

文章编号 1006-8147(2016)05-0373-04

论 著

抑癌基因 ST7L 对卵巢癌细胞增殖、细胞周期和裸鼠移植瘤的影响

周 闻^{1,2}, 杨 臻¹, 刘 民¹, 汤 华¹

(1. 天津医科大学基础医学院病原生物学系生命科学中心实验室, 天津 300070; 2. 天津市天津医院检验科, 天津 300211)

摘要 目的: 研究 ST7L 基因对人类卵巢癌细胞系 OVCAR3 和 SKOV3 细胞增殖、细胞周期和体内裸鼠成瘤模型的影响。方法: PCR 扩增 ST7L 过表达质粒 (pcDNA3/ST7L), 生物合成 ST7L 的敲降质粒 (pSilencer/ST7L); 利用脂质体转染技术在卵巢癌细胞中过表达或者敲降 ST7L 基因, 用荧光定量 PCR、Western blot 验证质粒的有效性; MTT、克隆形成实验、流式细胞术检测 ST7L 对 OVCAR3 和 SKOV3 细胞增殖能力、周期的影响; 并通过裸鼠移植瘤实验研究 ST7L 在体内成瘤能力。结果: 过表达和敲降 ST7L 质粒是有效的; 过表达 ST7L 后抑制了卵巢癌细胞生长, 抑制了细胞 G1/S 期的转化; 过表达 ST7L 在体内能够有效抑制裸鼠的成瘤能力。结论: ST7L 抑制 OVCAR3 和 SKOV3 细胞的增殖能力, 抑制细胞周期进程, 抑制体内裸鼠成瘤能力。

关键词 抑癌基因 ST7L; 卵巢癌; 移植瘤; 细胞增殖; 细胞周期; 裸鼠

中图分类号 R737.31

文献标志码 A

Effects of ST7L on cell proliferation, cell cycle in ovarian cancer and tumour xenografts in nude mice

ZHOU Wen^{1,2}, YANG Zhen¹, LIU Min¹, TANG Hua¹

(1. Life Science Research Center, Department of Pathogen Biology, Basic Medical School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of ST7L on the proliferation, cell cycle in ovarian cancer and tumor xenograft in nude mice. **Methods:** Ectopic expression plasmid of ST7L by PCR and compounded the knockdown plasmid were established. ST7L was over-expressed and knocked down in OVCAR3 and SKOV3 cells via liposome 2000 transfection. Fluorescence based quantitative polymerase chain reaction and western blot assay were used to analyze the expression of ST7L. MTT, colony formation assay and flow cytometry were applied to detect the effects of ST7L on the proliferation and cell cycle of OVCAR3 and SKOV3 cells after transfection. Tumor xenograft studies were used to observe the tumor growth *in vivo*. **Results:** The used plasmids were effective; the ectopic expression of ST7L suppressed the proliferation and cell cycle of OVCAR3 and SKOV3 cells, and the tumor growth was inhibited by over-expression of ST7L *in vivo*. **Conclusion:** ST7L could inhibit the proliferation and cell cycle of ovarian cells and tumor growth in nude mice.

Key words ST7L; ovarian cancer; tumor xenograft; cell proliferation; cell cycle; nude mice

卵巢癌在女性肿瘤中是第二大常见肿瘤, 但致死率却是最高; 上皮细胞性卵巢癌约占卵巢癌的90%, 因此, 研究上皮细胞性卵巢癌对于了解卵巢癌的发生发展和治疗具有重大意义^[1-2]。据文献报道, 上皮细胞性卵巢癌的发生发展主要是由癌基因或者抑癌基因的异常表达所引起, 抑癌基因的失活会导致肿瘤的形成和恶性转化^[3]。ST7L 作为抑癌基因 ST7 的同源物被发现^[4], 但是其在卵巢癌中的功能及其分子机制目前还不清楚。本研究主要是在卵巢癌细胞系中通过 MTT 实验、克隆形成实验、细胞周期实验对 ST7L 的功能进行探究并在裸鼠移植瘤中分

析成瘤能力, 确定 ST7L 在卵巢癌中的抑癌作用, 为进一步研究其具体的分子机制奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 细胞系 人卵巢癌细胞系 OVCAR3 和 SKOV3 为本实验室保存, 其培养条件为含有 10% 胎牛血清、100 μg/mL 链霉素、100 IU/mL 青霉素的 RPMI-1640 培养液, 细胞置于 37 ℃ 含 5% CO₂ 的细胞孵箱中培养, 每隔 48~72 h 用 0.1% 胰蛋白酶消化液消化细胞, 进行传代培养。

