

RNA 干扰沉默钙蛋白酶 1 对口腔鳞状细胞癌细胞株 HSC3 增殖和迁移的影响

张厚华^{1*} 范华俐²

(1. 荆州市中医医院口腔科 湖北 荆州 434000; 2. 长沙市口腔医院 湖南 长沙 410000)

[摘要] 目的:探究 RNA 干扰使钙蛋白酶 1(calpain 1)沉默后,对口腔鳞状细胞癌(OSCC)细胞株 HSC3 增殖和迁移的影响。方法:将 calpain 1 基因的 siRNA 表达载体(siRNA-calpain 1),瞬时转染至 HSC3 中。应用 MTT 法比较转染后细胞增殖情况;应用流式细胞术检测细胞周期和凋亡情况;应用 Transwell 测定评估细胞迁移和侵袭能力;应用蛋白免疫印迹检测细胞内 TGF- β RII、Vimentin、Smad2、Smad3、磷酸化 Smad2/3、E-cadherin、N-cadherin、MMP-2、MMP-9 蛋白表达。结果:与 NOKSI 细胞系相比,HSC3 细胞系中 calpain 1 表达显著增加($P < 0.05$)。与 Blank 组和 si-NC 组相比,si-calpain 1 组 calpain 1 表达均显著降低($P < 0.05$)。与 si-NC 组相比,在转染 si-calpain1 后 48 h、76 h 和 96 h,si-calpain 1 组细胞活力均显著降低($P < 0.05$);si-calpain 1 组 G0/G1 期细胞比例显著增加,S 期细胞比例显著降低($P < 0.05$);si-calpain 1 组细胞内 E-cadherin 表达显著增加,而 cyclin-D1、cyclin-E、Vimentin、N-cadherin、MMP-2、MMP-9、TGF- β RII、Smad2、Smad3、p-Smad2/3 蛋白表达均显著降低($P < 0.05$)。结论:siRNA 沉默 calpain 1 基因能够通过使细胞周期 G0/G1 停滞而抑制细胞增殖,并通过抑制 MMPs 及 EMT 来抑制细胞迁移和侵袭,这一过程涉及 TGF- β /Smad 信号通路。

[关键词] 口腔鳞状细胞癌 钙蛋白酶 1 细胞株 HSC3 细胞增殖 细胞迁移

[中图分类号] R739.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-7651(2018)02-0152-05

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2018.02.011

Effect of Calpain 1 Gene Silencing by RNA Interference on Proliferation and Migration of Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Lines HSC3. ZHANG Hou-hua^{1*}, FAN Hua-li². 1. Department of Stomatology, Jingzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jingzhou 434000, China; 2. Changsha Stomatological Hospital, Changsha 410000, China.

[Abstract] **Objective:** To explore the silencing effect of calpain 1 by RNA interference on cell proliferation and migration in oral squamous cell carcinoma cell line HSC3. **Methods:** siRNA expression vector (siRNA-calpain 1) against the calpain 1 gene was transiently transfected into HSC3. The proliferation was tested by MTT method. The cell cycle and apoptosis was detected by flow cytometry. The cell migration and invasion were assessed by Transwell assay. The expression of TGF- β RII, Vimentin, Smad2, Smad3, phosphorylated Smad2/3, E-cadherin, N-cadherin, MMP-2, and MMP-9 protein were detected by western blot. **Results:** The expression of calpain 1 in HSC3 cell lines was significantly higher than those in NOKSI cell lines ($P < 0.05$). Compared with the blank group and the si-NC group, the expression of calpain 1 was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with si-NC group, the viability of si-calpain group was significantly decreased after 48 h, 76 h and 96 h after transfection with si-calpain1 ($P < 0.05$). The proportion of G0/G1 phase cells in si-calpain group was significantly increased, while the proportion of S phase cells was significantly decreased ($P < 0.05$). The expression of E-cadherin in si-calpain group was significantly increased, while cyclin-D1, cyclin-E, Vimentin, N-cadherin, MMP-2, MMP-9, TGF- β RII, Smad2, Smad3, p-Smad2/3 protein expression were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** siRNA silencing calpain 1 gene can inhibit cell proliferation by inhibiting cell cycle G0/G1, and inhibit cell

migration and invasion by inhibiting MMPs and EMT. This process involves TGF- β /Smad signaling pathway.

