

# PGRMC1 基因小分子干扰 RNA 对卵巢癌细胞体外增殖的影响

宋晓霞<sup>1</sup>, 姚丽<sup>1</sup>, 张占薪<sup>1</sup>, 程艳<sup>2</sup>

(1. 郑州人民医院, 河南 郑州 450053; 2. 河南省肿瘤医院, 河南 郑州 450008)

**摘要:** [目的] 探讨 PGRMC1 基因小分子干扰 RNA 对卵巢癌细胞体外增殖的影响。[方法] 首先利用免疫组化和实时定量 PCR 方法检测不同卵巢病变组织 (卵巢癌、良性卵巢肿瘤、交界性卵巢肿瘤和正常卵巢) 蜡块中 PGRMC1 蛋白及 mRNA 表达水平; 进一步通过构建裸鼠卵巢癌模型, 利用 RNA 干扰技术将 PGRMC1 基因特异性敲除, 检测由此导致的 PGRMC1 基因活性的改变。[结果] (1) 免疫组化结果显示, 与正常卵巢组及良性卵巢肿瘤组相比, 卵巢交界性肿瘤组和卵巢癌组 PGRMC1 蛋白的表达显著增高 ( $P < 0.01$ ); (2) 实时定量 PCR 方法检测结果显示, 与良性卵巢病变组 ( $0.936 \pm 0.725$ ) 相比, 卵巢癌组中 ( $3.526 \pm 1.386$ ) PGRMC1 mRNA 的表达显著增高, 卵巢癌组 PGRMC1 mRNA 表达是良性卵巢肿瘤组的 3.51 倍 ( $P < 0.01$ )。 (3) 重组载体组细胞中 PGRMC1 mRNA 转染前、后的表达水平分别为  $79.6\% \pm 2.3\%$  和  $29.4\% \pm 1.6\%$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 空载体组和空白对照组 PGRMC1 mRNA 转染前、后表达水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。 (4) 接种 5 周后, 重组载体组裸鼠的肿瘤重量和体积分别为  $0.7 \pm 0.4\text{g}$  和  $197 \pm 26\text{mm}^3$ , 明显低于空载体组 ( $2.3 \pm 0.4\text{g}$  和  $785 \pm 38\text{mm}^3$ ) 和空白对照组的 ( $2.5 \pm 0.8\text{g}$  和  $896 \pm 22\text{mm}^3$ )。 [结论] PGRMC1 siRNA 可显著降低卵巢癌细胞中的 PGRMC1 的表达, 并对卵巢癌细胞的体外增殖有抑制作用。

**关键词:** 卵巢癌; PGRMC1; siRNA; 转染

中图分类号: R737.31 文献标识码: A 文章编号: 1671-170X(2017)06-0508-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.06.B010

## Effect of Small Interfering RNA Silencing PGRMC1 Gene on Proliferation of Ovarian Carcinoma in vitro and in vivo

SONG Xiao-xia, YAO Li, ZHANG Zhan-xin, et al.

(Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450053, China)