1.2 质粒构建

1.2.1 过表达 ST7L 的质粒构建 (1) PCR 制备插入的外源片段: 循环温度为: 94 ℃ 5 min (预变性), 94 ℃ 30 s (变性)、56 ℃ 30 s (退火)、72 ℃ 120 s (延伸)、33 个循环, 72 ℃ 10 min (延伸), 产物大小约为 1 700 bp 的片段, 酶切位点为 *KpnI* 和 *EcoRI*。

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (91029714; 31270818; 81572790); 天津市自然科学基金资助项目 (12JCZDJC25100)

作者简介 周闻(1982-), 女, 硕士在读, 研究方向: 病原生物学; 通信作者: 汤华, E-mail: htang2002@yahoo.com。

上游引物 ST7L-S 序列为 5'CAGGGGTACCGCC ACCATGGCGGACCGTGGCGGCGTG3'; 下游引物 ST7L-AS 序列为 5'CCGGAATTCGCCAGAACTCAAA CCTAGGTCTTC3'。(2)将回收 PCR 产物连接至已切好的 pcDNA3 载体上。

1.2.2 生物合成 ST7L 的敲降质粒 上游引物为 shR-ST7L-Top 5'GATCCAGTCCTCAGCATGAAGC TCAACTCGAGTTGAGCTTCATGCTGAGGACTTTTTT GA3';下游引物为 shR-ST7L-Bot 5'AGCTTCAAAA AAGTCCTCAGCATGAAGCTAACTCGAGTTGAGCTT CATGCTGAGGACTG3'。

1.3 荧光定量 PCR 按照 RNA 提取试剂盒说明书步骤提取细胞总 RNA。然后使用逆转录试剂盒将其逆转录为 cDNA, 使用 CWBIO 公司的 SYBR Green Master Mix 进行荧光定量 PCR。PCR 进行 40 个循环, 循环参数为(94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s)。引物如下: ST7L 上游引物序列, 5'CGCGGATCCCCTCTG TGTGTGTGTGTGTAAC3', 下游引物序列, 5'CCGGA ATTCGATTCCTGGCAGGTCGGT3'; β -actin 上游引物序列, 5'CGTGACATTAAGGAGAAGCTG3', 下游引物序列, 5'CTAGAAGCATTTGCGGTGGAC3'。ST7L 基因转录水平按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法通过管家基因 β -actin 进行校正。

1.4 Western blot 用细胞裂解液 RIPA 从各组细胞中提取细胞全蛋白。蛋白样品用 10% SDS-PAGE 跑胶后用湿法转膜至 PVDF 膜上。5%脱脂牛奶室温封闭 2 h, 4 °C 孵育 ST7L (1:2 000 稀释)和 GAPDH (1:5 000 稀释)一抗过夜。兔抗人多克隆抗 ST7L 抗体购自天津赛尔生物技术有限公司。充分洗膜后室温孵育二抗 1 h。羊抗兔二抗购自天津赛尔生物技术有限公司。再次洗膜后于暗室中显影、定影, 得到最终结果。

1.5 MTT 96 孔板中分别转染 4 组细胞, 分别在转染后 48 h、72 h 加入 10 μ L/孔 5 mg/mL 的 MTT 溶液;继续 37 °C 温箱培养 4~6 h, 小心吸尽培养液, 每孔加入 100 μ L DMSO;避光振荡溶解结晶后用酶标仪于 570 nm 处检测吸光度 OD 值。每组实验重复 3 次。

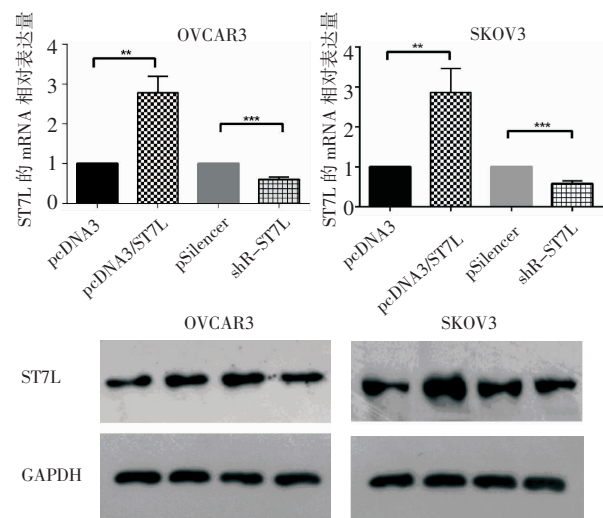
1.6 细胞周期流式细胞术 收集转染后 48 h 的 4 组细胞, 计数细胞, 每管取 6×10^5 个细胞, 然后严格按照周期检测试剂盒说明书进行操作, 后经流式细胞仪检测。该试剂盒购自凯基生物有限公司。

