

# ARHI 基因诱导人卵巢癌 SKOV3 细胞株 S 期阻滞、凋亡及自体吞噬的研究

朱巧英<sup>1</sup>, 孟惠娟<sup>2</sup>, 周金华<sup>2</sup>, 沈宇飞<sup>1\*</sup>, 胡建铭<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学附属南京妇幼保健院妇科, 江苏 南京 210004; <sup>2</sup>苏州大学附属第一人民医院妇产科, 江苏 苏州 215006)

**[摘要]** 目的: 研究母源性肿瘤抑制印迹基因 ARHI 对人卵巢癌 SKOV3 细胞株的作用。方法: 将 pIRES2-EGFP-ARHI 质粒转染至 ARHI 基因低表达的人卵巢癌 SKOV3 细胞内实现 ARHI 基因表达, CCK-8 法检测 pIRES2-EGFP-ARHI-SKOV3 细胞组(实验组)、pIRES2-EGFP-SKOV3 细胞组(质粒对照组)及 SKOV3 细胞组(阴性对照组)的吸光度值, 计算细胞生长抑制率, 流式细胞仪分析细胞周期分布并检测细胞凋亡率, 并用 Western blot 检测微管相关蛋白轻链 II (LC3-II) 的表达水平变化。结果: 实验组细胞培养 24、48、72、96 及 120 h 的生长抑制率分别为 64.69%、70.17%、67.01%、66.87%、67.70%, 均明显高于质粒对照组 ( $P < 0.01$ )。培养 48 h 时实验组、质粒对照组、阴性对照组 S 期细胞的比例分别为 64.18%、38.43% 及 15.15%, 凋亡率分别为 47.97%、26.53% 及 9.33%; 培养 72 h 时 S 期细胞的比例分别为 43.29%、10.37% 及 10.89%, 凋亡率分别为 51.34%、24.70% 及 4.39%; 实验组细胞培养 48 h 时 LC3-II 表达水平增加, 与对照组间有明显差异。结论: ARHI 基因抑制 SKOV3 细胞生长, 使 SKOV3 细胞阻滞于 S 期, 并诱导凋亡及自体吞噬。

**[关键词]** 卵巢癌; ARHI; 凋亡; 生长抑制; 自体吞噬

**[中图分类号]** Q813

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)07-902-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20130709

## ARHI gene induces S phase arrest, apoptosis and autophagy of human ovarian cancer SKOV3 cell lines

Zhu Qiaoying<sup>1</sup>, Meng Huijuan<sup>2</sup>, Zhou Jinhua<sup>2</sup>, Shen Yufei<sup>1\*</sup>, Hu Jianming<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Gynecology, Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210004; <sup>2</sup>Department of Gynecology and Obstetrics, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Soochow 215006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effects of aplasia rashomolog member I (ARHI) on HOC SKOV3 cell lines. **Methods:** After transfection of the pIRES2-EGFP-ARHI plasmid to the HOC SKOV3 cells with low expression level of ARHI gene, absorbance A was measured and performed to calculate the inhibitory rate of cell growth using CCK-8 method. To analyze the cell cycle distribution and apoptosis rate by using flow cytometry and to test the change in expression level of LC3-II protein by using Western blot approach in the pIRES2-EGFP-ARHI-SKOV3 (the test group), pIRES2-EGFP-SKOV3 (the plasmid control group) and SKOV3 (the negative control group) cell groups. **Results:** After the cells in the test group were cultured for 24, 48, 72, 96 and 120 h, we found that the inhibitory rates of cell growth were 64.69%, 70.17%, 67.01%, 66.87% and 67.70%, respectively. The inhibitory rates of cell growth in the test group were significantly higher than those in the plasmid control group ( $P < 0.01$ ). The ratios of S phase cells were 64.18%, 38.43% and 15.15%, and the apoptosis rates were 47.97%, 26.53% and 9.33% respectively after culturing the cells for 48 h in the test, plasmid control and negative control group. The proportions of cells in S phase were 43.29%, 10.37% and 10.89%, and the apoptosis rates were 51.34%, 24.70% and 4.39% respectively after culturing the cells in the test, plasmid control and negative control group for 72 h. The significant difference remained between the test and control groups. The expression level of LC3-II in test group increased with significant difference compared with the control group after cultured for 48 h. **Conclusion:** These find-

