

网络出版时间: 2021-11-25 8:27 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20211124.1046.012.html>

# sigma-1 受体对口腔鳞癌细胞增殖、迁移和侵袭影响的实验研究

张红丽<sup>1,2</sup>, 徐小立<sup>1</sup>, 戴永铮<sup>3</sup>, 应松成<sup>2</sup>, 蒋勇<sup>1,4</sup>

**摘要** 目的 探究 sigma-1 受体在口腔鳞状细胞癌(OSCC)组织和细胞系中的表达,并通过特异性 siRNA 转染降低 sigma-1 受体在 OSCC 细胞中的表达,检测对其生物学行为的影响,并初步分析其可能的机制。方法 免疫组化法检测人 OSCC 组织中 sigma-1 受体的表达。Western blot 和免疫荧光法检测人 OSCC 细胞系中 sigma-1 受体的表达。利用 GEPIA 数据库分析 sigma-1 受体表达水平与 OSCC 患者预后的相关性。通过转染特异性 siRNA 下调 sigma-1 受体表达, CCK-8 和 Transwell 迁移侵袭实验检测转染后 OSCC 细胞的增殖、迁移和侵袭。qRT-PCR 和 Western blot 检测转染后电压门控钠离子通道亚型 Nav1.5 在 OSCC 细胞中的表达水平。结果

免疫组化分析结果显示 sigma-1 受体在 OSCC 组织中较正常组织为高表达。Western blot 检测结果显示, sigma-1 受体在 4 种 OSCC 细胞系中均有表达。GEPIA 数据库分析结果显示, sigma-1 受体的表达水平与 OSCC 患者的总体生存率呈负相关。通过细胞免疫荧光实验结果显示 sigma-1 受体在 CAL-27 细胞中主要定位在质膜上。CCK-8 分析结果显示 sigma-1 受体通过 siRNA 下调表达后降低了 CAL-27 细胞的增殖。Transwell 分析结果显示降低 sigma-1 受体表达可显著抑制 CAL-27 细胞的迁移和侵袭。此外,下调 sigma-1 受体表达后 Nav1.5 的表达水平被抑制。结论 sigma-1 受体参与 OSCC 的发生发展,促进了 OSCC 细胞的增殖、迁移和侵袭,并可能通过调节 Nav1.5 离子通道参与 OSCC 的进展。

**关键词** 口腔鳞状细胞癌; sigma-1 受体; 电压门控钠离子通道; Nav1.5

中图分类号 R 739.85

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)12-1908-07  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.12.012

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)患者占有口腔恶性肿瘤的 90% 以上,且容

易复发和转移。早期患者的 5 年生存率约为 55% ~ 60%,晚期患者的 5 年生存率仅为 30% ~ 40%<sup>[1]</sup>。探索并识别新的诊断和治疗分子,从而实现 OSCC 的早发现及早治疗,改善预后,仍然是当前 OSCC 研究的主要任务。研究<sup>[2]</sup>表明 sigma-1 受体是一种具有伴侣活性的非阿片类独立受体,包括 sigma-1 受体和 sigma-2 受体 2 种亚型。sigma-1 受体(简称 Sig1R,又称  $\sigma 1$  受体)分子量约 26 ku,含 223 个氨基酸,其基因定位和蛋白结构较 sigma-2 受体更清晰,具有更广泛的特征<sup>[3]</sup>。研究表明 sigma-1 受体在结直肠癌<sup>[4]</sup>、前列腺癌<sup>[5]</sup>、宫颈癌<sup>[6]</sup>和乳腺癌<sup>[7-8]</sup>等中呈高表达,并参与癌细胞的发生发展。研究<sup>[9]</sup>表明, sigma-1 受体的表达与乳腺癌患者的总生存率降低相关,且 sigma-1 受体在细胞水平上增强细胞增殖和迁移。在乳腺癌中的研究<sup>[9]</sup>表明, sigma-1 受体的表达增加了电压门控钠离子通道亚型 Nav1.5 的电流密度,提示 sigma-1 受体可能通过增加 Nav1.5 活性进而增强细胞侵袭。该研究拟检测 sigma-1 受体在 OSCC 组织和细胞中的表达水平,探讨 sigma-1 受体在 OSCC 细胞增殖、迁移和侵袭中的作用及 sigma-1 受体与 Nav1.5 之间可能的相互作用,为 OSCC 的治疗提供新的诊断和治疗靶点。

