

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.09.008

SFRP2 在抑制宫颈癌细胞株的增殖作用研究

兰 健, 刘晓云[△], 刘虹岚
(贵州省遵义市第一人民医院妇产科 563002)

[摘要] 目的 了解 SFRP2 在人宫颈癌组织中的表达变化,探讨 SFRP2 对宫颈癌细胞增殖的影响。方法 采用 Western bolt 及 qRT-PCR 检测 SFRP2 在宫颈癌组织中的表达;用慢病毒构建过表达 SFRP2 的人宫颈癌细胞株,并用 CCK-8 及平板克隆分析 SFRP2 对细胞增殖的影响;Western bolt 和 qRT-PCR 检测 SFRP2 在肿瘤细胞内对 WNT 通路的相关蛋白和基因表达的影响。结果 与癌旁组织相比,SFRP2 在人宫颈癌组织中低表达;过表达 SFRP2 的宫颈癌细胞增殖受抑制;SFRP2 抑制细胞增殖是通过 WNT 信号通路而发生。结论 SFRP2 作为宫颈癌新的候选基因作用有待深入研究。

[关键词] SFRP2;宫颈肿瘤;增殖;WNT 信号通路
[中图分类号] R246.3;R737.33;R73-3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)09-1179-03

Study on inhibition role of SFRP2 on cervical cancer cell line proliferation
Lan Jian, Liu Xiaoyun[△], Liu Honglan
(Department of Gynecology and Obstetrics, Zunyi Municipal First People's Hospital, Zunyi, Guizhou 563002, China)

[Abstract] **Objective** To understand the expression change of SFRP2 in human cervical cancer tissue and to investigate the effect of SFRP2 on cervical cancer cell proliferation. **Methods** The expression of SFRP2 in cervical cancer tissue was detected by using Western blot and qRT-PCR;the SFRP overexpressed human cervical cancer line was constructed by using lentivirus,the effect of SFRP2 on the proliferation of human cervical cancer cell line was analyzed by CCK-8 and plate cloning. The effect of SFRP2 on the expression of WNT pathway related proteins and genes in human cervical cancer cell was detected by Western Bolt and qRT-PCR. **Results** Compared with paracancerous tissue,SFRP2 was lowly expressed in human cervical cancer tissue;overexpressed SFRP2 cervical cancer cell proliferation was inhibited;SFRP2 inhibiting cellular proliferation was occurred via WNT signal pathway. **Conclusion** The role of SFRP2 as a candidate gene for cervical cancer remains to be deeply studied.

[Key words] SFRP2;uterine cervical neoplasms;proliferation;WNT signaling pathway

宫颈癌是目前病死率较高的一种女性生殖系统肿瘤,严重威胁妇女的生命和健康^[1]。随着对宫颈癌的认识不断深入,诊疗方法发展,然而患者生存期仍不佳。因此,从分子水平探索宫颈癌的发生、发展机制,争取宫颈癌的早期诊治,对改善患者的预后有重要的意义。SFRP2 基因属于编码 SFRP 家族的一个成员,其含有一个富含半胱氨酸的同源 Frizzled 蛋白,后者为公认的 WNT 结合位点^[2]。SFRPs 是一种 WNT 通路的抑制分子,可以负向调节 WNT 信号通路^[3],抑制许多肿瘤的增殖、侵袭转移及增加肿瘤的凋亡^[4]。因此,作者推测在宫颈癌组织中 SFRP2 的表达也可能发生变化,并可能参与调控宫颈癌细胞的生物学行为。为验证上述假设,本研究拟在宫颈癌及癌旁组织中检测 SFRP2 的表达变化,探索 SFRP2 对宫颈癌细胞增殖的影响及其机制,为临床提供宫颈癌治疗靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 宫颈癌及癌旁组织来源于本院妇产科 2015 年 1 月至 2015 年 6 月切除的、初诊为原发性宫颈癌的住院患者 4 例,年龄 55~70 岁,平均年龄 61 岁,已获患者知情同意及本院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HeLa 和 C-33A 人宫颈癌细胞均购自中国科学院细胞库,使用 DMEM 培养基(GIBCO 公司),10%胎牛血清(FBS,GIBCO 公司)。在 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中培养。取对数期生长良好的细胞进行实验。

