

口腔癌细胞通过传递性内质网应激影响胰岛 β 细胞功能的初探

李若焱 黄颖昭 廖乃麟 吴沉洲 李一

口腔疾病研究国家重点实验室 国家口腔疾病临床医学研究中心 四川大学华西口腔医院头颈肿瘤外科, 成都 610041

[摘要] **目的** 探究口腔癌细胞是否通过传递性内质网应激 (TERS) 影响胰岛 β 细胞功能。**方法** 选用衣霉素 (TM) 作为内质网应激 (ERS) 剂、口腔鳞癌细胞系 CAI-27、SCC-25 作为供体细胞、小鼠胰岛素瘤 6 细胞系 MIN6 作为受体细胞, 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (qPCR)、蛋白免疫印迹 (WB) 检测 ERS 标志物及胰岛素表达情况, 通过脱氧核苷酸末端转移酶介导的脱氧尿苷三磷酸缺口末端标记 (TUNEL) 技术检测细胞凋亡水平, 采用克隆形成检测细胞增殖能力, 采用酶联免疫吸附测定 (ELISA)、二喹啉甲酸 (BCA) 试剂盒检测胰岛 β 细胞分泌功能。**结果** 对 MIN6 细胞施加 TM 刺激, 通过 qPCR、WB 发现, ERS 标志物上调, 这意味着 MIN6 细胞能产生 ERS。将 ERS 的口腔癌细胞的上清液加入 MIN6 细胞, 通过 qPCR、WB 发现 ERS 的口腔癌细胞可诱导 MIN6 细胞出现 ERS, 即发生 TERS 现象; 通过 TUNEL 实验, 发现 TERS 的 MIN6 细胞凋亡增加; 通过克隆形成实验, 发现 TERS 的 MIN6 细胞增殖能力下降; 通过 qPCR、WB 发现, TERS 的 MIN6 细胞的胰岛素合成减少, 在翻译水平抑制胰岛素的合成; 通过 ELISA、BCA 发现, TERS 的 MIN6 细胞分泌功能下降。

结论 口腔癌细胞可通过 TERS 引起胰岛 β 细胞应激, 导致其凋亡增加, 存活能力下降, 合成及分泌胰岛素能力下降。

[关键词] 口腔癌细胞; 内质网应激; 传递性内质网应激; 胰岛 β 细胞; 胰岛素

[中图分类号] R 739.8 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2022.01.004



开放科学 (资源服务)
标识码 (OSID)

Oral cancer cells affect pancreatic β -cell function through transmissible endoplasmic reticulum stress Li Ruohan, Huang Yingzhao, Liao Nailin, Wu Chenzhou, Li Yi. (State Key Laboratory of Oral Diseases & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Dept. of Head and Neck Oncology Surgery, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Supported by: The National Natural Science Foundation of China (81972546). Correspondence: Li Yi, E-mail: liyi1012@163.com.

[Abstract] **Objective** In this study, we aimed to investigate whether oral cancer cells affect pancreatic β -cells function through transmissible endoplasmic reticulum stress (TERS). **Methods** Tunicamycin (TM) was selected as the endoplasmic reticulum stress (ERS) inducer. The human oral cancer cell lines CAI-27 and SCC-25 were selected as the donor cells, and mouse insulinoma 6 (MIN6) cell lines were chosen as the recipient cells. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) and Western blot (WB) analysis were used to detect ERS markers and insulin expression. The TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) method was applied to detect apoptosis levels. The clone formation method was utilized to detect cell proliferation capability. The secretory function of pancreatic β -cells was detected with an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit and a bicinchoninic acid (BCA) kit. **Results** The MIN6 cells were sub-

jected to TM stimulation. qPCR and WB analysis revealed that ERS markers were upregulated. This result implied that the MIN6 cells can induce ERS. The supernatant of oral cancer cells under ERS was added to the

[收稿日期] 2021-01-23; **[修回日期]** 2021-11-15

[基金项目] 国家自然科学基金 (81972546)

[作者简介] 李若焱, 硕士, E-mail: 1246177834@qq.com

[通信作者] 李一, 教授, 博士, E-mail: liyi1012@163.com

MIN6 cells. qPCR and WB analysis showed that the oral cancer cells that had been subjected to ERS could induce ERS in the MIN6 cells, that is, the phenomenon of TERS occurred. The TUNEL assay indicated that the apoptosis of the MIN6 cells increased under TERS. The clone formation assay demonstrated that the proliferation capability of the MIN6 cells decreased under TERS. qPCR and WB analysis revealed that under TERS, insulin synthesis by the MIN6 cells decreased and insulin synthesis was inhibited at the translation level. The ELISA and BCA kits demonstrated that insulin secretion by the MIN6 cells was reduced under TERS. **Conclusion** Oral cancer cells can affect pancreatic β -cells through TERS, resulting in increased apoptosis, decreased viability, and reduced insulin secretion and synthesis capability.

[Key words] oral cancer cells; endoplasmic reticulum stress; transmissible endoplasmic reticulum stress; pancreatic β -cells; insulin

内质网是蛋白合成的重要细胞器,参与蛋白的生产、折叠、修饰、成熟、质量控制和降解^[1-2]。内质网与蛋白质稳定的维持密切相关,当内质网稳态被各种干扰破坏时,就会触发一种称为“内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)”的细胞状态。

为了克服应激并恢复蛋白质稳定,ERS会激活未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)^[3]。UPR可以减少蛋白质合成,增强内质网蛋白质折叠能力,降解错误折叠或未折叠的蛋白质^[4]。如果UPR不能协助细胞摆脱应激,那么UPR信号会从促生存转为促死亡^[5-8]。普遍认为癌症可导致ERS及UPR信号通路的激活^[9-11]。ERS对癌症的发生、发展有双向调控作用:如能及时解决ERS,UPR将有利于癌细胞的生存、转移、血管生成和耐药性的提高;如果内质网中错误折叠或未折叠的蛋白质大量积累,超过了内质网的自我调节能力,将激活ERS下游凋亡通路,诱导细胞凋亡^[12]。

ERS除了直接影响癌细胞外,还参与细胞之间的交流。2011年, Mahadevan等^[13]首次报道了前列腺癌细胞在ERS状态下会释放某些“可溶性的因子”,诱导骨髓来源的髓系细胞也出现ERS,这种细胞间的ERS传递现象称为传递性内质网应激(transmissible endoplasmic reticulum stress, TERS)。

研究^[14-16]发现,ERS状态的胰岛 β 细胞会引发多种反应,这些反应包括细胞凋亡、细胞功能受损、胰岛素分泌障碍等。目前许多研究认为,口腔癌对患者身体的损害不仅仅是由于癌症对进食器官的毁损,还由于包括胰岛功能下降等在内的诸多代谢紊乱,这些破坏对口腔癌患者的生活质量和预后造成了较大的负面影响。本研究的目的是为探究口腔癌细胞是否通过TERS影响了胰岛 β 细胞的功能。

