

网络出版时间: 2019-7-15 18:06 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190715.0922.012.html>

体外 siRNA-Nav1.5 干扰口腔鳞癌 HSC-3 细胞生物学行为研究

戴永铮 钱成炜 徐小立 蒋 勇

摘要 目的 探究电压门控钠离子通道(VGSC)亚型 Nav1.5 在口腔鳞癌细胞系和组织中的表达及小干扰 RNA (siRNA) 转染对 HSC-3 口腔鳞癌细胞的生物学行为的影响,并进一步分析其可能机制。方法 选取临床口腔鳞癌组织和正常口腔上皮组织免疫组化染色显示 Nav1.5 在组织中的表达。免疫荧光激光共聚焦显示细胞内 Nav1.5 的表达。利用脂质体转染 siRNA-Nav1.5 干扰 HSC-3 细胞中 Nav1.5 的表达水平,CCK8 和 Transwell 侵袭实验检测转染后细胞的增殖和侵袭能力。实时荧光定量 PCR(RT-PCR)和 Western blot 验证与细胞增殖侵袭相关的蛋白:细胞增殖核抗原(PCNA)、基质金属蛋白酶 2(MMP-2)、MMP-9 表达变化。结果 免疫组化结果可见在口腔鳞癌组织中 Nav1.5 阳性表达,正常组织中未见明显表达。免疫荧光结果可见 HSC-3 细胞中 Nav1.5 阳性表达。转染 siRNA-Nav1.5 明显降低 HSC-3 细胞的增殖和侵袭能力。转染 siRNA-Nav1.5 的 HSC-3 细胞 PCNA、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达降低。结论 Nav1.5 可通过调控 PCNA、MMP-2 和 MMP-9 的表达促进口腔鳞癌细胞的增殖和侵袭能力。

关键词 口腔鳞状细胞癌;电压门控钠离子通道;Nav1.5;侵袭;增殖

中图分类号 R 739.85

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)08-1227-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.08.012

口腔鳞状细胞癌复发率高、生存周期短,手术治疗的局限性造成治疗效果差,因而新的治疗方法对提高患者生存率具有重要意义。电压门控钠离子通道(voltage-gated sodium channel, VGSC)是一种跨膜糖蛋白,由一个 α 亚基和多个 β 亚基组成。根据 α 亚基的不同可将其分为 9 种,即 Nav1.1-Nav1.9^[1]。近年来一些研究发现,Nav1.5 在包括前列腺癌^[2]、乳腺癌^[3]、卵巢癌^[4]、宫颈癌^[5] 和非小细胞肺癌^[6]

等多种肿瘤中高表达,对肿瘤的增殖、侵袭等生物学过程具有明显的调节作用。在口腔鳞癌中,研究^[7]显示 Nav1.5 在癌组织中的表达相比正常组织明显升高,但其在口腔鳞癌中的表达调控机制研究甚少。该研究通过检测 Nav1.5 的表达水平变化以及在增殖和侵袭中具有重要作用的相关蛋白检测,来分析其对口腔鳞癌细胞增殖和侵袭的作用,为口腔鳞癌的靶向治疗寻求新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料和仪器 DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司;胎牛血清购自以色列 Biolnd 公司;胰酶消化液、细胞增殖核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)、蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;Nav1.5 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司;基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase 2, MMP-2)、MMP-9 多克隆抗体购自美国 santa cruz 公司;山羊抗鼠、抗兔 Ig 抗体购自北京中杉金桥公司;CCK8 试剂盒购自日本同仁公司;PCR 引物购自上海生物工程股份有限公司;逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR(Real Time-PCR, RT-PCR)试剂盒购自日本 Takara 公司;PVDF 膜购自美国 Invitrogen 公司;Matrigel 胶、Transwell 小室购自美国 Corning 公司;siRNA-Nav1.5 购自上海吉玛公司;li-po2000、CO₂ 恒温孵箱购自美国 Thermo Fisher 公司;RT-PCR 仪购自美国 Stratagene 公司;酶标仪购自美国 Bio-tek 公司。收集安徽医科大学第一附属医院口腔颌面外科口腔鳞癌组织(2 例)和正常口腔黏膜组织(牙龈 2 例),标本取下直接保存于 -80 °C 备用。