**[基金项目]** 南京市医学科技发展基金项目(YKK10037); 南京医科大学科技发展基金项目(09NJMUM101)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: shenyufei97@sohu.com, hu\_jm2001@yahoo.com.cn

ings suggest that ARHI gene inhibits the growth of SKOV3 cells, arrests the SKOV3 cells at S phase and induces apoptosis and autophagy.

[Key words] ovarian neoplasms; ARHI; apoptosis; proliferation inhibition; autophagy

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(7): 902-906]

肿瘤的发生是一个多步骤、多因素参与的复杂生物学过程,涉及到多个癌基因的激活和抑癌基因的失活。已知卵巢癌的发生与 p21、ras、c-myc、p53、RB、p27、p16、BRCA1 等基因变化有关。其他癌基因和抑癌基因有无参与卵巢癌的发生发展,具体作用机制如何,这些基因表达产物与卵巢癌的临床病理相关性怎样,如何对卵巢癌患者根据基因改变及基因表达产物进行个体化治疗等均有待进一步研究。

母源性肿瘤抑制印迹基因 ARHI (aplasia ras homolog member I, 也称 DIRAS3、NOEY2) 在乳腺、正常卵巢中存在较高的表达,心、肝、胰、脑等正常人组织也有一定表达,但在乳腺癌、63%~67%的卵巢癌、前列腺癌等肿瘤中却常存在表达下调<sup>[1-3]</sup>。

本实验用 pIRES2-EGFP-ARHI 质粒转染至 ARHI 基因低表达的人卵巢癌 SKOV3 细胞内,通过检测 ARHI 基因作用后 SKOV3 细胞的周期分布、凋亡率及自体吞噬关联的微管相关蛋白轻链 II (LC3-II),研究 ARHI 对人卵巢癌 SKOV3 细胞生长的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

卵巢癌细胞系 SKOV3 (中国科学院上海生命科学研究院),小牛血清 (美国 Thermo Scientific HyClone 公司),Lipofectamine™ 2000 (美国 Invitrogen Corporation 公司),LC3B(D11)XP® Rabbit mAb (美国 Cell Signaling Technology 公司),GAPDH Antibody (美国 Abmart Corporation 公司)。DNA 合成及检测由生工生物工程(上海)有限公司提供服务。*E.coli* 单菌落由江苏省血液研究所惠赠。细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒、细胞裂解液、Cell Counting Kit-8(CCK-8 试剂盒)购自上海碧云天公司。DNA marker、T4 DNA 连接酶、*Taq* 酶等购自大连宝生物工程公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 pIRES2-EGFP-ARHI 质粒细胞内转染

SKOV3 细胞株在 5% CO<sub>2</sub> 浓度、饱和湿度及 37℃ 条件下进行细胞培养及药物干预实验。转染前

1 d 接板 6 孔板,每孔取 (3~4) × 10<sup>5</sup> 个细胞接种在 2 ml 无抗生素的全培养基中,24 h 左右细胞汇合度达 90%~95%。用无血清培养液稀释 pIRES2-EGFP-ARHI 质粒 DNA,配置 A 液,终量 250 μl;用无血清培养液稀释 Lipofectamine™ 2000,配置 B 液,终量 250 μl,室温放置 5 min;轻轻混匀 A、B 液后室温放置 20 min。将 6 孔板中的培养基吸净,每孔加入 1.5 ml 无血清培养基;将 A、B 混合液缓缓加入 6 孔板中,前后左右十字摇匀;37℃,5% CO<sub>2</sub>,培养箱中培养 4~6 h 后换全培养液。24 h 后用 NIKON ECLIPSE TI-S 荧光显微镜观察 GFP 绿色荧光,细胞内有绿色荧光为转染成功细胞。

