

基质交联分子 1 表达下调对人胰腺癌 SW1990 细胞周期及细胞凋亡的影响

黎美琳¹ 顾鹏²

【摘要】 目的 探讨基质交联分子 1 (STIM1) 表达下调对人胰腺癌细胞株 SW1990 细胞周期和细胞凋亡的影响, 并研究其分子作用机制。方法 构建携带 STIM1 基因 siRNA 的慢病毒载体转染 SW1990 细胞, 分为对照组、空载体组和 STIM1 组。采用半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) 和 Western blot 验证 STIM1 组 SW1990 细胞 STIM1 表达下调。通过 MTT 增殖实验和流式细胞术检测 STIM1 表达下调对细胞增殖、周期和细胞凋亡的影响, 采用 RT-PCR 和 Western blot 法检测细胞周期和细胞凋亡相关分子表达的变化。两组间比较采用 *t* 检验。结果 STIM1 组 SW1990 细胞中 STIM1 表达 mRNA (0.261 ± 0.029)、蛋白(0.120 ± 0.032) 低于空载体组 mRNA (1.002 ± 0.091)、蛋白(0.996 ± 0.053), $t = 20.74, 26.89$, P 均 < 0.01 。SW1990 细胞 24、48、72 h 的增殖水平 STIM1 组分别为(0.122 ± 0.008)、(0.252 ± 0.031)、(0.373 ± 0.028), 相比空载体组(0.223 ± 0.035)、(0.618 ± 0.017)、(0.924 ± 0.140), $t = 6.48, 16.90, 23.99$, $P < 0.01$, 受到抑制。STIM1 组中 SW1990 细胞 G2/M 期细胞比例(41.47 ± 0.66)% 高于空载体组(10.30 ± 2.24)%, $t = 23.14$, $P < 0.01$ 。STIM1 组中 SW1990 细胞凋亡率(25.21 ± 1.96)% 高于空载体组(3.71 ± 1.23)%, $t = 16.03$, $P < 0.01$ 。半定量 RT-PCR 和 Western blot 提示, STIM1 组细胞周期蛋白 B1 (cyclin B1) 表达 mRNA (0.344 ± 0.031)、蛋白(0.776 ± 0.042) 相比空载体组 mRNA (1.011 ± 0.060)、蛋白(1.034 ± 0.036), $t = 40.06, 8.51$, P 均 < 0.01 下调; STIM1 组 p21 表达 mRNA (1.970 ± 0.107)、蛋白(1.315 ± 0.093) 相比空载体组 mRNA (1.025 ± 0.044)、蛋白(0.998 ± 0.036), $t = 17.10, 9.52$, P 均 < 0.01 上调; STIM1 组 Bcl-2 表达 mRNA (0.156 ± 0.025)、蛋白(0.381 ± 0.028) 相比空载体组 mRNA (1.010 ± 0.072)、蛋白(0.980 ± 0.057), $t = 15.46, 14.63$, P 均 < 0.01 下调; STIM1 组 survivin 表达 mRNA (0.188 ± 0.022)、蛋白(0.022 ± 0.019) 相比空载体组 mRNA (1.016 ± 0.090)、蛋白(0.994 ± 0.047) $t = 58.08, 442.58$, P 均 < 0.01 下调; STIM1 组 procaspase-3 表达蛋白(0.389 ± 0.030) 相比空载体组蛋白(1.008 ± 0.040) 下调, 差异有统计学意义($t = 19.22$, $P < 0.01$)。结论 在胰腺癌 SW1990 细胞中, 沉默 STIM1 可阻滞细胞于 G2/M 期, 抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 有望成为胰腺癌治疗的分子靶点。

【关键词】 胰腺癌; 基质交联分子 1; 细胞周期; 细胞凋亡

Effects of down-regulation of stromal interaction molecule 1 on cell cycle and apoptosis of pancreatic cancer cell line SW1990 Li Meilin¹, Gu Peng². ¹Department of Hepatology, Wuxi No.5 People's Hospital, Wuxi 214000, China; ²Department of Urology, Xishan People's Hospital of Wuxi, Wuxi 214000, China

