基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.11.010

RNAi沉默 clusterin 基因对卵巢癌 SKOV3 细胞放射敏感性的影响

黄 锣[1],张幸平[1],陈 诚[1],罗 茜[2],吴永忠[2]

(1. 重庆医科大学附属第一医院肿瘤科,重庆 400016;2. 重庆市肿瘤研究所放疗科,重庆 400030)

【摘 要】目的:研究 clusterin(CLU)基因沉默对卵巢癌 SKOV3 细胞放射敏感性的影响。方法:靶向 CLU 基因的 siRNA 转染卵巢癌 SKOV3 细胞,Western blot 法测定 CLU 基因蛋白表达水平。给予不同放射剂量(2、4、6 Gy)处理后,通过 MTT 法及克隆形成实验检测卵巢癌 SKOV3 细胞的存活率及克隆形成率,流式细胞仪 Annexin V/PI 法检测凋亡率。结果:靶向 CLU 基因的 siRNA 特异性地从蛋白水平抑制了 CLU 基因表达。MTT 及克隆形成实验结果显示卵巢癌 SKOV3 细胞的存活率及克隆形成率与放射剂量呈反比,剂量越大,存活率及克隆形成率越低,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。流式细胞仪 Annexin V/PI 法检测结果表明:2 Gy 放疗后实验组细胞凋亡率明显增加,达(24.32±1.75)%,较单纯放射组升高约 12%,差异具有明显统计学意义($P<0.05$)。结论:CLU 基因沉默可以明显增强卵巢癌 SKOV3 细胞对放射的敏感性,为卵巢癌放疗增敏基础研究提供了新的靶点。

【关键词】clusterin;放射敏感性;RNAi;卵巢癌

【中国图书分类法分类号】R737.31 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-05-13

Influence of silencing clusterin by RNAi on radiosensitivity of human ovarian carcinoma SKOV3 cell-line

HUANG Luo[1], *ZHANG Xing-ping*[1], *CHEN Cheng*[1], *LUO Qian*[2], *WU Yong-zhong*[2]

(*1. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University; 2. Department of Radiotherapy, Chongqing Cancer Institute*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the influence of silencing clusterin(CLU) by RNA interference on radiosensitivity of human ovarian carcinoma SKOV3 cell-line. *Methods*: The expression of CLU gene was silenced by siRNA against it, Western blot was performed to detect the expression of CLU on protein level. After receiving different doses of radiation(2,4,6 Gy), The cell survival rate was detected by MTT assay, and the cloning efficiency was also evaluated by the assay, the apoptotic rate was detected by flow cytometry. *Results*: The siRNA target clu specifically down regulated the expression of CLU significantly. The MTT and colony forming results showed that the cell survival and cloning efficiency became significantly lower with the increasing dose of ionizing irradiation, the capacity of proliferation and cloning efficiency was inhibited obviously($P<0.05$). The apoptotic rate became significantly higher with the increasing dose of ionizing irradiation, which reached(24.32±1.75)% after 2 Gy($P<0.05$), and increased about 12% compared with control group. *Conclusion*: The CLU-silencing can significantly enhance the radio-sensitivity of ovarian carcinoma SKOV3 cell-line in vitro, and the CLU gene may be a promising target for basic research of ovarian carcinoma.

【Key words】clusterin; radio-sensitivity; RNA interference; ovarian cancer

卵巢癌是严重威胁女性健康的常见妇科恶性肿瘤之一,临床上以上皮型最常见。研究证实分泌型CLU(Secretory clusterin,sCLU)蛋白在细胞受到各种伤害刺激时大量表达而保护细胞,对肿瘤细胞具有较强的保护作用,通过沉默其表达增加了放、化疗的敏感性[1,2]。我们在前期研究中已成功构建 sCLU 基因 siRNA,通过 RT-PCR 及 Western blot 证明其特异性及有效性,沉默其表达后,卵巢癌 SKOV3 细胞的增殖及侵袭能力受到明显抑制,并增加了其凋亡率[3]。本实验拟探讨 sCLU 沉默后对卵巢癌 SKOV3 细胞放射敏感性的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

人卵巢癌 SKOV3 细胞株购自重庆医科大学生命科学院。sCLU-siRNA 分子[3]由上海生工生物工程技术服务有限公

作者介绍:黄 锣(1986-),男,硕士,研究方向:肿瘤基因放疗增敏。

通信作者:吴永忠,男,教授,Email:cqmdwyz@yahoo.com.cn。

司合成。lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒购自凯基公司。四甲基偶氮唑盐(MTT)购自 Sigma。其他试剂为进口分装或国产分析纯。

