

## 论 著

(基础研究)

## 染色盒同源物 3 对人结直肠癌细胞增殖的影响及其机制研究

张嘉琦, 贾佩琦, 苏东明

**【摘要】 目的** 探讨染色盒同源物 3(CBX3)在结直肠癌组织和细胞中的表达,及其对结直肠癌细胞增殖能力的影响,并初步探讨其机制。**方法** 运用生物信息学方法对 CBX3 的表达情况、生存期以及共表达网络进行分析。应用免疫组织化学染色法检测 CBX3 在结直肠癌组织和配对癌旁组织中的差异表达。应用 Western blot 检测正常结肠上皮细胞 NCM460 以及结直肠癌细胞 HCT116、HT29、SW620 中 CBX3 的表达水平。将 CBX3 过表达质粒和特异性小干扰分别转染至 HCT116 细胞中,采用磺酰罗丹明 B(SRB)染色实验和克隆形成实验检测细胞的增殖能力。应用转录组测序技术检测差异表达基因。应用 qRT-PCR 及 Western blot 实验对差异基因进行验证。应用生物信息学方法对差异基因及 CBX3 进行相关性分析。**结果** 生物信息学分析显示 CBX3 在结直肠癌组织中表达高于癌旁组织( $P<0.001$ ),CBX3 高表达组患者无病生存期低于低表达组( $P<0.05$ ),CBX3 对转录组的影响广泛且复杂。CBX3 在结直肠癌组织中表达高于配对癌旁组织( $P<0.0001$ )。CBX3 在结直肠癌细胞中表达高于正常结肠上皮细胞( $P<0.01$ )。SRB 实验及克隆形成实验证实,过表达 CBX3 增强了 HCT116 细胞的增殖能力,敲低 CBX3 增殖能力降低( $P<0.01$ )。转录组测序结果显示,敲低 CBX3 后,CCAAT/增强子结合蛋白 delta(CEBPD) mRNA 表达升高( $P<0.001$ ),蛋白表达相应升高( $P<0.05$ ),且两者存在负性相关( $P<0.001$ ,  $R=-0.2$ )。**结论** CBX3 在结直肠癌组织及细胞中高表达,能够在体外促进细胞增殖。CBX3 可能通过抑制 CEBPD 转录因子的表达来发挥促癌作用。

**【关键词】** 结直肠癌;染色盒同源物 3;增殖;CCAAT/增强子结合蛋白 delta

**【中图分类号】** R36 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2021)01-0006-06

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1672-271X.2021.01.002

## The effect of CBX3 on the biological behavior of human colorectal cancer cells and its mechanism

ZHANG Jia-qi, JIA Pei-qi, SU Dong-ming

(Department of Pathology, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, Jiangsu, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression of Chromobox 3 (CBX3) in colorectal cancer tissues and cells. To explore the effect of CBX3 on the proliferation ability of colorectal cancer cells and its mechanism. **Methods** The bioinformatics method was used to analyze the expression, survival time and co-expression network of CBX3. Immunohistochemical staining was used to detect the differential expression of CBX3 in colorectal cancer tissues and paired adjacent tissues. Western blot was used to detect the expression level of CBX3 in normal colon epithelial cells NCM460 and colorectal cancer cells HCT116, HT29 and SW620. The CBX3 expression plasmid and specific siRNA were transfected into HCT116 cells, respectively. Sulphodamine B (SRB) staining experiment and clone formation experiment were used to detect the cell proliferation ability. RNA-seq was used to detect differentially expressed genes. qRT-PCR and Western blot were used to verify the differential genes. Bioinformatics method was used to analyze the correlation between differential genes and CBX3. **Results** Bioinformatics analysis showed that the expression of CBX3 in colorectal cancer tissues was higher than that in adjacent tissues ( $P<0.001$ ). The disease-free survival time of patients with high expression of CBX3 was lower

than that of patients with low expression of CBX3 ( $P<0.05$ ).