[Key words] Oral squamous cell carcinoma Calpain 1 Cell line HSC3 Cell proliferation Cell migration

基金项目 湖北省自然科学基金资助项目(编号:2015CFB089)

作者简介 张厚华(1972~),男,湖北武汉人,硕士,主治医师,主要从事口腔疾病的基础与临床研究。

* 通讯作者 张厚华, E-mail: zhanghouhua1972@sina.com

口腔鳞状细胞癌(OSCC)是发生于口腔黏膜上皮的恶性肿瘤,约占恶性口腔病变的 90%,约占全身恶性肿瘤的 1%~3%^[1]。疾病的转移、局部复发和进展是 OSCC 治疗失败,导致患者总体生存期过低的主要原因,而 OSCC 潜在的细胞和分子机制尚待阐明^[2]。钙蛋白酶 1(calpain 1)由 CAPN1 基因编码,与细胞信号传导、细胞凋亡等许多细胞功能有关,研究表明,钙蛋白酶的表达与多种肿瘤类型侵袭性肿瘤行为有关^[3,4],然而其在 OSCC 中的作用尚未见报道。本研究通过 RNA 干扰技术使 OSCC 细胞系 HSC3 中 CAPN1 基因沉默,探讨对 HSC3 细胞系的细胞增殖、周期、凋亡、迁移和侵袭的影响,并初步探讨相关分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 OSCC 细胞系(HSC3)和正常口腔角质细胞细胞系(NOK-SI)购自中国科学院上海细胞所。将细胞维持在含有 10%胎牛血清(FBS, Life Technologies),100 U/mL 青霉素和 100 g/L 链霉素的 RPMI-1640 培养基中,置于 37 °C 5% CO₂ 的潮湿培养箱中培养。

1.2 质粒转染 双链 calpain 1 靶向小干扰 RNA 序列(siRNA-calpain 1, si-calpain 1)和阴性对照(si-NC)质粒载体(上海生工)。根据 Lipofectamine 2000(Invitrogen)使用说明书,将 si-calpain 1 和 si-NC 质粒转染至 HSC3 细胞中。以空白组(Blank)作为对照,用荧光定量实时 PCR 和蛋白免疫印迹检测 si-NC 和 si-calpain 1 质粒转染效率。

1.3 MTT 增殖实验 将转染细胞以 1.0×10^5 个/孔接种至 96 孔板(Bio-Rad)中培养 24 h、48 h、72 h、96 h。每孔加入 50 μ g MTT,振荡混匀,置于恒温培养箱(37 °C 5%CO₂)温育 4 h。去上清液,每孔加入 100 μ L DMSO(Sigma-Aldrich)振荡 10 min,使结晶物完全融解。于酶标仪上 490 nm 波长下测定各 A 值。

1.4 细胞周期实验 转染 24 h 后,4 °C 下将细胞重悬于 70%乙醇中过夜。根据产品说明书,用 500 μ L PI/RNase Staining Buffer(BD Bioscience)染色细胞,使用流式细胞仪(Beckman Coulter)和 FlowJo 软件进行分析。

1.5 细胞凋亡实验 转染 48 h 后,将细胞用胰蛋白酶消化,PBS 洗涤 3 次,加入 75%乙醇 4 °C 过夜。PBS 洗涤固定细胞 3 次,用 10 μ L RNA 酶在 37 °C 下孵育 30 min。用 Annexin V-FITC(BD Biosci-

ence)和碘化丙啶(Sigma Chemical)对细胞进行双重染色后进行流式细胞分析。

1.6 Transwell 迁移实验 将转染的细胞(1×10^5 个/孔)悬浮于无血清培养基,转接至含 10%FBS 培养基的外室中,培养 12 h,用棉签擦洗膜顶部,将过滤器下表面细胞经 4%多聚甲醛固定后,用 0.1%结晶紫染色,洗涤后,在显微镜(200 \times)下对下表面细胞拍摄并计数。

