

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.03.006

文章编号: 1005-8982(2020)03-0027-05

临床研究·论著

钙激活中性蛋白酶2在口腔鳞状细胞癌中的表达 及对肿瘤细胞生物学行为的影响

郑博, 廖湘凌, 丁南, 王敬国, 庞晓霞

(首都医科大学附属北京潞河医院 口腔科, 北京 101100)

摘要: **目的** 探究钙激活中性蛋白酶2 (Calpain-2) 在口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 中的表达及 Calpain-2 对肿瘤细胞生物学行为的影响。 **方法** 通过 RT-PCR、Western blotting 和免疫组织化学方法检测 OSCC 组织 Calpain-2 的表达, 分析 Calpain-2 与临床病理的关系。利用敲低 Calpain-2 的 OSCC 细胞评价 Calpain-2 对细胞增殖、凋亡及迁移的影响。 **结果** OSCC 组织中 Calpain-2 表达水平升高 ($P < 0.05$)。Calpain-2 敲低的 OSCC 细胞增殖能力和凋亡率与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。敲低 Calpain-2 的表达能抑制 OSCC 细胞的迁移能力 ($P < 0.05$)。 **结论** Calpain-2 可能参与肿瘤细胞的迁移过程, 有可能成为抑制肿瘤细胞迁移的重要靶点。

关键词: 口腔鳞状细胞癌; 钙激活中性蛋白酶2; 迁移

中图分类号: R739.85

文献标识码: A

Calpain 2 expression in oral squamous cell carcinoma and its effect on tumor cells

Bo Zheng, Xiang-ling Liao, Nan Ding, Jing-guo Wang, Xiao-xia Pang

(Department of Stomatology, Beijing Luhe Hospital Capital Medical University, Beijing 101100)

Abstract: Objective To investigate the expression of calcium-activated neutral protease Calpain-2 in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and the effect of Calpain 2 on tumor cells. **Methods** The expression of Calpain-2 in OSCC tissues was detected by RT-PCR, Western blotting and immunohistochemistry, and the relationship between Calpain-2 and clinicopathology was analyzed. OSCC cells without Calpain-2 were used to evaluate the effects of Calpain-2 on cell proliferation, apoptosis and migration. **Results** The expression of Calpain-2 was increased in OSCC clinical samples ($P < 0.05$). There was no significant difference in proliferation and apoptotic rate of OSCC cells without Calpain-2 compared with the control group ($P > 0.05$). Knocking down the expression of Calpain-2 significantly inhibited the migration of OSCC cells ($P < 0.05$). **Conclusions** Calpain-2 may be involved in the migration of cancer cells and may become an important target for inhibiting the migration of cancer cells.

Keywords: oral squamous cell carcinoma; calpain-2; migration

口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 是人头颈部恶性肿瘤中常见的病理类型之一, 占世界癌症死亡率的第6位^[1]。钙激活中性蛋白酶2 (calcium activated neutral protease 2, Calpain-2) 是钙依

赖性半胱氨酸蛋白水解酶家族成员, 广泛表达在哺乳动物中。研究表明, Calpain-2 高表达与基底样或三阴性乳腺癌的不良结果相关^[2]。同时, Calpain-2 高表达也与卵巢癌患者的铂耐药性和较差的总体存活率相

收稿日期: 2019-08-10

[通信作者] 廖湘凌, E-mail: lhyykqk@qq.com

关^[9]。有文献报道,组织中的钙激活中性蛋白酶对某些肿瘤细胞的迁移能力有明显影响^[4]。本研究检测 OSCC 患者癌组织与癌旁组织中 Calpain-2 的表达量,并进行比较,统计分析 OSCC 组织 Calpain-2 的表达及对 5 年生存率的影响。同时,利用 shRNA 技术构建 OSCC 低表达 Calpain-2 的细胞系,研究 Calpain-2 对 OSCC 肿瘤细胞生物学行为的影响。

