

• 论 著 •

Livin 基因对口腔鳞癌细胞 TCA8113 增殖及凋亡调控作用的研究*

陈雁南¹, 胡 渝¹, 龚媛媛^{2△}

(1. 重庆市人民医院口腔科 400013; 2. 重庆医科大学附属口腔医院修复科/
口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室 400015)

摘要:目的 研究 Livin 基因在口腔鳞癌细胞 TCA8113 凋亡和增殖中的作用。方法 通过建立高表达的 Livin 基因、RNA 的干扰载体和脂质体转染的 TCA8113 细胞,采用 Western blot 和荧光定量 PCR 进行转染 mRNA 及蛋白表达变化的验证。细胞经 Annexin V/PI 染色,流式细胞仪检测其凋亡;四甲基偶氮唑蓝(MTT)分析转染后细胞增殖。结果 细胞转染 pcDNA3.1-Livin 后高表达,而 pSuper-shLivin 转染后 Livin 基因被有效沉默。MTT 增殖检测结果表明,高表达的 Livin 基因能促进 TCA8113 细胞增殖,而沉默的 Livin 基因能抑制细胞的增殖。细胞凋亡检测结果表明,高表达的 Livin 基因能抑制细胞凋亡,而沉默的 Livin 基因促进细胞凋亡。转染细胞时与顺铂同时使用后发现沉默的 Livin 基因能增强顺铂诱导细胞凋亡的能力。结论 本研究证实, Livin 基因的高表达和沉默能有效调控口腔鳞癌细胞 TCA8113 系的凋亡和增殖。顺铂与沉默的 LIVIN 基因联合使用后,诱导细胞凋亡的能力显著增强。

关键词: Livin; 口腔鳞癌; TCA8113; RNA; 高表达

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.09.010 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)09-1230-03

Research on the effect of gene Livin on regulating apoptosis and proliferation in oral squamous cell carcinoma cell line TCA8113*

CHEN Yannan¹, HU Yu¹, GONG Yuanyuan^{2△}

(1. Department of Stomatology, Chongqing General Hospital, Chongqing 400013, China; 2. Department of Prosthodontics, Affiliated Stomatology Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400015, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of Livin gene in the proliferation and apoptosis in oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell line TCA8113. **Methods** Over expression plasmid pcDNA3.1-Livin and RNAi vector pSuper-shLivin were constructed and transfected into OSCC cell line TCA8113 with lipofectamine 2000. Quantitative PCR or Western blot were used to validate the mRNA or protein expression level. The proliferation rate of TCA8113 cells was detected by MTT assay. The apoptosis was analyzed by Annexin V/PI staining and flow cytometry. **Results** Livin was highly expressed after pcDNA3.1-Livin transfection. While mRNA level of Livin was silenced after pSuper-shLivin transfection. Over-expression of Livin promoted TCA8113 cells proliferation and inhibited its apoptosis. In contrast, RNA silencing of Livin couldn't inhibit TCA8113 cells proliferation and promote apoptosis. **Conclusion** Livin gene can effectively promote the proliferation and inhibit the apoptosis of OSCC cell line TCA8113, and RNA silencing of Livin can effectively enhance the sensitivity of cisplatin-induced apoptosis.

Key words: Livin; oral squamous cell carcinoma; TCA8113; RNA; over-expression

在头颈部恶性肿瘤中,口腔癌较为常见,仅次于鼻咽癌,占所有肿瘤的 3%^[1]。口腔癌的恶性程度均较高,5 年生存率仅有 50%。在所有类型的口腔癌中,口腔鳞癌的恶性程度最高^[2]。最近发现的 Livin 基因,属于凋亡抑制蛋白家族(IAPs)。以往的研究中,对 Livin 基因抗细胞凋亡的机制研究地较透彻,Livin 基因发挥抑制细胞凋亡的作用是通过活化天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)的抑制来实现的。Livin 基因在杆状病毒细胞凋亡蛋白重复结构域(BIR)与 Caspase-3、Caspase-9 等蛋白结合后 Caspase 蛋白失活和降解,从而发挥抑制凋亡的作用^[3]。恶性肿瘤逃逸免疫效应细胞的杀伤往往也是通过抑制凋亡通路来实现的。有研究表明在健康组织中 Livin 基因低表达甚至不表达,而在很多肿瘤特别是恶性肿瘤(包括乳腺癌、宫颈癌、肠癌、前列腺癌、淋巴瘤、黑色素瘤等)中可以检测到高表达^[4]。李向新等^[5]对 48 例口腔鳞癌组织的研究中发现,Livin 基因高表达,而在正常口腔黏膜上皮细胞中,Livin 基因无表达,这提示,Livin 基因在口腔鳞癌的形成和发展中可能起重要作用^[6-7]。凋亡相关蛋白跟肿瘤的研究是目前研究关注的重点^[8],但是至今为止,还没有 Livin 基因与口腔