1.7 基质胶侵袭实验 用 10%FBS 的 PRMI-1640 培养基填充 Transwell 下室,将转染细胞(1×10^5 个/孔)接种至下室,孵育 24 h,用棉签将残留在上腔室上的无创细胞移出,将过滤器下表面的侵入细胞固定染色后,于显微镜(200 \times)下拍摄并计数。

1.8 荧光定量实时 PCR(Quantitative realtime-PCR, qRT-PCR) 使用 TRIzol 试剂(Invitrogen)提取总 RNA。使用反转录试剂盒(Takara)将 RNA 逆转录为 cDNA。使用 SYBR Green(Takara)进行实时 PCR 分析。以 β -actin 作为内参。利用 ABI7500 系统(Applied Biosystems)进行 qRT-PCR 反应。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 相对表达的倍数变化。qRT-PCR 反应条件:95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 72 °C 15 s, 共 40 个循环。所有引物均购自上海生工,引物设计如下:calpain 1, Forward:5' - CCACGGAACUGCUGUCAACCC - 3', Reverse:5' - CCCGGUGCCUUGACGACAGAAA - 3'; β -actin: Forward:5' - CTGTTGTTGCTGTGGCTGATA - 3', Reverse:5' - ACGCTGGTATAAGGTGGTCTG - 3'。

1.9 蛋白免疫印迹(Western Blot, WB) 使用补充有 PMSF(Riche)的 RIPA 蛋白提取试剂(Beyotime)裂解细胞,从细胞中提取蛋白质。4 °C 下 12 000 \times g 离心 10 min 后,10%SDS-PAGE 分离上清液,转移到硝酸纤维素膜(Sigma)。膜在 PBS 和 5%脱脂乳中封闭 1 h,并用 calpain 1, cyclin-D1, cyclin-E, E-cadherin, Vimentin, N-cadherin, MMP-2, MMP-9, TGF- β RII, Smad2, Smad3, p-Smad2/3 一抗(Cell Signaling Technology, 1:200)将膜在 4 °C 孵育过夜。将膜用 HRP 缀合的二抗(Cell Signaling Technology, 1:500)在室温下孵育 1 h。使用 Quantity One 软件(Life Technologies)评估相对蛋白表达水平。

1.10 统计学方法 本研究所有数据均采用 SPSS20.0 统计软件进行处理。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,行 t 检验;当 $P < 0.05$ 表示差异显著,有统计

学意义。

2 结果

2.1 HSC3 和 NOKSI 细胞系中 calpain 1 mRNA 和蛋白表达比较 与 NOKSI 细胞系相比, HSC3 细胞系中 calpain 1 mRNA 和蛋白表达水平均显著增加 (* $P < 0.05$)。

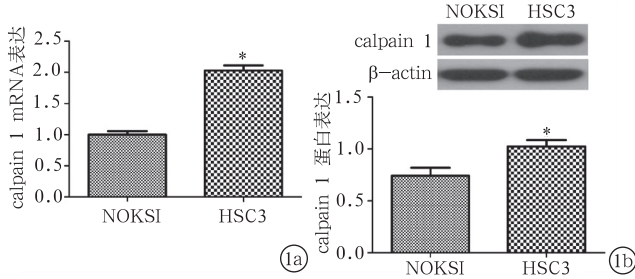


图 1 HSC3 和 NOKSI 细胞系中 calpain 1 mRNA 和蛋白表达

Fig. 1 Expressions of Calpain 1 mRNA and protein in HSC3 and NOKSI cell lines.

