

王开琼,邢贻雷,乔欣,等. *BTG1* 过表达对胰腺癌细胞增殖、侵袭和 cyclin D1、cyclin B1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(9): 81-86.

Wang KQ, Xing YL, Qiao X, et al. Effects of *BTG1* overexpression on proliferation, invasion and protein expression of cyclin D1, cyclin B1, MMP-2 and MMP-9 in pancreatic cancer cells [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(9): 81-86.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.09.012

BTG1 过表达对胰腺癌细胞增殖、侵袭和 cyclin D1、cyclin B1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响

王开琼,邢贻雷,乔欣,李仕总,宫东伟,余智威,吴奕强*

(海南省人民医院胆胰外科,海口 570311)

【摘要】 目的 探讨 B 细胞易位基因 1 (*BTG1*) 过表达对胰腺癌细胞增殖和侵袭的影响及其机制。**方法** 采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测人胰腺癌细胞株 PANC-1、AsPC-1、BxPc-3 和正常胰腺导管上皮细胞株 H6C7 中 *BTG1* mRNA 和蛋白的表达水平。将体外培养的 BxPc-3 细胞分为对照组 (未转染)、pcDNA3.1 组 (转染 pcDNA3.1 空载体质粒) 和 *BTG1* 组 (转染 pcDNA3.1-*BTG1* 过表达质粒), 转染 48 h 后, qRT-PCR 和 Western blot 检测转染效果; MTT 法、流式细胞术和 Transwell 小室法分别检测各组细胞的增殖能力、周期分布和侵袭能力; Western blot 检测各组细胞中细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1)、细胞周期蛋白 B1 (cyclin B1)、基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 和基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 蛋白的表达情况。**结果** 与 H6C7 细胞相比, PANC-1、AsPC-1、BxPc-3 细胞中 *BTG1* mRNA 和蛋白的表达水平均明显降低 ($P<0.05$), 且 BxPc-3 细胞差异最为显著。与对照组相比, *BTG1* 组细胞的增殖、侵袭能力、细胞在 S 期的百分比以及细胞中 cyclin D1、cyclin B1、MMP-2、MMP-9 蛋白的表达水平均明显降低, 而细胞在 G0/G1 期的百分比明显升高 ($P<0.05$); 而 pcDNA3.1 组和对照组细胞的增殖能力、侵袭能力、周期分布情况以及 cyclin D1、cyclin B1、MMP-2、MMP-9 蛋白的表达水平均无统计学差异 ($P>0.05$)。**结论** *BTG1* 过表达可抑制胰腺癌细胞的增殖和侵袭, 其作用机制可能与下调 cyclin D1、cyclin B1、MMP-2、MMP-9 蛋白的表达有关。

【关键词】 胰腺癌; *BTG1*; 细胞增殖; 侵袭; cyclin D1; MMP-9

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 09-0081-06

Effects of *BTG1* overexpression on proliferation, invasion and protein expression of cyclin D1, cyclin B1, MMP-2 and MMP-9 in pancreatic cancer cells

WANG Kaiqiong, XING Yilei, QIAO Xin, LI Shizong, GONG Dongwei, YU Zhiwei, WU Yiqiang*

(Department of Biliary and Pancreatic Surgery, Hainan General Hospital, Haikou 570311, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of B cell translocation gene 1 (*BTG1*) overexpression on proliferation and invasion of pancreatic cancer cells and to elucidate the mechanism. **Methods** The expression of *BTG1* mRNA and protein in the human pancreatic cancer cell lines, PANC-1, AsPC-1 and BxPc-3, and in the normal pancreatic ductal epithelial cell line, H6C7, was determined by qRT-PCR and Western blotting, respectively. BxPc-3 cells cultured *in vitro* were divided into a control group (untransfected), pcDNA3.1 group (transfected with an empty pcDNA3.1 vector)

[作者简介] 王开琼 (1985—), 男, 主治医师, 硕士。E-mail: kaqiong66@163.com

[通信作者] 吴奕强 (1969—), 男, 副主任医师。E-mail: wyq1948@126.com

and BTG1 group (transfected with pcDNA3.1-BTG1 overexpression plasmid). At 48 h after transfection, the transfection effects were examined by qRT-PCR and Western blotting. Cell proliferation, cell cycle distribution and invasion ability in each group were measured by MTT assay, flow cytometry and Transwell chamber, respectively. The expression of cell cycle protein D1 (cyclin D1), cyclin B1, matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and MMP-9 was determined by Western blotting.

