

慢病毒介导的 TSPY1 对肝癌 SMMC7721 和 Huh7 细胞系增殖的影响

翟励敏, 莫翠菊, 隋靖喆, 秦 雪, 李 山

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号:81060199); 广西自然科学基金资助项目(编号:2012GXNSFAA053088)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院检验科

作者简介: 翟励敏(1988-), 女, 临床检验诊断学硕士, 检验技师, 研究方向: 男女肝癌蛋白质组学差异研究。E-mail: xiaozhai1012011@163.com

通讯作者: 秦 雪(1963-), 女, 博士研究生导师, 主任技师, 研究方向: 肝癌蛋白质组学方面的研究。E-mail: qinxue919@126.com

[摘要] 目的 观察转染睾丸特异性蛋白 1(TSPY1)慢病毒表达载体对肝癌细胞 SMMC7721 和 Huh7 细胞系增殖能力的影响。方法 构建特异性的 TSPY1 慢病毒过表达载体稳定转染至 SMMC7721 和 Huh7 肝癌细胞系, 采用荧光定量 PCR 和蛋白印迹技术检测 TSPY1 mRNA 和蛋白的表达情况, Cell Counting Kit-8(CCK-8)实验检测转染后细胞的增殖情况。结果 在转染过表达 TSPY1 慢病毒的 SMMC7721 和 Huh7 细胞中, TSPY1 mRNA 和蛋白的表达均明显上调($P < 0.01$)。CCK-8 细胞增殖实验发现, 过表达 TSPY1 组 SMMC7721 和 Huh7 细胞的增殖能力比对照组增强。结论 TSPY1 慢病毒表达载体可明显上调 TSPY1 mRNA 和蛋白表达, 并能够促进肝癌 SMMC7721 和 Huh7 细胞的增殖。

[关键词] 睾丸特异性蛋白 1; 肝癌; 慢病毒

[中图分类号] R 446.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2014)06-0485-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2014.06.01

Effect of lentivirus vector-mediated TSPY1 gene on proliferation of SMMC7721 and Huh7 hepatocellular carcinoma cells ZHAI Li-min, MO Cui-ju, SUI Jing-zhe, et al. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of lentivirus vector-Testis-specific Protein Y-encoded 1 (TSPY1) on the proliferation ability of SMMC7721 and Huh7 hepatocellular carcinoma cells. **Methods** The lentivirus vector was constructed and transfected into the SMMC7721 and Huh7 cells. The expression of TSPY1 mRNA and protein was detected by quantitative RT-PCR and western blot. Cell Counting Kit-8 (CCK8) assay was performed to assess the transfected cells proliferation. **Results** The expression of TSPY1 both in mRNA and protein levels were significantly increased in the SMMC7721 and Huh7 cells transfected with lentivirus encoding TSPY1 cDNA ($P < 0.01$). CCK8 assay indicated that TSPY1 potentiates cell proliferation both in SMMC7721 and Huh7 cells over-expressed TSPY1, comparing to the control cells. **Conclusion** The transfection of lentiviralvector-mediated TSPY1 gene can obviously up-regulate the expression of TSPY1 mRNA and protein and promote the proliferation of SMMC7721 and Huh hepatocellular carcinoma cells.

[Key words] Testis-specific Protein Y-encoded 1(TSPY1); Hepatocellular carcinoma; Lentivirus

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是严重威胁人类生命健康的常见恶性肿瘤之一。流行病学调查结果显示, 男性肝癌的发病率远高于女性, 比例通常在 2:1 至 4:1 的范围之间^[1]。本课题组前期研究利用 iTRAQ 定量蛋白组学技术比较男女肝癌差异表达蛋白质, 发现 Y 染色体编码的睾丸特异性蛋白 1(Testis-specific Protein Y-encoded 1, TSPY1)

在男性肝癌组织中呈高表达^[2]。本研究将慢病毒介导的 TSPY1 的表达载体稳定转染至肝癌 SMMC7721、Huh7 细胞中, 观察过表达 TSPY1 对肝癌细胞增殖能力的影响, 旨在探讨 TSPY1 在肝癌发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 人肝癌细胞系 SMMC7721、Huh7, 细胞系均来源于男性, 购于中国科学院上海生命科学研究院。

