

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.07.006

稳定转染 PGRMC1 基因的小分子干扰 RNA 对卵巢癌细胞体外增殖的影响

程 艳^{1,2}, 姚 丽¹, 崔金全²

Effects of Small Interfering RNA Specific to Stable Transfection Gene of PGRMC1 on Proliferation of Ovarian Carcinoma *in vitro*

CHENG Yan^{1,2}, YAO Li¹, CUI Jinquan²

1. Department of Obstetrics and Gynecology, The Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450000, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital, Zhengzhou University

Corresponding Author: YAO Li, E-mail: linda63972002@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To investigate the effects of the proliferation of the human ovarian cell line (COC1) by stable transfection short hairpin RNA into the target PGRMC1 gene. **Methods** The text subjects were divided into three groups. PGRMC1 recombinant expression plasmid was constructed and then was transfected into COC1 cells by lipofectamine 2000. The mock-vehicle group only transfected the blank load pcDNA 3.1 A plasmid. And the blank group was composed of non-transfected plasmids. The three groups gained stable-transfected cell lines after resistance selection. The expression of PGRMC1 mRNA was tested by reverse transcription RT-PCR. The proliferation of COC1 cells after PGRMC1 gene transfection was measured by methylthiazolyl tetrazolium(MTT). And cells growth curves were plotted. The tumor growth of the nude mice inoculated of tumor cells was compared with before and after transfection.

Results The results of RT-PCR showed that the significant expressions of PGRMC1 mRNA after infected by PGRMC1 plasmid were higher than those in the control. The COC1 cell growth in stable transfection status was more significantly decreased than that in non-transfection status ($P<0.05$). After inoculating transfected cells into nude mice, it took (5.8 ± 0.7) days to grow the planed tumors in group infected by PGRMC1 plasmid. The days were significantly shorter than those in the control (11.9 ± 0.5) days and in the blank group (12.6 ± 0.9) days ($P<0.05$). There were no significant differences between the mock-vehicle group and the blank group ($P>0.05$). And five weeks after inoculation, mice tumors' weights and sizes of the recombinant vectors group were (0.7 ± 0.4) g and (197 ± 26) mm³ respectively, which were significantly lower than those of the mock-vehicle group (2.3 ± 0.4) g and (785 ± 38) mm³ and those of the blank control group (2.5 ± 0.8) g and (896 ± 22) mm³. **Conclusion** PGRMC1 siRNA could remarkably reduce the expression of PGRMC1 gene in ovarian cell and also inhabit the ovarian cell growth.

Key words: Ovarian neoplasm; RNA; Small interfering; PGRMC1 gene; Transfection

摘 要:目的 观察稳定转染 PGRMC1 基因的小分子干扰 RNA(siRNA)对卵巢癌 COC1 细胞体外增殖的影响。**方法** 实验分为 3 组,重组载体组即由 pcDNA 3.1A- PGRMC1 质粒转染 COC1 细胞;空载体组即仅转染空载体 pcDNA 3.1A 质粒;空白组即未转染质粒组。3 组均经抗性筛选获得稳定转染的细胞系。采用 RT-PCR 技术检测 3 组细胞中 PGRMC1 mRNA 的表达;四甲基偶氮唑盐比色法观察细胞增殖情况,绘制细胞生长曲线;裸鼠接种 3 组细胞后观察其成瘤能力的变化。**结果** (1)重组载体组细胞中 PGRMC1 mRNA 转染前、后的表达水平分别为 $(79.6 \pm 2.3)\%$ 和 $(29.4 \pm 1.6)\%$,两者比较,差异

有统计学意义($P<0.05$);空载体组和空白组 PGRMC1 mRNA 转染前、后表达水平分别比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。(2)重组载体组 COC1 细胞增殖速度明显慢于空载体组和空白对照组($P<0.05$);(3)接种转染后的 COC1 细胞后,重组载体组裸鼠的成瘤时间为 (5.8 ± 0.7) d,明显短于空

