

siRNA 沉默 MACC1 基因表达对宫颈癌细胞增殖及侵袭的影响

杜 珍, 陈志美, 周道秋, 黄洁萍

(海南省第二人民医院妇产科, 海南 五指山 572299)

【摘要】 目的 探讨 siRNA 沉默结肠癌转移相关基因 1(MACC1) 表达对 HeLa 宫颈癌细胞增殖及侵袭的影响。**方法** 通过脂质体将 siRNA MACC1 及 siRNA NC 转入 HeLa 细胞中, RT-PCR 及 western blot 检测转染效果, MTT 法检测细胞活力, 流式细胞术检测细胞周期, Transwell 法检测细胞侵袭能力, western blot 检测细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)、cyclin E、基质金属蛋白酶 2(MMP2)、MMP9 蛋白表达及细胞外调节蛋白激酶(ERK)磷酸化水平。**结果** 与 siRNA NC 组比较, siRNA MACC1 组中 MACC1 蛋白及 mRNA 表达量降低($P < 0.01$), 细胞活力及侵袭能力下降($P < 0.01$), 细胞周期阻滞在 G1 期, cyclin D1、cyclin E、MMP2、MMP9 及 p-ERK 表达量下调($P < 0.01$)。**结论** siRNA MACC1 能显著的抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖与侵袭, 可能与下调 ERK 磷酸化水平有关。

【关键词】 结肠癌转移相关基因 1(MACC1); 宫颈癌; 增殖; 侵袭

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 10-0080-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.10.016

Effect of silencing MACC1 gene on proliferation and invasion of cervical cancer cells

DU Zhen, CHEN Zhi-mei, ZHOU Dao-qiu, HUANG Jie-ping

(Department of Obstetrics and Gynecology; the Second People's Hospital of Hainan province, Wuzhishan 72299, China)

【Abstract】 Objective To explore the effect of silencing metastasis-associated in colon cancer 1 (MACC1) gene on proliferation and invasion of cervical cancer HeLa cells. **Methods** siRNA MACC1 and siRNA NC were transfected into cervical cancer HeLa cells with liposomes. The expression of MACC1 protein and mRNA was detected by western blot and RT-PCR. Cell viability and invasion ability were measured by MTT and transwell assay, respectively. The expression of cyclin D1, cyclin E matrix metalloproteinase 2 (MMP2), MMP9 and the level of extracellular regulated protein kinases (ERK) phosphorylation was detected by western blot. **Results** Compared with siRNA NC, the expression of MACC1 protein and mRNA was down-regulated, cell viability and invasion ability were reduced ($P < 0.01$), cell cycle was arrested at G1 phase ($P < 0.01$), the expression of cyclin D1, cyclin E, MMP2, MMP9 and p-ERK1/2 was down-regulated ($P < 0.01$). **Conclusions** siRNA MACC1 can inhibit proliferation and invasion of cervical cancer HeLa cells, which might be related to down-regulation of p-ERK.

【Key words】 Metastasis-associated in colon cancer 1 (MACC1); Cervical cancer; Proliferation; Invasion

宫颈癌是一种常见的恶性女性肿瘤,仅次于乳腺癌,近些年来由于宫颈癌细胞筛查技术的推广使得宫颈癌的发病率及死亡率均有所下降,但是随着高危型人乳头状病毒(HPV)持续感染的增加,导致了目前宫颈癌的发病年龄呈现了年轻化^[1,2]。同时宫颈癌的发病机制到目前为止还未详细阐述,因此从分子水平上进一步的探讨宫颈癌的发病机制对于宫颈癌的诊断,基因治疗及预后将具有重大意义。Stein 等学者在 2009 年结肠癌研究中发现了结肠癌转移相关基因 1 (metastasis-associated in colon cancer 1, MACC1),且后续研究表明 MACC1 在众多的肿瘤组织中高表达,并与肿瘤的侵袭转移密切相关^[3-6]。也有众多学者研究发现 MACC1 在正常宫颈组织,中-重度宫颈上皮内瘤变组织,宫颈癌组织中逐渐高表达,且发现 MACC1 在宫颈癌细胞的侵袭转移中发挥重要作用^[7,8]。但 MACC1 在宫颈癌细胞的增殖及侵袭中的作用还未见报道,因此本研究将较为详细的阐述此作用机制。