1.2.2 细胞转染及稳转细胞系的构建 利用 PCR 的方法克

隆人 SFRP2 的全长编码序列并构建表达载体 pcDNA3.1-SFRP2。利用慢病毒将表达载体及空载转入宫颈癌细胞株 HeLa 和 C-33A。利用 G418 筛选单克隆细胞,建立 SFRP2 基因稳定高表达及空载体,并分别命名为 Lv-SFRP2 组(转染过表达 SFRP2 病毒的 HeLa 和 C-33A 细胞),对照组(转染空载体的 HeLa 和 C-33A 细胞)及 Blank 组(未转染病毒的野生型 HeLa 和 C-33A 细胞)。

1.2.3 CCK-8 细胞增殖检测 取 2 000 个/孔对数生长期的细胞接种于 96 孔培养板,设 3 个复孔,并设立空白对照。孵育 0、24、48、72 h 后,每孔加入 CCK-8(日本同仁公司),继续孵育 1 h 后,用自动酶标仪以 450 nm 波长检测各孔吸光度(A)值,取复孔吸光度平均值进行比较。为研究 SFRP2 对宫颈癌细胞增殖能力的影响,采用 CCK-8 法检测 SFRP2 正常表达与过表达时 HeLa 和 C-33A 细胞增殖能力的变化。

1.2.4 平板克隆形成检测细胞增殖 取对数生长期细胞,接种于 6 孔培养板中,每孔 500 个细胞。加入细胞的培养基,每组设 3 个复孔。然后将培养板移入 37℃孵育箱中孵育 12 d 左右。4%多聚甲醛固定 15 min,结晶紫染色 10 min。显微镜下观察、拍照,并计算其克隆形成数(含 50 个细胞以上的集落为 1 个克隆)。

1.2.5 Western blot 检测 细胞增殖汇合达 80%时弃去培养基,冷 PBS 洗 2 遍,细胞直接刮下吸入 1.5 mL 无酶离心管,加入裂解液 RIPA(提前加入终浓度为 1 mmol/L 的蛋白酶抑制剂 PMSF)200 μ L,冰上裂解 30 min 后,4℃、12 000 r/min 离

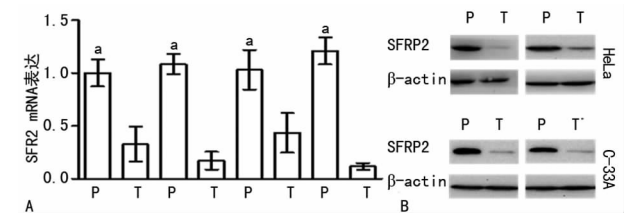
心 10 min, 吸取上清液至 1.5 mL 无酶离心管中, 用 BCA 法做标准曲线测蛋白浓度, 10% 分离胶、5% 浓缩胶进行电泳, 湿转法转膜, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 一抗于 4℃ 孵育过夜 (SFRP2, total- β -catenin, c-myc 和 Cyclin D1 抗体购买于 Abcam 公司, active- β -catenin 抗体购买于 Millipore 公司), TBST 洗膜 3 次, 二抗 (1:2 000) 于室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, ECL 发光试剂发光。为阐明 SFRP2 对宫颈癌细胞增殖的作用机制。用 Western blot 检测宫颈癌细胞株 (HeLa 和 C-33A) 用过表达 SFRP2 时对 WNT 信号通路的变化、c-myc 的变化及周期相关蛋白 Cyclin D1 的变化。

1.2.6 RT-PCR 检测 用 TRIzol 法提取 RNA (TRIzol 购于 Invitrogen 公司), 反转录合成 cDNA (反转录试剂盒 prime-Script™ RT kit 购于宝生物公司), 以其为模板, 用 SYBR premix Ex Taq™ Green II (购于 Takara 公司) 在 Real-time PCR 系统上 (BioRad, Hercules, CA, USA) 检测靶基因的 mRNA 水平。c-myc 引物 (上游: 5'-CCT GGT GCT CCA TGA GGA GAC-3', 下游: 5'-CAG ACT CTG ACC TTT TGC CAG G-3') Cyclin D1 引物 (上游: 5'-TCT ACA CCG ACA ACT CCA TCC G-3', 下游: 5'-TCT GGC ATT TTG GAG AGG AAG TG-3') 及内参 β -actin 的引物 (上游: 5'-CAC CAT TGG CAA TGA GCG GTT C-3', 下游: 5'-AGG TCT TTG CGG ATG TCC ACG T-3')。用 qRT-PCR 检测宫颈癌细胞株 (HeLa 和 C-33A) 过表达 SFRP2 时对 c-myc 和周期相关蛋白 Cyclin D1 的 mRNA 的变化。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件对数据进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SFRP2 在宫颈癌组织及癌旁组织中的 mRNA 和蛋白表达水平比较 宫颈癌组织中 SFRP2 的 mRNA 和蛋白水平均较癌旁组织明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1。



