

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.06.005

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20210122.1427.024.html\(2021-01-25\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20210122.1427.024.html(2021-01-25))

TTL12 过表达对口腔鳞癌 SCC-25 细胞株生物学特性的影响*

曾艳,薛伶俐,方川,程维,李雅冬[△]

(重庆医科大学附属第一医院颌面外科 400016)

[摘要] **目的** 检测微管蛋白酪氨酸连接酶类似物 12(TTL12)过表达对人舌鳞癌 SCC-25 细胞株生物学特性的影响。**方法** 建立 TTL12 稳定过表达的 SCC-25 细胞株,采用间接免疫荧光法和 Western blot 检测 TTL12 在 SCC-25 细胞内的分布,MTT 检测沉默 TTL12 对 SCC-25 细胞生长的影响,Boyden 小室侵袭试验检测沉默 TTL12 对 SCC-25 细胞侵袭的影响,采用 SPSS10.0 软件包对数据进行统计学分析。**结果** 间接免疫荧光法和 Western blot 结果均显示 TTL12 在细胞质、细胞核及细胞核膜均有分布。间接免疫荧光法结果显示 α 微管蛋白(α -tubulin)的分布与 TTL12 重合。MTT 实验结果显示沉默组(沉默 TTL12 基因的 SCC-25 细胞)的 SCC-25 细胞生长较对照组(未作任何处理的 SCC-25 细胞)受到明显抑制($P < 0.05$)。Boyden 小室侵袭实验结果显示沉默组的穿膜细胞百分比明显小于对照组($P < 0.05$)。**结论** 沉默 TTL12 可有效抑制 SCC-25 细胞的生长和侵袭能力。

[关键词] 口腔肿瘤;癌,鳞状细胞;微管蛋白酪氨酸连接酶类似物 12;转染;生物学特性**[中图分类号]** R739.8**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2021)06-0922-05

Effects of overexpression of TTL12 on the biological characteristics of oral squamous cell carcinoma SCC-25 cell line*

ZENG Yan, XUE Lingli, FANG Chuan, CHENG Wei, LI Yadong[△]

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective** To detect the effect of overexpression of tubulin tyrosine ligase like protein 12 (TTL12) on the biological characteristics of SCC-25 cell line. **Methods** The SCC-25 cell line with stable overexpression of TTL12 was established. Indirect immunofluorescence and Western blot were used to detect the distribution of TTL12 in SCC-25 cells. MTT assay was used to detect the effect of silencing TTL12 on the growth of SCC-25 cells. The Boyden chamber invasion test was used to detect the effect of silencing TTL12 on the invasion of SCC-25 cells. The data was analyzed by using SPSS10.0 software package. **Results** The results of indirect immunofluorescence and Western blot showed that TTL12 was distributed in the cytoplasm, nucleus and nuclear membrane. The results of indirect immunofluorescence showed that the distribution of α -tubulin overlapped with TTL12. The results of the MTT assay showed that the growth of SCC-25 cells in the silence group (SCC-25 cells that silenced the expression of TTL12 gene) was significantly inhibited when compared with the control group (SCC-25 cells without any treatment), $P < 0.05$. The results of Boyden chamber invasion test showed that the percentage of transmembrane cells in the silence group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Silencing TTL12 can effectively inhibit the growth and invasion of SCC-25 cells.

[Key words] mouth neoplasms; carcinoma, squamous cell; tubulin tyrosine ligase like12; transfection; biological characteristics

* 基金项目:重庆市科学按摩委员会自然科学基金(este2018jcyjAX0763);重庆市卫生与计划生育委员会医学高端后备人才培养项目(2017HBRC004);2019年留创计划创新类资助入选项目(cx2019089)。 作者简介:曾艳(1992-),住院医师,硕士,主要从事头颈肿瘤防治研究。

[△] 通信作者, E-mail: llxxydd2006@sina.com.

