

- [15] 狄婷婷,王秋杰,张美,等. 胶质细胞对A β 诱导的阿尔茨海默病大鼠脑神经损伤的影响[J]. 重庆医学,2015,44(11):1466-1468.
- [16] Schmitz TW, Soreq H, Poirier J, et al. Longitudinal Basal Forebrain Degeneration Interacts with TREM2/C3 Biomarkers of Inflammation in Presymptomatic Alzheimer's Disease[J]. J Neurosci, 2020, 40(9): 1931-1942.
- [17] Zhou R, Chen SH, Zhao Z, et al. Complement C3 Enhances LPS-Elicited Neuroinflammation and Neurodegeneration Via the Mac1/NOX2 Pathway[J]. Mol Neurobiol, 2023, 60(9): 5167-5183.
- [18] Lian H, Yang L, Cole A, et al. NF κ B-activated astroglial release of complement C3 compromises neuronal morphology and function associated with Alzheimer's disease[J]. Neuron, 2015, 85: 101-116.
- [19] 辛丹丹,邹晓华,佐满珍,等. S100A10蛋白的表达及其抗体的制备[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2014,30(11):1166-1169.
- [20] 史文哲,宋汉君,罗文哲,等. 大鼠海马区A1/A2型星形胶质细胞在弥漫性脑损伤后的表达变化[J]. 神经疾病与精神卫生,2022,22(12):888-893.
- [21] Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia[J]. Nature, 2017, 541(7638): 481-487.
- [22] 史文哲,罗文哲,宋汉君,等. 大鼠脑外伤后星形胶质细胞及血清中相关蛋白随时间表达变化研究[J]. 陕西医学杂志,2022,51(8):934-938.
- [23] Krysa M, Szymańska-Chargot M, Zdunek A. FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids - A review[J]. Food Chem, 2022, 393: 133430.
- [24] 罗善超,唐继仁. 橙皮素抑制氧化应激影响软骨细胞的炎性退变[J]. 中国组织工程研究,2024,28(26):4184-4188.
- [25] 郭玲,王兆领,黄振. 橙皮素通过circ-0039411/miR-296-5p影响IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡[J]. 免疫学杂志,2022,38(2):151-156,163.
- [26] Chen X, Ding HW, Li HD, et al. Hesperetin derivative-14 alleviates inflammation by activating PPAR- γ in mice with CCl $_4$ -induced acute liver injury and LPS-treated RAW264.7 cells[J]. Toxicol Lett, 2017, 274: 51-63.

(收稿日期:2024-01-17)

过表达Beclin1基因对横纹肌肉瘤RD细胞生物学行为的影响

吴恬菲,闫 涵,杨翼维,堵舒桐*

(大理大学病原生物学实验室,云南大理 671000)

摘要: **目的** 本研究旨在探究Beclin1基因调控横纹肌肉瘤RD细胞的机制。**方法** 通过转染技术使Beclin1基因在RD细胞中过表达,将其分为实验组和阴性对照组。运用RT-qPCR及Western Blot分别从mRNA水平和蛋白水平检测Beclin1基因在RD细胞中的表达情况。采用CCK-8实验、细胞划痕愈合实验、Transwell实验以及TUNEL实验分别检测转染前后细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡情况。**结果** 实验组Beclin1基因的mRNA表达量为 (4.06 ± 0.46) ,显著高于阴性对照组($P=0.008, P<0.01$),蛋白表达量为 (1.84 ± 0.30) ,显著高于阴性对照组($P=0.032, P<0.05$);根据吸光度值绘制出实验组和阴性对照组的生长曲线,实验组细胞生长水平显著低于阴性对照组($P<0.05$);实验组细胞迁移能力明显弱于阴性对照组($P<0.01$),侵袭能力显著弱于阴性对照组($P<0.01$),细胞凋亡率显著高于阴性对照组($P<0.01$)。**结论** 自噬调节基因Beclin1过表达可显著促进RD细胞凋亡,抑制RD细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

关键词: 横纹肌肉瘤;Beclin1;基因过表达;自噬

中图分类号: R738.6

文献标志码: A

文章编号: 1004-6879(2024)05-0367-06

资助项目:云南省教育厅科学研究基金项目(2024J0833)

*通讯作者

Effects of Beclin1 Gene Overexpression on Biological Behavior of Rhabdomyosarcoma RD Cells

