

慢病毒介导 Stathmin-1 基因沉默对 宫颈 Hela 细胞 p53 蛋白的影响

孔守芳¹,戴淑真²,吕 腾²,袁 汇¹,孙 选¹,钟金妍¹

(1.青岛大学医学院附属青岛市海慈医疗集团,山东 青岛 266033;

2.青岛大学附属医院黄岛院区,山东 青岛 266000)

摘要:[目的] 研究宫颈癌 Hela 细胞中 Stathmin-1 表达对 p53 蛋白的影响及对细胞增殖的作用。[方法] 构建 Stathmin-1 siRNA 慢病毒载体,包装重组慢病毒,感染宫颈癌 Hela 细胞株,沉默 Stathmin-1 表达为干扰组,采用导入阴性片段的慢病毒感染 Hela 细胞作为对照组。MTT 法检测细胞增殖,蛋白印迹法(Western-blot)检测细胞 p53 蛋白的表达。[结果] 感染重组慢病毒及阴性病毒后,Stathmin-1 基因干扰组 Hela 细胞增殖 24h 后较对照组抑制明显 ($P<0.05$)。与对照组相比,干扰组中 p53 蛋白表达明显减少($P<0.05$)。[结论] 宫颈癌 Hela 细胞中 Stathmin-1 影响 p53 蛋白表达,沉默 Stathmin-1 可抑制细胞增殖。

关键词:Stathmin-1;p53 蛋白;Hela 细胞;慢病毒;细胞增殖

中图分类号:R737.33 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-0242(2015)03-0246-04

doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2015.03.A016

Lentivirus-mediated Stathmin-1 Silencing on p53 Protein in Cervical Hela Cells

KONG Shou-fang¹,DAI Shu-zhen²,LV Teng²,et al.

(1. Qingdao Hiser Medical Group,Medical College of Qingdao University,Qingdao 266033,China;

2. Affiliated Hospital of Qingdao University,Qingdao 266003,China)

Abstract: [Purpose] To study the influences Stathmin-1 on p53 protein expression in Hela cells and the role on cells proliferation. [Methods] Short hairpin RNA(shRNA) targeting Stathmin-1 was designed and lentivirus carried the shRNA infected Hela cells as interference group. Control group cells were infected with lentivirus carried negative fragment. After recombinant lentivirus infected Hela cells,MTT assay was used to detect the status of proliferation. Western blot was used to analyze p53 protein expression. [Results] With STMN-1 silencing,MTT assay results suggested Hela cells proliferation was suppressed obviously in interference group compared with control group ($P<0.05$).The p53 protein expression in interference group was decreased ($P<0.05$). [Conclusion] Stathmin-1 expression can influence p53 protein expression in cervical Hela cells. Silencing Stathmin-1 can restrain cervical cancer cells proliferation.

Key words:Stathmin-1;p53 protein;Hela cell;Lentivirus;proliferation

宫颈癌是女性生殖道最常见的恶性肿瘤。1980~2010 年统计数据表明,尽管全世界宫颈癌发病率以每年 1.65%速率下降,死亡率以 1.6%速率下降,但是受人口基数和人口老龄化的影响,全世界宫颈癌发病人数仍年均 0.6%增长,死亡人数增长,而

且新发宫颈癌患者主要来自发展中国家^[1]。Stathmin 是一种微管不稳定蛋白,在正常宫颈组织中几乎不表达,在宫颈上皮内瘤变(CIN)及宫颈癌中呈高表达^[2]。本研究设计构建 Stathmin-1(STMN-1)siRNA 慢病毒载体,沉默宫颈癌 Hela 细胞中 STMN-1 表达,研究其对 Hela 细胞中 p53 蛋白表达及其对细胞增殖的影响,探讨 STMN-1、p53 在宫颈癌发生及进展中的作用。

收稿日期:2014-09-19;修回日期:2014-10-10

基金项目:青岛市科技发展计划(13-1-3-118-jcl)

