

- cytoplasmic HMGB1 levels in endotoxin - stimulated macrophages [J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 81(9): 1152 - 1163
- 13 Ellis LZ, Liu W, Luo Y, *et al.* Green tea polyphenol epigallocatechin - 3 - gallate suppresses melanoma growth by inhibiting inflammasome and IL - 1 β secretion[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 414

- (3): 551 - 556
- 14 Yang H, Tracey KJ. Targeting HMGB1 in inflammation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1799(1 - 2): 149 - 156
- (收稿日期: 2013 - 03 - 30)
- (修回日期: 2013 - 05 - 02)

SIAH1 可通过上调 Bim 表达诱导乳腺癌细胞失巢凋亡

温媛媛 杨志强 邓 涛 李春生

摘 要 **目的** 研究 SIAH1 对乳腺癌细胞失巢凋亡的影响及其相关机制。**方法** 采用脂质体介导法将 SIAH1 表达质粒 pcDNA3 - myc - SIAH1、对照质粒 pcDNA3 - myc、Bim 干扰片段 BimsiRNA 和对照片段 control siRNA 转染入乳腺癌细胞系 MCF - 7, 利用 Western blot 法检测 SIAH1 和 Bim 的表达, 并应用 Annexin V - FITC/PI 试剂盒及流式细胞仪技术分析各组细胞在悬浮和贴壁生长状态下细胞的凋亡情况。**结果** 与未处理组及转染对照质粒组相比, 转染 SIAH1 表达质粒后, SIAH1 ($P < 0.05$) 和 Bim ($P < 0.05$) 表达均明显上调, 且失巢凋亡率明显增加, 分别为 7.36%、8.02% 及 38.4%。另外, 与单独转染 SIAH1 表达质粒 pcDNA3 - myc - SIAH1 相比, 共转染 pcDNA3 - myc - SIAH1 与 Bim siRNA 后, Bim 表达显著降低 ($P < 0.05$), 同时细胞失巢凋亡率明显降低 ($P < 0.05$), 分别为 36.8% 与 8.16%。**结论** 过表达 SIAH1 可通过上调 Bim 表达来诱导乳腺癌细胞失巢凋亡。

关键词 乳腺癌 SIAH1 Bim 细胞失巢凋亡

SIAH1 Induces Anoikis through Up - regulating the Expression of Bim in Breast Carcinoma Cells. Wen Yuanyuan, Yang Zhiqiang, Deng Tao, Li Chunsheng. *Zhoushan Hospital, Zhejiang 316000, China*

Abstract Objective To investigate the effect and mechanisms of SIAH1 on the induction of anoikis of breast carcinoma. **Methods** MCF - 7 cells were transfected with pcDNA3 - myc - SIAH1, pcDNA3 - myc, Bim siRNA or control siRNA using Lipofectamine 2000. The expression of SIAH1 and Bim were detected by Western blot. Annexin V - FITC/PI reagent kit and Flow cytometry assay were used to analyze apoptosis in adherent and nor adherent cells. **Results** Compared with the control and the cells transfected with the pcDNA3 - myc, the level of SIAH1 and Bim were increased in the cells transfected with the pcDNA3 - myc - SIAH1. And the anoikis percentage was 7.36%, 8.02% and 38.4%, respectively. Further, MCF - 7 cells co - transfected pcDNA3 - myc - SIAH1 and Bim siRNA showed lower level of Bim ($P < 0.05$) and apoptosis rate (8.16% and 36.8%, respectively) than cells transfected with pcDNA3 - myc - SIAH1 only. **Conclusion** Overexpression of SIAH1 induced anoikis of breast carcinoma by upregulating the level of Bim.

Key words Breast carcinoma; SIAH1; Bim; Anoikis

SIAH (seven in absentia homolog) 家族蛋白是果蝇属 SINA 蛋白的同系物, 人类有两个高度保守的同源 SINA; SIAH1 和 SIAH2, siah1 定位于 16q12 号染色体, 编码 282 个氨基酸, 与果蝇属 sina 有 76% 的氨基酸相似, siah2 定位于 3q25 号染色体, 编码了 324 个氨基酸, 与果蝇属 sina 有 68% 的同一性, 与 siah1 有 77% 的同一性。然而 SIAH1 和 SIAH2 蛋白在 N 端有显著差别^[1,2]。Bim (Bcl - 2 interacting mediator of cell

