

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.08.005

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.08.005

TCF21对喉癌Hep-2细胞生物学行为的影响

杨庆军

(周口市中心医院耳鼻咽喉头颈外科, 河南 周口 466000)

[摘要] 目的: 探讨转录因子21(transcription factor 21, TCF21)对喉癌细胞株Hep-2生物学特性的影响及其相关的作用机制。方法: 利用慢病毒转染技术外源性过表达喉癌Hep-2细胞中的TCF21, 然后分别采用细胞增殖检测(Cell Counting Kit-8, CCK-8)法和流式细胞术检测细胞增殖及凋亡能力的变化; Western印迹检测周期及凋亡相关蛋白的表达。结果: 在Hep-2细胞中过表达TCF21后, 细胞的增殖能力显著降低, 周期进程缓慢, 而细胞凋亡显著增加; Transwell细胞迁移实验显示过表达TCF21可抑制Hep-2细胞迁移。Western印迹实验结果显示过表达TCF21后, cyclinD1, CDK4, CDK6, p-Rb及bcl-2的蛋白表达水平显著下降; P21和Bax及cleaved-caspase-3的蛋白表达水平显著升高。结论: 人喉癌细胞株Hep-2中, 过表达TCF21可通过调控周期及凋亡相关因子的表达, 发挥增殖抑制及凋亡促进作用, 提示TCF21可作为诊断和靶向治疗喉癌的潜在作用位点。

[关键词] 转录因子21; 喉癌; 增殖; 凋亡

Effect of TCF21 on cellular biological characteristics in laryngeal carcinoma Hep-2 cell

YANG Qingjun

(Department of E.N.T. & H.N Surgery, Zhoukou Center Hospital, Zhoukou Henan 466000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect and mechanism of transcription factor 21 (TCF21) on the cellular biological characteristics in laryngeal carcinoma cell line Hep-2. **Methods:** Lentiviral transfection was used to up-regulated TCF21 expression in Hep-2 cells, and then cell proliferation and apoptosis were detected with Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay and flow cytometry assay, respectively. The expression of cell cycle- and apoptosis-related molecules at protein level was measured by Western blot. **Results:** Over-expression of TCF21 suppressed cell proliferation and cell cycle, while promoted cell apoptosis in Hep-2 cell ($P<0.05$). Western blot showed that the expression of cyclinD1, CDK4, CDK6, p-Rb and Bcl-2 at protein level decreased significantly after up-regulation of TCF21, with an increased expression of P21, Bax and cleaved-caspase-3 ($P<0.05$). **Conclusion:** In Hep-2 cells, over-expression of TCF21 could suppress cell proliferation and cell cycle, while promote cell apoptosis via regulating the expression of cell cycle- and apoptosis-related molecules, suggesting that TCF21 may be a potential new target for diagnosis and targeted therapy of laryngeal carcinoma.

Keywords transcription factor 21; laryngeal carcinoma; proliferation; apoptosis

收稿日期 (Date of reception): 2017-06-12

通信作者 (Corresponding author): 杨庆军, Email: yangliqingsj@163.com

喉癌是耳鼻喉科常见的肿瘤之一，且大部分患者初诊时已进入肿瘤晚期，经过手术和/或化疗治疗后，预后仍不尽如人意^[1-2]。近来，研究者^[3-4]意识到基因的异常表达是恶性肿瘤发生发展的重要因素之一，因此探讨喉癌发生发展的相关基因，对于寻找有效的检测指标及协助喉癌诊疗具有重要的意义。

转录因子21(transcription factor 21, TCF21)基因位于6q23-q24染色体区域，属于碱性螺旋-环-螺旋(bHLH)家族，是编码转录因子21的基因，对细胞的生长及分化具有重要的调节作用^[5-6]。研究^[6-8]显示在乳腺癌、肺癌、肾癌等恶性肿瘤中TCF21均呈现低表达，推测TCF21可能作为一种抑癌基因参与调控肿瘤的发生发展。Dai等^[9]研究显示：下调TCF21可抑制结直肠癌细胞的增殖及迁移；胡松等^[10]研究显示：过表达TCF21可诱导非小细胞肺癌细胞A549的增殖及迁移，并促进其凋亡。在头颈癌中同样可检测到TCF21的低表达，且TCF21可作为头颈癌诊疗的潜在肿瘤分子标志物^[11]，但其对喉癌细胞的具体作用及相关机制仍不明确。

