

基础研究论著

细胞分化周期蛋白 27 基因沉默抑制 GH3 细胞迁移及其分泌功能

苏 星¹, 王安平¹, 郭清华^{1,2}, 母义明¹¹解放军总医院 内分泌科, 北京 100853; ²解放军总医院海南分院 内分泌科, 海南三亚 572013

摘要: **目的** 进行 3 种全基因组外显子测序所得基因体外的功能验证, 为垂体柄中断综合征病因研究的体内实验提供理论依据。 **方法** 将细胞分化周期蛋白 27 (cell division cycle protein 27, CDC27)、神经纤维瘤病 1 型 (neurofibromatosis type 1, NF1)、X 染色体关联的泛素特异性蛋白酶 9 (ubiquitin specific peptidase 9, X-Linked, USP9X) 三种基因经由小干扰 RNA (siRNA) 分别转染至细胞内, 每种基因均设置实验组、阴性对照 (negative control, NC) 组、空白细胞组。通过 RT-PCR 筛选出各基因最佳的 siRNA 敲低序列以用于复筛, Western bolt 复筛各基因最佳敲低序列在蛋白水平的表达, 以确定目标基因进行下一步研究。依次运用 CCK-8 检测细胞增殖能力及形态, 细胞划痕实验检测细胞迁移, 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测细胞分泌功能, Western bolt 检测垂体特异性转录因子 -1 (pit-oct-unc class 1 homeobox 1, POU1F1) 和垂体特异性转录因子祖先蛋白 (homeobox protein prophet of pit-1, PROP1) 表达水平。 **结果** 1) CDC27 在 siRNA 117 和 1968 序列时能够达到稳定的沉默效率, 并且在 mRNA 及蛋白两个水平上均能够被敲低, NF1 和 USP9X 仅能在 mRNA 水平上实现敲低而未实现蛋白水平的敲低, 无法进行后续实验; 2) CDC27 沉默对于细胞的增殖及形态无明显影响 ($P > 0.05$); 3) CDC27 沉默能够明显抑制细胞的迁移能力 ($P < 0.05$); 4) CDC27 沉默能够明显抑制细胞分泌生长激素 (growth hormone, GH)、泌乳素 (prolactin, PRL) 分泌 (P 均 < 0.05), 对促甲状腺激素 (thyroid stimulating hormone, TSH) 的分泌无明显影响 ($P > 0.05$); 5) CDC27 沉默能够明显下调 POU1F1 与 PROP1 的表达水平 ($P < 0.05$)。 **结论** CDC27 沉默可以抑制 GH3 细胞的迁移及其生长激素、泌乳素的分泌。

关键词: 细胞分化周期蛋白 27; 神经纤维瘤病 I 型基因; X 染色体关联的泛素特异性蛋白酶 9; 垂体柄中断综合征; 垂体特异性转录因子 -1; 垂体特异性转录因子祖先蛋白

中图分类号: R 329.2 文献标志码: A 文章编号: 2095-5227(2018)04-0324-09 DOI: 10.3969/j.issn.2095-5227.2018.04.014

网络出版时间: 2018-03-26 15:17 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/10.1117.R.20180326.1517.004.html>

Cell division cycle protein 27 gene silencing inhibited GH3 migration and its secretion function

SU Xing¹, WANG Anping¹, GUO Qinghua^{1,2}, MU Yiming¹¹Department of Endocrinology and Metabolism, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ²Department of Endocrinology and Metabolism, Hainan Branch of Chinese PLA General Hospital, Sanya 572013, Hainan Province, China

Corresponding author: GUO Qinghua. Email: gqh301@sina.com

Abstract: Objective To verify the function of three genes obtained from Whole-Exome Sequencing (WES) in vitro, in order to lay the theoretical foundation for pituitary stalk interruption syndrome etiology research. **Methods** The cell division cycle protein 27 (CDC27) siRNA, neurofibromatosis type 1 (NF1) gene siRNA, ubiquitin specific peptidase 9, X-linked (USP9X) siRNA were transfected into GH3 cells respectively and every gene was set up in experiment group, negative control (NC) group and blank control group. The real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was adopted to screen expressions of mRNA of each gene to determine the maximum knockdown efficiency at first, then western bolt (WB) were utilized for secondary screening to determine the optimal gene at the protein levels. Cell counting kit-8 (CCK-8) was used to detect cell proliferation and morphology, wound healing assay for cell migration, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for hormone secretion ability, and WB for expression levels of pit-oct-unc class 1 homeobox 1 (POU1F1) and homeobox protein prophet of Pit-1 (PROP1). **Results** 1) CDC27 could be knocked down by siRNA-117 and siRNA-1968 at both protein and mRNA levels, while NF1 and USP9X could only be knocked down at mRNA level, thus causing a halt to follow-up experiments; 2) CDC27 silencing had no significant effect on the proliferation and morphology of GH3 cells ($P > 0.05$); 3) CDC27 silencing inhibited cell migration ($P < 0.05$); 4) CDC27 silencing inhibited GH and PRL secretion significantly (all $P < 0.05$), but no significant effect was found on TSH ($P > 0.05$); 5) CDC27 silencing inhibited both POU1F1 and

收稿日期: 2017-12-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81570705; 81270866); 海南省自然科学基金项目 (20168353); 海南省卫计委课题 (15A200071)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81570705; 81270866); the Natural Foundation of Hainan Province Project (20168353); Wei Planning Commission of Hainan Province (15A200071)

作者简介: 苏星, 男, 硕士, 主治医师。研究方向: 垂体疾病。Email: 526763403@qq.com

通信作者: 郭清华, 女, 博士, 主任医师, 硕士生导师。Email: gqh301@sina.com

PROP1 expression significantly (all $P < 0.05$). **Conclusion** CDC27 silencing suppresses GH3 cell migration and GH and PRL secretion. **Keywords:** cell division cycle protein 27; neurofibromatosis type 1 gene; ubiquitin specific peptidase 9, X-Linked; pituitary stalk interruption syndrome; pit-oct-unc class 1 homeobox 1; homeobox protein prophet of pit-1

垂体柄中断综合征 (pituitary stalk interruption syndrome, PSIS) 是指由于垂体柄的纤细和 (或) 缺如导致下丘脑分泌的各种促激素释放激素不能发挥生理作用而引起的一系列临床综合征, 其典型的临床特征为不同程度的腺垂体激素分泌缺乏, 常伴有垂体外中线结构发育异常或畸形, 对患者的生活质量产生很大的负面影响。有关该病的致病因素目前倾向于两个方面: 一是围生期不良事件对垂体一下丘脑区域造成损伤; 二是先天基因缺陷导致垂体下丘脑的发育异常^[1]。迄今为止, 已经发现的致病基因有 HESX1、LHX4、PROP1、PROKR2、PROKR2、OTX2、SOX3、GPR161、CDON^[2-8]。基因突变极有可能成为其主要的病因, 但目前已经发现的基因导致 PSIS 发病的比例还不到 5%^[9], 提示可能存在其他致病基因未被发现。垂体特异性转录因子 -1 和垂体特异性转录因子祖先蛋白在胚胎早期表达较高, 在垂体发育过程中起着十分重要的作用^[10-11]。该基因已经在多个种群的矮小型畸形研究中得到了证实, 最主要的作用是引起多种垂体激素的缺乏而导致矮小现象的出现^[12-13]。为进一步获得功能性研究的理论依据, 本实验选取来自于临床病例中检测得到的细胞分化周期蛋白 27 (cell division cycle protein 27, CDC27)、神经纤维瘤病 1 型 (neurofibromatosis type 1, NF1)、X 染色体关联的泛素特异性蛋白酶 9 (ubiquitin specific peptidase 9, X-Linked, USP9X) 基因, 对 3 种基因预先筛选后, 研究其对 GH3 细胞性状的影响。

