

本文引文格式:林鑫,黄群. SPTBN2 基因对膀胱癌 5637 细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J].
右江民族医学院学报, 2023, 45(2):281-286.

【论著与临床报道】

SPTBN2 基因对膀胱癌 5637 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

林鑫^{1,2}, 黄群²

(1. 右江民族医学院研究生学院, 广西 百色 533000;
2. 右江民族医学院附属医院泌尿外科, 广西 百色 533000)

摘要:目的 研究非红细胞血影蛋白 $\beta 2$ (spectrin beta, non-erythrocytic 2, SPTBN2) 对膀胱癌 5637 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。方法 通过体外实验研究 SPTBN2 对膀胱癌 5637 细胞生物学行为的影响。实验组 (siRNA #1 组、siRNA #2 组) 转染靶向 SPTBN2 siRNA, 阴性对照组转染用阴性 siRNA, 空白对照组中加入等量转染试剂。实时荧光定量 PCR 检测细胞中 SPTBN2 基因的表达水平, Western Blot 检测细胞内 SPTBN2 蛋白的表达量。CCK-8 法检测细胞增殖情况。划痕实验、Transwell 侵袭实验检测细胞迁移、侵袭能力。结果 转染 SPTBN2 siRNA 后, 实验组的 SPTBN2 转录水平和蛋白表达量均低于阴性对照组和空白对照组。实验组的增殖、迁移和侵袭能力较阴性对照组降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 利用靶向 SPTBN2 siRNA 成功构建低表达 SPTBN2 的 5637 细胞株, 下调 SPTBN2 的表达可抑制膀胱癌 5637 细胞增殖、迁移和侵袭。

关键词:膀胱肿瘤; 非红细胞血影蛋白 $\beta 2$; 细胞增殖; 迁移; 侵袭

中图分类号: R737.14 文献标识码: A 文章编号: 1001-5817(2023)02-0281-06
doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.02.020

Effect of SPTBN2 gene on the proliferation, migration, and invasion of bladder cancer cell 5637

Lin Xin^{1,2}, Huang Qun²

(1. Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China; 2. Department of Urology, The Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of spectrin beta non-erythrocytic 2 (SPTBN2) on the proliferation, migration and invasion of bladder carcinoma cells 5637. **Methods** The effects of SPTBN2 on the biological behavior of bladder cancer cells 5637 were studied *in vitro* experiment. The experimental group (siRNA #1 group and siRNA #2 group) were transfected with targeted SPTBN2 siRNA, while the negative control group was transfected with negative siRNA, and the blank control group was added with the same amount of transfection reagents. Real-time quantitative PCR was employed to detect the expression of SPTBN2 gene in cells, and Western Blot was employed to detect the expression of SPTBN2 protein in cells. Cell proliferation was detected by CCK-8 assay. Cell migration and invasion ability were detected by wound healing assay and Transwell assay. **Results** After transfection of SPTBN2 siRNA, the transcription level and protein expression of SPTBN2 in experimental group were lower than those in the negative control group and the blank control group. The proliferation, migration and invasion abilities of cells in the experimental group decreased compared with the negative control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Cell line 5637 with low expression of SPTBN2 is successfully constructed by targeted SPTBN2 siRNA, and the proliferation, migration and invasion of bladder cancer cell line 5637 can be inhibited by down-regulating SPTBN2 expression.

Key words: bladder tumor; non-erythrocytic spectrin beta 2; cell proliferation; migration; invasion

第一作者简介: 林鑫(1993-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 泌尿系统肿瘤发病机制, E-mail: linxin5023@163.com

通讯作者简介: 黄群(1966-), 男, 本科, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 泌尿外科疾病, E-mail: Huangqundao@163.com

