

慢病毒介导 siRNA 干扰 CEP55 表达对卵巢癌细胞生物学行为的影响

陈春莹*, 程丽琴, 付艳霞

(中山大学附属第八医院(深圳福田)妇产科, 广东 深圳 518033)

摘要: 本文通过慢病毒介导 siRNA 干扰卵巢癌 SKOV3 细胞中心体相关蛋白 55 (CEP55) 表达, 以观察其对细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移等生物学行为的影响。实验分为 CEP55 组(转染 CEP55 siRNA 慢病毒)、阴性对照组(转染不含 CEP55 siRNA 的慢病毒)和空白对照组(不处理)。结果显示: CEP55 siRNA 慢病毒转染效率为 $(89.4 \pm 4.7)\%$, CEP55 组 CEP55 的 mRNA 和蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), 第 12、24、36、48、72 h 时的 OD(570) 值显著降低 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率 $[(23.7 \pm 6.9)\%]$ 显著增加 ($P < 0.05$), 穿膜细胞数目 $[(11.3 \pm 4.1)/\text{个}]$ 明显减少 ($P < 0.05$), 细胞迁移距离 $[(245.8 \pm 33.7) \mu\text{m}]$ 明显减小 ($P < 0.05$)。提示慢病毒介导 siRNA 干扰 CEP55 表达可显著抑制卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、促进其凋亡、降低其侵袭和迁移能力。

关键词: 慢病毒; 中心体相关蛋白 55; 卵巢癌; 生物学行为

中图分类号: R737.31 文献标识码: A

Effects of lentiviral-mediated siRNA interference CEP55 expression on biological behavior of ovarian cancer cells

CHEN Chunying, CHENG Liqin, FU Yanxia

(Department of Gynaecology and obstetrics, The Eighth Affiliated Hospital, Sunyat-sen University, Shenzhen 518000, Guangdong, China)

Abstract: In this paper, the expression of CEP55 in SKOV3 cells was interfered by lentiviral-mediated siRNA, and its effect on proliferation, apoptosis, invasion and migration of cells was observed. The experiment was divided into CEP55 group, negative control group and blank control group. The CEP55 group and negative control group was transfected with lentiviral-mediated CEP55 siRNA and lentivirus vector without CEP55 siRNA, respectively. The blank control group did not do any treatment. The results of this study: the transfection efficiency of lentiviral-mediated CEP55 siRNA was $(89.4 \pm 4.7)\%$, the mRNA and protein expression of CEP55 in CEP55 group decreased significantly ($P < 0.05$), the OD (570) value in CEP55 group decreased significantly at 12, 24, 36, 48 and 72 h, the apoptosis rate in CEP55 group $[(23.7 \pm 6.9)\%]$ increased significantly ($P < 0.05$), the number of crossed cells in CEP55 group (11.3 ± 4.1) reduced significantly ($P < 0.05$), the migration distance in CEP55 group $[(245.8 \pm 33.7) \mu\text{m}]$ reduced obviously ($P < 0.05$). The results of this study suggested that lentiviral-mediated CEP55 siRNA can significantly inhibit the proliferation of SKOV3 cells, promote its apoptosis, and reduce its invasion and migration.

Key words: lentivirus; centrosomal protein of 55; ovarian cancer; biological behavior

卵巢癌的发病率仅次于乳腺癌和宫颈癌, 死亡率占所有妇科恶性肿瘤死亡率之首, 是严重危害女性健康的恶性肿瘤之一^[1]。卵巢位于盆腔内, 位置

深, 发病隐匿, 早期无明显症状, 70% 以上的患者发现时已进展为晚期^[2]。手术根治和化疗是治疗卵巢癌的首选方法, 但临床效果不尽人意, 晚期患者 5 年生存率低至 25% ~ 30%^[3]。所以探讨卵巢癌的发病机制对于其临床防治具有重要意义。中心体相关蛋白 55 (centrosomal protein of 55, CEP55) 是卷曲螺旋蛋白家族成员之一, 锚定微管聚合相关蛋白, 参与纺锤体的形成, 从而调控细胞周期^[4-5]。研究

收稿日期: 2018-03-03; 修回日期: 2018-04-13

基金项目: 深圳市科技创新委员会科研项目资助(项目编号 201774106)。

* 通信作者, E-mail: chen_chuny2017@163.com.