1 材料和方法

1.1 实验材料

人口腔鳞癌细胞系CAL-27、SCC-25,小鼠胰岛素瘤6细胞系的MIN6细胞(四川大学口腔疾病研究国家重点实验室提供),达尔伯克改良伊格尔(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)培养基,DMEM/F-12培养基,洛斯维·帕克纪念研究所-1640(Roswell Park Memorial Institute-1640, RPMI-1640)培养基,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS),0.25%胰蛋白酶(Gibco公司,美国),磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)(武汉赛维尔生物科技有限公司),衣霉素(tunicamycin, TM)(北京市华中海威基因科技有限公司),RNA提取试剂(Trizol试剂)(TAKARA公司,日本),逆转录试剂盒(Thermo Fisher Scientific公司,美国),实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)扩增试剂盒(Bimake公司,美国),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、 β -肌动蛋白(β -actin)、结合免疫球蛋白蛋白(binding immunoglobulin protein, BiP)、剪切型X-盒结合蛋白1(spliced form of X-box binding protein 1, XBP1S)、CAAT区/增强子结合蛋白同源蛋白(C/EBP-Homologous Protein, CHOP)、胰岛素(insulin, INS)-1、INS-2的qPCR引物(上海市生工生物工程股份有限公司),兔抗BiP抗体,兔抗微管蛋白(tubulin, TUB)抗体(杭州华安生物技术有限公司),鼠抗INS单克隆抗体(Sigma-Aldrich公司,美国),抗兔二抗、抗鼠二抗(SAB公司,美国),脱氧核苷酸末端转移酶介导的脱氧尿苷三磷酸缺口末端标记(TdT-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒,二喹啉甲酸(Bicinchoninic acid,

BCA) 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), 小鼠 INS 酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒, 小鼠 C 肽 ELISA 试剂盒 (上海茁彩生物科技有限公司)。

1.2 细胞培养

CAL-27 细胞用含 10%FBS 的 DMEM 培养基, SCC-25 细胞用含 10%FBS 的 DMEM/F-12 培养基, MIN6 细胞用含 10%FBS 的 RPMI-1640 培养基, 置于 37 °C、5%CO₂ 的培养箱培养。细胞传代时用 0.25% 胰蛋白酶消化贴壁细胞, 用相应的培养基终止消化并离心, 重悬后接种于培养瓶中。

1.3 诱导口腔癌细胞 ERS

1.3.1 诱导口腔癌细胞 CAL-27 产生 ERS 用 TM (2 μg·mL⁻¹) 作为 ERS 应激剂, 持续刺激组使用 TM 持续处理 3、6、17、24 h 后收样; 间歇刺激组加入 TM 处理 2 h, PBS 清洗 3 次确保无 TM 残留后, 换成正常培养基, 继续培养 1、4、15、22 h 后, 0.25% 胰蛋白酶消化贴壁细胞, 收样。

1.3.2 诱导口腔癌细胞 SCC-25 产生 ERS 用 TM (2 μg·mL⁻¹) 作为 ERS 应激剂, 持续刺激组使用 TM 持续处理 3、6、24 h 后收样, 间歇刺激组加入 TM 处理 2 h, PBS 清洗 3 次确保无 TM 残留后, 换成正常培养基, 继续培养 1、4、22 h 后, 0.25% 胰蛋白酶消化贴壁细胞, 收样。

1.4 诱导 MIN6 细胞 ERS

用 TM (2 μg·mL⁻¹) 作为 ERS 应激剂, MIN6 细胞使用 TM 持续处理 3、6、17、24 h 后, 0.25% 胰蛋白酶消化贴壁细胞, 收样。

1.5 制作条件培养基

加入 0.2% 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 或 2 μg·mL⁻¹ TM 处理口腔癌细胞 2 h 后, PBS 清洗 3 次确保无 DMSO 或 TM 残留后, 换成正常培养基, 继续培养 12 h 后, 收集上清液, 离心 (1 000 r·min⁻¹, 5 min)、过滤 (0.22 μm 孔径), 去除杂质及细胞碎片。收集的条件培养基分别称为对照条件培养基 (control conditional medium, CCM)、介导 TERS 效应的条件培养基 (TERS conditional medium, TCM)。SCC-25 细胞的 CCM、TCM 称为 CCM25、TCM25, CAL-27 细胞的 CCM、TCM 称为 CCM27, TCM27。

1.6 TERS 实验

MIN6 细胞以 60 万/孔密度铺于 6 孔板中。使用 DMSO (0.2%, 阴性对照)、TM (2 μg·mL⁻¹, 阳性对照)、CCM25、TCM25、CCM27、TCM27 处理 MIN6 细胞 24 h、48 h 后, 0.25% 胰蛋白酶消化

贴壁细胞, 收样。

1.7 qPCR 检测

用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 溶于无酶水中, 用紫外分光光度计进行浓度和纯度的检测。取 10 μL 总 RNA, 用逆转录试剂盒逆转录为互补脱氧核糖核酸 (complementary deoxyribonucleic acid, cDNA), 用 qPCR 扩增试剂盒进行扩增。使用 GAPDH 作为 CAL-27、SCC-25 细胞的内参, 使用 β-actin 作为 MIN6 细胞的内参。反应体系为 10 μL: 5 μL qPCR 预混液, 0.5 μL 上游引物, 0.5 μL 下游引物, 4 μL cDNA。设置 3 个复孔, 反应条件为: 预变性 95 °C 3 min, 95 °C 5 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环。用 2^{-ΔΔCT} 统计学方法计算目的基因相对表达量。相关引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab 1 Primer sequence

| 引物名称 | 引物序列 |
|------------|--|
| 人 GAPDH | 上游: 5' - CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC -3' 下游: 5' - GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT -3' |
| 小鼠 β-actin | 上游: 5' - GGCTGTATTCCCCTCCATCG -3' 下游: 5' - CCAGTTGGTAACAATGCCATGT -3' |
| 人 BiP | 上游: 5' - TTCTGTGGTGGCTCGACT -3' 下游: 5' - GTCAGCATCTTGGTGGCTTT -3' |
| 小鼠 BiP | 上游: 5' - TGTGTGTGAGACCAGAACCG -3' 下游: 5' - TAGGTGGTCCCAAGTCGAT -3' |
| 人 XBP1S | 上游: 5' - CCGCAGCAGGTGCAGG -3' 下游: 5' - GGGGCTTGTTATATATGTGG -3' |
| 小鼠 XBP1S | 上游: 5' - CTGAGTCCGCAGCAGGTG -3' 下游: 5' - TTCCAGCTTGGCTGATGAGG -3' |
| 人 CHOP | 上游: 5' - GGAAACAGAGTGGTCATTCCC -3' 下游: 5' - CTGCTTGAGCCGTTTCATTCTC -3' |
| 小鼠 CHOP | 上游: 5' - GCAGCGACAGAGCCAGAATAA -3' 下游: 5' - ACCAGGTTCTGCTTTCAGGT -3' |
| 小鼠 INS-1 | 上游: 5' - CACCCACCTGGAGACCTTA -3' 下游: 5' - AAGTACCTCCTCTCTGCCCC -3' |
| 小鼠 INS-2 | 上游: 5' - CATCAGCAAGCAGGAAGCCT -3' 下游: 5' - GGACTCCCAGAGGAAGAGCA -3' |

