳞状细胞癌巢和角化珠(图 1,A),癌旁组织未见异型细胞(图 1,B)。TGF- $\beta$ 1 蛋白阳性表达为细胞质呈棕黄色着色(图 1,C、D)。TGF- $\beta$ 1 在食管癌组织中的阳性表达率为 82%(41/50),而在相对应的癌旁组织中的阳性表达率为 40%(20/50),两者比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,表 1)。Smad7 蛋白阳性表达为细胞质呈棕黄色着色(图 1,E、F),在食管癌组织中的阳性表达率为 2.0%(1/50),在相对应的癌旁组织中的阳性表达率为 52.0%(26/50),两者相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,表 1)。然而基于此样本,TGF- $\beta$ 1 和 Smad7 在食管癌组织中的表达与患者的肿瘤大体分型、浸润深度及预后等临床病理参

数间未见显著相关性(表 1)。

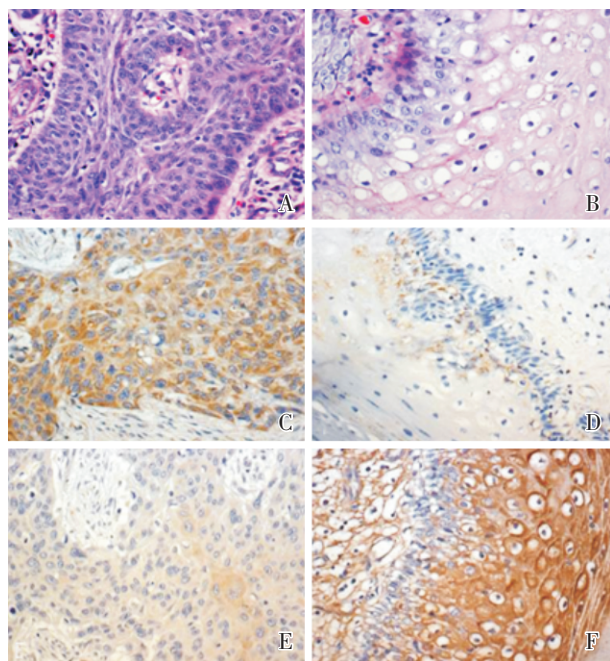


图 1 免疫组化检测食管鳞癌及癌旁组织中 TGF-β1、Smad7 的表达(放大倍数 × 400)

Fig.1 Detection of TGF-β1 and Smad7 expression in Kazakh's ESCC by IHC (magnification × 400)

All the samples of ESCC and non-cancerous adjacent tissue were confirmed by HE stain (A, ESCC tissue; B, non-cancerous adjacent tissue). Intensity of cytoplasmic staining was considered to present a positive stain for TGF-β1 (C, ESCC tissue; D, non-cancerous adjacent tissue) and Smad7 (E, ESCC tissue; F, non-cancerous adjacent tissue), respectively.

## 2.2 荧光检测 Ec9706 细胞转染 TGF-β1 siRNA 效果

将带有 FAM 标记的 TGF-β1 siRNA 转入 Ec9706 后,于荧光倒置显微镜下观察,可见绿色荧光在细胞内广泛表达,说明 TGF-β1 siRNA 转染成功(图 2)。

## 2.3 qRT-PCR 检测转染 TGF-β1 siRNA 后 Ec9706 细胞 TGF-β1 与 Smad7 mRNA 表达

转染 TGF-β1 siRNA 后 48 h 收集细胞并提取总 RNA,用 qRT-PCR 检测各组细胞 TGF-β1 及 Smad7 mRNA 表达量。结果显示:实验组 TGF-β1 mRNA 表达量( $2.45 \pm 0.14$ )显著低于阴性对照组( $5.73 \pm 0.16, P < 0.05$ )和空白对照组( $5.42 \pm 0.17, P < 0.05$ );实验组 Smad7 mRNA 表达量( $9.80 \pm 1.21$ )显著高于阴性对照组( $4.24 \pm 1.48, P < 0.05$ )和空白对照组( $4.64 \pm 1.32, P < 0.05$ ),图 3)。说明干扰 TGF-β1 能够显著升高 Smad7 蛋白的表达。

## 2.4 Western blot 检测转染 TGF-β1 siRNA 后 Ec9706 细胞中 TGF-β1、Smad7 及 EMT 相关蛋白的表达

转染 TGF-β1 siRNA 后 72 h 收集细胞并提取总蛋白,用 Western blot 检测各组细胞 TGF-β1、Smad7 及 E-cadherin 和 Vimentin 蛋白的表达。结果显示:实验组 TGF-β1 蛋白表达量( $0.43 \pm 0.05$ )显著低于阴性对照组( $1.76 \pm 0.09, P < 0.05$ )和空白对照组( $1.76 \pm 0.09, P < 0.05$ ),实验组 Smad7 蛋白表达量( $1.64 \pm 0.20$ )显著高于阴性对照组( $0.57 \pm 0.07, P < 0.05$ )和空白对照组( $0.59 \pm 0.17, P <$