显示,CEP55 与胃癌^[6]、乳腺癌^[7]等多种恶性肿瘤的发生、发展密切相关。然而有关 CEP55 与卵巢癌生物学行为的关系,鲜有文献报道。本研究通过慢病毒介导 siRNA 干扰 CEP55 表达,观察其对细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移等生物学行为的影响,从而为卵巢癌的临床防治提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 卵巢癌 SKOV3 细胞株(中国科学院上海细胞库);SPF 级雄性 BABL/c 小鼠,6~8 周龄(上海斯莱克实验动物中心,许可证号 SCXK 沪 2012-0005);RM-1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(Gibco 公司,美国);CEP55 siRNA 慢病毒载体(System Biosciences 公司,美国);逆转录 PCR 试剂盒(ABI Applied Biosystems 公司,美国);TRIzol 法 RNA 提取试剂盒(Invitrogen 公司,美国);兔抗人 CEP55 一抗、HRP 标记的羊抗兔二抗、BAD 显色试剂盒(Santa Cruz 公司,美国);噻唑蓝(Sigma 公司,美国);TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(罗氏公司,瑞士);超净工作台、恒温 CO₂ 培养箱、酶标仪(Thermo Scientific 公司,美国);低温高速离心机、微量移液枪(Eppendorf 公司,美国);倒置荧光显微镜(Olympus 公司,日本)。

1.2 实验方法 SKOV3 细胞株接种于 RM-1640 培养基(10%胎牛血清+100 U/mL 青霉素+100 U/mL 链霉素);置于 37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养,隔天换液,细胞融合至 85%时,用 0.25%的胰蛋白酶消化后传代。

1.3 CEP55 siRNA 慢病毒转染 SKOV3 细胞及稳定转染细胞株筛选 取对数生长期的 SKOV3 细胞接种于 6 孔板,细胞长满至 60%时,随机分为 3 组进行实验:(1) CEP55 组:用 CEP55 siRNA 慢病毒(MOI = 50)转染细胞,(2) 阴性对照组:用不含 CEP55 siRNA 基因的慢病毒(MOI = 50)转染细胞,(3) 空白对照组:不处理,未用慢病毒转染。转染 48h 后计算转染效率 = (荧光表达细胞数目/白光视野细胞总数) × 100%。

取上述各组细胞接种于 6 孔板内,分批次加入 0、1、2、3、4、5 μg/mL 的嘌呤霉素,14 天内让所有细胞死亡的最低浓度嘌呤霉素即为最佳筛选浓度。再取上述各组细胞接种于 6 孔板,孵育 24 h 后加入最佳筛选浓度的嘌呤霉素,隔天更换新的培养液(含最佳筛选浓度的嘌呤霉素),连续培养 10 天,收集抗性细胞,获得稳定抑制 CEP55 表达的转染细

胞株。

1.4 RT-CR 和 Western blot 检测 CEP55 表达 (1) 收集各组细胞,Trizol 法提取细胞总 RNA,A260/A280 比值 1.8~2.0 提示样品 RNA 满足实验要求,按逆转录试剂盒操作反转录成 cDNA,进行 PCR 扩增分析,引物委托上海吉玛公司合成,PCR 扩增产物经过 1.5%的琼脂糖凝胶电泳分离,Bio-Rad 扫描分析,目的基因表达量 = 目的基因光密度值/内参基因光密度值。(2) 收集各组细胞总蛋白,80 μg 总蛋白上样,SDS-PAGE 电泳,转 PVDF 膜。TBS-T 漂洗,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入兔抗人 CEP55 一抗工作液(1 : 500),4 °C 孵育过夜。TBS-T 漂洗,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗工作液(1 : 500),37 °C 孵育 1 h。TBS-T 漂洗,暗室内 BAD 显色、曝光,Bio-Rad 扫描分析。目的蛋白表达量 = 目的蛋白灰度值/β-actin 灰度值。

