

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.07.006

· 基础研究 ·

敲降 HE4 和 PAX8 基因对 TC 方案治疗上皮性卵巢癌细胞恶性生物学行为的影响

唐海峰, 李贤, 刘蓓 (香港大学深圳医院 妇科, 广东 深圳 518055)

[摘要] **目的:** 探讨敲降人附睾蛋白 4 (HE4) 和配对盒基因 8 抗原 (PAX8) 基因后对紫杉醇药+铂类药 (TC 方案) 治疗的上皮性卵巢癌 OVCAR3 细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的影响。**方法:** 分别设计和合成敲降 HE4 和 PAX8 的单靶 siRNA (HE4-siRNA 或 PAX8-siRNA) 及双靶 siRNA (HE4+PAX8-siRNA) 和阴性 siRNA 序列, 并与质粒载体 pGCsi-H1 相连形成重组质粒, 分别转染人上皮性卵巢癌 OVCAR3 细胞形成 HE4-siRNA 组、PAX8-siRNA 组、HE4+PAX8-siRNA 组和 siRNA-NC 组, 同时设立空白对照组 (无任何处理)。用 TC 方案 (紫杉醇 3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + 卡铂 2.82 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 分别处理上述 5 组细胞后, 用 MTT 法、划痕愈合实验、Transwell 侵袭实验、流式细胞术检测各组细胞的增殖、迁移、侵袭及凋亡能力的变化。**结果:** 敲降 HE4 和 PAX8 基因后, 与 siRNA-NC 组和空白对照组比较, HE4-siRNA 组、PAX8-siRNA 组、HE4+PAX8-siRNA 组卵巢癌 OVCAR3 细胞的增殖、迁移和侵袭能力显著降低 (均 $P < 0.01$), 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$), 尤以同时敲降 HE4 和 PAX8 基因的效果更佳。**结论:** 敲降 HE4 和 PAX8 基因均可增强 TC 方案抑制上皮性卵巢癌细胞增殖、迁移及侵袭能力并促进其凋亡, 尤以 HE4 和 PAX8 基因同时敲除的效果更好。

[关键词] 上皮性卵巢癌; OVCAR3 细胞; 人附睾蛋白 4; 配对盒基因 8 抗原; TC 方案; 增殖; 迁移; 侵袭; 凋亡

[中图分类号] R737.31; R730.5 [文献标识码] A [文章编号] 1007-385X(2019)07-0757-05

Effect of HE4 and PAX8 gene knockdown on malignant biological behaviors of epithelial ovarian cancer cells treated with TC regimen

TANG Haifeng, LI Xian, LIU Bei (Department of Gynaecology, Shenzhen Hospital, the University of Hong Kong, Shenzhen 518055, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of human epididymal protein 4 (HE4) and paired box gene 8 (PAX8) gene knockdown on proliferation, migration, invasion and apoptosis of human epithelial ovarian cancer OVCAR3 cells treated with TC regimen (paclitaxel+carboplatin). **Methods:** Sequences of single-target siRNA (HE4-siRNA or PAX8-siRNA) and double-target siRNA (HE4+PAX8-siRNA) as well as negative siRNA were respectively designed and synthesized, and then linked with plasmid vector pGCsi-H1 to obtain the recombinant plasmids. The obtained recombinant plasmids were then transfected into human epithelial ovarian cancer OVCAR3 cells, namely HE4-siRNA group, PAX8-siRNA group, HE4+PAX8-siRNA group and siRNA-NC group, respectively. The blank control group was also set up (without any treatment). The cells in above five groups were treated with TC regimen (paclitaxel 3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + carboplatin 2.82 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and the changes in proliferation, migration, invasion and apoptosis of the cells were detected by MTT, wound-healing assay, Transwell chamber assay, and flow cytometry, respectively. **Results:** After knocking down the HE4 and PAX8 genes, compared with siRNA-NC group and blank control group, the proliferation, migration and invasion abilities of OVCAR3 cells in HE4-siRNA group, PAX8-siRNA group and HE4+PAX8-siRNA group significantly decreased (all $P < 0.01$), and the apoptosis rate significantly increased ($P < 0.01$), especially in HE4+PAX8-siRNA group. **Conclusion:** Knockout of either HE4 or PAX8 can enhance the effect of TC regimen on inhibiting proliferation, migration and invasion as well as promoting apoptosis of epithelial ovarian cancer cells, and the effect of simultaneous down-regulation of HE4 together with PAX8 is better.

