

网络出版时间: 2021-7-28 11:35 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210728.1014.013.html>

沉默环状 RNA PIP5K1A 通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路来降低口腔鳞癌细胞生长与转移

王天雪¹ 孙强² 李佳¹

摘要 目的 研究环状 RNA PIP5K1A (circPIP5K1A) 对口腔鳞癌 (OSCC) 细胞生长和转移的影响及可能的作用机制。方法 用 RT-qPCR 法检测 OSCC 组织和细胞中 circPIP5K1A 的表达情况。将 si-circPIP5K1A 转入 OSCC 细胞后, CCK-8 法检测细胞活力, 集落形成实验检测细胞集落形成能力, Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞术法检测细胞凋亡, Transwell 法检测细胞迁移与侵袭, Western blot 法检测 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白的表达。Wnt/ β -catenin 信号通路激动剂 LiCl 处理已转染 si-circPIP5K1A 的 OSCC 细胞后, 分别检测细胞活力、集落形成能力、凋亡、迁移与侵袭。结果 circPIP5K1A 在 OSCC 组织和细胞中上调表达 ($P < 0.05$)。沉默 circPIP5K1A 后, OSCC 细胞的细胞活力、集落形成、迁移与侵袭的能力均降低 ($P < 0.05$), 细胞凋亡增加 ($P < 0.05$), Wnt1 和 β -catenin 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。LiCl 能抑制沉默 circPIP5K1A 对 OSCC 细胞的生长与转移的抑制作用 ($P < 0.05$)。结论 沉默 circPIP5K1A 能通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路来发挥抑制 OSCC 细胞的生长与转移的作用。

关键词 环状 RNA PIP5K1A; 口腔鳞癌; Wnt/ β -catenin 信号通路

中图分类号 R 739.85

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)08-1251-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.08.016

口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 是占 90% 以上比例的口腔癌的病理亚型, 是第六位常见的恶性肿瘤^[1]。近些年, 尽管在 OSCC 治疗 (包括手术、化疗和放射治疗) 和分子机制研究方面均取得了重要进展, 但 OSCC 具体的发病和进展机制至今仍不完全明晰, OSCC 的复发和转移率很高, 患者 5 年生存率相对较差^[2]。对影响 OSCC 进展的关键分子靶点的鉴定和筛选将为制定 OSCC 诊断和治疗的新策略提供参考依据。

环状 RNAs (circular RNAs, circRNAs) 是通过将

3' 端连接到 RNA 的 5' 端而形成圆环结构的一类独特的内源性非编码 RNA, 不仅具有高度稳定的生物学特点, 还在调节肿瘤细胞增殖、凋亡和自噬等多种病理生理过程中发挥着重要作用^[3-4]。环状 RNA PIP5K1A (circRNA PIP5K1A, circPIP5K1A) 已被发现在胃癌、非小细胞肺癌、结肠癌和卵巢癌中上调表达并发挥促癌作用^[5-8], 而其在 OSCC 中的表达和作用并不清楚, 该研究观察 circPIP5K1A 在 OSCC 组织和细胞系中的表达与作用, 并分析其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂与仪器 胎牛血清、DMEM 培养基、Lipofectamine 3000 和 TRIzol 试剂 (美国 Invitrogen 公司); RNase R 试剂 (美国 Epicentre 公司); CCK-8 试剂盒、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒、cDNA 第一链合成 (M-MLV) 试剂盒和 RT-qPCR 检测试剂盒 (南京凯基生物公司); 抗 β -catenin 和 Wnt1 抗体 (美国 Santa Cruz 公司); 抗 GAPDH 抗体和 HRP 标记的二抗 (上海碧云天生物公司)。LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 系统 (瑞士 Roche 公司); 318C + 酶标仪 (上海沛欧分析仪器有限公司); BX53MRF-S 显微镜 (日本 Olympus 公司); FACSCanto II 流式细胞仪 (美国 BD 公司); 蛋白垂直电泳电转系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.1.2 临床样本获取 样本来源于郑州大学第一附属医院口腔颌面外科行肿瘤切除术的 20 例 T1-T3 期 OSCC 患者, 并收集癌组织和癌旁组织样本。所有患者均首次确诊, 未进行过放化疗, 且所有患者对本研究均知情同意, 本研究经伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 口腔角质细胞 (human oral keratinocytes, HOK) 以及 OSCC 细胞株 SCC15 和 CAL27 购自美国 ATCC。细胞接种在添加 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养基中, 并置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 转染 circPIP5K1A 的 2 种小干扰 RNA [siR

2021-05-11 接收

基金项目: 河南省卫健委课题资助项目 (编号: 2018048)

