

PIWIL4 在人卵巢癌中的表达及其功能研究*

郭利敏 刘 民 李 欣 汤 华**

(天津医科大学基础医学院, 天津市生命科学中心实验室, 天津 300070)

摘要 采用半定量 RT-PCR 方法检测人卵巢透明细胞癌 ES-2 细胞中 PIWIL1、PIWIL2、PIWIL3、PIWIL4 mRNA 表达水平, 以及 PIWIL4 在卵巢癌组织和癌旁正常组织中的表达情况. 设计并化学合成针对 PIWIL4 的 siRNA, 用脂质体转染法将其转入 ES-2 细胞内, 通过 MTT 和克隆形成实验, 观察 PIWIL4-siRNA 对 ES-2 细胞生长活性和增殖能力的影响. 半定量 RT-PCR 实验结果发现, ES-2 细胞中, PIWIL4 相对 PIWIL1、PIWIL2、PIWIL3, 其表达水平最高($P < 0.05$), 而且 PIWIL4 在卵巢癌组织中的表达明显高于癌旁正常组织($P < 0.01$). MTT 实验和克隆形成实验结果显示, 转染 PIWIL4-siRNA 的 ES-2 细胞生长活性和克隆形成率明显低于对照组($P < 0.05$). 由此得出结论: PIWIL4 在卵巢癌细胞系 ES-2 细胞表达较高, 且它在卵巢癌组织中的表达明显上调, 同时 PIWIL4-siRNA 可有效抑制 ES-2 细胞的生长活性和增殖能力, 提示 PIWIL4 可能与卵巢癌发生、发展相关.

关键词 卵巢癌, PIWIL4, 增殖, RNA 干扰, siRNA

学科分类号 Q527, R737.31

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00478

Argonaute 蛋白家族是小分子 RNA 复合物的主要成分, 它分为 Ago 亚家族和 Piwi 亚家族. 人类 Piwi 亚家族主要有 4 个成员: PIWIL1、PIWIL2、PIWIL3、PIWIL4. 最初认为, 人类 Piwi 仅在成年男性生殖系统中特异表达, 而后研究发现, PIWIL4 在人正常卵巢组织中也有表达^[1]. 目前研究发现, Piwi 在睾丸中的表达仅限制在精子形成前的精母细胞和圆形精子细胞, 以及由胚胎生殖细胞起源并保持生殖细胞表型的肿瘤中, 表明 Piwi 在生殖细胞的增殖和维持中发挥作用. Piwi 与肿瘤的关系国内外研究报道很少, 有文献报道 PIWIL1 的过表达将导致睾丸精原细胞瘤的发生^[2]. 也有研究表明, PIWIL2 在人类女性生殖系肿瘤——卵巢癌中有阳性表达. 而人卵巢癌中 PIWIL4 的表达情况以及 PIWIL4 在卵巢癌和癌旁正常组织中差异表达情况国内外未见报道. 本研究旨在了解 PIWIL4 在人上皮性卵巢癌细胞株 ES-2 细胞中的表达情况及其在卵巢癌组织和癌旁正常组织中的差异表达, 并应用 RNA 干扰技术观察 PIWIL4 表达水平下降后 ES-2 细胞生长活性和增殖能力的变化.

1 材料和方法

1.1 材料

人卵巢透明细胞癌细胞系 ES-2 来自本实验室的保存株. 收集天津市中心妇产医院卵巢癌手术标本 11 例, 其中癌组织 8 例、癌旁组织 3 例, 均经病理组织学查实. 标本离体后立即置液氮休克, -80°C 保存. RPMI1640 购自美国 GIBCO 公司; 胎牛血清购自中美合资兰州民海生物工程有限公司; 脂质体 lipofectamine2000、Opti-MEM 无血清培养基、RNA 抽提试剂 TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司; RT-PCR 试剂购自美国 Promega 公司和日本 TaKaRa 公司.

1.2 细胞培养

ES-2 细胞用含 10% 胎牛血清, 100 U/ml 青霉素, 100 mg/L 链霉素的 RPMI1640 培养液培养于 37°C 、5% CO_2 孵箱中.