2.2 siRNA-calpain 1 转染效果评价 与 Blank 组和 si-NC 组相比, si-calpain 1 组 calpain 1 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低 (* $P < 0.05$)。

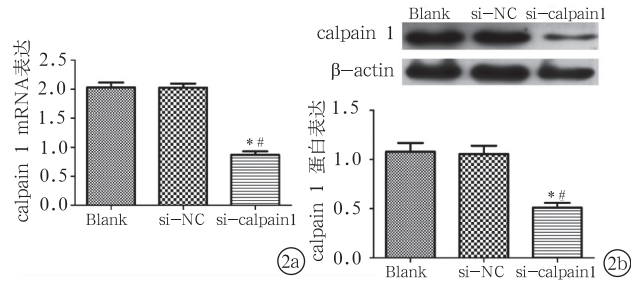


图 2 calpain 1 沉默对 HSC3 细胞内 calpain 1 mRNA 和蛋白表达水平

Fig. 2 Expressions of calpain 1 mRNA and protein in HSC3 cells after silencing calpain 1.

2.3 calpain1 沉默对 HSC3 细胞增殖的影响

MTT 结果显示, 与 si-NC 组相比, 在转染 si-calpain 1 后 48 h、76 h 和 96 h, si-calpain 1 组细胞活力均显著降低 (* $P < 0.05$)。

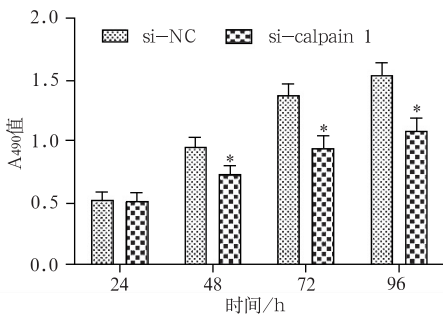


图 3 calpain 1 沉默对 HSC3 细胞增殖的影响

Fig. 3 Effect of silencing calpain 1 on proliferation of HSC3 cells.

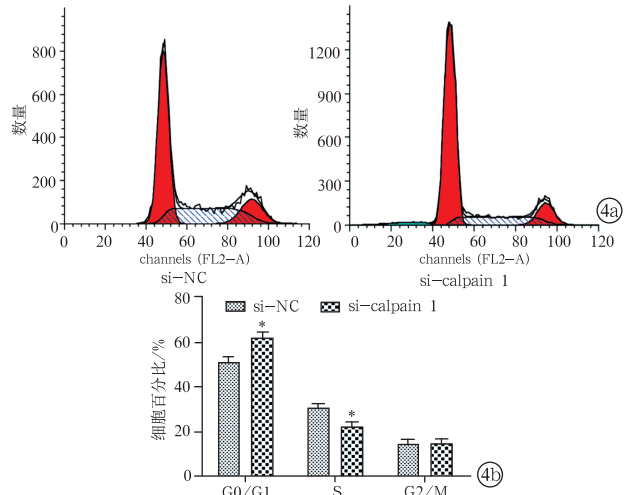


图 4 calpain 1 沉默对 HSC3 细胞周期的影响

Fig. 4 Effect of silencing calpain 1 on cell cycle of HSC3 cells.

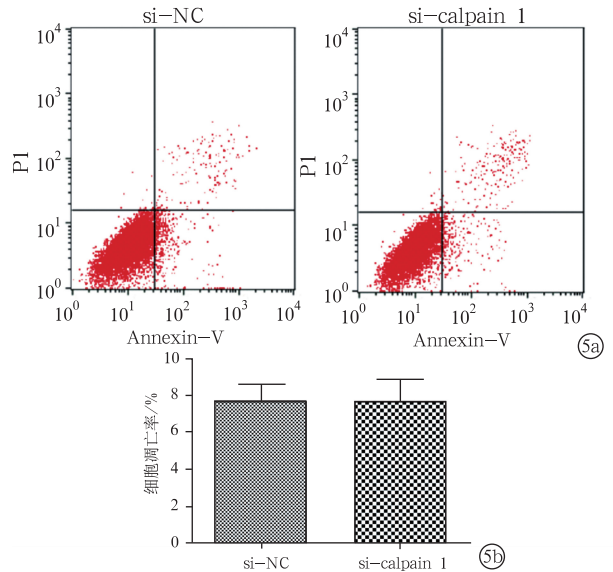


图 5 calpain 1 沉默对 HSC3 细胞凋亡的影响

Fig. 5 Effect of silencing calpain 1 on HSC3 cell apoptosis.