1.1.2 主要试剂 高糖 DMEM 培养基(杭州吉诺); RPMI-1640 培养基(Sigma); 胎牛血清(Gibco); 慢病毒阴性对照载体(GFP-NC-LV)(上海吉凯); 脂质体 2000(Invitrogen); 逆转录-聚合酶链反应试剂盒(Ferments); TSPY1 引物和内参引物(上海生工生物技术有限公司); SYBR Premix(TAKARA); 兔抗人 TSPY1 一抗(Abcam); 鼠抗人 GAPDH、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔和山羊抗鼠二抗均为 Biorad 公司产品; Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒(Dojindo)。

1.2 方法

1.2.1 TSPY1 慢病毒表达载体的构建 人类基因组 TSPY1 的 CDS 区的基因序列(基因 ID:7258), 已经由测序确定。由上海吉凯基因化学技术有限公司将 PCR 产物与 GV287 载体构建包装。按 Invitrogen 公司 Lipofectamine 2000 使用说明进行共转染 293T 细胞, 培养 48 h 后, 收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液, 对其浓缩后得到的滴度为 1×10^8 TU/ml。

1.2.2 细胞培养和转染 Huh7 细胞培养于 DMEM 培养基, SMMC7721 细胞培养于 RPMI-1640 培养基, 添加 10% 胎牛血清、100 U/ml 链霉素、100 U/ml 青霉素, 于 37 °C、5% CO₂ 的恒温箱培养。Huh7 和 SMMC7721 细胞设立过表达组(TSPY1 组), 阴性对照组(GFP 组)。转染前选用生长状态良好的细胞接种于 6 孔板中, 待细胞的密度约为 1×10^5 时准备转染, 弃去上清, 于 6 孔板中加入 1 ml 无血清细胞培养基, 将 1 μ l 10 mg/ml 的 polybrene 加入培养基中使其终浓度为 10 μ g/ml; 取过表达 TSPY1 的慢病毒载体和阴性对照病毒载体, 以 MOI = 20 为标准加入对应病毒量, 摇匀后置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中孵育。12 h 后弃去细胞上清, 更换为含血清的完全培养基继续培养。48 ~ 72 h 后, 在荧光显微镜下观察细胞荧光并拍照, 记录转染率; 提取蛋白质和 RNA 做进一步的验证实验, 收集细胞做进一步的功能实验。

1.2.3 荧光定量 PCR 检测 TSPY1 RNA 表达 各组间总的 RNA 用 Trizol 法提取。取 2 ~ 4 μ g 总 RNA 逆转录合成 cDNA。TSPY1 上游引物: 5'-ATGTTGTC-TTTCGGAGTAACCC-3', 下游引物 5'-TGAGAAGCC-CTGTATTCTGTGAT-3'; 内参上游引物 5'-CATGTAC-GTTGCTATCCAGGC-3', 内参下游引物 5'-CTCCTTA-

ATGTCACGCACGAT-3'。实时定量 PCR 按 Quant S-YBR Green PCR 试剂盒说明书操作, 在实时荧光定量 PCR 仪上扩增。反应条件为 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 30 s, 59 °C 15 s, 72 °C 20 s, 40 个循环, 读取 Ct 值。TSPY1 的相对表达量通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法得出。

1.2.4 蛋白印迹检测 TSPY1 蛋白表达 分别提取 4 组细胞总蛋白, 取 20 μ g 蛋白用 10% SDS-PAGE 电泳分离后并转移至 0.2 μ m 聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后, 加一抗 TSPY1(1:1 000)、内参基因 GAPDH(1:1 000), 4 °C 摇动孵育过夜。0.1% 洗膜缓冲液(TBST)洗膜 3 次。加 HRP 标记的二抗(1:10 000), 室温孵育 1 h, 0.1% TBST 洗膜 3 次, 电化学发光(ECL)检测蛋白条带。

1.2.5 Cell Counting Kit-8(CCK-8)实验检测细胞生长增殖 每组以 1 000 个已感染过表达 TSPY1 慢病毒载体和阴性对照慢病毒载体的 SMMC7721 和 Huh7 细胞接种于 96 孔板中, 培养过夜分别于 24、48、72 h 后, 每孔加入 10 μ l Cell Counting Kit-8 溶液 37 °C 培养箱中继续温育 1 h 后, 置于酶标仪上读取每孔 450 nm 吸光度(A)值。

