

斯钙素2对口腔鳞癌细胞的作用及机制研究

杨舒雯^{1,2}, 王宇¹, 杨恭²

1. 复旦大学附属肿瘤医院头颈外科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032;
2. 复旦大学附属肿瘤医院肿瘤研究所, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032

[摘要] 背景与目的: 口腔颌面部恶性肿瘤中约80%以上为口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC), 虽过去的几十年诊断及治疗技术不断改进, 其存活率却没有得到明显改善, 5年生存率仍小于50%。该研究旨在探讨斯钙素2(stanniocalcin 2, STC2)对口腔鳞癌细胞KB的增殖、凋亡及侵袭迁移的影响。方法: 构建STC2的RNA干扰载体, 将其转染KB细胞使STC2基因沉默后, 采用CCK8实验检测STC2对KB细胞增殖的影响, 通过APC Annexin V/7-AAD染色、流式细胞术检测细胞凋亡情况, 分析STC2对细胞凋亡的影响。细胞划痕和细胞小室(Transwell)试验分析比较STC2基因沉默后对口腔鳞癌细胞侵袭和迁移的差异。最后用蛋白[质]印迹法(Western blot)检测凋亡、转移相关蛋白。结果: 成功构建KB细胞STC2敲除细胞系, CCK8增殖实验结果显示, STC2沉默后, 细胞增殖被明显抑制, 其生长速度低于对照组($P < 0.001$)。在顺铂诱导细胞凋亡过程中, STC2沉默后KB细胞凋亡一定程度被促进。与KB细胞相比, STC2沉默后的细胞迁移和侵袭性明显减弱。Western blot检测发现, 沉默STC2后Bcl-2、促细胞迁移和侵袭蛋白Caveolin-1和 β -catenin表达下调, bax表达上升。结论: STC2可能参与调控口腔鳞癌细胞KB的增殖凋亡, 促进KB细胞的侵袭转移能力, 同时一定程度上减弱KB对化疗药物顺铂的敏感性。

[关键词] 口腔肿瘤; 增殖; 侵袭; 转移

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2015.04.005

中图分类号: R73-37 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2015)04-0269-06

The role of stanniocalcin 2 in oral squamous cells carcinoma YANG Shuwen^{1,2}, WANG Yu¹, YANG Gong² (1. Department of Head and neck Surgery, Fudan University Shanghai Cancer Center, Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China, 2. Department of Cancer Research Center, Fudan University Shanghai Cancer Center, Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: WANG Yu E-mail: neck130@hotmail.com

[Abstract] **Background and purpose:** About 80% patients with oral and maxillofacial malignant tumor are oral squamous cell carcinoma (OSCC). OSCC is one of the most common cancers in the world with less than 50% survival rate over 5 years. This experiment aimed to explore the effect of stanniocalcin 2 (STC2) on apoptosis, proliferation, migration and invasion of OSCC cell. **Methods:** RNA interference (RNAi) vector pLKO.1-shSTC2 was constructed and transfected into KB cells. Cell proliferation and cell apoptosis were then assessed by CCK8, APC Annexin V/7-AAD and flow cytometry. Differences of migration and invasion between KB scr and KB STC2i were examined by cell scratch and transwell tests. Finally, this study detected the apoptosis-associated proteins and metastasis-associated proteins by Western blot. **Results:** STC2 down-regulation plasmid was constructed and transfected into KB cells. CCK8 proliferation assay revealed that the STC2 down-regulation inhibited KB cells proliferation. By treating with cisplatin, this study found that STC2 silence could facilitate cell apoptosis significantly. With the knock down of STC2 gene, the expressions of Bcl-2, Caveolin-1 and β -catenin were decreased but the expression of bax was obviously increased. **Conclusion:** These data suggest that STC2 may be involved in the apoptosis, proliferation, migration and invasion of OSCC KB cells. Simultaneously, it can significantly weaken the sensitivity of KB cells to chemotherapeutic drug cisplatin.