通讯作者:戴淑真,E-mail:qddaishuzhen@163.com

1 材料与方法

1.1 实验材料

人宫颈癌 HeLa 细胞株受赠于青岛大学医学院病原学实验室。DMEM 完全培养基购自美国 Gibco 公司,HyClone 小牛血清购自北京方程生物有限公司。STMN-1 引物及小发夹 shRNA 片段均由上海吉凯基因化学技术有限公司合成,慢病毒 GV115 载体、Age I、EcoR I 酶,购自上海吉凯基因化学技术有限公司。Lipofectamine 2000、Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司,胰酶、噻唑蓝 (MTT)、二甲基亚砜 (DMSO) 购自上海生物试剂厂,p53 小鼠抗人单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 HeLa 细胞中 STMN-1 表达丰度测定

收集生长状态良好的 HeLa 细胞,提取 RNA,反转录成 cDNA,合成 STMN-1 上游引物 TGAGAAACGAGAGCAGGAG,下游引物 TCAGCAGGGTCTTTG-GATTC,采用 GAPDH 作为内参,采用 Real-time PCR 法检测目的基因的表达。

1.2.2 构建 STMN-1 基因沉默的慢病毒载体

根据慢病毒载体 GV115 (hU6-MCS-CMV-EGFP)的要求,在 STMN-1 编码区选择 4 段序列作为干扰序列,干扰靶序列如下:STMN-1-RNAi1 gaGAAACGAGAGCAGGAGAAA; STMN-1-RNAi2 gaAGAGAACTGACCCACAAA; STMN-1-RNAi3 aaGCTGACTAATTTGTTCTGA; STMN-1-RNAi4 aaGAGAACCGAGAGGCACAAA。

RNA 干扰阴性序列 Scramble 序列作为对照。将设计合成的 shRNA 序列及 GV115 载体进行酶切、连接,产物进行转化实验,并将阳性克隆进行测序。

1.2.3 重组慢病毒包装及筛选

按照 Lipofectamine 2000 操作说明,将重组质粒及 Lipofectamine 2000 共转染 293T 细胞,48h 后收集细胞培养液,超速离心浓缩病毒颗粒并测定病毒滴度。将病毒感染 HeLa 细胞,72h 观察绿色荧光蛋白表达,收集细胞提取 RNA,进行 Real-time PCR 实验,将敲除 STMN-1 表达效率达到 70% 设为有效感染序列。

1.2.4 MTT 检测宫颈癌 HeLa 细胞 STMN-1 沉默后细胞增殖情况

将 HeLa 细胞进行细胞计数,稀释浓度为 3×10^4

个/L,接种 96 孔板,每孔加入 100 μ l,干扰序列重组慢病毒及阴性慢病毒分别感染 HeLa 细胞,分别于 0、24、48、72、96h 弃去培养液,加入 MTT 孵育 4h 后弃去 MTT 加入 DMSO,震荡 15min 后与酶标仪下检测 490nm 波长下吸光度。只加入完全培养基无细胞接种的孔为空白孔。

1.2.5 Western-blot 蛋白印迹法检测 STMN-1 沉默后 p53 蛋白表达

STMN-1 基因敲除重组慢病毒及阴性病毒感染 HeLa 细胞,显微镜下 80%~90% 细胞表达绿色荧光蛋白,收集细胞,细胞裂解提取蛋白,比色法测蛋白含量。采用十二烷基硫酸钠-变性聚丙烯酰胺凝胶不连续缓冲系统,分离蛋白并电转移至 NC 膜上。5% 脱脂奶粉封闭,洗膜后放入 p53 小鼠抗人单克隆抗体中(按 1:300 稀释) 4 $^{\circ}$ C 过夜;再放入鼠抗人二抗(按 1:4000 稀释 3ml) 常温孵育 2h。采用 β -actin 作为对照,显色,洗片,Quantity One 软件测灰度值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 进行数据分析,均数采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,MTT 结果实验组与对照组间采用独立样本 t 检验,不同时间段分析采用析因设计方差分析,Western-blot 结果采用独立样本 t 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 HeLa 细胞中 STMN-1 表达丰度

Real-time PCR 检测 HeLa 细胞中 STMN-1 表达丰度高,Delta Ct>4,可行基因沉默实验。

2.2 重组慢病毒 PCR 鉴定结果

连接入 shRNA 片段的阳性克隆 PCR 片段大小为 341bp,没有连接入 shRNA 片段的空载体克隆 PCR 片段大小为 307bp。以 STMN-1-RNAi2 干扰,PCR 电泳图如 Figure 1,测序结果理想。

