

siRNA 干扰 Id1 表达增强卵巢癌细胞对顺铂的敏感性

于丽波, 孙文洲, 毕玉美, 戚伟华
(哈尔滨医科大学附属肿瘤医院, 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要: [目的] 探讨体外 DNA 结合抑制因子(inhibitor of DNA binding or differentiation, Id)的表达对卵巢上皮癌 SKOV3 对顺铂化疗敏感性的影响。[方法] 构建靶向 *Id1* 基因 siRNA 慢病毒载体并转染 SKOV3 细胞, 筛选出稳定转染的 SKOV3 细胞克隆。实验分为 4 组: 实验组(Cell+Lv-shRNA-Id1)、阴性对照组(Cell+Lv-shRNA-NC)、病毒对照组(Cell+Lv-control)与空白对照组(Cell group)。CCK8 检测各组 SKOV3 细胞不同时间增殖活性以及暴露于不同浓度顺铂(0.1、0.2、0.5、1、2、5、10 μ g/ml) 48h 后顺铂对各组 SKOV3 细胞的半数抑制浓度, 分析沉默 *Id1* 基因后卵巢癌细胞对顺铂化疗敏感性的影响。[结果] 三组对照组细胞增殖活性随着时间增加显著, 而实验组则增加缓慢。在 48h 和 72h 时, 实验组细胞增殖活性值分别为 0.449 \pm 0.072 μ g/ml、0.885 \pm 0.232 μ g/ml, 与三组对照组比较差异均有统计学意义(P 均 $<$ 0.05); 实验组顺铂对 SKOV3 细胞的半数抑制浓度为 1.5 \pm 0.71 μ g/ml, 明显低于对照组(P $<$ 0.01)。[结论] 抑制 *Id1* 基因表达可以增加顺铂对卵巢癌细胞的生长抑制作用, 为临床进一步提高卵巢癌的疗效提供了研究基础。

关键词: 结合抑制因子; 卵巢癌; 化疗耐药

中图分类号: R737.31 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2014)09-0775-04
doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2014.09.A015

siRNA Targeting Id1 Enhances Chemosensitivity of Ovarian Cancer Cells to Cisplatin

YU Li-bo, SUN Wen-zhou, BI Yu-mei, et al.

(Affiliated Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of inhibitor of DNA binding or differentiation 1(Id1) on the chemosensitivity of ovarian epithelial carcinoma SKOV3 cells to cisplatin in vitro. [Methods] The lentiviral vector of siRNA targeting Id1 gene was constructed and transfected into SKOV3 cells, stably transfected SKOV3 cell was selected and cloned. The experiment was divided into four groups: Cell+Lv-shRNA-ID1, Cell+Lv-shRNA-NC, Cell+Lv-control and Blank cell group. The proliferations of SKOV3 cells at different times were detected by CCK8. SKOV3 cells were exposed to different concentrations of cisplatin (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 μ g/ml) for 48 hours in each group and half inhibitory concentrations of cisplatin to SKOV3 cells were detected by CCK8. The effect of targeting Id1 gene on the chemosensitivity in ovarian cancer cells to cisplatin was analyzed. [Results] Cell proliferations in three control groups increased significantly over time, cell proliferations in the Cell+Lv-shRNA-ID1 group increased slowly. Cell proliferations were 0.449 \pm 0.072 μ g/ml at 48h and 0.885 \pm 0.232 μ g/ml at 72h in the Cell+Lv-shRNA-ID1 group, the differences were statistically significant compared with three control groups (P all $<$ 0.05). Half inhibitory concentration of cisplatin to SKOV3 cells in the Cell+Lv-shRNA-ID1 group was 1.5 \pm 0.71 μ g/ml which was significantly lower than that in three control groups (P $<$ 0.01) with no significant difference among the three control groups. [Conclusion] Silence of Id1 expression increases growth inhibition effect of cisplatin to ovarian cancer cells. It provides the research foundation for further improving the clinical efficacy for ovarian cancer.

