

SBP1 基因在涎腺肿瘤中的表达及相关性分析

李伟¹, 王银龙¹, 朱友明¹, 陆婧雅¹, 朱丽², 许旭东¹, 汪聪¹

摘要 目的 研究硒结合蛋白 1(SBP1) 在涎腺肿瘤中的表达情况, 明确其与涎腺肿瘤发生、发展、侵袭及转移的关系。方法 收集 15 组涎腺肿瘤及其瘤旁组织, 提取组织内 RNA, 采用实时荧光定量 RT-PCR 法检测组织中 SBP1 的表达。设计及合成 SBP1 的 shRNA 序列, 慢病毒转染 scc-3 细胞, 应用 MTT、细胞划痕实验检测细胞增殖与迁移。结果 SBP1 在涎腺肿瘤中的表达明显低于正常涎腺组织 ($P < 0.05$); 划痕试验和 MTT 检测显示 SBP1 对肿瘤细胞的增殖与迁移起抑制作用。结论 SBP1 在涎腺肿瘤组织中低表达, 具有抑制肿瘤细胞的增殖和迁移能力。可作为涎腺肿瘤的早期诊断和预后判断的早期指标。

关键词 涎腺肿瘤; 硒结合蛋白 1; 增殖; 迁移

中图分类号 R 739.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)10-1449-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.10.012

涎腺肿瘤约占头颈部肿瘤的 3%~6%, 其肿瘤细胞形态、组织结构和生物学行为具有多样性, 涎腺肿瘤也比较多样及复杂, 临床疗效难以预料^[1]。研究^[2]显示硒元素具有显著抗癌和预防癌症的效果。硒元素在体内是以硒蛋白质的形式存在, 其中, 硒结合蛋白 1(Selenium binding protein 1, SBP1) 被认为是硒元素抑癌作用的重要载体。人硒结合蛋白 1

(SBP1) 位于染色体 1q21-22 上, 是一种特殊的含硒蛋白质, 能够促进肿瘤细胞的凋亡。研究^[3]表明 SBP1 在许多肿瘤组织中表达下调, 这提示其与肿瘤的发生发展可能有关。目前, SBP1 在涎腺肿瘤发生中的作用的相关研究较少。该研究选用人舌鳞状细胞癌 scc-3 细胞系, 检测 SBP1 对其迁移与增殖的影响, 选取 15 组良性涎腺肿瘤和正常涎腺组织, 检测 SBP1 的表达水平。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人舌癌鳞状细胞株 scc-3 由安徽医科大学口腔实验室提供。DMEM 培养基 + 10% 胎牛血清培养。

1.2 标本来源 组织来源: 随机选取 2014 年 5 月~2015 年 5 月安徽医科大学第一附属医院和安徽省口腔医院颌面外科经手术切除、病理证实的涎腺病变组织 15 例, 及手术中切除的病变涎腺组织 10 mm 以外的正常涎腺组织 15 例。所有涎腺肿瘤患者为在院初诊患者, 即之前未做过局部扩大切除手术, 并且术前均未进行过放疗、化疗等治疗, 病例组除涎腺肿瘤外, 无其他系统性疾病。组织处理方法: 将获取的组织样品置于冻存管内, 并用记号笔标记编号。标本存置于液氮罐中保存待用。做好登记组织样品的详细内容, 如组织类型、编号、日期以及患者的基本资料。

1.3 材料与仪器 DMEM 培养基、胰蛋白酶、10% 胎牛血清(美国 HyClyone 公司); 逆转录反应试剂盒、QRT 反应试剂盒(日本 TaKaRa 公司); 质粒提取试剂盒(美国 Axygen 公司); RNA 抽提试剂 TRIzol、细胞裂解液(上海碧云天公司); 构建载体所用的大

2016-06-12 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31501103); 安徽省自然科学基金(编号: 1508085QC62)