death) 是 Bcl - 2 家族中 BH3 - only 亚家族的成员, 是一种重要的凋亡调节蛋白。现已明确, Bim 分子在一定的凋亡刺激下被激活, 活化的 Bim 分子即可通过与 Bcl - 2/Bax 的相互作用激活 Bax, 引起线粒体途径的细胞凋亡^[3], 又可诱导细胞失巢凋亡 (anoikis)。细胞凋亡是机体生长、分化、发育和病理过程中, 由基因编码调控的细胞自发死亡过程, 又称程序性死亡。失巢凋亡 (anoikis) 是一种特殊形式的细胞凋亡, 由于细胞与细胞外基质和其他细胞失去接触而诱导的一种程序化死亡形式, 发生在肿瘤细胞转移的起始阶段, 是抑制肿瘤细胞转移的人体重要防御机制之一^[4,5]。失去与细胞外基质的黏附是肿瘤细胞发生转移必须经历的过程, 即能够抵抗失巢凋亡的肿瘤细

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (青年科学基金项目) (81201853); 浙江省自然科学基金资助项目 (Y2110620, Y2111209)

作者单位: 316000 浙江省舟山医院 (温媛媛、杨志强、邓涛、李春生); 310018 杭州师范大学临床医学院 (温媛媛、杨志强)

通讯作者: 杨志强, 电子信箱: zqyang703@yahoo.com.cn

胞才能生存,进而发生转移。与失巢凋亡相关的基因有 Bim、P53 等^[6-8],同时与失巢凋亡密切相关的信号通路有 PI₃K、P38MAPK 与 ERK^[9-11]。

笔者的研究表明,SIAH1 可通过上调 Bim 表达,进而诱导乳腺癌细胞凋亡^[12-13]。但尚不清楚 SIAH1 是否对乳腺癌细胞失巢凋亡有影响,为此,我们采用乳腺癌细胞系作为研究对象,利用脂质体介导法,将 pcDNA3 - myc - SIAH1 质粒或对照质粒 pcDNA3 - myc 导入乳腺癌细胞系 MCF - 7,观察其在贴壁生长和悬浮生长状态下 Bim 蛋白的表达情况及其对乳腺癌细胞自发凋亡和失巢凋亡的影响,同时共转染 pcDNA3 - myc - SIAH1 质粒与 Bim siRNA,检测乳腺癌细胞失巢凋亡率,以进一步了解 SIAH1 在乳腺癌细胞失巢凋亡中的作用及其机制。

材料与方法

1. 细胞与质粒:人乳腺癌细胞系 MCF - 7 购于中国科学院上海生科院细胞资源中心,Poly - HEMA 购自美国 Sigma 公司,SIAH1 表达质粒 pcDNA3 - myc - SIAH1 与对照质粒 pcDNA3 - myc 由美国 Matsuzawa Shu - ichi 教授(Burnham Institute, La Jolla, CA, USA)惠赠。

2. siRNA 干扰:根据 siRNA 设计原则,选取人 Bim mRNA 中的特异性核苷酸片段为靶目标,应用 Ambion 公司在线 siRNA 设计软件设计 Bim 的 RNAi 序列,经 Blast 确定所选靶向的基因是特异的,序列由上海吉凯基因化学技术有限公司合成。control siRNA 序列:5' - AAGAGCCGTCAGACTGCTACA - 3'。Bim siRNA 序列:5' - ACCGAGAAGGUAGACAAU - 3'。每个实验均重复 3 次,转染具体步骤按 Lipofect 2000 试剂说明书进行。

3. 主要试剂:山羊抗人 SIAH1 (1:400) 购于 Santa Cruz 公司,兔抗人 Bim (1:1000) 购于 cell signal 公司和抗 β - actin (1:200) 购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

4. 细胞培养与转染:乳腺癌细胞系 MCF - 7,接种在含 10% 胎牛血清、100U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养液中,pH 值保持在 7.2 ~ 7.4,于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 孵箱内培养。采用脂质体介导法,将 SIAH1 表达质粒 pcDNA3 - myc - SIAH1 与对照质粒 pcDNA3 - myc 导入处于对数生长期的细胞中,具体转染步骤按脂质体 LipofectamineTM 试剂说明书进行,以未处理细胞和转染空载体细胞作为对照。每个实验均重复 3 次。

