

· 基础研究 ·

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2022.10.005

BNC1 调控食管鳞状细胞癌细胞的恶性生物学行为及其可能的作用机制

熊黎^{ab}, 熊蓉^a, 刘燕群^c, 谭劲松^c, 张若兰^{ab}, 岳秋菊^a, 宋桂芹^c, 冯刚^a, 刘康^a(川北医学院 a. 第二临床医学院 南充市中心医院 组织工程与干细胞研究所; b. 医学检验系; c. 基础医学与法医学院, 四川 南充 637100)

[摘要] **目的:** 探讨碱性核蛋白1(BNC1)对食管鳞状细胞癌(ESCC)细胞增殖、迁移、侵袭、细胞周期和凋亡的影响及其作用机制。**方法:** 通过qPCR法检测ESCC细胞和正常食管上皮细胞中BNC1 mRNA的表达水平,免疫组织化学染色法检测10例ESCC患者癌及癌旁组织中BNC1的蛋白表达水平。利用siRNA敲低BNC1在KYSE-150和KYSE-30细胞中的表达,CCK-8法、划痕愈合实验、Transwell实验和流式细胞术检测BNC1对细胞增殖、迁移、侵袭、细胞周期和凋亡等的影响。通过CHIP-seq实验和GEPIA在线网站数据分析并结合敲低BNC1后的转录组测序数据分析筛选BNC1调控的下游靶基因,qPCR法验证BNC1敲低后靶基因的表达变化,并用双荧光素酶报告基因实验验证BNC1对靶基因的调控作用。**结果:** BNC1 mRNA和蛋白水平在ESCC组织中较癌旁组织高表达(均 $P<0.01$)。敲低BNC1可明显抑制KYSE-150、KYSE-30细胞的增殖、迁移和侵袭能力($P<0.05$ 或 $P<0.01$),将细胞阻滞于G1期并促进细胞的凋亡(均 $P<0.01$)。CHIP-seq实验结果和在线网站GEPIA数据分析结合敲低BNC1后的转录组测序数据显示,G蛋白通路抑制因子1(GPS1)可能为BNC1正向调控的致癌靶基因。qPCR法和双荧光素酶报告基因实验结果显示,BNC1对GPS1有调控作用($P<0.01$)。**结论:** BNC1在ESCC组织和细胞中高表达,干扰BNC1可显著抑制ESCC细胞的增殖、迁移和侵袭能力,阻滞细胞于G1期并促进细胞凋亡,其机制可能是BNC1通过靶向GPS1调控ESCC细胞的恶性生物学行为。

[关键词] 食管鳞状细胞癌;碱性核蛋白1;G蛋白通路抑制因子;增殖;迁移;侵袭;凋亡

[中图分类号] R735.1;R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)10-0896-08

BNC1 regulates the malignant biological behaviors of esophageal squamous cell carcinoma cells and its possible mechanism

XIONG Li^{ab}, XIONG Rong^a, LIU Yanqun^c, TAN Jingsong^c, ZHANG Ruolan^{ab}, YUE Qiuju^a, SONG Guiqin^c, FENG Gang^a, LIU Kang^a
(a. Institute of Tissue Engineering and Stem Cells, the Second Clinical Medical College & Nanchong Central Hospital; b. Department of Laboratory Medicine; c. School of Basic Medicine and Forensic Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637100, Sichuan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects of basonuclin 1 (BNC1) on the proliferation, migration, invasion, cell cycle and apoptosis of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells and its mechanism. **Methods:** The mRNA expression level of BNC1 in ESCC cells and normal esophageal epithelial cells was detected by qPCR. The protein expression level of BNC1 in cancer and para-cancerous tissues of 10 ESCC patients was detected by immunohistochemical staining. The expression of BNC1 in KYSE-150 and KYSE-30 cells was down-regulated by siRNA, and the effects of BNC1 on cell proliferation, migration, invasion, cell cycle and apoptosis were investigated using CCK-8, scratch healing, Transwell and flow cytometry assays, respectively. The downstream target genes of BNC1 were identified by ChIP-seq assay and GEPIA online website date analysis combined with knockdown transcriptome sequencing data after BNC1 knockdown. qPCR was used to verify the expression of target genes after BNC1 knockdown, and dual luciferase reporter gene assay was used to confirm the regulatory effect of BNC1 on the target genes. **Results:** The mRNA and protein levels of BNC1 were higher in ESCC tissues than in para-cancerous tissues (all $P<0.01$). Knockdown of BNC1 significantly inhibited the proliferation, migration and invasion of KYSE-150 and KYSE-30 cells ($P<0.01$ or $P<0.01$), arrested the cells in G1 phase and promoted the cell apoptosis (all $P<0.01$). The results of ChIP-seq assay and online website GEPIA date analysis combined with transcriptome sequencing data indicated after BNC1 knockdown that G protein pathway repressor 1 (GPS1) may be a oncogenic target gene that positively regulated by BNC1. The results of qPCR and dual luciferase reporter gene assay showed that BNC1 had a regulatory effect on GPS1 ($P<0.01$). **Conclusion:** BNC1 is highly expressed in ESCC tissues and cells. Interfering with BNC1

[基金项目] 四川省卫生健康委员会科研资助项目(No. 20PJ177);南充市市校科技战略合作项目(No. 20SXQT0328, No. 20SXPTJS0003)

[作者简介] 熊黎(1998—),男,硕士生,主要从事食管癌生物治疗研究,E-mail: 2639532361@qq.com

[通信作者] 刘康,E-mail: liukang@nsmc.edu.cn

significantly inhibits the proliferation, migration and invasion of ESCC cells, arrests cells at G1 phase and promotes cell apoptosis possibly by targeting GPS1 to regulate the malignant biological behaviors of ESCC cells.