膀胱癌 (bladder cancer) 是泌尿系统常见的恶性肿瘤, 约 75% 的初诊患者为非肌层浸润性膀胱癌^[1]。其中约 50% 的非肌层浸润性膀胱癌患者在接受经尿道膀胱肿瘤切除术后 2 年出现复发, 40% 的病例在 5 年后进展为肌层浸润性膀胱癌^[2], 而进展为浸润性膀胱癌后的 5 年生存率约为 57%^[3]。肌层浸润性膀胱癌的标准治疗为根治性膀胱切除同时行盆腔淋巴结清扫术, 但 50% 的膀胱癌病例最终出现转移, 且不同分子亚型的膀胱癌对各类治疗手段的敏感性也存在很大差异^[4]。PD-1/PD-L1 抑制剂是近年来膀胱癌免疫治疗的一次重大突破, 显示出较好的效果及良好的安全性, 虽然可以通过 PD-1 表达量、膀胱癌分型等预测免疫治疗效果, 但仍有部分病人对 PD-1/PD-L1 抑制剂无反应^[5]。针对晚期膀胱癌患者的治疗, 仍需找到有效的治疗靶点, 指导治疗方案的分子标志物。

Spectrin 蛋白是细胞膜骨架的重要组成部分, 由两个 α 亚基和两个 β 亚基形成丝状四聚体结构, 在维持胞膜完整性、介导细胞黏附及迁移等方面发挥重要作用^[6]。非红细胞血影蛋白 $\beta 2$ (spectrin beta, non-erythrocytic 2, SPTBN2) 是 Spectrin 蛋白 β -III 亚基的编码基因, 定位于染色体 11q13^[7]。既往研究发现, SPTBN2 在肺腺癌、子宫内膜癌等肿瘤中出现不同程度的差异性表达^[8-9]。有研究认为 SPTBN2 蛋白免疫组化结果可以作为一种潜在的诊断恶性周围神经鞘瘤的高敏感性指标^[10]。在结直肠癌中, SPTBN2 出现高表达, 与淋巴转移、远处转移密切相关^[11]。SPTBN2 已被证明在多种肿瘤细胞中出现差异性表达且影响预后, 但其在膀胱癌中的作用机制尚不明确, 在膀胱癌细胞中的生物学作用目前国内外少有报道。本研究旨在探讨 SPTBN2 基因对膀胱癌 5637 细胞增殖、迁移和侵袭的作用, 为研究膀胱癌发生发展和转移机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料 人类膀胱癌细胞 5637 (武汉普诺塞生命科技有限公司); RPMI-1640 培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素 (美国 gibco 公司); siRNA、引物合成 (苏州吉玛生物科技有限公司); Lipofectamine 2000、TRIzol 试剂、逆转录试剂盒 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Matrigel 基质胶、Transwell 小室 (美国 Corning 公司); SYBR Green PCR Master Mix (上海翊圣生物科技有限公司); CCK-8 试剂盒 (上海同仁生物科技有限公司); SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、7.5% PAGE 凝胶快速制备盒、RIPA 强效裂解液、ECL 化学发光试剂盒 (上海雅酶生物医药科技有限公司); PVDF 膜 (美国 Millipore 公司); SPTBN2 多克隆抗体、GAPDH 多克隆抗体、HRP 标记羊抗兔二抗 (武汉

三鹰生物技术有限公司)。

1.2 主要设备与仪器 生物安全柜、CO₂ 恒温培养箱、离心机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); LightCycle 96 荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司); 多功能酶标仪 (美国 Perkin Elmer 公司); 电泳转移槽 (美国 BIO-RAD 公司); AI600 化学发光成像仪 (美国 GE 公司); 倒置光学显微镜 (德国 Laica 公司); 超微量紫外分光光度计 (北京天根生化科技有限公司)。

1.3 细胞培养与转染 将人类膀胱癌 5637 细胞培养于含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 RPMI1640 培养基中, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养, 胰蛋白酶常规消化细胞以传代, 选择对数生长期细胞进行下一步实验。实验分为空白对照组 (blank control group, Blank 组)、阴性对照组 (negative control, NC 组)、siRNA 实验组 (siRNA #1 组、siRNA #2 组)。转染前 24 h, 常规消化细胞, 用完全培养基重悬细胞后进行细胞计数, 于 6 孔板中每孔接种 3×10^5 个细胞, 待细胞密度至 50%~70% 时进行转染。250 μ L 基础培养基分别稀释 5 μ L Lipofectamine 2000 转染试剂与 5 μ L siRNA, 混合孵育 20 min 后加入至 6 孔板中, 转染体系总计为 2 mL, 阴性对照组转染通用阴性序列 siRNA, 空白对照组中加入等量转染试剂, 转染 6 h 后更换新鲜培养基。

