

过表达 KLF7 对食管鳞状癌细胞的增殖和迁移的影响

陈晶晶, 张志威, 慕晓玲

摘要 目的 探索 Kruppel-like factor 7 (KLF7) 对食管鳞癌细胞 Eca109 细胞增殖、迁移和周期的影响。方法 利用生物信息学方法研究 KLF7 在食管鳞癌组织中的表达模式及其与患者预后、病理分级的关系。利用 Real-time PCR、Western blot 与细胞免疫荧光技术研究食管鳞癌细胞中 KLF7 的表达模式与亚细胞定位。利用 KLF7 过表达质粒 (pcDNA-3.10-KLF7) 细胞转染实现 KLF7 在 Eca109 食管鳞癌细胞中过表达。采用平板克隆计数和 CCK-8 检测研究细胞增殖能力, 利用 Transwell 研究细胞迁移能力, 利用流式细胞术检测细胞周期。结果 KLF7 在食管癌组织和细胞中均有表达, 其表达水平与患者病理分级显著相关 ($P < 0.05$), 与患者生存率无显著相关性。食管癌细胞系 (Eca109 和 EC9706) 中 KLF7 的表达水平显著高于正常食管上皮细胞 (Het-1A, $P < 0.05$), 并且 Het-1A 细胞中 KLF7 高表达于细胞质和细胞核, 而 2 种食管癌细胞 Eca109 和 EC9706 中 KLF7 仅高表达于细胞核, 在 Eca109 细胞中过表达 KLF7 后改变细胞周期、促进细胞的增殖和迁移以及 CCND1 和 P53 的表达水平上调 ($P < 0.05$)。结论 KLF7 的过表达可能促进食管癌细胞的增殖和迁移。

关键词 食管癌; Kruppel-like factor 7; 增殖; 迁移; P53; CCND1

中图分类号 R 73; Q 279; R 32

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)01-0120-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.01.020

食管癌 (esophageal carcinoma, ESCA) 是最常见的恶性消化道肿瘤之一^[1]。我国是食管癌高发地区, 食管癌发病率在我国位居恶性肿瘤发病率的第 3 位, 死亡率位居所有癌症死亡的第 4 位^[2]。食管癌的发病与环境因素和遗传因素密切相关^[3-6]。虽然食管癌的检测和治疗方面已经有了很大进展, 但是, 总体来说 ESCA 患者的预后仍然很差。Kruppel-like

factor 7 (KLF7) 是一类蛋白质羧基端具有 3 个高度保守的 C2H2 锌指结构的转录因子, 近年来大量研究^[7-11]报道显示 KLF7 在胰腺导管癌、肺癌、头颈鳞癌与胃癌等多种癌症中充当抑癌因子。而 KLF7 在食管癌中的研究甚少, 目前只报道了 KLF7 在食管癌组织中高表达^[12]。为了进一步探索 KLF7 在食管癌中的分子功能, 该研究探索了 KLF7 在食管癌组织和细胞中的表达模式, 并研究了 KLF7 对食管癌 Eca109 细胞增殖和迁移能力的影响, 有助于进一步揭示食管癌发生发展的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料 本研究所使用的食管鳞状细胞系 Eca109、EC9706 和 Het-1A, 购于北京大学医学院细胞资源中心; pcDNA-3.10 空载质粒 (empty vector, EV) 和 KLF7 过表达质粒 (pcDNA-3.10-KLF7, KLF7) 为石河子大学医学院组织胚胎学教研室构建并保存; RPMI1640 培养液购于美国 Gibco 公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购于以色列 BI 公司; Lipofectamine™ 2000 转染试剂购于美国赛默飞世尔科技有限公司; 山羊抗兔 IgG、鼠抗人 β -actin 蛋白抗体、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 购于北京中杉金桥生物技术有限公司; KLF7 抗体购于美国 Abcam 公司; RNA 提取试剂盒购于美国 Omega 公司; 反转录试剂购于美国 Promega 公司; 实时定量 PCR 试剂盒以及专用 96 孔板购于德国 QIAGEN 公司; transwell 小室购于美国康宁公司; CCK-8 试剂盒购于西安米鼠生物有限公司; 引物由上海生工工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理 使用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青链霉素的 RPMI1640 培养基培养 Eca109、EC9706 和 Het-1A 细胞。采用以下方法处理细胞: 采用阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 按照说明书操作向 Eca109 细胞内转染 KLF7 的过表达质粒及空载质粒。

1.2.2 生物信息学分析 利用 Sangerbox 和 GEPIA 生物信息学平台分析 KLF7 在不同癌症组织中的表

2022-09-08 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31460310); 石河子大学拔尖人才项目 (编号: CXBJ201905)

作者单位: 石河子大学医学院组织胚胎学教研室, 石河子 832000

作者简介: 陈晶晶, 女, 硕士研究生;

