

网络出版时间: 2021-9-7 16:24 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210907.1400.009.html>

靶向下调 Cav3.1 诱导人喉癌 Hep-2 细胞凋亡

江旋, 许为青, 潘春晨

摘要 目的 探讨 Cav3.1 在喉鳞癌组织和细胞中的表达以及靶向下调 Cav3.1 在喉鳞癌细胞增殖和凋亡的影响。方法 应用免疫组织化学、RT-PCR 和 Western blot 方法检测 30 例喉癌患者中 Cav3.1 在喉癌组织、正常切缘黏膜组织中的表达情况; siRNA 瞬转技术构建靶向下调 Cav3.1 的 Hep-2 细胞系, 应用 Western blot 检测各组细胞 BAX、Cleaved-caspase-3、BCL-2 的表达情况, 应用 CCK-8 实验检测该喉癌细胞增殖的情况, Annexin V-PI 染色技术检测喉癌 Hep-2 细胞凋亡的情况。结果 相对癌旁组织, Cav3.1 在喉癌组织中高表达 ($P < 0.05$); 下调组 Cav3.1 在喉癌细胞中 mRNA 和蛋白的表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 下调 Cav3.1 可抑制喉癌细胞的增殖 ($P < 0.05$), 促进喉癌细胞的凋亡 ($P < 0.05$), Western blot 验证下调 Cav3.1, BAX、Cleaved-caspase-3 蛋白表达显著升高, BCL-2 表达明显下降 ($P < 0.05$)。结论

Cav3.1 在喉癌组织和喉癌细胞系中高表达, 下调 Cav3.1 抑制喉癌细胞的增殖, 促进喉癌细胞凋亡。

关键词 喉鳞癌; Hep-2; Cav3.1; 增殖; 凋亡

中图分类号 R 739.65

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)11-1723-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.11.009

头颈部肿瘤在世界范围内占据第六位, 喉癌是头颈部肿瘤中较常见的恶性肿瘤, 世界上每年约有 90 000 人死于喉癌, 超过 95% 的喉癌被诊断为鳞状细胞癌^[1]。它的病因及作用机制都还没有明确, 所以从分子学探讨其作用机制很有必要。近年来, 关于 T 型钙离子通道在肿瘤中的研究越来越多。这些通道在肿瘤细胞系中的表达已广泛报道于乳腺肿瘤^[2]、前列腺肿瘤^[3]、非小细胞肺癌^[4]、视神经母细胞瘤^[5]、口腔鳞癌^[6]。然而, 在喉鳞癌中关于 Cav3.1 的报道几乎没有。该研究通过免疫组化法、RT-PCR、Western blot 检测 Cav3.1 在喉鳞癌组织和

癌旁组织中的表达, 并通过互补 siRNA 靶向下调 Cav3.1 的表达, 探讨 Cav3.1 是否参与介导喉癌细胞的增殖与凋亡。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本采集 收集 30 例喉癌组织和癌旁正常组织(距肿瘤边缘至少 0.5 cm), 来源于 2018 年 3—10 月在安徽医科大附属省立医院行手术治疗的患者, 切除的标本均立即放入液氮中保存, 术后病理证实癌组织为鳞状细胞癌, 癌旁组织无癌细胞。本研究经医院伦理委员会批准。30 位喉癌患者, 其中 I 期患者 15 例, II 期患者 9 例, III 期患者为 3 例, IV 期患者 3 例, 获得组织标本来源患者的知情同意, 年龄 46~66(53.3 ± 2.6) 岁, 30 例均为男性。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基购自 Gibco 公司, 胎牛血清购自 Hyclone 公司, Cav3.1 抗体购自 Santa Cruz 公司, BCL-2、BAX、Cleaved-caspase-3 抗体购自 Proteintech 公司, Simple Total RNA kit 购自天根生化科技有限公司, BCA 试剂盒、ECL 试剂盒购自江苏南通碧云天公司, qPCR Mix 试剂盒购自 TaKaRa 公司, Cell Counting Kit-8、RPMI-1640 培养基购自上海生工生物工程有限公司, 免疫组化试剂盒购自福州迈新生物公司。