CBX3 had extensive and complex effects on the transcriptome. The expression of CBX3 in colorectal cancer tissues was higher than that in matched adjacent tissues ( $P<0.0001$ ). The ex-

基金项目:国家自然科学基金(81570779)

作者单位:211166 南京,南京医科大学病理学系(张嘉琦、贾佩琦、苏东明)

通信作者:苏东明, E-mail: sudongming@njmu.edu.cn

pression of CBX3 in colorectal cancer cells was higher than that in normal colon epithelial cells ( $P < 0.01$ ). SRB experiment and clone formation experiment confirmed that overexpression of CBX3 enhanced the proliferation of HCT116 cells, while knockdown of CBX3 decreased the proliferation of HCT116 cells ( $P < 0.01$ ). Transcriptome sequencing results showed that the mRNA expression of CCAAT/enhancer binding protein Delta (CEBPD) was increased after knocking down of CBX3 ( $P < 0.001$ ), and the protein expression was correspondingly increased ( $P < 0.05$ ), and there was a negative correlation between CEBPD and CBX3 ( $P < 0.001$ ,  $R = -0.2$ ). **Conclusion** CBX3 is highly expressed in colorectal cancer tissues and cells, and can promote cell proliferation *in vitro*. CBX3 may play a role in promoting tumor progression by inhibiting the expression of CEBPD transcription factors.

**[Key words]** colorectal cancer; chromobox3; proliferation; CCAAT/enhancer-binding protein delta

## 0 引言

结直肠癌是胃肠道中常见的恶性肿瘤,在我国其发病率近年不断上升。结直肠癌治疗选择多样且个体化,包括腹腔镜和手术局部切除、术前放疗、姑息化疗、靶向治疗和免疫治疗等等<sup>[1-3]</sup>。尽管如此,其治疗形势仍不乐观。部分与结直肠癌风险相关的癌症易感基因已被成功鉴定,但大多数导致发病的机制仍不清楚,有待进一步研究<sup>[4]</sup>。探讨结直肠癌发生发展的分子机制,寻找可靠的结直肠癌早期治疗靶点,仍旧是一个热点与难点。

染色盒同源物 3 (Chromobox3, CBX3), 属于 CBX 蛋白家族,是一种异染色质蛋白,又被称为异染色质蛋白 1 $\gamma$  (heterochromatin protein 1 $\gamma$ , HP1 $\gamma$ ), 存在于哺乳动物体内。CBX3 已被证实在肺腺癌、宫颈癌、乳腺癌、结直肠癌等多种癌症中表达存在不同程度的上调,特别是结直肠癌中,已有研究证实 miR-30a 靶向 CBX3,在小鼠异种移植模型中特异性地抑制结直肠癌细胞的生长<sup>[5]</sup>,说明 CBX3 在结直肠癌发生发展中发挥重要作用,而其可能涉及到的下游机制还未被完全阐明,有待进一步的研究。本研究旨在探讨 CBX3 在结直肠癌中的表达,及其对结直肠癌细胞增殖的影响,并初步研究其下游作用机制,以期对结直肠癌治疗提供新的思路。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 人正常结肠上皮细胞系 (NCM460) 及人结直肠癌细胞系 (HCT116、HT29、SW620) 购自美国模式培养物集存库 (American type culture collection, ATCC) 公司。16 例结直肠癌患者组织样本及其配对癌旁组织样本来自南京医科大学附属逸夫医院病理科,病理诊断均为腺癌。