1 资料与方法

1.1 组织及细胞样本

选取 2011 年 3 月—2014 年 3 月首都医科大学附属北京潞河医院口腔科进行外科手术并确诊为 OSCC 患者的癌组织 74 例,取距离癌组织 ≥ 5 cm 的癌旁组织作为对照组。HSC3、HSC6 细胞购自日本生物资源细胞库。OSCC 细胞为贴壁生长,用 DMEM 培养基 +10% 胎牛血清,放置在 37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 孵箱中培养。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学及评分标准 将 OSCC 组织及癌旁组织用 4% 多聚甲醛固定 48 h,按试剂盒说明书操作,以不加一抗为对照,受试样一抗为 Calpain-2 单克隆抗体 [美国赛默飞世尔科技(中国)有限公司]。免疫染色阳性物质均呈棕黄色颗粒,2 人双盲法观察切片。染色分值由 2 个指标衡量:一是阳性细胞率,每例随机选择 8 个高倍镜视野,取平均值共计 800 个细胞,按阳性细胞数占总细胞数的比例计算阳性表达率:1 分,1% ~ 33%;2 分,34% ~ 67%;3 分,68% ~ 100%。二是染色强度,1 分,弱表达;2 分,中表达;3 分,强表达。染色分值 = 阳性细胞率 × 染色强度,分值为 0 ~ 9 分, <6 分为低表达, ≥ 6 分为高表达。

1.2.2 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 使用 RNAiso Reagent (日本 TaKaRa 公司) 试剂盒提取总 RNA,用 Oligo primer 和 Go Script™ Reverse Transcription System (美国 Roche 公司),取 1 μ g 总 RNA 逆转录成 cDNA,然后 RT-PCR (Light Cycler 480, 美国 Roche 公司) 用双链 DNA 特异 SYBR Green I Dye 检测 Calpain-2 的表达。具体反应体系参照试剂盒说明书,总体积 20 ml,95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 10 s,60℃ 退火 20 s,72℃ 延伸 30 s,共 45 个循环。Calpain-2 正向引物:5'-GCTGCCGTTTC CTGAGTGTC-3';反向引物:5'-CGGTCACAGAGTAGG

CATGG-3'。长度 120 kb。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 为内参,GAPDH 正向引物:5'-AACTTTGGC ATTGTGGAAGG-3';反向引物:5'-ACACATTGGGGG TAGGAACA-3'。长度 310 kb。

1.2.3 Western blotting 用 RIPA 裂解液裂解 OSCC 样本或细胞系,加入 5× 上样缓冲液 95℃ 3 min,提取总蛋白,10% SDS-PAGE 电泳,分离蛋白样本,以抗人 Calpain-2 (美国 Abcam 公司) 单克隆抗体 4℃ 孵育过夜。过氧化物酶连接的抗小鼠二抗 (CST) 常温孵育 2 h 后,以 HRP 化学发光液 (美国 Millipore 公司) 观察蛋白表达量。

1.2.4 shRNA 转染 OSCC 细胞系以 2×10^5 个 / 孔接种到 6 孔板中。待细胞贴壁后用凝聚铵溶液每孔转染 5 mg Calpain 2-shRNA 载体或对照载体。转染 48 h 后,将细胞消化下来重新铺到 15 cm 培养皿中,加入 0.5 mg/ml 嘌呤霉素的细胞培养基进行培养。2 周后,分离出单个克隆并接种到 96 孔板中进一步筛选。2 个月后可以筛选出具嘌呤霉素抗性的稳转系,继续在含 1 mg/ml 嘌呤霉素的培养基中培养。

1.2.5 细胞增殖实验 Calpain-2 shRNA 转染后的 OSCC 细胞系以 5×10^3 个 / ml 接种到 96 孔板中,培养 24、48、72 和 96 h 后,用 Cell Counting Kit-8 (CCK-8, 美国 Sigma 公司) 检测细胞生长情况。每孔加入 10 μ l CCK-8 37℃ 孵育 3 ~ 4 h 后,用 450 nm 处的光密度 (OD) 值减去 650 nm 处的背景进行测量染色。