Corresponding author: Gu Peng, Email: gdp_1988@126.com

【Abstract】 **Objective** To investigate effects of down-regulation of STIM1 on cell cycle and apoptosis of pancreatic cancer cell line SW1990 and explore its possible molecular mechanism. **Methods** Lentiviral vectors, which carrying siRNA of STIM1 gene, were constructed. Then lentiviral vectors were used to transfect the SW1990 cells and were divided into three groups: an untreated group, an empty vector group and an STIM1 group. The effects of down-regulation of STIM1 expression on cell proliferation, cell cycle and apoptosis were assessed by MTT assay and flow cytometry, respectively. Further expression changes of genes related to cell cycle and

apoptosis were detected by semi-quantitative RT-PCR and Western blot. All values present the mean \pm SD. *t* test was used between the two groups. **Results** The STIM1 expression of STIM1 group mRNA (0.261 ± 0.029), protein (0.120 ± 0.032) was down-regulated compared with the empty vector group [mRNA (1.002 ± 0.091) $t = 20.74$, $P < 0.01$], [protein (0.996 ± 0.053) $t = 26.89$, $P < 0.01$] in the SW1990 cells. Cell proliferation of SW1990 in the STIM1 group in 24 h, 48 h, 72 h (0.122 ± 0.008), (0.252 ± 0.031), (0.373 ± 0.028) was significantly inhibited compared with the empty vector group [(0.223 ± 0.035) $t = 6.48$, $P < 0.01$], [(0.618 ± 0.017) $t = 16.90$, $P < 0.01$], [(0.924 ± 0.140) $t = 23.99$, $P < 0.01$]. The results of flow cytometry revealed that the percentage of cells at G2/M phase in the STIM1 group was (41.47 ± 0.66)%, significantly higher than that in the empty vector group [(10.30 ± 2.24)%, $t = 23.14$, $P < 0.01$]. In addition, the percentage of apoptotic cells in the STIM1 group was (25.21 ± 1.96)%, significantly higher than that in the empty vector group [(3.71 ± 1.23)%, $t = 16.03$, $P < 0.01$]. Moreover, the results of semi-quantitative RT-PCR and Western blot showed that Cyclin B1 expression of the STIM1 group [mRNA (0.344 ± 0.031)], [protein (0.776 ± 0.042)] was down regulated compared with the empty vector group [mRNA (1.011 ± 0.060) $t = 40.06$, $P = 0.000$] [protein (1.034 ± 0.036) $t = 8.51$, $P < 0.01$], P21 expression of STIM1 group [mRNA (1.970 ± 0.107)], [protein (1.315 ± 0.093)] was regulated compared with the empty vector group [mRNA (1.025 ± 0.044) $t = 17.10$, $P < 0.01$], [protein (0.998 ± 0.036) $t = 9.52$, $P < 0.01$], Bcl-2 expression of STIM1 group [mRNA (0.156 ± 0.025)], [protein (0.381 ± 0.028)] was down regulated compared with the empty vector group [mRNA (1.010 ± 0.072) $t = 15.46$, $P < 0.01$], [protein (0.980 ± 0.057) $t = 14.63$, $P < 0.01$]. Survivin expression of STIM1 group [mRNA (0.188 ± 0.022)], [protein (0.022 ± 0.019)] was down regulated compared with the empty vector group [mRNA (1.016 ± 0.090) $t = 58.08$, $P < 0.01$], [protein (0.994 ± 0.047) $t = 442.58$, $P < 0.01$]. Procaspase-3 expression of STIM1 group [protein (0.389 ± 0.030)] was down regulated compared with the empty vector group [protein (1.008 ± 0.040) $t = 19.22$, $P < 0.01$]. **Conclusion** STIM1 may play a pivotal role in the proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cell line SW1990, which could become a molecular target for therapy of pancreatic carcinoma.

