

网络出版时间: 2023-05-31 10:03:29 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/34.1065.R.20230529.1634.018.html>

骨形成蛋白 7 在 ESCC 中的表达及功能初步探究

孙梦菲¹, 黄红芳¹, 董宇航¹, 张华坤¹, 周紫茹¹, 孙琦², 管文燕², 赵琳玥², 崔晓宾², 陈云昭³, 李锋¹

摘要 目的 分析骨形成蛋白 7 (BMP7) 在食管鳞癌 (ESCC) 中的表达和免疫浸润水平。方法 在 274 例 ESCC 及 242 例正常组织中应用免疫组织化学的形式验证 BMP7 的水平, 探索其表达差异与 ESCC 患者生存周期及临床病理特征间的联系, 并且建立 BMP7 过表达质粒转染 ESCC 细胞系, 借助 CCK-8、Clone、Transwell 检验 BMP7 对 ESCC 细胞生物学行为的作用。结果 BMP7 在正常组织中表达高于 ESCC ($P < 0.001$), BMP7 的表达与患者分化程度 ($P = 0.006$) 和 TNM 分期 ($P < 0.001$) 相关, 且 BMP7 高表达患者生存期超过 BMP7 低表达患者 ($P = 0.041$), CCK-8、Clone 实验表明过表达 BMP7 组细胞增殖效果低于对照组, Transwell 实验表明过表达 BMP7 组细胞侵袭迁移能力小于对照组。免疫浸润结果显示 BMP7 与巨噬细胞呈正相关 ($P = 0.008$), 与 γ - δ T 细胞呈负相关 ($P = 0.028$)。结论 BMP7 在 ESCC 中低表达且与患者不良预后和免疫浸润水平相关。

关键词 食管鳞癌; BMP7; 免疫; 预后

中图分类号 R 735.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)06-0995-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.020

骨形态发生蛋白 (bone morphogenetics protein, BMP) 原为一种诱导骨组织形成的生长因子, 它的亚型除 BMP1 是金属蛋白酶家族外, 其余如 BMP7 等均隶属转录生长因子 β (TGF- β) 超家族且具有典型的半胱氨酸结构域^[1]。近些年, 有研究^[2]表明 BMP7 与肿瘤高度相关, 该分子在小细胞肺癌、结直肠癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、肝癌、食管癌等病理生理机制中起着重要价值。食管癌作为全球病死率排在第 6 位的恶性肿瘤, 其中约一半是病理亚型为食管鳞癌 (esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 的中国人^[2]。从正常食管到 ESCC 转化过程中, 不只癌细胞本身发生了改变, 周围免疫微环境也发生了变化, BMP7 可以通过抑制巨噬细胞和 CD4⁺ T 细胞来调节微环境中的促炎反应。但是 BMP7 在 ESCC 中研究较少且不一致亟待进一步探讨, 该研究从组织、细胞、生物信息学 3 个层次观察 BMP7 在 ESCC 的表达与临床病理指标和生存的关系, 免疫细胞的相关性、通路富集分析等探寻 BMP7 与 ESCC 产生的分子机制^[3-4]。

1 材料与方法

1.1 主要材料 EC9706 (ESCC 细胞系) 来源于中国科学院细胞库; DAB 染色液试剂盒 (北京中杉金

2023-03-20 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 82160542、U1903305); 兵团财政科技计划项目 (编号: 2020AB022); 医疗卫生科技计划项目 (编号: 2019F004); 石河子大学高层次人才科研启动项目 (编号: RCZX201535)

作者单位: ¹ 石河子大学医学院病理系, 石河子 832002

² 南京大学医学院附属鼓楼医院病理科, 南京 210008

³ 苏州高新区人民医院病理科, 苏州 215129

作者简介: 孙梦菲, 女, 硕士研究生;

李锋, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: lifeng7855@126.com

trypsin digestion; KC were identified using immunofluorescence method, cell growth status was observed under microscopy, different seed plate times and densities were designed, and cell proliferation viability was detected by CCK-8, EdU and high connotation method. Four adult mouse KC differentiation was detected by Western blot. **Results** Trypsin digestion was used to extract four strains of adult mouse back skin KC, and the Kunming (KM) mice had the lowest number of KC and C57BL/6 to extract the highest number of cells for the same area of skin tissue. BALB/c, KM, and nude mouse had higher plate-laying efficiency at a density of 8×10^3 /well, respectively, and C57BL/6 had higher plate-laying efficiency at a density of 1.6×10^4 /well. Among the four strains of mice, the primary KC of BALB/c mice was weaker than that of C57BL/6 mice, and there was no statistical difference in the degree of differentiation. **Conclusion** The proliferation and differentiation capacity of four adult mouse primary KC on the dorsal skin is successfully isolated and compared by a simple and easy method, which provided a certain experimental basis for the strain selection of mice with skin-related diseases.

