# STIM1 基因在人下咽癌细胞系 FaDu 中的表达及对细胞凋亡的影响

武 帅,崔晓波,孙源昊,王 军,王博谦 (内蒙古医科大学附属医院耳鼻咽喉科,内蒙古 呼和浩特 010050)

[摘 要] **目的** 探索 STIM1 基因在人下咽癌细胞系 FaDu 中的表达情况及其表达沉默后对细胞凋亡的影响。**方法** 培养人下咽癌 FaDu 细胞,根据不同慢病毒感染分 2 组。STIM1-siRNA 组为经 STIM1-siRNA 慢病毒感染的下咽癌细胞;对照组为经阴性对照慢病毒感染的下咽癌细胞。Real-Time PCR 法检测 STIM1 在人下咽癌 FaDu 细胞中的表达以及 siRNA 慢病毒感染后 STIM1 mRNA 水平的表达;Western blot 检测 siRNA 慢病毒感染后 STIM1 在蛋白水平的表达;流式细胞仪检测 STIM1 基因沉默后的人下咽癌 FaDu 细胞的凋亡情况。采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计学分析。**结果** 以 GAPDH 为内参(Ct = 12.08 ± 0.05),STIM1 在下咽癌细胞系 FaDu 中表达显著(Ct = 22.21 ± 0.05,$P < 0.01$);Real-time PCR 结果显示对照组和 STIM1-siRNA 组人下咽癌 FaDu 细胞的表达值分别为(1.00 ± 0.08)和(0.12 ± 0.01),2 组差异具有统计学意义($P < 0.01$);Western blot 的结果显示,STIM1-siRNA 组 FaDu 细胞中 STIM1 蛋白明显受抑制,与 Real-time PCR 结果一致,慢病毒感染成功;流式细胞仪检测结果显示对照组凋亡率为(4.36 ± 1.32)%;实验组凋亡率为(9.81 ± 0.56)%,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** STIM1 基因与人下咽癌 FaDu 细胞凋亡显著相关,人下咽癌 FaDu 细胞中,STIM1 可能抑制凋亡,可能成为下咽癌诊治的全新切入点。

[关键词] STIM1;下咽癌;FaDu 细胞;siRNA;慢病毒感染;凋亡

[中图分类号] R739.65 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2016)03-0167-04

## Expression of STIM1 gene in human hypopharyngeal carcinoma cell line FaDu and its effect on FaDu cell apoptosis

WU Shuai, CUI Xiao-bo, SUN Yuan-hao, WANG Jun, WANG Bo-qian (Department of Otolaryngology, Inner Mongolia Medical University Affiliated Hospital, Hohhot Inner Mongolia 010050, China)

**Abstract: Objective** To study the expression of STIM1 gene in human hypopharyngeal carcinoma cell line FaDu and its effect on FaDu cell apoptosis. **Methods** Lentivirus infection was used to knock STIM1 down in FaDu cells. Group STIM1-siRNA: the expression of STIM1 in FaDu cell was inhibited by STIM1-siRNA lentivirus. Group control: FaDu cells were infected by negative control siRNA lentivirus. Real-Time PCR was applied to identify the efficacy of lenticirus infection and the expression of STIM1 in FaDu cells. Western blot was used to identify the expression of STIM1 protein after lenticirus infection. Flow cytometry assay was performed to detect the apoptosis of FaDu cells in the two groups. The data were statistically analyzed with SPSS 17.0 software. **Results** Compared with GAPDH (Ct = 12.08 ± 0.05), the expression of STIM1 in FaDu cells was significant expressed (Ct = 22.21 ± 0.05, $P < 0.001$). Real-Time PCR analysis the relative mRNA expression of STIM1 in FaDu cells of control group and STIM1-siRNA group were (1.00 ± 0.08) and (0.12 ± 0.01) respectively ($P < 0.001$). Western blot showed that the expression of STIM1 gene and protein in FaDu cells were inhibited significantly after STIM1-siRNA lentiviral infection, which was in accordance with the results of Real-Time PCR analysis. Flow cytometry assay showed that the siRNA-mRNA group had a higher apoptosis percentage (9.81 ± 0.56)% compared to the control group (4.36 ± 1.32)%, with statistically significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion** STIM1 gene correlated significantly with FaDu cell apoptosis. It inhibits apoptosis of FaDu cells, and it may be a potential diagnostic and therapeutic target for the hypopharyngeal carcinoma.