作者单位: ¹ 开封大学医学部口腔医学科, 开封 475000

² 郑州大学第一附属医院口腔颌面外科, 郑州 450052

作者简介: 王天雪, 女, 主治医师, 讲师, 责任作者, E-mail: wangtianxue5241@tom.com

#1(5'-UUCUUCUAAGGGAUUGGAGUU-3')和 siR#2(5'-UAAGGGAUUGGAGUUGGUCUU-3')以及阴性对照 si-NC(5'-AAUUCUCCGAACGUGUCACGU-3')由上海吉玛基因公司合成。根据说明书步骤,用 Lipofectamine 3000 将 siR#1、siR#2 和 si-NC 分别转染至 SCC15 和 CAL27 细胞。48 h 后,收集细胞,用 RT-qPCR 检测转染效率,并筛选最有效的 siR 作为候选 si-circPIP5K1A 用于后续实验。

1.2.3 RNase R 处理与 RT-qPCR 用 TRIzol 试剂从 OSCC 组织、癌旁组织以及细胞中提取总 RNA。取 OSCC 组织来源的 RNA,在 37℃ 条件下,用或不用 2 U/ μ g 剂量的 RNase R 处理 15 min,用于鉴定 circPIP5K1A 环形结构。分别取上述所有样本的 RNA 通过 cDNA 第一链合成(M-MLV)试剂盒逆转录为 cDNA。然后根据说明书,将 cDNA、目的基因的引物以及 Maxima SYBR Green qPCR Master Mix 试剂在实时 PCR 系统上进行 RT-qPCR 反应。所用的引物: circPIP5K1A-F: 5'-AGATTCCTAACCTCAAC CAGA-3', circPIP5K1A-R: 5'-CGAATGTTCTTGCC ACCTGC-3'; PIP5K1A-F: 5'-CCTCATGCAAGATTTC TACGTGG-3', PIP5K1A-R: 5'-GGCCGGATACCAAA TAGCTCC-3'; GAPDH-F: 5'-GAAGGTGAAGGTCCG AGTC-3', GAPDH-R: 5'-GAAGATGGTGATGGGAT TTC-3'; U6-F: 5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3', U6-R: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。PCR 设置程序为: 94℃ 预热 5 min; 35 个循环(94℃ 变性 30 s, 54℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min); 72℃、10 min。反应结束后,分别以 U6 和 GAPDH 为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法量化 circPIP5K1A 和 PIP5K1A 的相对表达水平。

1.2.4 CCK-8 检测 取已转染的 SCC15 和 CAL27 细胞接种在 96 孔板,培养 48 h 后,每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液,并孵育 1 h,用酶标仪测定波长为 450 nm 处的吸光度值。

1.2.5 集落形成实验 取已转染的 SCC15 和 CAL27 细胞分别接种到 24 孔板(300 个细胞/孔)中,常规培养 2 周后,用 PBS 洗涤细胞 2 次并用甲醇固定,结晶紫染色后显微镜下计数集落数,以肉眼可见细胞团或 >50 个细胞的细胞团为一个集落。

1.2.6 Annexin V-FITC/PI 染色 取已转染的 SCC15 和 CAL27 细胞分别接种到 35 mm 细胞皿(1×10^5 个/孔)中,常规培养 48 h。收集细胞,按照试剂盒说明书,进行 Annexin V-FITC 和 PI 染色,然后用流式细胞仪分析细胞凋亡情况。

1.2.7 细胞迁移和侵袭实验 取已转染的 SCC15 和 CAL27 细胞经重悬后,分别接种于铺或未铺基质胶的 Transwell 上室中(100 μ l 细胞悬浮液,5 000 个/孔),下室中添加 600 μ l 含 10% 胎牛血清的培养基,常规培养 24 h。擦除膜上层面的细胞,用 4% 多聚甲醛固定膜下层面的细胞后,0.1% 结晶紫染色 30 min,显微镜下取 6 个随机视野拍照并对细胞计数。

1.2.8 Western blot 用 RIPA 裂解液提取细胞的蛋白并用 BCA 法定量蛋白浓度。每个样本取 60 μ g 蛋白行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离并将分离的蛋白转移至甲醇预活化的 PVDF 膜。用 5% 脱脂牛奶封闭 PVDF 膜上的蛋白后,室温孵育孵育一抗(鼠抗 β -catenin, 1:1 000; 兔抗 Wnt1, 1:2 000; 兔抗 GAPDH, 1:4 000) 2 h, TBST 洗涤膜后,室温孵育 HRP 标记的抗鼠(1:1 000)或抗兔(1:2 000)二抗 1 h, TBST 再次洗涤膜后,用 ECL 法显影条带,并用 Quantity One 软件分析条带的灰度值。

1.2.9 LiCl 处理 取已转染 siR#1 的 SCC15 和 CAL27 细胞,用 10 ng/ml LiCl(Wnt/ β -catenin 信号激动剂)预处理 30 min,分别培养处理后,用 CCK-8 法、集落形成实验、Transwell 法和 Annexin V-FITC/PI 染色法检测细胞活力、细胞集落数、细胞迁移与侵袭和细胞凋亡情况。