Key words keratinocytes; primary culture; mouse epidermis; proliferation; differentiation

桥生物技术有限公司); 10% 胎牛血清(上海酶研生物科技有限公司); 1% 青-链霉素(大连美仑生物技术有限公司); RPMI-1640(德国制药企业勃林格殷格翰); Lipofectamine2000 转染试剂(赛默飞世尔科技中国区有限公司); pcDNA3.1BMP7 质粒(南京晶百生物科技有限公司); Young PAGE 预制胶(南京金斯瑞生物科技有限公司); Loading Buffer(上海碧云天生物技术有限公司); 转膜液(苏州新赛美生物技术有限公司); 蛋白酶封闭液(上海雅酶生物医药科技有限公司); 羊抗兔二抗等抗体(武汉三鹰生物技术有限公司); ECL 化学发光底物(广州硕谱生物科技有限公司); 0.1% 结晶紫(北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 组织样本收集 整理 2000—2021 年食管鳞状细胞癌石蜡包埋组织样本共 516 例, 其中, 有 274 例为癌组织, 242 例为正常组织。所收集的病例均得到患者的同意并签署医学伦理委员会的知情同意书, 通过电话和随访信等进行随访(截止时间: 2021 年 9 月)。

1.3 免疫组化染色 使用 DAB 染色液试剂盒, 免疫组化操作程序: 脱蜡和水化, 抗原修复, 阻断内源性过氧化物酶, 滴加一抗, 滴加酶标羊抗鼠/兔 IgG 聚合物, DAB 显色、复染、脱水、透明、封片、阅片。2 位有相应资质的病理医师遵循 2019 版 WHO 消化系统标准对染色效果进行判读。依据棕黄色为阳性, 细胞着色强度和肿瘤细胞阳性百分比分数评分的具体细节(无着色 = 0, 黄色 = 1, 棕黄色 = 2, 棕色 = 3; 肿瘤细胞阳性百分比 < 5% = 0, 6% ~ 25% = 1, 26% ~ 50% = 2, 51% ~ 75% = 3, 75% ~ 100% = 4), 其免疫组化评分等于细胞着色强度分数与肿瘤细胞阳性百分比分数的乘积(免疫组化评分 ≤ 8 为低表达, 评分 > 8 为高表达)。

1.4 细胞培养 EC9706(ESCC 细胞系) 细胞培养与转染 EC9706 培养于含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素的 RPMI-1640 细胞培养基中, 并置于 37 °C, 5% CO₂ 恒温培养箱中。

1.5 细胞学实验 当细胞密度约 85% 开展实验处理; 铺板 6 孔板每孔计数 60 万个细胞, 过夜细胞贴壁后, EP 管各加入 100 μl RPMI-1640 培养基, 再分别添加 7.5 μl Lipofectamine2000 转染试剂和 2.5 μg pcDNA3.1BMP7 质粒。① Western blot 实验应用 YoungPAGE 预制胶, 将转染 48 h 后的细胞用 PBS 清洗 3 遍, 蛋白提取全程在冰上进行, 加入 5 × Loading Buffer 100 °C 煮沸 10 min, 电泳后采用快速

转膜液湿转法 400 mA 30 min 转膜, 无蛋白酶封闭液封闭 10 ~ 15 min, 敷一抗 4 °C 过夜(BMP7 1 : 500; GAPDH 1 : 50 000) 1 × TBST 清洗 4 °C 孵二抗孵育 2 h(羊抗兔二抗 1 : 10 000) (BMP7、GAPDH、羊抗兔二抗等抗体) 1 × TBST 清洗, 使用 ECL 化学发光底物显色。② CCK-8 与 Clone 实验将转染细胞在 96 孔板中每孔接种约 2 000 个, 每组每个时间点设置 3 复孔, 每个时间点至少留 1 个无细胞孔作为调零孔, 96 孔板旁边一圈要加无菌 PBS 防蒸发, 测 6 d 共 6 个时间点, 取 3 次的均值。平板克隆每孔 1 000 个细胞接种于 6 孔板中, 培养 10 d 左右显示肉眼可见的克隆后 PBS 清洗 3 次, 4% 多聚甲醛于 4 °C 固定 20 min, 重复清洗 0.1% 结晶紫 4 °C 染色, 20 min 后 PBS 再次清洗 3 次。Image J 软件计算细胞克隆数。Transwell 迁移实验将转染 48 h 后的细胞密度约为 1 × 10⁵ 个/ml 加入上室 200 μl, 下室加入 500 μl 含 20% FBS 培养基于培养箱中培养 24 h 后取出, 吸去上室培养基, 10% 甲醇溶液固定细胞 30 s, 0.1% 结晶紫染色 20 min, 自来水中清洗至背景清晰。