鳞癌细胞增殖与凋亡相关的研究。本研究以口腔鳞癌 TCA8113 细胞系为模型,试图通过高表达以及 RNAi 沉默 Livin 基因,研究 Livin 基因对口腔鳞癌细胞系凋亡和增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料来源 人口腔鳞癌细胞株 TCA8113(采集自重庆医科大学基础医学院);胎牛血清、RPMI1640(Gibco 公司,美国);总 RNA 提取试剂 Trizol、转染试剂 LipofectamineTM2000(Invitrogen 公司,美国);PCR 试剂、实时荧光定量 PCR 试剂盒、反转录试剂盒(Promega 公司,美国);鼠抗人 Myc 单克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology 公司,美国);HRP 标记的兔抗鼠二抗体(中杉金桥生物技术有限公司,中国);四甲基偶氮唑蓝(MTT, Sigma 公司,美国);Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒(深圳晶美生物工程有限公司,中国);普通 dNTP 和 Taq 酶等试剂以及引物合成、测序:由生物工程公司完成;顺铂(山东齐鲁制药厂,中国);pSuper 和 pcDNA3.1 载体:本实验室保存。

1.2 细胞培养 在 DMEM 培养基(10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素)中进行细胞培养。将人口腔鳞癌

* 基金项目:重庆市教委课题(KJ400234)。

作者简介:陈雁南,男,主治医师,主要从事牙齿移动与颌骨改建方面的研究。△ 通信作者,E-mail:gongyy_good@yeah.net。

细胞株 TCA8113 置于培养基中,根据试验需求,培养皿规格 10 cm,传代密度 90%左右,以 2×10^5 于 6 孔板接种,培养时放进 37 °C、5%CO₂ 培养箱中。部分实验组还需加入浓度为 4 μL/mL 的化疗药物顺铂。

1.3 质粒构建及转染 根据文献设计靶标为 19nt 的短发夹 RNA(shRNA)序列^[9],序列根据需要有所调整,shLivin 靶序列为:sense 5'-GAG AGG UCC AGU CUG AAA G-3',antisense 5'-CUU UCA GAC UGG ACC UCU C-3'。按说明书要求合成合适的序列,连接进 pSuper 载体,构建重组 pSuper-shLivin 干扰载体。提取总 RNA,反转录为 cDNA,用 Livin 引物扩出 Livin 基因 CDS 全长,克隆进 pcDNA3.1 载体,构建 pcDNA3.1-Livin-Myc 高表达载体。用 Lipo2000 (Invitrogen 公司)进行转染,设立空载体做对照,严格按说明书操作:接种细胞于 24 孔或 96 孔板,使转染前细胞密度为 50%~70%,转染时更换培养基为无双抗培养基;准备 2 μL Lipo2000 试剂和 50 μL Opti-MEM,同时取 0.8 μg 质粒溶于 50 μL Opti-MEM,静置 5 min,混匀后再静置 20 min,最后进行细胞转染。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测 实时荧光定量 PCR 的检测过程依照 Promega 公司说明书进行。Trizol 提取总 RNA (Invitrogen),反转录为 cDNA 模板。Livin 引物:sense 5'-GTC AGT TCC TGC TCC GGT CAA-3',antisense 5'-GGG CAC TTT CAG ACT GGA CCT C-3',GAPDH 引物,sense 5'-GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC-3',antisense 5'-ATG GTG GTG AAG ACG CCA GT-3'。反应条件:95 °C 初始变性 10 min;94 °C 变性 10 s;60 °C 退火 30 s;72 °C 延伸 30 s;进行 40 个循环,再根据 Ct 法,计算相对 mRNA 水平。