1.3 统计学方法 应用 SPSS16.0 统计软件分析进行数据处理, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用重复测量资料的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TSPY1 基因慢病毒表达载体对肝癌 SMMC7721 和 Huh7 细胞株的转染效率 用 TSPY1 慢病毒表达载体转染肝癌 Huh7 和 SMMC7721 细胞株后, 在 SMMC7721 和 Huh7 细胞中, 90% 以上细胞均表达绿色荧光蛋白, 提示细胞转染效率较高。见图 1。

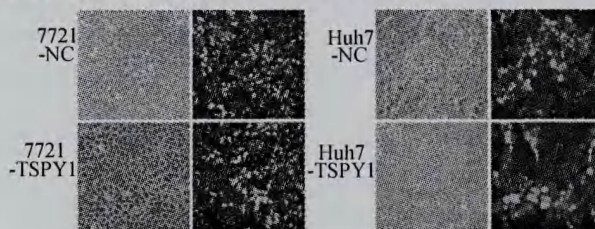


图 1 慢病毒转染 SMMC7721 和 Huh7 细胞($\times 100$)

2.2 各组 TSPY1 mRNA 的表达率 SMMC7721 阴性对照组和过表达组中 TSPY1 mRNA 相对表达水平分别为 (1.000 ± 0.000) 、 (59501 ± 2162) ; Huh7 阴性对照组和过表达组中 TSPY1 mRNA 相对表达水平分别为 (1.000 ± 0.000) 、 (57468 ± 1834) , 差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 2。

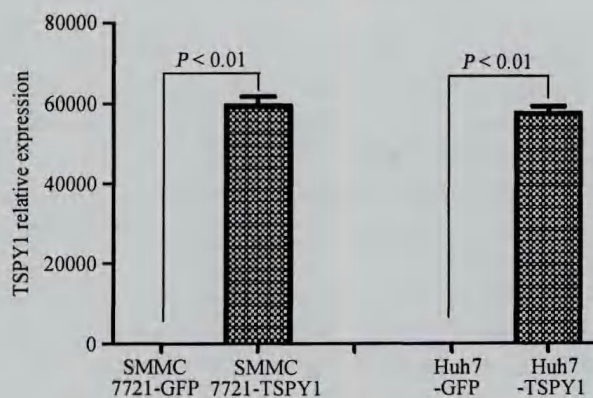


图2 荧光定量PCR检测TSPY1的mRNA表达

2.3 蛋白印迹检测 TSPY1 蛋白表达 SMMC7721 和 Huh7 转染后过表达组中蛋白水平明显高于阴性对照组,差异有统计学意义($P < 0.001$)。见图3。

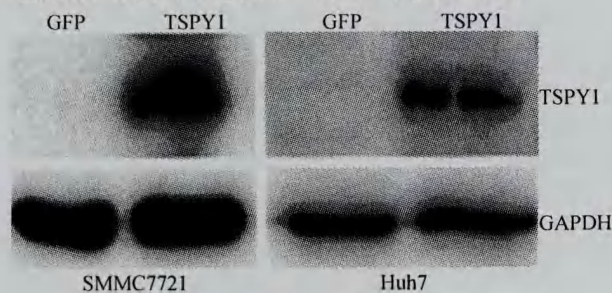


图3 western blot 检测 TSPY1 蛋白表达

2.4 TSPY1 对细胞增殖的影响 CCK-8 细胞增殖结果显示,过表达 TSPY1 组 SMMC7721 和 Huh7 细胞在 24、48、72 h 时间点分别与其阴性对照组比较,各个时间点过表达 TSPY1 组 SMMC7721 和 Huh7 细胞的增殖能力比阴性对照组增强,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1,2。

表1 SMMC7721 细胞增殖能力在各时间点的比较[A 值, ($\bar{x} \pm s$)]

组别	例数	24 h	48 h	72 h
SMMC 7721-GFP	96	0.0400 ± 0.0130	0.1000 ± 0.005	0.3000 ± 0.0600
SMMC 7721-TSPY1	96	0.1100 ± 0.0100	0.2800 ± 0.0600	0.8100 ± 0.0750
<i>t</i>	-	3.467	2.081	4.135
<i>P</i>	-	0.002	0.030	0.001