WU Tian-fei, YAN Han, YANG Yi-wei, DU Shu-tong*

(Pathogenic Biology Laboratory of Dali University, Yunnan, Dali, 671000, China)

Abstract: **Objective** The aim of this study was to investigate the mechanism by which Beclin1 gene regulates rhabdomyosarcoma RD cells. **Methods** Beclin1 gene was overexpressed in RD cells using the transfection technique and was divided into experimental group and negative control group. At the mRNA and protein levels, RT-qPCR and western blotting were used to detect the expression of Beclin1 gene, respectively. Cell proliferation, migration, invasion and apoptosis were detected based on CCK-8 test, scratch healing test, Transwell test and TUNEL test. **Results** Beclin1 gene had a significantly greater mRNA expression in the experimental group (4.06 ± 0.46) compared to the negative control group ($P=0.008$, $P<0.01$). The expression level of protein in the experimental group was (1.84 ± 0.30), which was higher than that in the negative control group ($P=0.032$, $P<0.05$). Two group's growth curve were drawn based on its optical density value. The experimental group's level of cell growth was lower than that of the negative control group ($P<0.05$). Cell migration in the experimental group was noticeably worse than that in the negative control group ($P<0.01$), and the experimental group's capacity for invasion was observably weaker than that of the negative control group ($P<0.01$). But the rate of apoptosis was notably higher than that of the negative control group ($P<0.01$). **Conclusion** The overexpression of autophagy regulatory gene Beclin1 can significantly promote the apoptosis of RD cells and inhibit the proliferation, migration and invasion of RD cells.

Key words: Rhabdomyosarcoma; Beclin1; Gene overexpression; Autophagy

横纹肌肉瘤是儿童最常见的软组织肉瘤,约占儿童恶性肿瘤的7%^[1]。当前临床治疗以手术切除结合放化疗为主,尽管术后5年的生存率有明显提高,但部分高危患儿生存率仍然较低^[2-3]。靶基因治疗是临床恶性肿瘤治疗的有效手段之一,为了提高患者生存率,找到横纹肌肉瘤有效靶基因至关重要。Beclin1基因是第一个被发现的自噬基因^[4],其主要功能是在自噬诱导阶段介导ATG蛋白定位于前自噬小体,诱导自噬发生。目前,已有研究^[5]证实Beclin1基因与多种恶性肿瘤的发展有关,如肝癌、肺癌、乳腺癌等,但Beclin1基因在横纹肌肉瘤中的作用机制尚不清楚。因此,本研究通过在RD细胞中过表达Beclin1基因,检测细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的变化,阐明Beclin1基因对横纹肌肉瘤细胞生物学行为的影响。

1 材料与方法

1.1 质粒构建与细胞转染

人恶性胚胎横纹肌肉瘤RD细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。细胞在含特级胎牛血清(南美血源)、青链霉素混合液(100×)、DMEM高糖培养基的完全培养基中培养。细胞在37℃、5%二氧化碳的恒温培养箱中培

养。本实验质粒为PCDNA3.1质粒(NC组)和Beclin1质粒(Beclin1组),均由武汉金开瑞生物工程有限公司合成,再按照质粒抽提试剂盒说明书进行质粒提取,并根据实验所需细胞量不同,分别进行6孔板和24孔板转染。

1.2 Beclin1基因在RD细胞中过表达

1.2.1 RT-qPCR从mRNA水平检测过表达效果 24孔板转染48 h后收集细胞,进行细胞总RNA提取。将RNA溶液进行浓度以及纯度测定,再将RNA反转录为cDNA。采用ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix检测Beclin1。使用特定引物评估mRNA表达。 β -actin作为内参基因,使用 $\Delta\Delta C_t$ 方法计算每个样本的表达水平。引物序列如下:
Beclin1上游引物 ACATCTGGCACAGTGGACAGTTTG
Beclin1下游引物 AGCATGGAGCAGCAACACAGTC。

1.2.2 Western blot从蛋白水平检测过表达效果 6孔板转染48 h后收集细胞,用RIPA裂解液裂解细胞,离心取上清,测定吸光度值,计算蛋白浓度。加入5×蛋白上样缓冲液,混匀后加热使蛋白变性。取蛋白样品进行电泳,用聚偏氟乙烯(Polyvinylidene fluoride, PVDF)膜转膜,再用5%脱脂牛奶封闭,最后孵育一抗二抗。PVDF膜滴加ECL超