* 天津市科技发展计划重点项目(033182911).

** 通讯联系人.

Tel: 022-23542503, E-mail: htang2002@yahoo.com

收稿日期: 2008-07-04, 接受日期: 2008-09-22

1.3 半定量逆转录聚合酶链式反应(Semi-qRT-PCR)

TRIzol 试剂抽提对数生长期的 ES-2 细胞、卵巢癌组织和癌旁正常组织的总 RNA, 紫外分光光度仪定量. 取 5 μ g 总 RNA 按说明书步骤逆转录为 cDNA, 再用不同引物进行 PCR 反应. PCR 引物序列设计如下: PIWIL1, 正义 5' GGAGATAAGAGGCGTAAAG 3', 反义 5' GAATCATGTCCCAGTTCC 3', 扩增产物为 286 bp; PIWIL2, 正义 5' CCTTCTCCAACCCTGTAG 3', 反义 5' CCTGCCTTAGCCTCCTGAG 3', 扩增产物为 367 bp; PIWIL3, 正义 5' CACAAGCTGGCTTACCTCG 3', 反义 5' CTCTGTCACATATTTGAAAGGG 3', 扩增产物为 323 bp; PIWIL4, 正义 5' CATGAACACTGGCATCAC 3', 反义 5' GGGAATTAGACTCTGTTTATC 3', 扩增产物为 340 bp; 内参照 β -肌动蛋白(β -actin), 正义 5' CGTGACATTAAGGAGAAAGCTG 3', 反义 5' CTAGAAGCATTTGCGGTGGAC 3', 扩增产物为 500 bp. PIWIL1、PIWIL3、PIWIL4、 β -actin 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 33 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. PIWIL2 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 33 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察并拍照. LabWorksTM 成像和分析软件分析条带灰度值, 分别以 PIWIL1、PIWIL2、PIWIL3、PIWIL4 与 β -actin 条带灰度值的比值作为 4 种基因 mRNA 的相对表达水平.

1.4 siRNA 的设计及合成

使用 Ambion 公司的 siRNA 设计软件, 依据 PIWIL4 基因的 cDNA 序列(NM_152431)进行设计. 设计出的 PIWIL4-siRNA(HTPI4-SR)定位于其序列的 919~939 核苷酸处, 共 21 个碱基, siRNA 每条链的 3' 端各外加 2 个 TT 的突出端. 其序列为: 正义链, 5' GCU CCU GUU UAG UGC UGA UGU TT 3', 反义链, 5' ACA UCA GCA CUA AAC AGG AGC TT 3'. 作为阴性对照的半乳糖苷酶基因的 siRNA(si-LacZ)定位于其编码序列的 689~709 核苷酸, 共 21 个碱基, 同样在 siRNA 两条链的 3' 端各外加 2 个 TT 的突出端, 其序列为: 正义链, 5' GAC UAC ACA AAU CAG CGA UUU TT 3', 反义链, 5' AAA UCG CUG AUU UGU GUA GUC TT 3'. 它们分别由中国上海吉玛公司和中国奥科公司化学合成, 经 PAGE 胶纯化并退火

形成双链.

1.5 细胞转染

采用脂质体转染法. 将培养的 ES-2 细胞分为 3 组: A 组转染空脂质体(lipofectamine only, 空白对照), B 组转染对照的 si-LacZ+脂质体(阴性对照), C 组转染针对 PIWIL4 的 HTPI4-SR+脂质体(实验组). 转染前一天, 将 ES-2 细胞接种于 24 孔板中, 转染时细胞汇合至 70%~80%时, 按照 Lipofectamine2000 说明书的步骤分别转染空脂质体、阴性对照 si-LacZ、实验组 HTPI4-SR. 转染后 5 h, 补加 0.5 倍转染时体积的新鲜含 10%胎牛血清的全培养基, 转染后 24 h 全部更换为新鲜的含 10%胎牛血清的全培养基.