[Key words] esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); basonuclin 1 (BNC1); G protein pathway inhibitor 1 (GPS1); proliferation; migration; invasion; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(10): 896-903. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.10.005]

食管癌(esophageal carcinoma, ESCA)是世界上第6大致死恶性肿瘤,其中绝大多数的确诊病例为食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)^[1-2];中国ESCA为第4大常见恶性肿瘤,其中90%的病理类型为ESCC^[3-4]。由于现有的ESCC治疗预后差且5年生存率低于20%^[5-6],因此,寻找新的治疗靶基因并探明其分子作用机制,对于ESCC的预防和治疗均具有重要的意义。碱性核蛋白1(basonuclin1, BNC1)是一种特异性锌指蛋白,在进化过程中较为保守,在体外培养的人表皮角质形成细胞中首次发现了BNC1,其可能在生殖细胞中发挥着重要的作用^[7-8]。更多的研究结果显示,BNC1与肿瘤的发生密切相关,其在头颈部鳞状细胞癌中受转录因子肿瘤蛋白P63调控而表达上调^[9],在基底细胞癌中被Gli蛋白调控而高表达^[10]。但是BNC1在ESCC发生发展中的作用及其机制尚未明了。因此,本实验以ESCC细胞KYSE-150和KYSE-30为研究对象,通过siRNA敲低BNC1的表达,观察其对ESCC细胞恶性生物学行为的影响,为阐明ESCC发生发展的分子机制及治疗ESCC提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 GEPIA 在线生信网站预测 BNC1 在 ESCA 组织和正常组织中的表达

通过GEPIA(<http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php>)在线生信网站预测BNC1基因在ESCA组织和正常组织中的表达差异。设置条件为:匹配TCGA数据库,|Log₂FC|Cut-off=1, P value Cut-off=0.01, Jitter Size=0.4。

1.2 组织标本、细胞及主要试剂

收集2020年1月至2020年12月在川北医学院第二临床医学院收治的10例ESCC患者的癌及对应癌旁组织标本。ESCC细胞KYSE-30和KYSE-410购自武汉普诺赛生命科技有限公司, KYSE-150和TE-1购自上海吉凯基因有限公司,正常食管上皮细胞HET-1A购自上海逸轩生物科技有限公司。RPMI 1640培养基、DMEM培养基和0.25%胰蛋白酶均购自美国HyClone公司,胎牛血清(FBS)和无EDTA胰蛋白酶购自美国赛默飞公司, CCK-8检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒和RNAi序列购自南京凯基生物科技发展有限公司,细胞凋亡检测试剂盒、RNA提取试剂盒(FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation

Kit)、逆转录试剂盒(HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit)和SYBR Green Master Mix均购自南京诺维赞生物有限公司, BNC1多克隆抗体(P5A-85954)和Lipofectamine™ 2000购自美国赛默飞公司, GAPDH一抗(AF5009)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG(A0208)和山羊抗小鼠IgG(A0216)购自碧云天公司,免疫组织化学通用二步法检测试剂盒(PV9000)购自中衫金桥公司。

1.3 细胞培养、转染及分组

KYSE-30和HET-1A细胞用含10%FBS的DMEM培养液培养, KYSE-150、KYSE-410及TE-1细胞均在含10%FBS的RPMI 1640培养液中,于37℃、5%CO₂培养箱中常规培养。将对数生长期KYSE-150和KYSE-30细胞进行消化后,接种至6孔板中,待细胞汇合度至50%左右时进行细胞转染,分别将两条siRNA序列(si-BNC1#2、si-BNC1#3)及其阴性对照(si-NC)序列转染至KYSE-150和KYSE-30细胞。实验分为si-NC组、si-BNC1#2组和si-BNC1#3组。

1.4 qPCR 法检测 ESCC 细胞中 BNC1、G 蛋白通路抑制因子 1(G protein pathway repressor 1, GPS1) mRNA 的表达水平

取转染48h后的各组细胞,按照RNA提取试剂盒和逆转录试剂盒说明书提取总RNA并逆转录为cDNA。cDNA按照SYBR Green Master Mix说明书进行qPCR扩增。qPCR引物序列: BNC1上游为5'-ACAGTGGAGGGCTGTAATGC-3',下游为5'-ATGCTTCCTGGCTCAATGCT-3'; GPS1上游为5'-GGTTGGGATCTCTTGAGTGGA-3',下游为5'-GTGCATTCTGCGGGTCTTCC-3'; GAPDH上游为5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC,下游为5'-GGC ATGGACTGTGGTCATGAG-3'。qPCR反应条件: 95℃预变性3 min; 95℃ 30 s、60℃ 30 s、55℃ 10 s,共40个循环。以GAPDH为内参,采用2^{-ΔΔCt}法计算BNC1、GPS1 mRNA的相对表达量。

1.5 CCK-8 法检测 ESCC 细胞的增殖能力

取转染48h后的各组细胞,进行消化重悬计数细胞,以3.5×10³个细胞/孔接种到96孔板中进行培养。分别在24、48、72和96h加入CCK-8试剂(10 μL/孔),继续培养1h后,上酶标仪450 nm波长处检测每孔光密度(D)值,以D值反映细胞的增殖活性。每组细胞取3个复孔均数,进行统计分析。

1.6 划痕愈合实验检测 ESCC 细胞的迁移能力

取转染 48 h 后的细胞接种于 6 孔板中,待细胞完全贴壁后,用移液器吸头尖端在每孔划痕。在 0.48 h 用倒置显微镜拍照,观察划痕愈合情况,计算细胞的划痕愈合率[划痕愈合率=(1-48 h 划痕宽度/0 h 划痕宽度)×100%]。

1.7 Transwell 实验检测 ESCC 细胞的迁移及侵袭能力

将转染后 48 h 的各组细胞消化、离心,用无血清培养基清洗 2 次去除残留血清。(1)细胞迁移实验:用无血清培养基重悬各组细胞,密度为 2.5×10^5 个/mL,每个 Transwell 上室中接种 100 μ L 细胞悬液,下室中加入 500 μ L 含 10% 血清的 RPMI 1640 培养基。培养 48 h 后取出上小室,20% 甲醇固定后用 0.1% 结晶紫染色 10 min,用润湿的棉签小心擦去未穿过的细胞,PBS 清洗 2 次后在光学显微镜($\times 100$)下观察、拍照并计数。(2)细胞侵袭实验:除使用预铺基质胶的 Transwell 上室和加入 100 μ L 密度为 7.5×10^5 个/mL 细胞悬液外,其他实验操作步骤与迁移实验一致。