口腔鳞癌是头颈部肿瘤中最常见的恶性肿瘤之一^[1]。虽然目前临床治疗口腔鳞癌的方法较多,但由于其易复发和转移^[2-3],在过去的几十年中,存活率仍没有得到明显的提高,且发病率还在逐年升高^[4]。伴随着肿瘤发展并对邻近组织的侵袭,会严重影响患者的言语、进食、吞咽、呼吸等功能,从而大大降低患者的生存质量^[5]。因此,临床迫切需要找到新的有效的治疗方法。

众所周知,癌症的生物学基础是抑癌基因的失活或原癌基因的激活,从而导致细胞不受控制的增殖和异常的凋亡,因此,癌症的发生和发展与原癌基因密切相关^[6]。本课题组曾经报道,在头颈肿瘤中发现微管蛋白酪氨酸连接酶类似物 12(tubulin tyrosine ligase like 12, TTLL12)可通过阻碍硝基化酪氨酸与微管蛋白的结合,而促进头颈鳞癌的生长,具有潜在原癌基因的作用^[7]。但目前,对于 TTLL12 在细胞内的分布尚不清楚,这为进一步深入研究 TTLL12 的作用机制造成了不小的障碍,本文将主要阐述近期本课题组的研究成果,以期对口腔鳞癌的治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人舌鳞癌 SCC-25 细胞株由重庆医科大学中心实验室提供,培养液成分:伊格尔培养基、10% 小牛血清、1 mmol/L 丙酮酸钠、40 μg/mL 庆大霉素(美国 Sigma 公司)。激光共聚焦扫描显微镜(德国 Leica),CF15 型低温离心机(德国 Heraeus 公司)。四甲基偶氮唑蓝(MTT)、Boyden 小室、siRNA 及脂质体 Lipofectamine™2000(Sigma 公司),内参 TATA 结合蛋白(TATA-binding protein, TBP)抗体、TTLL12 抗体、β 微管蛋白(β-tubulin)抗体(美国 Sigma 公司),Na⁺/K⁺-ATPase α1 抗体(美国 Proteintech 公司),YG-875 型超净工作台、CO₂ 孵箱(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 建立 TTLL12 过表达的 SCC-25 细胞株

利用慢病毒将 TTLL12 cDNAs 转染入 SCC-25 细胞,筛选稳定高表达 TTLL12 的细胞株(过表达组),同时利用空白质粒转染入 SCC-25 细胞,建立空白对照组。

1.2.2 Western blot

收集细胞,PBS 清洗 2 遍,加入细胞裂解液,收集裂解产物,煮沸变性,行蛋白电泳,转硝酸纤维素膜,5% 的牛奶封闭 1 h,依次加入一抗,4 °C 孵育过夜,加二抗(辣根过氧化物酶标记鼠抗兔 IgG 抗体,1:1 000 稀释),室温下孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min 后,利用 DAB 显色试剂盒进行化学发光反应并拍照。用美国 BioRad 公司 Quantity One 系统进行灰度分析,以目的蛋白条带与内参蛋白条带的灰度值

比值为目的蛋白相对表达水平。

1.2.3 间接免疫荧光法检测

待过表达组和空白对照组 SCC-25 细胞爬满玻片后,弃去培养液,用 100% 乙醇固定细胞,然后依次与一抗和二抗孵育 60 min。取出玻璃片,用滤纸吸去多余水分,滴加一滴甘油缓冲液(甘油和 pH7.4 PBS 液以 9:1 体积混合而成),再覆以盖玻片。荧光显微镜高倍视野下观察,判定结果。

1.2.4 TTLL12 在 SCC-25 细胞内的分布检测

取稳定过表达 TTLL12 的 SCC-25 细胞株,PBS 清洗两遍,分别提取总细胞蛋白、细胞质蛋白、细胞核蛋白和细胞膜蛋白。加入细胞裂解液裂解细胞,收集裂解后产物,得到总细胞蛋白。室温下 1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,轻弹管底,将离心管置于冰面,加入 600 μL 冷 bufferA,振荡 15 s,置于冰面 15 min,加 25 μL 10% NP40,振荡 5 s,置于冰面 10 min,在 4 °C 下 10 000×g 离心 5 min,轻轻吸取上清液为细胞质蛋白,PBS 清洗 2 遍,在 4 °C 下 10 000×g 离心 5 min,将离心管置于冰面,加 100 μL 冷 bufferC,反复振荡,在冰面上静置 40 min,在 4 °C 下 13 000×g 离心 20 min,轻轻吸取上清液为细胞核蛋白,PBS 清洗 2 遍,获得细胞核膜蛋白。利用各组蛋白进行 Western 检测 TTLL12 的分布。

1.2.5 沉默 TTLL12 在 SCC-25 细胞内的表达

将 1×10⁵/mL 浓度的 SCC-25 细胞接种于 24 孔培养板中,加伊格尔培养基,于 37 °C,5% CO₂ 培养箱内培养,待细胞长至 70% 时,进行 siRNA 转染。参照 Lipofectamine™2000 试剂说明操作,干扰组 siTTLL12 序列:5'-GGU UGU UCG UGU AUG AUG U-3',转染空白对照序列的为对照组,转染 24 h 后,收集细胞,利用 Western blot 检测 TTLL12 的表达情况。

