

溶酶体组织蛋白酶L对人卵巢癌SKOV3细胞迁移及侵袭的作用

郑海燕¹, 阮健², 潘玲兰¹, 刘见桥¹

Cathepsin L Promotes Invasion and Migration of Human Ovarian Cancer Cell Line SKOV3

ZHENG Haiyan¹, RUAN Jian², PAN Linglan¹, LIU Jianqiao¹

1. Center for Reproductive Medicine, The Institute of Gynecology and Obstetrics, The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, China; 2. Cancer Center of The Southern Medical University, Southern Medical University, Guangzhou 510315, China

Abstract: Objective To investigate whether Cathepsin L affects the invasion and migration of ovarian cancer cells SKOV-3 via regulating epithelial mesenchymal transition(EMT). **Methods** The expression of Cathepsin L in ES-2, SKOV3, OV1 and OV2 cell lines were analyzed by Real-time PCR. shRNA targeting Cathepsin L was designed and synthesized, and then transfected into SKOV-3 cells which expressed the highest level Cathepsin L in four cell lines via Lipofectamine 2000 mediation. Western blot and Real-time PCR were used to detect the expression of Cathepsin L in SKOV-3 cells which were transfected with shRNA. The migration ability of SKOV-3 was analyzed by Wound scratch assay. The invasion ability was detected by Transwell assay. The expression of E-cadherin, N-cadherin, p-AKT and Snail were detected by Western blot. **Results** The expression of Cathepsin L mRNA and protein were the highest in SKOV3 cells, while those in ES-2, OV1 and OV2 were (0.72±0.04), (0.34±0.03) and (0.55±0.05). Cathepsin L-shRNA could significantly down-regulate Cathepsin L expression in SKOV3/shRNA. Cell migration ability was significantly inhibited in shRNA interference group at 12 and 24h time points. The migration cells of SKOV3/shRNA was (35.67±4.73), while those of the SKOV3 and SKOV3/Con groups were (93.67±8.62) and (90.33±12.22)($P<0.001$). In addition, the expression of E-cadherin was increased, while those of N-cadherin, p-AKT and Snail were decreased in shRNA interference group. **Conclusion** Cathepsin L gene could promote the invasion and migration of ovarian cancer cells SKOV-3 via regulating upstream signaling pathway of EMT, suggesting that Cathepsin L plays an important role in the development of ovarian cancer.

Key words: Cathepsin L; Epithelial mesenchymal transition(EMT); Ovarian cancer

摘要: 目的 探讨溶酶体组织蛋白酶L (Cathepsin L) 是否通过上皮-间充质转化 (EMT) 影响卵巢癌细胞的侵袭及迁移能力。**方法** 荧光定量PCR法检测人卵巢癌细胞ES-2、SKOV3、OV1以及OV2中Cathepsin L的表达水平; 设计并合成靶向Cathepsin L的特异性shRNA, 通过脂质体转染法转染Cathepsin L表达最高的卵巢癌细胞SKOV3以构建稳定低表达Cathepsin L细胞株, Western blot和定量PCR法验证shRNA的干扰效率; 划痕实验及Transwell法检测干扰后细胞的迁移及侵袭能力, Western blot法检测EMT相关指标E-cadherin和N-cadherin以及其上游信号分子Snail、p-AKT的变化。**结果** 四株卵巢癌细胞中, SKOV3的Cathepsin L表达水平最高 (以此为参照), 而ES-2、OV1以及OV2细胞的表达水平分别为0.72±0.04、0.34±0.03和0.55±0.05。Cathepsin L-shRNA转染SKOV3细胞后, SKOV3/shRNA中的Cathepsin L的表达水平较空白组和对照组显著下降; 划痕12 h和24 h后, SKOV3/shRNA组的细胞迁移能力明显受到抑制; SKOV3、SKOV3/Con和SKOV3/shRNA组的穿膜细胞数分别为 (93.67±8.62)、(90.33±12.22)、(35.67±4.73), 与对照组相比, SKOV3/shRNA组细胞侵袭能力受到显著抑制 ($P<0.01$); Cathepsin L干扰组细胞的E-cadherin表达增加, N-cadherin的表达降低; 此外, Cathepsin L干扰组细胞的Snail、p-AKT表达较对照组显著下降。

结论 Cathepsin L可以促进卵巢癌细胞的迁移和侵袭; 其机制可能与调节EMT的上游信号分子Snail、p-AKT有关。提示Cathepsin L在卵巢癌的发生发展中起重要作用。

