

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.36.004

c-cbl 基因沉默对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖和侵袭的影响*

付冲¹, 胡建国^{2△}

(1. 重庆市第五人民医院妇产科 400062; 2. 重庆医科大学第二附属医院妇产科 400010)

[摘要] **目的** 探讨 c-cbl 在卵巢癌的表达及其对卵巢癌细胞增殖、侵袭的影响。**方法** 通过免疫组织化学法(S-P 法)检测 c-cbl 蛋白在卵巢癌组织的表达;EdU 检测卵巢癌 SKOV3 细胞沉默 c-cbl 基因后细胞增殖能力变化;Transwell 检测卵巢癌 SKOV3 细胞侵袭能力;Western blot 检测 P21 蛋白和 P53 蛋白的表达。**结果** c-cbl 蛋白在卵巢癌中表达位于细胞质,在卵巢癌中,c-cbl 蛋白呈强阳性表达,在正常卵巢组织 c-cbl 蛋白呈弱阳性或者阴性表达。与正常卵巢组织比较,c-cbl 蛋白在卵巢癌表达明显增高($P<0.05$);c-cbl 蛋白在卵巢癌的表达与 FIGO 分期相关($P<0.05$);沉默卵巢癌 SKOV3 细胞 c-cbl 基因后,卵巢癌细胞增殖能力和侵袭能力降低($P<0.05$);沉默 c-cbl 基因后,P21 和 P53 蛋白表达上调($P<0.05$)。**结论** c-cbl 蛋白在卵巢癌表达上调,沉默 c-cbl 基因可能与上调 P21 和 P53 蛋白有关。

[关键词] c-cbl;卵巢肿瘤;细胞增殖;肿瘤侵袭**[中图分类号]** R737.31**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)36-5061-04

The effect on proliferation and invasion after silence c-cbl gene in ovarian cancer SKOV3 cell*

Fu Chong¹, Hu Jianguo^{2△}

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, the Fifth People's Hospital in Chongqing, Chongqing 400062, China;

2. Department of Obstetrics and Gynecology, Second Affiliated Hospital of Chongqing

Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] **Objective** To study the expression of c-cbl protein in ovarian cancer and its effect on proliferation and invasion in ovarian cancer cell. **Methods** The expression of c-cbl protein in ovarian tissue were detected by immunohistochemical(S-P method), the mRNA expression of c-cbl protein in ovarian cancer SKOV3 cells were detected, the proliferation ability and migration in ovarian cancer SKOV3 cells were detected by EdU assay and Transwell assay. Western blot was used to detect the expression of P21 and P53 protein. **Results** c-cbl was located in the cytoplasm in ovarian cancer tissues. c-cbl showed moderate or strong positive expression in ovarian cancer. In contrast, it showed weakly positive or negative expression in normal ovarian tissue. c-cbl expressed increased significantly in ovarian cancer compared with those of in normal ovarian tissue($P<0.05$);c-cbl expressed was associated with FIGO stage in ovarian cancer($P<0.05$);silence c-cbl expression in ovarian cancer SKOV3 cells decreased the proliferation and invasion($P<0.05$). Silence c-cbl expression increased the expression of P21 and P53 protein($P<0.05$). **Conclusion** c-cbl was increased expression in ovarian cancer tissues. Silence c-cbl expression may be related to increased expression of P21 and P53.

[Key words] c-cbl;ovarian neoplasms;cell proliferation;neoplasm invasiveness

卵巢癌是发病率位居第 2 位的女性生殖系统恶性肿瘤,其病死率却高居首位。卵巢癌早期诊断非常困难,临床上发现时通常为中晚期。同时,由于卵巢癌的化疗耐药以及复发等因素,导致卵巢癌患者 5 年生存率较低。近年来,关于卵巢癌的起源产生了很多新的学说,如:肿瘤干细胞学说,卵巢癌二元论学说以及卵巢癌输卵管起源学说等。这些都足以说明卵巢癌发生复杂,早期诊断困难。因此,有必要对卵巢癌进一步研究^[1]。c-cbl 是 CBL(the Casitas B-cell lymphoma)家族的 2 个重要成员。拥有连接体功能及 E3 泛素连接酶功能,其在表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)下调过程中发挥重要作用。研究发现,c-cbl 在胃癌、肺癌、前列腺癌和结肠癌的增殖和迁移中发挥重要作用。但是,目前尚无在卵巢癌中的报道^[2-5]。本文拟研究 c-cbl 蛋白在卵巢癌的表达及其功能。