[Key words] epithelial ovarian cancer; OVCAR3 cell; human epididymal protein 4 (HE4); paired box gene 8 (PAX8); TC regimen; proliferation; migration; invasion; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(7): 757-761. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.07.006]

[基金项目] 广东省深圳市知识创新计划—基础研究项目 (No. 20140331130511)。Project supported by the Knowledge Innovation Project in Shenzhen of Guangdong Province-Basic Research Project (No. 20140331130511)

[作者简介] 唐海峰 (1971-), 女, 硕士, 副主任医师, 主要从事妇科肿瘤的临床治疗研究, E-mail: lili1276@sina.com

[通信作者] 刘蓓 (LIU Bei, corresponding author), 硕士, 副主任医师, 主要从事妇科恶性肿瘤的综合治疗研究, E-mail: liub@hku-szh.org

上皮性卵巢癌是女性生殖系统最常见恶性肿瘤之一,其发病率仅次于宫颈癌和子宫体癌,但其致死率在妇科肿瘤中占据首位;上皮性卵巢癌临床分期不同,预后差异巨大,据统计早期患者5年生存率可达90%,而晚期仅为30%^[1-2]。手术切除、肿瘤细胞减灭术和术后紫杉醇联合铂类化疗(TC方案)是晚期患者的主要治疗手段,尽管近年来以上技术均有明显提高,但仍无法跳出治疗瓶颈,对复发性卵巢癌最为无效^[3-4]。随着肿瘤基因研究不断深入,大多数学者认为上皮性卵巢癌的发生是多因素、多步骤、多阶段综合作用的结果,与一系列基因改变密切相关,基因成为其诊疗的新“焦点”^[5]。人附睾蛋白4(human epididymis protein 4, HE4)为盆腔肿瘤新型高特异性标志物之一,在不同来源卵巢癌和子宫内膜癌中均有不同程度高表达^[6]。配对盒基因8抗原(paired box gene 8, PAX8)位于人染色体2q12-q14上,在胎儿器官形成中具有重要作用^[7]。目前有研究^[8]提示,PAX8在判断肿瘤细胞来源及鉴别细胞类型上有一定价值。但关于两者对上皮性卵巢癌细胞生物学行为及治疗的影响少见报道。本课题通过在卵巢癌细胞株OVCAR3中利用siRNA靶向敲降HE4和PAX8表达,探讨其对TC方案治疗上皮性卵巢癌细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的影响,旨在为上皮性卵巢癌靶向治疗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

人上皮性卵巢癌细胞株OVCAR3购自中国科学院上海细胞研究所。紫杉醇注射液(意大利Bristol-Myers Squibb S.R.L.生产,批号20171006,规格5 ml/30 mg/支),卡铂注射液(齐鲁制药有限公司生产,批号20170519,规格10 ml/支),RPMI 1640培养基、无血清培养液、10%胎牛血清、胰蛋白酶、PBS缓冲液、100 U/ml青霉素及100 mg/链霉素均购自美国Thermo Fisher Scientific公司,四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自美国Sigma公司,二甲基亚砜(DMSO)购自美国Amresco公司,Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,Transwell小室购自美国Corning公司。

1.2 细胞培养、载体构建及细胞分组

OVCAR3细胞复苏后接种于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中,于37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养,根据细胞密度进行换液及传代。

HE4、PAX8单靶siRNA(HE4-siRNA和PAX8-siRNA)、双靶siRNA(HE4+PAX8-siRNA)和阴性siRNA序列的设计及合成均委托广州锐博生物科技有

限公司完成,并与pGCsi-H1质粒载体相连构成重组质粒。将上述质粒分别转染对数生长期OVCAR3细胞,构建HE4-siRNA组、PAX8-siRNA组、HE4+PAX8-siRNA组和阴性siRNA对照(siRNA-NC)组,同时设立空白对照组(无任何处理)。