1.2 实验方法

1.2.1 组织免疫组化 4% 甲醛固定组织 6 h,石蜡包埋 4 μ m 厚切片,60 °C 烤片 4 h,脱蜡至水,抗原修复,3% H₂O₂ 室温孵育 10 min,1:200 稀释 Nav1.5 一抗 4 °C 孵育过夜(16 h 左右),HRP 二抗 37 °C、30 min, DAB 显色,苏木精复染,封片,镜下观

2019-05-10 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1508085MH187)

作者单位: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:戴永铮,男,硕士研究生;

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

察。

1.2.2 细胞培养 HSC-3 细胞在含 10% FBS、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素 DMEM 培养基中, 放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。每 3 d 传代一次。

1.2.3 免疫荧光实验 将细胞以 5 × 10⁵ 个/ml 的密度接种于共聚焦小皿, 孵箱过夜。4% 多聚甲醛室温下固定 30 min, 0.5% Triton X-100 室温下穿通 20 min, 1% BSA 封闭细胞 30 min, 加入 Nav1.5 的一抗(6 μg/ml) 冰箱孵育 24 h, 次日室温孵育 1 h。加入罗丹明标记的二抗(1 : 50) 避光孵育 2 h, DAPI (1 : 2 000) 避光孵育 8 min。在 Zeiss LSM510 共聚焦成像系统下观察细胞。

1.2.4 siRNA 转染实验 美国国立生物技术信息中心(national center for biotechnology information, NCBI) 上查找 Nav1.5 的序列, 根据目的基因序列设计合成 3 条 Nav1.5 的小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA) 组, 以及一条阴性对照(negative control, NC) 组, 同时设置空白对照(control, CON) 组, 序列见表 1。转染前 1 d, 将 2 × 10⁵ 个/ml 细胞接种于培养板中, 每孔中加入约 500 μl 无抗生素的培养基。取 1 μl/孔 lipo2000, 用 50 μl opti-MEM 无血清培养基稀释, 并室温孵育 5 min。取 2 μl siRNA, 以 50 μl opti-MEM 无血清培养基稀释, 混匀。2 种液体轻轻混匀, 室温静置 20 min。加入含有细胞及培养液的孔中, 混匀。转染 6 h 后, 换为含血清的完全培养基。见表 1。

表 1 siRNA 序列

基因	引物序列
siRNA-1(F)	5'-GCUGGACUUUAGUGUGAUUTT-3'
siRNA-1(R)	5'-AAUCACACUAAAGUCCAGCTT-3'
siRNA-2(F)	5'-GCACAUGAUGGACUUCUUUTT-3'
siRNA-2(R)	5'-AAAGAAGUCCAUAUGUGCTT-3'
siRNA-3(F)	5'-GCAACGCUCUUUGAAGCAUTT-3'
siRNA-3(R)	5'-AUGCUUCAAGAGCGUUGCTT-3'
siRNA-NC(F)	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'
siRNA-NC(R)	5'-ACGUGACACGUCGGAGAATT-3'

1.2.5 RT-PCR 检测 按 TRIzol 试剂盒说明书提取各组细胞总 RNA, 使用 PrimeScript™-PCR kit 逆转录试剂盒逆转录成 cDNA, 然后以此为模板, 用目标基因的引物进行扩增和检测。反应条件: 95 °C、1 min、60 °C、30 s、72 °C、30 s。每个样品设置 3 个复孔, PCR 的所有引物均由上海生物工程公司进行设计合成, 序列见表 2。

