

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.05.008

· 基础研究 ·

RNA 干扰 *CTSL* 表达抑制卵巢癌细胞的侵袭和转移

王素梅^a, 李力^b, 张玮^b, 黎丹戎^b, 唐步坚^b(广西医科大学 a. 第一附属医院 妇产科; b. 附属肿瘤医院 妇科, 广西南宁 530021)

[摘要] 目的: 构建组织蛋白酶 L 基因(cathepsin L, *CTSL*)RNAi 的真核表达载体, 探讨干扰 *CTSL* 基因表达对卵巢癌细胞侵袭和转移的影响。方法: 设计并合成 4 对 *CTSL* 小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA), 转染卵巢癌 A2780 细胞, RT-PCR 检测各转染细胞 *CTSL* 的表达, 筛选沉默效果最好的 siRNA 序列。设计并合成 *CTSL*-shRNA 序列, 与 psilence4.1-CMV-neo 载体连接, 构建 psilence4.1-*CTSL* 表达载体。psilence4.1-*CTSL* 转染 A2780 细胞, 获得稳定转染克隆 A2780-*CTSL*。RT-PCR 和 Western blotting 验证 *CTSL* 基因干扰效果, MTT 法和集落形成实验检测 A2780 细胞的增殖, 流式细胞术检测 A2780 细胞周期, Transwell 侵袭小室实验检测 A2780 细胞体外侵袭和迁移能力。结果: 筛选出干扰效果最好的 siRNA-*CTSL*-1202 序列, 并成功构建相应的 *CTSL*-shRNA 表达载体 psilence4.1-*CTSL*。稳定转染 psilence4.1-*CTSL* 能沉默 A2780 细胞中 *CTSL* 的表达。沉默 *CTSL* 基因后可抑制 A2780 细胞的侵袭和转移, 但不影响 A2780 细胞的增殖、细胞周期和黏附活性。结论: 成功构建 *CTSL* 基因 siRNA 的真核表达载体, RNA 干扰 *CTSL* 基因表达可抑制卵巢癌细胞的侵袭和转移。

[关键词] 组织蛋白酶 L 基因(*CTSL*); siRNA; 卵巢癌; 侵袭; 转移

[中图分类号] R737.31; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)05-0525-06

RNA interfering of *CTSL* expression inhibits invasion and migration of ovarian cancer cells

WANG Su-mei^a, LI Li^b, ZHANG Wei^b, LI Dan-rong^b, TANG Bu-jian^b(a. Department of Gynecology and Obstetrics, First Affiliated Hospital; b. Department of Tumor of Gynecology and Obstetrics, Affiliated Tumor Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a cathepsin L (*CTSL*)-siRNA eukaryotic expression plasmid and investigate its influence on the invasion and migration of ovarian cancer cells. **Methods:** Four pairs of small interfering RNA sequences targeting *CTSL* were designed and synthesized, and were transfected into ovarian cancer A2780 cells. *CTSL* expressions were analyzed by RT-PCR in different *CTSL*-siRNA transfected-A2780 cells, and the siRNA pair with the best interfering effect was chosen; the corresponding *CTSL*-shRNA was synthesized and inserted into psilence4.1-CMV-neo plasmid to construct psilence4.1-*CTSL* plasmid. Psilence4.1-*CTSL* was then transfected into A2780 cells and the stable transfectant A2780-*CTSL* was obtained. The interfering effect of psilence4.1-*CTSL* was detected by RT-PCR and Western blotting analysis; the proliferation of A2780 cells was examined by MTT and colony formation assay; the cell cycle of A2780 cells was measured by flow cytometry; and the invasion and migration of A2780 cells were detected by Transwell chamber assay. **Results:** The siRNA-*CTSL*-1202 sequence with the best interfering effect was selected and the corresponding *CTSL*-shRNA expression plasmid psilence4.1-*CTSL* was successfully constructed. *CTSL* expression in psilence4.1-*CTSL*-stably transfected A2780 cells was significantly decreased. The invasion and migration of A2780 cells were inhibited by *CTSL* silence, while their proliferation, cell cycle and adhesion were not significantly influenced. **Conclusion:** The siRNA eukaryotic expression plasmid targeting *CTSL* gene is successfully constructed, and interfering *CTSL* expression can suppress invasion and migration of ovarian cancer cells.