1.3 TC方案处理各组卵巢癌OVCAR3细胞

将上述5组细胞继续培养至对数生长期,将现配TC方案药液(紫杉醇3.13 μg/ml+卡铂2.82 μg/ml)分别加入其中,继续培养24 h后进行后续实验。

1.4 MTT法检测卵巢癌OVCAR3细胞的增殖能力

收集对数生长期细胞并调整期密度,以每孔 2×10^3 个细胞接种于96孔板,每组设置3个复孔,共培养5 d。于第1、2、3、4和第5天分别向每孔加入20 μl MTT溶液,继续培养4 h后弃废液,PBS缓冲液洗2遍,弃废液后每孔加入150 μl DMSO液,低速振荡10 min,使其充分溶解。然后,用酶联免疫检测仪于波长490 nm处检测各孔的光密度(D)值,以各组第1天所测D值为参照,依次计算各组第2、3、4和5天的D值与第1天的D值的比值。

1.5 Annexin V-FITC/PI染色流式细胞术检测卵巢癌OVCAR3细胞的凋亡能力

收集对数生长期细胞并调整期密度,以每孔 2×10^3 个细胞接种于96孔板,每组设置3个复孔,共培养5 d。于第3、5天分别加入150 μl的Annexin V-FITC溶液,充分混匀,再加入10 μl的PI染色液,混匀后避光冰浴20 min后,上流式细胞仪检测,采用Cell Quest Software软件进行分析,并计算细胞的凋亡率(细胞凋亡率=凋亡细胞/细胞总数 $\times 100\%$)。

1.6 划痕愈合实验检测卵巢癌OVCAR3细胞的迁移能力

将上述5组对数生长期细胞接种于6孔板(2×10^5 个/孔)中过夜培养,使细胞汇合度达90%。用10 μl无菌枪头沿培养基底部划一横线,用无血清培养液洗2次,除去被划下细胞,加入无血清RPMI 1640培养液后继续培养。分别于12、24 h后用倒置相差显微镜下摄片并测量其迁移距离。将空白对照组细胞迁移距离为标准(设为100%),分别计算其他4组细胞的迁移能力(实验组细胞迁移距离/空白对照组细胞迁移距离 $\times 100\%$)。

1.7 Transwell实验检测卵巢癌OVCAR3细胞的侵袭能力

将Transwell小室上室置于24孔板上,下室用滤膜隔开,并放入500 μl完全培养液,以每孔 2×10^3 个细胞将上述5组对数生长期细胞接种上小室,继续培养48 h。取出小室,用棉签擦去上室留存细胞,4%甲醛溶液固定30 min,0.5%结晶紫染色15 min,PBS清洗

3 次后待其自然晾干后,显微镜下观察、摄片并计数细胞数(随机计数 5 个视野)。以空白对照组侵袭细胞数为标准(设为 100%),分别计算其他 4 组细胞的侵袭细胞数。细胞侵袭率=侵袭细胞数/空白对照组侵袭细胞数×100%。

1.8 统计学处理

细胞增殖、凋亡、划痕愈合、Transwell 实验均重复 3 次。所有数据均用 SPSS20.0 统计学软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;细胞增殖、凋亡及迁移实验用重复测量方差分析进行比较,其他则采用单因素方差分析或 t 检验进行比较。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$

表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 敲降 HE4 和 PAX8 基因后卵巢癌 OVCAR3 细胞的增殖能力显著降低

MTT 检测结果(表 1)显示,敲降 HE4 和 PAX8 基因后第 2 天起,HE4-siRNA 组、PAX8-siRNA 组和 HE4+PAX8-siRNA 组 OVCAR3 细胞的增殖能力显著低于 siRNA-NC 组和空白对照组细胞($F=15.931, P < 0.01$),且以 HE4+PAX8-siRNA 组细胞增殖能力下降最为显著。

表 1 敲降 HE4 和 PAX8 基因对卵巢癌 OVCAR3 细胞增殖能力的影响

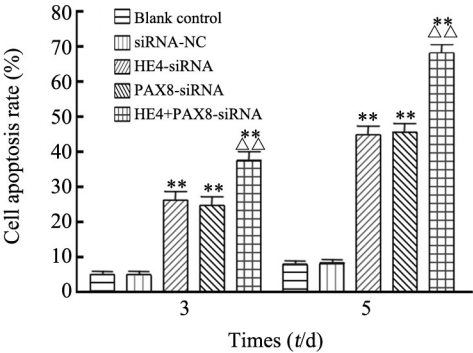
Tab.1 Effect of HE4 and PAX8 gene knockdown on proliferation of ovarian cancer OVCAR3 cells