1.3 统计学处理 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS20.0 软件进行统计分析,两组数据间比较采用 t 检验,多组数据间两两比较采用单因素方差分析,事后的 Bonferroni 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 circPIP5K1A 在 OSCC 组织和细胞中上调表达 RT-qPCR 实验结果显示:与癌旁组织相比,OSCC 组织中 circPIP5K1A 表达增加(图 1A, $t = 8.736$, $P < 0.05$);与 HOK 细胞相比,OSCC 细胞株 SCC15 和 CAL27 中 circPIP5K1A 表达均增加(图 1B, $F = 46.894$, $P < 0.05$)。另外, RNase R 处理导致 PIP5K1A mRNA 降低(图 1C, $t = 11.325$, $P < 0.05$)而不影响 circPIP5K1A 的表达。

2.2 沉默 circPIP5K1A 抑制 OSCC 细胞的细胞活性和集落形成并促进凋亡 首先将 siR#1 和 siR#2 转染至 SCC15 以及 CAL27 中,与转染 si-NC 比较,转染 siR#1 和 siR#2 的 SCC15 和 CAL27 细胞中 circPIP5K1A 表达均降低($F_A = 42.365$, $F_B = 54.192$, P

<0.05) 且 siR#1 的效果明显, 后续实验选择 siR#1 作为 si-circPIP5K1A, 见图 2A、B。然后观察沉默 circPIP5K1A 表达对 OSCC 细胞活性、集落形成与凋亡的影响, 结果显示, 与转染 si-NC 比较, 转染 si-circPIP5K1A 能降低 OSCC 细胞活性(图 2C, $t_{\text{SCC15}} = 6.379$, $t_{\text{CAL27}} = 7.624$)、集落形成数(图 2D, $t_{\text{SCC15}} = 9.165$, $t_{\text{CAL27}} = 11.832$) 并促进细胞凋亡(图 2E, $t_{\text{SCC15}} = 13.478$, $t_{\text{CAL27}} = 12.154$) (均 $P < 0.05$)。

2.3 沉默 circPIP5K1A 抑制 OSCC 细胞迁移与侵袭

实验结果显示, 与转染 si-NC 比较, 转染 si-circPIP5K1A 能降低 SCC15 和 CAL27 细胞的迁移 ($t_{\text{SCC15}} = 10.176$, $t_{\text{CAL27}} = 14.625$) 与侵袭 ($t_{\text{SCC15}} = 12.364$, $t_{\text{CAL27}} = 16.852$) (均 $P < 0.05$) , 见图 3。

2.4 沉默 circPIP5K1A 降低 OSCC 细胞 Wnt/ β -catenin 信号活性

Western blot 实验结果显示, 与转染 si-NC 比较, 转染 si-circPIP5K1A 能降低 SCC15 和 CAL27 细胞中 Wnt1 和 β -catenin 蛋白表达 ($P < 0.05$) , 见图 4。

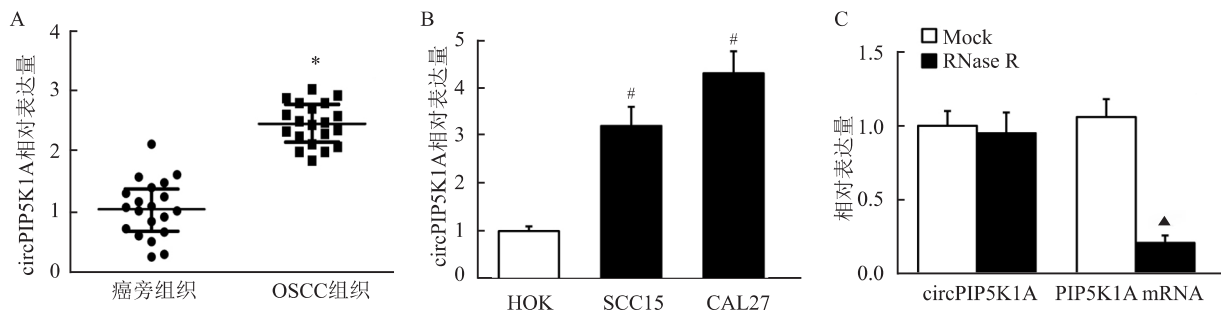


图1 circPIP5K1A 在 OSCC 组织和细胞中的表达情况

A: 癌旁组织和 OSCC 组织中的 circPIP5K1A 表达情况; B: 口腔上皮细胞 HOK 以及 OSCC 细胞株 SCC15 和 CAL27 中的 circPIP5K1A 表达情况; C: circPIP5K1A 的环状结构鉴定; 与癌旁组织比较: * $P < 0.05$; 与 HOK 细胞比较: # $P < 0.05$; 与 Mock 比较: ▲ $P < 0.05$