1.6 生物信息学分析 生物信息学使用 TCGA 数据库和 limma、reshape2、ggpubr、vioplot、ggExtra 等包绘制免疫浸润图, 同时用 gridExtra、ggplot2 等包画 GSEA 图。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 26.0 软件统计分析, BMP7 于正常食管鳞状上皮与鳞癌组织之间以及高低表达 BMP7 两组样本临床信息之间比较均采用 χ^2 预后生存曲线分析使用 Kaplan-Meier 法, ESCC 预后的单因素和多因素分析运用 cox 法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。细胞学实验每组数据重复 3 次, 计量资料符合独立正态分布方差齐时组间比较用 t 检验, 不符合时用非参数检验。

2 结果

2.1 组织学验证 BMP7 表达与临床信息的关系

2.1.1 BMP7 蛋白在 ESCC 组织的表达 正常食管鳞状上皮及 ESCC 组织免疫组化染色显示(图 1), BMP7 主要富集在胞核, 染色具有显著差异, 在 ESCC 组织中的蛋白表达水平显著低于癌旁正常食管组织($P < 0.05$) (表 1)。

2.1.2 BMP7 表达差异与临床特征的关系 具有临床病理数据的 226 例依据免疫组化总分(IRS) 进行分组(表 2), 分值 < 8 分为低表达, 分值 ≥ 8 分为高表达, 其中 BMP7 的表达差异与不同级别分化

程度 ($P = 0.006$)、N 分期 ($P < 0.001$)、TNM 分期 ($P < 0.001$) 之间差异有统计学意义。

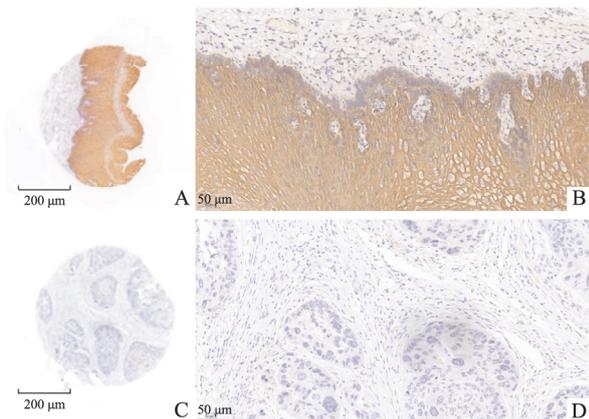


图1 正常组织与 ESCC 组织中 BMP7 蛋白表达

A: 正常食管鳞状上皮组织 $\times 40$; B: 正常食管鳞状上皮组织 $\times 200$; C: 食管鳞癌组织 $\times 40$; D: 食管鳞癌组织 $\times 200$

表1 低、高表达 BMP7 的两组样本的比较 [n(%)]

组别	BMP7	
	低表达(评分 < 8 分)	高表达(评分 ≥ 8 分)
正常组织	22(9.1)	220(90.9)
ESCC	238(86.9)	36(13.1)
χ^2 值	310.907	
P 值	< 0.001	

表2 BMP7 表达与临床特点 [n(%) n = 226]

项目	BMP7		χ^2 值	P 值
	低表达	高表达		
性别			0.020	0.886
男	61(87.1)	9(12.9)		
女	137(87.8)	19(12.2)		
年龄(岁)			0.387	0.534
< 65	132(88.6)	17(11.4)		
≥ 65	66(85.7)	11(14.3)		
部位			0.022	0.881
上段 + 中段	169(87.6)	24(12.4)		
下段	28(84.8)	5(15.2)		
分化程度			7.575	0.006
高分化 + 中分化	127(67.9)	60(32.1)		
低分化	35(89.7)	4(10.3)		
T 分期			2.253	0.133
T1 + T2	70(83.3)	14(16.7)		
T3 + T4	128(90.1)	14(9.9)		
N 分期			43.908	< 0.001
Nx + N1	64(37.2)	108(62.8)		
N2 + N3	48(88.9)	6(11.1)		
TNM 分期			134.001	< 0.001
I + II	15(12.5)	105(87.5)		
III + IV	95(89.6)	11(10.4)		

2.1.3 BMP7 与 ESCC 患者生存预后和预后影响因

素 有 137 例 ESCC 患者通过电话、信件随访、病案记录等方式获得完整的随访信息,通过 Kaplan-Meier 生存分析 ESCC 患者 BMP7 蛋白表达水平与生存时间的关系, BMP7 低表达组的生存时间低于高表达者 ($P = 0.041$) (图 2)。单因素分析后把所有因素使用更严格的多因素计算, TNM 分期差异有统计学意义 ($P < 0.001$), cox 多因素回归分析显示 TNM 分期是影响 ESCC 预后的独立因素(表 3)。