收稿日期:2012-09-18;修回日期:2013-02-24
作者单位:1. 450000 郑州,郑州人民医院妇产科;
2. 郑州大学第二附属医院妇产科
通信作者:姚丽, E-mail: linda63972002@yahoo.com.cn
作者简介:程艳(1978-),女,博士在读,副主任医师,主要从事妇科肿瘤工作

载体组的(11.9±0.5)d和空白对照组的(12.6±0.9)d,差异均有统计学意义($P<0.05$);而空载体组与空白对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。接种5周后,重组载体组裸鼠的肿瘤重量和体积分别为(0.7±0.4)g和(197±26)mm³,明显低于空载体组[(2.3±0.4)g和(785±38)mm³]和空白对照组[(2.5±0.8)g和(896±22)mm³],差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 PGRMC1 siRNA 可显著降低卵巢癌细胞中的 PGRMC1 表达,并对卵巢癌细胞的生长有抑制作用。

关键词:卵巢肿瘤;RNA;小分子干扰;PGRMC1 基因;转染
中图分类号:R737.31 文献标识码:A

0 引言

卵巢癌是妇科三大恶性肿瘤之一,其治疗方法以传统的手术治疗和化疗为主,且预后较差。因此,研究有效的卵巢癌治疗方法非常重要。PGRMC1(孕酮膜受体成份1)是孕酮膜受体家族之一,现已证实,其在正常组织中无表达或低表达,而在多种肿瘤组织,特别是卵巢癌中高表达^[1-3]。本研究中,我们通过构建裸鼠卵巢癌模型,利用 RNA 干扰(RNAi)技术沉默 PGRMC1 基因的表达,检测由此导致的 PGRMC1 基因活性的改变及其对卵巢癌 COC1 细胞体外增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人卵巢癌细胞系 COC1 购自上海艾研生物科技有限公司。裸鼠购自郑州大学动物研究所,4~6 周龄,体质量(17~23.2)g,雌性,无特殊病原体(SPF)条件下饲养。

1.2 主要试剂

RPMI 1640 培养液、新生牛血清、反转录(RT)-PCR 试剂盒购自美国 Gibco 公司,限制性内切酶、DNA 连接酶购自上海生工生物有限公司,脂质体 Lipofectamine2000、Trizol 试剂、空载体 pcDNA 3.1A 为美国 Introvigen 公司产品,四甲基偶氮唑盐(MTT)、氨基糖苷类抗生素 G418 购自美国 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与实验分组 人卵巢癌细胞株 COC1 细胞培养于含 10%新生牛血清的 RPMI 1640 培养液中,加入 50 u/ml 青霉素、50 μg/ml 链霉素,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中行传代培养,2~3 天传代一次。

1.3.2 PGRMC1 基因表达载体的构建 (1) PGRMC1 基因 siRNA 片段设计与合成:人 PGRMC1 基因的 siRNA 由广州锐博生物科技有限公司设计并合成。正义链:5'-GCAAUUGAAU-

GUCGUGUCU dTdT-3'; 反义链:3'-dTdT CGUUAACUUACAGCACAGA-5';干扰的靶序列为:5'-GCAATTGAATGTCGTGTCT-3'。siRNA 序列两端包含 *Msp*I、*Smo*I 酶切位点;(2)将合成的 PGRMC1 siRNA 序列,互补退火,用 T4DNA 连接酶分别接入 pcDNA 3.1A 载体中的 *Msp*I、*Smo*I 酶切位点之间,通过回收、连接及转化、构建表达 PGRMC1 基因的重组载体 pcDNA 3.1A-PGRMC1 质粒,通过 PCR 技术鉴定和阳性克隆测序验证,测序由广州锐博生物科技有限公司完成。

1.3.3 脂质体介导的质粒转染与筛选 脂质体 Lipofectamine2000 与 PSHAPRIL 按 1:1.25 的比例混合,并用 PBS 配制成相应工作浓度的转染液。实验分为 3 组:重组载体组即由 pcDNA 3.1A-PGRMC1 质粒转染 COC1 细胞;空载体组即仅转染空载体 pcDNA 3.1A 质粒;空白组即未转染质粒组。在含氨基糖苷类抗生素的培养液中进一步培养和筛选。具体过程:转染前 1d,将对数生长期贴壁细胞,分别以 5×10⁴个/孔接种于 12 孔板;24 h 内细胞生长汇合达 60%~70%时进行转染。分别转染以上 3 组,操作步骤按 Lipofectamine2000 说明书进行。转染 12 h 换为完全培养液继续培养 24 h,加入浓度为 500 μg/ml 的 G418 筛选,3 周后筛选出多个单集落,扩大培养,3 组分别获得稳定转染的细胞系。