## 1 材料与方法

**1.1 主要材料** DMEM 高糖培养基、PBS 购自美国 Hyclone 公司;胎牛血清(FBS)购自乌拉圭 ExCell 公司;胰酶细胞消化液、RIPA 裂解液、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物、蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 配胶试剂盒、0.5% Triton X-100、DAPI、DAB、CCK-8 试剂盒、结晶紫均购自上海碧云天生物技术有限公司; sigma-1 受体和 Nav1.5 多克隆抗体购自美国 Affinity 公司; IgG 标记的山羊抗鼠、抗兔二级抗体购自北京中杉金桥公司; FITC 标记的荧光二抗购自成都正能生物公司; PVDF 膜购自美国 Millipore 公司; TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)试剂盒购自南京诺唯赞公司; Lipofectamine™ 2000 购自美国 Thermo Fisher 公司; Matrigel 胶、Transwell 小室购自美国 Corning

2021-09-27 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1508085MH187)

作者单位: <sup>1</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

<sup>2</sup> 安徽医科大学基础医学院免疫学教研室,合肥 230032

<sup>3</sup> 合肥市口腔医院综合科,合肥 230001

<sup>4</sup> 安徽医科大学第四附属医院口腔科,合肥 230000

作者简介: 张红丽,女,硕士研究生;

蒋勇,男,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: j6263@163.com

公司; 人 OSCC 细胞系 (SCC-4、HSC-3、CAL-27 和 SCC-9) 由南京大学医学院附属口腔医院中心实验室赠送; 人 OSCC 组织及邻近正常组织取自安徽医科大学第一附属医院口腔科。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** OSCC 细胞系 SCC-4、HSC-3、CAL-27 和 SCC-9 在添加了 10% 胎牛血清和 1% 青霉素链霉素混合液的高糖型 DMEM 培养基的细胞培养瓶中, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。每隔 2 d 换 1 次培养基, 细胞长至 90% 左右用胰酶细胞消化液消化传代。

**1.2.2 免疫组织化学检测** 为了防止破坏组织抗原性, 石蜡包埋的组织切片被放置在 60 °C 恒温箱中烘烤 2 h, 然后用二甲苯和乙醇进行脱蜡和水化。用 3% 过氧化氢室温孵育 10 min, 以消除内源性过氧化物酶的活性。蒸馏水冲洗后将切片放入装有磷酸盐缓冲液 (PBS) 的容器中, 并在微波炉中加热 15 min 以促进抗原修复。将冷却后的切片用山羊血清封闭 15 min, 然后加入抗 sigma-1 受体的一抗 (1:200) 后 4 °C 孵育过夜。将切片与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二级抗体 (1:1 000) 室温孵育 90 min, 并用 DAB 显色, 苏木精复染。最后用中性树脂封片后观察切片, 并使用 Image J 软件进行分析。

**1.2.3 细胞免疫荧光实验** 将长好细胞的爬片用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 然后在室温下用 0.5% Triton X-100 室温通透 20 min。随后, 在 PBS 浸洗后的爬片上滴加正常山羊血清封闭细胞 30 min。加入稀释好的抗 sigma-1 受体的一抗 (1:200), 并在 4 °C 孵育过夜, 第二天加入 FITC 标记的荧光二抗 (1:200) 在湿盒中 37 °C 避光孵育 2 h。然后用 DAPI 对细胞核染色 5 min 后, 用含抗荧光淬灭剂的封片液封片, 随后在激光共聚焦显微镜下观察。

**1.2.4 Western blot 实验** 细胞用 RIPA 裂解液处理以获得总蛋白裂解物, 蛋白质浓度用 BCA 蛋白质测定试剂盒测定, 随后按比例加入蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物后 -20 °C 保存。样品用 10% (sigma-1 受体) 或 6% (Nav1.5) 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝胶电泳分离, 并转移到 PVDF 膜上, 然后用 5% 奶粉室温封闭 2 h。将膜与稀释好的一抗在 4 °C 孵育过夜, 随后用相应的山羊抗兔或抗鼠 IgG 二抗孵育 90 min。最后, 通过化学发光成像系统曝光, 蛋白质印迹条带通过密度分析定量。

**1.2.5 qRT-PCR 实验** 按照制造商的说明, 用 TRIzol 试剂从 OSCC 细胞中提取总 RNA。然后用引物

逆转录试剂盒进行基因合成, 将 RNA 逆转录为 cDNA。定量聚合酶链反应在 20 μl 的反应体积中进行扩增, 每组 3 个复孔。反应条件如下: 95 °C、5 min; 95 °C、10 s、60 °C、30 s, 扩增 40 个循环。所有引物均由上海生物工程公司进行设计合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列 (5'-3')
sigma-1	F: 5'-CTGTCGAGTATGTGCTGCTCTTC-3' R: 5'-GGTGCCCTCTCTCCACTGGTG-3'
Nav1.5	F: 5'-CAGCTGCTTCGAGACATTCA-3' R: 5'-TTGTCGGCATACTCAAGCAG-3'
β-actin	F: 5'-GGCACCACACCTTCTACAATGAGC-3' R: 5'-GATAGCAGACGCTGGATAGCAACG-3'