材料和方法

1 主要实验试剂及仪器 大鼠垂体瘤细胞 (GH3), 购自中国协和医科大学基础医学细胞中心; F-12K (Thermo 公司, 美国); 2.5% 胎牛血清 (FBS, Thermo 公司, 美国); 15% 马血清 (HS, 应用生物系统公司, 美国); 胰酶 (0.25% EDTA, Thermo 公司, 美国); **Rfect 细胞小核酸转染试剂 (百代生物科技有限公司, 常州)**; 细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8, DojinDo 公司, 日本); 鼠 CDC27 单克隆抗体、鼠 NF1 单克隆抗体、鼠 USP9X 单克隆抗体、鼠 POU1F1 单克隆抗体、鼠 PROP1 单克隆抗体 (Santa Cruz 生物技术有限公司, 美国); 鼠生长激素放免试剂盒 (GH ELISA 试剂盒); 鼠泌乳素放免试剂盒 (PRL ELISA 试剂盒); 鼠促甲状

腺激素放免试剂盒 (TSH ELISA 试剂盒, 健坤生物技术有限公司, 北京); Millipore 超纯水制备系统 Milli-Q (Millipore 公司, 美国); CFX96 RT-PCR 仪 (BIO-RAD 公司, 瑞典); -80℃ 冰箱 (Thermo 公司, 美国)。

2 细胞培养 购买的 GH3 细胞保存于解放军总医院内分泌科实验室, 常规传代培养, 生长条件为 F-12K 培养基 + 2.5% FBS + 15% HS。于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱内培养, 2~3 d 可传代 1 次。

3 siRNA 转染初筛培养 GH3 细胞至融合度 90% 时, 消化铺于 24 孔板, 细胞密度为 1×10^5 /孔, 继续培养至细胞融合度达到 50% 时开始转染, 采用 CDC27 (sense: 5'-GACGACCTTGTCACTGAGTTTGG-3'; anti-sense: 5'-CTGGCTTCTCACCTATTTTCAC-3')、NF1 (sense: 5'-CTCTCTCAGTTGATCATATTGG-3'; anti-sense: 5'-CCGAAGTTCCGCTGCATGTTGG-3')、USP9X (sense: 5'-CTCGTGGCTCTCCAGTTGGAGGG-3'; anti-sense: 5'-GCCAGGTCAGTGTGTGGAATG-3') (GenePharma 公司, 上海) 小干扰 RNA 瞬时转染的方式予以转染, 均按照 12.5×10^{-6} mmol/L、 25×10^{-6} mmol/L、 50×10^{-6} mmol/L 设置转染梯度。取出培养液, 磷酸盐缓冲液 (PBS, Sigma 公司, 美国), 胰酶, 37℃ 下预热, 更换为无抗生素培养基, 将 siRNA 分别配制于无血清培养基中, 室温放置 5 min。将转染试剂混合液, 加至 siRNA 混合液中, 室温孵育 20 min。取转染混合液 100 μl 至 24 孔板, 混匀后入培养箱中培养。转染后 2 h 收集细胞, RT-PCR (GoTaq® qPCR Master Mix, Promega 生物技术有限公司, 北京) 检测 siRNA 转染后的敲低效率。

4 siRNA 转染复筛 根据预实验结果, CDC27 选择 siRNA-117 和 siRNA-1968 序列, 在 25×10^{-6} mmol/L、24 h 时达到最佳敲低效率, NF1 选择 siRNA-6859 和 siRNA-7139 序列, 在 50×10^{-6} mmol/L、24 h 时达到最佳敲低效率, USP9X 选择 siRNA-910 和 siRNA-2199 序列, 在 25×10^{-6} mmol/L、24 h 时达到最佳敲低效率。三种基因均同时设置阴性对照 (negative control, NC) 组和空白细胞组, 运用 Western bolt 方法检测沉默后的蛋白水平。

5 总 RNA 提取和 RT-PCR 检测 mRNA 表达 采用 Trizol 法按 RNA 提取试剂盒 (Invitrogen 公司, 美国) 操作说明提取总 RNA, 然后按照逆转录试剂盒说明书将 RNA 特异性逆转录为 cDNA, 反

应体系: DNase 缓冲液 $1\mu\text{l}$, DNase $1\mu\text{l}$, RNA $5\mu\text{l}$, RNA 酶抑制剂 $0.2\mu\text{l}$, 超纯水 $2.8\mu\text{l}$ 。37℃ 孵育 30 min, 加 $1\mu\text{l}$ 终止液, 65℃ 孵育 5 min 终止反应。纯化后的 RNA 进行 cDNA 模板第一链的合成, 合成的 cDNA 稀释至 $100\mu\text{l}$ 。RT-PCR 反应程序按照: 95℃ 下 2 min, (95℃ 10 s、55℃ 30 s、60℃ 30 s)35 个循环, 65℃ 下 2 min。反应结束后对产物的溶解曲线进行分析, 并用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析数据。

6 Western blot 检测蛋白表达 -80℃ 取出转染处理的 GH3 细胞样品 (24 孔板中), 每孔加入 $60\mu\text{l}$ 含蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂和 PMSF 的裂解液, 细胞刮刀刮下细胞, 收集液体至 EP 管中, 4℃ 轻柔地摇 40 min, 16 000 r/min, 4℃ 离心 10 min, 取上清至新的 EP 管。BCA 蛋白浓度测定后, 配制 8%SDS-PAGE Gel 胶, 加入样品 1/5 体积的 $4\times$ 上样缓冲液, 100℃ 加热 5 min, 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 分别加入抗 CDC27 (1 : 500)、NF1 (1 : 100)、USP9X (1 : 100)、POU1F1 (1 : 100)、PROPI (1 : 100), 4℃ 水平摇床孵育过夜后, 用 TBST (谱振生物有限公司, 上海) 洗涤膜 $3\times 10\text{ min}$, 加入相应的二抗 (1 : 5 000), TBST 洗涤 $3\times 10\text{ min}$ 后, 化学发光成像仪拍照记录。

7 CCK-8 法检测 GH3 细胞增殖能力 细胞铺 24 孔板, 浓度选择 CDC27 siRNA-117 和 siRNA-1968 $25\times 10^{-6}\text{ mmol/L}$ 转染, 加上 NC 组和空白细胞组。转染完成后胰酶消化细胞 5 min, 重新铺入 96 孔板, 每孔 1 000 个细胞。细胞贴壁过夜后, 第 2 天记为 0 d, 分别在 0 d、1 d、2 d、3 d、4 d 检测细胞增殖并拍照记录细胞, 视野选取 $40\times$ 。在酶联免疫检测仪上测定各孔光密度 (optical density, OD), 选择 450 nm 波长, 记录结果。该步骤重复 3 次。