1.8 流式细胞术检测 ESCC 细胞的细胞周期及凋亡水平

细胞周期检测:收集转染 48 h 后的各组细胞,胰酶消化,PBS 清洗 1 次,重悬后 -20°C 过夜。第 2 天去除乙醇,用预冷 PBS 清洗后,加入 PI 和 RNAase 混合工作液,使密度达 1×10^6 个细胞/mL,室温处理 40 min 后上流式细胞仪进行检测。

细胞凋亡检测:用无 EDTA 胰蛋白酶消化并收集各组转染细胞,预冷 PBS 清洗 2 次后加入 100 μ L $1 \times$ 结合缓冲液,轻轻吹匀,使成为单细胞悬液。加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI 溶液,混合均匀,室温避光处理 15 min 后上流式细胞术检测。

1.9 WB 法检测 ESCC 细胞中 BNC1 的蛋白表达

细胞转染 72 h 后,用刮刀收集细胞并转移至离心管中,加入细胞裂解液提取蛋白样品,利用 BCA 蛋白定量试剂盒进行定量。取等量的蛋白样品,进行 10% SDS-PAGE,将蛋白质转移至醋酸纤维素膜(NC 膜),5% 脱脂奶粉常温封闭 1 h,加入 BNC1(1:8 000)和 GAPDH(1:5 000)一抗 4°C 后过夜培养。次日,洗膜后在 2.5% 脱脂奶粉稀释的二抗(1:1 000)中处理 1 h 后,ECL 发光液曝光、显影。以 GAPDH 为内参,用 ImageJ 软件分析目的蛋白条带的灰度值。

1.10 染色质免疫共沉淀-高通量测序(ChIP-seq)及转录组测序联合分析预测 BNC1 的靶基因

ChIP-seq:以终浓度为 1% 甲醛交联处理 KYSE-30 细胞后,利用甘氨酸终止交联反应。对交联形成的 DNA-蛋白质复合物进行超声处理,加入 BNC1 蛋白抗体,形成抗体-靶蛋白-DNA 复合物,利用 G 蛋白珠沉淀此复合物,特异性富集与 BNC1 蛋白结合的 DNA 片段。多次洗涤以除去非特异结合的染色质,并纯化复合物。解

交联、纯化 DNA 片段后,进行 ChIP-seq。

转录组测序分析:收集 KYSE-30 细胞和转染 48 h 后的 si-BNC1#3 细胞的 RNA,并于 Illumina 平台测序,获得 3 对 si-NC 和 si-BNC1#3 转录组数据。

1.11 免疫组织化学染色法分析 ESCC 组织中 BNC1 的蛋白表达

将临床收集的 10 例 ESCC 患者的癌及癌旁组织切片置于 65°C 烘箱中烤片 4 h,进行梯度脱蜡、水化,在柠檬酸盐缓冲液中加热修复后取出,用 3% H_2O_2 阻断内源性过氧化氢酶活性。参照免疫组织化学通用二步法检测试剂盒说明书进行操作,一抗 BNC1 稀释倍数为 1:200。BNC1 的表达情况主要依据抗体的染色强度和阳性细胞百分数进行评价。(1)染色强度评分:无染色为 0 分、淡黄色为 1 分、黄色为 2 分、黄棕色为 3 分;(2)阳性细胞百分数评分: $\leq 25\%$ 为 0 分、 $25\% \sim \leq 50\%$ 为 1 分、 $50\% \sim \leq 75\%$ 为 2 分、75% 以上为 3 分。两者得分乘积为最终评分标准,总分为 9 分。

1.12 双荧光素酶报告基因实验验证 BNC1 与 GPS1 之间的靶向关系

BNC1 过表达载体构建:全基因合成 BNC1 序列,并亚克隆至 pCDNA3.1 载体多克隆位点。GPS1pro 载体构建:选 peak 序列下游加上 mCMV 启动子,构建至 pGL3 载体多克隆位点。将实验分为 pCDNA3.1+pGL3-GPS1pro 和 pCDNA3.1-BNC1+pGL3-GPS1pro 两组,两组质粒分别共转 293T 细胞,转染 48 h 后,收集细胞进行双荧光素酶活性检测。

1.13 统计学处理

以上主要实验均独立重复 3 次。采用 GraphPad 7.0 进行统计分析和绘图。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据比较采用 t 检验,多组间数据比较进行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.0$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 BNC1 在 ESCC 组织和细胞中均高表达

GEPIA 在线生信网站预测结果(图 1A)显示,与癌旁组织($n=13$)相比,在 ESCA 组织($n=182$)中 BNC1 mRNA 表达水平显著升高($P < 0.05$)。qPCR 法检测结果(图 1B)显示,与 HET-1A 细胞相比,KYSE-150、KYSE-30、KYSE-410 及 TE-1 细胞中 BNC1 mRNA 均高表达(均 $P < 0.01$)。由于 KYSE-150 和 KYSE-30 细胞中表达上调最为显著,因此,选用此两种细胞进行后续实验研究。免疫组织化学染色法检测结果(图 1C)显示,ESCC 组织中 BNC1 的蛋白表达水平显著高于癌旁组织(7.20 ± 2.10 vs 3.90 ± 1.45 , $P < 0.01$)。结果提示,BNC1 在 ESCC 中可能为致癌基因。