### 1.2 研究方法

**1.2.1 生物信息学分析** 利用基因表达谱交互分析

(GEPIA) 数据库 (<http://gepia.pku.cn/>) 分析 CBX3 在各个类型癌症中癌组织及癌旁组织的表达情况,并对 TCGA 数据集内 270 例结直肠癌患者进行生存期分析, Kaplan-Meier 生存曲线评估 CBX3 表达与结直肠癌生存结果之间的相关性;利用 Oncomine 数据库 (<https://www.oncomine.org/>) 分析 CBX3 基因在结直肠癌中表达差异,阈值的确定依据如下值:  $P$  值为 0.0001, 倍数变化为 2, 各基因排序;利用 LinkedOmics 数据库 (<http://www.linkedomics.org/login.php>) 筛选 CBX3 相关基因并进行京都基因与基因组百科全书通路 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathway, KEGG 通路) 富集分析。

**1.2.2 免疫组织化学染色** 使用链霉菌生物素-过氧化物酶法 (SP 法) 对收集的 16 例结直肠癌配对标本进行免疫组织化学染色。兔抗人 CBX3 抗体购自英国 Abcam 公司,鼠兔通用型二抗及浓缩型 DAB 购自北京中山金桥公司。染色结果由 2 位病理医师独立评分并进行统计,根据 CBX3 表达量,阴性 0 分,弱阳性 1 分,阳性 2 分,强阳性 3 分。

**1.2.3 细胞培养** 人正常结肠上皮细胞 NCM460, 人结肠癌细胞系 HCT116、HT29、SW620, 均使用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基进行培养。培养条件为: 95% 空气, 5% 二氧化碳, 37 °C, 培养箱湿度 70% ~ 80%。

**1.2.4 Western blot 检测蛋白表达量** 收取正常结肠上皮细胞 NCM460 和结直肠癌细胞 HCT116、HT29、SW620 的细胞总蛋白进行 Western blot 实验。使用 10% 或 12% 的 SDS-PAGE 胶进行蛋白质电泳, 每孔上样量 20  $\mu$ g。湿转法将蛋白质转到 PVDF 膜上, 室温下 5% 的脱脂奶粉溶液封闭 2 h。分别加入一抗 4 °C 过夜, 次日二抗室温孵育 1 ~ 2 h。在摇床上进行以上操作, 每个步骤之间用 TBST 洗膜 10 min  $\times$  3 次, 最后加 ECL 超敏发光液暗室内曝光,

拍照并进行灰度分析。

**1.2.5 结直肠癌细胞转染** CBX3 过表达质粒购自南京诺唯赞生物科技有限公司, CBX3 特异性小干扰购自上海吉玛制药技术有限公司。用于转染的质粒载体经 DNA Mini-prep (QIAGEN 公司, 德国) 提取。按照脂质体核酸转染试剂使用说明书 (上海翊圣生物科技有限公司) 将 CBX3 过表达质粒 (记作 CBX3-OE 组)、空载质粒 (记作 Vector 组), 或特异性小干扰 (共三组序列, 后续实验使用 si-1、si-2 及 si-3 混合组进行, 记作 CBX3-RNAi 组)、无义序列 (同记作 Vector 组) 转染至 6 孔板上培养的结直肠癌细胞。24 h 后用于增殖实验; 48 h 后收集细胞用于 Western blot 实验。

**1.2.6 细胞增殖实验** 采用 SRB 实验及克隆形成实验来观察细胞增殖情况。用含 10% 胎牛血清的培养基悬浮细胞并计数, 在 96 孔板中每孔接种 3000 个细胞, 完全培养基体积 200  $\mu$ L, 分别于 24 h、48 h、72 h 和 96 h 收取细胞进行 SRB 染色, 检测 515 nm 波长处吸光值; 在六孔板中每孔接种 300~500 个细胞, 培养 10~14 d, 肉眼可见细胞克隆时, 进行结晶紫染色后拍照, 镜下计数克隆数目。

**1.2.7 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)** HCT116 细胞转染特异性小干扰及无义序列后, 提取 RNA, 按照逆转录试剂盒 (美国 Qiagen 公司) 说明书进行逆转录, 获得 cDNA, 存于  $-20^{\circ}\text{C}$ 。订购 CBX3 及 CEBPD (CCAAT/enhancer-binding protein delta, CCAAT/增强子结合蛋白 delta) 引物, 按照 qRT-PCR 标准体系加样, 在实时定量 PCR 仪 (ABI 公司, 美国) 上运行程序。CBX3 及 CEBPD 相对于 GAPDH 的表达使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算和标准化。