**Abstract:** [Objective] To investigate the effect of small interfering RNA silencing PGRMC1 gene on proliferation of ovarian carcinoma in vitro and in vivo. [Methods] The expression of PGRMC1 protein and mRNA were detected by the immunohistochemical technique and real-time quantitative PCR in ovarian cancer, benign ovarian lesions and normal ovarian tissues. Human ovarian carcinoma COC1 cells were inoculated in nude mice, and the PGRMC1 gene was silenced by RNA interference in vivo. The changes of PGRMC1 expression were detected. [Results] Immunohistochemical results showed that compared with normal ovarian and benign ovarian tumors, PGRMC1 protein expression in borderline ovarian tumors and ovarian cancer was significantly higher ( $P < 0.01$ ). Real-time quantitative PCR results showed that compared with benign ovarian lesions ( $0.936 \pm 0.725$ ), PGRMC1 mRNA expression in ovarian cancer ( $3.526 \pm 1.386$ ) was significantly higher ( $P < 0.01$ ). The expression level of PGRMC1 mRNA in COC1 cells was reduced from  $79.6\% \pm 2.3\%$  to  $29.4\% \pm 1.6\%$  after transfected with siRNA targeting to PGRMC1 ( $P < 0.05$ ). Five weeks after inoculation, the tumor weight and volume in nude mice with silenced PGRMC1 gene were  $0.7 \pm 0.4\text{g}$  and  $197 \pm 26\text{mm}^3$ , which were significantly lower than those in the empty vector group ( $2.3 \pm 0.4\text{g}$  and  $785 \pm 38\text{mm}^3$ ) and blank group ( $2.5 \pm 0.8\text{g}$  and  $896 \pm 22\text{mm}^3$ ) ( $P < 0.05$ ). [Conclusion] PGRMC1 siRNA can significantly reduce the expression of PGRMC1 in ovarian cancer cells and inhibit the proliferation of ovarian cancer cells in vitro and in vivo.

**Subject words:** ovarian cancer; progesterone receptor membrane component-1; small interfering RNA; transfection

卵巢癌是女性生殖系统中常见的恶性肿瘤, 病

通讯作者: 姚丽, 科主任, 主任医师, 本科; 郑州人民医院妇产科, 河南省郑州市黄河路 33 号 (450053); E-mail: sxx1130@163.com  
收稿日期: 2016-10-29; 修回日期: 2016-12-24

死亡率居妇科肿瘤首位, 具有不易早期发现、易转移、预后差的特点。其发病原因至今不明, 且缺乏早期诊断方法。目前治疗方法主要为手术治疗加术后化疗,

但现有治疗患者5年生存率不高,同时给患者造成巨大的经济与精神负担。因此深入研究卵巢癌相关的致病基因,有助于探讨卵巢癌的病因学机制,为卵巢癌的治疗开辟新的前景。

## 1 材料与方 法

### 1.1 一般材料

选取郑州人民医院于1995年1月至2010年12月病理诊断归档的石蜡标本78例用于PGRMC1蛋白的免疫组化分析。其中卵巢上皮性癌标本35例,按WHO分类标准进行肿瘤组织分型,包括浆液性腺癌20例,粘液性癌9例,子宫内膜样腺癌4例,透明细胞癌2例。还包括正常卵巢组织标本16例,良性卵巢肿瘤15例,交界性肿瘤12例,年龄22~49岁,平均年龄36岁。另取10例因妇科良性疾病切除的卵巢新鲜标本和20例卵巢上皮性癌核数大于80%以上的新鲜标本,行实时定量PCR分析PGRMC1基因的mRNA表达水平。

人卵巢癌细胞系COC1购自上海艾研生物科技有限公司。裸鼠购自郑州大学动物研究所,4~6周龄,体重17.0~23.2g,雌性,无特殊病原体(SPF)条件下饲养。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 PGRMC1 蛋白免疫组化分析

免疫组化一步法检测蛋白的表达水平,石蜡标本4 $\mu$ m连续切片,切片常规脱蜡水化。采用染色强度结合阳性细胞百分比法<sup>[4]</sup>判读结果:每例标本高倍镜( $\times 400$ )视野下随机选取5个视野,每个视野观察细胞数不少于200个,细胞胞浆内出现棕黄色颗粒计3分;出现黄色颗粒计2分;出现淡黄色颗粒计1分;无黄色颗粒出现计0分。以胞浆出现棕黄色或黄色或淡黄色颗粒为阳性细胞,计算阳性细胞百分比:阳性细胞百分比 $< 6\%$ 计0分,5%~25%计1分,25%~50%计2分,50%~75%计3分, $\geq 75\%$ 计4分。2项分值的乘积为最后的免疫积分,免疫积分 $\geq 3$ 分为阳性表达病例。