[基金项目] 广西壮族自治区卫生厅资助项目(No. 200614)。Project supported by the Public Health Bureau of Guangxi Zhuang Autonomous Region of China (No. 200614)

[作者简介] 王素梅(1972 -), 女, 山东省济宁市人, 副主任医师, 博士, 主要从事妇科肿瘤方面的研究

[通信作者] 李力(LI Li, Corresponding author), E-mail: lili@gxmu.net.cn

[**Key words**] cathepsin L gene (*CTSL*); siRNA; ovarian neoplasms; invasion; migration

[*Chin J Cancer Biother*, 2010, 17(5): 525-530]

组织蛋白酶 L (cathepsin L, CTSL) 是存在于所有细胞溶酶体内的酸性半胱氨酸蛋白酶, CTSL 通过降解胶原、弹性蛋白、层黏连蛋白及细胞外基质的其他成分促进肿瘤的侵袭和转移。本课题组前期研究^[1]发现, CTSL 在卵巢癌组织中表达明显增高, 并与肿瘤浸润、转移有关。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术是能特异且高效地抑制目的基因表达的技术^[2]。在目前可以选择的多种 RNAi 方案中, 构建 shRNA 表达载体, 使之在细胞中扩增并持续抑制靶基因的表达, 是一种发挥效能更佳、持续时间更长、且能进行哺乳动物体内实验的手段^[3]。本研究选择的 psilencer4. 1-CMV-neo 载体具有抗 *Amp* 基因和抗 *Neo* 基因, 便于原核和真核筛选; 构建针对 *CTSL* mRNA 的 RNAi 表达载体, 稳定转染卵巢癌细胞 A2780, 探讨抑制 *CTSL* 基因对卵巢癌细胞侵袭转移能力的影响, 为卵巢癌的基因治疗提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 主要材料与试剂

卵巢癌细胞株 A2780、感受态 DH5 α 均由本实验室保存。Psilencer4. 1-CMV-neo 载体购自 Ambion 公司。BamHI、Hind III、T4DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司, 胶回收试剂盒、载体小提试剂盒、TRIzol 购自 Promega 公司, LipofectamineTM2000 购自 Invitrogen 公司, 逆转录试剂盒购自 MBI Fermentas 公司, 鼠抗人 CTSL 单克隆抗体购自 Bender 公司, HRP 标记的抗鼠二抗、纤黏连蛋白 (FN)、Matrigel 胶购自美国 BD Biosciences 公司, Transwell 侵袭小室购自美国 Corning Costar 公司, 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 siRNA 设计和筛选

根据 Genbank 中 CTSL 的序列, 由吉玛公司设计合成 4 对 siRNA 序列, 荧光标记的一对靶序列, 一对 GAPDH 阳性对照序列, 一对阴性对照序列。其靶位及序列分别为: (1) CTSL-1202, 正义链为 GCA-CAGAAUCAGAUACAAdTdT, 反义链为 UUGUUAUCUGAUUCUGUGCTdT; (2) CTSL-441, 正义链为 GGCGAUGCACAACAGAUAdTdT, 反义链为 UAAUCUGUUGUGCAUCGCCTdT; (3) CTSL-1265, 正义链为 UGGGUGGCUACGUAAGAUdT, 反义链为 AUCU-UUACGUAGCCACCCAdTdT; (4) CTSL-906, 正义链为 GUAUGUUCAGGAUAAUGGAdTdT, 反义链为 UC-CAUUAUCCUGAACAUACTdG。将荧光标记的靶序