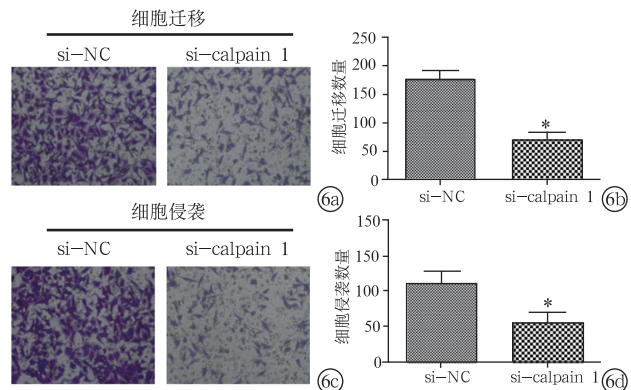


图 6 calpain 1 沉默对 HSC3 细胞迁移和侵袭的影响

Fig. 6 Effect of silencing calpain 1 on migration and invasion of HSC3 cells

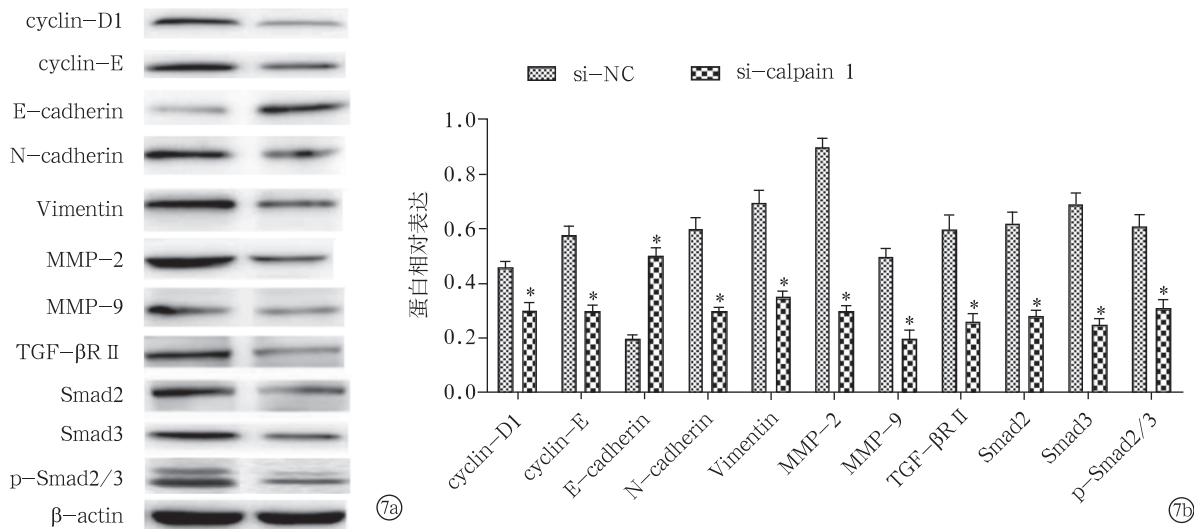


图 7 calpain 1 沉默对 HSC3 细胞内相关蛋白表达水平的影响

Fig. 7 Effect of silencing calpain 1 on expression of related proteins in HSC3 cells.

2.4 calpain1 沉默对 HSC3 细胞周期的影响 与 si-NC 组相比, si-calpain 1 组 G0/G1 期细胞比例显著增加, 而 S 期细胞比例显著降低 (* $P < 0.05$)。Si-NC 组和 si-calpain 1 组 G2/M 期细胞比例差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 calpain 1 沉默对 HSC3 细胞凋亡的影响 流式细胞术结果显示, si-calpain 1 组 Annexin B+PI 双重染色的阳性细胞比例与 si-NC 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.6 calpain 1 沉默对 HSC3 细胞迁移和侵袭的影响 与 si-NC 组相比, si-calpain 1 组细胞迁移 (A、B) 和侵袭 (C、D) 细胞数均显著降低 (* $P < 0.05$)。

