

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.22.005

靶向干扰 Livin 对 HEC-1-A 细胞侵袭迁移能力的影响*

王晓华, 张玉娟[△]

(承德医学院附属医院妇科, 河北承德 067000)

[摘要] **目的** 探讨靶向抑制 Livin 对子宫内 膜癌细胞株(HEC-1-A)细胞侵袭及迁移能力的影响。**方法** 将 Livin 的特异性小分子干扰 RNA(Livin-siRNA)和阴性对照序列(Livin-NC)应用脂质体法转染 HEC-1-A 细胞, 试验分为 Livin-si 组、Livin-NC 组和 Livin-B 组。应用 qRT-PCR 及 Western blot 法检测转染 Livin-siRNA 后, Livin mRNA 及蛋白表达情况。Transwell 小室试验观察干扰 Livin 后, HEC-1-A 细胞侵袭及迁移能力的变化。**结果** qRT-PCR 和 Western blot 结果显示, Livin-si 组 Livin mRNA 及蛋白相对表达量明显减少($P < 0.01$)。侵袭及迁移试验结果显示, 抑制 Livin 表达后, Livin-si 组穿膜细胞数明显减少($P < 0.01$)。**结论** Livin-siRNA 能有效抑制 Livin 在 HEC-1-A 细胞中的表达, 靶向干扰 Livin 可明显减弱 HEC-1-A 细胞的侵袭及迁移能力。

[关键词] 子宫内 膜癌; Livin; siRNA; 侵袭; 迁移

[中图法分类号] R737.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)22-2901-04

Effects of target Livin interference on invasion and migration ability of HEC-1-A cells*WANG Xiaohua, ZHANG Yujuan[△]

(Department of Gynecology, Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde, Hebei 067000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of targeted inhibition of Livin on the invasion and migration of endometrial carcinoma HEC-1-A cells. **Methods** Livin-specific small interfering RNA (Livin-siRNA) and negative control sequence (Livin-NC) were transfected into HEC-1-A cells by liposome method. The experiment was divided into Livin-si group, Livin-NC group and Livin-B group. The expression of Livin mRNA and protein was detected by qRT-PCR and Western blot after transfection of Livin-siRNA. Transwell chamber was used to observe the changes of cell invasion and migration after Livin interference. **Results** qRT-PCR and Western blot results showed that the expression level of Livin mRNA and protein in Livin-si group was significantly decreased ($P < 0.01$). The invasion and migration experiment results showed that the number of transmembrane cells after inhibiting Livin expression in the Livin-si group was significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** Livin-siRNA can effectively inhibit the expression of Livin in HEC-1-A cells. Target-interfering Livin can significantly weaken the invasion and migration ability of HEC-1-A cells.

[Key words] endometrial carcinoma; Livin; siRNA; invasion; migration

子宫内 膜癌发病率逐年上升, 早期患者经外科手术治疗预后较好, 但晚期患者的中位生存时间不超过 1 年^[1], 侵袭转移是影响晚期肿瘤患者生存率的重要因素。Livin 基因是凋亡蛋白抑制因子(IAPs)家族中的一员, 目前对 Livin 的研究主要集中在其抗细胞凋亡方面, 而对子宫内 膜癌细胞侵袭及迁移能力的影响目前鲜有报道。本研究应用 RNA 干扰技术特异性下调 Livin 基因表达水平, 观察 Livin 对子宫内 膜癌细胞株(HEC-1-A)细胞侵袭及迁移能力的调控作用。

1 材料与方法**1.1 材料**

1.1.1 细胞株 HEC-1-A 细胞株购自广州吉妮欧公司。

1.1.2 小分子干扰 RNA 特异性小分子干扰 RNA (Livin-siRNA)和阴性对照序列(Livin-NC)由苏州吉玛公司设计合成。

1.1.3 主要试剂 Lipofectamine 2000、SYBR Green qPCR SuperMIX-UDG 购自美国 Invitrogen 公司;

Trizol 购自美国 Ambion 公司; Takara RNA PCR TM KIT(AMV) Ver. 3.0 购自日本 TaKaRa 公司; Livin, β -actin 兔多克隆抗体购自英国 Abcam 公司; Transwell 小室购自美国 Corning 公司; Matrigel matrix Basement membrane 购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染