本研究利用慢病毒转染技术外源性过表达喉癌Hep-2细胞中的TCF21，研究TCF21基因对喉癌细胞株Hep-2的增殖、周期及凋亡等生物学特性的影响和相关作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

胎牛血清(fetal calf serum, FBS), RPMI 1640培养基及Opti-NEM培养基购自美国Gibco公司；人喉癌细胞系Hep-2购自中国科学院上海细胞库；TCF21, cyclinD1, CDK4, CDK6, p-Rb/Rb, P21, Bcl-2, Bax, cleaved-caspase-3/caspase-3及GAPDH抗体购自美国Abcam公司；细胞增殖检测(Cell Counting Kit-8, CCK-8)分析试剂盒购自日本同仁化学研究所；细胞周期及凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司；TCF21过表达慢病毒载体(TCF21)及其对照空载体(vec)由美国Invitrogen公司构建并合成；相关转染试剂和SYBR Green I real-time PCR kit购自美国Invitrogen公司；其余试剂均为国产市售分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、转染和分组

实验用人喉癌细胞株Hep-2常规培养于含10%FBS的RPMI 1640培养基中；培养环境为37℃，

含5% CO₂的恒温培养箱。每隔1天换液，3~5 d常规使用胰酶消化传代。慢病毒载体转染：取对数生长期的细胞消化后接种于6孔板中，待细胞生长融合至60%~80%，更换为无血清的培养基同步化12 h，随后分组并转染相应载体。组别设置为空白对照组(Ctrl)、空载体对照组(vec)、TCF21过表达组(TCF21)。将载体分别溶解于含Polybrene的培养基中轻柔混匀，将混合物加入相应组别的细胞中，置于培养箱中培养8 h后，更换为正常细胞培养基继续培养48 h。提取细胞蛋白测定转染效率并进行后续实验分析。

1.2.2 CCK-8 法测定细胞活力

取对数生长期的细胞接种于96孔板中，并调整细胞密度至 2×10^3 个/孔。各组细胞经相应处理后继续培养22 h，然后每孔加入CCK-8试剂10 μ L，置于细胞培养箱中孵育2 h。酶标仪测定各孔在450 nm波长处的吸光度(optical density, OD)值。每组设3个复孔取平均值，另设单孔只加入培养基作空白对照。

1.2.3 流式细胞术检测细胞周期

各组细胞经相应处理后，用不含EDTA的胰酶消化并离心收集细胞，加PBS漂洗3次，而后用70%无水乙醇固定(4℃，避光过夜)。1 000 r/min离心洗去乙醇，然后避光加入碘化丙啶(propidium iodide, PI)，37℃孵育30 min，用流式细胞仪检测激发波长488 nm处的荧光强度。

1.2.4 Annexin V/PI 双染色法检测细胞凋亡

各组细胞经相应处理后，用不含EDTA的胰酶消化并离心收集细胞，加PBS漂洗3次，而后加Binding Buffer重悬细胞。加入Annexin V-FITC室温避光孵育10 min，然后避光加入PI继续孵育5 min。用流式细胞仪检测激发波长488 nm，发射波长530 nm处的荧光强度。

1.2.5 RT-PCR

依据TRIzol说明书提取细胞中的总RNA。所提RNA经纯化及定量后，取2 μ g经反转录酶催化合成cDNA，然后采用SYBR Green实时荧光PCR的方法检测TCF21的表达。PCR循环条件：94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 30 s，40个循环；以GAPDH为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析基因的相对表达量。相应引物序列见表1。

1.2.6 Western 印迹测定蛋白表达水平

各组细胞经处理后，RIPA裂解提取细胞蛋白，然后用BCA蛋白定量试剂盒对所提蛋白进行定量分析。依据蛋白定量结果调整各组蛋白上样总量为80 μ g，加入loading buffer(体积比为1:4)后