1 材料与方法

1.1 实验方法

1.1.1 免疫组织化学法 卵巢癌标本组织芯片购买于西安艾丽娜生物科技有限公司。免疫组织化学法步骤按免疫组织化

学 S-P 法试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司)说明书操作:载玻片脱蜡、水化,然后在枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0;sigma 公司)中运用微波炉抗原修复 20 min,自然冷却至室温。PBS 液洗 3 min×3 次,3% H₂O₂ 室温孵育 15 min,PBS 液洗 3 min×3 次,5% 驴血清(ab7475, Abcam Company)37℃ 水浴 30 min,兔抗人 c-cbl 多克隆抗体(1:100, ab32027, abcam 公司,美国);4℃ 过夜,阴性对照用 PBS 代替一抗。37℃ 水浴 2 h,PBS 液洗 3 min×3 次,辣根过氧化物酶标记驴抗羊 IgG(1:300, bse-0294D,北京博奥森生物技术有限公司),PBS 液洗 3 min×3 次,辣根酶标记链霉卵白素工作液(北京博奥森生物技术有限公司)37℃ 水浴 30 min,PBS 液洗 3 min×3 次,二氨基联苯胺(DAB)显色。阴性对照用 PBS 代替一抗。阳性结果判定标准:所有切片的观察经 3 名病理科医生独立在光学显微镜下完成,每名病理科医生选择 22 个具有代表性的高倍视野(10×40 倍),计数每个标本阳性细胞数的比例。阳性结果标准按照 De Falco 等^[6]描述的方法判定并评分:0 分(阳性细胞数小于 1%);1 分(阳性细胞数占 1%~20%);2 分(阳性细胞数占 21%~40%);3 分(阳性细胞数占 41%~60%);4 分(阳性细

胞数超过 61%)。所有值用均值±标准差表示。

1.1.2 荧光定量 PCR 检测 c-cbl mRNA 的表达 用 Trozel (GIBCO) 抽提细胞总 RNA, 逆转录, PCR 扩增 c-cbl, 并扩增 GAPDH 作为内参物, 逆转录试剂盒和 RNA 提取试剂购自广州复能基因有限公司。c-cbl 引物以及荧光定量 PCR 试剂盒购于广州复能基因有限公司。反应条件: 预变性 95 °C 10 min, 95 °C 10 s, 60 °C 20 s, 72 °C 10 s, 重复 40 个循环。阴性对照以无 RNA 酶的水代替 cDNA 模板, 每例样品及对照均设 3 个平行复孔, 取平均值。反应结束后, 由软件自动得出荧光反应曲线以及每个标本反应体系的扩增效率 (efficiency) 及 CT 值, 实验不同时间重复 3 次。

1.1.3 c-cbl siRNA 由上海吉玛制药技术有限公司合成 以 0.25% 胰蛋白酶消化, 用 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基制成单细胞悬液, 接种于 6 孔培养板, 1.0×10^5 细胞/孔, 每孔 100 μ L。当细胞达 30%~50% 融合时用 RNAmate 转染 c-cbl siRNA, 终浓度为 5 nM。转染 48 h 后, 提取同一样品总 RNA 和总蛋白。

1.1.4 EdU 检测细胞增殖 EdU 购自广州锐博生物科技有限公司。按照 He 等^[7] 步骤检测。

1.1.5 细胞侵袭检测 用 24 孔 Boydem 趋化小室 (8 m, Becton Dickinson), 按照说明书方法进行。收获处理后 72 h 后的各实验组细胞, 用无血清培养液悬浮, 将 0.2 mL 细胞悬液 (1×10^6) 加入上室, 将含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液 600 μ L 加入下室, 每组设 3 个复孔。在 37 °C、以 5% CO₂ 条件下