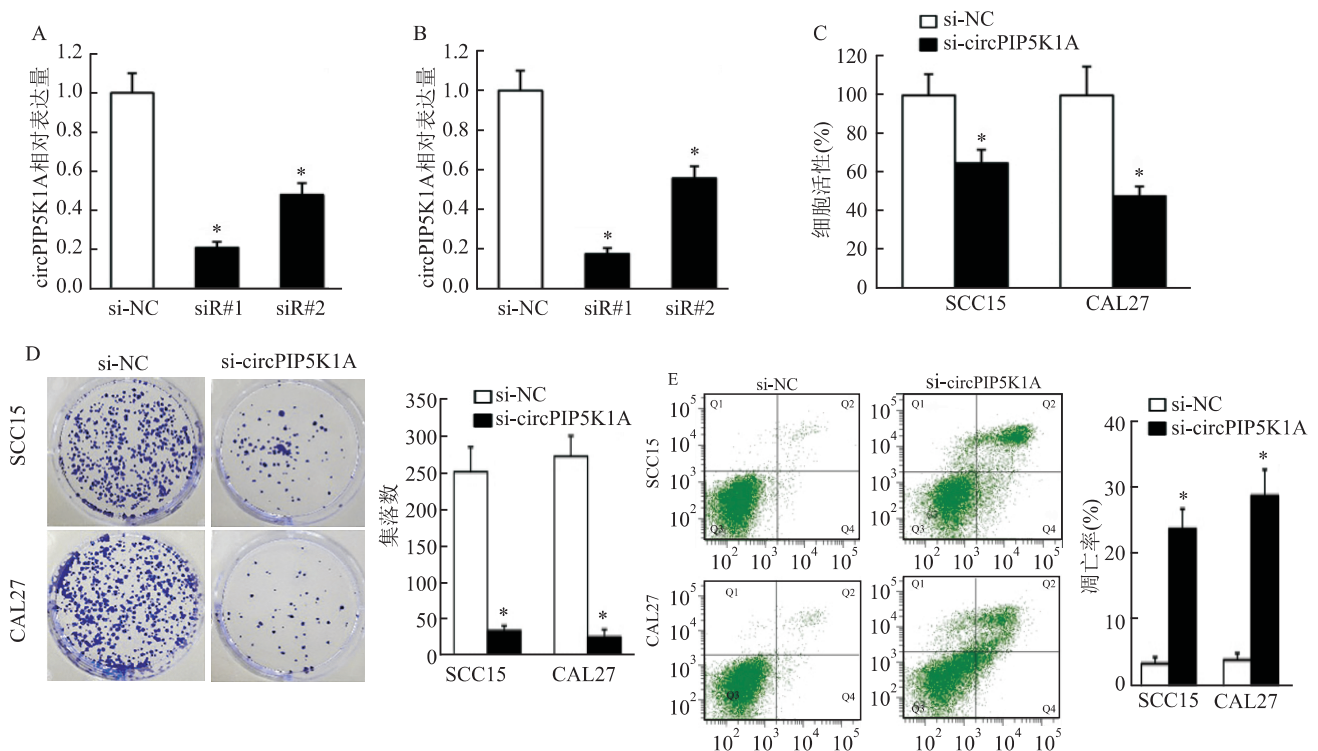


图2 沉默 circPIP5K1A 对 OSCC 细胞活性、集落形成与细胞凋亡的影响

A、B: 在 SCC15 和 CAL27 细胞中的 circPIP5K1A 干扰效率鉴定; C: 细胞活性的检测结果; D: 细胞集落的检测结果; E: 细胞凋亡的检测结果; 与 si-NC 比较: * $P < 0.05$