1.2.6 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞增殖

将干扰组与对照组细胞制成单细胞悬液,接种到 96 孔培养板内,使每孔细胞数为 2 000 个,在 37 °C 的 CO₂ 孵箱中孵育,每 24 小时检测 1 次,共 9 d,检测前在每个孔内加入 MTT(5 mg/mL)10 μL,放入 CO₂ 孵箱中孵育 4 h,去上清液,每孔加入二甲基亚砷与 0.04 mol/L 盐酸的混合物 150 μL,震荡 1 h 后,再利用酶标仪在 570 nm 波长处比色,每次检测至少 6 个孔,最后取其平均值。

1.2.7 Boyden 小室侵袭试验

将 Boyden 小室放入每孔加有 500 μL 含 10% 胎牛血清的 6 孔培养板中,Boyden 小室中加入 500 μL 不含胎牛血清的培养基,取浓度为 4×10⁵/mL 的各组细胞悬液 200 μL 加入 Boyden 小室,37 °C 孵育 4 h 后,取出 Boyden 小室,滤膜下层向上,PBS 洗涤,3% 戊二醛固定,苏木素染色,用棉花棒擦净小室滤膜上层未侵袭的细胞。使用倒置显微镜进行观察和拍照,

计算出穿过滤膜的细胞百分比。

1.3 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件分析数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 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 TTLL12 在 SCC-25 细胞的表达分析

经 Western blot 检测结果显示过表达组 TTLL12 相对表达水平较空白对照组明显增强, 证明 TTLL12 稳定高表达的 SCC-25 细胞株成功建立, 见图 1。间接免疫荧光试验结果显示过表达组 SCC-25 细胞内有亮红色荧光, 分布于细胞质、细胞核和细胞核膜, 而空白对照组 SCC-25 细胞内仅有较暗、较浅的红色荧光, 见图 2。间接免疫荧光试验结果还显示 TTLL12 与 α -tubulin 的分布重合, 见图 3。

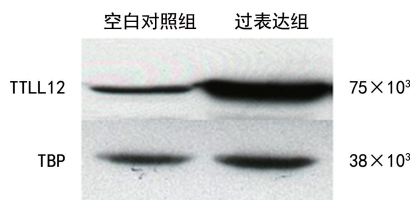
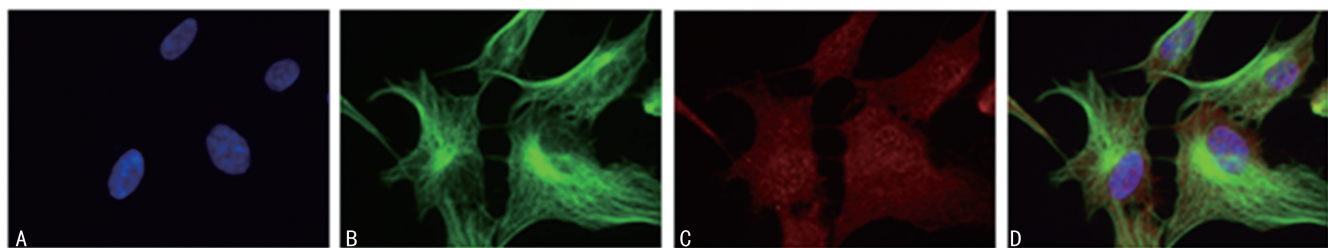


图 1 Western blot 检测 TTLL12 在 SCC-25 细胞的表达

2.2 TTLL12 在细胞内的分布

Western blot 结果显示在细胞总蛋白中,



A: 细胞核; B: α -tubulin; C: TTLL12; D: 重合。

图 3 间接免疫荧光法检测 α -tubulin 和 TTLL12 的分布 (800 \times)

