

# GRP78在食管癌细胞ECA-109增殖过程中的功能研究

丁伟超<sup>1,2,3</sup> 马岩岩<sup>1,2</sup> 邱贤秀<sup>1,2</sup> 王绍祥<sup>1,2</sup> 王莹<sup>3\*</sup> 任哲<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>暨南大学生物医药研究开发基地, 广东省生物工程药物重点实验室, 广州 510632;  
<sup>2</sup>基因工程药物国家工程研究中心, 广州 510632; <sup>3</sup>暨南大学生命科学技术学院, 广州 510632)

**摘要** 食管癌在中国是高发性肿瘤, 并具有较高的致死率。肿瘤细胞的持续增殖与细胞增殖失调密切相关。肿瘤细胞在增殖过程中需要合成大量蛋白质, 葡萄糖调节蛋白78(glucose regulated protein, GRP78)作为分子伴侣, 在蛋白质的折叠、组装、修饰和错误折叠蛋白的降解过程中发挥着重要作用。该研究通过构建pGRP78-EGFP-N1重组质粒, 瞬时转染ECA-109细胞, 研究GRP78过表达对细胞增殖能力的影响; 采用RNA干扰技术, 瞬时转染靶向GRP78的siRNA, 研究敲低GRP78对细胞增殖能力的影响。该研究发现GRP78过表达后, 更多的细胞从G<sub>1</sub>期进入S期和G<sub>2</sub>/M期, 细胞增殖速率加快, 细胞克隆形成率亦明显提高; 敲低GRP78后, 细胞更多地被阻滞在G<sub>1</sub>期而无法进入S期和G<sub>2</sub>/M期, 细胞增殖速率减慢, 细胞克隆形成率降低。GRP78可能通过调节细胞周期而促进ECA-109细胞的增殖。

**关键词** GRP78; 过表达; RNA干扰; 增殖; 细胞周期; ECA-109细胞

## Study the Function of GRP78 in Cell Proliferation Process in Esophageal Cancer Cell Line ECA-109

Ding Weichao<sup>1,2,3</sup>, Ma Yanyan<sup>1,2</sup>, Qiu Xianxiu<sup>1,2</sup>, Wang Shaoxiang<sup>1,2</sup>, Wang Ying<sup>3\*</sup>, Ren Zhe<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>Biomedicine Research and Development Center of Jinan University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Bioengineering Medicine, Guangzhou 510632, China; <sup>2</sup>National Engineering Research Center of Genetic Medicine, Guangzhou 510632, China; <sup>3</sup>College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract** In China, esophageal cancer is a malignant tumor of high incidence and high mortality. Sustained proliferation of tumor cells is closely related to the cell proliferation disorder. Large amounts of proteins need to be synthesized during tumor cell proliferation process. GRP78 as a molecular chaperone, plays an important role in the process of protein folding, assembly, modification and misfolded protein degradation. The research studied the influence of proliferation ability with over-expression or knock-down of GRP78 in ECA-109 cells through transient transfection of GRP78 recombinant plasmid pGRP78-EGFP-N1 or siRNA, respectively. The study found that after GRP78 over-expression, more cells converted from G<sub>1</sub> phase to S and G<sub>2</sub>/M phases, then cell proliferation rate and cell clony formation rate were increased; as well as after knock-down GRP78, more cells were arrested in G<sub>1</sub> phase and couldn't transfer into S and G<sub>2</sub>/M phases, then cell proliferation rate and cell clony formation rate were

收稿日期: 2012-10-08 接受日期: 2012-10-31

广东省教育厅高等学校高层次人才项目(批准号: 粤教师函[2010]79号)和中国博士后科学基金(批准号: 2012M511882)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 020-85220219, E-mail: yingwang331@163.com; Tel: 020-85222706-319, E-mail: rz62@163.com

Received: October 8, 2012 Accepted: October 31, 2012

This work was supported by the Foundation for High-level Talents in Higher Education of Guangdong (Grant No. Guangdong Teachers Letter[2010]79) and the General Financial Grant from China Postdoctoral Science Foundation (Grant No.2012M511882)

\*Corresponding author. Tel: +86-20-85220219, E-mail: yingwang331@163.com; Tel: +86-20-85222706-319, E-mail: rz62@163.com

reduced. GRP78 may promote ECA-109 cell proliferation by regulating the cell cycle.