Key words: inhibitor of DNA binding or differentiation; ovarian cancer; chemoresistance

卵巢癌为妇科恶性肿瘤之一, 死亡率居妇科恶性肿瘤之首。卵巢癌对化疗中度敏感, 对铂类药物联合化疗有 70%~80% 的有效率, 20%~30% 患者对化

疗无反应, 而且绝大多数晚期卵巢癌容易复发, 加之原发性耐药、继发性耐药、无确切疗效的二线化疗药物, 使卵巢癌的治疗更为棘手。顺铂是卵巢癌一线化疗药物基石, 目前对卵巢癌研究除了探索新治疗药物外, 如何增加卵巢癌对顺铂的敏感性, 降低化疗耐

收稿日期: 2013-12-18; 修回日期: 2014-02-16
基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12531275)
E-mail: sjystudent@126.com

药性为研究热点。DNA 结合抑制因子又名 Id(inhibitor of DNA binding or differentiation), Id1 蛋白是 Id 类蛋白一种。有研究证实在转录和翻译水平 Id1 过表达抑制化疗药物诱导的凋亡, 相反利用 siRNA 技术沉默肿瘤细胞 *Id1* 基因, Id1 下调可以增加肿瘤细胞对化疗药物诱导凋亡的敏感性, 提示在转录和翻译水平 Id1 的表达变化可能与肿瘤细胞对化疗药物诱导凋亡的敏感性有关。我们前期实验利用免疫组化证实卵巢癌细胞中存在 Id1 过表达^[1]。本课题通过 siRNA 干扰卵巢癌上皮细胞株 SKOV3 中 Id1 表达, 研究 siRNA 沉默 Id1 对 SKOV3 卵巢癌细胞株顺铂敏感性的影响。

1 材料与方 法

1.1 细胞株及主要试剂

人卵巢癌细胞系 SKOV3 细胞由哈尔滨医科大学附属肿瘤医院肿瘤研究所提供。*Id1* 基因 siRNA 慢病毒载体购自上海吉凯基因化学技术有限公司。RPMI 1640 培养基、FBS、Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。96 孔细胞培养板购自 Corning 公司。CCK-8 试剂购自日本同仁化学研究所。顺铂购自江苏豪森公司。酶标测定仪购自南京华东电子。

1.2 细胞培养

SKOV3 细胞株常规培养于 RPMI 1640 培养液中, 内含 10% 胎牛血清(FBS)、100U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素, 置于 37℃、5%CO₂ 及饱和湿度条件下培养, 每 3d 用胰酶消化传代 1 次, 取对数生长期细胞用于实验。实验分为 4 组: 实验组 Cell+Lv-shRNA-Id1, 转染 Id1siRNA 的卵巢癌细胞; 阴性对照组 (Cell+Lv-shRNA-NC); 转染非特异性序列的卵巢癌细胞; 病毒对照组 (Cell+Lv-control), 转染空慢病毒载体的卵巢癌细胞; 空白对照组 SKOV3 细胞, 未转染的卵巢癌细胞。

1.3 靶向 Id1-siRNA 慢病毒载体构建及细胞转染

根据 Genbank 中 *Id1* 基因序列和 siRNA 设计原则, 运用设计软件设计 siRNA, 由广州锐博科技有限公司核对、化学合成方法合成, 经基因库检索与 Id1 以外的基因序列无同源性。

靶片段退火成双链 DNA 后与酶切的质粒 pGene-sil-1 连接, 转化 DH5α 大肠杆菌, 随机选取 8 个

菌落进行 PCR 鉴定, 2.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 并对阳性克隆测序, 测序结果与 GeneBank 数据库进行 Blast 比对。

将 Lipofectamine 2000 脂质体复合物、无内毒素病毒包装质粒、膜蛋白表达质粒加入 293T 细胞中, 混匀、培养, 收集转染 48h 的 293T 细胞上清液。离心、PVDF 滤膜过滤, 收集病毒浓缩液, 并进行病毒生物学滴度测定。

取对数生长期的 SKOV3 细胞胰酶消化, 接种于 6 孔板内, 接种密度为 1×10⁵/孔, 细胞培养 24h 细胞汇合度达 60%~70% 时分别加入稀释好的慢病毒液和感染添加剂至终浓度为 6μg/ml, GFP 标记慢病毒, 相同条件下转染观察转染效率。转染效率=GFP 阳性细胞数/总细胞数×100%, 取转染效率在 80% 以上稳转细胞株进行后续实验。