在转染前 24 h 将细胞以 1×10^5 /mL 密度接种在 6 孔板中,使转染期间细胞丰度为 30%~50%。根据 Lipofectamine 2000 说明进行转染试剂的制备。试验分为 Livin-si 组(转染 Livin-siRNA 干扰序列)、Livin-NC 组(转染 Livin-NC 阴性对照序列)和 Livin-B 组(正常培养的 HEC-1-A 细胞)。转染 6 h 后弃去原培养基,更换为含 10% 胎牛血清(FBS)培养基继续培养。

1.2.2 qRT-PCR 检测 Livin mRNA 表达

转染后 48 h,用预冷却的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 6 孔板中的细胞 2 次,Trizol 法提取细胞总 RNA。由大连宝生物公司设计合成目的基因 Livin 及内参基因 GAPDH 的引物序列(表 1)。根据 Takara RNA PCR TM KIT(AMV) Ver. 3.0 说明书逆转录合成 cDNA 第 1 条链,应用 SYBR Green qPCR SuperMIX-UDG 试剂盒进行 qRT-PCR 反应。反应条件:95 °C 3 min 共 1 循环,95 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s 共 40 循环,然后 95 °C 1 min,60 °C 30 s,95 °C 30 s 进行熔解曲线分析。应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目的基因相对表达量。

表 1 Livin 和 GAPDH 引物序列

基因	序列	长度(bp)
Livin	上游:5'-ACGGAGCATGCCAAGTGGT-3'	78
	下游:5'-CTGCACACTGTGGACAAAGTCTCT-3'	
GAPDH	上游:5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'	138
	下游:5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGGA-3'	

1.2.3 Western blot 检测 Livin 蛋白表达

转染后 48 h 收集各组细胞,将蛋白裂解液加入细胞沉淀中并在冰浴中孵育 30 min。BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白含量后,取 50 μ g 进行凝胶电泳,分离蛋白并电转到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,5%脱脂奶粉封闭 2 h,一抗(1:1 000)4 °C 孵育过夜,二抗(1:3 000)孵育 1 h。电化学发光(ECL)超敏化学发光液显影,Tanon 6100 化学发光图像分析系统进行成像分析,目的蛋白 Livin 与内参蛋白 β -actin 的光密度比值计算 Livin 的相对表达量。

1.2.4 Transwell 小室侵袭及迁移试验

使用 Corning 的小室模型,Matrigel 基质胶 1:5 稀释后每个小室 100 μ L 均匀包被小室基底膜。收集转染 48 h 后各组细胞,加入 DMEM 培养基制备单细胞悬液,调整细

胞密度至 4×10^5 /mL,上室加入 100 μ L 细胞悬液,下室加入 600 μ L 含 20% FBS 培养基。培养 36 h 甲醇固定,结晶紫染色,树脂封片。显微镜下观察 6 个视野细胞数量计数取平均值,每组 3 个小室。迁移试验不用包被 Matrigel 基质胶,培养箱孵育时间为 26 h,其余同细胞侵袭试验。

1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK 法,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 qRT-PCR 检测转染后 Livin mRNA 表达情况

Livin-si 组与 Livin-NC 组、Livin-B 组比较,Livin mRNA 相对表达量明显减少,差异有统计学意义($F = 95.976, P = 0.007$);Livin-NC 组与 Livin-B 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 1。

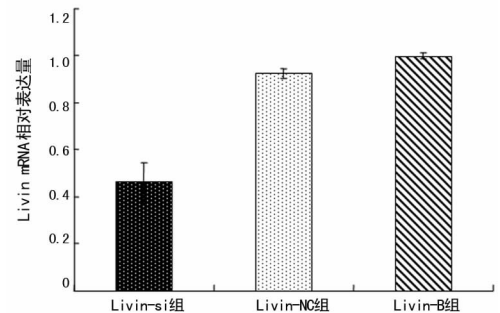
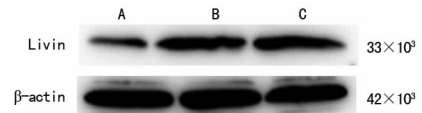


图 1 转染后 3 组细胞 Livin mRNA 比较

2.2 Western blot 检测转染后 Livin 蛋白表达情况

Livin-si 组比较 Livin-NC 组、Livin-B 组,Livin 蛋白相对表达量明显较少,差异有统计学意义($F = 603.705, P = 0.002$);Livin-NC 组与 Livin-B 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 2、3。



