

# Nav1. 6-RNAi 通过 AKT 通路抑制口腔鳞癌细胞增殖作用研究

许 乐<sup>1</sup> 洪礼琳<sup>1</sup> 刘玮佳<sup>2</sup> 胡媛平<sup>1</sup> 蒋 勇<sup>3</sup>

**摘要** 目的 探讨 Nav1. 6-RNAi 对口腔鳞状细胞癌细胞增殖作用的影响, 并分析其可能相关机制。方法 使用免疫组化、Western blot 和 qRT-PCR 法检测电压门控钠通道 Nav1. 6 在口腔鳞状细胞癌组织中的表达情况; 将 Nav1. 6-RNAi 转染到人舌鳞癌细胞株 (CAL-27 细胞) 中, 使用 Western blot 法检

测 Nav1. 6、CyclinD1、C-myc、AKT 及 p-AKT 的表达, 并通过流式细胞仪检测细胞周期。结果 免疫组化、Western blot 和 qRT-PCR 结果证实 Nav1. 6 在口腔鳞状细胞癌组织中表达高于口腔正常组织 ( $P < 0.05$ ); Nav1. 6-RNAi 转染到 CAL-27 细胞中后, CyclinD1、C-myc、p-AKT 蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ ), 且 S 期细胞明显减少。结论 电压门控钠通道 Nav1. 6 可能通过 AKT 通路参与口腔鳞状细胞癌的增殖。

**关键词** 口腔鳞状细胞癌; Nav1. 6; 增殖; CyclinD1; AKT 通路  
中图分类号 R 739. 85

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2021) 11 - 1696 - 05  
doi: 10. 19405/j. cnki. issn1000 - 1492. 2021. 11. 004

2021 - 07 - 15 接收

基金项目: 安徽医科大学校科研项目(编号: 2018xkj063); 安徽省公益性技术应用研究联动计划项目(编号: 1704f0804020)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学第四附属医院口腔科, 合肥 230041  
<sup>2</sup> 合肥市口腔医院西区儿童口腔科, 合肥 230001  
<sup>3</sup> 安徽医科大学口腔医学院, 安徽医科大学附属口腔医院, 安徽省口腔疾病研究重点实验室, 合肥 230032

作者简介: 许 乐, 男, 主治医师;  
蒋 勇, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: j6263@163. com

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC) 是最常见的口腔颌面部恶性肿瘤, 占口腔癌病例的 90% 以上, 其年患病率超过 500 000 例<sup>[1]</sup>。

## Preparation and characterization of antibacterial high strength composite films

Zhou Pu, Cheng Dongdong, Zou Duohong

(Stomatological College of Anhui Medical University, The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Anhui Province Key Laboratory of Oral Diseases Research, Hefei 230032)

**Abstract Objective** By testing the tensile strength of sodium alginate bacterial cellulose composite membrane loaded with nano silver, the antibacterial property of *Staphylococcus aureus* and its effect on the proliferation of mouse embryonic fibroblasts were studied to explore its feasibility as a new type of guided bone tissue regeneration membrane. **Methods** The sodium salt (SA) solution was uniformly mixed with bacterial cellulose (BC) solution in proportion (the mass fraction ratio between SA and BC was 10 : 3, 10 : 5, 10 : 7, 10 : 9 and pure SA membrane), then the membrane was self-evaporating and the silver nanoparticles (AgNPs) were produced by in-situ reduction of dopamine on the membrane surface. The tensile strength of each film specimen was tested by universal mechanical testing machine. The microstructure of composite film with the maximum tensile strength was observed by scanning electron microscope and the composition was analyzed by X-ray diffractometer. The biocompatibility of the composite membrane was tested by cell counting kit. The antibacterial activity was tested by inhibition zone method. **Results** Silver nanoparticles were uniformly distributed in the Ag-SA /BC composite film, and X-ray diffraction analysis showed that AgNPs, sodium alginate and BC existed in the composite film. When the mass fraction ratio of SA to BC was 10 : 7, the tensile strength of the composite membrane reached (223. 8 ± 9. 9) MPa. The results of cell experiments showed that the AG-SA/BC composite membrane had excellent biocompatibility. *Staphylococcus aureus* showed clear inhibition zone after incubation for 24 h. **Conclusion** When the Ag-SA /BC mass fraction ratio was 10 : 7, the tensile strength of the composite membrane is the highest, which shows excellent antibacterial property to *Staphylococcus aureus* and good cellular compatibility.