沸水煮5 min变性处理。然后进行SDS-PAGE电泳。待蓝色的loading buffer跑出分离胶后将蛋白电转至PVDF膜上,加5%脱脂牛奶室温封闭90 min。依据说明书要求加入相应比例的一抗4 ℃孵育过夜,复温后TBST洗涤5 min×3次;加入对应的二抗室温孵育120 min, TBST洗涤10 min×3次,暗室中显影,定影并冲洗胶片。所得结果录入电脑后,经ImageJ行灰度分析。

1.3 统计学处理

实验数据均录入SPSS15.0软件中进行统计分析。实验结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,各组均数间的两两比较用Bonferroni校正的*t*检验,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

表1 引物的名称和序列

Table 1 Name and sequence of the primers

名称	序列 (5'-3')
TCF21	F: CCAGCTACATCGCCCACTTG
	R: CTTTCAGTCACTCTCGGGTTTC
GAPDH	F: ACCACAGTCCATGCCATCAC
	R: TCCACCACCCTGTTGCTGTA

2 结果

2.1 TCF21 过表达效率检测

将TCF21过表达慢病毒载体转染至Hep-2细胞中,分别采用RT-PCR和Western印迹检测过表达效率。结果显示:转染了TCF21过表达慢病毒载体后,Hep-2细胞中的TCF21的mRNA和蛋白表达水平

显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$,图1);且感染复数(multiplicity of infection, MOI)=100时,效果较好,后续实验分析均选用此病毒滴度。

2.2 过表达 TCF21 抑制细胞增殖

首先采用CCK-8细胞增殖分析试剂盒初步检测过表达TCF21对Hep-2细胞活力的影响,结果显示:过表达TCF21后,Hep-2的细胞活力显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$,图2A)。

进一步采用流式细胞术检测了细胞增殖周期的变化,结果显示:过表达TCF21后, G_0/G_1 期细胞所占百分比增加至 $83.71\pm 4.09\%$,S期细胞所占百分比则减少至 $8.43\pm 1.38\%$,差异均有统计学意义($P<0.05$,图2B,C)。说明在Hep-2细胞中,过表达TCF21可抑制细胞周期由 G_0/G_1 期向S期转换。

2.3 过表达 TCF21 促进细胞凋亡

采用流式细胞AnnexinV/PI双染法检测过表达TCF21对Hep-2细胞凋亡的影响。结果显示:过表达TCF21后,早期凋亡率由 $12.37\pm 3.12\%$ 增加至 $39.68\pm 3.77\%$;而中晚期细胞凋亡/坏死率则由 $7.26\pm 2.01\%$ 增加至 $14.49\pm 2.65\%$,差异均有统计学意义($P<0.05$,图3)。结果表明:过表达TCF21可明显促进喉癌细胞Hep-2的凋亡。

2.4 细胞周期及凋亡相关调控因子的蛋白表达水平

采用Western印迹检测过表达TCF21对Hep-2细胞中周期及凋亡相关调控因子表达的影响。结果显示:过表达TCF21后,Hep-2细胞中cyclinD1,CDK4,CDK6,p-Rb及Bcl-2的蛋白表达水平显著下降,差异均有统计学意义($P<0.05$;图4,5);P21,Bax及cleaved-caspase-3的蛋白表达水平显著升高。

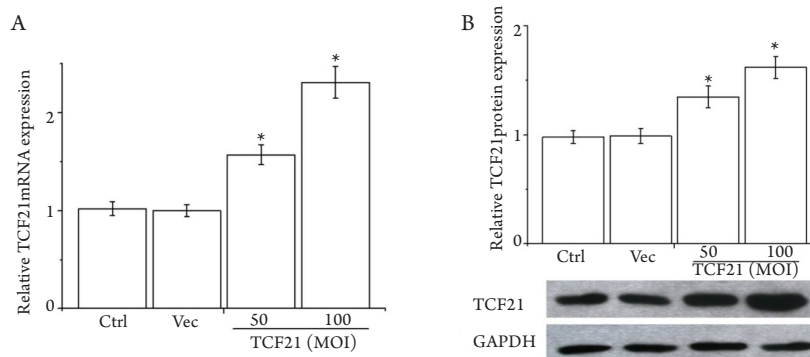


图1 Hep-2细胞转染TCF21过表达慢病毒载体后TCF21的表达水平

Figure 1 Expression levels of TCF21 in the Hep-2 cell after transfection of TCF21 lentiviral vector

(A) TCF21 mRNA表达; (B) TCF21蛋白表达。与对照组相比, $*P<0.05$ 。 $n=6$ 。

(A) TCF21 mRNA expression; (B) TCF21 protein expression. $*P<0.05$ vs the control group. $n=6$.

