

# AAVC- I 对人口腔鳞癌 Tca8113 细胞 GRP78 和 Caspase-4 基因表达的影响

任琳琳<sup>1</sup>, 柴 琳<sup>2</sup>

( 皖南医学院 1. 病理生理学教研室; 2. 口腔医学院, 安徽 芜湖 241002)

**【摘要】**目的: 研究不同浓度的 AAVC-I 对人口腔鳞癌 Tca8113 细胞 GRP78、Caspase-4 基因表达的影响。方法: 设置正常对照组和 AAVC-I 实验组, Trizol 试剂提取各组总 RNA, 运用 RT-PCR 法扩增内参基因  $\beta$ -actin 及目的基因 GRP78、Caspase-4 片段, ChemiDoc XRS 凝胶成像系统观察电泳结果并采用 QuantityOne 软件测定目的条带灰度值。结果: 正常对照组、实验组均扩增出 GRP78、Caspase-4 目的条带, 且随 AAVC-I 浓度增大 GRP78、Caspase-4 表达增加。结论: 高浓度 AAVC-I 可上调 GRP78、Caspase-4 基因的表达, 因此 AAVC-I 可能诱导人口腔鳞癌 Tca8113 细胞发生了内质网应激。

**【关键词】**AAVC-I; GRP78; Caspase-4; Tca8113; 内质网应激

**【中图分类号】**R 739. 8 **【文献标识码】**A

**【DOI】**10. 3969/j. issn. 1002-0217. 2016. 01. 004

## Effects of AAVC- I on GRP78 and Caspase-4 gene expression in human oral squamous cell carcinoma Tca8113

REN Linlin, CHAI Lin

Department of Pathophysiology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

**【Abstract】Objective:** To observe the effects anti-tumor component-I from Agkistrodon acutus venom (AAVC-I) in diverse dosage on the expression GRP78 and Caspase-4 gene in human oral squamous carcinoma Tca8113 cell lines. **Methods:** The experiment was performed in normal control group and AAVC-I group. Trizol reagent was used to extract total RNA in each group, and RT-PCR was performed to amplify the internal control  $\beta$ -actin gene and fragments of GRP78 and Caspase-4. ChemiDoc XRS gel imaging system was used to observe electrophoresis presentation, and QuantityOne software to measure the gray value in the target band. **Results:** Both GRP78 and Caspase-4 were amplified, and the expression of these two genes was up-regulated with increased dose of AAVC-I. **Conclusion:** High dose of AAVC-I can increase the expression of GRP78 and Caspase-4 genes, suggesting that AAVC-I may induce endoplasmic reticulum stress in the oral squamous carcinoma Tca8113 cell lines.

**【Keywords】**AAVC-I; GRP78; Caspase-4; Tca8113; endoplasmic reticulum stress

蛇毒是一种复杂的蛋白质混合物,含有多种毒素和酶类,具有很大的潜在药用价值,已有大量研究证实,蛇毒提取成分在凝血、抗血栓、止痛及抗肿瘤等方面发挥重要作用<sup>[1]</sup>,其中抗肿瘤作用已成为广大学者研究的焦点。尖吻蝮蛇毒抑瘤组分 1 (anti-tumor component-I from Agkistrodon acutus venom, AAVC-I) 是本校蛇毒研究所利用蛋白分离纯化技术从皖南尖吻蝮蛇毒中提取的一种活性成分,且已证实其具有很好的抗凝血作用<sup>[2-3]</sup>,而有关其抗肿瘤

的作用国内外报道较少。实验室前期研究表明 AAVC-I 对小鼠肺癌 LLC 细胞、A549 和 K562 具有增殖抑制和诱导凋亡的作用<sup>[4-6]</sup>。本实验以 Tca8113 细胞为研究对象,进一步探讨 AAVC-I 的抗肿瘤作用,为开发高效抗肿瘤药物更好服务临床提供理论依据。

### 1 资料与方法

1.1 主要试剂与仪器 AAVC-I 冻干粉由本校蛇

基金项目: 皖南医学院重点科研培育基金项目( WK2015Z08)