1.8 WB 检测

用蛋白裂解液提取细胞总蛋白, 在蛋白液中加入蛋白上样缓冲液, 99 °C、1 400 r·min⁻¹、5 min 进行变性。样品进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳后转膜, 用 5% 牛血清白蛋白溶液室温封闭 30 min, 洗涤缓冲液清洗。孵育一抗: 抗 TUB (1 : 5 000), 抗 BiP (1 : 1 000), 抗 INS (1 : 500), 4 °C 过夜。洗涤缓冲液洗涤 3 次, 每次为 20 min。室温孵育二抗 1 h。增强化学发光显影, 并进行灰度分析, “目的蛋白/内参蛋白” 表示。

1.9 MIN6细胞的细胞凋亡实验

MIN6细胞以2万/孔密度铺于96孔板中。使用DMSO(0.2%, 阴性对照)、TM($2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 阳性对照)、CCM27、TCM27处理MIN6细胞24h。PBS洗涤一次, 加入免疫染色固定液固定细胞30min。PBS洗涤一次, 加入免疫染色强力通透液, 室温孵育5min。PBS洗涤2次, 加入TUNEL检测液染凋亡细胞, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育60min。PBS洗涤3次, 加入4',6-联脒-2'-苯基吲哚(4',6-di-amidino-2'-phenylindole, DAPI)染色液染所有细胞的细胞核, 室温孵育5min。PBS洗涤3次, 加入抗荧光淬灭封片液, 在荧光显微镜下观察。于200倍倒置荧光显微镜下, 计数6个视野中凋亡细胞数和总细胞数, 取均值, 计算细胞凋亡率: 细胞凋亡率=凋亡细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.10 MIN6细胞的克隆形成实验

MIN6细胞以500个/孔密度铺于12孔板中。使用DMSO(0.2%, 阴性对照)、TM($2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 阳性对照)、CCM25、TCM25、CCM27、TCM27处理MIN6细胞24h后, 使用正常培养基继续培养7d后吸弃上清, 用4%多聚甲醛室温固定10min, 再加入结晶紫染色, 10min后用PBS洗涤2次, 拍照记录实验结果并计算每孔中的细胞群落数, 克隆形成率=(克隆数/接种细胞数) $\times 100\%$ 。

1.11 MIN6细胞的分泌功能实验

1.11.1 葡萄糖刺激胰岛素分泌(glucose-stimulated insulin secretion, GSIS)实验 MIN6细胞以60万/孔密度铺于6孔板中。使用DMSO(0.2%, 阴性对照)、TM($2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 阳性对照)、CCM27、TCM27处理MIN6细胞24h后, 用克雷布斯林格缓冲液(Krebs-Ringer Buffer, KRB)洗涤2次, 并在KRB缓冲液中培养1h后, 一组换液成含 $3.3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖的培养基, 另一组换液成含 $16.7\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖的培养基。继续培养1h后, 收集细胞及上清液, 用小鼠INS ELISA试剂盒检测细胞内及上清液中的INS含量, MIN6细胞的INS分泌量采用“上清液INS浓度/细胞内INS浓度”表示。

1.11.2 葡萄糖刺激C肽分泌实验 MIN6细胞以60万/孔密度铺于6孔板中。使用DMSO(0.2%, 阴性对照)、TM($2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 阳性对照)、CCM27、TCM27处理MIN6细胞24h后, 用KRB缓冲液洗涤2次, 并在KRB缓冲液中培养1h后, 一组换液成含 $3.3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖的培养基, 另一组换液成含 $16.7\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖的培养基。继续培养1h后, 收集细胞及上清液, 用BCA试剂盒检测细胞

总蛋白含量, 用小鼠C肽ELISA试剂盒检测上清液中的C肽含量, MIN6细胞的C肽分泌量采用“上清液C肽浓度/总蛋白”表示。

1.12 统计学分析

采用Graphpad Prism 8软件对实验结果进行统计分析, 两组之间比较使用 t 检验, 多组之间比较使用方差分析, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 诱导口腔癌细胞ERS实验结果

在CAL-27细胞中, ERS标志物BiP在持续刺激组和间歇刺激组中4个时间点的mRNA相对表达量及蛋白表达量均高于0h(图1A、D、E), ERS标志物XBP1S、CHOP的mRNA相对表达量在持续刺激组的3h和间歇刺激组的3h+均高于0h(图1B、C), BiP、XBP1S、CHOP的mRNA相对表达量及BiP的蛋白表达量在持续刺激组和间歇刺激组组间同时间点比较的差异无统计学意义(图1)。

在SCC-25细胞中, BiP、XBP1S、CHOP在持续刺激组和间歇刺激组中3个时间点的mRNA相对表达量均高于0h, 持续刺激组和间歇刺激组组间同时间点比较的差异无统计学意义(图2)。

