

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.06.006

SAA 对鼻咽癌 CNE2 细胞生物学行为的影响*

江青山, 邓 珊, 沈宝茗[△]

(南华大学附属第一医院耳鼻喉科, 湖南衡阳 421001)

摘要:目的 观察血清淀粉样蛋白 A(SAA)的超表达和抑制表达对鼻咽癌 CNE2 细胞生物学行为的影响。方法 体外培养 SAA 高表达的 pcDNA3.1(+)-SAA-CNE2 细胞系和干扰 SAA 表达的 pGPU6/GFP/Neo-SAA-CNE2 细胞系,两种细胞由课题组前期重组的 SAA 高表达 pcDNA3.1(+)-SAA 质粒及抑制 SAA 表达的 pGPU6/GFP/Neo-SAA 质粒分别转染构建。流式细胞仪分析以上两种细胞的细胞周期。平皿克隆实验检测细胞的增殖状况。结果 流式细胞仪检测细胞周期显示 SAA 表达的增多可促进 CNE2 细胞分裂。平皿克隆实验显示 SAA 可使 CNE2 细胞的增殖能力增强。结论 SAA 具有促进人鼻咽癌 CNE2 细胞增殖和体外迁移浸润的作用。

关键词:血清淀粉样蛋白 A;鼻咽肿瘤;CNE2 细胞;转染;细胞周期

中图分类号:R856

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)06-0736-02

Effects of SAA protein on biological behavior of nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells*

Jiang Qingshan, Deng Shan, Shen Baoming[△]

(Department of Otolaryngological, the First Affiliated Hospital of the University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Objective To observe the effects of over expression and inhibition expression of SAA protein on biological behavior of nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells. **Methods** pcDNA3.1(+)-SAA-CNE2 cell lines of high expression and pGPU6/GFP/Neo-SAA-CNE2 cell lines of interference expression of SAA protein in vitro. These two cells constructed by transfection of pcDNA3.1(+)-SAA plasmid of SAA high expression and pGPU6/GFP/Neo-SAA plasmids of SAA inhibition expression respectively, plasmids of which were previously successfully reconstructed by the research group. Cell cycle of these two cells was analyzed by flow cytometry with PI staining. The ability of cell proliferation was inspected by plate cloning-forming test. **Results** Flow cytometry showed that with the increase of expression of SAA protein, it had effect on promoting CNE2 cell division. Plate cloning-forming test showed that SAA protein can improve proliferation of the CNE2 cells. **Conclusion** SAA protein has the effect on promoting proliferation of human nasopharyngeal carcinoma CNE2 cell and migration in vitro.

Key words: serum amyloid A protein; nasopharyngeal neoplasms; CNE2 cell; transfection; cell cycle

鼻咽癌是一种发生于鼻咽部的恶性肿瘤,占头颈部肿瘤发病率首位,多发于东南亚各国和我国南方。恶性程度高,约 90% 属低分化鳞癌,主要的治疗方式是放疗。导致鼻咽癌的原因之一是遗传因素,目前已发现多个鼻咽癌相关易感基因。人血清淀粉样蛋白 A(SAA)是一组由多基因编码的蛋白家族,位于 11 号染色体 15.1 短臂上,属于急性期蛋白。SAA 不仅是炎症标志物,也可作为多种肿瘤的血清生物学标志。虽然 SAA 主要产生于肝脏,但是目前有研究发现,在人类某些正常或肿瘤组织中也有 SAA 的表达,并且在不同组织的恶性肿瘤发展过程中,血清中的 SAA 明显有一个高水平^[1]。本实验主要研究 SAA 对人鼻咽癌 CNE2 细胞分裂增殖能力的影响,探讨其促进肿瘤细胞生长的基本机制。

1 材料与与方法

1.1 材料 课题组前期已成功构建的 pcDNA3.1(+)-SAA 真核表达载体和 pGPU6/GFP/Neo-SAA 表达干扰载体。人鼻咽癌 CNE2 细胞株购自湖南湘雅细胞库。改良型 1640 培养基购于 Hyclone 公司。无支原体胎牛血清购自杭州四季青。二甲基亚砜(DMSO)购自 Applichem 公司。胰酶、G418 及 GIMSA 染液购自 Solarbio 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 鼻咽癌 CNE2 细胞、SAA 高表达的 pcDNA3.1(+)-SAA-CNE2 细胞系及干扰 SAA 表达的 pGPU6/GFP/Neo-SAA-CNE2 细胞系,分别设置为空白组、高表达组 and 低表达组。培养于含 12% 胎牛血清的 1640 培养液中,置于 37℃ 5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱内培养,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 流式细胞检测 消化培养瓶中的细胞,转移至 10 mL 的离心管中,800 r/min 离心 5min,弃上清,收集细胞沉淀。用 5 mL 预冷 PBS 离心洗涤 2 次,加入预冷的 75% 乙醇,于 4℃ 固定 12 h 以上。再次加入 5 mL 预冷 PBS 1 000 r/min 离心 5 min 洗涤,弃上清,加入 400 μL 溴化乙锭(PI, 50 μg/mL),100 μL RNase A(100 μg/mL),4℃ 避光孵育 30 min。用流式细胞仪进行检测,结果用细胞周期拟和软件 ModFit 分析。