Group	2 d	3 d	4 d	5 d
Blank control	5.29±0.21	10.08±0.45	14.64±0.07	19.52±0.18
siRNA-NC	4.94±0.07	9.64±0.34	13.89±0.37	19.03±0.12
HE4-siRNA	2.56±0.21*	3.83±0.24**	4.95±0.07**	6.51±0.33**
PAX8-siRNA	2.43±0.37*	3.70±0.20**	4.78±0.18**	5.82±0.22**
HE4+PAX8-siRNA	1.85±0.11**△△	2.51±0.12**△△	3.14±0.10**△△	3.56±0.08**△△

* $P < 0.01$, ** $P < 0.01$ vs siRNA-NC group; △△ $P < 0.01$ vs PAX8-siRNA or HE4-siRNA group

2.2 敲降 HE4 和 PAX8 基因后促进卵巢癌 OVCAR3 细胞的凋亡

流式细胞术检测检测结果(图 1)显示,敲低 HE4 和 PAX8 后第 3 天开始,HE4-siRNA 组、PAX8-siRNA 组和 HE4+PAX8-siRNA 组卵巢癌 OVCAR3 细胞凋亡率显著高于 siRNA-NC 组和空白对照组($F=18.932, P < 0.01$);且以 HE4+PAX8-siRNA 组细胞凋亡率增高最明显。



** $P < 0.01$ vs siRNA-NC group; △△ $P < 0.01$ vs PAX8-siRNA or HE4-siRNA group

图 1 敲降 HE4 和 PAX8 基因后促进卵巢癌 OVCAR3 细胞凋亡
Fig.1 Down-regulation of HE4 and PAX8 gene promoted apoptosis of ovarian cancer OVCAR3 cells

2.3 敲降 HE4 和 PAX8 基因后抑制卵巢癌 OVCAR3 细胞的迁移能力

划痕愈合实验结果(图 2A、C)显示,敲降 HE4 和 PAX8 基因后第 12 h 起,HE4-siRNA 组、PAX8-siRNA 组和 HE4+PAX8-siRNA 组 OVCAR3 细胞的迁移能力显著低于 siRNA-NC 组和空白对照组细胞($F=18.635, P < 0.01$),且以 HE4+PAX8-siRNA 组细胞迁移能力下降最为显著。