2.2 诱导MIN6细胞ERS实验结果

3、6、17、24h的BiP、XBP1S、CHOP的mRNA相对表达量高于0h(图3A~C), 3、6、17、24h的BiP的蛋白表达量高于0h(图3D、E)。

2.3 MIN6细胞的细胞凋亡实验结果

TM组相较0组、TCM27组相较CCM27组, 镜下见MIN6细胞的细胞凋亡比例增加(图4), 细胞凋亡率增加(图5)。

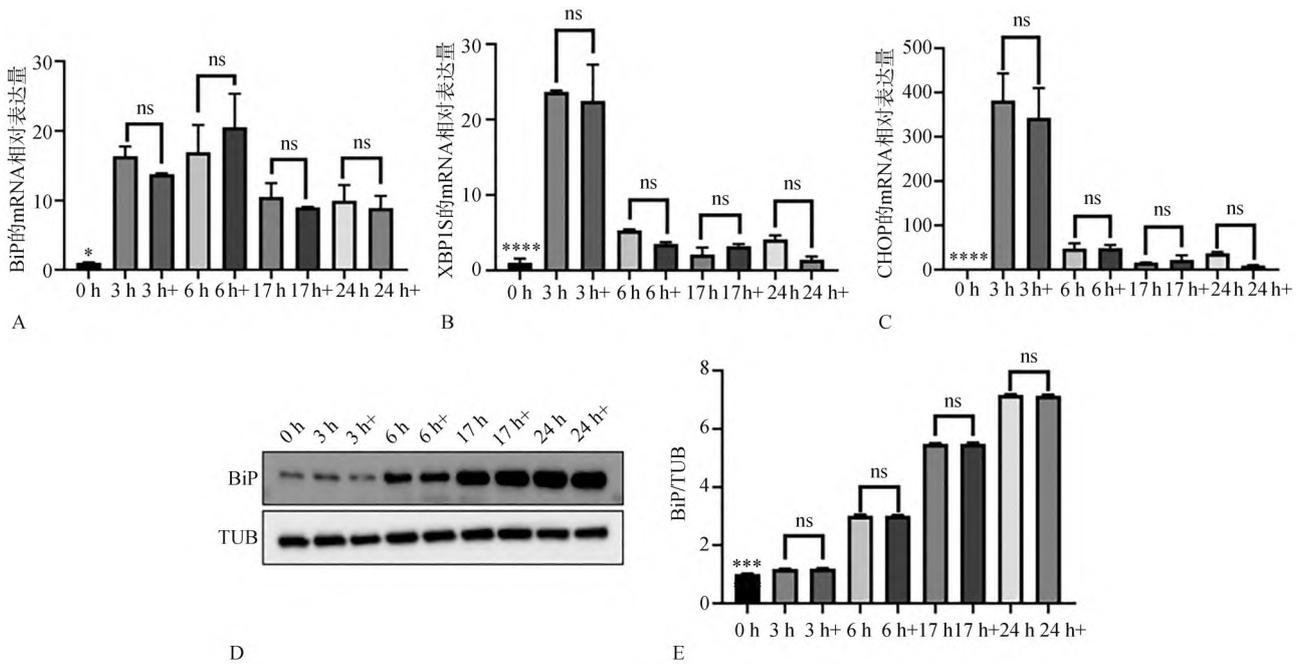
2.4 MIN6细胞的克隆形成实验结果

TM组相较0组、TCM25组相较CCM25组、TCM27组相较CCM27组, MIN6细胞克隆形成的群落数减少, 克隆形成率降低(图6)。

2.5 TERS实验结果

TM组相较0组、TCM25组相较CCM25组、TCM27组相较CCM27组, BiP、XBP1S的mRNA相对表达量上调(图7A~D), BiP的蛋白表达量上调(图7E~H)。

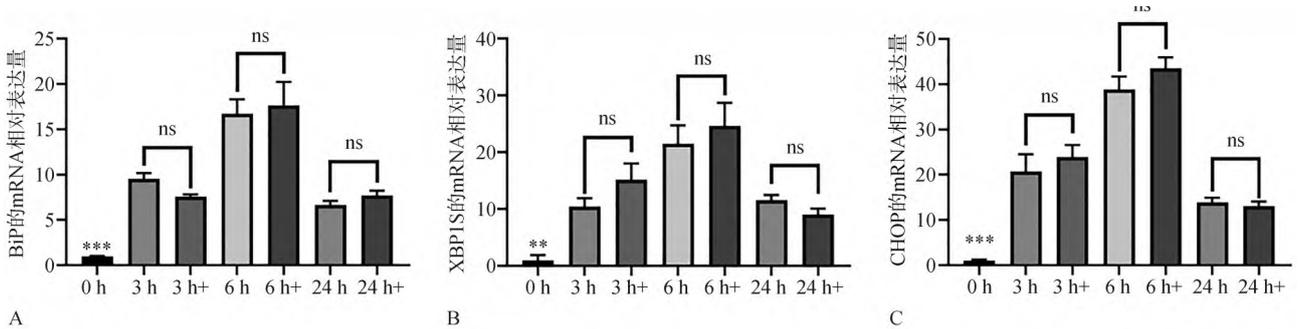
TM组相较0组、TCM25组相较CCM25组、TCM27组相较CCM27组, INS的蛋白表达量下调(图8A~D), INS的mRNA相对表达量上调(图8E~H)。



A: qPCR 检测 BiP 的 mRNA 相对表达量; B: qPCR 检测 XBP1S 的 mRNA 相对表达量; C: qPCR 检测 CHOP 的 mRNA 相对表达量; D、E: WB 检测 BiP 的蛋白表达量。+指细胞施加 TM 刺激 2 h 后撤除 TM。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ns 差异无统计学意义。

图 1 CAL-27 细胞的 ERS 标志物表达

Fig 1 Expression of ERS markers in CAL-27 cells



A: qPCR 检测 BiP 的 mRNA 相对表达量; B: qPCR 检测 XBP1S 的 mRNA 相对表达量; C: qPCR 检测 CHOP 的 mRNA 相对表达量。+指细胞施加 TM 刺激 2 h 后撤除 TM。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns 差异无统计学意义。

图 2 SCC-25 细胞的 ERS 标志物表达

Fig 2 Expression of ERS markers in SCC-25 cells

2.6 MIN6 细胞的分泌功能实验结果

2.6.1 GSIS 实验结果 在 3.3、16.7 mmol·L⁻¹ 两种浓度的葡萄糖刺激下，TM 组相较 0 组、TCM27 组相较 CCM27 组，INS 分泌量降低 (图 9)。

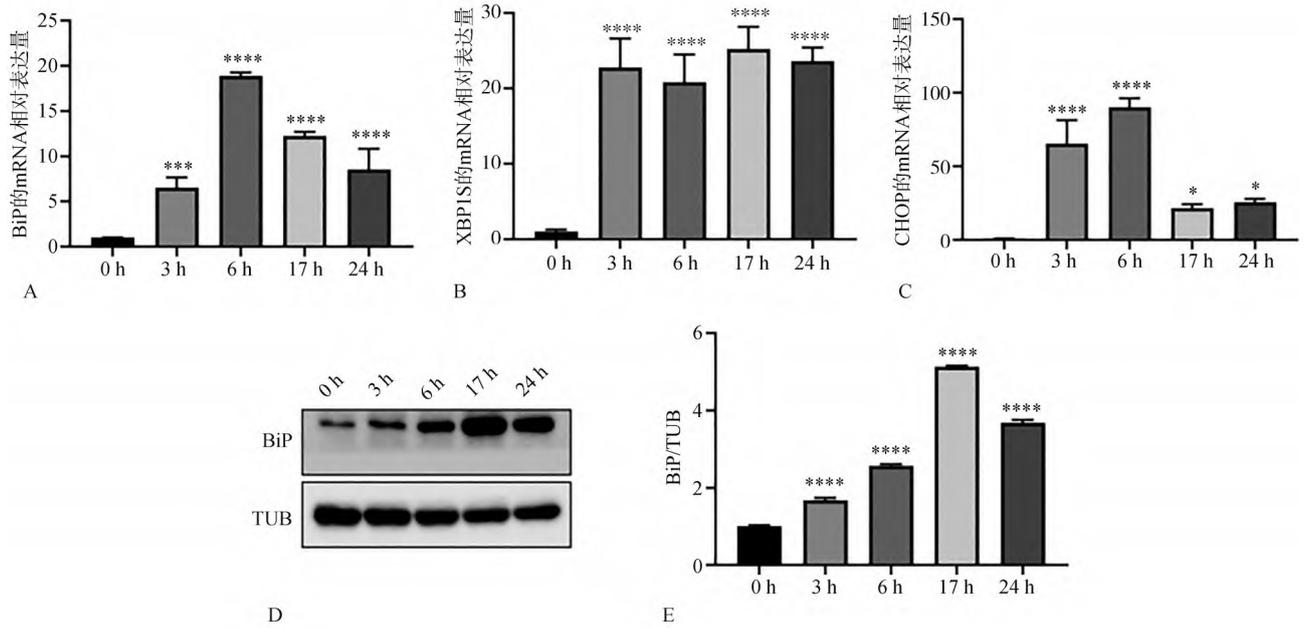
2.6.2 葡萄糖刺激 C 肽分泌的实验结果 在 3.3、16.7 mmol·L⁻¹ 两种浓度的葡萄糖刺激下，TM 组相较 0 组、TCM27 组相较 CCM27 组，C 肽分泌量降低 (图 10)。