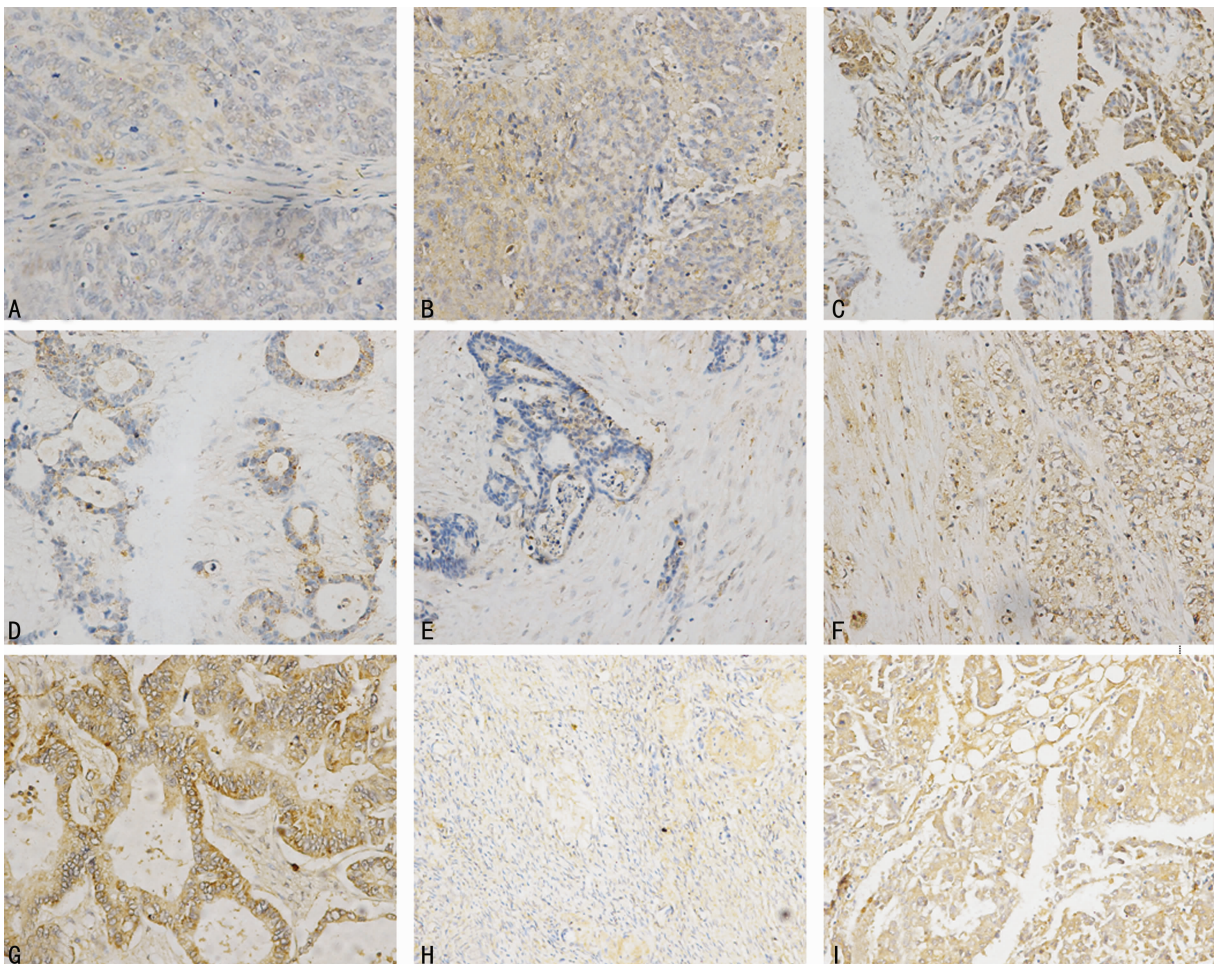
培养 24 h。取出膜, 用棉签去除上室底部未侵袭细胞, 甲醇固定, HE 染色, 光学显微镜下观察侵袭至膜上的细胞, 每孔计数 5 个高倍视野 ($\times 100$) 的细胞数。