列转染 A2780 细胞, 荧光显微镜下观察转染效率约为 40% ~ 50%, 以同样的条件将靶序列和对照序列瞬时转染 A2780 细胞, 24 h 后提取细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA, 行 CTSL 基因的 PCR 扩增, 以 β -actin 为内参, 凝胶成像系统分析 CTSL 的灰度比值, 根据灰度比值筛选出沉默效果最好的 siRNA 序列。

1.3 寡核苷酸链的合成

按照表达载体 psilencer4. 1-CMV-neo 的要求, 选择 TTCAAGAGA 为 loop, loop 两端为互补 siRNA 靶序列, 设计带有 BamHI、Hind III 黏性末端且能表达其发卡结构的短小 RNA (small hairpin RNA, shRNA) 的 DNA 序列; 阴性对照为 siRNA 序列随机打乱顺序后, Blast 结果显示与人无同源性的序列, 命名为 control 基因。shRNA 正义链为 5'-GATCCG-CACAGAATCAGATAACAATTC AAGAGATTGTTATCTGATTCTGTGCAGA-3', 反义链为 5'-AGCTTCTGCA-CAGAATCAGATAACAATCTCTTGAATTGTTATCTGATTCTGTGCG-3'。阴性对照 (control): 正义链为 5'-GATCCCCGCGAACGAAATAAAATATTC AAGAGATA TTTTATTTTCGTTTCGCGGAGA-3', 反义链为 5'-AGCT-TCTCCGCGAACGAAATAAAATATCTCTTGAATATTT TATTTTCGTTTCGCGGG-3'。

1.4 siRNA 表达载体的构建

将正反义寡核苷酸链退火形成寡核苷酸对, psilencer4. 1-neo 载体用 BamHI、Hind III 酶双酶切, 与寡核苷酸对连接。重组 siRNA 表达质粒命名为 psilencer4. 1-CTSL、psilencer4. 1-Control。重组质粒转化感受态细菌 DH5 α 后提取重组质粒, 用紫外分光光度计测出其浓度后, 用水稀释为 0.5 μ g/ μ l 备用。菌液取出 1 ml 送上海生工公司测序, 其余菌液保存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱。

1.5 siRNA 表达质粒转染 A2780 细胞

将鉴定正确的重组 siRNA 质粒利用脂质体 LipofectamineTM2000 转染 A2780 细胞, 同时以 psilencer4. 1-CMV-neo 载体为对照。G418 筛选转染细胞, 选取阳性细胞克隆并扩大培养, 借助 RT-PCR 和 Western blotting 方法检测 CTSL 基因的沉默效果。获得的细胞株分别命名为 A2780-CTSL、A2780-Control、A2780-psilencer。

1.6 MTT 法和集落形成实验检测细胞增殖能力

取对数生长期细胞, 以密度为 1×10^5 的细胞, 接种于 24 孔板中, 每孔体积 100 μ l, 每个密度接种 3

复孔。从接种当日起,每日同一时间从培养箱中取出细胞,选择只加培养液没有细胞的孔为空白对照孔,每孔加入 5 mg/ml MTT 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 继续孵育 4 h,终止培养,小心弃去孔内培养液,每孔加入 500 μ l DMSO,震荡 10 min,以 100 μ l/孔加入 96 孔板进行比色。以时间为横轴,光密度值为纵轴绘制细胞生长曲线。采用集落形成实验,通过对比转染空质粒和转染 pcDNA3.1-CTSL 重组质粒的细胞克隆形成效率,可以初步评价 CTSL 基因对卵巢癌细胞增殖及独立生存能力的影响。

1.7 流式细胞术检测细胞生长周期

取对数生长期细胞,PI 避光染色 30 min,流式细胞仪分析 G₁、G₂、S 各期细胞比例。每组实验重复 3 次。

1.8 Transwell 侵袭小室实验检测细胞体外侵袭、迁移能力

细胞侵袭迁移实验在 Transwell 侵袭小室模型中进行。用 50 μ l 含 5 μ g FN 的 PBS 处理 Transwell 小室聚碳酸滤膜,Matrigel 用冷的无血清的 RPMI 1640 培养基稀释成 1.25 mg/ml,50 μ l 加入滤膜上表面(60 μ g/滤膜),37 $^{\circ}$ C 孵育 4~5 h,形成胶状。细胞悬液加入至上室,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 20~24 h。采用 MTT 法检测下室细胞的光密度值来表示肿瘤细胞的侵袭能力。细胞的体外迁移能力测定除 Transwell 上室不加入 Matrigel 外,其余操作同体外侵袭实验。