收稿日期: 2015-08-11

作者简介: 任琳琳( 1985-) 女, 2013 级硕士研究生 ( 电话) 18375348220 ( 电子信箱) 747104463 @ qq. com;

柴 琳, 女, 副教授, 硕士生导师 ( 电子信箱) 869319562@ qq. com 通讯作者。

毒研究所提供。PBS 缓冲液、RPMI1640 液体培养基(赛默飞世尔生物化学制品有限公司),无支原体胎牛血清(杭州四季青公司),青霉素-链霉素溶液、胰酶消化液(碧云天生物技术公司),GRP78、Caspase-4、CHOP 引物合成(南京金斯瑞生物科技有限公司),RNA 提取试剂 Trizol(美国 Invitrogen 公司),逆转录试剂盒(Thermo 公司),扩增试剂盒(Thermo 公司)。细胞培养箱(Thermo),倒置相差显微镜(日本 OLYMPUS IX51),超净工作台(上海三发科学仪器有限公司),DYY-10C 电泳仪、水平电泳槽(北京六一仪器厂),ChemiDoc XRS 凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司),S1000 ThermalCyclerPCR 仪(美国 BIO-RAD 公司),NANO DROP2000 分光光度计(Thermo 公司),SCIOLOGEX D1008 掌上离心机(美国 SCIOLOGEX 公司)。

1.2 细胞培养 人口腔鳞癌细胞 Tca8113 来自课题组冻存保留,培养液配制: RPMI1640 液体培养基加 10% 胎牛血清加 1% 青霉素-链霉素溶液,将 Tca8113 接种于培养瓶中,37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中常规培养,待细胞长至 80% 左右,胰蛋白酶消化后进行分瓶传代。

1.3 倒置显微镜观察不同浓度 AAVC-I 干预后细胞形态的变化。

1.4 RT-PCR 检测 GRP78、Caspase-4 基因片段表达

Trizol 试剂提取总 RNA,NANO DROP2000 分光光度计测定 RNA 浓度。12 μL 反转录体系: TemplateRNA 5 μL, Oligo(dt)<sub>18</sub> 1 μL, H<sub>2</sub>O( nuclease-free) 6 μL, 离心混匀,70℃、5 min 取出迅速置于冰盒内,3 min 后加入 5 × Reaction Buffer 4 μL, RiboLock RNase inhibitor(20U/μL) 1 μL, 10 mmol/L dNTPMix 2 μL, RevertAid MuLVRT(200U/μL) 1 μL, 离心混匀,42℃ 60 min,95℃ 5 min 以灭活反转录酶。β-actin、GRP78、Caspase-4 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,序列、扩增产物长度、退火温度见表 1。

表 1 引物序列、产物长度及退火温度

基因	引物序列	产物碱基数/bp	T <sub>m</sub> /℃
β-actin	F: 5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3'	285	58
	R: 5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3'		
GRP78	F: 5'-CTATGTCGCCTTCACTCC-3'	132	50
	R: 5'-ACAGACGGGTCATTCAC-3'		
Caspase-4	F: 5'-TCACAGGGATGAAGGAGC-3'	449	51
	R: 5'-TGCCCTTGAAGAGCAGAA-3'		