1.4 实时荧光定量聚合酶链式反应 (quantitative real-time PCR, qPCR) 转染 24 h 后, 用 TRIzol 法提取细胞总 RNA, 超微量紫外分光光度计测量总 RNA 浓度, 取 1 μ g 总 RNA 进行逆转录合成 cDNA, 配制 SYBR Green PCR Master Mix 体系进行实时荧光定量 PCR, 反应条件为: 95 °C 5 min, 95 °C 10 s, 62 °C 60 s, 共计 40 个循环。以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法处理数据, 对相对表达量进行分析, 进行 3 次以上重复实验。SPTBN2 上游引物: GCCCGCAACCTGCAT ACTAA, 下游引物: AGCTCTCGCCCTTCCTTGTC, GAPDH 上游引物: ACAACTTTGGTATCGTGGAAGG, 下游引物: GCCATCACGCCACAGTTTC。

1.5 蛋白免疫印迹 (Western Blot) 转染 48 h 后用 RIPA 强效裂解液提取细胞总蛋白, BCA 法进行蛋白定量, 加入足量 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液后煮沸 10 min。每孔蛋白上样量为 30 μ g。7.5% SDS-PAGE 胶电泳分离蛋白, SPTBN2 蛋白转膜条件为恒流 300 mA 转膜 4 h, 将蛋白转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 用 TBST 清洗 3 次, 每次 5 min。各个条带分别加入 SPTBN2 一抗 (1:3000) 和 GAPDH 一抗 (1:5000), 4 °C 摇床孵育过夜, 用 TBST 清洗后加入二抗 (1:10000) 孵育 1 h, 使用 ECL 试剂显影, 以 GAPDH 为内参使用 ImageJ 软件对结果进行

分析。

1.6 CCK-8 增殖实验 转染后以胰蛋白酶常规消化细胞,用完全培养基重悬细胞,将细胞接种于 96 孔板中,细胞接种密度为 2 000 个/孔,每组设 5 个复孔,分别于细胞贴壁后 0 h、24 h、48 h、72 h 加入 CCK-8 试剂,37 °C 孵育 2 h 后使用酶标仪测量 450 nm 波长吸光度(OD 值)。

1.7 划痕实验 6 孔板底部做 3 条平行横线,以每孔 4×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板中,转染后常规培养 48 h 至细胞铺满,用 200 μ L 枪头垂直于孔板表面画下划痕,吸出培养基后以 PBS 缓冲液清洗两遍,加入含 2% 胎牛血清的培养基,取 5 个视野于倒置显微镜下拍照,并于 24 h 后再次拍照记录,使用 ImageJ 软件分析,计算划痕愈合率,划痕愈合率=(初始划痕宽度值-对应时间点划痕宽度值)/初始划痕宽度值。

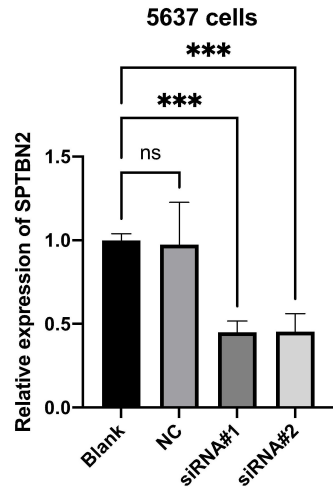
1.8 Transwell 侵袭实验 Matrigel 基质胶中加入新鲜培养基稀释至 500 mg/mL,每个 Transwell 小室中分别加入 100 μ L 基质胶,置于 37 °C 培养箱中 3 h,细胞转染后常规消化,使用无血清培养基重悬细胞调整细胞浓度至 5×10^5 /mL,每个小室上层加入 100 μ L 细胞悬液,在下室内加入 500 μ L 含 10% 胎牛血清的培养基,继续培养 48 h 后用 4% 多聚甲醛固定 15 min,用棉签轻轻拭去上室中的基质胶,结晶紫染色 15 min 后,用 PBS 清洗两遍,于倒置显微镜下拍照,使用 Image J 软件计算透过滤膜的细胞数。

1.9 统计学方法 采用 SPSS 26.0 进行统计学分析,用 Graphpad prism 9.0 做图,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验。多组间均数比较采用 ANOVA 方法, Dunnetts' T3 法和 Kruskal-Wallis 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

