

综上所述,丙泊酚序贯右美托咪定可有效地治疗苏醒期躁动,有缩短 EA 治疗时间及 PACU 停留时间,减少额外镇静药物用量的优势,更适于麻醉苏醒期 EA 的治疗。右美托咪定治疗成人 EA 的最佳剂量,有待于进一步研究。

#### 参考文献

- 1 Frederick HJ, Wofford K, de Lisle Dear G, *et al.* A randomized controlled trial to determine the effect of depth of anesthesia on emergence agitation in children[J]. *Anesth Analg*, 2016, 122(4): 1141 - 1146
- 2 Peng W, Zhang T. Dexmedetomidine decreases the emergence agitation in infant patients undergoing cleft palate repair surgery after general anesthesia [J]. *BMC Anesthesiol*, 2015, 13(15): 145 - 152
- 3 Polat R, Peker K, Baran I, *et al.* Comparison between dexmedetomidine and remifentanyl infusion in emergence agitation during recovery after nasal surgery[J]. *Anaesthesist*, 2015, 64(10): 740 - 746
- 4 Boku A, Hanamoto H, Oyamaguchi A, *et al.* Effectiveness of dexmedetomidine for emergence agitation in infants undergoing palatoplasty: a randomized controlled trial[J]. *Braz J Anesthesiol*, 2016, 66(1): 37 - 43

- 5 Jiang S, Liu J, Li M, *et al.* The efficacy of propofol on emergence agitation - a meta - analysis of randomized controlled trials[J]. *Acta Anaesthesiol Scand.*, 2015, 59(10): 1232 - 1245
- 6 Munk L, Andersen G, Møller AM, *et al.* Post - anaesthetic emergence delirium in adults: incidence, predictors and consequences [J]. *Acta Anaesthesiol Scandinavica*, 2016, doi: 10.1111/aas.12717
- 7 Yu D, Chai W, Sun X, *et al.* Emergence agitation in adults: risk factors in 2,000 patients[J]. *Can J Anaesth*, 2010, 57(9): 843 - 848
- 8 Keating GM. Dexmedetomidine: a review of its use for sedation in the intensive care setting[J]. *Drugs*, 2015, 75(10): 1119 - 1130
- 9 Bokua AJ, Hanamoto HS, Oyamaguchia AK, *et al.* Effectiveness of dexmedetomidine for emergence agitation in infants undergoing palatoplasty: a randomized controlled trial[J]. *Rev Bras Anesthesiol*, 2016, 66(1): 37 - 43
- 10 Kim HC, Lee YH, Jeon YT, *et al.* The effect of intraoperative dexmedetomidine on postoperative catheter - related bladder discomfort in patients undergoing transurethral bladder tumour resection: A double - blind randomised study[J]. *Eur J Anaesthesiol*, 2015, 32(9): 596 - 601

(收稿日期:2016 - 06 - 20)

(修回日期:2016 - 06 - 23)

## 提高精脒/精胺 N<sup>1</sup> 乙酰基转移酶表达水平 对前列腺癌细胞活性的影响

杨 波 温晓飞 刘 辉 刘 峰 王伟峰 郝继东 万建省 邓晓俊 廖国强

**摘 要** **目的** 研究提高前列腺癌细胞(PC3)中精脒/精胺 N<sup>1</sup> 乙酰基转移酶(spermidine/spermine N<sup>1</sup> acetyltransferase, SSAT)表达水平对细胞增殖及侵袭和转移的影响。**方法** 腺病毒载体 Ad - SSAT 感染 PC3 细胞, Western blot 法检测细胞中 SSAT 的表达水平, CCK - 8 法和克隆形成法检测细胞的增殖能力和克隆形成能力, 划痕修复实验和 Transwell 跨膜实验检测细胞的转移能力。**结果** Ad - SSAT 组细胞的 SSAT 水平显著高于对照组( $P < 0.05$ ); 培养 48h 后, Ad - SSAT 组细胞的增殖能力较对照组和 Ad - GFP 组有所降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。克隆形成实验显示, Ad - SSAT 组的克隆形成率(14.3%)显著低于对照组(39.7%)和 Ad - GFP 组的(40.2%)。划痕修复实验显示对照组和 Ad - GFP 组的迁移率没有明显差异, 而 Ad - SSAT 组迁移速度较慢, 在两个时间点均显著低于对照组, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。Transwell 跨膜实验, 可见对照组与 Ad - GFP 组跨膜细胞数差异无统计学意义( $P < 0.05$ ); Ad - SSAT 组跨膜细胞明显低于对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 提高前列腺癌细胞中 SSAT 表达能抑制细胞生长, 降低细胞的迁移能力。

