

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.01299

· 论 著 ·

特异性 shRNA 干扰下调骨桥蛋白表达增强宫颈癌 HeLa 细胞对化疗药物的敏感性

方 芳, 惠 宁*

第二军医大学长海医院妇产科, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨短发卡 RNA(shRNA)干扰沉默骨桥蛋白(osteopontin, OPN)基因对宫颈癌细胞株 HeLa 化疗敏感性的影响及其可能机制。**方法** OPN shRNA 真核表达质粒 pGCsi3.0 在脂质体介导下转染 HeLa 细胞(shOPN 组),以转染空载质粒的细胞(shNon 组)和未转染细胞(Con 组)作为对照。分别用 0、0.5、1、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂和 0、50、100、500 nmol/L 紫杉醇处理各组细胞 24 h,流式细胞术检测细胞凋亡。蛋白质印迹分析检测下调 OPN 表达后细胞凋亡相关蛋白 cleaved caspase-3、Bcl-x_L、Bcl-2 和 Bax 表达的变化。**结果** 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂处理后 shOPN 组细胞凋亡率为(44.53±2.78)%,与 shNon 组[(15.34±2.18)%]和 Con 组[(15.37±1.03)%]比较差异有统计学意义($P<0.05$)。500 nmol/L 紫杉醇处理后 shOPN 组细胞凋亡率为(51.46±1.49)%,与 shNon 组[(19.16±1.87)%]和 Con 组[(17.03±2.37)%]比较差异有统计学意义($P<0.05$)。下调 OPN 表达后顺铂对 cleaved caspase-3 的活化作用增强($P<0.01$),同时抗凋亡蛋白 Bcl-x_L、Bcl-2 的表达下调,促凋亡蛋白 Bax 表达上调。**结论** OPN 沉默后可通过促进宫颈癌 HeLa 细胞的凋亡进而增强细胞对化疗药物的敏感性,OPN 的 RNA 干扰可能成为一种新的治疗策略应用于宫颈癌的新辅助化疗。

[关键词] 宫颈肿瘤;骨桥蛋白;RNA 干扰;凋亡调节蛋白质类

[中图分类号] R 737.33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)12-1299-05

Down-regulating osteopontin expression by shRNA interference enhances chemotherapy sensitivity of cervical cancer HeLa cells

FANG Fang, HUI Ning*

Department of Obstetrics and Gynecology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of silencing osteopontin (OPN) expression by short-hairpin RNA (shRNA) interference on chemotherapy sensitivity of cervical cancer HeLa cells and the possible mechanism. **Methods** HeLa cells were transfected with eukaryotic expression vector pGCsi3.0 carrying OPN shRNA via liposome (shOPN group). Untransfected HeLa cells (Con group) and those transfected with empty plasmids (shNon group) served as controls. HeLa cells in all the groups were treated with different concentrations of cisplatin (0, 0.5, 1, and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and paclitaxel (0, 50, 100, and 500 nmol/L) for 24 h, respectively; the apoptosis in HeLa cells was analyzed by flow cytometry. The expressions of apoptosis related protein cleaved caspase-3, Bcl-x_L, Bcl-2, and Bax were examined by Western blotting analysis. **Results** The apoptotic rate in shOPN group ([44.53±2.78]%) was significantly higher than those in shNon group ([15.34±2.18]%) and Con group ([15.37±1.03]%) after treatment with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cisplatin ($P<0.05$); and significant difference was also found between the apoptotic rates after treatment with 500 nmol/L paclitaxel (shOPN group: [51.46±1.49]%, shNon group: [19.16±1.87]%, Con group: [17.03±2.37]%; $P<0.05$). Down-regulating OPN expression significantly enhanced the cisplatin-induced activation of cleaved caspase-3 ($P<0.01$), and it also resulted in inhibition of Bcl-2/Bcl-x_L expression and up-regulation of Bax expression. **Conclusion** OPN silencing can sensitize cervical cancer HeLa cells to chemotherapeutic agents by promoting HeLa cells apoptosis. RNA interference mediated depletion of OPN may be a promising strategy for the new adjuvant chemotherapy treatment of cervical cancer.