1.2.6 细胞迁移实验 将细胞重悬在无血清 DMEM 培养基中,按 1.5×10^5 个 / 孔将用 Cell Trace 标记的细胞铺在 Transwell 小室的上层,下层放置 500 ml 含 10% FBS 的 DMEM 培养基,放置在 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养。24 h 后将细胞固定,荧光显微镜下 400 放大倍数计数细胞,计 5 个视野,取均值。

1.2.7 细胞凋亡实验 OSCC 细胞转染 Calpain-2 shRNA 48 h 后,用 FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (美国 BD 公司) 检测细胞的凋亡情况。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,比较采用 *t* 检验;计数资料以例 (%) 表示,比较采用 χ^2 检验;生存分析用 Kaplan-Meier 法,采用 Log-rank χ^2 检验;*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OSCC 组织及癌旁组织 Calpain-2 的表达

Calpain-2 在 OSCC 组织中的表达较癌旁组织高 ($\chi^2=99.925, P=0.000$)。74 例早期 OSCC 患者中, 57 例 (77.03%) Calpain-2 表达于细胞质, 其中, 38 例为高表达, 19 例为低表达; 56 例 (75.68%) Calpain-2 表达于细胞膜, 其中, 30 例阴性, 26 例阳性; 30 例于细胞质和细胞膜共同表达。见图 1。

2.2 OSCC 组织及癌旁组织的 Calpain-2 mRNA 和 Calpain-2 蛋白表达

RT-PCR 结果显示, OSCC 组织的 Calpain-2 mRNA 相对表达水平为 (4.81 ± 0.14), 癌旁组织为 (1.15 ± 0.08), 两组比较, 差异有统计学意义 ($t=195.259, P=0.001$), OSCC 组织的 Calpain-2 mRNA 水平较癌旁组织上调。Western blotting 显示 OSCC 组织的 Calpain-2 表达高于癌旁组织。见图 2。

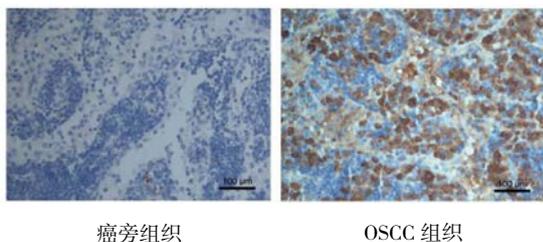


图 1 OSCC 组织及癌旁组织 Calpain-2 表达 (免疫组织化学 $\times 200$)

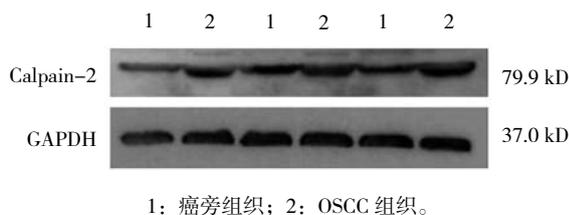


图 2 OSCC 组织与癌旁组织的 Calpain-2 的表达情况比较

2.3 Calpain-2 表达与总体生存率的关系

74 例患者 5 年死亡 33 例 (44.59%), 存活 41 例 (55.41%)。Calpain-2 在细胞膜中阴性与阳性 5 年生存率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (见表 1)。

2.4 转染 Calpain-2 shRNA 的 OSCC 细胞系中 Calpain-2 的表达

与对照组比较, Calpain-2 敲低的稳转 OSCC 细胞系中 Calpain-2 表达降低 ($P < 0.05$)。见图 3。

表 1 Calpain-2 表达与 OSCC 患者 5 年生存率的关系

Calpain-2 表达	n	5 年生存率例 (%)	χ^2 值	P 值
细胞质				
低表达	19	16 (84.21)	0.041	0.841
高表达	38	9 (23.68)		
细胞膜				
阴性	30	23 (76.67)	4.406	0.036
阳性	26	7 (26.92)		

2.5 转染 Calpain-2 shRNA 的 OSCC 细胞系细胞的生长情况

转染 Calpain-2 shRNA 后, OSCC 细胞系 (HSC3) 在 100 h 的 OD 值为 (3.1 ± 1.0), 与转染阴性对照细胞的 Control shRNA OD 值 (2.8 ± 0.9) 比较, 差异无统计学意义 ($t=1.918, P=0.060$)。见图 4。