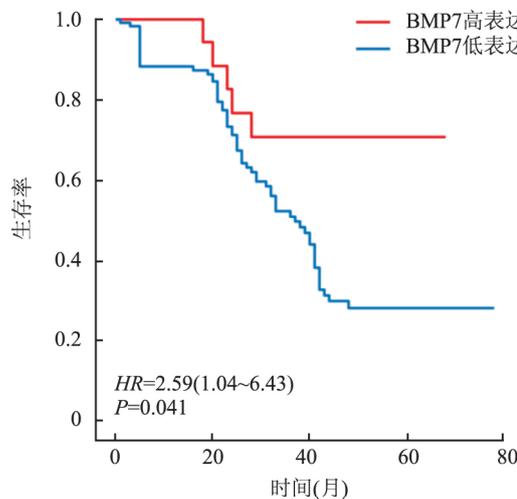


图2 ESCC 中 BMP7 蛋白表达差异与生存预后

2.2 细胞学实验验证 BMP7 对 ESCC 的影响

EC9706 细胞中,按照转染说明书分别使用不同量 BMP7 质粒: Lipofectamine2000 比例在 6 孔板中进行转染 分别 24、48、72 h 转染,同时做了无处理的 Control 组和转染了正常载体的 NC 组做对照, BMP7 组分别按照 2.5、2.0、3.0 μg 浓度梯度,确定最佳转染条件 48 h BMP7 质粒 2.5 μg , Lipofectamine2000 7.5 μl 时过表达效果较好(图 3A)。使用最佳转染条件进行过表达 BMP7 对 ESCC 细胞增殖能力的影响等实验,在 CCK-8 实验中, EC9706 细胞过表达 BMP7 组吸光度值低于对照组 ($P < 0.01$) (图 3B),平板克隆实验在 EC9706 细胞中过表达 BMP7 组细胞集落数显著低于对照组 ($P < 0.0001$) (图 3C),结果显示 BMP7 可以抑制 ESCC 细胞的增殖能力。Transwell 迁移结果显示过表达 BMP7 组的细胞迁移数目低于对照组的细胞迁移数目 ($P < 0.0001$) (图 3D)。

2.3 BMP7 在 ESCC 免疫微环境中的角色

基于 TCGA 数据库去验证 ESCC 中 BMP7 与免疫细胞浸润水平的相关性。如图 4A 所示, BMP7 与 B 细胞 ($r = 0.373, P = 0.008$)、树突状细胞 ($r = 0.343, P =$

0.016)、巨噬细胞($r = 0.307, P = 0.032$)、NK 细胞($r = -0.304, P = 0.034$)免疫细胞呈正相关,它与 γ - δ T 细胞($r = -0.313, P = 0.028$)、M1-TAM($r = -0.353, P = 0.013$)、M2-TAM($r = -0.281, P = 0.050$)呈负相关。同时,BMP7 相关的基因集 GSEA

富集分析显示其与哮喘、自身免疫性甲状腺疾病、补体与凝血疾病、糖脂磷脂酰肌醇、移植物抗宿主疾病通路呈正相关,与造血细胞系疾病、视黄醇代谢、RNA 降解、氨基酸代谢、剪接体通路呈负相关(图 4B)。

表 3 ESCC 中 cox 单因素和多因素分析($n = 137$)

变量	单因素分析			多因素分析		
	β	P 值	HR	β	P 值	HR
性别	-0.159	0.578	0.486 ~ 1.496	-0.353	0.241	0.390 ~ 1.267
年龄	-0.001	0.949	0.969 ~ 1.030	0.001	0.941	0.968 ~ 1.036
T 分期	0.231	0.242	0.855 ~ 1.857	-0.221	0.421	0.468 ~ 1.373
N 分期	0.192	0.487	0.705 ~ 2.082	-0.523	0.240	0.248 ~ 1.418
M 分期	-0.120	0.841	0.276 ~ 2.855	-1.220	0.091	0.072 ~ 1.213
TNM 分期	0.325	0.069	0.976 ~ 1.964	0.928	0.019	1.166 ~ 5.487
BMP7	-0.014	0.684	0.918 ~ 1.058	0.036	0.645	0.890 ~ 1.207
肿瘤部位	-0.255	0.373	0.443 ~ 1.357	-0.419	0.183	0.355 ~ 1.218
分化程度	-0.008	0.973	0.639 ~ 1.541	0.095	0.696	0.683 ~ 1.769
BMP7 高表达	-0.265	0.351	0.440 ~ 1.339	-0.625	0.306	0.162 ~ 1.771