#### 1.2.2 PGRMC1 mRNA 实时定量 PCR 分析

实时定量PCR方法分析PGRMC1基因mRNA在良性卵巢病变组和卵巢癌组的表达水平,1.5%琼脂糖胶电泳总RNA,以鉴定RNA质量。用TaqMan<sup>®</sup>

Reverse Transcription Reagents (Ambion公司,美国)逆转录合成cDNA,按照产品使用说明混合TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Master Mix和PGRMC1 TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assay(Ambion)。人TBP(TATA box binding protein)内源基因对照试剂(Ambion)作为PGRMC1基因分析的内参对照基因。如参考文献<sup>[2,3]</sup>所述,结果以相对量表示。对每个样本的逆转录反应平行做3个PCR扩增反应。

#### 1.2.3 细胞培养与实验分组

人卵巢癌细胞株COC1细胞培养于含10%新生牛血清的RPMI 1640培养基中,加入50U/ml青霉素、50g/L链霉素,置于37.0 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中行传代培养,2~3d传代一次。

#### 1.2.4 PGRMC1 基因表达载体的构建

PGRMC1基因siRNA片段设计与合成:人PGRMC1基因的siRNA由广州锐博生物科技有限公司设计并合成。正义链:5'-GCAAUUGAAUGUCGUGUCUdTdT-3';反义链:3'-dTdT CGUUAACUACAGCACA-GA-5';干扰的靶序列为:5'-GCAATTGAATGTCGTGTCT-3'。siRNA序列两端包含Msp I、Smo I酶切位点;将合成的PGRMC1 siRNA序列,互补退火,用T4DNA连接酶分别接入pcDNA3.1A载体中的Msp I、Smo I酶切位点之间,构建表达PGRMC1基因的重组载体pcDNA3.1A-PGRMC1质粒,通过PCR技术鉴定和阳性克隆测序验证,测序由广州锐博生物科技有限公司完成。

#### 1.2.5 脂质体介导的质粒转染与筛选

脂质体Lipofectamine2000与PSHAPRIL按1:1.25的比例混合,并用PBS配制成相应工作浓度的转染液。实验分为3组:重组载体组即由pcDNA3.1A-PGRMC1质粒转染COC1细胞;空载体组即仅转染空载体pcDNA3.1A质粒;空白组即未转染质粒组。具体过程:转染前1d,将对数生长期贴壁细胞;24h内细胞生长汇合达60%~70%时进行转染。分别转染以上3组,操作步骤按Lipofectamine2000说明书进行。转染12h换为完全培养基继续培养24h,加入浓度为500 $\mu$ g/ml的G418筛选,3周后筛选出多个单集落,扩大培养,3组分别获得稳定转染的细胞系。

#### 1.2.6 RT-PCR 技术检测转染前、后3组细胞中的PGRMC1 mRNA 的表达

应用Trizol(invetrogen公司,美国)加miRNeasy

Mini Kit (Qiagen 公司, 美国) 提取和分离组织中总 RNA, NanoDrop 2000c 分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, 美国) 测量总 RNA 质量, 1.5% 琼脂糖胶电泳总 RNA, 以鉴定 RNA 质量。用 TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Ambion 公司, 美国) 反转录合成 cDNA, 按照产品使用说明混合 TaqMan® Gene Expression Master Mix 和 PGRMC1 TaqMan® Gene Expression Assay (Ambion), 配制 PCR 扩增体系, 反应体积为 20 $\mu$ l, 利用 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems 公司, 美国) 行 PCR 扩增, 扩增条件: 50 $^{\circ}$ C 2min, 95 $^{\circ}$ C 10min; 95 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 1min, 40 个反应周期。人 TBP (TATA box binding protein) 内源基因对照试剂 (Ambion) 作为 PGRMC1 基因分析的内参对照基因。如文献 [4,5] 所述, 结果以相对量表示。对每个样本的反转录反应平行做 3 个 PCR 扩增反应。实验重复 5 次, 取平均值。