1.2 细胞培养、转染及分组

卵巢癌 SKOV3 细胞培养于含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中。种板后细胞汇合度约 50%~60%时进行转染，实验分 3 组：实验组(sCLU-siRNA)、阴性对照组(阴性对照 siRNA)及空白对照组(等体积培养液)，转染步骤严格按照 lipofectamine 2000 说明书操作。

1.3 Western blot 检测 sCLU 沉默前后蛋白表达水平

分组同上。转染后 48 h，提取细胞总蛋白，BCA 法测定蛋白浓度。10%SDS-PAGE 凝胶电泳，后转移至 PVDF 膜，以含 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭后，1:1 000 sCLU 抗体和 1:1 000 β-actin 抗体孵育，用辣根过氧化酶标记的二抗杂交，最后放射自显影，成像，拍照并记录。

1.4 MTT 法检测放射敏感性

放疗条件：采用医用直线加速器 (Varian 2300C/D)，6 MV-X 射线，源皮距 100 cm。各组细胞转染后 6 h，给予不同放射剂量处理(2、4、6 Gy)，继续无菌孵育，每 24 h 换液。48 h 后终止培养，每孔加入 MTT(5 mg/ ml) 10 μl，继续培养 4 h 后吸尽孔内液体，加入 150 μl DMSO，振荡 10 min，最后在酶联免疫检测仪 570 nm 波长处比色，记录各孔吸光度值(OD 值)，根据 OD 值计算出各组存活分数并绘制相应存活曲线图。存活分数(SF)=实验组平均吸光值/对照组平均吸光值×%。

1.5 Annexin V/PI 法检测 SKOV3 细胞凋亡率

转染后 6 h，各组细胞给予 2 Gy 放射处理，后继续于 37℃、饱和湿度及 5%CO_2 浓度孵箱中无菌培养。24 h 后终止培养，收集细胞，PBS 洗涤后制成 500 μl 单细胞悬液，分别加入 Annexin V 5 μl、稀释的 PI 10 μl 混匀，然后冰浴、暗处静置 10 min，最后置流式细胞仪检测。凋亡率%=凋亡细胞数/总细胞数×%。

1.6 克隆形成实验检测放射敏感性

采用梯度倍数稀释法将对数生长期细胞稀释至 1×10^3 个/ml，取 200 μl 每孔种板至 6 孔板内，继续置于孵箱无菌孵育。过夜后转染，转染后 6 h，常温下，各组细胞给予不同放射剂量处理(2、4、6 Gy)。照射后每 48 h 换液。7 d 后终止培养，细胞固定、染色，最后于显微镜下计数≥50 个细胞数的集落，以肿瘤的克隆形成率来评估放射结果。克隆形成率=集落数目/接种细胞数×%。

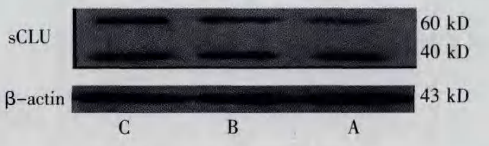
1.7 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件，计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示，多组间差异比较采用方差分析，均数间多重比较采用 *LSD-t* 检验。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 Western blot 检测 sCLU 基因蛋白表达结果

sCLU 蛋白目的条带在 60 kD 处和 40 kD 处清晰表达，实验组蛋白条带表达明显弱于对照组。通过统计分析各组光密度值，实验组蛋白表达水平较对照组明显降低，差异具有统计学意义($P<0.01$)；阴性对照组间比较无明显区别($P>0.05$)，从蛋白水平证明 sCLU-siRNA 特异性地沉默了 sCLU 基因表达(图 1)。



A. 实验组；B. 阴性对照组；C. 空白对照组

图 1 Western blot 检测 sCLU 蛋白表达水平

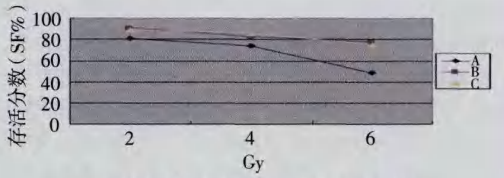
2.2 MTT 检测结果

从表 1 及图 2 数据可知，随着放射剂量的增加，各组细胞的存活分数明显减低，与放射剂量呈正相关。在相同放射剂量下，实验组细胞存活分数较各对照组均低，差异有统计学意义($P<0.05$，表 1)，具有统计学意义，而阴性对照组间无明显差异。说明沉默 sCLU 基因明显增加了卵巢癌 SKOV3 细胞对放射的反应，放射敏感性有一定的提高。