表 1 TGF-β1 与 Smad7 蛋白在哈萨克族食管鳞癌中的表达及与临床病理特征的关系(%)

Table 1 The correlation between TGF-β1, Smad7 expression and clinicopathologic features in Kazakh's ESCC (%)

Clinicopathologic features	N	TGF-β1		P	Smad7		P
		Negative	Positive		Negative	Positive	
ESCC	50	9(18)	41(82)		49(98.0)	1(2.0)	
Non-cancerous tissue	50	30(60)	20(40)	0.000	24(48.0)	26(52.0)	0.000
Lymphatic metastasis							
Yes	17	2(11.8)	15(88.2)		17(100)	0(0)	
No	33	7(21.2)	26(78.8)	0.699	32(97.0)	1(3.0)	1.000
Depth of invasion							
Mucous	3	1(33.3)	2(66.7)		3(100)	0(0)	
Muscular	24	6(25.0)	18(75.0)	0.114	24(100)	0(0)	0.317
Serosa	23	2(8.7)	21(91.3)		22(95.7)	1(4.3)	
Differentiated degree							
High	27	3(11.1)	24(88.9)		26(96.3)	1(3.7)	
Moderately	18	5(27.8)	13(72.2)	0.285	18(100)	0(0)	0.402
Poor	5	1(20.0)	4(80.0)		5(100)	0(0)	

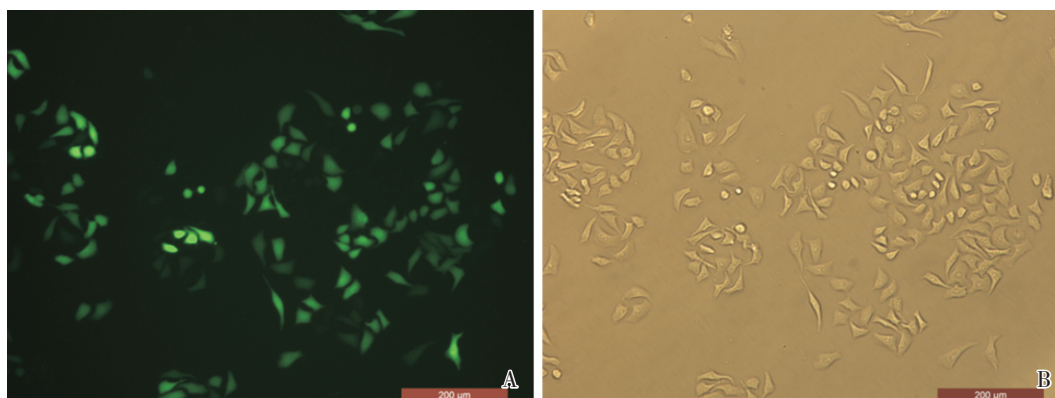


图 2 TGF-β1 siRNA 转染食管鳞癌 Ec9706 细胞 (放大倍数×100)

Fig.2 Transfection of TGF-β1 siRNA into ESCC cell line Ec9706 (Magnification×100)

Observation of Ec9706 cells transfected with TGF-β1 siRNA by Fluorescence microscopy (A) and Inverted microscope (B). siRNA for TGF-β1 was successfully transfected into Ec9706 cells.