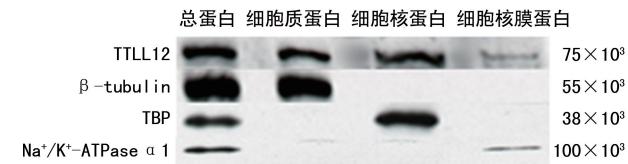


图 4 Western blot 检测 TTLL12 在 SCC-25 细胞中的分布

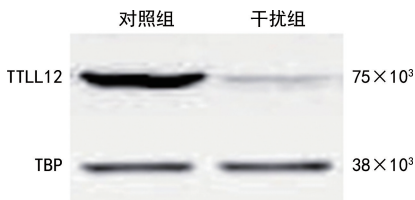
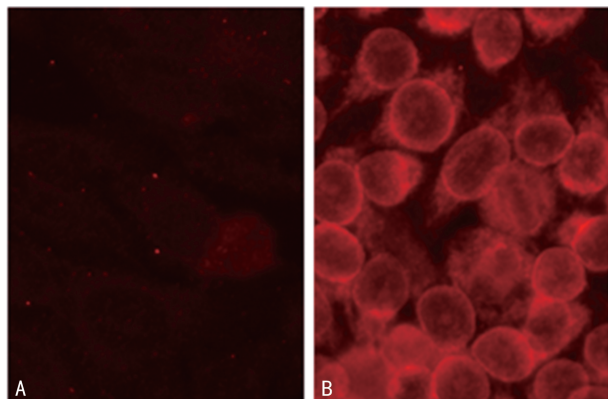


图 5 干扰 TTLL12 在 SCC-25 细胞内的表达

2.4 干扰 TTLL12 对 SCC-25 细胞生长的影响

MTT 法检测 SCC-25 细胞生长的情况, 结果表明, 干扰组 SCC-25 细胞的生长较对照组受到明显抑

制 ($P < 0.05$), 见图 6。TTLL12、 β -tubulin、TBP 和 Na^+/K^+ -ATPase $\alpha 1$ 均有条带显示; 在细胞质蛋白中, TTLL12 和 β -tubulin 有条带显示; 在细胞核蛋白中, TTLL12 和 TBP 有条带显示; 在细胞核膜蛋白中, TTLL12 和 Na^+/K^+ -ATPase $\alpha 1$ 有条带显示, 见图 4。



A: 空白对照组; B: 过表达组。

图 2 间接免疫荧光实验检测 TTLL12 蛋白在各组 SCC-25 细胞中的表达 (200 \times)

2.3 干扰 TTLL12 在 SCC-25 细胞内的表达

利用 siRNA 沉默 TTLL12 的表达, 经 Western blot 检测结果显示干扰组 TTLL12 蛋白较对照组降低, 见图 5。

制 ($P < 0.05$), 见图 6。

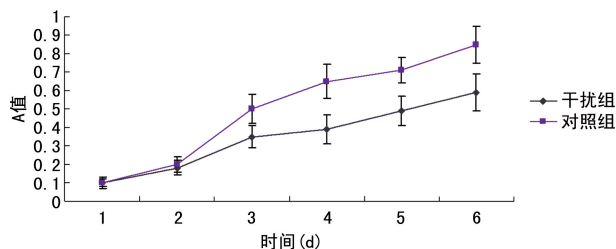


图 6 SCC-25 生长曲线

2.5 干扰 TTLL12 对 SCC-25 细胞侵袭的影响

Boyden 小室侵袭试验结果表明, 干扰组穿过滤膜的细胞百分比为 (31 \pm 2)%, 对照组穿过滤膜的细胞百分比是 (56 \pm 5)%, 干扰组 SCC-25 细胞穿过滤膜的细胞百分比相对对照组明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 7。

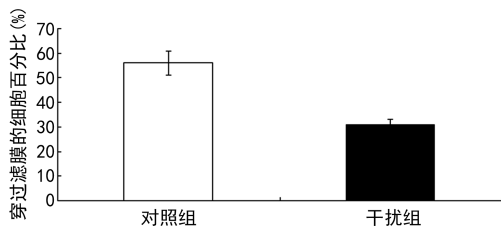


图 7 Boyden 小室侵袭试验

3 讨 论

口腔鳞癌的发生发展是一个逐级进行的复杂生物学过程,其中,原癌基因的过表达在肿瘤的发生发展中扮演着重要的角色^[8]。笔者曾经报道在头颈鳞癌中,TTLL12 具有潜在原癌基因的作用^[7]。近年,有学者发现 TTLL12 在肺腺癌、结肠腺癌、直肠腺癌、前列腺癌和肺癌中表达明显升高,并与患者的不良预后密切相关($P < 0.05$)^[9-12]。还有一些学者发现 TTLL12 与人体免疫有关,例如 PENG 等^[13]发现,和 HIV 阴性的健康人比较,TTLL12 在 HIV 阳性患者中的表达升高,表明 TTLL12 可能与先天免疫调节,免疫缺陷综合征的疾病进展和 HIV-1 复制相关。JU 等^[14]发现 TTLL12 可以抑制抗病毒的 RIG-I 通路活性,从而增强 RNA 病毒在细胞内的复制能力,LORENZ 等^[15]发现在发生急性闭角型青光眼后的 0~12 周,TTLL12 在患者的血清中的表达呈线性增长趋势。