2.6 稳转 Calpain-2 shRNA 的 OSCC 细胞系细胞的凋亡情况

以 Calpain-2 shRNA 稳转的 OSCC 细胞系 (HSC6) 凋亡率为 (9.83 ± 1.57)%, 与对照细胞系的凋亡率 (10.13 ± 0.94)% 及其 Annexin V 单阳性细胞和 Annexin V/PI 双阳性细胞比较, 差异无统计学意义 ($t=1.410, P=0.163$)。见图 5。

2.7 稳转 Calpain-2 shRNA 的 OSCC 细胞系细胞的迁移情况

低表达 Calpain-2 的稳转 OSCC 细胞系迁移率

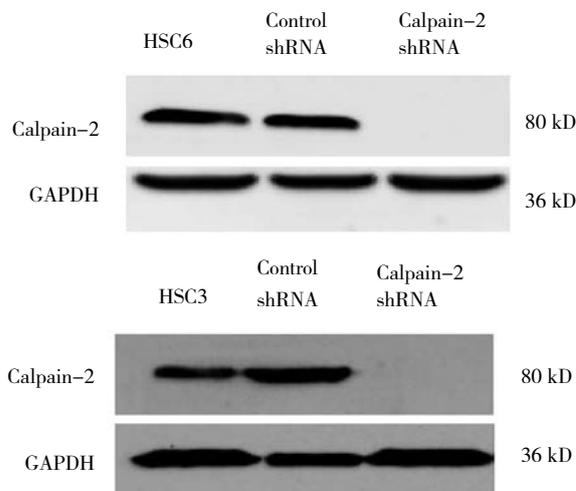


图 3 Calpain-2 敲低的稳转 OSCC 细胞系中 Calpain-2 的表达

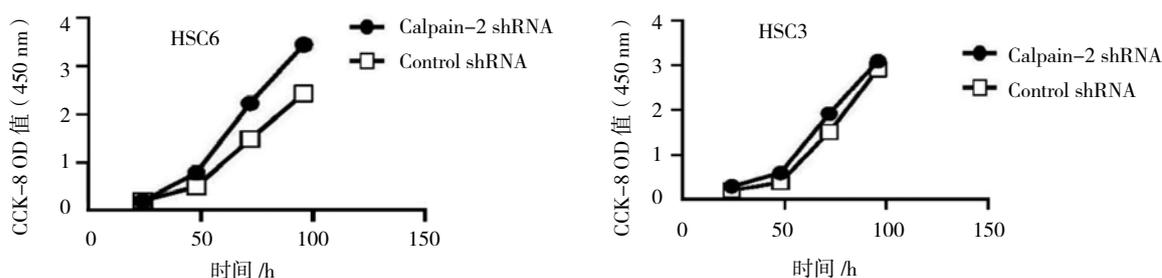


图 4 转染 Calpain-2 shRNA 的 OSCC 细胞系的生长情况

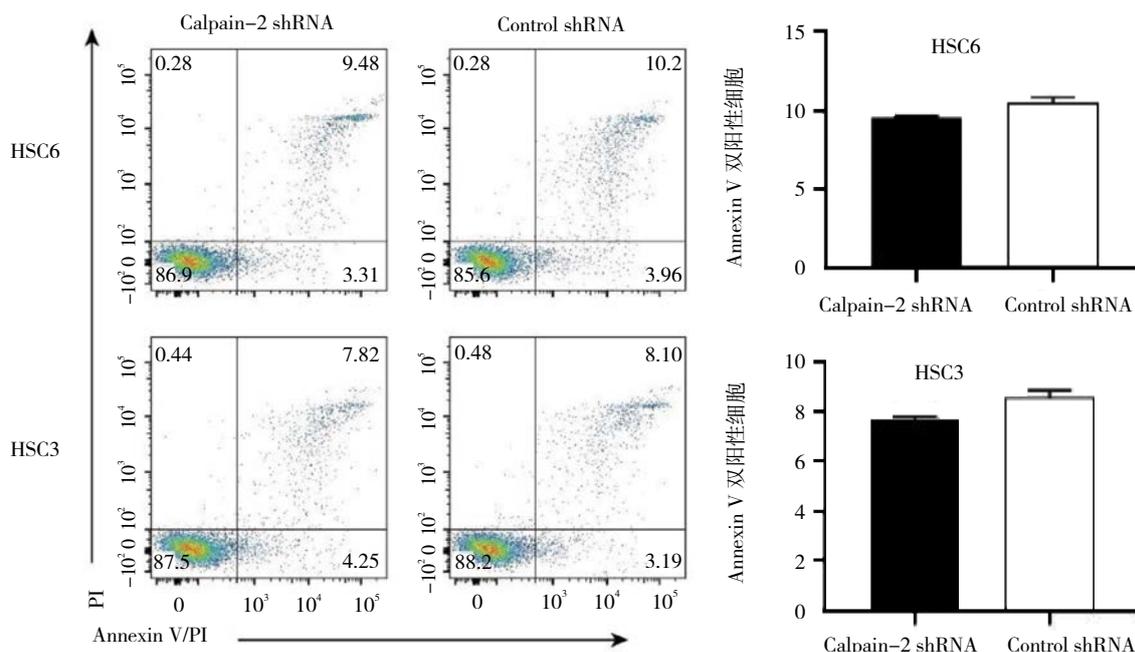


图 5 Calpain-2 敲低的稳转 OSCC 细胞系的细胞凋亡情况

(58.1 ± 2.98)% 与对照细胞系 (15.56 ± 6.07)% 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (见图 6)。在接种至培养

