

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.32.002

上调 OPN 和 TIP30 表达对口腔鳞癌 cal-27 细胞的影响

周姝含¹ 陈 冲² 唐 敏³ 胡蓉蕾⁴ 李翠翠⁵ 唐 震^{1Δ}

(1 第二军医大学附属长海医院口腔科 上海 200433; 2 苏州大学附属口腔医院 苏州口腔医院 江苏 苏州 215006;

3 第二军医大学肿瘤研究所 上海 200433; 4 第二军医大学附属长海医院病理科 上海 200433;

5 第二军医大学附属长海医院核医学科 上海 200433)

摘要 目的:探讨上调骨桥蛋白(OPN)和 TIP30 表达对口腔鳞状细胞癌 cal-27 细胞增殖和迁移能力的影响。**方法:**采用过表达 OPN 载体病毒和过表达 TIP30 质粒分别感染或转染 cal-27 细胞株后, 通过实时荧光定量 PCR 法和蛋白印迹 western blot 法检测 OPN 和 TIP30 的表达, CCK-8 法检测细胞增殖能力, 细胞划痕实验检测细胞的迁移能力。**结果:**过表达 OPN 载体病毒感染的 cal-27-shOPN 细胞株 OPN mRNA 和蛋白的表达均明显高于 cal-27-shN 细胞株($P<0.001$, $P=0.002$), 且细胞的增殖能力和迁移能力强($P<0.001$, $P=0.002$)。过表达 TIP30 质粒转染的 cal-27-pTIP30 细胞株 TIP30 mRNA 和蛋白的表达均明显高于 cal-27-pc3.0 细胞株 ($P=0.001$, $P=0.003$), 且细胞的增殖能力和迁移能力弱($P<0.001$, $P=0.005$)。**结论:**OPN 能促进 cal-27 细胞的增殖和迁移, TIP30 抑制 cal-27 细胞的增殖和迁移。

关键词:cal-27 细胞株; OPN; TIP30; 增殖; 迁移

中图分类号:R739.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)32-6209-06

The Influence of up-regulated Expressions of TIP30 and OPN on the Oral Squamous Cell Carcinoma Cal-27 Cells

ZHOU Shu-han¹, CHEN Chong², TANG Min³, HU Rong-lei⁴, LI Cui-cui⁵, TANG Zhen^{1Δ}

(1 Department of Stomatology, Changhai Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai, 200433, China;

2 Oral Maxillofacial Surgery Department, Suzhou Dental Hospital, Jiangsu, Suzhou, 215006, China;

3 Institute of Cancer Research, The Second Military Medical University, Shanghai, 200433, China;

4 Department of Pathology, Changhai Hospital, The Second Military University, Shanghai, 200433, China;

5 Department of Nuclear Medicine, Changhai Hospital, The Second Military University, Shanghai, 200433, China)

ABSTRACT Objective: To study the influence of up-regulated expressions of OPN (osteopontin) or TIP30 on the oral squamous cell carcinoma cal-27 cells. **Methods:** The TIP30 and OPN were overexpressed in the cal-27 cell lines respectively by infection or transfection technology. Real-time fluorescent quantitative PCR (RT-PCR) and western blot were used to detect the TIP30 and OPN mRNA and protein expressions. The proliferation ability was tested by CCK-8 tests, while the migration ability was tested by cell scratch experiment tests. **Results:** The expression of OPN mRNA and protein in cal-27-shOPN cell line was higher than those in the cal-27-shN cell lines ($P<0.001$, $P=0.002$). The proliferation and migration ability of cal-27-shOPN cell line were better than those of cal-27-shN cell line ($P<0.001$, $P=0.002$). The expression of TIP30 mRNA and protein in cal-27-pTIP30 cell line were higher than in the cal-27-pc3.0 cell line ($P=0.001$, $P=0.003$). The proliferation and migration ability of cal-27-pTIP30 cell line were worse than those of the cal-27-pc3.0 cell line ($P<0.001$, $P=0.005$). **Conclusion:** OPN could improve the ability of proliferation and migration of cal-27 cell line, while TIP30 could reduce the ability of proliferation and migration of cal-27 cell line.

Key words: Cal-27 cell line; OPN; TIP30; Proliferation; Migration

Chinese Library Classification (CLC): R739.8 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2017)32-6209-06

前言

头颈部鳞状细胞癌, 包括源于不同的解剖位置的口腔、咽喉、喉及下咽部, 其发病率在恶性肿瘤中排名第六^[1]。骨桥蛋白是 1986 年由 Senger 等人发现的一种存在于骨细胞外基质的分泌性磷酸化蛋白, 并把它定义为一个与转化相关磷酸化蛋白

^[2]。研究表明 OPN 在头部和颈部癌症(HNC)中发挥作用, 血浆 OPN 可能是 NHC 潜在生物标志物^[3]。TIP30 也称为 HTATIP2 或 CC3, 是在 1997 年初步确定抑癌基因, 是一种从小鼠的小细胞肺癌变体(v-SCLC)中发现的抑癌基因^[4]。在口腔鳞状细胞癌中, TIP30 的表达低于癌旁组织和正常黏膜组织, 且在临床分期及淋巴结转移病例中有明显差异^[5]。本研究对舌鳞癌 cal-27