**Key words** sodium alginate; bacterial cellulose; silver nanoparticles; tensile strength; bacteriostatic; biocompatibility

OSCC 在发病早期即可出现对周围组织的浸润与扩散或者远端转移,因此治疗较困难。虽然近年来对 OSCC 的治疗有了很大进展,但其主要的治疗方法(如手术、化疗等)有较大的副作用,故寻找一种新的治疗方法十分有意义。

电压门控钠通道(voltage-gated sodium channel, VGSC)已成为治疗 OSCC 新的研究方向<sup>[2]</sup>。VGSC 通常由一个  $\alpha$  亚基与一个或多个  $\beta$  亚基组成,根据  $\alpha$  亚基的差异,可分为 Nav1.1-Nav1.9 和 Navx 共 10 种亚型,其通过调节  $\text{Na}^+$  跨膜转运从而发挥作用,是细胞动作电位产生和传播的基础。越来越多研究<sup>[3]</sup>表明, VGSC 与多种肿瘤的增殖关系密切,其中 Nav1.6 的作用尤为明显。现通过研究 Nav1.6 在正常及 OSCC 中表达差异,初步探讨 Nav1.6 与 OSCC 的可能关系及机制,以期为临床上早期诊断 OSCC 和利用 VGSC 阻断剂治疗 OSCC 提供理论基础。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂** LipoFiter™ 脂质体转染试剂(货号: HB-TRLF-1000)和 Nav1.6-RNAi 购自上海汉恒生物科技有限公司, TB Green™ Premix Ex Taq™ II (货号: RR820A)和 PrimeScript™ RT Master Mix (货号: RR036A)购自日本 TAKARA 公司, Nav1.6 抗体(货号: ab230654, 浓度: 1:500)购自美国 Abcam 公司, CyclinD1 抗体(货号: 55506S, 浓度: 1:500)、C-myc 抗体(货号: 18583S, 浓度: 1:500)、AKT 抗体(货号: 4685S, 浓度: 1:500)和 p-AKT 抗体(货号: 4060S, 浓度: 1:500)均购自美国 Cell Signaling Technology 公司, 细胞周期与凋亡检测试剂盒(货号: C1052)购自上海碧云天生物技术有限公司, 所有引物均由生工生物(上海)股份有限公司合成。

**1.2 组织收集与细胞培养** 收集 6 例仅患有 OSCC 患者术中切除的癌症组织,患者年龄 50~70(64.5 ± 3.86)岁,另收集 6 例口腔手术中切除的非癌症组织,以上组织收集后立即固定保存。本实验所使用的 CAL-27 细胞为安徽省口腔疾病重点实验室所保留,用于研究 OSCC 的发病机制。

**1.3 免疫组化** 组织经中性多聚甲醛固定后,脱水石蜡包埋,根据标准流程制片、染色等, Nav1.6 抗体浓度为 1:200。封片后显微镜观察。

**1.4 细胞转染** 转染使用对数生长期的细胞,按照说明书使用 LipoFiter™ 脂质体转染试剂将 Nav1.6-RNAi 转染到 CAL-27 细胞中, 6 h 后换液。细胞转染 48 h 后,收集细胞进行后续研究。Nav1.6-RNAi 正义

链序列: 3'-GCUCAUUGAUGCGAGCAAATT-5', 反义链序列: 3'-AUUCUUGAUGUUCUUCAGCTT-5'。

**1.5 实时定量 PCR (qRT-PCR)** 收集组织和细胞,利用 TRIzol 法提取组织和细胞中的 RNA,定量后使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转成 cDNA。根据 TB Green™ Premix Ex Taq™ II 说明书步骤,采用 qRT-PCR 检测细胞中 Nav1.6、CyclinD1 和 C-myc mRNA 的表达。