8 GH3 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 细胞铺 24 孔板, 重新铺入 24 孔板, 每孔 5×10^5 个细胞。细胞贴壁过夜后, 直接加入丝裂霉素 C 处理 1 h 后, 更换含 0.1% HS 的培养基, 划痕拍照记为 0 h, 分别在 0 h、24 h、48 h 拍照, 用倒置显微镜, 于 0 h、24 h、48 h 下随机选择 5 个 $200\times$ 视野内计算迁移到划痕空隙中的细胞总数。通过 Image J 软件计算每个视野面积。

9 ELISA 检测细胞分泌能力 采用 ELISA 法进行, 将 GH3 细胞铺 24 孔板, 转染 48 h 以后, 收集 48 h 细胞及上清液, 并同时制备标准品梯度, 后加入包被有 GH 抗体、PRL 抗体和 TSH 抗体的酶标板, 37℃ 下孵育 90 min, 依次滴加生物素, 37℃ 下孵育 60 min, 辣根过氧化物酶工作液, 37℃ 下孵育 30 min,

洗板后加入底物溶液, 37℃ 下避光孵育 150 min, 加终止液终止反应, 相同标本设 3 个复孔, 重复 3 次, 在酶标仪 450 nm 测定 OD 值。绘制标准曲线, 计算各样本 OD 值所对应的浓度。

10 统计学方法 实验结果采用 SPSS19.0 进行分析, 各实验独立重复 3 次, 所有数据均检验其方差齐性, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 四组数据组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 事后检验采用 LSD 法; CCK-8 法检测细胞增殖能力的比较采用重复测量方差分析, 事后检验 SNK-q 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 三种 siRNA 转染初筛 经 siRNA 转染后, CDC27 在 $25\times 10^{-6}\text{ mmol/L}$ 浓度下, 24 h 时敲低效率相对较好 ($P < 0.05$, 图 1), 这其中 CDC27 siRNA-117 序列和 CDC27 siRNA-1968 序列敲低效率为最佳 (图中黑框); NF1 在 $50\times 10^{-6}\text{ mmol/L}$ 浓度下, 24 h 时敲低效率相对较好 ($P < 0.05$, 图 1), 这其中 NF1 siRNA-6859 序列和 NF1 siRNA-7139 序列敲低效率为最佳 (图中黑框); USP9X 在 $50\times 10^{-6}\text{ mmol/L}$ 浓度下, 24 h 时敲低效率相对较好 ($P < 0.05$, 图 1), 这其中 USP9X siRNA-910 序列和 USP9X siRNA-2199 序列敲低效率为最佳 (图中黑框)。三种基因对应的最佳敲低效率将进行下一步复筛实验。

2 siRNA 转染复筛 将上述初筛中三种基因各自所能达到的最佳敲低效率的序列选出, NF1 和 USP9X 在 WB 检测的蛋白水平的表达上没有差异 ($P > 0.05$, 图 2C ~ 图 2F); CDC27 敲低效率在蛋白水平上具有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$, 图 2A、图 2B)。结果表明 CDC27 不仅能够在 mRNA 水平上达到沉默效应, 在蛋白水平也能够达到, 而 USP9X 和 NF1 无法在蛋白水平上实现敲低, 所以最终确定选取 CDC27 基因进行进一步研究。

3 CDC27 siRNA 转染验证实验 将 siRNA-117 和 siRNA-1968 转染细胞后, 分别在 24 h 和 48 h 各检测一次蛋白水平。通过 Image J 分析灰度值, 结果显示 siRNA-117 和 siRNA-1968 转染效率稳定, 能够达到预期的沉默效应 ($P < 0.01$, $P < 0.05$, 图 3)。

4 细胞增殖与细胞形态 实验结果转染后, CCK-8 检测结果显示 CDC27 沉默组 (siRNA-117 和 siRNA-1968) 与对照组 (NC 组) 和空白细胞组比较, 在细胞的增殖和形态等方面差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 4 和图 5)。