作者单位: ¹安徽医科大学附属口腔医院口腔颌面外科, 合肥 230032

²安徽医科大学第二附属医院儿科, 合肥 230601

作者简介: 李伟, 女, 硕士研究生;

王银龙, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wangylah@sina.com

group, hyperbaric oxygen preconditioning had significantly improved neurological scores at ischemia 24 h and 72 h ($P < 0.05$). After ischemia 72 h, hyperbaric oxygen preconditioning group had significantly reduced brain infarct size and brain water content as compared with the model group ($P < 0.05$). Hyperbaric oxygen preconditioning group had significantly reduced expressions of IL-1 β , TNF- α , MMP-9 as compared with the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Hyperbaric oxygen preconditioning significantly inhibites the expression of IL-1 β , TNF- α , MMP-9 and maintains the integrity of blood brain barrier, thus, reduces the brain water content.

Key words cerebral infarction; hyperbaric oxygen; cerebral edema; MMP-9

肠杆菌 Dh5 α 、病毒包装细胞系 293T(安徽医科大学口腔实验室);沉默 SPB1(shSBP1) (美国 Sigma 公司);限制性内切酶 EcoR I 和 Xba I(英国 Invitrogen 公司);24、12、6 孔板(美国 Corning Costar 公司);无水乙醇、异丙醇(上海生物工程技术服务有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 scc-3 细胞株、293T 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,常规加入青霉素和链霉素,置 5% CO₂、饱和湿度、37 °C 培养箱内培养。根据细胞生长情况 2~3 d 传代 1 次,取对数生长期的细胞用于实验。

1.4.2 过表达 SBP1 的构建及目的基因扩增 在 Pubmed 上检索人源性的 SBP1 的 Nucleotide 核苷酸序列,检索到 SBP1 的 CDS 序列后,利用 DNA club 软件设计出 SBP1 的基因序列,SBP1 上游引物:5'-GCCAATTCATGCCAACAGGCCTGGTCAGG-3',下游引物:5'-GCACGCGTCTAGACATCCTCTTCTGCATCT-3'。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。限制性内切酶为 EcoR I: GAATTC; Xba I: TCTAGA。将含有待扩增序列的 DNA 为模板进行 PCR 反应,30 μ l 总体积包括:上游引物 1 μ l,下游引物 1 μ l, cDNA 1 μ l, 2 \times Pfu PCR MasterMix 15 μ l, 无菌蒸馏水 12 μ l。在 PCR 扩增仪上完成 PCR 扩增。反应条件如下:95 °C 预变性 10 min,95 °C 变性 1 min,56 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 3 min,完成 30 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min,置于 4 °C 保温。将 PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳,电泳结果经紫外检测仪观察,并将目的条带进行产物回收。

1.4.3 质粒的扩增和提取 将设计引物时设计的限制性内切酶 37 °C 水浴酶切相应 DNA 片段和表达载体,将酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳并产物回收后,回收后的酶切产物和载体在 T4 连接酶下连接 1 h 后转入感受态大肠杆菌 Dh5 α ,次日手抽酶切验证,并通过测序获得含有 SBP1 片段载体的大肠杆菌 Dh5 α 菌株。

1.4.4 shSBP1 病毒的包装及感染 2 μ g PLKO.1 空载或 PLKO.1-SBP1、2 μ g pREV、2 μ g pGag 和 1 μ g pVSVG 转染入生长在 6 孔板中的 HEK 293T 细胞中,用纯 DMEM 培养基培养 6 h 后更换含有 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基,培养 24 h 后,收集含有病毒的培养基上清液,上清液用 0.45 μ m PVDF 滤头(Millipore)过滤。过滤后含有病毒的培养基上清液分别感染 scc-3 细胞,同时加入 4 μ g/ml polybrene

(美国 Sigma 公司) 37 °C 孵育 24 h 后更换含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养并加入 5 μ g/ml puromycin 筛选细胞 24 h。