关键词: 溶酶体组织蛋白酶L; 上皮-间充质转化; 卵巢癌

中图分类号: R737.31

文献标识码: A

收稿日期: 2014-05-16; 修回日期: 2014-08-11

基金项目: 广州市科技计划项目 (民主科技重大专项) (2012Y2-00022); 广东省自然科学基金博士启动项目 (S2013040013849); 广州医科大学基金博士启动项目 (2012C54); 南方医科大学中西医结合医院博士启动基金 (1201302009)

作者单位: 1. 510150 广州, 广州医科大学附属第三医院生殖中心; 2. 510315 广州, 南方医科大学肿瘤中心

作者简介: 郑海燕 (1983-), 女, 博士, 主治医师, 主要从事妇科肿瘤的综合治疗



0 引言

在女性生殖器官恶性肿瘤中, 卵巢癌 (ovarian cancer) 发病率占第三位, 然而病死率一直位居第一位。原因是大多数卵巢癌发病隐匿, 约75%的患者发现时已属晚期。针对晚期卵巢癌, 癌细胞减灭术加紫杉醇/铂类联合化疗, 能暂时缓解疾病进展, 但是肿瘤复发率却高达80%以上^[1]。因此, 迫切需要寻找新的治疗卵巢癌的有效方法。随着分子生物学的飞速发展, 分子靶向治疗已成为当今卵巢癌防治研究的热点。溶酶体组织蛋白酶L (Cathepsin L) 是一种溶酶体半胱氨酸水解蛋白酶, 可降解基底膜和细胞外基质, 其在肿瘤细胞的侵袭及转移过程中起着重要作用^[2]。此外, 上皮细胞-间充质转化 (epithelial mesenchymal transition, EMT) 在肿瘤转移中也发挥了关键作用^[3]。然而, 关于Cathepsin L是否能够调节卵巢癌细胞的迁移及侵袭能力, 则尚未有研究报道。本研究拟应用RNA干扰技术将靶向Cathepsin L基因的shRNA稳定转染卵巢癌离体细胞株SKOV3, 观察Cathepsin L基因表达沉默后对SKOV3迁移及侵袭的影响以及EMT相关指标的表达变化, 初步探讨Cathepsin L基因在卵巢癌细胞中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

人卵巢癌细胞ES-2、SKOV3、OV1以及OV2购自于中科院上海细胞库。四株细胞培养于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液中, 并置于体积分数为5%CO₂、37℃的细胞培养箱内培养。

1.2 Cathepsin L特异性shRNA和转染

shRNA购自美国Santa Cruz公司 (Cat. No: sc-29939-SH)。采用脂质体转染技术, 具体操作流程参照英韦创津公司的Lipofectamine 2000产品说明书。48 h后加入筛选抗生素G418, 浓度为400 μg/ml, 维持培养6天后, G418浓度改为200 μg/ml; 细胞扩增后, 提取蛋白和RNA, 进行RT-PCR和Western blot鉴定。将构建好的稳定细胞株命名为SKOV3/shRNA, 空白组和对照组分别为SKOV3和SKOV3/Con。

1.3 荧光定量PCR

采用TGuide RNA提取试剂盒 (Tiangen公司) 提取RNA。反转录反应则采用TAKARA的PrimeScript™ II Reverse Transcriptase 试剂盒。荧光定量PCR引物则由Premier Primer 5.0 软件来设计, 序列如下: 人Cathepsin L前导链: 5'-CTGGTGGTTGGCTACGGATT-3', 人Cathepsin L后随链: 5'-CTC

CGGTCTTTGGCCATCTT-3' (261 bp); 人GAPDH前导链: 5'-AGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3', 人GAPDH后随链: 5'-CGCTCCTGGAAGATGGTGAT-3' (232 bp)。实验重复3次。

1.4 蛋白印迹法 (Western blot)

将约 1×10^7 个细胞加至蛋白裂解液, 冰上静置30 min, 低温离心20 min (转速12 000 r/min), 提取上清液。应用BCA定量法计算蛋白的浓度。取60 μg总蛋白跑胶 (恒压100 V)。电转膜30 min。含5%脱脂奶粉的TBST封闭1 h。一抗4℃冰箱过夜。二抗孵育1 h后显影。Cathepsin L、E-cadherin、N-cadherin、p-AKT、total-AKT、Snail以及GAPDH抗体均购自美国Santa Cruz公司。