【Key words】 Pancreatic cancer; Stomal interaction molecule 1; Cell cycle; Cell apoptosis

胰腺癌是消化系统恶性肿瘤之一,近年来发病率不断攀升,在西方国家其死亡率现已位居恶性肿瘤第四位。由于胰腺癌起病隐匿、缺乏早期检测手段,恶性程度高、进展迅速、放化疗不敏感,故预后极差,五年生存率不足5%^[1]。因此寻找有效的分子治疗靶点是目前胰腺癌研究热点。

基质交联分子1 (stomal interaction molecule 1, STIM1) 是一种主要分布于内质网的跨膜蛋白,具有一个内质网端 Ca^{2+} 结合区域和多个胞质端蛋白-蛋白相互作用区域。它不仅作为内质网钙浓度的感受器,而且参与细胞内钙库操纵性钙内流的激活^[2-4]。近年来研究表明 STIM1 在乳腺癌、肝癌、宫颈癌、肺癌等恶性肿瘤组织中高表达,抑制其表达可减弱肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭、转移、血管生成^[5-8]等生物学行为。本课题组前期研究^[9-11]发现在前列腺癌 PC-3 细胞中抑制 STIM1 表达后,细胞增殖能力降低,细胞凋亡增加;在前列腺癌 DU145 细胞中抑制 STIM1 表达后,细胞迁移及侵袭能力明显降低。而在胰腺癌中 STIM1 功能尚不清楚,本实

验采用小干扰 RNA 靶向抑制胰腺癌细胞 SW1990 中 STIM1 的表达,进一步观察 STIM1 表达下调后 SW1990 细胞增殖、凋亡的变化及其相关机制。

材料与方 法

一、试剂和器材

人胰腺癌细胞株 SW1990 购自中国科学院上海细胞库。STIM1 基因的 siRNA 干扰序列,携带 STIM1 siRNA 的慢病毒载体 STIM1-pGCSIL-GFP 及空载体 pGCSIL-GFP 由上海吉凯基因公司设计与合成; STIM1 基因 siRNA 干扰序列如下: CCGGGCTCTCCACATTTGGATTCTTTTCAAGA GAAAGAATCCAAATGTGGAGAGCTTTTTG 及 A ATTCAAAAAGCTCCACATTTGGATTCTTTCTCTT GAAAAGAATCCAAATGTGGAGAGC。RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司)。胎牛血清(杭州四季青公司)。四甲基偶氮唑盐(MTT)(美国 Sigma 公司)。Annexin V-FLTC/PI 检测试剂盒(美国 Invitrogen 公

司)。cDNA 逆转录试剂盒(美国 Fermentas 公司)。细胞周期检测试剂盒、Western blot 相关试剂(武汉碧云天公司)。PCR 引物序列由上海生工设计合成。survivin、Bcl-2、caspase-3 一抗(美国 CST 公司), STIM1 一抗(美国 ABGENT 公司), cyclinB1 一抗(美国 Santa Cruz 公司), P21、GAPDH 一抗, 羊抗兔、羊抗鼠二抗(武汉碧云天公司)。

二、细胞培养

胰腺癌 SW1990 细胞生长于含有 10% 胎牛血清 RPMI 1640 的培养基中, 于 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱内培养, 细胞常规每 2~3 d 传代 1 次, 收集对数生长期细胞用于实验。

1. 细胞转染及实验分组: SW1990 细胞以 2×10^4 孔接种于 24 孔板, 待细胞贴壁后去除培养基, 加入含有 5 $\mu\text{g/ml}$ polybrene 转染增强液, 以感染复数(MOI) = 50 加入相应慢病毒载体, 分组如下: (1) 对照组: 未感染病毒; (2) 空载体组: 感染空白 pGCSIL-GFP; (3) STIM1 组: 感染 STIM1-pGCSIL-GFP。转染后 12 h 去除病毒加入正常培养基继续培养, 于转染后 72 h 观察 SW1990 细胞绿色荧光表达量。

2. MTT 细胞增殖实验: 细胞处理及分组同上, 取对数生长期的各组细胞以每孔 5×10^3 个细接种于 96 孔板, 每组设立 3 个复孔, 分别于 24、48 和 72 h 后, 每孔加入 10 μl MTT (5 mg/L), 避光孵育 4 h, 弃上清液, 每孔加入 150 μl DMSO, 振荡摇匀, 于酶标仪 490 nm 波长测定吸光度(A 值)。实验重复 3 次。

3. 细胞周期检测: 细胞处理及分组同上, 培养 48 h 后, 收集各组上清液及贴壁细胞, PBS 洗涤, 冰预冷的 70% 乙醇 4 °C 固定过夜后, PBS 洗涤 3 次去除固定液, 按试剂盒说明书要求加入配置好的碘化丙啶染色液, 于 37 °C 避光孵育 30 min, 最后采用流式细胞仪分析样品中的 DNA 含量。实验重复 3 次。