1.1.3 细胞培养 人喉癌细胞株 Hep-2 购于中国科学院上海生命科学院, 细胞用 5% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养, 培养基中加入一定比例青霉素和链霉素, 培养于 37 °C、5% CO₂ 的湿度环境中, 隔天更换培养基待用。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学 取部分喉癌及癌旁组织, 固定、石蜡包埋后, 3.5 μm 连续切片。经过烤片、脱蜡水化、抗原修复等操作后根据 SP 试剂盒分别加入 Cav3.1 一抗(1:200)、二抗孵育, 显微镜下观察 DAB 显色并及时终止显色。低倍镜取阳性视野最多区域, 再取 5 个高倍镜视野阳性百分比平均值, 根据半定量免疫评分法采用双盲法评估染色结果。

1.2.2 细胞转染 靶向 CACNA1G 的 si-RNA 和 si-

2021-06-21 接收

基金项目 “科大新医学”联合基金(编号: WK9110000053); 安徽省自然科学基金(编号: 1808085QH248); 国家自然科学基金(编号: 81800911)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院耳鼻咽喉科, 合肥 230001

作者简介: 江旋, 男, 硕士研究生;

许为青, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: weiqingxu@aliyun.com

RNA 阴性对照由上海汉宝生工公司负责设计合成, 实验分组为 Hep-2 对照组(NC 组)、空载体组(mock 组)、Cav3.1 下调组(si-Cav3.1 组)。将 Hep-2 细胞接种在 24 孔培养板上, 当细胞贴壁后, 观察细胞密度达到 75% 时, 吸弃板上的培养液, 加 0.5 ml Cav3.1 si-RNA 液和 6 mg/L 的 polybrene 混合液, 37 °C 环境中培养 4 h, 再加 0.5 ml 的完全培养基到培养板上, 并在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度的孵箱中培养。每 3 d 用 2 μg/ml 的 puromycin 进行筛选, 荧光显微镜下观察 Cav3.1 si-RNA 处理的各组细胞中 Cav3.1 表达效率。

1.2.3 RT-PCR 取各组细胞、喉癌组织和癌旁组织, 匀浆后提取 RNA, 检测其纯度和浓度。根据反转试剂盒步骤制备 cDNA。以 cDNA 为模板按照 SYBR qPCR Master Mix 说明相应加入引物, 进行 40 个循环 RT-PCR。用 2^{-ΔΔCt} 法进行计算, 结果用相对定量表示。GAPDH 在体内广泛表达且恒定, 故用作本实验的内参基因, Cav3.1 引物 F: GCTCTTTG-GAGACCTGGACTGT, R: TAGGCGAGATGACCGTGT-TG; GAPDH 引物 F: CATGTTTCGTCATGGGTGT-GAACC, R: GGTCATGAGTCCTTCCACGATACC。

1.2.4 细胞增殖检测 细胞转染后, 重新制成悬液并将细胞接种在 96 孔板中, 每孔 100 μl。培养 24、48、72 h 后分别加入 CCK-8 溶液 10 μl, 每组设置 3 个复孔, 再孵育 2 h 后, 用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(optical density, OD) 值。

1.2.5 Western blot 取各组细胞、喉癌和癌旁组织, 匀浆后提取浆、膜蛋白并测定浓度纯度, 高温煮沸使蛋白变性。配制分离胶和浓缩胶, 取 20 μg 蛋白于 SDS-PAGE 琼脂糖凝胶进行电泳。转膜后标记, 加一抗 Cav3.1 抗体(稀释 1 : 400) 孵育过夜, 加山羊抗兔二抗(稀释 1 : 2 000) 孵育 1 h, PBS 冲洗后用 ECL 试剂盒发光显影, 分析结果。