表 2 引物序列

基因	引物序列
Nav1.5(F)	5'-CAGCTGGTTCGAGACATTCA-3'
Nav1.5(R)	5'-TTGTCCGCATACTCAAGCAG-3'
MMP-2(F)	5'-GCCTCTCTGACATTGACCTTGG-3'
MMP-2(R)	5'-CACACCGGATCTGAGCGATGC-3'
MMP-9(F)	5'-TCCTGGTGCTCCTGGTGCTG-3'
MMP-9(R)	5'-CTGCCTGTCGGTGAGATTGGTTC-3'
PCNA(F)	5'-GAAGTGTTGGAGGCACTCAAGG-3'
PCNA(R)	5'-GCACGGTAGGTGTCAAGC-3'
β-actin(F)	5'-GGCACCACACCTTCTACAATGAGC-3'
β-actin(R)	5'-GATAGCACAGCCTGGATAGCAACG-3'

1.2.6 Western blot 检测 用 RIPA 细胞裂解液提取各组细胞总蛋白。BCA 试剂盒测定各组蛋白浓度, 调整各组浓度一致后, 99 °C、10 min 使蛋白变性, SDS-PAGE 凝胶电泳, 然后转移至 0.45 μm 的 PVDF 膜上, 5% BSA 封闭, 一抗、二抗孵育, 经 ECL 曝光成像。

1.2.7 Transwell 实验 Matrigel 胶与 DMEM 培养基按 1 : 9 混匀制成稀释液。小室滤膜均匀涂抹 50 μl 稀释液, 37 °C、5% CO₂ 恒温箱滞留 2 h。取 3 组培养 24 h 细胞, 0.25% 胰酶消化, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液得下层细胞, DMEM 重悬计数, 细胞密度调为 1 × 10⁶ 个/ml。上室加细胞悬液各 100 μl, 下室加 600 μl 20% FBS 的 DMEM 培养液, 37 °C、5% CO₂ 恒温箱孵育 24 h, 每组细胞设 3 个复孔。取出小室, 吸出上室培养液, 擦净上室表面 Matrigel 胶, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 结晶紫染色 20 min, 晾干, 拍照, 200 倍显微镜下计算穿膜细胞数。

1.2.8 CCK8 检测细胞增殖活性 待检测细胞计数, 并铺于 96 孔板。确定细胞贴壁后, 继续培养 2 ~ 4 h 使其贴壁紧密。96 孔板每个孔加 10 μl CCK8 溶液, 在培养箱孵育 1 h, 显色反应后, 酶标仪测定 450 nm 处吸光度值(optical density, OD), 每组设 5 个复孔。根据 OD450 值绘制 12、24、48、72 h 柱状图。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较使用 *t* 检验, 多组间差异的比较采用方差分析, 组间比较采用 SNK *q* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织和细胞中 Nav1.5 的表达 临床收集的正常口腔黏膜组织和口腔鳞癌组织做免疫组化, 光镜下观察组织中 Nav1.5 蛋白表达情况, 癌组织中于

细胞的胞膜和胞质中出现不同程度的棕黄深染,即 Nav1.5 蛋白呈阳性表达。在正常口腔黏膜组织中几乎看不到棕黄色,见图 1。HSC-3 细胞中免疫荧光染色激光共聚焦镜下观察,在胞质和胞膜上可见荧光标记的 Nav1.5 呈红色,胞核呈蓝色,Nav1.5 在 HSC-3 细胞中阳性表达,见图 2。

