

CSN6 对宫颈癌 HeLa 细胞与 SiHa 细胞自噬能力的影响研究

李 想, 于思琪, 李 彤, 薛朋旭, 罗富海

(佳木斯大学医学部, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要:目的 探讨组成型光形态发生因子 9 信号复合体亚基 6(CSN6)对宫颈癌 HeLa 细胞与 SiHa 细胞自噬能力的影响。方法 购置宫颈癌 HeLa 细胞与 SiHa 细胞,并测定腺病毒中 GFP 与 mRFP 表达水平,标记、追踪 LC3,示踪自噬流的水平;将购置的细胞放置在 6 孔板中进行培养,随机分为对照序列组、CSN6 siRNA 组、空载体质粒组与 CSN6 过表达组,各组细胞均进行相应的处理(连续完成 24 h 干预);采用 Western Blot 法测定各组细胞中 CSN6、LC3 蛋白、Beclin1、Atg5 表达水平,荧光显微镜下检测两种细胞中自噬体个数,采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测各组细胞干预后增殖抑制率。结果 siCSN6 组不同宫颈癌细胞中自噬体个数高于 siCtrl 组,差异具有统计学意义 ($P<0.05$);siCSN6 组 CSN6、LC3 蛋白、Beclin1、Atg5 表达水平高于 siCtrl 组,siCSN6 组及 CSN6 组,差异具有统计学意义 ($P<0.05$);CSN6 组 CSN6、LC3 蛋白、Beclin1、Atg5 表达水平低于 siCtrl 组、siCSN6 组,差异具有统计学意义 ($P<0.05$);siCSN6 组干预后 2、6、12、24、48 h 细胞增殖抑制率高于 siCtrl 组、siCSN6 组及 CSN6 组,差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。结论 转染 CSN6 能提高宫颈细胞的自噬水平,而过表达 CSN6 则能抑制自噬活性,均会对细胞增殖抑制率产生影响。关键词:组成型光形态发生因子 9 信号复合体亚基 6;宫颈癌;自噬能力;增殖抑制率

中图分类号:R737.33

文献标识码:A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2020.17.021

文章编号:1006-1959(2020)17-0073-04

The Effect of CSN6 on the Autophagy Ability of Cervical Cancer HeLa Cells and SiHa Cells

LI Xiang, YU Si-qi, LI Tong, XUE Peng-xu, LUO Fu-hai

(Faculty of Medicine, Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of constitutive photomorphogenetic factor 9 signaling complex subunit 6 (CSN6) on the autophagy ability of cervical cancer HeLa cells and SiHa cells. Methods Purchasing cervical cancer HeLa cells and SiHa cells, and determining the expression levels of GFP and mRFP in adenovirus, labeling and tracking LC3, and tracing the level of autophagic flux; the purchased cells were placed in a 6-well plate for culture and randomly divided into control sequence group, CSN6 siRNA group, empty vector plasmid group and CSN6 overexpression group. Cells in each group were treated accordingly (continuously completed 24 h intervention); Western Blot method was used to determine the CSN6, LC3 protein, the expression levels of Beclin1 and Atg5, the number of autophagosomes in the two types of cells were detected under a fluorescence microscope, and the proliferation inhibition rate of each group of cells after intervention was detected by the tetramethylazazole blue (MTT) method. Results The number of autophagosomes in different cervical cancer cells in the siCSN6 group was higher than that in the siCtrl group, the difference was statistically significant ($P<0.05$); the expression levels of CSN6, LC3 protein, Beclin1, Atg5 in the siCSN6 group were higher than those in the siCtrl group, siCSN6 group and CSN6 group, the difference was statistically significant ($P<0.05$); the expression levels of CSN6, LC3 protein, Beclin1, Atg5 in the CSN6 group were lower than those in the siCtrl and siCSN6 groups, the difference was statistically significant ($P<0.05$); The cell proliferation inhibition rate in the siCSN6 group was higher than that in the siCtrl group, siCSN6 group and CSN6 group at 2, 6, 12, 24, and 48 h after intervention, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Conclusion Transfection of CSN6 could increase the autophagy level of cervical cells, while overexpression of CSN6 could inhibit the autophagy activity, both of which would affect the cell proliferation inhibition rate.