2.3 包装慢病毒

病毒浓缩后测重组干扰序列慢病毒滴度为 4×10^8 /ml,阴性病毒为 5×10^9 /ml。

2.4 筛选有效干扰靶点

取病毒上清,分别按照 MOI=10,MOI=5 感染 HeLa 细胞,加等量 Polybrene,72h 观察,均有 >80% 细胞绿色荧光蛋白表达明显(Figure 2),故按照 MOI=5 进行细胞感染。提取细胞 RNA,反转录后进行 Real-

time PCR 检测, 结果确定针对 STMN-1-RNAi2 的重组慢病毒 shRNA 为有效干扰序列。

2.5 Hela 细胞感染重组慢病毒及阴性病毒细胞增殖 MTT 结果

感染 0~24h, 两组细胞增殖无统计学差异 ($P>0.05$); 感染 24h 后干扰序列慢病毒感染细胞增殖较阴性病毒对照组抑制明显 (Table 1) ($P<0.05$)。感染 72h 后 Hela 细胞 80%~90% 表达绿色荧光蛋白。

2.6 Western-blot 蛋白印迹法结果

STMN-1 干扰组 p53 蛋白表达较对照组减少, 且差异有统计学意义 ($t=-9.421$, $P<0.001$) (Figure 3)。

3 讨论

宫颈癌是明确病因的恶性肿瘤, 许多肿瘤相关因子参与作用。STMN-1 是重要的微管不稳定蛋白, 通过结合微管蛋白二聚体, 参与纺锤体、极体的形成分离和细胞分裂运动。STMN-1 作为信号传导因子通过调节微管动力学在丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路中发挥重要作用, 作用于细胞周期及细胞生长过程^[3]。目前研究已发现 STMN-1 在多种恶性肿瘤细胞中呈高表达, 如乳腺癌、膀胱癌等^[4,5], 相关研究发现该基因高表达参与肿瘤的浸润运动^[6]。STMN-1 在宫颈疾病中的研究, 叶丽华等^[7]报道 Stathmin 与宫颈

癌的临床分期、组织分级和区域淋巴结转移有关^[7]。STMN-1 在宫颈疾病与相关蛋白相互作用机制研究少见报道。

p53 基因是目前发现与人类肿瘤发病相关性最密切的抑癌基因之一, 野生型 p53 蛋白可及时识别细胞 DNA 损伤, 诱导细胞凋亡, 调节细胞周期, 防止肿瘤细胞发生。突变 p53 蛋白在口腔鳞癌^[8]及宫颈