1.2.7 裸鼠成瘤实验检测转染后裸鼠的成瘤能力

选取 4~6 周龄雌性裸鼠 15 只, 随机分为 PGRMC1 siRNA 组、空载体组和空白对照组, 每组 5 只。待瘤体积达到 100mm<sup>3</sup>~200mm<sup>3</sup> 时, 分别向 3 组裸鼠瘤块内注射 PGRMC1 siRNA、空载体和 PBS 液。每 2d 注射 1 次, 处理 2 周, 每次注射前测量瘤块体积, 绘制瘤块体积随注射时间的变化曲线。治疗期间, 每天观察裸鼠的生存状况。于注射结束后 1 周, 切取裸鼠肿瘤组织, 称量瘤块重量及体积并计算肿瘤生长抑制率。肿瘤生长抑制率 = (1 - PGRMC1 siRNA 组平均瘤重 / 空白对照组平均瘤重)  $\times$  100%。

1.3 统计学处理

实验数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。组间 PGRMC1 表达差异采用独立样本 *t* 检验, 免疫组化组间免疫积分的比较采用单因素方差分析, 组间阳性率的比较采用  $\chi^2$  检验, 两组间的倍数差异用  $\Delta\Delta$ CT 方法进行计算, 转染前后实验所得数据用均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示;  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PGRMC1 蛋白在不同卵巢病变中表达及其与病理参数间的关系

正常卵巢组织仅在其基底部分上皮细胞胞膜上偶可见少量淡黄色颗粒。随着病变程度的加重, 细胞染

色强度逐渐加深, 阳性染色细胞比例逐渐增加, 细胞膜及胞浆出现明显阳性着色。卵巢癌细胞胞膜和胞浆中均可见黄色或棕黄色颗粒沉着。与正常卵巢组及良性卵巢肿瘤组相比, 卵巢交界性肿瘤组和卵巢癌组 PGRMC1 蛋白的表达显著增高 ( $P < 0.01$ ); 见 Figure 1、2, Table 1。PGRMC1 表达与卵巢肿瘤组织类

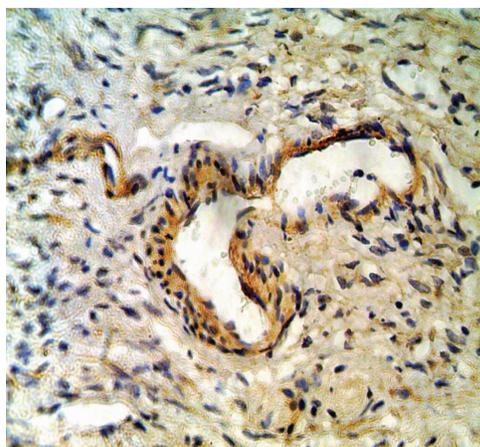


Figure 1 Expression of PGRMC1 protein in begin ovarian tumor tissues ( $\times 200$ )

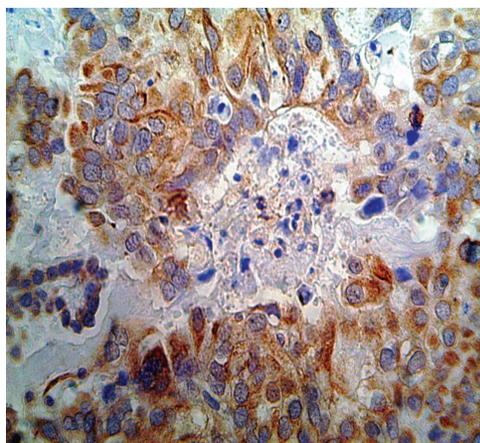


Figure 2 Expression of PGRMC1 protein in epithelial ovarian cancer tissues ( $\times 200$ )