1.2.6 流式细胞术 将 FITC-Annexin V 和 PI 加入孵育液配成浓度为 1 mg/L 的标记液待用, 收集细胞悬液, 孵育液冲洗离心后加入 100 μl 标记液避光孵育 10 min, 加入荧光溶液避光振动孵育 20 min, 用流式细胞仪检测结果并分析。

1.3 统计学处理 统计学分析用 Graphpad Prism 8.2.1、SPSS 22.0 软件。使用 Image J 软件对蛋白免疫印迹条带的结果进行分析, 两组间样本均数的比较采用独立 *t* 检验分析, 多组间计量资料的比较采用 one-way ANOVA 检验, 实验数据均服从正态分布, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Cav3.1 在喉癌组织中的表达 免疫组化染色(图 1) 显示, Cav3.1 广泛表达于细胞质中, 少许表达在细胞核。在 30 例喉癌组织中, 27 例 Cav3.1 阳性表达, 阳性表达率为 90%; 在 30 例癌旁正常黏膜组织中, 有 3 例 Cav3.1 阳性表达, 阳性表达率 10%。与癌旁正常黏膜组织相比, 喉癌组织中 Cav3.1 表达水平明显增高, 差异有统计学意义($\chi^2 = 38.4, P < 0.001$)。

采用 RT-PCR 和 Western blot 检测 30 例喉癌样本和细胞中 Cav3.1 的表达情况, RT-PCR 结果显示, 喉癌组织中 Cav3.1 的 RNA 表达水平(3.816 ± 1.757) 显著高于癌旁组织(1.131 ± 0.843), 差异有统计学意义($t = 7.550, P < 0.001$); Western blot 检测 30 例喉癌样本, 喉癌组织中 Cav3.1 的蛋白表达水平(4.251 ± 2.496) 显著高于癌旁组织(1.445 ± 1.143), 差异有统计学意义($t = 5.755, P = 0.0001$)。见图 2。

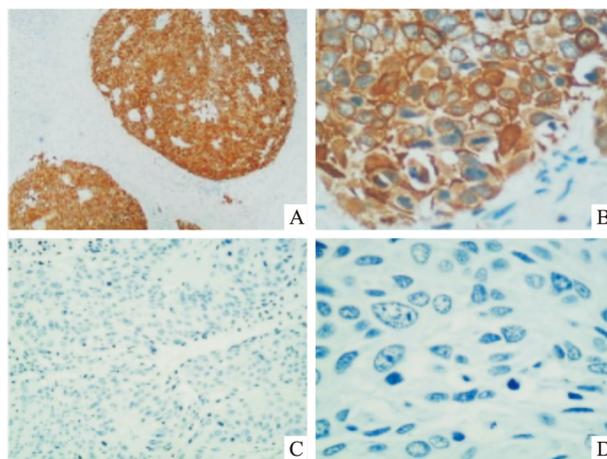


图 1 Cav3.1 在喉癌及癌旁组织中的表达

A、B: 免疫组化染色提示 Cav3.1 主要表达在胞质和胞核; C、D: 喉癌组织的 HE 染色结果; A、C: $\times 10$; B、D: $\times 40$

2.2 喉癌 Cav3.1 表达和基因干预 使用 si-Cav3.1 转染 Hep-2 细胞后, 流式细胞术提示转染效率(92 ± 2.31)%, Western blot 验证检测显示, si-Cav3.1 组中的 Cav3.1 蛋白显著减少(si-Cav3.1 组 0.4 ± 0.08 , mock 组 0.96 ± 0.45 , NC 组 0.98 ± 0.2 , $n = 3$), si-Cav3.1 组中的 Cav3.1 相对表达水平则显著下降(图 3), 与 NC 组、mock 组相比差异有统计学意义($F = 18.109, P = 0.0008$), 证实细胞转染效率适合接下来的研究。

