

Preliminary study on the role and mechanism of SYT7 regulating HMGB3 in non-small cell lung cancer

Yarui Zhang Gen Teng Liguang Zhang Di Wu Cuimin Zhu*

Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde, Hebei, 067000, China

Abstract

Objective: Detect the expression of SYT7 and HMGB3 in NSCLC cells and explore whether SYT7 affects the progression of NSCLC cells by regulating HMGB3. **Methods:** The expression of SYT7 and HMGB3 in NSCLC cell lines was detected by real-time fluorescence quantitative PCR technology (qRT-PCR) and Western blot assay. Transfect siSYT7 and siNC in H1299 and H520 cell lines, respectively, and detect the expression of HMGB3. **Results:** Cell experiments have shown that SYT7 and HMGB3 are highly expressed at mRNA and protein levels in H1299 and H520 cell lines. After knocking down SYT7, the mRNA and protein expression of HMGB3 decreased. **Conclusions:** This experiment demonstrates that SYT7 may Promote the Progression of lung cancer by regulating HMGB3.

Keywords

non-small cell lung cancer; Synaptic binding Protein 7; High migration rate group box 3

SYT7 调控 HMGB3 在非小细胞肺癌中的作用及机制的初步研究

张亚睿 滕根 张立广 吴迪 朱翠敏*

承德医学院附属医院, 中国·河北承德 067000

摘要

目的: 检测NSCLC细胞肺癌细胞系H1299和肺鳞癌细胞系H520中SYT7和HMGB3的表达, 探究SYT7是否通过调控HMGB3影响NSCLC细胞的进展。**方法:** 通过实时荧光定量PCR技术(qRT-PCR)和蛋白免疫印迹实验(Western blot)检测H1299和H520细胞系中SYT7和HMGB3的表达情况。在H1299和H520细胞系中分别转染siSYT7和siNC, 采用qRT-PCR和Western blot检测HMGB3的表达。**结果:** 细胞实验证明, SYT7、HMGB3在H1299和H520细胞系中mRNA和蛋白水平高表达。敲减SYT7后, HMGB3的mRNA和蛋白表达均下降。**结论:** 该实验证明SYT7可能通过调控HMGB3促进肺癌的进展。

关键词

非小细胞肺癌; 突触结合蛋白7; 高迁移率组蛋白3

1 引言

肺癌是全球范围内最常见的恶性肿瘤之一, 在2022年世界卫生组织国际癌症研究机构最新发布的数据中显示^[1,2], 其在全球癌症死亡率排名中位居首位。

肺癌是一种源于肺部支气管黏膜或腺体的恶性肿瘤, 肺癌在组织病理学上主要分为非小细胞肺癌(non small cell lung cancer, NSCLC)和小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)两大类。其中约80%的肺癌类型为NSCLC, 包括鳞

状细胞癌(鳞癌)、腺癌、大细胞癌等亚型。及早诊断对改善患者预后具有一定的积极意义。并且发现新的生物标志物对临床医生诊断治疗以及预测预后十分关键^[3]。

近年来, 相继有研究报道突触结合蛋白7(synaptic binding protein 7, SYT7)参与恶性肿瘤的发病及进展。SYT7在肺癌、甲状腺癌、肝癌、胃癌、结直肠癌、脑胶质瘤等恶性肿瘤中高表达并且促进肿瘤的发生发展^[4-10]。但SYT7影响肺癌的具体机制的研究少见报道。高迁移率组蛋白B(HMGB)3参与结直肠癌、膀胱癌、乳腺癌及非小细胞肺癌等多种恶性肿瘤的发生。课题组前期工作已经证实, HMGB3在NSCLC癌组织和细胞系中均高表达, 且与NSCLC的发生发展密切相关^[11]。而在NSCLC中SYT7能否调控HMGB3的表达尚未见报道。因此本文主要探索SYT7与HMGB3在NSCLC的关系。