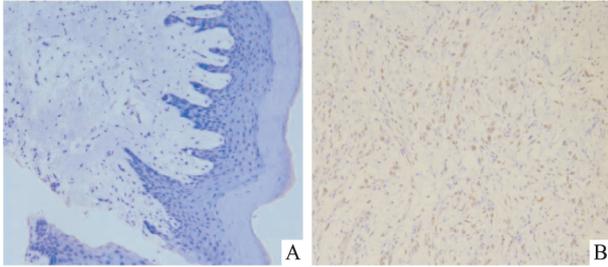


图 1 免疫组化法检测 Nav1.5 蛋白的表达 ×100
A: 正常组织染色阴性; B: 癌组织染色阳性

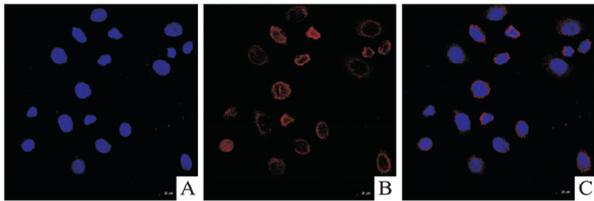


图 2 免疫荧光法检测 HSC-3 细胞中 Nav1.5 的表达 ×200

A: 细胞核的染色呈蓝色; B: Nav1.5 蛋白的染色呈红色; C: A 和 B 的合成图

2.2 HSC-3 细胞 Nav1.5 的沉默效率 FAM 标记的 siRNA 转染 HSC-3 细胞,镜下观察细胞,与明场视野下对比,转染效率较高。RT-PCR 和 Western blot 结果显示与 CON 组比较, S₁、S₂ 和 S₃ 组 Nav1.5 的 mRNA 表达均有所下调, S₂ 和 S₃ 组下调较多,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。CON 组和 NC 组之间差异无统计学意义,见图 3。因此以下实验均采用 S₃ 转染。

2.3 Nav1.5 对 HSC-3 细胞增殖和侵袭的影响

CCK8 检测干扰后的细胞在 450 nm 处 OD 值,测量结果显示,在转染 48 h 后 siRNA 组 (1.31 ± 0.21) 与 CON 组 (1.06 ± 0.22) 和 NC 组 (0.67 ± 0.09) 比较,差异有统计学意义 ($F = 9.006, P < 0.01$), CON 组和 NC 组之间差异无统计学意义,见图 4。Transwell 侵袭实验结果表明, siRNA 组 (7.33 ± 1.55) 与 CON 组 (55.0 ± 3.00) 和 NC 组 (47.0 ± 4.00) 比较,穿过小室细胞数明显减少,差异有统计学意义 ($F = 222.7, P < 0.001$), CON 组和 NC 之间差异无统计学意义,见图 5。

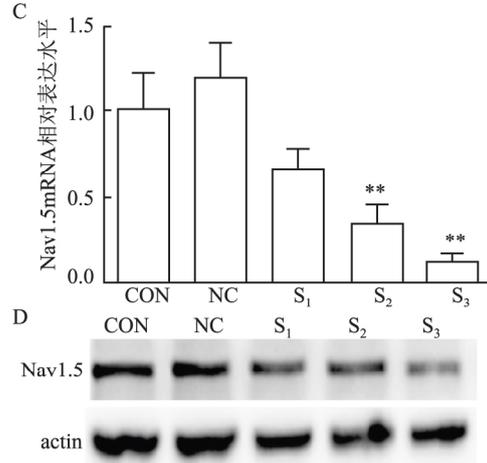
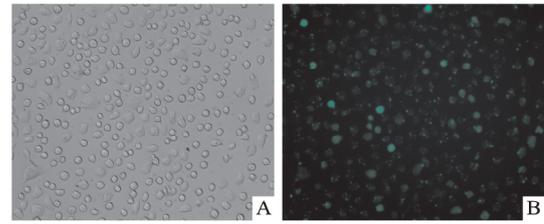


图 3 经 siRNA 转染后 Nav1.5 沉默效率

A: 转染 FAM 标记 siRNA 明场视野下; B: 同一视野下荧光观察 ×200; C: 转染后各组 Nav1.5 mRNA 相对表达水平; 与 CON 组比较: ** $P < 0.01$; D: 转染后各组 Nav1.5 蛋白表达水平; S₁、S₂ 和 S₃ 分别代表转染不同序列 siRNA-Nav1.5