Key words: Constitutive photomorphogenetic factor 9 signaling complex subunit 6; Cervical cancer; Autophagy; Proliferation inhibition rate

宫颈癌(cervical cancer)是临床上发生率较高的女性恶性肿瘤,好发于 30~55 岁人群中,常见病因包括^[1]HPV 感染、多性伴侣、多孕多产、单纯疱疹病毒 II 型感染等。患者发病早期临床症状缺乏典型性,随着病情的不断发展,会出现阴道流血、排液等,影响患者健康、生活。自噬在细胞中较为常见,能通过自身的溶酶体等将受损的细胞器/大分子进行溶解,以适应恶劣的生存环境^[2-3]。研究表明^[4],自噬在机体中多处于平衡状态,当自噬发生异常后则会诱发肿瘤的发生。近年来,随着医疗技术的不断发展,临床对于自噬研究不断深入,发现自噬在肿瘤的发生、发展中能发挥双重作用^[5-6]。组成型光形态发生因子 9 信号复合体亚基 6(CSN6)属于是 CSN 的关键亚基,且在

多种恶性肿瘤中表达水平较高。同时,CSN 能与 E3 泛素连接酶相互作用,从而完成肿瘤细胞增殖、转移及凋亡的调节,但是对于宫颈癌细胞自噬的影响研究较少^[7-8]。因此,本研究以宫颈癌 HeLa 细胞与 SiHa 细胞为对象,探讨 CSN6 对宫颈癌 HeLa 细胞与 SiHa 细胞自噬能力的影响,报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源 2018 年 8 月~2019 年 6 月购置宫颈癌 HeLa 细胞与 SiHa 细胞作为对象,所有细胞均源于中国上海中科院生物研究所。

1.2 仪器与设备 本实验主要仪器及设备厂家情况见表 1。

1.3 方法

1.3.1 细胞的培养、复苏及处理 将购置的宫颈癌 HeLa 细胞与 SiHa 细胞从液氮中取出,37℃恒温水浴锅中手动摇晃(加快细胞溶解),待 2/3 体积的冻

基金项目:2020 年黑龙江省大学生创新创业训练项目(编号:202010222066)

作者简介:李想(2000.1-),男,黑龙江五常人,本科在读

表 1 仪器与设备

| 仪器与试剂 | 厂家 |
|------------------------------------|--------------------------|
| DMEM/F-12 培养基 | 美国 Gibco 公司 |
| 自噬双标腺病毒 | 购自于上海恒生物科技公司 |
| 离心机 | MSE MISTRAL1000, 英国 |
| pcDNA3.1(+)-CSN6 过表达质粒 | 实验室提供 |
| 二氧化碳培养箱 | Thermo 公司 |
| 胎牛血清 | 杭州四季青公司 |
| X-tremeGENE HP DNA 转染试剂盒 | 购自于瑞士 Roche 公司 |
| PcDNA3.1(+)-空载体质粒 | 实验室提供 |
| siLent-Fect TM RNA 转染试剂 | 美国 Bio-Rad 公司 |
| 超净工作台 | 苏州安泰空气技术有限公司 |
| 微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)—抗、CSN6—抗 | 均购自于美国 Cell Signaling 公司 |

存液溶解;超净工作台上打开封口膜,放入完全培养液 10 ml 的离心管中,5 min 离心,速度 1000 rpm;去除上清,采用 DMEM 完全培养液 5 ml 完成细胞沉淀重悬,利用适当力度吹打细胞,混合后将其放置在细胞培养瓶中。标记相应细胞的类型、处理时间后,经酒精消毒后放置在细胞培养箱内进行培养(5%CO₂、温度 37 ℃)。倒置显微镜下观察细胞形态、是否获得良好贴壁,当培养液变黄后完成细胞首次全量换液(换液前采用 PBS 缓冲液完成 3 次清洗),加入浓度为 10.0%的 PBS 新鲜培养基继续培养,待细胞融合瓶底 80.0%以上后完成细胞传代培养。取传代后的细胞,离心完毕后去除上清,根据实验所需,调整细胞密度,备用^[9,10]。

1.3.2 自噬双标腺病毒示踪自噬流 采用单体红色荧光蛋白耦合到绿色荧光蛋白-LC3 (mRFP-GFP-L3)串联荧光蛋白腺病毒中表达的 GFP 与 mRFP,并标记、追踪 LC3,示踪自噬流的水平。CFP 减弱能指示溶酶体与自噬小体融合形成自噬溶酶体,在显微镜下对于细胞中存在黄色斑点即为自噬体。采用自噬双标腺病毒完成 HeLa 细胞与 SiHa 细胞的转染(每 2 h 换液 1 次),连续进行 24 h 干预,荧光显微镜下每孔取视野 5 个,观察 mRFP-GFP-LC3 荧光斑点数量^[11]。