【作者简介】张亚睿(1997-), 女, 中国河南濮阳人, 在读硕士, 从事肺癌的基础与临床研究。

【通讯作者】朱翠敏(1981-), 女, 中国河北唐山山人, 在读博士, 主任医师, 从事肺癌的基础与临床研究。

2 材料与方法

2.1 细胞及主要试剂

本项研究所采用的正常人支气管上皮细胞 (HBE) 系由承德医学院附属医院中心实验室馈赠, 人源非小细胞肺癌 (H1299) 和鳞癌 (H520) 细胞系购自武汉普诺赛生命科技有限公司。SiSYT7 及对照 siNC 购自广州锐博生物技术有限公司。SYT7 兔源一抗购自中国爱博泰克有限公司。

2.2 方法

2.2.1 细胞培养

将细胞放入 37°C、5%CO₂ 的细胞培养箱中, 用 10% 1640 培养基培养。

2.2.2 细胞转染

用 liPo3000 试剂将 siSYT7 及其对照 siNC 分别转入六孔板中, 无血清培养基培养 6 小时后换完全培养基。

2.2.3 qRT-PCR 实验

收集细胞样品提取总 RNA, 利用微量分光光度计检测 RNA 浓度。按照说明书反转成 cDNA, 配置体系上机进行 mRNA 扩增。SYT7 正向引物序列 5' -ACTCCATCATCGTGAACATCA-3', 反向引物序列 5' -ACTCCATCATCGTGAACATCA-3'。HMGB3 正向引物序列 5' -ACACTCCAGCTGGGGTCCAG-3', 反向引物序列 5' -TGTCGTGGAGTCGGCAATTC-3'。GAPDH 正向引物序列 5' -GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3', 反向引物序列 5' -TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'。

2.2.4 Western Blot 实验

收集细胞样品提取蛋白液制备样品, 进行电泳和转膜。将转印完毕的 PVDF 膜浸于配制好的 5% 脱脂奶粉中封闭过夜。加一抗孵育 3h 后, 漂洗 3 次。二抗孵育 1h, 漂洗 3 遍, 配置显影液, 显像前均匀滴在膜上, 放入 C300 显影仪中显影, 保存图片做好记录。

三、统计学分析

本研究所有数据统计分析采用 SPSS 25.0 版本分析, 图表用 GraPhPad Prism 9.0 绘制。方差分析细胞系中 SYT7 mRNA 和蛋白的表达差异, 以 $P < 0.05$ 被认为差异或关联有统计学意义。

3 结果

3.1 SYT7、HMGB3 在 NSCLC 癌细胞系中的表达情况

结果显示, 和 HBE 相比, SYT7、HMGB3 蛋白表达水平于 NSCLC 细胞系中均显著升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (见图 1)。

3.2 SYT7 调控 HMGB3 对 NSCLC 细胞的影响

敲减 SYT7 后利用 Western blot、qRT-PCR 验证下调 SYT7 基因后 HMGB3 蛋白和 mRNA 的变化。结果提示, 当敲减 SYT7 后, 相对于 NC 组 HMGB3 的 mRNA 和蛋白表达均下降 (见图 2A-B)。