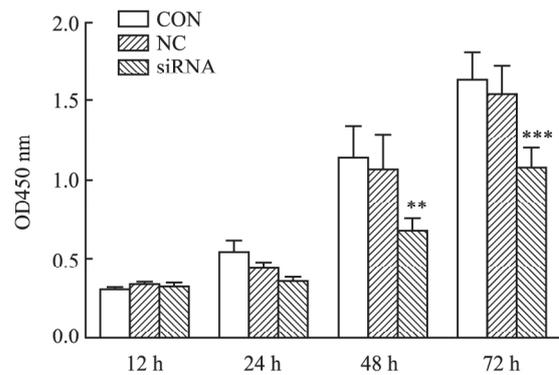


图 4 经 siRNA 干扰后 HSC-3 细胞 OD450 值比较
与 CON 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.4 RT-PCR 和 Western blot 检测转染 siRNA-Nav1.5 对相关蛋白表达的影响

经 siRNA-Nav1.5 转染后的 HSC-3 细胞内 PCNA、MMP-2 和 MMP-9 基因水平表达和蛋白水平表达均有所下降,差异有统计学意义 ($F = 15.12, 22.89, 11.72, P < 0.05$),见表 3 和图 6、7。

3 讨论

口腔鳞状细胞癌作为颌面部最常见的恶性肿瘤,常常发生区域淋巴结转移,晚期可发生远处转

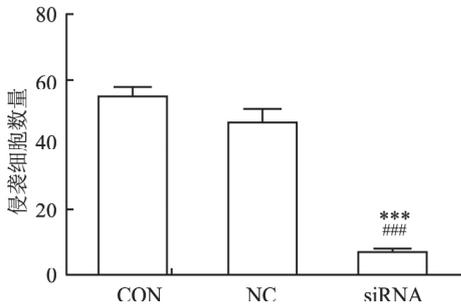
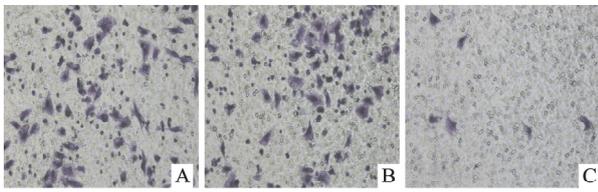


图5 经 siRNA 转染后 HSC-3 细胞侵袭性比较 ×200

A: CON 组; B: NC 组; C: siRNA 组; 与 CON 组比较: *** $P < 0.001$; 与 NC 组比较: ### $P < 0.001$

表3 转染 siRNA 及空白组相关蛋白 mRNA 表达量 ($n = 5 \bar{x} \pm s$)

蛋白	CON 组	NC 组	siRNA 组	F 值	P 值
PCNA	1.001 ± 0.049	0.778 ± 0.127	0.356 ± 0.068 *** ##	41.810	< 0.01
MMP-2	1.020 ± 0.236	1.068 ± 0.182	0.495 ± 0.082* ##	9.493	< 0.05
MMP-9	1.002 ± 0.069	0.785 ± 0.121	0.583 ± 0.146* ##	9.722	< 0.05

与 CON 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 NC 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

移, 严重威胁着人类的健康。为了克服传统手术加放疗治疗方法的弊端, 分子靶向治疗越来越重要。为了寻找更为有效的治疗靶点, 在本课题组的早期研究中, 刘伟佳等^[7]发现在口腔鳞状细胞癌中, Nav1.5 的表达与正常组织相比显著提高, 本研究免疫组化结果也得到证实。此外, Nav1.5 的表达与组织分化程度和淋巴结转移有关, 这提示着 Nav1.5 有望成为口腔鳞癌治疗的新靶点。

近年来, 越来越多的研究^[8-11]发现 Nav1.5 与癌症密切相关, 并表明 Nav1.5 在癌症增殖转移中发挥着重要作用。Mohammed et al^[8]研究显示 Nav1.5