1.9 MTT 法检测细胞体外黏附能力

取 96 孔培养板,每孔加入 20 mg/L 的 FN 50 μ l,在超净工作台过夜风干后置 4 $^{\circ}$ C 备用。使用前 PBS 洗 2 次重新水化,用 1% BSA 封闭结合位点,加入细胞悬液,在 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% CO₂ 条件下培养 60 min 后,分别以 PBS 洗 2 遍去除未黏附的细胞,黏附细胞用 MTT 法测 D₄₉₀ 值。每组实验重复 3 次。

1.10 统计学方法

使用 SPSS13.0 统计软件,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料以单因素方差分析进行比较,以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 绿色荧光阴性对照质粒成功转染 A2780 细胞

将绿色荧光阴性对照序列转染卵巢癌细胞 A2780,48 h 后荧光显微镜观察,结果显示,转染的最佳细胞融合度为 80%~85%,siRNA 寡核苷酸的体积为 20 μ l,LipofectamineTM 2000 的体积为 5 μ l,转染效率约 40%,证明转染成功。

2.2 siRNA-CTSL 靶序列的选择

转染 siRNA-CTSL-441、siRNA-CTSL-906、siRNA-CTSL-1202、siRNA-CTSL-1265 的 A2780 细胞,CTSL 基因表达半定量值分别为 0.83 ± 0.65 、 0.89 ± 0.055 、 0.526 ± 0.086 和 1.246 ± 0.050 ,其中转染靶位 1202 的 siRNA 下调最显著,作为后续试验构建 RNA 干扰 CTSL 真核细胞表达质粒的靶点(图 1),而转染阴性对照 siRNA 的 A2780 细胞,其 CTSL 基因表达无明显变化。

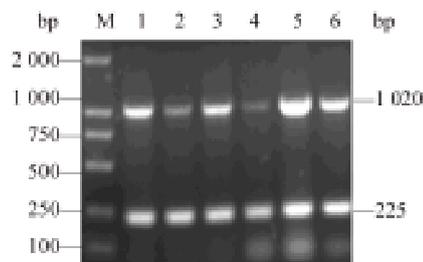


图 1 不同 siRNA-CTSL 转染后 A2780 细胞 CTSL 的表达

Fig.1 Expression of CTSL in A2780 cells transfected with different siRNA-CTSL

M: Marker; 1: Control; 2: siRNA-CTSL-441; 3: siRNA-CTSL-906; 4: siRNA-CTSL-1202; 5: siRNA-CTSL-1265; 6: siRNA-Control

2.3 Psilencer4.1-CTSL 重组质粒的成功构建及测序鉴定

将线性 psilencer4.1-CMV-neo 与 CTSL 寡核苷酸对连接后,载体重新环化,0.8% 琼脂糖凝胶电泳后条带与原质粒位于同一水平,证明连接成功(图 2)。psilencer4.1-CTSL、psilencer4.1-control 质粒阳性克隆的测序结果,用 Vector NTI Suite 7.1 软件比对显示重组质粒构建成功。

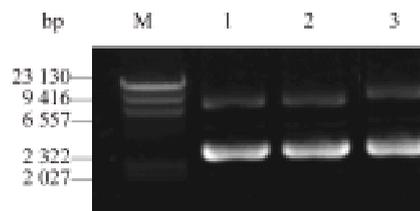


图 2 Psilencer4.1-CTSL 重组质粒的鉴定

Fig.2 Identification of psilencer4.1-CTSL recombinant plasmid

M: Marker; 1: Psilencer4.1-CMV-neo; 2: Psilencer4.1-CTSL; 3: Psilencer4.1-Control