敏发光液进行检测并显影,采用Image J软件进行分析。

1.3 细胞增殖检测

细胞增殖效应检测采用CCK-8实验。细胞培养48 h后,计数,调整密度。设置时间组(2 h、24 h、48 h、72 h),每组设置5个复孔。根据时间段每孔加入CCK-8增强型溶液,孵育,测定吸光度值。

1.4 细胞迁移检测

1.4.1 细胞划痕实验 在6孔板底部画出九宫格后进行细胞转染,48 h后吸出培养基,在底部划3道竖线,清洗划下的细胞,镜下观察0 h划痕宽度。每孔加无血清培养基,孵育48 h。吸出培养基并清洗2次,镜下观察48 h划痕愈合宽度。计算划痕愈合比例:48 h划痕愈合比例=[(0 h划痕宽度-48 h划痕宽度)/0 h划痕宽度]×100%。

1.4.2 Transwell迁移实验 24孔板转染48 h后收集细胞,调整细胞浓度。上室加入细胞悬液,下室加入培养基进行细胞培养。取出小室,擦去上层培养基,染色后清洗,镜下观察细胞迁移情况,使用Image J软件计数,分析阴性对照组和实验组差异。

1.5 细胞侵袭检测

通过Transwell侵袭实验检测细胞侵袭效应。基质胶与DMEM按1:8稀释后,加入上室,待其凝结成胶;其余步骤同1.4.2迁移实验。

1.6 细胞凋亡检测

采用TUNEL实验。在6孔板内放入TC处理过的细胞爬片,进行细胞铺板及细胞转染。用4%多聚甲醛溶液固定爬片,洗涤后滴加0.2% Triton X-100溶液,再清洗。阳性对照样本滴加1×DNase I Buffer,平衡5 min,再滴加DNase I,孵育10 min后清洗。所有样本滴加1×Equilibration Buffer,放置30 min,再滴加孵育缓冲液。将爬片置于湿盒,在温箱避光孵育60 min后清洗。用DAPI溶液在黑暗中对样本进行复染,清洗后滴加甘油,在(620±20) nm荧光下观察Bright Red的红色荧光,在460 nm处观察DAPI的蓝色荧光。使用Image J软件对被染色的细胞进行计数,统计分析阴性对照组和实验组之间的凋亡情况。

1.7 统计学方法

采用SPSS 22.0统计学软件进行数据分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,2组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统

计学意义。

2 实验结果

2.1 RT-qPCR检测Beclin1基因在RD细胞中的表达

转染48 h后,与阴性对照组(NC)比较,实验组在RD细胞中的mRNA表达量为(4.06±0.46);实验组基因表达明显上调,经统计分析,差异具有统计学意义($P=0.008$, $P < 0.01$)。见图1。

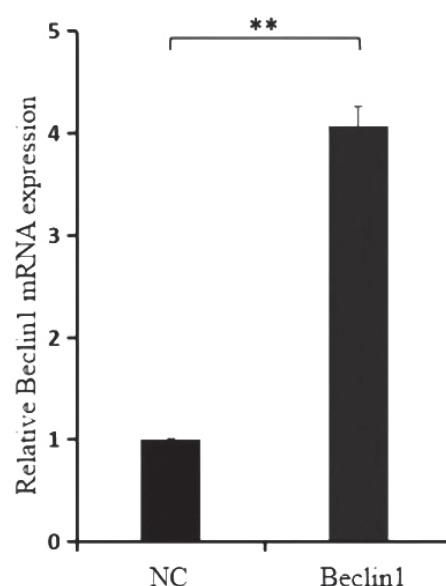


图1 RT-qPCR检测Beclin1基因的过表达效果
与阴性对照组相比,** $P < 0.01$

2.2 Western blot检测Beclin1基因在RD细胞中的表达

转染48 h后,与阴性对照组比较,实验组在RD细胞中的蛋白表达量为(1.84±0.30);实验组基因表达明显上调,经统计分析,差异具有统计学意义($P=0.032$, $P < 0.05$)。见图2。