慕晓玲, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: xiaoling-mr@163.com;

张志威, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zzwneau@163.com

达数据;GEPIA2 数据库的参数设置如下,① 基因: KLF7;② 总生存期(overall survival, OS);③ 分组阈值:中位值;④ 风险比:显示(Yes);⑤ 95% 置信区间(95% CI):显示(Yes)。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 提取细胞总 RNA,逆转录成 cDNA,然后进行 PCR 扩增,GAPDH 作为内参。所用到的引物详见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 检测引物

基因名	参考序列(检索号)	引物序列
KLF7	NM_003709.4	F: 5'-GATGGCAGCTTCGTGTCAGTG-3' R: 5'-AGAGGAGCGACTGACTGGG-3'
KLF7	NM_001270943.1	F: 5'-CTCCAGAAAACGAGAAATCGAG-3' R: 5'-GGAACAGTCCAAGTCTCACC-3'
KLF7	NM_001270944.1	F: 5'-GAGATGATGTAAGTGGTTCGGC-3' R: 5'-GGAACAGTCCAAGTCTCACC-3'
KLF7	NM_001270942.1	F: 5'-GCGCTTCTTCTCTGCACC-3' R: 5'-TCAGTCTGTCTGGCTCAC-3'
GAPDH	NM_001256799.3	F: 5'-GCTGGTCTCCTCTGACTTCAACA-3' R: 5'-CCAAATTCGTTGTCATACCAGGAAATG-3'
P21	NM_000389.5	F: 5'-TCACCGAGACACCACTGGAG-3' R: 5'-AGAGGAGCGAGTGAAGTGGG-3'
P53	NM_000546.6	F: 5'-GGAAATTTGCGTGTGAGTATTT-3' R: 5'-GTTGTAGTGGATGCTGTACAG-3'
CCND1	NM_053056.3	F: 5'-CCTCGGTGCTCTACTTCAAAATG-3' R: 5'-CACTTCTGTCTCTCGCAGAC-3'

1.2.4 Western blot 裂解细胞并提取总蛋白,调整蛋白浓度,上样、电泳、转膜和封闭后,将已经封闭好的 PVDF 膜加入对应的抗体,其中 KLF7 抗体(美国 abcam 公司,1:1 000), β -actin 抗体(北京中杉金桥,1:5 000),4℃ 孵育过夜;洗涤后,孵育二抗 1 h,洗膜曝光。

1.2.5 细胞免疫荧光实验 细胞消化离心,将悬液接种于 20 mm 盖玻片上,次日,固定 30 min 后清洗,透膜 10 min 清洗,室温封闭 10 min,加入 KLF7 抗体(美国 abcam 公司,1:50)孵育过夜,洗涤后予以二抗(北京中杉金桥,1:100)避光室温孵育 1 h,滴加 DAPI 染液孵育 15 min 后洗涤。滴加抗荧光淬灭剂,封片观察。

1.2.6 CCK-8 实验 按照 3×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板,每组设置 5 个复孔,于 24、48、72、96 h 每孔添加 100 μ l 的 CCK-8 试剂,继续孵育 1 h 后,检测吸光度值。

1.2.7 平板克隆实验 按照 1×10^3 /孔的密度接种于 6 孔板,每组设置 3 个复孔,常规培养 10 d,至肉眼可见的克隆时弃上清液,加入 1 ml、40 g/L 多聚甲醛固定 20 min,清洗 2 次,加入结晶紫溶液染色

20 min,冲洗,拍照计数。

1.2.8 流式细胞术分析 消化收集细胞,加入 1 ml PBS,加入 3 ml 无水乙醇置于 -20℃ 冰箱过夜,次日加入 PBS 离心静置 15 min,离心,弃上清液,加入 1 ml DNA staining solution,室温避光孵育 30 min。流式细胞仪上机测试。每组 3 个重复。

1.2.9 Transwell 实验检测 取 200 μ l 加入 Transwell 上室,细胞数为 4×10^4 个/孔,取 600 μ l 含有 20% FBS 的培养基加入 Transwell 下室,培养 24 h,经甲醇固定和结晶紫染色后,显微镜下随机选取 5 个视野对迁移细胞进行细胞计数。每组设置 3 个重复。

1.3 统计学处理 数据分析使用 Graphpad Prism 8 软件,如非特殊说明,数据均表示为 $\bar{x} \pm s$,两组数据间差异采用非配对双尾 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KLF7 在食管癌中表达模式的生物信息学分析 利用 Sangerbox 生物信息分析平台对 KLF7 在多种癌组织中的表达模式进行分析,结果显示 KLF7 在大多数癌组织中与相应正常组织中的表达存在显著差异($P < 0.05$,图 1A)。利用 GEPIA 在线工具分析 KLF7 在食管癌患者中的表达模式,结果显示 KLF7 表达水平与食管癌患者的病理分期显著相关($F = 3.03$, $P = 0.0307$,图 1B),但是,没有发现 KLF7 表达水平与食管癌患者的总体生存率存在显著相关(图 1C)。