2.4 Psilencer4.1-CTSL 质粒抑制 A2780 细胞中

CTSL 基因的表达

RT-PCR 检测 psilencer4. 1-CTSL 质粒转染 A2780 细胞和亲本 A2780 细胞的 CTSL 基因表达情况, 结果(图 3)显示, A2780-CTSL 细胞中的 CTSL 基因表达 (0.42 ± 0.020) 较 A2780-Control 细胞 (0.83 ± 0.015)、A2780-psilencer 细胞 (0.85 ± 0.010) 和亲本 A2780 细胞 (0.86 ± 0.020) 的 CTSL 基因表达明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); A2780 细胞与 A2780-con 细胞、A2780-psilencer 细胞比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。说明 psilencer4. 1-CTSL 能够抑制 A2780 细胞中 CTSL 基因的表达。

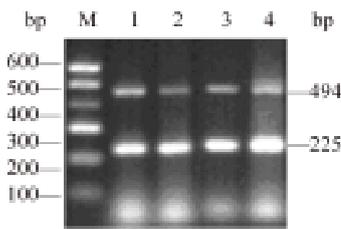


图 3 Psilencer4. 1-CTSL 质粒抑制 A2780 细胞中 CTSL mRNA 的表达

Fig. 3 Psilencer4. 1-CTSL plasmid inhibited CTSL mRNA expression in A2780 cells

1: Untransfected; 2: psilencer4. 1-CTSL; 3: psilencer4. 1-Control; 4: psilencer4. 1-CMV-neo; M: Marker

2.5 Psilencer4. 1-CTSL 质粒抑制 CTSL 蛋白的表达

细胞株 A2780-CTSL 细胞的 CTSL 蛋白表达 (0.64 ± 0.03) 较 A2780-Control 细胞 (1.50 ± 0.02)、A2780-psilencer 细胞 (1.47 ± 0.02) 和 A2780 细胞 (1.43 ± 0.10) 的 CTSL 蛋白表达明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); A2780 细胞与 A2780-Control 细胞、A2780-psilencer 细胞比较, CTSL 蛋白的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 4)。结果证实, psilencer4. 1-CTSL 质粒能够在蛋白水平抑制 CTSL 基因的表达。



图 4 Psilencer4. 1-CTSL 质粒抑制 A2780 中 CTSL 蛋白的表达

Fig. 4 Psilencer4. 1-CTSL plasmid inhibited CTSL protein expression in A2780 cells

2.6 Psilencer4. 1-CTSL 质粒对 A2780 细胞增殖的影响

MTT 法测定 A2780-CTSL、A2780-Control、A2780-psilencer 及 A2780 细胞生长情况, 结果(图 5)可见, A2780-CTSL 细胞与 A2780 细胞、A2780-Control 细胞和 A2780-psilencer 细胞比较, 生长速度降低, 但差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明干扰 CTSL 基因的表达不影响 A2780 细胞的增殖。

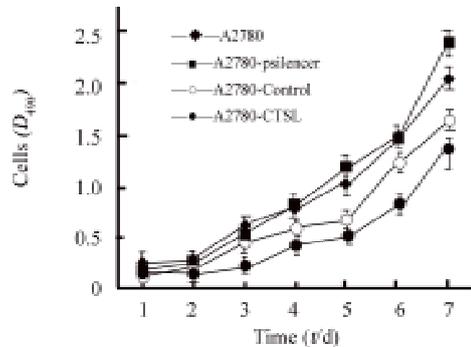


图 5 Psilencer4. 1-CTSL 质粒对 A2780 细胞增殖的影响

Fig. 5 Influence of psilencer4. 1-CTSL plasmid on proliferation of A2780 cells

流式细胞仪分析结果显示了各组细胞中处于 G₀-G₁ 期、S 期、G₂-M 期的细胞比例(表 1)。以 S + G₂ + M 期细胞的比例作为观察指标, 反应 A2780 细胞的增殖能力。A2780-CTSL 细胞与 A2780-Control 细胞、A2780-psilencer 细胞及 A2780 亲本细胞相比, S + G₂ + M 期细胞的比例稍有减少, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明 psilencer4. 1-CTSL 质粒抑制 CTSL 基因对 A2780 细胞增殖无明显改变。