作者简介: 周姝含 (1990-), 硕士研究生, 住院医师, 主要研究方向: 口腔颌面外科学, 电话: 15121174387, E-mail: twinweiwei@163.com

Δ 通讯作者: 唐震 (1975-), 研究生导师, 副教授, 主要研究方向: 口腔颌面外科学, 电话: 021-31162031, E-mail: tangzhen1999@aliyun.com

(收稿日期: 2017-05-04 接受日期: 2017-05-27)

细胞株分别进行感染过表达的 OPN 病毒和转染过表达的 TIP30 质粒,再通过 PCR 和 Western blot 技术对其感染或转染效果进行检测;最后通过 CCK-8 实验和细胞划痕实验检测 cal-27 细胞株的增殖和迁移能力,结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

cal-27 细胞购于和元生物技术(上海)有限公司;DMEM 培养基购于上海增博生物科技有限公司;小牛血清(FBS)购于上海亿佰生物科技有限公司;shOPN、shN 病毒和 pTIP30、pC3.0 质粒由第二军医大学肿瘤研究所提供;cDNA 试剂盒上海申能博彩公司;OPN、TIP30 和管家基因引物和探针购于上海生工生物工程技术服务公司;羊抗人 OPN 抗体购于 R&D systems 公司;兔抗人 TIP30 抗体购于 Cell Signaling Technology 公司;鼠抗人 GAPDH(HPR)购于上海康想生物科技有限公司;羊抗兔 -HRP 抗体和驴抗羊 -HRP 抗体购于 Santa Cruz Biotechnology, Inc 公司;CCK-8 试剂盒购于东仁化学科技(上海)有限公司。

1.2 细胞培养、感染和转染

cal-27 细胞培养于含 10%FBS 的 DMEM 中,置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。将状态良好的 cal-27 细胞消化后,离心弃上清液,加入 1 mL 完全培养基并用移液枪吹打成细胞悬液。根据测量的密度计算,每孔加入 2.5×10^5 个细胞于 6 孔板中,加入完全培养基使每个孔最后的体积为 2 mL。

感染病毒:24 小时后,弃上清液,加入 PBS 洗涤两次,每孔中加入 1 mL 的完全培养基。分别加入 1 mL 的 shOPN 和 shN 病毒。再加入 8 μ L 的 polybrene,记为“cal-27-shOPN”和“cal-27-shN”,24 小时更换成完全培养基培养。

转染质粒:24 小时后,弃上清液,加入 PBS 洗涤两次。根据质粒浓度计算含 3 μ g 质粒所需体积,分别加入 DMEM 培养基(无 FBS)至 0.2 mL,再加入 6 μ L 的 transgene 混匀,静置 15 min。分别加完全培养基培养基 1.8 mL,记为“cal-27-pTIP30”和“cal-27-pc3.0”。

1.3 RT-PCR 法检测 mRNA 的表达

将感染或转染后 48 小时的细胞分别弃上层培养基,加入 PBS 洗 2 次,再加入 RA2 提取液 500 μ L,静置 1 min,用 200 μ L 的移液枪头刮取细胞,提取 RNA。将样品提取物全部吸入内套管离心 1 min,吸去外套管中液体后加入 500 μ L 洗液,离心 1 min。再重复一次此步骤。吸去外套管中液体不加洗液,离心 1 min。将内套管移入新的 1.5 mL Eppendorf 管,加入洗脱液 25~50 μ L。室温静置 1 min 后,离心 1 min,获得总 RNA。反转录反应参照 TaKaRa RT-PCR 说明书进行,反转录条件如下:37℃ 15 min,85℃ 5 s 合成 cDNA。取逆转录后的 cDNA 于全自动荧光定量 PCR 系统中进行荧光定量 PCR 扩增,反应体系 20 μ L。20 μ L 反应体系包括 cDNA 1.0 μ L,SYBR GREEN 10 μ L,基因引物 0.5 μ L,ddH₂O 7.4 μ L。加入反应板后,设置反应条件为:95℃ 2 min,循环 45 次,95℃ 15 s;60℃ 15 s;72℃ 20 s。实时荧光定量 PCR 过程中,仪器自动在 72℃~95℃绘制熔解曲线。所有样本均重复 3 次检测。

1.4 western blot 法检测蛋白的表达

转染后的细胞培养 48 小时,PBS 洗两次,分别加入 1 $\times$ SDS 提取液 280 μ L,分装提取蛋白。用 200 μ L 的枪头刮除细胞提取的蛋白质。测定蛋白浓度后,分别加入 loading buffer 于 30 μ L 蛋白提取物,放入 100℃ 孵箱中 3 分钟至变性。经 10% 的 SDS-PAGE 分离电泳分离后,通过转膜将蛋白质转至纤维膜上。用 2% BSA 液封闭 1 小时后,TBS·T 洗 5 次,每次 5 min。分别加入 OPN、TIP30 及 GAPDH 的一抗,4℃ 摇床过夜,TBS·T 洗 3 次。分别加入 OPN、TIP30 的二抗,室温孵育 1 小时。TBS·T 洗涤 3 次后发光。所有样本均重复 3 次检测。应用 ImageJ 图像处理软件对条带进行分析。

