

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2016.05.005

siRNA 沉默 B7-H4 基因对人卵巢癌细胞增殖能力的影响*

秦燕霞 李 京 柳新平

(济宁医学院基础医学院, 济宁 272067)

摘要 目的 探讨 B7-H4 基因的小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 对卵巢癌 SKOV-3 细胞生长及增殖的影响。方法 化学合成 B7-H4-siRNA, 转染 SKOV-3 细胞, MTT 法检测卵巢癌细胞增殖情况, 细胞计数法计算细胞倍增时间。结果 B7-H4-siRNA 成功转入 SKOV-3 细胞, B7-H4-siRNA 组细胞生长受到明显抑制, 细胞倍增时间明显长于未转染组、随机乱码组和转染试剂对照组。结论 B7-H4-siRNA 能沉默 SKOV-3 细胞中 B7-H4 的表达, 抑制 SKOV-3 细胞的生长增殖, B7-H4 可能成为卵巢癌基因治疗的候选靶点。

关键词 卵巢癌; B7-H4; siRNA; 增殖

中图分类号: R737.31 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2016)10-320-04

Effect of silencing B7-H4 expression by small interference RNA on proliferation of ovarian carcinoma cells

QIN Yanxia, LI Jing, LIU Xinping

(School of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of silencing B7-H4 expression by small interference RNA (siRNA) on proliferation of ovarian carcinoma cells. **Methods** Chemical synthesized siRNA targeting B7-H4 was transfected into SKOV-3 cells. The proliferation of SKOV-3 cells was determined by MTT assay and cell doubling time was detected by cell counting method. **Results** B7-H4-siRNA was successfully transfected into SKOV-3 cells. In the B7-H4-siRNA group, the proliferation of SKOV-3 cells was significantly inhibited, and the doubling time was longer than that in the untransfected group, the Ctrl-siRNA group and the transfection reagent group. **Conclusion** B7-H4-siRNA can silence B7-H4 expression in SKOV-3 cells, and inhibit the proliferation of SKOV-3 cells. B7-H4 can be regarded as a candidate gene for ovarian carcinoma gene therapy.

Keywords: Ovarian carcinoma; B7-H4; siRNA; Proliferation

卵巢癌是妇科 3 大恶性肿瘤之一, 卵巢上皮癌死亡率占各类妇科肿瘤的首位。其 5 年存活率不足 30%^[1]。研究发现, RNA 干扰可以特异性抑制靶基因表达的同时可以避免对正常组织的毒副作用。因此, 应用 RNA 干扰技术对肿瘤进行基因治疗是肿瘤治疗的新的策略。B7-H4 (又称 B7S1 或 B7x) 是 B7 家族中新发现的一个成员, 与上皮性卵巢癌的临床分期、病理分型、预后密切相关。目前,

B7-H4 基因沉默对卵巢癌细胞增殖影响的相关报道比较少。本文应用 siRNA 干扰技术, 抑制人卵巢癌细胞 B7-H4 的表达, 并观察对卵巢癌细胞生长及增殖的影响, 为临床治疗卵巢癌提供实验依据, 并有望为分子靶向个体治疗提供依据^[2]。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

卵巢癌细胞株 SKOV-3 购于上海生命科学院细胞库; RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司; 胎牛血清购于杭州四季青生物制品公司; RNA 提取试

* [基金项目] 2015 年济宁医学院校级科研项目 (JY2015 KJ018)

剂 Trizol 和转染试剂盒 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen; MTT 购于 Sigma 公司。

1.2 细胞培养

卵巢癌细胞株 SKOV-3 在 37℃、含 5% CO₂ 的培养箱中培养。选择对数生长期的细胞用于实验。

1.3 B7-H4-siRNA 的设计及合成

根据文献报道^[3], 设计 B7-H4-siRNA 序列为 5'-GGUGUUUAGGCUUGGUCC-3', 并经过 BLAST 比对, 由广州锐博生物科技有限公司合成, 同时合成荧光 GFP 标记的 B7-H4-siRNA 及 Ctrl-siRNA。

1.4 细胞转染及分组

转染前 1 天, 选择生长良好的 SKOV-3 细胞以 2×10^5 /孔的密度接种于 6 孔板。实验设转染试剂对照组、B7-H4-siRNA 组、随机乱码组和未转染组, 按转染试剂说明书进行转染, 培养 4h 后换培养基。

1.5 MTT 法

收集转染试剂对照组、B7-H4-siRNA 组、随机乱码组和未转染组的细胞, 接种于 96 孔板, 置于 37℃、含 5% CO₂ 的培养箱中培养。每 24h 随机抽取一块 96 孔板, 每孔加 MTT 溶液 20μl, 继续孵育 4h, 终止培养, 小心吸弃孔内上清液, 每孔加 150μl DMSO, 振荡 10min, 使结晶物充分融解。选择 490nm 波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值, 记录结果。