**1.6 Western blot** 收集组织和细胞,加入适量蛋白裂解液冰上裂解 15 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min 后吸取上清液为总蛋白,按照 4:1 的比例加入 SDS-蛋白上样缓冲液变性。使用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳法检测 Nav1.6、CyclinD1、C-myc、AKT 及 p-AKT 蛋白相对表达量。按照组别依次加样,电泳、转膜、封闭、洗膜,一抗孵育过夜,二抗(1:8 000)孵育 1 h,洗膜。使用凝胶成像分析系统扫描成像并分析。

**1.7 细胞周期检测** 流式细胞仪检测细胞周期,胰酶消化收集对数生长期的细胞,用预冷的 PBS 清洗 2 次后,使用 70% 乙醇溶液 4 °C 固定 30 min 变性。1 000 r/min 离心 5 min,清洗后收集细胞,根据说明书分别加入缓冲液重悬细胞、RNaseA、PI, 4 °C 避光孵育 30 min 后上机检测分析。

**1.8 统计学处理** 数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 GraphPad Prism 6.0 进行统计分析,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)进行统计,两组之间比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 OSCC 组织中 Nav1.6 的表达** 免疫组化检测结果显示,与正常口腔黏膜组织比较,OSCC 组织中 Nav1.6 表达升高。Western blot 和 qRT-PCR 检测发现,Nav1.6 蛋白( $F = 19.81$ )和 mRNA( $F = 22.63$ )在 OSCC 组织中呈高表达,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见图 1。

**2.2 Nav1.6-RNAi 对 CAL-27 细胞中 Nav1.6 表达的影响** 培养正常的 CAL-27 细胞,将 Nav1.6-RNAi 转染到 CAL-27 细胞中,Western blot 和 qRT-PCR 结果显示:Nav1.6-RNAi 能够降低 CAL-27 细胞中 Nav1.6 蛋白( $F = 15.28$ )和 mRNA( $F = 21.78$ )的表达,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见图 2。

**2.3 Nav1.6-RNAi 对 CAL-27 细胞中 CyclinD1 及 C-myc 表达的影响** Western blot 和 qRT-PCR 结果显示 Nav1.6-RNAi 转染后,CAL-27 细胞中 CyclinD1

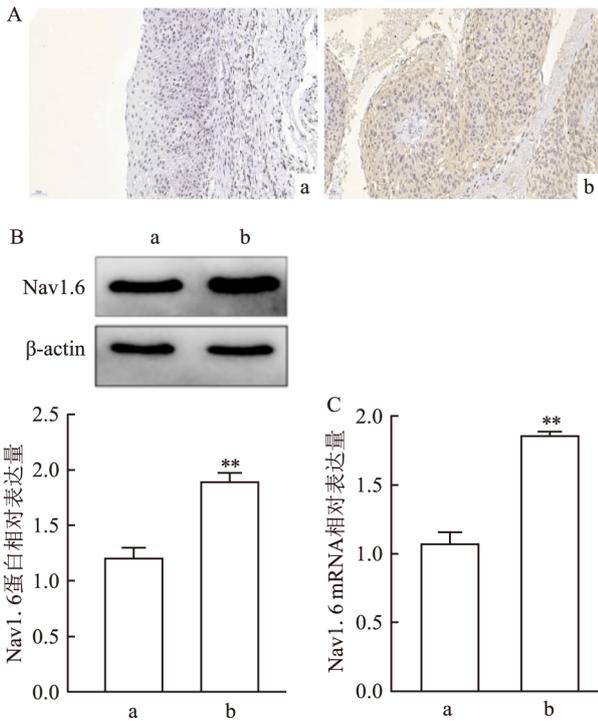


图1 OSCC组织中Nav1.6的表达

A: 免疫组化检测 Nav1.6 在正常口腔黏膜组织和 OSCC 组织的表达 ×200; B: Western blot 检测 Nav1.6 蛋白在正常口腔黏膜组织和 OSCC 组织的表达; C: qRT-PCR 检测 Nav1.6 mRNA 在正常口腔黏膜组织和 OSCC 组织的表达; a: 正常口腔黏膜组; b: OSCC 组; 与正常口腔黏膜组比较: \*\*  $P < 0.01$