1.6 MTT 实验

取对数生长期的 ES-2 细胞, 按 6×10^3 /孔于 100 μ l 培养液中接种于 96 孔板, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养过夜后, 按 Lipofectamine2000 说明书的步骤转染 A、B、C 三组, 每组设 4 个复孔. 转染后 72 h, 每孔加入(5 mg/L) MTT 10 μ l, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下继续孵育 4 h. 吸出上清液, 每孔加(二甲苯亚砷)溶解剂 100 μ l, 微量振荡器振荡约 10 min, 镜下观察甲瓚结晶全部溶解后, 利用酶标仪在 570 nm 波长处测定每孔的吸光度(A_{570} 值).

1.7 克隆形成实验

A、B、C 三组细胞转染 48 h 后, 1 $\times$ PBS 洗涤 1 次, 用 0.01%胰蛋白酶将三组 ES-2 细胞均消化成单个细胞, 调整细胞密度至 1×10^3 个/ml. 取上述各组 ES-2 细胞, 以 120 个/孔的密度接种于 12 孔板中, 每组设 3 个复孔, 并且每 3 天更换一次新鲜 10%胎牛血清的 RPMI1640 全培养基. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 相对湿度为 90%的条件下培养 10 天, 甲醇固定 10 min, 2 g/L 结晶紫染色 10 min, 倒置显微镜下计数大于 50 个细胞的克隆. 克隆形成率 = (克隆数/120) $\times$ 100%.

1.8 统计学方法

统计软件 SPSS 12.0 进行数据处理, 统计数据以 $\bar{x} \pm s$ 来表示, 组间比较采用 Students' test 和 t -test. * $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义.

2 结果与讨论

2.1 PIWIL4 在卵巢透明细胞癌 ES-2 细胞中的表达

半定量 RT-PCR 的结果显示, PIWIL1、PIWIL2、PIWIL3、PIWIL4 在人卵巢透明细胞癌细

胞系 ES-2 细胞中均有表达. 其中, 与 PIWIL1、PIWIL2、PIWIL3 相比, PIWIL4 的相对表达水平最高(* $P < 0.05$)(图 1).

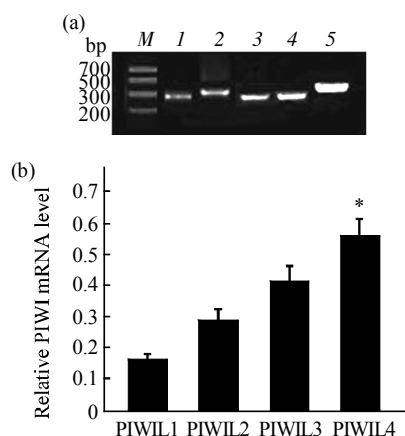


Fig. 1 Relative PIWI mRNA expression of human ovarian clear cell carcinoma ES-2 cells

(a) The picture of agarose gel electrophoresis of DNA. M: DNA marker; 1: PIWIL1; 2: PIWIL2; 3: PIWIL3; 4: PIWIL4; 5: β -actin. (b) The relative expression level of PIWI mRNA, compared to β -actin. * $P < 0.05$, compared to PIWIL1, PIWIL2, PIWIL3.

2.2 PIWIL4 在卵巢癌和癌旁组织中的差异表达

半定量 RT-PCR 的结果显示, 卵巢癌组织和癌旁正常组织中, PIWIL4 mRNA 水平的表达不一致. 卵巢癌组织中: PIWIL4/ β -actin (0.84 ± 0.19); 癌旁正常组织中: PIWIL4/ β -actin (0.46 ± 0.05). PIWIL4 在癌组织中的表达明显高于正常组织中的表达, 差异具有统计学意义(* $P < 0.01$)(图 2).