2.7 calpain 1 沉默对 HSC3 细胞内相关蛋白表达的影响 与 si-NC 组相比, si-calpain 1 组细胞内 E-cadherin 表达水平显著增加, 而 cyclin-D1、cyclin-E、Vimentin、N-cadherin、MMP-2、MMP-9、TGF-β RII、Smad2、Smad3、p-Smad2/3 蛋白表达水平均显著降低 (* $P < 0.05$)。

3 讨论

钙蛋白酶属于细胞内 Ca^{2+} 依赖性半胱氨酸蛋白酶家族, 包括钙蛋白酶-1 和-2, 与细胞分化、转录调控、细胞因子加工、迁移和凋亡等各种细胞过程有关。Calpain 1 作为钙蛋白酶家族成员之一, 是细胞质的主要蛋白质水解酶, 主要由 CAPN1 基因编码。在大肠腺癌中 CAPN1 基因表达增加, 是大肠腺癌的关键致病基因^[5]。另外, Calpain 1 表达的增加与胃食管癌患者的不良癌症特异性有关^[6]。这些研究提示, calpain 1 基因与癌症具有相关性。然而,

calpain1 在 OSCC 中的生物学意义研究较少, 且在国内的研究中尚未见报道。本研究发现, OSCC 细胞系 HSC3 中 calpain1 表达水平显著增加, 提示 calpain1 表达上调可能参与肿瘤细胞生长发育过程。为研究 calpain1 在 OSCC 细胞发育中的作用, 本研究通过瞬时钙蛋白酶 1 基因敲除, 探讨该基因对 OSCC 细胞系增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响。

肿瘤增殖异常和细胞周期进程异常密切相关。细胞周期转换异常会导致细胞周期紊乱、细胞增殖失控, 最终引起癌变。钙蛋白酶能够通过细胞周期蛋白 D1 (cyclin-D1) 和细胞周期蛋白 E (cyclin-E), 来调控细胞周期进程, 特别是 G1 期和 S 期之间的转变, 从而参与调控细胞周期和细胞增殖^[7]。本研究中, calpain 1 沉默能够降低 OSCC 细胞系 HSC3 的生长速度, 使细胞在 G0/G1 期显著积累并伴随 S 期细胞的减少。进一步分析发现 calpain 1 沉默能够抑制 cyclin-D1 和 cyclin-E 表达。cyclin-D1 降解使肿瘤细胞周期呈现 G1 期阻滞^[8]。结合过往研究推测, calpain 1 沉默能够导致细胞周期 G0/G1 停滞, 从而抑制肿瘤细胞系的增殖。

转移是癌症患者死亡的主要原因, 细胞迁移和侵袭是癌症转移的标志。本研究发现 calpain 1 沉默抑制 HSC3 细胞迁移和侵袭能力。上皮-间质转化是癌细胞的侵袭性表型, 与肿瘤进展和转移密切相关, 通常表现为上皮标志物 E-cadherin 表达下降, 间质标志物 N-cadherin 和 Vimentin 表达增加^[9]。本研究发现, calpain 1 沉默使 E-cadherin 表达增加, 而 N-cadherin 和 Vimentin 表达显著降低, 提示 calpain 1 通过增加 E-cadherin 表达、降低

N-cadherin 和 Vimentin 表达参与调节上皮间质转化过程。推测 calpain 1 沉默对 HSC3 细胞迁移和侵袭的抑制作用可能与其对上皮间质转化过程的调节有关。