表 1 不同放射剂量照射后细胞存活分数(Gy,%)

实验分组	2	4	6
A组	81.07 ± 1.54*	70.11 ± 0.87*	48.39 ± 0.52*
B组	91.01 ± 1.29	82.61 ± 0.95	77.39 ± 0.82
C组	88.93 ± 0.82	85.77 ± 1.65	74.95 ± 0.49

*：与空白对照组比较，$P<0.05$



A. 实验组；B. 阴性对照组；C. 空白对照组

图 2 MTT 检测 SKOV3 细胞放射敏感性

2.3 流式细胞仪 Annexin V/PI 法检测 2 Gy 放射处理后凋亡率

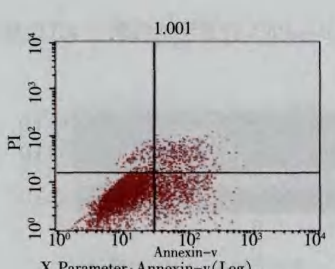
给予 2 Gy 放疗后实验组细胞凋亡率达(24.32±1.75)%，明显高于阴性对照组及空白对照组，提高了约 12%，具有显著差异性($P<0.05$)，阴性对照组及空白对照组间无显著差异性，说明 sCLU 沉默明显提高了卵巢癌 SKOV3 细胞对放射所致的凋亡(图 3)。

2.4 克隆形成实验

细胞经过不同放射剂量处理后，克隆形成能力明显受到抑制，与剂量呈反比，在 6 Gy 时最低，与各对照组比较，实验组细胞克隆形成能力明显减弱，差异具有显著统计学意义($P<0.05$)，表明 sCLU 对卵巢癌 SKOV3 细胞的克隆形成能力具有明显的影响(图 4)。

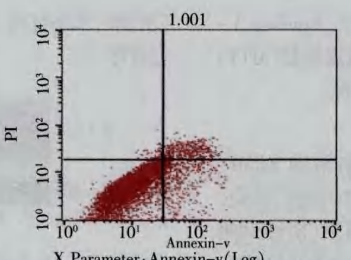
3 讨 论

人 CLU 蛋白与肿瘤的发生、发展及转移密切相关，而且在肿瘤的放、化疗增敏性中具有重要的作用，显示了强大的肿瘤治疗潜能[1,2,4]。在卵巢肿瘤中，CLU 蛋白表达程度与卵巢肿瘤恶性程度紧密相关，而且研究发现其可能与卵巢肿瘤的



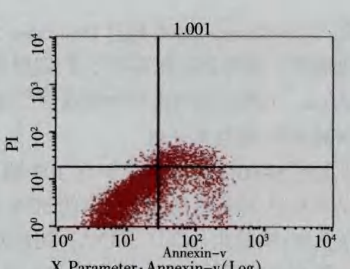
Quad	Events	% Gated
UL	109	1.09
UR	445	4.45
LL	8 603	86.03
LR	843	8.43

A. 空白对照组



Quad	Events	% Gated
UL	78	0.78
UR	557	5.57
LL	8 475	84.75
LR	890	8.90

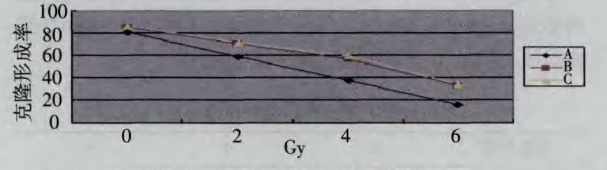
B. 阴性对照组



Quad	Events	% Gated
UL	091	0.91
UR	874	8.74
LL	7 478	74.78
LR	1 557	15.57

C. 实验组

图 3　2 Gy 放射后各组细胞凋亡率（%）



A. 实验组；B. 阴性对照组；C. 空白对照组

图 4　不同剂量放射处理后细胞克隆形成率（%）

发病、转移及耐药甚至治疗抵抗密切相关[5,6]。我们在前期体外研究中发现：sCLU 基因沉默明显抑制了卵巢癌 SKOV3 细胞的增殖及侵袭能力，同时促进了其凋亡[3]，提示 sCLU 蛋白对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、侵袭功能具有明显的促进作用。