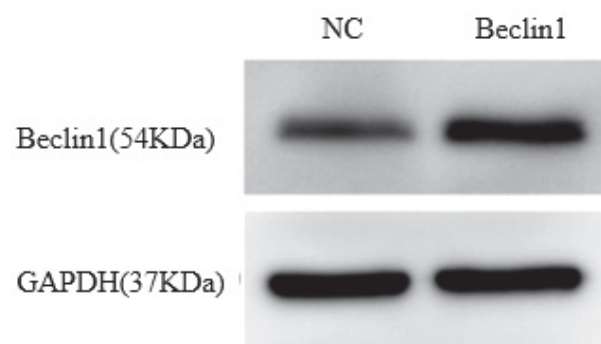


图2 Western blot检测Beclin1基因的表达水平

2.3 过表达Beclin1基因对RD细胞生物学行为的影响

2.3.1 细胞增殖结果 根据测定出的2 h、24 h、48 h、72 h的吸光度值,绘制出阴性对照组和实验组的生长曲线(图3)。与阴性对照组比较,实验组细胞生长缓慢,说明过表达Beclin1基因对横纹肌肉瘤RD细胞的增殖起抑制作用($P<0.05$)。

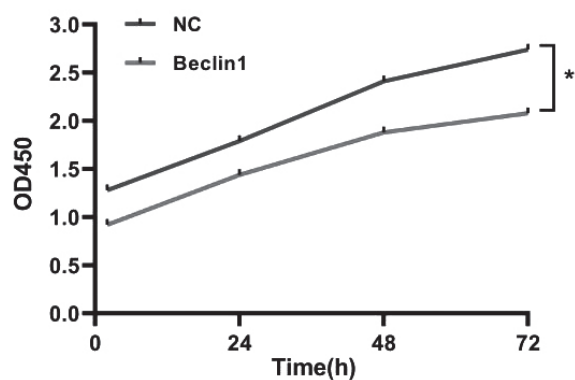


图3 过表达Beclin1基因对RD细胞增殖的影响
与阴性对照组相比,* $P<0.05$

2.3.2 细胞划痕结果 经过统计分析得出阴性对照组、实验组的细胞迁移率分别为(56.52±3.32)%、(33.90±0.57)%。与阴性对照组对比,实验组细胞迁移率降低($P=0.003$),说明过表达Beclin1基因对横纹肌肉瘤RD细胞的迁移起抑制作用($P<0.01$)。见图4。

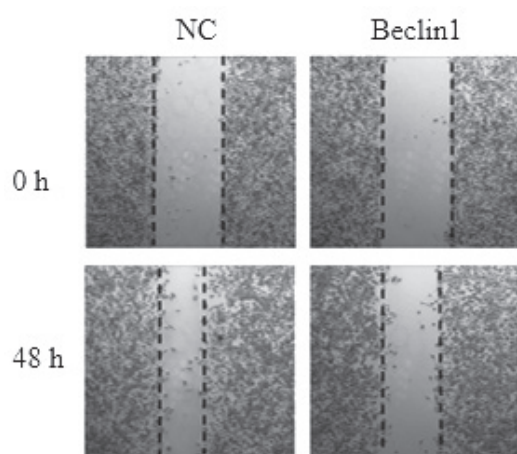


图4 划痕愈合实验(40×)

2.3.3 Transwell迁移实验结果 阴性对照组、实验组的迁移细胞数分别为(402.67±4.16)、(246.67±9.02)。与阴性对照组相比,实验组的细胞迁移数降低($P=0.001$),说明Beclin1基因的过表达对RD细胞的迁移能力起抑制作用($P<0.01$)。见图5。

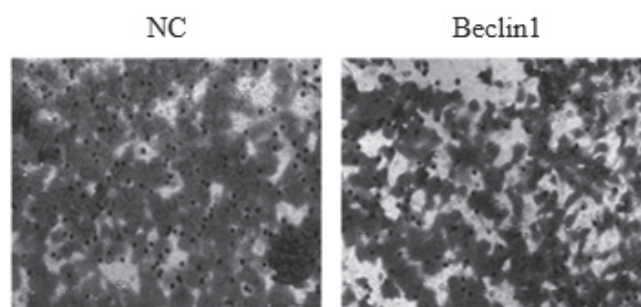


图5 Transwell迁移实验(100×)