1.5 CCK-8 法检测细胞增殖能力

感染或转染后的细胞培养 48 小时,消化后收集细胞,按每孔 1×10^4 个细胞铺于 96 孔板中,周围滴入 PBS 液,孵箱孵育。每 24 小时每组分别取 5 个复孔和 1 个 PBS 孔进行 CCK-8 实验检测。连续测定 5 天,绘制增殖曲线。

1.6 划痕实验法检测细胞迁移能力

感染或转染后的细胞培养 48 小时,PBS 洗 3 次,用 200 μ L 的枪头垂直于培养皿在铺满的细胞上划一条直线,PBS 洗 3 次后用 DMEM 培养基培养,分别在 0 h、6 h、12 h、24 h 观察细胞,拍照。

1.7 统计学方法

应用 SPSS 20.0 统计学软件进行 t 检验和多组重复测量资料的方差分析,以 $P \leq 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 感染病毒后 cal-27 细胞中 OPN 的 mRNA 和蛋白表达

根据实验测得的 CT 值,计算 $\Delta CT_{cal-27-shOPN}$ 和 $\Delta CT_{cal-27-shN}$ 分别代表在 cal-27-shOPN 和 cal-27-shN 中 OPN 的模板扩增到一定拷贝数所需循环数大小, ΔCT 值越大,说明其 OPN mRNA 表达越少。OPN 在 cal-27-shOPN 中 ΔCT 值较低 (2.870 ± 0.085),在 cal-27-shN 中 ΔCT 值较高 (12.995 ± 0.330),说明 OPN mRNA 在 cal-27-shOPN 中表达明显高于 cal-27-shN 中的表达($P < 0.001$),见表 1。

表 1 cal-27-shOPN 和 cal-27-shN 中 OPN mRNA ΔCT 值的比较

Table 1 Comparison of OPN mRNA in cal-27-shOPN and cal-27-shN Δ

OPN	CT value	
	$\Delta CT(\bar{x} \pm s)$	P
cal-27-shOPN	2.870 ± 0.085	<0.001
cal-27-shN	12.995 ± 0.330	

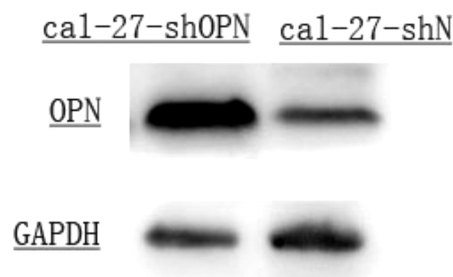


图 1 OPN 蛋白在 cal-27-shOPN 和 cal-27-shN 中的表达

Fig. 1 OPN protein expressions in the cal-27-shOPN and cal-27-shN stripe

从 OPN 蛋白条带中可以看出 (图 1), OPN 蛋白在 cal-27-shOPN 中的表达明显高于在 cal-27-shN 中的表达 ($P<0.05$)。

表 2 OPN 蛋白在 cal-27-shOPN 和 cal-27-shN 中的相对表达量及统计分析
Table 2 The OPN protein in the cal-27-shOPN and cal-27-shN relative expression and statistical analysis

OPN	test 1	test 2	test 3	$\bar{x} \pm s$	P
cal-27-shOPN	2.56	2.65	2.87	2.693 ± 0.159	0.002
cal-27-shN	0.26	0.33	0.27	0.287 ± 0.378	

2.2 转染 TIP30 过表达质粒的 cal-27 细胞中 TIP30 的 mRNA 和蛋白表达

根据实验测得的 CT 值, 计算 $\Delta CT_{cal-27-pTIP30}$ 和 $\Delta CT_{cal-27-pc3.0}$ 分别代表在 cal-27-pTIP30 和 cal-27-pc3.0 中 TIP30 的模板扩增到一定拷贝数所需循环数大小, ΔCT 值越大, 说明其 TIP30 mRNA 表达越少。TIP30 mRNA 在 cal-27-pTIP30 中 ΔCT 值较低 (-5.169 ± 0.070), 在 cal-27-pc3.0 中 ΔCT 值较高 ($6.440 \pm$

0.277), 说明 TIP30 mRNA 在 cal-27-pTIP30 中表达明显高于 cal-27-pc3.0 中的表达 ($P=0.001$), 见表 3。

从 TIP30 蛋白条带中可以看出 (图 2), TIP30 蛋白在 cal-27-pTIP30 中的表达明显高于在 cal-27-pc3.0 中的表达 ($P<0.05$)。