**关键词** 精脒/精胺 N<sup>1</sup> 乙酰基转移酶 前列腺癌细胞 转移

**中图分类号** R6 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.02.017

**Influence of Elevated SSAT Level on the Activity of Prostate Cancer Cell PC3.** Yang Bo, Wen Xiaofei, Liu Hui, *et al.* Department of Urology, Zhoupu Hospital Affiliated to Shanghai Health Medical College, Shanghai 201318, China

基金项目:上海市卫生和计划生育委员会科研课题(20134428);上海市浦东新区卫生系统优秀学科带头人培养计划(PWRd2011 - 08);吴阶平医学基金资助项目(320.6750.14197)

作者单位:201318 上海健康医学院附属周浦医院泌尿外科(杨波、刘辉、刘峰、王伟峰、郝继东、万建省、邓晓俊、廖国强);201318 上海,同济大学附属东方医院泌尿外科(温晓飞)

通讯作者:杨波,副主任医师,副教授,电子信箱:ybpersonal@126.com

**Abstract Objective** To explore the influence of elevated spermidine/spermine  $N^1$  acetyltransferase(SSAT)level on the activity of prostate cancer cell PC3. **Methods** PC3 was infected with adenovirus vector Ad - SSAT, and the level of SSAT was determined by western blot. CCK - 8 and clone formation assay were used to test the proliferation and clone formation rate. Wound healing assay and transwell migration assay were applied to analyze the metastasis ability of the cell. **Results** The level of SSAT was elevated obviously compared with control group( $P < 0.05$ ). After cultured for 48h, the proliferation rate of cell in Ad - SSAT group was declined compared with the Ad - SSAT group and control group( $P < 0.05$ ). The clone formation assay showed that the clone formation rate(14.3%) was much lower than in the Ad - GFP and control group(39.7% and 40.2% respectively). The wound healing assay revealed that there was no difference between the wound healing rate in the control group and Ad - GFP group( $P > 0.05$ ), and it was much lower in the Ad - SSAT group after 6 and 12h, the difference was statistically significant( $P < 0.05$ ). The transwell migration assay revealed that the metastasis ability was statistically declined compared with the Ad - GFP and the control group( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Elevated the expression level of SSAT in PC3 can inhibit the proliferation, metastasis ability.

**Key words** Spermidine/spermine  $N^1$  acetyltransferase; Prostate cancer cell; Metastasis

正常生理状况下,人体组织中多胺含量极少,而当组织发生癌变,患者体液和肿瘤组织中的腐胺和精胺含量都有不同程度的升高<sup>[1,2]</sup>。通过对多胺代谢与肿瘤的发生相关机制进行研究,发现多胺的积累可促进肿瘤的增生及转移<sup>[3,4]</sup>。精脒/精胺  $N^1$  - 乙酰基转移酶(spermidine/spermine  $N^1$  - acetyltransferase, SSAT)是多胺分解代谢中的限速酶,可根据细胞的需要保持细胞内多胺的平衡<sup>[5,6]</sup>。Huang 等<sup>[7]</sup>研究发现,前列腺癌组织中 SSAT 较正常组织有所提高,且晚期患者组织中的 SSAT 表达水平较早期患者组织中高,这也说明 SSAT 对肿瘤的发生和发展有重要影响。本研究中笔者假设提高前列腺癌细胞中 SSAT 的含量可降低组织中多胺的含量,可能会对细胞的活性及侵袭转移能力产生影响。本研究中选用人前列腺癌细胞 PC3 细胞株,通过腺病毒载体提高细胞中 SSAT 的表达,研究其对细胞增殖、转移及侵袭的影响。