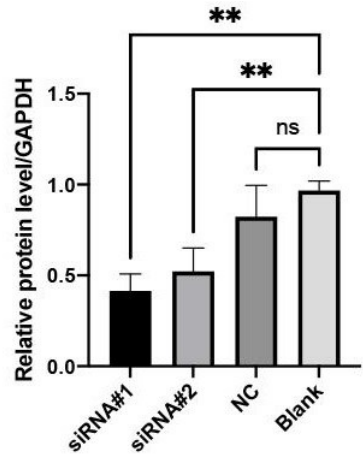
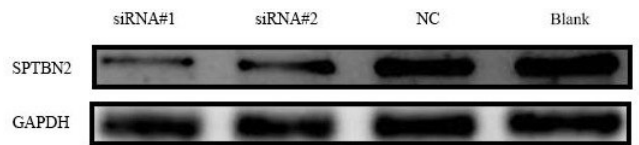
2.1 构建 SPTBN2 低表达细胞株 实时荧光定量 PCR 结果显示,转染 SPTBN2 siRNA 的 5637 膀胱癌细胞中 SPTBN2 mRNA 表达水平较空白对照组和阴性对照组降低(见图 1),差异具有统计学意义($P < 0.001$)。空白对照组和阴性对照组间无统计学差异($P > 0.05$)。Western Blot 结果显示,实验组的 SPTBN2 蛋白表达量明显低于对照组(见图 2),差异具有统计学意义($P < 0.01$),空白对照组和阴性对照组间无统计学差异($P > 0.05$)。

2.2 敲低 SPTBN2 抑制膀胱癌 5637 细胞的增殖 CCK-8 实验结果显示,48 h 起,实验组的 OD 值低于阴性对照组($P < 0.001$),72 h 各组细胞的 OD 值低于阴性对照组(见图 3),差异具有统计学意义($P < 0.05$)。



注:与 Blank 组相比,*** $P < 0.001$ 。

图 1 各组 SPTBN2 mRNA 相对表达量



注:与 Blank 组相比,** $P < 0.01$ 。

图 2 各组 SPTBN2 蛋白表达量

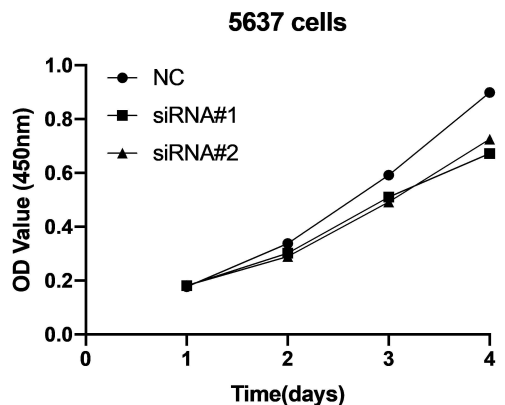


图 3 CCK-8 法检测细胞增殖的结果

表 1 CCK-8 法检测细胞增殖的结果

组别	n	OD 值(450 nm)			
		1 d	2 d	3 d	4 d
NC 组	5	0.179(0.172~0.180)	0.338±0.035	0.592±0.012	0.898±0.083
siRNA#1 组	5	0.180(0.175~0.187)	0.302±0.021	0.510±0.026 ^a	0.672±0.051 ^a
siRNA#2 组	5	0.182(0.179~0.185)	0.290±0.028	0.492±0.020 ^a	0.726±0.081 ^b
H/F		3.262	3.882	35.502	13.139
P		0.196	0.050	<0.001	0.001

注:①表内正态分布计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示,非正态分布计量资料数据以 $M(P_{25}\sim P_{75})$ 表示;②与 NC 组相比,a: $P<0.001$,b: $P<0.01$ 。

2.3 SPTBN2 对膀胱癌迁移、侵袭能力的影响 经过 siRNA 处理的两组细胞,24 h 的迁移率低于阴性对照组(见图 4),差异具有统计学意义($P<0.001$)。Transwell 侵袭实验显示,实验组细胞穿透至下室的数量较阴性对照组明显减少(见图 5),差异具有统计学意义($P<0.001$)。