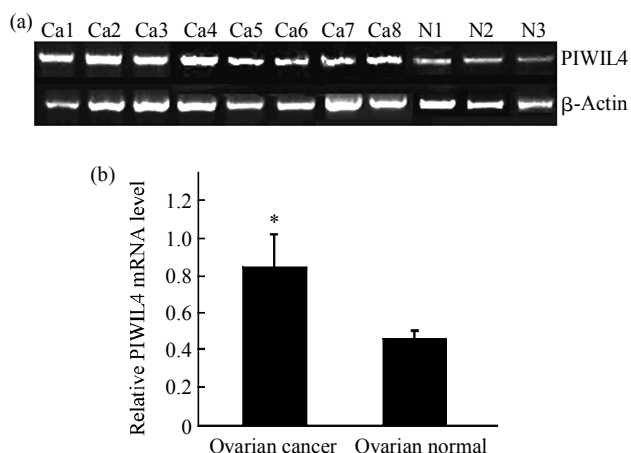


Fig. 2 Relative PIWIL4 mRNA expression of ovarian cancer and adjacent normal tissues

(a) The picture of agarose gel electrophoresis of DNA. Ca1 ~ Ca8: 8 ovarian cancer tissue samples; N1 ~ N3: 3 ovarian cancer adjacent normal tissue samples. (b) The relative expression of PIWIL4 mRNA, compared to β -actin. * $P < 0.01$.

2.3 MTT 法检测 PIWIL4-siRNA 对 ES-2 细胞生长活性的影响

MTT 实验结果显示, Lipofectamine only、si-LacZ、HTPI4-SR 转染的 A, B, C 三组 A_{570} 值分别为: (0.68 ± 0.02), (0.69 ± 0.04), (0.54 ± 0.03). 说明转染 HTPI4-SR 的 ES-2 细胞的生长活性降低, 与 lipofectamine only、si-LacZ 两组相比差异有统计学意义(* $P < 0.05$), 而两个对照组相比无明显差异(** $P > 0.05$)(图 3). 结果表明, PIWIL4-siRNA 可以抑制卵巢癌细胞的生长活性.

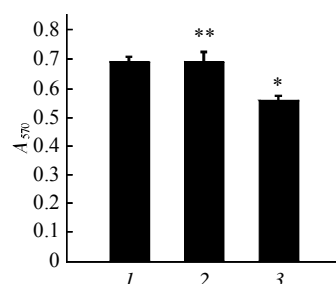


Fig. 3 PIWIL4-siRNA suppresses ES-2 cell growth

* $P < 0.05$, ** $P > 0.05$. 1: Lipofectamine only; 2: si-LacZ; 3: HTPI4-SR.

2.4 PIWIL4-siRNA 转染 ES-2 细胞后细胞克隆形成能力的变化

将转染了空脂质体, si-LacZ, PIWIL4-siRNA (HTPI4-SR) 的卵巢透明细胞癌 ES-2 细胞接种于 12 孔板中, 培养 10 天后, 显微镜下计数大于 50 个细胞的克隆(图 4), 依据公式计算克隆形成率. 各组克隆形成率如下: A 组(lipofectamine only), (26.1 ± 2.55); B 组(si-LacZ), (26.7 ± 3.33); C 组(HTPI4-SR), (15 ± 1.67)%. C 组与 A、B 两组相比克隆形成率明显降低, 差异具有统计学意义(* $P < 0.01$), 而 A、B 两组比较, 差异无统计学意义(** $P > 0.05$) (图 5). 结果表明, ES-2 细胞转染 HTPI4-SR (PIWIL4-siRNA) 后, 细胞体外独立增殖能力和肿瘤形成能力明显受到抑制.