1.7 裸鼠移植瘤模型 由中国科学院动物中心购买 6 周大的 BALB/c 免疫缺陷的裸鼠, 转染过表达 pcDNA3/ST7L 质粒和 pcDNA3 对照质粒至 OVCAR3 细胞 48 h 后, 计数 1×10^6 个细胞注射入裸

鼠腋窝皮下。每组含 5 只裸鼠。剥离肿瘤观察其大小。
1.8 统计学处理 计量资料实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较采用 *t* 检验, 多组均数比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法。使用 Graphpad Prism 6 统计软件进行统计分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达质粒 pcDNA3/ST7L 和敲降质粒 pSilencer/ST7L 有效 我们扩增了 ST7L 的过表达片段并连接至 pcDNA3 载体, 命名为 pcDNA3/ST7L;生物合成的敲降质粒命名为 pSilencer/ST7L。图 1 示, 过表达 ST7L 后能够明显升高 ST7L 的 mRNA 和蛋白水平;敲降 ST7L 后能够显著降低 ST7L 的 mRNA 和蛋白水平。该结果表明所构建的质粒是有效的。

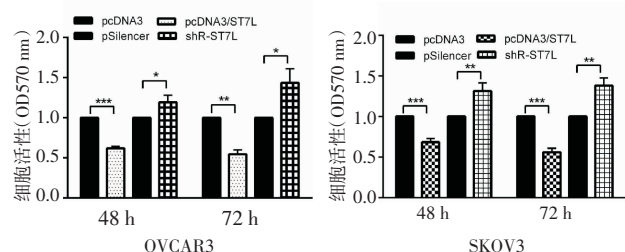


** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图1 荧光定量 PCR 实验和 western blot 实验验证质粒是有效的

Fig 1 The plasmids proved to be effective by RT-qPCR and western blot assay

2.2 ST7L 抑制 OVCAR3 和 SKOV3 细胞的细胞活性 图 2 示, 过表达 ST7L 后, 48 h、72 h 后的细胞活性明显受到抑制; 敲降 ST7L 后明显促进几个时间点的细胞活性。

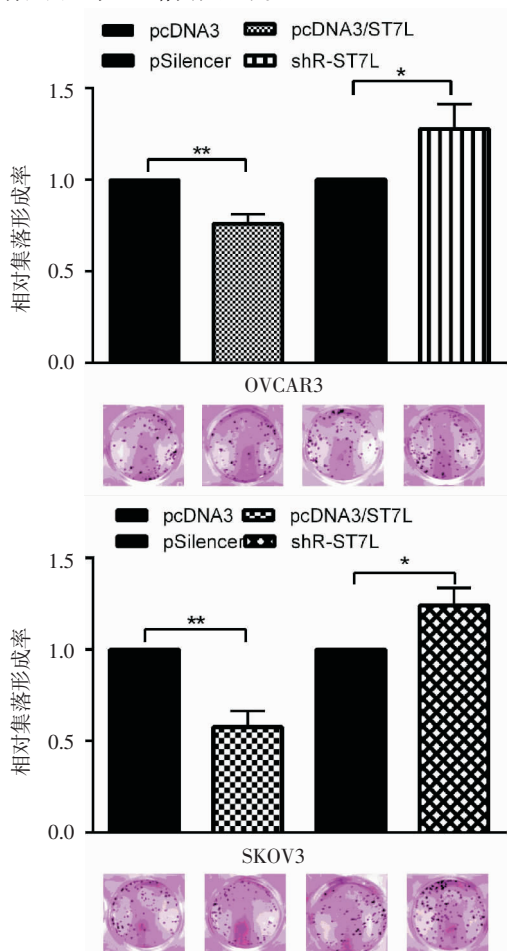


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图2 MTT 实验分析过表达 ST7L 抑制 OVCAR3 和 SKOV3 的细胞活性

Fig 2 Overexpression of ST7L suppressed cell viability of OVCAR3 and SKOV3 by MTT assay