1.5 Western blot 检测 制备聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)时,先用浓缩胶 80 V 和分离胶 120 V,电泳保持稳压,在溴酚蓝刚跑出凝胶时,停止电泳,再取出凝胶,转膜后取出聚偏二氟乙烯膜,用 TBST 洗涤后脱脂牛奶室温封闭,1 h 后在室温下加入一抗(Anti-Myc 抗体 1:3 000 稀释)孵育 2 h,再加入二抗(1:5 000 稀释)室温反应 1 h,每次更换孵育液时,必须用 TBST 洗,重复 3 次,最后以化学发光底物进行曝光检测。

1.6 Annexin V/PI 检测细胞凋亡 在离心收集细胞时弃用上清,再用预冷的 PBS(1 mL)洗涤。将细胞重悬于 200 μL Binding Buffer,加入 10 μL Annexin V 试剂混匀,冰上反应 30 min,加入 5 μL PI 以及 300 μL Binding Buffer,使总反应体系为 500 μL。反应结束后流式细胞仪(BD FACSCalibur)检测。

1.7 MTT 比色法检测细胞增殖 于 96 孔板中接种收集的细胞,按照每孔 2×10^4 接种。细胞的收集应在 10 cm 培养皿中中长到 70%~80%满时,待均匀悬浮至单细胞后进行。按 1.3 所述进行细胞转染。转染后 24、48、72、96 h 每孔加入 MTT (浓度为 10 mg/mL)试剂 10 μL,在 CO₂ 培养箱(浓度 5%,温度 37 °C)中培养 4 h。培养后吸出孔内培养液,每孔中加入二甲亚砜(DMSO)150 μL。最后用酶标仪进行吸光值 OD490 的检测。未转染组为对照组,将其细胞增殖率定为 100%。各实验组细胞增殖率的计算方法:(各实验组 OD490/对照组 OD490)×100%。

1.8 统计学处理 使用 SPSS10.0 软件对数据进行分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$,组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Livin 基因低表达的实时荧光定量 PCR 检测 TCA8113 细胞的转染使用两个载体,一是 pSuper 空载体,二是 pSuper-shLivin 低表达载体。使用 pEGFP 转染细胞,流式细胞仪检测

绿色荧光信号。转染 48 h 后,转染 pSuper-shLivin 的实验组 mRNA 表达水平明显下调,为 $(35.3 \pm 12.0)\%$,pSuper 空载体的对照组为 $(98.3 \pm 5.5)\%$,RNA 干扰后 Livin 表达明显下调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 Western blot 检测 Livin 基因高表达 用 pcDNA3.1 空载体和 pcDNA3.1-Livin-Myc 高表达载体转染 TCA8113 细胞,24 h 后,pcDNA3.1-Livin-Myc 高表达载体带有 Myc 标签,Anti-Myc 抗体可检测到融合 Myc 蛋白的高表达 Livin 基因。在检测转染 pcDNA3.1-Livin 的实验组中可见条带,而空载体的对照组中未检测到条带,此结果说明转染的 Livin 基因被有效高表达。见图 1。

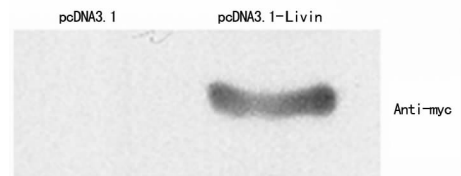


图 1 Western blot 检测转染后 Livin 基因高表达

2.3 Livin 基因高表达对 TCA8113 细胞增殖影响的 MTT 检测 转染 48 h 后,对照组和 Livin 基因高表达组 TCA8113 细胞增殖情况以 MTT 法进行检测。检测时间点为 24、48、72、96 h,结果显示高表达的 Livin 基因组中细胞增值率均比对照组的细胞增值率高。其中 48 h 时,Livin 基因高表达组的细胞增值率为 $(65.2 \pm 1.9)\%$,对照组 $(55.7 \pm 2.4)\%$,差异有统计学意义($P < 0.05$),结果表明转染后的 Livin 基因被高表达,这可以促进 TCA8113 细胞的增殖。

2.4 Livin 基因的沉默对 TCA8113 细胞增殖影响的 MTT 检测 检测时间点选取 24、48、72、96 h,结果显示实验组中 Livin 基因沉默后的细胞增殖率比对照组低,其中 48 h 时的增值率分别为对照组 $(61.2 \pm 2.1)\%$,Livin 沉默组 $(52.2 \pm 1.6)\%$,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明,Livin 基因的沉默对 TCA8113 细胞的增殖起到抑制作用。