#### 1.2.2 CCK-8 法检测 SKOV3 细胞生长抑制率

取指数生长期的 SKOV3 细胞,经胰酶消化,制成单细胞悬液,调整浓度为 5 × 10<sup>4</sup> 个/ml。将细胞以每孔 100 μl 接种于 5 块 96 孔板。细胞培养 24 h,实验组转染入 pIRES2-EGFP-ARHI 质粒,质粒对照组转染入 pIRES2-EGFP 质粒,阴性对照组 SKOV3 细胞不转染质粒,只加 1640 及 10% FBS 培养基,每组设 6 个平行孔。放入培养箱中培养,于培养 24、48、72、96 及 120 h 后分别取出 1 块培养板,吸出上清,每孔加入 100 μl 1640 培养液、10 μl CCK-8 试剂,同样条件继续培养 4 h,用自动酶标仪每天固定时间分别测定 30、60 及 120 min 时的吸光度值,计算细胞抑制率,取平均值。测定波长为 450 nm,参考波长为 650 nm,空白对照调零。

细胞抑制率(%)=[(细胞对照组吸光度值-实验组吸光度值)/细胞对照组吸光度值]×100%。实验重复 3 次。

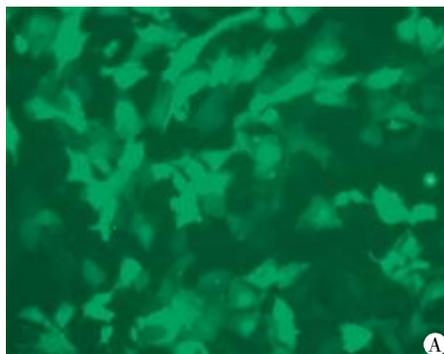
#### 1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率

质粒对照组和阴性对照组各设 4 个平行孔,转染 48、72 h 检测细胞周期及凋亡情况。实验操作按照细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒说明书进行。各组细胞胰酶消化后 1 000 g 左右离心 5 min,吸除上清后加入 1 ml 冰浴预冷的 PBS 重悬细胞,再次离心后加入 70%乙醇固定。于 4℃ 过夜,取出固定细胞,离心后 PBS 洗 2 次,加 RNase A 10 μl,25 μl 碘化丙啶(PI)单染,室温避光放置 30 min,用流式细胞仪

检测,每个样品观察  $1 \times 10^4$  个细胞,于培养 48、72 h 各重复测定 2 次。

#### 1.2.4 Western blot 检测

于细胞培养 48 h 后分实验组、质粒对照组和阴性对照组进行检测。参照说明书进行细胞裂解,收集蛋白样品并测定每个样品的蛋白浓度,在收集的蛋白样品中加入适量浓缩的 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,等量蛋白上样。加入上样缓冲液后沸水浴加热 5 min,以充分变性蛋白。经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后将蛋白转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉封闭 90 min。加入一抗为兔抗人 LC3B 单克隆抗体,室温振荡 20 min 后 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次  $\times$  10 min。加入 HRP 标记羊抗兔 IgG 的二抗(1:5 000 稀释), 37℃ 振荡孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。用增强化学发光法,凝胶成像分析系统拍照



成像,Quantity One 软件扫描分析蛋白表达的相对值。每组细胞均培养 3 份,各测定 1 次。

#### 1.3 统计学方法

应用 SPSS13.0 统计软件对数据进行分析,生长抑制率、凋亡率等比较采用  $\chi^2$  检验;蛋白相对表达量以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间两两比较采用 SNK-*q* 检验, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ARHI 在 SKOV3 细胞中的蛋白表达

在荧光显微镜下观察, pIRES2-EGFP-ARHI-SKOV3 细胞在显微镜下见到较多绿色荧光(图 1A); pIRES2-EGFP-SKOV3 细胞中只能见到少量绿色荧光(图 1B);未转染 ARHI 蛋白的 SKOV3 细胞中则未见绿色荧光。