在高侵袭性乳腺癌细胞的胞质和核周区域以及板状伪足中表达。本研究免疫荧光共焦显微镜的结果显示 HSC-3 细胞中也有着相同分布。为探讨 Nav1.5 对 HSC-3 细胞增殖和侵袭能力的影响, 本研究对 HSC-3 细胞进行 siRNA-Nav1.5 干扰实验, RT-PCR 和 Western blot 检测干扰后 HSC-3 细胞中 Nav1.5 出现明显下调后再分别进行 Transwell 侵袭实验和 CCK8 检测干扰后细胞增殖 OD 值, 实验结果显示经 siRNA-Nav1.5 干扰后的 HSC-3 细胞的增殖和侵袭能力显著下降。说明 Nav1.5 在口腔鳞癌细胞生物学特性方面具有重要的调节作用。在乳腺癌的研究^[9]中也有着相似的结果, 沉默 Nav1.5 基因后, MDA-MB-231 细胞的侵袭能力显著降低。在结肠癌中, 研究^[10]表明 Nav1.5 基因涉及广泛的信号调节并参与肿瘤细胞侵袭的调节, 是癌细胞侵袭的关键驱动因子。在动物体内研究^[11]中, 发现敲低 Nav1.5 显著抑制了肿瘤的生长和体内局部侵袭。尽管证明了 Nav1.5 在口腔鳞状细胞癌的生长和转移中起重要作用, 但其具体机制尚不清楚。

PCNA 与细胞的 DNA 合成密切相关, 在细胞的增殖中起关键作用, 也是细胞异常增殖的关键蛋白, 有研究^[12]表明, 相比正常口腔组织在口腔鳞状细胞癌中 PCNA 过表达, 提示其与口腔鳞癌的发生发展过程有关。在本实验中, RT-PCR 和 Western blot 结果显示经 siRNA-Nav1.5 转染的 HSC-3 细胞内 PCNA 表达下降。对肿瘤侵袭和转移机制的研究发现: 细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的降解是肿瘤侵蚀正常组织并引发转移的重要途径。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 是最重要的, 可以降解 ECM 的所有成分, 近年来已成为肿瘤侵袭和转移研究的热点, 其中又以 MMP-2 和 MMP-9 最为重要。Chandolia et al^[13]研究发现: 相比正常口腔黏膜上皮, 口腔鳞癌中 MMP-9 表达水平显著提高。在本实验中, 转染 siRNA-Nav1.5 48 h 后 HSC-3

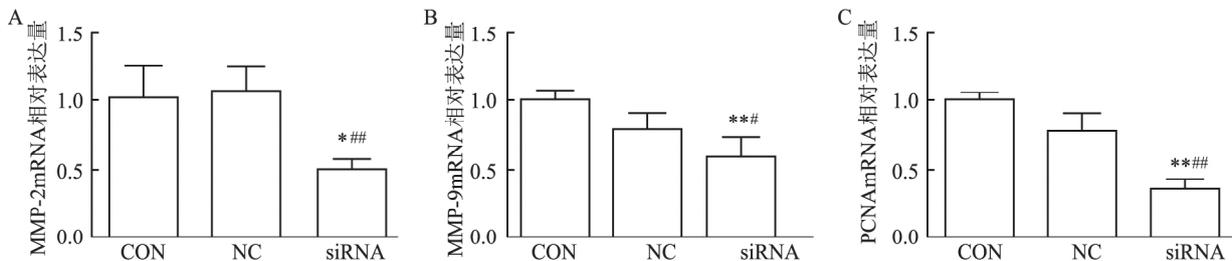


图6 RT-PCR 检测 MMP-2、MMP-9 和 PCNA mRNA 表达

A: MMP-2 mRNA 相对表达量; B: MMP-9 mRNA 相对表达量; C: PCNA mRNA 相对表达量; 与 CON 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 NC 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