5 划痕检测细胞迁移能力 相对于对照组,

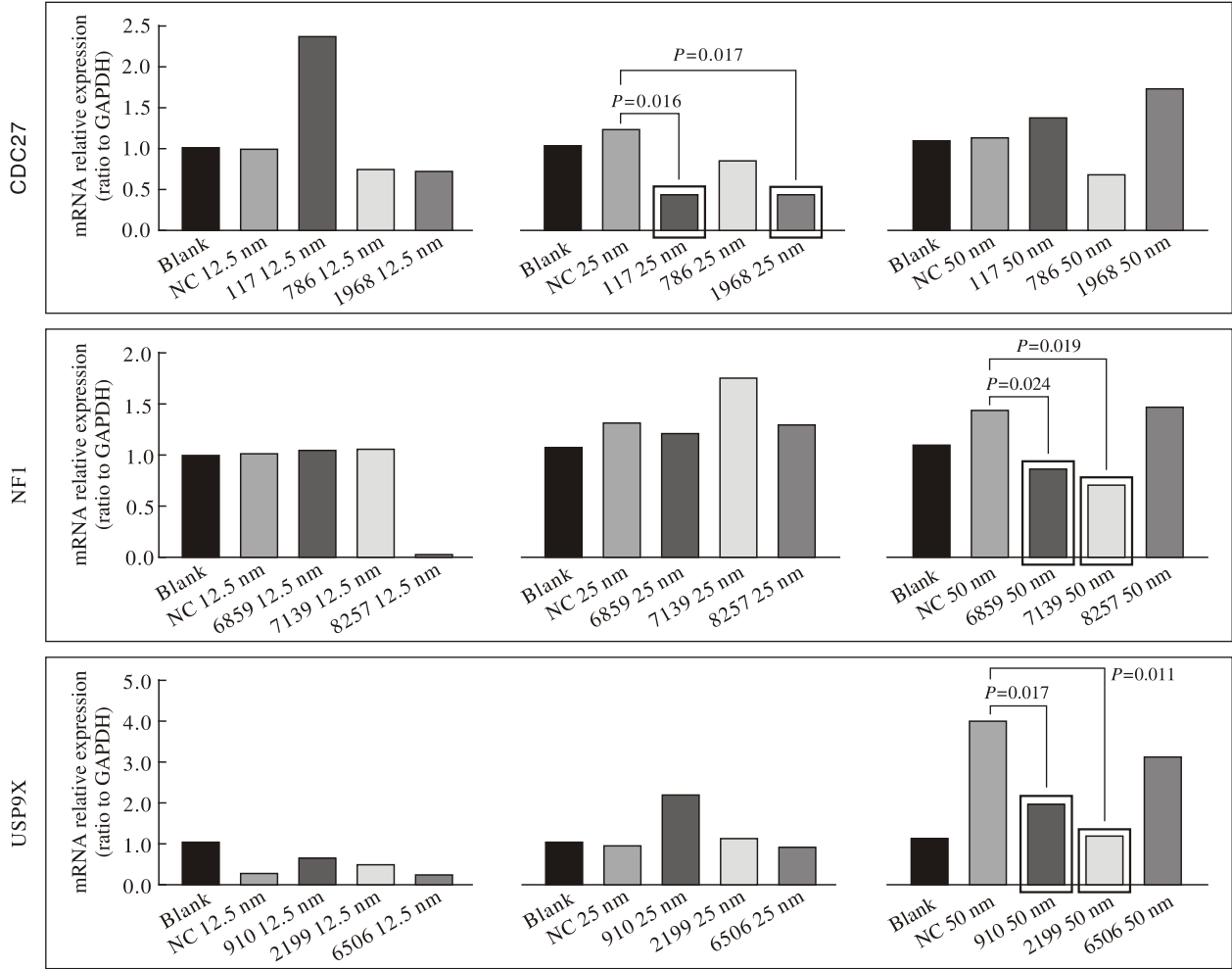


图 1 siRNA 敲低效率初筛结果 ($\times 10^{-6}$ mmol/L, 24 h)。CDC27 基因在 siRNA-117 序列和 siRNA-1968 序列敲低效率为最佳; NF1 基因在 siRNA-6859 序列和 siRNA-7139 序列敲低效率为最佳; USP9X 基因在 siRNA-910 序列和 siRNA-2199 序列敲低效率为最佳

Fig.1 Knockdown efficiency detection results ($\times 10^{-6}$ mmol/L, 24 h). The CDC27 gene reached the optimal knockdown efficiency in siRNA-117 and siRNA-1968; the NF1 gene reached the optimal knockdown efficiency in siRNA-6859 and siRNA-7139; the USP9X gene reached the optimal knockdown efficiency in siRNA-910 and siRNA-2199

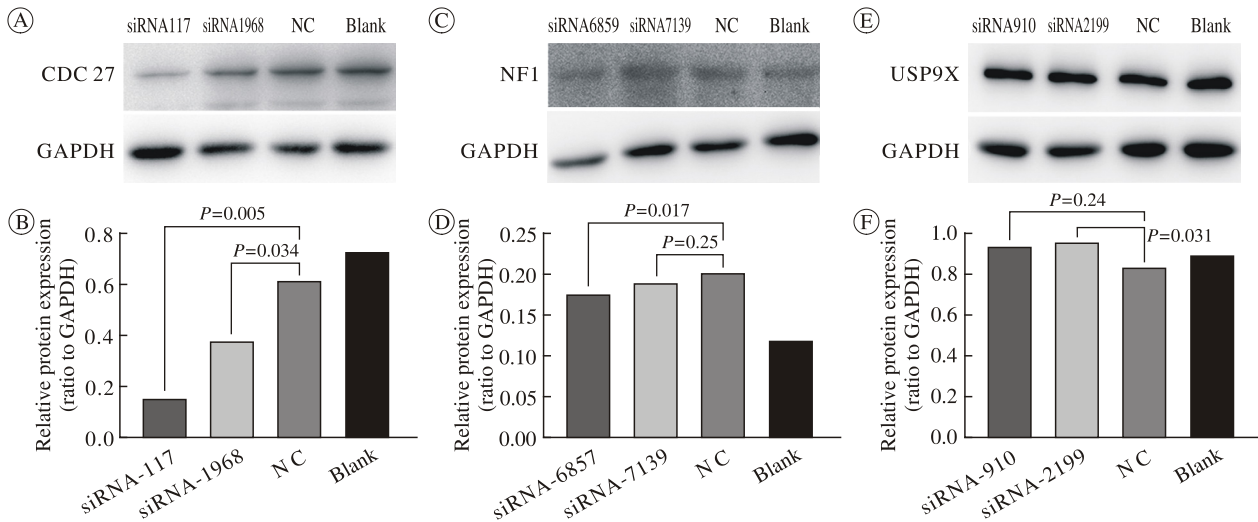


图 2 三种基因最佳敲低序列蛋白检测结果的灰度值相对量统计图

Fig.2 Results of optimal silencing efficiency from the three genes A, C and E: Western bolt detections of protein level of CDC27, NF1, and USP9X; B, D and F: the corresponding amount of gray values from the left results

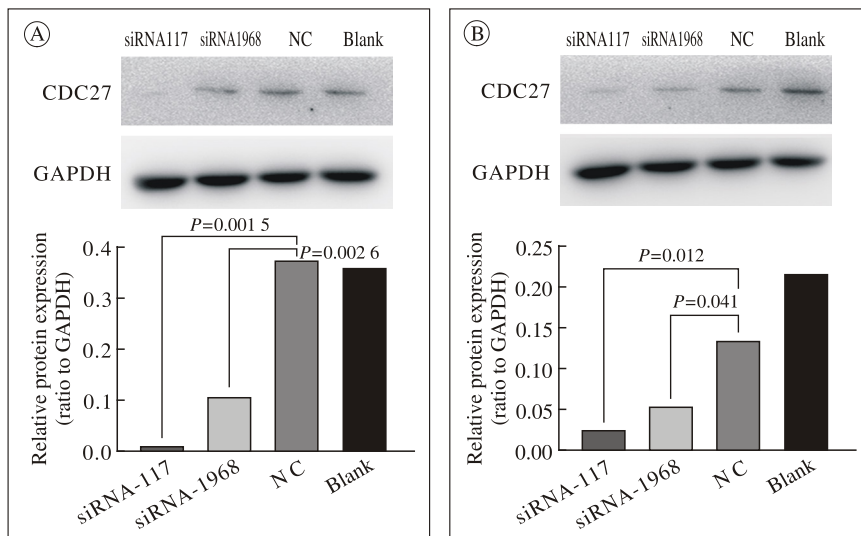


图 3 CDC27 转染后沉默效应验证
A:24 h; B:48 h

Fig.3 Verifying experiment of silencing effect after CDC27 siRNA transfection
A:24 h; B:48 h

CDC27 siRNA 转染后细胞的迁移能力有所下降,且在 siRNA-117 组中更为明显 ($P < 0.05$, 图 6)。提示 CDC27 沉默会使 GH3 细胞的迁移能力下降。

6 POU1F1 与 PROP1 的表达水平 GH3 细胞在 CDC27 siRNA 转染后, POU1F1 与 PROP1 表达均明显低于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, 图 7)。

7 ELISA 检测细胞分泌能力 细胞转染之后,分泌生长激素、泌乳素的能力与对照组相比明显下降 ($P < 0.01$, $P < 0.05$, 图 8A 和图 8B),促甲状腺激素分泌未见统计学差异 ($P > 0.05$, 图 8C)。

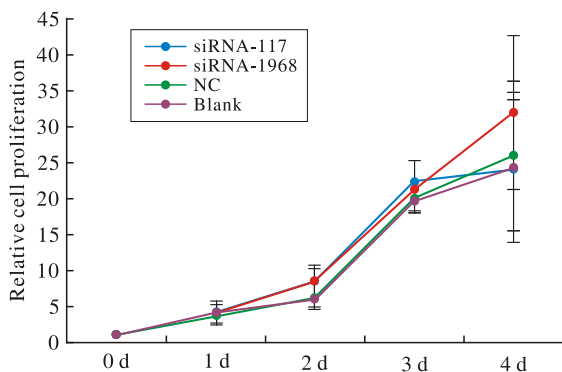


图 4 转染对细胞增殖影响。转染细胞达到沉默效应后,各组之间细胞增殖未见明显差异

Fig.4 Effects of transfection on cell proliferation. Observations were recorded for consecutive 4 days, and the results showed that there was no significant difference in the cell proliferation between each group