4. 流式细胞术检测细胞凋亡—Annexin V/PI 双染色法: 细胞处理及分组同上, 培养 48 h 后, 收集各组上清液及贴壁细胞, PBS 洗涤。按凋亡试剂盒步骤进行操作。以 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 密度用 $1 \times$ binding buffer 1 ml 重悬细胞, 取 100 μl 细胞悬液加入 5 μl Annexin V-FLTC 和 1 μl PI (100 $\mu\text{g/ml}$), 室温避光作用 15 min, 再加入 400 μl $1 \times$ binding buffer, 混匀后上机检测。

5. 半定量 RT-PCR 检测 mRNA 表达: 转染 72 h 后, Trizol 充分裂解各组细胞, 提取细胞总 RNA, 检

测 RNA 纯度和浓度。取 5 μg RNA 按照逆转录试剂盒要求合成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR 特异性扩增, 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。以各基因灰度与 GAPDH 灰度比值作为相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
P21	上游 5'-GCAGACCAGCATGACAGATTT-3'	70 bp
	下游 5'-GGATTAGGGCTTCCTCTTGGGA-3'	
cyclinB1	上游 5'-CAGTCAGACCAA AATACCTACTGGGT-3'	191 bp
	下游 5'-ACACCA ACCAGTCGACGATCTTCTT-3'	
Survivin	上游 5'-AGGACCACCGCATCTCTACAT -3'	118bp
	下游 5'-AAGTCTGGCTCGTTCCTCAGTG -3'	
Bcl-2	上游 5'-TTTGAGTTTCGGTGGGGTCAT -3'	203bp
	下游 5'-TTCAGAGACAGCCAGGAGAAAT-3'	
STIM1	上游 5'-CTCCTCTCTTGACTCGCCAT -3'	134bp
	下游 5'-CGGTGTAACCCCTCCAAGTC -3'	
GAPDH	上游 5'-GTGGTCTCCTCTGACTTCAAC-3'	212 bp
	下游 5'-TCTCTCCTCTTGCTCTTG-3'	

6. Western blot 检测蛋白表达: 转染 72 h 后, 收集各组细胞, PBS 洗 2 次, 加入 RIPA 蛋白裂解液, 冰上裂解 30 min, 12 000 $\times g$ 高速离心 10 min, 取上清液, BCA 法进行蛋白定量。将蛋白样品与 $5 \times$ loading buffer 混合煮沸 5 min, 进行 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 之后转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 一抗 4 °C 孵育过夜。TBST 洗 3 次后, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 37 °C 孵育 1 h, TBST 洗 3 次, ECL 法显色, 压片, 曝光。应用图像分析软件 Quantity One 对显色条带进行灰度分析。

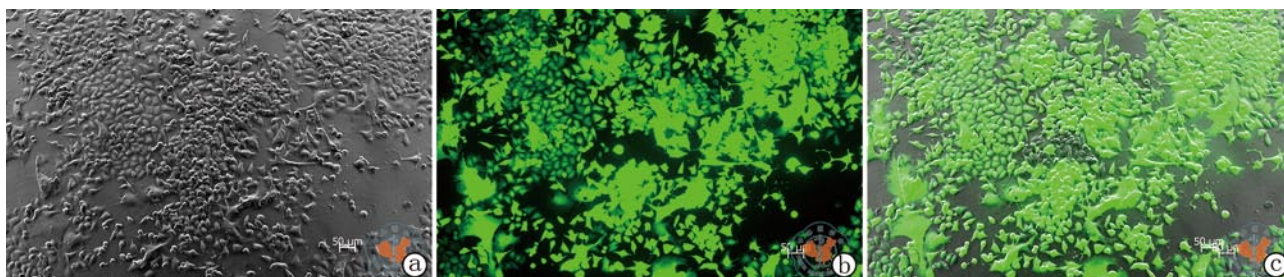
三、统计学分析方法

应用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理, STIM1 的 mRNA 及蛋白相对表达量, 细胞增殖 A 值, 细胞周期、凋亡相对数目, 细胞周期和凋亡相关基因的 mRNA 和蛋白相对表达量用 $\bar{x} \pm s$ 表示。STIM1 组与空载体组比较, 空载体组与对照组比较采用 *t* 检验。STIM1 组、空载体组和对照组, 三组均数比较采用方差分析 *F* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