**Keywords:** STIM1; hypopharyngeal carcinoma; FaDu cell; siRNA; lentivirus infection; apoptosis

钙离子通路与癌症的关系十分密切,抑制钙离子流可以促使癌症细胞的生长停滞或诱导细胞死亡[1]。而调控细胞质内钙离子浓度的过程被称为钙库操纵性钙离子输入(store-operated calcium entry, SOCE)[2]。作为钙库操纵性钙离子输入过程的关键组分之一的基质相互作用蛋白 1(stromal interaction molecule 1, STIM1),对于调控癌症细胞的生存与生长起到重要作用[3]。多项研究表明,STIM1 是一个致癌基因,在很多癌症中高表达,如乳腺癌、宫颈癌等[3-4]。但迄今 STIM1 在下咽癌中的表达情况及其生物学功能尚未见文献报道。本次实验,我们利用 Real-time PCR 检测下咽癌细胞系 FaDu 中 STIM1 基因的表达,并利用慢病毒感染沉默 FaDu 细胞中的 STIM1 基因,观察 FaDu 细胞凋亡情况,并探讨其机制。

doi:10.11659/jjssx.09E015125

[基金项目] 内蒙古自治区自然科学基金(2014MS0856);内蒙古医科大学科技百万工程项目(KJbw2013014)

[通信作者] 崔晓波,E-mail: nmcxb@sina.com.cn

[收稿日期] 2015-09-28 [修回日期] 2015-11-05

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

人下咽癌 FaDu 细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。DMEM 细胞培养基购自 Invitrogen 公司;胎牛血清购自 GIBCO 公司;Trizol 细胞总 RNA 提取试剂盒购自 Invitrogen 公司;PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司;Annexin V、碘化丙啶(PI)购自 BD Biosciences 公司;慢病毒由上海吉凯基因公司制备;兔抗人 STIM1 抗体购自北京中杉金桥公司。

### 1.2 方法

1.2.1 STIM1 基因 RNA 干扰慢病毒载体制备 首先合成含干扰序列的单链 DNA oligo,然后退火配对产生双链 DNA oligo,再通过其两端所含酶切位点直接连入酶切后的 RNA 干扰慢病毒载体上;将连接产物转入制备好的细菌感受态细胞,对长出的单克隆菌落先进行 PCR 鉴定,PCR 鉴定阳性菌落进行测序鉴定,比对正确的克隆即为构建成功的目的基因 RNA 干扰慢病毒载体。

1.2.2 STIM1 基因 RNAi 慢病毒包装及梯度检测 制备编码慢病毒颗粒的重组病毒质粒及其 2 种辅助包装原件载体质粒,3 种质粒载体分别进行高纯度无内毒素抽提,按 Invitrogen 公司 Lipofectamine 2000 使用说明进行共感染 293T 细胞,感染后 8 h 更换为完全培养基,培养 48 h 后,收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液,对其浓缩后得到高滴度的慢病毒浓缩液,在 293T 细胞中测定并标定病毒滴度。

1.2.3 细胞培养 从液氮中取出人下咽癌 FaDu 细胞后,迅速解冻,离心去上层清液。置于含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 DMEM 培养基中,于 37 ℃、5% $CO_2$ 的细胞培养箱中进行培养,每 2 日换液 1 次。