**Key words** GRP78; over-expression; RNAi; proliferation; cell cycle; ECA-109 cell

食管癌是发生在食管上皮组织的恶性肿瘤,它严重威胁着人类的健康。在世界范围内食管癌是最为常见的癌症之一,食管癌是第六大致死性癌症<sup>[1]</sup>。和西方国家相比,中国的食管癌更为普遍,太行山以南的一些地区(如河南、山西、河北)食管癌死亡率较高<sup>[2]</sup>。中国疾病预防控制中心给出的统计报告显示,2000年全国慢性病死亡人数731万,其中死于肿瘤的140多万,占死亡总人数的19.3%。在这140多万肿瘤死亡者中,因为食管癌而死亡的有大约14万<sup>[3]</sup>。食管癌的发病率排在中国肿瘤发病率的第六位,其死亡率排在第四位。

热休克蛋白70(heat shock protein 70, Hsp70)家族是细胞分子伴侣和蛋白折叠反应中的重要组成部分<sup>[4]</sup>。葡萄糖调节蛋白78(glucose regulated protein, GRP78),又名免疫球蛋白重链结合蛋白(the immunoglobulin heavy chain binding protein, Bip),与Hsp70家族具有高度同源性,被认为是Hsp70家族中的一员,在蛋白质的折叠、组装以及错误蛋白的降解过程中发挥着重要作用。同时,GRP78还参与了信号转导和钙平衡的维持,在肿瘤细胞的发生发展过程中扮演着重要角色<sup>[5]</sup>。研究发现,在食管癌组织中的GRP78表达量高于正常组织,GRP78表达量高的食管癌病人较之表达量低的病人生存期更短<sup>[6]</sup>。但GRP78在食管癌发生发展中的功能研究鲜有报道,本文通过过表达和敲低GRP78,研究其在食管癌增殖过程中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞 食管癌细胞ECA-109购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,培养于1640培养基+10%胎牛血清、5% CO<sub>2</sub>、37 °C培养箱中。

1.1.2 主要试剂 Trizol、RT-PCR试剂盒、质粒

中抽试剂盒购自Invitrogen公司; KOD DNA聚合酶、核酸Marker(DL5 000)、限制性核酸内切酶PST1和KPN1、T4 DNA连接酶均购自宝生物工程(大连)有限公司; 大肠杆菌DH5 $\alpha$ 购自Promega公司; 哺乳动物细胞表达载体pEGFP-N1购自Novagen公司; 质粒抽提和DNA胶回收试剂盒均购自Omega公司; 一抗(兔抗人GRP78)购自Cell Signaling Technology公司; 二抗(羊抗兔)购自Millipore公司; 蛋白预染Marker购自Fermentas公司; 超敏ECL化学发光试剂盒购自上海碧云天生物科技有限公司。Lipofectamine2000购自Invitrogen公司; OPTI-MEM购自Gibco公司。

1.1.3 GRP78引物设计 根据GRP78基因序列(Gene ID: 3309, NM\_005347.4)使用Primer Premier5.0设计包含PST1和KPN1酶切位点(加粗)的GRP78引物,交由华大基因合成。引物序列为:上游引物: 5'-AAC TGC AGA TGA AGC TCT CCC TGG TGG-3', 下游引物: 5'-CGG GGT ACC GAC AAC TCA TCT TTT TCT GC-3'。

1.1.4 靶向GRP78的siRNA 特异靶向高效沉默GRP78的siRNA由本实验室设计筛选,阴性对照siN.C由上海吉玛制药技术有限公司提供,序列见表1。siRNA和siN.C均由上海吉玛制药技术有限公司合成。

### 1.2 方法

1.2.1 pGRP78-EGFP-N1重组质粒的构建与鉴定 ECA-109细胞长至80%~90%融合时,25 cm<sup>2</sup>培养瓶中加入1 mL Trizol裂解液提取细胞总RNA,立即反转录为cDNA。以cDNA为模版,PCR扩增GRP78,PCR反应条件为:94 °C预变性3 min; 94 °C变性30 s, 60 °C退火30 s, 68 °C延伸75 s, 30个循环; 68 °C延伸10 min; 4 °C结束反应。PST1和KPN1双酶切GRP78,将酶切后的目的片段插入p-EGFP-N1质粒构建成pGRP78-EGFP-N1重组质粒。重组pGRP78-EGFP-N1转化感受态大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,铺平板挑取阳性单克隆,菌液

