

·论 著·
Original Articles

沉默 Icmt 基因对舌鳞癌 CAL-27 和 SCC-4 细胞 增殖、凋亡及细胞周期的影响

陈正岗¹,王奇民¹,童磊¹,王云英²,徐晓娜²,王莹³,韩红钰¹,盛善桂⁴,王少如⁵

(1.青岛大学附属青岛市市立医院 口腔医学中心,2.中心实验室,山东 青岛 266071;

3.济南市第四人民医院 口腔科,山东 济南 250031;

4.青岛大学 口腔医学院,山东 青岛 266003;

5.大连医科大学口腔医学院,辽宁 大连 116044)

[摘要] 目的:探讨异戊二烯基半胱氨酸羧基甲基转移酶(isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase,Icmt)对舌鳞癌 CAL-27 和 SCC-4 细胞增殖、凋亡和细胞周期的影响及其相关机制。方法:针对人 Icmt 基因序列设计并构建 3 条小干扰 RNA(small interfering RNA,siRNA),采用脂质体载体瞬时转染 Icmt-siRNA 抑制舌鳞癌 CAL-27 和 SCC-4 细胞 Icmt 表达,将实验组分为 Icmt-siRNA-1 组、Icmt-siRNA-2 组、Icmt-siRNA-3 组;同时将脂质体转染 NC-siRNA 作为阴性对照组,只加转染试剂作为空白对照组。采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)和蛋白质免疫印记法(Western blot)检测转染后各组细胞 Icmt、K-Ras 的 mRNA 和蛋白表达及 K-Ras 膜蛋白的表达;Western 免疫印迹检测 Cyclin D1、p21、Akt、p-Akt 蛋白表达;细胞增殖活性检测试剂盒和流式细胞术检测细胞的增殖活性、周期变化和凋亡能力。应用 GraphPad Prism 8.2.1 软件对实验数据进行统计学分析。结果:qRT-PCR 和 Western 免疫印迹检测结果显示,与对照组相比,实验组 Icmt mRNA 和蛋白表达显著下降($P<0.05$),K-Ras mRNA 和蛋白表达无显著差异($P>0.05$),K-Ras 膜蛋白表达显著下降($P<0.05$);周期相关蛋白 Cyclin D1 表达显著下调,p21 表达显著上调($P<0.05$);Ras/PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白 Akt 表达无统计学差异($P>0.05$),但 p-Akt 表达显著下降($P<0.05$)。细胞增殖活性检测结果表明,与对照组相比,实验组细胞增殖能力显著下降($P<0.05$);流式细胞术检测结果表明,实验组细胞凋亡水平较对照组显著增加,细胞周期被阻滞在 G1/S 期($P<0.05$)。结论:体外沉默 Icmt 基因可有效抑制 CAL-27 和 SCC-4 细胞增殖且诱导凋亡,其作用可能是通过影响 K-Ras 膜蛋白靶向膜定位,负性调控细胞周期和下调 Ras/PI3K/Akt/mTOR 信号通路而实现。

[关键词] 异戊二烯基半胱氨酸羧基甲基转移酶;K-Ras;舌鳞状细胞癌;CAL-27;SCC-4;细胞增殖;细胞周期;细胞凋亡

[中图分类号] R739.8

[文献标志码] A

DOI: 10.19438/j.cjoms.2021.02.001

Effects of silencing Icmt on the proliferation, apoptosis, and cell cycle of CAL-27 and SCC-4 cells CHEN Zheng-gang¹, WANG Qi-min¹, TONG Lei¹, WANG Yun-ying², XU Xiao-na², WANG Ying³, HAN Hong-yu¹, SHENG Shan-gui⁴, WANG Shao-ru⁵. (1. Department of Stomatology, 2. Central Laboratory, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong Province; 3. Department of Stomatology, Fourth People's Hospital of Jinan, Jinan 250031, Shandong Province; 4. School of Stomatology, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province; 5. School of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China)

[Abstract] PURPOSE: This study was aimed to explore the effects and regulatory mechanisms of silencing Icmt on cell proliferation, apoptosis, and cell cycle of cell line CAL-27 and SCC-4 *in vitro*. **METHODS:** Three siRNAs were designed and constructed for Icmt gene sequence, and then transfected into CAL-27 and SCC-4 cells to silence Icmt expression. The tested cells were divided as follows: RNA interference groups including Icmt-siRNA-1, Icmt-siRNA-2, and Icmt-siRNA-3, negative control group, and blank control group. The mRNA and protein expression of Icmt and K-Ras were

[收稿日期] 2020-05-28;[修回日期] 2020-08-17

[基金项目] 国家自然科学基金(81372908)