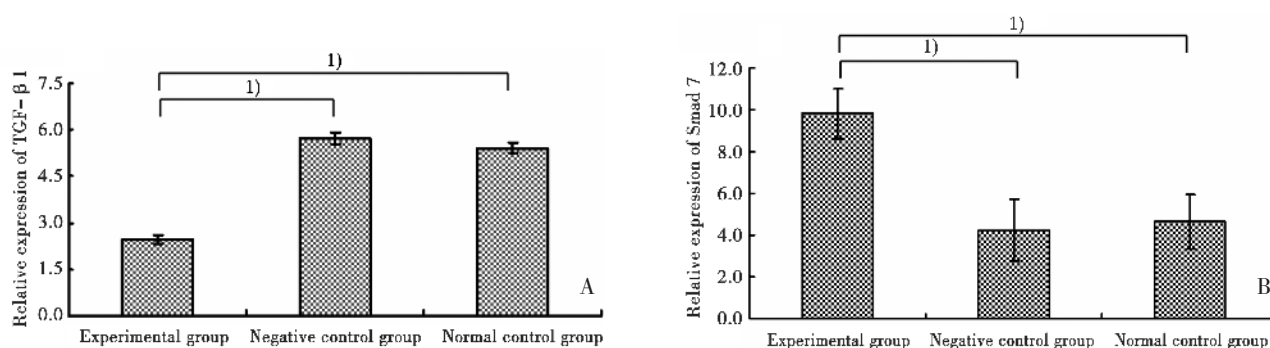


图 3 qRT-PCR 检测 TGF-β1 siRNA 转染 Ec9706 后 TGF-β1 及 Smad7 mRNA 相对表达量

Fig.3 Detection of TGF-β1 and Smad7 mRNA expression by qRT-PCR

A: TGF-β1 relative expression level; B: Smad7 relative expression level 1)  $P < 0.05$ ) Expression of TGF-β1 mRNA in Ec9706 cell was significantly down-regulated by TGF-β1 siRNA when compared with negative control group and normal control group. However, Smad7 was up-regulated when compared with negative control group and normal control group.

0.05);同时实验组 E-cadherin 蛋白表达量( $2.92 \pm 0.14$ )明显高于阴性对照组( $1.63 \pm 0.03, P < 0.05$ )和空白对照组 ( $1.72 \pm 0.03, P < 0.05$ ), 实验组 Vimentin 蛋白表达量( $1.66 \pm 0.07$ )显著低于阴性对照组( $2.95 \pm 0.07, P < 0.05$ )和空白对照组( $2.88 \pm 0.08, P < 0.05$ ,图 8)。说明干扰 TGF-β1 能够显著升高 Smad7 蛋白的表达,同时促进上皮标志物 E-cadherin 的表达,降低间质标志物 Vimentin 的表达。说明 TGF-β1 负调控 Smad7 的表达,该通路可能诱导食管鳞癌细胞发生 EMT。

### 2.5 MTT 检测转染 TGF-β1 siRNA 后 Ec9706 细胞增殖能力

用 MTT 法检测各组细胞的增殖能力。结果显示:转染 TGF-β1 siRNA 后 48 h、72 h、96 h 实验组的生长抑制率分别为:( $25.51 \pm 0.12$ )%,( $29.60 \pm$

$0.23$ )%,( $18.24 \pm 0.20$ )%,细胞增殖能力较阴性对照组和空白对照组降低,72 h 降低最为显著,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 5),而阴性对照组和空白对照组相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。说明干扰 TGF-β1 表达能够显著抑制 Ec9706 细胞的增殖能力。但是转染 TGF-β1 siRNA 后,Ec9706 细胞的生长抑制率并没有随着时间的延长而逐渐增加,说明生长抑制效应不具有时间依赖性。

### 2.6 划痕实验检测转染 TGF-β1 siRNA 后 Ec9706 细胞迁移能力

转染 TGF-β1 siRNA 后细胞迁移速度比较发现,实验组细胞的移动速度明显慢于阴性对照组及空白对照组。转染后 72 h,阴性对照组以及空白对照组细胞划痕宽度明显减小并基本愈合,实验

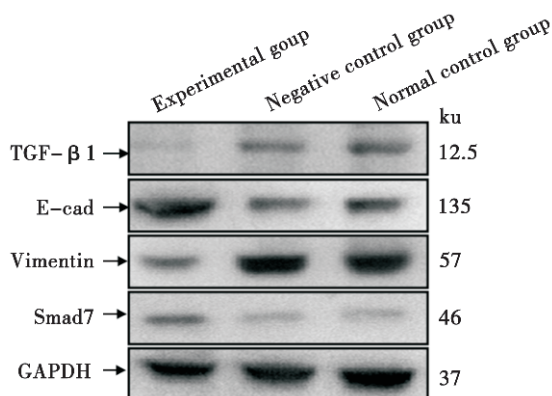


图 4 Western blot 检测 TGF- $\beta$ 1 siRNA 转染 Ec9706 后 TGF- $\beta$ 1、Smad7 及 EMT 相关蛋白表达

Fig.4 Detection of TGF- $\beta$ 1, Smad7 and EMT-associated protein expression after transfected with TGF- $\beta$ 1 siRNA by Western blot

Expression of TGF- $\beta$ 1 protein in Ec9706 cell was significantly down-regulated by TGF- $\beta$ 1 siRNA when compared with negative control group and normal control group. However, E-cadherin and Smad7 were up-regulated, and Vimentin was down-regulated after transfected with TGF- $\beta$ 1 siRNA.