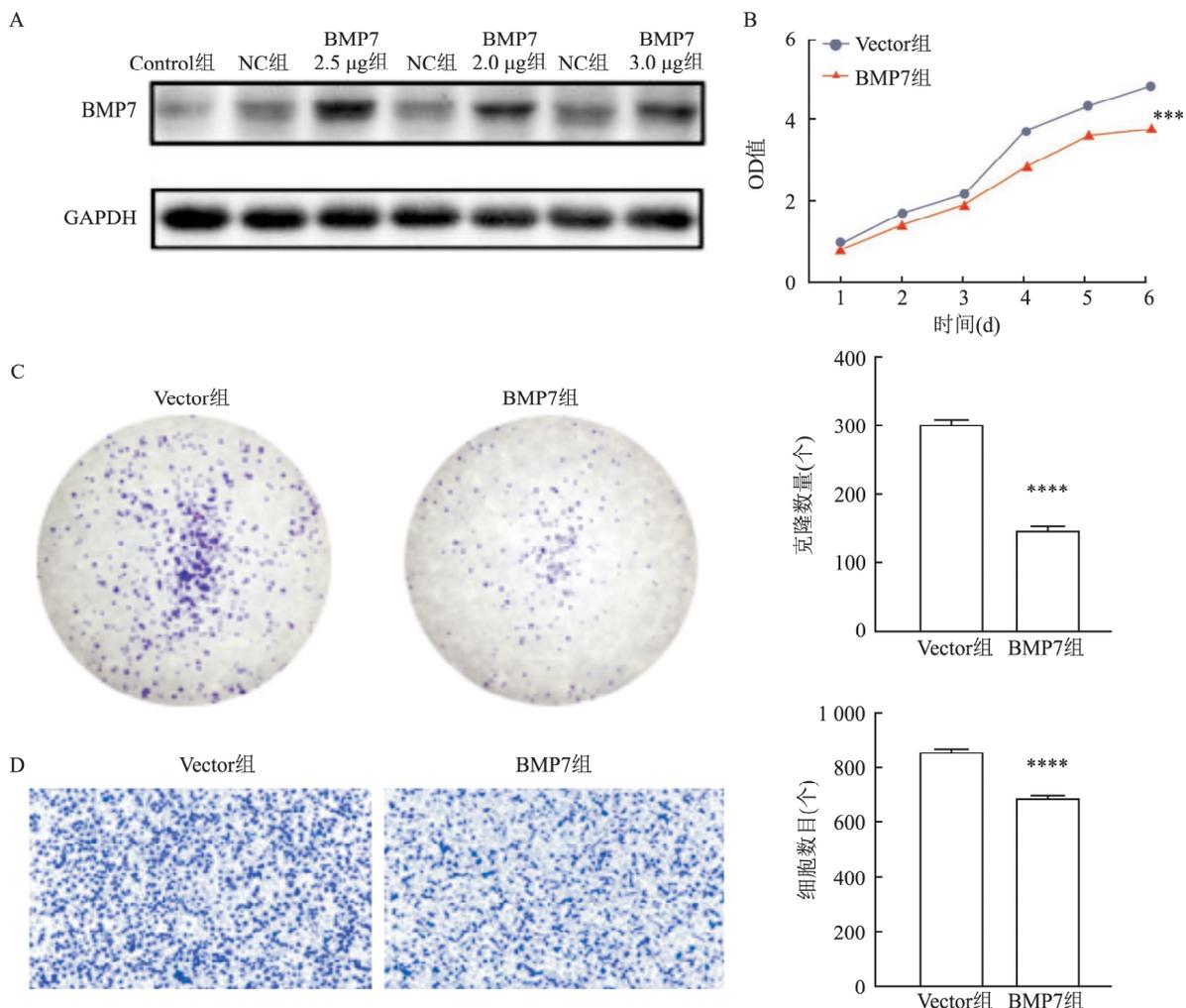


图 3 BMP7 对 ESCC 细胞的影响

A: Western blot 实验验证 BMP7 质粒最佳转染比例; B: CCK-8 实验验证 ESCC 细胞的增殖能力; C: 克隆实验验证 ESCC 细胞的增殖能力;

D: Transwell 迁移实验验证 ESCC 细胞的迁移能力 $\times 100$; 与 Vector 组比较: *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

2.4 BMP7 基因的列线图 根据年龄、性别、分化程度、N 分期、TNM 分期、BMP7 免疫组化表达评分等绘制可视化列线图 预测 ESCC 患者的患病风险, 评估预后生存时间(图 5)。

3 讨论

近年来, ESCC 的发病率和病死率开始下降, 但患者术后总体生存率仍然较低。寻找有效的分子标志物可以为食管鳞状细胞癌提供新的诊断标志物, 早诊早治提高患者生存率^[5]。BMPs 发挥抑癌作用

或致癌作用, 这取决于细胞环境和肿瘤类型^[6]。肿瘤本身是细胞发生累积性基因突变的结果^[3], 寻找新的标志物有望提高诊断的有效性和准确性。比较近 10 年来 BMP7 与 ESCC 的研究进展, 严琳等^[7]在 56 例 ESCC 组织标本中验证出 BMP7 阳性率 (73.2%) 远高于正常食管黏膜, 且主要在胞膜和胞质。有研究^[8]使用 160 例 ESCC 组织标本表明 BMP7 在 ESCC 细胞中有高、中、低表达 3 种情况, 主要富集癌巢。该研究 516 例样本中 BMP7 在 ESCC 组织中主要为低表达, 主要表达在胞质, 从样本角度