[作者简介] 陈正岗(1973-),男,博士,主任医师

E-mail: chenzhg1973@163.com

[通信作者] 王少如, E-mail: wangxiaorukw@163.com

©2021 年版权归《中国口腔颌面外科杂志》编辑部所有

examined by real-time PCR and Western blot, respectively. The expression of Cyclin D1, p21, Akt, and p-Akt were examined by Western blot. The proliferation abilities of CAL-27 and SCC-4 cells were determined by cell counting kit-8 assay. Cell cycle analysis and apoptosis abilities of CAL-27 and SCC-4 cells were detected by flow cytometry. Statistical analysis and presentation was performed using GraphPad Prism 8.2.1 software. **RESULTS:** The expression of Icm1 mRNA and protein in CAL-27 and SCC-4 cells was reduced significantly after Icm1 siRNAs were transfected ($P<0.05$). No significant difference in K-Ras mRNA and protein expression was detected ($P>0.05$), but the expression of K-Ras membrane protein was decreased significantly compared with the negative control group and the blank control group ($P<0.05$). Cyclin D1 expression was decreased, whereas p21 expression was increased significantly. The expression of Akt was invariant ($P>0.05$), but the expression of p-Akt was significantly decreased ($P<0.05$). The cell cycle was altered in G1/S, the growth-proliferative activity was inhibited and apoptosis was significantly induced ($P<0.05$). **CONCLUSIONS:** Silencing Icm1 can effectively reduce the proliferation and induce apoptosis of CAL-27 and SCC-4 cells by affecting K-Ras membrane targeting localization, and then negatively regulating cell cycle and down-regulating K-Ras /PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **[Key words]** Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase; K-Ras; Tongue squamous cell carcinoma; CAL-27; SCC-4; Cell proliferation; Cell cycle; Cell apoptosis

China J Oral Maxillofac Surg, 2021, 19(2):97-104.

舌鳞状细胞癌(tongue squamous cell carcinoma, TSCC)具有高转移性、高侵袭性及高致死率等特点,且因解剖部位特殊,手术重建困难,临床预后较差,严重影响患者的生存质量^[1]。虽然不断地改进肿瘤的手术治疗方法及采用联合放疗、化疗的综合治疗方案,但患者的预后并没有得到明显改善,仍有复发和转移的可能,5年生存率依然在50%~60%左右^[2]。目前,随着生物技术和基因工程的发展,肿瘤的生物靶向治疗成为研究的热点。在舌鳞癌研究中,寻找新的有效靶点显得尤为重要。

K-Ras 是 Ras 家族中最易发生突变的致癌基因之一,与多种肿瘤的发生、发展密切相关^[3]。其发挥生物学功能的前提是与细胞膜的稳定结合,通过细胞膜转导信号,调控参与肿瘤细胞分化、增殖、黏附和凋亡的细胞信号通路^[4]。Icm1 作为第三步翻译后修饰的唯一修饰酶,催化 Ras 蛋白羧基末端的甲基化修饰,促进 Ras 蛋白的膜亲和力^[5]。在缺乏 Icm1 介导的甲基化修饰的情况下, K-Ras 蛋白不能正确定位于胞膜上,导致其调节细胞生长和增殖的能力减弱^[6]。大量研究证明,降低 Icm1 酶活性可对多种肿瘤的发展产生一定影响,如鼻咽癌^[7]、卵巢癌^[8]、胰腺癌^[9]、肝癌^[10]等,但对口腔癌的影响及其相关机制尚不清楚。

本研究利用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术体外沉默舌鳞癌 CAL-27 和 SCC-4 细胞的 Icm1 基因的表达,观察对 K-Ras 蛋白和舌鳞癌细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响,检测调控细胞周期和信号通路相关蛋白的表达,以探讨 Icm1 对舌鳞癌的作用及其相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

人舌鳞状细胞癌细胞系 CAL-27 购自中南大学高等研究中心, SCC-4 由山东大学口腔医学院馈赠。DMEM 高糖型基础培养基、胎牛血清 (BI, 以色列), 胰蛋白酶、100×青霉素/链霉素 (Gibco, 美国), DMSO (Amersco, 美国), Icm1-siRNA 片段设计、合成及 riboFECTTM CP 转染试剂 (广州市锐博生物科技有限公司), RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、TB Green Premix Ex Taq™ (TaKaRa, 日本), PCR 引物 Icm1、K-Ras、GAPDH 设计合成 (上海生工生物工程有限公司), 细胞增殖活性检测试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) (MCE, 美国), Annexin V-APC/PI 荧光双染细胞凋亡检测试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司), 细胞周期与凋亡检测试剂盒、RIPA 裂解液、细胞膜蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物、二喹啉甲酸 (BCA) 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), 兔抗人多克隆抗体 Icm1、p21、Cyclin D1 (Proteintech, 美国), K-Ras (Abcam, 美国), Akt、p-Akt、GAPDH、羊抗兔 IgG 二抗 (CST, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素的 DMEM 高糖培养基培养 CAL-27、SCC-4。细胞于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养, 以 1:3 比例传代培养。取处于对数生长期的细胞进行 siRNA 转染处理, 用于后续实验。

1.2.2 siRNA 转染沉默 Icm1 基因 针对人 Icm1 基因序列设计并合成 3 条 siRNA(表 1)和 1 条阴性对照序列 NC-siRNA。分别取对数生长期的 CAL-27 和 SCC-4 细胞,以每孔 2×10^5 个细胞密度接种于 6 孔板,待细胞融合至 30%~50%时用于转染。按照 siRNA 转染试剂盒说明书,首先用 120 μ L riboFECT™ CP Buffer 稀释 5 μ L 20 μ mol/L siRNA 储存液(转染时 siRNA 终浓度为 50 nmol/L),轻轻吹打混匀后,加入 12 μ L riboFECT™ CP Reagent,混匀,制备成转染复合物,室温下孵育 15 min。取出 6 孔板,弃原液,PBS 冲洗 3 次,每孔加入 1 863 μ L 无双抗培养基,将制备好的转染复合物均匀加入相应孔内,继续于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。待转染一定时间后,进行相关细胞水平或分子水平的检测。