1 材料和方法

1.1 细胞株

宫颈癌细胞 HeLa 购自中国科学院细胞库,目录号 TCHu187。

1.2 主要试剂和仪器

兔抗人 MACC1、cyclin D1、cyclin E、MMP2、MMP9、ERK1/2、p-ERK1/2 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司;兔抗人 GAPDH 单克隆抗体、BCA 蛋白测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;胎牛血清、DMEM 培养基购自 Hyclone 公司;transwell 小室购自美国 Corning 公司;siRNA MACC1 及 siRNA NC 购自上海吉玛生物制药公司;一步法 RT-PCR 扩增试剂盒、trizol RNA 提取试剂盒购自大连宝生生物技术有限公司。DYCZ-25D 型双垂直电泳仪、DYCZ-25D 型转印电泳仪购自北京六一仪器厂;GelDoc 2000 凝胶成像系统购自美国伯乐公司;Biosciences FACS Aria 流式细胞仪购自美国 BD 公司;MK3 酶标仪购自美国 Thermo 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 siRNA 的转染

当 HeLa 细胞生长达到 50% 左右的时候,利用脂质体将 siRNA MACC1 及 siRNA NC 转染到 HeLa 细胞中,6 h 后换液,继续培养 48 h,利用 RT-PCR 法及 western blot 法检测转染效果。

1.3.2 MTT 法检测细胞活力

将 HeLa 细胞接种到 96 孔板,培养 24 h 后,按“1.3.1”进行转染,继续培养 48 h 后,加入 MTT 20 μ L,培养 4 h,将 96 孔板翻过来弃去上清液,再往 96 孔板中每个孔加入 150 μ L 的二甲基亚砷,96 孔板在微量振荡器中震荡约 10 min,最后在酶标仪中检测 OD 值,波长选择为 560 nm,OD 值即是细胞活力。

1.3.3 流式细胞术检测细胞周期

将 HeLa 细胞接种到 6 孔板,培养 24 h 后,按“1.3.1”进行转染,继续培养 48 h 后,每组分别收集 1×10^5 /mL 个细胞,加入 Rnase (终浓度为 10 mg/mL) 5 μ L,小心吹打吹打混匀后,室温下孵育 1 h,再加入 PI 染液,继续吹打混匀,并在室温下避光孵育 30 min,于 1 h 内在流式细胞仪进行细胞周期检测分析。

1.3.4 Transwell 法检测细胞侵袭能力

将 matrigel 胶平铺于 Transwell 小室微膜上以被使用。利用 0.25% 胰蛋白酶将按“1.3.1”进行转染并培养了 48 h 的 HeLa 细胞消化下来,离心收集细胞后,将细胞接种到 Transwell 的上室,下室不接种细胞,仅加入 DMEM 培养基,48 h 后,将 Transwell 小室取出来,用 4% 的多聚甲醛固定 5 min, PBS 洗涤后,结晶紫再染色 5 min,在倒置显微镜下观察,并取 5 个视野中的细胞数目进行计数,取平均值,即为细胞的侵袭数目。

1.3.5 RT-PCR 检测 MACC1 mRNA 的表达

采用 trizol RNA 提取试剂盒提取细胞总的 RNA,并用检测总 RNA 的纯度,当检测结果 OD260/OD280 在 1.8 ~ 2.1 之间,说明 RNA 纯度的良好,可以接着采用一步法 RT-PCR 试剂盒逆转录 RNA,而逆转录产物 cDNA 进行扩增,最后将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳。引物如下。MACC1 上游引物: 5'-AACCCCAAACCTAAAAAGACTC-3', 下游引物: 5'-ACCCAGGACATCAGCTAAAAC-3', GAPDH 上游引物: 5'-AGCCACATCGCTCAGACA-3', 下游引物: 5'-TGGACTCCACGACGTACT-3'。