A: SFRP2 的 mRNA 表达; B: SFRP2 的蛋白表达; P: 癌旁组织; T: 宫颈癌; $a: P < 0.05$, 与癌旁组织比较。

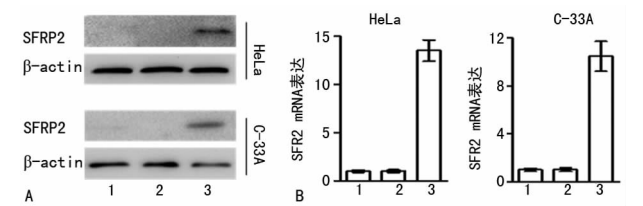
图 1 SFRP2 在宫颈癌及癌旁组织中的表达水平比较

2.2 宫颈癌细胞株 HeLa 和 C-33A 中 SFRP2 的过表达效果鉴定 在宫颈癌组织中, SFRP2 的 mRNA 及蛋白水平均低于癌旁组织。在 HeLa 和 C-33A 细胞中, 相比于 Blank 组, 对照组的 SFRP2 的 mRNA 和蛋白表达水平并无明显变化; 而 Lv-SFRP2 组 SFRP2 的表达水平较 Blank 组及对照组细胞明显升高 ($P < 0.05$), 见图 2。

2.3 CCK-8 检测宫颈癌细胞株 HeLa 和 C-33A 中 SFRP2 的过表后增殖的影响 在 4 d 的培养中, Blank 组和对照组的增殖能力并没有发生明显改变, 但 SFRP2 过表达 Lv-SFRP2 组细胞增殖能力明显低于前两组, 见图 3。

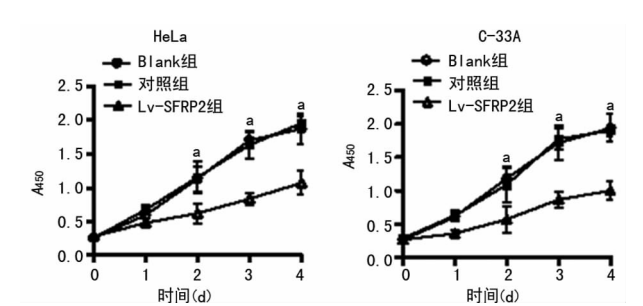
2.4 平板克隆检测宫颈癌细胞株 HeLa 和 C-33A 中 SFRP2 的过表后增殖的影响 平板克隆形成实验检测 SFRP2 对宫颈癌细胞增殖能力的影响, 结果显示, Blank 组和对照组的增殖

能力没有发生明显改变, 而在 SFRP2 过表达的 Lv-SFRP2 组细胞增殖能力明显低于前两组, 见图 4。



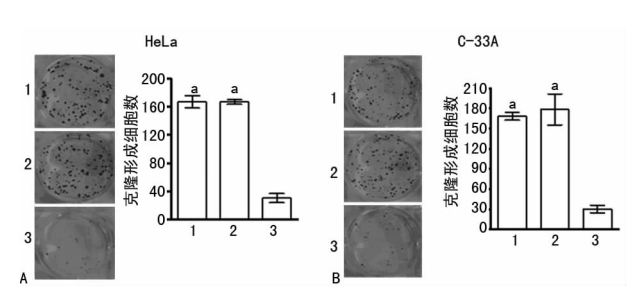
A: 转染病毒后 HeLa 和 C-33A 细胞 SFRP2 的蛋白表达; B: 转染病毒后 HeLa 和 C-33A 细胞的 mRNA 表达; 1: Blank 组; 2: 对照组; 3: Lv-SFRP2 组; $a: P < 0.05$, 与 Lv-SFRP2 组比较。