2.3 ST7L 抑制 OVCAR3 和 SKOV3 细胞的集落形成能力 集落形成实验表明,在卵巢癌细胞中过表达 ST7L 后集落形成率较对照组明显受到抑制,抑制率大约为 30%;敲降后的集落形成能力明显增强,增强了约 1.4 倍(图 3)。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 3 克隆形成实验检测 ST7L 对克隆形成能力的影响

Fig 3 The effects of ST7L on colony formation rate by colony formation assay

2.4 ST7L 抑制 OVCAR3 细胞 G1/S 期转化 流式细胞术检测分析结果发现,过表达 ST7L 能够明显抑制 OVCAR3 细胞 G1/S 的转化,敲降 ST7L 后能够有效地促进 OVCAR3 细胞 G1/S 期的转化(图 4)。

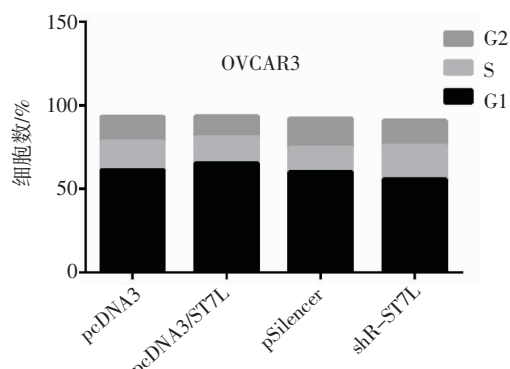


图 4 过表达 ST7L 阻滞 OVCAR3 细胞由 G1 期向 S 期转化

Fig 4 ST7L overexpressed inhibited G1/S progress of OVCAR3

2.5 ST7L 抑制裸鼠成瘤的能力 裸鼠移植成瘤模型实验结果表明,过表达 ST7L 的裸鼠组裸鼠的成瘤能力明显低于对照组,而且这种差异是有意义的(图 5)。

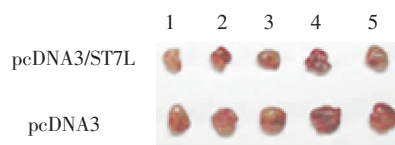


图 5 裸鼠移植瘤模型分析 ST7L 对体内成瘤能力的影响

Fig 5 The effects of ST7L on growth ability by tumor xenograft model *in vivo*

3 讨论

2015 年约有 21 980 例新增卵巢癌患者,14 270 例患者死于该癌症^[5]。目前的治疗手段主要为扩大性的手术治疗以及铂依赖的化疗^[6-7],70%~80%的癌症病人可以获得缓解性的手术治疗,但是绝大部分患者是难以治愈的^[8]。卵巢癌高致死率的原因部分是因为早期难以诊断,75%的患者诊断出来已经到三期或是四期^[9]。这些不断增加的病例很难治疗,导致 5 年的生存率低于 30%^[10],因此研究卵巢癌的分子机制、提高早期诊断率对于治疗卵巢癌是有意义的。

ST7 作为抑癌基因与 wnt2 基因成簇定位于 7 号染色体。Katoh 等^[4,11]通过生物信息学预测和 cDNA-PCR 确定了 ST7 的一个相关基因,并命名为 ST7L,其包括有 575 个氨基酸。在乳腺癌、头颈部鳞状细胞癌、非小细胞性肺癌、脑膜瘤、黑色素瘤、急性淋巴瘤等一系列癌症中,由于等位基因的缺失或者人类染色体区域的重组,ST7L 可能作为新的抑癌基因发挥作用。Chen 等^[12]报道,在神经胶质瘤细胞中,ST7L 抑制细胞的增殖能力和侵袭能力,并且可以诱导细胞凋亡。我们查阅大量文献^[13-15]发现,ST7L 在卵巢癌中作用及其分子机制到目前为止鲜有报道。我们构建了 ST7L 的过表达和敲降质粒,通过脂质体转染法转染质粒进入卵巢癌的 OVCAR3 和 SKOV3 两种细胞系,并且验证了质粒有效性。MTT 和克隆形成实验表明,ST7L 能够抑制卵巢癌细胞的增殖能力;流式细胞术检测细胞周期发现,ST7L 能够阻滞细胞由 G1 期向 S 的转化;裸鼠的移植瘤模型发现,ST7L 能够抑制移植瘤的生长。

综上所述,本研究可以确定 ST7L 在卵巢癌中作为抑癌基因影响着细胞的生长增殖能力以及细胞的周期转化。这为进一步研究 ST7L 在卵巢癌中具体分子机制及其相关通路奠定了工作基础,也为早期诊断卵巢癌找寻新的靶标分子提供了一定的参考价值。