1.3.3 细胞分组与处理 取上述处理后的宫颈癌 HeLa 细胞与 SiHa 细胞,将其放置在 6 孔板中进行培养,随机分为对照序列组(siCtrl 组)、CSN6 siRNA 组(siCSN6 组)、空载体质粒组(Vector 组)与 CSN6 过表达组(CSN6 组),各组细胞均进行相应的处理(连续完成 24 h 干预)。采用 siLent-Fect 转染试剂向 siCtrl 组完成阴性对照序列助燃,siCSN6 组转染 CSN6 siRNA,各组细胞均连续完成 24h 干预。同时,采用 Roche 转染试剂转染 Vector 组细胞[pcDNA3.1(+)-空载体质粒];采用 pcDNA3.1(+)-CSN6 过表达,转染 CSN6 组细胞,各组细胞均连续完成 24 h 干预,荧光显微镜下检测不同细胞中自噬体个数。

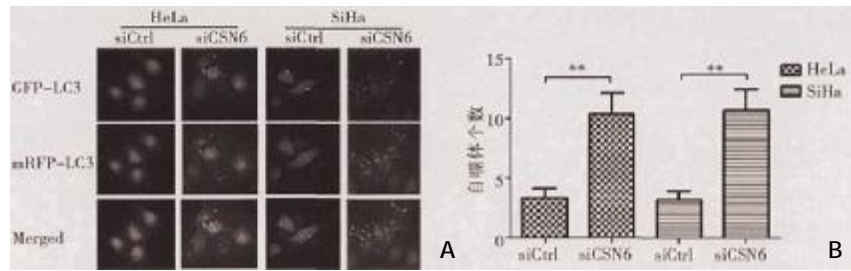
1.3.4 自噬相关基因蛋白水平 取各组干预后的细胞,加入蛋白裂解液 200 μ l,30 min 裂解,温度 4 ℃,10 min 离心,速度为 12000 rpm,离心半径为 5.5 cm,上述操作完毕后将获得的上清移到高压消毒的 EP 管中。根据相关说明采用 Western Blot 法测定各组细胞中 CSN6、LC3 蛋白、Beclin1、Atg5 表达水平。请各组样品 40 μ g 完成 SDS-PAGE 电泳,转膜到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,并利用浓度为 5%胎牛血清白蛋白(BSA)完成 1 h 封闭。同时,根据蛋白分子量完成条带切割,分别加入 CSN6、LC3 蛋白、Beclin1、Atg5 蛋白一抗,常温下完成 2h 孵育,经洗膜、显色、显影等操作后拍照^[12]。

1.3.5 细胞增殖抑制率 采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测各组细胞干预后增殖抑制率,取四组处理后的细胞,根据 5×10^3 个接种在 96 孔培养板中,待细胞贴壁后分别加入不同浓度的、新鲜配置的 ASP 培养基 200 μ l(浓度为 0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、20.0 mmol/L),各组均连续完成 48 h 培养,设置阴性对照组(加入等体积不含有 ASP 的培养基)。向每孔中加入 MMT 液 20 μ l,浓度为 5 mg/ml,连续完成 4 h 孵育,去除上层清液,向每孔中加入 DMSO 液 150 μ l,摇床上连续完成 10 min 干预。在酶标仪 492 nm 下完成吸光度值 A 值测定,根据公式计算细胞增殖率(%) [抑制率=1-A 测定细胞/A 阴性对照组] $\times 100.00\%$ ^[13]。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件处理数据,计数资料采用[n(%)]表示,行 χ^2 检验,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,行 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同细胞中自噬体个数比较 荧光显微镜下完成宫颈癌 HeLa 细胞与 SiHa 细胞中 mRFP-GFP-LC3 荧光斑点数量,siCSN6 组不同宫颈癌细胞中自噬体个数高于 siCtrl 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

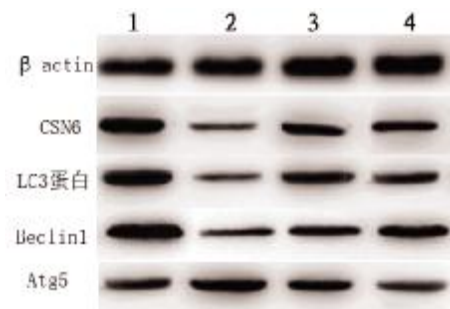


注:A:不同细胞荧光显微镜下 CSN6 siRNA 转染后细胞自噬流;B:不同细胞自噬体个数; ** $P<0.05$

图 1 不同细胞中自噬体个数比较

2.2 四组自噬相关基因蛋白水平比较 siCSN6 组 CSN6、LC3 蛋白、Beclin1、Atg5 表达水平高于 siCtrl 组、siCSN6 组及 CSN6 组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); CSN6 组 CSN6、LC3 蛋白、Beclin1、Atg5 表达水平低于 siCtrl 组、siCSN6 组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见图 2。