2.2 KLF7 在食管癌细胞中的表达与亚细胞定位

Western blot 结果显示,KLF7 在食管癌细胞系 Eca109 和 EC9706 与正常食管上皮细胞系 Het-1A 中均有表达(图 2A),并且食管癌细胞中 KLF7 的表达水平高于正常上皮细胞($t = 2.876$, $t = 6.517$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。Real-time PCR 结果显示 KLF7 的 4 种转录本(NM_003709、NM_001270943、NM_001270944 和 NM_001270942)在正常食管上皮和食管癌细胞系中均有表达,它们的转录水平在正常食管上皮细胞系和食管癌细胞系中不存在显著差异(图 2B)。

采用免疫荧光细胞化学染色技术对 KLF7 在食管癌细胞中进行亚细胞定位研究,结果显示,在食管癌细胞 Eca109 和 EC9706 细胞系中,KLF7 的表达主要表达于细胞核,而在正常食管上皮细胞 Het-1A 细胞系中,KLF7 同时高表达于细胞核和细胞质,见

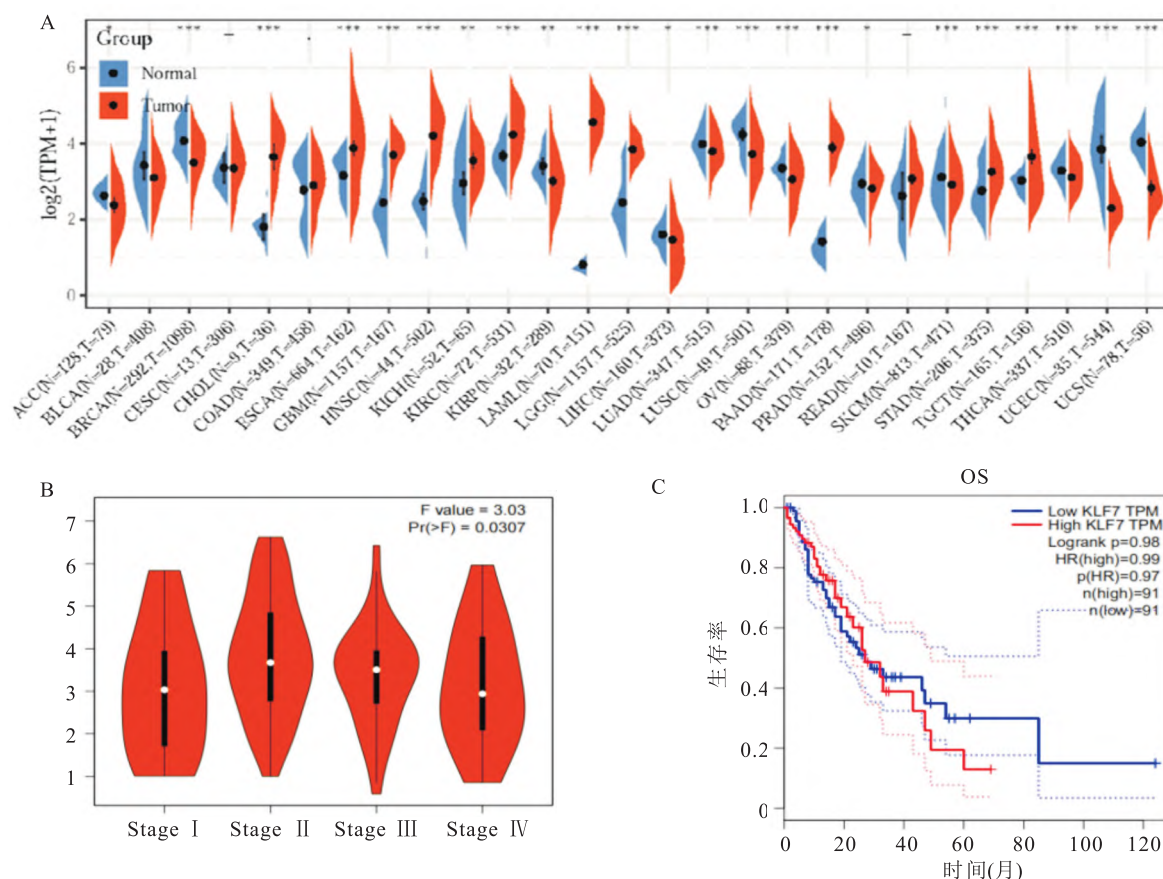


图1 生物信息学分析 KLF7 在癌组织和正常组织的表达模式

A: KLF7 在多种癌症组织的表达模式; B: KLF7 与食管癌患者不同病理分期的关系; C: KLF7 与患者总生存率的关系

图 2C。

2.3 过表达 KLF7 促进 Eca109 细胞系的增殖 为了进一步研究 KLF7 在食管癌细胞中的生物学作用,本研究选择了 Eca109 细胞系作为研究对象,使用 pcDNA-3.10-KLF7 和 pcDNA-3.10 空载体质粒(empty vector, EV)分别转染细胞,采用 Western blot 验证质粒转染后细胞中 KLF7 的表达水平,结果如图 3A 