皿 48 h 后, 迁移的细胞数量降低 63.3%。

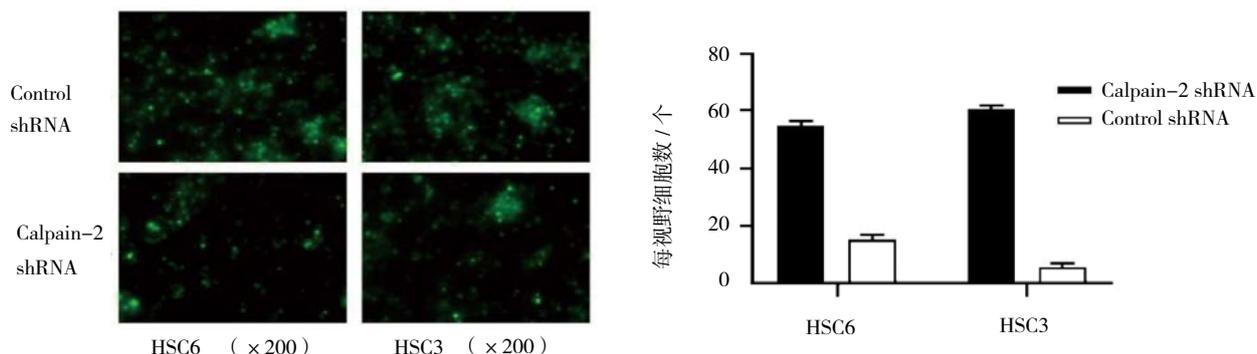


图 6 以 Calpain-2 shRNA 稳转的 OSCC 细胞系细胞的迁移情况

3 讨论

近年来, 关于 Calpain 介导的蛋白水解与 Calpain 参与化学性和兴奋毒性神经元创伤中神经坏死的

研究受到极大的关注^[5]。在静息状态下, Calpain-1 和 Calpain-2 以异质二聚体酶原 (80+29) kD 的形式广泛存在于各种细胞中。当细胞中 Ca^{2+} 的含量发生异常

马上可以激活 Calpain-2 和 Calpain-2 发生自溶, 形成异质二聚体的活化形式^[6]。在生理状态下, Calpain-2 的活性受内源性的蛋白酶抑制蛋白调控^[7]。在极端的情况下, Calpain-2 会被过度激活, 导致细胞内 Ca^{2+} 的含量持续处于高水平^[8]。Calpain 反应底物包括细胞支架蛋白、浆膜-细胞膜相关蛋白信号转导和钙调蛋白依赖的蛋白质和转录因子。当少量 Calpain 被活化时, 上述底物蛋白被水解后, 可能会转导细胞信号或触发细胞功能, 如膜融合或细胞伸展^[9]。