**1.2.6 siRNA 转染** 根据制造商的说明, 使用 Lipofectamine™ 2000 用 Sig1R-siRNA 或阴性对照的 siRNA-NC 转染 CAL-27 细胞。转染 6 h 后, 用添加 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基代替无血清基础培养基, 然后在转染后 24 h 或 48 h 收集细胞进行下一步实验。所有 siRNAs 均由上海吉玛制药有限公司合成。相关 siRNA 序列见表 2。

表 2 siRNA 序列

基因	引物序列 (5'-3')
Sig1R-siRNA1	F: 5'-GCAGUGGGUGUUCGUGAAUTT-3' R: 5'-AUUCACGAACACCCACUGCTT-3'
Sig1R-siRNA2	F: 5'-CCAUAUCUCUGGCACCUUTT-3' R: 5'-AAGGUGCCAGAGAUGAUGGTT-3'
Sig1R-siRNA3	F: 5'-GCUCACCACCUACCUCUUUTT-3' R: 5'-AAAGAGGUAGGUGGAGCTT-3'
siRNA-NC	F: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3' R: 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'

**1.2.7 CCK-8 检测细胞增殖** 根据制造商的说明, 使用 CCK-8 试剂盒测定细胞增殖情况。对照组和经 siRNA 转染后的 CAL-27 细胞重新接种在 96 孔板中 (每组设 5 个复孔) 并培养至 24、48、72 h。在指定的时间加入 CCK-8 溶液 (10 μl / 孔) 后 37 °C 培养 2 h, 显色反应后, 用酶标仪测定 450 nm 处吸光度值 (optical density, OD)。

**1.2.8 Transwell 实验** Transwell 细胞迁移实验是将各组细胞血清饥饿过夜, 用无血清 DMEM 培养基重悬细胞后取 200 μl 接种到 Transwell 小室的上室中, 然后在下室中加入 600 μl 含有 20% FBS 作为化学引诱剂的 DMEM 培养基。在 37 °C 孵育 24 h 后 (侵袭 48 h), 用棉签轻轻擦去上室中剩余的细胞,

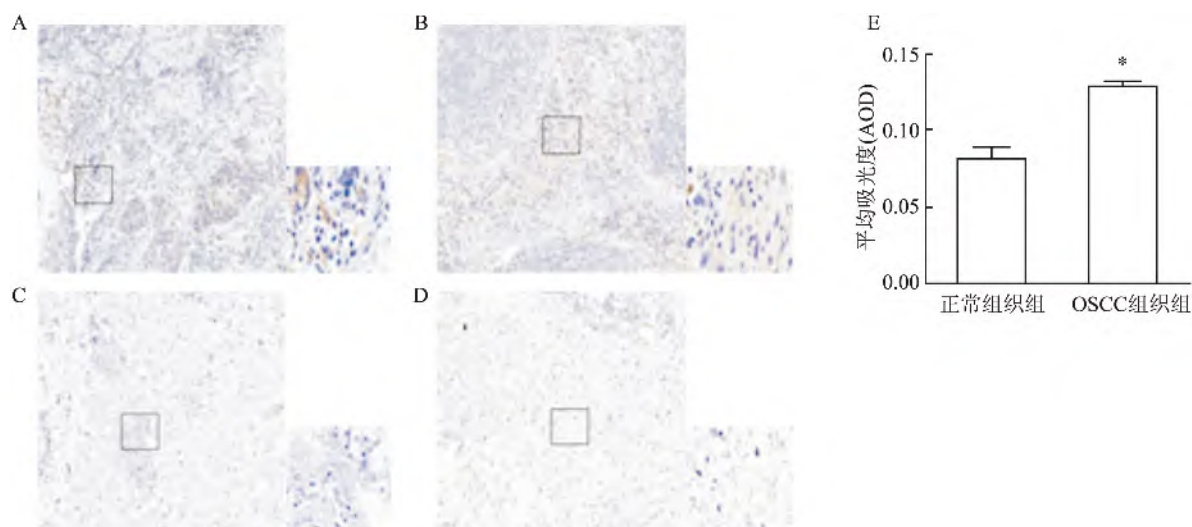


图1 免疫组化法检测 sigma-1 受体的表达

A、B: OSCC 组织; C、D: 邻近正常组织; 左:  $\times 20$ , 右:  $\times 40$ ; E: sigma-1 受体的表达量以平均吸光度 (AOD) 表示; 与正常组织组比较: \*  $P < 0.05$

然后将黏附在过滤器下表面的细胞用 4% 多聚甲醛固定 20 min, 并用结晶紫染色 30 min。在倒置显微镜下观察被侵入或迁移的细胞图像, 并进行拍照和计数。Transwell 侵袭实验除需要在细胞接种前在上室中预先涂好基质凝胶外, 其余方法与迁移实验一致。