3 讨论

TM 可以阻断 N-连接糖基化，从而影响真核细

胞糖蛋白的折叠，产生 ERS，激活 UPR，是 ERS 常用应激剂之一。UPR 的激活是因为内质网中累积的错误折叠或未折叠蛋白质竞争性地与 BiP 结合，3 种 ERS 感受器 (蛋白激酶 RNA 样内质网激酶、肌醇需要酶 1、激活转录因子 6) 与 BiP 解离并激活^[17-18]，启动下游 3 个主要信号通路 (蛋白激酶 RNA 样内质网激酶/真核起始因子 2 α 、肌醇需要酶 1/x-盒结合蛋白 1、激活转录因子 6)^[19]。通过查阅文献^[20]确定 TM 处理细胞的浓度范围，进行预实验。预实验中，不同浓度的 TM 分别处理 CAL-27、SCC-25、MIN6 细胞，镜下观察细胞状态，并通过 qPCR 检测 ERS 标志物的表达。预实验

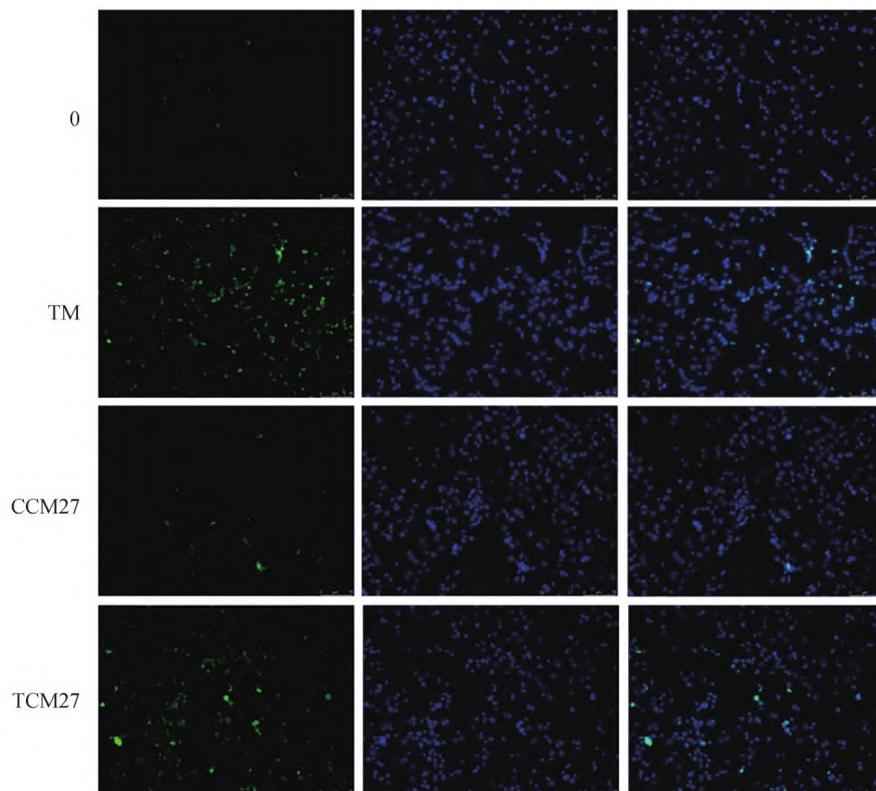
发现TM浓度在2 μg·mL⁻¹时, 镜下细胞未有大面积漂浮现象, 并通过qPCR检测ERS标志物明显上调, 确定了本研究TM浓度为2 μg·mL⁻¹。



A: qPCR检测BiP的mRNA相对表达量; B: qPCR检测XBP1S的mRNA相对表达量; C: qPCR检测CHOP的mRNA相对表达量; D、E: WB检测BiP的蛋白表达量。**P*<0.05, ****P*<0.001, *****P*<0.0001。