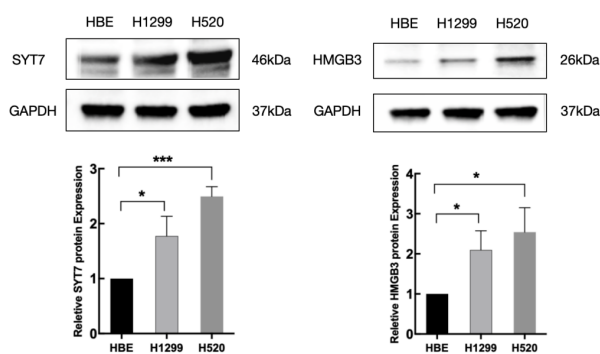


图 1 SYT7 和 HMGB3 蛋白在 NSCLC 细胞中的表达情况

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$

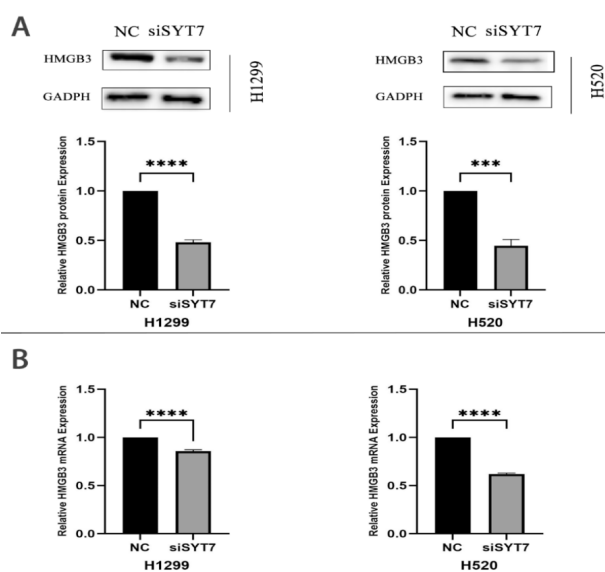


图 2 敲减 SYT7 后 HMGB3 的蛋白和 mRNA 表达情况

A: HMGB3 蛋白在 NSCLC 细胞系中的表达;

B: HMGB3 mRNA 在 NSCLC 细胞系中的表达;

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$

4 讨论

肺癌是世界范围内最常见的癌症之一, 也是癌症死亡的主要原因^[12]。研究肺癌发病的分子机制, 不仅有助于进行早期筛查, 还有利于找到新的治疗靶点。

SYT7 是突触囊泡结合蛋白家族重要成员之一, 表达于多种细胞膜上, 其介导突触传递过程中钙依赖性的膜转运调控^[13]。而近年来, 已有多篇报道证实 SYT7 在肿瘤发生中存在的致癌作用。在多种恶性肿瘤中, SYT7 表达上调, 促进肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。例如在胃癌中^[7], SYT7 已被证明是转移形成的驱动因子, 此外, SYT7 还可以促进结肠癌细胞和脑胶质母细胞瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力^[8, 9]。但是在肺癌中的作用机制尚未被研究。

其中 HMGB 家族包括 HMGB1、HMGB2、HMGB3

和HMGB4, 可调控DNA复制、转录、重组和修复机制, 其介导了感染、损伤和炎症反应, 其中, HMGB3作为重要成员之一, 它是多种癌症的致癌基因, 它通过调控Wnt/ β -catenin、MAPK、Akt等信号通路、调节细胞周期来促进癌细胞的增殖和侵袭^[14-17]。

课题组前期工作已经证实, HMGB3可以通过抑制Notch1信号通路调控NSCLC的发生发展, 但其上游调控机制较为复杂。我们在查阅文献时注意到, SYT7基因与HMGB3基因作为原癌基因, 都能够促进肿瘤的发生发展, 有研究者通过GeneChIP和Ingenuity通路分析结合细胞相关实验已经证实了SYT7可以通过间接调控HMGB3的泛素化从而促进甲状腺癌的发生发展^[18], 但在NSCLC中两者的关系却尚未有报道, 因此本文选择研究在NSCLC中SYT7能否调控HMGB3及对细胞的影响。

我们的研究结果显示, 与正常细胞系HBE相比, SYT7、HMGB3在NSCLC细胞系中的mRNA和蛋白水平显著升高。通过敲减SYT7发现HMGB3的表达发生一致性变化, HMGB3在NSCLC细胞系中相对于NC组的mRNA和蛋白表达下降。因此, 推断SYT7对于HMGB3可能存在正向调控关系。

综上所述, 通过敲减SYT7发现HMGB3表达相应下调, 提示SYT7可能通过正向调控HMGB3促进NSCLC细胞的进展, 这些结论为临床上发现新的早期筛查标志物及新的治疗靶点提供了可行的理论思路, 对NSCLC的诊疗和预后判断具有一定的现实意义。