1.4.5 划痕实验检测细胞迁移能力 取处于对数生长期的慢病毒感染的 scc-3 细胞,5 \times 10⁵ 个/每孔均匀接种于 6 孔板,分为正常组、shSBP1 组、SBP1 过表达组,24 h 后待细胞长至 90%,用灭菌的移液器枪头,在培养板底部均匀划出两条划痕,然后用 PBS 洗去被划下的细胞,并以此时间点作为 0 h,细胞用 hoechst 染色后,0、24、48 h 时用荧光显微镜下观察细胞迁移情况,并进行拍照、比较。

1.4.6 MTT 法检测细胞增殖能力 取对数生长期的 scc-3 细胞,分为正常组、shSBP1 组、SBP1 过表达组,2 000 个/每孔均匀接种于 96 孔板,每孔加入体积 200 μ l 培养基培养,每组设 3 个复孔,用倒置显微镜观察细胞情况,待细胞贴壁后,按时间梯度加入药物,加入 20 μ l MTT 溶液(终浓度为 5 g/L) 37 °C 孵育 4 h 后吸走上清液,每孔加入 DMSO 150 μ l,震荡 10 min,用酶联免疫检测仪测定各孔吸收值,绘制细胞生长曲线。

1.4.7 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 SBP1 mRNA 的表达水平 总 RNA 提取及 cDNA 合成:取 100 mg 冷冻的涎腺肿瘤组织及瘤旁组织,用组织剪剪碎,TRIzol 法获取组织总 RNA。取总 RNA 进行逆转录获得 cDNA,-20 °C 保存备用。qRT-PCR 法检测 SBP1 mRNA 的相对表达水平,SBP1 及内参 β -actin 的引物经 GenBank 检索引物序列并设计合成。扩增条件:94 °C 预变性 1 min,94 °C 变性 1 min,56 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,共 30 个循环。待反应结束后,取反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,电泳后紫外灯下观察电泳条带并进行拍照。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析及 q 检验。

2 结果

2.1 SBP1 对细胞迁移的影响 SBP1 被认为是硒元素抑癌作用的重要载体,通过划痕实验可以看出,当培养 48 h 后正常组与 SBP1 过表达组比较,细胞向中间迁移速度明显较快(图 1A),而在 scc-3 肿瘤细胞株中沉默 SBP1 时,24 h 后 shSBP1 组向中间迁移的速度明显快于正常组(图 1B),差异有统计学意义($P < 0.05$)。过表达 SBP1 可抑制细胞迁移,而敲