1.6 细胞计数法

收集转染试剂对照组、B7-H4-siRNA 组、随机乱码组和未转染组的细胞, 接种于培养瓶, 于 37℃、含 5% CO₂ 的培养箱中培养 7d。根据公式计算增时间。倍增时间 (h) = $t \times [\lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)]$, t: 培养时间, No: 首次细胞数, Nt: t 时间后的细胞数。

1.7 Westernblot

SKOV-3 细胞以 2×10^5 /孔的密度接种于 6 孔板。转染后继续培养 48h, 吸弃上清, 预冷 PBS 清洗细胞, 刮脱细胞收集至离心管, 离心。加入细胞裂解液, 反复吹打至蛋白析出, BCA 法测浓度。调整上样量为 10μl/孔, 经电泳、转膜、封闭, 一抗 B7-H4 (1:1000) 4℃ 过夜, 加入二抗 (1:2000), 化学发光显色。

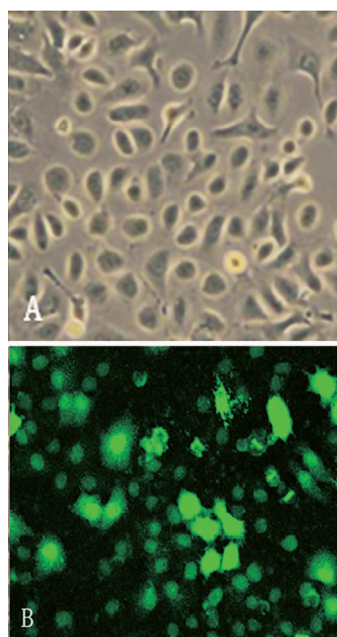
1.8 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件进行数据处理。

2 结果

2.1 B7-H4-siRNA 转染 SKOV-3 细胞效率的结果观察

B7-H4-siRNA 分别以 50、80、100nmol/L 转染 SKOV-3 细胞, 转染后在荧光倒置显微镜下可观察到细胞内有绿色荧光出现, 表明转染成功 (图 1)。24h 后在 200 倍镜下随机选取 5 个视野, 计数细胞总数量和荧光细胞数量, 计算转染效率。本试验转染效率为 80%, 结果显示 80nmol/L 转染时转染效率最高, 因此, 本实验中选择 80nmol/L 作为 siRNA 的转染浓度。



A: 转染 B7-H4-siRNA 前 SKOV-3 细胞图

B: 转染成功 B7-H4-siRNA 后 SKOV-3 细胞图

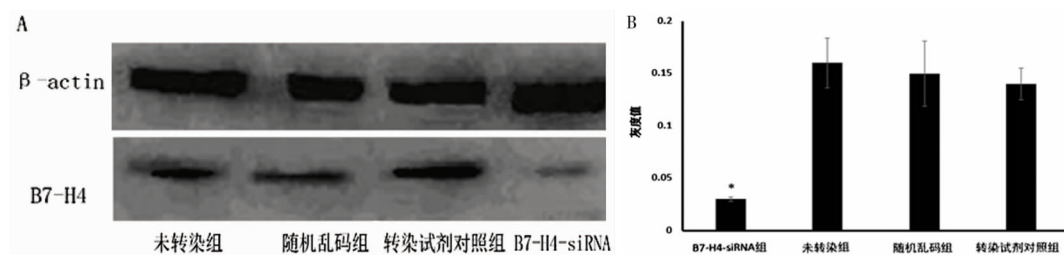
图 1 B7-H4-siRNA 成功转染 SKOV-3 细胞 (200 ×)

2.2 Westernblot 结果

B7-H4-siRNA 组 B7-H4 蛋白表达下降, 与未转染组、随机乱码组和转染试剂对照组相比具有明显差异 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 MTT 法检测 SKOV-3 细胞增殖的结果

B7-H4-siRNA 组与转染试剂对照组、随机乱码组和未转染组相比, 细胞生长抑制作用明显, 有显著性差异 ($P < 0.05$), 而转染试剂对照组、随机乱码组和未转染组之间均无显著性差异 ($P > 0.05$)。见表 1。



注: A. B7-H4 蛋白印迹表达图, B. B7-H4 蛋白表达柱状图 (与未转染组相比, * $P < 0.05$)