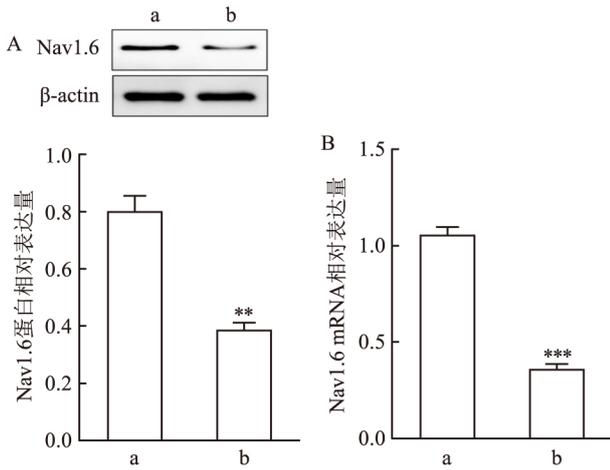


图2 Nav1.6-RNAi对CAL-27细胞中Nav1.6表达的影响

A: Western blot 检测转染 Nav1.6-RNAi 后 CAL-27 细胞中 Nav1.6 蛋白的表达; B: qRT-PCR 检测转染 Nav1.6-RNAi 后 CAL-27 细胞中 Nav1.6 mRNA 的表达; a: NC-RNAi 细胞组; b: 转染 Nav1.6-RNAi 细胞组; 与 NC-RNAi 细胞组比较: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

及 C-myc 蛋白及 mRNA 表达降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见图 3。

2.4 Nav1.6-RNAi 对 CAL-27 细胞周期的影响  
与 NC-RNAi 组 ( $62.38 \pm 2.11$ ) 比较, Nav1.6-RNAi

组 S 期细胞比例 ( $23.82 \pm 3.27$ ) 明显降低, 差异有统计学意义 ( $F = 16.28, P < 0.01$ ) 见图 4。以上结果提示, 抑制 Nav1.6 表达可以抑制 OSCC 细胞 CAL-27 的增殖。

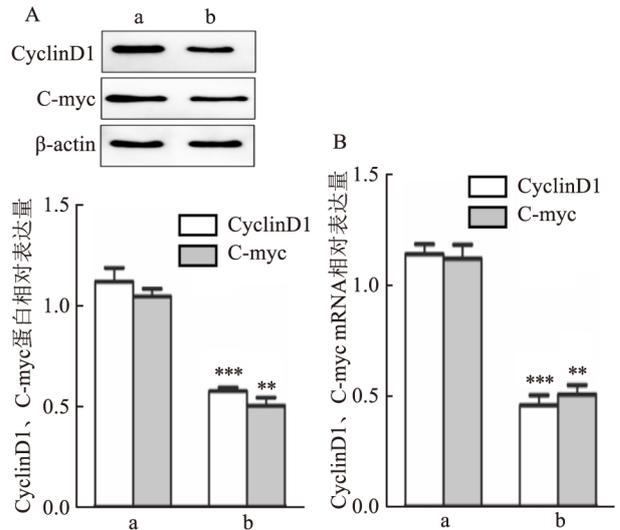


图3 Nav1.6-RNAi对CAL-27细胞中CyclinD1及C-myc表达的影响

A: Western blot 检测转染 Nav1.6-RNAi 后 CAL-27 细胞中 CyclinD1、C-myc 蛋白的表达; B: qRT-PCR 检测转染 Nav1.6-RNAi 后 CAL-27 细胞中 CyclinD1、C-myc mRNA 的表达; a: NC-RNAi 细胞组; b: 转染 siRNA-Nav1.6 细胞组; 与正常细胞组比较: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