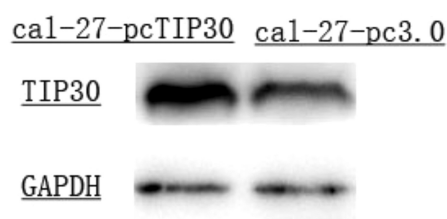


图 2 TIP30 蛋白在 cal-27-pTIP30 和 cal-27-pc3.0 中的表达
Fig. 2 TIP30 protein expressions in the cal-27-pTIP30 and cal-27-pc3.0 stripe

表 3 cal-27-pTIP30 和 cal-27-pc3.0 中 TIP30 mRNA ΔCT 值的比较
Table 3 Comparison of TIP30 mRNA in cal-27-pTIP30 and cal-27-pc3.0

TIP30	$\Delta CT(\bar{x} \pm s)$	P
cal-27-pTIP30	-5.169 ± 0.070	0.001
cal-27-pc3.0	6.440 ± 0.277	

表 4 TIP30 蛋白在 cal-27-pTIP30 和 cal-27-pc3.0 中的相对表达量及统计分析
Table 4 The TIP30 protein in the cal-27-pTIP30 and cal-27-pc3.0 relative expression and statistical analysis

TIP30	test 1	test 2	test 3	$\bar{x} \pm s$	P
cal-27-pTIP30	2.22	2.37	2.42	2.337 ± 0.104	0.003
cal-27-pc3.0	0.56	0.55	0.43	0.513 ± 0.072	

2.3 OPN 对 cal-27 细胞增殖的影响

我们将数据绘制成折线图来描述两种细胞活细胞数随时间变化而变化的趋势, 通过图 3 发现 cal-27-shOPN 细胞的增殖速度比 cal-27-shN 细胞快。

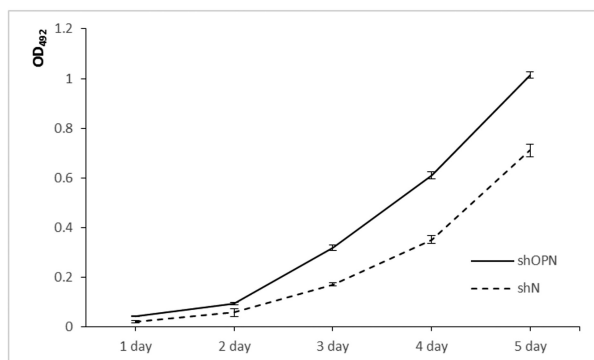


图 3 cal-27-shOPN 细胞和 cal-27-shN 细胞连续 5 天的增殖情况
Fig.3 Five consecutive days of multiplication of cal-27-shOPN and cal-27-shN

对 5 天的数据进行统计学分析, 采用多重重复资料方差分析, $F=1073.417$, $P<0.001$, 说明 cal-27-shOPN 和 cal-27-shN 的增殖能力不同, 且第 1~5 天两组细胞的均有统计学差异, 说明 cal-27-shOPN 细胞增殖能力强于 cal-27-shN 细胞, 见表 5。

表 5 cal-27-shOPN 和 cal-27-shN 的 OD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 5 Comparison of OD value in cal-27-shOPN and cal-27-shN ($\bar{x} \pm s$)

day	cal-27-shOPN	cal-27-shN	P
1	0.044 ± 0.002	0.021 ± 0.004	<0.001
2	0.095 ± 0.004	0.067 ± 0.017	0.012
3	0.318 ± 0.011	0.171 ± 0.007	<0.001
4	0.610 ± 0.015	0.352 ± 0.015	<0.001
5	1.014 ± 0.012	0.723 ± 0.025	<0.001

2.4 TIP30 对 cal-27 细胞增殖的影响

我们数据绘制成折线图来描述两种细胞活细胞数随时间变化而变化的趋势, 通过图 4 我们发现 cal-27-pTIP30 细胞的

增殖速度比 cal-27-pc3.0 细胞慢。

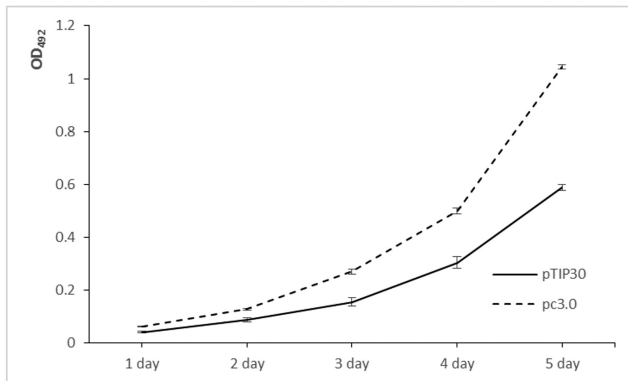


图 4 cal-27-pTIP30 细胞和 cal-27-pc3.0 细胞连续 5 天的增殖情况
Fig.4 Five consecutive days of multiplication of cal-27-pTIP30 and cal-27-pc3.0