表 2 统计分析 TGF- $\beta$ 1 siRNA 转染 Ec9706 后各组细胞周期时相改变 (%)

Table 2 Statistical analysis of cell cycle after transfected with TGF- $\beta$ 1 siRNA in Ec9706 (%)

Group	Cell cycle		
	G0/G1	S	G2/M
Experimental group	73.6 $\pm$ 0.6	20.5 $\pm$ 1.2	5.7 $\pm$ 1.8
Negative control group	55.7 $\pm$ 1.0 <sup>1)</sup>	30.5 $\pm$ 2.0	14.0 $\pm$ 1.1
Normal control group	56.6 $\pm$ 0.6 <sup>1)</sup>	27.8 $\pm$ 1.7	12.5 $\pm$ 2.5

1) There is a statistic significance between experimental and control group,  $P < 0.05$

组细胞划痕宽度无显著变化, 实验组与阴性对照组及空白对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 6), 而阴性对照组与空白对照组相比, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。说明干扰 TGF- $\beta$ 1 表达后, Ec9706 细胞的迁移力显著下降, 并且迁移速度随着时间的延长逐渐降低, 迁移速度具有时间依赖性。

### 2.7 流式细胞术检测转染 TGF- $\beta$ 1 siRNA 对 Ec9706 细胞凋亡的影响

通过 Annexin V 和 PI 染色, 经流式细胞仪检

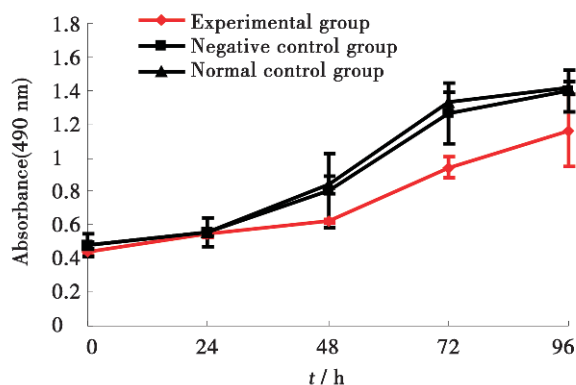


图 5 MTT 检测 TGF- $\beta$ 1 siRNA 转染 Ec9706 后细胞增殖能力变化

Fig.5 Detection of cell proliferation after transfected with TGF- $\beta$ 1 siRNA in Ec9706 by MTT

The proliferation rate of Ec9706 cells after knockdown of TGF- $\beta$ 1 was examined by MTT. Transfection of TGF- $\beta$ 1 siRNA obviously suppressed the proliferation compared with negative control group and normal control group.

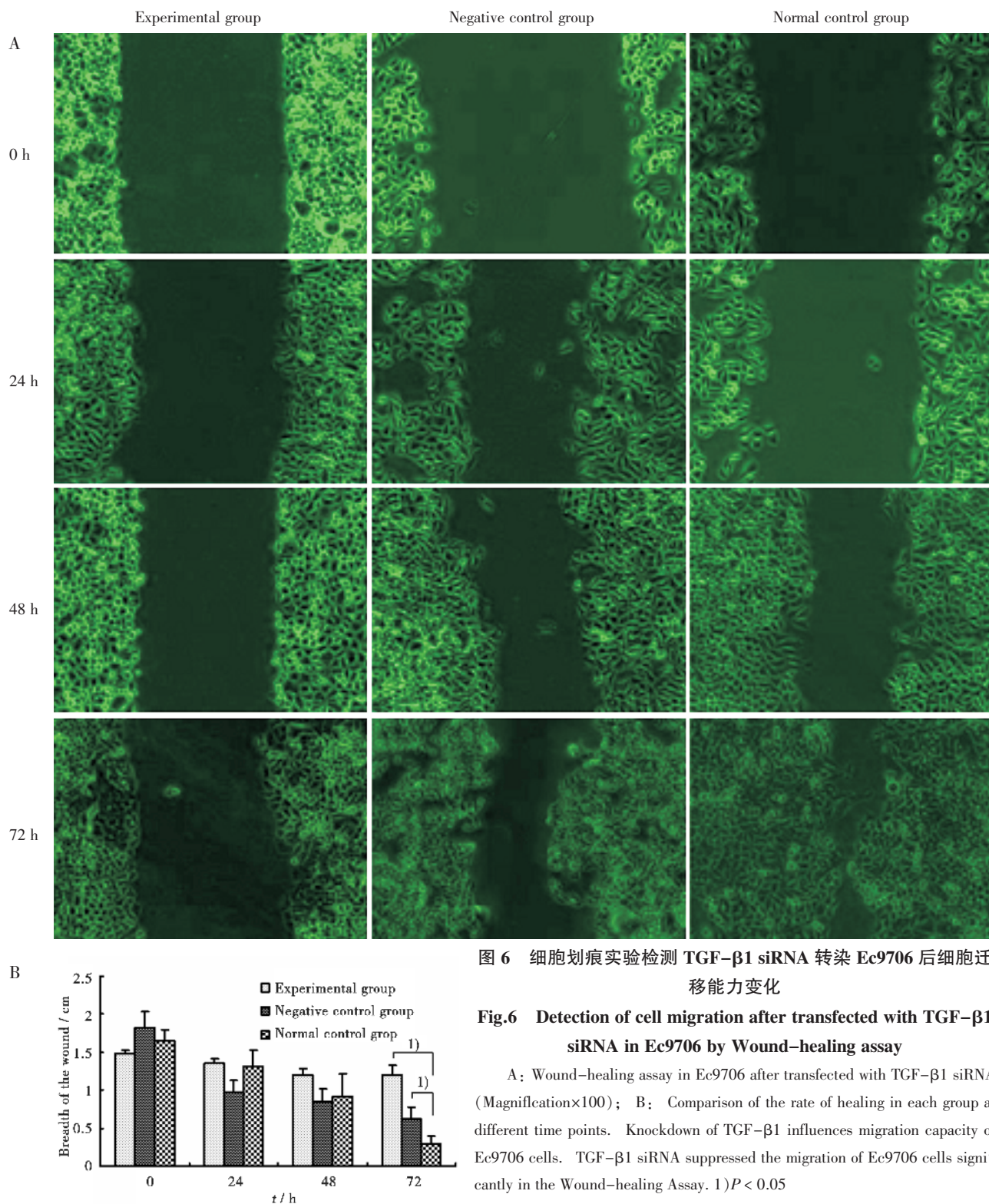
测转染 TGF- $\beta$ 1 siRNA 后 Ec9706 细胞凋亡变化。结果发现, 实验组细胞凋亡率 ( $24.4 \pm 1.1$ )% 较阴性对照组 ( $1.6 \pm 0.4$ )% 以及空白对照组 ( $0.91 \pm 0.22$ )% 显著升高 ( $P < 0.05$ , 图 7), 即干扰 TGF- $\beta$ 1 表达能够促进 Ec9706 细胞凋亡。