参考文献

- [1] CAO, W, CHEN, H. D, YU, Y. W, et al. Changing Profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J]. Chin Med J (Engl), 2021, 134(7): 783-791.
- [2] SUNG, H, FERLAY, J., SIEGEL, R. L., et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [3] DI PAOLO, A, DEL RE, M., PETRINI, I., et al. Recent advances in ePigenomics in NSCLC: real-time detection and therapeutic implications[J]. EPigenomics, 2016, 8(8): 1151-1167.
- [4] HAN, Q, ZOU, D., LV, F., et al. High SYT7 expression is associated with Poor Prognosis in human non-small cell lung carcinoma[J]. Pathol Res Pract, 2020, 216(9): 153101.
- [5] DONG, S, PAN, J., SHEN, Y. B., et al. SYT7 Plays a role in Promoting thyroid cancer by mediating HMGB3 ubiquitination[J]. Endocr Relat Cancer, 2022, 29(4): 175-189.
- [6] JIN, H, PANG, Q., FANG, M., et al. Syt-7 overexpression Predicts Poor Prognosis and Promotes cell Proliferation in hepatocellular carcinoma[J]. Future Oncol, 2020, 16(34): 2809-2819.
- [7] KANDA, M, TANAKA, H., SHIMIZU, D., et al. SYT7 acts as a driver of hepatic metastasis formation of gastric cancer cells[J]. Oncogene, 2018, 37(39): 5355-5366.
- [8] WANG, K, XIAO, H., ZHANG, J., et al. Synaptotagmin 7 Is Overexpressed In Colorectal Cancer And Regulates Colorectal Cancer Cell Proliferation[J]. J Cancer, 2018, 9(13): 2349-2356.
- [9] XIAO, B, LI, J., FAN, Y., et al. Downregulation of SYT7 inhibits glioblastoma growth by Promoting cellular apoptosis[J]. Mol Med ReP, 2017, 16(6): 9017-9022.
- [10] FU, Y, TIAN, G., ZHANG, Z., et al. SYT7 acts as an oncogene and a Potential therapeutic target and was regulated by Δ NP63 α in HNSCC[J]. Cancer Cell Int, 2021, 21(1): 696.
- [11] 李新洋. miR145-5P/HMGB3轴调控Notch信号通路抑制NSCLC进展的研究[D]. 导师: 朱翠敏. 承德医学院, 2023.
- [12] XIA, C, DONG, X., LI, H., et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: Profiles, trends, and determinants[J]. Chin Med J (Engl), 2022, 135(5): 584-590.
- [13] WEYRER, C, TURECEK, J., HARRISON, B., et al. Introduction of synaptotagmin 7 Promotes facilitation at the climbing fiber to Purkinje cell synapse[J]. Cell ReP, 2021, 36(12): 109719.
- [14] MI, L, ZHANG, N., WAN, J., et al. Remote ischemic Postconditioning alleviates ischemia/reperfusion-induced intestinal injury via the ERK signaling pathway mediated RAGE/HMGB axis[J]. Mol Med ReP, 2021, 24(5).
- [15] LI, Y, MA, Y., ZHANG, T., et al. High-mobility group box 3 (HMGB3) silencing inhibits non-small cell lung cancer development through regulating Wnt/ β -catenin pathway[J]. Biol Chem, 2020, 401(10): 1191-1198.
- [16] ZHANG, S, LIU, J., YUAN, T., et al. Circular RNA 0001313 Knockdown Suppresses Non-Small Cell Lung Cancer Cell Proliferation and Invasion via the microRNA-452/HMGB3/ERK/MAPK Axis[J]. Int J Gen Med, 2020, 13: 1495-1507.
- [17] GU, M, JIANG, Z., LI, H., et al. MiR-93/HMGB3 regulatory axis exerts tumor suppressive effects in colorectal carcinoma cells[J]. Exp Mol Pathol, 2021, 120: 104635.
- [18] DONG, S., PAN, J., SHEN, Y. B., et al. SYT7 Plays a role in Promoting thyroid cancer by mediating HMGB3 ubiquitination[J]. Endocr Relat Cancer, 2022, 29(4): 175-189.