对 5 天的数据进行统计学分析,采用多重重复资料方差分析, $F=1168.673$, $P<0.001$,说明 cal-27-pTIP30 和 cal-27-pc3.0 的增殖能力不同,且第 1~5 天两组细胞的均有统计学差异,说明 cal-27-pTIP30 细胞的增殖能力弱于 cal-27-pc3.0 细胞,如表 6。

表 6 cal-27-pTIP30 和 cal-27-pc3.0 的 OD 值比较($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Comparison of OD value in cal-27-pTIP30 and cal-27-pc3.0($\bar{x} \pm s$)

day	cal-27-pTIP30	cal-27-pc3.0	P
1	0.041± 0.001	0.063± 0.003	<0.001
2	0.087± 0.003	0.128± 0.007	<0.001
3	0.155± 0.009	0.270± 0.015	<0.001
4	0.304± 0.011	0.499± 0.022	<0.001
5	0.588± 0.008	1.045± 0.010	<0.001

2.5 OPN 对 cal-27 细胞侵袭力的影响

在图 5 中,第一列分别为 cal-27-shOPN 在 0 h、6 h、12 h、24 h 的图片,第二列分别为 cal-27-shN 在 0 h、6 h、12 h、24 h 的图片。我们可以看出,cal-27-shOPN 细胞的迁移速度比 cal-27-shN 细胞快。

分别测量 cal-27-shOPN 和 cal-27-shN 在 0 h、6 h、12 h、24 h 细胞间的宽度($n=5$),并计算细胞迁移率(以 0 小时为基准)。方差分析得出, $F=38.809$, $P<0.001$,说明 cal-27-shOPN 和 cal-27-shN 的迁移能力不同。且 6 h、24 h 两组细胞的均有统计学差异($P<0.001$, $P=0.002$),尚不能认为 12 h 两组细胞的统计学差异($P=0.897$),如图 6。

2.6 TIP30 对 cal-27 细胞侵袭力的影响

图 7 中,第一列分别为 cal-27-pTIP30 在 0 h、6 h、12 h、24 h 的图片,第二列分别为 cal-27-pc3.0 在 0 h、6 h、12 h、24 h 的图片。我们可以看出,cal-27-pTIP30 细胞的迁移速度比 cal-27-pc3.0 细胞慢。

分别测量 cal-27-pTIP30 和 cal-27-pc3.0 在 0 h、6 h、12 h、24 h 细胞间的宽度 ($n=5$),并计算细胞迁移率 (以 0 小时为基准),cal-27-pTIP30 和 cal-27-pc3.0 的迁移能力不同,且两组细胞 24 h 有统计学差异($P=0.005$),如图 8。

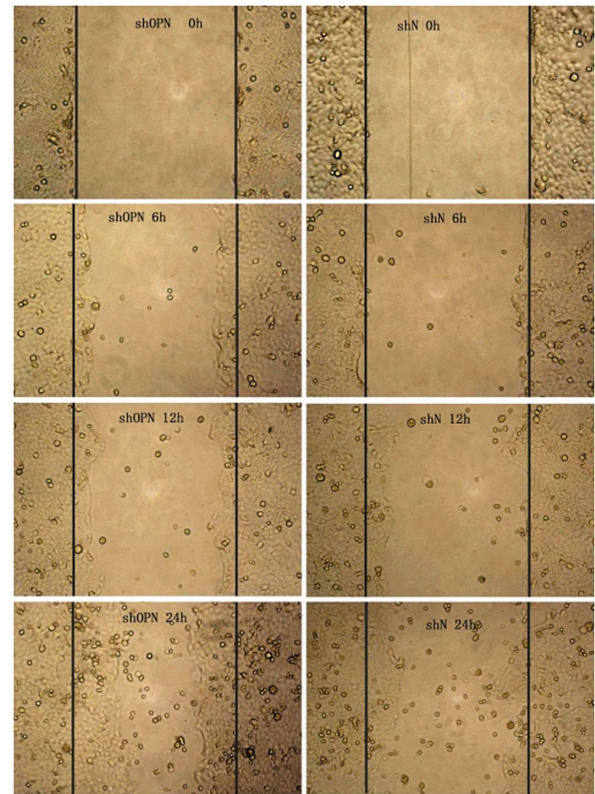


图 5 划痕实验中 cal-27-shOPN 和 cal-27-shN 细胞 0 h、6 h、12 h、24 h 迁移能力

Fig. 5 Scratch experiment the ability of migrate cal-27-shOPN and cal-27-shN in 0 h, 6 h, 12 h, 24 h

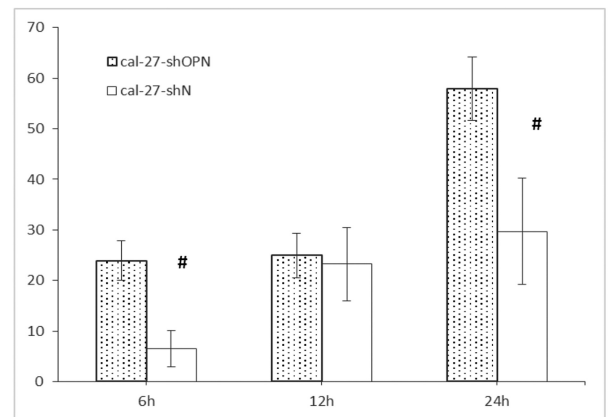


图 6 cal-27-shOPN 和 cal-27-shN 细胞 6 h、12 h、24 h 迁移能力的统计分析

Fig. 6 The statistical analysis of the ability of migrate cal-27-shOPN and cal-27-shN during 6 h, 12 h, 24 h

Note: # $P \leq 0.05$.