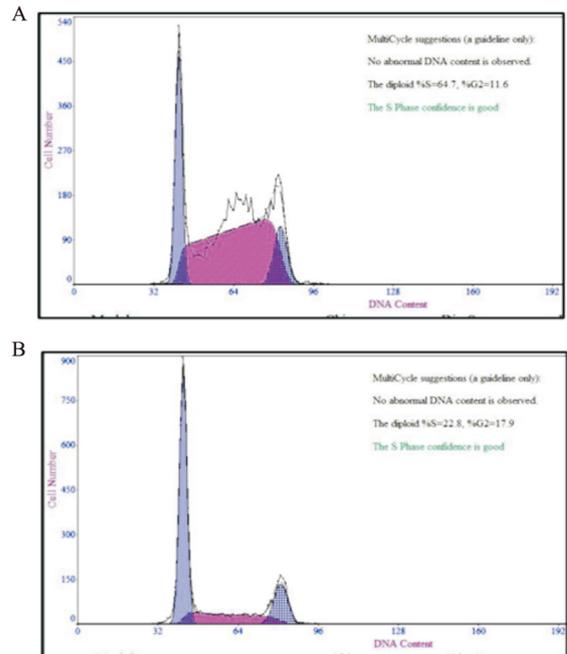


图4 流式细胞术检测转染 siRNA-Nav1.6 后对 CAL-27 细胞周期的影响

A: NC-RNAi 细胞组; B: 转染 siRNA-Nav1.6 细胞组

**2.5 Nav1.6 对 CAL-27 细胞 AKT 及 p-AKT 表达的影响** Western blot 结果显示, siRNA-Nav1.6 转染后 CAL-27 细胞中 p-AKT 蛋白表达较 NC-RNAi 组明显降低, 差异有统计学意义 ( $F = 28.36, P < 0.01$ ) (见图 5), 提示 Nav1.6 可能通过 AKT 信号通路调控 CAL-27 细胞的增殖。

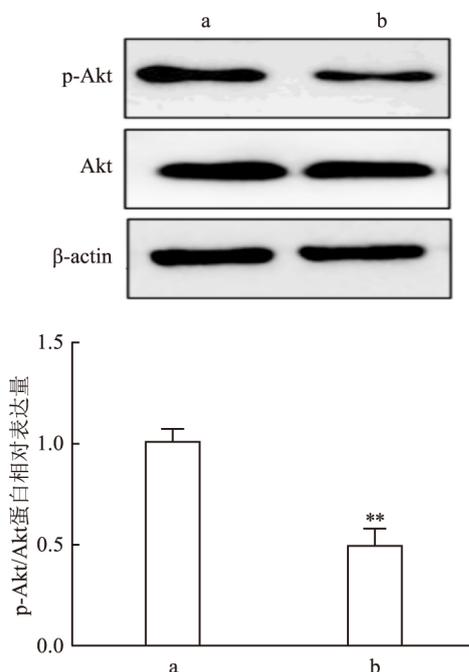


图5 Western blot 检测转染 siRNA-Nav1.6 后 CAL-27 细胞中 AKT 及 p-AKT 蛋白的表达  
a: NC-RNAi 细胞组; b: 转染 siRNA-Nav1.6 细胞组

### 3 讨论

随着细胞生物学和分子生物学的发展, 研究<sup>[4]</sup>显示, 恶性肿瘤的基本生物学特征是细胞增殖失控、异常分化和凋亡受阻。OSCC 的发生发展必定经历相当复杂的变化过程, 其中细胞增殖及凋亡具有重要的研究意义。多细胞生物体自身稳定性的维持取决于机体细胞增殖与凋亡之间的动态平衡, 凋亡不足或过度都会导致疾病的产生。肿瘤的形成和发展是由多种原因导致这种平衡失调, 形成细胞增殖大于细胞凋亡的结果, 最终引起组织恶变的发生。在这个复杂过程中, 最早期的表现为细胞周期的破坏及细胞增殖的失控。虽然, 近年来医疗技术不断发展, 但 OSCC 仍然没有比较完善的治疗方法, 在临床上依然是口腔最常见的致命疾病。大量研究<sup>[5-6]</sup>表明电压门控钠通道各亚型与前列腺癌、卵巢癌、乳腺癌及胃癌等多种肿瘤的增殖、侵袭等生物学行为关