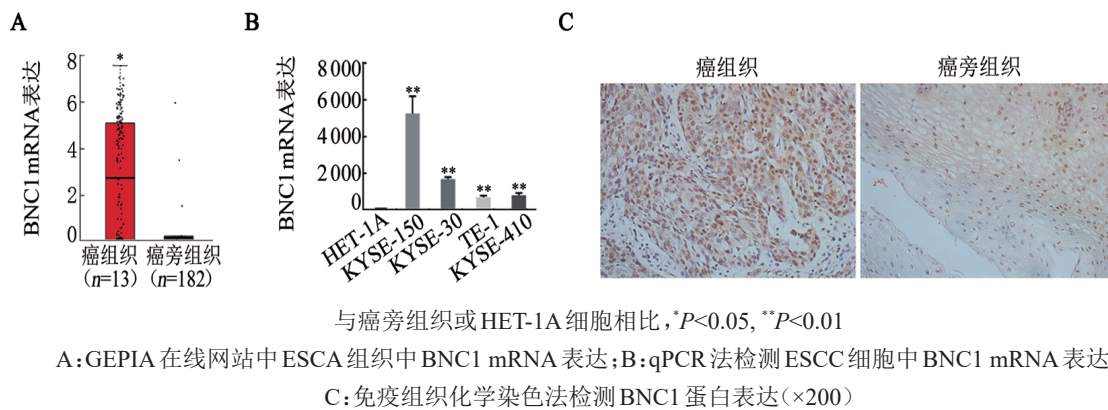


图 1 ESCA 组织和 ESCC 细胞中 BNC1 mRNA 和蛋白的表达

2.2 敲低 BNC1 可显著抑制 ESCC 细胞的增殖能力

利用 siRNA 转染 48、72 h 后, qPCR 和 WB 法检测结果(图 2A、B)显示, 与 si-NC 组相比, si-BNC1#2 和 si-BNC1#3 组 KYSE-150 和 KYSE-30 细胞中 BNC1 mRNA 和蛋白的表达水平均显著降低(均 $P < 0.01$)。

转染 96 h 时, CCK-8 法检测结果(图 2C)发现, 与 si-NC 组相比, si-BNC1#2 和 si-BNC1#3 组细胞的增殖活力均显著降低(均 $P < 0.01$)。结果表明, 在 ESCC 细胞中已成功敲低 BNC1 基因表达, 而敲低 BNC1 可显著降低 ESCC 细胞的增殖能力均显著降低。