图3 MIN6细胞的ERS标志物表达

Fig 3 Expression of ERS markers in MIN6 cells



左: 凋亡细胞(绿色); 中: 细胞核(蓝色); 右: 合并图。

图4 MIN6细胞TUNEL染色结果 倒置荧光显微镜 ×200

Fig 4 TUNEL staining of MIN6 cells inverted fluorescence microscope ×200

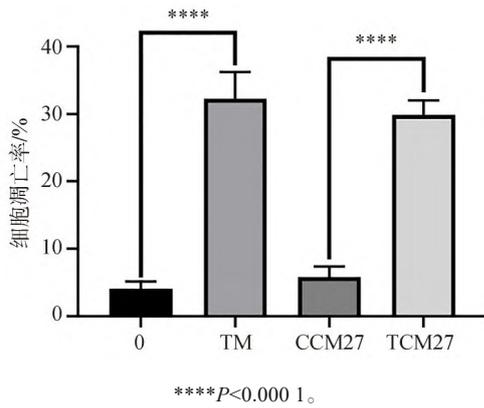


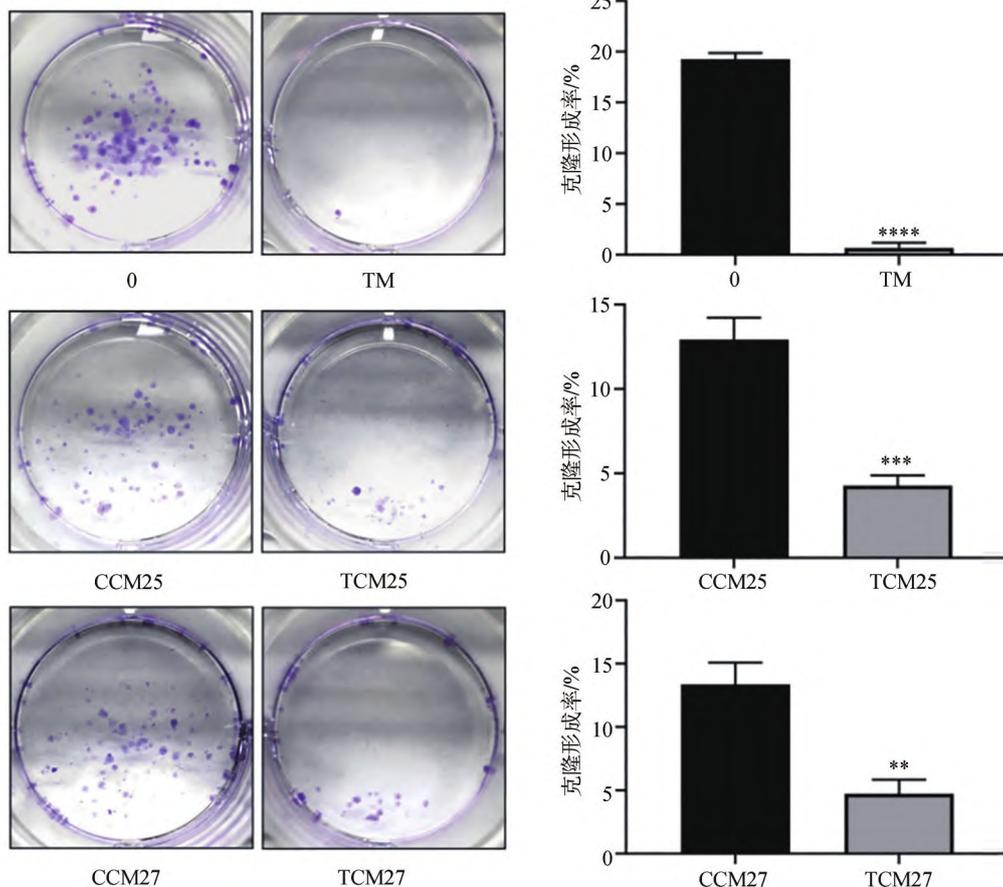
图 5 MIN6 细胞凋亡率

Fig 5 Apoptosis rate of MIN6 cells

在诱导 CAL-27 细胞 ERS 实验中，发现 ERS 标志物的表达在持续刺激组和间歇刺激组间同时间点比较的差异无统计学意义。表明对 CAL-27 细胞施加 TM 刺激 2 h 后撤除 TM，与持续施加 TM 刺激，两种刺激方式的 ERS 效应无明显差别。在

诱导 SCC-25 细胞 ERS 实验中，选择与诱导 CAL-27 细胞 ERS 实验相同的 TM 刺激时长 2 h，发现 ERS 标志物的表达在持续刺激组和间歇刺激组间同时间点比较的差异无统计学意义，可得出与 CAL-27 细胞相同的结论，意味着可收集 TM 刺激 2 h 后不含 TM 的口腔癌细胞条件培养基供后续实验。诱导 MIN6 细胞 ERS 实验发现，MIN6 细胞可以产生 ERS 现象。

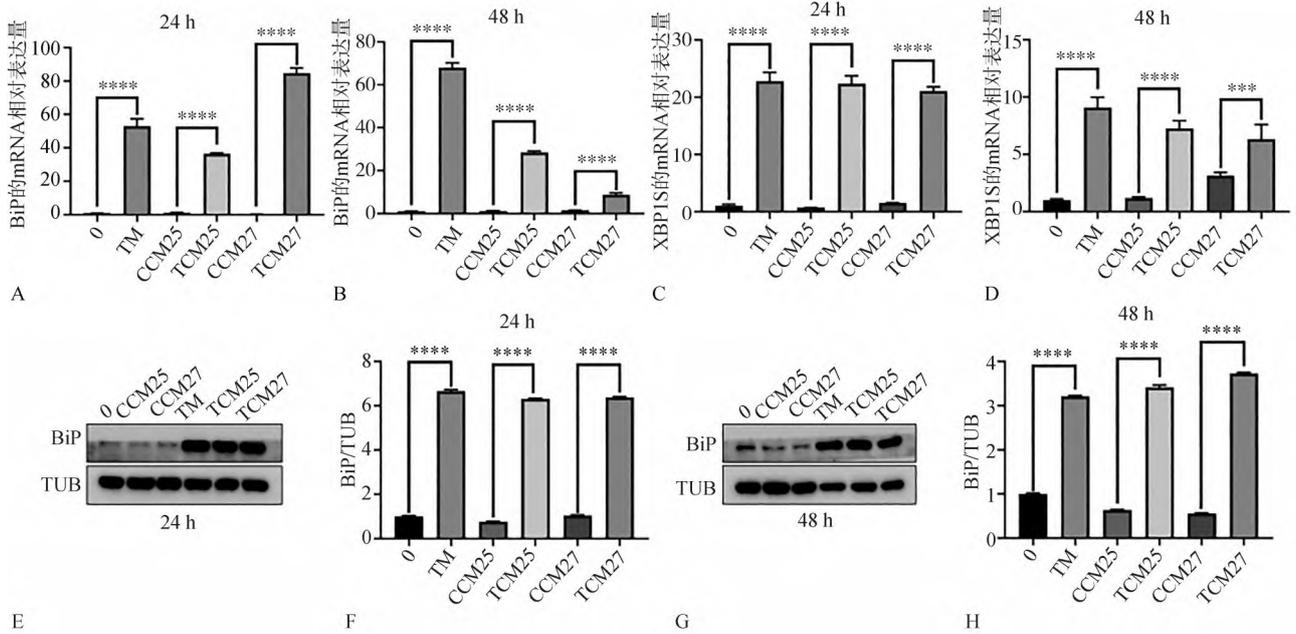
TERS 实验发现，ERS 的口腔癌细胞可将 ERS 传递给 MIN6 细胞，TERS 导致 MIN6 细胞的胰岛素合成减少，在翻译水平抑制胰岛素的合成。MIN6 细胞的细胞凋亡实验发现，TERS 的 MIN6 细胞凋亡现象增加。MIN6 细胞的克隆形成实验发现，TERS 的 MIN6 细胞增殖能力下降，这可能意味着 TERS 的胰岛 β 细胞存活能力下降。MIN6 细胞的分泌功能实验发现，MIN6 细胞的分泌功能下降。



左：克隆群落形成情况；右：克隆形成率。** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ，**** $P < 0.0001$ 。