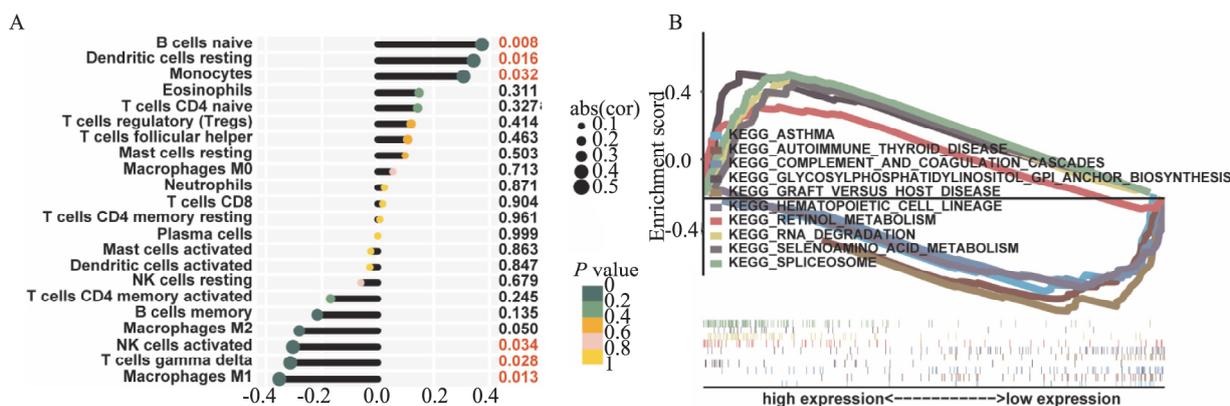


图 4 BMP7 的表达与 ESCC 中的免疫浸润水平相关

A: 生信数据库验证 BMP7 与免疫细胞的浸润水平; B: GSEA 富集分析验证 BMP7 相关的基因通路

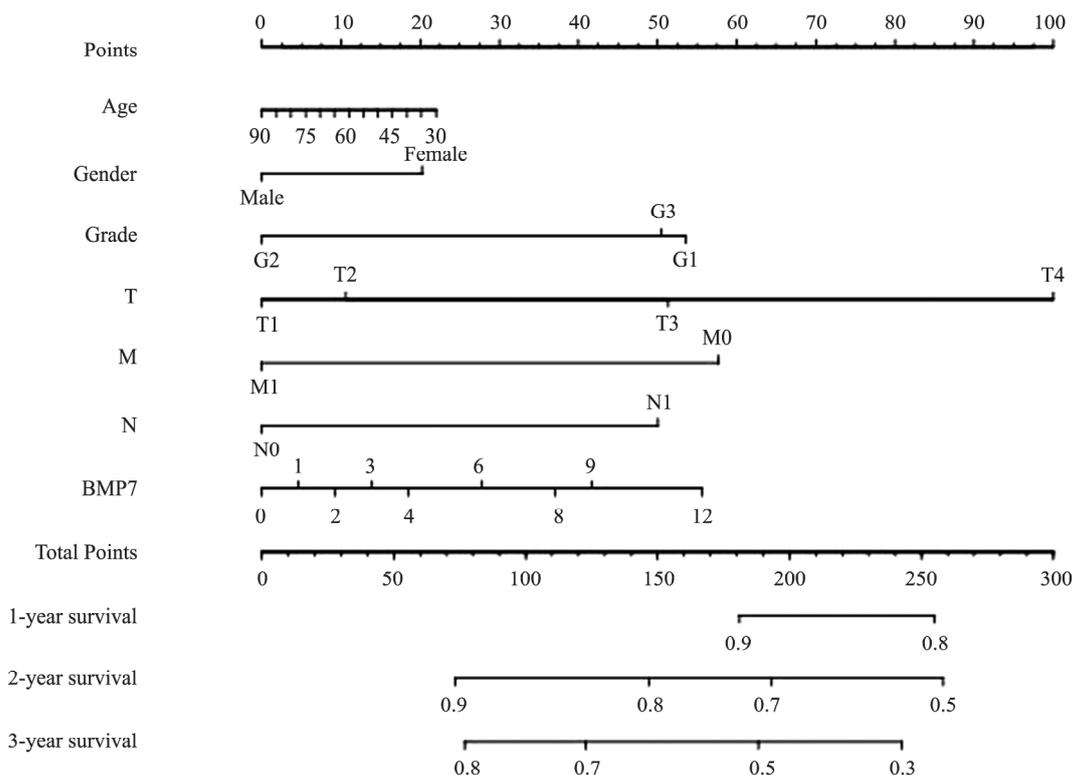


图 5 ESCC 风险预测列线图

分析原因可能是相对之前的研究扩大了样本数量且使用了其他地区的组织样本;从分子本身角度分析原因可能是 ESCC 可通过自分泌和旁分泌的方式产生 BMP7 调节 ESCC 微环境,其分泌量受多种因素影响也处于一种动态平衡状态。综合分析不同的 ESCC 组织 BMP7 表达量有所不同,进一步研究可使用内镜下黏膜剥离术或类器官等 ESCC 样本深入构建模型研究。列线图能综合多种影响因素,简易方便地实现个人评估,提高 ESCC 患者个体化诊断和预后的效率^[9]。