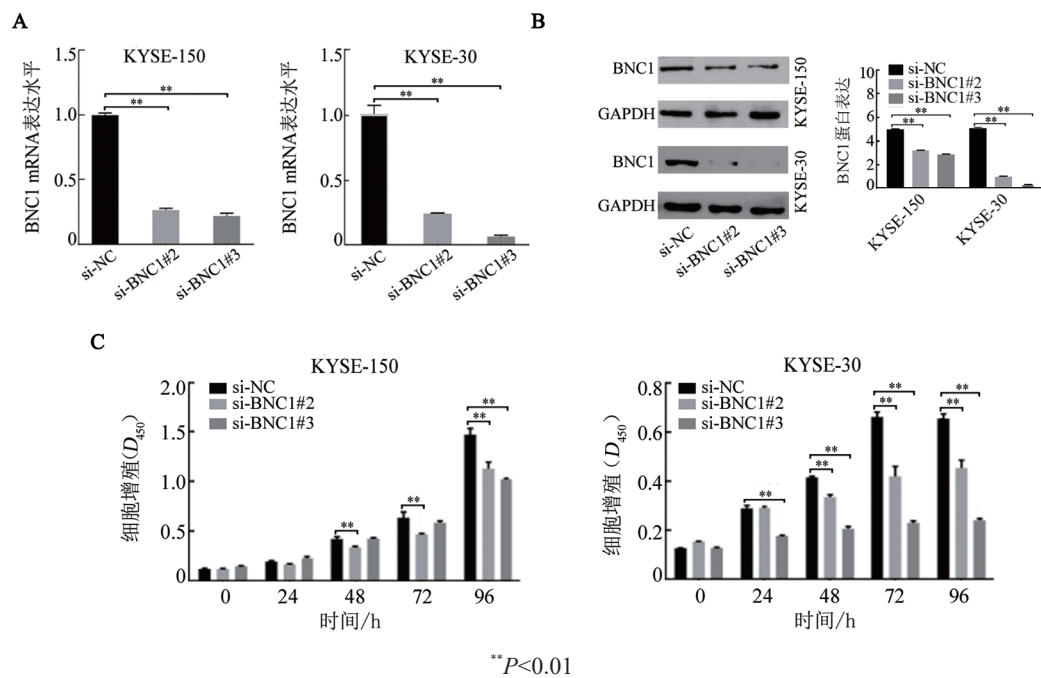


图 2 敲低 BNC1 对 ESCC 细胞 BNC1 mRNA(A)和蛋白(B)表达及增殖(C)的影响

2.3 敲低 BNC1 可显著抑制 ESCC 细胞的迁移与侵袭能力

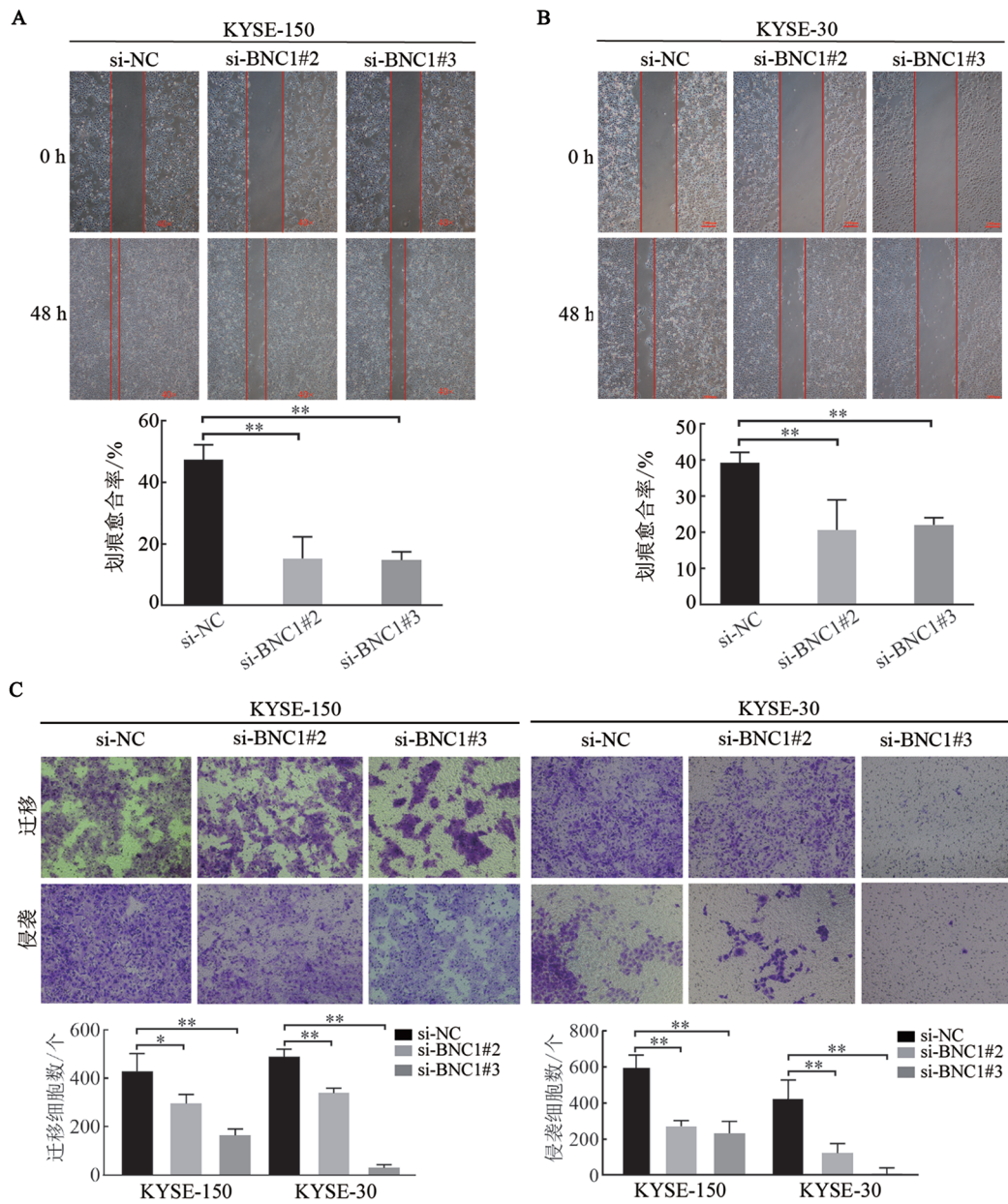
划痕愈合实验结果(图 3A、B)显示, 敲低 BNC1 后的 KYSE-150 和 KYSE-30 细胞的迁移能力均显著下降(均 $P < 0.01$)。Transwell 实验结果(图 3C)显示, 敲低 BNC1 后的 KYSE-150 和 KYSE-30 细胞的迁移和侵袭能力均受到明显抑制($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。实验结果表明, 敲低 BNC1 基因表达可显著降低 ESCC 细胞的迁移和侵袭能力。

2.4 敲低 BNC1 可将 ESCC 细胞阻滞在 G1 期

流式细胞术检测结果(图 4)显示, 敲低 BNC1 后的 KYSE-150 和 KYSE-30 细胞均被阻滞在 G1 期(均 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。实验结果表明, BNC1 被敲低后可能诱发了细胞被阻滞在 G1 期, 进而使 ESCC 细胞的增殖能力显著降低。

2.5 敲低 BNC1 可促进 ESCC 细胞的凋亡

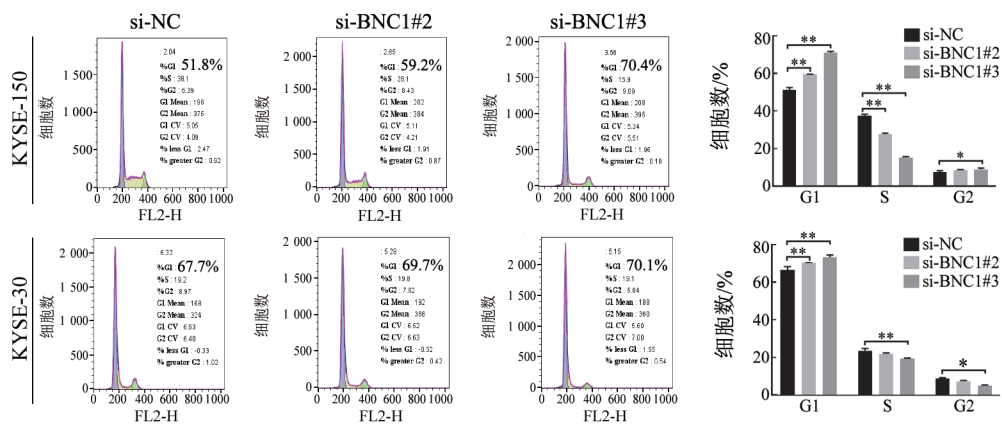
流式细胞术检测结果(图 5)显示, 敲低 BNC1 后的 KYSE-150 和 KYSE-30 细胞凋亡率均显著升高(均 $P < 0.01$)。结果表明, 敲低 BNC1 可促进 ESCC 细胞的凋亡。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A、B: 划痕愈合实验检测细胞的迁移能力; C: Transwell 实验检测细胞的迁移和侵袭能力(结晶紫染色, $\times 200$)