### 2.8 流式细胞术检测转染 TGF- $\beta$ 1 siRNA 对 Ec9706 细胞周期的影响

实验组细胞 G0/G1 期 ( $73.6 \pm 0.6$ )% 较阴性对照组 ( $55.7 \pm 1.0$ )% 和空白对照组 ( $56.6 \pm 0.6$ )% 均显著增多, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 8, 表 2), 说明干扰 TGF- $\beta$ 1 能够使食管鳞癌 Ec9706 细胞周期发生 G0/G1 期阻滞。

## 3 讨论

食管鳞癌是常见的恶性肿瘤之一, 新疆北部以游牧为生的哈萨克族聚集区是我国食管癌高发区之一<sup>[10]</sup>。由于经济及卫生条件落后, 哈萨克族食管癌确诊时大多已有远处转移。因此, 立足于分子水平探讨哈萨克族食管癌发生浸润转移的相关机制就更为重要。近几年多项研究显示: EMT 相关现象存在于各个系统的恶性肿瘤中, 并且促进了肿



瘤的浸润转移<sup>[11]</sup>。EMT 是多细胞生物胚胎发生过程中的基础过程，也存在于多种慢性疾病的发病以及肿瘤的进展过程中，以上皮细胞极性的丧失及其间质特性的获得为主要特征，与肿瘤细胞的原位侵袭和远处转移有着密切的关系<sup>[12,13]</sup>。TGF-

β1 广泛分布于细胞内，在趋化炎症因子、刺激细胞增殖、分化和迁移以及抑制免疫监视等方面发挥重要的作用<sup>[14]</sup>。有研究表明，TGF-β1 通过一系列转录调节因子诱导 EMT 的发生，促进肿瘤的侵袭和转移<sup>[15]</sup>。TGF-β 信号传导通路主要包括 Smad