1.2.3 qRT-PCR 实验 siRNA 转染 24 h 后,提取各组细胞总 RNA,紫外分光光度计检测每组所提 RNA 的浓度和纯度。按照反转录试剂盒说明书,将适量 RNA 反转录为 cDNA,然后各组均取 1 μ L cDNA 进行 qRT-PCR 反应,以 GAPDH 为内参,每组均设 3 个平行副孔。Icm1 的引物序列,上游序列:5'-CGGCATCCTTCTTACGTCGG-3',下游序列:5'-CCACACTGTCAGGGCATAGC-3';K-Ras 引物序列,上游序列:5'-AGTTGGAGCTGGTGGCGTAGG-3',下游序列:5'-TACTCCTCTTGACCTGCTGTGTCG-3';GAPDH 引物序列,上游序列:5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3',下游序列:5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'。严格按照 TaKaRa TB Green Premix Ex Taq™ 试剂盒说明书配置 PCR 反应体系及调整反应参数。使用 ABI PRISM 7000 实时荧光定量 PCR 仪对荧光信号实时监测,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算各组 Icm1 和 K-Ras mRNA 的相对表达水平。

1.2.4 Western 免疫印迹实验 siRNA 转染 48 h 后,RIPA 裂解液裂解各组细胞,提取总蛋白质。K-Ras 膜蛋白应用细胞膜蛋白与细胞质蛋白提取试剂盒进行提取,利用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。100 $^{\circ}$ C 变性 10 min,每泳道等量上样,用 10%聚丙烯酰胺

凝胶电泳分离后,转至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉室温摇床封闭 1 h。根据各抗体稀释比例(Icm1,1:1000;K-Ras,1:200;p21,1:800;Cyclin D1,1:5000;Akt,1:1000;p-Akt,1:1000;GAPDH,1:5000)制备一抗孵育液,将膜放置于一抗孵育液中,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日,用三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水(triethanolamine buffered saline,TBST)洗膜 10 min,重复 3 次,充分浸泡于二抗(1:50000)孵育液中,室温摇床孵育 2 h,再次洗膜 10 min \times 3 次。电化学发光液(electrochemiluminescence,ECL)显色、曝光,采集图像。

1.2.5 CCK-8 细胞增殖实验 分别将处于对数生长期的 CAL-27 和 SCC-4 细胞接种于 96 孔板内,每孔 2×10^3 个细胞,预培养 24 h,待细胞融合率至 30%~40%时进行转染(方法同前)。每组设 5 个平行副孔,并设置 2 个不加细胞的空白孔。分别转染 0、24、48、72 h 后,取出相应 96 孔板,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液后,于培养箱中避光孵育 2 h。用酶标仪读取 450 nm 波长处各孔的吸光度(A)值,绘制细胞增殖曲线并计算各组细胞的相对生存率。计算公式:细胞相对存活率(%)=(A_{实验组}-A_{空白孔}/A_{对照组}-A_{空白孔}) \times 100%。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞周期 取转染 48 h 后的各组细胞,消化、收集于离心管中,以 1000 r/min 离心 5 min 后弃上清。用 1 mL 冰浴预冷 PBS 重悬细胞,离心、洗涤 2 次后弃上清。加入 1 mL 冰浴预冷 70%乙醇,重悬细胞,4 $^{\circ}$ C 固定过夜。次日,适量冰浴预冷 PBS 再次洗涤 2 次,每管样品加 0.5 mL 碘化丙啶(PI)染色,37 $^{\circ}$ C 避光温浴 30 min 后,24 h 内进行流式细胞仪检测及分析。

1.2.7 Annexin V-APC/PI 荧光双染法检测细胞凋亡 收集转染 48 h 后的各组原液于离心管内,与 0.25%胰蛋白酶(不含 EDTA)消化获得的相应组别的细胞悬液一起离心,PBS 洗涤后重悬并计数。每组均取 5×10^5 个细胞,500 g \times 5 min 离心,弃上清,加入 500 μ L 稀释 1 \times Annexin V Binding Buffer 工作液,重悬细胞。先后加入 5 μ L Annexin V-APC 和 5 μ L PI 染色液,涡旋混匀后,室温避光孵育 20 min,立即上机检测。实验结果判定:左上象限(Q1)为 PI 单染

表 1 针对 Icm1 基因序列设计 3 条 Icm1-siRNA
Table 1 Three Icm1-siRNA sequences designed for Icm1 gene

名称	产品编号	产品名称	靶序列
Icm1-siRNA-1	stB0010313A	genOFFTmst-h-ICMT-001	GAAGAAGAAATCTCACTAA
Icm1-siRNA-2	stB0010313B	genOFFTmst-h-ICMT-002	GTTAGAGTTCACACTTGAA
Icm1-siRNA-3	stB0010313C	genOFFTmst-h-ICMT-003	CTTCCCGGATCGAACAGAA

的坏死细胞或机械性损伤细胞; 右上象限 (Q2) 为 Annexin V-APC、PI 双染的晚期凋亡细胞; 右下象限 (Q3) 为 Annexin V-APC 单染的早期凋亡细胞; 左下象限 (Q4) 为无染色的存活细胞, 流式细胞仪计量测得各象限细胞比率, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