1.2.4 FaDu 细胞慢病毒感染 处于对数生长期的目的细胞进行胰酶消化,制成细胞悬液。将细胞悬液(细胞数约为 $5\times10^4$/mL)接种于 6 孔板中,37 ℃、5% $CO_2$ 培养箱培养待细胞融合度达到约 30%。根据细胞 MOI 值,加入适宜量的病毒。12 h 后观察细胞状态:如果没有明显的细胞毒性作用,继续培养 24 h 后更换培养基;如果有明显的细胞毒性作用,立即更换培养基。感染 3 d 后观察慢病毒上报告基因 GFP 的表达情况,荧光率大于 80% 者,将细胞分成两份,一份分于 12 孔培养板中待长满后收集细胞用于 RNA 提取,另一份分于 6 孔板中待长满后收集细胞用于蛋白提取;感染效率低于 80% 的实验组,重新进行感染实验。

1.2.5 实时定量聚合酶链反应分析 培养生长状态良好的 FaDu 细胞,采用实时定量聚合酶链反应(Real-Time PCR)的方法检测 STIM1 基因在 FaDu 中的表达情况。病毒感染前 1 d 将目的细胞分入 6 孔板培养,感染当天按实验设计的组别加入 RNAi 慢病毒颗粒进行目的细胞的感染实验。感染 3 d 后荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达情况,感染 5 d 后收集细胞,采用 Real-Time PCR 的方法检测 STIM1 基因的表达情况,进而判断靶点的干扰效果。根据 Invitrogen 公司的 Trizol 操作说明书进行总 RNA 抽提。根据 Promega 公司的 M-MLV 操作说明书进行 RNA 逆转录获得 cDNA。STIM1 基因引物序列上游引物:5'-GCCTATATCCAGAACCGTTACTC-3';下游引物:5'-TGCTCCAACTCCTCCTCAG-3';GAPDH 基因引物序列上游引物:5'-TGCTCCAACTCCTCCTCAG-3';下游引物:5'-CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA-3';预变性 95 ℃,15 s;之后每一步变性 95 ℃,5 s;退火延伸 60 ℃,30 s;共进行 45 个循环。每次在延伸阶段读取吸光值。制作溶解曲线。分析 STIM1 基因在慢病毒感染后,其 mRNA 水平的表达情况。以及 STIM1 基因在正常喉细胞和 FaDu 细胞中的表达。

1.2.6 Western blot 利用细胞裂解液提取实验组和对照组细胞的总蛋白,加热变性后 10% SDS-PAGE 电泳分离,电转移至 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 Tris 盐溶液封闭 2 h,加入 STIM1 一抗(1∶200),4 ℃孵育过夜。用含吐温 -20 的 Tris 盐溶液洗膜(3 次,每次 10 min)后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶2 000),室温下孵育 1 h。化学发光法(ECL)检测条带。GAPDH 作为内参。最后,利用 ImageJ 软件进行蛋白表达条带的灰度值分析,并与内参灰度比较后计算灰度百分比。

1.2.7 细胞凋亡检测 感染 5 d 后,分别将指数生长的阴性对照慢病毒感染的 FaDu 细胞(对照组)和经 STIM1 基因 RNAi 有效靶点慢病毒感染的 FaDu 细胞(实验组)接种于 2 个 6 孔细胞培养板中,每孔接种 $1\times10^3$ 个细胞于 2 mL DMEM 培养基中,于 37 ℃、5% $CO_2$ 的细胞培养箱中培养,待细胞汇合度达 85% 时(48 h)进行检测。收集细胞于 5 mL 离心管中,预冷 PBS 洗涤细胞 3 次,分别收集 $3\times10^5$ 个细胞制成 0.5 mL悬液,每组加入 5 μl Annexin V 与碘化丙啶(PI)的混合液,暗室中静置15 min。转移至流式上机管中,上机检测凋亡率。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计学分析，数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，统计方法采用独立样本 $t$ 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义，$P<0.01$ 为差异具有极显著性统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 FaDu 细胞中 STIM1 的表达情况