1.3.4 RT-PCR 技术检测转染前、后 3 组细胞中的 PGRMC1 mRNA 的表达 应用 Trizol(invetrogen 公司,美国)加 miRNeasy Mini Kit (Qiagen 公司,美国)提取和分离组织中总 RNA,NanoDrop 2000c 分光光度计(Thermo Fisher Scientific,美国)测量总 RNA 浓度,1.5% 琼脂糖胶电泳总 RNA,以鉴定 RNA 质量。用 TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Ambion 公司,美国)反转录合成 cDNA,按照产品使用说明混合 TaqMan® Gene Expression Master Mix 和 PGRMC1 TaqMan® Gene Expression Assay(Ambion),配制 PCR 扩增体系,反应体积为 20 μl,利用 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems 公司,美国)行 PCR 扩增,扩增条件:50℃ 2 min,95℃ 10 min;95℃ 15 s,60℃ 1 min,40 个反应周期。人 TBP (TATA box binding protein) 内源基因对照试剂 (Ambion) 作为 PGRMC1 基因分析的内参对照基因。如文献^[4-5]所述,结果是以相对量表示。对每个样本的反转录反应平行做 3 个 PCR 扩增反应。实验重复 5 次,取平均值。

1.3.5 MTT 比色法检测转染前、后 3 组细胞的增殖情况 用 0.25% 胰酶消化 COC1 细胞,以含 10%

胎牛血清的 DMEM 培养液调整细胞浓度至 2.5×10^4 /ml,按 200 μ l/孔接种于 96 孔板,37℃、5 % CO₂ 培养箱中培养 12 h,光学显微镜下观察细胞贴壁后,换用无血清的 DMEM 培养液培养 24 h 使同步化;弃去培养液,每孔重新加入含不同工作浓度的培养液共 200 μ l,每一浓度设 5 个复孔,无药对照组仅加入等体积的含 0.1 % DMSO 培养液,并设无细胞培养液的空白对照;常规培养 48 h 后取出培养板,每孔加入 MTT(5 g/L)20 μ l 并继续孵育 4 h;弃去培养液,每孔加入 DMSO 200 μ l,空白对照调零,酶标仪上测定 570 nm 波长处吸光度值(absorbance, A),以此表示细胞增殖情况,A 越大,表示生长越快。实验重复 5 次,取平均值。

1.3.6 裸鼠成瘤实验检测转染后裸鼠的成瘤能力
选取 4~6 周龄雌性裸鼠 15 只,随机分为 PGRMC1 siRNA 组、空载体组和空白对照组,每组 5 只。待瘤体积达到(100~200) mm³时,分别向 3 组裸鼠瘤块内注射 PGRMC1 siRNA、空载体和 PBS 液。每 2 天瘤内注射 1 次,处理 2 周,每次注射前测量瘤块体积,绘制瘤块体积随注射时间的变化曲线。治疗期间,每天观察裸鼠的生存状况。于注射结束后 1 周,切取裸鼠肿瘤组织,称量瘤块重量及体积并计算肿瘤生长抑制率。肿瘤生长抑制率 = (1 - PGRMC1 siRNA 组平均瘤重/空白对照组平均瘤重) × 100 %。

1.4 统计学方法

实验数据采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析。实验所得数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用完全随机设计的单因素方差分析,多个样本均数间的两两比较采用 Student-Newman-Keuls *q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染前、后 3 组细胞中 PGRMC1 mRNA 表达水平情况