显示,转染 48 h 后,相对于转染 EV 的细胞,转染 KLF7 过表达质粒的细胞中, KLF7 蛋白表达水平明显升高($t = 7.202, P < 0.01$);采用 CCK-8 法和平板克隆实验检测细胞的增殖能力,过表达 KLF7 后, Eca109 细胞的增殖能力显著增加($t = 18.43, P < 0.05$),见图 3B、C。以上结果表明,体外细胞水平,过表达 KLF7 促进食管癌 Eca109 细胞增殖。

2.4 过表达 KLF7 影响细胞的周期 流式细胞术研究转染 KLF7 过表达质粒 48 h 后 Eca109 细胞周期,如图 4A、B 所示, G0/G1 期和 G2 期细胞的比例

在 KLF7 过表达组和对照组之间没有显著差异($t = 13.06, t = 1.733$),但是,过表达 KLF7 的 Eca109 细胞的 S 期比例显著高于对照组($t = 5.917, P < 0.05$),见图 4A。

Real-time PCR 检测结果如图 4C 所示,过表达 KLF7 的 Eca109 细胞中 P53 和 CCND1 表达水平显著增加($t = 6.936, t = 4.898, P < 0.01$),而 P21 的表达水平未发现显著变化,但存在上调趋势($t = 1.378, P > 0.05$),表明过表达 KLF7 可能通过调控 CCND1 促进细胞从 G0 期向 S 转变,同时通过调控 P53 的表达反馈调控细胞周期和增殖。

2.5 过表达 KLF7 促进细胞的迁移能力 为了探究 KLF7 对食管鳞癌细胞的迁移能力的影响,采用 Transwell 实验检测 Eca109 的迁移能力。结果表明,与 EV 组相比,过表达 KLF7 后 Eca109 细胞穿过聚碳脂膜的细胞数目增多($P < 0.01$,图 5),表明过表达 KLF7 促进食管癌 Eca109 细胞的迁移。