利用 Real-Time PCR 并以 GAPDH 为内参检测 STIM1 基因在人下咽癌细胞系 FaDu 中的 mRNA 水平表达情况。Real-Time PCR 的 Ct 数值结果显示 GAPDH 的表达量为（12.08 ± 0.05）；STIM1 的表达量为（22.21 ± 0.05），利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算后，STIM1 在 FaDu 中的表达量为（1 ± 0.01），该结果提示 STIM1 基因在 FaDu 细胞中显著表达。

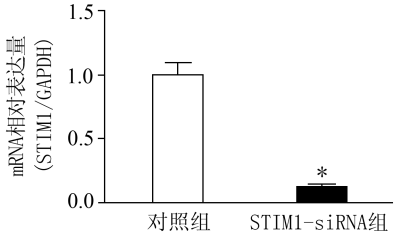
### 2.2 FaDu 细胞慢病毒感染检测结果

Real-Time PCR 的数值经 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析法计算后得出，对照组的数值为（1.0 ± 0.08）；STIM1-siRNA 组的数值为（0.12 ± 0.01）；经 STIM1-siRNA 慢病毒感染后，STIM1-siRNA 组 FaDu 细胞中 STIM1 基因 mRNA 的表达量受到明显抑制（$P<0.01$），见图 1。

利用 Western blot 检测 STIM1-siRNA 慢病毒感染后 STIM1 蛋白的表达情况，结果显示 STIM1-siRNA 组 FaDu 细胞中 STIM1 蛋白的表达（0.57 ± 0.02）与对照组（0.10 ± 0.03）相比受到明显抑制（$P<0.01$），见图 2。这一结果与 Real-time PCR 的结果一致。

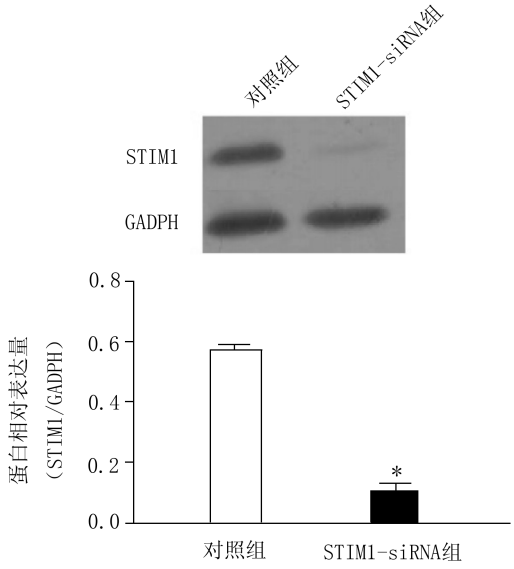
### 2.3 细胞凋亡实验结果

流式细胞仪检测 2 组细胞的凋亡情况，结果显示经 STIM1 基因 RNAi 有效靶点慢病毒感染的 FaDu 细胞组的凋亡率为（9.81 ± 0.56）%；阴性对照慢病毒感染的 FaDu 细胞组的凋亡率为（4.36 ± 1.32）%；siRNA 慢病毒感染后，实验组发生凋亡的 FaDu 细胞显著增加，提示 STIM1 基因与 FaDu 细胞的凋亡显著相关（$P<0.05$），见图 3。