Results Compared with the H6C7 cells, the expression levels of *BTG1* mRNA and proteins in PANC-1, AsPC-1 and BxPc-3 cells were significantly decreased ($P < 0.05$), and the most significant difference was observed in the BxPc-3 cells. Compared with the control group, the proliferation, invasiveness, the percentage of cells in S phase and the protein expression of cyclin D1, cyclin B1, MMP-2 and MMP-9 in the BTG1 group were significantly decreased, while the percentage of cells in G0/G1 phase was significantly increased ($P < 0.05$). There was no significant difference between the pcDNA3.1 group and the control group in cell proliferation, invasiveness, cell cycle distribution and expression of the abovementioned proteins ($P > 0.05$). **Conclusions** *BTG1* overexpression inhibits the proliferation and invasion of pancreatic cancer cells, and its mechanism may be associated with downregulation of cyclin D1, cyclin B1, MMP-2 and MMP-9 protein expression.

【Keywords】 pancreatic cancer; *BTG1*; cell proliferation; invasion; cyclin D1; MMP-9

胰腺癌是一种常见的消化系统恶性肿瘤,具有恶性程度高、早期诊断困难、病情进展快和预后效果差等特点,胰腺导管腺癌是其重要的病理类型,约占全部胰腺癌的 90% 以上^[1]。在我国,胰腺癌发病率位居恶性肿瘤的第 8 位,五年生存率只有 7.2%^[2]。目前,能够进行手术根治性治疗的患者只有不到 20%,大部分患者就诊时已发生局部转移^[3]。因此,阐明胰腺癌发生发展的分子机制以及寻找有效的治疗靶点一直是学术界研究的热点。B 细胞易位基因 1 (BTG1) 是 TOB/BTG 家族成员,被报道在喉鳞状细胞癌、胃癌和结肠癌等多种肿瘤组织或细胞中异常低表达,具有调控细胞增殖、凋亡、侵袭和转移等多种生物学功能,有望成为肿瘤诊断和治疗的潜在靶点^[4-6]。近年来,有报道发现 BTG1 在胰腺导管腺癌组织中表达下调,且与肿瘤的分期、淋巴结转移和预后不良等密切相关^[7],但 BTG1 在胰腺癌发生发展中的作用及其机制尚不清楚。因此,本研究通过体外细胞实验构建 BTG1 过表达的胰腺癌细胞株,探讨 BTG1 对胰腺癌细胞增殖和侵袭的影响,并探讨其可能的分子机制,以期对胰腺癌的诊治提供新的靶点。

1 材料和方法

1.1 实验材料

人胰腺癌细胞株 PANC-1、AsPC-1、BxPc-3 和正常人胰腺导管上皮细胞株 H6C7,来源于美国 ATCC。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 培养基、青/链霉素和胎牛血清,美国 Gibco 公司(批号分别为 8115051、15140-122、

SH41289); Lipofectamine 2000、Opti-MEM 培养基和 TRIzol 试剂,美国 Invitrogen 公司(批号分别为 11668027、31985-070、15596-026); 二甲基亚砜,上海国药集团化学试剂公司(批号 20160915); 碘化丙啶、噻唑蓝 (MTT) 试剂,美国 Sigma 公司(批号分别为 MKBP1360 V、M2128); Matrigel 基质胶,美国 BD Biosciences 公司(批号为 356234); 细胞 IP 裂解液、SDS-PAGE 上样缓冲液和 ECL 发光试剂盒,上海碧云天生物公司(批号分别为 C1054、P0015、P0018); 鼠抗人 BTG1、细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1)、细胞周期蛋白 B1 (cyclin B1)、基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 和基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 和 β 肌动蛋白 (β -actin) 单克隆抗体,美国 Santa Cruz 公司(批号分别为 SC-450、SC-70898、SC-10736、SC-21733、SC-47778); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠二抗,北京中杉金桥生物公司(批号为 107724); pcDNA3.1-BTG1 过表达质粒和 pcDNA3.1 空载体质粒由海南大学生物技术实验中心提供; 二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白定量试剂盒,上海捷瑞生物公司(批号为 1008G18); 逆转录试剂盒,北京智杰方远科技有限公司(批号为 K1622); PCR 反应试剂盒,北京百奥莱博科技有限公司(批号为 RFT100)。Transwell 小室(美国 Corning 公司); Eco-170 CO₂ 培养箱(美国 Harris 公司); BDS200 倒置显微镜(重庆奥特光学仪器公司); 550 型全自动酶标仪、GelDoc EZ 型凝胶成像分析系统和 CFX96 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); C6 流式细胞仪(北京科誉兴业科技公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