## 材料及方法

1. 材料及试剂:人前列腺癌细胞 PC3 细胞株(中科院上海细胞生物学研究所细胞库),RPMI 1640 培养基、胰酶购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自美国 Hyclone 公司,细胞活力检测试剂盒(cell counting kit - 8, CCK - 8)购于上海和元生物,病毒载体 Ad - SSAT 和 Ad - GFP 由汉恒生物构建,结晶紫购自上海崇明化学试剂厂,抗人精脒 - 精胺  $N^1$  - 乙酰基转移酶抗体购自润裕生物。

2. 细胞培养和转染:PC3 细胞,用含 10% 胎牛血清购自美国 Gibco 公司, Cate: C2027050)、1% 双抗(100U/ml 青霉素、100 $\mu$ g/ml 链霉素购自美国 Invitrogen 公司, Cate: 15140 - 148)的 RPMI 1640 培养基培养于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中,收集对数生长期的

细胞用 Ad - SSAT 感染,48h 后检测细胞活力。加入蛋白裂解液裂解细胞,用 BCA 试剂提取总蛋白,行 SDS - PAGE 蛋白电泳,转膜后用封闭液封闭,按照 1:400 加入一抗,4℃ 孵育过夜后, PBS 冲洗,加入二抗(1:500),常温孵育 1h,加入化学发光试剂盒的 A、B 液,曝光显影。用图片处理软件 Scion Image 分析计算灰度值。

3. 细胞增殖活力检测:取对数生长期 PC3 细胞,以  $2 \times 10^4$ /ml 接种于 96 孔板中,每孔 100 $\mu$ l。培养 24h 后,根据 Lipofectamine 2000 说明书,转染 SSAT siRNA,4~6h 后更换含 10% 胎牛血清培养基,分别于 24、36、48、72h 节点进行增殖活力检测(5 个复孔)。终止培养前每孔加入 10 $\mu$ l 的 CCK - 8 溶液继续培养,同时设空白对照组(加 10 $\mu$ l 培养基),3h 后酶标仪检测(A490nm),计算细胞增殖活力。

4. 克隆形成实验:取对数生长期细胞,实验组转染 24h 后消化,按照每孔  $10^3$  个的密度接种于 6 孔板,每组 3 个复孔,接种 10 天后,用 Gimesa 染色,计数阳性克隆数。

5. 细胞迁移实验:克隆形成率(%) = 克隆形成数量/接种细胞数  $\times 100\%$ 。将细胞接种于 24 孔板中,培养至细胞达到 80% 融合后,弃去培养基,用 200 $\mu$ l 移液器枪头制造细胞划痕, PBS 清洗 2 次后拍照;加入无血清培养基培养 6h 和 12h 后,拍照,计算迁移距离,细胞迁移率 = (开始划痕时面积 - 6 或 12h 时面积)/开始划痕时面积  $\times 100\%$ 。细胞达到 60% 融合后弃去培养基, PBS 洗 3 次后加入无血清培养基继续培养 24h,消化细胞后稀释成  $1 \times 10^5$  个/毫升。24 孔板下室就含有 20% FBS 的培养液 800 $\mu$ l,放入 Transwell 小室后小室内加入 200 $\mu$ l 细胞悬液。将 24 孔板放入细胞培养箱培养 24h,取出小室, PBS 冲洗

干净后用棉签擦去小室上层细胞。多聚甲醛固定 20min, 苏木素染色 5min 后蒸馏水冲洗干净。倒置显微镜下观察计数, 细胞迁移率 (%) = (对照组迁移细胞数 - 实验组迁移细胞数) / 对照组迁移细胞数 × 100%。

6. 统计学方法: 数据使用 SPSS 13.0 处理, 细胞增殖率采用  $t$  检验, 划痕修复率及跨膜率采用  $\chi^2$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 感染 Ad-SSAT 后 SSAT 的表达水平: 由图 1 可知, 对照组和 Ad-GFP 组 SSAT 的表达水平无显著变化, 感染 Ad-SSAT 后, 细胞中 SSAT 的表达水平显著提高。