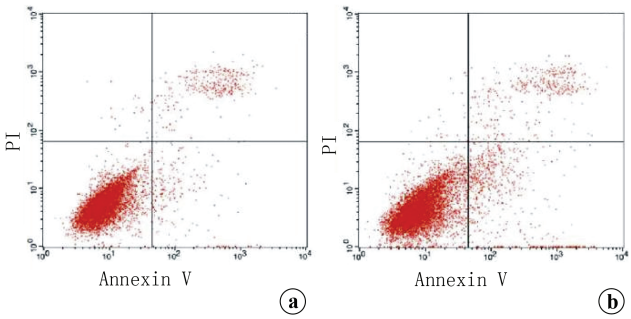

*：慢病毒感染后 Real-Time PCR 检测，与对照组比较，$P<0.01$

**图 1 各组 STIM1 的 mRNA 相对表达量**




*：与对照组比较，$P<0.001$

**图 2 各组 STIM1 的蛋白表达量**




a：对照组；b：STIM1-siRNA 组

**图 3 流式细胞仪检测中各组细胞的凋亡率**

## 3 讨论

本研究利用 Real-time PCR 发现人下咽癌细胞系 FaDu 中 STIM1 基因表达显著，并且利用慢病毒感染的方法成功沉默人下咽癌 FaDu 细胞系中的 STIM1 基因和蛋白，结果显示慢病毒感染后 FaDu 细胞的凋亡率增加。

细胞凋亡是由基因调控的细胞程序性死亡，是一个主动过程。肿瘤与凋亡的关系十分密切，肿瘤的发生被认为是由于凋亡受阻导致，肿瘤的凋亡机制受到抑制不能正常死亡，致使肿瘤细胞数量不断增加。而细胞凋亡的过程会受到多种因素影响，包括基因、淋巴因子、生长因子等。研究表明，调节凋亡的基因包括凋亡抑制基因（P35、BCL2、FLIPS 等）和 P53、Bax 等凋亡促进基因[5]。本次实验中当 STIM1 基因被沉默后，人下咽癌 FaDu 细胞的凋亡明显增加。由此可见，STIM1 基因可能抑制下咽癌细胞凋亡，促进下咽癌发生发展。

细胞质 $Ca^{2+}$ 浓度的动态平衡调节一些重要的信

号通路,而这些信号通路和很多调节细胞凋亡的生长因子、细胞因子相关[6]。研究表明,钙库操纵性钙离子输入(SOCE)是调节细胞内 $Ca^{2+}$ 浓度的关键环节而且与癌细胞的凋亡密切相关[2,7]。作为 SOCE 的重要组成部分,STIM1 是一个含 685 个氨基酸的跨膜蛋白,由氨基酸的内质网基质部分、跨膜区和细胞质部分组成。它同时起着内质网 $Ca^{2+}$ 感受器和 SOCE 激发器的双重作用[8]。STIM1 能够通过调节自身的结构和在胞质内的位置来控制 $Ca^{2+}$ 通道开放从而调节细胞内的 $Ca^{2+}$ 浓度。McConkey 等[9]发现,$Ca^{2+}$ 浓度的升高在凋亡早期就已发生,$Ca^{2+}$ 可能是主动调控凋亡起始的因素之一。此外,大部分对凋亡的刺激都能够刺激细胞 $Ca^{2+}$ 浓度的同步升高;而某些钙释放孔道被抑制后,凋亡也发生同步抑制[10]。由此可见,STIM1 可能通过调节细胞内的 $Ca^{2+}$ 浓度来调控癌细胞凋亡。

本次试验中,我们发现在沉默 STIM1 后,人下咽癌 FaDu 细胞系的凋亡率增加。这一结果提示下咽癌中的 STIM1 基因可能通过调控 SOCE 关闭了 FaDu 细胞的 $Ca^{2+}$ 通道,从而使胞内 $Ca^{2+}$ 浓度降低,最终抑制了 FaDu 细胞的凋亡,促进癌症的进一步发生发展。

目前,STIM1 在癌症发生发展中的作用还存在一些争论。发现其在钙离子信号转导中的作用之前。STIM1 被认为是一个肿瘤抑制因子,因其可以在人横纹肌样瘤细胞 G401 和横纹肌肉瘤细胞 RD 中使细胞生长停滞[11]。但后续更多的研究表明,STIM1 是一个致癌基因,在很多人类癌症中的表达都被上调,比如乳腺癌、胶质瘤、宫颈癌等。本次研究,我们在喉癌中发现 STIM1 基因上调,与上述其他癌症的研究结果一致,提示 STIM1 基因可能是普遍癌症发生发展的重要基因之一。