1.3.6 Western blot 检测 cyclin D1、cyclin E、MMP2、MMP9 及 p-ERK 的表达

在冰浴条件下把细胞刮下来,离心加入细胞裂解液进行裂解,大约 30 min,并在 4℃ 条件下离心,收集到的上清液即是总蛋白。接着采用 BCA 试剂盒对蛋白浓度进行测定。蛋白定容后,在微波炉上

煮沸变性。制作浓缩胶和分离胶,并蒸馏水封闭。然后蛋白样品上样,进行十二烷基苯磺酸钠凝胶电泳,湿法转膜。5%脱脂奶粉封闭 1 h,一抗溶液(兔抗人 cyclin D1、cyclin E、MMP2、MMP9、ERK1/2、p-ERK1/2 及 GAPDH 多克隆抗体,稀释度为 1:100)孵育,4℃过夜;第二天在二抗溶液中室温条件下孵育 1~2 h。最后在凝胶成像系统中曝光。

1.4 统计学方法

所有数据均采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验分析组间差异性,以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 siRNA MACC1 对 Hela 细胞中 MACC1 表达的影响

如图 1 所示,与 siRNA NC 组中 MACC1 蛋白(1.07 ± 0.10)及 mRNA(0.69 ± 0.07)表达比较,siRNA MACC1 组 MACC1 蛋白(0.29 ± 0.03)及 mRNA(0.12 ± 0.01)表达下调,差异有显著性($P < 0.01$)。

2.2 siRNA MACC1 对 Hela 细胞活力的影响

Hela 细胞转染 siRNA NC 及 siRNA MACC1,48 h 后经 MTT 实验发现,二者细胞活力分别为(0.73 ± 0.07)、(0.38 ± 0.03),差异有显著性($P < 0.01$)。

2.3 siRNA MACC1 对 Hela 细胞周期的影响

如表 1 所示,Hela 细胞转染 siRNA NC 及 siRNA MACC1,48 h 后经流式细胞周期实验发现,siRNA

MACC1 能使细胞周期阻滞在 G1 期。

2.4 siRNA MACC1 对 Hela 细胞侵袭能力的影响

如图 2 所示,Hela 细胞转染 siRNA NC 及 siRNA MACC1,48 h 后经 transwell 侵袭实验发现,二者细胞侵袭数目分别为(159.65 ± 15.94)、(38.59 ± 3.86),差异有显著性($P < 0.01$)。

2.5 siRNA MACC1 对 Hela 细胞中 cyclin D1 及 cyclin E 表达的影响

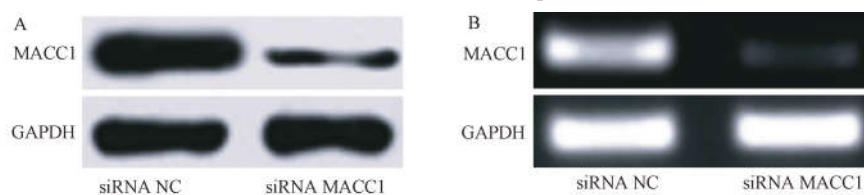
如图 3 所示,Hela 细胞转染 siRNA NC 及 siRNA MACC1,48 h 后经 western blot 实验发现,与 siRNA NC 组中 cyclin D1(0.54 ± 0.05)及 cyclin E(0.60 ± 0.06)表达比较,siRNA MACC1 组 cyclin D1(0.15 ± 0.01)及 cyclin E(0.20 ± 0.02)表达下调,差异有显著性($P < 0.01$)。

2.6 siRNA MACC1 对 Hela 细胞中 MMP2 及 MMP9 表达的影响

如图 4 所示,Hela 细胞转染 siRNA NC 及 siRNA MACC1,48 h 后经 western blot 实验发现,与 siRNA NC 组中 MMP2(1.19 ± 0.12)及 MMP9(1.03 ± 0.10)表达比较,siRNA MACC1 组 MMP2(0.30 ± 0.03)及 MMP9(0.24 ± 0.02)表达下调,差异有显著性($P < 0.01$)。

2.7 siRNA MACC1 对 Hela 细胞中 ERK 磷酸化水平的影响

如图 5 所示,Hela 细胞转染 siRNA NC 及 siRNA MACC1,48 h 后经 western blot 实验发现,与 siRNA NC 组(1.38 ± 0.12)比较,siRNA MACC1 组(0.46 ± 0.04)p-ERK1/2 表达下调($P < 0.01$)。



A:蛋白表达;B:mRNA 表达。

图 1 siRNA MACC1 对 Hela 细胞中 MACC1 表达的影响($n=6$)

Note. A: Protein expression; B: mRNA expression.

