

EphA2 siRNA 转染对人卵巢癌细胞 SKOV3 生物学行为的影响

韩丽萍¹, 李萌萌¹, 张晓雪¹, 耿莉娜¹, 索振河²

1. 郑州大学第一附属医院 妇产科(郑州 450052); 2. 挪威奥斯陆大学肿瘤医院 病理科(奥斯陆 0310)

【摘要】 目的 探讨促红素人肝细胞受体酪氨酸激酶 A2(EphA2)干扰性小 RNA(siRNA)转染人卵巢癌细胞 SKOV3 后,对其生物学行为的影响。**方法** 根据 *EphA2* 序列合成一对 siRNA,转染 SKOV3 细胞,通过荧光倒置显微镜观察转染效率和细胞形态;Western blot 检测 EphA2 蛋白表达水平;台盼蓝染色细胞计数法绘制细胞生长曲线;集落形成实验、黏附力测定、细胞侵袭重建基底膜实验测定细胞的集落形成率、黏附和侵袭力。**结果** 构建的 *EphA2* siRNA 转染 SKOV3 后,荧光倒置显微镜下可见大量荧光颗粒;Western blot 检测 EphA2 蛋白水平表达降低($P<0.05$);细胞的增殖、黏附力、侵袭力均受到抑制($P<0.05$);集落形成率无明显影响($P>0.05$)。**结论** *EphA2* siRNA 有效降低细胞中 *EphA2* 基因表达,抑制细胞的增殖,降低细胞的黏附力和侵袭力,从而逆转其恶性生物学行为,为肿瘤的有效干预和治疗提供新的靶点。

【关键词】 EphA2 干扰性小 RNA SKOV3 细胞侵袭力 细胞增殖

Influence of *EphA2* siRNA Transfection on the Biological Behavior of Human Ovarian Carcinoma Cell HAN Li-ping¹, LI Meng-meng¹, ZHANG Xiao-xue¹, GENG Li-na¹, SUO Zhen-he². 1. Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Department of Pathology, Norwegian Radium Hospital, Oslo University, Oslo 0310, Norway

【Abstract】 Objective To explore *EphA2* siRNA transfection and its influence on the biological behavior of human ovarian carcinoma cells. **Methods** One pairs of siRNA was synthesized and transfected into the human ovarian carcinoma cell line SKOV3. Observation of the transfection efficiency through the fluorescence inverted microscope was followed by the evaluation of expression of EphA2 protein using Western blot. The effects of *EphA2* siRNA on proliferation of SKOV3 cells were observed by drawing cell growth curves and measuring cloning efficiency, and the adhesion and invasion of SKOV3 were detected by cell adhesion assay and Matrigel-boyden chamber method respectively. **Results** After successful transfection, a large number of fluorescent particles were observed under the fluorescence inverted microscope. The expression of EphA2 protein was obviously suppressed by *EphA2* siRNA ($P<0.05$), The cell proliferation, adhesiveness and invasiveness were significantly inhibited ($P<0.05$). However, no changes in colony-forming efficiency were observed ($P>0.05$). **Conclusion** Down-regulation of *EphA2* gene by *EphA2* siRNA in SKOV3 cell line showed retardation of cell growth, proliferation and partial reversion of the malignant phenotype, including the ability of adhesion and invasion. *EphA2* may be a new and potent target of gene therapy in ovarian carcinoma.

【Key words】 EphA2 Small interfering RNA SKOV3 Cell invasiveness Cell proliferation

酪氨酸激酶(Eph)受体家族是受体蛋白酪氨酸激酶家族(PTK)中最大的亚家族,PTK 参与肿瘤的发生和发展^[1],EphA2 是 Eph 亚族第 3 个被发现并克隆全长 cDNA 的成员,广泛表达于上皮来源细胞中。在多种肿瘤细胞中存在 EphA2 高表达并出现功能改变。EphA2 表达水平与疾病的进展及细胞的恶性行为有关^[2]。*EphA2* 作为强有力的致癌基因参与肿瘤的发生发展过程^[3]。本研究前期实验已经证实存在卵巢癌组织和卵巢癌细胞 SKOV3 中存在 EphA2 的高表达,EphA2 高表达与卵巢癌的恶