1.4 CCK-8 法检测细胞增殖活性

取对数生长期的 SKOV3 及其转基因细胞株, 制备细胞悬液接种到 96 孔细胞培养板, 每孔添加 100μl 细胞悬液, 细胞数目为 2×10⁴ 个, 接种后正常条件(37℃和 5%CO₂)培养细胞, 6h 后换液; 按照不同时间点(0、24、48、72h)加入 CCK-8, 进行细胞活性检测。测定时每孔加入 10μl 的 CCK-8 溶液, 将培养板在培养箱内 (37℃和 5%CO₂ 浓度) 孵育 4h; 然后将 96 孔培养板中液体转移至另一个 96 孔板; 上机, 使用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度。

1.5 沉默 Id1 对卵巢癌细胞顺铂敏感性影响

同 1.4 培养细胞, 12h 后四组分别加入 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10μg/ml 的顺铂, 培养 48h 后, 同 1.4 CCK8 法测定在 450nm 处的吸光度。用统计软件的 Probit 回归法分别计算四组 7 个浓度下顺铂 IC₅₀, 取其平均值。

1.6 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件分析, 数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)示, 两样本均数间比较采用两独立样本 *t* 检验, 多个样本均数间比较采用方差分析。P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 *Id1* 基因沉默后 SKOV3 细胞增殖活性变化

实验组 (Cell+Lv-shRNA-Id1)、阴性对照组 (Cell+

Lv-shRNA-NC)、病毒对照组(Cell+Lv-control)和空白对照组(Cell)细胞增殖能力逐渐增加,但对照组增加趋势明显,而实验组趋势缓慢,对照组之间在 0h、24h、48h、72h 比较差异无统计学意义,基因干预组与对照组在 0h 和 24h 比较差异无统计学意义,但在 48h 和 72h 比较差异具有统计学意义,分别 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ (Table 1)。

2.2 干扰 Id1 基因后 SKOV3 细胞对顺铂敏感性变化

四组顺铂 IC_{50} 分别为 $12.5 \pm 1.08 \mu\text{g/ml}$ 、 $13.5 \pm 0.94 \mu\text{g/ml}$ 、 $12.0 \pm 1.20 \mu\text{g/ml}$ 、 $1.5 \pm 0.71 \mu\text{g/ml}$ (Figure 1)。基因干预组顺铂 IC_{50} 明显低于各对照组,差异均具有统计学意义 ($P<0.01$),可见基因干预组 SKOV3 细胞对顺铂敏感性显著性提高。

3 讨论

RNAi 是由小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 引起的转录后基因沉默。2001 年 Tuschl 等证明合成的双链 siRNA 在哺乳动物细胞中可实现靶基因特异沉默作用,经过十几年的发展,siRNA 因其特异性、高效性以及作为基因治疗药物的巨大潜力而备受青睐^[2,3]。Id1 分子主要分布于胚胎及未分化成熟的组织中,在正常人体内除胸腺、生殖腺中有微量表达外,所有分化成熟的组织中低表达或不表达。Id1 蛋白在细胞分化、细胞增殖、肿瘤转移和血管生成方面有不同作用。现已证实 Id1 在鼻咽癌、宫颈癌、乳腺癌及前列腺癌等多种恶性肿瘤细胞中表达。Ao 等^[4]发现 Id1 是雄激素阳性肝癌细胞转移和侵袭的重要基因。Id1 因本身缺乏 DNA 结合所必需的碱性氨基酸,在与碱性螺旋-环-螺旋蛋白 (bHLH) 结合形成异二聚体后抑制 bHLH 与 DNA 及其他组织特异性转录因子的结合,对 bHLH 转录因子活性起负调节作用,从而抑制细胞分化,促进细胞增殖。本研究利用 siRNA 技术干扰卵巢癌细胞 SKOV3 中 Id1 表达,通过 CCK8 检测 Id1 基因沉默