Fig. 1 Effect of siRNA MACC1 on the expression of MACC1 in Hela cells

表 1 siRNA MACC1 对 Hela 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab. 1 Effect of siRNA MACC1 on Hela cell cycle

组别 Groups	G1 期 G1 phase	S 期 S phase	G2 期 G2 phase
siRNA NC	48.37 ± 4.90	16.43 ± 1.64	35.20 ± 3.52
siRNA MACC1	$62.54 \pm 6.29^{**}$	$11.48 \pm 1.20^{**}$	$25.98 \pm 2.60^{**}$

注:与 siRNA NC 比较, $^{**}P < 0.01$ 。

Note. Compared with the siRNA NC group, $^{**}P < 0.01$.

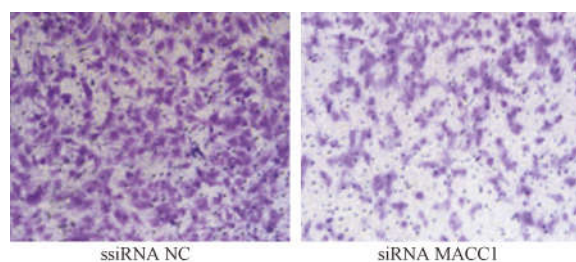


图 2 siRNA MACC1 对 HeLa 细胞侵袭能力的影响($\times 200$)

Fig. 2 Effect of siRNA MACC1 on the invasion ability of HeLa cells

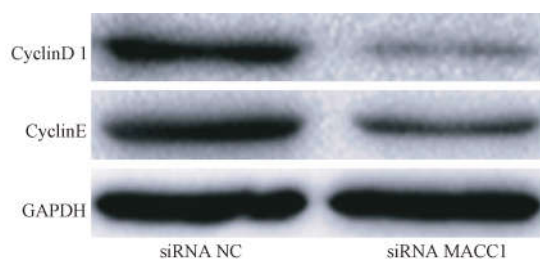


图 3 siRNA MACC1 对 HeLa 细胞中 CyclinD1 及 CyclinE 表达的影响

Fig. 3 Effect of siRNA MACC1 on the expression of cyclin D1 and cyclin E in HeLa cells

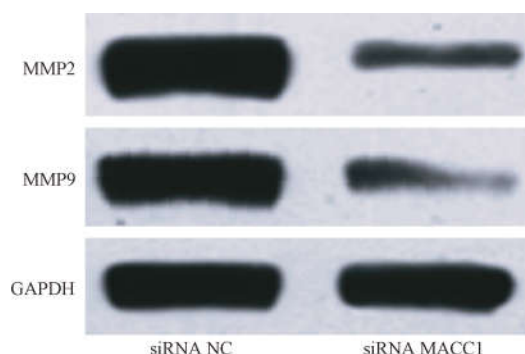


图 4 siRNA MACC1 对 HeLa 细胞中 MMP2 及 MMP9 表达的影响

Fig. 4 Effect of siRNA MACC1 on the expression of MMP2 and MMP9 in HeLa cells

3 讨论

2009 年 Stein 等学者通过基因比对技术在结肠癌的研究中发现了一种与结肠癌转移密切相关的基因,并命名为 MACC1。MACC1 位于人第 7 号染色体上,所编码的蛋白质由 852 个氨基酸组成。此蛋白质结构域包括 ZU5, SH3 及死亡结构域等,能够介导蛋白质之间相互作用,信号传导,也能够参与细胞凋亡,迁移,炎症反应及免疫调节^[5, 6]。MACC1