2.3.4 Transwell侵袭实验结果 阴性对照组、实验组的细胞侵袭数分别为(49.00±2.00)、(33.67±2.08)。与阴性对照组相比,实验组的细胞侵袭数降低($P=0.004$),说明Beclin1基因的过表达对RD细胞的侵袭能力起抑制作用($P<0.01$)。见图6。

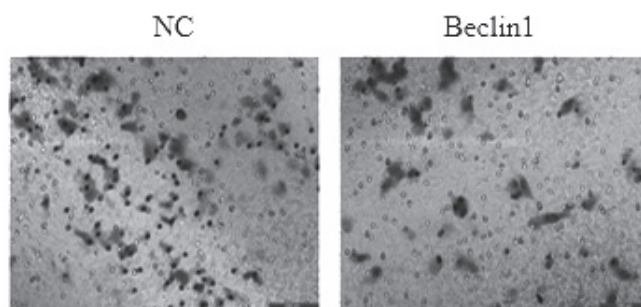


图6 Transwell侵袭实验镜下(100×)

2.3.5 TUNEL实验结果 如图7,阴性对照组、实验组的凋亡细胞数分别为(33.00±2.00)、(298.33±8.02)。与阴性对照组相比,实验组的细胞凋亡数升高($P=0.000$),说明Beclin1基因的过表达对RD细胞的凋亡起促进作用($P<0.01$)。

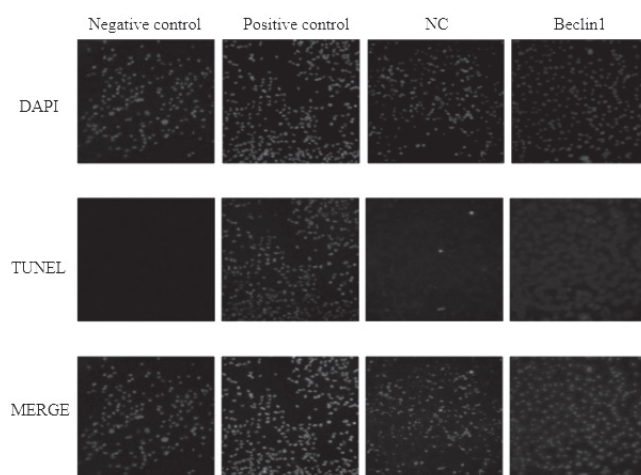


图7 TUNEL检测凋亡率镜下(200×)

3 讨论

横纹肌肉瘤具备早期症状不明显、恶性程度高、易转移、复发率高、预后差的特点,部分初诊为横纹肌肉瘤的患者已经出现肿瘤转移,这也是导致患者死亡的主要原因^[6]。自噬是近几年研究的热点内容,在机体遭受感染之后,细胞自噬能够消灭入侵细胞的细菌或病毒。自噬异常可能会导致肿瘤等代谢性疾病的发生,严重时能够影响到生物体生长发育、衰老、死亡等整个过程^[7]。自噬在恶性肿瘤中扮演“双刃剑”的角色,自噬的行为随肿瘤的类型、分级、内环境等因素的变化而变化^[8]。有学者^[9]在研究自噬与乳腺癌转移关系中发现,抑制癌细胞的自噬能够阻断体内外肿瘤细胞的侵袭转移过程,此研究证实抑制自噬将有可能是阻断恶性肿瘤转移扩散的有效途径,从而为肿瘤治疗提供一个新的方法。

Beclin1是调控自噬的关键蛋白,含450个氨基酸序列,分子量约为60kDa,并有3个结构域,分别为BH3结构域、中央卷曲螺旋结构域(Coiled-coil domain, CCD)及进化保守结构域(Evolutionarily conserved domain, ECD)。Bcl-2/Bcl-XL能通过BH3结构域与Beclin1相互作用,使其无法与III类磷脂酰肌醇3-激酶复合物结合而失活,从而抑制自噬^[10]。VPS34能通过CCD结构域和ECD结构域与Beclin1结合形成复合体,磷酸化磷脂酰肌醇,产生磷脂酰肌醇3-激酶,调控自噬进程^[11]。Beclin1通过结构域与多种蛋白结合,形成复合体参与多种通路,调节自噬,影响肿瘤的发生发展。