BMP7 是一种通过改变靶基因转录调节许多不同细胞类型的增殖、分化和凋亡的分泌蛋白^[3]。该细胞学实验验证过表达的 BMP7 质粒转染 EC9706 细胞后 CCK-8 以及平板克隆实验结果中过表达组的细胞增殖能力发生了显著的下降,同时 Transwell 迁移实验结果也提示,过表达 BMP7 的处理组中,ESCC 细胞的迁移能力也出现明显的减弱,BMP7 在 EC9706 中可发挥抑癌作用。有文献^[10]表明 BMP7 能抑制转移性肿瘤,能延缓肺癌转移和扩散。

越来越多的研究^[11-13]表明 BMPs 调节免疫细胞反应并在癌症中具有免疫抑制作用,比如调节巨噬细胞的激活和极化等。在 ESCC 里,该研究表明 BMP7 与 M1-TAM(经典活化型巨噬细胞)和 M2-TAM(交替活化型巨噬细胞)呈负相关。肿瘤相关巨噬细胞是数量最大的炎症细胞群,有 2 种亚型,M1-TAM 可产生 IFN- γ 、肿瘤坏死因子、IL-10 等,可在一定程度上抵抗食管鳞状细胞癌的进展,但随着食管肿瘤细胞及间质细胞分泌的相关细胞因子(包括 CCL-2、CCL-48 等趋化因子和 CSF-1)增加,部分 M1 型肿瘤细胞能向 M2 型转化,形成以 M2-TAMs 为主的免疫微环境浸润^[14],M2-TAM 促进癌症发生。在这里,BMP7 与树突状细胞呈正相关。树突状细胞表达 I 型和 II 型 BMP 受体(BMPRIA、BMPRIIB、IA 型激活素受体、BMPRII)和 BMP 信号转导分子(Smad1),其信号激活通过增加共刺激分子和 CD83、程序性细胞死亡配体 1(PD-L1)和 PD-L2 的表达,促进人类 DC 的表型成熟,而且 BMPs 处理的树突状细胞表现可增强的 T 细胞刺激能力。BMP7 可通过自分泌和旁分泌影响肿瘤微环境肿瘤和免疫细胞进而影响肿瘤的进展。研究^[3]表明 BMP7 信号通路是癌症中潜在的免疫治疗靶标,同时在 TC-GAESCC 数据库中 BMP7 相关的基因集与自身免疫性疾病通路呈正相关。高表达 BMP7 的 ESCC 也可以介导正常成纤维细胞活化为肿瘤相关成纤维细

胞,BMP7 可通过激活 Smad1/5/8 并抵消 TGF- β /Smad2/3 信号通路来抑制纤维化^[14]。BMP7 抑制可能是克服 ESCC 免疫治疗一个靶点。

参考文献

- [1] Delolme F, Anastasi C, Alcaraz L B, et al. Proteolytic control of TGF- β co-receptor activity by BMP-1/tolloid-like proteases revealed by quantitative iTRAQ proteomics [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(5): 1009-27.
- [2] 南红星,禹刘丽,王良海. CCL20 通过 ERK 通路促进 ESCC 细胞迁移和侵袭 [J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(3): 396-401.
- [3] Cortez M A, Masrourpour F, Ivan C, et al. Bone morphogenetic protein 7 promotes resistance to immunotherapy [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1-14.
- [4] 崔演,刘胜男,孙凤丹等. ESCC 间质组织中 FAP、CD68 的表达及意义 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2014, 30(1): 82-4.
- [5] 马琰迪,卢香云,何尚峰,等. m6A 甲基化修饰结合蛋白 YTHDF2 在食管癌组织中的表达及其对食管癌细胞增殖和迁移的影响 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2022, 48(4): 962-70.
- [6] 赵薇,季国忠. 微环境中肿瘤细胞与免疫细胞之间的代谢对话及对免疫治疗的影响 [J]. *南京医科大学学报:自然科学版* 2020, 40(6): 4.
- [7] 严琳,任景丽,孙凤丹,等. 食管鳞状细胞癌组织中骨形成蛋白 7 的表达 [J]. *郑州大学学报(医学版)* 2012, 47(5): 601-4.
- [8] 郑高赞. 食管癌旁分泌 BMP7 促进成纤维细胞活化调控肿瘤微环境的机制研究 [D]. 西安: 中国人民解放军空军军医大学 2018.
- [9] 田甜,景慧,付佳,恶性肿瘤患者谵妄发生风险的预测模型研究 [J]. *实用医学杂志* 2021, 37(20): 2641-6.
- [10] Lee J H, Lee G T, Woo S H, et al. BMP-6 in renal cell carcinoma promotes tumor proliferation through IL-10-dependent M2 polarization of tumor-associated macrophages [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(12): 3604-14.
- [11] Chen W, Ten Dijke P. Immunoregulation by members of the TGF β superfamily [J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(12): 723-40.
- [12] Martínez V G, Hernández-López C, Valencia J, et al. The canonical BMP signaling pathway is involved in human monocyte-derived dendritic cell maturation [J]. *Immunol Cell Biol* 2011, 89(5): 610-8.
- [13] Singla D K, Singla R, Wang J. BMP-7 treatment increases M2 macrophage differentiation and reduces inflammation and plaque formation in Apo E^{-/-} mice [J]. *PLoS One* 2016, 11(1): 78-9.
- [14] Mai S, Liu L, Jiang J, et al. Oesophageal squamous cell carcinoma-associated IL-33 rewires macrophage polarization towards M2 via activating ornithine decarboxylase [J]. *Cell Prolif* 2021, 54(2): 12-9.