恶性肿瘤的高度侵袭、抗治疗能力是肿瘤恶化的一个重要因素，也是肿瘤治疗抵抗的重要因素，如何抑制其增殖、侵袭，同时减弱其治疗抵抗是肿瘤治疗的关键。Cantin 等[7]通过 sCLU 抗体抑制 TGF-β 诱导的肿瘤细胞上皮-间质细胞转变功能，成功抑制了肿瘤的转移能力。Chi 等[6]通过抑制 sCLU 表达也在多种肿瘤中成功增加了其放、化疗敏感性。我们在实验中发现，sCLU 基因沉默后，卵巢癌 SKOV3 细胞的存活分数较阴性对照组及空白对照组明显减小，差异显著，说明 clu 基因沉默明显增加了卵巢癌 SKOV3 细胞对放疗的敏感性，克隆形成实验结果更进一步证明了 clu 基因的放疗增敏能力，提示沉默 sCLU 基因可以增加卵巢癌 SKOV3 细胞对放射的敏感性。Yamanaka 等[8]认为 clu 主要通过与 P53 协同作用，进而增加了肿瘤的放、化疗敏感性。也有研究认为[9,10]sCLU 主要通过抑制促凋亡分子 Bax 寡聚化，阻止其对线粒体的作用，从而抑制细胞色素 C 的释放，以此抑制细胞内源化凋亡发生，抑制其表达能够明显增加肿瘤细胞的凋亡率及放、化疗敏感性。虽目前其具体作用机制还未完全明了，但 sCLU 沉默后却能明显检测到其增加了肿瘤治疗的敏感性。我们通过流式细胞仪 Annexin V/PI 法凋亡检测还发现，2 Gy 放射处理后，实验组细胞的凋亡率较对照组明显升高，结合前期研究及目前研究现状，我们认为 sCLU 不是单纯通过某一种途径增加了肿瘤细胞对放、化疗的敏感性，而是通过多种途径协同作用增加肿瘤的治疗敏感性[10]。

通过体外实验我们证明sCLU基因沉默后，卵巢癌SKOV3细胞对放射的敏感性有了一定程度的提高，说明 sCLU 基因与卵巢癌 SKOV3 细胞的放射敏感性具有密切相关性，这为以 CLU 基因为靶点治疗卵巢肿瘤提供了新的基础研究策略及有效的实验室数据，具有广泛的研究价值。

参 考 文 献

[1] Wei L,Xue T,Wang J,et al.Roles of clusterin in progression, chemoresistance and metastasis of human ovarian cancer[J].Int.J.Cancer. 2009,125(4):791-806.

[2] Shannan B,Seifert M,Leskov K,et al.Challenge and promise:roles for clusterin in pathogenesis,progression and therapy of cancer[J].Cell Death Differ,2006,13(1):12-19.

[3] 黄　锣,罗　茜,吴永忠,等.clusterin 基因沉默对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、侵袭的影响[J].第二军医大学学报,2011,32(1):28-31.

[4] He L R,Liu M Z,Li B K,et,al.Clusterin as a predictor for chemoradiotherapy sensitivity and patient survival in esophageal squamous cell carcinoma[J].Cancer Sci,2009,100(12):2354-2360.

[5] Loruda M,Gonos E S,Trouqakos I P.Development of resistance to chemotherapeutic drugs in human osteosarcoma cell lines largely depends on up-regulation of Clusterin/Apolipoprotein J[J].Int J Cancer, 2007,120(3):611-622.

[6] Chi K N,Hotte S J,Tu D,et al.Randomized phase II study of docetaxel and prednisone with or without OGX-011 in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer[J].J Clin Oncol,2010,27: 4247-4254.

[7] Lenferink A E,Cantin C,Nantel A,et al.Transcriptome profiling of a TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition reveals extracellular clusterin as a target for therapeutic antibodies[J].Oncogene, 2010,29(6):831-844.

[8] Yamanaka K,Gleave M E,Miyake H,et al.Synergistic antitumor effect of combined use of adenoviral-mediated p53 gene transfer and antisense oligodeoxynucleotide targeting clusterin gene in an androgen-independent human prostate cancer model[J].Mol.Cancer Ther,2005,4(2): 187-195.

[9] Zhang H,Kim J K,Edwards C A,et al.Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax[J].Nat Cell Biol,2005,7(9):909-915.

[10] Ranney M K,Ahmed I S,Potts K R,et al.Multiple pathways regulating the anti-apoptotic protein clusterin in breast cancer[J].Biochim Biophys Acta,2007,1772(9):1103-1111.

（责任编辑：冉明会）