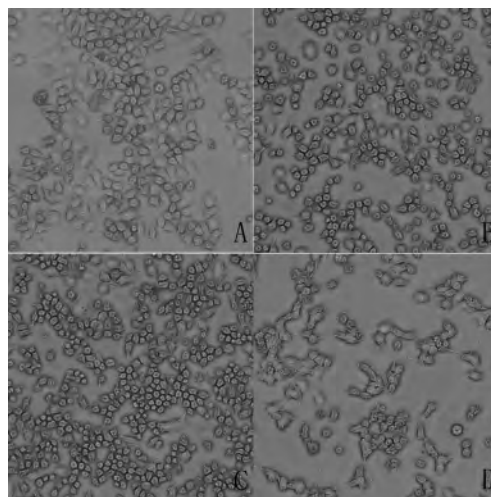
50 μL PCR 反应体系: PCR Master Mix(2 ×) 25

μL、Forward primer 5 μL(1 μmol/L)、Reverse primer 5 μL(1 μmol/L)、Template DNA 1 μL(1 μg/μL)、H<sub>2</sub>O( nuclease-free) 14 μL。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析,各实验数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK- $\eta$  检验,以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 AAVC-I 作用后 Tca8113 细胞形态变化 正常 Tca8113 细胞呈不规则的多边形或梭形,胞质均匀,细胞间分界明显,贴壁生长。AAVC-I 作用 12 h 后随浓度增加(0、3、12.5、6.25、12.5 μg/mL),Tca8113 细胞体积变小,细胞间隙增大,半贴壁细胞或悬浮细胞增加,出现凋亡细胞样改变,细胞皱缩变圆,胞质密度增加,细胞膜破坏,细胞融合抱团界限不清(如图 1 所示)。



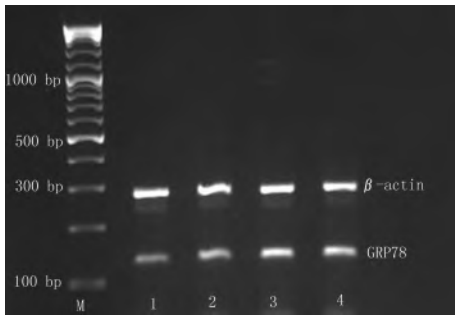
A: 正常对照组 (×200); B: AAVC-I 3.125 μg/mL 组 (×200); C: AAVC-I 6.25 μg/mL 组 (×200); D: AAVC-I 12.5 μg/mL 组 (×200)。

图 1 不同浓度 AAVC-I 作用下细胞形态改变

2.2 琼脂糖凝胶电泳 配制 2% 琼脂糖凝胶,β-actin、GRP78、Caspase-4 PCR 扩增产物上样,每孔 5 μL 样品 + BeyoRed DNA 上样缓冲液(6 ×) 1 μL,选择 110 V,50 min 进行电泳,运用 ChemiDoc XRS 凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司)拍照,正常对照组、实验组均扩增出 β-actin、GRP78、Caspase-4 目的条带,其中 β-actin 稳定表达,GRP78、Caspase-4 随 AAVC-I (0、3、12.5、6.25、12.5 μg/mL) 浓度增大表达增加。如图 2、3 示。

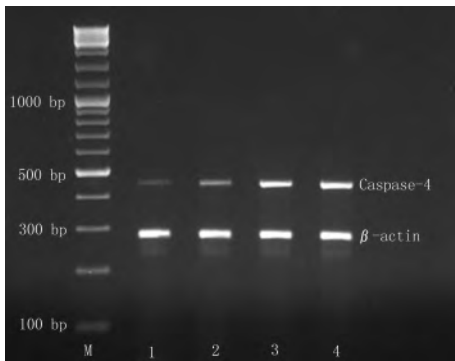
2.3 数据分析 采用 QuantityOne 软件分别检测正常对照组和 AAVC-I 实验组目的条带灰度值,各组 GRP78 与内参基因的比值如表 2 示,Caspase-4 与内

参基因的比值如表 3 示 ,AAVC-I 实验组随浓度的增大 ,GRP78、Caspase-4 基因表达水平较正常组显著上调 , $P < 0.05$  代表其差异具有统计学意义。



M: DNA Ladder; 1 2 3 4 泳道各 AAVC-I (0、3.125、6.25、12.5 μg/mL) 实验组 β-actin 及 GRP78、Caspase-4 目的条带。

图 2 不同浓度 AAVC-I 作用下 GRP78 基因表达



M: DNA Ladder; 1 2 3 4 泳道各 AAVC-I (0.3.125、6.25、12.5 μg/mL) 实验组 β-actin 及 GRP78、Caspase-4 目的条带。

