

· 论 著 ·

## PES1 在卵巢癌中的表达及其对内皮生长因子的影响

江絮萍, 叶 泓

(武警福建总队医院妇产科, 福州 350003)

**摘要:**目的 探讨 PES1 在卵巢癌中的表达及其与血管内皮生长因子(VEGF)表达的关系。方法 用蛋白印迹法检测 PES1 在卵巢癌组织以及相应的癌旁组织中的表达。结果 肿瘤组织中 PES1 的表达水平明显高于相应的癌旁组织。转染 FLAG-PES1 的 CAOV-3 和 ES-2 细胞培养液的 VEGF 分泌量分别由(178.0±11.8) pg/mL 和(309.5±18.5)pg/mL 上升到(375.0±18.3)pg/mL 和(633.2±25.7)pg/mL, VEGF 分泌量明显升高( $P<0.01$ );而且 VEGF 相对 mRNA 水平也分别上升了约 1.8 倍和 2 倍( $P<0.01$ );蛋白印迹法结果表明, PES1 过表达能升高这 2 种细胞中缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )的表达。荧光素酶报告基因的转录激活活性检测表明, PES1 对调节 VEGF 的转录没有直接影响。将 HIF-1 $\alpha$  SiRNA 与 FLAG-PES1 共转染 CAOV-3 和 ES-2 细胞后,蛋白印迹法结果表明, HIF-1 $\alpha$  SiRNA 能明显抑制 PES1 引起的 HIF-1 $\alpha$  升高,同时 VEGF 的分泌量和 mRNA 水平也被明显抑制。结论 PES1 在卵巢癌组织中表达明显升高。

**关键词:**卵巢肿瘤;血管内皮生长因子 A;缺氧诱导因子 1,  $\alpha$  亚基;PES1

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.27.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)27-3211-03

### Expression of VEGF induced by PES1 via enhancing hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ expression in epithelial ovarian cancer cells

Jiang Xuping, Ye Hong

(Department of Gynecology and Obstetrics, Fujian Corps Hospital of Armed Police Forces, Fuzhou, Fujian 350003, China)

**Abstract:**Objective To investigate the expression of PES1 in ovarian cancer and its relationship with the vascular endothelial growth factor(VEGF) expression. **Methods** The expression of PES1 in ovarian cancer tissues and corresponding pericancerous tissues was detected with Western blot. **Results** The expression of PES1 in ovarian cancer tissues was obviously higher than that in the pericancerous tissues. The secretion amounts of VEGF in cell culture fluid of CAOV-3 and ES-2 with transfection of FLAG-PES1 were elevated from (178.0±11.8) pg/mL and (309.5±18.5) pg/mL to (375.0±18.3) pg/mL and (633.2±25.7)pg/mL respectively ( $P<0.01$ ), the secretion amounts of VEGF were also increased( $P<0.01$ ). The relative VEGF mRNA levels were also raised by 1.8 times and 2 times respectively ( $P<0.01$ ); Western blot simultaneously showed that the over expression of PES1 could increase the expression of HIF-1 $\alpha$  in these two kinds of cells. The luciferase report gene transcriptional activation activity detection revealed that PES1 had no direct effect on the VEGF transcription. After cotransfecting HIF-1 $\alpha$  SiRNA and FLAG-PES1 to CAOV-3 and ES-2 cells, Western blot demonstrated that HIF-1 $\alpha$  SiRNA could obviously inhibit the increase of HIF-1 $\alpha$  expression induced by PES1, at the same time the secretion amounts of VEGF and mRNA level were also suppressed. **Conclusion** The expression of PES1 is obviously up-regulated in ovarian cancer tissues.

**Key words:** ovarian neoplasms; vascular endothelial growth factor A; hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit; PES1

Pescadillo 基因是在研究逆转录病毒诱发的斑马鱼胚胎发育缺陷中发现的。该基因在酵母、小鼠和人类均有表达,且功能高度保守,分别被命名为 YPH1/Nop7p、Pes1 和 PES1<sup>[1-3]</sup>。Pescadillo 主要表达在乳腺、卵巢等细胞分裂旺盛的组织中,能诱导染色质发生大规模伸展,而且能直接诱导下游靶基因表达,表明该分子具有转录因子功能<sup>[4-6]</sup>。研究表明, PES1 在多种肿瘤如乳腺癌、胶质瘤、前列腺癌、胃癌以及头颈部鳞状上皮细胞癌中高表达<sup>[4,7-10]</sup>。血管内皮生长因子(VEGF)在卵巢癌的发生、发展中起极其重要的作用。因此,本研究初步探讨 PES1 在卵巢癌中的表达及其与 VEGF 表达的关系,报道如下。