1.2.3 平皿克隆实验 取对数生长期各组细胞,制成细胞悬液。取细胞悬液计数细胞数,加入一定量的培养基将细胞悬液按梯度倍数稀释,准备 6 个直径 6 cm 的培养皿,每个加入 2 mL 预温培养液,再分成 3 组,每组 2 个培养皿分别加入 100、200 个细胞,轻轻转动培养皿使细胞分散均匀。将培养皿置于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中,培养 2 周左右,期间适当换液,直至培养皿中可见较大克隆。弃去培养液,PBS 液小心浸

* 基金项目:湖南省卫生厅科研基金资助项目(B2010-047)。 作者简介:江青山(1971-),副主任医师,硕士,主要耳鼻喉科疾病的诊治与研究。 △ 通讯作者,E-mail:shenbaoming@163.com。

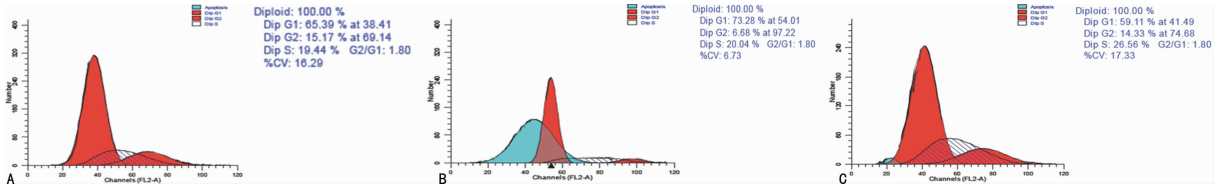
洗 2 次,再加入适量甲醛固定细胞 15 min。去固定液,加适量吉姆萨(GIMS)染液染色 10~30 min,流水缓慢洗去染色液,空气干燥。将培养皿倒置,其上覆盖一张带网格的透明胶片,肉眼直接观察计数克隆,计数大于 10 个细胞的克隆数。克隆形成率=(克隆数/接种细胞数)×100%。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析或 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

流式细胞仪检测细胞周期显示 SAA 表达的增多,促进 CNE2 细胞分裂。平皿克隆实验显示 SAA 可使 CEN2 细胞的增殖能力增强。见图 1,表 1、2。



A:空白组;B:低表达组;C:高表达组。

图 1 各组细胞周期变化情况

表 1 SAA 对各组细胞的细胞周期的影响 (%)

组别	G ₁ 期	S 期	G ₂ 期
低表达组	73.28	20.04	6.68
空白组	65.39	19.44	15.17
高表达组	59.11	26.56	14.33

表 2 不同组别细胞的克隆形成率 (%)

组别	接种 200 个细胞	接种 100 个细胞	平均
高表达组	45.0	30.0	32.5
低表达组	17.0	15.0	16.0
空白组	20.0	26.0	23.0

3 讨 论

SAA 基因位于 11 号染色体 15.1 短臂上,人类 SAA 的完整氨基酸序列已经获得,其基因序列和诱导能力在哺乳动物中的表达均高度保守^[2],表明 SAA 具有重要的生物学功能。目前,已发现多种与鼻咽癌的发生与转移有关的基因,如 HPV-DNA 基因^[3]、Galectin-3 基因^[4]等,SAA 基因也是其中之一。传统上,SAA 被认为是一种急性期蛋白,能够诱导炎症细胞的趋化、聚集^[5]。虽然 SAA 主要由肝细胞合成,但是有研究发现,在人类某些正常或肿瘤组织中也同样能够表达 SAA,且在不同器官及组织的恶性肿瘤发展过程中,SAA 在血清中具有一个明显的高水平。已有研究表明,SAA 与肿瘤具有极大的相关性^[6]。通过双向电泳/质谱技术研究鼻咽癌中的血清蛋白,结果发现,SAA 蛋白在鼻咽癌患者血清中的表达有所增高,SAA 是鼻咽癌潜在肿瘤标志物的可能性相对较大^[7]。另有研究发现,有淋巴结转移的鼻咽癌患者与无淋巴结转移的鼻咽癌患者比较,前者血清中 SAA 的表达量相对更高^[8-9]。