1.5 噻唑蓝比色法检测 SKOV3 细胞增殖 实验分组同 1.3,细胞接种于 96 孔板,分别于 12、24、36、48、72 h 每孔加入 20 μL 噻唑蓝溶液(5 mg/μL)。4 h 后甩干,每孔再加入二甲基亚砷 150 μL,待结晶溶解后,酶标仪于 570 nm 处测定 OD 值,并绘制生长曲线。

1.6 TUNEL 法检测 SKOV3 细胞凋亡 实验分组同 1.3,细胞接种于放置盖玻片的 6 孔板,48 h 后收集盖玻片,二甲苯浸洗 2 次,梯度酒精浸洗 1 次,磷酸盐缓冲液漂洗 2 次。加入 Proteinase K 工作液,37 °C 下孵育 30 min。磷酸盐缓冲液漂洗 2 次,加入 50 μL 的 TUNEL 反应混合液,封膜,暗湿盒中 37 °C 下孵育 30 min。磷酸盐缓冲液漂洗 3 次,加 50 μL 的 converter-POD 工作液,封膜,暗湿盒中 37 °C 下孵育 30 min。磷酸盐缓冲液漂洗 3 次,加入 100 μL 的 DAB 显色剂,25 °C 下孵育 10 min。磷酸盐缓冲液漂洗 3 次,苏木素,自来水冲洗,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。光学显微镜下进行细胞计数。

1.7 Transwell 实验检测 SKOV3 细胞侵袭 实验分组同 1.3,用不含血清的 RM-1640 培养液将细胞接种于 Transwell 小室上室,同时在 Transwell 小室下室中加入含 10%胎牛血清的 RM-1640 培养液。孵育 48 h 后,用棉签擦去基底膜内侧细胞,基底膜外侧的细胞用 4%中性甲醇固定,结晶紫染色,显微镜下计数染色细胞数目。

1.8 细胞划痕实验检测 SKOV3 细胞迁移 实验分组同 1.3,将细胞接种于 6 孔板,待融合至 85%时,在 6 孔板底部划直线,用不含血清的 RM-1640 培养液继续孵育,48 h 后弃去培养液,细胞经 4%中性甲醛

固定, Gimesa 染色, 细胞迁移能力 = 0 h 划痕距离 - 48 h 划痕距离。

1.9 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计学软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析, 组内比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞转染及稳定转染细胞株筛选 转染 48 h 后, CEP55 组和阴性对照组转染效率分别为 $(89.4 \pm 4.7)\%$ 和 $(87.5 \pm 4.3)\%$, 并经最佳浓度的嘌呤霉素 ($4 \mu\text{g}/\text{mL}$) 筛选得到了稳定转染细胞株。见图 1。

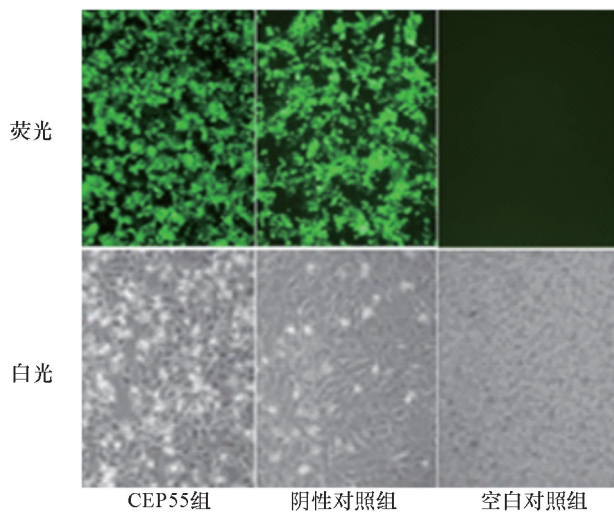


图 1 荧光显微镜观察细胞绿色荧光蛋白表达情况 (100×) 空白对照组未见绿色荧光蛋白, CEP55 组和阴性对照组可见大量细胞表达绿色荧光蛋白, 提示慢病毒转染成功