低 SBP1 明显促进细胞的迁移,说明 SBP1 具有抑制细胞迁移的能力。

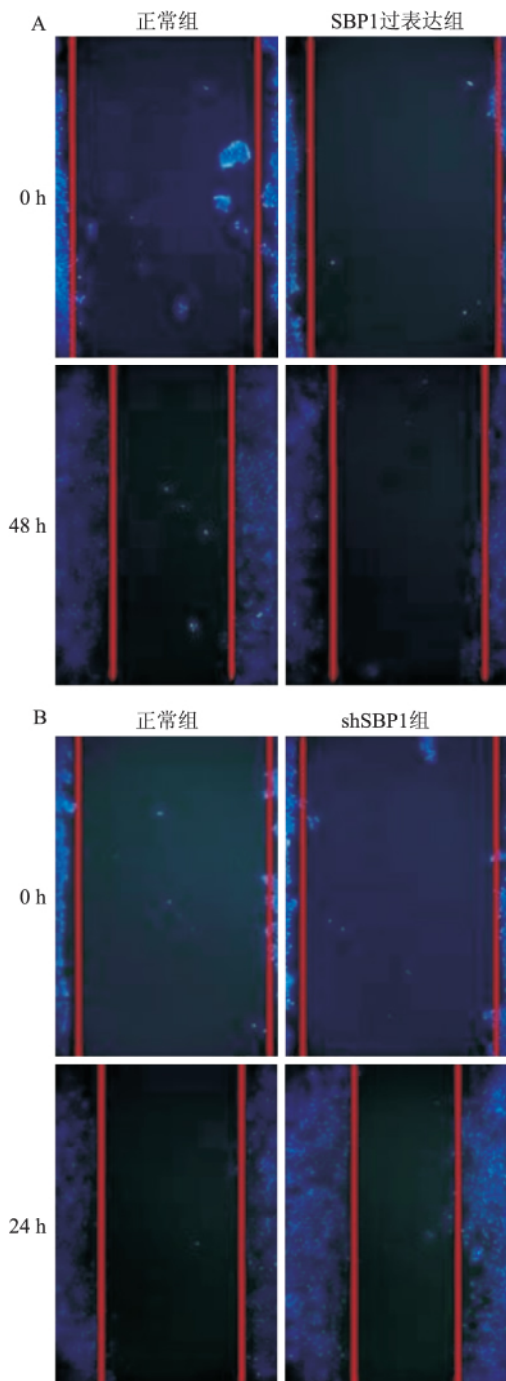


图1 划痕试验检测 SBP1 对肿瘤细胞迁移能力的影响

A: *sec-3* 肿瘤细胞分别感染正常组和 SBP1 过表达组 48 h 后观察和比较两组细胞的迁移能力; B: *sec-3* 肿瘤细胞分别感染正常组和 shSBP1 组 24 h 后观察和比较两组细胞的迁移能力

2.2 SBP1 对细胞增殖的影响 通过 MTT 实验检测不同 SBP1 表达程度时 *sec-3* 的生长曲线,差异有统计学意义($P < 0.05$) 48 h 后,正常组较 SBP1 过

表达组细胞增殖能力明显较高(图 2A),而在 *sec-3* 肿瘤细胞株中沉默 SBP1 时,shSBP1 组细胞增殖能力则明显高于正常组(图 2B)。过表达 SBP1 可抑制肿瘤细胞增殖,而敲低 SBP1 则促进肿瘤细胞增殖。说明 SBP1 具有抑制细胞增殖的能力。

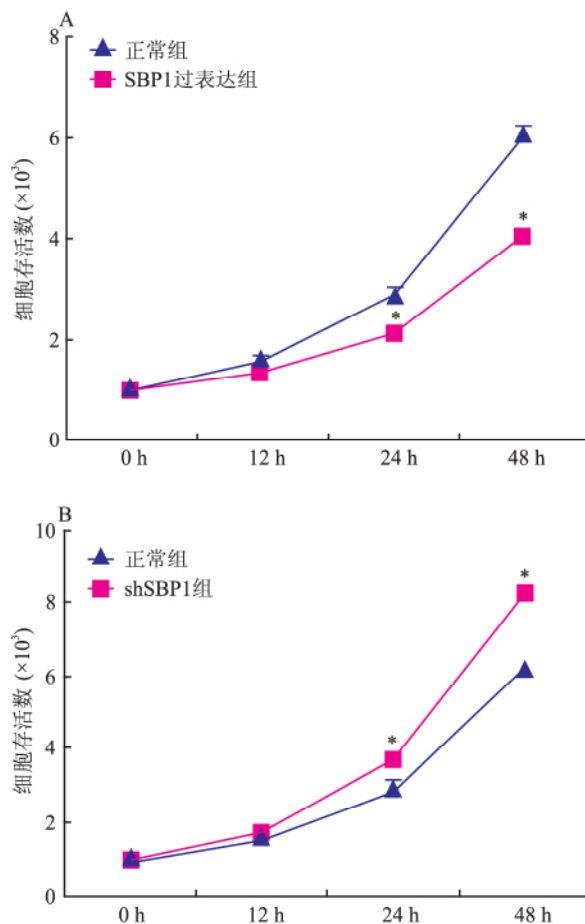


图2 MTT 法检测 SBP1 对肿瘤细胞增殖能力的影响

A: *sec-3* 肿瘤细胞分别感染正常组和 SBP1 过表达组,检测不同时间段 *sec-3* 肿瘤细胞的活性; B: *sec-3* 肿瘤细胞分别感染正常组和 shSBP1 组,检测不同时间段 *sec-3* 肿瘤细胞的活性;与正常组比较: * $P < 0.05$