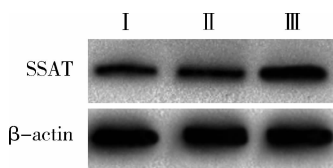


图 1 细胞中 SSAT 的表达水平

I. 对照组; II. Ad-GFP 组; III. Ad-SSAT

2. Ad-SSAT 对细胞增殖的影响: CCK-8 法检测细胞的增殖活性, 与对照组比较, Ad-GFP 组的吸光度在各个时间点差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 从 48h 开始, Ad-SSAT 组显著低于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。

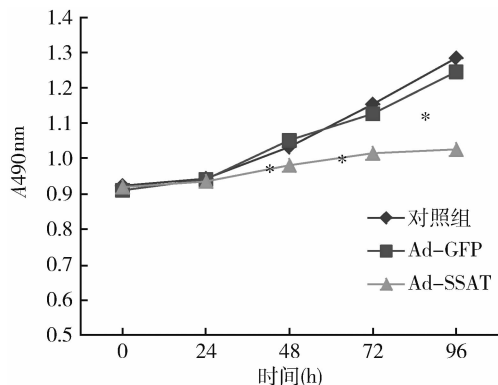


图 2 Ad-SSAT 对细胞增殖的影响

与对照组比较, \*  $P < 0.05$

3. 克隆形成实验: 通过克隆形成实验可知, Ad-GFP 组的克隆形成率为 39.7%, 与对照组的 40.2% 比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), Ad-SSAT 组的克隆形成率为 14.3%, 明显低于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。

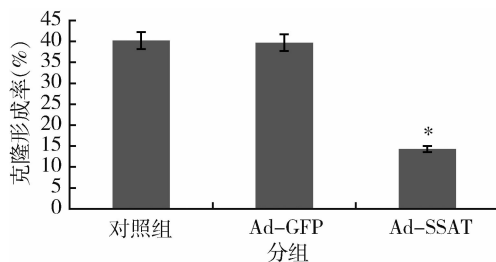


图 3 3 组细胞的克隆形成率

与对照组比较, \*  $P < 0.05$

4. 细胞迁移实验: 细胞划痕实验是一种简单易行检测细胞运动的方法, 可用来检测贴壁肿瘤的侵袭转移能力。通过对细胞制作划痕, 分别培养 6h 和 12h 后观察细胞迁移可见, 对照组和 Ad-GFP 组的迁移率没有明显差异, 而 Ad-SSAP 组迁移速度较慢, 在两个时间点均显著低于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 4、图 5。Transwell 跨膜实验诱导细胞从低营养培养液向高营养培养液迁徙, 可用来检测细胞的迁移能力。本研究通过 Transwell 跨膜实验, 可见对照组与 Ad-GFP 组跨膜细胞数差异无统计学意义 ( $P < 0.05$ ); Ad-SSAP 组跨膜细胞明显低于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 6、图 7。

## 讨 论

多胺作为一种低分子质量阳离子脂肪簇有机胺在细胞的 DNA 复制、转录、翻译、核酸包装、细胞凋亡等多项细胞生理及病理活动中起重要作用<sup>[8-10]</sup>。多项研究表明, 增殖旺盛的细胞中多胺的含量明显高于增殖缓慢或静止的细胞<sup>[11]</sup>。在胃癌、结肠癌等癌症组织中, 多胺的含量高于周围正常组织, 通过控制多胺的代谢来控制肿瘤的生长已经成为抗肿瘤的热点研究内容<sup>[12-14]</sup>。SSAT 是多胺分解途径中的限速酶, 通过将对精胺和精胺的 N<sup>1</sup> 位置进行乙酰化, 改变多胺与乙酰化高分子的结合能力<sup>[15]</sup>。通过提高 SSAT 的表达量及活性可以抑制多胺的生物合成或促进多胺的降解, 改变肿瘤组织多胺的含量, 从而达到抑制肿瘤细胞增殖的目的。

本研究通过使用腺病毒载体 Ad-SSAT 感染 PC3 细胞系, 构建出 SSAT 高表达的细胞株, 检测了该细胞相对正常 PC3 细胞的增殖能力及其侵袭和转移能力的变化。结果显示, Ad-SSAT 感染的 PC3 细胞能稳定高表达 SSAT, 而高表达的 SSAT 能抑制细胞生长, 克隆形成率降低。