[Key words] Oral squamous cell carcinoma; Proliferation; Invasion; Migration

头颈部恶性肿瘤主要影响口腔、舌咽、咽喉、喉部及涎腺等, 位居常见恶性肿瘤的第六位, 恶性程度较高, 虽然随着早期诊断水平以及手术、放化疗的综合治疗水平提高, 患者5年生存率仍小于50%^[1-2]。近年来, 靶向药物已成为研究的热点, 因此, 研究口腔鳞癌发生、发展过程中的分子生物学机制, 寻找更多的潜在靶点十分必要。

斯钙素(stanniocalcin, STC)是一种糖蛋白激素, 最早在硬骨鱼中发现, 由鱼类独有的内分泌腺——斯坦尼小体(corpuscles of stannius, CS)所分泌。其生理作用在于抑制腮、肠的Ca²⁺转运使血钙降低和促进肾脏磷酸盐的重吸收。近年来发现, 在人和其他哺乳动物中也存在STC样蛋白, 分别命名为STC1和STC2。STC2基因定位于染色体5q35, 包含4个外显子, 302个氨基酸残基, 相对分子质量约为33×10³, 和STC1有30%左右氨基酸同源性, 广泛表达于各种组织, 在心血管疾病、炎性反应细胞迁移、胚泡着床和子宫的蜕膜化等多方面都起重要作用, 且越来越多的研究表明STC2的表达与人类肿瘤的发展过程相关, 是肿瘤治疗的潜在分子靶点^[3]。目前国内、外关于STC2在口腔鳞癌中的表达及作用的研究鲜见报道。本研究通过抑制STC2在口腔鳞癌细胞KB中的表达, 探讨了STC2在口腔鳞癌细胞系中的具体作用。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

口腔鳞癌细胞株KB由中国科学院上海生命科学研究所生物化学与细胞生物学研究所细胞库提供, 慢病毒包装细胞293T购自美国ATCC公司。鳞癌细胞培养于DMEM培养基(购自美国Gibco公司), 含10%胎牛血清、1 mmol/L非必需氨基酸、2 mmol/L L-谷氨酰胺、100 U/mL青霉素及100 μg/mL链霉素, 慢病毒包装细胞293T用含10%胎牛血清、1 mmol/L非必需氨基酸、2 mmol/L L-谷氨酰胺的DMEM培养基, 置于37 ℃, CO₂体积分数为5%的恒温培养箱中培

养。当细胞在培养皿中长到约90%时, 移去培养液, 用磷酸盐缓冲溶液(PBS)清洗, 加入含EDTA的0.25%胰酶溶液消化传代。

1.2 真核质粒载体的构建

STC2干扰质粒构建按常规操作, 设计合成特异性STC2 shRNA 靶序列5'-GAATGCTACCTCAAGCACGA-3'靶向STC2 mRNA 的412-431核苷酸序列, 按要求合成序列, 随后克隆到载体pLKO.1中, 经过酶切、连接, 构建成STC2干扰重组质粒pLKO.1-shSTC2。所有实验用载体均经过测序验证。

1.3 细胞系构建

将构建的pLKO.1-shSTC2质粒载体转染293T细胞, 随后对目的细胞KB感染, 构建稳定表达的KB-STC2i细胞系, 感染48 h后收集细胞行蛋白[质]印迹法(Western blot)检测。

1.4 Western blot检测

将收集好的细胞沉淀用含蛋白酶抑制剂的裂解液缓冲液RIPA裂解后, BCA法测定蛋白浓度(试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司), 然后用6×SDS加样缓冲液制备成适当浓度的样品, 用100 ℃左右的水浴处理样品5~10 min。用10%的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离裂解的蛋白样品, 然后将蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF membrane)上, 并用10%的脱脂奶粉(Bio-Rad)在室温下封闭2 h。此后依次加入一抗和HRP(辣根过氧化物酶)-偶联的二抗(依一抗而定)。转移到膜上的蛋白用化学发光底物(ECL购自Millipore公司)进行显色后, LAS4000化学发光成像分析仪曝光显出条带。

1.5 细胞增殖检测

细胞分别以每孔1 000个细胞的密度接种于96孔板, 每个时间点做6个平行样本, 将培养板置37 ℃, CO₂体积分数为5%的条件下培养。分别在24、48、72、96、120和144 h时向每孔加入10 μL CCK8溶液, 在培养箱内温育2 h。用酶标仪测定在450 nm处的吸光度(D), 计算每6孔的D值的平均值和标准差, 绘制细胞生长曲线。