表1 siRNA序列

Table 1 siRNA sequence

基因	正义链(5'-3')	反义链(5'-3')
Genes	Sense primer(5'-3')	Antisense primer(5'-3')
siRNA	GGC AGC UGC UAU UGC UUA UdTdT	AUA AGC AAU AGC AGC UGC CdTdT
siN.C	UUC UCC GAA CGU GUC ACG UdTdT	ACG UGA CAC GUU CGG AGA AdTdT

抽质粒, PCR鉴定和双酶切鉴定后由华大基因测序。

1.2.2 GRP78过表达对ECA-109细胞增殖的影响  
参考Invitrogen质粒抽提试剂盒说明书抽提pGRP78-EGFP-N1质粒, Nanodrop2000检测质粒纯度和浓度。将对数生长期的ECA-109细胞消化计数铺于6孔板中, 每孔 $4 \times 10^5$ 细胞, 充分贴壁、待细胞长至近90%融合时, 参照lipofectamine2000说明书瞬时转染pGRP78-EGFP-N1, 同时设立空白对照组(只加培养基)和阴性对照组(转染p-EGFP-N1), 转染6 h后换培养液继续培养。

Western blot检测GRP78过表达效果: ECA-109细胞瞬时转染48 h后, 消化, 洗涤, 收集细胞, RAPI裂解, BCA蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度, 调整蛋白浓度后变性,  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。将蛋白进行8% SDS-PAGE, 每孔上样量40  $\mu\text{g}$ 。电泳结束后, 根据预染Marker切下目的胶片, 稳流200 mA转膜90 min。转膜结束后, 将膜于TBS中洗5 min, 5%脱脂奶粉封闭1 h, TBST洗3次, 每次5 min,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育一抗过夜。一抗孵育完成后, 将膜于TBST中洗3次, 每次5 min,  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育二抗1 h后TBST中洗3次, 每次5 min。暗房中显影, 将膜上液体吸净, 于ECL反应混合液中2 min, 压X光片, 显影、定影、漂洗、晾干后扫描。

MTT法检测GRP78过表达对ECA-109细胞增殖的影响: 将瞬时转染24 h后的细胞消化计数, 铺于96孔板中, 每孔2 000个细胞, 每组6个复孔。分别培养12, 24, 36, 48, 60, 72 h后, 每孔加入5 mg/mL的MTT 20  $\mu\text{L}$ ,  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育4 h后吸尽MTT, 每孔加100  $\mu\text{L}$  DMSO, 震荡充分溶解10 min, 酶标仪570 nm检测波长, 630 nm参考波长, 检测 $D_{570}$ 吸光度, 计算细胞增殖率。以各组培养12 h后的 $D_{570}$ 吸光度作为对照, 细胞增殖率=(培养N小时后的 $D_{570}$ 吸光度/相应组培养12 h后的 $D_{570}$ 吸光度) $\times 100\%$ 。

细胞克隆形成实验检测GRP78过表达后对ECA-109细胞克隆形成的影响: 细胞消化计数后铺于6孔板中, 200细胞/孔, 5%  $\text{CO}_2$ 、 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养10 d, 每2 d换一次培养液。培养结束后吸尽培养基, PBS洗涤2次, 甲醇固定, GIEMSA染色, 去离子水漂洗、晾干, 统计克隆形成数。

细胞流式术检测GRP78过表达后对ECA-109细胞周期的影响: 细胞周期检测采用碘化丙啶染细胞DNA的方法。细胞瞬时转染48 h后消化洗涤收集细胞, 70%乙醇固定,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜。固定后的细胞PBS洗涤