性行为有关,为卵巢癌独立的预后指标^[4,5]。因此下调肿瘤细胞中 EphA2 的蛋白表达水平可能会降低肿瘤细胞的恶性程度,提示 *EphA2* 可作为新的肿瘤分子标志指导卵巢癌的靶基因治疗。有关 *EphA2* 干扰性小 RNA (small interfering RNA, siRNA)转染肿瘤细胞的研究报道较少。本研究首次应用 siRNA 技术抑制 EphA2 在卵巢癌细胞 SKOV3 中的表达,观察 *EphA2* siRNA 对卵巢癌细胞 SKOV3 生物学行为的影响,探索 *EphA2* 作为卵巢癌治疗靶基因的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料

EphA2 siRNA 由德国 QIAGEN 公司合成;人卵巢癌细胞 SKOV3 购自美国 ATCC 细胞库;人/鼠 RNAiFect 转染试剂盒购自德国 QIAGEN 公司;*EphA2* 兔抗人多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;Bio-Rad 蛋白浓度测定试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司;BioCoat™ Matrigel™ 侵袭小室和 Diff-Quik™ 染液购自 Becton Dickinson 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人卵巢癌细胞 SKOV3 常规培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中,含青霉素 250 $\mu\text{L/L}$ (400 万单位),链霉素 500 $\mu\text{L/L}$ (100 万单位)。培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度,约 2~3 d 更换 1 次培养液。待细胞长满瓶底时,0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 质粒转染 依据双链 RNA 的设计原则,借助计算机辅助分析 *EphA2* 基因序列确定 1 对 siRNA,由德国 QIAGEN 公司合成。取对数生长期的细胞,按照 RNAiFect 转染试剂盒步骤以设计好的 *EphA2* siRNA 转染 SKOV3 细胞 (*EphA2* siRNA 转染组),选取与已知哺乳动物基因组无同源性、以荧光基团 Alexa Fluor 488 标记的 siRNA 转染的 SKOV3 细胞为阴性对照 (SKOV3 siRNA 阴性对照组),同时设未转染的 SKOV3 细胞为空白对照组。*EphA2* siRNA 转染效率按发绿色荧光细胞数量占白光下相同视野中细胞数量的百分比计算。

1.2.3 Western blot 检测 *EphA2* 蛋白表达 转染 48、72、96 h 后收获细胞,加入蛋白裂解液,提取蛋白,Bradford 比色法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 分离蛋白,转移至 PVDF 膜,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h,加一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,加二抗,室温孵育 1 h, TBST 洗膜后,暗室中压片显色。确认特异性条带,*EphA2* 蛋白的相对分子质量为 130×10^3 ,内参 β -actin 的相对分子质量为 42×10^3 ,用凝胶成像扫描系统分别测定其灰度值,以 *EphA2* 蛋白与内参灰度值的比值作为目的蛋白的相对含量。

1.2.4 细胞生长曲线的测定 取对数生长期细胞培养于 24 孔板中,每隔 24 h 取 1 孔经台盼蓝染色后进行细胞计数,每天每组重复 3 孔,取 3 孔平均值,共计数 5 d,绘制细胞生长曲线。

1.2.5 集落形成实验 转染后 72 h 收获各组细

胞,制成细胞悬液,以 50、100、200 个细胞/皿的密度接种于培养皿内。当出现肉眼可见的克隆时终止培养,显微镜下计数大于 50 个细胞的细胞集落,测 3 次,取平均值。按下式计算集落形成率:集落形成率(%)=克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.2.6 细胞黏附力测定 转染后 72 h 收获各组细胞,制成细胞悬液,按每孔 $4 \times 10^4/\text{mL}$ 密度接种于 24 孔培养板,分别于第 3、6、9 h 弃去培养液,0.25% 胰酶消化后显微镜下计数,测 3 次,取平均值。按下式计算细胞黏附率:细胞黏附率(%)=黏附细胞总数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.2.7 体外细胞侵袭力测定 取 24 孔板,加入无血清条件培养基,将 Boyden 小室转移至培养板上。转染 72 h 后, $4 \times 10^4/\text{mL}$ 密度接种于 Boyden 小室内,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内孵育 22 h,棉签拭去小室内未侵袭的细胞,Diff-Quik™ 固定液孵育 Boyden 小室 2 min,侵袭至 Matrigel 膜下方的细胞染色。Diff-Quik™ 染液 1 和 Diff-Quik™ 染液 2 孵育 Boyden 小室各 2 min,显微镜下观察并计数,细胞膜呈紫色,细胞浆呈粉红色。显微镜下观察,随机计数 5 个高倍视野 (HP, $\times 100$) 中的细胞数,以每个 HP 中侵袭细胞的平均数表示肿瘤细胞的侵袭能力。