A: Livin-si 组; B: Livin-NC 组; C: Livin-B 组

图 2 3 组细胞 Western blot 蛋白条带

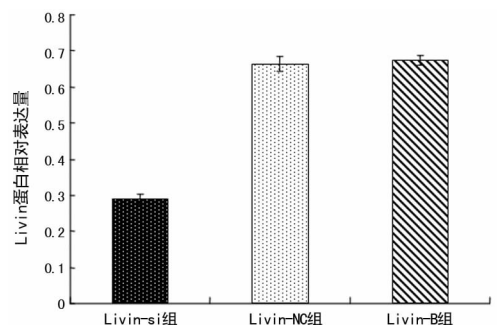
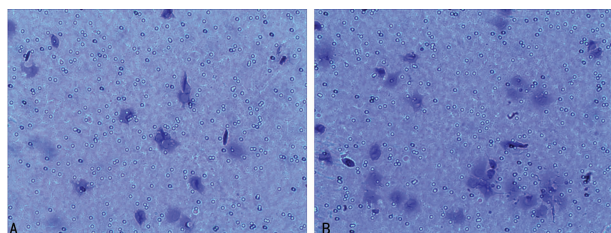


图 3 转染后 3 组细胞 Livin 蛋白表达比较

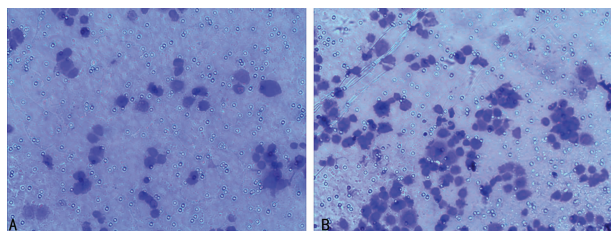
2.3 干扰 Livin 表达后细胞侵袭及迁移能力变化

Transwell 小室侵袭试验中, Livin-si 组与 Livin-NC 组、Livin-B 组比较, 穿膜细胞数明显减少, 差异有统计学意义 ($F=41.026, P=0.001$)。迁移试验中, 与 Livin-NC 组和 Livin-B 组相比, Livin-si 组穿膜细胞数同样明显减少, 差异有统计学意义 ($F=42.058, P<0.01$), 见图 4~6。



A: Livin-si 组; B: Livin-NC 组

图 4 干扰 Livin 表达后细胞侵袭能力变化 (结晶紫染色, $\times 200$)



A: Livin-si 组; B: Livin-NC 组

图 5 干扰 Livin 表达后细胞迁移能力变化 (结晶紫染色, $\times 200$)

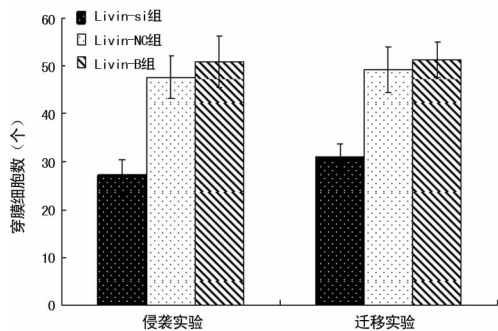


图 6 干扰 Livin 表达后 3 组穿膜细胞数比较

3 讨 论

子宫内膜癌发病率逐年上升且呈低龄化趋势发展, 尤其是 II 型内膜癌因其更具有早期侵袭转移的倾向, 临床预后更差, 控制其浸润和转移则成为临床治疗中亟待解决的问题^[2-3]。目前对于恶性肿瘤的治疗方法, 除了手术和放化疗外, 基因靶向治疗为恶性肿瘤的治疗提供了新的方向^[4]。基因靶向治疗的策略是通过制备正常基因代替存在遗传缺陷的基因, 或关闭、抑制异常基因的表达。

