·论　　著·　　DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.07.004

肾母细胞瘤基因 1 对鼻咽癌细胞-2 表皮生长因子受体的靶向作用研究*

方慧云,程伟民,季明芳,俞　霞,李付贵,何洁冰
(中山大学附属中山医院肿瘤研究所,广东中山 528403)

摘　要:目的　探讨肾母细胞瘤基因 1(WT1)对鼻咽癌细胞(CNE)-2 表皮生长因子受体(EGFR)的靶向作用,证实 WT1 对 CNE-2 免疫活性的影响。**方法**　采用 WT1 对 CNE-2 进行处理,借助蛋白质免疫印迹法(Western blot)对 EGFR 的蛋白表达情况进行检测,借助 CKK-8 观察 CNE-2 增殖能力情况,借助流式细胞术观察 CNE-2 凋亡情况,借助基质胶侵袭试验(Transwell)测定 CNE-2 侵袭情况。**结果**　Western blot 测定结果显示,采用 WT1 组信号强度明显低于二甲亚砜(DMSO)组和空白组,差异均有统计学意义($P<0.05$);WT1 组检测灰度值为 0.358±0.148,DMSO 组为 1.370±0.068,空白组为 1.390±0.077,WT1 组检测灰度值明显低于 DMSO 组和空白组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。CKK-8 检测结果显示,采用 WT1 进行处理后 3、6、9、12 h,抑制值表现为逐渐增大,差异有统计学意义($P<0.05$)。流式细胞术检测结果显示,空白组细胞凋亡率为(0.832±0.207)%,DMSO 组为(2.081±1.221)%,WT1 组为(20.731±1.104)%,WT1 组细胞凋亡率高于空白组和 DMSO 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。Transwell 测定结果显示,DMSO 组穿透细胞数量为 67.21±2.17,WT1 组为 20.13±2.25,WT1 组穿透细胞数量低于 DMSO 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论**　WT1 抗原能够作为 CNE-2 EGFR 的靶向基因,可较好地实现对 CNE-2 EGFR 免疫活性的抑制。

关键词:鼻咽癌;　肾母细胞瘤基因 1;　靶向作用;　免疫活性;　表皮生长因子受体
中图法分类号:R446.1;R739.62　　**文献标志码:**A　　**文章编号:**1672-9455(2019)07-0878-04

Targeting effect of nephroblastoma gene 1 on epidermal growth factor receptor in nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cells*

FANG Huiyun, CHENG Weimin, JI Mingfang, YU Xia, LI Fugui, HE Jiebing
(*Tumor Research Institute, Zhongshan Hospital Affiliated to Sun Yat-Sen University, Zhongshan, Guangdong* 528403, *China*)

Abstract: Objective　To investigate the targeting effect of nephroblastoma gene 1 (WT1) on epidermal growth factor receptor (EGFR) of nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cells, and to confirm the effect of WT1 on immune activity of CNE-2 cells. **Methods**　The cells were treated by WT1, the protein expression of EGFR was detected by Western blot, the proliferation capacity of CNE-2 cells was observed by CKK-8, the apoptosis of CNE-2 cells was observed by flow cytometry, and the invasion of CNE-2 cells was determined by Transwell assay. **Results**　Western blot showed that the signal intensity of WT1 group was significantly lower than that of dimethyl sulfoxide (DMSO) group and control group ($P<0.05$). The gray value detected in the WT1 group was (0.358±0.148), which in the DMSO group was (1.370±0.068), and that of the blank group was (1.390±0.077). The gray value in the WT1 group was significantly lower than that in the DMSO group and the blank group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). CKK-8 test results showed that the inhibition value of WT1 increased gradually after 3, 6, 9 and 12 h of treatment, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The results of flow cytometry showed that the apoptosis rate of the blank group was (0.832±0.207)%, which in the DMSO group was (2.081±1.221)%, and that of the WT1 group was (20.731±1.104)%. The apoptosis rate of the WT1 group was higher than that of the DMSO group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Transwell assay showed that the number of penetrating cells in DMSO group was 67.21±2.17, in WT1 group was 20.13±2.25, and the number of penetrating cells in WT1 group was lower than that in DMSO group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$).

*　**基金项目:**2014 年广东省中山市科技计划立项课题资助项目(2014A1FC071)。
作者简介:方慧云,女,副主任医师,主要从事临床医学检验方面的研究。

Conclusion　WT1 antigen can be used as a target gene of EGFR in CNE-2 cells,and can better inhibit the EGFR immune activity of CNE-2 cells.