2.2 各组细胞 CEP55 表达比较 RT-CR 和 Western blot 检测显示, CEP55 组 CEP55 mRNA 和蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$)。见表 1 和图 2。

表 1 RT-CR 和 Western blot 检测 CEP55 表达

组别	n	CEP55 mRNA	CEP55 蛋白
CEP55 组	5	0.21 ± 0.09	0.10 ± 0.04
阴性对照组	5	1.17 ± 0.32	0.91 ± 0.14
空白对照组	5	1.23 ± 0.24	0.87 ± 0.13

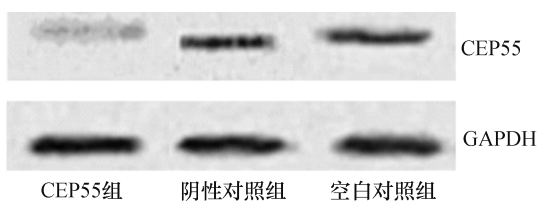


图 2 Western blot 检测 CEP55 蛋白表达

2.3 干扰 CEP55 表达对 SKOV3 细胞增殖、凋亡的影响 细胞生长曲线显示, 第 12、24、36、48、72 h 时, CEP55 组 OD (570) 值明显低于阴性对照组和空白对照组 ($P < 0.05$); TUNEL 检测显示, CEP55 组细胞凋亡率 $(23.7 \pm 6.9)\%$ 显著大于阴性对照组 $(5.3 \pm 1.4)\%$ 和空白对照组 $(6.4 \pm 1.1)\%$, ($P < 0.05$)。见图 3、图 4。

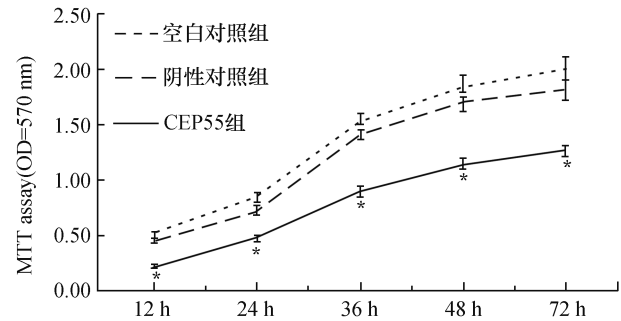


图 3 噻唑蓝比色法检测干扰 CEP55 表达对 SKOV3 细胞增殖的影响 与阴性对照组和空白对照组比较, * $P < 0.05$

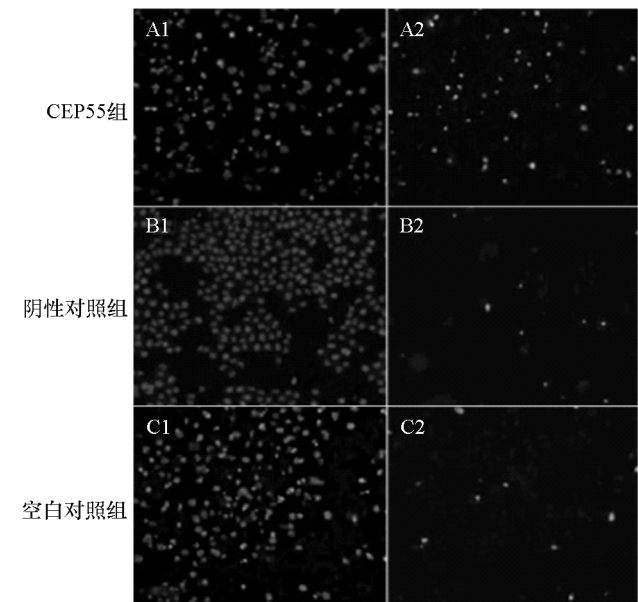


图 4 TUNEL 检测干扰 CEP55 表达对 SKOV3 细胞凋亡的影响 (200×)