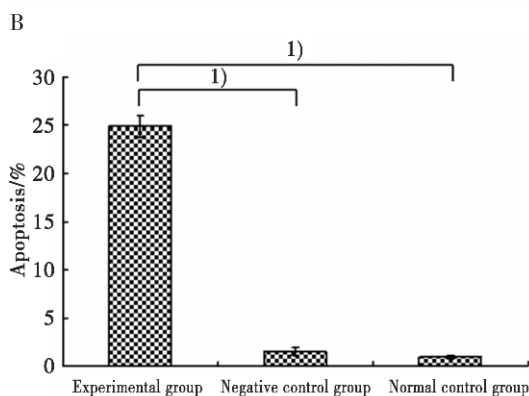
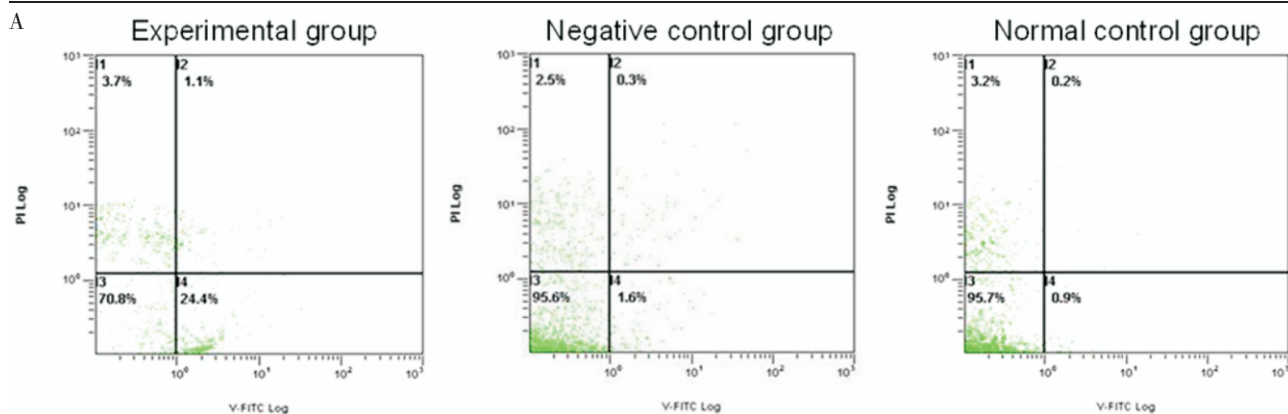


图 7 流式细胞术检测 TGF-β1 siRNA 转染 Ec9706 后细胞凋亡率的改变

Fig.7 Analyzing of cell apoptosis after transfected with TGF-β1 siRNA in Ec9706 by flow cytometry

A: flow cytometry analysis; B: Quantification of results (1)  $P < 0.05$ . Ec9706 cells were incubated for 48 h following transfection and labeled with fluorescein isothiocyanate-labeled Annexin V and PI, and analyzed by Flow cytometry. These results showed that apoptosis of ESCC cells affected by TGF-β1 inhibition significantly increased compared to negative control group and normal control group.

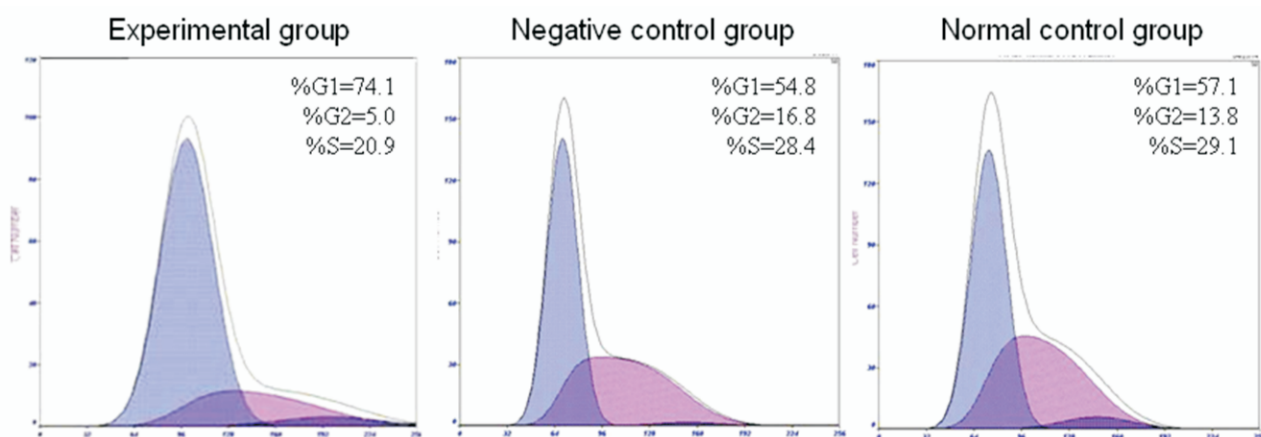


图 8 流式细胞术检测 TGF-β1 siRNA 转染 Ec9706 细胞周期时相变化

Fig.8 Analyzing of cell cycle after transfected with TGF-β1 siRNA in Ec9706 by flow cytometry

Cells were harvested 48 h after treatment, fixed, stained with PI and analyzed for DNA staining profiles by Flow cytometry. After transfection of TGF-β1 siRNA, cells arrest at G0/G1 phase.