5. Western blot:于 4 $^{\circ}$ C 下取 1 ~ 2g 标本,加约 5 倍湿重的裂解缓冲液,粉碎匀浆后,4 $^{\circ}$ C 静置 24h,低温高速离心(4 $^{\circ}$ C,12000r/min,40min),提取上清即为总蛋白。经电泳、转印,5% 正常小牛血清封闭,抗 SIAH1 (1:200)、抗 Bim (1:1000) 和抗 β - actin (1:500) 4 $^{\circ}$ C 下孵育,过夜;于二抗室温下孵育 2h。ECL 显色,X 线胶片曝光成像,经自动电泳凝胶成像分析仪采集图像。每组结果均为相同条件下重复 3 次。

6. 失巢凋亡的诱导:Poly - HEMA (10mg/ml) 溶于无水乙醇,60mm 培养皿中加入 2ml Poly - HEMA 溶液,乙醇挥发后,重复操作 1 次,PBS 洗 4 次。细胞转染 48h 后,收集活细胞,计数,并以 1×10^6 细胞接种到 Poly - HEMA 包被或未包被的培养皿内,常规条件下培养,于指定时间收集细胞。

7. Annexin V - FITC/PI 试剂盒检测凋亡:收集细胞,离心后用冷 PBS 洗 3 次,离心后用 Binding Buffer 重悬,调整细胞浓度至 1×10^6 细胞/毫升,取 100 μ l 细胞,加入 Annexin V - FITC 和 PI 各 5 μ l,室温避光 15m 后加 400 μ l PBS,使用流式细胞仪进行检测。

8. 统计学方法:采用 SPSS 13.0 统计学分析软件,Western blot 和凋亡实验结果均采用 *t* 检验进行数据分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

结 果

1. 瞬时转染及 SIAH1 表达的鉴定:转染 48h 后,Western blot 结果显示,与未处理组及转染对照质粒 pcDNA3 - myc 组相比较,MCF - 7 细胞转染 SIAH1 表达质粒 pcDNA3 - myc - SIAH1 后,SIAH1 表达明显增加($P < 0.05$) (图 1)。

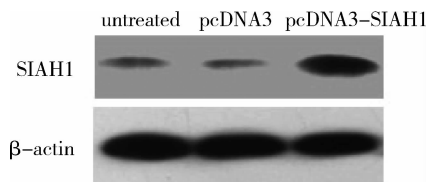
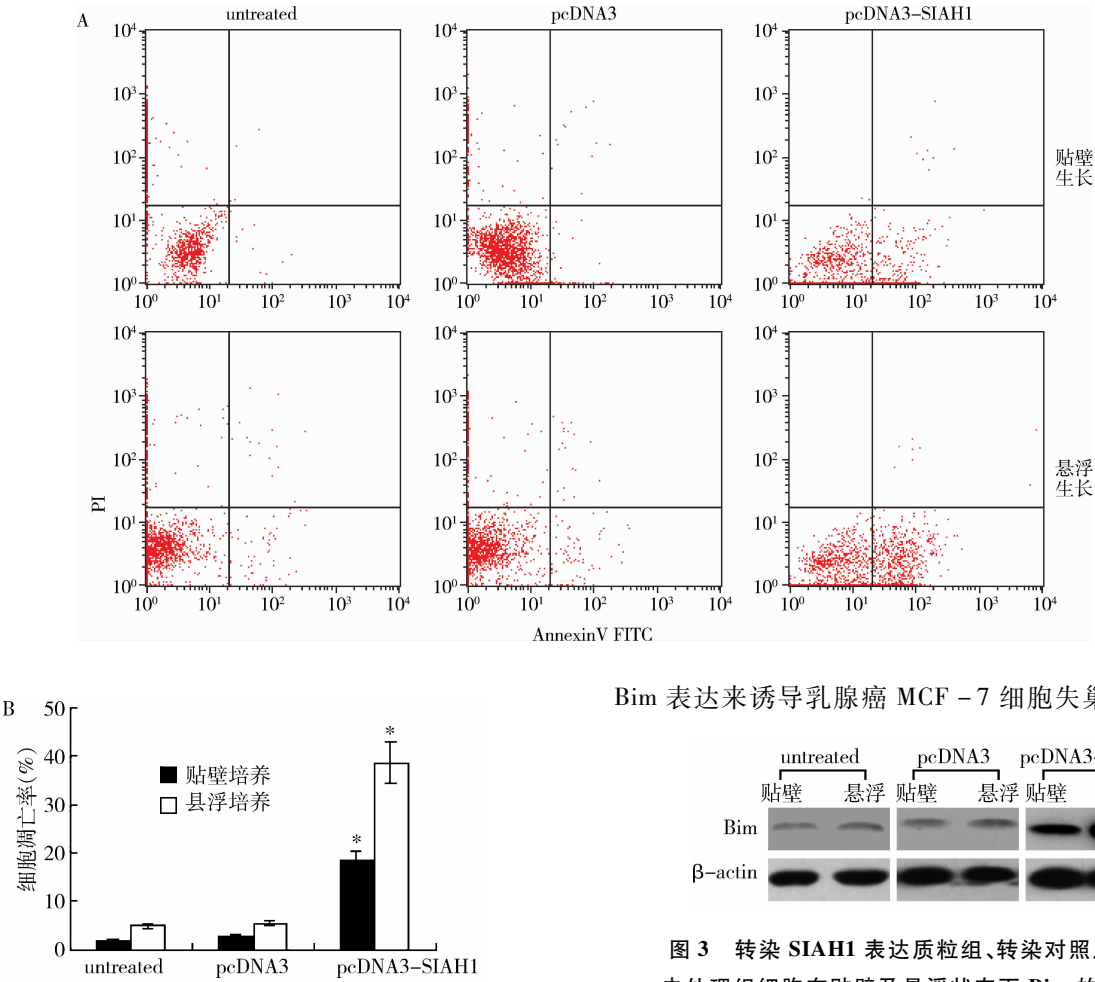