讨论

垂体柄中断综合征是内分泌与代谢病学中的一种罕见的综合征,该疾病的发展常在胚胎或新生儿期开始,但由于其进展缓慢,常难以引起重视,所引起的临床症状一是外貌方面如面部、颅脑、生殖系统等的畸形;二是功能方面(相关激素

缺乏)如生长、性腺、垂体功能发育不良^[14]。

本研究中, CDC27 基因沉默后在 mRNA 水平和蛋白水平上均能够呈现有差异性且稳定的敲低,达到了预期的沉默效应,后续的功能性实验主要是研究 CDC27 沉默对 GH3 细胞生物学功能的影响。验证实验确定成功转染后,细胞划痕和 Western bolt 的结果表明, CDC27 沉默后 GH3 细胞的迁移能力和 POU1F1、PROP1 的表达水平均有所降低的,且有统计学差异,提示 CDC27 与细胞迁移的调控可能相关。研究表明,在机体内作为祖先蛋白的 PROP1 的作用是活化 POU1F1 基因,进而使其发挥功能^[15-19]。POU1F1 基因定位于人体第 3 号染色体上,由 6 个外显子和 5 个内含子组成,作为一个在垂体发育后期起作用的垂体特异性转录因子,其在胚胎期的第 16 天对 GH、PRL 和 TSH 分化的能力达到最强,加之这 3 种激素细胞均同属 POU1F1 细胞系,所以 POU1F1 突变对于 GH、PRL 和 TSH 发育的影响也是最大的,因此垂体功能低下可以通过 POU1F1 突变导致相关细胞不完全发育来解释^[20-24]。针对 PROP1 基因而言,其在拉克特氏囊前体细胞迁移中则发挥着十分重要的作用,并参与垂体器官早期的形成,一旦其表达下降,则后续的迁移过程便无法完成,使得原本调控生长激素细胞增殖的 POU1F1 无法作用于生长激素释放激素受体和生长抑素受体,后续的生长激素分泌便明显下降,所以 PROP1 突变与 POU1F1 突变所引起的激素水平缺乏的结果往往是类似的,其病理原因正是自身表达水平的下降影响了后续的细胞迁移。在一些侏儒鼠模型中,如 Snell 和 Jackson 小鼠, POU1F1 以及 PROP1 基因表达量在其体内很难测出,同样这些侏儒鼠体内 GH、PRL、

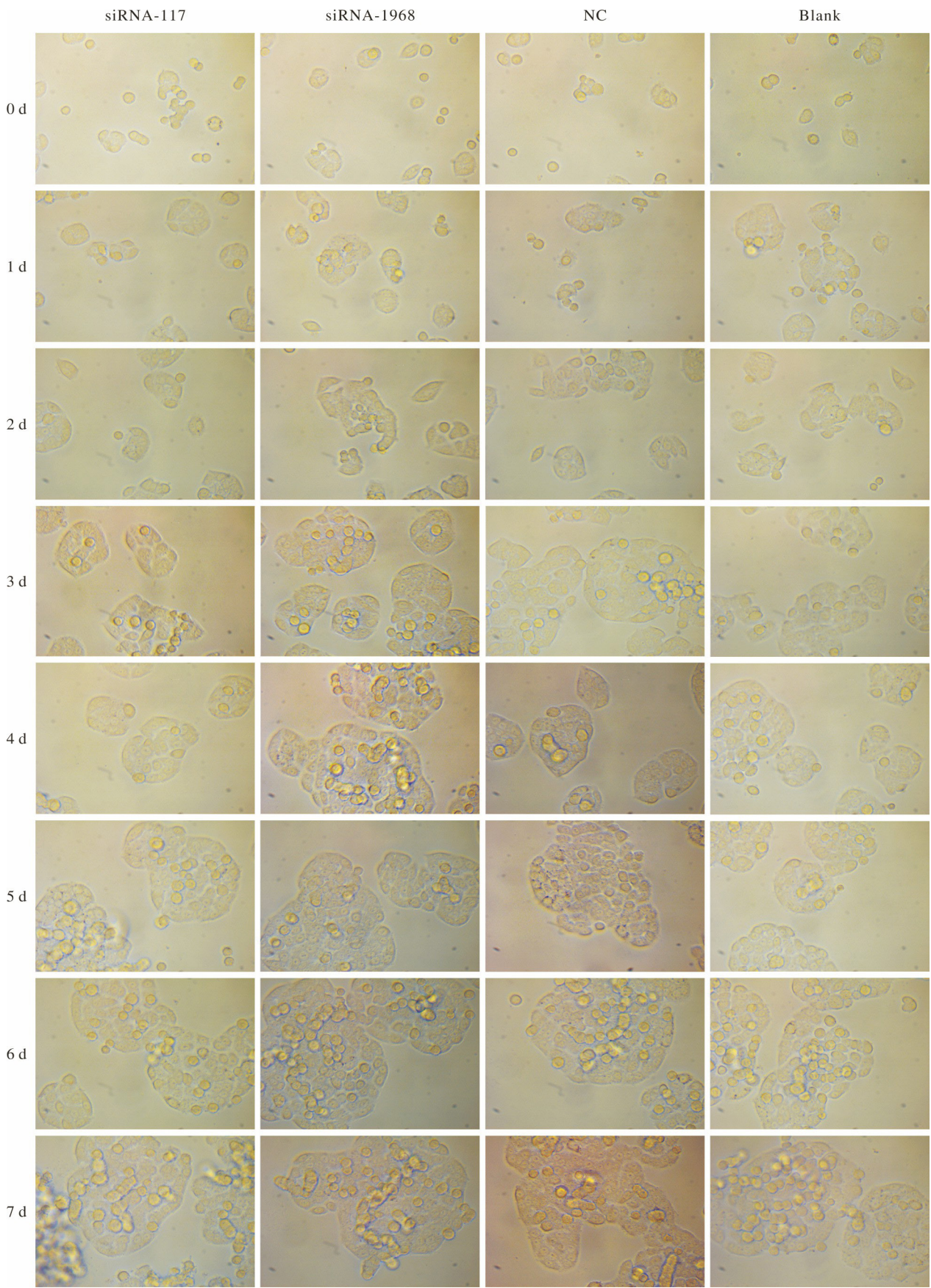


图 5 转染对细胞形态影响。转染细胞达到沉默效应之后,各组之间细胞形态未见明显差异(40×)

Fig.5 Effects of transfection on cell morphology. Observations were recorded, and the results showed that there was no significant difference in the cell morphology between each group (40× visual field)