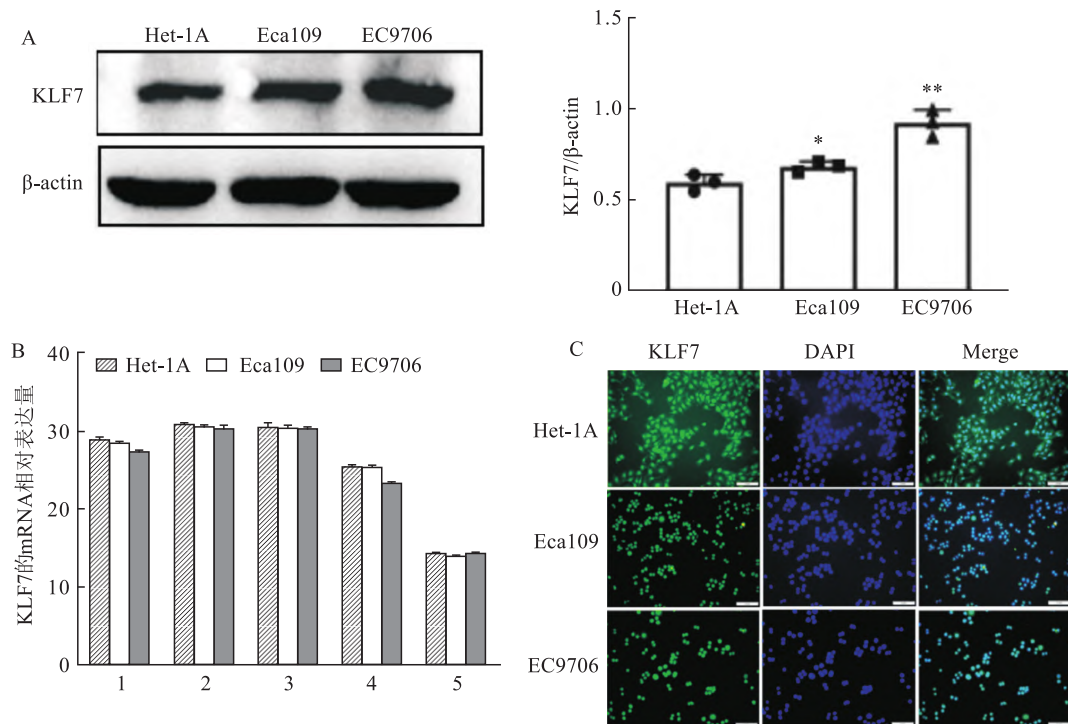


图2 KLF7在Eca109、EC9706和Het-1A中的表达与定位

A: Western blot 检测 KLF7 在 Eca109、EC9706 与 Het-1A 细胞系中蛋白表达; B: Real-time PCR 分析 4 种 KLF7 转录本在 Eca109、EC9706 与 Het-1A 细胞系中 mRNA 表达; C: 免疫荧光细胞化学染色检测 KLF7 在 Eca109、EC9706 与 Het-1A 细胞系中的定位 $\times 200$; 1: NM_001270942. 1; 2: NM_001270943. 1; 3: NM_001270944. 1; 4: NM_003709. 4; 5: GAPDH; 与 Het-1A 细胞系比较; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

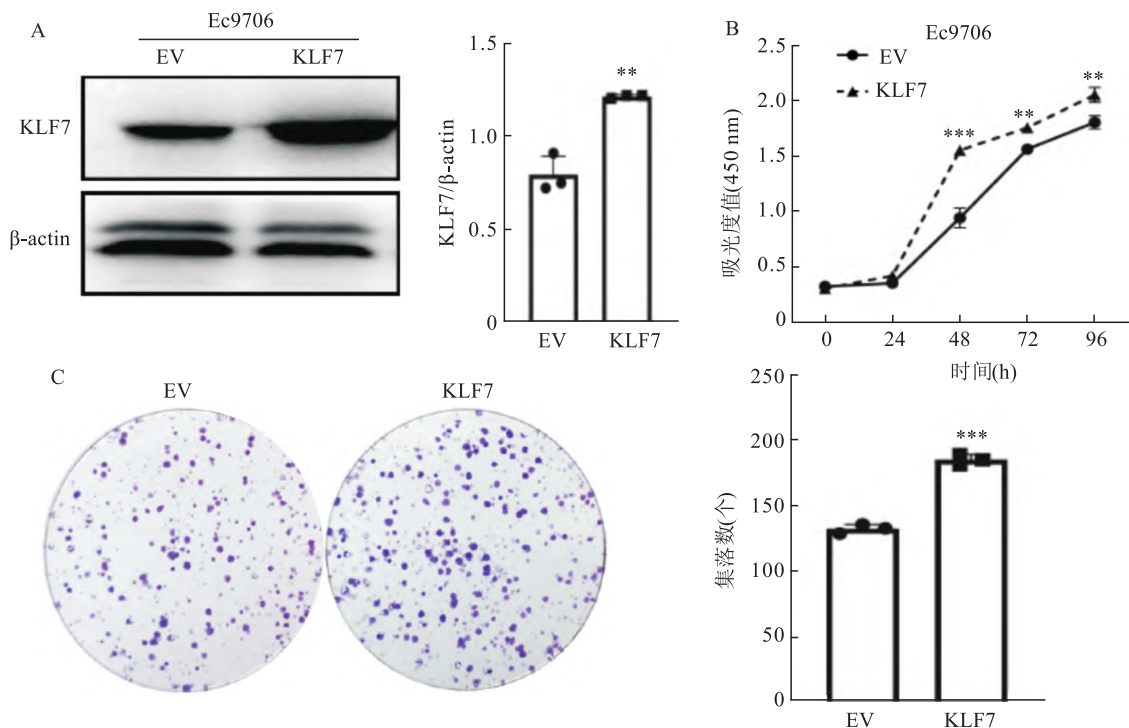


图3 过表达 KLF7 对 Eca109 细胞增殖能力的影响

A: Western blot 检测在 Eca109 细胞中转染过表达质粒后 KLF7 蛋白表达水平; B: CCK-8 检测 Eca109 细胞系增殖能力; C: 平板克隆实验检测 Eca109 细胞系增殖能力; 与 EV 组比较; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