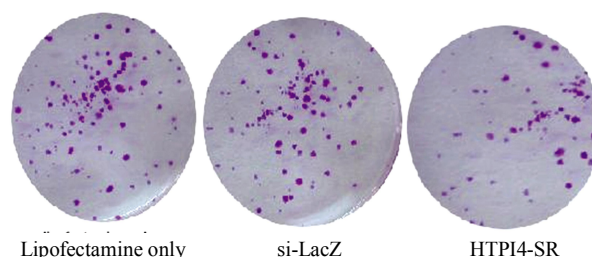


Fig. 4 Representative pictures of clones

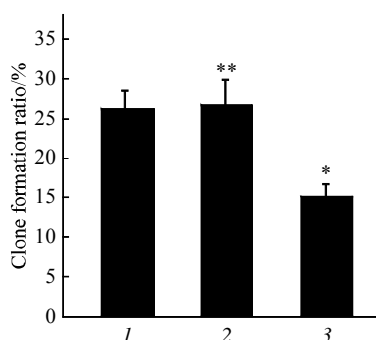


Fig. 5 The change of ES-2 cell clone formation ratio

* $P < 0.01$, ** $P > 0.05$. 1: Lipofectamine only; 2: si-LacZ; 3: HTP14-SR.

3 讨 论

肿瘤的发生是细胞发生恶性转化的结果,在这一过程中有多种基因出现异常表达,包括多个癌基因在时间和空间上的激活和(或)抑癌基因的失活。女性生殖系肿瘤——卵巢癌已成为严重危害妇女健康的恶性肿瘤之一,大多数病人临床表现为腹腔内播散和远处转移,由于缺乏有效的早期诊断方法和完善的治疗方案,其5年存活率仅为20%~30%。卵巢癌的发生、发展过程中也有多个癌基因和(或)抑癌基因的异常表达,具体的发生机制尚未完全阐明。

PIWIL4 属于 Argonaute 家族的 Piwi 亚家族,定位于染色体 11q12。在动物细胞中,Argonaute 家族主要在 RNA 干扰和 miRNA 介导的基因调控中发挥着十分重要的作用;Piwi 亚家族,主要与种系特异性时间相关,如胚胎干细胞的维持和减数分裂等,它们在睾丸组织中特异表达,与 piRNA (Piwi-interacting RNA) 相互作用,在精子发生过程中起着非常重要的作用^[3~5],但具体的作用机制尚不明确。目前已知 PIWIL4 基因在包括卵巢在内的人类多种组织中普遍表达,而且它在 p16^{INK4a} (CDKN2A) 位点介导 H3K9 甲基化导致 p16^{INK4a} 基因表达下调,表明 PIWIL4 在人类体细胞的染色质修饰途径中发挥重要作用^[6]。已有文献报道 PIWIL2 通过激活 stat3/Bcl-XL 途径抑制细胞的凋亡而发挥癌基因的作用^[7]。

本文首先利用半定量 RT-PCR 方法检测了 PIWIL4 在卵巢透明细胞癌 ES-2 细胞中的表达情况,结果发现:PIWIL4 与 Piwi 亚家族的其他三个成员相比,它在卵巢癌细胞中的表达水平最高(图 1)。本实验又检测了 PIWIL4 分别在卵巢癌组织和癌旁正常组织标本中的表达水平,实验结果表

明,PIWIL4 在卵巢癌组织中的表达明显上调(图 2)。由此初步推测,PIWIL4 可能参与了卵巢癌的发生、发展过程。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种转录后基因沉默机制,指当细胞中导入与内源性 mRNA 编码区同源的双链 RNA(dsRNA)时,该 mRNA 发生降解而导致基因表达沉默的现象^[8,9]。现在 RNAi 已成为一种研究基因功能强有力的新工具,通过导入序列特异的小双链干扰 RNA(siRNA)可以诱导真核细胞内与其同源的 mRNA 的特异性降解,产生类似基因敲除的效应^[10~13]。本实验利用 RNA 干扰技术使卵巢癌 ES-2 细胞中的 PIWIL4 表达水平降低,并运用 MTT 法和克隆形成实验检测了 ES-2 细胞转染 PIWIL4-siRNA 后细胞生长活性和增殖能力的变化。实验结果表明:PIWIL4 表达水平下降后 ES-2 细胞的生长活性降低,与对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图 3),而 ES-2 细胞增殖能力降低更明显(图 5)。这提示,PIWIL4 表达水平降低后短期内癌细胞的生长抑制作用表现不很明显,但对癌细胞长期的抑制作用表现很显著。