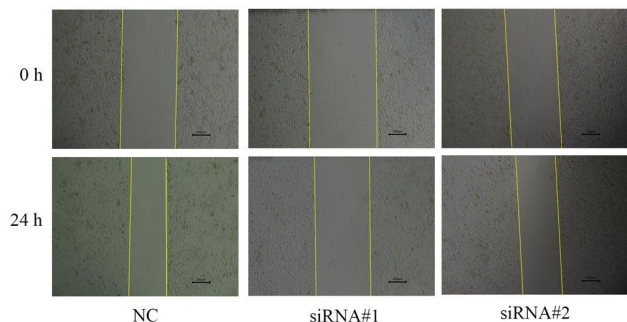
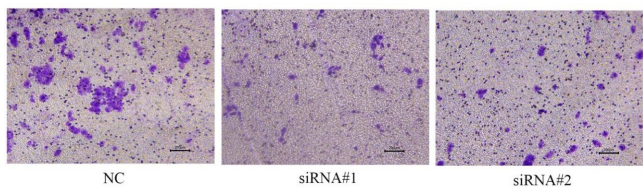
图 4 划痕实验结果($\times 40$)

表 2 划痕实验愈合百分比

组别	n	愈合百分比/%
NC 组	3	32.69±2.74
siRNA#1 组	3	23.52±3.59 ^a
siRNA#2 组	3	26.17±4.26 ^a
F		26.005
P		<0.001

注:①表内计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示;②与 NC 组相比,a: $P<0.001$ 。

图 5 Transwell 侵袭实验结果($\times 100$)

3 讨论

膀胱癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤,患者的不良预后与肿瘤侵袭深度、淋巴结转移、远处转移和化疗耐药相关,因此,有必要了解膀胱癌发展的分子机制和寻

表 3 Transwell 实验侵袭细胞数

组别	n	侵袭细胞数/个
NC 组	3	559(352~694)
siRNA#1 组	3	197(114~378) ^a
siRNA#2 组	3	230(195~380) ^a
H		15.838
P		<0.001

注:①表内计量资料数据以 $M(P_{25}\sim P_{75})$ 表示;②与 NC 组相比,a: $P<0.001$ 。

找有效的肿瘤标志物,以开发新的治疗靶点^[12]。肿瘤组织中 SPTBN2 高表达提示预后不良,这在肺腺癌、子宫内膜癌等多种癌症中均有报道。本研究发现,在人类膀胱癌 5637 细胞中沉默 SPTBN2 的表达能抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭,提示 SPTBN2 对膀胱癌的发展具有重要作用。

SPTBN2 是 Spectrin 蛋白 β -III 亚基的编码基因,定位于染色体 11q13,SPTBN2 参与维持细胞正常形态和功能,同时还是细胞高尔基体膜的主要组成部分^[7]。SALCEDO-SICILIA L 等^[13]研究发现,SPTBN2 在维持高尔基体膜结构完整性和调控蛋白分泌中发挥重要作用,SPTBN2 编码的蛋白主要富集于高尔基体的远端膜囊,维持高尔基体结构完整性和分泌活性,完全去除 SPTBN2 可导致高尔基体裂解。此外,SPTBN2 还参与细胞信号通路的传导,SPTBN2 可通过稳定细胞膜表面兴奋性氨基酸转运体 4(excitatory amino acid transporter 4, EAAT4)以调控谷氨酸信号通路^[14]。在小鼠模型中,SPTBN2 缺失能引起浦肯野细胞中钠离子电流减少及谷氨酸信号通路发生改变^[15]。针对 SPTBN2 与疾病的研究主要集中在神经退行性疾病如脊髓小脑性共济失调、认知障碍等方面^[16]。SPTBN2 蛋白可与肌动蛋白丝结合,形成 SPTBN2 收缩蛋白-肌动蛋白骨架,SPTBN2 基因突变促使 SPTBN2 蛋白与肌动蛋白丝亲和力增加而导致 5 型脊髓小脑性共济失调^[17]。近年来的研究发现,在肺腺癌中,SPTBN2 表达量与肺癌患者预后显著相关,SPTBN2 可促进肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[8]。在结直肠癌中,SPTBN2 可通过 m6A 修饰促进翻译从