1.1.6 P21 和 P53 蛋白检测 裂解组织以每孔 25 μ g 上样, 行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转移至 PVDF 膜, 依次加入兔抗人 P21 和 P53 多克隆抗体 (稀释度 1:500), 和辣根过氧化物酶标记驴抗羊 IgG, 化学荧光发光法 (ECL) 显影 (碧云天公司), 操作过程按说明书进行。用凝胶成像系统成像, 对结果进行灰度扫描分析, 相对表达量以 P21 和 P53 灰度面积积分分别与内参的比值计算。

1.2 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 实验数据为正态分布, 所有数据方差具有齐同性, 两组数据的比较采用独立样本 *t* 检验进行比较分析, 3 个或者 3 组以上的采用 one-way ANOVA 分析, c-cbl 和卵巢癌组织病理关系采用 Mann-Whitney U 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 免疫组织化学法染色结果 c-cbl 蛋白在卵巢癌组织腺癌、透明细胞癌、内胚窦癌、颗粒细胞瘤、无性细胞瘤、卵泡膜瘤、转移癌均呈阳性表达。在正常卵巢组织呈弱阳性或者不表达。c-cbl 在卵巢上皮性癌组织表达评分和正常卵巢组织比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。c-cbl 在晚期卵巢癌 (III/IV 期) 组织中表达比早期卵巢癌组织 (I/II 期) 明显增高。c-cbl 在不同年龄患者的卵巢癌组织的表达水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 1。



A: 浆液性卵巢癌 I 期; B: 浆液性卵巢癌 II 期; C: 浆液性卵巢癌 III 期; D: 黏液性腺癌 I 期; E: 内膜样腺癌 I 期; F: 透明细胞癌 II 期; G: 卵巢癌转移性腺癌; H: 正常卵巢组织; I: 肝癌组织 (阳性对照)。

图 1 免疫组织化学法检测 c-cbl 在卵巢癌组织的表达水平 ($\times 20$)

2.2 荧光定量 PCR 结果 卵巢癌 SKOV3 细胞中,沉默 c-cbl 后,与对照组比较,c-cbl mRNA 水平明显下调(图 2)。

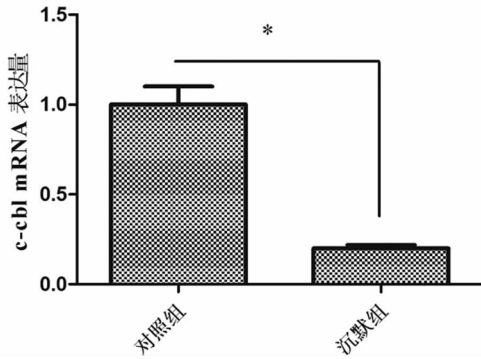


图 2 c-cbl siRNA 转染 SKOV3 细胞 48 h 后, c-cbl mRNA 和蛋白表达降低

2.3 Western blot 检测 c-cbl、P21 和 P53 蛋白水平的表达情况 卵巢癌 SKOV3 细胞转染 c-cbl siRNA 48 h 后,Western blot 结果显示:与对照组比较,c-cbl 蛋白水平下调,P21 和 P53 蛋白水平上调($P < 0.05$),见图 3。