本研究分析多个 OSCC 组织中 Calpain-2 的含量, OSCC 组织中 Calpain-2 表达比癌旁组织要高。Calpain-2 可能参与肿瘤细胞的发展。Calpain-2 的高表达并不是影响 OSCC 患者总体生存率的独立因素, 说明 Calpain-2 并非直接影响肿瘤的发展, 而是通过调控其他因素促进肿瘤的发生。为进一步研究 Calpain-2 在肿瘤细胞中的作用, 利用 Calpain-2 shRNA 构建低表达 Calpain-2 的 OSCC 稳转系, 发现 Calpain-2 敲低的 OSCC 细胞的生长情况与对照组比较无差异, 同时凋亡率与对照组也无差异。同时, 通过细胞迁移实验发现, 降低 Calpain-2 的表达能抑制细胞的迁移。根据实验结果可以推测, OSCC 癌细胞内 Ca^{2+} 的含量异常, 激活 Calpain-2 发生自溶形成活化状态与胞内底物蛋白发生反应, 从而转导细胞信号或使肿瘤细胞发生迁移。已有文献报道 Calpain-2 与纤维肉瘤细胞、胶质母细胞瘤细胞、胃癌细胞等癌细胞的迁移有关^[10]。研究表明, Calpain-2 可能也参与到 OSCC 癌细胞的迁移过程中, 有可能成为抑制 OSCC 癌细胞迁移的重要靶点。

参 考 文 献:

[1] MATSUI T, OKADA T, KAWADA K, et al. Detection of second primary malignancies of the esophagus and Hypopharynx in oral squamous cell carcinoma patients[J]. *Laryngoscope Investigative Otolaryngology*, 2018, 3(4): 263-267.

[2] STORR S J, LEE K W, WOOLSTON C M, et al. Calpain system protein expression in basal-like and triple-negative invasive breast cancer[J]. *Ann Oncol*, 2012, 23(9): 2289-2296.

[3] STORR S J, SAFUAN S, WOOLSTON C M, et al. Calpain-2 expression is associated with response to platinum based chemotherapy, progression-free and overall survival in ovarian cancer[J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16(10): 2422-2428.

[4] AHMAD F, DAS D, KOMMADDI R P, et al. Isoform-specific hyperactivation of calpain-2 occurs presymptomatically at the synapse in Alzheimer's disease mice and correlates with memory deficits in human subjects[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 13119.

[5] TAO X G, CHEN X T, HOU Z G, et al. Protective functions of PJ34, a poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor, are related to down-regulation of calpain and nuclear factor-kappa B in a mouse model of traumatic brain injury[J]. *World Neurosurg*, 2017, 107(11): 888-899.

[6] YANG S J, WANG J, XU J, et al. miR-93-mediated collagen expression in stress urinary incontinence via calpain-2[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1): 624-629.

[7] JANG H S, LAL S, GREENWOOD J A. Calpain-2 is required for glioblastoma cell invasion: regulation of matrix metalloproteinase 2[J]. *Neurochem Res*, 2010, 35(11): 1796-1804.

[8] WANG S, WANG S, ASGAR J, et al. Ca^{2+} and calpain mediate capsaicin-induced ablation of axonal terminals expressing transient receptor potential vanilloid 1[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(20): 8291-8303.

[9] REDPATH G M I, WOOLGER N, PIPER A K, et al. Calpain cleavage within dysferlin exon 40a releases a synaptotagmin-like module for membrane repair[J]. *Mol Biol Cell*, 2014, 25(19): 3037-3048.

[10] LIU B D, ZHOU Y, LU D, et al. Comparison of the protein expression of calpain-1, calpain-2, calpastatin and calmodulin between gastric cancer and normal gastric mucosa[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(3): 3705-3710.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 郑博, 廖湘凌, 丁南, 等. 钙激活中性蛋白酶 2 在口腔鳞状细胞癌中的表达及对肿瘤细胞生物学行为的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(3): 27-31.