1.3 结果处理和统计学分析

Western 免疫印迹图像采用 image J 软件进行灰度分析, 流式细胞仪检测的凋亡、周期结果分别采用 FlowJo™ 10 和 ModFit LT 软件分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 GraphPad Prism 8.2.1 软件作图, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 siRNA 转染后各组细胞 Icm1 的表达水平

qRT-PCR 检测结果 (图 1) 显示, Icm1-siRNA 转染 CAL-27 和 SCC-4 细胞 24 h 后, Icm1 mRNA 表达水平显著降低, 其中 Icm1-siRNA-1 和 Icm1-siRNA-3 组与空白对照组相比, $P < 0.01$; Icm1-siRNA-2 组与空白对照组相比, $P < 0.05$ 。因 Icm1-siRNA-1 和 Icm1-siRNA-3 组沉默效率高于 Icm1-siRNA-2 组, 故后续应用此两组作为实验组。转染 48 h 后行 Western 免疫印迹检测, 进一步证明 (图 1), 实验组 CAL-27 和 SCC-4 细胞 Icm1 的蛋白相对表达量显著下降 ($P < 0.05$)。

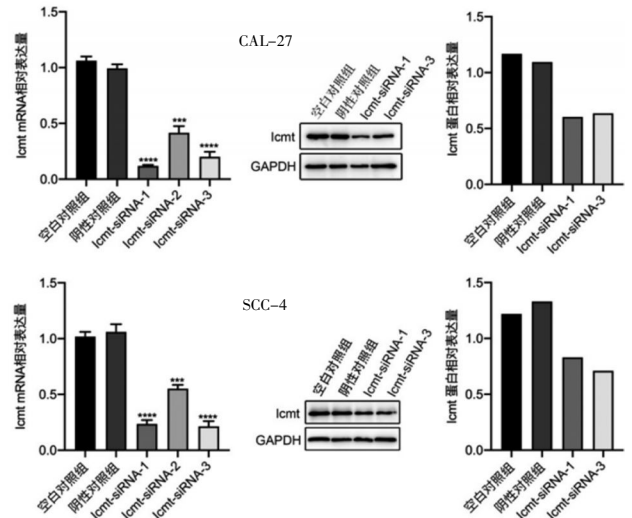


图 1 CAL-27 和 SCC-4 细胞转染 Icm1-siRNA 后各组细胞 Icm1 mRNA 及蛋白的表达变化 (与空白对照组相比, $***P < 0.05$; $****P < 0.01$)
 Figure 1 Expression of Icm1 mRNA and protein in CAL-27 and SCC-4 cells after Icm1-siRNA transfection (Compare with blank control group, $***P < 0.05$; $****P < 0.01$)

2.2 体外沉默 Icm1 后各组细胞 K-Ras mRNA 及 K-Ras 总蛋白和膜蛋白表达

qRT-PCR 及 Western 免疫印迹检测结果显示, 与阴性对照组和空白对照组相比, 实验组 K-Ras mRNA 及总蛋白相对表达量无显著变化 ($P > 0.05$), 但 K-Ras 膜蛋白相对表达量显著下降 ($P < 0.05$, 图 2)。

2.3 体外沉默 Icm1 对 CAL-27 和 SCC-4 细胞增殖能力的影响

应用 CCK-8 试剂盒检测 CAL-27 和 SCC-4 细

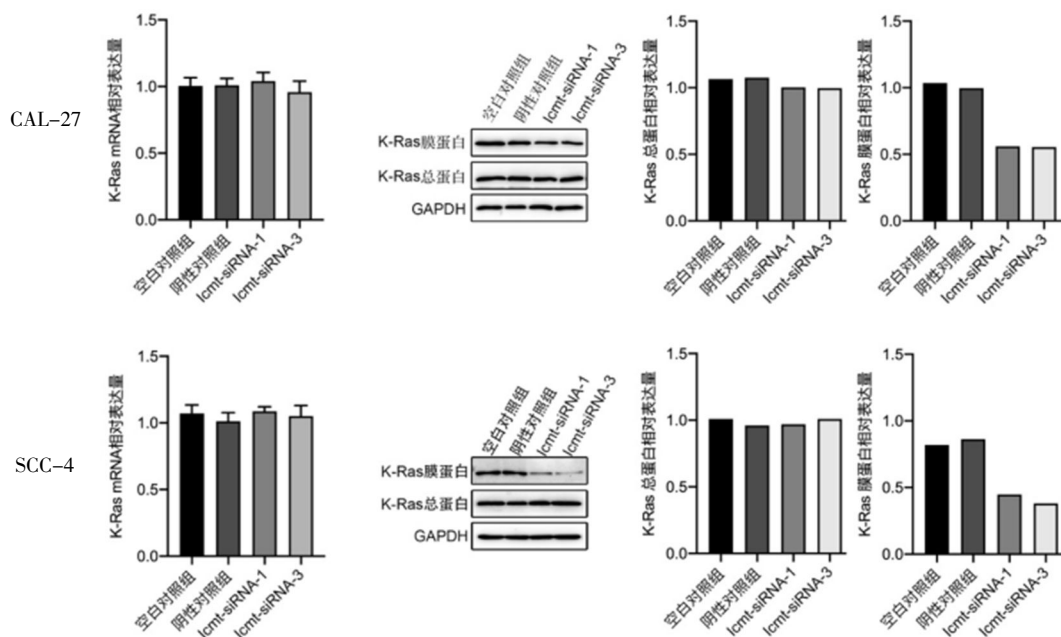


图 2 CAL-27 和 SCC-4 细胞转染 Icm1-siRNA 后各组细胞 K-Ras mRNA 及蛋白的表达变化
 Figure 2 Expression of K-Ras mRNA and protein in CAL-27 and SCC-4 cells after Icm1-siRNA transfection