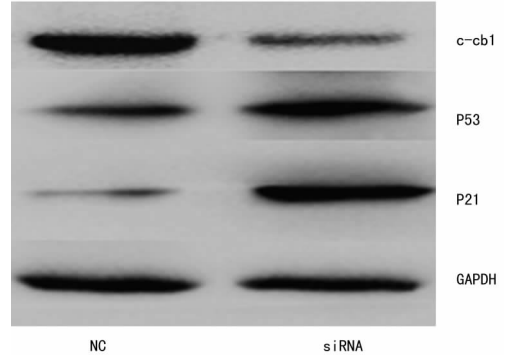
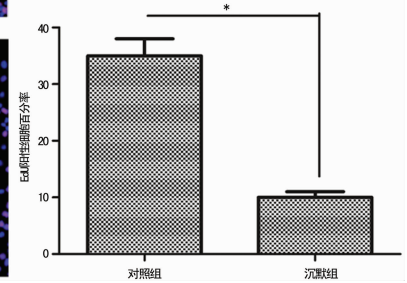
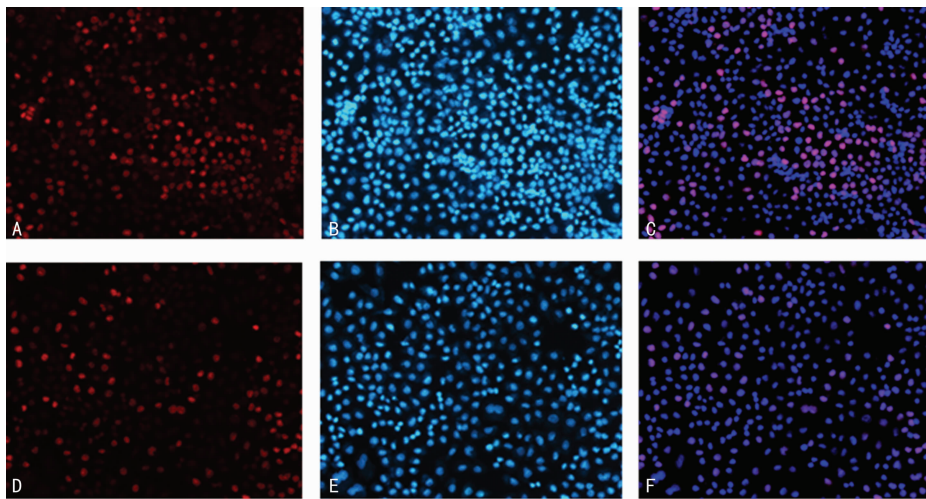


图 3 SKOV3 细胞沉默 c-cbl 后,c-cbl、P53 和 P21 蛋白水平变化

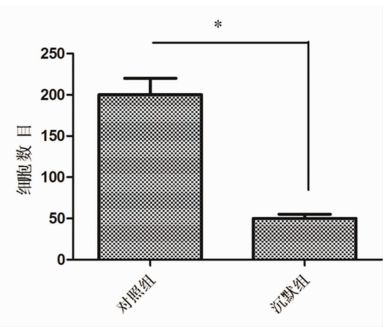
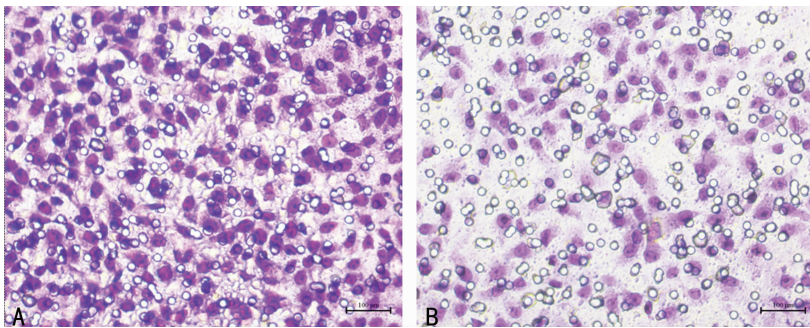
2.4 沉默 c-cbl 后,卵巢癌 SKOV3 细胞增殖能力降低 转染 c-cbl siRNA 48 h 后,采用 EdU 标记卵巢癌 SKOV3 细胞的增

殖能力。EdU 浓度为 10 μ M,加入卵巢癌 SKOV3 细胞中标记 4 h。后续检测步骤参照 Salic 等^[8]。作者发现,卵巢癌 SKOV3 细胞中 c-cbl 基因沉默 48 h 后,与对照组比较,细胞增殖率降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 4。