[收稿日期] 2013-06-06

[接受日期] 2013-07-08

[作者简介] 方芳,博士. E-mail: 13311686868@189.cn

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31162044, E-mail: huin1956@yahoo.com

[Key words] uterine cervical neoplasms; osteopontin; RNA interference; apoptosis regulatory proteins

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(12): 1299-1303]

在发展中国家宫颈癌是导致妇女死亡的重要原因之一,治疗方法包括根治性手术和放、化疗。对于局部晚期的宫颈癌常采用新辅助化疗(NACT)以缩小瘤体,改善宫旁浸润,为手术彻底切除肿瘤创造机会,并减少术中播散及术后转移。但部分患者对新辅助化疗无反应,这将延误手术及放疗等治疗时机。因此,迫切需要寻找到能够预测新辅助化疗敏感性的分子机制,并通过调节相应的分子靶点促进宫颈癌细胞对新辅助化疗的敏感性进而提高疗效、改善预后。目前已知骨桥蛋白(osteopontin, OPN)在多种人类恶性肿瘤中表达和分泌,如肺癌^[1]、结肠癌^[2]、胃癌^[3]、乳腺癌^[4]和宫颈癌^[5]。OPN表达的升高预示着肿瘤具有较高的恶性程度和较强的侵袭能力^[6]。Yang等^[7]发现下调OPN表达将增强乳腺癌细胞的放、化疗敏感性。在缺氧和常氧环境中,沉默乳腺癌MDA-MB-343细胞中OPN的表达将导致缺氧诱导因子1(HIF-1)和血管内皮生长因子(VEGF)蛋白表达的明显下调,从而增加放疗的敏感性^[8]。OPN在宫颈癌新辅助化疗中是否具有调节能力及其可能的机制鲜有报道。本实验选择OPN高表达的宫颈癌HeLa细胞作为研究对象,用特异性OPN短发卡RNA(shRNA)的质粒表达载体转染HeLa细胞,观察下调OPN表达对HeLa细胞化疗敏感性的影响,并进一步研究其可能的分子机制。

1 材料和方法

1.1 细胞株及试剂 宫颈癌细胞株HeLa由第二军医大学长海医院中心实验室冻存并赠予。pGCsi3.0(-)质粒、pGCsi3.0(-)/OPN重组质粒、Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司。RPMI 1640培养液、小牛血清购自Gibco公司; TRIzol试剂、DNA marker购自TaKaRa公司; 反转录试剂盒购自Ferments公司; OPN和GAPDH引物购自上海生工生物工程技术有限公司; cleaved caspase-3、Bcl-2、Bax抗体均购自Sigma公司; 兔抗人OPN单克隆抗体、兔抗人Bcl-x_L多克隆抗体和β-actin抗体为Santa Cruz公司产品; Annexin V-FITC试剂盒、碘化丙啶(PI)、丙烯酰胺、四甲基乙二胺(TEMED)、十二烷基硫酸钠(SDS)、NC膜等购自中国医药上海化学试剂公司。

1.2 细胞培养 将宫颈癌细胞株HeLa常规培养于含有10%小牛血清的RPMI 1640培养液中,置于37℃、5%CO₂培养箱中孵育,每周传代2~3次。

1.3 靶向OPN特异性shRNA质粒的构建 设计靶向OPN的RNA干扰序列(aaGGACAGTTAT-GAAACGAGTTTCAAGAGAAGCTCGTTTCATA-ACTGTCCtt),装入pGCsi 3.0载体中,构建pGCsi-OPN shRNA的质粒表达载体,通过酶切及测序进行鉴定。

1.4 细胞转染及分组 取对数生长期HeLa细胞,用0.25%胰酶消化后制备成细胞悬液,取5×10⁵/mL细胞接种于6孔板,当细胞80%融合时进行瞬时转染。实验分未转染组(Con组)、空载质粒转染组(shNon组)、转染特异性OPN shRNA质粒表达载体组(shOPN组)。细胞转染按照Lipofectamine 2000说明书操作。