3 讨论

OPN 存在于多种肿瘤细胞中,包括鼻咽癌、前列腺癌、膀胱癌、宫颈癌和口腔鳞状细胞癌等^[6-10]。OPN 与肿瘤发生、发展相关的功能主要有:(1)促使肿瘤的血管生成;(2)促进肿瘤的趋化、黏附和迁移;(3)促进肿瘤细胞的凋亡;(4)参与免疫应答;(5)促进肿瘤细胞外基质的降解^[11]。OPN 和其受体复合物随着血管

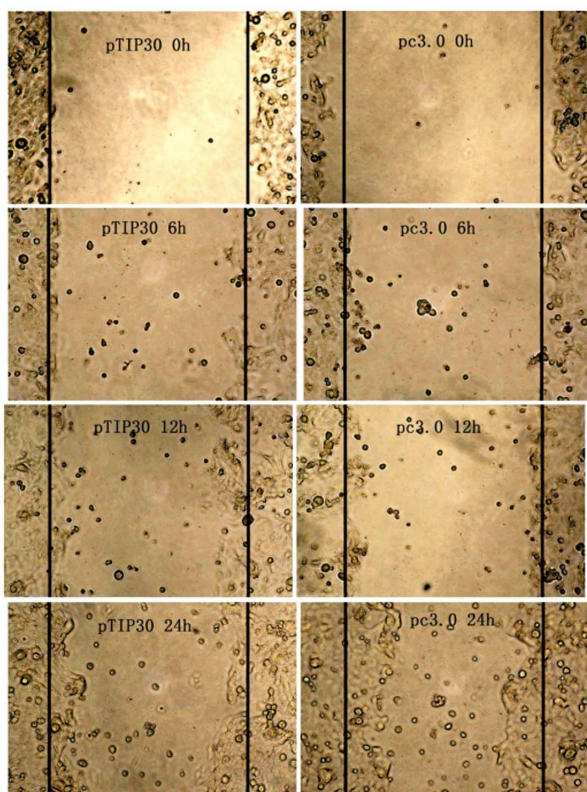


图7 划痕实验 cal-27-pTIP30 和 cal-27-pc3.0 细胞 0 h、6 h、12 h、24 h 迁移能力

Fig. 7 Scratch experiment the ability of migrate cal-27-pTIP30 and cal-27-pc3.0 in 0 h, 6 h, 12 h, 24 h

内皮生长因子受体 2(VEGFR2)活化而激活 PI3k / PKB 途径,这将导致 eNOS/NO 信号的活化。同时,VEGFR2 还可以通过 PLC γ 传导信号,导致 eNOS 磷酸化和 NO 生成增强,这个过程将导致内皮细胞生存、增殖、迁移和渗透率增加。这些复合物也通过激活 MEK / Erk 通路,协调肿瘤细胞的运动和入侵。还有研究表明富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白(SPARC)整合素结合,诱导 ILK/FAK/PKB 激活,增加细胞迁移能力^[11]。

研究表明 TIP30 基因在多种人类肿瘤中的表达降低或缺失,如胰腺导管癌、子宫颈癌、乳腺癌、脑胶质瘤和口腔血管瘤等^[12-16]。TIP30 与肿瘤发生、发展相关的功能主要有:(1)抑制肿瘤细胞增殖;(2)促进肿瘤细胞凋亡;(3)抑制基因肿瘤的转移;(4)抑制肿瘤血管生成;(5)对 DNA 损伤的反应^[17];(6)调节肿瘤细胞的葡萄糖代谢^[18];(7)抑制基因转录^[19]。在肝癌细胞, TIP30 异位表达能导致 p53 表达水平增加和 Bcl-2/Bcl-xL 表达水平降低,从而抑制细胞增殖。此外, TIP30 敲除的小鼠肝细胞癌肿瘤,结合表达 TIP30 的腺病毒并且接受细胞毒性药物 5-氟尿嘧啶治疗后,使肿瘤的生长和长时间生存得到抑制^[20]。体内实验表明抑制 TIP30 的表达能够促进肿瘤细胞转移。目前,有两种机制来解释其抑制肿瘤转移功能。第一种是凋亡诱导效应,因变异 SCLC 中缺乏生长因子而被认可^[4];第二种是间接抑制效果,即 TIP30 通过抑制血管生成从而抑制肿瘤转移^[21]。