**1.2.8 转录组测序** 选取 HCT116 细胞系, 利用 siRNA 敲低 CBX3 表达, 对 CBX3 敲低组及其对照组进行转录组测序。测序后, 对 2 组间基因表达量进行差异分析, 筛选出显著差异基因并制作热图。

**1.3 统计学分析** 使用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析。所有实验均重复 3 次, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间比较采用  $t$  检验, 相关基因筛选采用 Pearson 相关性分析。以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 生物信息学分析

**2.1.1 数据库分析 CBX3 表达及其与生存期关系** GEPIA 数据库分析显示, CBX3 在多种癌症中呈现高表达, 尤其在结肠癌与直肠癌中, CBX3 显著高表达, 见图 1。在 Oncomine 数据库中, CBX3 的 mRNA 表达水平明显高于正常组织 ( $P < 0.01$ )。上述结果提示 CBX3 表达水平在结直肠癌中明显升高。Kaplan-Meier 生存曲线显示, 高表达 CBX3 的患者无病生存期低于低表达组 (log-rank 检验,  $P = 0.034$ ), 提示 CBX3 高表达与低生存率相关, 见图 2。

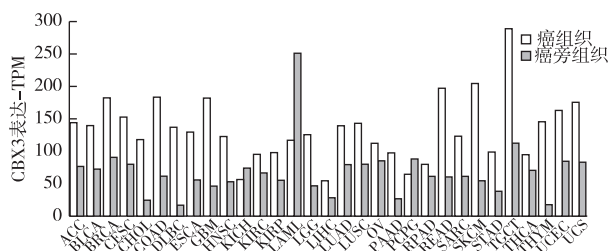


图 1 GEPIA 数据库分析 CBX3 在癌症特别是结直肠癌中表达水平

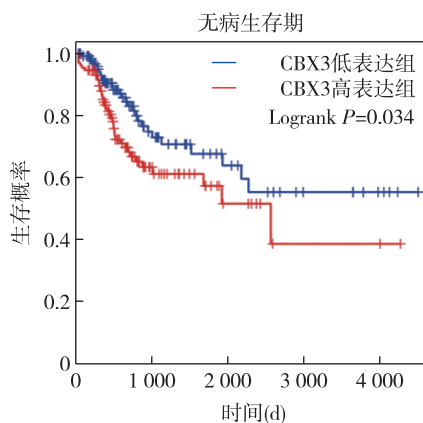


图 2 CBX3 表达水平与无病生存期关系

**2.1.2 CBX3 共表达网络研究** KEGG 通路分析结果显示, CBX3 相关基因在核糖体、剪接体、蛋白酶体、RNA 运输及降解、错配修复、细胞周期、Th17 细胞分化、T 细胞受体信号等多种途径富集, 表明 CBX3 对转录组的影响广泛且复杂。

**2.2 结直肠癌组织及细胞中 CBX3 表达水平** 免疫组织化学染色结果显示, CBX3 主要定位于细胞

核中,且在肿瘤组织中的表达明显高于对应癌旁组织,染色结果进行评分统计,差异具有统计学意义 ( $P < 0.0001$ ),见图 3。Western blot 实验表明,CBX3 在各结直肠癌细胞系中蛋白表达量显著高于正常结肠上皮细胞系,见图 4。