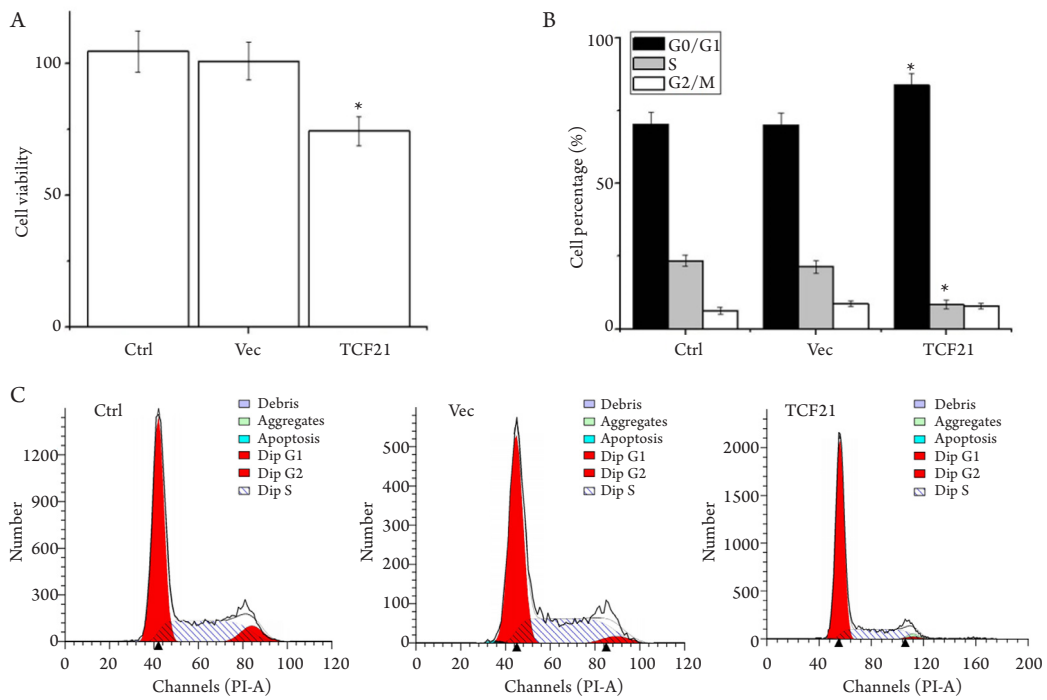


图2 过表达TCF21对Hep-2细胞增殖的影响

Figure 2 Cell proliferation of Hep-2 cells after transfection of TCF21 lentiviral vector

(A) CCK-8检测细胞活力; (B,C)流式细胞术检测细胞周期。与对照组相比, * $P < 0.05$ 。 $n = 6$ 。

(A) Cell viability determined by CCK-8 assay; (B,C) Cell cycle detected by flow cytometry assay. * $P < 0.05$ vs the control group. $n = 6$.