转染前、后细胞中 PGRMC1 mRNA 表达水平,重组载体组细胞中 PGRMC1 mRNA 的表达水平分别为(79.6 ± 2.3) %和(29.4 ± 1.6) %,两者比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);空载体组的表达水平分别为(72.3 ± 0.9) %和(68.4 ± 1.6) %,两者比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);空白组分别为(70.1 ± 1.2) %和(62.8 ± 0.7) %,两者比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。转染后细胞中 PGRMC1 mRNA 表达水平,重组载体组明显低于空载体组和空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而空载体组与空白组间比较,差异无统计学意义($P >$

0.05),见图 1。

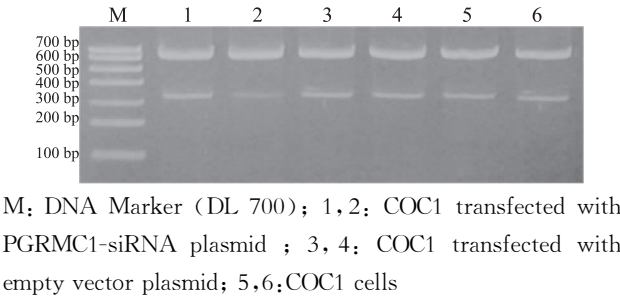


图 1 转染前、后 3 组细胞中 PGRMC1 mRNA 表达水平
Figure 1 Expression of PGRMC1 mRNA in different cell lines before and after transfection detected by RT-PCR

2.2 转染前、后 3 组细胞的增殖情况

转染 48 h 内,3 组间细胞增殖速度比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);转染 72 h 开始,重组载体组增殖速度明显慢于空载体组和空白对照组($P < 0.05$),其增殖速度趋于平缓上升趋势;转染 48 h 内,空载体组细胞的增殖速度低于空白对照组,转染 72 h 开始明显低于空白对照组($P < 0.05$),但明显高于重组载体组($P < 0.05$),见图 2。

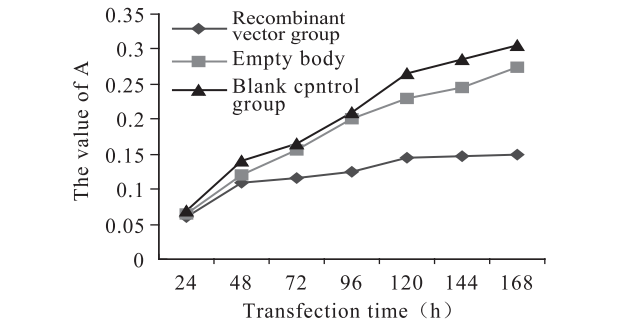


图 2 MTT 比色法检测各组转染后细胞的生长曲线
Table 2 Growth curve of different cell lines after transfection detected by MTT

2.3 接种转染后细胞的 3 组裸鼠成瘤能力的比较

重组载体组裸鼠的成瘤时间为(5.8 ± 0.7) d,分别与空载体组的(11.9 ± 0.5) d 和空白对照组的(12.6 ± 0.9) d 比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);而空载体组与空白对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。接种 5 周后,重组载体组裸鼠的肿瘤重量和体积分别为(0.7 ± 0.4) g 和(197 ± 26) mm³,明显低于空载体组[(2.3 ± 0.4) g 和(785 ± 38) mm³]和空白对照组的[(2.5 ± 0.8) g 和(896 ± 22) mm³];而空载体组与空白对照组的肿瘤重量和体积比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