基质金属蛋白酶(MMPs)诱导的细胞外基质降解是细胞侵袭过程的标志,能够调控癌细胞的侵袭能力^[10]。MMP-2 和 MMP-9 与肿瘤晚期阶段增加的侵袭和转移密切相关^[11]。本研究发现发现, calpain 1 沉默显著降低 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平,这可能与 calpain 1 沉默对细胞迁移和侵袭能力的抑制作用有关。研究证明, TGF- β /Smad 信号通路是与上皮间质转化有关的主要信号通路^[12]。TGF- β /Smad 信号通路的抑制能够通过抑制上皮间质转化过程而抑制肿瘤细胞的转移和侵袭^[13]。Tan 等人报道, calpain 1 能够通过调节 TGF- β 诱导的 EMT 过程而调控细胞的转移能力^[14]。本研究发现, TGF- β RII、Smad2、Smad3 和 p-Smad2/3 蛋白表达均显著降低,提示 calpain 1 沉默至少部分通过调节 TGF- β /Smad 信号传导途径抑制 OSCC 细胞系 HSC3 的上皮间质转化过程。

综上所述, siRNA 沉默 calpain 1 基因能够通过调控细胞周期 G0/G1 停滞而抑制肿瘤细胞系的增殖,另外 calpain 1 沉默能够通过抑制 MMPs 和 GF- β /Smad 信号通路,并影响 EMT 而抑制细胞迁移和侵袭。

参考文献

- [1] 刘盼,多力昆·吾甫尔. 鳞状细胞癌抗原在口腔鳞癌诊治中的应用[J]. 现代口腔医学杂志, 2017, 31(1): 49-52
- [2] 夏冬景,黄莹莹,李海朋,等. 磷酸二酯酶 4D 在口腔鳞状细胞癌发生发展过程中的作用研究[J]. 口腔医学研究, 2017, 33(6): 663-667
- [3] 安静,朱筑霞,王红梅,等. 钙蛋白酶抑制 EGF 诱导雌激素受体阴性乳腺癌细胞体外增殖[J]. 基础医学与临床, 2015, 35(3): 336-340
- [4] Liu B, Zhou Y, Lu D, et al. Comparison of the protein expression of calpain-1, calpain-2, calpastatin and calmodulin between gastric cancer and normal gastric mucosa[J]. Oncology Letters, 2017, 14(3): 3705-3710
- [5] 曾伟,南清振,戴益琛,等. 大肠腺瘤与大肠腺癌肿瘤相关基因的差异表达[J]. 世界华人消化杂志, 2011(8): 868-873
- [6] Storr S J, Pu X, Davis J, et al. Expression of the calpain system is associated with poor clinical outcome in gastro-oesophageal adenocarcinomas. [J]. Journal of Gastroenterology, 2013, 48(11): 1213-1221
- [7] 陈华妹,李铮,王旭东,等. 钙蛋白酶-1 周期蛋白 E 介导 EGF 诱导的 MCF-7 乳腺癌细胞迁移能力增强[J]. 贵阳医学院学报, 2015, 40(12): 1344-1347
- [8] Santra MK, Narendra W, Green MR. F-Box Protein FBXO31 Mediates Cyclin D1 Degradation to Induce G1 Arrest Following DNA Damage[J]. Nature, 2009, 459(7247): 722-725
- [9] 艾军华,时军. 肿瘤干细胞和上皮-间质转化之间的关系及其在肿瘤侵袭转移中的作用[J]. 医学综述, 2015, 21(12): 2180-2183
- [10] 祝丽晶,李芹芹,刘强,等. 血清基质金属蛋白酶-9 水平在非小细胞肺癌侵袭和转移中意义[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2017, 31(2): 165-166
- [11] 焦慧,高志光,高发鹏,等. 基质金属蛋白酶-2 沉默对喉癌侵袭生长的影响[J]. 系统医学, 2017, 2(1): 10-12
- [12] 汪婷,程真顺,刘媛,等. TGF- β 1/Smad2 通路参与 IL-17 诱导的 A549 细胞上皮-间质转化[J]. 武汉大学学报(医学版), 2017, 38(5): 719-723
- [13] 邢洲,张惠,胡慧贤,等. CCL18 与 TGF- β 促进乳腺癌 EMT 的比较[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2016, 37(5): 367-371
- [14] Tan WJ, Tan QY, Wang T, et al. Calpain 1 regulates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in human lung epithelial cells via PI3K/Akt signaling pathway[J]. Am J Transl Res, 2017, 9(3): 1402-1409

[收稿日期: 2017-10-09]

(本文编辑 李四群)