2.3 四组细胞增殖抑制率比较 siCtrl 组、siCSN6 组不同时间点细胞增殖抑制率比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); siCSN6 组干预后 2、6、12、24 及 48 h 细胞增殖抑制率高于 siCtrl 组、siCSN6 组及 CSN6 组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); CSN6 组不同时间点细胞增殖抑制率高于 siCtrl 组、siCSN6 组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 2。



注:1:siCSN6 组自噬相关基因蛋白水平;2:CSN6 组自噬相关基因蛋白水平;3:siCtrl 组自噬相关基因蛋白水平;4:siCSN6 组自噬相关基因蛋白水平

图 2 四组自噬相关基因蛋白水平比较

表 2 四组细胞增殖抑制率比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 2 h | 6 h | 12 h | 24 h | 48 h |
|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| siCSN6 组 | 0.23±0.06 ^{abc} | 0.37±0.09 ^{abc} | 0.53±0.11 ^{abc} | 0.68±0.15 ^{abc} | 0.84±0.16 ^{abc} |
| siCtrl 组 | 0.11±0.03 ^a | 0.16±0.06 ^a | 0.19±0.08 ^a | 0.26±0.11 ^a | 0.34±0.13 ^a |
| Vector 组 | 0.10±0.02 ^a | 0.15±0.05 ^a | 0.20±0.09 ^a | 0.25±0.10 ^a | 0.33±0.12 ^a |
| CSN6 组 | 0.21±0.05 | 0.32±0.06 | 0.39±0.08 | 0.53±0.12 | 0.63±0.14 |

注:与 CSN6 组比较, ^a $P<0.05$;与 siCSN6 组比较, ^b $P<0.05$;与 siCtrl 组比较, ^c $P<0.05$

3 讨论

宫颈癌是女性发病率较高的生殖系统恶性肿瘤,由于患者发病早期临床症状缺乏典型性,导致远期预后较差。因此,积极研发宫颈癌新的治疗方法、策略成为研究的热点。细胞自噬是真核生物中进化保守的、对细胞内物质周围较为重要的过程,该过程中损坏的蛋白或细胞器被双层膜结构的自噬小泡包裹后,能进入溶酶体、液泡中进行降解并循环使用。临床研究表明:细胞自噬过程是细胞成分分解、回收利用的重要基础,多用于营养缺乏状态下培养的细胞、植物的免疫反应、叶片衰老等。细胞自噬属于较为重要的生物学现象,能直接参与生物的发育、生长等过程,当细胞自噬异常时则会出现癌细胞。本研究中,siCSN6 组不同宫颈癌细胞中自噬体个数高于 siCtrl 组,差异有统计学意义 ($P<0.05$),说明 CSN 转染能改变细胞自噬体的数量,可能直接参与宫颈癌的发生、发展。CSN6 属于是 CSN 的关键亚基,在诸多恶性肿瘤中表达,与致癌活性相关,且临床对于 CSN6 的研究更多的集中在调节 E3 泛素连接酶介导的癌症相关蛋白泛素化水平,从而能调节肿瘤细

胞的周期、增殖、转移与凋亡,但是临床对于肿瘤细胞自噬的机制尚未阐明。

CSN 最初发现于南芥中光依赖性生长与转录的阻遏物,属于是一种泛素-蛋白酶体调节剂。临床研究表明:CSN 主要由 9 个不同的亚基组成,在多种恶性肿瘤中呈高表达,其表达水平与肿瘤细胞的活性有关。多种肿瘤抑制因子、致癌因子均受到 CSN 的影响,并且 CSN6 亦可与 E3 泛素连接酶相互作用、结合,能同届机体泛素化水平,从而在肿瘤周期的调节、肿瘤细胞的增殖与凋亡中发挥重要作用。本研究中,Western Blot 法测定结果表明:siCSN6 组 CSN6、LC3 蛋白、Beclin1、Atg5 表达水平高于 siCtrl 组、siCSN6 组及 CSN6 组 ($P<0.05$); CSN6 组 CSN6、LC3 蛋白、Beclin1、Atg5 表达水平低于 siCtrl 组、siCSN6 组 ($P<0.05$),说明 CSN6 在宫颈癌细胞自噬的调节中发挥了重要的作用。既往研究表明:CSN6 能提高 SCF 泛素连接酶的生物活性,能降解哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)活性,从而能调节细胞自噬作用。CSN6 已经证实在多种恶性肿瘤中呈高表达,与致癌活性有关,能与 E3 泛素连接酶及相关