图 3 不同浓度 AAVC-I 作用下 Caspase-4 基因表达

表 2 AAVC-I 作用下各组 GRP78 基因表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	AAVC-I / (μg/mL)	GRP78/β-actin
对照组	0	0.3598 ± 0.02655
实验组	3.125	0.6127 ± 0.06650
	6.25	0.8228 ± 0.05156
	12.5	0.8969 ± 0.07941
F 值		49.486
P 值		<0.01

表 3 AAVC-I 作用下各组 Caspase-4 基因表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	AAVC-I / (μg/mL)	Caspase-4/β-actin
对照组	0	0.0545 ± 0.00134
实验组	3.125	0.2493 ± 0.00620
	6.25	0.7081 ± 0.01480
	12.5	0.8058 ± 0.01891
F 值		2527.950
P 值		<0.01

### 3 讨论

口腔鳞癌作为头颈部常见的肿瘤性疾病之一 ,目前主要采用手术为主的综合治疗<sup>[7-8]</sup> ,预后较差 ,且严重影响人们的面容 给患者带来身心上的伤害 ,亟待寻求一种有效的治疗药物。文献报道蛇毒提取物不但具有止痛、抗凝<sup>[9]</sup> 等作用 ,还可通过诱导肿瘤细胞凋亡 ,起到抗肿瘤作用。李凤君等<sup>[10]</sup> 研究表明眼镜蛇心脏毒素 (CTX) 对肺癌 A549 细胞具有增殖抑制作用 ,可促进线粒体内细胞色素 C 的释放 ,降低线粒体膜电位 ,激活 Procaspase-9 和 Procaspase-3 通过线粒体途径诱导 A549 细胞凋亡。同时有研究 AAVC-I 显示从尖吻蝮蛇毒中提取的细胞毒素 ACTX-6 能激活 Fas 通路使 JNK 表达上调 ,进而级联激活 caspase-3 ,诱导 A549 细胞凋亡<sup>[11]</sup>。因此 ,研究蛇毒抗肿瘤机制 ,开发新的抗肿瘤药物成为必然趋势。

本实验利用 RT-PCR 法检测 AAVC-I 作用后 Tca8113 细胞 GRP78、Caspase-4 基因表达情况 ,发现随 AAVC-I 浓度增大 ,GRP78、Caspase-4 基因表达呈上升趋势 ,提示 AAVC-I 可能诱导人口腔鳞癌 Tca8113 细胞发生了内质网应激反应。死亡受体途径和线粒体途径是诱导细胞凋亡的主要途径 ,也是研究较多的途径 ,近些年来发现内质网应激作为一条新的途径也可诱导肿瘤细胞凋亡。缺氧、毒物、理化因素等诱发内质网应激的产生 ,Caspase-4、GRP78 是内质网应激的标志分子 ,其中 GRP78 位于内质网膜上 ,负责蛋白质的折叠及转运 ,正常情况下与内质网应激启动蛋白 PERK、AIF6、IRE1 结合 ,在内质网应激发生时 GRP78 与三者分离表达增加 ,并结合内质网内错误折叠及未折叠蛋白将其转运出去<sup>[12-13]</sup> ,而游离之后的 PERK、AIF6、IRE1 转变为活性分子 ,可启动下游细胞凋亡相关信号分子如: TRAF2、JNK、ASKT 等来诱导细胞凋亡。Caspase-4 在内质网应激时被活化的 IRE1 激活 ,进而级联激活下游 caspase 家族信号分子 ,诱导凋亡反应。

本实验将不同浓度的 AAVC-I 处理 Tca8113 细胞 ,发现 Caspase-4、GRP78 随着 AAVC-I 浓度增大其表达逐渐增加 ,其中 3.125 μg/mL、6.25 μg/mL 两组差值较 6.25 μg/mL、12.5 μg/mL 两组差值大 ,考虑 AAVC-I 诱发内质网应激具有一定的浓度范围 ,CHOP 通路、JNK-ASKT、Caspase-4/Caspase-12 通路是内质网应激诱发凋亡的主要通路 ,AAVC-I 具体通过哪一条通路诱导 Tca8113 细胞凋亡还需进一步研究。