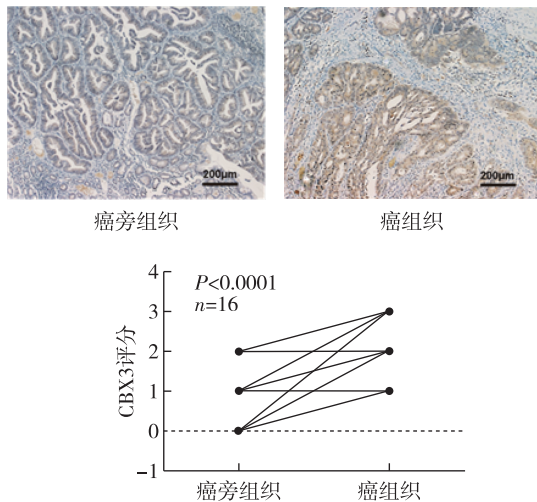


图 3 免疫组织化学染色检测结直肠癌组织中 CBX3 表达及评分

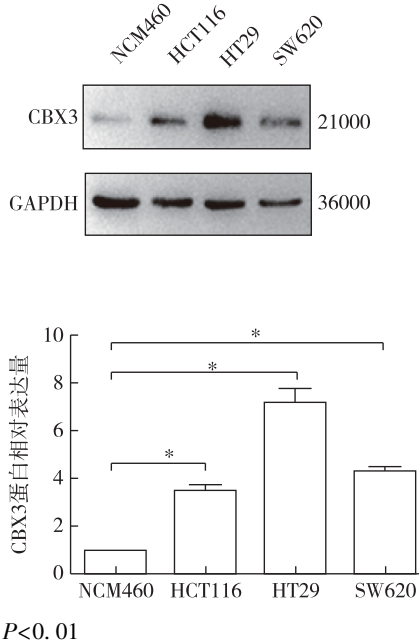


图 4 Western blot 检测结直肠癌细胞系中 CBX3 蛋白相对表达量 ( $n = 3$ )

**2.3 CBX3 对结直肠癌细胞增殖的影响** Western blot 结果显示过表达及敲低效率显著,见图 5。SRB 实验结果显示,与 Vector 组相比,CBX3-OE 组细胞增殖速率明显上升,CBX3-RNAi 组细胞增殖速率

明显下降;克隆形成实验结果显示,与 Vector 组相比,CBX3-OE 组细胞克隆形成数量明显增多,CBX3-RNAi 组克隆形成数目明显减少;见图 6。以上结果提示 CBX3 能够促进 HCT116 细胞的增殖。

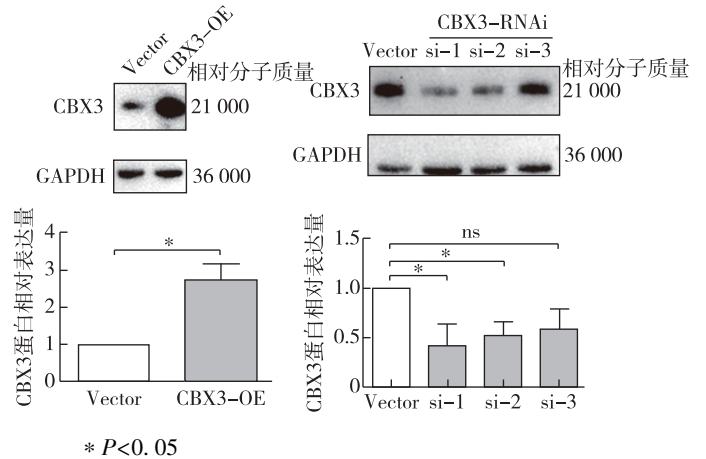


图 5 Western blot 验证 CBX3 过表达或敲低效率 ( $n = 3$ )