1.2.8 统计学方法 各组计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组以上均数的比较采用方差分析 (ANOVA),两两比较采用最小显著差法 (LSD 法)。 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 转染效率

EphA2 siRNA 基因整合入人卵巢癌细胞 SKOV3 基因组后,激发光波长 488 nm 下视野中发荧光细胞数量,与白光下相同视野中细胞数量一致,即转染效率为 100%。见图 1。

2.2 转染 *EphA2* siRNA 后 SKOV3 细胞中 *EphA2* 蛋白的表达

EphA2 siRNA 转染组 (48 h、72 h、96 h),阴性对照组,空白对照组 *EphA2* 蛋白的相对表达量分别为 6.55 ± 0.10 、 6.40 ± 0.07 、 6.28 ± 0.13 、 12.19 ± 0.62 、 11.23 ± 0.72 ,组间比较差异有统计学意义 ($P=0.014$),*EphA2* siRNA 转染 48 h、72 h、96 h 后对人卵巢癌 SKOV3 细胞中 *EphA2* 蛋白表达有明显的抑制作用,且随着转染时间的延长,*EphA2* 蛋白的表达逐渐降低 ($P<0.05$)。见图 2。

2.3 转染 *EphA2* siRNA 后对细胞增殖的影响

SKOV3 细胞在转染 *EphA2* siRNA 后 48 h 开

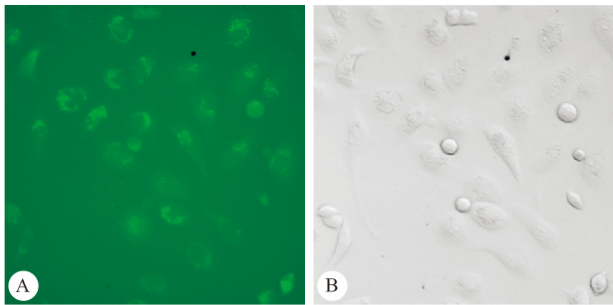


图 1 SKOV3 细胞 *EphA2* siRNA 转染后的荧光表达。×400

Fig 1 Fluorescent particles in SKOV3 after *EphA2* siRNA transfection. ×400

A: SKOV3 observed with the fluorecence inverted microscope after transfection; B: SKOV3 under the bright field microscopy the same field

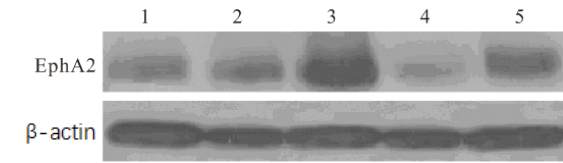


图 2 *EphA2* siRNA 转染后 SKOV3 细胞 *EphA2* 蛋白的表达

Fig 2 Expression of *EphA2* protein in SKOV3 cells at different time after *EphA2* siRNA transfection

1: 48 h; 2: 72 h; 3: SKOV3 siRNA; 4: 96 h; 5: SKOV3

始出现增殖抑制,持续至 96 h。与阴性对照、空白对照组比较,*EphA2* siRNA 转染组在 48、72、96 h 的细胞数减少($P<0.01$)。见图 3。

2.4 转染 *EphA2* siRNA 后对细胞集落形成的影响

附表 <i>EphA2</i> siRNA 对 SKOV3 细胞集落形成率和细胞黏附力的影响 ($n=3$)							
Number of cells (/dish)	Cell cloning efficiency (%)			Incubation time (h)	Cell adhesion (%)		
	<i>EphA2</i> siRNA	SKOV3 siRNA	SKOV3		<i>EphA2</i> siRNA	SKOV3 siRNA	SKOV3
50	6.8±0.7	7.4±1.3	7.6±1.0	3	21.8±1.6	32.5±1.0*	34.6±1.6*
100	11.4±0.4	12.6±0.8	12.7±1.3	6	36.0±2.1	42.8±1.7*	43.6±1.8*
200	17.4±0.9	18.5±0.7	18.4±0.6	9	38.9±2.1	77.6±1.9*	81.1±1.8*