采用含有胎牛血清 100 g/L 和青链霉双抗各 100 U/mL 的 DMEM 培养基于 CO₂ 体积分数为 5% 的 37℃ 恒温培养箱中培养 PANC-1、AsPC-1、BxPc-3 和 H6C7 细胞株。每 2 ~ 3 d 换液一次,当细胞铺满瓶底 80% 左右时,加入 0.25% 胰蛋白酶消化,并按照 1:3 的比例进行传代。

1.3.2 qRT-PCR 检测 BTG1 mRNA 的表达

参照 TRIzol 试剂说明书提取总 RNA,并将其反转录合成单链 cDNA。以 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。分析产物熔解曲线检测目的基因的特异性,目的基因的相对定量分析采用 β -actin 内参基因循环阈值进行标准化,数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。PCR 反应条件:94℃ 灭活或预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,60 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,循环 40 次,72℃ 延伸 5 min。由美国 Invitrogen 公司合成的 PCR 引物序列如下:BTG1-F: 5'-CACCATGCATCCCTTCTACACCCGG-3', BTG1-R: 5'-TTAACCTGATACAGTCATCATATTG-3'; β -actin-F: 5'-CCAAGGCCAACC GCCAGAAGATGAC-3'; β -actin-F: 5'-AGGTACATGTGTGCCGCCAGAC-3'。实验重复 3 次。

1.3.3 Western blot 检测 BTG1、cyclin D1、cyclin B1、MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达

采用 IP 细胞裂解液提取待测细胞的总蛋白后,并以 BCA 法测定总蛋白的浓度。总蛋白 60 μ g/孔在 SDS-PAGE 凝胶中电泳分离后,转膜。将 PVDF 膜放入含 5% 脱脂奶粉的 Tween 20 溶液中常温下摇床孵育 1 h。4℃ 下,转入含特异性一抗的 Tween 20 溶液中摇床孵育 24 h。采用 Tween 20 溶液浸洗 10 min $\times$ 3 次后,37℃ 下转入含二抗的 Tween 20 溶液中摇床孵育 1 h。再经 Tween 20 溶液洗膜 3 次后,加入 ECL 发光剂暗室内显影曝光。以 β -actin 为内参,分析目的蛋白的相对表达水平。实验重复 3 次。

1.3.4 细胞分组及转染

实验分为对照组(未转染)、pcDNA3.1 组(转染 pcDNA3.1 空载体质粒)和 BTG1 组(转染 pcDNA3.1-BTG1 过表达质粒),每组设 3 个复孔。取第 5 代生长良好的对数生长期 BxPc-3 细胞以 2.5×10^5 个/孔铺于 6 孔细胞板上,于细胞培养箱中常规培养至 70% 融合度时,参照 Lipofectamine 2000 转染试剂说明书步骤根据实验分组将 pcDNA3.1 空载体质粒和 pcDNA3.1-BTG1 过表达质粒转染至 BxPc-3 细胞中。转染 24 h 后,采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测转染效果。

1.3.5 MTT 法检测 BxPc-3 细胞增殖能力

采用 0.25% 胰蛋白酶消化对照组、pcDNA3.1 组和 BTG1 组细胞,以每孔 100 μ L 细胞悬液(浓度为 1×10^4 个/mL)接种于 96 孔板上,每组设置 3 个复孔。置于培养箱内分别培养 48, 72, 96 h 后,加入 5 mg/mL MTT 试剂 20 μ L/孔。孵育 4 h 后,弃上清,加入 150 μ L 二甲基亚枫震荡反应 15 min。酶联免疫检测仪测定 492 nm 波长处各组 BxPc-3 细胞的吸光度(OD)值。实验重复 3 次。