本研究通过转染技术上调横纹肌肉瘤RD细胞中Beclin1基因的表达水平,结果显示Beclin1过表达能减弱RD细胞的增殖能力,使细胞生长速度变缓($P<0.05$)。与阴性对照组相比,实验组细胞的迁移数明显降低($P<0.01$),结果表明Beclin1基因的过表达降低了RD细胞的侵袭能力。Zheng等^[12]也发现,在胃癌BGC-823和MKN28细胞过表达Beclin1基因后,胃癌细胞的增殖、迁移、侵袭和肿瘤生长被抑制,而沉默Beclin1基因的细胞则相反。Lan等^[13]的研究结果也表明,Beclin1基因在肝癌HepG2、HUH-7细胞过表达后,细胞周期受到影响,细胞生长速度下降。除此之外,我们发现Beclin1基因过表达还可以促进RD细胞的凋亡。尽管自噬在形态学上不同于凋亡,但

它可能发生在凋亡之前或与凋亡共存^[14-15]。Beclin1可以通过BH3结构域与Bcl-2结合,激活Bcl-2/Bax/caspase-3凋亡信号通路,进而启动细胞凋亡,抑制细胞生长^[15]。有研究者^[16]提出,Beclin1是把自噬与凋亡联系起来的桥梁,这两个过程可以发挥协同作用,促进肿瘤细胞的死亡。

Beclin1是调控自噬过程的重要基因,而自噬在肿瘤的发生发展过程中发挥重要作用。因此,明确Beclin1基因在恶性肿瘤中的具体调控机制,阐明Beclin1对肿瘤细胞自噬与死亡的作用机制,或许能为恶性肿瘤的药物研发及靶向治疗提供依据。

参考文献

- [1] Skapek SX, Ferrari A, Gupta AA, et al. Rhabdomyosarcoma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5(1): 1.
- [2] Hung GY, Yen CC, Homg JL, et al. Incidences of Primary Soft Tissue Sarcoma Diagnosed on Extremities and Trunk Wall: A Population-Based Study in Taiwan[J]. Medicine (Baltimore), 2015, 94(41): e1696.
- [3] Hettmer S, Linardic CM, Kelsey A, et al. Molecular testing of rhabdomyosarcoma in clinical trials to improve risk stratification and outcome: A consensus view from European paediatric Soft tissue sarcoma Study Group, Children's Oncology Group and Cooperative Weichteilsarkom-Studiengruppe[J]. Eur J Cancer, 2022, 172: 367-386.
- [4] Tran S, Fairlie WD, Lee EF. BECLIN1: Protein Structure, Function and Regulation[J]. Cells, 2021, 10(6): 1522.
- [5] Wu CL, Zhang SM, Lin L, et al. BECN1-knockout impairs tumor growth, migration and invasion by suppressing the cell cycle and partially suppressing the epithelial-mesenchymal transition of human triple-negative breast cancer cells[J]. Int J Oncol, 2018, 53(3): 1301-1312.
- [6] Jawad N, McHugh K. The clinical and radiologic features of paediatric rhabdomyosarcoma[J]. Pediatr Radiol, 2019, 49(11): 1516-1523.
- [7] Perera RM, Stoykova S, Nicolay BN, et al. Transcriptional control of autophagy-lysosome function drives pancreatic cancer metabolism[J]. Nature, 2015, 524(7565): 361-365.
- [8] 叶萍, 叶秀仙, 康川川, 等. 自噬与肿瘤关系研究的最新进展[J]. 赣南医学院学报, 2018, 38(3): 260-264.
- [9] Sharifi MN, Mowers EE, Drake LE, et al. Autophagy Promotes

- (收稿日期:2024-03-01)

(基础医学栏目编辑:张明溪)

[illegible]COPD并Ⅱ型呼吸衰竭患者HIF-1 α 、SP-D、Copeptin水平及价值

(中国人民解放军联勤保障部队第九八八医院呼吸消化内科,河南焦作 450042)

关键词: 慢性阻塞性肺疾病; II型呼吸衰竭; 缺氧诱导因子1 α ; 肺表面活性物质蛋白D; 和肽素

中图分类号: R562.2 文献标志码: A 文章编号: 1004-6879(2024)05-0372-06

LI Mei-xia, WU Na-na

(Department of Respiratory and Gastroenterology, 988 Hospital of Chinese People's Liberation Army Joint Logistic Support Force, Jiaozuo, Henan, 450042, China)