2.5 Annexin V/PI 检测 Livin 基因高表达对 TCA8113 细胞凋亡的影响 细胞转染 48 h 后进行 Annexin V/PI 染色,使用流式细胞仪进行凋亡检测。Livin 基因高表达组的细胞凋亡率为 9%,而对照组中,细胞凋亡率为 15%。用顺铂处理对照组和高表达组 TCA8113 细胞,联合顺铂使用后的结果显示,对照组中细胞凋亡率为 36%,Livin 基因高表达组则为 19%,凋亡率显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.6 Annexin V/PI 检测 Livin 基因沉默对 TCA8113 细胞凋亡的影响 Livin 基因沉默后检测 TCA8113 细胞的凋亡情况,分析表明,对照组的凋亡率为 12%,而 Livin 低表达后凋亡率升高到 23%。用顺铂处理对照组和 Livin 低表达组 TCA8113 细胞,结果表明,对照组顺铂处理后的凋亡率为 31%,Livin 沉默组顺铂处理后为 64%,凋亡率显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨 论

含有 7 个外显子的人 Livin 基因由 298 个氨基酸组成,是一种编码蛋白。该基因具体位置在人类染色体 20q13.3。在 Livin 蛋白的 N 端是杆状病毒凋亡抑制重复序列(BIR),而 C 端则是 RING 结构域。该基因对细胞凋亡的抑制作用是通过 BIR 结构域来发挥的。Livin 特异性表达于人胚胎组织,在成人的大多数组织中没有表达或者表达量极低,主要在胎儿发育过程中起重要作用。Livin 基因的异常表达在许多人类肿瘤中均可发现,如黑色素瘤、肺癌、膀胱癌、白血病、乳腺癌以及多种

消化系统肿瘤等,说明该基因与肿瘤的发生和发展相关^[10-14]。分子标志物的筛查是肿瘤发现和诊断的重要依据,寻找肿瘤标志物是本研究的重点所在^[15-16]。有研究证实,在口腔鳞癌组织中可以检测到高表达的 Livin 基因,而在正常口腔黏膜中未发现^[5],这提示 Livin 基因与口腔鳞癌的发生、发展有关。

本研究构建了 pSuper-shLivin 干扰载体以及 pcDNA3.1-Livin 高表达载体,在口腔鳞癌 TCA8113 细胞中高效沉默或者外源高表达 Livin 基因。实时荧光定量 PCR 检测的结果显示,在实验组中,Livin 基因 mRNA 在转染 shLivin 后的表达量与对照组中转染空载体的表达量相比显著减少。本研究构建了带有 Myc 标签蛋白的 pcDNA3.1-Livin-Myc 高表达载体,可用 Anti-Myc 抗体检测到融合带有 Myc 蛋白的高表达 Livin 基因,这通过 Western blot 的检测得到证实。

有效进行高表达和低表达实验后,本研究进一步用 MTT 实验检测 Livin 基因对 TCA8113 细胞增殖的影响。结果表明在不同时间点均能检测到对细胞增殖的促进,外源高表达 Livin 基因对 TCA8113 细胞的增殖有明显的促进作用,其中 48 h 时的增值率分别为对照组(55.7±2.4)%,Livin 高表达组(65.2±1.9)%。与之相符,Livin 基因沉默能够抑制 TCA8113 细胞的增殖,不同时间点 Livin 低表达细胞的增值率均低于对照组细胞,其中 48 h 时的增值率分别为对照组(61.2±2.1)%,Livin 沉默组(52.2±1.6)%。这些数据证实了本研究的推测,Livin 基因的表达量跟口腔癌细胞系的增殖相关,也间接说明口腔癌组织中 Livin 基因的高表达与肿瘤的发生、发展密切相关。Annexin V/PI 染色后,本研究用流式细胞仪检测细胞凋亡的情况,以此研究 Livin 基因对 TCA8113 细胞凋亡的影响。研究结果表明经外源性高表达的 Livin 基因能极大地抑制细胞凋亡,而 Livin 基因的沉默对细胞凋亡则有促进。