图 6 MIN6 细胞的克隆形成能力

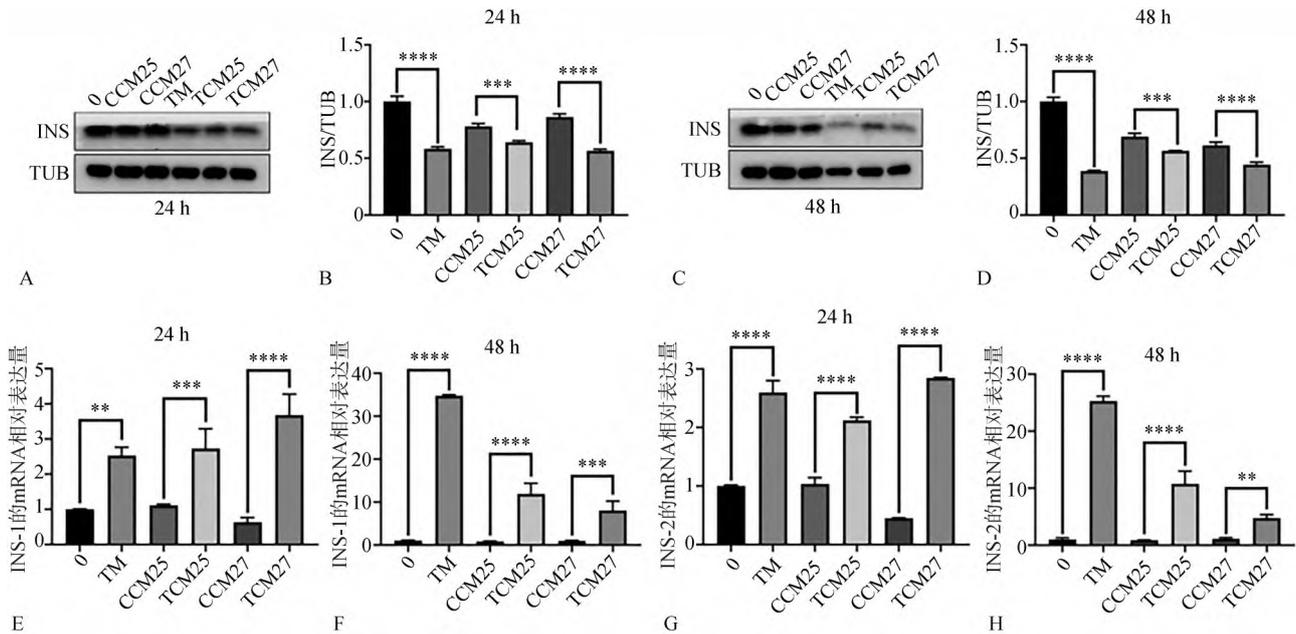
Fig 6 Colony formation ability of MIN6 cells



A: qPCR 检测处理 24 h 后 BiP 的 mRNA 相对表达量; B: qPCR 检测处理 48 h 后 BiP 的 mRNA 相对表达量; C: qPCR 检测处理 24 h 后 XBP1S 的 mRNA 相对表达量; D: qPCR 检测处理 48 h 后 XBP1S 的 mRNA 相对表达量; E、F: WB 检测处理 24 h 后 BiP 的蛋白表达量; G、H: WB 检测处理 48 h 后 BiP 的蛋白表达量。***P<0.001, ****P<0.0001。

图 7 MIN6 细胞的 ERS 标志物表达

Fig 7 Expression of ERS markers in MIN6 cells



A、B: WB 检测处理 24 h 后 INS 的蛋白表达量; C、D: WB 检测处理 48 h 后 INS 的蛋白表达量; E: qPCR 检测处理 24 h 后 INS-1 的 mRNA 相对表达量; F: qPCR 检测处理 48 h 后 INS-1 的 mRNA 相对表达量; G: qPCR 检测处理 24 h 后 INS-2 的 mRNA 相对表达量; H: qPCR 检测处理 48 h 后 INS-2 的 mRNA 相对表达量。**P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001。

图 8 MIN6 细胞的 INS 表达

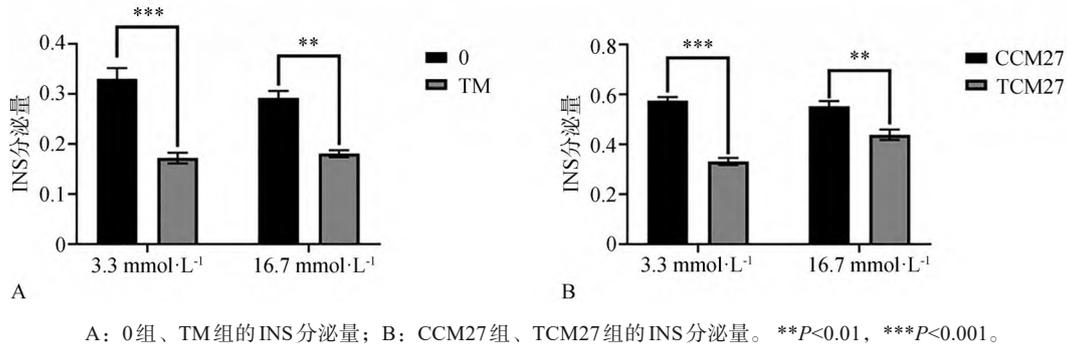
Fig 8 Expression of INS in MIN6 cells

在 TERS 实验和 MIN6 细胞的分泌功能实验中, MIN6 细胞的胰岛素合成在转录水平上调, 在翻译水平下调, 胰岛素分泌下调, 这三者结果出

现矛盾。内质网是加工分泌性蛋白质的主要场所, ERS 引起了蛋白质分泌的变化; 内质网和核糖体偶联密切, 是具有翻译功能的机器, ERS 抑制了

蛋白质的合成，导致细胞内胰岛素的减少；转录水平胰岛素上调的现象，可能原因是ERS状态下的胰岛β细胞尝试自我修复，加强负荷，代偿性地

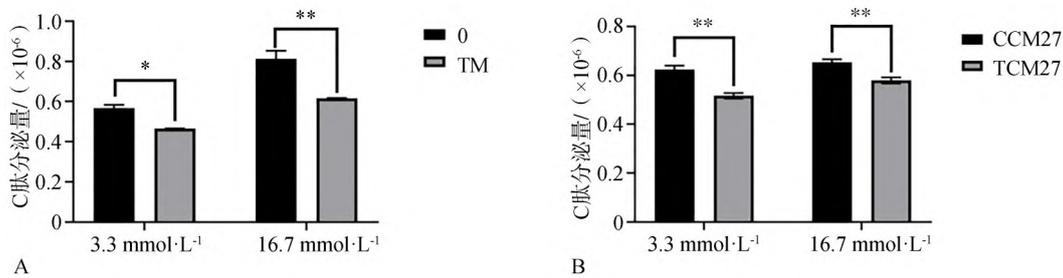
在转录水平合成更多胰岛素，具体机制尚不清楚，有待进一步的研究。



A: 0组、TM组的INS分泌量；B: CCM27组、TCM27组的INS分泌量。 **P<0.01, ***P<0.001。

图 9 MIN6细胞的INS分泌量

Fig 9 INS Secretion in MIN6 cells



A: 0组、TM组的C肽分泌量；B: CCM27组、TCM27组的C肽分泌量。 *P<0.05, **P<0.01。

图 10 MIN6细胞的C肽分泌量

Fig 10 C-peptide Secretion in MIN6 cells

有研究表明，癌症恶病质能降低参与胰岛素分泌的相关胰岛蛋白的表达。Violato等^[21]研究发现，与对照组小鼠相比，在皮下接种实体艾氏肿瘤细胞的小鼠中，参与胰岛素分泌不同通路的关键蛋白在胰腺中表达明显减少。也有研究^[22]表明，恶性肿瘤能抑制胰岛素的分泌，与对照组相比，Walker 256荷瘤大鼠的胰岛在受到葡萄糖刺激时，胰岛素分泌减少。ERS可导致胰岛β细胞衰竭，表现为胰岛素分泌的丧失和因凋亡导致的胰岛β细胞数量下降^[23-24]。