图 1 转染 SIAH1 表达质粒及对照质粒后 SIAH1 的表达情况

2. 过表达 SIAH1 可诱导乳腺癌细胞的失巢凋亡:乳腺癌细胞 MCF - 7 在 Poly - HEMA 包被的培养皿中不能贴壁,呈悬浮生长状态。在悬浮生长 18 h 后,未处理组、转染对照质粒 pcDNA3 - myc 组及转染 SIAH1 表达质粒 pcDNA3 - myc - SIAH1 组细胞的失巢凋亡率分别为 7.36%、8.02% 及 38.4%,均较贴壁生长的相同组细胞自发凋亡率(2.05%、2.87% 及 18.4%)高,且转染 SIAH1 表达质粒后,乳腺癌细胞的失巢凋亡率(38.4%)明显高于自发凋亡率(18.4%)($P < 0.05$)。未处理组与转染对照质粒组在贴壁生长时自发凋亡率无明显差别,在悬浮生长时失巢凋亡率也无明显差别。但二者与转染 SIAH1 表达质粒组细胞的自发凋亡率及失巢凋亡率均有明显差别($P < 0.05$) (图 2)。

3. SIAH1 可通过 Bim 来诱导乳腺癌细胞失巢凋亡:Western blot 结果显示,未转染组与转染对照质粒组在细胞悬浮生长和贴壁生长时,Bim 表达无明显差



Bim 表达来诱导乳腺癌 MCF - 7 细胞失巢凋亡。

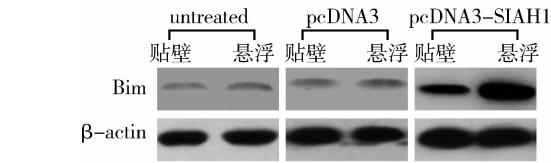


图 3 转染 SIAH1 表达质粒组、转染对照质粒组及未处理组细胞在贴壁及悬浮状态下 Bim 的表达情况

图 2 过表达 SIAH1 可诱导 MCF - 7 细胞失巢凋亡

A. 转染 SIAH1 表达质粒组、转染对照质粒组及未处理组细胞在贴壁及悬浮状态下细胞的凋亡情况; B. 各组别中细胞凋亡率的统计学分析, * $P < 0.05$

异($P > 0.05$),但转染 SIAH1 表达质粒后,悬浮生长和贴壁生长时 Bim 表达均较前两组细胞高($P < 0.05$),且悬浮生长时 Bim 表达更强($P < 0.05$) (图 3)。表明 SIAH1 诱导贴壁细胞的自发凋亡与 Bim 有关(这与我们以前研究结果一致),SIAH1 可能通过 Bim 诱导悬浮生长状态时细胞的失巢凋亡。另外,Western blot 结果表明,与未转染组和转染对照组 control siRNA 相比较,转染 Bim siRNA 后 MCF - 7 细胞表达 Bim 明显减少,证明 Bim siRNA 可有效降低 Bim 表达(图 4A)。在细胞悬浮生长状态下,与转染 SIAH1 表达质粒 pcDNA3 - myc - SIAH1 相比,共转染 pcDNA3 - myc - SIAH1 与 Bim siRNA 后,Bim 表达显著降低($P < 0.05$) (图 4B),同时 MCF - 7 细胞失巢凋亡率明显降低($P < 0.05$),分别为 36.8% 与 8.36% (图 4C),进一步证明 SIAH1 可以通过上调