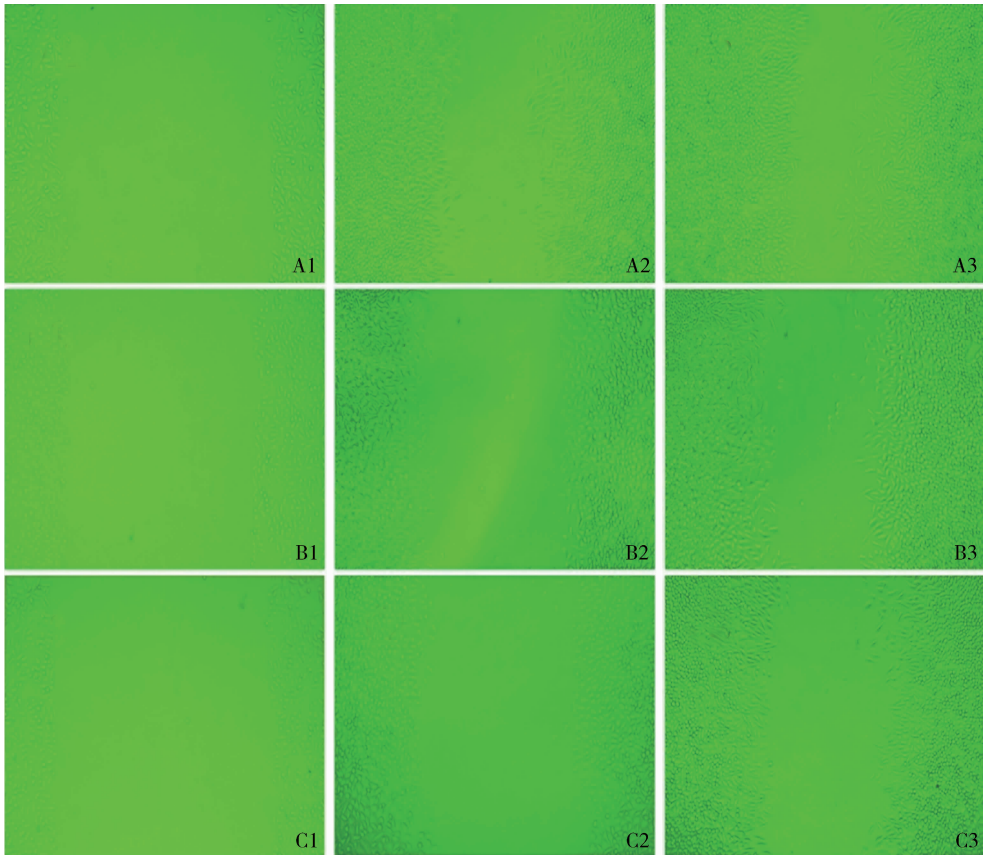


图 4 划痕修复实验

A1、A2、A3、B1、B2、B3 和 C1、C2、C3 分别为对照组、Ad - GFP 和 Ad - SSAT 在划痕后 0h、6h 和 12h 时的状态

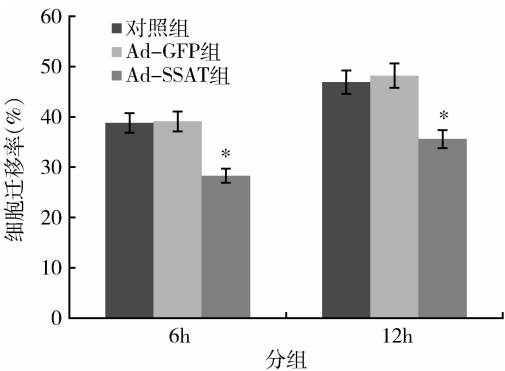


图 5 划痕修复实验总细胞迁移率  
与对照组比较, \*  $P < 0.05$

目前研究发现,恶性肿瘤患者体液中精胺和腐胺含量较正常人有不同程度升高,可作为肿瘤的诊断的一项指标<sup>[16]</sup>。多胺的代谢会影响细胞分化、生长,并促进正常细胞向恶性发展。同时,因其可促进核酸及蛋白质的合成,诱导血管再生,肿瘤组织中多胺水平高会导致肿瘤的进一步增生。癌症患者癌细胞的浸润和转移所造成的肿瘤组织转移和复发是患者死亡的首要原因。肿瘤的转移表现为肿瘤细胞离开原来的瘤灶组织,侵犯邻近组织器官,并继续生长繁殖。部分肿瘤细胞侵入淋巴管、血管和体腔,进而进入远隔部位,形成继发肿瘤<sup>[17]</sup>。本研究中调高 SSAT 在