系密切, 其中以 Nav1.6 的作用尤为明显。有学者研究发现 Nav1.6 在肠癌组织中表达异常, 且与淋巴结转移密切相关, 在手术切除的转移性淋巴结中 Nav1.6 而非 Nav1.5 呈高表达, 提示 Nav1.6 的高表达可能促进了肠癌的淋巴结转移<sup>[7]</sup>。同时, BenAissa et al<sup>[8]</sup>通过电生理实验利用钠通道肽 AaHIV 毒素激活 Nav1.6, 提示该钠通道亚型与前列腺癌细胞的增殖密切相关。目前有关 Nav1.6 与口腔颌面部鳞癌研究报道较少。本研究测定 OSCC 与口腔非癌组织 Nav1.6 表达的差异, 结果显示, 在两组组织中 Nav1.6 均有表达, 且在 OSCC 组织中呈高表达, 这与向娟等<sup>[9]</sup>研究结果一致, 同时有学者还发现 Nav1.6 的表达量在高分化、中分化、低分化 OSCC 组织中的阳性表达率不同, 其与分化程度呈负相关性<sup>[9-10]</sup>。研究还显示 Nav1.6 的表达与患者的性别、年龄及肿瘤生长的部位等因素无关。本研究还发现抑制 Nav1.6 的表达可以抑制人舌鳞癌细胞 CAL-27 细胞的增殖, 提示 Nav1.6 可能与 OSCC 的发生及增殖关系密切。

细胞增殖调控机制的异常是肿瘤发生发展的重要原因。细胞增殖异常通常是由细胞周期紊乱引起的。许多研究证实, CyclinD1 和 C-myc 与细胞的增殖密切相关, 可以作为细胞增殖指标<sup>[11]</sup>。本研究显示, 敲低 Nav1.6 可以降低细胞周期蛋白 CyclinD1 和癌基因 C-myc 表达。为了进一步明确 Nav1.6 在 OSCC 细胞增殖中的作用, 使用流式细胞仪检测细胞周期, 发现敲低 Nav1.6 后 CAL-27 细胞中 S 期细胞比例降低, 细胞的有丝分裂受到抑制, 进而细胞增殖受到阻滞, 以上研究结果提示 Nav1.6 可能参与 OSCC 细胞增殖的调控, 进而参与 OSCC 的发生。

目前, 电压门控钠通道参与肿瘤细胞增殖的具体机制尚未明确, 有研究<sup>[12-14]</sup>表明电压门控钠通道可能是通过改变细胞对  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  的通透性以及细胞的电生理活动, 或直接、间接调节与癌细胞生长关系密切的信号通路, 进而改变细胞的各种功能, 如改变了细胞的增殖、分泌和动力功能, 这样的生理过程可能与更复杂的交互功能关系密切。Akt 信号通路在多种恶性肿瘤细胞增殖、侵袭、迁移、凋亡等生物学行为中起到重要作用, 其促进肿瘤细胞的恶性转变, 参与恶性肿瘤的发生<sup>[15]</sup>。本研究通过抑制 OSCC 细胞中 Nav1.6 的表达, 发现 p-Akt 蛋白表达降低, 提示 Nav1.6 可能通过 Akt 信号通路调控 OSCC 细胞的增殖。