#### 1 材料与方 法

**1.1 材料** FLAG-PES1 和 pSliencer 2.1-U6 neo 载体由本科室构建并保存。293T 细胞由本科室保存,采用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 孵箱内常规培养。卵巢癌 CAOV-3 和 ES-2 细胞培养基同条件培养。FLAG 抗体和鼠抗 GAPDH 购自 Sigma 公司,抗缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )抗体购自北京中山公司, PES1 抗体购自中衫金桥公司。限制性内切酶、DNA 连接酶、DNA 纯化试剂和 Lipofectamine 2000 等分别购自美国 NEB 公司、德国 Qiagen 公司及美国 In-

vitrogen 公司。VEGF 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自北京邦定公司。含 VEGF 启动子的荧光素酶报告基因由解放军 309 医院熊志红研究员惠赠。卵巢癌及癌旁组织取自本科室患者的组织标本。

#### 1.2 方法

**1.2.1 组织蛋白的提取** 分别取出小块的癌组织或癌旁组织,先用生理盐水洗涤,放入研磨器中加入 200  $\mu$ L RIPA(含 10 g/L NP40, 5 g/L 脱氧胆酸钠, 10 g/L 十二烷基硫酸钠)充分研磨后 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min 取上清液。

**1.2.2 蛋白印迹分析** 样品蛋白电泳(SDS-PAGE),封闭、洗膜,加到硝酸纤维素膜上压片显影。

**1.2.3 细胞转染和转录激活活性的测定** 参照文献[11]:将总量为 2.0  $\mu$ g 的重组质粒 DNA 与 80  $\mu$ L 的培养基混合,再将 2.5  $\mu$ L 脂质体 2000 与 80  $\mu$ L 的培养基混合,然后将上述 2 种溶液混合,室温放置 20 min,加入到含有 800  $\mu$ L 培养液和 10% 胎牛血清的 12 孔板中。各组同时转染 0.2  $\mu$ g 含 VEGF 启动子的荧光素酶报告基因和 0.1  $\mu$ g 表达半乳糖苷酶的质粒。每组检测 3 个复孔,作用 24 h 后分别测定各组的转录激活活性,取平均值,计算各组与空白对照组的转录激活活性的

比值为相对值。

**1.2.4 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 VEGF 的分泌量** 每组细胞接种  $2 \times 10^5$  个,细胞贴壁后,用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 2 次,加入不含血清的培养液培育 24 h,收集相应细胞的培养液,按照人 VEGF ELISA 试剂盒说明书进行检测,每组重复 3 次。

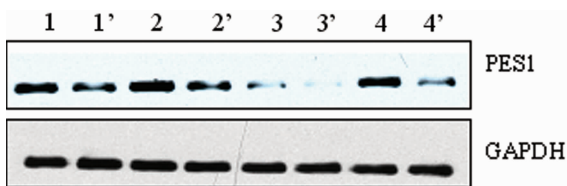
**1.2.5 荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测 VEGF 的相对 mRNA 表达** 总 RNA 用 Trizol 试剂提取后,按一步法 RT-PCR 试剂盒说明进行。VEGF 的上游引物为 5'-TCT ACC TCC ACC ATG CCA AGT-3',下游引物为 5'-GAT GAT TCT GCC CTC CTC CTT-3'; $\beta$ -actin 上游引物为 5'-TCA AGA TCA-TTG CTC CTC CTG-3',下游引物为 5'-CTG CTT GCT GAT CCA CAT CTG-3'。循环条件为:50 °C 10 min,95 °C 5 min 为 1 个循环,再 95 °C 10 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s,共 40 循环。扩增结果与  $\beta$ -actin 进行比较作为 VEGF 的相对 mRNA 表达水平,每组实验重复 3 次。

**1.2.6 HIF-1 $\alpha$  SiRNA** SiRNA 表达载体的构建参照文献[12]。siRNA 正义链为 5'-AGT TAG TTC AAA CTG AGT TAA TCC C-3';反义链为 5'-GGG ATT AAC TCA-GTT TGA ACT AAC T-3'。构建好的 SiRNA 表达载体用 Lipofectamine 2000 转染细胞。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 进行统计学分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较行 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 PES1 在卵巢癌组织中的表达** 为阐明 PES1 与卵巢癌的相关性,提取了 4 例不同卵巢癌患者的肿瘤组织及其对应的癌旁组织蛋白,蛋白印迹检测结果显示,肿瘤组织中 PES1 的表达水平明显高于相应的癌旁组织(图 1)。