2.4 敲降 HE4 和 PAX8 基因后抑制卵巢癌 OVCAR3 细胞的侵袭能力

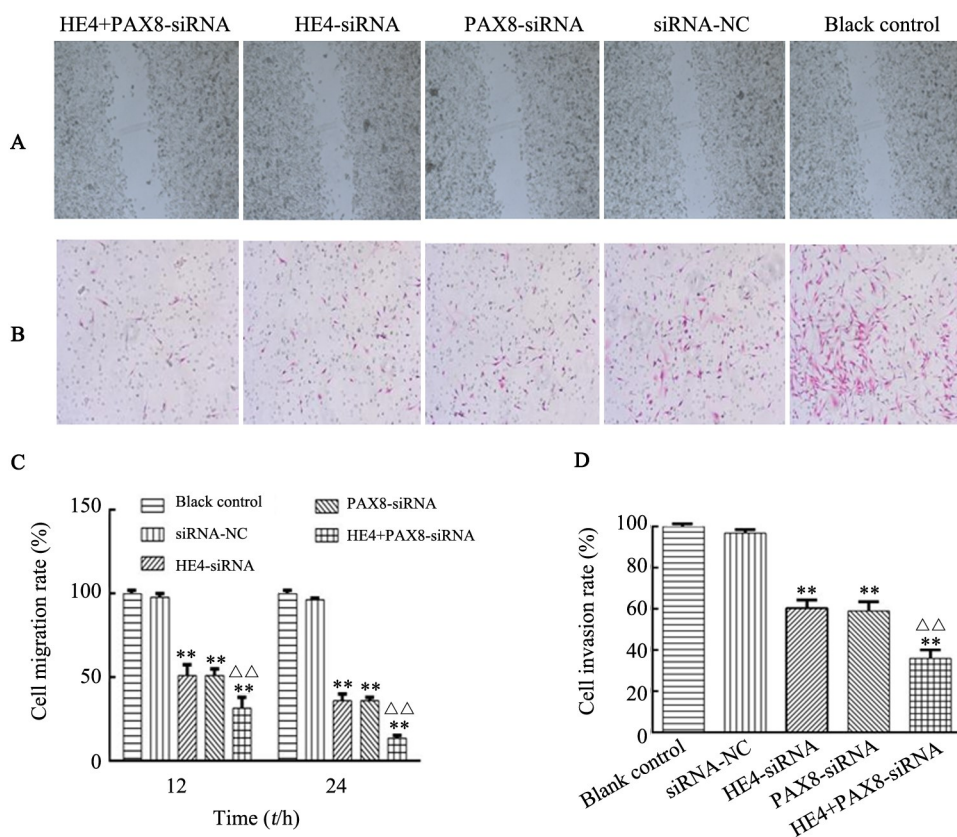
Transwell 侵袭实验结果(图 2B、D)显示,敲降 HE4 和 PAX8 基因后,HE4-siRNA 组、PAX8-siRNA 组和 HE4+PAX8-siRNA 组 OVCAR3 细胞的侵袭能力显著低于 siRNA-NC 组和空白对照组细胞($F=18.635, P < 0.01$),且以 HE4+PAX8-siRNA 组细胞侵袭能力下降最为显著。

3 讨论

HE4 基因位于人染色体 20q12-13.1,最早由 KIRCHHOFF 等^[9]于 1991 年在人附睾远端上皮细胞克隆得到,认为其与精子成熟及天然免疫密切相关。1999 年确定了其与卵巢癌的关系,发现其在子宫内膜样卵巢癌、浆液性卵巢癌和透明细胞卵巢癌中表达率分别达 100%、93% 和 50%^[10]。在 HE4 和卵巢癌

的临床研究^[11-12]中发现, HE4在早期卵巢癌诊断中灵敏度和特异度较高,在一定程度上可有效提高早期诊断率,为患者争取更多有效治疗时间;此外,其还

可作为黏液性卵巢癌与非黏液性卵巢癌及妇科良性疾病与恶性疾病的有效鉴别指标。但关于其与上皮性卵巢癌药物的相关研究较少。



** $P < 0.01$ vs siRNA-NC group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs PAX8-siRNA or HE4-siRNA group

图2 敲降HE4和PAX8基因后抑制卵巢癌OVCAR3细胞的迁移(A,C)及侵袭(B,D)能力(结晶紫染色, $\times 200$)

Fig.2 Down-regulation of HE4 and PAX8 gene inhibited migration (A,C) and invasion (B,D) of ovarian cancer OVCAR3 cells (crystal violet staining, $\times 200$)

PAX8属于PAX家族,通过限制基因转录在维持细胞功能上扮演重要角色,近年受到学者们的广泛关注。研究^[13]发现,PAX8在苗勒上皮来源恶性肿瘤中高表达,对输卵管上皮源性恶性肿瘤尤为重要。但关于其在上皮性卵巢癌中的表达观点不一致,有人认为PAX8不在上皮性卵巢癌中明显表达;而有人则认为其不仅在卵巢癌中呈阳性表达,还可作为上皮来源和盆腔间皮来源卵巢癌的重要鉴别标志^[14-15]。但关于其与上皮性卵巢癌药物的相关研究也鲜见报道。

在本研究中,采用RNA干扰技术分别沉默HE4、PAX8及HE4+PAX8基因,成功构建HE4-siRNA组、PAX8-siRNA组和HE4+PAX8-siRNA组卵巢癌OVCAR3细胞,并同时建立阴性siRNA对照组以排除siRNA对细胞的影响,以及建立空白对照组以作为参照。用TC方案药物处理后,分别采用MTT法、流式细胞术、划痕愈合实验及Transwell侵袭实验检测各