而促使肿瘤恶性转化^[11]。甲状腺癌细胞敲低 SPTBN2 后,甲状腺癌细胞株的增殖、迁移能力和细胞周期 G1/S 期转化被抑制,凋亡细胞比例增加,同时细胞周期抑制蛋白 P21、cleaved-caspase-8、cleaved-caspase-3、Bax 等凋亡相关蛋白表达增加,说明 SPTBN2 在甲状腺癌细胞中可能参与细胞周期转换,抑制肿瘤细胞凋亡^[18]。在子宫内腺癌中,SPTBN2 是 miR-424-5p 的下游靶基因,SPTBN2 可以与 Claudin-4(CLDN4)相互作用,通过 PI3K/AKT 通路促进子宫内腺癌转移^[9]。以上研究表明,SPTBN2 参与多方面生物学过程,在多种肿瘤发生发展中发挥重要作用,具有较高研究价值。

膀胱癌早期临床症状不明显,导致部分患者首诊时肿瘤可能已发展至中晚期,且易复发的特点要求患者需要长期、规范的检查,这也增加了患者的治疗成本和心理负担。膀胱癌的生物学性质复杂,目前对其发病机制、进展过程仍未完全了解。因此,对膀胱癌发生、转移机制的研究,为寻找新的肿瘤标志物和预后评估具有重要意义。前期生物信息学研究结果表明 SPTBN2 显著影响膀胱癌患者预后,可能与膀胱癌的发展相关^[19],但 SPTBN2 在膀胱癌细胞中的相关作用尚未被深入研究。为进一步探讨 SPTBN2 在膀胱癌细胞中的作用,验证 SPTBN2 对膀胱癌细胞的影响,本研究设计了两条靶向 SPTBN2 siRNA 序列,通过 RNA 干扰技术构建 SPTBN2 低表达细胞株,qPCR 和 Western Blot 结果显示,两条 siRNA 序列具有较好的干扰效率。CCK-8 增殖实验结果表明,两组经过转染靶向 SPTBN2 siRNA 的细胞,48 h 和 72 h 的增殖速率均低于阴性对照组,SPTBN2 siRNA 实验组的增殖活性受到抑制;划痕实验和 Transwell 实验显示,下调 SPTBN2 表达后,膀胱癌 5637 细胞的迁移和侵袭能力较对照组弱。实验发现减少膀胱癌 5637 细胞中 SPTBN2 的表达量能抑制肿瘤增殖、迁移和侵袭,提示 SPTBN2 在膀胱癌发展中发挥促进作用,本研究的结果与既往研究结果相一致^[19]。

近年来,膀胱癌手术技术的改进以及新型治疗方案的应用,改善了部分患者的预后情况,但膀胱癌具有高度异质性,对各种治疗手段的敏感性存在很大差异,总体上膀胱癌患者的长期生存率仍变化不大^[20]。针对膀胱癌的部分靶向药物显示出较好的治疗效果和应用前景^[21]。但仍有部分患者不能从治疗中获益,现有的靶向药物在临床应用中仍具有局限性。如何减少肿瘤复发和进展仍然是膀胱癌治疗中有待突破的难点。SPTBN2 分布于多种细胞,在膀胱癌、甲状腺癌、结直肠癌等肿瘤发展过程中发挥促进作用,高表达 SPTBN2 提示肿瘤患者的预后较差,SPTBN2 的靶向药物研究可能成为未来膀胱癌治疗药物研发的方向。本研究验证了两条靶向 SPTBN2 siRNA 的有效性,实验结

果显示,SPTBN2 是促进膀胱癌肿瘤细胞增殖和侵袭的因子,降低 SPTBN2 的表达能有效抑制膀胱癌 5637 细胞的恶性生物学行为。因此 SPTBN2 可能是肿瘤治疗的潜在靶点,针对 SPTBN2 的进一步研究,对指导膀胱癌患者的临床治疗,研究新的治疗靶点具有重要意义。

本研究观察到 SPTBN2 的表达与膀胱癌 5637 细胞的增殖、迁移和侵袭能力相关,但作用机制尚不清楚,下调 SPTBN2 是否影响细胞内增殖与侵袭有关蛋白的表达以及细胞 DNA 复制活性能否受到抑制,有待进一步研究。