1.5 Transwell小室法检测细胞侵袭能力

首先将Transwell小室放进24孔板里, 然后将稳定转染Cathepsin L或阴性对照序列的细胞用胰蛋白酶消化, 用不含胎牛血清的RPMI 1640培养液洗涤细胞3次, 随之将细胞重悬, 每孔加入100 μl细胞悬液, 在小室的下层加入500 μl 1%胎牛血清的RPMI 1640培养液, 在培养箱中放置24 h。最后取出小室, 弃掉培养液, 使用棉签轻轻擦去小室内的残余细胞。甲醛固定并结晶紫染色。显微镜下观察, 随机选取8个视野进行细胞计数。

1.6 细胞划痕实验

将生长状态良好的各组细胞以 2×10^5 个/ml接种于6孔板内, 每孔2 ml。待细胞长至约80%汇合时, 用200 μl枪头垂直划出一无细胞的细痕, 分别观察0、12、24 h时细胞划痕处细胞运动变化, 随机选取3个视野并计算划痕区域的细胞数, 3次独立实验。

1.7 统计学方法

采用SPSS13.0统计软件进行处理, 计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。Transwell侵袭实验采用析因设计方差分析比较各组间差异; 荧光定量PCR实验采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 比较各组间差异。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢癌细胞中Cathepsin L的表达

荧光定量PCR结果显示, 见图1。四株卵巢癌细胞中, SKOV3的Cathepsin L表达水平最高 (以此为参照), 而ES-2、OV1以及OV2细胞的表达水平分别为 0.72 ± 0.04 、 0.34 ± 0.03 和 0.55 ± 0.05 。因此, 选择SKOV3作为研究对象进行下一步实验。

2.2 shRNA抑制SKOV3细胞中Cathepsin L的表达

图2所示, 特异性shRNA经过转染筛选后,

Western blot显示Cathepsin L的蛋白水平较前明显下降, 荧光定量PCR结果显示, SKOV3、SKOV3/Con以及SKOV3/shRNA细胞的相对表达水平分别为 0.99 ± 0.05 、 0.96 ± 0.07 以及 0.37 ± 0.03 , Cathepsin L的核酸水平表达均较对照组显著下调 ($P = 0.00527$), 结果提示, Cathepsin L表达下调的SKOV3细胞株构建成功, 并用于下一步实验。

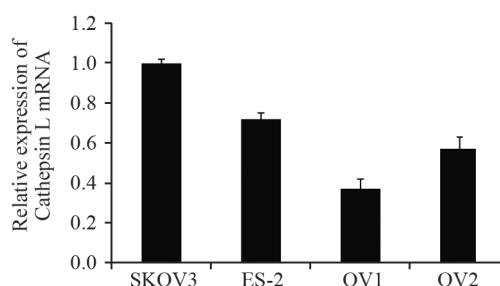
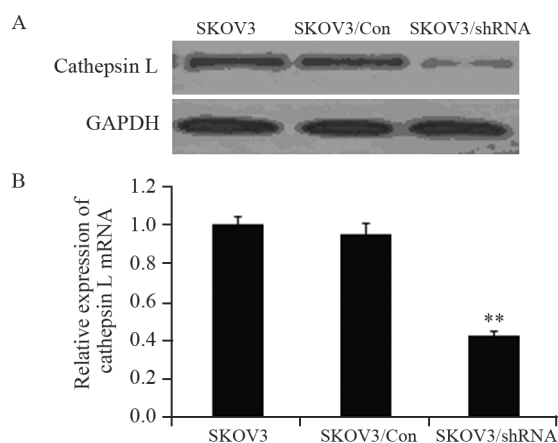


图1 Cathepsin L在四株人卵巢癌细胞中的表达水平

Figure1 Expression of Cathepsin L in four human ovarian carcinoma cell lines



** $P < 0.01$, compared with control group

图2 shRNA显著抑制SKOV3细胞的Cathepsin L表达

Figure2 shRNA significantly suppressed Cathepsin L expression in SKOV3 cells

2.3 Cathepsin L基因沉默后SKOV3细胞的迁移能力变化

划痕0 h时两组细胞贴壁良好, 划痕完全, 划痕处无细胞贴壁或悬浮; 划痕12 h后, SKOV3/Con组较SKOV3/shRNA组的迁移细胞明显增多; 划痕24 h后, SKOV3/Con组的划痕基本愈合, 而SKOV3/shRNA组的划痕尚未愈合, 见图3。

2.4 Cathepsin L基因沉默后SKOV3细胞的侵袭能力变化

SKOV3、SKOV3/Con组和SKOV3/shRNA组的穿膜细胞数分别为 93.67 ± 8.62 , 90.33 ± 12.22 和 35.67 ± 4.73 。与对照组相比, SKOV3/shRNA组细胞侵袭能力受到显著抑制 ($P = 0.00372$), 见图4。