1.3.6 流式细胞术检测 BxPc-3 细胞的周期分布

将对数生长期的对照组、pcDNA3.1 组和 BTG1 组(每组 3 个重复)细胞以 0.25% 胰蛋白酶消化后,1000 r/min 离心 5 min 弃上清液。经预冷的 PBS 漂洗 2 ~ 3 次后,于 4℃ 下加入 2 mL 预冷的 70% 乙醇固定 24 h。离心弃乙醇后,以 PBS 漂洗细胞。弃上清后,加入含 RNA 酶的碘化丙啶溶液避光染色 20 min。采用流式细胞仪检测各组 BxPc-3 细胞的周期变化。实验重复 3 次。

1.3.7 Transwell 小室检测 BxPc-3 细胞侵袭能力

取 Transwel 小室放入 24 孔细胞板中,将 Matrigel 基质胶以 100 μ L/孔铺于小室底部的聚碳酸酯微孔膜上。置于 4℃ 下充分聚合成胶。以胰蛋白酶消化待检细胞后,制备浓度为 5×10^4 /mL 的细胞悬液。按照每孔 200 μ L 细胞悬液接种至成胶的 Transwel 小室上层,并于下层中加入 600 μ L/孔含胎牛血清的细胞培养液。细胞培养箱中常规培养 48 h 后,以棉签小心擦去未穿膜的细胞。常温下,先以甲醛固定 30 min,再以 0.5% 结晶紫染色 15 min。显微镜下观察,结果以随机选取的 5 个视野细胞数的平均值表示。实验重复 3 次。

1.4 统计学方法

实验数据以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 形式表示,采用 SPSS 22.0 进行统计学分析,多组间比较使用单因素方差分析,组间多重比较采用 SNK-q 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BTG1 在胰腺癌细胞中低表达

qRT-PCR 检测发现,与正常胰腺导管上皮细胞 H6C7 相比,胰腺癌细胞 PANC-1、AsPC-1 和 BxPc-3 中 BTG1 mRNA 的表达水平逐渐降低,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。Western blot 检测与 qRT-PCR 检测结果相一致,与 H6C7 细胞相比,BTG1 蛋

白在 PANC-1、AsPC-1 和 BxPc-3 细胞中的表达水平均明显降低 ($P<0.05$), 且 BxPc-3 细胞差异最为显著。故后续选用胰腺癌 BxPc-3 细胞进行实验。结果见图 1 和表 1。

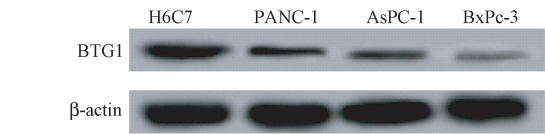


图 1 胰腺癌细胞中 BTG1 蛋白的表达

Figure 1 BTG1 protein expression in the pancreatic cancer cells

表 1 BTG1 蛋白和 mRNA 在胰腺癌细胞中的相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 1 Relative expression of BTG1 protein and mRNA in pancreatic cancer cells

细胞系 Cell line	BTG1 蛋白 BTG1 protein	BTG1 mRNA
H6C7	0.67±0.04	1.00±0.05
PANC-1	0.35±0.03 *	0.82±0.04 *
AsPC-1	0.23±0.03 *	0.67±0.03 *
BxPc-3	0.11±0.02 *	0.54±0.03 *
F 值 F-value	183.158	79.780

注:与 H6C7 细胞系比较, * $P<0.05$ 。
Note. Compared with the H6C7 cell line, * $P<0.05$.

2.2 上调 BTG1 表达抑制胰腺癌 BxPc-3 细胞增殖

qRT-PCR 和 Western blot 检测发现, 转染 pcDNA3.1-BTG1 过表达质粒的 BTG1 组细胞中 BTG1 mRNA 和蛋白的表达水平较对照组明显升高 ($P<0.05$); 而转染 pcDNA3.1 空载体的 pcDNA3.1 组与对照组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。MTT 实验检测发现, 与对照组相比, BTG1 组细胞在 48, 72, 96 h 时间点的 OD 值均明显降低, 细胞增殖能

力减弱 ($P<0.05$); 而 pcDNA3.1 组与对照组细胞的增殖能力差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结果见图 2 和表 2。