1,2,3,4:肿瘤组织;1',2',3',4':相应的癌旁组织。

图 1 PES1 在卵巢癌组织中的表达

**2.2 过表达 PES1 对卵巢癌细胞中 HIF- $\alpha$  表达和 VEGF 分泌的影响** 由于 VEGF 表达在卵巢癌的发生、发展过程中起极其重要的作用,而 PES1 具有转录因子功能,因此,观察 PES1 是否能调节 VEGF 的表达。将 FLAG-PES1 瞬时转染上皮性卵巢癌 CAOV-3 和 ES-2 细胞 24 h 后,取细胞培养液用 ELISA 检测其中 VEGF 的分泌量发现,转染 PES1 的 CAOV-3 和 ES-2 细胞培养液的 VEGF 分泌量分别由  $(178.0 \pm 11.8)$  pg/mL 和  $(309.5 \pm 18.5)$  pg/mL 上升到  $(375.0 \pm 18.3)$  pg/mL 和  $(633.2 \pm 25.7)$  pg/mL,这 2 种细胞的 VEGF 分泌量明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。RT-PCR 结果表明,转染 PES1 的 CAOV-3 和 ES-2 细胞的 VEGF 相对 mRNA 水平分别上升了约 1.8 倍和 2 倍,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。结果表明,PES1 可以增强 CAOV-3 和 ES-2 细胞中 VEGF 的表达。由于 VEGF 是 HIF-1 $\alpha$  的直接靶基因,因此,进一步观察过表达 PES1 是否升高 HIF-1 $\alpha$  表达。蛋白印迹结果表明 PES1 表达能升高这两种细胞中 HIF-1 $\alpha$  的表达(图 2)。

**2.3 PES1 对含 VEGF 启动子的荧光素酶报告基因的转录激活活性的影响** 由于 PES1 具有转录调节功能,因此,需要观察 PES1 是否能直接调节 VEGF 的转录。将不同剂量的

FLAG-PES1 与含 VEGF 启动子的荧光素酶报告基因共转染 293T 细胞后,检测报告基因的转录激活活性,发现加入不同剂量的 PES1 与没有加入 PES1 的转录激活活性相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),说明 PES1 对调节 VEGF 的转录没有直接影响。

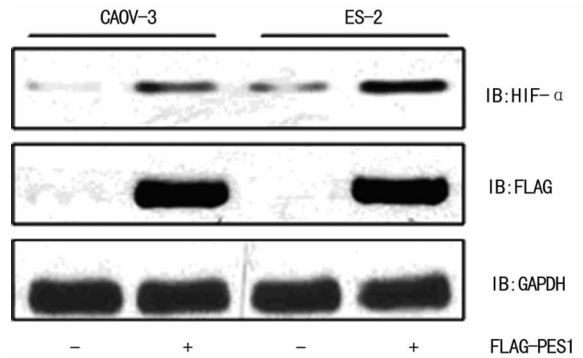


图 2 PES1 对 CAOV-3 和 ES-2 细胞中 VEGF 表达的影响

**2.4 PES1 升高 VEGF 的表达依赖于 HIF-1 $\alpha$**  将构建好的 HIF-1 $\alpha$  SiRNA 或空载体转染 CAOV-3 细胞后,发现转染 HIF-1 $\alpha$  SiRNA 的 CAOV-3 细胞中 HIF-1 $\alpha$  的表达明显降低,说明所构建的 HIF-1 $\alpha$  SiRNA 能有效地抑制 HIF-1 $\alpha$  表达。将 HIF-1 $\alpha$  SiRNA 与 FLAG-PES1 共转染 CAOV-3 和 ES-2 细胞后,蛋白印迹结果表明,HIF-1 $\alpha$  SiRNA 明显抑制 PES1 引起的 HIF-1 $\alpha$  表达升高,而且 VEGF 的蛋白分泌量和 mRNA 水平也被明显抑制,说明 PES1 升高 VEGF 的表达依赖于 HIF-1 $\alpha$ (图 3、4)。