细胞的增殖变化,结果(图3)显示,在转染0、24、48、72 h后,阴性对照组和空白对照组细胞均呈持续性快速增殖状态;而实验组细胞在24 h后与对照组相比,增殖速度显著减慢($P<0.05$),且随着时间延长,细胞增殖被抑制的趋势越明显。与对照组相比,实验组细胞的相对生存率也显著下降($P<0.01$)。

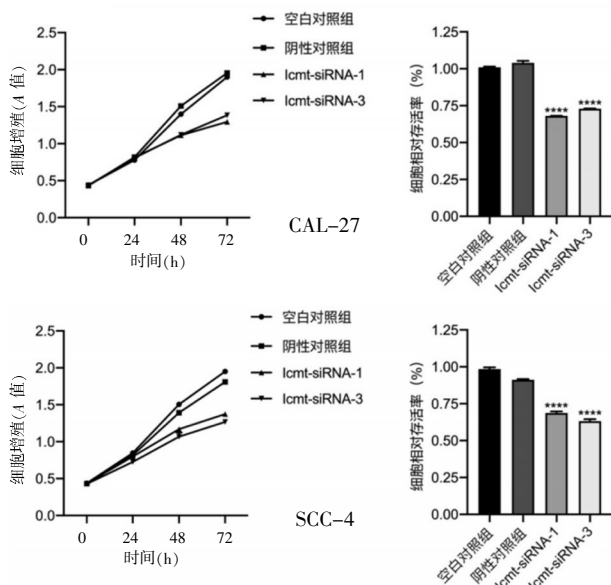


图3 沉默 Icm1 后对各组细胞增殖能力的影响(与空白对照组相比, $****P<0.01$)

Figure 3 Effect of silencing Icm1 on cells proliferation capacity (Compare with blank control group, $****P<0.01$)

2.4 体外沉默 Icm1 对 CAL-27 和 SCC-4 细胞周期和凋亡能力的影响

为探讨体外沉默 Icm1 基因的表达对 CAL-27 和 SCC-4 细胞增殖能力的抑制是否与细胞周期、凋亡水平增加有关,本研究首先应用流式细胞术检测 siRNA 转染 48 h 后各组细胞周期的变化,结果显示,实验组较对照组相比,G1 期细胞比例显著增加,S 期细胞比例减少,G2 期细胞无明显变化,其差异具有统计学意义($P<0.05$,图 4A)。其次,为进一步证实体外沉默 Icm1 对细胞周期的影响,应用 Western 免疫印迹测定与 G1 期相关的细胞周期蛋白的表达,结果发现,实验组在转染 Icm1 siRNA 后,Cyclin D1 蛋白表达显著下调,p21 蛋白表达显著上调 ($P<0.05$,图 4B)。应用 Annexin V-APC/PI 荧光双染法处理各组细胞,于流式细胞仪上检测细胞的凋亡水平,结果(图 4C)显示:各组细胞凋亡率(CAL-27: $2.02\% \pm 0.19\%$ 、 $2.77\% \pm 0.07\%$ 、 $8.83\% \pm 0.12\%$ 、 $7.17\% \pm 0.12\%$; SCC-4: $1.35\% \pm 0.11\%$ 、 $1.85\% \pm 0.02\%$ 、 $6.28\% \pm 0.08\%$ 、 $6.81\% \pm 0.21\%$),实验组凋亡细胞百分率显著增加

($P<0.01$)。表明沉默 Icm1 基因表达对细胞增殖的抑制可能与将细胞周期停滞于 G1 期和诱导细胞凋亡增加有关。

2.5 体外沉默 Icm1 后 Ras/PI3K/Akt/mTOR 信号通路的相关蛋白表达变化

为了进一步研究体外沉默 Icm1 对 CAL-27 和 SCC-4 影响的相关机制,应用 Western 免疫印迹检测 Ras/PI3K/Akt/mTOR 信号通路的相关蛋白,结果显示,Akt 蛋白表达无变化,p-Akt 蛋白表达显著下调($P<0.05$,图 5)。

3 讨论

Tadokoro 等^[11]首次报道在口腔癌细胞系中存在激活的 Ras 基因。随后,Saranath 等^[12]发现,在口腔癌细胞系中存在 K-Ras 扩增现象。Das 等^[13]在 50 例东印度口腔癌组织标本中,发现 H-Ras、K-Ras 基因分别有 28%和 33%的突变。目前,Ras 被认为是口腔癌中最常见的突变致癌基因之一,与肿瘤的发生、发展关系密切^[13]。因此,抑制 Ras 活性对口腔癌的发生、发展可产生一定影响。因在其结构上含有-CAAX 末端残基,必须依赖于翻译后修饰,才能获得与细胞膜的稳定结合,进而发挥生物活性作用^[14]。故抑制相关修饰酶的活性,可能成为治疗口腔癌的潜在靶点。