后, 1 mL PI染液重悬(PI: 50 mg/mL, 包含100  $\mu\text{g/mL}$  RNase), 黑暗中孵育30 min。流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.3 敲低GRP78对ECA-109细胞增殖的影响  
将对数生长期的ECA-109细胞消化计数铺于六孔板中, 每孔 $2 \times 10^5$ 细胞, 充分贴壁, 待细胞长至近40%融合时, 参照lipofectamine2000说明书瞬时转染siRNA, 同时设立空白对照组(只加培养基)和阴性对照组(转染siN.C)。转染6 h后换培养液继续培养。Western blot检测GRP78沉默效果, MTT法检测敲低GRP78对ECA-109细胞增殖的影响, 细胞克隆形成实验检测敲低GRP78后对ECA-109细胞克隆形成的影响, 细胞流式术检测敲低GRP78后对ECA-109细胞周期的影响, 检测方法同1.2.2。

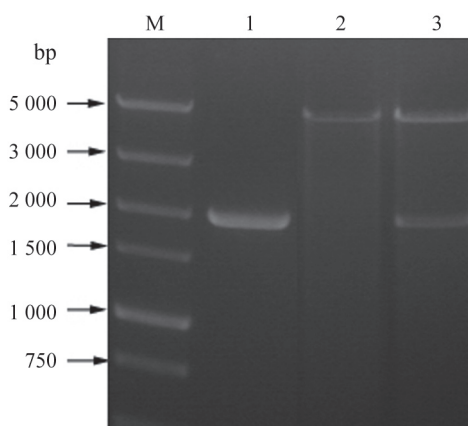
### 1.3 统计分析

实验结果采用SPSS 17.0统计软件分析, 组间数据差异分析采用独立样本t检验。 $P < 0.05$ 认为有显著差异,  $P < 0.01$ 认为有极显著差异。

## 2 结果

### 2.1 pGRP78-EGFP-N1重组质粒的构建与鉴定

pGRP78-EGFP-N1重组质粒双酶切电泳出现两条带, 与pEGFP-N1(4.7 Kb)双酶切产物条带和GRP78(1 965 bp) PCR扩增产物条带位置一致, 结果见图1。测



M: DL5 000 DNA分子标记; 1: GRP78 PCR产物; 2: pEGFP-N1 *PST1*和*KPN1*双酶切产物; 3: pGRP78-EGFP-N1重组质粒*PST1*和*KPN1*双酶切产物。

M: DL5 000 DNA molecular marker; 1: PCR products of GRP78; 2: *PST1* and *KPN1* double restriction enzyme digestion product of pEGFP-N1; 3: *PST1* and *KPN1* double restriction enzyme digestion products of pGRP78-EGFP-N1 recombinant plasmid.

图1 pGRP78-EGFP-N1重组质粒双酶切鉴定

Fig.1 Double digestion of pGRP78-EGFP-N1 recombinant plasmid

序结果递交BLAST进行比对, 结果与NCBI中 $GRP78$ 基因序列相同(Gene ID: 3309, NM\_005347.4), 无基因突变, pGRP78-EGFP-N1重组质粒构建成功。

## 2.2 pGRP78-EGFP-N1重组质粒功能鉴定

转染48 h后, 荧光显微镜下观察发现pEGFP-N1质粒或pGRP78-EGFP-N1重组质粒转染细胞均产生荧光, 重组质粒pGRP78-EGFP-N1可以在细胞内正常表达, 具有生物学功能, 结果见图2。

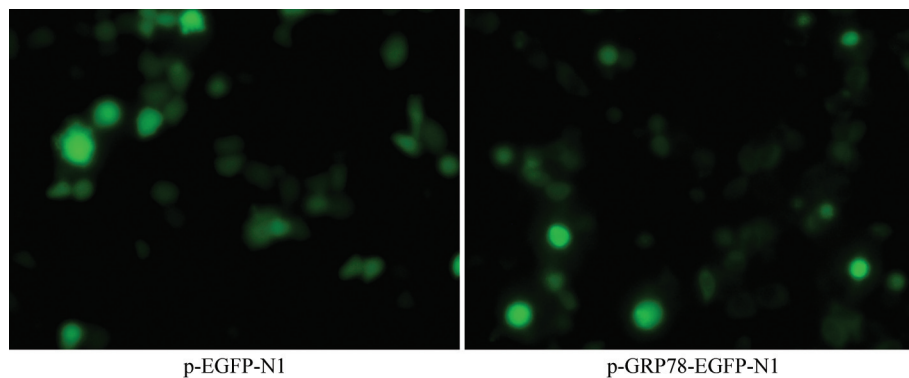


图2 pGRP78-EGFP-N1重组质粒功能鉴定(400×)