**1.3 统计学处理** 采用 GraphPad Prism 和 SPSS 20.0 进行绘图和统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 数据采用  $t$  检验和方差分析进行差异比较, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 sigma-1 受体在人 OSCC 组织中的表达情况

免疫组化检测临床收集的 OSCC 组织及邻近正常组织中 sigma-1 受体的表达。结果显示 OSCC 组织中可见明显的棕黄色染色, 表明 sigma-1 受体呈阳性表达; 相反, 在正常组织中几乎看不到棕黄染色, 见图 1。结果表明, 与正常组织比较, sigma-1 受体在 OSCC 中呈高表达 ( $P < 0.05$ )。

**2.2 sigma-1 受体的表达水平与 OSCC 患者预后的相关性** 利用 GEPIA 数据库分析 sigma-1 受体表达水平与 OSCC 患者预后的相关性。结果表明, sigma-1 受体的表达水平与 OSCC 患者的总体生存率呈负相关, 即 sigma-1 受体表达水平高的患者的总体生存率低于表达水平较低者, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 2。提示 sigma-1 受体的高表达可能影响 OSCC 患者的生存和预后。

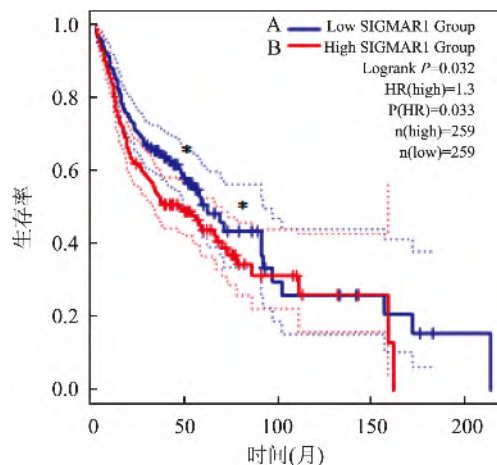


图2 sigma-1 受体表达水平与 OSCC 患者总生存率的相关性

A: sigma-1 受体低表达组; B: sigma-1 受体高表达组; 与高表达组比较: \*  $P < 0.05$

**2.3 sigma-1 受体在 OSCC 细胞系中的表达情况及定位** Western blot 检测了 sigma-1 受体在 4 种 OSCC 细胞系中的表达水平, 包括 SCC-4、HSC-3、CAL-27 和 SCC-9。结果表明 sigma-1 受体在 4 种人 OSCC 细胞系中均有表达, 且在 CAL-27 细胞中 sigma-1 受体的表达水平高于其他细胞, 见图 3A, 因此, 选择 CAL-27 细胞用于之后的研究。此外, 还通过细胞免疫荧光分析检测 sigma-1 受体在 OSCC 细胞中的表达定位, 激光共聚焦结果显示 sigma-1 受体在 CAL-27 细胞中主要表达在质膜上, 见图 3B。

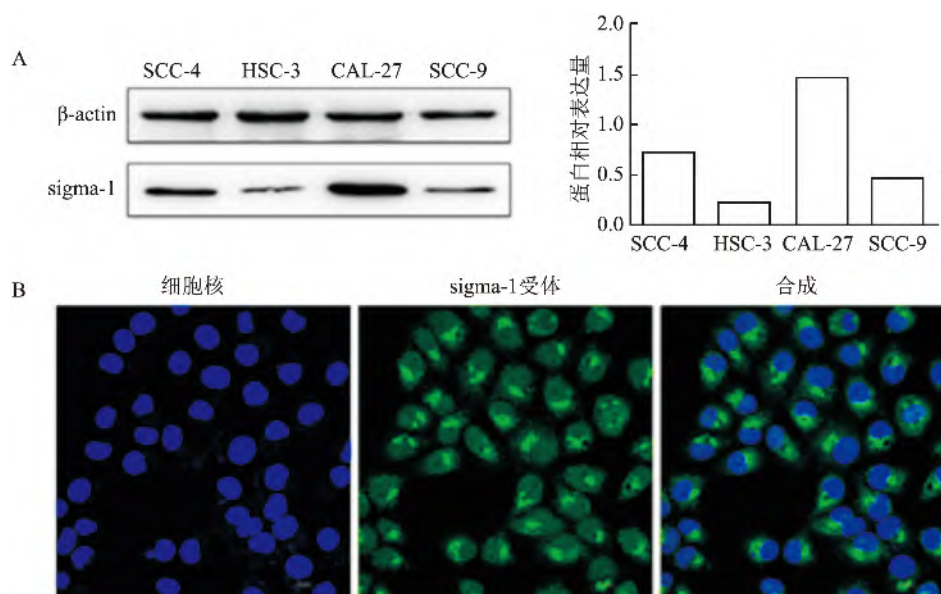


图3 sigma-1受体在OSCC细胞中的表达及定位

A: Western blot 检测 sigma-1 受体在 4 种 OSCC 细胞系中的表达水平; B: 免疫荧光法检测 CAL-27 细胞中 sigma-1 受体的定位表达  $\times 40$