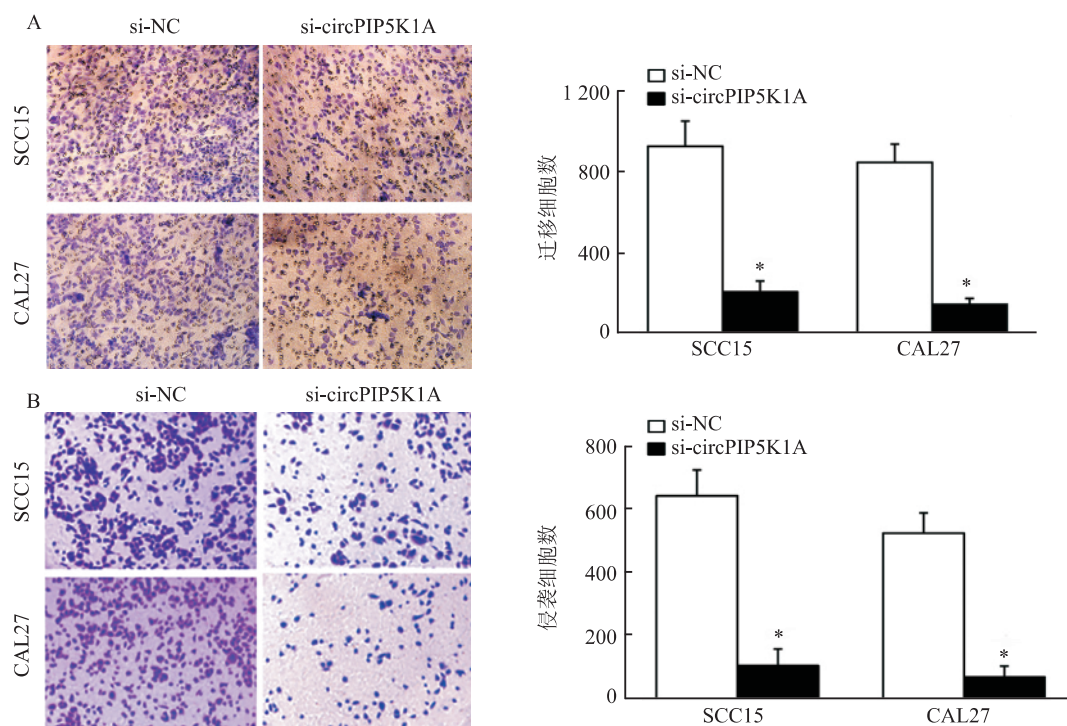


图3 沉默 circPIP5K1A 对 OSCC 细胞凋亡的影响 ×200

A: 细胞迁移的检测结果; B: 细胞侵袭的检测结果; 与 si-NC 比较: * $P < 0.05$

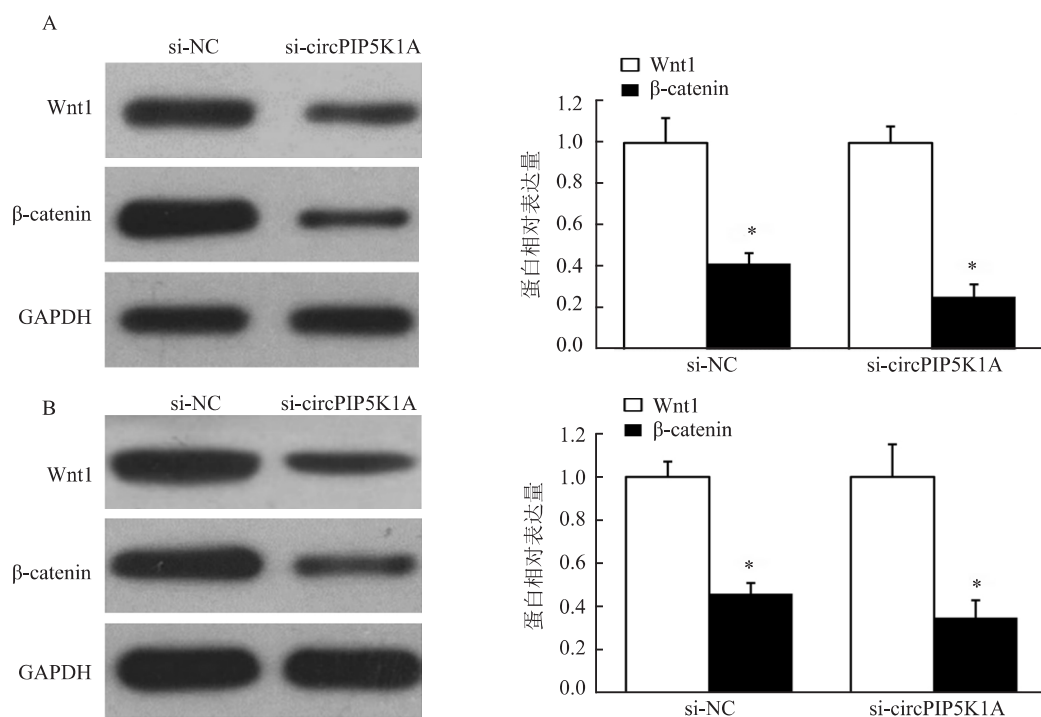


图4 沉默 circPIP5K1A 对 OSCC 细胞中 Wnt1 和 β-catenin 蛋白表达的影响

A: Western blot 法检测 SCC15 细胞中 Wnt1 和 β-catenin 的表达; B: Western blot 法检测 CAL27 细胞中 Wnt1 和 β-catenin 的表达; 与 si-NC 比较: * $P < 0.05$