Fig.2 Functional identification of pGRP78-EGFP-N1 recombinant plasmid(400×)

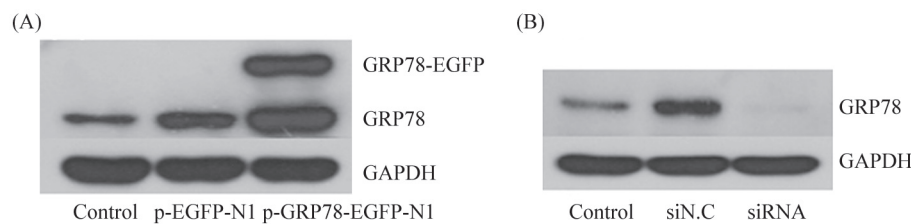


图3 Western blot检测过表达或敲低 $GRP78$ 的效果

Fig.3 Western blot analysis of over-expression or knock-down of  $GRP78$

## 2.4 过表达或敲低 $GRP78$ 对细胞增殖的影响

在不同时间MTT法检测ECA-109细胞增殖发现,  $GRP78$ 过表达组ECA-109细胞增殖率(cell proliferation rate, CPR)明显高于阴性对照组, 二者有极显著差异( $P < 0.01$ ), 结果如图4A所示; 敲低 $GRP78$ 组ECA-109细胞增殖率明显低于阴性对照组, 二者有极显著差异( $P < 0.01$ ), 结果如图4B所示。

## 2.5 过表达或敲低 $GRP78$ 对细胞克隆形成的影响

细胞克隆实验发现,  $GRP78$ 过表达组ECA-109细胞克隆形成率(cell clony formation rate, CCFR)明显增高, 与阴性对照组相比具有极显著差异( $P < 0.01$ ), 结果

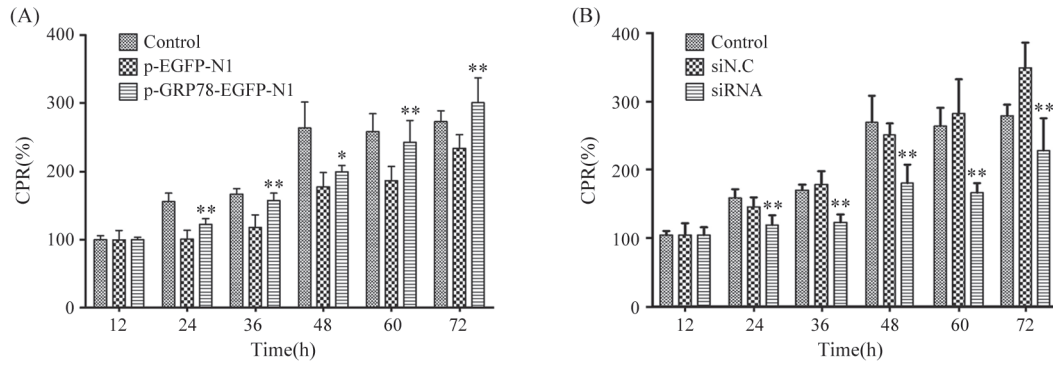
## 2.3 Western blot检测过表达或敲低 $GRP78$ 的效果

Western blot发现, 转染pGRP78-EGFP-N1重组质粒后,  $GRP78$ 蛋白以及 $GRP78$ -EGFP融合蛋白表达总量明显高于阴性对照组和空白对照组, 表明转染的pGRP78-EGFP-N1重组质粒可有效过表达 $GRP78$ , 结果如图3A所示。转染siRNA后,  $GRP78$ 蛋白表达量显著低于阴性对照组和空白对照组, siRNA可有效沉默 $GRP78$ 基因, 结果如图3B所示。

见图5A; 敲低 $GRP78$ 组ECA-109细胞克隆形成率明显降低, 与阴性对照组相比有显著差异( $P < 0.05$ ), 结果见图5B。

## 2.6 过表达或敲低 $GRP78$ 对细胞周期的影响

与阴性对照组相比,  $GRP78$ 过表达组ECA-109细胞处于S期和 $G_2/M$ 期的比例明显升高, 更多的细胞从 $G_1$ 期进入S期和 $G_2/M$ 期, 细胞增殖更加活跃, 结果见图6A。敲低 $GRP78$ 组ECA-109细胞处于 $G_1$ 期的细胞明显增多, 而处于S期和 $G_2/M$ 期的细胞明显减少, 更多的细胞被阻滞在 $G_1$ 期而不能进入S期和 $G_2/M$ 期完成分裂, 结果见图6B。