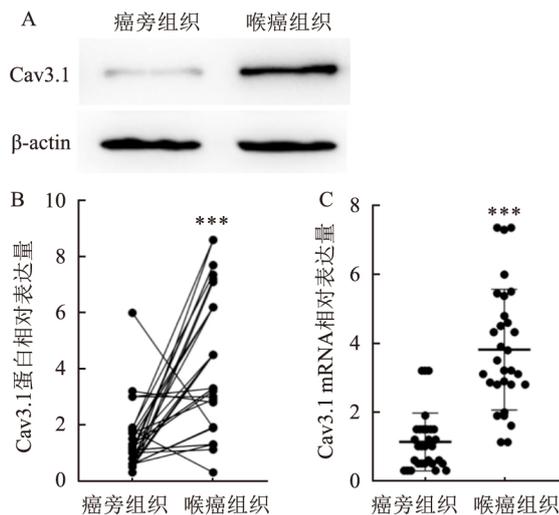


图2 喉癌组织和癌旁组织中 Cav3.1 蛋白和 mRNA 表达

A: Cav3.1 蛋白表达; B: Cav3.1 蛋白相对表达量; C: Cav3.1 mRNA 的表达; 与癌旁组织比较: *** $P < 0.001$

2.3 下调 Cav3.1 对喉癌细胞增殖的影响 CCK-8 实验结果显示,与 NC 组、mock 组比, si-Cav3.1 组 Hep-2 细胞在培养 24、36、48、72 h 后增殖能力显著减弱,差异有统计学意义 ($F = 51.109, P < 0.001$),

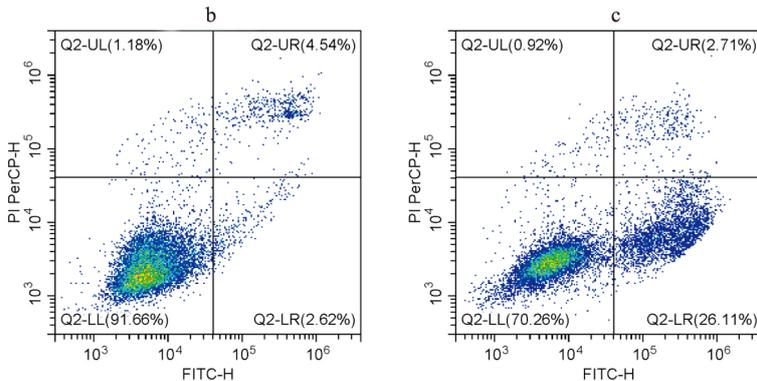
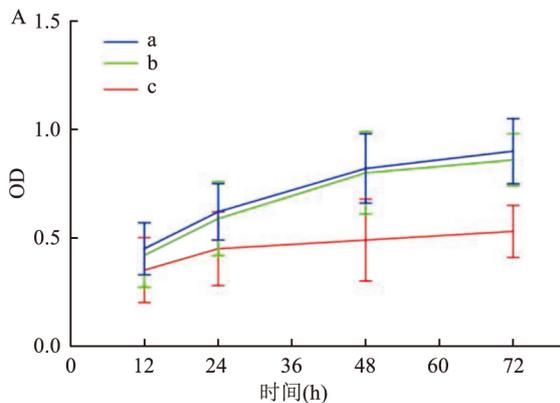


图4 各组细胞增殖和凋亡率

A: CCK-8 法检测下调 Cav3.1 对喉癌细胞增殖的影响; B: 流式细胞术检测下调 Cav3.1 对细胞凋亡的影响; a: NC 组; b: mock 组; c: si-Cav3.1 组; 与 NC 组、mock 组比较: *** $P < 0.001$