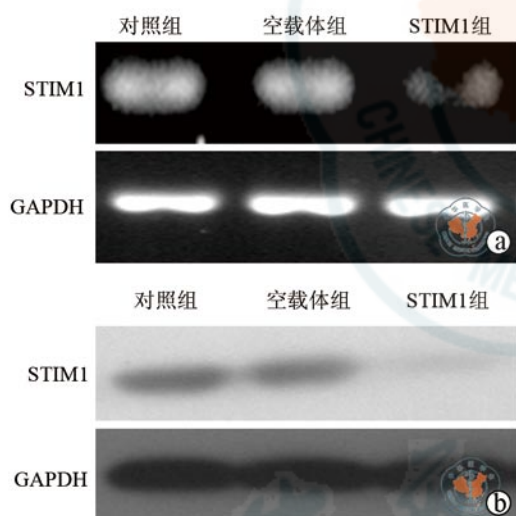
一、胰腺癌细胞 SW1990 转染 STIM1 siRNA 后 STIM1 表达下调

在 MOI = 50 条件下, 慢病毒载体转染 SW1990



注: a 图为对照组, b 图为空载体组, c 图为 STIM1 组。a、b 图为同一视野下蓝光激发前、后细胞图片, c 图为视野合并后大于 90% 细胞表达绿色荧光
图 1 倒置荧光显微镜下观察慢病毒载体转染 SW1990 细胞 72 h ($\times 100$)

细胞 72 h 后, 荧光倒置显微镜下可见大于 90% 细胞表达绿色荧光, 转染效率较高(图 1)。RT-PCR 和 Western blot 证明 STIM1 组与空载体组比较, SW1990 细胞 STIM1 基因 mRNA 和蛋白的表达下降($P < 0.05$); 空载体组与对照组比较, STIM1 mRNA 和蛋白表达差异均无统计学意义($P > 0.05$, 图 2、表 2)。



注: a 图为 RT-PCR 检测 STIM1 mRNA 表达; b 图为 Western blot 分析 STIM1 蛋白表达

图 2 STIM1 siRNA 靶向干扰 SW1990 细胞后 STIM1 的表达变化

二、STIM1 表达下调抑制 SW1990 细胞增殖

MTT 增殖实验示, STIM1 组和空载体组比较, SW1990 细胞在转染后 24、48、72 h 的增殖水平均受到抑制(均 $P < 0.05$), 但空载体组与对照组之间的差异无统计学意义(P 均 > 0.05 , 表 3)。

三、STIM1 表达下调使 SW1990 细胞阻滞于 G2/M 期

STIM1 组 SW1990 细胞 G0/G1 期细胞数为 (43.78 ± 2.96)%, 低于空载体组 (74.04 ± 3.51)% ($P < 0.05$); G2/M 期细胞数 (41.47 ± 0.66)%, 高于空载体组 (10.30 ± 2.24)% ($P < 0.05$, 表 4)。提

示抑制 STIM1 表达能使 SW1990 细胞大量静止于 G2/M 期。

四、Annexin V/PI 双染色法检测细胞凋亡

对照组和空载体组的细胞凋亡率分别为 (3.51 ± 1.19)% 和 (3.71 ± 1.23)%, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 但 STIM1 组的细胞凋亡率高达 (25.21 ± 1.96)%, 高于空载体组($P < 0.05$)。

表 2 STIM1 siRNA 靶向干扰 SW1990 细胞后, STIM1 mRNA 和蛋白相对表达量($\bar{x} \pm s$)

分组	mRNA	蛋白
对照组	1.000 ± 0.064	1.000 ± 0.071
空载体组	1.002 ± 0.091	0.996 ± 0.053
STIM1 组	0.261 ± 0.029 ^{ab}	0.120 ± 0.032 ^{ab}
<i>F</i> 值	124.286	260.614
<i>P</i> 值	< 0.01	< 0.01

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与空载体组比较, ^b $P < 0.05$; 实验重复 3 次