Table 1 Comparison of cell proliferation among various group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Group	0h	24h	48h	72h
Cell	0.262±0.078	0.405±0.069	0.634±0.138	1.494±0.252
Cell+Lv-control	0.287±0.069	0.385±0.074	0.658±0.089	1.755±0.226
Cell+Lv-shRNA-NC	0.309±0.095	0.370±0.092	0.659±0.129	1.616±0.251
Cell+Lv-shRNA-Id1	0.257±0.068	0.336±0.078	0.449±0.072*	0.885±0.232**

*: $P<0.05$

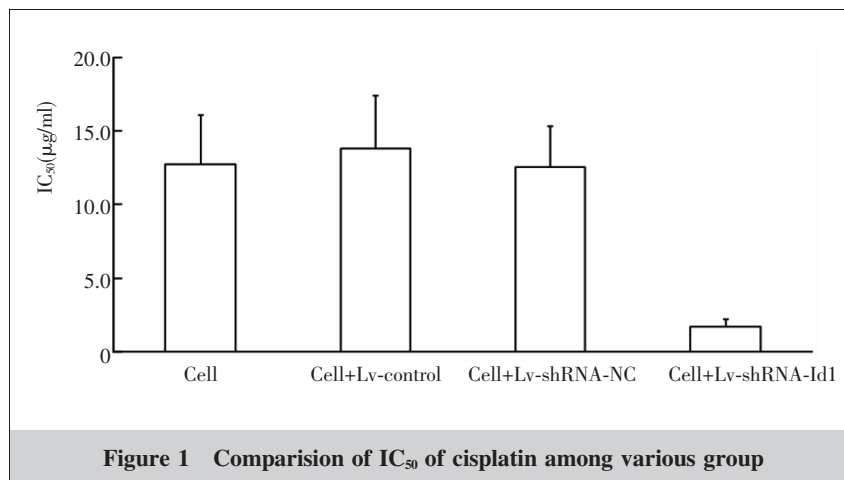


Figure 1 Comparison of IC_{50} of cisplatin among various group

后卵巢癌细胞增殖能力变化,发现实验组较对照组细胞增殖活性明显下降,提示 Id1 对卵巢癌细胞的增殖起一定的促进作用,再一次证明 Id1 在卵巢癌细胞发展中的作用,也为卵巢癌的治疗提供了一个作用靶点。

肿瘤细胞通常通过改变 DNA 修复过程来获得耐药性或者放射抵抗,而 Id1 在 DNA 修复过程中扮演重要角色。我们在沉默 Id1 基因表达后继续在各组加入不同浓度顺铂,结果发现实验组与对照组比较 IC_{50} 明显降低,提示沉默 Id1 基因卵巢癌细胞对顺铂的敏感性提高,表明抑制 Id1 表达能提高卵巢癌细胞对化疗的敏感性,进而可以改善卵巢癌化疗耐药,而且 Id1 调节肿瘤细胞耐药性在前列腺癌中也得到证实^[5]。

卵巢癌化疗耐药是多因素、多基因、多水平的过程,细胞凋亡异常、卵巢癌内部的缺氧微环境等均可引起细胞耐药。有研究发现 PI3K/Akt 信号途径和 NF- κ B 在顺铂耐药性卵巢癌细胞株中起到一定作用,是卵巢癌细胞对顺铂敏感性的关键因素^[6,7],Id1 可以通过 PI3K/Akt 和 NF- κ B/MMP-2 信号途径介导肿瘤细胞增殖和转移^[8,9]。通过沉默 Id1 来提高耐药细胞株对顺铂敏感性可能是通过抑制 PI3K/Akt 和 NF- κ B/MMP-2 信号通路来实现的,这也为耐药性卵

巢癌靶向治疗进一步研究提供了分子理论依据。

虽然目前大部分研究显示 Id1 具有促细胞增殖和致癌的性质, 研究证实下调 *Id1* 基因表达抑制胃癌细胞增殖^[10], 在涎腺癌、前列腺癌中也发现类似现象^[11-13], 但也有研究显示上调 Id1 表达与前列腺癌长期无复发生存有关^[14], Id1 高表达增加了胶质细胞瘤的放疗敏感性^[15], 这与目前对 Id1 的研究以及本实验结果相反, 分析可能同一基因对不同癌细胞的作用存在差异性, 不同癌细胞对同一基因的反应性也不尽一致。虽然 Id 蛋白在不同肿瘤组织中均呈高表达, 但需具体分析肿瘤细胞种类及其分化状态等, Id 蛋白在不同来源及发育状态的细胞中有不同的表达模式, 此为其细胞种类及阶段特异性。