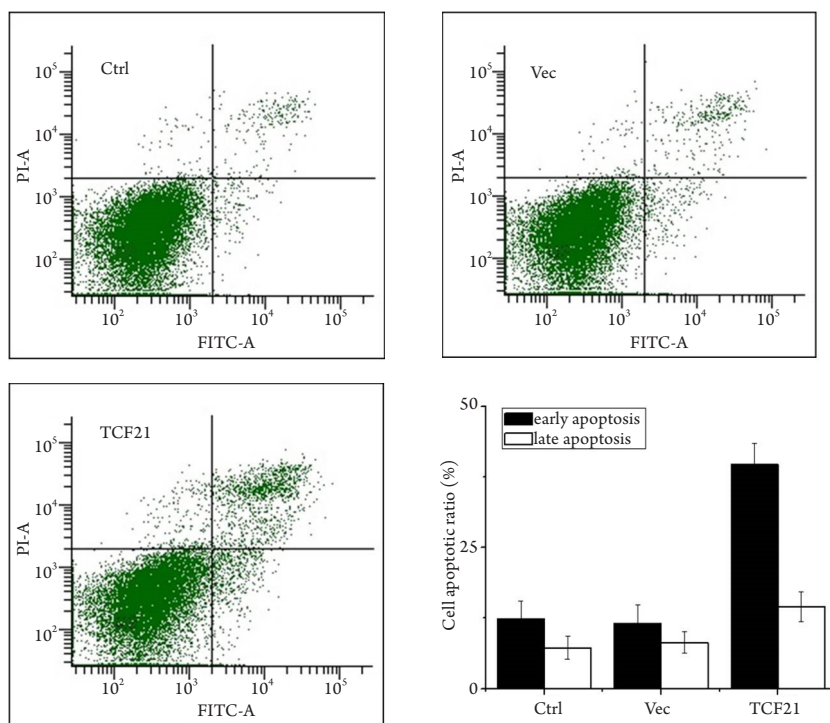


图3 流式细胞术检测过表达TCF21对Hep-2细胞凋亡的影响

Figure 3 Cell apoptosis of Hep-2 cells after transfection of TCF21 lentiviral vector determined by flow cytometry assay

与对照组相比, * $P < 0.05$ 。 $n = 6$ 。

* $P < 0.05$ vs the control group. $n = 6$.

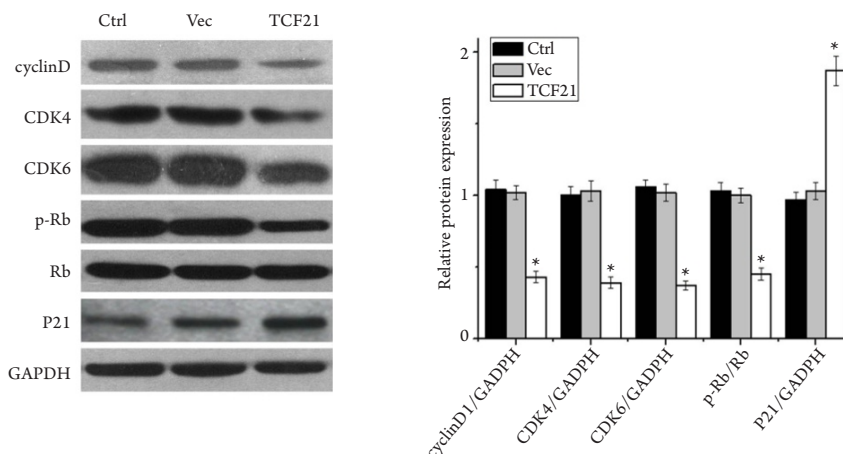


图4 Western印迹检测过表达TCF21对Hep-2细胞中周期相关因子表达的影响

Figure 4 Protein expression of cell cycle-related molecules in Hep-2 cells after transfection of TCF21 lentiviral vector determined by Western blot

与对照组相比, * $P < 0.05$ 。 $n = 6$ 。

* $P < 0.05$ vs the control group. $n = 6$.

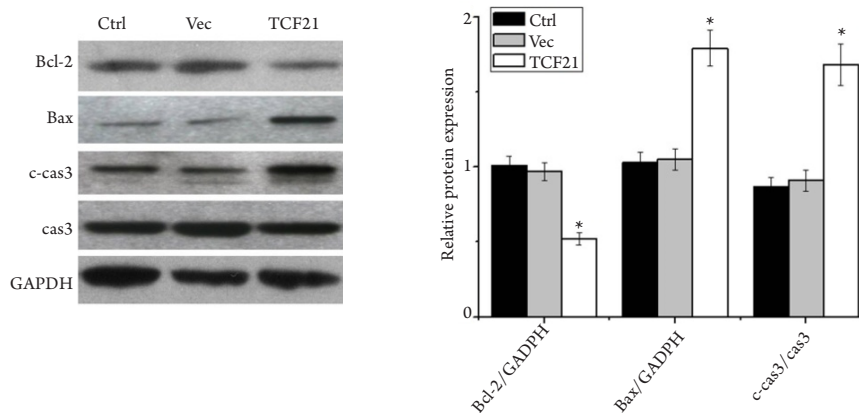


图4 Western印迹检测过表达TCF21对Hep-2细胞中周期相关因子表达的影响

Figure 4 Protein expression of cell cycle-related molecules in Hep-2 cells after transfection of TCF21 lentiviral vector determined by Western blot

与对照组相比, * $P < 0.05$ 。 $n = 6$ 。

* $P < 0.05$ vs the control group. $n = 6$.