**2.4 Sig1R-siRNA 对 CAL-27 细胞中 sigma-1 受体表达水平的抑制作用** 为了检测 Sig1R-siRNA 在 CAL-27 细胞中的沉默效果,分别通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测了 sigma-1 受体在 Control 组、siRNA-NC 组以及 3 种 Sig1R-siRNA 中的 mRNA 和蛋白质表达水平。与 Control 组比较, Sig1R-siRNA 1 组、Sig1R-siRNA 2 组和 Sig1R-siRNA 3 组 sigma-1 受体的 mRNA 表达均明显下调。sigma-1 受体的蛋白表达水平仅被 Sig1R-siRNA 2 和 Sig1R-siRNA 3 有效下调,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与之相反, Control 组和 siRNA-NC 组之间差异无统计学意义,见图 4。这些数据表明 Sig1R-siRNA 能有效地抑制 CAL-27 细胞中 sigma-1 受体的表达水平,接下来的实验均采用 Sig1R-siRNA 3 转染。

**2.5 下调 sigma-1 受体表达对 CAL-27 细胞增殖、迁移和侵袭的影响** 通过 CCK-8 和 Transwell 分析探究了 sigma-1 受体在 OSCC 细胞 CAL-27 发展中的作用。分别在转染 24、48、72 h 后检测细胞 OD<sub>450</sub> 值, CCK-8 测定结果显示,与 Control 组和 NC 组相比,转染 24 h 后, Sig1R-siRNA3 组的细胞增殖能力显著降低 ( $F = 3.04$ ,  $P < 0.05$ )。见图 5A。通过 Transwell 试验检测了下调 sigma-1 受体表达对 CAL-27 细胞迁移和侵袭能力的影响。与 Control 组和 NC 组比较, Sig1R-siRNA3 组明显抑制 CAL-27 细胞的迁移和侵袭 ( $F = 0.145$ ,  $0.009$ ,  $P < 0.01$ )。Control 组和 siRNA-NC 组之间差异无统计学意义,见图

5B、C。研究证明下调 sigma-1 受体可以显著抑制 CAL-27 细胞的增殖、迁移和侵袭。

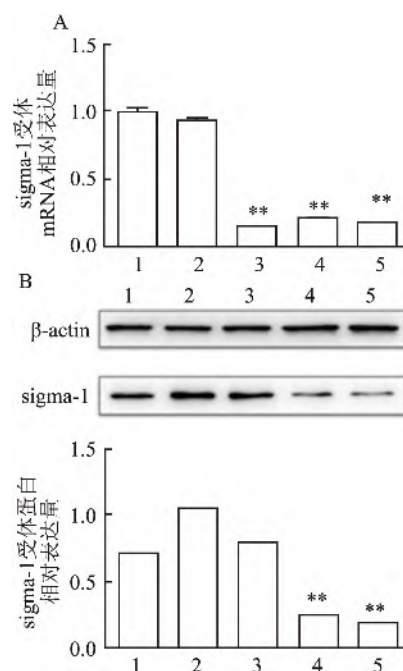


图4 经 siRNA 转染后 sigma-1 受体的表达水平

A: qRT-PCR 检测转染后各组 sigma-1 受体 mRNA 相对表达水平; B: Western blot 检测转染后各组 sigma-1 受体蛋白质相对表达水平; 1: Control 组; 2: siRNA-NC 组; 3: Sig1R-siRNA 1 组; 4: Sig1R-siRNA 2 组; 5: Sig1R-siRNA 3 组; 与 Control 组比较: \*\*  $P < 0.01$

**2.6 沉默 sigma-1 受体表达对 CAL-27 细胞中 Nav1.5 表达的影响** 分别采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测了转染 Sig1R-siRNA 3 后 CAL-27 细胞