表 3 抑制 STIM1 表达对 SW1990 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	24 h (OD)	48 h (OD)	72 h (OD)
对照组	0.221 ± 0.023	0.603 ± 0.009	0.900 ± 0.137
空载体组	0.223 ± 0.035	0.618 ± 0.017	0.924 ± 0.140
STIM1 组	0.122 ± 0.008 ^{ab}	0.252 ± 0.031 ^{ab}	0.373 ± 0.028 ^{ab}
<i>F</i> 值	16.507	290.062	22.294
<i>P</i> 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与空载体组比较, ^b $P < 0.05$; 实验重复 3 次

表 4 抑制 STIM1 表达对 SW1990 细胞周期影响($\%$, $\bar{x} \pm s$)

分组	G0/G1 期	S 期	G2/M 期
对照组	71.55 ± 2.86	16.15 ± 3.28	12.30 ± 1.24
空载体组	74.04 ± 3.51	15.66 ± 1.29	10.30 ± 2.24
STIM1 组	43.78 ± 2.96	14.75 ± 2.49 ^{ab}	41.47 ± 0.66 ^{ab}
<i>F</i> 值	0.244	391.899	173.085
<i>P</i> 值	0.791	< 0.01	< 0.01

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与空载体组比较, ^b $P < 0.05$; 实验重复 3 次

表5 抑制 STIM1 表达对 SW1990 细胞周期与凋亡相关基因 mRNA 和蛋白表达的变化(%, $\bar{x} \pm s$)

分组	cyclinB1		P21		Bcl-2		survivin		caspase-3
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	蛋白
对照组	1.000±0.055	1.000±0.061	1.000±0.043	1.000±0.039	1.000±0.070	1.00±0.037	1.000±0.066	1.000±0.056	1.000±0.063
空载体组	1.011±0.060	1.034±0.036	1.025±0.044	0.998±0.036	1.010±0.072	0.980±0.057	1.016±0.090	0.994±0.047	1.008±0.040
STIM1 组	0.344±0.031 ^{ab}	0.776±0.042 ^{ab}	1.970±0.107 ^{ab}	1.315±0.093 ^{ab}	0.156±0.025 ^{ab}	0.381±0.028 ^{ab}	0.188±0.022 ^{ab}	0.022±0.019 ^{ab}	0.389±0.030 ^{ab}
F 值	173.085	26.079	180.637	26.127	201.945	206.135	155.933	499.817	175.424
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与空载体组比较,^b $P < 0.05$;实验重复3次

五、与细胞周期和细胞凋亡相关基因的表达变化

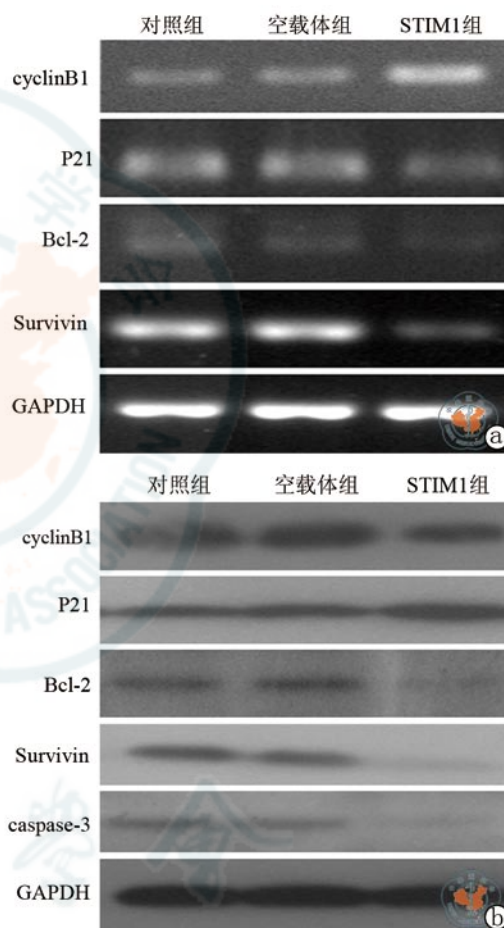
RT-PCR 结果显示,与空载体组比较,STIM1 组中与细胞周期相关的 cyclinB1 mRNA 表达减弱($P < 0.05$),P21 mRNA 表达增强($P < 0.05$);与细胞凋亡相关的 Bcl-2、survivin mRNA 表达均下调(P 均 < 0.05)。空载体组与空白组相比较,上述基因 mRNA 相对表达量差异无统计学意义(P 均 > 0.05 ,图 3a、表 5)。