图3 敲低 BNC1 后对 KYSE-150 和 KYSE-30 细胞的迁移和侵袭的影响



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图4 敲低 BNC1 对 ESCC 细胞周期的影响

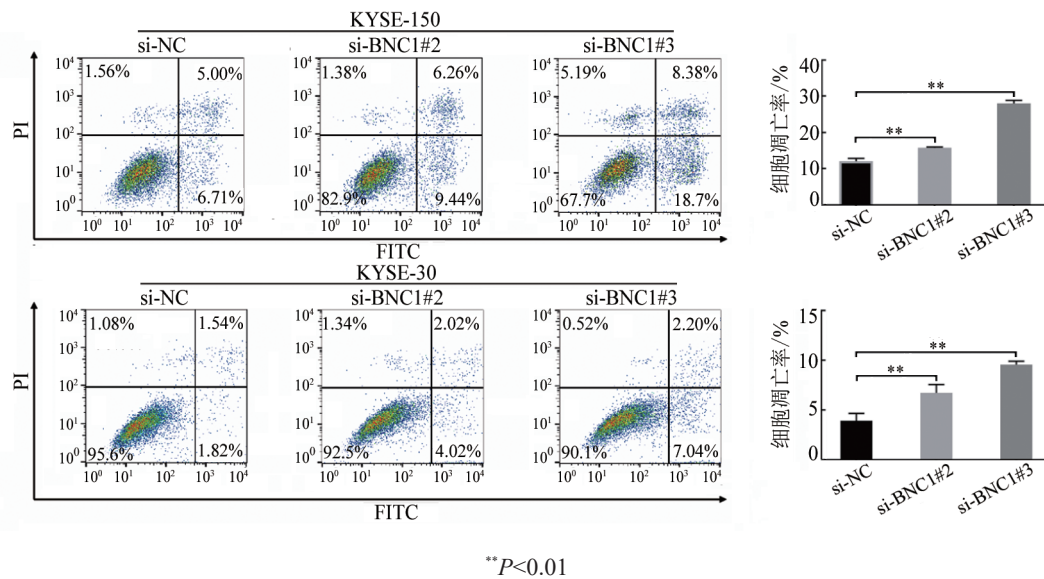


图5 敲低BNC1对ESCC细胞凋亡的影响

2.6 BNC1通过靶向GPS1调控ESCC的发生发展

CHIP-seq实验结果发现,BNC1富集到RBM28、SMC6、CHN1、GPS1基因的启动子(图6A)上,并且通过GEPIA在线网站预测该4个基因在ESCA组织中均高表达(均 $P<0.05$,图6B)。敲低BNC1转录组数据分析发现,上调的差异基因与核苷酸结合寡聚化结构域(nucleotide-binding oligomerization domain, NOD)样受体信号通路密切相关(图6C),且4个富集在启动子的基因中只有GPS1会随着BNC1敲低而表达水平降低(8.98 ± 2.52 vs 13.2 ± 3.61 , $P<0.05$),因此推测GPS1为BNC1正向调控的致癌基因。qPCR法检测结果(图6D)显示,敲低BNC1后,KYSE-30细胞中GPS1 mRNA水平显著降低($P<0.05$)。双荧光素酶报告基因检测结果(图6E)显示,BNC1能与GPS1启动子特异性结合($P<0.01$)。划痕愈合实验检测结果(图6F)发现,敲低GPS1可显著抑制KYSE-30细胞的迁移能力($P<0.01$)。实验结果表明,GPS1为BNC1下游调控的靶基因。

3 讨论

目前ESCC的治疗方案仍以手术切除联合化疗、放疗和免疫治疗等的综合治疗,患者5年生存率依旧很低^[11-12]。因此,发现新的ESCC基因治疗靶点及研究作用机制显得尤为重要。BNC1位于人类的15号染色体,已有研究结果显示BNC1是一个转录因子,通过与RNA聚合酶I和RNA聚合酶II相互作用,调控靶基因的转录^[9];BNC1维持核糖体的产生和调节基因的表达,从而影响细胞的增殖与分化^[13-14]。BNC1的表达水平会随着皮肤鳞状细胞癌的发生发展而逐渐升高,提示其可能是致癌基因^[15];BNC1可

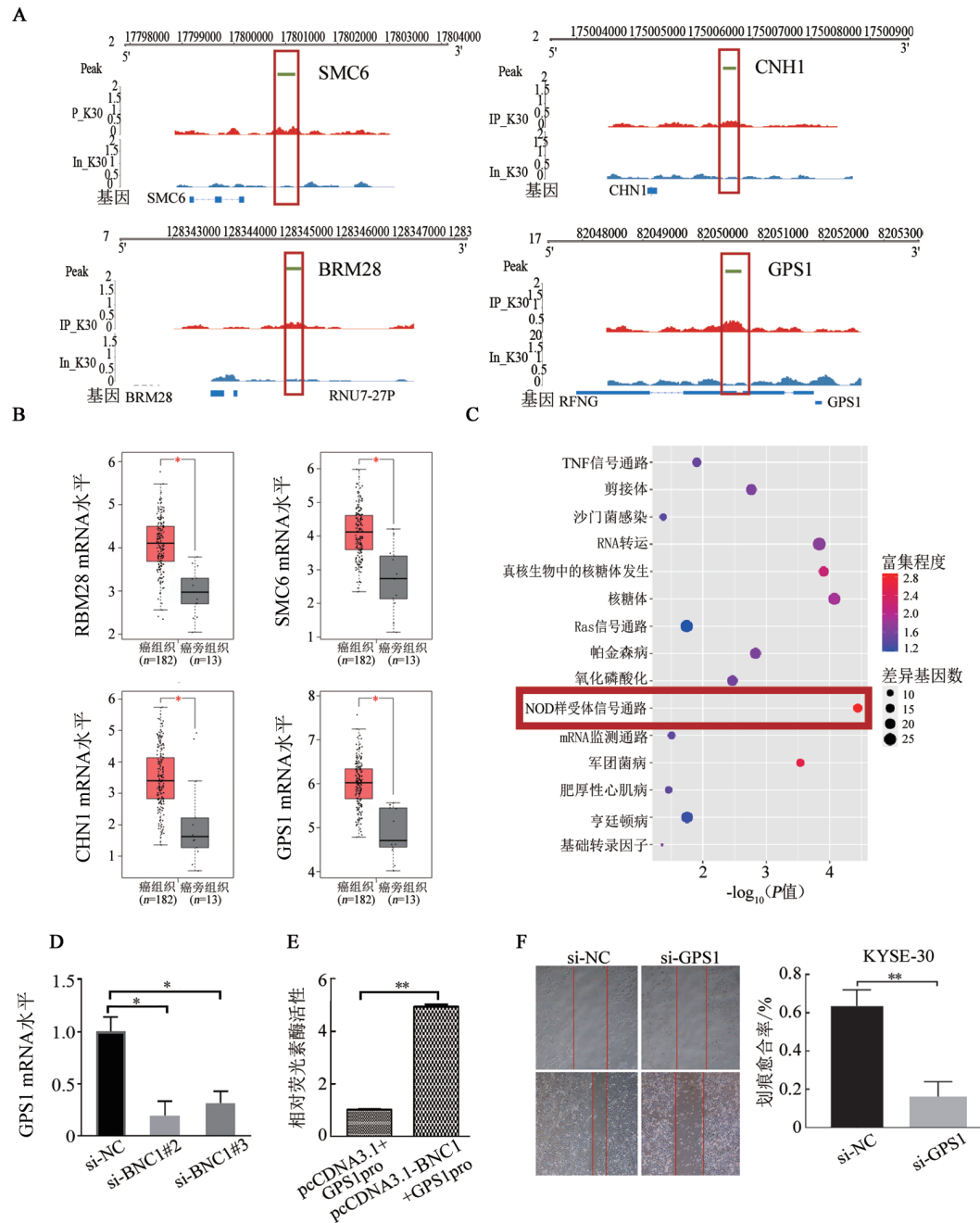
能为宫颈癌的致癌基因^[16]。但是BNC1在ESCC中的表达及其发挥作用的机制尚未明确。