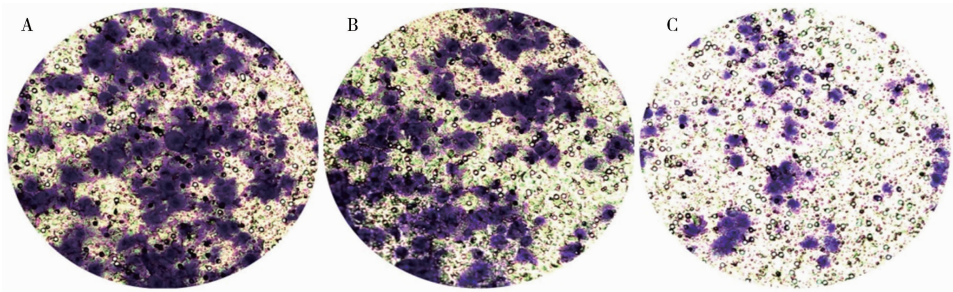


图 6 Transwell 跨膜实验

A. 对照组; B. Ad - GFP; C. Ad - SSAT 组

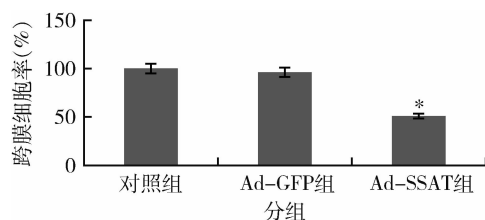


图7 3组细胞跨膜细胞率

与对照组比较, \*  $P < 0.05$ 

PC3 中的表达,可以提高细胞的增殖能力。同时,通过划痕修复实验和 Transwell 跨膜实验可知,SSAT 表达提高可以降低前列腺癌细胞 PC3 的转移能力。这和临床研究中肿瘤组织中多胺高表达患者预后差、病情进展快相一致。综上所述,提高前列腺癌细胞中 SSAT 表达能使细胞能抑制前列腺癌细胞生长,降低细胞的迁移能力。

## 参考文献

- Casero RA, Marton LJ. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases [J]. *Nat Rev Drug Disc*, 2007, 6(5): 373–390
- Zhu Q, Huang Y, Marton LJ, *et al.* Polyamine analogs modulate gene expression by inhibiting lysine-specific demethylase 1 (LSD1) and altering chromatin structure in human breast cancer cells [J]. *Amino Acids*, 2012, 42(2–3): 887–898
- Zhang Y, Peng G, Hsueh EC. Induction of autophagy and apoptosis with polyamine synthesis inhibition and metformin in human melanoma and colon cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(S19): 1418
- 王清, 王艳林, 曹春雨. 以多胺代谢为靶点的抗肿瘤研究进展 [J]. *中国肿瘤临床*, 2014, 41(9): 597–600
- 张军, 韩钰, 王艳林. 多胺调控细胞生长机制的研究进展 [J]. *生命科学*, 2014, 26(1): 85–90
- Çoker A, Arisan ED, Palavan-ünsal N. Silencing of the polyamine catabolic key enzyme SSAT prevents CDK inhibitor-induced apopto-

sis in Caco-2 colon cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5(4): 1037–1042