根据目前的研究成果可知,TTLL12 具有 SET 和 TTL 结构域,而 TTLL12 的 TTL 结构域缺少其他家族成员所保留的 7 个基序中的 3 个。TTLL12 的 TTL 结构域可能与 TTLL12 参与微管修饰功能有关^[16-17]。有研究认为在真核细胞的进化过程中,TTLL12 的 SET 结构域可能对异染色质和常染色质的形成起到非常重要的作用^[18]。另外,TTLL12 高表达会导致 H4K20 表达升高,很可能与 TTLL12 的 SET 结构域有关^[17,19]。但 TTLL12 在细胞内的分布及生物学功能尚不清楚。

了解和掌握 TTLL12 在细胞中的分布,对进一步研究 TTLL12 的功能至关重要,因此,本研究利用间接免疫荧光法和 Western blot 率先证实 TTLL12 主要分布在细胞质、细胞核及细胞核膜,细胞质内的 α -微管蛋白与 TTLL12 的分布一致,这一结果很好地解释了 TTLL12 的已知功能。笔者前期实验证实 TTLL12 会干扰硝基化酪氨酸与微管蛋白的结合。在真核细胞中, α -tubulin 主要分布在细胞质内,参与形成细胞骨架、维持细胞形态、细胞移动、细胞内各种物质的运输及细胞的分裂等,与细胞的正常生命活动密切相关。硝基化酪氨酸与 α -tubulin 结合,形成硝基化酪氨酸微管蛋白,影响微管的功能,导致细胞凋亡。TTLL12 可能利用 TTL 结构域的微管蛋白酪氨酸连接酶活性,与细胞质中的 α -tubulin 结合,从而阻

碍了硝基化酪氨酸与 α -tubulin 的结合,最终促进头颈鳞癌的生长^[7]。分布在细胞核和细胞核膜的 TTLL12 很可能与染色体数量明显增多^[17],H4K20 表达升高^[19],HIV-1 复制^[13]有关,而这些功能很可能与 TTLL12 的 SET 结构域有关。由此可见,搞清楚 TTLL12 的分布,可以更好地理解 TTLL12 的各种功能,同时也为下一步研究奠定了良好的基础。

另外,在沉默 TTLL12 的表达后,本研究利用 MTT 试验和 Boyden 小室侵袭试验检测细胞生长和侵袭能力的变化,结果表明沉默 TTLL12 会导致 SCC-25 细胞生长变慢,侵袭能力变弱。这说明沉默 TTLL12 可有效抑制 SCC-25 细胞的生长和侵袭,其原因可能是,沉默 TTLL12 后,阻断了 TTLL12 对微管的影响作用。微管与细胞周期和细胞移动密切相关^[20-21],在细胞间期时, α -tubulin 聚合形成微管,形成细胞内的网架结构,当细胞进入分裂期时,核膜分解, α -tubulin 解聚,然后重新聚合形成纺锤体,并引导染色体运动,在分裂末期,纺锤体又会发生解聚,重新形成细胞质内的网架结构,核膜重新形成。当细胞移动时,会发生形状改变,伪足形成,这些都需要微管的参与^[22]。在沉默 TTLL12 后,TTLL12 对微管的作用也会消失,从而导致细胞生长变慢,侵袭能力变弱。TTLL12 在核膜也有分布,这或许影响了有丝分裂时的核膜分解和形成。但其具体作用机制尚需进一步研究。

综上所述,TTLL12 分布于细胞质、细胞核及细胞核膜。由于其分布较广,TTLL12 很可能还有一些其他功能尚未发现,需进一步研究。沉默 TTLL12 会导致 SCC-25 细胞生长变慢,侵袭能力变弱。因此,TTLL12 有望作为治疗口腔鳞癌的靶点之一。