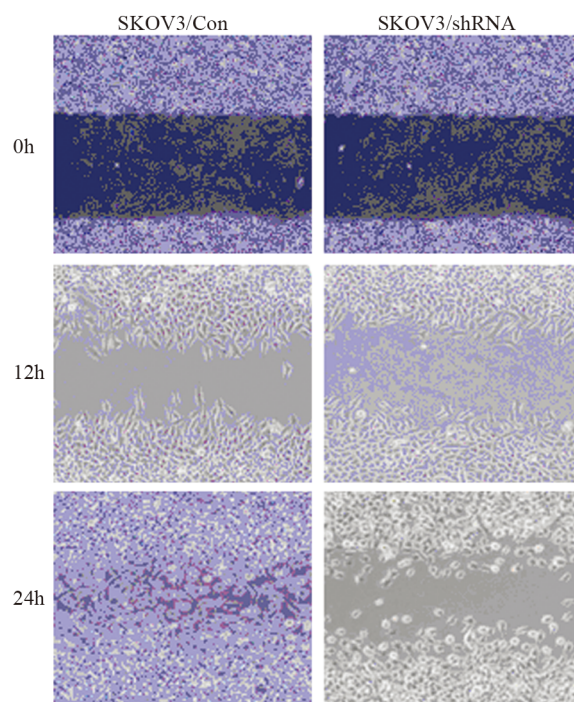


图3 Cathepsin L基因敲除对SKOV3细胞迁移的影响

Figure3 Effect of Cathepsin L gene transfection on the migration of human ovarian cancer cells SKOV3

2.5 Cathepsin L基因沉默后SKOV3细胞E-cadherin、N-cadherin、Snail以及p-AKT的表达

通过 Western blot 检测发现, SKOV3/shRNA组的E-cadherin表达显著增加, 而N-cadherin的表达显著降低; 此外, Cathepsin L干扰组细胞的Snail、p-AKT表达较对照组显著下降, 见图5。结果提示Cathepsin L可能通过调节Snail和p-AKT两种上游信号因子来调控EMT的发生。

3 讨论

卵巢癌是一类恶性程度较高的肿瘤, 容易发生局部浸润及远处转移^[1]。Cathepsin L是溶酶体半胱氨酸蛋白酶家族中的一员, 可通过分解代谢多种蛋白质参与机体的多种生理病理活动, 目前研究已证实, 其在肺癌、乳腺癌、结肠癌以及黑色素瘤等多种肿瘤中高表达, 并与预后密切相关^[4-7]。本研究结果表明, 在卵巢癌中, Cathepsin L是高表达的; 成功构建Cathepsin L低表达的细胞株后, 发现该组细胞的迁移及侵袭能力较对照组显著下降 ($P < 0.01$)。因此推测Cathepsin L基因是卵巢癌的促转移相关基因。

EMT作为上皮源性肿瘤发生发展过程中的重要步骤, 与肿瘤浸润及转移密切相关, 其主要特征为上皮标志物E-cadherin表达的减少, 间质标志物N-cadherin表达的增加^[8]。Snail是E-cadherin