3 讨论

喉癌是常见的头颈恶性肿瘤,近年来随着工业污染的加重,其发病率明显上升,且呈年轻化趋势,严重威胁着人类的生命健康。随着分子生物学研究的不断进展和诊疗水平的提高,人们对喉癌相关的肿瘤标记分子的认识也逐渐加深。有研究^[11]提示:TCF21在头颈癌中低表达从而发挥

抑癌基因的作用;且有研究^[9-10]显示TCF21可诱导肿瘤细胞增殖,促进细胞凋亡,但其在喉癌细胞中的具体作用及相关机制仍不明确。本实验通过外源性过表达人喉癌细胞系Hep-2中的TCF21,探讨TCF21对喉癌细胞增殖及凋亡等生物学特性的影响。CCK-8和流式细胞术细胞周期检测显示:过表达TCF21后,Hep-2细胞的活力显著降低,并出现细胞周期的G₁/S阻滞,AnnexinV/PI双染法检测细

胞凋亡则发现：过表达TCF21后Hep-2细胞的凋亡率明显增加。这一结果提示：TCF21过表达可能是通过抑制肿瘤细胞的增殖同时促进其凋亡，抑制肿瘤的发展及恶化。

细胞增殖是通过细胞周期进程实现的，故而周期异常就成为影响细胞增殖的一个重要因素。关于细胞周期的分子生物学研究^[12-14]显示：细胞周期素通过与细胞周期素依赖蛋白激酶(CDK)结合形成复合物促进Rb的磷酸化，而磷酸化的Rb(p-Rb)则通过一系列的核内调控程序促使细胞越过周期的G₁/S调控点进入S期进行DNA复制，整个过程同时受到周期素依赖蛋白激酶抑制剂的负向调控。本实验发现过表达TCF21后，Hep-2细胞中cyclin D1，CDK4，CDK6和p-Rb的蛋白表达水平显著降低，而P21的蛋白表达水平显著升高。说明在喉癌Hep-2细胞中，过表达TCF21可通过下调cyclin D1，CDK4及CDK6，同时上调P21，抑制cyclin/CDK复合物的形成，进而抑制Rb的磷酸化，阻滞细胞周期的G₁/S转换，进而抑制细胞增殖。

细胞凋亡是一个涉及多个因素及多条通路的复杂病理生理过程，其中bcl-2家族在细胞凋亡的调控中发挥重要的作用。Bcl-2和Bax则分别是bcl-2家族中最具代表性的凋亡抑制和凋亡促进因子^[15]。在多种肿瘤组织中可检测到bcl-2的高表达和Bax的低表达，而且过表达bcl-2或下调Bax还可抑制多种因素所致的肿瘤细胞凋亡^[16-18]。Western印迹检测结果显示：过表达TCF21可下调Hep-2细胞中bcl-2的表达，同时上调Bax的表达。此外，caspase-3是细胞凋亡的重要效应蛋白，也是多条凋亡信号的共同通路^[19-20]，本实验检测到过表达TCF21之后，Hep-2细胞中cleaved-caspase-3的表达显著升高。表明过表达TCF21可通过调控bcl-2家族蛋白的表达，进一步激活caspase-3，最终导致细胞凋亡。考虑到细胞周期及凋亡调节机制的复杂，除实验中检测的周期及凋亡相关调控因子之外，是否还有其他分子的参与以及该过程中涉及信号通路还值得进一步研究。

综上所述，人喉癌细胞株Hep-2中，过表达TCF21可通过阻滞细胞周期和促进凋亡相关因子的表达，进而抑制肿瘤的发展及恶化。

参考文献

1. Pointer KB, Ko HC, Brower JV, et al. Small cell carcinoma of the head and neck: an analysis of the national cancer database[J]. *Oral Oncol*, 2017, 69: 92-98.