Western blot 结果显示,与空载体组比较,STIM1 组中与细胞周期相关的 cyclin B1 蛋白表达下调($P < 0.05$),P21 蛋白表达升高($P < 0.05$);与细胞凋亡相关的 caspase-3 裂解激活,Bcl-2、survivin 蛋白表达下调(P 均 < 0.05)。空载体组与空白组相比较,上述基因的蛋白相对表达量差异无统计学意义(P 均 > 0.05 ,图 3b、表 5)。

讨 论

Ca^{2+} 作为细胞内简单的第二信使,广泛参与、维持细胞正常生理功能如肌肉收缩、神经递质和激素的释放,基因转录、细胞增殖、凋亡等。研究表明 STIM1 是激活细胞内钙库操纵性钙内流的重要因子。当细胞内质网中 Ca^{2+} 浓度极低时,STIM1 可感受此信号而活化并转移至细胞膜上,通过介导钙库操纵性钙通道蛋白 Orail 等结构的改变,使钙通道开放,钙离子内流,从而提高细胞质及内质网腔中的 Ca^{2+} 浓度^[2-3]。这一途径是调节 Ca^{2+} 进入非兴奋性细胞的主要方式,在维持细胞内外钙离子的动态平衡具有十分重要的意义。

许多研究表明钙离子调节的失衡在肿瘤发生过程中起重要作用,因此作为 Ca^{2+} 浓度感受器的 STIM1 是近年来肿瘤学研究的热点。既往文献报道 STIM1 在多种恶性肿瘤组织中表达增加,靶向沉默 STIM1 基因可干扰肿瘤的细胞生物学行为^[5-8]。



注: a 图为 RT-PCR 分析相关基因 mRNA 表达 b 图为 Western blot 分析相关基因蛋白表达

图3 抑制 STIM1 表达对 SW1990 细胞周期与细胞凋亡相关分子变化

El Boustany 等^[7]指出在人肝癌细胞中抑制 STIM1 表达,通过下调细胞周期蛋白 cyclinD1 表达,阻滞细胞于 G0/G1 期,进一步抑制细胞增殖;2009 年一篇文章指出^[8]沉默 STIM1 可通过抑制黏着斑循环来减弱乳腺癌细胞侵袭、迁移的能力。由此可见,STIM1 基因通过不同途径在肿瘤发生、发展中起作用,但具体机制有待进一步探索。目前为止,STIM1 基因在胰腺癌中的功能尚不清楚。与既往研究方法

类似,本实验采用胰腺癌细胞 SW1990,利用小干扰 RNA 靶向抑制 SW1990 细胞中 STIM1 表达,建立有效细胞模型进一步探索 STIM1 基因沉默在胰腺癌发生发展过程中的可能机制。

细胞周期调节失衡,致细胞正常生长、分化障碍,进而引起细胞恶性增殖,是肿瘤发生的基础。细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)、周期蛋白(cyclin)与细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(CKI)在调节细胞周期进展,启动细胞的有丝分裂过程中起重要作用。Li 等^[12]在脑胶质瘤细胞中最新研究指出, RNA 干扰技术特异性抑制 U251 细胞中 STIM1 表达后能抑制胶质瘤细胞的增殖,使细胞阻滞在 G0/G1 期,其可能机制与上调 p21 及下调 CDK4、cyclinD1 的表达,阻断 DNA 合成有关。本实验中采用流式细胞术检测了 STIM1 表达下调后胰腺癌 SW1990 细胞周期分布的变化,结果表明,抑制 STIM1 表达使 SW1990 细胞阻滞于 G2/M 期,干扰有丝分裂,抑制肿瘤的增殖。半定量 RT-PCR 和 Western blot 检测显示此过程伴有细胞周期相关基因表达变化,故提示 SW1990 细胞增殖抑制和周期阻滞可能与下调 cyclinB1 与上调 p21 有关。