综上所述,研究发现降低 SPTBN2 在膀胱癌 5637 细胞中的表达能抑制膀胱癌细胞的增殖、迁移和侵袭。这提示 SPTBN2 在膀胱癌诊断和治疗中具有重要意义,值得深入研究。

参考文献:

- [1] OTTLEY E C,PELL R,BRAZIER B,et al. Greater utility of molecular subtype rather than epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) markers for prognosis in high-risk non-muscle-invasive (HG1) bladder cancer[J]. *J Pathol Clin Res*,2020,6(4):238-251.
- [2] 贺海蓉,李莉,冯敖梓,等. 1990~2017 年全球膀胱癌发病率和死亡率的研究[J]. *中国循证医学杂志*,2020,20(11):1257-1265.
- [3] MAK R H,HUNT D,SHIPLEY W U,et al. Long-term outcomes in patients with muscle-invasive bladder cancer after selective bladder-preserving combined-modality therapy: a pooled analysis of Radiation Therapy Oncology Group protocols 8802,8903,9506,9706,9906, and 0233 [J]. *J Clin Oncol*,2014,32(34):3801-3809.
- [4] CAO R,YUAN L S,MA B,et al. An EMT-related gene signature for the prognosis of human bladder cancer[J]. *J Cell Mol Med*,2020,24(1):605-617.
- [5] ROSENBERG J E,HOFFMAN-CENSITS J,POWLES T,et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial[J]. *Lancet*,2016,387(10031):1909-1920.
- [6] PAN L T,YAN R,LI W,et al. Super-resolution microscopy reveals the native ultrastructure of the erythrocyte cytoskeleton[J]. *Cell Rep*,2018,22(5):1151-1158.
- [7] STANKEWICH M C,TSE W T,PETERS L L,et al. A widely expressed beta III spectrin associated with Golgi and cytoplasmic vesicles[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,1998,95(24):14158-14163.
- [8] WU C L,DONG B,HUANG L,et al. SPTBN2, a new biomarker of lung adenocarcinoma [J]. *Front Oncol*,2021,11:754290.
- [9] WANG P L,LIU T,ZHAO Z D,et al. SPTBN2 regulated by miR-424-5p promotes endometrial cancer progression via CLDN4/PI3K/AKT axis[J]. *Cell Death Discov*,2021,

7(1):382.

- [10] HIRBE A C, ZHANG X C, DAHIYA S, et al. β -III-spectrin immunohistochemistry as a potential diagnostic tool with high sensitivity for malignant peripheral nerve sheath tumors[J]. *Neuro Oncol*, 2018, 20(6):858-860.
- [11] ZHANG Z, WAN G Q, ZHANG M M, et al. Comprehensive analysis of the transcriptome-wide m6A methylome in colorectal cancer by MeRIP sequencing[J]. *Epigenetics*, 2021, 16(4):425-435.
- [12] DONG L M, LI Y P, XUE D W, et al. PCMT1 is an unfavorable predictor and functions as an oncogene in bladder cancer[J]. *IUBMB Life*, 2018, 70(4):291-299.
- [13] SALCEDO-SICILIA L, GRANELL S, JOVIC M, et al. β III spectrin regulates the structural integrity and the secretory protein transport of the Golgi complex[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(4):2157-2166.
- [14] JACKSON M, SONG W, LIU M Y, et al. Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAT4 by two interacting proteins[J]. *Nature*, 2001, 410(6824):89-93.
- [15] PERKINS E M, CLARKSON Y L, SABATIER N, et al. Loss of beta-III spectrin leads to Purkinje cell dysfunction recapitulating the behavior and neuropathology of spinocerebellar ataxia type 5 in humans[J]. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*, 2010, 30(14):4857-4867.