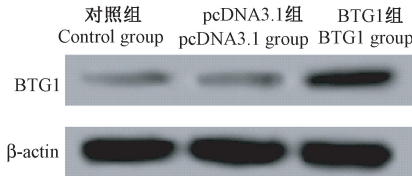


图 2 各组中 BTG1 蛋白的表达

Figure 2 BTG1 protein expression in each group

2.3 上调 BTG1 表达诱导胰腺癌 BxPc-3 细胞周期阻滞于 G0/G1 期

流式细胞仪检测发现, pcDNA3.1 组细胞在 G0/G1 期、S 期和 G2/M 期所占的百分比与对照组相比, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); 但 BTG1 组细胞在 G0/G1 期的百分比明显高于对照组, 在 S 期的百分比明显低于对照组, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。Western blot 进一步检测周期相关蛋白 cyclin D1 和 cyclin B1 的表达发现, 与对照组相比, BTG1 组细胞中 cyclin D1 和 cyclin B1 蛋白的表达水平均明显降低 ($P<0.05$); 而 pcDNA3.1 组与对照组相比, cyclin D1 和 cyclin B1 蛋白的表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结果见图 3 和表 3。

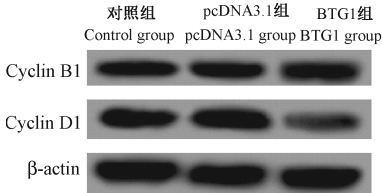


图 3 各组中 cyclin D1 和 cyclin B1 蛋白的表达

Figure 3 Cyclin D1 and cyclin B1 protein expression in each group

表 2 转染效果及上调 BTG1 表达对细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 2 Transfection efficiency and the effect of BTG1 upregulation on cell proliferation

组别 Groups	BTG1 蛋白相对表达量 Relative expression of BTG1 protein	BTG1 mRNA 相对表达量 Relative expression of BTG1 mRNA	OD 值 OD value		
			48 h	72 h	96 h
对照组 Control group	0.09±0.02	1.00±0.06	0.54±0.03	0.65±0.04	0.88±0.06
pcDNA3.1 组 pcDNA3.1 group	0.12±0.03	0.98±0.05	0.52±0.03	0.63±0.03	0.85±0.05
BTG1 组 BTG1 group	0.58±0.05 *	3.42±0.28 *	0.41±0.02 *	0.50±0.03 *	0.64±0.03 *
F 值 F-value	178.658	209.652	20.046	17.559	21.986

注:与对照组比较, * $P<0.05$ 。
Note. Compared with the control group, * $P<0.05$.

表 3 上调 BTG1 表达对胰腺癌细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)
Table 3 Effect of BTG1 upregulation on the cell cycle of pancreatic cancer cells

组别 Groups	细胞周期(%) Cell cycle			Cyclin D1	Cyclin B1
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M		
对照组 Control group	57.15±2.06	32.64±1.18	10.22±0.45	0.75±0.06	0.87±0.05
pcDNA3.1 组 pcDNA3.1 group	55.34±1.25	33.27±2.30	11.35±1.32	0.73±0.05	0.92±0.06
BTG1 组 BTG1 group	78.28±3.12 *	11.45±0.63 *	10.27±0.85	0.48±0.03 *	0.31±0.02 *
F 值 F-value	94.205	196.105	1.375	29.100	158.815

注:与对照组比较, * $P<0.05$ 。
Note. Compared with the control group, * $P<0.05$.

2.4 上调 BTG1 表达抑制胰腺癌细胞侵袭

与对照组相比,pcDNA3.1 组的穿膜细胞数和 MMP-2、MMP-9 蛋白的表达水平无明显改变 ($P>0.05$),而 BTG1 组的穿膜细胞数以及 MMP-2、MMP-9 蛋白的表达水平均明显低于对照组 ($P<0.05$)。结果见图 4 和表 4。

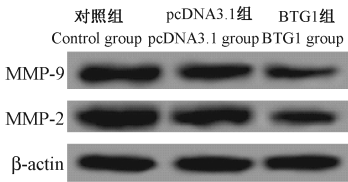


图 4 各组中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达
Figure 4 MMP-2 and MMP-9 protein expression in each group

3 讨论

BTG1 最早是从慢性 B 淋巴细胞性白血病染色体上得到的,后又从淋巴母细胞中分离出来,定位于 12q22 染色体上,可通过调控细胞周期进程调节细胞的增殖过程,在肿瘤的发生发展过程中扮演着重要角色^[8]。BTG1 在食管癌组织中表达降低,与