Icm1 是定位于 ER 上的分子量为 32 kDa 的蛋白,作为翻译后修饰的第三步修饰酶,催化 Ras 蛋白末端-CAAX 的羧基甲基化修饰^[15]。本研究以舌鳞癌 CAL-27 和 SCC-4 细胞为研究对象,应用 siRNA 干扰技术,有效沉默 Icm1 基因的表达,检测其对 K-Ras 的影响,结果发现,K-Ras mRNA 和总蛋白的表达无明显变化,但其膜蛋白相对表达量较对照组显著降低。由此推测,Icm1 并不影响 K-Ras 蛋白的合成,而可能是通过修饰 K-Ras 的蛋白末端-CAAX 羧基甲基化,影响 K-Ras 与细胞膜的稳定结合,这与在 K-Ras 突变诱导的多种肿瘤中的研究结果一致。在缺乏羧基甲基化修饰的情况下,K-Ras 蛋白不能有效地与细胞膜结合,而滞留在胞质内处于非活性状态,使肿瘤进展受到明显抑制^[5,6,13,16]。由此表明,Ras 的膜靶向定位和稳定性在很大程度上依赖于 Icm1,故抑制 Icm1 可能是一种更有效的抗癌靶点。

大量研究^[17-18]证明,降低 Icm1 酶活性可显著抑制肿瘤细胞的生长、存活、转移和侵袭等。近年来,国内的相关研究报道主要是探讨 Icm1 对恶性肿瘤的化

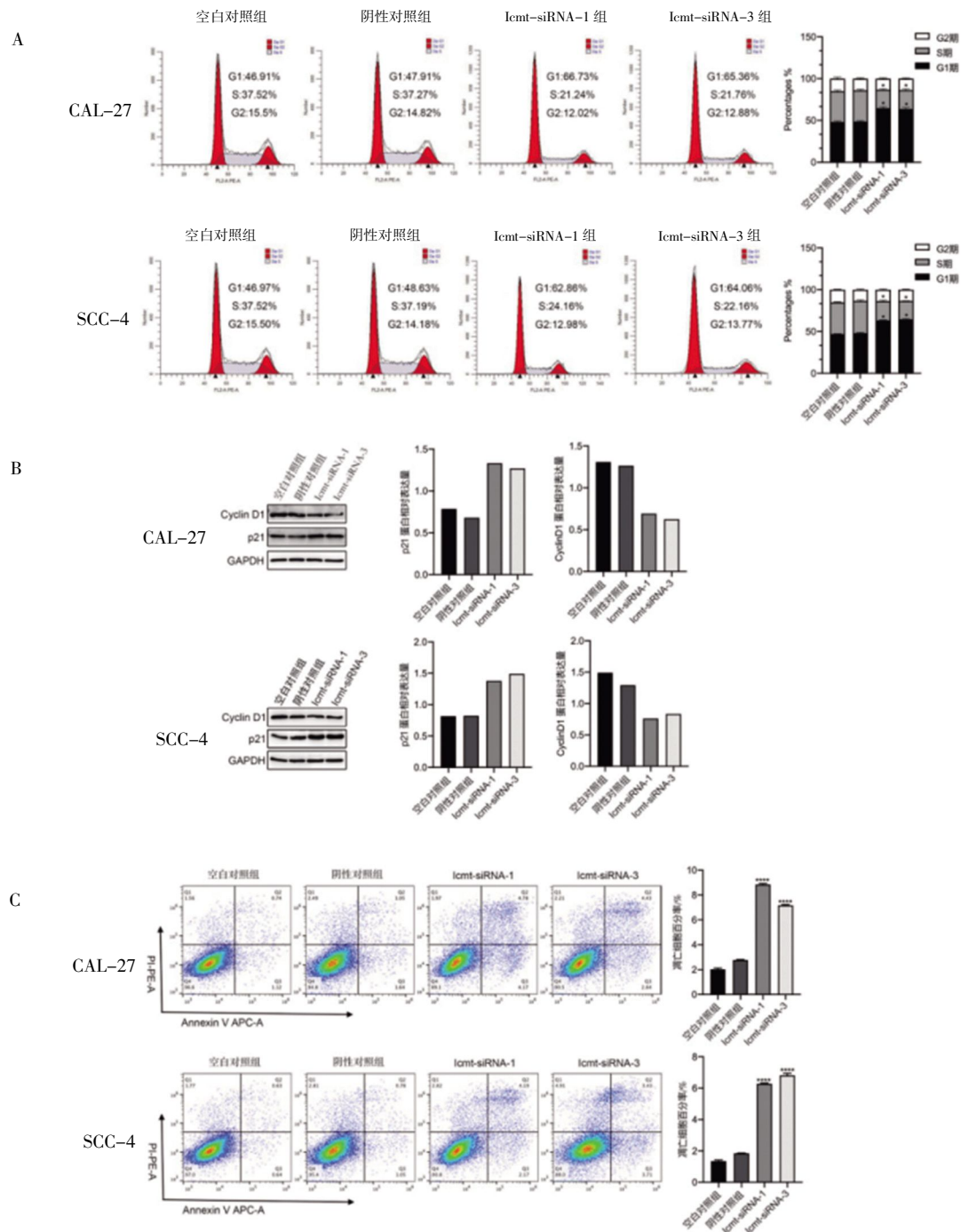


图 4 体外沉默 Icm1 对 CAL-27 和 SCC-4 细胞周期和凋亡能力的影响。A. 代表性流式细胞术图像和细胞周期分布统计图 (与空白对照组相比, $P < 0.05$); B. 细胞周期相关蛋白 p21 和 Cyclin D1 的相对表达量; C. 代表性流式细胞术图像和凋亡细胞百分比统计图 (与空白对照组相比, $^{****}P < 0.01$)