组细胞的增殖、凋亡、迁移及侵袭能力发现,敲降HE4和PAX8基因后,显著抑制OVCAR3细胞增殖、迁移及侵袭能力,促进其凋亡。其中,以两种基因同时敲降后的效果更佳。实验结果提示,靶向沉默HE4和PAX8基因可增强卵巢癌细胞的化疗敏感性,为上皮性卵巢癌的个体化精准治疗提供了实验依据,但具体机制研究尚待后续深入研究。

综上,靶向敲降HE4和PAX8基因均可增强TC方案抑制上皮性卵巢癌细胞增殖、迁移及侵袭能力并促进其凋亡,以HE4和PAX8基因双靶联合沉默效果则更好。

[参考文献]

- [1] JESSMON P, BOULANGER T, ZHOU W, et al. Epidemiology and treatment patterns of epithelial ovarian cancer[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2017, 17(5): 427-437. DOI: 10.1080/14737140. 2017. 1299575.

- [2] WEBB P M, JORDAN S J. Epidemiology of epithelial ovarian cancer[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2017, 41: 3-14. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2016.08.006.
- [3] 李秀琴, 王欣彦. 上皮性卵巢癌精准治疗研究进展[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2016, 32(8): 810-813.
- [4] 李君, 刘恩令, 杨丽. 雌激素受体与卵巢癌SKOV3细胞顺铂耐药的相关性研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 33(4): 347-350. DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2017.04.016.
- [5] ROJAS V, HIRSHFIELD K M, GANESAN S, et al. Molecular characterization of epithelial ovarian cancer: implications for diagnosis and treatment[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12): E2113[2019-03-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5187913/>. DOI:10.3390/ijms17122113.
- [6] INNAO P, POTHISUWAN M, PENGSA P. Does human epididymis protein 4 (HE4) have a role in prediction of recurrent epithelial ovarian cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(9): 4483-4486.
- [7] ADLER E K, CORONA R I, LEE J M, et al. The PAX8 cistrome in epithelial ovarian cancer[J/OL]. *Oncotarget*, 2017, 8(65): 108316-108332[2019-03-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5752447/>. DOI:10.18632/oncotarget.22718.
- [8] KIRCHHOFF C, HABBEN I, IVELL R, et al. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors[J]. *Biol Reprod*, 1991, 45(2): 350-357.
- [9] GRANATO T, PORPORA M G, LONGO F, et al. HE4 in the differential diagnosis of ovarian masses[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 446: 147-155. DOI:10.1016/j.cca.2015.03.047.
- [10] 李轲, 谢付静, 李军. 血清人附睾蛋白4联合糖类抗原125检测对浆液性卵巢癌的诊断价值[J]. *山东医药*, 2016, 56(9): 79-80. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2016.09.032.
- [11] 吴磊, 惠慧, 周云松, 等. 血清CA125、HE4单独或联合检测在卵巢癌中的诊断价值[J]. *山东医药*, 2016, 56(29): 91-92, 93. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2016.29.033.
- [12] 毛燕南, 曾丽霞, 李宇虹, 等. PAX8、PAX2、p53和RAS蛋白在卵巢及输卵管组织中的表达对于高级别卵巢浆液性癌起源的意义[J]. *中华妇产科杂志*, 2017, 52(10): 687-696. DOI:10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2017.10.008.
- [13] LAURY A R, PERETS R, PIAO H Y, et al. A comprehensive analysis of PAX8 expression in human epithelial tumors[J]. *Am J Surg Pathol*, 2011, 35(6): 816-826. DOI:10.1097/PAS.0b013e318216c112.
- [14] CHAPEL D B, HUSAIN A N, KRAUSZ T, et al. PAX8 expression in a subset of malignant peritoneal mesotheliomas and benign mesothelium has diagnostic implications in the differential diagnosis of ovarian serous carcinoma[J]. *Am J Surg Pathol*, 2017, 41(12): 1675-1682. DOI:10.1097/PAS.0000000000000935.
- [15] CHAI H J, REN Q, FAN Q, et al. PAX8 is a potential marker for the diagnosis of primary epithelial ovarian cancer[J/OL]. *Oncol Lett*, 2017, 14(5): 5871-5875[2019-03-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5661437/>. DOI:10.3892/ol.2017.6949.

[收稿日期] 2019-03-21

[修回日期] 2019-05-25

[本文编辑] 党瑞山