Key words:nasopharyngeal carcinoma;　targeting effect of nephroblastoma gene 1;　targeted action;　immune activity;　epidermal growth factor receptor

鼻咽癌是我国南方地区一种常见的恶性鼻咽黏膜肿瘤,是耳鼻咽喉恶性肿瘤最主要的病死原因和癌种。近年来,有学者指出,鼻咽癌发病率呈非常明显的持续递增趋势[1]。目前,针对鼻咽癌的临床治疗,多以放疗和化疗为主,这种治疗方法的 5 年生存率为 53%～80%,进展期放疗和化疗后的生存率为 28%～61%[2]。有研究显示,超过 85%的鼻咽癌患者均呈现表皮生长因子受体(EGFR)过度表达,这是导致患者预后受到影响的关键因素,因而成为鼻咽癌靶向治疗的关键点[3]。本研究应用肾母细胞瘤基因 1(WT1)对鼻咽癌细胞(CNE)-2 所表达 EGFR 进行分析,观察细胞免疫活性情况,现报道如下。

1　材料与方法

1.1　仪器与试剂　WT1 由本研究所负责设计,由中山生物公司进行合成;CNE-2 株;WT1 溶于二甲亚砜(DMSO);0.25%胰酶、胎牛血清、PMI1640 与青链霉素;辣根过氧化物酶与 GAPDH 标记山羊抗兔;兔抗人 EGFR;酶标分析仪;CKK-8;Annexin V-FITC/PI 试剂盒;流式细胞仪 PACS Caliber;Matrigel 基质胶;Transwell 小室。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　应用含 100 mg/L 青链霉素的 RPMI-1640 培养液与 10%胎牛血清对 CNE-2 进行培养,放置于 5%CO_2、37 ℃细胞培养箱内培养。观察发现,培养细胞表现出明显的单层贴壁生长,进行传代的过程中细胞汇合度达 80%～90%。将培养液处理后,应用磷酸盐缓冲液(PBS)连续进行 3 次冲洗,以 0.25%胰酶对其实施消化,并制作成单细胞悬液进行常规传代处理即可[4]。

1.2.2　蛋白质免疫印迹法(Western blot)　应用 RIPA 对 WT1、DMSO 处理 1 h 后的细胞进行总蛋白提取,应用 BCA 法对蛋白浓度进行测定,在获得等量蛋白后再通过 SDS-PAGE 电泳法对其进行分离处理,并转移到 PVDF 膜上,在 PVDF 膜 200 mA 转膜3 h。5%脱脂奶粉在室温下进行 1 h 封闭,应用兔抗人 EGFR 在 4 ℃环境下孵育,次日应用 TBST 洗膜。放置于辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗室进行 1 h 孵育,连续进行 3 次 TBST 洗膜处理,每次持续15 min,暗房显色曝光。将 GAPDH 作为内参[5]。

1.2.3　CKK-8 检测细胞增殖　在 96 孔板上接种1×10^5 个/mL 对数生长期细胞,各孔分别加入 100 μL,将其放置在 5%CO_2 细胞培养箱内培养,持续培养 24 h,将其培养到汇合度能够达到 90%左右,向各孔中加入 10 μmol/L 的 WT1 作为 WT1 组,分别进行 3、6、9、12 h 培养。在进行检测之前,每次都需要取 10 μL的 CKK-8 试剂加入培养液中,持续 2 h 孵育,酶标450 nm检测吸光度(*OD*)值。将不含有任何培养液的细胞设置作为空白组,将应用 DMSO 处理后的细胞设置为 DMSD 组。各组分别设定 6 个副孔,连续进行 3 次重复试验,以平均值为准。采用公式对增殖抑制率进行计算,抑制率(%)=(DMSD 组－WT1 组)/(DMSD 组－空白组)×100%[6]。

1.2.4　流式细胞仪细胞凋亡分布　在 6 孔板上接种1×10^5 个/mL 对数生长期细胞,将其培养到汇合度达 70%～80%,向各孔中加入 10 μmol/L 的 WT1,持续培育 1 h 后对细胞进行收集。结合 Annex in VFITC/PI 双标记试验盒说明,应用 300 μL Binding Buffer 重悬沉淀,向其中加入 Annexin VFITC 5 mL,在充分混合后避光进行 10 min 孵育,向其中加入 PI 5 μL,充分混合后在避光条件下进行 5 min 孵育[7]。采用流式细胞仪对细胞的凋亡情况进行检测。