A1~C1 显示用 DAPI 对细胞核染色, A2~C2 显示用 TUNEL 染色的凋亡细胞

2.4 干扰 CEP55 表达对 SKOV3 细胞侵袭、迁移的影响 Transwell 实验显示, CEP55 组穿膜细胞数目 (11.3 ± 4.1) 个, 明显少于阴性对照组 (33.8 ± 7.3) 和空白对照组 (37.5 ± 7.0) , ($P < 0.05$); 细胞划痕实验显示, CEP55 组细胞迁移距离 $(245.8 \pm 33.7) \mu\text{m}$, 明显小于阴性对照组 $(447.8 \pm 53.1) \mu\text{m}$ 和空白对照组

(453.6 ± 55.2) μm , ($P < 0.05$)。见图 5、图 6。

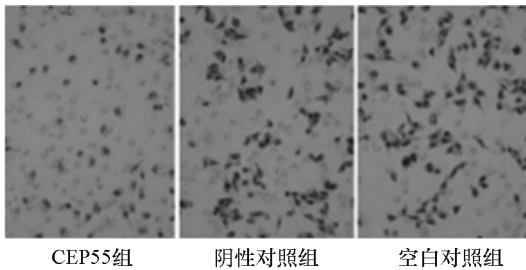


图 5 Transwell 实验检测干扰 CEP55 表达对 SKOV3 细胞侵袭能力的影响(100 \times)

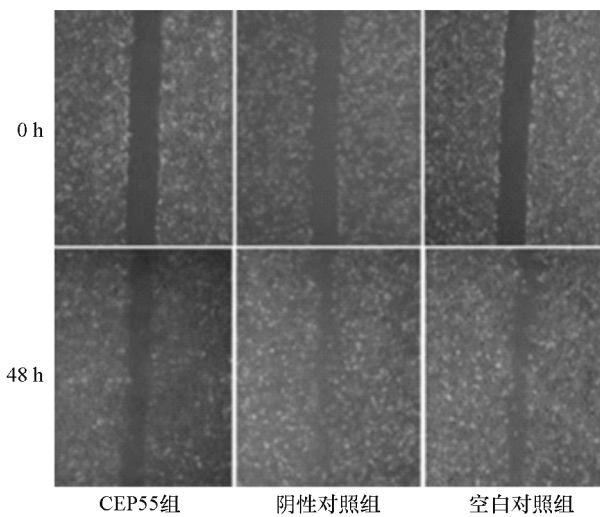


图 6 细胞划痕实验检测干扰 CEP55 表达对 SKOV3 细胞迁移能力的影响(100 \times)

3 讨 论

中心体是一个非膜性细胞器,位于细胞核周围,作为细胞中首要的微管组织,在细胞生命活动中发挥着重要作用,中心体由中心粒和中心粒周围物质两部分组成^[8]。CEP55 是中心粒周围物质中的重要调节蛋白,参与微管聚集、纺锤体装配、极化、分离和胞质分裂,Fabbro 等^[9]学者研究发现沉默 CEP55 可导致多核细胞、中期纺锤体异常,细胞停滞于中间体阶段,胞质分裂失败。此外,CEP55 还参与中心体功能的调节,其表达异常导致非整倍体细胞和不稳定染色体组的出现,而多种恶性肿瘤细胞中均存在非整倍体细胞和不稳定染色体组^[10]。说明 CEP55 参与了多种恶性肿瘤的发生、发展。张

勇等^[11]研究发现,下调 CEP55 表达能够显著抑制肝癌 HepG2 和 HeP3B 细胞的增殖,阻滞细胞 G2 周期。于震男等^[12]研究显示,CEP55 在脑胶质瘤组织中的表达显著增加,而沉默 CEP55 表达可显著抑制胶质瘤 LN229 细胞的增殖、侵袭和迁移。然而有关 CEP55 与卵巢癌生物学行为的关系,鲜有文献报道。