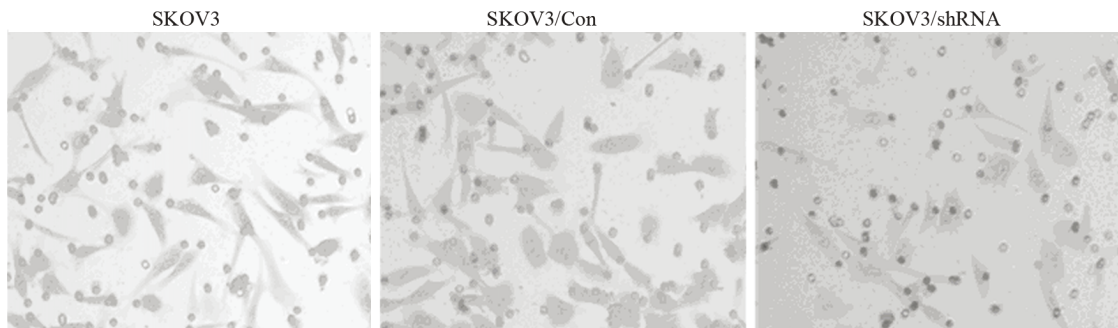


图4 Cathepsin L对细胞体外侵袭能力的影响

Figure4 Effect of Cathepsin L knockdown on the invasion of SKOV3 cells

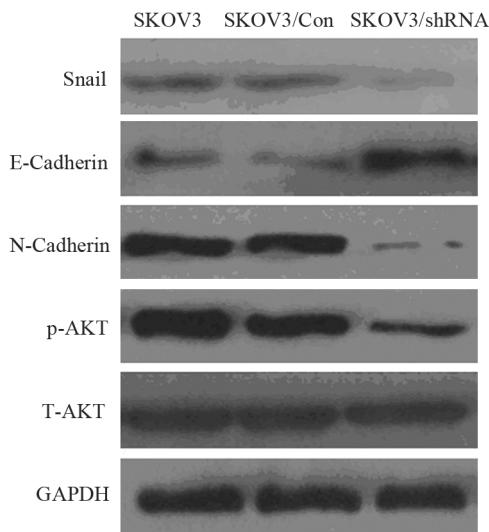


图5 Cathepsin L基因敲除对SKOV3细胞中E-cadherin、N-cadherin、Snail以及p-AKT表达的影响

Figure5 Effect of Cathepsin L gene knockdown on the E-cadherin, N-cadherin, Snail and p-AKT expression in human ovarian cancer cells SKOV3

的主要调节因子，可通过与Smad相互作用蛋白（SIP1）竞争性结合E-cadherin蛋白启动子区的E-box连接基序，抑制E-cadherin的表达，从而诱导EMT发生^[9]。有研究表明，Cathepsin L能直接作用于E-cadherin，使其降解，从而松动细胞间的粘连，增强肿瘤细胞的侵袭能力^[10]。因此，我们推测Cathepsin L是否通过调节Snail来调控E-cadherin的表达水平，从而推动EMT的发生。

我们进一步研究结果显示，卵巢癌细胞在Cathepsin L下调后，Snail分子的表达水平较对照组显著降低，而E-cadherin表达显著增加，N-cadherin表达则显著下降，提示了Cathepsin L与卵巢癌细胞EMT密切相关，其部分机制可能为Cathepsin L通过对Snail因子的调控，从而影响E-cadherin的表达水平。然而，值得注意的是，EMT的调节涉及多条信号通路，且这些信号通路之间可能还存在着相互作用。PI3K/AKT通路是目前研究得比较深入的与EMT密切相关的信号通路^[11]。为了进一步明

确Cathepsin L对EMT的调节作用，我们还检测了PI3K/AKT通路的关键调节因子p-AKT的表达，发现Cathepsin L下调后，p-AKT蛋白表达亦受到明显抑制，这提示了Cathepsin L对EMT的调控可能也与PI3K/AKT通路相关。

综上所述，本研究探讨了Cathepsin L与EMT及卵巢癌细胞迁移侵袭之间的相互关系，发现Cathepsin L可通过调控EMT的发生影响卵巢癌细胞的迁移及侵袭，其可能机制为调节EMT上游通路分子Snail及p-AKT。这为进一步揭示Cathepsin L基因与卵巢癌的关系提供新的实验依据，为探讨卵巢癌转移的分子机制提供新的思路。

参考文献:

- [1] Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, *et al.* Ovarian cancer[J]. Lancet, 2014, 384(9951): 1376-88.
- [2] Arvat G, Shafat I, Levy-Adam F, *et al.* The heparanase system and tumor metastasis: is heparanase the seed and soil?[J]. Cancer Metastasis Rev, 2011, 30(2): 253-68.
- [3] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(3): 178-96.
- [4] Chen Q, Fei J, Wu L, *et al.* Detection of cathepsin B, cathepsin L, cystatin C, urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor in the sera of lung cancer patients[J]. Oncol Lett, 2011, 2(4): 693-9.
- [5] Jagodic M, Vrhovc I, Borstnar S, *et al.* Prognostic and predictive value of cathepsins D and L in operable breast cancer patients[J]. Neoplasia, 2005, 52(1): 1-9.
- [6] Sullivan S, Tosetto M, Kevans D, *et al.* Localization of nuclear cathepsin L and its association with disease progression and poor outcome in colorectal cancer[J]. Int J Cancer, 2009, 125(1): 54-61.
- [7] Stabuc B, Mrevlje Z, Markovic J, *et al.* Expression and prognostic significance of Cathepsin L in early cutaneous malignant melanoma[J]. Neoplasia, 2006, 53(3): 259-62.
- [8] Tsai JH, Yang J. Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis[J]. Genes Dev, 2013, 27(20): 2192-206.
- [9] Gheldof A, Berx G. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2013, 116: 317-36.
- [10] Gocheva V, Zeng W, Ke D, *et al.* Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis[J]. Genes Dev, 2006, 20(5): 543-56.
- [11] Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways[J]. Oncogene, 2005, 24(50): 7443-54.

[编辑校对: 刘红武]