表2 Huh7 细胞增殖能力在各时间点的比较[A 值, ($\bar{x} \pm s$)]

组别	例数	24 h	48 h	72 h
Huh 7-GFP	96	0.0125 ± 0.0700	0.0771 ± 0.0289	0.1615 ± 0.2350
Huh 7-TSPY1	96	0.0829 ± 0.0300	0.1621 ± 0.0021	0.3470 ± 0.0100
<i>t</i>	-	2.759	2.154	2.710
<i>P</i>	-	0.048	0.036	0.040

3 讨论

3.1 TSPY1 作为一个新近发现的蛋白在近年被深入研究。TSPY 是一类 Y 染色体基因编码的睾丸特异蛋白,TSPY1 是 TSPY 家族的一员^[3],TSPY 基因在哺乳动物的 Y 染色体中进化是比较保守的,其同源的基因家族在猴、牛等其他哺乳动物上均有发现,说明 TSPY1 可能成为一个雄性生殖细胞生成的重要基因。TSPY 有促进精子早期发生的功能,刺激精原细胞转化为精母细胞^[4]。另有研究发现 TSPY1 基因与一个已知的致癌基因(SET)有显著的同源性,两者都能与有丝分裂细胞周期蛋白 B 相互作用,并参与 DNA 的复制过程^[5]。此外,还发现其与生殖系统肿瘤的发生发展有关,在早期原位的睾丸癌、成熟的精原细胞瘤、促性腺激素母细胞瘤^[6]中发现有较强烈的表达。经广泛研究后还发现,前列腺癌、乳腺癌、黑色素瘤等组织中也有该基因的表达^[7]。Shane^[8]通过微阵列分析发现过表达 TSPY 可以促进人宫颈癌细胞(HeLa)和小鼠胚胎成纤维细胞(NIH3T3)细胞增殖,而且 TSPY 表达可以影响细胞周期和凋亡。Tatsuo^[9]发现 TSPY 可以和翻译延长因子 eEF1A 相互作用,通过加强基因的转录和蛋白的合成来发挥致癌作用。

3.2 中国男性肝癌的年龄标准化发病率为 37.9/10 万,女性为 14.2/10 万。已有研究报道性别差异与肝癌的发生及预后密切相关,但其深入的分子机制尚不明确。Yin^[10]报道 TSPY 在肝癌中表达上调,TSPY 基因在 50% 的分化好 HCC 标本和 16% 的分化差 HCC 标本中有表达,呈现出表达的差异性,这提示 TSPY 基因有可能参与了肝癌的致癌过程。本课题组前期应用 iTRAQ 定量蛋白质组学技术筛选在 HBV 背景下男女肝癌发病过程中差异表达的蛋白质分子,筛选出 73 个 HBV 相关肝癌男女性别差异的蛋白质,其中上调的蛋白有 16 个,下调的蛋白有 57 个。经 RT-PCR 和蛋白印迹验证取得一致结果,发现其中 TSPY1 是男性肝癌中特异高表达的蛋白质分子^[2],提示了 TSPY1 可能在男性肝癌发生发展中起到了重要的作用。

3.3 为了进一步探讨 TSPY1 在男性肝癌中作用,我们构建了 TSPY1 慢病毒表达载体并转染至 SMMC7721 和 Huh7 细胞中,通过荧光镜检,90% 以上细胞均表达绿色荧光蛋白,提示细胞转染效率较高,说明构建的 TSPY1 慢病毒表达载体已稳定转染至肝癌 Huh7 和 SMMC7721 细胞中。我们采用荧光定量 PCR 和蛋白印迹法检测转染后的肝癌细胞中 TSPY1

mRNA 和蛋白表达水平,发现转染后的肝癌细胞 TSPY1 mRNA 和蛋白表达水平比对照组明显升高。通过 CCK-8 细胞增殖实验进一步发现,过表达的 TSPY1 可以促进肝癌 Huh7 和 SMCC7721 细胞增殖,表明 TSPY1 在男性肝癌中起到促进其发生发展的作用。本研究初步探讨了 TSPY1 与肝癌间的联系,有助于肝癌病理机制的阐明,它很有可能是导致 HBV 相关肝细胞癌男女性别差异的重要因子,为肝癌的诊断和治疗研究提供新的靶点。