参考文献

- [1] BAO X, LIU F, LIN J, et al. Nutritional assessment and prognosis of oral cancer patients: a large-scale prospective study [J]. BMC Cancer, 2020, 20(1): 146.
- [2] TIAN T, ZHANG L, TANG K, et al. SEMA3A exon 9 expression Is a potential prognostic marker of unfavorable recurrence-free survival in patients with tongue squamous cell carcinoma [J]. DNA Cell Biol, 2020, 39(4): 555-562.
- [3] LI Y Y, TAO Y W, GAO S, et al. Cancer-associated fibroblasts contribute to oral cancer cells proliferation and metastasis via exosome-mediated paracrine miR-34a-5p [J]. EBioMedicine, 2018, 36: 209-220.
- [4] Global Burden of Disease Cancer Collaboration, FITZMAURICE C, ALLEN C, et al. Global, re-

- gional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015; a systematic analysis for the global burden of disease study[J]. *JAMA Oncol*, 2017, 3(4):524-548.
- [5] GOSWAMI S, GUPTA S S. How cancer of oral cavity affects the family caregivers? A cross-sectional study in Wardha, India, using the Caregiver Quality of Life Index-Cancer questionnaire[J]. *South Asian J Cancer*, 2020, 9(1):62-65.
- [6] FLAM E L, DANILOVA L, KELLEY D Z, et al. Differentially methylated super-enhancers regulate target gene expression in human cancer[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):15034.
- [7] 李雅冬, 张劲松, 杨凯, 等. 微管蛋白酪氨酸连接酶类似物 12 通过干扰微管蛋白酪氨酸硝基化促进 Hep-2 细胞生长[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2012, 28(8):728-732.
- [8] ALI J, SABIHA B, JAN H U, et al. Genetic etiology of oral cancer[J]. *Oral Oncol*, 2017, 70:23-28.
- [9] SANADA H, SEKI N, MIZUNO K, et al. Involvement of dual strands of miR-143 (miR-143-5p and miR-143-3p) and their target oncogenes in the molecular pathogenesis of lung adenocarcinoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18):4482.
- [10] LIU J, LI H, SHEN S, et al. Alternative splicing events implicated in carcinogenesis and prognosis of colorectal cancer[J]. *J Cancer*, 2018, 9(10):1754-1764.
- [11] WEN R, XIAO Y, ZHANG Y, et al. Identification of a novel transcript isoform of the TTLL12 gene in human cancers[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(6):3172-3180.
- [12] MASSONER P, LUEKING A, GOEHLER H, et al. Serum-autoantibodies for discovery of prostate cancer specific biomarkers[J]. *Prostate*, 2012, 72(4):427-436.
- [13] PENG X, SUN T, YAO P, et al. Differential expression of innate immunity regulation genes in chronic HIV-1 infected adults[J]. *Cytokine*, 2020, 126:154871.
- [14] JU L G, ZHU Y, LEI P J, et al. TTLL12 inhibits the activation of cellular antiviral signaling through interaction with VISA/MAVS[J]. *J Immunol*, 2017, 198(3):1274-1284.
- [15] LORENZ K, BECK S, KEILANI M M, et al. Course of serum autoantibodies in patients after acute angle-closure glaucoma attack[J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2017, 45(3):280-287.
- [16] LI H, HUANG Y, YU Y, et al. Self-catalyzed assembly of peptide scaffolded nanozyme as a dynamic biosensing system[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(4):2833-2839.
- [17] WASYLYK C, ZAMBRANO A, ZHAO C, et al. Tubulin tyrosine ligase like 12 links to prostate cancer through tubulin posttranslational modification and chromosome ploidy[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(11):2542-2553.
- [18] ARAVIND L, ABHIMAN S, IYER L M. Natural history of the eukaryotic chromatin protein methylation system[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2011, 101:105-176.
- [19] BRANTS J, SEMENCHENKO K, WASYLYK C, et al. Tubulin tyrosine ligase like 12, a TTLL family member with SET- and TTL-like domains and roles in histone and tubulin modifications and mitosis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12):e51258.
- [20] LOIODICE I, JANSON M E, TAVORMINA P, et al. Quantifying tubulin concentration and microtubule number throughout the fission yeast cell cycle[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(3):86.
- [21] LEE C C, CHENG Y C, CHANG C Y, et al. Alpha-tubulin acetyltransferase/MEC-17 regulates cancer cell migration and invasion through epithelial-mesenchymal transition suppression and cell polarity disruption[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):17477.
- [22] PELLEGRINI F, BUDMAN D R. Review: tubulin function, action of antitubulin drugs, and new drug development[J]. *Cancer Invest*, 2005, 23(3):264-273.