- Huang W, Eickhoff JC, Mehraein-Ghomi F, *et al.* Expression of spermidine/spermine N1-acetyl transferase (SSAT) in human prostate tissues is related to prostate cancer progression and metastasis [J]. *The Prostate*, 2015, 75[11]: 1150–1159
- 李海涛, 周华军, 田书梅, 等. 多胺参与细胞程序性死亡调控的研究进展 [J]. *生命科学研究*, 2015, 19(3): 242–245
- Jang SJ, Wi SJ, Choi YJ, *et al.* Increased polyamine biosynthesis enhances stress tolerance by preventing the accumulation of reactive oxygen species: T-DNA mutational analysis of *Oryza sativa* lysine decarboxylase-like protein 1 [J]. *Mol Cells*, 2012, 34(3): 251–262
- Karouzakis E, Gay RE, Gay S, *et al.* Increased recycling of polyamines is associated with global DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. *Arth Rheum*, 2012, 64(6): 1809–1817
- Zwighaft Z, Aviram R, Shalev M, *et al.* Circadian clock control by polyamine levels through a mechanism that declines with age [J]. *Cell Metab*, 2015, 22(5): 874–885
- König SG, Öz S, Krämer R. A polyamine-modified near-infrared fluorescent probe for selective staining of live cancer cells [J]. *Chem Commun*, 2015, 51(34): 7360–7363
- Tomasi ML, Ryoo M, Skay A, *et al.* Polyamine and methionine adenosyltransferase 2A crosstalk in human colon and liver cancer [J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(12): 1902–1911
- 赵璐, 张莹石, 刘然, 等. 多胺在恶性肿瘤诊断及疗效观察中的应用 [J]. *实用药物与临床*, 2015, 18(1): 97–99
- Schwarz RE, Abdalla EK, Aloia TA, *et al.* AHPBA/SSO/SSAT sponsored consensus conference on the multidisciplinary treatment of colorectal cancer metastases [J]. *HPB: the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*, 2013, 15(2): 89
- Pirnes-Karhu S, Sironen R, Alhonen L, *et al.* Lipopolysaccharide-induced anti-inflammatory acute phase response is enhanced in spermidine/spermine N1-acetyltransferase (SSAT) overexpressing mice [J]. *Amino Acids*, 2012, 42(2–3): 473–484
- 吕阳, 许戈良. 肿瘤干细胞与肿瘤转移的关系 [J]. *中国普通外科杂志*, 2013, 22(3): 359–362

(收稿日期:2016–12–01)

(修回日期:2016–12–11)

(上接第13页)

- Zhang C, Wu H, Wang Y, *et al.* Expression patterns of circular RNAs from primary kinase transcripts in the mammary glands of lactating rats [J]. *J Breast Cancer*, 2015, 18(3): 235
- Wang X, Zhang Y, Huang L, *et al.* Decreased expression of hsa\_circ\_001988 in colorectal cancer and its clinical significances [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(12): 16020–16025
- Li P, Chen S, Chen H, *et al.* Using circular RNA as a novel type of biomarker in the screening of gastric cancer [J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 444: 132–136
- Qu S, Song W, Yang X, *et al.* Microarray expression profile of circular RNAs in human pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Genomics Data*, 2015, 5: 385–387
- Song X, Zhang N, Han P, *et al.* Circular RNA profile in gliomas revealed by identification tool UROBORUS [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(9): e87
- Qin M, Liu G, Huo X, *et al.* Hsa\_circ\_0001649: A circular RNA and potential novel biomarker for hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Biomark*, 2016, 16(1): 161–169

- Guarnerio J, Bezzi M, Jeong JC, *et al.* Oncogenic role of fusion-circRNAs derived from cancer-associated chromosomal translocations [J]. *Cell*, 2016, 165(2): 289–302
- Wang K, Long B, Liu F, *et al.* A circular RNA protects the heart from pathological hypertrophy and heart failure by targeting miR-223 [J]. *Eur Heart J*, 2016, Epub ahead of print
- Li B, Li R, Zhang C, *et al.* MicroRNA-7a/b protects against cardiac myocyte injury in ischemia/reperfusion by targeting poly(ADP-Ribose) polymerase [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e90096
- Geng H, Li R, Su Y, *et al.* The Circular RNA Cdr1as promotes myocardial infarction by mediating the regulation of miR-7a on its target genes expression [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e151753
- Zheng Q, Bao C, Guo W, *et al.* Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11215
- Lin S, Ye S, Long Y, *et al.* Circular RNA expression alterations are involved in OGD/R-induced neuron injury [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 471(1): 52–56

(收稿日期:2016–05–11)

(修回日期:2016–06–13)