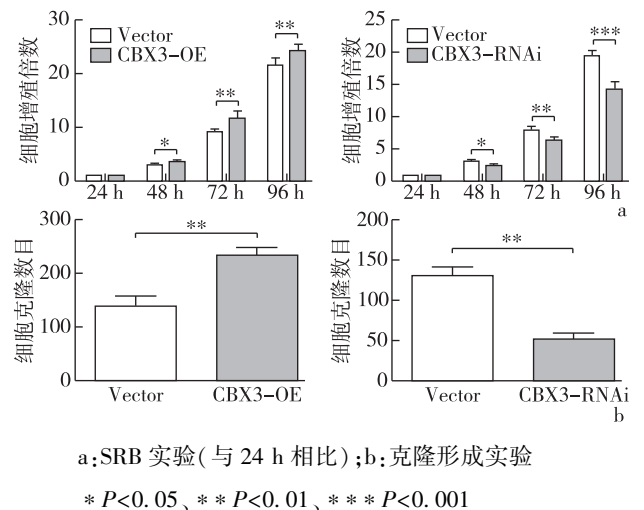
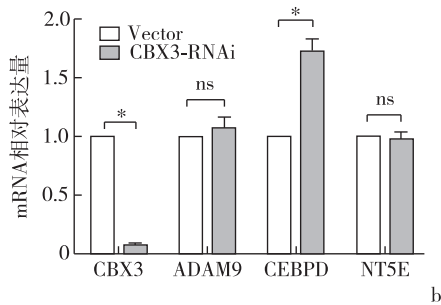
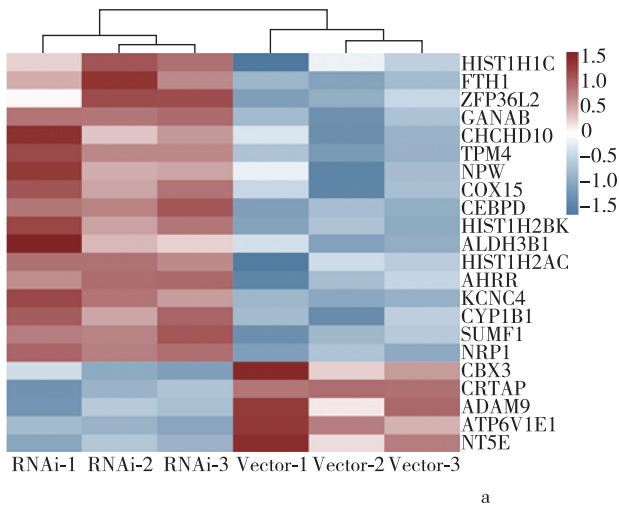


图 6 SRB 实验及克隆形成实验检测细胞增殖能力 ( $n = 3$ )

**2.4 敲低 CBX3 后对 CEBPD 表达的影响** 转录组测序筛选差异基因热图见图 7a,查阅其基因功能最终选取 CEBPD、ADAM9、NT5E 进行后续实验。qRT-PCR 结果显示,敲低 CBX3 后,CEBPD mRNA 水平显著升高,见图 7b。Western blot 结果显示,CEBPD 蛋白水平也相应升高,见图 8a。GEPIA 数据库中 CBX3 与 CEBPD 相关性分析提示两者存在负性相关,见图 8b。以上结果提示,CBX3 的促癌作用可能通过抑制下游 CEBPD 的表达来实现。

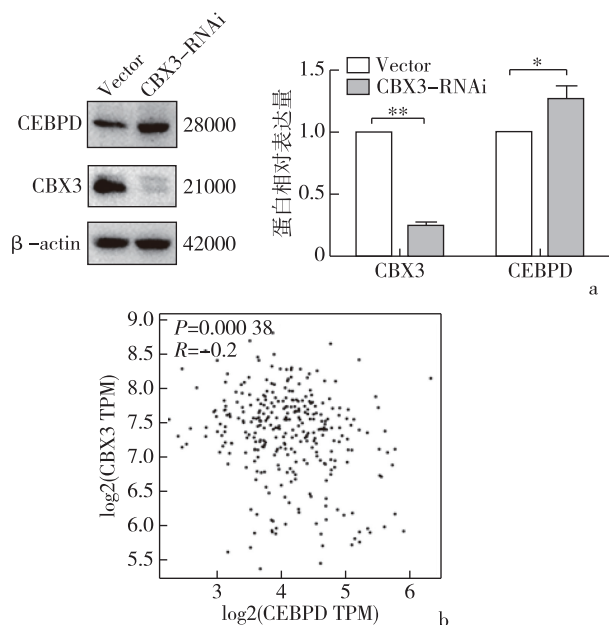




a: 转录组测序差异基因热图; b: qRT-PCR 检测差异基因表达

\*  $P < 0.001$

图 7 转录组测序筛选差异基因并进行验证 ( $n=3$ )