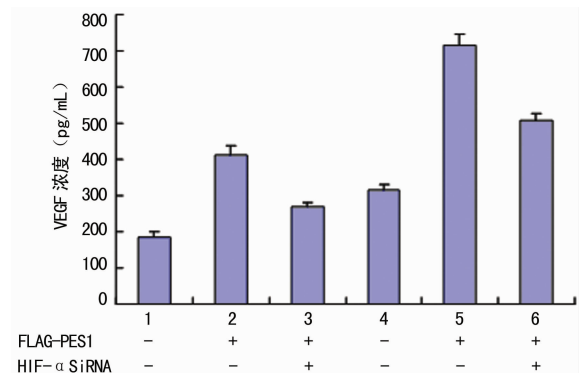


图 3 HIF-1 $\alpha$  SiRNA 对 PES1 引起的 VEGF 分泌的影响

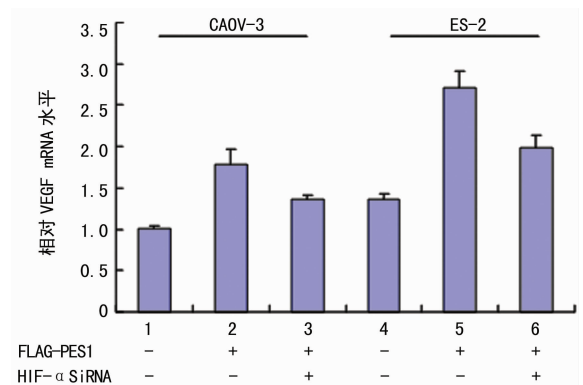


图 4 HIF-1 $\alpha$  SiRNA 对 PES1 引起的 VEGF 相对 mRNA 水平的影响

## 3 讨论

卵巢癌是妇科常见的恶性肿瘤之一,病死率居妇科恶性肿

瘤首位。由于卵巢位于盆腔深部,难以早期筛查,缺乏早期诊断方法,多数患者确诊时已处于晚期,预后差,长期以来人们一直为找到敏感的肿瘤标志物而努力。目前,卵巢癌发生的分子机制并不十分清楚,因此,进一步揭示卵巢癌发生、发展的分子机制,对指导卵巢癌的诊断和治疗具有重要的指导意义。

Pescadillo 在细胞增殖和细胞周期进程中起着极其重要的作用。在哺乳动物中,PES1 与上游结合因子(upstream binding factor,UBF1)一起在核糖体生物合成中起重要的作用,PES1 是核糖体生物合成所必需的,PES1 突变或缺陷会导致细胞周期阻滞<sup>[13-14]</sup>。PES1 在许多肿瘤细胞中过量表达。研究表明,外源性 Pescadillo 表达能够转化人、鼠的成纤维细胞,使其在软琼脂中发生、非依赖性生长<sup>[15]</sup>。雌激素能诱导乳腺癌细胞中 PES1 的表达,而且 PES1 在乳腺癌细胞中高表达;PES1 会引起细胞周期蛋白 D1 表达降低,而周期素依赖性蛋白激酶抑制剂 p27 升高,从而抑制乳腺癌细胞增殖和致瘤性<sup>[4,16]</sup>。这些表明 PES1 与细胞的转化、恶变密切相关,可能参与肿瘤的发生、发展。本研究的结果表明,PES1 在卵巢癌组织比在癌旁组织中表达明显升高,提示 PES1 可能在卵巢癌的发生、发展过程中起重要的作用。

活跃的血管生成是实体肿瘤生长和转移过程中普遍存在的病理现象,VEGF 是重要的血管生成因子。在肿瘤的发生过程中,其增生速度超过血管生成的速度而造成局部缺氧。HIF-1 $\alpha$  是缺氧状态下在细胞内的一种转录因子,其靶基因涉及肿瘤细胞能量代谢、血管生成、肿瘤转移和离子代谢等,在肿瘤发生、发展中的作用逐渐被重视。VEGF 是 HIF-1 $\alpha$  直接调节的下游靶基因。VEGF 和 HIF-1 $\alpha$  在卵巢癌组织表达明显升高,并在其发生、发展、转移等过程中起极其重要的作用。由于 90% 以上的卵巢癌起源于卵巢上皮细胞,因此,本研究用上皮性卵巢癌细胞 CAOV-3 和 ES-2 进行实验。结果表明,过表达 PES1 可以明显升高 CAOV-3 和 ES-2 细胞的 VEGF 分泌及其 mRNA 水平,可以升高 VEGF 的表达,同时 PES1 增强 HIF-1 $\alpha$  的表达。但报告基因的转录活性检测说明,PES1 不能直接调节 VEGF 的转录。将 HIF-1 $\alpha$  SiRNA 与 PES1 共转染细胞后,发现 HIF-1 $\alpha$  SiRNA 能明显抑制 PES1 诱导的 VEGF 分泌升高以及其 mRNA 水平的升高。说明 PES1 能通过 HIF-1 $\alpha$  通路升高 VEGF 的表达。但是 HIF-1 $\alpha$  SiRNA 没有完全抑制 PES1 诱导的 VEGF 表达升高,说明 PES1 可能还通过其他途径影响 VEGF 的表达。有研究表明,雌激素受体(ER)可以调节 VEGF 的表达,PES1 可以与 ER 相互作用并调节其下游基因的表达<sup>[17-18]</sup>。因此,PES1 可能通过 HIF-1 $\alpha$  途径影响 VEGF 的表达,当然这需要进一步的实验研究证明。