2. Leeman JE, Li JG, Pei X, et al. Patterns of treatment failure and postrecurrence outcomes among patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma after chemoradiotherapy using modern radiation techniques[J]. *JAMA Oncol*, 2017, Epub ahead of print.
3. de Barros Gallo C, Marichalar-Mendia X, Setien-Olarrá A, et al. Toll-like receptor 2 rs4696480 polymorphism and risk of oral cancer and oral potentially malignant disorder[J]. *Arch Oral Biol*, 2017, 82: 109-114.
4. Sailer V, Gevensleben H, Dietrich J, et al. Clinical performance validation of PITX2 DNA methylation as prognostic biomarker in patients with head and neck squamous cell carcinoma[J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0179412.
5. Tandon P, Miteva YV, Kuchenbrod LM, et al. Tcf21 regulates the specification and maturation of proepicardial cells[J]. *Development*, 2013, 140(11): 2409-2421.
6. Gao X, Yang J, Wang M, et al. TCF21 genetic polymorphisms and breast cancer risk in Chinese women[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(34): 55757-55764.
7. Tessema M, Willink R, Do K, et al. Promoter methylation of genes in and around the candidate lung cancer susceptibility locus 6q23-25[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(6): 1707-1714.
8. Gooskens SL, Gadd S, Guidry Auvil JM, et al. TCF21 hypermethylation in genetically quiescent clear cell sarcoma of the kidney[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(18): 15828-15841.
9. Dai Y, Duan H, Duan C, et al. Down-regulation of TCF21 by hypermethylation induces cell proliferation, migration and invasion in colorectal cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 469(3): 430-436.
10. 胡松, 阳诺, 陈铭伍, 等. 抑癌基因TCF21对肺癌细胞A549增殖、凋亡和迁移的影响[J]. *中国肺癌杂志*, 2014, 17(4): 302-307. HU Song, YANG Nuo, CHEN Mingwu, et al. Effects of tumor suppressor gene TCF21 on the proliferation, migration and apoptosis of A549 cells[J]. *Chinese Journal of Lung Cancer*, 2014, 17(4): 302-307.
11. Weiss D, Stockmann C, Schrödter K, et al. Protein expression and promoter methylation of the candidate biomarker TCF21 in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2013, 36(3): 213-224.
12. Qie S, Diehl JA. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2016, 94(12): 1313-1326.
13. O'Leary B, Finn RS, Turner NC. Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13(7): 417-430.
14. Heo SK, Noh EK, Gwon GD, et al. Radotinib inhibits acute myeloid leukemia cell proliferation via induction of mitochondrial-dependent apoptosis and CDK inhibitors[J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 69: 92-98.

- 2016, 789: 280-290.
15. Reed JC. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities[J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(8): 1378-1386.
 16. Solomon VR, Almnayan D, Lee H. Design, synthesis and characterization of novel quinacrine analogs that preferentially kill cancer over non-cancer cells through the down-regulation of Bcl-2 and up-regulation of Bax and Bad[J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 137: 156-166.
 17. Xu GY, Tang XJ. Troxerutin (TXN) potentiated 5-Fluorouracil (5-Fu) treatment of human gastric cancer through suppressing STAT3/NF- κ B and Bcl-2 signaling pathways[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 92: 95-107.
 18. Liang F, Xie S. Puerarin prevents tumor necrosis factor- α -induced apoptosis of PC12 cells via activation of the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(1): 813-818.
 19. Huang EW, Xue SJ, Li XY, et al. EEN regulates the proliferation and survival of multiple myeloma cells by potentiating IGF-1 secretion[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 447(2): 271-277.
 20. Vakifahmetoglu-Norberg H, Ouchida AT, Norberg E. The role of mitochondria in metabolism and cell death[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482(3): 426-431.

本文引用: 杨庆军. TCF21对喉癌Hep-2细胞生物学行为的影响[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(8): 1576-1582. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.08.005

Cite this article as: YANG Qingjun. Effect of TCF21 on cellular biological characteristics in laryngeal carcinoma Hep-2 cell[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(8): 1576-1582. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.08.005