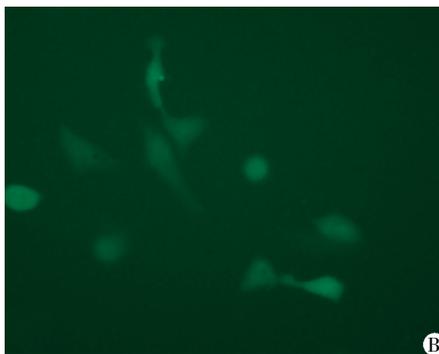


图 1 pIRES2-EGFP-ARHI(A)与 pIRES2-EGFP(B)转染入 SKOV3 细胞 48 h 后绿色荧光蛋白的表达情况( $\times 200$ )

Figure 1 Green fluorescence protein expression after pIRES2-EGFP-ARHI (A) and pIRES2-EGFP (B) were transfected to SKOV3 cells 48 h( $\times 200$ )

### 2.2 细胞生长抑制率检测结果

质粒对照组细胞培养 24、48、72、96、120 h 的生长抑制率分别为 27.20%、31.10%、29.80%、30.73% 和 31.28%。实验组细胞的生长抑制率分别为 64.69%、70.17%、67.01%、66.87% 和 67.70%,均明显高于质粒对照组( $P < 0.01$ ,图 2)。

### 2.3 ARHI 对细胞周期分布相及细胞凋亡率的影响

培养 48 h 及 72 h 后,流式细胞仪检测 pIRES2-EGFP-ARHI-SKOV3 组 S 期细胞分别占 64.18% 及 43.29%,较质粒对照组及阴性对照组有明显增加( $P < 0.01$ ),培养 72 h 时更明显,出现了明显的 S 期阻滞现象。实验组凋亡率于培养 48、72 h 时测定值分别为 47.97% 及 51.34%,与质粒对照组和阴性对照组比较,显著增加,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ,表 1)。

### 2.4 Western blot 检测 LC3-II 结果

LC3-II 蛋白在培养 48 h 的 SKOV3 细胞、

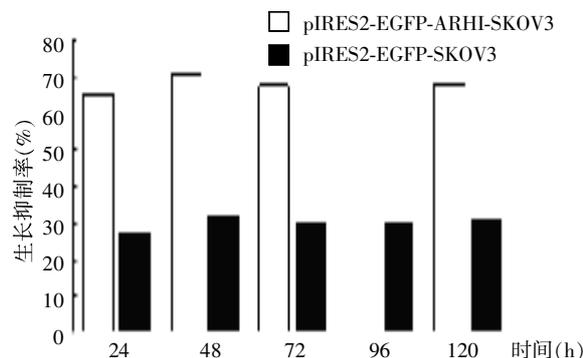


图 2 CCK-8 法测定 pIRES2-EGFP-ARHI-SKOV3 及 pIRES2-EGFP-SKOV3 的生长抑制率

Figure 2 Effect of ARHI on cell proliferation inhibition in SKOV3 by CCK-8 assay

pIRES2-EGFP-SKOV3 细胞及 pIRES2-EGFP-ARHI-SKOV3 细胞中的表达水平见图 3。与内参照

表 1 ARHI 对 SKOV3 细胞周期分布及细胞凋亡率的影响  
Table 1 Influence of ARHI on the cell cycle phase distribution and apoptosis rate (n=4, %)

	48 h				72 h			
	G0/G1	S	G2/M	凋亡率	G0/G1	S	G2/M	凋亡率
SKOV3 组	63.33	15.15	21.52	9.33	70.51	10.89	18.60	4.39
pIRES2-EGFP- SKOV3 组	49.71	38.43	11.87	26.53	66.49	11.57	15.41	20.55
pIRES2-EGFP-ARHI-SKOV3 组	29.57	64.18	6.26	47.97	43.17	43.29	12.04	51.34