依赖通路和非 Smad 依赖通路, 其中 Smad 是 TGF-β 信号通路的中心转导物质, 也是 EMT 中最为关键的信号通路<sup>[16]</sup>。而 Smad 蛋白又分为 3 类: 1、受体调节型 Smads(R-smads): Smad1、2、3、5、8、9、10, 其中 Smad2、3 参与 TGF-β 的信号转导; 2、共同介导型 Smads(Co-smads): Smad4, 为 TGF-β

信号途径的共同通路; 3、抑制型 Smads(I-smads): Smad6、7, 可拮抗受体激活的 Smad 蛋白介导的信号转导<sup>[7]</sup>。

Smad7 是 Smad 家族中的一员, 具有保守的 C 端 MH2 结构域, 可以与激活的 TβR1 及 R-Smads 作用并抑制细胞内信号的转导, 阻断 TGF-β 与

T $\beta$ R2 的结合,是 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路负调控的主要承担者,并被认为参与了信号的终止。因此,它可以通过干扰 TGF- $\beta$  所诱导产生的 Smad-DNA 复合物的形成而抑制转录,在肿瘤的发生发展中发挥抑癌基因的作用<sup>[7]</sup>。

本研究从组织水平探讨了 TGF- $\beta$ 1/Smad7 信号通路与新疆哈萨克族食管鳞癌的相关性,并进一步采用 RNAi 技术,特异性抑制 TGF- $\beta$ 1 的表达,分别从细胞增殖、迁移运动能力、周期和凋亡改变,以及 EMT 相关蛋白表达变化等方面,探讨 TGF- $\beta$ 1/Smad7 信号通路与 EMT 的关系,以期食管癌浸润转移的阻断治疗提供理论基础。

徐国萍<sup>[17]</sup>等研究报道表明在肺泡 EMT 过程中过表达 Smad7 蛋白能抑制 TGF- $\beta$ 1 介导的细胞内 Smad 信号转导,从而阻止 EMT 相关靶基因的转录,证明 TGF- $\beta$ 1 通过抑制 Smad7 的表达,进而促进 EMT;Woo-Kwang Jeon<sup>[18]</sup>等研究表明,在人肺癌细胞系 A549 中,过表达 Smad7 能够诱导癌细胞凋亡,抑制癌细胞浸润转移,有望成为克服肿瘤治疗耐药性的一种重要手段。本研究结果发现:沉默 TGF- $\beta$ 1 能够抑制食管鳞癌细胞的增殖和迁移,促进凋亡,引起细胞周期阻滞于 G0/G1 期,并且能使上皮标志物 E-cadherin 表达增高,间质标志物 Vimentin 表达降低,间接说明 TGF- $\beta$ 1 可以促进食管鳞癌细胞的增殖、迁移,抑制凋亡,促进食管鳞癌发生 EMT。进一步检测 Smad7 表达变化,结果发现抑制 TGF- $\beta$ 1 的表达后,Smad7 mRNA 及蛋白表达均升高,说明 Smad7 在 TGF- $\beta$ 1 介导的食管鳞癌细胞 EMT 中起重要作用,是 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路的抑制性因子,起抑癌基因的作用。

目前已有研究表明:食管癌组织中 TGF- $\beta$ 1 蛋白的高表达与食管癌的恶性生物学特性相关,食管癌组织 TGF- $\beta$ 1 表达增高有利于肿瘤的侵袭和转移,可作为判断食管癌恶性程度和临床分期的重要参考指标<sup>[19]</sup>。此外,HIDENOBU OSAWA<sup>[20]</sup>等通过在组织水平检测 Smad6 和 Smad7 表达量的差异发现,在食管鳞癌中,Smad7 表达缺失,该变化促进了食管癌的发生、发展和远处淋巴结转移。本研究结果显示:哈萨克族食管鳞癌中 TGF- $\beta$ 1 蛋白的阳性表达率显著高于其在癌旁组织中的表达,Smad7 在癌组织中的阳性表达率显著低于癌旁组织。然而由于样本量的限制,基于此样本,未见 TGF- $\beta$ 1、Smad7 与患者的肿瘤大体分型、浸润

深度及预后等临床病理参数间存在显著相关性,该结果有待在大样本中进一步验证。

综上所述,哈族食管癌中存在 TGF- $\beta$ 1/Smad7 信号通路的激活,TGF- $\beta$ 1 通过抑制 Smad7 的表达,促进食管鳞癌发生 EMT,进一步促进食管癌细胞的增殖和迁移,并抑制细胞凋亡,影响细胞周期中的 G0/G1 期。深入探讨新疆哈萨克族食管鳞癌浸润转移的分子机制,该结果有待在哈族食管鳞癌细胞系及扩大的组织样本中进一步验证,以期哈族食管癌浸润转移的阻断治疗提供理论基础。