Figure 4 Effect of silencing Icm1 on cell cycle and apoptosis in CAL-27 and SCC-4 cells. A. Diagram of flow cytometry and statistical chart of cell cycle (Compare with blank control group, $P < 0.05$); B. Relative expression of p21 and Cyclin D1 protein; C. Diagram of flow cytometry and statistical chart of cell apoptosis (Compare with blank control group, $^{****}P < 0.01$)

疗药物反应性的影响,如鼻咽癌^[7]、卵巢癌^[8]、肝癌^[10]和宫颈癌^[19]等。研究发现,Icm1 高表达时,可增加肿瘤细胞对化疗药物的耐受性;而应用 siRNA 技术或药物抑制剂下调 Icm1 表达后,肿瘤细胞则对化疗药物的敏感性显著增加,并通过降低 Ras 活性及其介导

的 MAPK 或 Ras/PI3K/Akt 信号通路,抑制肿瘤细胞增殖及诱导凋亡。但 Icm1 对口腔癌的影响及作用机制国内尚未见有相关文献报道。本研究以 CAL-27 和 SCC-4 细胞为研究对象,探讨沉默 Icm1 对舌鳞癌生物学行为的影响。CCK-8 检测结果显示,实验组

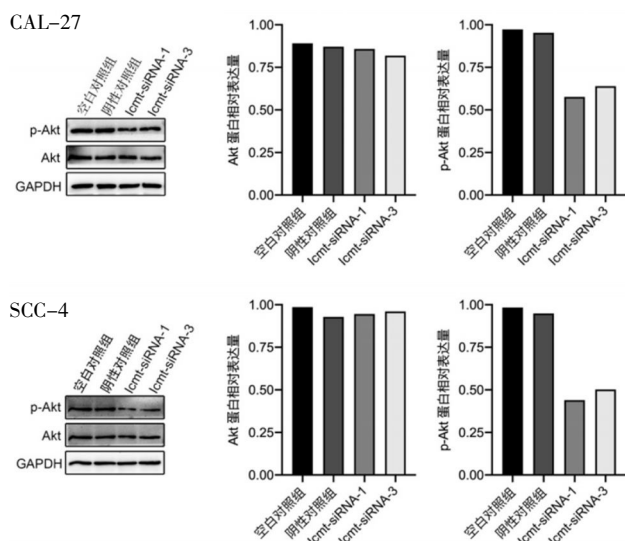


图5 沉默Icmt后,Ras/PI3K/Akt/mTOR信号通路的相关蛋白表达
Figure 5 Expression of related proteins in Ras/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway after silencing Icmt

CAL-27和SCC-4细胞在转染Icmt-siRNA 24 h后,与对照组相比,细胞增殖能力开始受到抑制;转染72 h时,细胞相对存活率显著下降。通过流式细胞术检测到细胞周期的分布发生变化,主要表现在G1期细胞比例明显增加,S期细胞比例减少,而G2期细胞无明显变化;细胞凋亡水平也显著增加。由此表明,降低Icmt酶活性,可能通过改变细胞周期分布,抑制舌鳞癌细胞的增殖且诱导凋亡。推测其原因,可能是沉默Icmt降低了K-Ras蛋白的甲基化修饰和膜定位,进而影响K-Ras对下游效应分子及Ras多级联信号通路的调控作用。

PI3K/Akt/mTOR是Ras蛋白调控最典型的通路之一,与多种恶性肿瘤的发生、发展相关,且其在舌癌的增殖、迁移等过程中也发挥重要的作用^[20-22]。为进一步探讨Icmt对舌鳞癌细胞增殖影响相关机制,本研究应用Western免疫印迹检测PI3K/Akt/mTOR通路的关键分子Akt及Akt的磷酸化水平,结果显示,沉默Icmt基因表达后,各组间Akt蛋白表达无显著差异,而实验组Akt蛋白的活性形式磷酸化水平较对照组显著下降。研究^[23-24]证实,Ras可使多种肿瘤细胞的Cyclin D1表达上调,其可调控CDK4/CDK6,并与之结合形成Cyclin D1-CDK4/6复合物,使细胞由G1期进入S期,加速细胞周期进程,促使细胞持续性增殖。Ras亦可通过调控PI3K/Akt/mTOR信号通路,促进Cyclin D1表达和稳定性增加^[21,23]。Ras/PI3K/Akt/mTOR对CKIs(p21、p27等)也存在一定的调节作用,其中,p21作为最早发现并克隆的人

CKI,几乎是所有调控细胞周期的Cyclin-CDK复合物的结合抑制因子,抑制细胞周期进展,亦可调控细胞凋亡。p-Akt也可靶向调控p21,使其滞留在胞质内,阻止其对细胞周期的抑制作用^[23,25]。Manu等^[26]在对胰腺癌的研究中发现,降低Icmt酶活性,可激活p21及其下游信号通路,抑制肿瘤细胞增殖而诱导细胞凋亡。本研究在沉默Icmt后,发现实验组CAL-27和SCC-4细胞的G1期调控蛋白Cyclin D1表达下调,周期抑制蛋白p21表达上调。表明沉默Icmt基因表达,可抑制K-Ras与细胞膜的稳定结合,使K-Ras对下游效应分子或Ras/PI3K/Akt/mTOR信号通路的级联反应的激活作用明显减弱,导致细胞周期阻滞在G1/S期,诱导细胞凋亡水平增加且抑制细胞增殖。