本研究成功建立了 OPN 和 TIP30 过表达 cal-27 细胞株,初步探讨了过表达 OPN 和 TIP30 细胞株的增殖和迁移能力。结果显示:提高 cal-27 细胞中 OPN 的表达能提高其细胞增殖

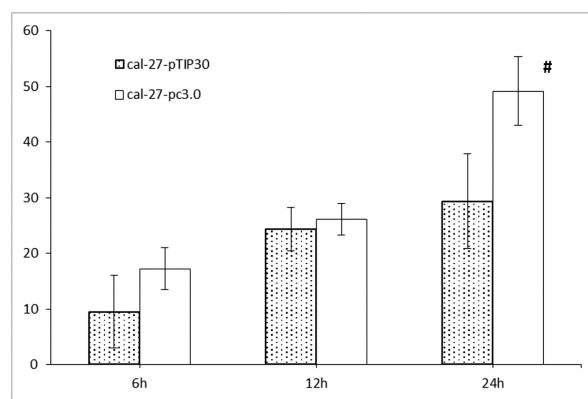


图8 cal-27-pTIP30 和 cal-27-pc3.0 细胞 6 h、12 h、24 h 迁移能力的统计分析

Fig. 8 The statistical analysis of the ability of migrate cal-27-pTIP30 and cal-27-pc3.0 during 6 h, 12 h, 24 h

Note: #P $\leq$ 0.05.

能力,而提高 cal-27 细胞中 TIP30 的表达能抑制细胞的增殖能力。此外,提高 cal-27 细胞中 OPN 的表达能提高其细胞迁移能力,而提高 cal-27 细胞中 TIP30 的表达能抑制细胞的迁移能力。在细胞划痕实验中,两组细胞均在 24 h 时细胞的迁移能力有所不同,而在 12 h 时细胞的迁移能力尚不能认为有差异。这可能是因为划痕实验为了排除细胞本身的增殖影响以及避免血清的成分不稳定,将细胞在划痕后在无血清的培养基中培养,这样细胞可能需要一定的时间来适应生长条件的变化。又因 cal-27 细胞的细胞增殖时间为 35 h,我们在 36 h 时细胞时发现细胞培养基浑浊,可能是由于培养基中无血清,细胞增殖所需的营养物质不足导致细胞大量死亡,因此选取 24 h 为观察点进行比较分析。结果表明过表达 OPN 能促进 cal-27 细胞的增殖和迁移,而过表达 TIP30 抑制 cal-27 细胞的增殖和迁移。因此,OPN 和 TIP30 可望作为口腔鳞状细胞癌诊断的标志和潜在治疗靶点。

参考文献(References)

- [1] Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(1): 9-22
- [2] Senger DR, Wirth DF, Hynes RO. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins [J]. Cell, 1979, 16: 885-893
- [3] Eto M, Kodama S, Nomi N, et al. Clinical significance of elevated osteopontin levels in head and neck cancer patients [J]. Auris nasus larynx, 2007, 34(3): 343
- [4] Shtivelman E. A link between metastasis and resistance to apoptosis of variant small cell lung carcinoma [J]. Oncogene, 1997, 14 (18): 2167-2173
- [5] 潘淑婷. 骨桥蛋白与 TIP30 在口腔鳞状细胞癌中的表达及相关性研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2013
- [6] Pan Shu-ting. Expression and relationship of Osteopontin and TIP30 in Oral Squamous Carcinoma [D]. Shanghai: The Second Military Medical University, 2013
- [6] Subramani VN, Narasimhan M, Thiyagarajan M, et al. Expression of Osteopontin in Oral Squamous Cell Carcinoma and its Surgical Margins-An Immunohistochemical Study [J]. Journal of Clinical &