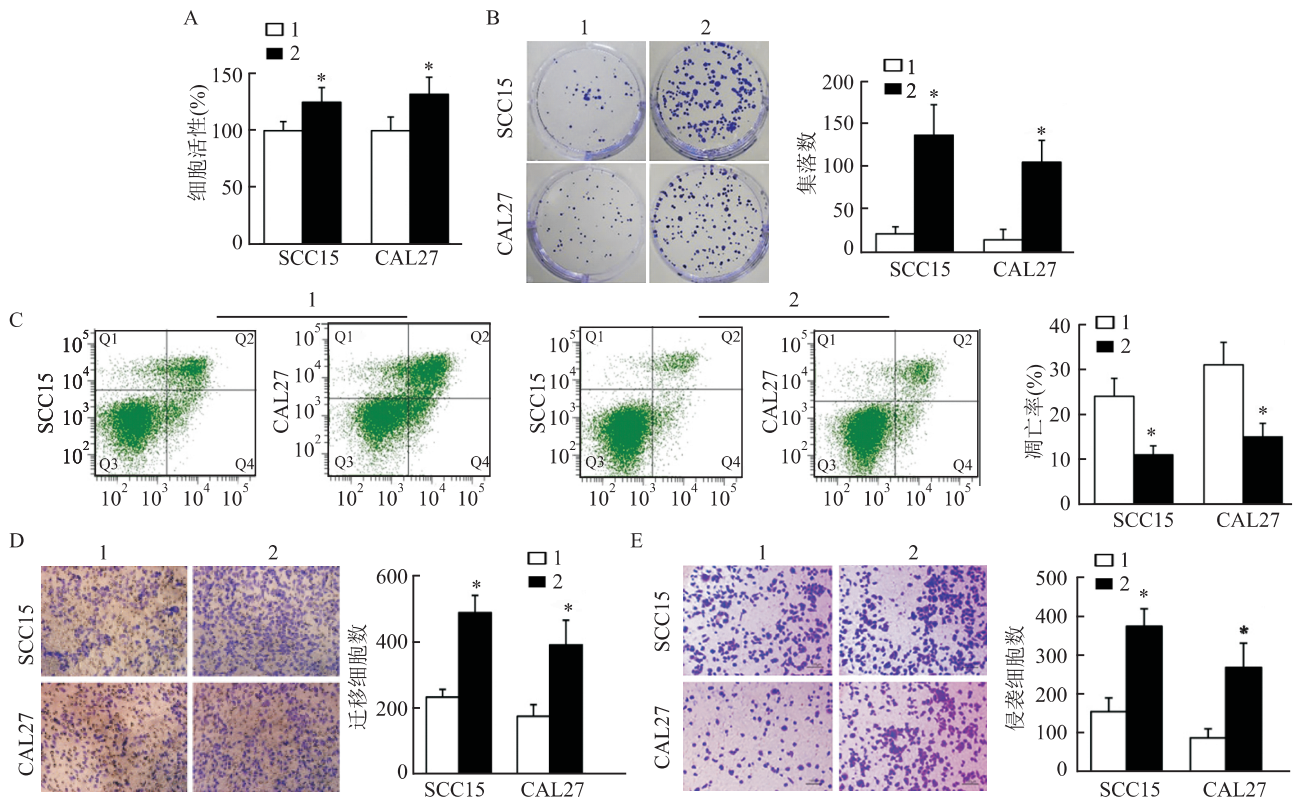


图5 LiCl对已转染si-circPIP5K1A的OSCC细胞的细胞活性、集落形成、细胞凋亡、细胞迁移与侵袭的影响

A: 细胞活性的检测结果; B: 细胞集落的检测结果; C: 细胞凋亡的检测结果; D: 细胞迁移的检测结果 × 200; E: 细胞侵袭的检测结果 × 200; 1: si-circPIP5K1A; 2: si-circPIP5K1A + LiCl; 与 si-circPIP5K1A 组比较: * $P < 0.05$

2.5 LiCl能逆转沉默circPIP5K1A对OSCC细胞活性、集落形成、细胞凋亡、细胞迁移与侵袭的作用

与 si-circPIP5K1A 组比较, si-circPIP5K1A + LiCl 组 SCC15 和 CAL27 细胞的细胞活性(图 5A $t_{\text{SCC15}} = 5.125$ $t_{\text{CAL27}} = 5.837$)、集落形成能力(图 5B $t_{\text{SCC15}} = 11.362$ $t_{\text{CAL27}} = 9.763$)、迁移(图 5D $t_{\text{SCC15}} = 7.158$, $t_{\text{CAL27}} = 8.693$)与侵袭(图 5E $t_{\text{SCC15}} = 8.602$ $t_{\text{CAL27}} = 7.536$)能力均增强(均 $P < 0.05$), 凋亡降低(图 5C, $t_{\text{SCC15}} = 7.189$ $t_{\text{CAL27}} = 6.894$) ($P < 0.05$)。

3 讨论

OSCC 是最常见的恶性肿瘤之一,且患者的发病年龄呈年轻化趋势^[1]。OSCC 一般采用手术切除后辅以放化疗的治疗模式,但目前此类肿瘤的整体预后较差^[2],其主要原因是 OSCC 细胞具有高速增长和高速转移的特性。因此,研究 OSCC 细胞的生长与转移机制对 OSCC 的治疗策略的制定具有重要意义。

circRNAs 是一类独特的环状结构的内源性非编码 RNAs,其在肿瘤的发生和发展过程中发挥着

重要作用^[3-4]。如: circRNA_100290、circ_0109291 和 circPVT1 等 circRNAs 在 OSCC 组织和细胞中高表达,抑制其表达能降低 OSCC 细胞增殖与迁移^[9-11]。circRNAs 家族成员庞大,在 OSCC 进展中,有众多具有抑癌或促癌功能的 circRNAs 未被鉴定。本研究显示 circPIP5K1A 在 OSCC 组织和细胞中上调表达,而沉默 circPIP5K1A 可降低 OSCC 细胞的细胞活力、集落形成、迁移与侵袭并促使细胞凋亡,这一结果提示,靶向抑制 circPIP5K1A 表达可能是潜在的 OSCC 治疗策略。