以上结果初步显示了 PIWIL4 与人卵巢透明细胞癌细胞系 ES-2 细胞的增殖相关,而其在卵巢癌发生发展中的作用及其机制有待进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 Sasaki T, Shiohama A, Minoshima S, *et al.* Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome. *Genomics*, 2003, **82** (3): 323~330
- 2 Qiao D, Zeeman A M, Deng W, *et al.* Molecular characterization of hiwi, a human member of the piwi gene family whose over expression is correlated to seminomas. *Oncogene*, 2002, **21** (25): 3988~3999
- 3 Girard A, Sachidanandam R, Hannon G J, *et al.* A germline specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*, 2006, **442** (7009): 199~202
- 4 Grivna S T, Beyret E, Wang Z, *et al.* A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes & Dev*, 2006, **20** (13): 1709~1714
- 5 Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, *et al.* A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testis. *Nature*, 2006, **442** (7099): 203~207
- 6 Sugimoto K, Kage H, Aki N, *et al.* The induction of H3K9 methylation by PIWIL4 at the p16^{INK4a} locus. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **359** (3): 497~502
- 7 Lee J H, Schutte D, Wulf G, *et al.* Stem-cell protein Piwil2 is widely expressed in tumors and inhibits apoptosis through activation of Stat3/Bcl-XL pathway. *Hum Mol Genet*, 2006, **15** (2): 201~211

- 8 Sharp P A. RNA interference-2001. *Genes Dev*, 2001, **15**(5): 485~490
- 9 Hannon G J. RNA interference. *Nature*, 2002, **418**(6894): 244~251
- 10 Hamilton A J, Baulcombe D C. A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants. *Science*, 1999, **286**(5441): 950~952
- 11 Bernstein E, Caudy A A, Hammond S M, *et al.* Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 2001, **409**(6818): 363~366
- 12 朱 睿, 张开立, 邹向阳. RNA 干扰(RNAi)技术及其在功能基因组学研究中的应用. *大连医科大学学报*, 2003, **25**(2): 105~107
- 13 Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, **411**(6836): 494~498

The Expression and Functional Research of PIWIL4 in Human Ovarian Cancer*

GUO Li-Min, LIU Min, LI Xin, TANG Hua**

(Tianjin Life Science Research Center and Basic Medical School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract To explore the expressional information of PIWIL4 in human ovarian cancer, semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (semi-qRT-PCR) was used to detect the mRNA expression level of PIWIL1, PIWIL2, PIWIL3 and PIWIL4 in human ovarian clear cell carcinoma ES-2 cells. Meanwhile, in human ovarian cancer and adjacent normal tissues, the mRNA expression of PIWIL4 was determined. Then, PIWIL4-siRNA, which was designed to target PIWIL4 and chemical synthesized, was transfected into ES-2 cells with lipofectamine. MTT assay and clone formation assay were used to investigate the effects of PIWIL4-siRNA on the cell growth activity and proliferation capacity of ES-2 cells. Experimental results showed that the mRNA expression level of PIWIL4 was the highest compared to PIWIL1, PIWIL2 and PIWIL3 in ES-2 cells ($P < 0.05$), and the expression of PIWIL4 mRNA in ovarian cancer tissues was higher than that in adjacent normal tissues ($P < 0.01$). MTT and clone formation analyses demonstrated that the cell growth activity and clone formation ratio of PIWIL4-siRNA transfected ES-2 cells were markedly decreased ($P < 0.05$). In conclusion, the expression of PIWIL4 mRNA was highest in ovarian cancer cell line ES-2 cells and was significantly increased in ovarian cancer tissues. Moreover, PIWIL4-siRNA can efficiently inhibit the cell activity and proliferation ability of ES-2 cells. In a word, PIWIL4 may be related to the pathogenesis of human ovarian cancer.

Key words ovarian cancer, PIWIL4, proliferation, RNA interference, siRNA

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00478

*This work was supported by a grant from The Technology Development Key Project of Tianjin (033182911).

**Corresponding author.

Tel: 86-22-23542503, E-mail: htang2002@yahoo.com

Received: July 4, 2008 Accepted: September 22, 2008