GAPDH 相比, SKOV3 细胞组、pIRES2-EGFP-SKOV3 细胞组和 pIRES2-EGFP-ARHI-SKOV3 细胞组 LC3-II 蛋白的相对表达量分别为  $0.0988 \pm 0.0030$ 、 $0.2743 \pm 0.0002$ 、 $2.0811 \pm 0.0061$ , 与质粒对照组和阴性对照组比较, pIRES2-EGFP-ARHI-SKOV3 细胞组 LC3-II 蛋白的表达明显增加, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

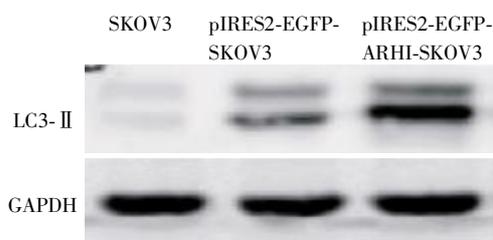


图 3 不同组别中 LC3-II 的蛋白表达情况

Figure 3 The changes of the expressions of LC3-II in different groups

### 3 讨论

ARHI 于 1999 年首次被美国德克萨斯大学 Anderson 癌症中心发现, 为 Ras 超家族成员之一, 属小 GTP 结合蛋白, 定位于人染色体 1p31, 大约 8 kb。ARHI 表达缺失与肿瘤的发生关系密切, 其异常表达的机制有杂合子丢失、甲基化异常及乙酰化组蛋白水平低表达<sup>[4-5]</sup>。许多研究表明 ARHI 抑制细胞生长、迁移、黏附及侵袭, 细胞中 ARHI 失表达有助于卵巢癌的形成<sup>[6-7]</sup>。

本研究将 pIRES2-EGFP-ARHI 质粒转染至 ARHI 低表达的人卵巢癌 SKOV3 细胞中, 在实现 ARHI 基因表达后, 通过 CCK-8 法检测出实验组 pIRES2-EGFP-ARHI-SKOV3 细胞的生长抑制率明显高于对照组, 流式细胞仪检测到 S 期细胞比例升高, 凋亡率增加, 说明 ARHI 对 SKOV3 细胞的增殖有抑制作用, 使细胞阻滞于 S 期, 起到诱导凋亡作用。目前公认的细胞周期调控模式是细胞周期在不同时相的多个调控点上受到调节, 其中主要有 3 个

调控点即 G1/S、G2/M 和有丝分裂中期/后期。在这些调控点上失控就很容易导致异常生长或凋亡的发生。其中 G1/S 调控点最为重要, G1/S 调控点是细胞内外信号经过传递、整合汇集到细胞核, 对细胞的增殖进行调控的关键点, 通过此点后, 细胞的分裂、增殖基本上是由细胞内部自主完成的<sup>[8]</sup>。Hu 等<sup>[9]</sup>的研究观察到 ARHI 可使胰腺癌细胞 G0/G1 期细胞数增多, S 期细胞数减少。本研究表明, ARHI 作用后大量的细胞阻滞于 S 期, 而凋亡率明显增加则说明有很多细胞不能成功完成自我修复, 从 S 期进入到下一期, 从而凋亡。因此, 本文认为 ARHI 对卵巢癌 SKOV3 细胞周期有调控作用, 使细胞不能正常进行增殖, 从而导致凋亡。

至目前为止, 细胞死亡分为 3 类: 细胞凋亡、自噬型细胞死亡和坏死。这 3 类细胞死亡均可以被调控<sup>[10]</sup>。自噬常发生在营养缺乏条件下, 细胞通过降解胞浆内物质, 获得其生存所需能量和生物合成的原料。故自噬在保持细胞稳态, 移除多余或者有害成分, 即在抗衰老、帮助细胞重塑功能或抵御病原体等方面起着重要作用<sup>[11-12]</sup>。LC3 可视为自噬的标志物, 可分为与微管相关的 2 个亚型 1A 和 1B, 人类的 LC3 分为两型: LC3-I 和 LC3-II, 在自噬发生时 LC3-I 在泛素样系统包括 Apg7 和 Apg3 的调解下转化成 LC3-II, 参与自噬小泡的形成<sup>[13]</sup>。