#### 参考文献

- [1] Holmes RS, Vaughan TL. Epidemiology and pathogenesis of esophageal cancer [J]. *Semin Radiat Oncol*, 2007, 17(1): 2-9.
- [2] 卢晓梅,彭辉,刘赞,等.全基因组寡核苷酸表达谱筛选哈萨克族食管癌相关靶基因[J].*中华消化外科杂志*,2008,7(5):372-374.  
LU Xiao-mei, PENG Hui, LIU Zan, et al. Screening of target genes in esophageal squamous cell cancer in Kazakh by oligonucleotide microarray [J]. *Chinese Journal Of Digestive Surgery*, 2008, 7(5): 372-374.
- [3] Umar SB, Fleischer DE. Esophageal cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention [J]. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 2008, 5(9): 517-526.
- [4] Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells [J]. *J Cell Biol*, 1982, 95(1): 333-339.
- [5] Hay ED. The extracellular matrix in development and regeneration. An interview with Elizabeth D. Hay [J]. *Int J Dev Biol*, 2004, 48(8-9): 687-94.
- [6] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(6): 442-454.
- [7] Balogh P, Katz S, Kiss AL. The Role of Endocytic Pathways in TGF- $\beta$  Signaling [J]. *Pathol Oncol Res*, 2013, 19(2): 141-148.
- [8] Salot S, Gude R. MTA1-mediated transcriptional repression of SMAD7 in breast cancer cell lines [J]. *European Journal of Cancer*, 2013, 49(2): 492-499.
- [9] Patel SA, Meyer JR, Greco SJ, et al. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF- $\beta$  [J]. *J Immunol*, 2010, 184(10): 5885-5894.

- [10] Qin JM, Yang L, Chen B, et al. Interaction of methylenetetrahydrofolate reductase C677T, cytochrome P4502E1 polymorphism and environment factors in esophageal cancer in Kazakh population [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(45): 6986-6992.
- [11] 戴维奇, 徐凌, 柯爱武, 等. 上皮间质转化在肿瘤发生发展中的作用[J]. *医药论坛杂志*, 2011, 32(12): 203-206.
- DAI Wei-qi, Xu Lin, KE Ai-wu, et al. Role of EMT in carcinoma development [J]. *Journal of Medical Forum*, 2011, 32(12): 203-206.
- [12] Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2005, 17(5): 548-558.
- [13] Fernando RI, Litzinger M, Trono P, et al. The T-box transcription factor Brachyury promotes epithelial-mesenchymal transition in human tumor cells [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(2): 533-544.
- [14] Rahimi RA, Leof EB. TGF-beta signaling: a tale of two responses [J]. *J Cell Biochem*, 2007, 102(3): 593-608.
- [15] Jang MJ, Back SH, Kim JH. UCH-L1 promotes cancer metastasis in prostate cancer cells through EMT induction [J]. *Cancer Lett*, 2011, 302(2): 128-135.
- [16] Heldin CH, Moustakas A. Role of Smads in TGF-beta signaling [J]. *Cell and Tissue Research*, 2012, 347(1): 21-36.
- [17] 徐国萍, 李清泉, 曹汐汐, 等. Smad7 对转化生长因子 beta1 诱导的肺泡上皮细胞向间质细胞转变的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(27): 1918-1923.
- XU Guo-ping, LI Qing-quan, CAO Xi-xi, et al. Effect of Smad7 on transforming growth factor beta1-induced alveolar epithelial to mesenchymal transition [J]. *National Medical Journal of China*, 2007, 87(27): 1918-1923.
- [18] Jeon WK, Hong HY, Seo WC, et al. Smad7 sensitizes A549 lung cancer cells to cisplatin-induced apoptosis through heme oxygenase-1 inhibition [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 420(2): 288-292.
- [19] 杨文锋, 张百江, 李道堂, 等. 转化生长因子 beta1 蛋白在食管癌组织中的表达 [J]. *肿瘤防治杂志*, 2005, 12(21): 1629-1631.
- YANG Wen-feng, ZHANG Bai-jiang, LI Dao-tang, et al. Expression of transforming growth factor beta one (TGF-beta1) protein in esophageal tumor tissue [J]. *Chinese Journal of Cancer Prevention And Treatment*, 2005, 12(21): 1629-1631.
- [20] Osawa H, Nakajima M, Kato H, et al. Prognostic value of the expression of smad6 and smad7, as inhibitory smads of the tgfbeta superfamily, in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2004, 24(6): 3703-3710.

(编辑 孙慧兰)