的靶蛋白结合,调节其泛素化水平。CSN6 能增强 SCF 泛素连接酶的亚基 Fbxw7 的自我泛素化与降解。而 Fbxw7 能靶向降解哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR),是调控自噬起始的关键复合物。国外学者研究表明:宫颈癌细胞中自噬活性水平降低与疾病的发生有关,有效的提高肿瘤细胞自噬活性,能为宫颈癌治疗提供新的思路与方法。本研究中,siCSN6 组干预后 2、6、12、24 及 48 h 细胞增殖抑制率高于 siCtrl 组,siCSN6 组及 CSN6 组($P<0.05$),说明 CSN6 能提高宫颈癌细胞的姿势能力,提高细胞的增殖抑制率,有望成为宫颈癌新的治疗靶点。

总之,转染 CSN6 能提高宫颈细胞的自噬水平,过表达 CSN6 能抑制自噬活性,均会对细胞增殖抑制率产生影响,能为宫颈癌治疗提供新思路。

参考文献:

- [1]金彦斌,姜李乐,张怡,等.阿司匹林联合肿瘤坏死因子相关凋亡诱导因子诱导剂通过增强自噬促进宫颈癌细胞凋亡[J].中国临床药理学杂志,2019,35(8):39-43.
- [2]聂珺妍,张斌,赵阳,等.饮水高碘对雄性子代大鼠学习记忆能力及海马神经细胞自噬的影响[J].环境与健康杂志,2018,35(1):5-9.
- [3]Liao CL,Chu YL,Lin HY,et al.Bisdemethoxycurcumin Suppresses Migration and Invasion of Human Cervical Cancer HeLa Cells via Inhibition of NF- κ B, MMP-2 and -9 Pathways[J]. Anticancer Research,2018,38(7):3989-3997.
- [4]杨民,郑伟伟,张俊宇,等.缺氧复氧环境对成骨细胞自噬水平的影响[J].中华医学杂志,2019,99(11):844.
- [5]唐中国,张宁,狄文,等.3-甲基腺嘌呤对低氧状态下上皮性卵巢癌细胞自噬、迁移和侵袭的影响[J].上海交通大学学报(医学版),2018,38(10):26-30.
- [6]屈秋慧,韩红芳,吴胜军,等.三种噻唑烷二酮类药物对宫颈癌细胞增殖的影响[J].临床和实验医学杂志,2018,17(23):30-34.
- [7]Lin CC,Kuo CL,Huang YP,et al.Demethoxycurcumin Suppresses Migration and Invasion of Human Cervical Cancer HeLa Cells via Inhibition of NF- κ B Pathways[J].Anticancer Research,2018,38(5):2761.
- [8]李岩,杨大业,张德巍.长链非编码 RNAMEG3 对肝癌细胞增殖及自噬能力的影响[J].现代肿瘤医学,2019,27(3):27-30.
- [9]王雅雯,陈灼庚,王彬婷,等.缺氧下激活成骨细胞自噬对细胞增殖的影响[J].口腔医学,2018,38(10):876-880.
- [10]朱涛,涂淑贞,杨阳丽,等.白藜芦醇诱导人乳腺癌 MDA-MB231 细胞凋亡及自噬[J].中国药理学通报,2019,35(6):104-108.
- [11]袁雪,廖婷,荣曦,等.高糖高脂环境下生长激素释放肽对胰腺 β 细胞自噬的影响(英文)[J].广西医科大学学报,2019,36(4):7-12.
- [12]Li J,Zhang Y,Chen L,et al.Cervical Cancer HeLa Cell Autocrine Apoptosis Induced by Co-immobilized TNF- α plus IFN- γ Biomaterials [J].ACS Applied Materials&Interfaces,2018,10(10):8451-8464.
- [13]张钰,路佳,熊君宇.激活 AMPK 对老龄小鼠脓毒症的影响及其与自噬的关系[J].中华麻醉学杂志,2019,39(5):617-620.

收稿日期:2020-07-08;修回日期:2020-07-23

编辑/成森