(下转第 1010 页)

the lnc-CCDC117-1 expression vector and knockdown vector were constructed and transfected with HN6 , SCC9 , CAL27 cells , CCK-8 method , cloning and formation to verify the proliferation of tongue squamous cell. **Results** LncRNAs positively regulated by c-Myc were initially screened by gene chip technology. After overexpression or c-Myc knockdown in tongue squamous cell HN6 , these lncRNAs were verified to be consistent with the results of the chip , and the expression difference of lnc-CCDC117-1 was found to be the most significant. qRT-PCR test showed that c-Myc had a positive regulatory effect on lnc-CCDC117-1. When c-Myc was overexpressed , the expression of lnc-CCDC117-1 could be significantly up-regulated. lnc-CCDC117-1 expression was significantly down-regulated by c-Myc knockdown. Dual luciferase reporter genes showed that c-Myc could target the regulation of lnc-CCDC117-1 , and c-Myc was involved in regulating and enhancing the transcriptional activity of lnc-CCDC117-1. lnc-CCDC117-1 mainly existed in the nucleus of the cell. qRT-PCR results showed that the expression of lnc-CCDC117-1 and c-Myc significantly decreased by sh-lnc-CCDC117-1. The expression of lnc-CCDC117-1 was significantly up-regulated by + lnc-CCDC117-1. The results of growth curve assay , CCK-8 assay , cell scratch assay and cloning formation showed that overexpression of lnc-CCDC117-1 significantly promoted the proliferation and migration of tongue squamous cell cells , while knockdown of lnc-CCDC117-1 could inhibit the growth and proliferation of tongue squamous cell carcinoma cells. **Conclusion** lnc-CCDC117-1 is positively regulated by c-Myc , and overexpression of lnc-CCDC117-1 can promote cell proliferation , on the contrary , inhibit cells growth.

Key words long non-coding RNA; c-Myc; tongue squamous cell carcinoma; lnc-CCDC117-1; cell proliferation

(上接第 1000 页)

Preliminary study on the expression and function of bone morphogenetics protein 7 in ESCC

Sun Mengfei¹ , Huang Hongfang¹ , Dong Yuhang¹ , Zhang Huakun¹ , Zhou Ziru¹ , Sun Qi² , Guan Wenyan² , Zhao Linyue² , Cui Xiaobin² , Chen Yunzhao³ , Li Feng¹

(¹Dept of Pathology , School of Medicine , Shihezi University , Shihezi 832002; ²Dept of Pathology Nanjing Drum Tower Hospital , The Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School , Nanjing 210008;

³Dept of Pathology , The People's Hospital of SND , Suzhou 215129)

Abstract Objective To analyze the expression and immune infiltration levels of the BMP7 gene(BMP7) in esophageal squamous cell carcinoma(ESCC) . **Methods** Initially , in 274 cases of ESCC and 242 cases of normal tissues , the level of BMP7 was verified by immunohistochemistry , and the relationship between the expression difference and the survival cycle and clinical pathological characteristics of patients with ESCC was explored , and BMP7 overexpression plasmid transfection of ESCC cells was established , and the effect of BMP7 on the biological behavior of ESCC cells was examined by CCK-8 , Clone , and Transwell. **Results** BMP7 expression in normal esophageal tissues was higher than that of ESCC($P < 0.001$) , the expression level of BMP7 was correlated with the degree of differentiation of patients($P = 0.006$) and TNM staging($P < 0.001$) , and the survival of patients with high expression of BMP7 exceeded that of patients with low BMP7($P = 0.041$) , and the experiments of CCK-8 and Clone showed that the proliferation effect of cells in the overexpressed BMP7 group was lower than that of the control group. Transwell experiments confirmed that the cell invasion migration capacity of the overexpressed BMP7 group was less than that of the control one. The immune infiltration results showed that BMP7 was positively correlated with macrophages($P = 0.008$) and negatively correlated with γ - δ T cells($P = 0.028$) . **Conclusion** BMP7 is low in ESCC and associated with poor prognosis and immune infiltration levels in patients.

Key words esophageal squamous cell carcinoma; BMP7; immunity; prognosis