- Diagnostic Research Jcdr, 2015, 9(11): ZC66
- [7] 李华. OPN 和 MMP-9 在宫颈鳞癌组织中的表达意义[J]. 医药论坛杂志, 2015(12): 118-119
- Li Hua. Expression significance of OPN and MMP-9 in Cervical squamous carcinoma tissue[J]. Medical Forum, 2015(12): 118-119
- [8] 白春侠. OPN 和 MMP-9 在膀胱移行细胞癌中的表达及临床意义[J]. 当代医学, 2016(1): 23-24
- Bai Chun-xia. Expression of OPN and MMP-9 in bladder transitional cell carcinoma and clinical significance [J]. Contemporary Medicine, 2016(1): 23-24
- [9] 王超奇, 侯建全, 欧阳骏, 等. 蛋白 P27、Survivin 和骨桥蛋白在前列腺癌组织中的表达和意义[J]. 中国老年学, 2016, (4): 806-808
- Wang Chao-qi, Hou Jian-quan, Ou-Yang Jun, et al. Expression and significance of protein P27, Survivin and OPN in Prostate cancer tissue[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2016, (4): 806-808
- [10] Wang HH, Wang XW, Tang CE. Osteopontin expression in nasopharyngeal carcinoma: its relevance to the clinical stage of the disease [J]. Journal of Cancer Research & Therapeutics, 2011, 7(2): 138
- [11] Subraman V, Thiagarajan M, Malathi N, et al. OPN-Revisited[J]. Journal of Clinical & Diagnostic Research Jcdr, 2015, 9(6): ZE10
- [12] Guo S, Jing W, Hu X, et al. Decreased TIP30 expression predicts poor prognosis in pancreatic cancer patients [J]. International Journal of Cancer, 2014, 134(6): 1369-1378
- [13] 周燕, 汪庚明, 崔珍, 等. TIP30/CC3 在鼻咽癌组织中的表达和意义[J]. 蚌埠医学院学报, 2015, 40(12): 1635-1638
- Zhou Yan, Wang Geng-ming, Cui Zhen, et al. The expression of TIP30/CC3 in nasopharyngeal carcinoma tissue and its significance [J]. Journal of Bengbu Medical College, 2015, 40(12): 1635-1638
- [14] 高亚丽, 任铁军, 薛琪, 等. TIP30、EGFR 在 HER-2 阳性乳腺癌诊疗中的价值探讨[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(10): 1525-1527
- Gao Ya-li, Ren Tie-jun, Xue Qi, et al. Values of TIP30 and EGFR in diagnosis and treatment of HER-2 positive breast cancer patients[J]. Maternal and Child Health Care of China, 2015, 30(10): 1525-1527
- [15] 胡莹莹, 刘新会, 罗荣城. TIP30 在脑胶质瘤中的表达及其临床意义[J]. 热带医学杂志, 2013, 13(5): 595-597
- Hu Ying-ying, Liu Xin-hui, Luo Rong-Cheng. Expression of TIP30 in glioma and its clinical significance [J]. Journal of Tropical Medicine, 2013, 13(5): 595-597
- [16] 陈忠辉. 口腔血管瘤组织中 TIP30/CC3 基因的表达及意义 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2015, (2): 189-192
- Chen Zhong-hui. Expression and significance of TIP30/CC3 gene in oral hemangiomas [J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2015, (2): 189-192
- [17] Fong S, King F, Shtivelman E. CC3/TIP30 affects DNA damage repair[J]. BMC Cell Biology, 2010, 11(1): 1-14
- [18] Chen V, Shtivelman E. CC3/TIP30 regulates metabolic adaptation of tumor cells to glucose limitation [J]. Cell Cycle, 2011, 9 (24): 4941-4953
- [19] Yu X, Li Z, Wu WK. TIP30: A Novel Tumor-Suppressor Gene. Oncology Research, 2015, 22(5): 339-348
- [20] Zhao J, Zhang X, Shi M, et al. TIP30 inhibits growth of HCC cell lines and inhibits HCC xenografts in mice in combination with 5-FU [J]. Hepatology, 2006, 44(1): 205-215
- [21] NicAmhlaoibh R, Shtivelman E. Metastasis suppressor CC3 inhibits angiogenic properties of tumor cells in vitro [J]. Oncogene 2001, 20 (2): 270-275

(上接第 6370 页)

- [24] 陈凌玉, 周彩华. 医学模拟教学应用于护理实务临床处置课程的研究[J]. 中华现代护理杂志, 2015, 21(32): 3845-3849
- Chen Ling-yu, Zhou Cai-hua. Application of medical simulation teaching on the curriculum of clinical nursing practice [J]. Chinese Journal of Modern Nursing, 2015, 21(32): 3845-3849
- [25] 张阳阳, 李艳霞, 卢书明, 等. 临床实践教学模拟教学的应用与意义[J]. 医学与哲学, 2015, 36(22): 84-87
- Zhang Yang-yang, Li Yan-xia, Lu Shu-ming, et al. The Application of Simulation Based Education in Clinical Practice [J]. Medicine & Philosophy, 2015, 36(22): 84-87
- [26] Kalaniti K, Campbell DM. Simulation-based medical education: time for a pedagogical shift[J]. Indian Pediatr, 2015, 52(1): 41-45
- [27] Gardner AK, Lachapelle K, Pozner CN, et al. Expanding simulation-based education through institution-wide initiatives: A blueprint for success[J]. Surgery, 2015, 158(5): 1403-1407
- [28] Kang KA, Kim S, Kim SJ, et al. Comparison of knowledge, confidence in skill performance (CSP) and satisfaction in problem-based learning (PBL) and simulation with PBL educational modalities in caring for children with bronchiolitis [J]. Nurse Educ Today, 2015, 35(2): 315-321
- [29] 周志刚, 田锐, 胡家昌, 等. 医学模拟教学在重症医学 PBL 教学中的应用[J]. 中华医学教育探索杂志, 2014, 13(6): 592-596
- Zhou Zhi-gang, Tian Rui, Hu Jia-chang, et al. Role of simulation based medical education in critical care medicine PBL teaching[J]. Chinese Journal of Medical Education Research, 2014, 13 (6): 592-596
- [30] Roh YS, Kim SS. Integrating Problem-Based Learning and Simulation: Effects on Student Motivation and Life Skills[J]. Comput Inform Nurs, 2015, 33(7): 278-284