参考文献

- 1 El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and molecular carcinogenesis[J]. *Gastroenterology*, 2007,132(7): 2557-2576.
- 2 黄 珊. 乙型肝炎病毒相关肝细胞癌性别差异的蛋白质组学研究[D]. 广西医科大学, 2012.
- 3 Weissenbach J, Goodfellow PN, Smith KD. Report of the committee on the genetic constitution of the Y chromosome[J]. *Cytogenet Cell Genetics*, 1989,51(1-4):438-449.
- 4 Hertel JD, Huettnner PC, Dehner LP, et al. The chromosome y-linked testis-specific protein locus tsyp1 is characteristically present in gonadoblastoma[J]. *Hum Pathol*, 2010,41(11):1544-1549.
- 5 Schnieders F, Dork T, Arnemann J, et al. Testis-specific protein, y-encoded(tspy) expression in testicular tissues[J]. *Hum Mol Genet*, 1996,5(11):1801-1807.
- 6 Lau YF, Li Y, Kido T. Gonadoblastoma locus and the TSPY gene on the human Y chromosome[J]. *Birth Defects Res C. Embryo Today*, 2009,87(1):114-122.
- 7 Kido T, Lau YF. The Y-located gonadoblastoma gene TSPY amplifies its own expression through a positive feedback loop in prostate cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014,446(1):206-211.
- 8 Oram SW, Liu XX, Lee TL, et al. TSPY potentiates cell proliferation and tumorigenesis by promoting cell cycle progression in HeLa and NIH3T3 cells[J]. *BMC Cancer*, 2006,6(1):154.
- 9 Kido T, Lau YF. The human y-encoded testis-specific protein interacts functionally with eukaryotic translation elongation factor eef1a, a putative oncoprotein[J]. *Int J Cancer*, 2008,123(7):1573-1585.
- 10 Yin YH, Li YY, Qiao H, et al. Tspy is a cancer testis antigen expressed in human hepatocellular carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2005, 93(4):458-463.

[收稿日期 2014-03-26][本文编辑 黄晓红 韦 颖]

课题研究·论著

广西乳腺癌非前哨淋巴结转移相关影响因素分析及新转移预测模型的建立

罗 铭, 李 富, 何留生, 李天罡, 曾 健

基金项目: 广西卫生厅科研课题(编号:Z2008147)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院胃肠腺体外科

作者简介: 罗 铭(1986-), 男, 医学硕士, 研究方向: 乳腺与甲状腺疾病临床与基础研究。E-mail:15077194097@163.com

通讯作者: 曾 健(1965-), 男, 医学硕士, 主任医师, 教授, 研究方向: 乳腺与甲状腺的临床与基础研究。E-mail:zengjian125@hotmail.com

【摘要】 目的 回顾性分析与广西前哨淋巴结(SLN)阳性乳腺癌患者非前哨淋巴结(NSLN)癌转移相关的临床病理因素,建立预测模型量化 NSLN 的转移风险,使低危的 SLN 阳性患者避免不必要的腋窝淋巴结清扫(ALND)。方法 共有 83 例 SLN 阳性并行补充 ALND 的乳腺癌患者纳入该研究。对与 NSLN 转移相关的临床病理因素进行单因素及多因素分析,建立一个多变量的 NSLN 转移风险预测模型。并将新建模型运用于 83 例研究对象,计算受试者操作曲线下面积(AUC)评估该模型预测的准确度。连续变量用 Mann-Whitney U 检验,分类变量用 χ^2 检验或确切概率法。结果 肿瘤大小、肿瘤分级、有无血管淋巴管浸润、SLN 癌灶大小等四个影响因素在 logistic 回归分析中被证实是 NSLN 转移的独立预测因素,并纳入最终的 NSLN 转移预测模型。将新建模型运用于 83 例研究对象,AUC 为 0.832(95% CI=0.744~0.919)。结论 新建立的预测模型能较好地地区分广西乳腺癌 SLN 阳性患者 NSLN 有无肿瘤侵犯,但新建模型预测的准确度,仍需要进行前瞻性的中心内部验证及外部验证进行评估。

【关键词】 乳腺癌; 非前哨淋巴结; 风险预测模型