见图 4A。

2.4 下调 Cav3.1 对细胞凋亡的影响 流式细胞术检测 24 h 后凋亡率, NC 组、mock 组和 si-Cav3.1 组凋亡率分别为 1.26 ± 0.31 、 2.62 ± 0.42 、 25.11 ± 2.56 见图 4B, 与 NC 组相比, si-Cav3.1 组细胞凋亡率升高 ($F = 514.5, P < 0.001$)。

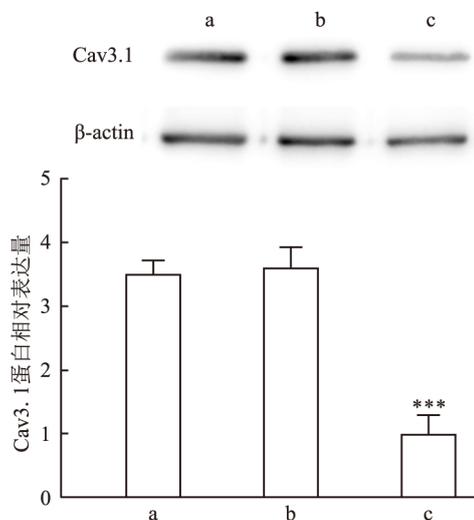


图3 Cav3.1 蛋白在各组细胞中的表达

a: NC 组; b: mock 组; c: si-Cav3.1 组; 与 NC 组、mock 组比较: *** $P < 0.001$

2.5 下调 Cav3.1 细胞中凋亡蛋白表达 通过 Western blot 检测凋亡蛋白 BCL-2、BAX、Cleaved-caspase-3 在各组细胞中的表达量,与 NC 组、mock 组比较,si-Cav3.1 组细胞中 BCL-2、BAX、Cleaved-caspase-3 蛋白的表达水平显著改变 ($P < 0.05$),下调 Cav3.1 显著促进 Hep-2 细胞的增殖能力 ($P < 0.05$),见图 5。

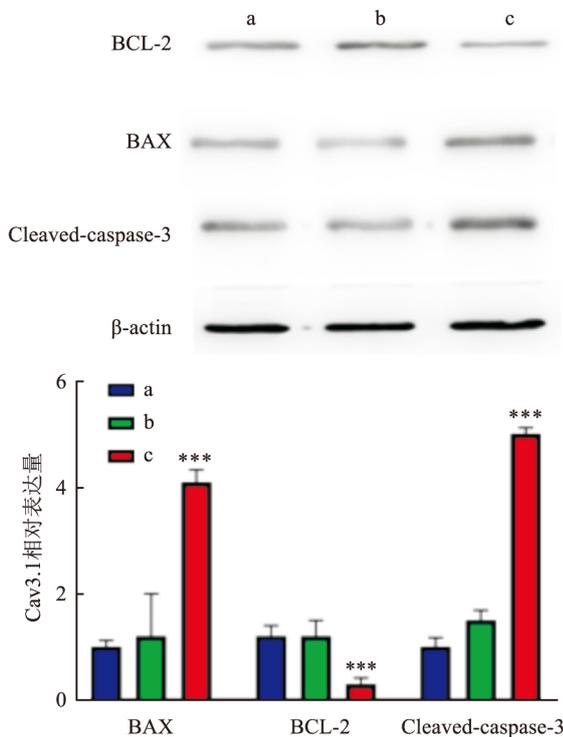


图5 各组 BCL-2、BAX、Cleaved-caspase-3 的表达

a: NC 组; b: mock 组; c: si-Cav3.1 组; 与 NC 组、mock 组比较:

*** $P < 0.001$

3 讨论

喉癌作为头颈部肿瘤中很常见的癌症,其发生跟分子和遗传有着密切的关系,在细胞发生癌变后,细胞中的离子通道也会相应发生很大改变。其中 T 型钙离子通道的活性调节比较独特。钙在细胞内信号传导中起关键作用^[7],并控制许多不同的细胞过程,如增殖、分化、生长、细胞死亡和凋亡。因此,钙信号的改变会导致细胞生长和侵袭的缺陷,并与某些类型的癌症有关。钙是细胞中最常见的信号转导元素,刺激细胞会导致细胞内钙浓度增加,钙是一种普遍存在的第二信使,参与调节广泛的细胞过程,如调节血管的收缩和舒张,神经冲动传递和激素的分泌。钙的调节涉及多种分子结构,如电压门控钙通道、受体操纵的钙通道、钙泵、钠钙泵。电压门控钙

通道允许钙进入以响应膜去极化,这些通道具有多种功能,包括肌肉收缩、激素和神经递质释放、细胞运动、细胞生长和调节、细胞损伤和死亡以及细胞存活。因此电压激活的钙离子通道,特别是 T 型通道,在调节肿瘤生长和进展中具有潜在作用。

有文献^[8]报道 T 型钙离子通道 Cav3.1 对癌细胞的增殖起到很大促进作用,细胞癌变后 Cav3.1 的表达明显增高。本研究通过免疫组织化学技术检测早期喉癌队列中的一部分肿瘤过度表达 T 型钙离子通道 Cav3.1,证明了在肿瘤组织和细胞中 Cav3.1 的高表达。

Cav3.1 表达于多种类型基础代谢率高的组织,包括大脑、心脏、肾脏和平滑肌;同样,Cav3.1 在肿瘤细胞中的异常上调对肿瘤有维持其高代谢水平和维持其恶性特点的作用^[9]。在下调 Cav3.1 基因表达的癌细胞中^[10],细胞周期已被证实在 G1/S 或 G2/M 过渡期受到阻滞。同样,在乳腺癌^[2,11]、前列腺癌^[4]、口腔鳞癌^[7]中,下调 Cav3.1 对癌细胞的增殖具有抑制作用。本研究针对性下调了 Cav3.1 的表达,探索 Cav3.1 与喉鳞癌增殖与凋亡的关系。结果显示,下调 Cav3.1 组细胞 72 h 内增殖能力显著减弱,这表明通过靶向下调 Cav3.1 能有效抑制 Hep-2 细胞的增殖;下调 Cav3.1 组细胞 24 h 内凋亡率明显升高,下调 Cav3.1 组中 BCL-2、Cleaved-caspase-3 蛋白表达显著升高,BAX 表达明显下降,这预示着下调 Cav3.1 对喉癌细胞 Hep-2 的凋亡具有促进作用。

研究^[12]表明,Akt 的活性在 T 型钙离子通道调节下发生改变。在胶质母细胞瘤细胞中,在特定的 T 型钙离子通道抑制剂治疗或 Cav3.1 下调后,观察到 Akt 活性的失调^[13]。在前列腺癌中,p-Akt (S473) 和 p-Akt (T308) 在 Cav3.1 下调后表达显著降低,预示着 Cav3.1 可调节 Akt 从而影响癌细胞的增殖^[4];而关于喉癌细胞中 Akt 与 Cav3.1 的关系有待进一步研究。

本研究检测了 Cav3.1 在喉癌组织、癌旁组织和喉癌细胞系 Hep-2 细胞系中的表达,特异性 siRNA 下调 Cav3.1 可显著抑制 Hep-2 细胞的增殖并促进其凋亡。据此推测 Cav3.1 可能在人类喉癌的增殖和抗凋亡活性中起关键作用。