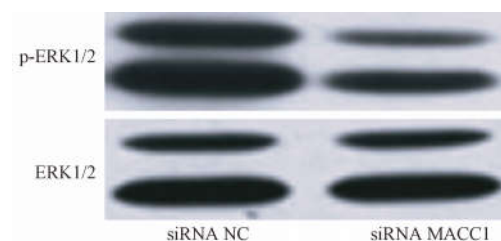


图 5 siRNA MACC1 对 HeLa 细胞中 p-ERK1/2 表达的影响

Fig. 5 Effect of siRNA MACC1 on the expression of p-ERK1/2 in HeLa cells

是 HGF/c-Met 信号通路中关键调节因子,能够结合于 c-Met 启动子,激活此信号通路,进而调控下游靶基因的转录表达,也能够促使 c-Met 自身发生磷酸化,进而介导多种生物学反应^[5]。众多研究已经表明 MACC1 在宫颈癌、乳腺癌、卵巢癌等多种妇科肿瘤中高表达,并与肿瘤细胞的侵袭转移密切相关^[5, 7, 8]。另外研究还表明 siRNA MACC1 能够显著的抑制宫颈癌细胞的侵袭转移,与下调 MMP2 及 MMP9 表达有关^[9]。但是目前 MACC1 在宫颈癌细胞的增殖及侵袭中的作用报道较少,并且相应作用机制不清楚,因此本课题组将对此展开研究。本研究首先利用脂质体将 siRNA MACC1 及 siRNA NC 转染到宫颈癌细胞 HeLa 中,并利用 western blot 及 RT-PCR 证实转染成功。接着采用 MTT 法检测 siRNA MACC1 对 HeLa 细胞活力的影响,结果表明 siRNA MACC1 能显著的降低 HeLa 细胞活力,与 Zhou 等^[9]研究一致。

肿瘤细胞增殖旺盛源于细胞周期的紊乱,细胞周期相关蛋白异常表达,使细胞周期调控系统失去控制,导致细胞中蛋白质合成远大于分解,细胞有丝分裂加快,细胞不断增值。其中 G1 期, G2 期是细胞周期主要调控点,是众多抗肿瘤药物作用靶点^[10, 11]。cyclin D1 是与 G1 期密切相关的细胞周期蛋白,在 G1 期合成并达到顶峰,能与 CDK4/6 结合形成复合物,促使下游核转录因子进入细胞核与细胞增殖相关基因结合,并促使其转录,最终使得 G1 期向 S 期迅速转换。cyclin E 亦是与 G1 期相关的细胞周期蛋白,能在 cyclin D1 降解后,与 CDK2 结合,促进 DNA 继续复制。另外肿瘤细胞的侵袭转移是导致外科手术失败的重要因素之一。其中细胞外基质的降解能够促使肿瘤细胞的快速迁移,介导这一个过程的是蛋白水解酶,其中最为主要的是 MMPs。MMP2 在降解细胞外基质成分的同时还能

够诱导新生血管的发生,进而促进肿瘤细胞的迁移、扩散及转移。MMP9 是分子量最大的 MMPs,几乎能够降解所有的细胞外基质成分,包括 IV 胶原。而且有研究表明 siRNA MACC1 能够通过下调 cyclin D1, cyclin E 表达,并使细胞周期阻滞在 G1 期,进而遏制胶质瘤细胞 U251 的增殖^[12]。另外也有研究表明 siRNA MACC1 能够抑制大肠癌细胞的迁移侵袭与下调 MMP2, MMP9 的表达有关^[13]。因此探讨 siRNA MACC1 对 HeLa 细胞周期、细胞侵袭、细胞周期相关蛋白及 MMPs 表达的影响将具有重要意义。所以本研究进一步检测了 siRNA MACC1 对 HeLa 细胞周期,细胞侵袭能力,细胞周期蛋白及 MMPs 表达的影响,结果表明 siRNA MACC1 能使细胞周期阻滞在 G1 期,降低细胞侵袭能力,下调 cyclin D1, cyclin E, MMP2 及 MMP9 表达,最终抑制 HeLa 细胞的增殖与侵袭。