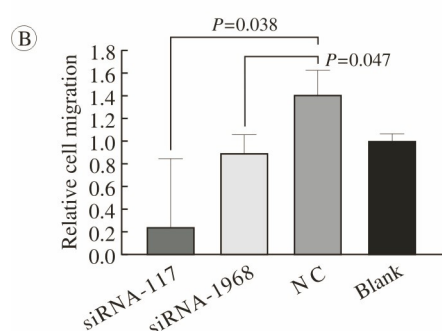
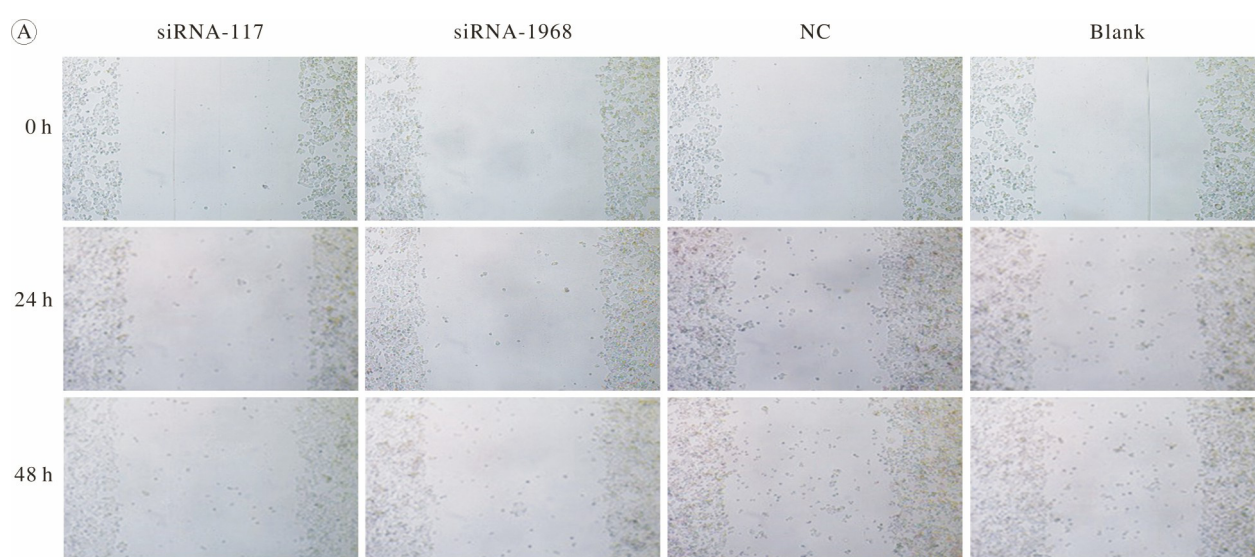


图 6 细胞迁移实验显示转染后细胞迁移能力下降 A:显微镜下(200×); B:细胞迁移即使结果柱状图

Fig.6 Decreased cell migration ability after transfection A: The cells migration results were observed at 0 h, 24 h and 48 h (200×); B: Histogram of cell migration. The migration significantly decreased compared with NC and blank groups

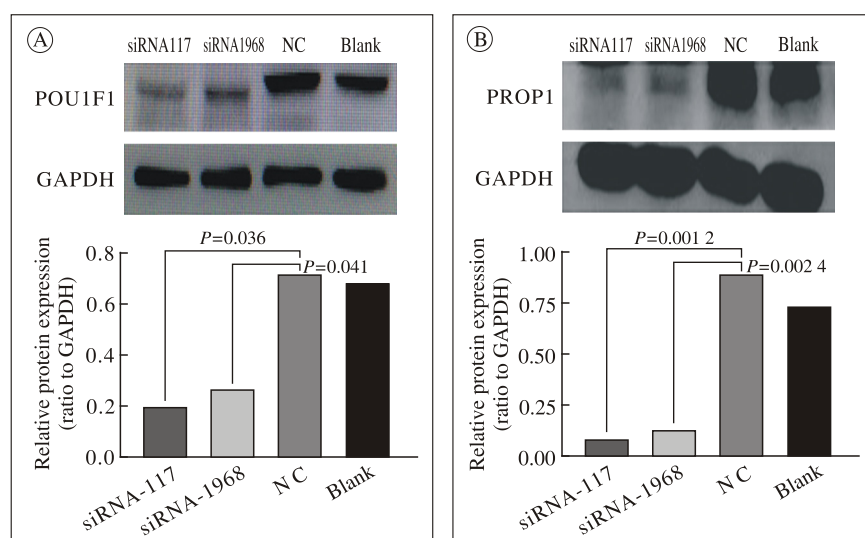


图 7 POU1F1(A) 及 PROP1(B) 表达水平在 siRNA-117 和 siRNA-1968 组中明显下降

Fig.7 POU1F1 (A) and PROP1 (B) expression levels. Both expression levels decreased significantly when knocked down by siRNA-117 and siRNA-1968

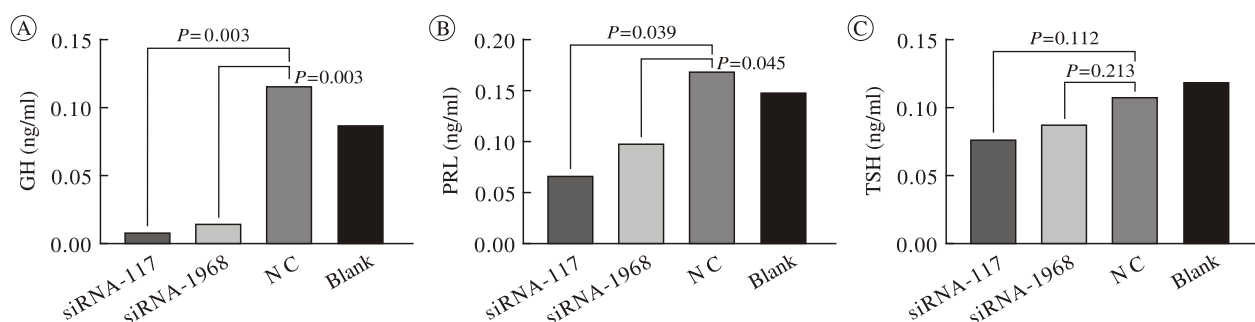


图 8 CDC27 达到沉默效应后上清液中生长激素(A)、泌乳素(B)、促甲状腺激素(C)水平

Fig.8 Detections of GH, PRL and TSH from supernatant. A: GH level (ng/ml); B: PRL level (ng/ml); C: TSH level (ng/ml)

TSH 细胞较野生正常的同种小鼠均是萎缩的^[25]。

Lee 等^[26]指出胞葬作用、细胞迁移、神经突生长均与一个名为 Elmo 的蛋白家族有关(该家族共包含 Elmo1、Elmo2、Elmo3 三个成员),其中 Elmo1 在细胞迁移过程中发挥重要的作用,针对其的磷酸化或其他调节作用可能会使其成为后期促进复合物(anaphase-promoting complex, APC)的底物,而 CDC27 正是该复合物中的一个重要组成成分,且作为新伴侣与 Elmo1 相结合,但 CDC27 表达无论高低,对于细胞的吞噬和凋亡均没有影响。Nishimura 等^[27]进一步指出 PROP1 所表现出的转录活性为细胞类型依赖型,作用位点位于 PROP1 基因 5' 端上游区域和第 1 号内含子的位置处,该作用的发挥与 Notch 通路关系密切;此外还发现了 18 种涉及垂体早期器官形成和发育的转录因子(均为 Notch 通路中所包含的因子),也都是在 5' 端上游区域位点参与对 PROP1 的调节,而 Notch 通路是一个既可以在胚胎期也可以在成体后影响垂体的形态、增殖及最终垂体结构定位、分化的通路^[28-29]。我们的实验结果也验证了 CDC27 沉默对于 GH3 细胞增殖和形态两个方面均未产生明显影响,即在细胞存活方面与前述的研究是相吻合的,证实了 CDC27 沉默主要是影响细胞迁移的过程,也就是说 CDC27 在细胞迁移中确实起着重要的作用。