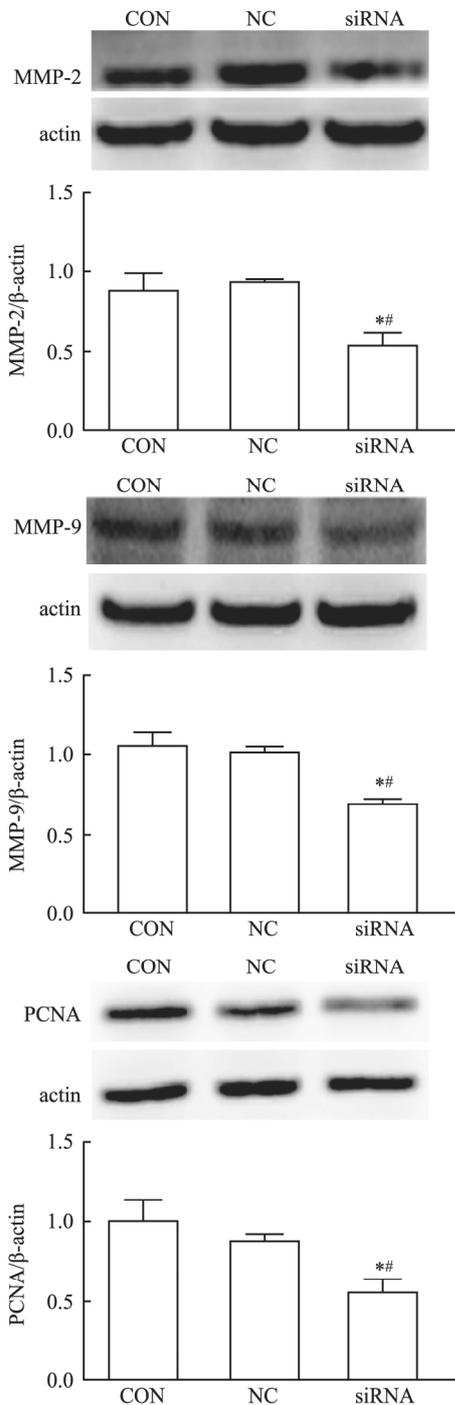


图7 Western blot 检测干扰后 HSC-3 细胞 PCNA、MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达变化

与 CON 组比较: * $P < 0.05$; 与 NC 组比较: # $P < 0.05$

细胞内 MMP-2 和 MMP-9 表达均下调。以上结果说明口腔鳞癌中 Nav1.5 可能通过直接或间接地调控 PCNA、MMP-2 和 MMP-9 的表达进而影响着细胞生物学行为的改变。

为了进一步研究证明动物体内 Nav1.5 的生物

学作用,下一步将进行裸鼠皮下造瘤后的进一步动物实验,从而推进 Nav1.5 作为临床口腔鳞癌治疗靶点的应用。

参考文献

- [1] Catterall W A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels[J]. *Neuron*, 2000, 26(1): 13–25.
- [2] Grimes J A, Fraser S P, Stephens G J, et al. Differential expression of voltage-activated Na^+ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness *in vitro* [J]. *FEBS Lett*, 1995, 369(2): 290–4.
- [3] Roger S, Besson P, Le Guennec J Y. Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1616(2): 107–11.
- [4] Roger S, Rollin J, Barascu A, et al. Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(4): 774–86.
- [5] Diaz D, Delgadillo D M, Hernandez-Gallegos E, et al. Functional expression of voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 210(2): 469–78.
- [6] Gao R, Shen Y, Cai J, et al. Expression of voltage-gated sodium channel alpha subunit in human ovarian cancer [J]. *Oncol Rep*, 2010, 23(5): 1293–9.
- [7] 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.
- [8] Mohammed F H, Khajah M A, Yang M, et al. Blockade of voltage-gated sodium channels inhibits invasion of endocrine-resistant breast cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(1): 73–83.
- [9] Gillet L, Roger S, Besson P, et al. Voltage-gated sodium channel activity promotes cysteine cathepsin-dependent invasiveness and colony growth of human cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(13): 8680–91.
- [10] House C D, Vaske C J, Schwartz A M, et al. Voltage-gated Na^+ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(17): 6957–67.
- [11] Nelson 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.
- [12] 沈建军, 王燕. PCNA 和 P53 在口腔癌中的表达及临床意义 [J]. *科学技术创新*, 2018(9): 53–4.
- [13] Chandolia B, Basu S K, Kumar M. Can MMP-9 be a prognostic marker for oral squamous cell carcinoma [J]. *J Clin Diagn Res*, 2016, 10(1): ZC09–13.