1.2.5　基质胶侵袭试验(Transwell)　取 WT1 10 μmol/L 加入放置对数生长期的 CNE-2 试管内,进行 1 h 消化处理后,经离心处理悬浮在无血清培养液内。对细胞进行调整,使其达到1×10^6 个/mL,在 Transwell 滤膜上每孔分别种入 100 μL,小室预先采用 Matrigel 基质胶包被,含 10%FBS 培养液加入到小室中,每组分别设置 3 个副孔;在培养箱内持续24 h培养,将其取出后连续进行 2 次 PBS 冲洗处理,对结晶紫进行染色,放置于显微镜下观察非细胞接种情况并拍照[8]。以加入的 DMSO 作为对照,连续进行 3 次试验。

1.3　统计学处理　采用 SPSS17.0 统计学软件进行数据分析处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　　果

2.1　Western blot 测定 CNE-2 生长情况　采用 Western blot 对 WT1 组、DMSO 组、空白组中 CNE-2 的生长情况进行测定,比较其 EGFR 表达信号强度。图 1 显示,WT1 组信号强度明显低于 DMSO 组和空白组,差异均有统计学意义($P<0.05$);DMSO 组和空白组信号强度比较差异无统计学意义($P>0.05$)。WT1 组细胞 EGFR/GAPDH 的检测灰度值为 0.358 ±

0.148，DMSO 组为1.370±0.068，空白组为1.390±0.077，WT1 组细胞 EGFR/GAPDH 的检测灰度值明显低于 DMSO 组和空白组，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。由此表明 WT1 能够有效实现对 CNE-2 的 EGFR 表达水平控制。

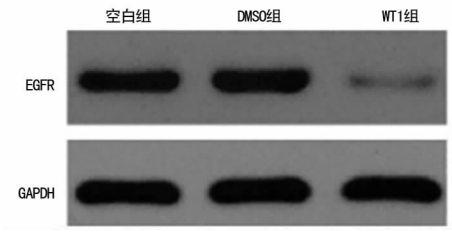

图 1　各组 CNE-2 细胞 1 h 后 EGFR 蛋白表达

2.2　WT1 对 CNE-2 增殖能力的影响　采用 WT1 对 CNE-2 进行 3、6、9、12 h 分别处理后，采用酶联免疫检测仪对其各孔的 *OD* 值进行测定，连续测试 3 次，取平均值。CKK-8 检测结果显示，应用 WT1 处理后 3 h 抑制值为 15.86±1.10，处理后 6 h 为 38.51±2.51，处理后 9 h 为 45.67±1.02，处理后 12 h为 52.95±0.75，随着时间延长，抑制值表现为逐渐增大，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；DMSO 组在处理后 3 h 抑制值为 0.47±0.98，处理后6 h为 0.95±1.14，处理后 9 h 为 1.35±0.46，处理后 12 h 为1.63±0.96，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。该结果充分表明，WT1 组细胞生长情况得到有效抑制，且随着时间延长其对 CNE-2 增殖抑制作用越强，见图 2。提示 WT1 能够实现对细胞增殖的有效抑制。

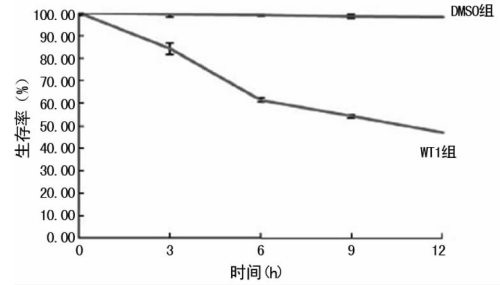

图 2　CKK-8 检测 WT1 对 CNE-2 增殖能力的影响

2.3　流式细胞术 WT1 对 CNE-2 凋亡能力的影响　见图 3。采用流式细胞仪对 CNE-2 凋亡分布情况进行观察，结果显示，空白组在处理后 CNE-2 凋亡率为（0.832±0.207）%，DMSO 组为（2.081±1.221）%，WT1 组为（20.731±1.104）%，WT1 组处理后细胞凋亡率明显高于空白组和 DMSO 组，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；空白组和 DMSO 组处理后细胞凋亡率比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。提示 WT1 能够加速 CNE-2 的凋亡。