a: Western blot 检测 CEBPD 蛋白相对表达量; b: CBX3 与 CEBPD 相关性分析 (GEPIA)

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.001$

图 8 Western blot 检测 CEBPD 表达水平 ( $n=3$ )

### 3 讨 论

CBX3 蛋白属于 CBX 蛋白家族, 与其结构相似的还有 CBX1 和 CBX5, 均属于异染色质蛋白。已知异染色质蛋白高度保守并参与细胞功能, 包括 DNA 复制和修复<sup>[6]</sup>、转录调控<sup>[7]</sup>和 RNA 拼接<sup>[8]</sup>、细胞分化<sup>[9-10]</sup>、细胞周期和细胞分裂调控<sup>[11]</sup>、着丝粒和端粒内环境稳定<sup>[12]</sup>等。而不同的亚型又具有各自独特的功能, 本课题重点关注 CBX3 的功能及机制。

前期调研发现, CBX3 与多种癌症相关, 例如, 有研究显示 CBX3 的体内敲低减少了 K-RasG12D 诱导的肺腺癌的发生, 延长了 K-RasG12D 诱导的肺腺癌小鼠的存活期<sup>[13]</sup>; 有关胰腺癌的研究中发现, CBX3 的过度表达可以诱导胰腺癌细胞的体外增殖、无锚定生长、迁移和侵袭等等<sup>[14]</sup>。课题组通过生物信息学分析, 明确了 CBX3 在多种癌症中均呈现高表达, 尤其在结直肠癌中, CBX3 表达显著升高且与预后相关。KEGG 通路分析提示, CBX3 可能通过蛋白酶体、RNA 运输及降解、错配修复、细胞周期等途径影响结直肠癌的发生发展, 从而发挥积极的促癌作用。

后续研究中, 利用免疫组织化学染色及 Western blot 实验, 确认了 CBX3 在结直肠癌组织中及细胞中均显著高表达。通过在结直肠癌细胞中过表达或敲低 CBX3 证明了 CBX3 能够促进结直肠癌细胞的体外增殖。在此基础上进一步进行转录组测序, 以期能够找到 CBX3 促进结直肠癌细胞增殖的下游分子机制。

通过转录组测序, 在敲低 CBX3 后, 课题组发现多个癌症相关因子表达发生改变, 其中 CEBPD 表达明显升高。CEBPD 是一种转录因子, 由单个外显子 CEBPD 基因编码, 能够调控细胞分化、运动、生长停滞、增殖和死亡等多种生物学过程。有研究显示, 紫草素对银屑病局部皮损 JAK/STAT3 信号通路有明显抑制作用, 并增加 CEBPD 的表达, 从而显著抑制细胞增殖并诱导凋亡<sup>[15]</sup>。而另有研究证实, CBX3 敲低可以导致骨肉瘤细胞中 G0 和 G1 期的凋亡增加和细胞周期停滞<sup>[16]</sup>, 提示 CBX3 与细胞凋亡途径密切相关。通过 GEPIA 数据库对 CBX3 和

CEBPD 进行相关性分析,发现两者存在负性相关,因此推测,CBX3 可能通过抑制 CEBPD 表达从而进一步抑制细胞凋亡,在结直肠癌中发挥促癌作用。但两者之间具体的作用机制还未完全明确,有待进一步研究与完善。