早期研究指出,细胞内钙离子稳态破坏具有明显细胞毒性,可导致细胞坏死或凋亡^[13]。如上所述, STIM1 在维持细胞内钙离子平衡中的关键作用,为进一步证明抑制 STIM1 的表达,打破细胞内钙离子稳态,是否介导细胞凋亡,采用 Annexin V/PI 双染法检测抑制 SW1990 细胞 STIM1 表达,细胞凋亡情况及相关分子变化。众所周知, caspases 家族在细胞凋亡进程中起关键作用,当各种信号激活 caspase 联级反应后,作为凋亡执行者的 caspase-3 可激发凋亡细胞特征性表现形成凋亡小体,诱导细胞发生程序性死亡。Bcl-2 蛋白是 Bcl-2 家族中最主要的成员,是细胞凋亡的抑制成分。既往研究表明^[14]在前列腺癌细胞中 Bcl-2 通过调节线粒体和内质网中钙浓度的变化,间接调节凋亡的发生。Survivin 是凋亡蛋白抑制因子家族的成员之一,主要通过 caspase-3 和 caspase-7 的结合抑制 caspase 联级反应,强烈地抑制凋亡的发生。本实验结果表明, STIM1 蛋白表达下调能使胰腺癌 SW1990 细胞凋亡比例明显增加,同时伴有 Bcl-2、survivin 细胞凋亡分子的表达下调及 caspase-3 的裂解激活。提示抑制 STIM1 表达,可明显诱导胰腺癌 SW1990 细胞凋亡,其可能与抑制 Bcl-2、survivin 蛋白表达,激活

caspase 联级反应有关。

综上所述,靶向抑制 STIM1 表达能够抑制 SW1990 细胞的增殖,阻滞细胞周期于 G2/M 期,诱导细胞凋亡发生,这些细胞生物学行为的改变与相关基因的异常表达存在密切的关系。因此认为,进一步对胰腺癌细胞中 STIM1 信号途径进行研究,有望成为胰腺癌临床治疗的分子靶点。

参 考 文 献

- 1 Saif MW. Advancements in the management of pancreatic cancer: 2013[J]. JOP, 2013, 14(2):112-118.
- 2 Liou J, Kim ML, Heo WD, et al. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx[J]. Curr Biol, 2005, 15(13):1235-1241.
- 3 Roos JI, DiGregorio PJ, Yeromin AV, et al. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ Channel function[J]. J Cell Biol, 2005, 169(3):435-445.
- 4 Spassova MA1, Soboloff J, He LP, et al. STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca(2+) channels[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(11):4040-4045.
- 5 Chen YF, Chiu WT, Chen YT, et al. Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(37):15225-15230.
- 6 Li W, Zhang M, Xu L, et al. The apoptosis of non-small cell lung cancer induced by cisplatin through modulation of STIM1[J]. Exp Toxicol Pathol, 2013, 65(7/8):1073-1081.
- 7 El Boustany C, Bidaux G, Enfissi A, et al. Capacitative calcium entry and transient receptor potential canonical 6 expression control human hepatoma cell proliferation[J]. Hepatology, 2008, 47(6):2068-2077.
- 8 Yang S, Zhang JJ, Huang XY. Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis[J]. Cancer Cell, 2009, 15(2):124-134.
- 9 阳东荣, 单玉喜, 刘晓龙, 等. 基质交联分子1对前列腺癌PC-3细胞增殖及细胞凋亡的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(12):2046-2048.
- 10 顾鹏, 周毅彬, 阳东荣, 等. 基质交联分子1对前列腺癌PC-3细胞凋亡相关蛋白表达的影响[J]. 中华男科学杂志, 2014, 20(3):225-228.
- 11 顾鹏, 周毅彬, 阳东荣, 等. 基质交联分子1对前列腺癌DU145细胞迁移及上皮-间充质转化的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2014, 31(6):1225-1227.
- 12 Li G, Zhang Z, Wang R, et al. Suppression of STIM1 inhibits human glioblastoma cell proliferation and induces G0/G1 phase arrest[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2013, 32:20.
- 13 Pinton P, Giorgi C, Siviero R, et al. Calcium and apoptosis:ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis[J]. Oncogene, 2008, 27(50):6407-6418.
- 14 Vanden Abeele F, Skryma R, Shuba Y, et al. Bcl-2-dependent modulation of Ca(2+) homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells[J]. Cancer Cell, 2002, 1(2):169-179.

(收稿日期: 2016-11-03)

(本文编辑: 蔡晓珍)