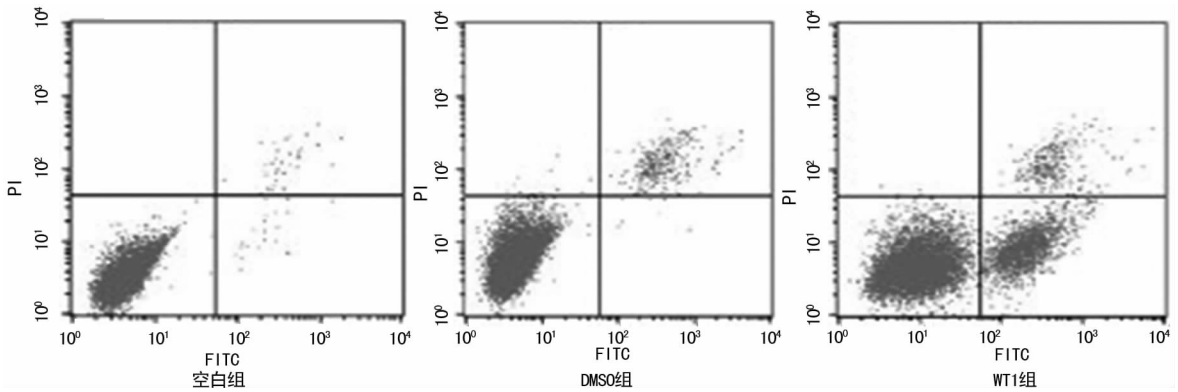

图 3　流式细胞术检测 WT1 对 CNE-2 细胞凋亡的影响

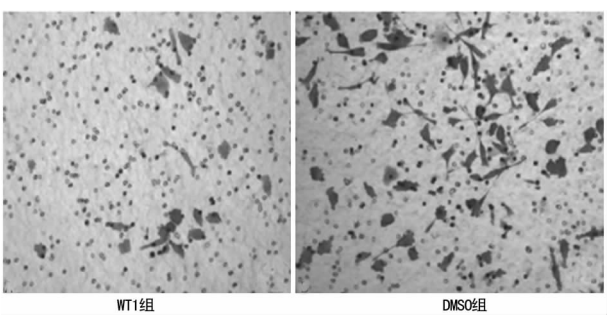

图 4　Transwell 测定 WT1 对 CNE-2 侵袭能力的影响

2.4　WT1 对 CNE-2 侵袭能力的影响　采用 Transwell 测定各组 CNE-2 侵袭能力，结果显示，DMSO 组在处理后其经过人工基膜的 CNE-2 数量为 67.21±2.17，WT1 组为20.13±2.25，WT1 组穿透细胞数量明显少于 DMSO 组，差异有统计学意义（$P<0.05$），见图 4。提示通过 WT1 干预，可较好地实现对 CNE-2 侵袭能力的抑制。

3　讨　论

有研究表明，在前列腺癌、神经胶质瘤、大肠癌、胰腺癌等恶性肿瘤中，特别是包含喉癌、鼻咽癌在内的各种头颈部鳞状细胞癌等上皮细胞来源的恶性肿瘤中，EGFR 均呈非常明显的异常扩增、活化及过度表达[9]。有研究发现，P13K-Akr 与 Ras-MAPK 是 EGFR 最主要的 2 个信号转导途径，在恶性肿瘤细胞

抑制凋亡、增殖、周期进展加速及增强 Ca^{2+} 等方面均发挥重要作用[10]，可有效帮助肿瘤细胞生长、存活得以强化，同时还可促使其侵袭能力增强。EGFR 与相对应的 WT1 结合后即可形成二聚体，使 EGFR 细胞能够迅速实现磷酸化，并对 2 条激酶途径造成刺激使其迅速活跃：经由细胞外信号调节激酶与 P13K-Akr 途径将外界的信号传输到细胞核中，并因此产生相应的生物学效应[11]。

WT1 得以确认主要与肾母细胞瘤的形成密切相关，故将其视为一种肿瘤抑制基因。肾母细胞瘤是小儿非常多见的一种肾脏恶性肿瘤，具有较高的病死率。肾母细胞瘤肿瘤抑制蛋白 WT1 作为一种转录调节蛋白，其能够对肿瘤的生长、凋亡及分化等过程进行有效调控[12]。在多种恶性肿瘤中均有野生型 WT1 的表达，而在正常细胞则表现为不表达或少表达。WT1 基因在对癌细胞的增殖和肿瘤形成上表现的抑制作用，又使其对肿瘤基因的抑制作用得以充分展现。例如：在 G401 细胞中导入 WT1-/-亚型可较好地实现对该细胞形态的改变，同时使无胸腺裸鼠体内的肿瘤得到明显控制。除此之外，在骨肉瘤细胞株中，通过检测发现，WT1 表达能够促使其信号通路得以改变，从而致使细胞迅速凋亡。另有研究者借助动物试验发现，WT1 能够对动物体内的肿瘤细胞进行有效抑制[13]。在肿瘤调控中，WT1 所发挥的具体作用机制尚无统一定论。