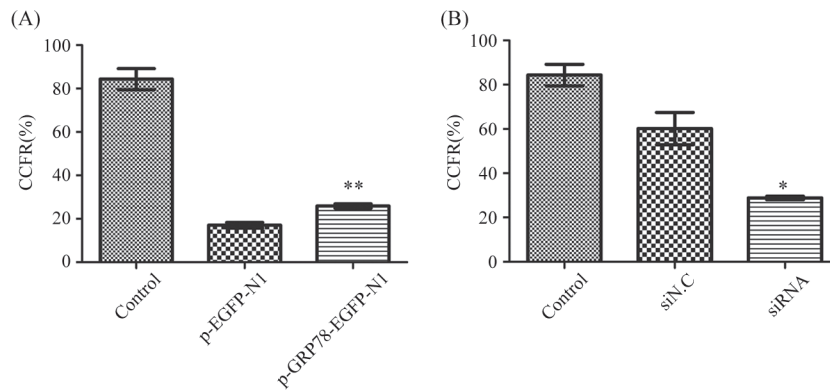


\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与siN.C组比较。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with siN.C group.

图4 MTT检测过表达或敲低GRP78后细胞增殖率

Fig.4 MTT analysis of cell proliferation rate with over-expression or knock-down of GRP78



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与siN.C组比较。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with siN.C group.

图5 过表达或敲低GRP78对细胞克隆形成的影响

Fig.5 The influence of cell clone formation rate with over-expression or knock-down of GRP78