Livin 是 IAPs 家族的成员, 编码 Livin 的杆状病毒 IAP 重复序列 7 (BIRC7) 基因位于人类染色体

20q13.3 上, 长度为 46 kb, 包含 7 个外显子和 6 个内含子。研究表明 Livin 在淋巴瘤、白血病、黑色素瘤、乳腺癌、胃肠肿瘤、肝癌、肺癌、宫颈癌等一些肿瘤组织中特异性高表达^[5-11]。孙炯等^[12-14]研究发现 Livin 在子宫内膜癌中存在异常高表达, 并且与子宫内膜癌的分期、病理分级、淋巴结转移显著相关。大量的研究报道主要是针对 Livin 基因促进肿瘤细胞增殖、抑制其凋亡的作用。然而, 最近的研究表明 Livin 不仅参与了肿瘤细胞的抗凋亡机制, 同时还在肿瘤细胞的侵袭及转移过程中发挥作用^[15-16]。LIU 等^[17]研究表明, Livin 可以促进肝癌 HepG2 细胞的侵袭及转移能力。ZHAO 等^[18]研究发现, Livin 在胃癌 BGC832 细胞的侵袭转移中发挥了重要作用, 干扰 Livin 表达可明显抑制 BGC832 细胞的侵袭转移能力。

本课题选择生物学行为更具侵袭性的 HEC-1-A 细胞(中低分化腺癌)作为研究对象, 构建 Livin 的小分子干扰 RNA, 转染细胞后, qRT-PCR 和 Western blot 分析评估 Livin mRNA 和蛋白质的表达水平。研究结果表明, 用 Livin-siRNA 转染的 HEC-1-A 细胞 Livin 表达水平下调, 表明所选靶序列的有效性。抑制 Livin 表达后, HEC-1-A 细胞的侵袭和迁移能力明显减弱。CHEN 等^[19]研究显示, 在前列腺癌 PC-3、DU-145 细胞系中, Livin 是通过 NF- κ B 信号通路调节大分子糖蛋白 FN, 进而调节前列腺癌细胞的侵袭能力。但 Livin 调节 HEC-1-A 细胞侵袭及迁移能力的具体分子机制目前尚不明确, 是否也通过上述信号通路调节尚需进一步研究证实。

综上所述, Livin 在子宫内膜癌的侵袭及转移中发挥了一定的作用, 干扰 Livin 表达可以为子宫内膜癌的靶向治疗提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] KITCHENER H. Management of endometrial cancer[J]. Eur J Surg Oncol, 2013, 32(7): 838-843.
- [2] GRAMMATIKAKIS I E, BOTSIS D C, GRIGIRIOU O V, et al. Fibronectin plasma levels in gynecological cancer [J]. J Buon, 2010, 15(1): 122-126.
- [3] LEBLANG E, NARDUCCI F. Cancer of the endometrium [J]. Rev Med Suisse, 2015, 3(133): 2616-2618.
- [4] GUINN B A, MULHERKAR R. International progress in cancer gene therapy[J]. Cancer Gene Ther, 2013, 15(12): 765-775.
- [5] CRNKOVIC M I, SEMZOW J, HOPPE S F, et al. Isoform-specific silencing of the Livin gene by RNA interference defines Livin beta as key mediator of apoptosis inhibition in HeLa cells[J]. J Mol Med, 2012, 84(3): 232-240.
- [6] 金翠香, 王雅琴, 徐昌青. 凋亡抑制蛋白 Livin 与消化道肿