综上所述,本研究表明,全基因组外显子测序所得的 3 种基因,即 CDC27、NF1、USP9X,只有 CDC27 具有在体外实验验证的可行性,而且在体外实验中也验证了其会对细胞的迁移有明显影响,所以推测 CDC27 的沉默表达可能会在体内研究中导致涉及垂体器官发育重要过程的 POU1F1 以及 PROP1 表达的下降,最终导致细胞无法完成迁移而发挥应有的生理功能。该结果可能会对垂体形成发育产生负性的影响。当然,本研究仅在体外验证方面取得了一定结果,可以作为体内实验开展的理论依据,更多的功能性研究亟待在体内实验中进一步验证。

参考文献

- 1 Wang Q, Hu Y, Li G, et al. Pituitary stalk interruption syndrome in 59 children: the value of MRI in assessment of pituitary functions[J]. Eur J Pediatr, 2014, 173 (5): 589-595.
- 2 Melo ME, Marui S, Carvalho LR, et al. Hormonal, pituitary magnetic resonance, LHX4 and HESX1 evaluation in patients with hypopituitarism and ectopic posterior pituitary lobe[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2007, 66 (1): 95-102.
- 3 Bas F, Uyguner ZO, Darendeliler F, et al. Molecular analysis of PROP1, POU1F1, LHX3, and HESX1 in Turkish patients with combined pituitary hormone deficiency: a multicenter study[J]. Endocrine, 2015, 49 (2): 479-491.
- 4 McCabe MJ, Gaston-Massuet C, Gregory LC, et al. Variations in PROKR2, but not PROK2, are associated with hypopituitarism and septo-optic dysplasia[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013, 98 (3): E547-E557.
- 5 Shimada A, Takagi M, Nagashima Y, et al. A Novel Mutation in OTX2 Causes Combined Pituitary Hormone Deficiency, Bilateral Microphthalmia, and Agenesis of the Left Internal Carotid Artery[J]. Horm Res Paediatr, 2016, 86 (1): 62-69.
- 6 Laumonnier F, Ronce N, Hamel BC, et al. Transcription factor SOX3 is involved in X-linked mental retardation with growth hormone deficiency[J]. Am J Hum Genet, 2002, 71 (6): 1450-1455.
- 7 Karaca E, Buyukkaya R, Pehlivan D, et al. Whole-exome sequencing identifies homozygous GPR161 mutation in a family with pituitary stalk interruption syndrome[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2015, 100 (1): E140-E147.
- 8 Kahn BM, Corman TS, Lovelace K, et al. Prenatal ethanol exposure in mice phenocopies Cdon mutation by impeding Shh function in the etiology of optic nerve hypoplasia[J]. Dis Model Mech, 2017, 10 (1): 29-37.
- 9 Bashamboo A, Bignon-Topalovic J, Moussi N, et al. Mutations in the Human ROBO1 Gene in Pituitary Stalk Interruption Syndrome[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2017, 102 (7): 2401-2406.
- 10 Lamberts SW, Hofland LJ. Future treatment strategies of aggressive pituitary tumors[J]. Pituitary, 2009, 12 (3): 261-264.
- 11 Viacava P, Gasperi M, Acerbi G, et al. Microvascular density and vascular endothelial growth factor expression in normal pituitary tissue and pituitary adenomas[J]. J Endocrinol Invest, 2003, 26 (1): 23-28.
- 12 李宏滨, 曹红鹤, 郑友民. PIT-1 基因在人、鼠及猪中的研究现状[J]. 遗传, 2001, 23 (6): 605-608.
- 13 王玺年, 陈金萍. Pit-1 基因的结构及生物信息学分析[J]. 畜牧兽医杂志, 2015, 34 (5): 22-25.
- 14 苏星, 王成芷, 王安平, 等. 从胚胎发育说起——垂体柄中断综合征的基因研究进展[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2017, 33 (8): 702-704.
- 15 Ward RD, Raetzman LT, Suh H, et al. Role of PROP1 in pituitary gland growth[J]. Mol Endocrinol, 2005, 19 (3): 698-710.
- 16 Davis SW, Potok MA, Brinkmeier ML, et al. Genetics, gene expression and bioinformatics of the pituitary gland[J]. Horm Res, 2009, 71 (Suppl 2): 101-115.
- 17 Himes AD, Raetzman LT. Premature differentiation and aberrant movement of pituitary cells lacking both Hes1 and Prop1[J]. Dev Biol, 2009, 325 (1): 151-161.
- 18 Perez Millan MI, Brinkmeier ML, Mortensen AH, et al. PROP1 triggers epithelial-mesenchymal transition-like process in pituitary stem cells[J]. 2016, 5: e14470.
- 19 Mortensen AH, MacDonald JW, Ghosh D, et al. Candidate genes for panhypopituitarism identified by gene expression profiling[J]. Physiol Genomics, 2011, 43 (19): 1105-1116.
- 20 Sakagami Y, Okimura Y, Kondoh T, et al. Expression of mPOU protein in the human pituitary adenomas[J]. Kobe J Med Sci, 2003, 49 (5-6): 117-122.
- 21 Schoenmakers N, Alatzoglou KS, Chatterjee VK, et al. Recent advances in central congenital hypothyroidism[J]. J Endocrinol, 2015, 227 (3): R51-71.
- 22 Iguchi G, Bando H, Takahashi Y. A Novel Clinical Entity of Autoimmune Endocrinopathy: Anti-PIT-1 Antibody Syndrome[J]. Front Horm Res, 2017, 48: 76-83.

(下转 352 页)