1.6 细胞凋亡实验

将细胞铺入6 cm培养皿中, 贴壁后加药,

顺铂浓度：4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，处理72 h后胰酶消化细胞，PBS清洗离心，按细胞凋亡试剂盒说明书(APC Annexin V和7-AAD，美国BD公司)操作规程，加入100 μL 1 \times 缓冲液(10 \times 缓冲液用ddH₂O稀释而成)，然后加入5 μL APC Annexin V和5 μL 7-AAD混匀，避光温育15 min，1 h内进行流式细胞仪分析检测STC2对顺铂诱导细胞凋亡的影响。

1.7 细胞划痕实验

分别将KB、KB-STC2i细胞等量接种至6孔板中，每种细胞接种3个平行孔。等细胞完全融合时，再用10 μL 枪头在每孔单层细胞上划痕，每孔划出的“伤口”宽度要保持一致。PBS清洗1次，加无血清培养基，置37 $^{\circ}\text{C}$ ，CO₂体积分数为5%的培养箱中培养，于0、24和48 h分别观察划痕愈合情况并拍照。计算不同时间段细胞迁移的距离，以迁移距离反映细胞迁移性，实验重复3次。

1.8 细胞侵袭实验

实验采用带有8 μm 微孔聚碳酸酯膜的Transwell小室(购自美国BD公司)。首先将Matrigel(50 mg/L)胶和无血清DMEM培养基以1:3比例进行混合。在小室上室铺100 μL 混合好的Matrigel，37 $^{\circ}\text{C}$ 无菌保持过夜，确保Matrigel充分凝固。收集对数生长期的KB、KB-STC2i细胞，用无血清DMEM培养基调整细胞浓度为 $1\times 10^6/\text{mL}$ ，每孔加入100 μL 细胞悬浮液于上室，每种细胞加3个复孔，下室每孔加600 μL 无血清DMEM。置37 $^{\circ}\text{C}$ 、CO₂体积分数为5%的培养箱温育16 h后取出小室，滤膜用4%多聚甲醛固定20 min。用棉签小心擦去未侵袭的滤膜表面细胞，结晶紫染色，在光镜下随机选5个视野，计算单个视野细胞平均数，以穿过Matrigel的细胞数来表示肿瘤细胞的侵袭性，实验重复3次。

1.9 统计学处理

采用GraphPad Prism 5软件进行统计分析，实验组与对照组比较用 t 检验，两组以上数据比较用方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞系构建

在KB细胞内转染STC2 shRNA表达质粒，构建STC2低表达细胞系(STC2i)，运用Western blot验证转染后STC2表达情况(图1)，相比于转染无义shRNA的对照组(scr)，STC2i组细胞STC2的蛋白表达水平明显降低，说明细胞系构建成功。

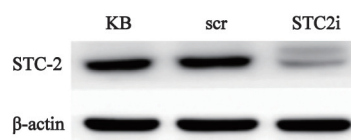


图1 Western blot检测pLKO.1-shSTC2质粒载体转染KB细胞后STC2表达水平

Fig. 1 Analysis of STC2 expression in OSCC cell line KB after transfected with STC2 pLKO.1-shSTC2

2.2 STC2促进KB细胞增殖

通过CCK8检测观察STC2对细胞增殖的影响，绘制生长曲线结果显示，随着时间延长，相比于对照组，KB细胞低表达STC2后细胞生长速度明显减慢，两组同一个时间点间比较差异均有统计学意义($P<0.05$ ，图2)。

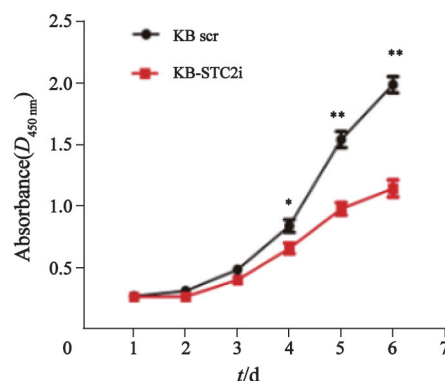


图2 下调STC2对KB细胞增殖的影响

Fig. 2 Effect of downregulation of STC2 on KB cell proliferation
*: $P<0.05$, **: $P<0.001$, compared with the control group.