Table 1 Expression of PGRMC1 in various ovarian lesions

Group	n	Score	Positive expression (%)
Normal ovarian	16	0.20 $\pm$ 0.71	1 (6.20)
Begin ovarian tumor	15	0.75 $\pm$ 1.12	4 (26.7)
Borderline ovarian tumors	12	3.60 $\pm$ 1.14 <sup>*<math>\Delta</math></sup>	8 (66.67) <sup>*<math>\Delta</math></sup>
Ovarian tumors	35	7.30 $\pm$ 2.12 <sup>*<math>\Delta</math></sup>	31 (88.57) <sup>*<math>\Delta</math></sup>
<i>F</i> / $\chi^2$		68.75	85.323
<i>P</i>		< 0.001	< 0.001

\*: Compared with normal ovarian group,  $P < 0.01$ ;  $\Delta$ : Compared with begin ovarian tumor group,  $P < 0.01$ .

型、分化程度、临床病理分期、淋巴结转移显著相关,见 Table 2。

## 2.2 卵巢癌 PGRMC1 mRNA 表达水平的改变

与良性卵巢肿瘤组 (0.936±0.725)相比,卵巢癌组中 PGRMC1 mRNA 的表达显著增高 (3.526±1.386),卵巢癌组 PGRMC1 mRNA 表达是良性卵巢肿瘤组的 3.51 倍 ( $P<0.01$ )。见 Figure 3。

## 2.3 转染前、后 3 组细胞中 PGRMC1 mRNA 表达情况

转染前、后细胞中 PGRMC1 mRNA 表达水平,重组载体组细胞中 PGRMC1 mRNA 的表达水平分别为 79.6%±2.3%和 29.4%±1.6%,两者比较,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ );空载体组的表达水平分别为 72.3%±0.9%和 68.4%±1.6%,两者比较,差异无统计学意义 ( $P>0.05$ );空白组分别为 70.1%±1.2%和 62.8%±0.7%,两者比较,差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。转染后细胞中 PGRMC1 mRNA 表达水平,重组载体组明显低于空载体组和空白对照组 ( $P<0.05$ )。而空载体组与空白组间比较,差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。见 Figure 4。

## 2.4 转染前、后 3 组细胞的增殖情况

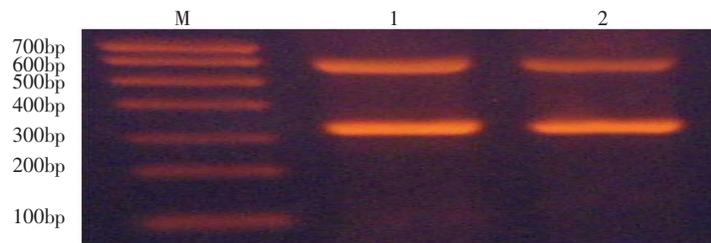
转染 48h 内,3 组间细胞增殖速度比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ );转染 72h 开始,重组载体组增殖速度明显慢于空载体组和空白对照组 ( $P<0.05$ ),其增殖速度趋于平缓上升趋势;转染 48h 内,空载体组细胞的增殖速度低于空白对照组,转染 72h 开始明显低于空白对照组 ( $P<0.05$ ),但明显高于重组载体组 ( $P<0.05$ )。见 Figure 5。

## 2.5 接种转染后细胞的 3 组裸鼠成瘤能力比较

重组载体组裸鼠的成瘤时间为 5.8±0.7d,与空载体组的 11.9±0.5d 和空白对照组的 12.6±0.9d 比

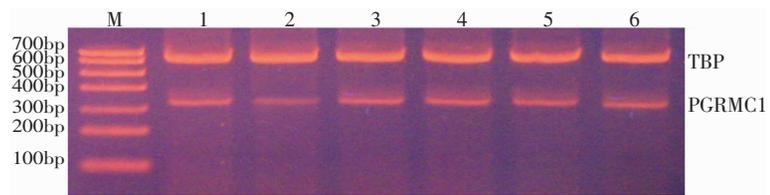
**Table 2 Relationship between the PGRMC1 expression and clinicopathologic features of ovarian cancer**