图 2 宫颈癌细胞株 HeLa 和 C-33A 中 SFRP2 的过表达



$a: P < 0.05$, 与 0、1 d 比较。

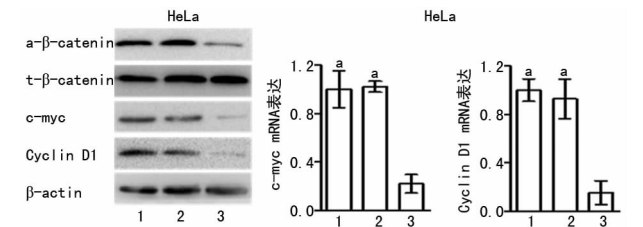
图 3 CCK-8 法检测宫颈癌细胞株 HeLa 和 C-33A 中 SFRP2 的过表达



1: Blank 组; 2: 对照组; 3: Lv-SFRP2 组; $a: P < 0.05$, 与 Lv-SFRP2 组比较。

图 4 平板克隆形成实验检测宫颈癌细胞株 HeLa 和 C-33A 中 SFRP2 的过表达

2.5 SFRP2 对宫颈癌细胞的抑制作用 WNT 信号被激活后, c-myc 蛋白表达降低, Cyclin D1 蛋白表达减少; c-myc 和 Cyclin D1 的 mRNA 表达减少, 见图 5。



a- β -catenin: 激活型的 β -catenin; t- β -catenin: 总的 β -catenin; 1: Blank 组; 2: 对照组; 3: Lv-SFRP2 组; $a: P < 0.05$, 与 Lv-SFRP2 组比较。

图 5 宫颈癌 HeLa 细胞株过表达 SFRP2 时对 WNT 信号通路的影响

3 讨 论 宫颈癌是全球女性恶性肿瘤中仅次于乳腺癌的恶性肿瘤^[5], 严重危害女性健康。据统计, 全世界每年有 20 多万妇女死于宫颈癌^[6]。而宫颈癌的发生、发展是多因素共同作用下的

结果,由于目前有关调控宫颈癌发生、发展的分子机制尚未完全阐明,用以指导临床的研究更为缺乏,所以中晚期宫颈癌的疗效不佳。因而,探讨宫颈癌发生、发展的分子机制,寻找宫颈癌治疗靶点,对于提高宫颈癌的疗效具较大的临床意义与社会价值。

SFRP2 属于一种分泌型卷曲相关蛋白族组成的 SFRPs,该家族主要成员包括 SFRP1~5,均为 WNT/ β -catenin 信号通路的抑制蛋白^[7-8]。众所周知,WNT 信号通路在肿瘤的发生、胚胎发育和神经退行性疾病均发挥着重要的作用^[9],并已被广泛的在人类癌症研究。研究表明,WNT 信号通路在非小细胞肺癌(NSCLC)^[10]和白血病^[11]等多种人类肿瘤中被异常激活。有研究报道,SFRP2 可通过影响 SLUG、TWIST 和 SNAIL 这 3 个参与上皮间质转化(EMT)的转录因子,从而增加上皮细胞的标志物 E-cadherin 的表达,最后抑制宫颈癌的侵袭转移^[12]。Luo 等^[13]研究发现,在黑色素瘤中 SFRP2 启动子发生甲基化,造成该基因表达降低,激活 WNT 通路;使用 DNA 甲基化抑制剂后,SFRP2 表达增加,并可促进黑色素瘤的侵袭转移能力。此外,Xiao 等^[14]在口腔鳞状细胞癌中研究发现,SFRP2 的 mRNA 水平较癌旁减少,同时,SFRP2 启动子发生了超甲基化,通过激活 WNT 通路,增加了口腔鳞状细胞癌细胞的增殖能力。Yamamura 等^[15]在体外和体内研究中发现,减少肾肿瘤细胞的 SFRP2 表达可以明显促进肿瘤的生长;相反,稳定过表达 SFRP2 可以通过增加细胞 G₂ 期阶段的比例,抑制肿瘤的生长、诱导细胞产生凋亡。研究人员还发现,稳定过表达 SFRP2 的细胞系中,磷酸化 β -catenin 水平升高。同时可观察到 c-fos、Bcl-2、Bcl-w、cyclin B2 及细胞周期蛋白 E₂ 基因的表达增加与 p53 的表达下降;SFRP2 激活 WNT 通路而引起的不同信号转导通路的改变,促进了肾癌细胞的生长。可见 SFRP2 可从多个角度,调控多种肿瘤的 WNT 通路活性,在肿瘤的发生、发展过程中起重要作用。