图 2 Westernblot 检测细胞中 B7-H4 蛋白的表达

表 1 MTT 法检测 SKOV-3 细胞增殖

组别	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d
未转染组	0.08 ± 0.02	0.33 ± 0.07	0.61 ± 0.14	0.74 ± 0.17	0.94 ± 0.21	1.01 ± 0.23	1.11 ± 0.24
B7-H4 siRNA	0.03 ± 0.01 *	0.16 ± 0.03 *	0.21 ± 0.05 *	0.41 ± 0.10 *	0.54 ± 0.11 *	0.61 ± 0.14 *	0.71 ± 0.16 *
随机乱码组	0.07 ± 0.02	0.24 ± 0.05	0.55 ± 0.13	0.72 ± 0.16	0.88 ± 0.20	0.94 ± 0.22	1.05 ± 0.23
转染试剂对照组	0.06 ± 0.01	0.31 ± 0.07	0.52 ± 0.13	0.69 ± 0.14	0.85 ± 0.20	0.88 ± 0.23	1.01 ± 0.23
<i>F</i> 值	8.10	4.61	6.76	3.80	3.31	9.13	5.45
<i>P</i>	0.003	0.048	0.006	0.031	0.022	0.002	0.029

注: 与未转染组相比, * $P < 0.05$

2.4 细胞计数法计算细胞倍增时间的结果

B7-H4-siRNA 抑制 SKOV-3 细胞生长明显, 细胞计数计算倍增时间, 结果显示 B7-H4-siRNA 转染 48h 后 SKOV-3 细胞的倍增时间为 (34.65 ± 0.25)h, 与转染试剂对照组 (26.87 ± 0.17)h、随机乱码组 (27.23 ± 0.19)h 和未转染组 (28.65 ± 0.13)h 相比, 有统计学意义 ($P < 0.05$)。可见, B7-H4-siRNA 能明显抑制 SKOV-3 细胞的生长。见表 2。

表 2 细胞计数法计算细胞倍增时间

组别	48h
未转染组	28.65 ± 0.13
B7-H4 siRNA	34.65 ± 0.25 *
随机乱码组	27.23 ± 0.19
转染试剂对照组	26.87 ± 0.17
<i>F</i> 值	11.16
<i>P</i>	0.001

注: 与未转染组相比, * $P < 0.05$

3 讨论

RNA 干扰是由双链 RNA 介导的、在转录后 mRNA 水平关闭相应基因表达, 从而导致靶基因的表达沉默, 产生相应的功能表型缺失的现象。siRNA 干扰技术具有高效、高特异性、低毒性等优点, 已广泛应用于肿瘤的研究, 可以特异的抑制癌症相

关基因、癌基因等的过度表达, 并成为肿瘤基因研究的新方法。

B7-H4 是 B7 家族中新发现的成员, 它能够通过抑制 T 细胞的增殖, 抑制细胞因子产生和细胞周期的进程负性调控 T 细胞的免疫应答^[4-5]。B7-H4 在人体正常组织和良性肿瘤中不表达, 在许多肿瘤组织中高表达, 包括乳腺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肾癌、前列腺癌以及脑肿瘤等, 提示可能与肿瘤的形成和发展密切相关^[6]。张羽等^[7]发现 B7-H4 蛋白表达定位于肿瘤细胞的细胞膜和胞浆中, 在正常卵巢组织、良性卵巢肿瘤及交界性卵巢肿瘤中均不表达, 而在上皮性卵巢癌组织中阳性率为 86.4%。B7-H4 在浆液性囊腺癌、黏液性囊腺癌、子宫内膜样癌和透明细胞癌组织中的阳性表达率分别为 100.0%、50.0%、90.0% 和 87.5%, 其阳性表达率均明显高于黏液性囊腺癌组织 ($P < 0.05$), 血清 B7-H4 表达与上皮性卵巢癌的临床分期、病理分型、预后密切相关。在 SCID 小鼠荷瘤实验中 B7-H4 过度表达可以促进卵巢癌细胞的增殖, 小鼠肿瘤生长明显加快, 高表达还能防止上皮细胞失巢凋亡, 敲除 B7-H4 基因, 荷瘤鼠的存活率提高。

有学者发现 B7-H4-siRNA 可以抑制结肠癌细胞 LOVO 的增殖、迁移和浸润^[8]。B7-H4-siRNA 不仅可以抑制胰腺癌细胞的增殖、迁移和克隆形成,

而且还可以通过提高 caspase 的活性或降低 Erk1/2 的磷酸化作用使胰腺癌细胞凋亡增加^[9]。转染了 B7-H4-siRNA 的间充质干细胞株 C3H10 与小鼠淋巴瘤细胞株 EL-4 共培养,结果发现 C3H10 能抑制 EL-4 的增殖^[10]。