肿瘤是机体细胞异常增殖形成的新生物,是细

胞生长调控发生严重紊乱的结果。具有倍增时间缩短,生长分数增大,生长速度加快等特点。抑制肿瘤细胞的增殖,抑制肿瘤细胞的生长则成为当前治疗恶性肿瘤的有效手段之一。

1996 年 Wehling 实验室从猪肝脏实质细胞微粒体膜中提取、纯化了一种与孕酮具有高亲和力的结合蛋白,2001 年 Wehling 实验室对该孕酮氨基酸残基序列进行了修正,把它们归类为孕酮膜受体组成部分(PRGCs),目前已经发现有 PGRMC1 和 PGRMC2,其中,对 PGRMC1 的研究较多。PGRMC1 是一类小分子蛋白,含有 194 个氨基酸,包括 1 个 N 端跨膜结构域,1 个细胞色素 b5 样或亚铁血红/类固醇结合域。PRGC-1 主要分布在后期卵黄的卵巢、肝脏和头肾。动物实验发现 PGRMC1 在卵巢中含量比较大^[6-8]。现已研究表明 PGRMC1 与女性生殖系统肿瘤及癌症的发生有关。研究发现 PGRMC1 在乳腺癌、结肠癌、肺癌、宫颈癌等恶性肿瘤组织中呈过度表达;且 PGRMC1 在卵巢癌组织中普遍呈过度表达,可促进卵巢癌细胞的增殖^[4-8]。

RNAi 是一种强有力的沉默哺乳动物基因表达的技术,可以作为一种基因治疗和基因功能的研究方法。本研究中,通过 RT-PCR 技术在 mRNA 水平检测,我们发现稳定转染可以显著抑制卵巢癌细胞中 PGRMC1 基因的表达。通过与空载体组及空白对照组的比较,更加明确了 PGRMC1 siRNA 下调 PGRMC1 基因表达的意义。为了验证稳定转染 PGRMC1 siRNA 对卵巢癌细胞增殖的影响,我们利用 MTT 比色法进一步证实了 PGRMC1 siRNA 可以特异地通过抑制 PGRMC1 基因的表达,引起细胞增殖能力的下降。本研究也成功构建了裸鼠卵巢癌动物模型,利用 RNAi 技术,通过裸鼠移植瘤内注射 PGRMC1 siRNA 后,PGRMC1 mRNA 的相对表达量显著低于空载体组和空白对照组($P<0.05$)。我们还发现,PGRMC1 siRNA 组的肿瘤生长速度明显减慢,实验结束后,取出瘤块称重,PGRMC1 siRNA

组的瘤块重量明显低于空载体组和空白对照组。说明 PGRMC1 siRNA 可能降低细胞的成瘤能力,从而降低肿瘤细胞的恶性程度。

本研究为卵巢癌的基因治疗做了前期验证性的工作,并证实了 PGRMC1 siRNA 能够抑制卵巢癌移植瘤的生长。PGRMC1 基因有望成为卵巢癌基因治疗中的一个新的治疗靶位。

参考文献:

[1] Peluso JJ, Romak J, Liu X. Progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) is the mediator of progesterone's antiapoptotic action in spontaneously immortalized granulosa cells as revealed by PGRMC1 small interfering ribonucleic acid treatment and functional analysis of PGRMC1 mutations[J]. Endocrinology, 2008, 149(2):534-43.

[2] Peluso JJ, Pappalardo A, Losel R, *et al.* Progesterone membrane receptor component 1 expression in the immature rat ovary and its role in mediating progesterone's antiapoptotic action[J]. Endocrinology, 2006, 147(6):3133-40.

[3] Peluso JJ, Pappalardo A. Progesterone regulates granulosa cell viability through a protein kinase G-dependent mechanism that may involve 14-3-3sigma[J]. Biol Reprod, 2004, 71(9): 1870-8.

[4] Ace CI, Okulicz WC. Microarray profiling of progesterone-regulated endometrial genes during the rhesus monkey secretory phase[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2004, 2:54.

[5] Min L, Strushkevich NV, Harnastai IN, *et al.* Molecular identification of adrenal inner zone antigen as a heme-binding protein[J]. FEBS J, 2005, 272(22):5832-43.

[6] Hughes AL, Powell DW, Bard M, *et al.* Dap1/PGRMC1 binds and regulates cytochrome P450 enzymes[J]. Cell Metab, 2007, 5(2):143-9.

[7] Ghosh K, Thompson AM, Goldbeck RA, *et al.* Spectroscopic and biochemical characterization of heme binding to yeast Dap1p and mouse PGRMC1p [J]. Biochemistry, 2005, 44(50):16729-36.

[8] Mifsud W, Bateman A. Membrane-bound progesterone receptors contain a cytochrome b5-like ligand-binding domain[J]. Genome Biol, 2002, 3(12):RESEARCH0068.

[编辑:安 凤;校对:刘红武]