Clinicopathologic features	n	PGRMC1 expression		$\chi^2$	P
		Positive (%)	Negative (%)		
<b>Histological type</b>					
Serous cystadenocarcinoma	20	18(90.0)	2(10.0)	6.004	0.006
Mucinous Cystadenocarcinoma	9	8(88.9)	1(11.1)		
Endometrioid adenocarcinoma	4	3(75.0)	1(25.0)		
Clear cell carcinoma	2	2(100)	0(0)		
<b>Differentiation</b>					
High	8	5(62.5)	3(37.5)	5.243	0.031
Moderate or poor	27	26(96.3)	1(3.7)		
<b>Clinical stage</b>					
I	6	4(66.7)	2(33.3)	3.576	0.041
II~III	29	27(93.1)	2(6.9)		
<b>Lymph node metastasis</b>					
No	15	12(80.0)	3(20.0)	4.958	0.023
Yes	20	19(95.0)	1(5.0)		



M: Marker, 1: Ovarian cancer; 2: Benign ovarian tumor

**Figure 3 PGRMC1 expression in different ovarian tissues**



M: DNA Marker (DL 700); 1, 2: COC1 transfected with PGRMC1-siRNA plasmid; 3, 4: COC1 transfected with empty vector plasmid; 5, 6: COC1 cells

**Figure 4 Expression of PGRMC1 mRNA in different cell lines before and after transfection detected by RT-PCR**

较,差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ );而空载体组与空白对照组比较,差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。接种 5 周后,重组载体组裸鼠的肿瘤重量和体积分别为 0.7±0.4g 和 197±26mm<sup>3</sup>,明显低于空载体组 (2.3±0.4g 和 785±38mm<sup>3</sup>) 和空白对照组 (2.5±0.8g 和 896±22mm<sup>3</sup>)。

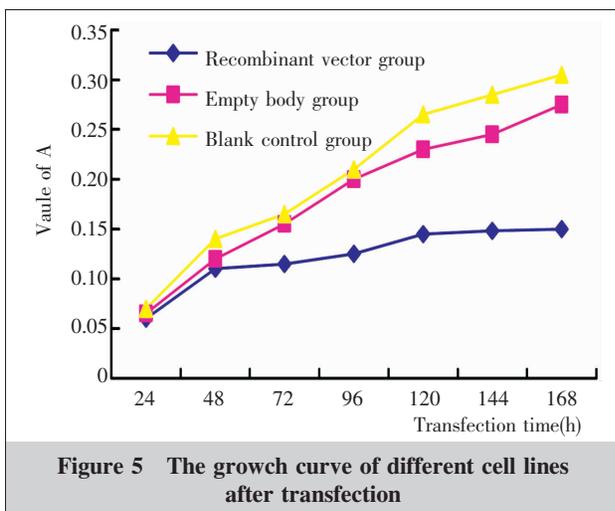


Figure 5 The growth curve of different cell lines after transfection

### 3 讨论

PGRMC1 作为孕酮结合复合物的一个元件发挥重要的作用, 不仅与孕酮结合, 还可以与其他的甾类、非甾类物质结合, 它的结合因子有 P450 蛋白、PAIR-BPI、胰岛素诱导基因和非特异性激素/药物结合蛋白, 通过活化 P450 蛋白 Cyp51/羊毛固醇的去甲基化来控制固醇的合成。Peluso 等<sup>[2,3]</sup>和 Min 等<sup>[8]</sup>研究发现 PGRMC1 在促进卵巢癌细胞增殖方面作用很重要, 敲除 PGRMC1 基因的卵巢癌组织, 其增殖活性受到明显抑制, 且化疗敏感性增强, 并且提出以减弱 PGRMC1 作用为目的的靶向治疗可作为辅助化疗的一部分。对于卵巢癌病变病理研究发现, PGRMC1 的表达与卵巢病变的严重程度显著相关, 抑制细胞内 PGRMC1 基因的表达可导致卵巢癌细胞的死亡<sup>[6,7,9]</sup>, 该基因具有典型癌基因的特点。鉴于以上研究, 我们利用免疫组化和实时定量 PCR 方法, 对不同卵巢病变中的 PGRMC1 蛋白和 mRNA 的表达情况进行了分析, 发现卵巢癌中 PGRMC1 蛋白和 mRNA 的表达均较良性卵巢病变组织显著增加, 且 PGRMC1 基因蛋白表达与卵巢癌病理参数如分化程度、临床病理分期、淋巴结有无转移相关, 说明随着卵巢组织恶变程度的升高, PGRMC1 表达水平也随之升高。由此我们可以推论 PGRMC1 基因在卵巢癌的发生、发展中起着重要作用, 并可做为判断其恶性程度的有效指标。