表 1 Psilencer4. 1-CTSL 质粒对 A2780 细胞周期的影响

Tab. 1 Influence of psilencer4. 1-CTSL plasmid on cell cycle of A2780 cells

Group	Cell cycle phase (%)			
	G ₀ -G ₁	G ₂ -M	S	S + G ₂ + M
A2780	43.9	19.4	36.7	56.1
A2780-psilencer	40.7	21.2	38.2	59.4
A2780-Control	49.5	22.4	28.2	50.6
A2780-CTSL	49.7	25.6	24.7	50.3

2.7 Psilencer4. 1-CTSL 质粒对 A2780 细胞集落形成的影响

在 24 孔板中接种不同细胞数的 A2780-CTSL、

A2780-Control、A2780-psilencer 及 A2780 亲本细胞, 37 °C、5% CO₂ 温箱中培养 6 d, 姬姆萨染色肉眼可见不同程度的集落形成, 4 组细胞集落形成率见表 2, 各组之间均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 Psilencer4. 1-CTSL 质粒对 A2780 细胞集落形成的影响 (n)

Tab. 2 Influence of psilencer4. 1-CTSL plasmid on colony formation of A2780 cells (n)

Group	Implanted cells		
	50	100	200
A2780	39	44	51
A2780-psilencer	36	46	52
A2780-Control	37	45	50
A2780-CTSL	34	41	48

表 3 Psilencer4. 1-CTSL 质粒对 A2780 细胞的侵袭、迁移和黏附的影响 ($\bar{x} \pm s, D_{490}$)

Tab. 3 Effect of psilencer4. 1-CTSL plasmid on invasion, migration and adhesion of A2780 cells ($\bar{x} \pm s, D_{490}$)

Group	Invasion	Migration	Adhesion
A2780	0.435 4 ± 0.049	0.227 3 ± 0.074	0.202 3 ± 0.080
A2780-psilencer	0.437 0 ± 0.056	0.177 6 ± 0.035	0.201 5 ± 0.044
A2780-Control	0.387 1 ± 0.040	0.208 3 ± 0.055	0.207 3 ± 0.044
A2780-CTSL	0.284 9 ± 0.057*	0.134 0 ± 0.046*	0.201 5 ± 0.040

* $P < 0.5$ vs A2780 or A2780-psilencer or A2780-Control group

3 讨论

侵袭和转移是卵巢癌患者治疗失败和死亡的直接原因, 抑制转移成为提高卵巢癌治疗效果的关键。CTSL 基因在恶性肿瘤组织中过表达, 且与肿瘤的侵袭和转移有关^[4]。研究^[5]发现, CTSL 基因在直肠癌的转移中起了重要的作用, 并且与直肠癌的预后相关。CTSL 基因使非转移黑色素瘤细胞具有致瘤性和高转移性^[6]。本课题前期研究^[1]表明, CTSL 基因在卵巢癌组织中表达高于正常卵巢组织和卵巢良性肿瘤组织, 患者血清中 CTSL 的含量亦明显增加, 且与肿瘤的恶性程度及转移、预后有关^[7]。因此, 本实验利用 RNAi 技术抑制卵巢恶性肿瘤细胞中 CTSL 基因的表达, 探讨 CTSL 基因阻断对卵巢恶性肿瘤侵袭和转移的影响。

2.8 Psilencer4. 1-CTSL 质粒抑制 A2780 细胞的侵袭和迁移

以 Transwell 小室下室细胞的光密度值来表示肿瘤细胞的侵袭力(表 3)。A2780-CTSL 细胞与 A2780-Control 细胞、A2780-psilencer 细胞及 A2780 亲本细胞比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); A2780 细胞与 A2780-control 细胞、A2780-psilencer 细胞比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明 psilencer4. 1-CTSL 质粒抑制 CTSL 基因的表达使 A2780 细胞穿过 Matrigel 的数目降低, 抑制了 A2780 细胞的侵袭和迁移。