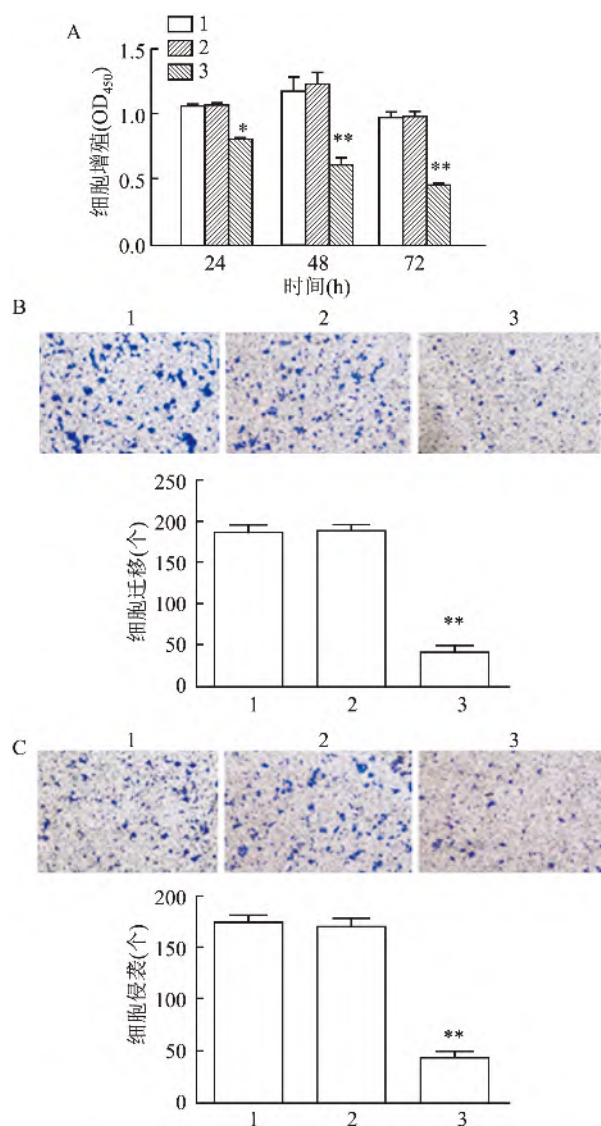


图5 经 siRNA 转染后对 CAL-27 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

A: CCK-8 检测转染 24、48、72 h 后 CAL-27 细胞 OD<sub>450</sub> 值; B、C: Transwell 实验检测转染后对 CAL-27 细胞迁移和侵袭能力的影响 × 200; 1: Control 组; 2: siRNA-NC 组; 3: Sig1R-siRNA 3 组; 与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

中 Nav1.5 的 mRNA 和蛋白质表达水平。结果表明,与 Control 组和 NC 组相比, Sig1R-siRNA 3 组沉默 sigma-1 受体表达后细胞内 Nav1.5 的 mRNA 和蛋白质表达水平也明显降低 ( $F = 1.28$ ,  $P < 0.05$ )。见图 6。结果表明 sigma-1 受体可能通过与 Nav1.5 的相互作用从而影响 OSCC 生物学行为的改变。

### 3 讨论

sigma 受体最初被误认为是阿片受体亚型,随后研究表明其是一种独特的药理学调控的伴侣或支架蛋白,独立于任何其他已知的受体。sigma-1 受体最初主要在中枢神经系统进行研究,临床研究<sup>[10]</sup>表明

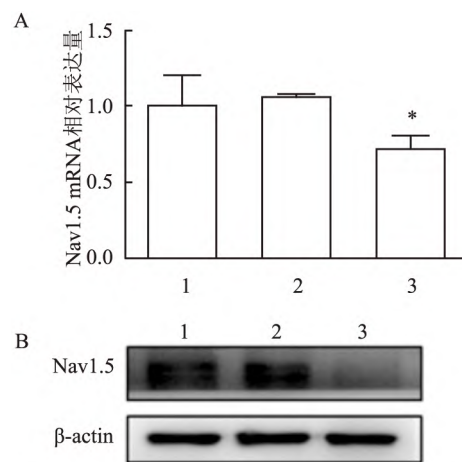


图6 沉默 sigma-1 受体表达后 CAL-27 细胞内 Nav1.5 的表达水平

A: qRT-PCR 检测沉默 sigma-1 受体后 Nav1.5 的 mRNA 表达水平; B: Western blot 检测沉默 sigma-1 受体后 Nav1.5 的蛋白质表达水平; 1: Control 组; 2: siRNA-NC 组; 3: Sig1R-siRNA3 组; 与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$

sigma-1 受体与许多疾病相关,如抑郁症、神经退行性疾病和药物成瘾等。研究<sup>[11]</sup>表明, sigma-1 受体在肺癌、乳腺癌、前列腺癌和恶性黑色素瘤等多种人类癌细胞和组织中表达上调, sigma-1 受体通过介导脂质筏重构影响乳腺癌细胞系的黏附和增殖。研究<sup>[12]</sup>表明, siRNA 沉默 sigma-1 受体以及 sigma-1 受体配体药物可以抑制乳腺癌、结肠癌和前列腺癌细胞的增殖和迁移。因此, sigma-1 受体作为癌症潜在的新治疗靶点和预后标志物,具有重要的研究价值。该研究表明 sigma-1 受体在 OSCC 组织和细胞系中高表达,通过转染 siRNA 下调 sigma-1 受体表达显著抑制了 OSCC 细胞的增殖、迁移和侵袭行为,表明 sigma-1 受体可作为 OSCC 治疗靶点和预后生物标志物的可能性,为 OSCC 的治疗提供了新的方向。