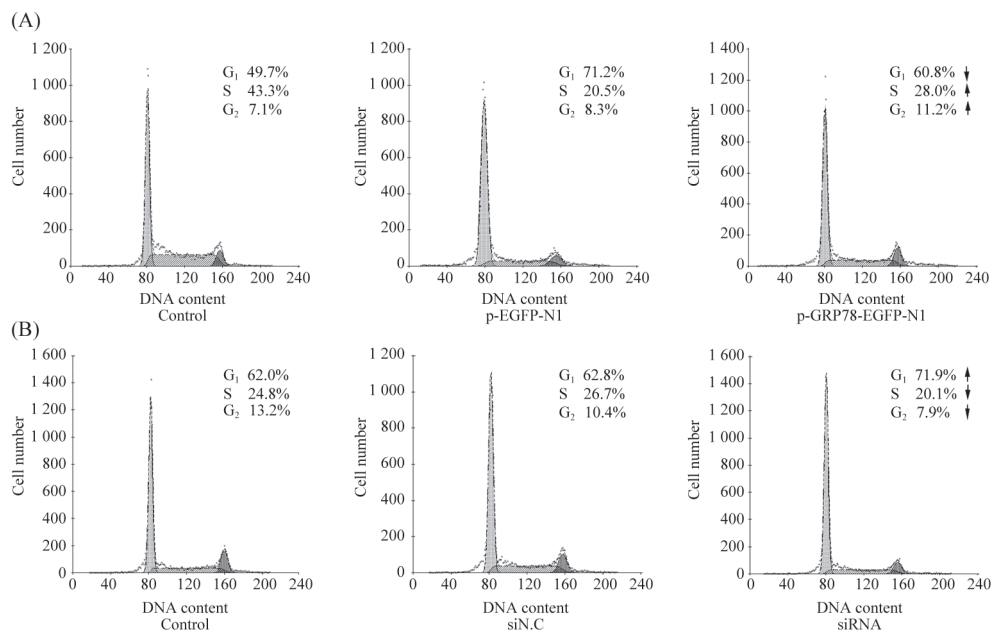


图6 过表达或敲低GRP78对细胞周期的影响

Fig.6 The influence of cell cycle with over-expression or knock-down of GRP78

### 3 讨论

在国内,食管癌发病率较高,严重影响了人类的健康与生活质量。食管癌的发生发展与Plummer-Vinson综合征、头颈癌病史、食管腐蚀性损伤、吸烟、嗜酒等众多因素相关<sup>[7]</sup>。GRP78是Hsp70家族中的一员,在食管癌等多种实体瘤中异常高表达,在肿瘤的发生发展过程中发挥着重要作用。GRP78作为分子伴侣在蛋白质的合成、组装、修饰过程中也有重要作用。肿瘤细胞可以长期增殖,并且可以逃避机体对其生长的抑制<sup>[8]</sup>,肿瘤细胞增殖失去控制是其区别于正常组织细胞的一个重要特点,许多化疗药物对肿瘤的抑制作用在于其对细胞增殖的干预<sup>[9]</sup>。肿瘤细胞快速增殖过程中需要合成大量蛋白质,而蛋白质的正确折叠与组装等过程均需要GRP78的参与。

本研究利用哺乳动物细胞过表达质粒pEGFP-N1构建GRP78过表达载体pGRP78-EGFP-N1;利用RNA干扰技术,靶向下调GRP78 mRNA,进而下调GRP78的蛋白表达水平,研究过表达或敲低GRP78后对ECA-109细胞增殖能力的影响。实验结果显示,lipofectamine2000具有一定的细胞毒性,在转染过程中会引起细胞的部分死亡,表现为瞬时转染实验组和阴性对照组的细胞增殖率、细胞克隆形成率均低于空白对照组,同时细胞周期发生改变。GRP78作为内质网应激中的关键蛋白<sup>[10]</sup>,lipofectamine2000可能会引起食管癌细胞ECA-109内质网应激水平的提高,表现为阴性对照组较之空白对照组GRP78的高表达。

本研究发现GRP78过表达后,会引起ECA-109细胞增殖速率和细胞克隆形成率明显增高;敲低GRP78后,ECA-109细胞增殖速率和细胞克隆形成率明显降低,说明GRP78对于ECA-109细胞增殖是必要

的,GRP78的高表达促进了ECA-109细胞增殖。细胞周期检测结果显示,GRP78过表达后使更多的ECA-109细胞处于S期和G<sub>2</sub>/M期;敲低GRP78后导致更多的细胞处于G<sub>1</sub>期,而S期和G<sub>2</sub>/M期细胞减少。GRP78过表达可能通过调节细胞周期,使更多的ECA-109细胞从G<sub>1</sub>期进入S期和G<sub>2</sub>/M期,从而促进ECA-109细胞的增殖。本研究结果为GRP78作为抗肿瘤药物的潜在靶标提供了理论依据。

### 参考文献 (References)

- 1 Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Erratum: Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int. J. Cancer*, 83, 18-29 (1999). *Int J Cancer* 1999; 83(6): 870-3.
- 2 Oka M, Yamamoto K, Takahashi M, Hakozaki M, Abe T, Iizuka N, *et al.* Relationship between serum levels of interleukin 6, various disease parameters and malnutrition in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56(12): 2776-80.
- 3 陈万青, 张思维, 郑荣寿, 雷正龙, 李光琳, 邹小农, 等. 中国肿瘤登记地区2007年肿瘤发病和死亡分析. 中国肿瘤(Chen Wanqing, Zhang Siwei, Zheng Rongshou, Lei Zhenglong, Li Guanglin, Zou Xiaonong, *et al.* A report of cancer incidence and mortality from 38 cancer registries in China, 2007. *China Cancer*) 2011; 20(3): 162-9.
- 4 Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62(6): 670-84.
- 5 Dudek J, Benedix J, Cappel S, Greiner M, Jalal C, Muller L, *et al.* Functions and pathologies of BiP and its interaction partners. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66(9): 1556-69.
- 6 Du XL, Hu H, Lin DC, Xia SH, Shen XM, Zhang Y, *et al.* Proteomic profiling of proteins dysregulated in Chinese esophageal squamous cell carcinoma. *J Mol Med* 2007; 85(8): 863-75.
- 7 Enzinger PC, Mayer RJ. Medical progress esophageal cancer. *New Engl J Med* 2003; 349: 2241-52.
- 8 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646-74.
- 9 Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; 411(6835): 342-8.
- 10 Sou SN, Ilieva KM, Polizzi KM. Binding of human BiP to the ER stress transducers IRE1 and PERK requires ATP. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 420(2): 473-8.