- Suppl): 14–18.
- 16 Benov A, Salas MM, Nakar H, et al. Battlefield pain management: A view of 17 years in Israel Defense Forces [J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2017, 83 (1 Suppl 1): S150–S155.
- 17 Polomano RC, Buckenmaier CC 3rd, Kwon KH, et al. Effects of low-dose IV ketamine on peripheral and central pain from major limb injuries sustained in combat [J]. *Pain Med*, 2013, 14 (7): 1088–1100.
- 18 Jennings PA, Cameron P, Bernard S, et al. Morphine and ketamine is superior to morphine alone for out-of-hospital trauma analgesia: a randomized controlled trial [J]. *Ann Emerg Med*, 2012, 59 (6): 497–503.
- 19 Jennings PA, Cameron P, Bernard S. Ketamine as an analgesic in the pre-hospital setting: a systematic review [J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2011, 55 (6): 638–643.
- 20 费翔, 孙雪峰, 李萌萌, 等. 小剂量氯胺酮减轻烧伤切痂植皮术中瑞芬太尼所致痛觉过敏的效应 [J]. *解放军医学院学报*, 2014, 35 (6): 593–596.
- 21 Rasmussen KG. Psychiatric side effects of ketamine in hospitalized medical patients administered subanesthetic doses for pain control [J]. *Acta Neuropsychiatr*, 2014, 26 (4): 230–233.
- 22 Nackenson J, Baez AA, Meizoso JP. A Descriptive Analysis of Traction Splint Utilization and IV Analgesia by Emergency Medical Services [J]. *Prehosp Disaster Med*, 2017, 32 (6): 631–635.
- 23 孟进松, 杨晓东, 林国安, 等. 包扎过紧致小腿骨筋膜室综合征一例 [J]. *中华烧伤杂志*, 2013, 29 (4): 406–407.
- 24 孙秀明, 安丽娜, 彭碧波. 战创伤疼痛分级救治与管理 [J]. *中华灾害救援医学*, 2017, 5 (8): 467–469.
- 25 Buckenmaier C 3rd, Mahoney PF, Anton T, et al. Impact of an acute pain service on pain outcomes with combat-injured soldiers at Camp Bastion, Afghanistan [J]. *Pain Med*, 2012, 13 (7): 919–926.
- 26 Carness JM, Wilson MA, Lenart MJ, et al. Experiences with Regional Anesthesia for Analgesia During Prolonged Aeromedical Evacuation [J]. *Aerosp Med Hum Perform*, 2017, 88 (8): 768–772.
- 27 Mora AG, Ganem VJ, Ervin AT, et al. En Route Use of Analgesics in Nonintubated, Critically Ill Patients Transported by U.S. Air Force Critical Care Air Transport Teams [J]. *Mil Med*, 2016, 181 (5 Suppl): 145–151.
- 28 Buckenmaier CC 3rd, Rupprecht C, McKnight G, et al. Pain following battlefield injury and evacuation: a survey of 110 casualties from the wars in Iraq and Afghanistan [J]. *Pain Med*, 2009, 10 (8): 1487–1496.
- 29 Harris KC, Rathmell JP. Forward-deployed anesthesiologists and pain treatment in combat support hospitals: making decisions about deployment of anesthesiologists in support of the global war on terrorism [J]. *Anesthesiology*, 2007, 107 (6): 872–874.
- 30 刘俊乐, 王晓琳, 张宏. 外周神经阻滞的并发症 [J]. *解放军医学院学报*, 2013, 34 (12): 1303–1305.
- 31 Wedmore IS, Kotwal RS, McManus JG, et al. Safety and efficacy of oral transmucosal fentanyl citrate for prehospital pain control on the battlefield [J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2012, 73 (6 Suppl 5): S490–S495.
- 32 Schauer SG, Robinson JB, Mabry RL, et al. Battlefield Analgesia: TCCC Guidelines Are Not Being Followed [J]. *J Spec Oper Med*, 2015, 15 (1): 85–89.
- 33 王延明, 王能, 钱国军. 便携式超声在战伤救治中应用 [J]. *临床军医杂志*, 2017, 45 (1): 100–103.
- 34 林倩, 唐杰. 超声评价创伤危重患者肾血流灌注的应用进展 [J]. *解放军医学院学报*, 2014, 35 (4): 392–394.
- 35 向佳兵, 陶兴, 刘静, 等. 彩色多普勒超声在骨科战伤救治中的应用 [J]. *中外医学研究*, 2012, 10 (31): 53–54.

(上接 331 页)

- 23 Davis SW, Keisler JL, Perez-Millan MI, et al. All Hormone-Producing Cell Types of the Pituitary Intermediate and Anterior Lobes Derive From Prop1-Expressing Progenitors [J]. *Endocrinology*, 2016, 157 (4): 1385–1396.
- 24 Takagi M, Kamasaki H, Yagi H, et al. A novel heterozygous intronic mutation in POU1F1 is associated with combined pituitary hormone deficiency [J]. *Endocr J*, 2017, 64 (2): 229–234.
- 25 Galsgaard ED, Rasmussen BB, Folkesson CG, et al. Re-evaluation of the prolactin receptor expression in human breast cancer [J]. *J Endocrinol*, 2009, 201 (1): 115–128.
- 26 Lee J, Moon B, Lee DH, et al. Identification of a novel protein interaction between Elmo1 and Cdc27 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 471 (4): 497–502.
- 27 Nishimura N, Ueharu H, Nishihara H, et al. Search for regulatory factors of the pituitary-specific transcription factor PROP1 gene [J]. *J Reprod Dev*, 2016, 62 (1): 93–102.
- 28 Nantie LB, Himes AD, Getz DR, et al. Notch signaling in postnatal pituitary expansion: proliferation, progenitors, and cell specification [J]. *Mol Endocrinol*, 2014, 28 (5): 731–744.
- 29 Oyama T, Harigaya K, Sasaki N, et al. Mastermind-like 1 (MamL1) and mastermind-like 3 (MamL3) are essential for Notch signaling in vivo [J]. *Development*, 2011, 138 (23): 5235–5246.

(上接 334 页)

- 9 Eippert F, Tracey I. Pain and the PAG: learning from painful mistakes [J]. *Nat Neurosci*, 2014, 17 (11): 1438–1439.
- 10 陈敏, 于生元. 慢性偏头痛动物模型研究进展 [J]. *解放军医学院学报*, 2016, 37 (3): 286–288.
- 11 王宁, 张婷, 苏园林, 等. 中脑导水管周围灰质电刺激与丘脑电刺激对大鼠伤害感知行为的差异调节 (英文) [J]. *生理学报*, 2016, 68 (2): 115–125.
- 12 Hortnagl H, Tasan RO, Wieselthaler A, et al. Patterns of mRNA and protein expression for 12 GABAA receptor subunits in the mouse brain [J]. *Neuroscience*, 2013, 236: 345–372.
- 13 Samineni VK, Grajales-Reyes JG, Copits BA, et al. Divergent Modulation of Nociception by Glutamatergic and GABAergic Neuronal Subpopulations in the Periaqueductal Gray [J/OL]. <http://europepmc.org/abstract/MED/28374016>.
- 14 娄超, 王桂芝, 于剑锋, 等. 中脑导水管周围灰质腹外侧区 GABAA $\alpha 3$ 及 GABAB 受体在调节急性疼痛中的作用 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2017, 33 (5): 488–491.
- 15 徐龙河, 薛毅琰, 刘耀波, 等. 神经慢性挤压伤疼痛模型大鼠脊髓 GABAA 受体 mRNA 表达的变化 [J]. *军医进修学院学报*, 2002, 23 (4): 248–250.
- 16 Paul J, Yevenes GE, Benke D, et al. Antihyperalgesia by $\alpha 2$ -GABAA receptors occurs via a genuine spinal action and does not involve supraspinal sites [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2014, 39 (2): 477–487.
- 17 范伟, 杨晓苏, 郭一航, 等. γ -氨基丁酸 A 受体 $\alpha 1$ 亚基信使核糖核酸在硝酸甘油偏头痛大鼠模型脑干及三叉神经组织中的表达变化 [J]. *中华神经科杂志*, 2013, 46 (7): 479–482.
- 18 Bravo-Hernandez M, Corleto JA, Barragan-Iglesias P, et al. The $\alpha 5$ subunit containing GABAA receptors contribute to chronic pain [J]. *Pain*, 2016, 157 (3): 613–626.