肿瘤的淋巴结转移、临床分期、组织学分级和总体生存时间显著相关,上调其表达后,可通过抑制 cyclin D1、Bcl-2 和 MMP-9 蛋白的表达减弱 Eca-109 细胞的增殖、侵袭、迁移能力,增强细胞凋亡能力,升高 G0/G1 期细胞比例^[9]。BTG1 在胃癌组织中的表达明显低于非肿瘤性粘膜和淋巴结转移癌,与肿瘤浸润深度、淋巴结转移、TNM 分期和预后效果差等呈正相关,BTG1 过表达能够明显抑制 BGC-823 和 MKN28 细胞的增殖、迁移和侵袭,并诱导细胞周期 G2/M 期阻滞、细胞分化、衰老和凋亡^[10]。在结肠直肠癌中,BTG1 过表达可诱导 HCT-15 细胞阻滞于 G2 期,也可诱导 HCT-116 细胞阻滞于 G1 期,同时也可增强肿瘤细胞对紫杉醇和顺铂等化疗药物的敏感性^[6]。可见,BTG1 在肿瘤发生发展过程中发挥着类似抑癌基因的作用,并可能是肿瘤潜在的生物标志物和治疗靶点。有报道发现,BTG1 在胰腺癌组织中异常低表达,与临床分期、淋巴结转移和预后不良等有关^[7,11],但目前 BTG1 在胰腺癌发生发展中的作用并不明确。本研究通过体外细胞实验,初步验证了 BTG1 在人胰腺癌细胞株 PANC-1、

表 4 上调 BTG1 表达对胰腺癌细胞侵袭的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)
Table 4 Effect of BTG1 upregulation on invasion of pancreatic cancer cells

组别 Groups	穿膜细胞数 Number of penetrating cells	MMP-2	MMP-9
对照组 Control group	76.00±5.12	1.32±0.17	1.09±0.12
pcDNA3.1 组 pcDNA3.1 group	73.52±3.96	1.16±0.22	0.96±0.09
BTG1 组 BTG1 group	41.00±2.85 *	0.55±0.03 *	0.42±0.03 *
F 值 F-value	68.636	19.001	48.551

注:与对照组比较, * $P<0.05$ 。
Note. Compared with the control group, * $P<0.05$.

AsPC-1、BxPc-3 中低表达。通过转染 pcDNA3.1-BTG1 过表达质粒成功构建 BTG1 过表达的 BxPc-3 细胞株后,检测发现 BxPc-3 细胞的增殖和侵袭能力明显减弱;同时发现,BxPc-3 细胞在 G₀/G₁ 期的百分比明显升高,S 期的百分比明显降低,细胞被阻滞于 G₀/G₁ 期。该结果与 BTG1 在既往研究中发挥的抑癌基因的结果相一致。

细胞周期失控导致的肿瘤细胞恶性增殖是肿瘤发生发展的重要原因,该过程受到细胞周期依赖性蛋白激酶和细胞周期蛋白等多种因子的共同调控;cyclin D1 和 cyclin B1 是调节细胞周期活性的两种重要的周期蛋白,前者是调控 G₁/S 期转变的 G₁ 期细胞周期蛋白,后者是促进 G₂/M 期转换的分裂期周期蛋白,两者均在胰腺癌组织或细胞中异常表达,参与细胞的周期调控,进而推动肿瘤细胞的恶性增殖^[12-13]。进一步检测 cyclin D1 和 cyclin B1 蛋白的表达发现,BTG1 过表达可下调 BxPc-3 细胞中 cyclin D1 和 cyclin B1 蛋白的表达。这一结果与 Zhu 等^[14]研究得到的 BTG1 过度表达可通过抑制 cyclin D1 和 cyclin B1 表达诱导细胞阻滞于 G₀/G₁ 期,抑制乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞增殖的分子机制相吻合。这也提示,BTG1 过表达可能通过抑制 cyclin D1 和 cyclin B1 表达诱导胰腺癌细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期,进而抑制癌细胞增殖。胰腺癌的发生发展不仅与肿瘤细胞的恶性增殖有关,细胞的侵袭也是影响其进展的重要因素。基质金属蛋白酶家族是一类与细胞侵袭和转移关系密切的锌依赖性内肽酶家族,MMP-2 和 MMP-9 是该家族中重要的明胶酶,在胰腺癌细胞侵袭和转移过程中发挥着重要作用^[15-16]。为了进一步探讨 BTG1 调控胰腺癌细胞侵袭的分子机制,本研究进一步检测发现,在 BTG1 过表达的 BxPc-3 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达明显受到抑制。提示,BTG1 过表达可能通过下调 MMP-2 和 MMP-9 表达抑制胰腺癌细胞的侵袭。