2.3 SBP1 在涎腺肿瘤组织的表达 应用 qRT-PCR 法检测 15 对良性涎腺肿瘤组织和瘤旁组织中 SBP1 mRNA 的表达水平,差异有统计学意义($P < 0.05$)。11 例肿瘤组织 SBP1 mRNA 的表达水平均低于相应的瘤旁组织 4 例肿瘤组织 SBP1 mRNA 的表达水平则高于相应的瘤旁组织。表明在涎腺肿瘤组织中,SBP1 的表达水平呈现下调趋势。见图 3。

3 讨论

肿瘤指在各种致瘤因素的作用下,机体局部组织的细胞在基因水平上无法调控自身的生长过程,

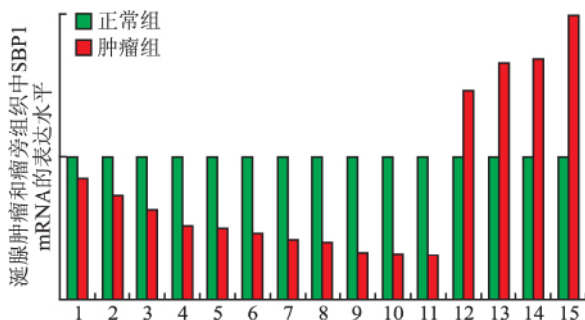


图3 涎腺肿瘤组织中 SBP1 的表达
1 ~ 15: 涎腺肿瘤和瘤旁组织标号

导致单克隆性异常增生而形成的新生物。涎腺肿瘤约占口腔颌面部肿瘤的 20% ,发病率较高,并不断上升。涎腺肿瘤细胞的形态、组织结构和生物学行为比较复杂,涎腺肿瘤种类也比较多样^[4],临床疗效较差。因缺乏特异性的早期检测涎腺肿瘤的生物标记,难以做到早发现、早诊断、早治疗。

学者们对涎腺肿瘤的发病机制进行大量研究,认为肿瘤的发生可能与体内某些元素的缺失有关,硒元素是其中的一种。硒是人体内具有抗癌活性的微量元素,SBP1 是一种与其他含硒蛋白质有明显差异的特殊的蛋白。SBP1 参与了细胞周期的调控,与多种肿瘤的发生、发展及预后相关。与正常组织比较,SBP1 在前列腺癌^[5]、胃癌^[6]、结直肠癌^[7]等组织中表达明显减少。大量学者认为 SBP1 的表达变化可能是肿瘤发生发展的重要事件,SBP1 对细胞周期进行调控,抑制肿瘤细胞生长,其表达减少可能是正常细胞向肿瘤细胞转化的过程。研究^[8]显示 SBP1 通过阻止过氧化物对 DNA 的损伤,增加 p53 和 COX-2 的表达,从而改变 DNA、RNA、蛋白质的合成,阻止癌细胞的生长等。研究^[9]表明 SBP1 的表达受到低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α) 的调控, HIF-1 α 在低氧条件下表达增高并诱导多种靶基因表达,进而调节细胞增殖、血管新生和重构。

肿瘤发生的过程是多阶段并逐步演进,细胞通过一系列进行性的改变向恶性发展^[10-11]。本研究 MTT 检测结果显示 SBP1 基因的表达,使肿瘤细胞的增殖能力受到抑制。划痕试验结果显示 SBP1 的表达使肿瘤细胞的迁移能力受到抑制。说明 SBP1 可能参与肿瘤细胞周期的调控。