Wnt 信号传导是由配体蛋白 Wnt 和膜蛋白受体结合后而激发的一组信号转导途径,β-catenin 是 Wnt 信号通路的主要组成部分。Wnt/β-catenin 信号通路激活在 OSCC 发生和进展中起着重要的促进作用^[12],并且有已有研究^[13-14]报道抑制 Wnt/β-catenin 信号活性能抑制 OSCC 细胞增殖与转移。本研究结果显示,沉默 circPIP5K1A 表达能抑制 Wnt/β-catenin 信号通路关键蛋白 Wnt1 和 β-catenin 的表达,因此推测沉默 circPIP5K1A 表达可能通过抑制 Wnt/β-catenin 信号活性来发挥对 OSCC 细胞生长

与转移的抑制作用。为证实这一推测,本研究进一步采用 Wnt/ β -catenin 信号激动剂 LiCl 处理已转染 si-circPIP5K1A 的 OSCC 细胞,结果显示, LiCl 能部分逆转沉默 circPIP5K1A 对 OSCC 细胞的细胞活力、集落形成、细胞迁移与侵袭的抑制作用和凋亡的促进作用。以上结果说明,沉默 circPIP5K1A 至少是部分通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号活性来发挥抗 OSCC 的作用。

另外, circRNAs 通常作为 miRNAs 的内源竞争 RNA (competing endogenous RNAs, ceRNA) 来发挥“miRNA 海绵作用”。本研究对与 circPIP5K1A 具有直接作用的 miRNAs 并未探讨。另外,本研究中 Wnt/ β -catenin 信号通路为 circPIP5K1A 的下游通路,且 Wnt/ β -catenin 信号激动剂 LiCl 并不能完全逆转沉默 circPIP5K1A 的抗 OSCC 作用,说明沉默 circPIP5K1A 依然存在其他具有调节 OSCC 细胞的细胞活力、集落形成、迁移、侵袭以及细胞凋亡的信号通路。

参考文献

- [1] Ghosh S, Pal S, Ghatak S, et al. A clinicopathologic and epidemiologic study of chronic white lesions in the oral mucosa[J]. *Ear Nose Throat J*, 2017, 96(8): E13-7.
- [2] Omura K. Current status of oral cancer treatment strategies: surgical treatments for oral squamous cell carcinoma[J]. *Int J Clin Oncol*, 2014, 19(3): 423-30.
- [3] Zhou R, Wu Y, Wang W, et al. Circular RNAs (circRNAs) in cancer[J]. *Cancer Lett*, 2018, 425: 134-42.
- [4] 高敏, 刘文博, 赵奇红等. 环状 RNA hsa_circ_0010985 对胃癌细胞增殖与凋亡的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(9): 1387-91.
- [5] Ma Y, Cong X, Zhang Y, et al. CircPIP5K1A facilitates gastric cancer progression via miR-376c-3p/ZNF146 axis[J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 81.
- [6] Chi Y, Luo Q, Song Y, et al. Circular RNA circPIP5K1A promotes non-small cell lung cancer proliferation and metastasis through miR-600/HIF-1 α regulation[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(11): 19019-30.
- [7] Zhang Q, Zhang C, Ma J X, et al. Circular RNA PIP5K1A promotes colon cancer development through inhibiting miR-1273a[J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(35): 5300-9.
- [8] Sun Y, Li X, Chen A, et al. circPIP5K1A serves as a competitive endogenous RNA contributing to ovarian cancer progression via regulation of miR-661/IGFBP5 signaling[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(12): 19406-14.
- [9] Chen X, Yu J, Tian H, et al. Circle RNA hsa_circRNA_100290 serves as a ceRNA for miR-378a to regulate oral squamous cell carcinoma cells growth via Glucose transporter-1 (GLUT1) and glycolysis[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(11): 19130-40.
- [10] Ouyang S B, Wang J, Zhao S Y, et al. CircRNA_0109291 regulates cell growth and migration in oral squamous cell carcinoma and its clinical significance[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2018, 21(11): 1186-91.
- [11] He T, Li X, Xie D, et al. Overexpressed circPVT1 in oral squamous cell carcinoma promotes proliferation by serving as a miRNA sponge[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(4): 3509-18.
- [12] Yang J, Wei D, Wang W, et al. TRAF4 enhances oral squamous cell carcinoma cell growth, invasion and migration by Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9): 11837-46.
- [13] Liu L, Jiang H, Zhao J, et al. MiRNA-16 inhibited oral squamous carcinoma tumor growth *in vitro* and *in vivo* via suppressing Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 5111-9.
- [14] Zhang N, Wei Z L, Yin J, et al. MiR-406a^{*} inhibits oral squamous cell carcinoma progression by directly targeting MeCP2 and suppressing the Wnt/ β -Catenin signaling pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(11): 3542-54.