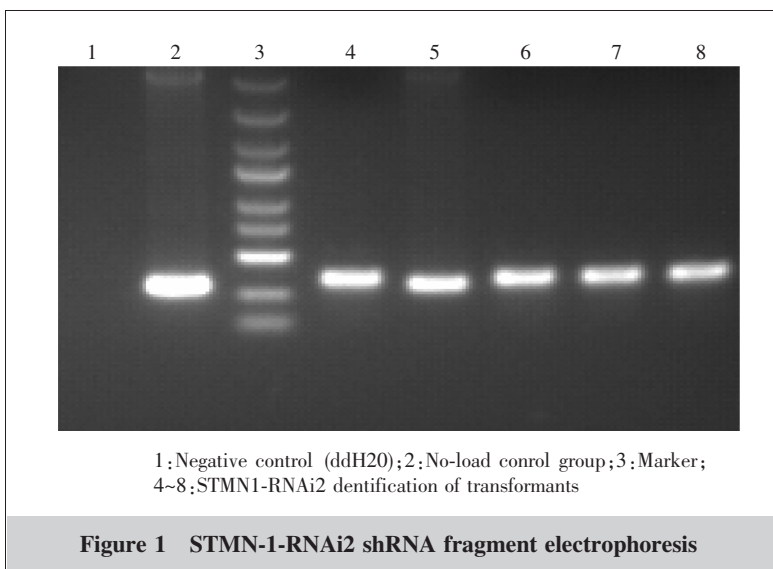
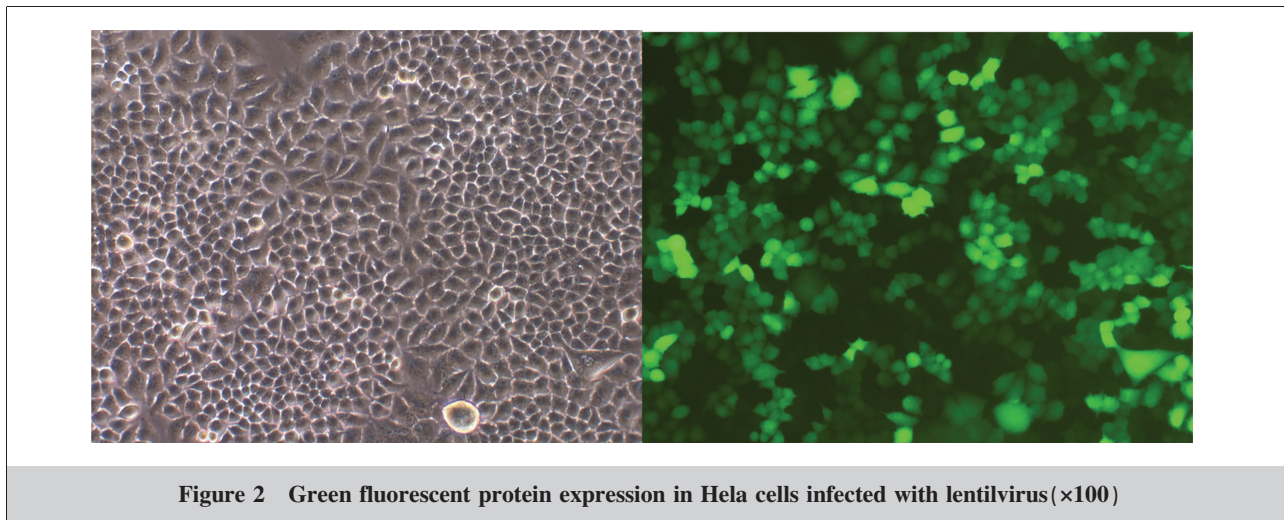
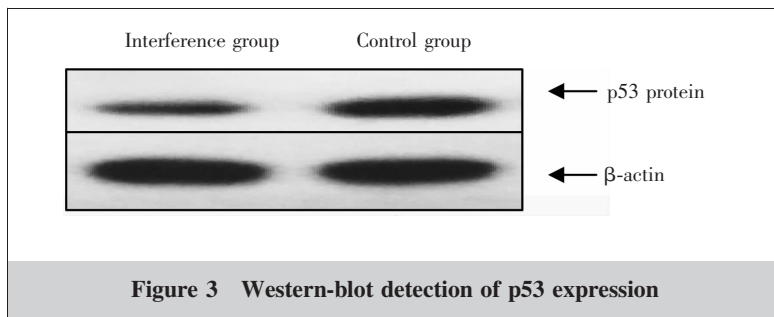


Table 1 MTT assay absorbance in different time

Time	Control group	Interference group	<i>F</i>	<i>t</i>	<i>P</i>
0h	0.210±0.011	0.209±0.006	0.892	0.232	0.828
24h	0.400±0.029	0.371±0.016	1.644	1.513	0.205
48h	0.552±0.025	0.412±0.012	1.316	8.924	0.001
72h	0.787±0.023	0.660±0.018	0.372	7.582	0.002
96h	1.034±0.044	0.763±0.062	0.328	6.149	0.004





癌^[9]等组织中表达升高,且其与肿瘤浸润、转移相关。Hela 细胞为 HPV18 阳性癌细胞,HPVE6 蛋白能通过泛素作用途径与野生型 p53 蛋白结合,促使 p53 快速降解^[10]。本研究通过沉默 STMN-1 在宫颈癌 Hela 细胞中表达,发现 p53 蛋白表达明显减少,而 Hela 细胞增殖受抑制明显。但是野生型 p53 可以抑制 Hela 细胞生长^[11]。在正常情况下野生型 p53 蛋白半衰期短,约为 5~20min,一般方法难以检测,而突变型 p53 蛋白稳定性增加,并可在细胞内聚集^[12]。STMN-1 沉默可致 Hela 细胞中突变 p53 蛋白减少,换言之,高表达 STMN-1 可以增加突变 p53 蛋白的表达,从而加速细胞增殖及肿瘤发生。研究结果还显示,沉默 STMN-1 并不能完全抑制 p53 蛋白表达,提示影响 Hela 细胞中 p53 蛋白表达因素复杂,尚待进一步探索。本研究发现沉默 STMN-1 表达,Hela 细胞增殖明显抑制,提示 STMN-1 沉默可以抑制宫颈癌细胞增殖,有望成为宫颈癌治疗中重要的靶标。