研究<sup>[13]</sup>表明 Nav1.5 参与 OSCC 的发生发展,在乳腺癌中的研究<sup>[14]</sup>表明 sigma-1 受体通过与 Nav1.5 通道的功能性相互作用增加了乳腺癌细胞的侵袭和黏附能力,在乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 中 sigma-1 受体以 4 倍对称性结合 Nav1.5 通道,增加 Nav1.5 电流密度,使细胞侵袭能力增强。在 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞中, sigma-1 受体通过与幼稚型 Nav1.5 通道的功能作用增加了细胞对底物的黏附<sup>[7]</sup>。电压门控钠离子通道 (VGSCs) 已被证明在多种癌症组织和细胞中异常表达,并与肿瘤的恶性表型和侵袭转移明确相关。课题组前期研究<sup>[13]</sup>表明,低分化 OSCC 组织中 Nav1.5 的表达水平高于高分化 OSCC 组织,其表达水平与 NLR、

PLR、TNM 分期及淋巴结转移密切相关,通过转染特异性 siRNA 沉默 Nav1.5 基因可显著抑制 OSCC 细胞的生物学行为<sup>[15]</sup>。该研究表明转染 Sig1R-siRNA 沉默 sigma-1 受体表达后,CAL-27 细胞中 Nav1.5 的表达水平也随之降低。因此,研究 OSCC 中 sigma-1 受体与 Nav1.5 可能的相互作用机制及其配体药物对癌细胞功能的影响具有重要意义和价值。该研究通过细胞免疫荧光实验表明 sigma-1 受体可以分布在整个细胞质中,在靠近核周区有聚集分布,可能是在线粒体相关的内质网膜上,这与之前文献中的研究结果是一致的。综上所述,该研究表明 sigma-1 受体参与 OSCC 的发生发展,并为 OSCC 的诊断和治疗提供了新的思路。

### 参考文献

- [1] Hema K N, Smitha T, Sheethal H S, et al. Epigenetics in oral squamous cell carcinoma[J]. J Oral Maxillofac Pathol, 2017, 21(2): 252-9.
- [2] Kim F J. Introduction to sigma proteins: evolution of the concept of sigma receptors[J]. Handb Exp Pharmacol, 2017, 244: 1-11.
- [3] Crottès D, Guizouarn H, Martin P, et al. The sigma-1 receptor: a regulator of cancer cell electrical plasticity[J]. Front Physiol, 2013, 4: 175.
- [4] Skrzycki M, Czczot H. Altered expression level of sigma-1 receptor gene in human colorectal cancer[J]. J Recept Signal Transduct Res, 2013, 33(5): 313-8.
- [5] Vilner B J, John C S, Bowen W D. sigma-1 and sigma-2 receptors are expressed in a wide variety of human and rodent tumor cell lines[J]. Cancer Res, 1995, 55(2): 408-13.
- [6] 邓亚勤,周新欢,姜季乐,等.  $\sigma_1$  受体在子宫颈癌组织中高表达的意义及其配体化合物对子宫颈癌细胞生长的作用[J]. 中华妇产科杂志, 2017, 52(7): 473-82.
- [7] Aydar E, Stratton D, Fraser S P, et al. sigma-1 receptors modulate neonatal Nav 1.5 ion channels in breast cancer cell lines[J]. Eur Biophys J, 2016, 45(7): 671-83.
- [8] Wang B, Rouzier R, Albarracín C T, et al. Expression of sigma-1 receptor in human breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2004, 87(3): 205-14.
- [9] Aydar E, Onganer P, Perrett R, et al. The expression and functional characterization of sigma-1 receptors in breast cancer cell lines[J]. Cancer Lett, 2006, 242(2): 245-57.
- [10] Brimson J M, Akula K K, Abbas H, et al. Simple ammonium salts acting on sigma-1 receptors yield potential treatments for cancer and depression[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 9251.
- [11] Palmer C P, Mahen R, Schnell E, et al. sigma-1 receptors bind cholesterol and remodel lipid rafts in breast cancer cell lines[J]. Cancer Res, 2007, 67(23): 11166-75.
- [12] Kim F J, Schrock J M, Spino C M, et al. Inhibition of tumor cell growth by sigma-1 ligand mediated translational repression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 426(2): 177-82.
- [13] 刘玮佳,许乐,祝心威,等. 电压门控钠离子通道亚型 Nav1.5 的表达在口腔鳞癌细胞侵袭和转移中作用的初步探究[J]. 中华口腔医学杂志, 2017, 52(3): 188-93.
- [14] Simony-Lafontaine J, Esslimani M, Bribes E, et al. Immunocytochemical assessment of sigma-1 receptor and human sterol isomerase in breast cancer and their relationship with a series of prognostic factors[J]. Br J Cancer, 2000, 82(12): 1958-66.
- [15] 戴永铮,钱成炜,徐小立,等. 体外 siRNA-Nav1.5 干扰口腔鳞癌 HSC-3 细胞生物学行为研究[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(8): 1227-32.