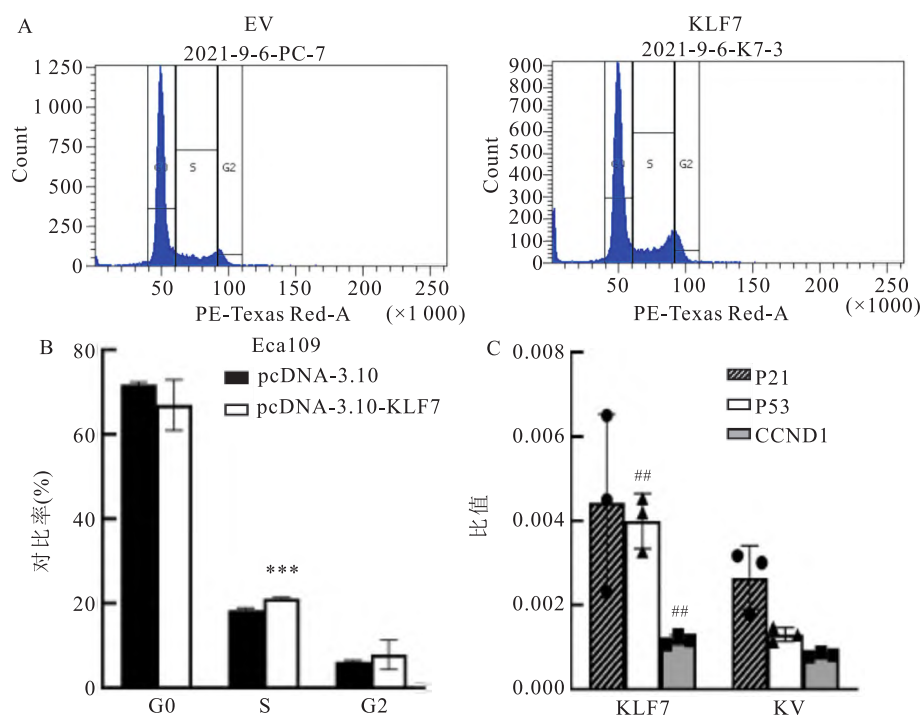
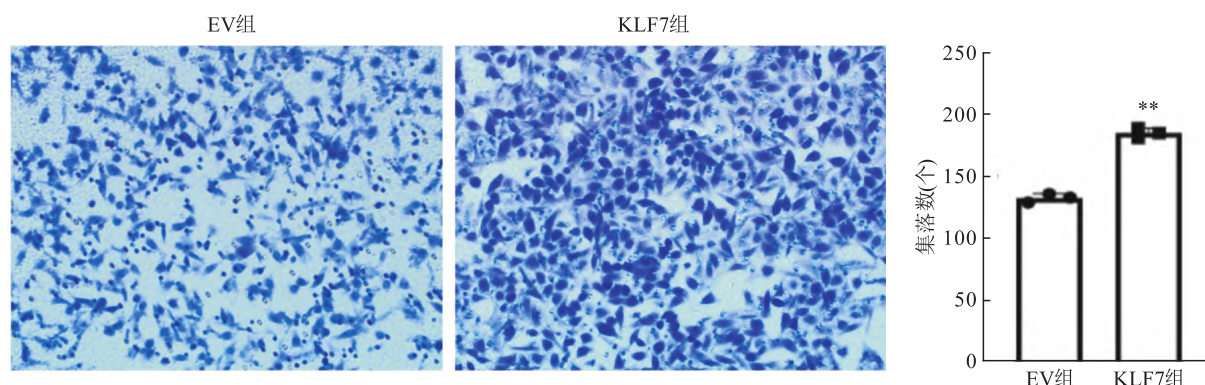


图4 过表达 KLF7 对食管鳞癌细胞系周期的影响

A:流式细胞术检测检测 Eca109 细胞周期;B:流式细胞分析结果的统计学分析;C:Real-time PCR 检测 Eca109 细胞中 P21、P53 和 CCND1 的表达;与 EV 组比较:*** $P < 0.001$;与 KV 比较:## $P < 0.01$

图5 过表达 KLF7 对食管鳞癌 Eca109 细胞系迁移的影响 $\times 200$

与 EV 组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

转录失调是癌症生长和转移的主要驱动力,形成了癌症转录组,从而形成了癌细胞蛋白质组。KLF7 作为转录因子,调控来源于神经外胚层和中胚层的细胞分化^[13],此,KLF7 通过作用于基因表达模式的改变在癌症发生过程中发挥了重要作用,研究表明,KLF7 可通过下调 E-钙黏蛋白的表达,促进口腔鳞状细胞癌的迁移和表皮间充质转化^[11]。

生物信息学技术结果显示 KLF7 在食管癌组织中的表达水平明显高于正常组织,同时 KLF7 表达

与食管癌的 TNM 分期相关,这与程序的结果一致^[12]。Western blot 和 Real-time PCR 结果显示 KLF7 在食管癌细胞系 Eca109、EC9706 和正常上皮细胞 Het-1A 细胞中都有表达,但在 Eca109 细胞、EC9706 细胞中 KLF7 的蛋白表达水平显著高于 Het-1A 细胞。免疫荧光实验结果显示在 Het-1A 细胞中 KLF7 同时定位细胞质与细胞核,但是在 Eca109 细胞、EC9706 细胞中 KLF7 仅定位于细胞核中。有文献^[14]报道 KLF7 一个互作因子,被命名为 KLF7 的活性调节因子(MOKA),该因子能够调控 KLF7 亚细胞定位,KLF7 与 MOKA 蛋白组成复合物