2.3 STC2对顺铂诱导细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测顺铂处理后细胞凋亡情况，如图3所示，无顺铂处理的情况下，KB细胞凋亡率略低于STC2低表达后的细

胞($P=0.0178$); 应用顺铂处理的情况下, STC2低表达组的KB细胞凋亡率高于对照组($P=0.0163$)。可见STC2低表达一定程度上增强了口腔鳞癌细胞对顺铂的敏感性。

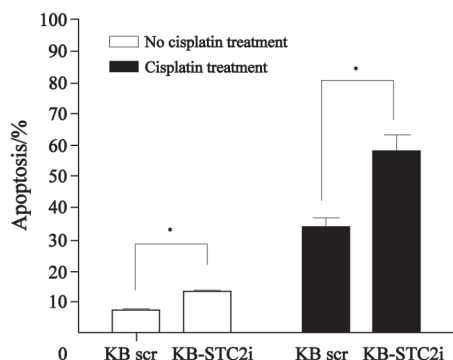


图3 STC2低表达对顺铂诱导的KB细胞凋亡的促进作用

Fig. 3 Promotion effect of STC2 silence on apoptosis of KB cells induced by cisplatin

*: $P<0.05$.

2.4 STC2具有增强KB细胞体外迁移和侵袭能力

细胞划痕检测结果显示, 24 h后KB细胞中“伤口”已有明显的缩小, 而KB-STC2i细胞迁移

距离较短, 48 h后KB细胞划痕已基本愈合, 而KB-STC2i细胞仍有一段距离未闭合($P<0.01$, 图4)。说明未敲除STC2的KB细胞的迁移性比敲除后的细胞强。

用带有Matrigel的Transwell小室检测KB和KB-STC2i细胞侵袭能力, 结果显示, 经过24 h体外培养, KB细胞穿过Matrigel的个数为 812 ± 143 (单个视野的平均数), 而KB-STC2i细胞穿过Matrigel的个数仅为 176 ± 38 (单个视野的平均数), 两者差异有统计学意义($P<0.001$, 图5)。说明KB细胞的体外侵袭性比KB-STC2i细胞强。

2.5 STC2使细胞中抑制凋亡相关蛋白表达

Western blot检测结果显示, STC2低表达的KB-STC2i相比于KB细胞, 低表达STC2后促凋亡蛋白bax表达上升, 而抑制凋亡蛋白Bcl-2、促细胞迁移和侵袭蛋白Caveolin-1和 β -catenin表达相对下调(图6)。说明STC2可能抑制KB细胞凋亡从而促进细胞增殖, 并参与调控KB细胞的迁移和侵袭。

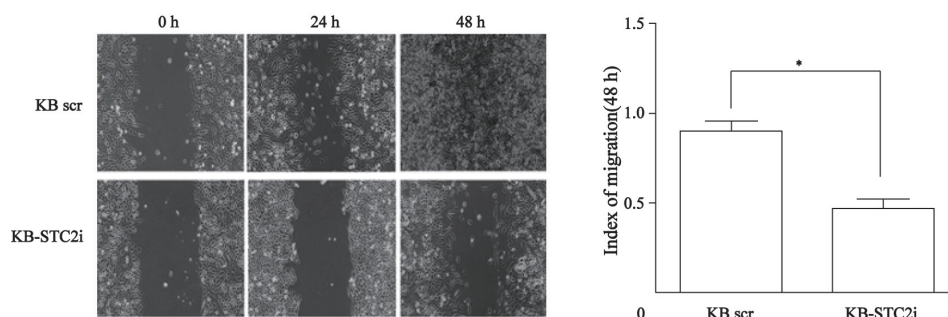


图4 KB细胞和STC2基因敲除后细胞体外迁移性的比较

Fig. 4 The comparison of the ability of migration between KB and KB-STC2i

*: $P<0.01$.

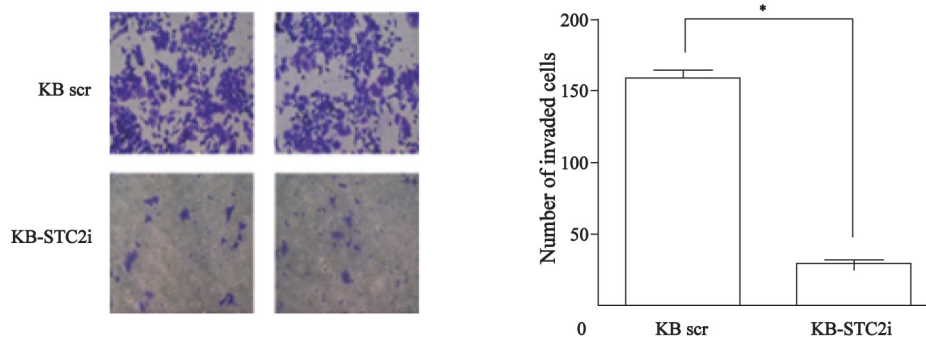


图5 KB细胞和STC2基因敲除后细胞体外侵袭性的比较

Fig. 5 The comparison of the ability of invasion between KB and KB-STC2i

*: $P<0.001$.