- 瘤关系的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(17): 1737-1740.
- [7] NEDELCO T, KUBISTA B, KOLLER A, et al. Livin and Bcl-2 expression in high-grade osteosarcoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2013, 134(2): 237-244.
- [8] KEMPENSTEFFEN C, HINZ S, KRAUSE H, et al. Expression of splicing variants of the inhibitor of apoptosis Livin in testicular germ cell tumors[J]. *Tumor Biol*, 2014, 29(2): 76-82.
- [9] KITAMURA H, HONMA I, TORIGOE T, et al. Expression of Livin in renal cell carcinoma and detection of anti-livin autoantibody in patients[J]. *Urology*, 2007, 70(1): 38-42.
- [10] 武延格, 孙学峰. HIF-1 与 Livin 蛋白在肺腺癌及鳞癌组织中的表达及其临床意义[J]. *江苏大学学报·医学版*, 2017, 27(5): 445-448.
- [11] 郭亚荣, 柴宝, 贾军梅. 沉默 Livin 基因表达对人肝癌 HepG2 细胞生物学特性的影响[J]. *中国药物与临床*, 2015, 15(2): 176-178.
- [12] 孙炯, 杨留才, 李仕红, 等. Livin 与 Caspase-3 在子宫内膜癌组织中的表达水平及相关性研究[J]. *医学综述*, 2014, 20(9): 1708-1710.
- [13] 王晓华, 张玉娟. 靶向抑制 Livin 表达对子宫内膜癌细胞增殖、侵袭及迁移能力的影响[J]. *山东医药*, 2018, 58(10): 39-41.
- [14] 秦燕, 王肖力. Livin、Beclin-1 在子宫内膜癌中的表达及临床意义[J]. *肿瘤学杂志*, 2015, (2): 128-132.
- [15] GYRD-HANSEN M, MEIER P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-KappaB, inflammation and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(8): 561-574.
- [16] SRINIVASULA S M, ASHWELL J D. IAPs; what's in a name? [J]. *Mol Cell*, 2008, 30(2): 123-135.
- [17] LIU F, CHANG H, XU W, et al. The effects of Livin shRNA on the response to cisplatin in HepG2 cells[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(5): 2957-2961.
- [18] ZHAO C L, HAN S N, WANG Z J, et al. Concomitant modulation of PTEN and Livin in gastric cancer treatment[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(5): 2901-2908.
- [19] CHEN F, YANG D, WANG S, et al. Livin regulates prostate cancer cell invasion by impacting the NF- κ B signaling pathway and the expression of FN and CXCR4[J]. *IUBMB Life*, 2012, 64(3): 274-283.
- (收稿日期: 2017-11-24 修回日期: 2018-05-12)
- (上接第 2888 页)
- [20] WEI S C, LEVINE J H, COGDILL A P, et al. Distinct cellular mechanisms underlie Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 checkpoint blockade[J]. *Cell*, 2017, 170(6): 1120-1133.
- [21] HELLMANN M D, RIZVI N A, GOLDMAN J W, et al. Nivolumab plus ipilimumab as first-line treatment for advanced non-small-cell lung cancer (CheckMate 012): results of an open-label, phase 1, multicohort study[J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18(1): 31-41.
- [22] HELLMANN M D, CIULEANU T E, PLUZANSKI A, et al. Nivolumab plus ipilimumab in lung cancer with a high tumor mutational burden[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(22): 2093-2104.
- [23] MEDLER T R, COTECHINI T, COUSSENS L M. Immune response to cancer therapy: mounting an effective antitumor response and mechanisms of resistance [J]. *Trend Cancer*, 2015, 1(1): 66-75.
- [24] GALLUZZI L, BUQUE A, KEPP O, et al. Immunological effects of conventional chemotherapy and targeted anti-cancer agents[J]. *Cancer Cell*, 2015, 28(6): 690-714.
- [25] GANDHI L, RODRIGUEZ-ABREU D, GADGEEL S, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy in metastatic non-small-cell lung cancer[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(22): 2078-2092.
- [26] CHEN D S, MELLMAN I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle[J]. *Immunity*, 2013, 39(1): 1-10.
- [27] OTT P A, HODI F S, BUCHBINDER E I. Inhibition of immune checkpoints and vascular endothelial growth factor as combination therapy for metastatic melanoma: an overview of rationale, preclinical evidence, and initial clinical data[J]. *Front Oncol*, 2015(5): 202.
- [28] AHN M J, YANG J, YU H, et al. 136O: osimertinib combined with durvalumab in EGFR-mutant non-small cell lung cancer; results from the TATTON phase Ib trial[J]. *J Thorac Oncol*, 2016, 11(4 Suppl): S115.
- [29] GIBBONS D L, CHOW L Q, KIM D W, et al. 57O efficacy, safety and tolerability of MEDI4736 (durvalumab [D]), a human IgG1 anti-programmed cell death-ligand-1 (PD-L1) antibody, combined with gefitinib (G): A phase I expansion in TKI-naive patients (pts) with EGFR mutant NSCLC[J]. *J Thorac Oncol*, 2016, 11(4 Suppl): S79.
- [30] GONG J, LE T Q, MASSARELLI E, et al. Radiation therapy and PD-1/PD-L1 blockade: the clinical development of an evolving anticancer combination[J]. *J Immun Cancer*, 2018, 6(1): 46.
- (收稿日期: 2018-06-18 修回日期: 2018-07-13)