涎腺肿瘤组织中 SBP1 的表达水平显著低于瘤旁组织。提示: ① SBP1 与涎腺肿瘤的发生有关,可能在一定程度上抑制了涎腺肿瘤的发生及发展; ②

SBP1 可能是涎腺组织中的生理蛋白,但是处于激活状态,一旦体内特定通路遭到抑制,便诱导了肿瘤的发生; ③ SBP1 可作为涎腺肿瘤的肿瘤标志物,进一步研究在不同的涎腺肿瘤中的表达量,对肿瘤作出明确诊断; ④ 可以探寻 SBP1 基因失活的通道,进行早期干预,阻止肿瘤的发生发展; ⑤ 本研究显示并非所有的肿瘤组织中 SBP1 都呈低表达,说明在涎腺肿瘤的发生过程中 SBP1 是其发生的一个重要因素,但是并不是导致涎腺肿瘤发生的唯一原因,与 SBP1 无关因素在涎腺肿瘤发生过程中也发挥重要作用,涎腺肿瘤的发生是多种因素综合产生的结果,这也是日后研究的重点。

参考文献

- [1] Bansal A K, Bindal R, Kapoor C, et al. Current concepts in diagnosis of unusual salivary gland tumors[J]. Dent Res J(Isfahan), 2012, 9(Suppl 1): S9 - S19.
- [2] Björnstedt M, Fernandes A P. Selenium in the prevention of human cancers[J]. EPMA J, 2010, 1(3): 389 - 95.
- [3] Jerome-Morais A, Wright M E, Liu R, et al. Inverse association between glutathione peroxidase activity and both selenium-binding protein 1 levels and gleason score in human prostate tissue[J]. Prostate, 2012, 72(9): 1006 - 12.
- [4] Donadio E, Giusti L, Seccia V, et al. New insight into benign tumours of major salivary glands by proteomic approach[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71874.
- [5] Ansong E, Ying Q, Ekoue D N, et al. Evidence that selenium binding protein 1 is a tumor suppressor in prostate cancer[J]. PLoS One 2015, 10(5): e0127295.
- [6] Zhang C, Xu W, Pan W, et al. Selenium-binding protein 1 may decrease gastric cellular proliferation and migration[J]. Int J Oncol, 2013, 42(5): 1620 - 9.
- [7] Pohl N M, Tong C, Fang W, et al. Transcriptional regulation and biological functions of selenium-binding protein 1 in colorectal cancer *in vitro* and in nude mouse xenografts[J]. PLoS One, 2009, 4(11): e7774.
- [8] Silvers A L, Lin L, Bass A J, et al. Decreased selenium-binding protein 1 in esophageal adenocarcinoma results from posttranscriptional and epigenetic regulation and affects chemosensitivity[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(7): 2009 - 21.
- [9] Scortegagna M, Martin R J, Kladney R D, et al. Hypoxia-inducible factor-1 suppresses squamous carcinogenic progression and epithelial-mesenchymal transition[J]. Cancer Res, 2009, 69(6): 2638 - 46.
- [10] Chen S H, Li D, Xu C. Downregulation of Colla1 induces differentiation in mouse spermatogonia[J]. Asian J Androl, 2012, 14(6): 842 - 9.
- [11] Terova G, Rimoldi S, Bernardini G, et al. Inhibition of myostatin gene expression in skeletal muscle of fish by *in vivo* electrically mediated dsRNA and shRNAi delivery[J]. Mol Biotechnol, 2013, 54(2): 673 - 84.