在鼻咽癌形成中 WT1 的具体作用目前尚不完全明确。作者在以往研究中证实，WT1 抗原负载的 DC 诱导 CIK 可有效增强 CNE 的体外杀伤作用[14]。通过对 CNE 细胞株 PLC/PRF/5 与 HepG2 进行检测发现均有 WT1 表达，且表达率达 42%[14]。除此之外，还有研究证实，鼻咽癌的预后效果与 WT1 呈负相关性[15]。本研究通过对 CNE-2 应用 WT1 进行处理，经 Western blot 观察发现，细胞中 EGFR 明显减少，并且信号带也表现为低信号；应用 CKK-8 对其做进一步检测发现，伴随时间的延长，WT1 组抑制值明显增加，细胞增殖速度得到明显控制；而流式细胞术检测结果提示，WT1 组细胞凋亡率明显高于空白组和 DMSO 组，表明 WT1 可加速细胞的凋亡速度。在 Transwell 中，WT1 组穿透细胞数量明显少于 DMSO 组，表明经过 WT1 处理后，CNE-2 的浸润转移能力得到抑制。总体来看，通过 WT1 干预能够促使 EGFR 的表达下调，促使其介导的一系列细胞传导通路得以改变，从而实现对 CNE-2 的增殖、侵袭能力的控制。

综上所述，靶向 WT1 抗原能够有效实现对 CNE-2 增殖、侵袭能力的抑制，在鼻咽癌治疗中，可将其作为一项重要的靶向基因。

参考文献

[1] 李彩红，汪建，徐夏. miR-375 通过靶向 NLK 影响鼻咽癌的增殖及迁移[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志，2018，24(3)：236-242.

[2] 刘春丽，张洁，齐志伟，等. MiR-130a-3p 通过抑制 BACH2 抑制鼻咽癌细胞增殖和转移[J]. 中国地方病防治杂志，2017，32(12)：1355-1357.

[3] 杨伟斌，刘志毅，曹宽，等. 表皮生长因子受体家族特点及与肿瘤关系的研究进展[J]. 现代肿瘤医学，2019，27(2)：346-351.

[4] 陈俊玲，杨芝春. Wilms 肿瘤基因在生长发育及非肿瘤性疾病中作用研究[J]. 中南医学科学杂志，2018，46(3)：232-235.

[5] 毛建平，朱华渊，沈文怡，等. 超小剂量地西他滨对骨髓增生异常综合征 $CD4^-$ + $CD25^-$ + $CD127^-$ (low)调节性 T 细胞及 WT1 基因水平的影响研究[J]. 中国实用内科杂志，2018，38(5)：475-477.

[6] 雷越，万婕，文韬宇，等. siRNA 沉默 FOXM 1 基因表达对人鼻咽癌细胞增殖、凋亡及化疗敏感性的影响[J]. 肿瘤，2018，38(1)：25-34.

[7] 王晓明，范慧康，刘旸，等. 靶向敲除 WT1 基因诱导人肺癌 A549 细胞凋亡[J]. 中国实验诊断学，2017，21(8)：1433-1436.

[8] 陈虹宇，刘春燕，宋婷婷. 以 WT1 为靶点的恶性肿瘤主动特异性免疫治疗的临床转化研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志，2017，24(1)：68-72.

[9] 张珺，阿祥仁. 青海地区 CXCL16、CXCR6、EGFR 及 sCXCL16 在非小细胞肺癌患者肺组织中表达及临床意义[J]. 国际检验医学杂志，2018，39(22)：2836-2841.

[10] 冷雪峰，梅建东，刘伦旭. EGFR 突变调控肺腺癌 PD-L1 表达的分子机制研究进展[J]. 中国肺癌杂志，2018，21(11)：875-879.

[11] 张乃友，刘佳. EGFR 和 CXCL14 在大肠癌组织中的表达[J]. 解剖科学进展，2018，24(6)：567-569.

[12] 何玲，吴红卫，谭大为. 急性髓系白血病患者外周血 WT1 基因的表达水平及其与血清 IL-6、C3、C4 的关系[J]. 癌症进展，2018，16(4)：512-515.

[13] OH J K，WFIDFRPASS F. Infection and cancer；global distribution and burden of diseases[J]. Ann Glob Hcalth，2014，80(5)：384-392.

[14] 方慧云，程伟民，季明芳. WT1 抗原负载的 DC 联合 CIK 对鼻咽癌细胞的体外杀伤活性研究[J]. 黑龙江医学，2015，39(7)：731-732.

[15] CHEN W，ZHENG R，BAADE P D，et al. Cancer statistics in China，2015[J]. CA Cancer J Clin，2016，66(2)：115-132.

（收稿日期：2018-10-24　修回日期：2018-12-06）