总之,体外沉默舌鳞癌细胞Icmt基因表达,可负性调控细胞周期,抑制其增殖和诱导凋亡,其相关机制可能是通过降低K-Ras蛋白的膜靶向定位,进而不能有效激活下游效应分子或Ras/PI3K/Akt/mTOR信号通路。本研究为Icmt作为舌鳞癌基因靶向治疗的新的有效靶点提供了一定的实验依据。

利益冲突声明:无。

作者贡献声明:陈正岗负责蛋白检测分析、实验设计、论文写作指导及修改;王奇民、童磊负责资料收集及分析;王云英、徐晓娜负责部分实验操作指导;王莹、韩红钰负责文献整理;盛善桂负责部分体外实验操作及部分统计分析;王少如负责体外实验操作、统计分析、论文撰写。

[参考文献]

- Li S, Chien C, Huang WT, et al. Prognostic significance and function of mammalian target of rapamycin in tongue squamous cell carcinoma[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 8178-8178.
- Feng Z, Xu QS, Qin LZ, et al. Predicting radiotherapy necessity in tongue cancer using lymph node yield[J]. *Oral Maxillofac Surg*, 2017, 75(5): 1062-1070.
- Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(10): 2457-2467.
- Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(7): 517-531.
- Winter-Vann AM, Casey PJ. Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(5): 405-412.
- Bergo MO, Leung GK, Ambroziak P, et al. Targeted inactivation of the Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase gene causes mislocalization of K-Ras in mammalian cells [J]. *Biol Chem*, 2000, 275(23): 17605-17610.

- [7] Zhu YB, Hu QY, Li H. Isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase is associated with nasopharyngeal carcinoma chemoresistance and Ras activation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 516(3): 784–789.
- [8] Liu Q, Chen J, Fu B, et al. Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase regulates ovarian cancer cell response to chemotherapy and Ras activation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 501(2): 556–562.
- [9] Court H, Amoyel M, Hackman M, et al. Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase deficiency exacerbates K-RAS-driven pancreatic neoplasia *via* Notch suppression [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(11): 4681–4694.
- [10] Xu J, Zhu Y, Wang F, et al. ICMT contributes to hepatocellular carcinoma growth, survival, migration and chemoresistance via multiple oncogenic pathways [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 518(3): 584–589.
- [11] Tadokoro K, Ueda M, Ohshima T, et al. Activation of oncogenes in human oral cancer cells: a novel codon 13 mutation of c-H-ras-1 and concurrent amplifications of c-erbB-1 and c-myc[J]. *Oncogene*, 1989, 4(4): 499–505.
- [12] Saranath D, Panchal RG, Nair R, et al. Oncogene amplification in squamous cell carcinoma of the oral cavity [J]. *Jpn J Cancer Res*, 1989, 80(5): 430–437.
- [13] Das N, Majumder J, Dasgupta UB. Ras gene mutations in oral cancer in eastern India[J]. *Oral Oncol*, 2000, 36(1): 76–80.
- [14] Glomset JA, Farnsworth CC. Role of protein modification reactions in programming interactions between Ras-related GTPases and cell membranes[J]. *Annu Rev Cell Biol*, 1994, 10(1): 181–205.
- [15] Dai Q, Choy E, Chiu V, et al. Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum [J]. *Biol Chem*, 1998, 273(24): 15030–15034.
- [16] Wahlstrom AM, Cutts BA, Liu M, et al. Inactivating Icm1 ameliorates K-Ras-induced myeloproliferative disease [J]. *Blood*, 2008, 112(4): 1357–1365.
- [17] Lau HY, Tang J, Casey PJ, et al. Isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase is critical for malignant transformation and tumor maintenance by all RAS isoforms[J]. *Oncogene*, 2017, 36(27): 3934–3942.
- [18] Magkouta S, Pappas A, Moschos C, et al. Icm1 inhibition exerts anti-angiogenic and anti-hyperpermeability activities impeding malignant pleural effusion [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (15): 20249–20259.
- [19] Pan Q, Liu R, Banu H, et al. Inhibition of isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase sensitizes common chemotherapies in cervical cancer *via* Ras-dependent pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 99: 169–175.
- [20] Murugan AK, Munirajan AK, Tsuchida N, et al. Ras oncogenes in oral cancer: the past 20 years[J]. *Oral Oncol*, 2012, 48(5): 383–392.
- [21] Morgensztern D, Mcleod HL. PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy[J]. *Anti Cancer Drugs*, 2005, 16(8): 797–803.
- [22] Wang K, Lin C, Wang C, et al. Silencing Kif2 a induces apoptosis in squamous cell carcinoma of the oral tongue through inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9 (1): 273–278.
- [23] Pruitt K, Der CJ. Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis[J]. *Cancer Lett*, 2001, 171(1): 1–10.
- [24] Shvartsur A, Bonavida B. Trop2 and its overexpression in cancers: regulation and clinical/therapeutic implications [J]. *Genes Cancer*, 2015, 6(3–4): 84–105.
- [25] Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(6): 400–414.
- [26] Manu KA, Chai TF, Teh JT, et al. Inhibition of Isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase induces cell-cycle arrest and apoptosis through p21 and p21-regulated BNIP3 induction in pancreatic cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2017, 16(5): 914–923.