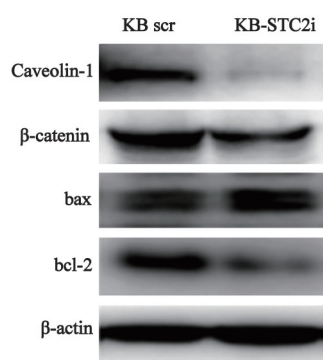


图6 KB细胞和沉默STC2后KB细胞中转移相关蛋白 β -catenin和Caveolin-1, 凋亡相关蛋白bax、Bcl-2表达的比较

Fig. 6 The difference in the expression of metastasis-promoting proteins Caveolin-1 and β -catenin and the expression of apoptosis-associated proteins bax and Bcl-2 between KB and KB-STC2i cells

3 讨论

研究已发现STC2的异常表达与肿瘤的发生、发展密切相关, 推测可用于评估肿瘤的恶性程度及增殖潜能。与相应的正常组织相比, STC2在多种肿瘤组织中均过表达, 如乳腺癌^[4]、成纤维细胞瘤^[5]、食管鳞癌^[6]、胃癌^[7]、结直肠癌^[8]、肾细胞癌^[9-10]、前列腺癌^[11]、子宫内膜癌^[12], 其中在结直肠癌、胃癌和肾细胞癌中, STC2高表达与患者生存率呈负相关。缺氧条件下, STC2是HIF-1的下游基因, 通过促进Rb和cyclinD的磷酸化, 促进细胞增殖、抑制凋亡^[13]。Ieta等^[14]将STC2基因转染至分化程度高且STC2基因低表达的结直肠癌细胞系中, 结果伴随着STC2基因表达的增加, 同时还出现细胞分化程度降低、细胞增殖旺盛等系列改变, 提示STC2可能通过参与调控细胞增殖来促进结肠癌细胞的侵袭及转移。此外, 有研究报道, STC2通过增加人成纤维细胞瘤细胞的基础凋亡率抑制细胞的增殖^[5]。因此, 关于STC2对肿瘤的具体作用尚不明确。

本研究采用体外细胞增殖、凋亡实验和Western blot检测发现, STC2参与调控口腔鳞癌细胞KB的增殖和凋亡。低表达STC2相比于对照组可抑制口腔鳞癌细胞的增殖($P < 0.05$)。流式

细胞仪检测了KB细胞和STC2低表达对细胞凋亡的影响, 结果显示在KB细胞凋亡过程中, STC2低表达相对促进细胞凋亡。因此, 推测STC2的异常表达与口腔鳞癌细胞KB的增殖有关。顺铂是头颈部鳞癌常用的化疗药物, 本实验用顺铂来诱导口腔鳞癌细胞凋亡, 结果发现, 在顺铂诱导细胞凋亡的过程中, STC2敲除后可明显促进凋亡, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 该结果表明干扰STC2可能增强顺铂对口腔鳞癌细胞的杀伤效果, 通过干扰STC2的表达来影响其凋亡或增殖通路, 从而增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性, 以提高治疗效果。

口腔鳞癌发生远处转移的时间早、比例高, 并且很多患者并不是因为原发病灶致死, 而是由于发生远处转移, 导致重要脏器功能丧失、全身衰竭、恶病质, 最后死亡^[15-17]。肿瘤转移是多因素、多步骤、多阶段过程, 一般受到多个通路和信号分子的调控, 肿瘤细胞的迁移是其侵袭转移的基础, 而且涉及机制非常复杂。同一种蛋白分子对不同的肿瘤甚至对同一种肿瘤在不同环境下有着不同调节作用。本研究采用体外细胞划痕、侵袭实验和Western blot检测发现STC2表达的KB细胞相比于对照组, 其促转移相关蛋白 β -catenin和Caveolin-1表达水平也较高, 差异均具有统计学意义, 提示STC2表达上调与口腔鳞状细胞癌的恶性程度、转移呈正相关性, STC2在口腔鳞癌中可能为肿瘤转移的促进因素。