目前,已有一些研究提示 SAA 和某些肿瘤的转移有关。戴嵩玮等^[10]从肺癌患者血清中鉴定并证实了血清 SAA,其敏感性和特异性分别为 84.1%和 80.0%,表明血清 SAA 很可能成为肺癌诊断和病情监测的一个标志分子。Ramankulov 等^[11]研究了 98 例肾癌患者和 55 例健康对照者的血清,其中肾癌患者按 TNM 进一步细化分组,结果发现,SAA 的水平在发生转移的患者中有显著上升,从某种意义上说,SAA 与肾癌的转移有明显联系。Le 等^[12]应用表面增强激光解离/电离飞行时间质谱技术发现,SAA 是前列腺癌伴骨转移患者血清中有较高特异性和敏感性的蛋白。

CNE2 细胞和抑制 SAA 表达的 pGPU6/GFP/Neo-SAA-CNE2 细胞,采用流式细胞术及平皿克隆实验,分析 SAA 对 CNE2 细胞生长、增殖及细胞周期的影响。初步了解 SAA 在鼻咽癌 CNE2 生长增殖中的作用机制,为揭示其在鼻咽癌发生、发展过程中的分子机制提供实验依据。

综上所述,人 SAA 具有促进肿瘤细胞的分裂增殖能力,在临床上可通过检测和调节 SAA 的表达来指导鼻咽癌的治疗。

参考文献:

- [1] Malle E, Sodin-Semrl S, Kovacevic A. Serum amyloid A: an acute-phase protein involved in tumour pathogenesis [J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(1): 9-26.
- [2] Taylor BA, Rowe L. Genes for serum amyloid A proteins map to Chromosome 7 in the mouse [J]. Mol Gen Genet, 1984, 195(3): 491-499.
- [3] 沈娜,张潜英,陈鸿雁,等. siRNA 抑制 HPV16E6 基因对鼻咽癌细胞生物学特性的影响[J]. 重庆医学, 2008, 37(20): 2263-2265.
- [4] 刘四红,伍勇,刘国龙,等. Galectin-3 蛋白在鼻咽癌组织的表达及其临床意义[J]. 广州医药, 2011, 42(5): 17-19.
- [5] Urieli-Shoval S, Linke RP, Matzner Y. Expression and function of serum amyloid A, a major acute phase protein, in normal and disease states [J]. Curr Opin Hematol, 2000, 7: 64-69.
- [6] Rosenthal CJ, Sullivan LM. Serum amyloid A to monitor cancer dissemination [J]. Ann Intern Med, 1979, 91(3): 383-390.
- [7] 廖秋林,陈晓东,赵亮,等. 鼻咽癌血清比较蛋白质组学研究[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(2): 154-158.
- [8] 江青山. 鼻咽癌患者血清标志物的初步筛选、鉴定及功能研究[D]. 衡阳:南华大学, 2008.
- [9] Liao Q, Zhao L, Chen X, et al. Serum proteome analysis for pro-filing protein markers associated with carcinogenesis and lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma [J]. Clin Exp Metastasis, 2008, 25(4): 465-476.
- [10] 戴嵩玮,王小敏,刘丽云,等. 一个在肺癌血清中高表达的标志分子 SAA 的发现和鉴定[J]. 中国科学, 2007, 37(2): 129-134.
- [11] Ramankulov A, Lein M, Johannsen M, et al (下转第 740 页)

本研究通过培养 SAA 高表达的 pCDNA3. 1(+)-SAA-

3 讨 论

pNET 是一组起源于肽能神经元和神经内分泌细胞的异质性肿瘤,人群发病率约在 1/10~4/10 万,可发生于任何年龄,近年来呈稳步上升趋势^[8]。PNET 的诊断与治疗近年来取得了快速的发展,分子靶向治疗致力于控制 pNET 细胞生长和在血管生成的重要信号通路中寻找治疗靶点。目前最受关注的为血管内皮生长因子(VEGF)受体信号通路以及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)。PI3K/Akt/mTOR 受体信号通路在 pNET 肿瘤细胞的生长、增殖、代谢和血管生成中发挥了重要作用。依维莫司(Everolimus)作为一种新型的口服 mTORC1 抑制剂,早在 2011 年就被美国 FDA 批准用于治疗不可手术切除或已经扩散到身体其他部位的晚期 pNET。尽管大部分的 pNET 包含 PI3K/Akt 过度表达以及 pTEN、TSC1/2、LKB1 缺失导致 mTORC1 的异常激活^[9],但实际上 pNET 患者对依维莫司治疗的反应不一。