A、B 和 C 为同一视野下照片。A 为 EdU 标记,阴性对照;B 为 Hoechst 标记的细胞核;C 为 AB 的叠加;D 为转染 c-cbl siRNA 72 h 后卵巢癌 SKOV3 细胞增殖情况。* : $P < 0.05$,与对照组比较。

图 4 EdU 检测 SKOV3 细胞 c-cbl 基因沉默前、后细胞增殖能力的变化



A:对照组($\times 20$);B:siRNA 组($\times 20$);* : $P < 0.05$,与对照组比较。

图 5 Transwell 检测 SKOV3 细胞 c-cbl 基因沉默后的侵袭能力

3 讨 论

表皮生长因子受体是 erbB 家族的成员之一,是一种 170

$\times 10^3$ 的膜受体蛋白,具有酪氨酸激酶活性。结合生长因子能够活化细胞内信号转导,促进细胞的增殖,而受体本身则发生

内化及下调。c-cbl 是 CBL 家族的重要成员,具有连接功能以及 E3 泛素连接酶功能,能够靶向以 EGFR 为代表的一系列具有酪氨酸激酶活性的受体蛋白使之降解。在维持机体稳态中发挥重要作用。

自噬是细胞利用溶酶体消化受损细胞器及大分子物质并为细胞提供能量的过程,被称为“II型程序性死亡”,其功能异常与肿瘤的发生、发展密切相关。卵巢癌起病隐匿,预后差,晚期卵巢癌 5 年生存率仅 5%~15%^[9]。有研究发现,自噬与卵巢癌的发生、预后及治疗相关^[10]。Beclin1 等多种自噬相关基因在卵巢癌中表达下调,高表达自噬相关蛋白 PEA-15 的卵巢癌患者生存期更长,有望成为卵巢癌新的预后指标^[11]。有研究发现,CBL 拥有一个 LIR 结构域,这个结构域可以和自噬蛋白 LC3 相互作用,并且 CBL 可以作为 SRC 的受体从而调控自噬^[12]。

作者研究发现,c-cbl 蛋白主要表达于卵巢癌组织的细胞质。在卵巢癌不同组织来源,包括卵巢腺癌、透明细胞癌、内胚窦癌、颗粒细胞瘤、无性细胞瘤、卵泡膜瘤、转移癌均呈阳性表达。在正常卵巢组织呈弱阳性或者不表达。同时,作者体外实验发现,卵巢癌 SKOV3 细胞沉默 c-cbl 基因后,SKOV3 细胞侵袭能力和增殖能力均降低,说明 c-cbl 蛋白在卵巢癌过表达有利于卵巢癌的生长和侵袭。在胃癌当中,c-cbl 的高表达与胃癌的侵袭和发展有关,c-cbl 有可能成为胃癌新的分子标志物^[13]。因此,作者推测,c-cbl 蛋白在卵巢癌中高表达和卵巢癌的发生和发展有关,有可能成为一个新的标志物。

P21 基因是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂家族中的重要成员。一方面,P21 与肿瘤抑制作用相关,同时又能通过抑制周期素依赖激酶复合物活性,调整细胞周期、DNA 复制与修复之间的关系。进而将肿瘤抑制作用与细胞周期控制过程联系起来。P21 基因的发现、克隆及其在细胞周期控制与肿瘤发生中有重要作用^[14]。近年研究发现,P53 是一种肿瘤抑制基因,其基因编码的蛋白质是一种转录因子,控制着细胞周期的启动。和其他肿瘤抑制基因一样,P53 基因在正常情况下对细胞分裂起着减慢或监视的作用。在细胞周期中,P53 的调节功能主要体现在 G1 和 G2/M 期校正点的监测,与转录激活作用密切相关。P53 基因下游基因 P21 编码蛋白是一个依赖 Cyclin 的蛋白激酶抑制剂。P21 可与一系列 Cyclin-cdk 复合物结合,抑制对应的蛋白激酶活性,引起 Cyclin-cdk 无法磷酸化 Rb,非磷酸化状态的 Rb 保持与 E2F 的结合,导致 E2F 这一转录调节因子不能活化,引起 G1 期阻滞^[15]。作者研究发现,卵巢癌 SKOV3 细胞沉默 c-cbl 后,P21 和 P53 蛋白表达上调。提示 c-cbl 调控 SKOV3 细胞周期和增殖可能通过调控 P21 和 P53 蛋白引起。