参考文献

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide

- for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394–424.
- [2] Ranzato E, Magnelli V, Martinotti S, et al. Epigallocatechin-3-gallate elicits Ca^{2+} spike in MCF-7 breast cancer cells: essential role of Cav3.2 channels[J]. *Cell Calcium*, 2014, 56(4): 285–95.
- [3] Hu S, Li L, Huang W, et al. Cav3.1 knockdown suppresses cell proliferation, migration and invasion of prostate cancer cells by inhibiting AKT[J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10(10): 4603–14.
- [4] Suo A, Childers A, D'Silva A, et al. Cav 3.1 overexpression is associated with negative characteristics and prognosis in non-small cell lung cancer[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(9): 8573–83.
- [5] Gong Q, Wen X, Li H, et al. Up-regulation of Cav3.1 expression in SHSY5Y cells induced by lidocaine hydrochloride [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(sup1): 372–9.
- [6] Li R F, Man Q W, Liu J Y, et al. Overexpression of T-type calcium channel Cav3.1 in oral squamous cell carcinoma: association with proliferation and antiapoptotic activity [J]. *J Mol Histol*, 2021, 52: 511–20.
- [7] Buchanan P J, McCloskey K D. Cav channels and cancer: canonical functions indicate benefits of repurposed drugs as cancer therapeutics[J]. *Eur Biophys J*, 2016 45(7): 621–33.
- [8] Barceló C, Sisó P, Maiques O, et al. T-type calcium channels: A potential novel target in melanoma [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(2): 391.
- [9] Panner A, Wurster R D. T-type calcium channels and tumor proliferation [J]. *Cell Calcium*, 2006, 40(2): 253–9.
- [10] Dziegielewska B, Casarez E V, Yang W Z, et al. T-type Ca^{2+} channel inhibition sensitizes ovarian cancer to carboplatin [J]. *Mol Cancer Ther*, 2016, 15(3): 460–70.
- [11] Ohkubo T, Yamazaki J. T-type voltage-activated calcium channel Cav3.1, but not Cav3.2, is involved in the inhibition of proliferation and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(1): 267–75.
- [12] Divolis G, Mavroedi P, Mavrofydi O, et al. Differential effects of calcium on PI3K-Akt and HIF-1 α survival pathways [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2016, 32(5): 437–49.
- [13] Valerie N C, Dziegielewska B, Hosing A S, et al. Inhibition of T-type calcium channels disrupts Akt signaling and promotes apoptosis in glioblastoma cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85(7): 888–97.

Cav3.1 targeted-knockdown induces apoptosis of human laryngeal squamous carcinoma Hep-2 cells

Jiang Xuan, Xu Weiqing, Pan Chunchen

(Dept of Otolaryngology-Head & Neck Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the expression of Cav3.1 in laryngeal squamous cell carcinoma tissues and cells and the effect of the proliferation and apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma by targeted-knockdown of Cav3.1. **Methods** Immunohistochemistry, RT-PCR and Western blot were used to detect the expression of Cav3.1 in laryngeal cancer tissues and normal mucosal tissues of incisional margin. Hep-2 cell lines of Cav3.1 targeted-knockdown were constructed by siRNA transient technique. Western blot was used to detect the expression of BAX, Cleaved-caspase-3, BCL-2 in all groups. CCK-8 test was used to detect the proliferation of laryngeal carcinoma cell. Annexin V-PI staining was used to detect the apoptosis of laryngeal carcinoma cells in the targeted-knockdown group. **Results** Cav3.1 was highly expressed in 30 cases of laryngeal cancer compared to pericarcinomatous tissues ($P < 0.05$). The expression of Cav3.1 mRNA and protein was decreased in si-Cav3.1 groups ($P < 0.05$). In si-Cav3.1 group, the proliferation of laryngeal cancer cells decreased ($P < 0.05$), the apoptosis of laryngeal carcinoma cells increased ($P < 0.05$). The expression of BAX and Cleaved-caspase-3 was increased, and BCL-2 expression was decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Cav3.1 is highly expressed in laryngeal cancer tissues and laryngeal cancer cell lines. Cav3.1 targeted-knockdown inhibits the proliferation and promotes apoptosis of laryngeal carcinoma cells.

Key words laryngeal squamous carcinoma; Hep-2; Cav3.1; proliferation; apoptosis