入核,因此,可以猜测,食管癌变的过程中,KLF7 从胞浆入核的生物学行为可能与 MOKA 有关,但是尚需进一步的研究验证。

进一步 Eca109 细胞培养结果显示,过表达 KLF7 促进细胞体外增殖和迁移能力以及改变细胞周期,为了查找 KLF7 如何影响 Eca109 细胞的增殖和迁移,本研究检测过表达 KLF7 后 D 型细胞周期蛋白(CCND1)和 Protein 53(P53)的表达,结果显示过表达 KLF7 促进 CCND1 和 P53 的表达,该结果与其他癌症中的研究结果一致^[8-11]。

综上所述,本研究结果显示 KLF7 有可能通过促进 CCND1 和 P53 的表达调控癌细胞的分裂周期和增殖,提示 KLF7 可能是食管癌发生发展的重要调控因子,将有助于揭示食管癌发生发展的分子机制。

参考文献

- [1] Smyth E C, Lagergren J, Fitzgerald R C, et al. Oesophageal cancer[J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 27(3): 17-48.
- [2] 周家琛,郑荣寿,王少明,等. 2020 年中国和世界部分国家主要消化道肿瘤负担比较[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7(2): 26-32.
- [3] Peng Q, Chen H, Huo J R. Alcohol consumption and corresponding factors: A novel perspective on the risk factors of esophageal cancer[J]. Oncol Lett, 2016, 11(5): 3231-9.
- [4] 何尚峰,卢香云,马琰迪,等. E3 泛素连接酶 FBXW7 在食管鳞状细胞癌中的表达及对其生物学行为的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(11): 1732-8.
- [5] Wang R, Si L, Zhu D, et al. Genetic variants in GHR and PLCE1 genes are associated with susceptibility to esophageal cancer[J]. Mol Genet Genomic Med, 2020, 8(10): e1474.
- [6] Zhang X, Lu N, Wang L, et al. Recent advances of m6A methylation modification in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Cell Int, 2021, 21(1): 421.
- [7] Lee T I, Young R A. Transcriptional regulation and its misregulation in disease[J]. Cell, 2013, 152(6): 1237-51.
- [8] Gupta R, Malvi P, Parajuli K R, et al. KLF7 promotes pancreatic cancer growth and metastasis by up-regulating ISG expression and maintaining Golgi complex integrity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(22): 12341-51.
- [9] An Y, Shang Y, Xu Z, et al. STAT3-induced long noncoding RNA LINC00668 promotes migration and invasion of non-small cell lung cancer via the miR-193a/KLF7 axis[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 116: 109023.
- [10] Jiang Z, Yu T, Fan Z, et al. Krüppel-like factor 7 is a marker of aggressive gastric cancer and poor prognosis[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 43(3): 1090-9.
- [11] Ding X, Wang X, Gong Y, et al. KLF7 overexpression in human oral squamous cell carcinoma promotes migration and epithelial-mesenchymal transition[J]. Oncol Lett, 2017, 13(4): 2281-9.
- [12] 程序. KLF7 在食管癌和癌前病变中的表达及临床意义[D]. 郑州: 郑州大学, 2020.
- [13] Caiazzo M, Colucci-D'Amato L, Esposito M T, et al. Transcription factor KLF7 regulates differentiation of neuroectodermal and mesodermal cell lineages[J]. Exp Cell Res, 2010, 316(14): 2365-76.
- [14] Smaldone S, Laub F, Else C, et al. Identification of MoKA, a novel F-box protein that modulates Krüppel-like transcription factor 7 activity[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(3): 1058-69.

Effect of overexpression of KLF7 on proliferation and migration of esophageal squamous cell carcinoma

Chen Jingjing, Zhang Zhiwei, Mu Xiaoling

(Dept of Histology and Embryology, Medical College, Shihezi University, Shihezi 832000)

Abstract Objective To explore the effects of Kruppel-like factor 7 (KLF7) on the proliferation, migration and cycle of esophageal squamous cell carcinoma cell line Eca109. **Methods** Bioinformatics analysis was used to study the expression pattern of KLF7 in esophageal squamous cell carcinoma and its relationship with prognosis and pathological grade. The expression pattern of KLF7 in esophageal squamous cell carcinoma cells was studied by real-time PCR, Western blot and cellular immunofluorescence *in vitro*. The KLF7 overexpression in Eca109 cells was carried out by transfection of the plasmid of pcDNA-3.10-KLF7, and the effects of KLF7 on the proliferation and migration of ESCC cells were detected by CCK-8 assay, plate clone formation assay and Transwell assay, and the cell cycle was studied by Flow cytometric analysis. **Results** KLF7 was expressed in the tissues and cells of esophageal cancer, and its expression was significantly associated with the pathological grade of esophageal cancer patients ($P < 0.05$), however, there was no significant association of KLF7 expression with the survival rate of patients. The