综上所述,自噬调控基因 c-cbl 在卵巢癌组织表达增高,沉默 c-cbl 基因引起卵巢癌增殖能力和侵袭能力降低。c-cbl 可能作为卵巢癌治疗的一个靶点或者早期诊断的标志物。后续将继续深入研究 c-cbl 在卵巢癌中的作用机制。

参考文献

[1] 波蒂,昌晓红,沈丹华,等. 卵巢癌的二元论模型研究进展[J]. 中华妇产科杂志,2011,46(10):789-791.
[2] Cristobal I, Manso R, Rincon R, et al. Up-regulation of c-Cbl suggests its potential role as oncogene in primary colorectal cancer[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2014, 29(5):

641.
[3] Lo FY, Tan YH, Cheng HC, et al. An E3 ubiquitin ligase: c-Cbl; a new therapeutic target of lung cancer[J]. *Cancer*, 2011, 117(23):5344-5350.
[4] Knight JF, Shepherd CJ, Rizzo S, et al. TEAD1 and c-Cbl are novel prostate basal cell markers that correlate with poor clinical outcome in prostate cancer[J]. *Br J Cancer*, 2008, 99(11):1849-1858.
[5] Kamei T, Machida K, Nimura Y, et al. C-Cbl protein in human cancer tissues is frequently tyrosine phosphorylated in a tumor-specific manner[J]. *Int J Oncol*, 2000, 17(2):335-339.
[6] De Falco M, Fedele V, Cobellis L, et al. Pattern of expression of cyclin D1/CDK4 complex in human placenta during gestation[J]. *Cell Tissue Res*, 2004, 317(2):187-194.
[7] He Q, Man L, Ji Y, et al. Comparison in the biological characteristics between primary cultured sensory and motor Schwann cells[J]. *Neurosci Lett*, 2012, 521(1):57-61.
[8] Salic A, Mitchison TJ. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(7):2415-2420.
[9] Li H, Zeng J, Shen K. PI3K/AKT/mTOR signaling pathway as a therapeutic target for ovarian cancer[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2014, 290(6):1067-1078.
[10] Riahi A, Kharrat M, Lariani IA. High-resolution melting (HRM) assay for the detection of recurrent BRCA1/BRCA2 germline mutations in Tunisian breast/ovarian cancer families[J]. *Fam Cancer*, 2014, 13(4):603-609.
[11] De A, De A, Papasian C, et al. *Embllica officinalis* extract induces autophagy and inhibits human ovarian cancer cell proliferation, angiogenesis, growth of mouse xenograft tumors[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8):e72748.
[12] Zhou L, Yang H. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein promotes c-Cbl-independent poly-ubiquitylation and degradation of the activated EGFR[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9):e23936.
[13] 董茜,刘云鹏,曲秀娟,等. c-Cbl, Cbl-b 和 EGFR 在胃癌组织中的表达及其临床意义[J]. *癌症*, 2010, 29(1):59-64.
[14] Zhang HY, Zhang XL, Ji SF, et al. Sohlh2 inhibits ovarian cancer cell proliferation by upregulation of p21 and down-regulation of cyclin D1[J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(8):1863-1871.
[15] Li QL, Li J, Wen T, et al. Overexpression of HMGB1 in melanoma predicts patient survival and suppression of HMGB1 induces cell cycle arrest and senescence in association with p21 (Waf1/Cip1) up-regulation via a p53-independent, Sp1-dependent pathway[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(15):6387-6403.