2.9 Psilencer4. 1-CTSL 质粒对 A2780 细胞黏附能力的影响

细胞体外黏附能力测定(表 3), 在 FN 包被的 96 孔细胞培养板中, 细胞种植后 60 min, A2780-CTSL 细胞与 A2780-Control 细胞、A2780-psilencer 细胞及 A2780 亲本细胞比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

利用 RNAi 来治疗肿瘤、炎症和遗传性疾病已成为研究的热点, 在妇科肿瘤方面的研究也取得了一些进展。Merritt 等^[8]通过脂质体转染 IL-8 siRNA 至小鼠卵巢恶性肿瘤模型中, 发现细胞增殖下降, 微血管密度降低。Numnum 等^[9]利用腺病毒载体转染干扰 *Hec1* (促进有丝分裂的基因) 基因至卵巢癌细胞系 SKOV3, 结果显示, *Hec1* 基因被敲除, 细胞凋亡增加, RNAi 可以用于卵巢恶性肿瘤治疗。

与 siRNA 相比, siRNA 表达质粒具有进入细胞后不易被降解、作用时间长之优点, 有效地克服了直接向细胞内导入 siRNA 沉默目的基因维持时间短、体内运载难和转染效果不稳定等问题^[10]。本实验选择的 psilencer4. 1-CMV-neo 载体, 具有抗 *Amp* 基因和抗 *Neo* 基因以便于原核和真核筛选, 成功构建的 psilencer4. 1-CTSL 重组质粒转染 A2780 细胞,

G418 筛选获得能够稳定表达 siRNA-CTSL 的卵巢癌细胞, 经 RT-PCR 和 Western blotting 证实, 重组质粒能够抑制 *CTSL* 基因的表达。

研究结果显示, A2780-CTSL 细胞生长速度减慢, 克隆形成的数目减少, 但与对照组 A2780 细胞比较, 差异无统计学意义, 说明抑制 *CTSL* 基因对卵巢癌 A2780 细胞的增殖能力影响不大, 这可能与 *CTSL* 基因的生理特性有关, *CTSL* 基因兼有肽链内切酶和肽链外切酶的活性, 主要功能是降解蛋白, 水解某些前体蛋白(酶原或激素原)生成, 或激活其他蛋白水解系统^[11]。通过流式细胞仪检测细胞周期发现, A2780-CTSL 细胞 G₀/G₁ 期细胞与对照组相比较比例增加, S + G₂ + M 期细胞比例减少, 但差异无统计学意义, 提示抑制 *CTSL* 基因有减缓细胞分裂的趋势。

因细胞与细胞外基质的黏附是细胞迁移的重要因素, 本研究检测了 psilencer4.1-CTSL 转染前后 A2780 细胞的黏附能力。结果表明, 干扰 *CTSL* 基因后, A2780 细胞的黏附性无明显改变。进一步采用 transwell 小室和 matrigel 胶重建基底膜研究肿瘤细胞的侵袭和转移行为, 发现 A2780-CTSL 与对照组细胞比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示 psilencer4.1-CTSL 抑制 *CTSL* 基因表达后, A2780 细胞分解 Matrigel 胶的能力减弱, 细胞穿过 transwell 小室下表面的数目减少, 抑制了 A2780 细胞的体外侵袭和迁移能力。这与 Yang 等^[12]的研究结果一致, 该研究通过反义核酸技术抑制黑色素瘤细胞中 *CTSL* 基因的表达, 降低肿瘤细胞的侵袭转移能力, 但不影响肿瘤细胞的增殖和黏附性。Levicar 等^[13]通过构建 *CTSL* 反义表达载体转染人脑胶质瘤细胞 IPTP24, 降低 *CTSL* 基因的表达, 也发现转染后 IPTP24 细胞的增殖能力、黏附性与未转染细胞相比无明显改变, 而侵袭性明显下降, 认为 *CTSL* 基因主要通过降解细胞外基质, 参与肿瘤细胞的侵袭和转移。本实验也发现干扰 *CTSL* 基因后不影响卵巢癌 A2780 细胞的黏附性和增殖能力, 但降低 A2780 细胞的迁移和侵袭, 说明 *CTSL* 基因主要是通过蛋白水解作用参与肿瘤的侵袭和转移。