但是,STIM1 基因在癌细胞的发生发展和对细胞凋亡的干扰作用的上游调控机制探究还不多。Ritchie 等[12]通过对 STIM1 基因启动子进行分析研究发现,STIM1 启动子上存在癌基因 WT1 和抑癌基因 EGR1 结合位点,并通过生化、细胞和动物实验证明在威尔斯氏肿瘤细胞中 WT1 和 EGR1 能结合于 STIM1 的启动子上,并下调 STIM1 的表达。STIM1 作为 SOCE 的关键蛋白,其在 SOCE 中的作用研究主要集中在乳腺癌、宫颈癌等激素相关肿瘤,在其他肿瘤中的作用报到较少,尤其是喉癌中还未见相关报道。在喉癌中,STIM1 是否也起到了上述的作用,需要我们在未来进行更多的相关实验验证。

下咽癌占下咽原发恶性肿瘤的 95%,现已成为严重威胁人类生命健康的头颈部恶性肿瘤。其主要治疗手段为手术和放疗,但因其发生部位隐蔽,恶性程度高,约 50% 的患者在确诊时已存在淋巴结转移,预后较差[13-14]。加之,咽喉器官位置的特殊性,手术极大地影响患者交流,呼吸以及心理,严重影响患者生存质量。因此,寻找新的有效、毒副作用小的治疗方法迫在眉睫。通过上述研究,STIM1 相关的基因治疗很可能成为下咽癌治疗新的切入点。

## [参考文献]


[1] Leanza L, Biasutto L, Managò A, et al. Intracellular ion channels and cancer[J]. Front Physiol, 2013, 4: 227. doi: 10. 3389/fphys. 2013. 00227.

[2] Yang S, Zhang JJ, Huang XY. Orai1and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis[J]. Cancer Cell, 2009, 15(2): 124 - 134.

[3] McAndrew D, Grice DM, Peters AA. ORAI1-mediated calcium influx in lactation and in breast cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2011, 10(3): 448 - 460.

[4] Chen YT, Chen YF, Chi WT. Microtubule-associated histone deacetylase 6 supports the calcium store sensor STIM1 in mediating cell behaviors[J]. Cancer Res, 2013, 73(14): 4500 - 4509.

[5] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC, et al. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997, 3(8): 917 - 921.

[6] Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodelling[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(7): 517 - 529.

[7] Kondratska K, Kondratskyi A, Yassine M, et al. Orai1 and STIM1 mediate SOCE and contribute to apoptotic resistance of pancreatic adenocarcinoma[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843(10): 2263 - 2269.

[8] Stathopulos PB, Zheng L, Li GY, et al. Structural and mechanistic insights into STIM1-mediated initiation of store-operated calcium entry[J]. Cell, 2008, 135(1): 110 - 122.

[9] McConkey DJ, Orrenius S. The role of calcium in the regulation of apoptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 239(2): 357 - 366.

[10] Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(7): 552 - 565.

[11] Sabbioni S, Veronese A, Trubia M, et al. Exon structure and promoter identification of STIM1 (alias GOK), a human gene causing growth arrest of the human tumor cell lines G401 and RD[J]. Cytogenet Cell Genet, 1999, 86(3 - 4): 214 - 218.

[12] Ritchie MF, Yue C, Zhou Y, et al. Wilms tumor suppressor 1 (WT1) and early growth response 1 (EGR1) are regulators of STIM1 expression[J]. J Biol Chem, 2010, 285(14): 10591 - 10596.

[13] Gourin CG, Terris DJ. Carcinoma of the hypopharynx[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2004, 13(1): 81 - 98.

[14] Buckley JG, MacLennan K. Cervial node metastases in laryngeal and hypopharyngeal cancer: a prospective analysis of prevalence and distribution[J]. Head Neck, 2000, 22(4): 380 - 385.


(编辑:魏 源)