关于是何种介质导致TERS现象的发生，有研究表明产生TERS现象的介质可能与外泌体有关。Javeed等^[14]发现，胰腺癌将富含肾上腺髓质素的外泌体释放到血液中，胰岛β细胞摄入此类外泌体后会出现ERS，导致胰岛素分泌障碍、胰岛功能受损。本实验初步探究了口腔癌细胞通过TERS对胰岛β细胞功能的影响，为TERS的机制研究打下基础，有一定临床研究价值，在为口腔癌患者提供有效的治疗策略以提高患者预后方面有一定的临床意义。

本实验存在一定的局限性。首先由于没有公认的小鼠口腔鳞状细胞癌细胞系和人的胰岛β细胞系的限制，本实验使用了人的口腔鳞状细胞癌细胞系的CAL-27、SCC-25细胞和小鼠胰岛素瘤6细胞系的MIN6细胞。MIN6细胞与胰岛β细胞有共同的形态生理特征，当受到刺激时，它们会分泌胰岛素并表达特定的UPR标志物，因此被广泛用于研究^[25]。前期研究发现，ERS的CAL-27、SCC-25细胞分别与相应同种细胞培养，后者能产生ERS；本实验研究发现，ERS的CAL-27、SCC-25细胞上清加入MIN6细胞，后者也能产生ERS，这在一定程度上体现了TERS现象物种的保守性。其次，本实验研究均为体外实验，未进行体内实验，实验结果证据较弱，未来可通过对小鼠定期注射TM、TCM、CCM，记录小鼠的体重、血糖、血清胰岛素变化，以及用免疫组化法检测ERS标志物和胰岛素表达情况等实验方法，进行进一步的研究。

综上所述，本实验发现了口腔癌细胞可通过TERS引起胰岛β细胞应激，导致其凋亡增加，存活能力下降，合成及分泌胰岛素能力下降，在研

究口腔癌症恶病质对胰岛 β 细胞功能障碍中有一定的意义。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

- [1] Braakman I, Bulleid NJ. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum[J]. *Annu Rev Biochem*, 2011, 80: 71-99.
- [2] Stefan CJ, Manford AG, Baird D, et al. Osh proteins regulate phosphoinositide metabolism at ER-plasma membrane contact sites[J]. *Cell*, 2011, 144(3): 389-401.
- [3] Jiang Z, Zhang GR, Huang LW, et al. Transmissible endoplasmic reticulum stress: a novel perspective on tumor immunity[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 846.
- [4] Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(2): 89-102.
- [5] Kim C, Kim B. Anti-cancer natural products and their bioactive compounds inducing ER stress-mediated apoptosis: a review[J]. *Nutrients*, 2018, 10(8): E1021.
- [6] Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1833(12): 3460-3470.
- [7] Hetz C, Papa FR. The unfolded protein response and cell fate control[J]. *Mol Cell*, 2018, 69(2): 169-181.
- [8] Almanza A, Carlesso A, Chintia C, et al. Endoplasmic reticulum stress signalling—from basic mechanisms to clinical applications[J]. *FEBS J*, 2019, 286(2): 241-278.
- [9] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.
- [10] Wang M, Kaufman RJ. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(9): 581-597.
- [11] Kaneko M, Imaizumi K, Saito A, et al. ER stress and disease: toward prevention and treatment[J]. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40(9): 1337-1343.
- [12] Hetz C, Chevet E, Oakes SA. Proteostasis control by the unfolded protein response[J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(7): 829-838.
- [13] Mahadevan NR, Rodvold J, Sepulveda H, et al. Transmission of endoplasmic reticulum stress and pro-inflammation from tumor cells to myeloid cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(16): 6561-6566.
- [14] Javeed N, Sagar G, Dutta SK, et al. Pancreatic cancer-derived exosomes cause paraneoplastic β -cell dysfunction[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(7): 1722-1733.
- [15] Papa FR. Endoplasmic reticulum stress, pancreatic β -cell degeneration, and diabetes[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(9): a007666.
- [16] Ghemrawi R, Battaglia-Hsu SF, Arnold C. Endoplasmic reticulum stress in metabolic disorders[J]. *Cells*, 2018, 7(6): 63.
- [17] Pincus D, Chevalier MW, Aragón T, et al. BiP binding to the ER-stress sensor Ire1 tunes the homeostatic behavior of the unfolded protein response[J]. *PLoS Biol*, 2010, 8(7): e1000415.
- [18] Kopp MC, Larburu N, Durairaj V, et al. UPR proteins IRE1 and PERK switch BiP from chaperone to ER stress sensor[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2019, 26(11): 1053-1062.
- [19] Zheng QP, Bao CY, Guo WJ, et al. Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11215.
- [20] Puyal J, Pétremand J, Dubuis G, et al. HDLs protect the MIN6 insulinoma cell line against tunicamycin-induced apoptosis without inhibiting ER stress and without restoring ER functionality[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 381(1/2): 291-301.
- [21] Violato NM, Rafacho A, Boschero AC, et al. Higher insulin sensitivity and impaired insulin secretion in cachectic solid Ehrlich tumour-bearing mice[J]. *Horm Et Metab*, 2014, 46(9): 615-620.
- [22] el Razi Neto S, Zorn TM, Curi R, et al. Impairment of insulin secretion in pancreatic islets isolated from Walker 256 tumor-bearing rats[J]. *Am J Physiol*, 1996, 271(3 Pt 1): C804-C809.
- [23] Moin ASM, Butler AE. Alterations in beta cell identity in type 1 and type 2 diabetes[J]. *Curr Diab Rep*, 2019, 19(9): 83.
- [24] Yalcinkaya M, Kerksiek A, Gebert K, et al. HDL inhibits endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis of pancreatic β -cells *in vitro* by activation of Smoothed[J]. *J Lipid Res*, 2020, 61(4): 492-504.
- [25] Skelin M, Rupnik M, Cencic A. Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research [J]. *ALTEX*, 2010, 27(2): 105-113.

(本文编辑 张玉楠)