1.5 蛋白质印迹分析检测OPN及细胞凋亡相关蛋白的表达 转染48 h后,用1×SDS裂解各组细胞,抽提细胞总蛋白。BCA法测定蛋白浓度,经SDS-PAGE后电转移至PVDF膜上,用含5%脱脂奶粉的TBST封闭1 h。按照DNA marker所指示的位置,根据目的条带的大小,剪下所需的条带。加入含特异性抗体(cleaved caspase-3、Bcl-x_L、Bcl-2、Bax)及β-actin抗体的抗体稀释液(1:500倍稀释),室温下孵育1 h,4℃过夜。用TBST洗膜3次,每次振摇10 min。加入HRP标记的二抗(1:2 000倍稀释),室温孵育2 h。用TBST洗膜3次,每次振摇10 min。用BCIP/NBT生色底物显色,扫描。应用Quantity one软件对所得结果进行定量分析。

1.6 流式细胞术测定细胞凋亡 调整细胞密度为2×10⁵/mL,接种于60 mm培养皿内,转染48 h后,分别用0、0.5、1、2 μg/mL顺铂和0、50、100、500 nmol/L紫杉醇处理各组细胞24 h,用Annexin V-FITC、PI双染法流式细胞术检测各组间细胞凋亡率。0.25%胰酶消化细胞,连同培养液一起移入15 mL离心管中。1 000 r/min离心5 min(离心机半径=25 cm),弃上清,预冷的PBS洗2遍,加入结合缓冲液200 μL,吹打混匀细胞后,加入Annexin V-FITC 1 μL,室温避光孵育10 min。加入PI染液2 μL,1 h内上机检测。

1.7 统计学处理 所有实验均至少重复 3 次, 采用 Excel 软件中的方差分析和 t 检验进行统计学分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 转染后宫颈癌 HeLa 细胞中 OPN 蛋白的表达 瞬时转染细胞 48 h 后, 蛋白质印迹分析结果显示, shOPN 组 OPN 蛋白表达水平低于 shNon 组和 Con 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 1)。

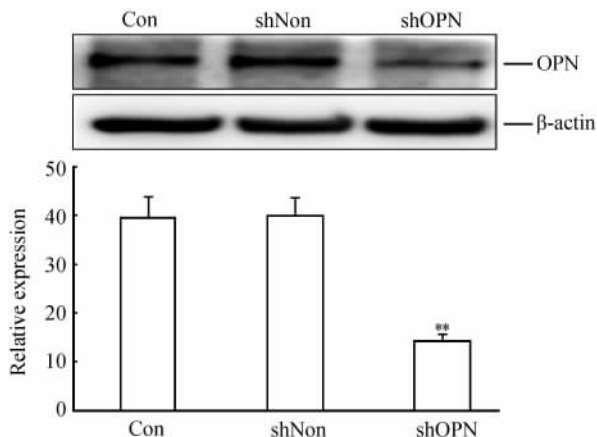


图 1 蛋白质印迹分析检测宫颈癌 HeLa 细胞中 OPN 蛋白的表达

Fig 1 Expression of osteopontin (OPN) protein in cervical cancer HeLa cells determined by Western blotting analysis

Con: Untransfected HeLa cells; shNon: HeLa cells transfected with empty plasmids; shOPN: HeLa cells transfected with eukaryotic expression vector carrying OPN shRNA via liposome. ** $P < 0.01$ vs Con group and shNon group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.2 下调 OPN 表达能够增强 HeLa 细胞的化疗敏感性 瞬时转染细胞 48 h 后, 分别用 0、0.5、1、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂和 0、50、100、500 nmol/L 紫杉醇处理各组细胞 24 h, 流式细胞术检测细胞凋亡结果显示, shOPN 组在加用化疗药物处理后各浓度的细胞凋亡均明显增多 ($P < 0.05$)。2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂处理 shOPN 组细胞凋亡率达 $(44.53 \pm 2.78)\%$, 与 shNon 组和 Con 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2A)。用化疗药物紫杉醇处理细胞所得结果相同。500 nmol/L 紫杉醇处理 shOPN 组细胞凋亡率达 $(51.46 \pm 1.49)\%$, 与 shNon 组和 Con 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2B)。