综上所述, 通过体外实验的初步研究, 发现STC2可能作为口腔鳞癌治疗的潜在靶点, 可以通过干扰STC2的表达来影响口腔鳞癌细胞凋亡或增殖通路, 抑制其迁移侵袭, 并且可增强口腔鳞癌细胞对化疗药物的敏感性, 提高治疗效果, 在动物体内或人体组织中是否如此, 尚需更多的实验数据证实。

[参 考 文 献]

- [1] LISTL S, JANSEN L, STENZINGER A, et al. Survival of patients with oral cavity cancer in Germany [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53415.
- [2] TAN W J, CHIA C S, TAN H K, et al. Prognostic significance

- of invasion depth in oral tongue squamous cell carcinoma [J] . *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 2012, 74(5): 264–270.
- [3] CHANG A C, REDDEL R R. Identification of a second stanniocalcin cDNA in mouse and human: stanniocalcin 2 [J] . *Mol Cell Endocrinol*, 1998, 141: 95–99.
- [4] DONDETI VR, WUBBENHORST B, LAL P, et al. Integrative genomic analyses of sporadic clear cell renal cell carcinoma define disease subtypes and potential new therapeutic targets [J] . *Cancer Res*, 2012, 72: 112–121.
- [5] VOLLAND S, KUGLER W, SCHWEIGERER L, et al. Stanniocalcin 2 promotes invasion and is associated with metastatic stages in neuroblastoma [J] . *Int J Cancer*, 2009, 125, 2049–2057.
- [6] KITA Y, MIMORI K, IWATSUKI M, et al. STC2: a predictive marker for lymph node metastasis in esophageal squamous-cell carcinoma [J] . *Ann Surg Oncol*, 2011, 18: 261–272.
- [7] YOKOBORI T, MIMORI K, ISHII H, et al. Clinical significance of Stanniocalcin 2 as a prognostic marker in gastric cancer [J] . *Ann Surg Oncol*, 2010, 17: 2601–2607.
- [8] IETA K, TANAKA F, YOKOBORI T, et al. Clinicopathological significance of stanniocalcin 2 gene expression in colorectal cancer [J] . *Int J Cancer*, 2009, 125: 926–931.
- [9] MEYER HA, TOLLE A, JUNG M, et al. Identification of stanniocalcin 2 as prognostic marker in renal cell carcinoma [J] . *Eur Urol*, 2009, 55, 669–678.
- [10] CHANG A C, REDDEL R R. Identification of a second stanniocalcin cDNA in mouse and human: stanniocalcin 2 [J] . *Mol Cell Endocrinol*, 1998, 141: 95–99.
- [11] TAMURA K, FURIHATA M, CHUNG S Y, et al. Stanniocalcin-2 overexpression in castration resistant prostate cancer and aggressive prostate cancer [J] . *Cancer Sci*, 2009, 100(5): 914–919.
- [12] KOGA Y, YASUNAGA M, KAJIKAWA M, et al. Novel virtual cytological analysis for the detection of endometrial cancer cells using autoscan fluoromicroscopy [J] . *Cancer Science*, 2011, 102(5): 914–919.
- [13] LAW AY, WONG CK. Stanniocalcin-2 is a HIF-1 target gene that promotes cell proliferation in hypoxia [J] . *Exp Cell Res*, 2010a, 316, 466–476.
- [14] IETA K, TANAKA F, YOKOBORI T, et al. Clinicopathological significance of stanniocalcin 2 gene expression in colorectal cancer [J] . *Int J Cancer*, 2009, 125: 926–931.
- [15] DAHLSTROM K R, CALZADA G, HANBY J D, et al. An evolution in demographics, treatment, and outcomes of oropharyngeal cancer at a major cancer center: A staging system in need of repair [J] . *Cancer*, 2013, 119(1): 81–89.
- [16] WOŹNIAK A, SZYFTER K, SZYFTER W, et al. Head and neck cancer—history [J] . *Przegl Lek*, 2012, 69(10): 1079–1083.
- [17] DAVIS S J, DIVI V, OWEN J H, et al. Metastatic potential of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma [J] . *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2010, 136(12): 1260–1266.

(收稿日期: 2014-06-23 修回日期: 2014-11-28)