目前 SFRP2 对宫颈癌细胞增殖的影响鲜见报道,为了初步探讨 SFRP2 在宫颈癌发生、发展中可能的重要作用,本研究用临床标本,检测了 SFRP2 的表达,发现在宫颈癌组织中 SFRP2 呈低表达状态;提示 SFRP2 异常表达很可能为促癌因子,参与宫颈癌的发生、发展过程。随后作者在体外部分的研究发现,通过 CCK-8 和平板克隆形成实验发现过表达 SFRP2 可以抑制宫颈癌的增殖能力,且 SFRP2 的这种效应与抑制 WNT 信号通路及其下游靶基因 c-myc 和 Cyclin D1 等基因和蛋白的表达水平密切相关。

综上所述,本研究首次发现了 SFRP2 参与宫颈癌发生、发展的可能机制,同时也加深了作者对 SFRP2 蛋白参与调控肿瘤生物学行为的认识,并为宫颈癌的诊断提供了方向,也为治疗宫颈癌新药的作用靶点提供了新的实验证据,值得进一步深入研究。

参考文献

- [1] Hellquist H,Skalova A,Barnes L,et al. Cervical lymph node metastasis in high-grade transformation of head and neck adenoid cystic carcinoma: a collective international review[J]. Adv Ther,2016,33(3):357-368.
- [2] Courtwright A,Siamakpour-Tellani S,Arbiser JL,et al. Secreted frizzle-related protein 2 stimulates angiogenesis via a calcineurin/NFAT signaling pathway[J]. Cancer

- Res,2009,69(11):4621-4628.
- [3] Roth W,Wild-Bode C,Platten M,et al. Secreted Frizzled-related proteins inhibit motility and promote growth of human malignant glioma cells[J]. Oncogene,2000,19(37):4210-4220.
- [4] Jia Y,Yang Y,Brock MV,et al. Epigenetic regulation of DACT2,a key component of the Wnt signalling pathway in human lung cancer[J]. J Pathol,2013,230(2):194-204.
- [5] Chang B,Kim J,Jeong D,et al. Klotho inhibits the capacity of cell migration and invasion in cervical cancer[J]. Oncol Rep,2012,28(3):1022-1028.
- [6] Fragoso-Ontiveros V,Alvarez-Garcia MR,Contreras-Paredes A,et al. Gene expression profiles induced by E6 from non-European HPV18 variants reveals a differential activation on cellular processes driving to carcinogenesis[J]. Virology,2012,432(1):81-90.
- [7] Mirotso M,Zhang Z,Deb A,et al. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2007,104(5):1643-1648.
- [8] Xiao X,Xiao Y,Wen R,et al. Promoting roles of the secreted frizzled-related protein 2 as a Wnt agonist in lung cancer cells[J]. Oncology reports,2015,34(5):2259-2266.
- [9] Klaus A,Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer[J]. Nat Rev Cancer,2008,8(5):387-398.
- [10] Uematsu K,He B,You L,et al. Activation of the Wnt pathway in non small cell lung cancer:evidence of dishevelled overexpression[J]. Oncogene,2003,22(46):7218-7221.
- [11] Aly RM,Taalab MM,Abdsalam EM. Prognostic significance of secreted frizzled-related protein 2 expression in cytogenetically normal primary acute myeloid leukemia[J]. Am J Med Sci,2015,350(5):369-373.
- [12] Chung MT,Lai HC,Sytwu HK,et al. SFRP1 and SFRP2 suppress the transformation and invasion abilities of cervical cancer cells through Wnt signal pathway[J]. Gynecol Oncol,2009,112(3):646-653.
- [13] Luo X,Wei B,Chen A,et al. Methylation-mediated loss of SFRP2 enhances melanoma cell invasion via Wnt signaling[J]. Am J Transl Res,2016,112(3):1502-1509.
- [14] Xiao C,Wang L,Zhu L,et al. Secreted frizzledrelated protein 2 is epigenetically silenced and functions as a tumor suppressor in oral squamous cell carcinoma[J]. Mol Med Rep,2014,10(5):2293-2298.
- [15] Yamamura S,Kawakami K,Hirata H,et al. Oncogenic functions of secreted Frizzled-related protein 2 in human renal cancer[J]. Mol Cancer Ther,2010,9(6):1680-1687.