* $P<0.05$, vs. *EphA2* siRNA group

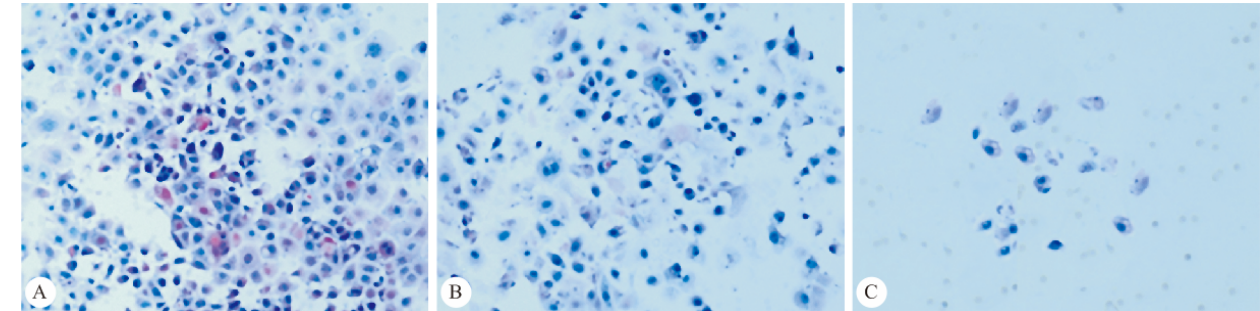


图 4 *EphA2* siRNA 转染后侵袭至 Matrigel 滤膜下表面的 SKOV3 细胞。×100

Fig 4 SKOV3 cells invasion through Matrigel after *EphA2* siRNA transfection. ×100

A: SKOV3; B: SKOV3 siRNA; C: SKOV3 transfected with *EphA2* siRNA

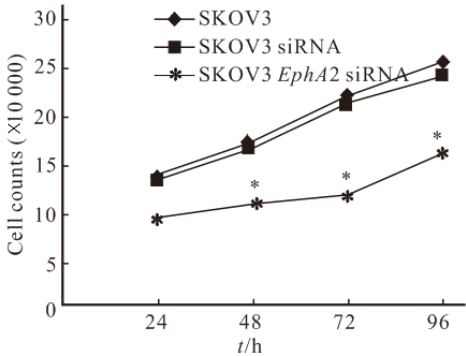


图 3 *EphA2* siRNA 转染后 SKOV3 细胞生长曲线

Fig 3 Growth curves of SKOV3 cells before and after *EphA2* siRNA transfection

* $P<0.05$, vs. SKOV3 siRNA and SKOV3 groups

转染后 72 h,在不同细胞接种密度下,*EphA2* siRNA 转染组与阴性对照组、空白对照组比较,集落形成率差异均无统计学意义。见附表。

2.5 转染 *EphA2* siRNA 后对细胞黏附力的影响

转染后 72 h,各组细胞培养 3 h、6 h、9 h 后,细胞黏附力差异均有统计学意义(P 均 = 0.000 1),*EphA2* siRNA 转染组与阴性对照组、空白对照组相比,SKOV3 细胞黏附力下降。见附表。

2.6 转染 *EphA2* siRNA 后对细胞体外侵袭力的影响

见图 4。转染 *EphA2* siRNA 后 72 h,侵袭细胞数分别为 *EphA2* siRNA 转染组(9.7 ± 2.5)/HP、阴性对照组(90.0 ± 8.7)/HP、空白对照组($95.0\pm$

15.0)/HP。EphA2 siRNA 转染组与阴性对照组及空白对照组比较,体外细胞侵袭力下降($P < 0.005$)。

3 讨论

Eph 受体酪氨酸激酶是已知最大的酪氨酸蛋白激酶家族。依据 Eph 受体亚族在胞外结构域上的同源性、表达分布及与结合配体的不同情况,将其分为 EphA 和 EphB 亚族^[6]。人类 *EphA2* 基因定位于染色体 1p36.1,此区在人体的多种肿瘤中常有缺失,被认为是肿瘤的遗传热点。*EphA2* 基因编码一个含有 976 个氨基酸残基的多肽,相对分子质量为 130×10^3 ,为膜结合 I 型糖蛋白,存在于细胞-细胞黏附部位^[7]。

RNA 干扰(RNAi)是高度特异的在 mRNA 水平上的基因沉默机制,由内源性或外源性双链 RNA(dsRNA)诱发。dsRNA 在细胞内被切割成 21~25 nt siRNA,siRNA 介导识别并靶向切割同源性靶 mRNA 分子,从而导致该基因不表达。本研究采用的 RNAiFect 是一种基于脂质的转染试剂,专门用于 siRNA 转染。转染复合物能够高效的在完全培养基中形成,因而整个转染过程可以在含血清的培养基中操作,无需更换培养基,方便转染操作。该试剂可以耐受较高浓度的 siRNA 而不引起细胞毒性,能够得到更好的转染效果。