综上所述, 本实验以 *CTSL* 基因为靶向的 RNA 干扰, 能明显抑制卵巢癌 A2780 细胞的侵袭和转移, 为逆转卵巢恶性肿瘤的侵袭和转移提供了可靠

的实验依据, 有望成为治疗卵巢癌的有效途径。

[参考文献]

- [1] 王素梅. 组织蛋白酶及其组织抑制剂与卵巢癌浸润转移关系的研究 [D]. 南宁, 广西医科大学, 2008.
- [2] Scherer L, Rossi JJ. Recent applications of RNAi in mammalian systems [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2004, 5(4): 355-360.
- [3] Lu PY, Xie F, Woodle MC. *In vivo* application of RNA interference: From functional genomics to therapeutics [J]. *Adv Genet*, 2005, 54(1): 117-142.
- [4] Seth P, Mahajan VS, Chauhan SS. Transcription of human cathepsin L mRNA species hCATL B from a novel alternative promoter in the first intron of its gene [J]. *Gene*, 2003, 321(4): 83-91.
- [5] Herszényi L, Farinati F, Cardin R, István G, Molnár LD, Hritz I, et al. Tumor marker utility and prognostic relevance of cathepsin B, cathepsin L, urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type-1, CEA and CA 19-9 in colorectal cancer [J]. *BMC Cancer*, 2008, 8(10): 194-198.
- [6] Jean D, Rousselet N, Frade R. Cathepsin L expression is up-regulated by hypoxia in human melanoma cells: Role of its 5'-untranslated region [J]. *Biochem J*, 2008, 413(1): 125-134.
- [7] 王素梅, 李力, 张玮, 黎丹戎, 唐步坚. 血清组织蛋白酶 L 在卵巢癌诊断及检测中的临床意义 [J]. *中国肿瘤临床*, 2008, 35(8): 167-168.
- [8] Merritt WM, Lin YG, Spanuth WA, Fletcher MS, Kam Fletcher MS, Kamat AA, et al. Effect of interleukin-8 gene silencing with liposome-encapsulated small interfering RNA on ovarian cancer cell growth [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2008, 100(5): 359-372.
- [9] Numnum TM, Makhija S, Lu B, Wang M, Rivera A, Stoff-Khalili M, et al. Improved anti-tumor therapy based upon infectivity-enhanced adenoviral delivery of RNA interference in ovarian carcinoma cell lines [J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 108(1): 34-41.
- [10] 闫歌, 黄爱龙, 唐霓, 张秉强, 薄丹, 向明确, 等. 短发夹状 RNA 抑制 Survivin 基因在肝癌细胞中的表达 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2003, 11(12): 712-715.
- [11] 曹新广. Cathepsin L 和 Cystatin B 的表达与大肠癌生物学行为的关系 [D]. 郑州, 郑州大学, 2007.
- [12] Yang Z, Cox JL. Cathepsin L increases invasion and migration of B16 melanoma cancer [J]. *Cell International*, 2007, 7(1): 8.
- [13] Levicar N, Dewey RA, Daley E, Bates TE, Davies D, Kos J, et al. Selective suppression of cathepsin L by antisense cDNA impairs human brain tumor cell invasion *in vitro* and promotes apoptosis [J]. *Cancer Gene Ther*, 2003, 10(2): 141-151.

[收稿日期] 2010-07-28

[修回日期] 2010-08-30

[本文编辑] 韩丹