哺乳动物 mTORC1 受营养、能量信号的调控而且对雷帕霉素敏感。现在很多研究显示,mTORC1 信号通路的激活参与了多种肿瘤的发生,如乳腺癌、胶质瘤、宫颈癌和肾癌等^[10]。既往有研究表明,细胞内的亮氨酸可通过独立于 PI3K-Akt-TSC-Rheb 通路的某种特殊方式进行传递,并最终激活 mTORC1 信号^[11]。最近的一项研究表明,亮氨酸通过 RagB-GDP-RagCGTP 突变体可直接激活 mTORC1 信号^[12-13],从而促进肿瘤的生长,抑制自噬。本研究表明 mTORC1 抑制剂通过影响 Gln 代谢抑制 BON 细胞的增殖,“Gln 代谢”是肿瘤细胞除了 Warburg 效应之外又一重要的能量代谢方式,迅速增殖的肿瘤细胞通过消耗 Gln 来提供其生长和增殖所需的能量和生物大分子原料,维持细胞内氧化还原平衡和参与细胞内信号通路的转导,由于肿瘤对 Gln 的大量消耗,有人把肿瘤描述成“氮陷阱”(nitrogen trap)^[14-15]。本研究发现 BON 细胞的增殖明显依赖于 Gln 代谢,BON 细胞不能在无 Gln 的培养基里生长,增加培养基里 Gln 的浓度可刺激 BON 细胞的生长,这意味着对 BON 细胞而言,Gln 已从必需氨基酸转变成必需氨基酸。而且雷帕霉素可以降低其对 Gln 的吸收,影响 Gln 代谢,说明 pNET 的生长是 mTORC1 通路依赖性的。靶向其代谢的关键环节对 pNET 的治疗具有重要意义。

参考文献:

- [1] Csibi A, Fendt SM, Li C, et al. The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4[J]. *Cell*, 2013, 153(4): 840-854.
- [2] 易梅, 向波, 李小玲, 等. 代谢重编程: 肿瘤的平衡之舞[J]. *中南大学学报: 医学版*, 2013, 38(11): 1177-1187.
- [3] Robey IF, Stephen RM, Brown KS, et al. Regulation of the

Warburg effect in early-passage breast cancer cells[J]. *Neoplasia*, 2008, 10(8): 745-756.

- [4] Ma WW, Jacene H, Song D, et al. [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography correlates with Akt pathway activity but is not predictive of clinical outcome during mTOR inhibitor therapy[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(16): 2697-2704.
- [5] Jaini S, Dadachova E. FDG for therapy of metabolically active tumors[J]. *Semin Nucl Med*, 2012, 42(3): 185-189.
- [6] Dang CV. MYC, microRNAs and glutamine addiction in cancers[J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(20): 3243-3245.
- [7] Lawrence B, Gustafsson BI, Chan A, et al. The epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors[J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2011, 40(1): 1-18.
- [8] Meng M, Chen S, Lao T, et al. Nitrogen anabolism underlies the importance of glutaminolysis in proliferating cells[J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(19): 3921-3932.
- [9] Inoki K, Li Y, Zhu T, et al. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling[J]. *Nat Cell Biol*, 2002, 4(9): 648-657.
- [10] Duran RV, Oppliger W, Robitaille AM, et al. Glutaminolysis activates rag-mTORC1 signaling[J]. *Mol Cell*, 2012, 47(3): 349-358.
- [11] Smith EM, Finn SG, Tee AR, et al. The tuberous sclerosis protein TSC2 is not required for the regulation of the mammalian target of rapamycin by amino acids and certain cellular stresses[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(19): 18717-18727.
- [12] Han JM, Jeong SJ, Park MC, et al. Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway[J]. *Cell*, 2012, 149(2): 410-424.
- [13] Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, et al. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response[J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(8): 935-945.
- [14] 张淑香, 李东晓, 朱明龙, 等. 谷氨酰胺限制对杂交瘤细胞生长, 代谢和单抗生产的影响[J]. *高效化学工程学报*, 2008, 22(1): 77-82.
- [15] DeBerardinis RJ, Cheng T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer[J]. *Oncogene*, 2010, 29(3): 313-324.

(收稿日期: 2014-10-08 修回日期: 2014-12-10)

(上接第 737 页)

al. Serum amyloid A as indicator of distant metastases but not as early tumor marker in patients with renal cell carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2008, 269(1): 85-92.

- [12] Le L, Chi K, Tyldesley S, et al. Identification of serum

amyloid A as a biomarker to distinguish prostate cancer patients with bone lesions[J]. *Clin Chem*, 2005, 51(4): 695-707.

(收稿日期: 2014-11-08 修回日期: 2014-12-15)