本研究人工设计并合成 B7-H4-siRNA,成功转染卵巢癌 SKOV-3 细胞,采用 MTT 法检测 siRNA 对细胞生长的抑制作用,细胞计数法计算细胞倍增时间,结果显示 B7-H4-siRNA 组与转染试剂对照组、随机乱码组和未转染组相比,细胞生长抑制作用明显,细胞倍增时间延长,提示 siRNA 沉默 B7-H4 基因能明显抑制 SKOV3 细胞的增殖能力。

综上所述,利用 siRNA 沉默 B7-H4 基因能明显抑制卵巢癌细胞株 SKOV3 的增殖能力,可以使细胞生长受到抑制,倍增时间延长,特异性干扰 B7-H4 基因的表达有望成为治疗卵巢癌的一种新手段。

参考文献:

[1] 王丽,许国峰,欧阳俊等. 卵巢肿瘤中 B7-H4 分子的表达及临床意义[J]. 现代免疫学,2013,33(6):446-450. DOI:1001-2478(2013)06-0446-05.

[2] 史亚飞,韩晓菲,李磊,等. 乳腺癌分子分型在新辅助化疗中的疗效预测[J]. 济宁医学院学报,2015,38(5):327-330. DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2015.05.007.

[3] Salceda S, Tang T, Kmet M, et al. The immunomodulatory protein B7-H4 is overexpressed in breast and ovarian cancers and promotes epithelial cell transformation[J]. Exp Cell Res, 2005, 306(1):128-141. DOI:10.1016/j.

yexcr. 2005. 01. 018.

[4] Smith JB, Stashwick C, Powell DJ Jr. B7-H4 as a potential target for immunotherapy for gynecologic cancers: a closer look[J]. Gynecol Oncol, 2014, 134(1):181-189. DOI:10.1016/j.ygyno.2014.03.553.

[5] Dangaj D, Scholler N. Blocking the B7-H4 pathway with novel recombinant antibodies enhances T cell-mediated antitumor responses[J]. Oncoimmunology, 2013, 2(8):e25913. DOI:10.4161/onci.25913.

[6] Dangaj D, Lanitis E, Zhao A, et al. Novel recombinant human b7-h4 antibodies overcome tumoral immune escape to potentiate T-cell antitumor responses[J]. Cancer Res, 2013, 73(15):4820-4829. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-12-3457.

[7] 张羽,陈曾燕. B7-H4 在上皮性卵巢癌中的表达及意义[J]. 临床肿瘤学杂志, 2013, 18(12):1104-1107. DOI:1009-0460(2013)12-1104-04.

[8] Peng HX, Wu WQ, Yang DM, et al. Role of B7-H4 siRNA in Proliferation, Migration, and Invasion of LOVO Colorectal Carcinoma Cell Line[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015:326981. DOI:10.1155/2015/326981.

[9] Qian Y, Hong B, Shen L, et al. B7-H4 enhances oncogenicity and inhibits apoptosis in pancreatic cancer cells[J]. Cell Tissue Res, 2013, 353(1):139-151. DOI:10.1007/s00441-013-1640-8.

[10] Yang AP, Tang LT, Chen JM. Inhibitory effect of bone marrow mesenchymal stem cells on lymphoma cell proliferation[J]. Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi, 2014, 22(6):1610-1615. DOI:10.7534/j.issn.1009-2137.2014.06.020.

(收稿日期 2016-04-15)

(上接第 319 页)

[3] Liu CL, Chen YS, Yang JH, et al. Antioxidant Activity of Tartary (Fagopyrum tataricum (L.) Gaertn.) and Common (Fagopyrum esculentum Moench) Buckwheat Sprouts[J]. J Agric Chem, 2008, 56(1):173-178. DOI:10.1021/jf072347s.

[4] Wang M, Liu JR, Gao JM, et al. Antioxidant Activity of Tartary Buckwheat Bran Extract and Its Effect on the Lipid Profile of Hyperlipidemic Rats[J]. J Agric Chem, 2009, 57(11):5106-5112. DOI:10.1021/jf900194s.

[5] Li D, Li XL, Ding XL. Composition and Antioxidative Properties of the Flavonoid-rich Fractions from Tartary Buckwheat Grains[J]. Food Science and Biotechnolo-

gy, 2010, 19(3):711-716. DOI:10.1007/s10068-010-0100-4.

[6] Guo XD, Ma YJ, Parry J, et al. Phenolics Content and Antioxidant Activity of Tartary Buckwheat from Different Locations[J]. Molecules, 2011, 16(12):9850-9867. DOI:10.3390/molecules16129850.

[7] Qin PY, Wu L, Yao Y, et al. Changes in phytochemical compositions, antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities during the processing of tartary buckwheat tea[J]. Food Research International, 2013, 50(2):562-567. DOI:10.1016/j.foodres.2011.03.028.

(收稿日期 2016-02-29)