2.3 特异性转染 shOPN 后通过 cleaved caspase-3 通路增强化疗药物的促凋亡作用 瞬时转染细胞 48 h 后用 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂处理各组细胞 24 h, 蛋白质印迹分析检测结果 (图 3) 显示, shOPN 组 cleaved caspase-3 表达上调, 提示转染 shOPN 后 HeLa 细胞对化疗药物敏感性的提高是由具有 caspase 依赖性的凋亡途径介导的。

2.4 下调 OPN 后对 Bcl-2 蛋白家族成员表达的调节 Bcl-2 蛋白家族是细胞中一组至关重要的凋亡蛋白, 该家族成员包括抗凋亡蛋白 (如 Bcl-2、Bcl-x_L 等) 和促凋亡蛋白 (如 Bad、Bax 等)。瞬时转染细胞 48 h 后用蛋白质印迹分析检测抗凋亡蛋白及促凋亡蛋白的表达。结果显示 Bcl-2、Bcl-x_L 蛋白表达下调, Bax 蛋白表达上调 (图 4)。

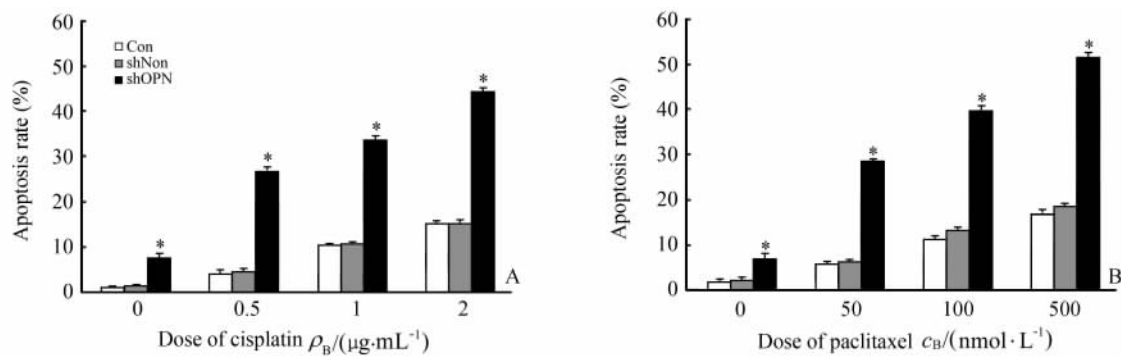


图 2 下调 OPN 表达增强宫颈癌 HeLa 细胞对化疗药物顺铂 (A) 和紫杉醇 (B) 的敏感性

Fig 2 Down-regulating osteopontin (OPN) expression sensitized cervical cancer HeLa cells to cisplatin (A) and paclitaxel (B)

Con: Untransfected HeLa cells; shNon: HeLa cells transfected with empty plasmids; shOPN: HeLa cells transfected with eukaryotic expression vector carrying OPN shRNA via liposome. * $P < 0.05$ vs Con group and shNon group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

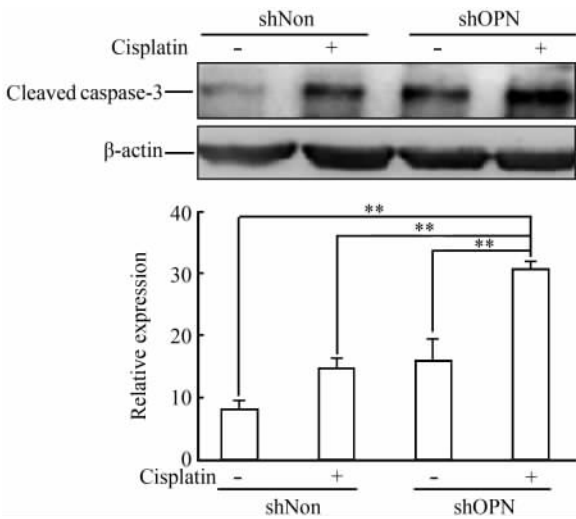


图 3 蛋白质印迹分析检测宫颈癌 HeLa 细胞中 cleaved caspase-3 蛋白表达

Fig 3 Expression of cleaved caspase-3 protein in cervical cancer HeLa cells determined by Western blotting analysis

shNon: HeLa cells transfected with empty plasmids; shOPN: HeLa cells transfected with eukaryotic expression vector carrying *OPN* shRNA via liposome. ** $P < 0.01$, $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