近年来关于化疗药物的研究,结果表明启动肿瘤细胞的凋亡是其作用机制。而对化疗药物引发细胞凋亡的对抗则是肿瘤细胞耐药性产生的主要原因。当前化疗药物在临床使用中需要解决的关键问题就是肿瘤细胞的耐药性,也就是怎样消除肿瘤细胞对化疗药物引发细胞凋亡的对抗。本研究发现,Livin 基因高表达后对 TCA8113 细胞的增殖和凋亡均有影响。根据此结果,假设 Livin 基因为肿瘤治疗的靶点,选择性抑制其表达,Livin 基因对肿瘤细胞凋亡的抑制则可消除,从而可以解决肿瘤细胞耐药性的问题。为探索 Livin 基因作为靶点联合化疗药物治疗口腔癌的可能性,本研究用顺铂处理 Livin 高表达或低表达的细胞。顺铂是临床常用的化疗药物之一,本研究发现顺铂处理后,Livin 高表达细胞的病死率显著下降,而 Livin 沉默细胞的病死率显著升高。这些结果初步表明,沉默 Livin 基因并联合化疗药物对口腔癌细胞的杀伤是有效果的。

本研究结果证实,Livin 基因高表达后对口腔鳞癌 TCA8113 细胞系的增殖和凋亡均有影响。通过 RNAi 技术对 Livin 基因表达沉默后,对 TCA8113 细胞的增殖产生抑制,促进细胞凋亡,这能有效降低口腔鳞癌 TCA8113 细胞对化疗药物的耐药性。在口腔鳞癌细胞中 Livin 基因高表达,在下一步的研究中以 Livin 基因为靶点,探索口腔鳞癌治疗的新方法。

参考文献

[1] Da Silva SD, Ferlito A, Takes RP, et al. Advances and applications of oral cancer basic research[J]. Oral Oncol, 2011, 47(9):783-791.

[2] Mueller CK, Thorwarth M, Schultze-Mosgau S. Late changes in cutaneous gene expression patterns after adjuvant treatment of oral squamous cell carcinoma(OSCC) by radiation therapy[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2010, 109(5):694-649.

[3] Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member[J]. J Biol Chem, 2001, 276(5):3238-3246.

[4] Wang L, Zhang Q, Liu B, et al. Challenge and promise: roles for Livin in progression and therapy of cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(12):3661-3669.

[5] 李向新, 蒋蕾, 白玲, 等. Livin 和 PCNA 在口腔鳞癌中的表达及意义[J]. 实用口腔医学杂志, 2011, 27(4):562-565.

[6] Chang H, Schimmer AD. Livin/melanoma inhibitor of apoptosis protein as a potential therapeutic target for the treatment of malignancy[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(1):24-30.

[7] Yan B. Research progress on Livin protein: an inhibitor of apoptosis[J]. Mol Cell Biochem, 2011, 357(1/2):39-45.

[8] 刘加强, 刘洪臣. 细胞凋亡及其在牙周领域中的研究进展[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2010, 8(2):110-113.

[9] Wang H, Tan SS, Wang XY, et al. Silencing livin gene by siRNA leads to apoptosis induction, cell cycle arrest, and proliferation inhibition in malignant melanoma LiBr cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28(12):1968-1974.

[10] Hariu H, Hirohashi Y, Torigoe T, et al. Aberrant expression and potency as a cancer immunotherapy target of inhibitor of apoptosis protein family, Livin/ML-IAP in lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(3):1000-1009.

[11] Gazzaniga P, Gradilone A, Giuliani L, et al. Expression and prognostic significance of LIVIN, SURVIVIN and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer[J]. Ann Oncol, 2003, 14(1):85-90.

[12] 李建广, 贾秀红, 唐慎华, 等. Livin 基因在儿童急性白血病中的表达及其意义[J]. 肿瘤防治研究, 2012, 39(1):41-43.

[13] Yagihashi A, Asanuma K, Nakamura M, et al. Detection of anti-survivin antibody in gastrointestinal cancer patients[J]. Clin Chem, 2001, 47(9):1729-1731.

[14] Qiuping Z, Jei X, Youxin J, et al. CC chemokine ligand 25 enhances resistance to apoptosis in CD4⁺ T cells from patients with T-cell lineage acute and chronic lymphocytic leukemia by means of livin activation[J]. Cancer Res, 2004, 64(20):7579-7587.

[15] 侯劲松, 黄洪章, 王建广, 等. Fas 基因转染对舌鳞癌 Tca8113 细胞生物学特性的影响[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2004, 2(4):202-204.

[16] 孔祥盼, 西玉立, 步荣发, 等. 表观遗传学在口腔鳞状细胞癌分子机制中的研究进展[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2013, 11(4):244-248.