细胞培养中黑点状污染物的种类及防治方法

谭百宏¹, 王艳玲¹, 郑敬彤², 于军¹, 刘利², 李艳超³

摘要 目的 探讨细胞培养中黑点状污染物的种类及防治措施。方法 倒置显微镜观察黑点状污染物的生长状态;革兰染色、金胺 O 染色以及电子显微镜术分析黑点状物质的形态学特征;16S rDNA 基因测序鉴定细菌种类;药敏实验筛选污染物敏感的抗生素;采用 RAW264.7 细胞培养上清液对冻存的 SH-SY5Y 细胞进行复苏。结果 倒置显微镜实时观察显示黑点状物质呈静止和运动两种生长状态;革兰染色呈阴性,金胺 O 染色呈阳性;电子显微镜负染技术揭示该污染物是一种短杆状细菌,游动期带有极性鞭毛;16S rDNA 基因测序表明该污染物是一种名为 *phenylobacterium zucineum* *HLK1* 的苯基杆菌。药敏实验筛选出头孢曲松、羧苄西林和亚胺培南等抗生素对该细菌具有抑制作用,但是细胞培养实验表明上述抗生素无法清除 SH-SY5Y 细胞内的细菌。被污染细胞不能长期冷冻保存,但是采用 RAW264.7 细胞培养上清液进行复苏可显著提高细胞的存活效率。结论 培养体系内的黑点状污染物是一种能够侵入细胞内部、生存能力极强的寡营养细菌,常规抗生素处理很难将它们从培养体系内清除。RAW264.7 细胞培养上清液可能含有某种对抗 *p. z. HLK1* 的活性物质,采用 RAW264.7 细胞培养上清进行细胞复苏可以显著提高细胞的存活效率。

关键词 SH-SY5Y 细胞;细胞培养;单核-巨噬细胞系统;细菌污染

中图分类号 R 372

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)01-0126-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.01.021

2022-09-22 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81871014)

作者单位:吉林大学白求恩医学部¹ 基础医学实验教学中心、² 病原生物学系、³ 组织学与胚胎学系,长春 130021

作者简介:谭百宏,女,高级工程师,责任作者, E-mail: tanbaihong@jlu.edu.cn;

李艳超,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: liyan-chao@jlu.edu.cn

近些年国内一些实验室出现一种特殊的细胞污染形式,该污染物在倒置显微镜下呈黑点状,看似细胞碎屑,却具有一定游动能力。这些黑点状物质通常对宿主细胞没有明显影响,只有在细胞复苏、换液不及时、或传代密度过低等情况下才会迅速增多并导致细胞死亡,因而有人形象地称之为“黑胶虫”。“黑胶虫”问题并不局限于国内,国外网站内也经常看到关于它们本质和危害的讨论^[1]。上述现象已经持续多年,但是很少有人对此做深入研究^[1-2]。探讨污染物的种类和防治措施不仅耗费时间和精力,而且还常与实验初衷严重偏离。然而如果不弄清污染的原因,细胞培养将会不断重复“培养-污染-丢弃-再培养”的恶性循环,造成实验浪费的同时还会培养出超级耐药细菌。为此,笔者对该实验室中出现的黑点状污染物进行详细分析,希望能对各位同行的相关实验有所帮助或借鉴。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂 本实验使用的细胞系包括人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞系(ATCC 公司)和小鼠巨噬细胞来源的 RAW264.7 细胞系(组织与胚胎学系传代保存细胞株);DMEM 高糖培养基购自 Gibco 公司(Invitrogen, 美国); γ 射线照射胎牛血清购自 Biological Industries(以色列);青链霉素和革兰染色试剂购自北京鼎国生物技术公司;金胺 O 购自上海 Aladdin 公司;血平板和药敏片购自杭州微生物试剂公司。本实验所使用的仪器包括 37℃ 细胞培养箱(SANY, 日本)、Olympus BX51 倒置显微镜(日本)以及 JEM 1200EXII 透射电子显微镜(JEOL, 日本)。

expression level of KLF7 in esophageal cancer cells (Eca109 and EC9706) was significantly higher than that in normal esophageal epithelial cells (Het-1A, $P < 0.05$). In addition, the expression of KLF7 was higher in the cytoplasm and nucleus of Het-1A cells, while only in the nucleus of esophageal cancer cells (Eca109 and EC9706). Additionally, the overexpression of KLF7 in Eca109 cells changed the cell cycle, promoted cell proliferation and migration, and up-regulated the expression levels of CCND1 and P53 ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression of KLF7 might promote the proliferation and migration of esophageal cancer cells.

Key words esophageal cancer; Kruppel-like factor 7; proliferation; migration; P53; CCND1