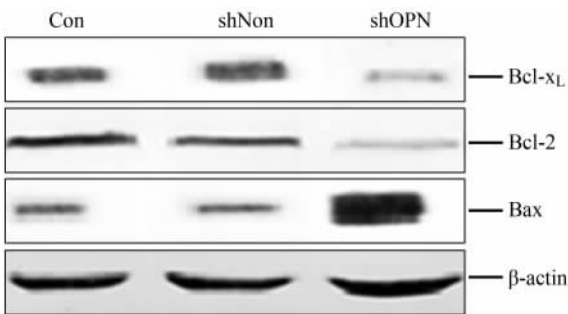


图 4 蛋白质印迹分析检测宫颈癌 HeLa 细胞中 Bcl-xL、Bcl-2 及 Bax 蛋白的表达

Fig 4 Expression of Bcl-xL, Bcl-2 and Bax proteins in cervical cancer HeLa cells determined by Western blotting analysis

Con: Untransfected HeLa cells; shNon: HeLa cells transfected with empty plasmids; shOPN: HeLa cells transfected with eukaryotic expression vector carrying *OPN* shRNA via liposome

3 讨论

近来新辅助化疗越来越多地应用于宫颈癌患者(特别是对于 I b2 ~ II a 期的患者),其可以缩小肿瘤体积、提高手术完全切除率、减少术中出血及手术

创伤,而宫颈癌患者对新辅助化疗的敏感性又直接影响着其治疗的有效率及预后。*OPN* 是一种多功能的分泌型磷酸化糖蛋白。研究表明,*OPN* 在多种肿瘤中高表达并与肿瘤的发生发展及复发转移密切相关,其可能的机制包括 *OPN* 通过和整合素家族或 CD44 受体及其变体相结合,诱导磷脂酰肌醇 3 (PI3)、丝氨酸/苏氨酸激酶(Akt)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等激酶磷酸化^[9]。活化后的激酶进而激活相关的转录因子如核因子 κ B (NF- κ B)、核转录因子激活蛋白 1(AP-1),从而合成、分泌尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)和基质金属蛋白酶(MMPs)等细胞外基质降解相关的蛋白酶,最终导致细胞外基质的降解,细胞运动能力增强,肿瘤发生浸润和转移^[9]。

Kumar 等^[10] 分别在体外及体内实验中证实,*OPN* 的高表达促进宫颈癌的进展,然而 *OPN* 表达下调后抑制了肿瘤的生长。其可能的机制为 *OPN* 和 CD44 受体结合促进 p38 磷酸化,p38 是 NF- κ B 活化的关键性调节因子,并进一步诱导 p65 磷酸化,从而上调了 Furin 的表达^[10]。我们课题组前期研究宫颈癌患者手术切除标本组织中 *OPN* 的表达,结果显示随着宫颈癌临床分期的进展,患者癌组织及血清中 *OPN* 的表达水平均明显升高,说明 *OPN* 的高表达可能参与了宫颈癌的癌变进展过程^[11]。在体外实验中,我们课题组使用 shRNA 干扰技术抑制 *OPN* 的表达,观察宫颈癌 HeLa 细胞生物学特性的改变,结果显示 shRNA 介导的 *OPN* 表达下调后抑制了宫颈癌 HeLa 细胞生长,促进了宫颈癌细胞的凋亡,并可显著降低宫颈癌细胞的侵袭能力^[12]。本次实验进一步观察了下调 *OPN* 表达后宫颈癌 HeLa 细胞对化疗药顺铂、紫杉醇敏感性的改变,结果显示顺铂、紫杉醇可以增加 *OPN* 特异性转染细胞的凋亡率;下调 *OPN* 表达后 HeLa 细胞对化疗药物的促凋亡作用敏感性增强。

凋亡在调节组织生长平衡中起着重要的作用,肿瘤细胞通常因为失去了正常的凋亡调节功能,最终导致了肿瘤细胞的扩散、转移以及化学耐药^[13-15]。细胞凋亡的关键蛋白主要包括 caspase 家族和 Bcl-2 蛋白家族。细胞中过表达 caspase 可诱导细胞凋亡,