综上所述, 本实验通过 RNA 干扰 Id1 表达抑制卵巢癌细胞增殖, 提高顺铂对卵巢癌细胞的生长抑制作用, 有望为提高顺铂卵巢癌化疗效果、降低化疗耐药性进一步研究提供突破点。

参考文献:

- [1] Li WL, Yu LB, Sun WZ, et al. The expression and clinical significance of Id-1 in ovarian cancer[J]. *Modern Oncology*, 2012, 20(8): 1703-1705. [李文乐, 于丽波, 孙文洲, 等. 分化抑制因子 Id-1 在卵巢癌中的表达及临床意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2012, 20(8): 1703-1705.]
- [2] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T, et al. RNA interference is mediated by 21- and 22- nucleotide RNAs [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(2): 188-200.
- [3] Bakhtiyari S, Haghani K, Basati G, et al. SiRNA therapeutics in the treatment of diseases [J]. *Ther Deliv*, 2013, 4(1): 45-57.
- [4] Ao J, Meng J, Zhu L, et al. Activation of androgen receptor induces ID1 and promotes hepatocellular carcinoma cell migration and invasion[J]. *Mol Oncol*, 2012, 6(5): 507-515.
- [5] Ling MT, Wang X, Zhang X, et al. The multiple roles of Id-1 in cancer progression[J]. *Differentiation*, 2006, 74(9-10): 481-487.
- [6] Su Y, Gao L, Teng L, et al. Id1 enhances human ovarian cancer endothelial progenitor cell angiogenesis via PI3K/Akt and NF- κ B/MMP-2 signaling pathways [J]. *J Transl Med*, 2013, 11: 132.
- [7] He K, Lei J, Lu ZK, et al. Expression and significance of NF- κ B in the cisplatin resistant cell line COC1/DDP [J]. *Chin J Lab Diagn*, 2008, 12(9): 1113-1114. [何凯, 雷娟, 卢战凯, 等. NF- κ B 在卵巢癌顺铂耐药株 COC1/DDP 中的表达及意义[J]. *中国实验诊断学*, 2008, 12(9): 1113-1114.]
- [8] Lee S, Choi EJ, Jin C, et al. Activation of PI3K/Akt pathway by PTEN reduction and PIK3CA mRNA amplification contributes to cisplatin resistance in an ovarian cancer cell line [J]. *Gynecol Oncol*, 2005, 97(1): 26-34.
- [9] Peng X, Wang Y, Kolli S, et al. Physical and functional interaction between the ID1 and p65 for activation of NF-B [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012, 303(3): C267-C277.
- [10] Yang G, Zhang Y, Xiong JJ, et al. Downregulation of Id1 by small interfering RNA in gastric cancer inhibits cell growth via the Akt pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5(4): 1075-1079.
- [11] Sumida T, Murase R, Onishi-Ishikawa A, et al. Targeting Id1 reduces proliferation and invasion in aggressive human salivary gland cancer cells [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 141.
- [12] Strong N, Millena AC, Walker L, et al. Inhibitor of differentiation 1 (Id1) and Id3 proteins play different roles in TGF β effects on cell proliferation and migration in prostate cancer cells [J]. *Prostate*, 2013, 73(6): 624-633.
- [13] Soroceanu L, Murase R, Limbad C, et al. Id-1 is a key transcriptional regulator of glioblastoma aggressiveness and a novel therapeutic target [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(5): 1559-1569.
- [14] Geng H, Rademacher BL, Pittsenbarger J, et al. ID1 enhances docetaxel cytotoxicity in prostate cancer cells through inhibition of p21 [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(8): 3239-3248.
- [15] Guo Q, Guo P, Mao Q, et al. ID1 affects the efficacy of radiotherapy in glioblastoma through inhibition of DNA repair pathways [J]. *Med Oncol*, 2013, 30(1): 325.