网络出版时间: 2016-8-10 11:04:48 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160810.1104.013.html>

TAK1 抑制剂对高糖环境巨噬细胞和系膜细胞相互作用的影响及机制

卫洁, 冯世尧, 徐兴欣, 吴永贵

摘要 目的 探讨高糖环境下转化生长因子 β 激活激酶1 (TAK1) 抑制剂 5Z-7-oxozeanol 在巨噬细胞和系膜细胞相互关系中的作用。方法 巨噬细胞和系膜细胞共培养、巨噬细胞单培养、系膜细胞单培养 3 种培养方式分别分为: 抑制剂对照组、甘露醇对照组、正常对照组、高糖组、高糖 + 不同浓度(30、100、300 nmol/L) 抑制剂组。采用 Western blot 法检测单培养巨噬细胞 p-TAK1、TAK1 结合蛋白(TAB1)、NF- κ B p65 蛋白表达变化, 免疫荧光检测 TAK1 抑制剂对 NF- κ B p65 亚基核转位的影响。采用 ELISA 法检测单培养和共培养各组细胞上清液中肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白介素(IL)-1 β 、单核细胞趋化因子(MCP)-1、IV型胶原(Col IV)、纤维连接蛋白(FN) 含量变化, 光镜下观察共培养对巨噬细胞迁移能力影响。结果 与对照组比较, 高糖刺激巨噬细胞 p-TAK1、TAB1、NF- κ B p65 蛋白表达均明显上调($P < 0.05$), 高糖组共培养和单培养细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1、

Col IV、FN 均显著高于对照组($P < 0.05$), 共培养细胞上清液中各种细胞因子含量较单培养升高更明显($P < 0.05$), 与高糖组比较, TAK1 抑制剂呈浓度依赖性降低各项指标表达($P < 0.05$)。300 nmol/L 抑制剂明显降低巨噬细胞迁移数目($P < 0.05$)。结论 高糖环境下, 巨噬细胞与系膜细胞之间存在相互影响, 这种作用能促进炎症因子(TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1) 和细胞外基质成分(Col IV、FN) 产生增加, 而 TAK1 抑制剂能通过干预 NF- κ B p65 核转位, 抑制巨噬细胞迁移, 减少炎症因子和细胞外基质成分的分泌, 发挥抗炎、抗纤维化效应, 从而起到肾脏保护作用。

关键词 TAK1; 共培养; 糖尿病肾病; 炎症; 纤维化

中图分类号 R 587.24

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)10-1453-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.10.013

2016-07-07 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81270813)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院肾内科, 合肥 230022

作者简介: 卫洁, 女, 硕士研究生;

吴永贵, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wuyonggui@medmail.com.cn

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病最严重的微血管并发症之一, 目前认为炎症贯穿 DN 病理过程的每个阶段。转化生长因子 β 激活激酶1(TGF- β activated kinase-1, TAK1) 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶。已被证明是参与肾纤维化和炎症反应通路的关键信号分子^[1]。对该通路进行干预

Expression of SBP1 gene in salivary gland tumor

Li Wei, Wang Yinlong, Zhu Youming et al

(Dept of Oral and Maxillofacial Sugar, The Affiliated Stomatology Hospital of Anhui Medical University Hefei 230032)

Abstract Objective Selenium binding protein 1 (SBP1) located on chromosome 1q21-22, a kind of special selenium protein, can promote the apoptosis of tumor cells. To discuss the expression of human SBP1 and to clarify its relationship with the occurrence, development, invasion and metastasis in salivary gland tumor. **Methods** The salivary gland tumor tissues ($n = 15$) were collected and their mRNA was abstracted. The relative expression of SBP1 was quantified by SYBR Green real-time PCR. SBP1 lentivirus were transfected into scc-3 cells after designing shRNA SBP1 sequence. The proliferation and growth ability of SBP1 were detected by MTT test respectively, and migration ability was detected by cell scratch assay. **Results** The positive rates of expression of SBP1 were significantly lower in tumor tissues ($P < 0.05$). SBP1 inhibited tumor cell proliferation and migration ability. **Conclusion** The expressions of SBP1 in salivary gland tumor and peritumoral tissue are different. Low expression of SBP1 may inhibit tumor cell proliferation and migration ability. It is a reliable marker of earlier period diagnosis and prognosis of the salivary gland tumor.

Key words salivary gland tumor; selenium binding protein 1; proliferation; metastasis