#### 参考文献:

[1] Allende mL, Amsterdam A, Becker T, et al. Insertional mutagenesis in zebrafish identifies two novel genes, pescadillo and dead eye, essential for embryonic development [J]. *Genes Dev*, 1996, 10(24): 3141-3155.

[2] Haque J, Boger S, Li J, et al. The murine Pes1 gene encodes a nuclear protein containing a BRCT domain [J]. *Genomics*, 2000, 70(2): 201-210.

[3] Kinoshita Y, Jarell AD, Flaman JM, et al. Pescadillo, a novel cell cycle regulatory protein abnormally expressed in malignant cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(9): 6656-

6665.

- [4] 张浩,李杰萍,王晓辉,等. Pescadillo 抗体的制备及其表达研究[J]. *中国科学 C 辑:生命科学*, 2007, 37(2): 135-142.
- [5] 张浩,方言,黄翠芬,等. 人 Pescadillo 能够诱导大规模染色质伸展[J]. *中国科学 C 辑:生命科学*, 2005, 35(1): 44-49.
- [6] Sikorski EM, Uo T, Morrison RS, et al. Pescadillo interacts with the cadmium response element of the human heme oxygenase-1 promoter in renal epithelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(34): 24423-24430.
- [7] Byungsik K, Seunghyun B, Seungkoo L, et al. Expression profiling and subtype-specific expression of stomach cancer [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(23): 8248-8255.
- [8] Li YW, Xin H, Maha H, et al. Gene expression profiling revealed novel molecular targets of docetaxel and estramustine combination treatment in prostate cancer cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(3): 389-398.
- [9] Weber A, Hengge UR, Stricker I, et al. Protein microarrays for the detection of biomarkers in head and neck squamous cell carcinomas [J]. *Hum Pathol*, 2007, 38(2): 228-238.
- [10] Li J, Yu L, Zhang H, et al. Down-regulation of pescadillo inhibits proliferation and tumorigenicity of breast cancer cells [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(12): 2255-2260.
- [11] 李杰萍,熊志红,杨智洪,等. 雌激素受体转录激活系统的构建[J]. *中华妇产科杂志*, 2008, 43(8): 611-614.
- [12] 李杰萍,张浩,杨树兴,等. 利用不同方法检测 RNAi 抑制人 Pescadillo 基因的表达 [J]. *细胞与分子免疫学*, 2007, 23(5): 1064-1065.
- [13] Lerch-Gaggl A, Haque J, Li JX, et al. Pescadillo is essential for nucleolar assembly, ribosome biogenesis, and mammalian cell proliferation [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(47): 45347-45355.
- [14] Prisco M, Maiorana A, Guerzoni C, et al. Role of pescadillo and upstream binding factor in the proliferation and differentiation of murine myeloid cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(12): 5421-5433.
- [15] Maiorana A, Tu X, Cheng GJ, et al. Role of pescadillo in the transformation and immortalization of mammalian cells [J]. *Oncogene*, 2004, 23(53): 7116-7124.
- [16] Li J, Yu L, Zhang H, et al. Down-regulation of pescadillo inhibits proliferation and tumorigenicity of breast cancer cells [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(12): 2255-2260.
- [17] Mueller MD, Vigne JL, Minchenko A, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(20): 10972-10977.
- [18] Cheng L, Li J, Han Y, et al. PES1 promotes breast cancer by differentially regulating ER $\alpha$  and ER $\beta$  [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(8): 2857-2870.