而过表达 Bcl-2 能够抑制由化疗诱导的细胞凋亡^[13]。下调 OPN 是否是通过调节凋亡相关蛋白来增强宫颈癌 HeLa 细胞化疗敏感性的呢? 我们进一步研究了其可能的机制, 结果表明顺铂处理相比未处理细胞活化的 cleaved caspase-3 表达上调, 下调 OPN 后又进一步增强了顺铂对 cleaved caspase-3 的活化作用。同时下调 OPN 后抗凋亡蛋白 Bcl-x_L、Bcl-2 的表达下调, 促凋亡蛋白 Bax 的表达上调。

综上所述, 下调 OPN 后促进了化疗药物诱导的宫颈癌 HeLa 细胞的凋亡, 增强了 HeLa 细胞对化疗药物的敏感性。下调 OPN 促进凋亡是 caspase 依赖性的细胞凋亡, 同时下调 OPN 使得宫颈癌 HeLa 细胞内 Bcl-x_L、Bcl-2 表达下调, Bax 表达上调, 这可能是增强常规化疗药物敏感性的原因之一。OPN 干扰可能成为一种新的治疗策略应用于宫颈癌的新辅助化疗。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Goparaju C M, Pass H I, Blasberg J D, Hirsch N, Donington J S. Functional heterogeneity of osteopontin isoforms in non-small cell lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2010, 5:1516-1523.
- [2] Likui W, Hong W, Shuwen Z. Clinical significance of the upregulated osteopontin mRNA expression in human colorectal cancer[J]. *J Gastrointest Surg*, 2010, 14:74-81.
- [3] Ue T, Yokozaki H, Kitadai Y, Yamamoto S, Yasui W, Ishikawa T, et al. Co-expression of osteopontin and CD44v9 in gastric cancer[J]. *Int J Cancer*, 1998, 79:127-132.
- [4] Mi Z, Bhattacharya S D, Kim V M, Guo H, Talbot L J, Kuo P C. Osteopontin promotes CCL5-mesenchymal stromal cell-mediated breast cancer metastasis[J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32:477-487.
- [5] Cho H, Hong S W, Oh Y J, Kim M A, Kang E S, Lee J M, et al. Clinical significance of osteopontin expression in cervical cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008, 134:909-917.
- [6] Ke H L, Chang L L, Yang S F, Lin H H, Li C C, Wu D C, et al. Osteopontin overexpression predicts poor prognosis of upper urinary tract urothelial carcinoma[J]. *Urol Oncol*, 2011, 29:703-709.
- [7] Yang L, Wei L, Zhao W, Wang X, Zheng G, Zheng M, et al. Down-regulation of osteopontin expression by RNA interference affects cell proliferation and chemotherapy sensitivity of breast cancer MDA-MB-231 cells[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5:373-376.
- [8] Yang L, Zhao W, Zuo W S, Wei L, Song X R, Wang X W, et al. Silencing of osteopontin promotes the radio-sensitivity of breast cancer cells by reducing the expression of hypoxia inducible factor 1 and vascular endothelial growth factor[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2012, 125:293-299.
- [9] Rangaswami H, Bulbule A, Kundu G C. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression[J]. *Trends Cell Biol*, 2006, 16:79-87.
- [10] Kumar V, Behera R, Lohite K, Karnik S, Kundu G C. p38 kinase is crucial for osteopontin-induced furin expression that supports cervical cancer progression[J]. *Cancer Res*, 2010, 70:10381-10391.
- [11] 方芳, 张俊杰. 骨桥蛋白在宫颈癌中的表达及临床意义[J]. *第二军医大学学报*, 2009, 30:95-97.
- Fang F, Zhang J J. Expression of osteopontin in cervical carcinoma and its clinical significance[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2009, 30:95-97.
- [12] 方芳, 惠宁. 下调骨桥蛋白对宫颈癌 HeLa 细胞生长和侵袭的影响[J]. *现代妇产科进展*, 2013, 22:26-29.
- [13] Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6:449-458.
- [14] Johnstone R W, Ruefli A A, Lowe S W. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy[J]. *Cell*, 2002, 108:153-164.
- [15] Adams J M, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy[J]. *Oncogene*, 2007, 26:1324-1337.