EphA2 具有双重调节作用,在正常上皮细胞,EphA2 与配体 EphrinA1 结合后激活 Eph 受体酪氨酸激酶,抑制 Ras/MAKP 旁路信号转导途径,对细胞黏附和增生进行负调节^[8]。EphA2 蛋白在多种实体瘤中高表达,如头颈部鳞状上皮细胞癌^[3]、鼻咽癌^[9]、非小细胞肺癌^[10]、甲状腺癌^[2]、喉癌^[11]、前列腺癌^[12]、胃癌^[13]、子宫内膜癌^[14]等,高表达的 EphA2 促进肿瘤细胞脱离黏附、降低细胞间的接触抑制,导致肿瘤细胞的游离、播散及侵袭。本研究前期实验证明,EphA2 在卵巢癌组织中高表达,高表达的 EphA2 为卵巢癌独立的预后指标^[4,5]。下调卵巢癌细胞中 EphA2 蛋白的表达水平可能会降低肿瘤细胞的恶性程度。本实验应用 siRNA 技术抑制 EphA2 在卵巢癌细胞 SKOV3 中的表达,*EphA2* siRNA 转染 SKOV3 细胞后 EphA2 蛋白表达明显降低,与应用单克隆抗体^[15]和反义寡核苷酸^[16]中和 *EphA2* 原癌基因的表达所引起的生物学效应一致。

EphA2 蛋白的抗体靶向实验表明抗体结合可以降低 EphA2 蛋白表达,降低肿瘤的恶性程度^[17]。

EphA2 降解能诱导强有力的原癌蛋白表达水平下降,EphA2 水平下降影响下游信号转导分子作用,从而阴性调节肿瘤细胞的生长、生存及侵袭等恶性行为^[15]。癌细胞或培养中发生恶性转化后的单个细胞培养时,形成集落(克隆)的能力比正常细胞强。另外癌细胞增殖数量增多扩展时,接触抑制消除,细胞能相互重叠向三维空间发展,形成堆积物。而本研究集落形成实验表明 EphA2 过表达与基因沉默效应并无明显区别,与文献报道一致^[18],表明单层细胞培养时良恶性上皮细胞的生物学行为并无明显区别。与单层细胞培养比较,肿瘤细胞在三维微环境下的行为如 Matrigel 更能准确反映肿瘤细胞的生长和侵袭特性,预测肿瘤细胞在体内的恶性行为。Matrigel 是从小鼠肉瘤中抽提得到的可溶性的基底膜抽提物,此种肉瘤富含细胞外基质蛋白,其主要成分是层黏连蛋白、胶原 IV、硫酸肝素糖蛋白、TGF- β 、纤维母细胞生长因子、组织纤溶酶原激活物(tPA)和其他的一些生长因子。在室温下,Matrigel 基质可自动聚集产生类似哺乳动物细胞基底膜的生物活性基质材料,作用与哺乳动物细胞基底膜类似。本研究证实转染组的黏附和侵袭能力明显低于对照组,抑制 EphA2 表达能有效阻止细胞在基质层的黏附和侵袭,表明 EphA2 在癌细胞向基质层黏附和体外侵袭过程中具有重要作用。

本研究发现,*EphA2* siRNA 能显著抑制卵巢癌细胞 SKOV3 的增殖、黏附及浸润,具体机制尚未完全阐明,但对胰腺癌细胞 PANC1、Capan2 等的研究显示,*EphA2* siRNA 能降低黏着斑激酶(FAK)的磷酸化程度,导致 FAK 激酶活性下降,抑制 FAK 相关的信号转导,降低细胞的侵袭能力^[1]。研究表明,EphA2 的过表达在很大程度上影响前列腺癌细胞的运动方式,使之通过阿米巴运动而不是蛋白水解酶的侵袭方式增加远处播散机会^[12]。在子宫内膜癌中,高表达的 EphA2 伴随着血管内皮细胞细胞生长因子表达的升高,增加肿瘤的微血管密度^[14]。

综上,通过 RNAi 技术抑制 *EphA2* 基因的表达可以抑制卵巢癌细胞的增殖并部分逆转其恶性生物学行为,从而为以 *EphA2* 为靶向的卵巢癌的基因治疗提供了新的思路 and 手段。

参 考 文 献

- 1 Walker-Daniels J, Hess AR, Hendrix MJ, et al. Differential regulation of EphA2 in normal and malignant cells. Am J Pathol, 2003;162(4):1037-1042.