RNAi 是一种强有力的沉默哺乳动物基因表达的技术, 可以作为一种基因治疗和基因功能的研究

方法<sup>[1,4,5]</sup>。本研究中, 通过 RT-PCR 技术在 mRNA 水平检测, 我们发现稳定转染可以显著抑制卵巢癌细胞中 PGRMC1 基因的表达。通过与空载体组及空白对照组的比较, 更加明确了 PGRMC1 siRNA 下调 PGRMC1 基因表达的意义。本研究我们成功构建了裸鼠卵巢癌动物模型, 利用 RNAi 技术, 通过裸鼠移植瘤内注射 PGRMC1 siRNA 后, PGRMC1 mRNA 的相对表达量显著低于空载体组和空白对照组 ( $P < 0.05$ )。我们还发现, PGRMC1 siRNA 组的肿瘤生长速度明显减慢, 实验结束后, 取出瘤块称重, PGRMC1 siRNA 组的瘤块重量明显低于空载体组和空白对照组。说明 PGRMC1 siRNA 可能降低细胞的成瘤能力, 从而降低肿瘤细胞的恶性程度。

### 参考文献:

- [1] Hughes AL, Powell DW, Bard M, et al. Dap1/PGRMC1 binds and regulates cytochrome P450 enzymes [J]. Cell Metab, 2007, 45(5):143-149.
- [2] Peluso JJ, Pappalardo A, Losel R, et al. Progesterone membrane receptor component 1 expression in the immature rat ovary and its role in mediating progesterone's anti-apoptotic action[J]. Endocrinology, 2006, 147(6):3133-3140.
- [3] Peluso JJ, Romak J, Liu X. Progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) is the mediator of progesterone's antiapoptotic action in spontaneously immortalized granulosa cells as revealed by PGRMC1 small interfering ribonucleic acid treatment and functional analysis of PGRMC1 mutations [J]. Endocrinology, 2008, 149(3): 534-543.
- [4] Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor Angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma[J]. N Engl J Med, 1991, 324(1):1-8.
- [5] Skibbens RV. Cell biology of cancer:BRCA1 and sister chromatid pairing reactions?[J]. Cell Cycle, 2008, 7:449-452.
- [6] Ace CI, Okulicz WC. Microarray profiling of progesterone-regulated endometrial genes during the rhesus monkey secretory phase[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2004, 46(2):54-56.
- [7] Peluso JJ, Pappalardo A. Progesterone regulates granulosa cell viability through a protein kinase G-dependent mechanism that may involve 14-3-3sigma [J]. Biol Reprod, 2004, 71(9):1870-1878.
- [8] Min L, Strushkevich NV, Harnastai IN, et al. Molecular identification of adrenal inner zone antigen as a heme-binding protein[J]. FEBS J, 2005, 272(22):5832-5843.
- [9] Ghosh K, Thompson AM, Goldbeck RA, et al. Spectroscopic and biochemical characterization of heme binding to yeast Dap1p and mouse PGRMC1p [J]. Biochemistry, 2005, 44(50):16729-16736.