- [16] BIAN X L, WANG S, JIN S Q, et al. Two novel missense variants in SPTBN2 likely associated with spinocerebellar ataxia type 5 [J]. *Neurol Sci*, 2021, 42(12):5195-5203.
- [17] AVERY A W, FEALEY M E, WANG F B, et al. Structural basis for high-affinity actin binding revealed by a β -III-spectrin SCA5 missense mutation[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1):1350.
- [18] ZHOU X F, LIN L Z, QI Y F, et al. SPTBN2 promotes the progression of thyroid cancer by accelerating G1/S transition and inhibiting apoptosis [J]. *Dis Markers*, 2022, 2022:2562595.
- [19] HUANG M R, LONG Y, JIN Y Z, et al. Comprehensive analysis of the lncRNA-miRNA-mRNA regulatory network for bladder cancer[J]. *Transl Androl Urol*, 2021, 10(3):1286-1301.
- [20] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2022[J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(1):7-33.
- [21] SIEFKER-RADTKE A O, CHO D C, DIAB A, et al. Bempegaldesleukin plus nivolumab in first-line metastatic urothelial carcinoma; results from PIVOT-02 [J]. *Eur Urol*, 2022, 82(4):365-373.

收稿日期:2022-11-24;修回日期:2023-01-11

(上接第 262 页)

BBN-100dB 组中同样观察到此类变化,提示 GAP-43 作为参与听觉中枢重建的重要因子,一旦重建完成, GAP-43 表达逐渐减少。由此推测,当噪声影响后,听皮层内神经元受损,使 GAP-43 受到刺激大量表达,从而使受损神经元发生轴突再生及突触大量生长,最终导致听皮层内神经元产生新的连接和突触效率的变化,促进耳鸣的病理生理过程。

综上所述,100dB SPL 噪声作为诱导因素可有效、快捷构建稳定的耳鸣动物模型,为耳鸣发病机制等研究贡献良好的模型基础。GAP-43 与听皮层的突触可塑性高度相关,在噪声干预两组中 GAP-43 表达升高,与小鼠出现耳鸣行为一致,这说明听觉中枢重塑化改变可能参与耳鸣的发生发展,为进一步探索药物阻断、保护新靶点奠定基础。

参考文献:

- [1] JARACH C M, LUGO A, SCALA M, et al. Global prevalence and incidence of tinnitus: a systematic review and meta-analysis[J]. *JAMA Neurol*, 2022, 79(9):888-900.
- [2] TANG D M, LI H W, CHEN L. Advances in understanding, diagnosis, and treatment of tinnitus[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1130:109-128.
- [3] 郭焕萍, 杨海弟, 郑亿庆, 等. 2171 例耳鸣患者的临床特征分析[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2017, 25(4):378-381.
- [4] 葛剑, 王勇, 陈谦学, 等. 葛根素对噪声慢性应激大鼠行为学及脑内记忆相关蛋白表达的影响[J]. *医药导报*, 2021,

40(5):592-597.

- [5] 王丽, 张璞, 杨江东, 等. 国内耳鸣动物模型方法比较研究[J]. *中华耳科学杂志*, 2018, 16(3):398-402.
- [6] OKADA M, KAWAGOE Y, SATO Y, et al. Phosphorylation of GAP-43 T172 is a molecular marker of growing axons in a wide range of mammals including primates[J]. *Mol Brain*, 2021, 14(1):66.
- [7] 苏文玲, 赵德安, 高兴强, 等. 耳鸣模型大鼠听皮层生长相关蛋白-43 和细胞骨架活性调节蛋白的表达[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2010, 18(4):320-323.
- [8] PIENKOWSKI M. Loud music and leisure noise is a common cause of chronic hearing loss, tinnitus and hyperacusis[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2021, 18(8):4236.
- [9] FABRIZIO-STOVER M, NICHOLS G, CORCORAN J, et al. Comparison of two behavioral tests for tinnitus assessment in mice[J]. *Front Behav Neurosci*, 2022, 16:995422.
- [10] 窦玉玉, 陆青兰, 罗菲, 等. 小鼠矽肺纤维化造模成功时间点的比较研究[J]. *右江民族医学院学报*, 2022, 44(1):1-5.
- [11] 周晶莹, 许铭, 沈卫东. 从中枢重塑阐述原发性耳鸣发病及治疗机制[J]. *中华耳科学杂志*, 2021, 19(2):328-331.
- [12] 朱金华, 李琳琳, 周敏, 等. 温胆汤含药血清对 10 mmol/L 谷氨酸条件下星形胶质细胞 PSD-95、GAP-43、JIP-3、Cx-43 表达的影响[J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(6):1-13.

收稿日期:2022-12-05;修回日期:2023-02-02