## 【参考文献】

- [1] 胡建国. 尖吻蝮蛇毒药理作用的研究进展 [J]. 中医学报, 2013 28( 1) : 74 - 75.
- [2] 孔岩, 李曙, 张根葆, 等. 蝮蛇蛇毒 PCA 对实验性心肌梗死大鼠血凝状态的影响 [J]. 皖南医学院学报, 2009 28( 5) : 316 - 318, 391.
- [3] 张根葆, 张毅, 孔岩, 等. 五步蛇毒蛋白 C 激活剂的纯化与活性分析 [J]. 蛇志, 2008 20( 4) : 249 - 251.
- [4] 周兵, 张根葆, 段婷, 等. 尖吻蝮蛇毒抑瘤组分 I 对小鼠肺癌 LLC 细胞增殖的抑制作用 [J]. 皖南医学院学报, 2012 31( 2) : 87 - 88, 91.
- [5] 徐平, 张根葆, 王斐, 等. 尖吻蝮蛇毒抑瘤组分 I 对人肺癌 A549 细胞增殖抑制作用 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014 19( 5) : 493 - 496.
- [6] 郑汝琦, 张根葆, 黄璐, 等. 尖吻蝮蛇毒抑瘤组分 I 诱导白血病 K562 细胞凋亡的线粒体机制 [J]. 中国实验血液学杂志, 2013 21( 3) : 591 - 595.
- [7] 徐冬贵. 口腔颌面部恶性肿瘤微转移的研究进展 [J]. 口腔医学研究, 2012 28( 4) : 385 - 387, 390.
- [8] ANNERTZ K, ANDERSON H, BIORKLUND A, *et al.* Incidence and survival of squamous cell carcinoma of the tongue in Scandinavia, with special reference to young adults [J]. *Int J Cancer* 2002, 101( 1) : 95 - 99.
- [9] 胡建国. 尖吻蝮蛇毒研究进展 [J]. 蛇志, 2012 24( 1) : 56 - 57.
- [10] 李凤君, 袁进, 韩丽萍, 等. 蛇毒心脏毒素诱导肺癌 A549 细胞的凋亡机制研究 [J]. 中国药房, 2014 25( 7) : 583 - 586.
- [11] LAURICELLA M, EMANUELLE S, DANNEO A, *et al.* JNK and AP-1 mediate apoptosis induced by bortezomib in HepG2 cells via FasL/caspase-8 and mitochondria dependent Pathways [J]. *Apoptosis* 2006, 11( 4) : 607 - 625.
- [12] KANEKO M. Molecular pharmacological studies on the protection Mechanism against endoplasmic reticulum stress-induced neurodegenerative disease [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2012, 132( 12) : 1437 - 1442.
- [13] CHEN X, LI M, CHEN D, *et al.* Autophagy induced by calcium phosphate precipitates involves endoplasmic reticulum membranes in autophagosome biogenesis [J]. *PLoS One*, 2012, 7( 12) : e52347.

## • 声 明 •

近期屡次发现有非法网站以《皖南医学院学报》的名义在网上广泛征稿, 以骗取作者的审稿费和发表费。对此, 皖南医学院学报编辑部郑重声明: 本刊编辑部为唯一合法的编辑出版单位, 从未授权任何单位或机构代理本刊的征稿与出版业务。

本刊办公和邮寄地址: 安徽省芜湖市文昌西路 22 号, 邮编 241002; 电话: 0553-3932553; 在线投稿网址: <http://xuebao.wnmc.edu.cn> ( 亦可通过皖南医学院校园网首页快速通道进入)。作者投稿时务必核实本刊的网址和邮寄地址, 谨防上当受骗。任何以《皖南医学院学报》名义所从事的各种征稿活动, 均属侵权行为, 与本刊无关, 本刊将追究其法律责任。请广大作者务必提高警惕, 一旦被骗, 及时报警。

皖南医学院学报编辑部