## Experimental study on the effect of sigma-1 receptor on proliferation, migration and invasion of oral squamous cell carcinoma

Zhang Hongli<sup>1,2</sup>, Xu Xiaoli<sup>1</sup>, Dai Yongzheng<sup>3</sup>, et al

(<sup>1</sup> Stomatological College of Anhui Medical University, The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Key Laboratory of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032;

<sup>2</sup> Dept of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032;

<sup>3</sup> Dept of General Dentistry, Hefei Stomatological Hospital, Hefei 230001)

**Abstract Objective** To investigate the expression of sigma-1 receptor in oral squamous cell carcinoma (OSCC) tissues and cell lines, reduce the expression of sigma-1 receptor in OSCC cells by transfection with specific siRNA, detect the effect on their biological behavior, and preliminarily analyze the possible mechanism. **Methods** The expression of sigma-1 receptor in human OSCC tissues were detected by immunohistochemistry. Western blot and immunofluorescence were used to detect the expression of sigma-1 receptor in human OSCC cell lines. GEPIA database was used to analyze the correlation between sigma-1 receptor expression level and prognosis of patients with (下转第 1919 页)

## Deacetylase SIRT6 promotes proliferation and migration of renal cancer cells by activating PI3K-AKT pathway

Li Tianyu<sup>1</sup>, Wang Xin<sup>2</sup>, Zhang Sen<sup>1</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Nephrology, <sup>2</sup>Dept of Urology, The Second Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

**Abstract Objective** To investigate the effect of SIRT6 on the proliferation and migration of renal cancer cell lines ACHN and 786-O. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expression of SIRT6 in renal cell carcinoma and adjacent tissues; Western blot was used to detect the expression levels of kidney cancer cell line SIRT6 and related downstream signaling pathway molecules; SIRT6-siRNA transfection and SIRT6 specific inhibitor OSS\_128167 were used to treat ACHN cells, Scratch test and Tetramethylazazole blue test were used to observe the proliferation and migration ability of treated ACHN cells, and Western blot was used to detect changes in downstream related signal pathways. **Results** The results of immunohistochemistry and Western blot showed that the expression of SIRT6 in renal cancer tissues was significantly higher than that in adjacent tissues. Compared with normal renal tubular epithelial cells HK-2, the expression of SIRT6 in renal cancer cell line ACHN significantly increased. After transfection of ACHN with SIRT6-siRNA, the expression of SIRT6 was significantly reduced. Scratch test and MTT showed that the proliferation and migration ability of ACHN cells was reduced. After OSS\_128167 treatment of renal cancer cell lines, the deacetylation activity of SIRT6 decreased, and the cell proliferation ability decreased. **Conclusion** The SIRT6 deacetylase can inhibit the proliferation and migration of renal cancer cells by down-regulating the PI3K-AKT pathway, and may become a potential new target for drug therapy.

**Key words** SIRT6; renal carcinoma cell; ACHN; 786-O; OSS\_128167; migration; proliferation

(上接第 1913 页)

OSCC. The expression of sigma-1 receptor was down-regulated by transfection of specific siRNA. Then the proliferation, migration and invasion of OSCC cells after transfection were detected by CCK-8 and Transwell assay, and the expression level of voltage-gated sodium ion channels subtype Nav1.5 in OSCC cells was detected by qRT-PCR and Western blot. **Results** Immunohistochemical analysis showed that the expression of sigma-1 receptor was higher in OSCC tissues than that in normal tissues. Western blot revealed that the sigma-1 receptor was expressed in all four OSCC cell lines. The results of GEPIA database analysis showed that the expression level of sigma-1 receptor was negatively correlated with the overall survival rate of patients with OSCC. Immunocytochemistry and confocal microscopy showed that the sigma-1 receptor was mainly localized in the plasma membrane in CAL-27 cells. CCK-8 analysis showed that the down-regulated expression of sigma-1 receptor reduced the proliferation of CAL-27 cells through its specific siRNA. Transwell analysis showed that the reduced expression of sigma-1 receptor significantly inhibited the migration and invasion of CAL-27 cells. In addition, down-regulation of sigma-1 receptor expression was found to inhibit the protein and mRNA expression levels of Nav1.5. **Conclusion** sigma-1 receptor participates in the occurrence and development of OSCC, promotes the proliferation, migration and invasion of OSCC cells, and may be involved in the progression of OSCC by regulating the Nav1.5.

**Key words** oral squamous cell carcinoma; sigma-1 receptor; voltage-gated sodium ion channels; Nav1.5