本研究首先利用生信在线网站GEPIA发现BNC1在ESCA组织中高表达,qPCR法和免疫组化检测结果进一步验证了BNC1基因和蛋白在ESCC细胞和组织中均高表达,可能为致癌基因。采用siRNA干扰技术敲低BNC1的表达,可显著抑制ESCC细胞的增殖、迁移和侵袭能力,将细胞阻滞在G1期并促进细胞凋亡。转录因子通过识别和直接结合作用于特定的DNA序列,在基因表达调控中发挥重要作用。这种结合导致了下游基因直接或间接的转录激活,将RNA聚合酶作用于靶基因的启动子序列^[17-18]。转录因子表达的改变导致靶基因的失调与肿瘤密切相关,因此研究转录因子及其靶基因显得尤为重要。

本研究通过CHIP-seq和转录组测序技术并结合GEPIA生信网站分析,筛选出了BNC1正向调控的致癌基因GPS1。GPS1又称COP9信号体亚基1(COP9 signalosome complex 1, GSN1),COP9(CSN)是一个保守的蛋白复合体,由GNS1~GNS8八个亚基构成,其中GPS1是构成COP9信号体最大的亚基^[19-21]。GPS1在胶质母细胞瘤组织中高表达,其可能为致癌基因^[22];GPS1能激活JNK通路,进而介导Wnt途径促进三阴性乳腺癌的发生发展^[23]。本研究进一步验证了BNC1和GPS1之间的调控关系,利用siRNA敲低BNC1后检测GPS1 mRNA表达水平变化,KYSE-30细胞中GPS1 mRNA显著降低;双荧光素酶报告基因实验结果也显示,BNC1结合GPS1的启动子。依据上述研究结果,推测BNC1正向调控致癌靶基因GPS1,进而激活JNK通路导致ESCC的发生发展。

但是本研究尚未进行BNC1调控的靶基因GPS1对ESCC细胞除迁移能力之外的生物学功能研究,GPS1

对ESCC发生发展的具体作用机制也待深入研究。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A:ChIP-seq法检测BNC1富集到的启动子基因;B:GEPIA在线网站中ESCA组织中RBM28,SMC6,CHN1和GPS1基因的mRNA表达;C:敲低BNC1转录组上调基因通路富集分析;D:qPCR法检测抑制BNC1后GPS1 mRNA表达;E:GPS1的双荧光素酶报告基因实验;F:敲低GPS1对KYSE-30细胞迁移能力的影响

图6 BNC1正向调控的致癌靶基因筛选及鉴定

综上所述,本研究结果发现敲低BNC1的表达,可显著抑制ESCC细胞的增殖、迁移、侵袭能力,将细胞阻滞在G1期并促进细胞凋亡。BNC1可能通过靶基因GPS1影响ESCC的发生发展。后续研究将会继续进行靶基因GPS1在ESCC发生进展中的作用及其分子机制的探索。

[参考文献]

[1] SHEN Y X, ZHANG H, YAO S H, *et al.* Methionine oxidation of CLK4 promotes the metabolic switch and redox homeostasis in esophageal carcinoma via inhibiting MITF selective autophagy[J/OL]. Clin Transl Med, 2022, 12(1): e719[2022-06-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8800482/>. DOI:10.1002/ctm2.719.