综上所述,BTG1 在胰腺癌细胞中低表达,在胰腺癌的发生发展过程中可能起着负调控作用。上调 BTG1 表达可通过抑制胰腺癌细胞增殖和侵袭,其作用机制可能与下调 cyclin D1、cyclin B1、MMP-2 和 MMP-9 表达有关。BTG1 具有多种生物学功能,本研究仅涉及到了胰腺癌细胞增殖、细胞周期和细胞侵袭部分生物学作用,后期将会从胰腺癌细胞凋亡及放化疗方面入手探讨 BTG1 在胰腺癌中的作用,为以 BTG1 为靶点的胰腺癌基因治疗提供实验依据。

参考文献:

- [1] Li J, Liu F, Gupta S, et al. Interventional nanotheranostics of pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Theranostics*, 2016, 6(9): 1393-1402.
- [2] 王鑫龙,孙备. 中国抗癌协会胰腺癌综合诊治指南(2018 版)更新解读 [J]. *临床外科杂志*, 2019, 27(1): 21-24.
- [3] 方向,麦刚,刘忠亮,等. 胰腺癌淋巴结转移情况对预后的影响 [J]. *肝胆胰外科杂志*, 2017, 29(1): 27-31.
- [4] 姜润学,胡万宁,孙国贵,等. BTG1 在喉鳞状细胞癌组织中的表达及其临床意义 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2015, 29(16): 1447-1450.
- [5] 曾宪清,吴勤祥,张晓勇,等. BTG1 在胃癌中的表达及其临床意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(7): 1106-1109.
- [6] Zhao S, Chen SR, Yang XF, et al. BTG1 might be employed as a biomarker for carcinogenesis and a target for gene therapy in colorectal cancers [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(5): 7502.
- [7] Huang Y, Zheng J, Tan T, et al. BTG1 low expression in pancreatic ductal adenocarcinoma is associated with a poorer prognosis [J]. *Int J Biol Markers*, 2018, 33(2): 189-194.
- [8] 姜润学,胡万宁,孙国贵,等. BTG1 对喉癌细胞增殖和凋亡的影响及其机制研究 [J]. *中国癌症杂志*, 2015, 25(12): 959-965.
- [9] Sun GG, Wang YD, Cheng YJ, et al. BTG1 underexpression is an independent prognostic marker in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(10): 9707-9716.
- [10] Zheng H, Li J, Shen D, et al. BTG1 expression correlates with pathogenesis, aggressive behaviors and prognosis of gastric cancer: a potential target for gene therapy [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(23): 19685-19705.
- [11] 黄于芳. BTG1 蛋白在胰腺癌中的表达及其临床意义 [D]. 福州: 福建医科大学, 2016.
- [12] Zhang Y, Su Y, Zhao Y, et al. microRNA-720 inhibits pancreatic cancer cell proliferation and invasion by directly targeting cyclin D1 [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 9256-9262.
- [13] Peng YP, Zhou J, Zhang JJ, et al. Prognostic value of cyclin B1 expression in cancers of the digestive system: a meta-analysis [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2016, 16(12): 12418-12425.
- [14] Zhu R, Zou ST, Wan JM, et al. BTG1 inhibits breast cancer cell growth through induction of cell cycle arrest and apoptosis [J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(5): 2137-2144.
- [15] Grunwald B, Vandooren J, Gerg M, et al. Systemic ablation of MMP-9 triggers invasive growth and metastasis of pancreatic cancer via deregulation of IL-6 expression in the bone marrow [J]. *Mol Cancer Res*, 2016, 14(11): 1147-1158.
- [16] Cai J, Du S, Wang H, et al. Tenascin-C induces migration and invasion through JNK/c-Jun signalling in pancreatic cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(43): 74406-74422.