本研究只在 Hela 细胞中进行了 STMN-1 的敲除研究,但宫颈癌细胞株种类丰富,在其他类型细胞系内的作用还需要进一步探索。

参考文献:

- [1] Forouzanfar MH,Foreman KJ,Delossantos AM,et al. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010:a systematic analysis [J]. Lancet,2011,378(9801): 1461-1486.
- [2] Howitt BE,Nucci MR,Drapkin R,et al.Stathmin-1 expression as a complement to p16 helps identify high-grade cervical intraepithelial neoplasia with increased specificity [J]. Am J Surg Pathol,2013,37 (1):89-97.
- [3] Lin X,Tang M,Tao Y,et al. Epstein-Barr virus-encoded LMP1 triggers regulation of the ERK-mediated Op18/

stathmin signaling pathway in association with cell cycle[J]. Cancer Sci,2012,103(6): 993-999.

- [4] Miceli C,Tejada A,Castaneda A,et al. Cell cycle inhibition therapy that targets stathmin in vitro and in vivo models of breast cancer [J]. Cancer Gene Ther,2013,20(5):298-307.
- [5] Hemdan T,Lindén MB,Lind S,et al. The prognostic value and therapeutic target role of stathmin-1 in urinary bladder cancer [J]. Br J Cancer, 2014 ,111(6):1180-1187.
- [6] Nemunaitis J. Stathmin 1:a protein with many tasks. new biomarker and potential target in cancer [J]. Expert Opin Ther Targets,2012,16(7):631-634.
- [7] Ye LH,Du YL,Jiang HY. Expression and significance of Stathmin in cervical carcinomas [J]. Prog Obstet Gyneco, 2009,18(12):902-904.[叶丽华,杜亚丽,姜海燕. Stathmin 在宫颈癌中的表达及意义[J]. 现代妇产科进展,2009,18 (12):902-904.]
- [8] Hoekstra JW,Kummer JA,van Es RJ. Late(>5years) regional lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma (SCC),proven by p53 mutation analysis [J]. J Craniomaxillofac Surg,2008,36(7):415-418.
- [9] Lei L,Ye B,Wang XC. Expressions of p16,p53 and ki67 in cervical carcinoma and their clinical significance [J]. PJCM,2014,11(4):123-125.[雷蕾,叶斌,王西川.p16、p53 和 Ki67 在宫颈癌中的表达及其临床意义 [J]. 实用医院临床杂志,2014,11 (4):123-125.]
- [10] Li GL,Xia Q,Chen SH,et al. Effects of Pinellia extract fraction on expressions of HPVE6 and p53 genes in cervical cancer cell lines [J]. CJTCMP,2012,27 (1):110-113. [李桂玲,夏晴,陈松华,等. 掌叶半夏提取物的有效部位对宫颈癌细胞株 HPVE6 和 p53 基因表达的影响[J]. 2012,27(1):110-113.]
- [11] Lin Y,Song QL,Zheng FY. Study on the inhibition of wild-type p53 gene on cervical cancer HeLa cells[J]. Prog Obstet Gyneco,2008,17(5):353-357.[林亚,宋巧丽,郑飞云. 野生型 p53 抑制宫颈癌 HeLa 细胞的研究 [J]. 现代妇产科进展,2008,17(5):354-357.]
- [12] Cai XL. Clinical study of p53 gene expression in cervical cancer and its relationship with the cytoplasmic thymidine kinase[J]. Chin J Crit Care Med(Electronic Edition),2013, 6(4):236-238.[蔡仙丽.p53 基因在宫颈癌组织中的表达及与细胞质胸苷激酶关系的临床研究[J]. 中华危重症医学杂志(电子版),2013,6(4):236-238.]