## 参考文献

- [1] Sathiyasekar A C , Chandrasekar P , Pakash A et al. Overview of immunology of oral squamous cell carcinoma [J]. *J Pharm Bioallied Sci* ,2016 ,8( Suppl 1) : S8 - 12.
- [2] Prevarskaya N , Skryma R , Shuba Y. Ion channels in cancer: Are cancer hallmarks oncochannelopathies? [J]. *Physiol Rev* ,2018 , 98: 559 - 621.
- [3] Tuszynski J , Tilli T M , Levin M. Ion channel and neurotransmitter modulators as electroceutical approaches to the control of cancer [J]. *Curr Pharm Des* ,2017 ,23: 4827 - 41.
- [4] Farhan-Alanie O M , McMahon J , McMillan D C. Systemic inflammatory response and survival in patients undergoing curative resection of oral squamous cell carcinoma [J]. *Br J Oral Maxillofac Surg* ,2015 ,53(2) : 126 - 31.
- [5] Xia J , Huang N , Huang H , et al. Voltage-gated sodium channel Nav1.7 promotes gastric cancer progression through MACC1-mediated upregulation of NHE1 [J]. *Int J Cancer* ,2016 ,139(11) : 2553 - 69.
- [6] Nellson M , Yang M , Millican-Slater R , et al. Nav1.5 regulates breast tumor growth and metastatic dissemination *in vivo* [J]. *Oncotarget* ,2015 ,6(32) : 32914 - 29.
- [7] Lin S , Lv Y , Xu J , et al. Over-expression of Nav1.6 channels is associated with lymph node metastases in colorectal cancer [J]. *World J Surg Oncol* ,2019 ,17: 175.
- [8] BenAissa R , Othman H , Villard C et al. AaHIV a sodium channel scorpion toxin inhibits the proliferation of DU145 prostate cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun* ,2020 ,521: 340 - 6.
- [9] 向娟,蔡伯慧,王润,等. Nav1.6在口腔颌面部鳞状细胞癌组织中的表达[J]. *安徽医科大学学报*,2015,50(8):1157-60.
- [10] 蔡伯慧,祝心威,王润,等. Nav1.6在口腔黏膜白斑及口腔鳞癌中的表达[J]. *实用口腔医学杂志*,2016,32(5):670-3.
- [11] 王磊,陈鹤,张敏,等. MAST3对胃癌细胞SGC-7901细胞增殖及迁移的作用[J]. *安徽医科大学学报*,2020,55(4):523-8.
- [12] Diss J K , Fraser S P , Djamgoz M B. Voltage-gated Na<sup>+</sup> channels: multiplicity of expression, plasticity, functional implications and pathophysiological aspects [J]. *Eur Biophys J* ,2004 ,33(3) : 180 - 93.
- [13] Ou S W , Kameyama A , Hao L Y , et al. Tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> channels in human neuroblastoma cells are encoded by new variants of Nav1.5/SCN5A [J]. *Eur J Neurosci* ,2005 ,22(4) : 793 - 801.
- [14] Onganer P U , Djamgoz M B A. Small-cell lung cancer (human): potentiation of endocytic membrane activity by voltage-gated Na<sup>+</sup> channel expression *in vitro* [J]. *J Membr Biol* ,2005 ,204(2) : 67 - 75.
- [15] Zhang X , Huang L F , Hua L , et al. Resveratrol protects myocardial apoptosis induced by ischemia-reperfusion in rats with acute myocardial infarction *via* blocking P13K/Akt/e-NOS pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* ,2019 ,23(4) : 1789 - 96.

## Nav1.6-RNAi inhibits the proliferation of oral squamous cell carcinoma cells through the AKT pathway

Xu Le<sup>1</sup> , Hong Lili<sup>1</sup> , Liu Weijia<sup>2</sup> , et al

(<sup>1</sup>Dept of Stomatology , The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230041;

<sup>2</sup>Dept of Children's Stomatology , West District , Hefei Stomatological Hospital , Hefei 230001)

**Abstract Objective** To explore the biological effects of Nav1.6-RNAi on the proliferation of oral squamous cell carcinoma cell lines and analyze its possible regulatory mechanism. **Methods** Immunohistochemistry , Western blot and qRT-PCR were used to detect the expression of Nav1.6 in oral squamous cell carcinoma tissues. After Nav1.6-RNAi transfected into oral squamous cell carcinoma , Western blot was used to validate the expression of CyclinD1 , C-myc , AKT and p-AKT. Cell cycle was also detected by flow cytometry. **Results** Immunohistochemistry , Western blot and qRT-PCR showed that the expression of Nav1.6 in oral squamous cell carcinoma tissues was significantly higher than that in normal oral tissues ( $P < 0.05$ ). After Nav1.6-RNAi transfected into oral squamous cell carcinoma , the expression of CyclinD1 , C-myc and p-AKT protein significantly decreased compared with the control group ( $P < 0.05$ ) , and the cells in S phase significantly reduced. **Conclusion** Voltage-gated sodium channel Nav1.6 can affect the proliferation of oral squamous cell carcinoma through the AKT pathway.

**Key words** oral squamous cell carcinoma; Nav1.6; proliferation; CyclinD1; AKT pathway