讨论

乳腺癌是危害妇女健康的主要恶性肿瘤之一,在全世界范围内约占女性恶性肿瘤总数的 21%,其发生率和病死率都位于女性恶性肿瘤之首,乳腺癌发生率及病死率有逐年上升的趋势。探讨什么基因在乳腺癌形成过程中(从良性到恶性的过程)起作用,找到并明确这些基因发生的改变,建立乳癌的早期诊断技术,寻找有助于早期诊断的生物学标志物及特异性的药物靶点已成为攻克乳腺癌的当务之急。

细胞与细胞外基质或相邻细胞脱离接触可诱发细胞失巢凋亡,失巢凋亡在机体生长发育,抑制肿瘤发生发展和转移中发挥重要作用^[4,5]。有研究报道稳定转染 SIAH - 1 于乳腺癌上皮细胞系后,发现可通过改变有丝分裂和诱导 p21Waf - 1/Cip - 1(一种依赖细胞周期素激酶的抑制剂)的表达来抑制细胞的生长。SIAH1 可以在 p53 依赖和独立的细胞凋亡和肿瘤抑制细胞模型中表达。可以看出,SIAH1 在

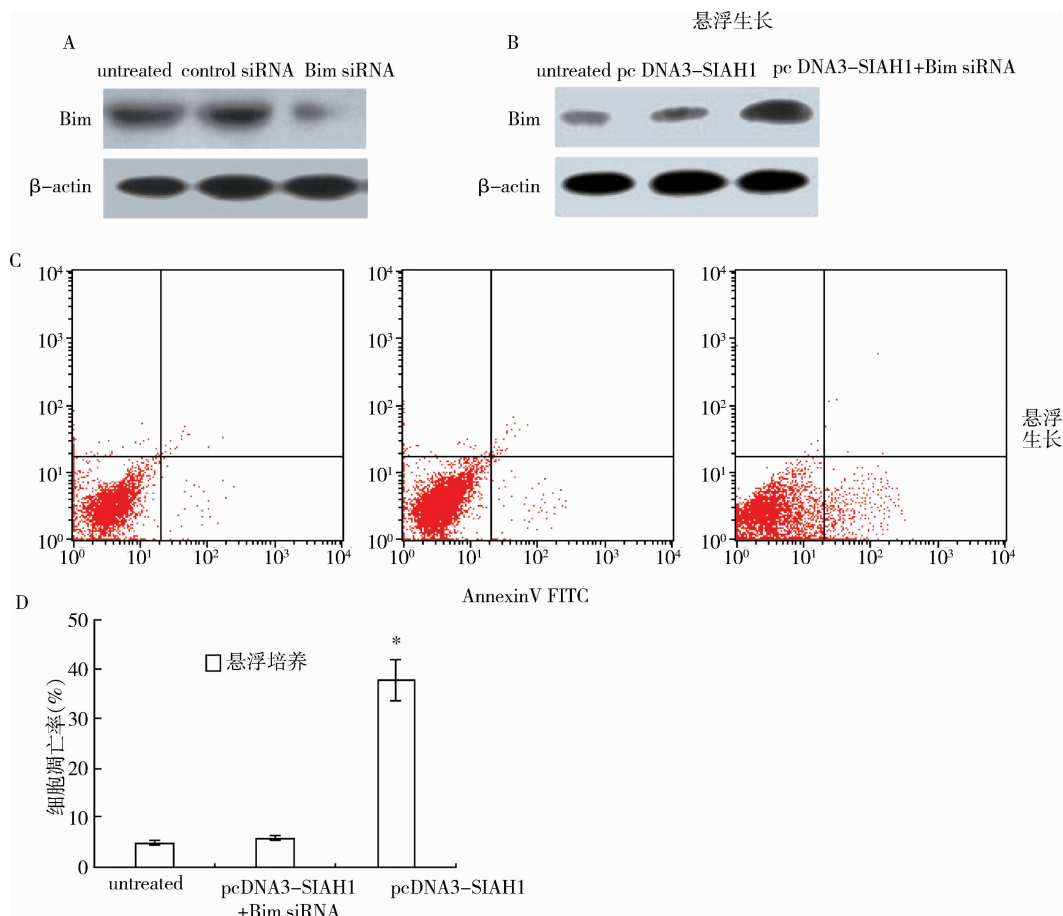


图4 过表达 SIAH1 可通过调控 Bim 表达来诱导 MCF-7 细胞失巢凋亡

A. 转染 Bim 干扰片段及对照片段后 Bim 的表达情况; B. 转染 SIAH1 表达质粒组、未处理组及共转染 SIAH1 表达质粒与 Bim 干扰片段组后细胞在悬浮生长状态下 Bim 的表达情况; C. 转染 SIAH1 表达质粒组、未处理组及共转染 SIAH1 表达质粒与 Bim 干扰片段组后细胞失巢凋亡情况; D. 各组别中细胞凋亡率的统计学分析, * $P < 0.05$

肿瘤细胞的凋亡中起重要作用。另外笔者研究发现过表达 SIAH1 可通过上调 Bim 表达来诱导乳腺癌细胞凋亡,同时有报道在乳腺癌上皮细胞中,激活 MAPK 通路可降低 Bim 的表达来发挥抗失巢凋亡作用^[14]。同样的结果在肺癌和黑色素瘤中也得到了证实^[14]。所以笔者推测 SIAH1 也可能与 Bim 参与的乳腺癌细胞失巢凋亡有关。在本研究中,笔者观察到与未处理组和转染对照质粒组相比,转染 SIAH1 表达质粒后,不仅在贴壁生长状态下乳腺癌细胞的自发凋亡率增加,在悬浮生长状态下乳腺癌细胞的失巢凋亡率增加更明显,表明过表达 SIAH1 不仅可诱导乳腺癌细胞的自发凋亡,同时对失巢凋亡影响更大。另外我们研究发现,过表达 SIAH1 在悬浮状态时 Bim 的表达明显高于贴壁生长时。提示 SIAH1 可能通过影响 Bim 的表达来诱导乳腺癌细胞失巢凋亡。进一步的笔者发现,与单独转染 pcDNA3 - myc - SIAH1 相

比,共转染 pcDNA3 - myc - SIAH1 与 Bim siRNA 后细胞失巢凋亡率明显降低,证明 SIAH1 可以通过上调 Bim 表达来诱导乳腺癌细胞失巢凋亡。至于过表达 SIAH1 上调 Bim 的表达来诱导乳腺癌细胞失巢凋亡,是否可能与 JNK 通路的激活有关,具体的机制将在后续研究中继续深入探讨。

参考文献

- 1 Carthew RW, Rubin GM. Seven in absentia, a gene required for specification of R7 cell fate in the Drosophila eye[J]. Cell, 1990, 63 (3): 561 - 577
- 2 Della NG, Senior PV, Bowtell DD. Isolation and characterization of murine homologues of the Drosophila seven in absentia gene (sina)[J]. Development, 1993, 117(4): 1333 - 1343
- 3 Li P, Nijhawan D, Wang X. Mitochondrial activation of apoptosis[J]. Cell, 2004, 116 (suppl2): 57 - 59
- 4 Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell - matrix interactions induces apoptosis[J]. J Cell Biol, 1994, 124(4): 619 - 626
- 5 Frisch SM, Sereaton RA. Anoikis mechanisms[J]. Curr Opin Cell