细胞的凋亡,增殖,分化,细胞周期,细胞迁移及侵袭等等生物学过程受多种信号通路的调控,MAPK 信号通路就是其中的一种^[14]。MAPK 家族包括 ERK, JNK 及 p38 MAPK 三个主要亚族。其中 ERK 是此信号通路的关节调控点,包括 5 个亚族(ERK1-5),其中 ERK1 和 ERK2 研究得最为彻底,能通过自身磷酸化并将信号传递给下游基因进而调控细胞的生命过程。且有研究表明 MACC1 能够通过 MAPK 信号通路级联反应参与乳腺癌的发生发展^[15]。提示 MACC1 可能也可以通过此信号通路影响宫颈癌的发生发展。所以本研究接着利用 western blot 检测 siRNA MACC1 对 HeLa 细胞中 ERK1/2 磷酸化水平的影响,结果表明 siRNA MACC1 能显著的下调 p-ERK1/2 表达,进而遏制 HeLa 细胞的增殖与侵袭。

综上所述,siRNA MACC1 能显著降低 HeLa 细胞活力,使细胞周期阻滞在 G 期,并降低细胞侵袭能力,是通过下调 cyclin D1、cyclin E、MMP2 及 MMP9 表达实现的,可能与抑制 ERK 信号通路激活有关。

参考文献:

- [1] Abboud S, De Penning E, Brawner BM, et al. Cervical cancer screening among arab women in the United States: an integrative review[J]. *Oncol Nurs Forum*, 2017, 44(1): E20 - E33.
- [2] Perkins AC, Skinner EN. A review of the current cervical cancer screening guidelines[J]. *N C Med J*, 2016, 77(6): 420 - 422.
- [3] Zhen T, Dai S, Li H, et al. MACC1 promotes carcinogenesis of colorectal cancer via beta-catenin signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(11): 3756 - 3769.
- [4] Sheng XJ, Li Z, Sun M, et al. MACC1 induces metastasis in ovarian carcinoma by upregulating hepatocyte growth factor receptor c-MET[J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(2): 891 - 897.
- [5] 柴红霞, 杨永秀. MACC1 与妇科肿瘤的研究进展[J]. *中国肿瘤*, 2015, 24(12): 1022 - 1025.
- [6] Wu Z, Zhou R, Su Y, et al. Prognostic value of MACC1 in digestive system neoplasms: a systematic review and meta-analysis[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 252043.
- [7] Guo L, Lu W, Zhang X, et al. Metastasis-associated colon cancer-1 is a novel prognostic marker for cervical cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(7): 4150 - 4155.
- [8] 石琳, 李丽. 宫颈癌组织中 MACC1、c-Met 蛋白表达相关性及其与盆腔淋巴结转移的关系[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(20): 5819 - 5820.
- [9] Zhou X, Xu C J, Wang J X, et al. Metastasis-associated in colon cancer-1 associates with poor prognosis and promotes cell invasion and angiogenesis in human cervical cancer[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2015, 25(8): 1353 - 1363.
- [10] 张百红, 岳红云. 肿瘤检查点相关研究进展[J]. *癌症进展*, 2015, 13(3): 260 - 264.
- [11] Otto T, Scinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(2): 93 - 115.
- [12] Sun L, Li G, Dai B, et al. Silence of MACC1 expression by RNA interference inhibits proliferation, invasion and metastasis, and promotes apoptosis in U251 human malignant glioma cells[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(3): 3423 - 3431.
- [13] Gao J, Ding F, Liu Q, et al. Knockdown of MACC1 expression suppressed hepatocellular carcinoma cell migration and invasion and inhibited expression of MMP2 and MMP9[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 376(1-2): 21 - 32.
- [14] 周璇, 阳学风. 神经酰胺诱导肿瘤细胞凋亡的机制研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2015(1): 174 - 177.
- [15] Kim GE, Lee JS, Park MH, et al. Metastasis associated in colon cancer 1 predicts poor outcomes in patients with breast cancer[J]. *Anal Quant Cytopathol Histopathol*, 2015, 37(2): 96 - 104.

[收稿日期] 2017 - 04 - 14