RNA 干扰技术是近年来广泛应用的调节基因表达的技术,已成为实现基因功能研究和基因治疗的重要手段^[13-14]。制约 RNA 干扰技术广泛应用的关键在于如何将外源性 siRNA 完整送入靶细胞,实现靶基因沉默。质粒和病毒是目前常用的两组 siRNA 载体,其中质粒载体制备简单,然而导入效率不高,且很难实现长期稳定的表达。病毒载体主要包括慢病毒、腺病毒和逆转录病毒,其中慢病毒具有导入效率高、免疫反应小等优点,能够将外源性 siRNA 高效整合至靶细胞,并实现长期稳定表达^[15-16]。

本文采用了 siRNA 慢病毒载体,结果发现,CEP55 siRNA 慢病毒转染效率为 (89.4 ± 4.7)%, CEP55 组 CEP55 的 mRNA 和蛋白表达显著降低,说明 CEP55 siRNA 转染成功并有效抑制 CEP55 表达,此外通过嘌呤霉素筛选,获得了稳定抑制 CEP55 表达的细胞株。恶性肿瘤的特点之一就是细胞接触生长抑制性丧失,为了验证 CEP55 与肿瘤细胞异常增殖的关系,本研究观察了干扰 CEP55 表达对细胞增殖、凋亡的影响,结果发现,CEP55 组第 12、24、36、48、72 h 时的 OD(570)值显著降低,细胞凋亡率 [(23.7 ± 6.9)%]显著增加,说明干扰 CEP55 表达能够明显抑制细胞增殖,促进其凋亡。为了进一步验证 CEP55 与肿瘤细胞侵袭、转移的关系,本研究进一步观察了干扰 CEP55 表达对细胞侵袭、迁移能力的影响,结果发现,CEP55 组穿膜细胞数目 [(11.3 ± 4.1)/个]明显减少,细胞迁移距离 [(245.8 ± 33.7) μm]明显减小,说明干扰 CEP55 表达抑制了肿瘤细胞的侵袭、迁移能力。

综上所述,慢病毒介导 siRNA 干扰 CEP55 表达可显著抑制卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、促进其凋亡、降低其侵袭和迁移能力。从而为卵巢癌的临床治疗提供了新的思路和靶点,但 CEP55 与卵巢癌发生、发展的具体作用机制尚需进一步研究。

(下转第 364 页)

肌瘤对手术者在腹腔镜下缝合的技术要求更高,采取本法缝合,止血彻底,简化了手术操作,同时出血量的减少使手术视野相对清晰,明显缩短了手术时间。(3)术后子宫形态恢复好,减少残腔血肿形成和继发感染,减少术后粘连;对于体积较大的子宫肌瘤传统的缝合方法需要先行梭形切口修剪掉部分浆肌层再进行缝合,破坏了子宫的完整性,而且缝合后创面浆肌层容易向外突出,不平整;而本方法将瘤腔周围的浆肌层内翻填入瘤腔即可,这样做一方面起到压迫止血、减少残腔血肿形成,另一方面缝合后子宫形态恢复好,浆膜面光滑,减少术后粘连。

妊娠期间子宫破裂是腹腔镜子宫肌瘤剔除术后严重的远期并发症,虽然文献报道其发生率仅0.26%~1%,但一旦发生对母儿造成严重危害,甚至危及生命。本研究中的改良缝合方法创面是浆膜对浆膜,愈合后若再次妊娠是否会增加子宫破裂的风险,还需通过进一步研究证实。

综上所述,腹腔镜子宫肌瘤剔除术中应用此种

改良缝合法操作简单,止血效果好,可以显著缩短手术时间,减少术中出血量,减少术后肌瘤残腔继发血肿的形成,安全性较高,值得临床应用。但远期疗效尚需延长随访时间和扩大样本数量来进一步证实。

参考文献:

- [1] 沈铿, 马丁. 妇产科学. 第3版[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016:307-10.
- [2] 王丹丹, 杨清. 腹腔镜子宫肌瘤剔除术的相关问题及其处理[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2015, 31(5):399-402.
- [3] 林仲秋. 子宫肌瘤的手术治疗[J]. 中国计划生育和妇产科, 2012, 4(3):38-9.
- [4] 王玢, 童英, 朱艳. 腹腔镜子宫肌瘤剔除术两种缝合方法疗效比较[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2010, 26(1):65-6.
- [5] 黄鑫, 张璐芳, 侯征, 等. 腹腔镜下子宫肌瘤剔除术中子宫创面缝合方法的探讨[J]. 中国微创外科杂志, 2013, 13(11):1005-8.
- [6] 金凤斌, 任波, 陈双, 等. Quill 缝线在腹腔镜下子宫肌瘤剔除术中的应用效果[J]. 中国微创外科杂志, 2016, 16(1):24-7.

(本文编辑:秦旭平)

(上接第 361 页)

参考文献:

- [1] 杨建华, 石一复. 卵巢癌的病因流行病学研究进展[J]. 中国妇幼保健研究, 2004, 15(6):382-4.
- [2] 李巍, 崔恒, 冯捷, 等. 卵巢癌诊断的研究进展[J]. 中华妇产科杂志, 2005, 40(7):496-8.
- [3] 丁金萍. 新辅助化疗联合手术治疗晚期卵巢癌的近期及远期疗效[J]. 现代预防医学, 2011, 38(14):2724-5.
- [4] 杨雪, 牛昀, 王慧, 等. 中心体相关激酶 Nek2 与乳腺癌前病变及早期癌变的相关性研究[J]. 现代肿瘤医学, 2015(1):54-8.
- [5] 王良震, 李春霖, 龚燕平, 等. 中心粒周蛋白相关疾病发病机制的新进展[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(15):2981-6.
- [6] TAO J, ZHI X, TIAN Y, et al. CEP55 contributes to human gastric carcinoma by regulating cell proliferation [J]. Tumor Biology, 2014, 35(5):4389-99.
- [7] WANG Y, JIN T, DAI X, et al. Lentivirus-mediated knockdown of CEP55 suppresses cell proliferation of breast cancer cells [J]. Biosci Trends, 2016, 10(1):67-73.
- [8] 张彤雯, 牛昀. 中心体相关调节蛋白及其异常与肿瘤发生的研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2007, 14(12):956-9.
- [9] FABBRO M, ZHOU BB, TAKAHASHI M, et al. Cdk1/Erk2- and Plk1-dependent phosphorylation of a centrosome protein, Cep55,

is required for its recruitment to midbody and cytokinesis [J]. Dev Cell, 2005, 9(4):477-88.

- [10] 赵凯越, 李福才. miRNA 调控中心体与肿瘤发生的相关性 [J]. 解剖科学进展, 2016(5):540-2.
- [11] 张勇, 孟凡迪, 张靖鑫, 等. 靶向下调 Cep55 表达水平对肝癌细胞增殖能力的影响 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2016, 37(1):45-8.
- [12] 于震男, 罗正祥, 赵鹏来, 等. RNAi 干扰脑胶质瘤 CEP55 表达对胶质瘤细胞 LN229 功能影响的相关性研究 [J]. 临床神经外科杂志, 2017, 14(2):86-90.
- [13] 薛玉文, 李铁军, 周家名, 等. 多靶向 RNA 干扰技术在基因治疗中的应用与前景 [J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(1):75-81.
- [14] 王淑芬, 董巍蕾, 谢晶, 等. miR-26a 通过调节 MTDH 基因表达抑制 CAOV3 细胞系生长 [J]. 中南医学科学杂志, 2014, 42(6):563-6.
- [15] 李妍, 杜红廷, 李红卫. 慢病毒载体及其在 RNA 干扰技术中的应用与发展 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2013(1):55-60.
- [16] 张曼, 孙秀萍, 宋铭晶. 慢病毒载体用于转基因技术的研究进展 [J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2014, 8(10):1949-53.

(本文编辑:蒋湘莲)