- Biol, 2001, 13(5): 555 – 562
- 6 Jennings S, Pham T, Ireland, SK, *et al.* Bit1 in anoikis resistance and tumor metastasis[J]. Cancer Lett, 2013, 333(2): 147 – 151
- 7 Whelan KA, Caldwell SA, Shahriari KS, *et al.* Hypoxia suppression of Bim and Bmf blocks anoikis and luminal clearing during mammary morphogenesis[J]. Mol Biol Cell, 2010, 21(22): 3829 – 3837
- 8 Akaogi K, Ono W, Hayashi Y, *et al.* MYBBP1A suppresses breast cancer tumorigenesis by enhancing the p53 dependent anoikis[J]. BMC Cancer, 2013, 13: 65
- 9 Toricelli M, Melo FH, Peres GB, *et al.* Timp1 interacts with beta – 1 integrin and CD63 along melanoma genesis and confers anoikis resistance by activating PI3 – K signaling pathway independently of Akt phosphorylation[J]. Mol Cancer, 2013, 12(1): 22
- 10 Tanaka AR, Noguchi K, Fukazawa H, *et al.* p38MAPK and Rho – dependent kinase are involved in anoikis induced by anicequol or 25 – hydroxycholesterol in DLD – 1 colon cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 430(4): 1240 – 1245
- 11 Ferraro A, Mourtzoukou D, Kosmidou V, *et al.* EZH2 is regulated by ERK/AKT and targets integrin alpha2 gene to control epithelial – mesenchymal transition and anoikis in colon cancer cells[J]. J Biochem Cell Biol, 2013, 45(2): 243 – 254
- 12 Wen YY, Yang ZQ, Song M, *et al.* SIAH1 Induced Apoptosis by activation of JNK pathway and inhibited invasion by inactivation of ERK pathway in breast cancer Cells[J]. Cancer Science, 2010, 101(1): 73 – 79
- 13 Wen YY, Yang ZQ, Song M, *et al.* The expression of SIAH1 is down – regulated and associated with bim and apoptosis in human breast cancer tissues and cells[J]. Molecular Carcinogenesis, 2010, 49(5): 440 – 449
- 14 Li Z, Zhao J, Du Y, *et al.* Down – regulation of 14 – 3 – 3 suppresses anchorage – independent growth of lung cancer cells through anoikis activation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(1): 162 – 167

(收稿日期: 2013 – 04 – 11)

(修回日期: 2013 – 05 – 02)

广东铁皮石斛 GAP 基地的石斛鲜品茎和叶中多糖的含量比较研究

鲁芹飞 王培培 陈建南 黄 松

摘 要 **目的** 通过对不同产地铁皮石斛引种到广东饶平铁皮石斛 GAP 种植基地的铁皮石斛药材鲜品茎和叶中的多糖含量比较研究,探讨环境因素对石斛多糖的影响。**方法** 以多糖含量为指标,应用苯酚 – 浓硫酸比色法测定不同产地的铁皮石斛鲜品茎和叶中的多糖含量。**结果** 不同原产地的铁皮石斛茎和叶中的多糖含量均有一定差异,其中鲜品的茎以云南 – 5(T8)样品的多糖含量最高,达到了 5.59%,广东河源的样品的多糖含量最低,仅为 1.22%;鲜品的叶以云南 – 4(T7)样品的多糖含量最高,达到了 1.90%,福建武夷山的样品的多糖含量最低,为 0.95%;多数品种的鲜品茎中的多糖含量高于叶中的多糖含量。**结论** 原产地的生长环境对铁皮石斛多糖的积累可能有一定影响。

关键词 铁皮石斛 鲜品 多糖 含量测定 苯酚 – 浓硫酸法

Comparative Study on Polysaccharides Content in Stem and Leaf of Iron Stone Dendrobium Fresh Product from different producing place.

Lu Qinfei, Wang Peipei, Chen Jiannan, Huang Song. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong 510006, China

Abstract Objective To establish a method for the determination of polysaccharide content in the stems and leaves of Iron stone dendrobium Fresh Product from different producing place, and to explore the influence of environment on the polysaccharide constituents in the stems and leaves. **Methods** Phenol – sulfuric acid method was applied for the determination of polysaccharide in the stems and leaves of Iron stone dendrobium Fresh Product. **Results** Polysaccharides content in stem and leaf of Iron stone dendrobium Fresh Product from different producing place was different. Polysaccharides content in stems of Yunnan – 5(T8) sample was the highest(5.59%), while it was the lowest in Guangdong Heyuan districts sample(1.22%). Polysaccharides content in leaves of Yunnan – 4(T7) sample was the highest(1.90%), while it was the lowest in Fujian Wuyishan districts sample(0.95%). It's common that polysaccharides content in fresh stems was higher than it in leaves. **Conclusion** Different growing environment of Iron stone dendrobium could probably influence the Pol-

基金项目: 广东省科技计划项目(2011A030100011); 广东省科技教育部产学研结合项目(2010B090400474); 广东省科技计划项目(2008A0301009)

作者单位: 510006 广州中医药大学(鲁芹飞、王培培、陈建南、黄松); 广州中医药大学中医药数理工程研究院(陈建南、黄松)

通讯作者: 黄松, 博士, 副教授, 硕士生导师, 电子信箱: hsl318@yahoo.com.cn