- 2 Karidis NP, Giaginis C, Tsourouflis G, *et al.* Eph-A2 and Eph-A4 expression in human benign and malignant thyroid lesions, an immunohistochemical study. *Med Sci Monit*,2011; 17(9):BR257-BR265.
- 3 Liu Y, Yu CY, Qiu YZ, *et al.* Downregulation of EphA2 expression suppresses the growth and metastasis in squamous-cell carcinoma of the head and neck *in vitro* and *in vivo*. *J Cancer Res Clin Oncol*,2012;138(3):195-202.
- 4 韩丽萍, 刘娟芳, 刘香荣等. EphA2 受体及其配体在浆液性卵巢癌中的表达及其临床意义. *四川大学学报(医学版)*,2011; 42(2):179-184.
- 5 Han L, Dong Z, Qiao Y, *et al.* The clinical significance of EphA2 and Ephrin A-1 in epithelial ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol*,2005;99(2):278-286.
- 6 Klein R. Excitatory Eph receptors and adhesive ephrin ligands. *Curr Opin Cell Biol*,2001;13(2):196-203.
- 7 Sulman EP, Tang XX, Allen C, *et al.* ECK, a human eph-related gene, maps to 1p36.1, a common region of alteration in human cancers. *Genomics*,1997;40(2):371-374.
- 8 Miao H, Wei BR, Peehl DM, *et al.* Activation of EphA receptor tyrosine kinase inhibits the Ras/MAPK pathway. *Nat Cell Biol*,2001;3(5):527-530.
- 9 朱国臣, 肖大江, 陈琦等. 鼻咽癌组织中 EphA2 的表达变化及其意义. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*,2011; 25(18):827-829, 833.
- 10 Ishikawa M, Miyahara R, Sonobe M, *et al.* Higher expression of EphA2 and ephrin-A1 is related to favorable clinicopathological features in pathological stage I non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer*,2012;76(3):431-438.
- 11 刘勇, 张欣, 邱元正等. 促红细胞生成素产生肝细胞受体 A2 在喉鳞癌中的表达及其与临床病理特征和预后的关系. *中华肿瘤杂志*,2011;33(3):197-201.
- 12 Taddei ML, Parri M, Angelucci A, *et al.* EphA2 induces metastatic growth regulating amoeboid motility and clonogenic potential in prostate carcinoma cells. *Mol Cancer Res*,2011;9(2):149-160.
- 13 Yuan WJ, Ge J, Chen ZK, *et al.* Over-expression of EphA2 and EphrinA-1 in human gastric adenocarcinoma and its prognostic value for postoperative patients. *Dig Dis Sci*,2009; 54(11): 2410-2417.
- 14 Merritt WM, Kamat AA, Hwang JY, *et al.* Clinical and biological impact of EphA2 overexpression and angiogenesis in endometrial cancer. *Cancer Biol Ther*, 2010; 10(12): 1306-1314.
- 15 Walker-Daniels J, Riese DJ, Kinch MS. c-Cbl-dependent EphA2 protein degradation is induced by ligand binding. *Mol Cancer Res*,2002;1(1):79-87.
- 16 Cheng N, Brantley DM, Liu H, *et al.* Blockade of EphA receptor tyrosine kinase activation inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced angiogenesis. *Mol Cancer Res*,2002; 1(1):2-11.
- 17 Carles-Kinch K, Kilpatrick KE, Stewart JC, *et al.* Antibody targeting of the EphA2 tyrosine kinase inhibits malignant cell behavior. *Cancer Res*,2002;62(10):2840-2847.
- 18 Zelinski DP, Zantek ND, Stewart JC, *et al.* EphA2 overexpression causes tumorigenesis of mammary epithelial cells. *Cancer Res*,2001;61(5):2301-2306.
- 19 Duxbury MS, Ito H, Zinner MJ, *et al.* EphA2, a determinant of malignant cellular behavior and a potential therapeutic target in pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene*,2004; 23(7):1448-1456.

(2013-04-22 收稿, 2013-07-22 修回)

编辑 余琳