Silencing of circular RNA PIP5K1A reduces the growth and metastasis of oral squamous cell carcinoma cells by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway

Wang Tianxue¹, Sun Qiang², Li Jia¹

(¹Dept of Stomatology, School of Medicine, Kaifeng University, Kaifeng 475000;

²Dept of Oral and Maxillofacial Surgery, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052)

Abstract Objective To study the effect of circular RNA PIP5K1A (circPIP5K1A) on the growth and metastasis of oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells and its possible mechanism. **Methods** The expression of circPIP5K1A in OSCC tissues and cells was detected by RT-qPCR. After transfecting si-circPIP5K1A into OSCC cells, cell viability was measured by CCK-8 assay, colony formation ability was detected by colony formation assay,

网络出版时间: 2021 - 7 - 28 11: 36 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210728.1015.015.html>

七叶皂苷钠对胆管结扎诱导的肝纤维化作用研究

王玮琛 周大臣 崔笑侯 辉张彬

摘要 目的 探究七叶皂苷钠(SA)对胆管结扎诱导的肝纤维化作用机制。方法 54只雄性SD大鼠随机均分为:假手术组(Sham组)仅行开腹术,术后每日注射等量生理盐水、生理盐水组(OJ组)行胆管结扎后术后每日注射等量生理盐水、SA组(SA组)行胆管结扎后术后每日注射SA 3.6 mg/kg。通过ELISA测定各组大鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBIL)的水平。HE及Masson染色观察大鼠肝脏形态结构和胶原纤维的改变。免疫荧光检测I、III型胶原。免疫组化及Western blot检测eIF-4E、P-4EBP1蛋白表达。结果 OJ组大鼠肝脏结构紊乱,血清中的ALT、AST、TBIL水平上升,I、III型胶原增多,eIF-4E、P-4EBP1在肝细胞中表达减少。SA干预的大鼠血清中ALT、AST、TBIL较OJ组下降,大鼠肝脏中I、III型胶原表达减少且上调OJ组大鼠肝细胞中原本下调的P-4EBP1、eIF-4E。结论 七叶皂苷钠可以通过促进肝细胞中的4EBP1的磷酸化及eIF-4E的激活保护肝细胞从而减少了肝纤维化。

关键词 eIF-4E; P-4EBP1; 胆管结扎; 肝纤维化; 七叶皂苷钠中图分类号 R 575

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2021)08 - 1257 - 06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2021.08.017

2021 - 03 - 10 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1808085MH270);安徽医科大学研究基金(编号:2017xkj034)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院普外科,合肥 230601

作者简介:王玮琛,男,硕士研究生;

张彬,男,副教授,副主任医师,研究生导师,责任作者,
E-mail: 65208928@qq.com

梗阻性黄疸(obstructive jaundice, OJ)是由于胆管管壁堵塞或胆管狭窄所致的急性胆汁胆管淤积症而引起的一种全身性的机体病理或生理功能改变,是一种临床常见症状^[1],且对肝脏损伤最严重,易引起肝纤维化肝硬化。OJ常见的病因主要是胆管结石、胆管恶性肿瘤、胰头部恶性肿瘤等^[2]。真核细胞翻译起始因子4E(eukaryotic translation initiation factor 4E, eIF-4E)是真核细胞翻译起始因子,广泛分布于细胞质与细胞核中,可与mRNA 5'端7-甲基鸟苷(7-methylguanosine, m7G)帽状结构特异性结合,从而介导翻译,其在多种疾病中起到调节作用^[3]。肝纤维化的疾病进程中受到了多种蛋白的调控,但是eIF-4E是否参与了OJ所引起的肝纤维化过程,目前并不清楚。

七叶皂苷钠(sodium aescate, SA)具有消炎、减少渗出、改善水肿等作用^[4],对急性肺损伤、肺纤维化及急性肝损伤有保护作用^[5-6]。但SA对OJ引起的肝纤维化的作用尚未见报道。因此,该研究以大鼠为实验对象,进而验证SA对梗阻性黄疸所引起的肝纤维化病理生理过程的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 54只雄性、健康、适龄的SD大鼠,体质量200~250 g,购自安徽医科大学动物实验中心,动物使用许可证号为SYXK(皖)2020-001。

cell apoptosis was detected by flow cytometry with Annexin V-FITC/PI staining, cell migration and invasion were detected by Transwell assay, and the expression levels of proteins related to Wnt/ β -catenin pathway were detected by Western blot. After treating OSCC cells transfected with si-circPIP5K1A with Wnt/ β -catenin signaling agonist LiCl, cell viability, colony formation, apoptosis, migration and invasion were determined. **Results** CircPIP5K1A was up-regulated in OSCC tissues and cells ($P < 0.05$). After silencing of circPIP5K1A, the cell viability, colony formation, migration and invasion in OSCC cells decreased (all $P < 0.05$), cell apoptosis significantly increased ($P < 0.05$), and the expression levels of Wnt1 and β -catenin protein decreased ($P < 0.05$). LiCl inhibited the inhibitory effect of silencing circPIP5K1A on the growth and metastasis of OSCC cells ($P < 0.05$). **Conclusion** Silencing of circPIP5K1A can inhibit the growth and metastasis of OSCC cells by inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words circPIP5K1A; oral squamous cell carcinoma; Wnt/ β -catenin signaling pathway