综上所述,本课题组在细胞水平验证了 CBX3 能够促进结直肠癌细胞的增殖,并发现这种促进作用可能是通过抑制 CEBPD 转录因子的表达而实现的,从而为基于 CBX3 为靶标的结直肠癌早期诊疗提供了新思路。

### 【参考文献】

- [1] Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, *et al.* Colorectal cancer[J]. *Lancet*, 2019,394(10207):1467-1480.
- [2] 陈昕涛,姚厚山.结直肠癌腹腔镜手术治疗的研究进展[J].*东南国防医药*,2020,22(3):283-288.
- [3] 杨蓉蓉,徐兴国,黄新冲.全麻联合硬膜外阻滞与腹横肌平面阻滞对结直肠癌根治术患者术后恢复的影响[J].*医学研究学报*,2019,32(10):1070-1075.
- [4] Jiao S, Peters U, Berndt S, *et al.* Estimating the heritability of colorectal cancer [J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23 (14): 3898-3905.
- [5] Liu M, Huang F, Zhang D, *et al.* Heterochromatin protein HP1 $\gamma$  promotes colorectal cancer progression and is regulated by miR-30a[J]. *Cancer Res*, 2015,75(21):4593-4604.
- [6] Bártoová E, Malýšková B, Komůrková D, *et al.* Function of heterochromatin protein 1 during DNA repair [J]. *Protoplasma*, 2017,254(3):1233-1240.
- [7] Kwon SH, Workman JL. The changing faces of HP1: From heterochromatin formation and gene silencing to euchromatic gene expression: HP1 acts as a positive regulator of transcription[J]. *Bioessays*, 2011,33(4):280-289.
- [8] Yearim A, Gelfman S, Shayevitch R, *et al.* HP1 is involved in regulating the global impact of DNA methylation on alternative splicing[J]. *Cell Rep*, 2015,10(7):1122-1134.
- [9] Mattout A, Aaronson Y, Sailaja BS, *et al.* Heterochromatin Protein 1 $\beta$  (HP1 $\beta$ ) has distinct functions and distinct nuclear distribution in pluripotent versus differentiated cells[J]. *Genome Biol*, 2015,16:213.
- [10] Casale AM, Cappucci U, Fanti L, *et al.* Heterochromatin protein 1 (HP1) is intrinsically required for post-transcriptional regulation of Drosophila Germline Stem Cell (GSC) maintenance [J]. *Sci Rep*, 2019,9(1):4372.
- [11] Chakraborty A, Prasanth SG. Phosphorylation-dephosphorylation cycle of HP1 $\alpha$  governs accurate mitotic progression[J]. *Cell Cycle*, 2014,13(11):1663-1670.
- [12] Canzio D, Larson A, Narlikar GJ. Mechanisms of functional promiscuity by HP1 proteins [J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24 (6):377-386.
- [13] Alam H, Li N, Dhar SS, *et al.* HP1 $\gamma$  Promotes Lung Adenocarcinoma by Downregulating the Transcription-Repressive Regulators NCOR2 and ZBTB7A [J]. *Cancer Res*, 2018, 78 (14):3834-3848.
- [14] Chen LY, Cheng CS, Qu C, *et al.* Overexpression of CBX3 in Pancreatic Adenocarcinoma Promotes Cell Cycle Transition-Associated Tumor Progression[J]. *Int J Mol Sci*, 2018,19(6):1768.
- [15] Yu YJ, Xu YY, Lan XO, *et al.* Shikonin induces apoptosis and suppresses growth in keratinocytes via CEBP- $\delta$  upregulation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019,72:511-521.
- [16] Ma C, Nie XG, Wang YL, *et al.* CBX3 predicts an unfavorable prognosis and promotes tumorigenesis in osteosarcoma[J]. *Mol Med Rep*, 2019,19(5):4205-4212.

(收稿日期:2020-07-05; 修回日期:2020-07-17)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:朱一超)