二苯乙烯苷减轻小鼠急性脑缺血再灌注后的氧化应激损伤及其对自噬的影响

张奇龙¹, 薛威¹, 徐博涵², 唐虹¹, 江勤¹, 董六一¹

摘要 目的 研究小鼠急性脑缺血再灌注损伤(CIRI)后二苯乙烯苷(TSG)对自噬作用的影响及其神经保护作用。方法 雄性昆明种小鼠100只,随机分为假手术组、模型组和TSG低、中、高剂量组(3、6、12 mg/kg)。采用双侧颈总动脉结扎法建立急性脑缺血再灌注模型,缺血2 h再灌注24 h,于缺血和再灌注前尾静脉注射给药各1次。断头取脑检测脑组织含水量,采用试剂盒检测血清中超氧化物歧化酶(SOD)活性与丙二醛(MDA)含量,HE染色检测小鼠脑组织病理变化,蛋白质印迹法检测自噬相关蛋白的表达。结果与模型组比较,TSG组脑皮层神经元的病理性损伤较轻,神经元数量增加,形态改善,核固缩减轻;TSG中、高剂量组显

著降低脑组织含水量及MDA的含量,并可显著升高血清中SOD活性($P < 0.01$),TSG高剂量组亦可显著抑制自噬相关基因Atg6(Beclin1)和微管相关蛋白1轻链3(LC3-II/I)蛋白的表达($P < 0.05$)。结论 TSG对小鼠急性CIRI具有很好的神经保护作用,作用机制可能与抑制CIRI中自噬激活有关。

关键词 脑缺血再灌注;二苯乙烯苷;自噬;Beclin1;LC3-II/I
中图分类号 R 743.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)08-1232-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.08.013

2019-05-19 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1408085MH174)

作者单位:¹安徽医科大学药理学教研室,合肥 230032

²安徽医科大学第二临床医学院,合肥 230032

作者简介:张奇龙,男,硕士研究生;

董六一,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: dongly@ahmu.edu.cn

脑卒中是一类复杂的高发病,发病后其病死率、致残率及复发率均高,目前已经成为威胁人类健康的三大疾病之一。其中缺血性卒中约占脑卒中疾病总数的70%,是由于大脑血供障碍而引发的缺血、缺氧,导致局限性缺血性坏死的一种疾病^[1]。二苯乙烯苷(tetrahydroxystilbene glycoside, TSG)是从

siRNA-Nav1.5 interferes HSC-3 cells and changes in biological behavior *in vitro*

Dai Yongzheng, Qian Chengwei, Xu Xiaoli, et al

(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)

Abstract Objective To study the expression and biological effects of voltage-gated sodium channel 1.5 subtype (Nav1.5) on oral squamous cell carcinoma cell lines and tissues transfected with small interfering RNA (siRNA-Nav1.5), and analyze its possible regulatory mechanism. **Methods** Oral squamous cell carcinoma tissues and normal oral epithelium tissues were selected from clinical, immunohistochemistry was used to detect the expression of Nav1.5. Confocal microscope showed intracellular expression of Nav1.5. The expression levels of Nav1.5 in HSC-3 cells were transfected with siRNA-Nav1.5 liposome. Transwell and CCK8 were used to detect the invasion and proliferation of HSC-3 cells. Western blot and RT-PCR were used to validate the expression of related protein PCNA, MMP-2 and MMP-9. **Results** Immunohistochemical results showed that Nav1.5 was positively expressed in oral squamous cell carcinoma, but no significant expression was observed in normal tissues. Immunofluorescence results showed positive expression of Nav1.5 in HSC-3 cells. The invasion and proliferation of HSC-3 cells transfected with siRNA-Nav1.5 were significantly suppressed. The expression of PCNA, MMP-2 and MMP-9 protein was decreased in HSC-3 cells after transfected with siRNA-Nav1.5. **Conclusion** Nav1.5 can promote the proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma by regulating the expression of PCNA, MMP-2 and MMP-9.

Key words oral squamous cell carcinoma; voltage-gated sodium ion channel; Nav1.5; invasion; proliferation