- [2] JIA Y L, TIAN C, WANG H Y, *et al.* Long non-coding RNA NORAD/miR-224-3p/MTDH axis contributes to CDDP resistance of esophageal squamous cell carcinoma by promoting nuclear accumulation of β -catenin[J/OL]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 162[2022-06-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8662861/>. DOI:10.1186/s12943-021-01455-y.
- [3] ZOU B B, GUO D H, KONG P Z, *et al.* Integrative genomic analyses of 1, 145 patient samples reveal new biomarkers in esophageal squamous cell carcinoma[J/OL]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 792779[2022-06-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8814608/>. DOI:10.3389/fmolb.2021.792779.
- [4] LI R, ZENG L X, ZHAO H Z, *et al.* ATXN2-mediated translation of TNFR1 promotes esophageal squamous cell carcinoma *via* m⁶A-dependent manner[J]. *Mol Ther*, 2022, 30(3): 1089-1103. DOI:10.1016/j.ymthe.2022.01.006.
- [5] ZHENG Y L, WU J J, DENG R, *et al.* G3BP2 regulated by the lncRNA LINC01554 facilitates esophageal squamous cell carcinoma metastasis through stabilizing HDGF transcript[J/OL]. *Oncogene*, 2022, 41(4): 515-526[2022-06-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8782723/>. DOI:10.1038/s41388-021-02073-0.
- [6] DINH H Q, PAN F, WANG G, *et al.* Integrated single-cell transcriptome analysis reveals heterogeneity of esophageal squamous cell carcinoma microenvironment[J/OL]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 7335[2022-06-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8683407/>. DOI:10.1038/s41467-021-27599-5.
- [7] LI J Y, YING Y Y, QIAN Y L, *et al.* BNC1 promotes spermatogenesis by regulating transcription of Ybx2 and papolb *via* direct binding to their promoter elements[J]. *Reprod Sci*, 2021, 28(3): 785-793. DOI:10.1007/s43032-020-00342-z.
- [8] ROMANO R A, LI H X, TUMMALA R, *et al.* Identification of Basonuclin2, a DNA-binding zinc-finger protein expressed in germ tissues and skin keratinocytes[J]. *Genomics*, 2004, 83(5): 821-833. DOI:10.1016/j.ygeno.2003.11.009.
- [9] BOLDRUP L, COATES P J, LAURELL G, *et al.* p63 transcriptionally regulates BNC1, a Pol I and Pol II transcription factor that regulates ribosomal biogenesis and epithelial differentiation[J]. *Eur J Cancer*, 2012, 48(9): 1401-1406. DOI:10.1016/j.ejca.2011.06.032.
- [10] CUI C H, ELSAM T, TIAN Q J, *et al.* Gli proteins up-regulate the expression of basonuclin in Basal cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(16): 5651-5658. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-04-0801.
- [11] LENG X F, DAIKO H, HAN Y T, *et al.* Optimal preoperative neoadjuvant therapy for resectable locally advanced esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2020, 1482(1): 213-224. DOI:10.1111/nyas.14508.
- [12] 熊黎, 熊黎, 吴佳林, 等. 1,25(OH)₂D₃ 调控 ERK 通路对食管鳞状细胞癌细胞生物学行为的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2021, 28(7): 696-701. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2021.07.007.
- [13] LIANG Z Q, ZHONG L Y, LI J, *et al.* Clinicopathological significance and underlying molecular mechanism of downregulation of basonuclin 1 expression in ovarian carcinoma[J/OL]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2022, 247(2): 106-119[2022-06-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8777474/>. DOI:10.1177/15353702211052036.
- [14] GAO Y B, LI J Y, JIAO J, *et al.* Upregulation of basonuclin1 is associated with p63-involved epithelial barrier impairment and type-2 helper T-cell inflammation in chronic rhinosinusitis with nasal polyps[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2021, 182(11): 1046-1057. DOI:10.1159/000516810.
- [15] GARCÍA-DÍEZ I, HERNÁNDEZ-MUÑOZ I, HERNÁNDEZ-RUIZ E, *et al.* Transcriptome and cytogenetic profiling analysis of matched in situ/invasive cutaneous squamous cell carcinomas from immunocompetent patients[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2019, 58(3): 164-174. DOI:10.1002/gcc.22712.
- [16] IDEN M, TSAIH S W, HUANG Y W, *et al.* Multi-omics mapping of human papillomavirus integration sites illuminates novel cervical cancer target genes[J/OL]. *Br J Cancer*, 2021, 125(10): 1408-1419 [2022-06-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8575955/>. DOI:10.1038/s41416-021-01545-0.
- [17] SOUTOURINA J. Transcription regulation by the mediator complex [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(4): 262-274. DOI:10.1038/nrm.2017.115.
- [18] LAMBERT S A, JOLMA A, CAMPITELLI L F, *et al.* The human transcription factors[J]. *Cell*, 2018, 172(4): 650-665. DOI:10.1016/j.cell.2018.01.029.
- [19] KUWAHARA T, YAMAYOSHI S, NODA T, *et al.* G protein pathway suppressor 1 promotes influenza virus polymerase activity by activating the NF- κ B signaling pathway[J/OL]. *mBio*, 2019, 10(6): e02867-e02819[2022-06-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6918087/>. DOI:10.1128/mBio.02867-19.
- [20] TSUGE T, MENON S, TONG Y C, *et al.* CSN1 inhibits c-Jun phosphorylation and down-regulates ectopic expression of JNK₁[J/OL]. *Protein Cell*, 2011, 2(5): 423-432[2022-06-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4875334/>. DOI:10.1007/s13238-011-1043-0.
- [21] WEI N, TSUGE T, SERINO G, *et al.* The COP9 complex is conserved between plants and mammals and is related to the 26S proteasome regulatory complex[J]. *Curr Biol*, 1998, 8(16): 919-922. DOI:10.1016/s0960-9822(07)00372-7.
- [22] SCRIDELE C A, CARLOTTI C G Jr, OKAMOTO O K, *et al.* Gene expression profile analysis of primary glioblastomas and non-neoplastic brain tissue: identification of potential target genes by oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR[J]. *J Neurooncol*, 2008, 88(3): 281-291. DOI:10.1007/s11060-008-9579-4.
- [23] LI Z L, LIM S K, LIANG X, *et al.* The transcriptional coactivator WBP2 primes triple-negative breast cancer cells for responses to Wnt signaling *via* the JNK/Jun kinase pathway[J/OL]. *J Biol Chem*, 2018, 293(52): 20014-20028[2022-06-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6311518/>. DOI:10.1074/jbc.RA118.005796.

[收稿日期] 2022-06-11

[修回日期] 2022-08-29

[本文编辑] 党瑞山