参考文献:

- [1] Clarke-Pearson D L. Clinical practice. Screening for ovarian cancer [J]. N Engl J Med, 2009, 361(2): 170
- [2] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69
- [3] Li S D, Zhang J R, Wang Y Q, et al. The role of microRNAs in ovarian cancer initiation and progression[J]. J Cell Mol Med, 2010, 14(9): 2240
- [4] Kirikoshi H, Katoh M. Expression of ST7R (ST7-like, ST7L) in normal tissues and cancer[J]. Int J Oncol, 2002, 21(1): 193
- [5] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5
- [6] Ozols R F, Bundy B N, Greer B E, et al. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study[J]. J Clin Oncol, 2003, 21(17): 3194
- [7] McGuire W P, Hoskins W J, Brady M F, et al. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer[J]. N Engl J Med, 1996, 334(1): 1
- [8] Bristow R E, Tomacruz R S, Armstrong D K, et al. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the Platinum era: a meta-analysis[J]. J Clin Oncol, 2002, 20(5): 1248
- [9] Chester C, Dorigo O, Berek J S, et al. Immunotherapeutic approaches to ovarian cancer treatment[J]. Immunother Cancer, 2015, 3: 7
- [10] Robertson D M. Screening for the early detection of ovarian cancer [J]. Womens Health (Lond Engl), 2009, 5(4): 347
- [11] Saitoh T, Katoh M. Molecular cloning and characterization of mouse St7r (St7-like, St7l)[J]. Int J Mol Med, 2002, 10(1): 119
- [12] Chen L, Zhang A, Li Y, et al. MiR-24 regulates the proliferation and invasion of glioma by ST7L via β -catenin/Tcf-4 signaling [J]. Cancer Lett, 2013, 329(2): 174
- [13] Kwak S Y, Yang J S, Kim B Y, et al. Ionizing radiation-inducible miR-494 promotes glioma cell invasion through EGFR stabilization by targeting p190B rhoGAP[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843(3): 508
- [14] Katoh M. Cardio-miRNAs and onco-miRNAs: circulating miRNA-based diagnostics for non-cancerous and cancerous diseases [J]. Front Cell Dev Biol, 2014, 2: 61
- [15] Heo H S, Kim J H, Lee Y J, et al. Microarray profiling of genes different expressed during erythroid differentiation of murine erythroleukemia cells[J]. Mol Cells, 2005, 20(1): 57

(2016-03-11 收稿)

医学论文中被误用为单位符号的“ppm、ppb、ppt”英文缩写的换算

在医学论文中,“ppm、ppb、ppt”这类英文缩写常常被作者作为单位符号使用,而“ppm、ppb、ppt”不是量纲一的量的单位的专门名称,也不是数学符号,更不是单位符号,只是表示数量份额的英文名词缩写(英文全称分别为 parts per million、parts per billion、parts per trillion)。在实际研究中,仪器测量的数值可能会以“ppm、ppb、ppt”形式给出结果,作者在撰写文章进行数据描述时则需对“ppm、ppb、ppt”进行换算。

对溶液而言,换算前需了解体积比还是质量比。 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 是质量-体积比,如果溶液的密度是 1 g/mL ,则 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 相当于 1 ppm ;如果溶液密度不是 1 g/mL ,则需要进行换算。

对大气中的污染物而言,常用体积浓度和质量-体积浓度来表示其在大气中的含量。体积浓度是用每立方米大气中含有污染物的体积数来表示(如 cm^3/m^3 、 mL/m^3),换算关系是: $1\text{ ppm}=1\text{ cm}^3/\text{m}^3=10^{-6}$, $1\text{ ppb}=10^{-9}$, $1\text{ ppt}=10^{-12}$;质量-体积浓度是用每立方米大气中污染物的质量数来表示(如 mg/m^3 、 g/m^3),换算关系是: $C=22.4\text{ X}/M$,式中:X为污染物以 mg/m^3 表示的浓度值;C为污染物以ppm表示的浓度值;M为污染物的分子质量。

在土壤、动植物、固体废弃物中“ppm、ppb、ppt”与质量含量的换算关系为: $1\text{ ppm}=1\text{ mg/kg}=1\text{ 000 }\mu\text{g/kg}$; $1\text{ ppb}=1\text{ }\mu\text{g/kg}=10^{-3}\text{ mg/kg}$; $1\text{ ppt}=1\text{ ng/kg}=10^{-6}\text{ mg/kg}$ 。

(编辑部)