Lu 等<sup>[14]</sup>的研究显示, ARHI 基因能让卵巢癌细胞移植瘤中的癌细胞保持休眠状态, 当休眠细胞中的 ARHI 水平下降时, 移植瘤生长迅速, 而在 ARHI 基因表达恢复到正常水平后, 卵巢癌细胞自体吞噬后死亡, 研究者认为在此过程中, ARHI 基因是卵巢癌细胞自体吞噬机制能否启动的关键。本研究发现培养 48 h 后, 实验组卵巢癌细胞中 LC3-II 蛋白的表达较对照组明显增加, 提示 ARHI 基因表达可促使细胞发生自体吞噬, 说明其对卵巢癌 SKOV3 细胞的生长抑制作用不仅仅因为该基因可使细胞阻滞于 S 期, 起到诱导凋亡作用, 自体吞噬活性增加亦为该基因致细胞死亡的原因。

卵巢恶性肿瘤常规治疗5年生存率低,徘徊在30%左右,因此在手术和化疗改善卵巢恶性肿瘤患者的近期治疗效果的基础上,寻求新的治疗方案及预防复发显得非常重要,近年来抑癌基因及应用抑癌基因治疗卵巢癌已成为研究的热点。Bao等<sup>[15]</sup>直接注射含ARHI基因腺病毒载体的液体到裸鼠模型的人乳腺癌瘤体内,发现肿瘤体积明显缩小。本次实验研究结果表明ARHI基因有可能用于治疗卵巢癌,然而能否真正应用于临床,有待于体内实验等进一步探索。

#### [参考文献]

- [1] Rosen DG, Wang L, Jain AN, et al. Expression of the tumor suppressor gene ARHI in epithelial ovarian cancer is associated with increased expression of p21WAF1/CIP1 and prolonged progression-free survival[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(19):6559-6566
- [2] Chen Y, Zaman MS, Deng G, et al. MicroRNAs 221/222 and genistein-mediated regulation of ARHI tumor suppressor gene in prostate cancer[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2011, 4(1):76-86
- [3] Yang H, Lu X, Qian J, et al. Imprinted tumor suppressor gene ARHI induces apoptosis correlated with changes in DNA methylation in pancreatic cancer cells[J]. *Mol Med Rep*, 2010, 3(4):581-587
- [4] Li J, Cui G, Sun L, et al. STAT3 acetylation-induced promoter methylation is associated with downregulation of the ARHI tumor-suppressor gene in ovarian cancer[J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(1):165-170
- [5] Zhang L, Liu P, Li H, et al. Effect of histone deacetylase inhibitors on cell apoptosis and expression of the tumor suppressor genes RUNX3 and ARHI in ovarian tumors [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(5):1705-1709
- [6] Lu Z, Bast RC Jr. The tumor suppressor gene ARHI (DIRAS3) inhibits ovarian cancer cell migration through multiple mechanisms [J]. *Cell Adh Migr*, 2013, 7(2):232-236
- [7] Badgwell DB, Lu Z, Le K, et al. The tumor-suppressor gene ARHI (DIRAS3) suppresses ovarian cancer cell migration through inhibition of the Stat3 and FAK/Rho signaling pathways[J]. *Oncogene*, 2012, 31(1):68-79
- [8] Skotheim JM, DiTalia S, Siggia ED, et al. Positive feedback of G1 cyclins ensures coherent cell cycle entry [J]. *Nature*, 2008, 454(7202):291-296
- [9] Hu YQ, Si LJ, Ye ZS, et al. Inhibitory effect of ARHI on pancreatic cancer cells and NF- $\kappa$ B activity [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(4):1180-1184
- [10] Chaabane W, User SD, El-Gazzah M, et al. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer [J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2013, 61(1):43-58
- [11] Todde V, Veenhuis M, van der Klei IJ. Autophagy: principles and significance in health and disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792(1):3-13
- [12] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion [J]. *Nature*, 2008, 451(7182):1069-1075
- [13] Kar R, Singha PK, Venkatachalam MA, et al. A novel role for MAP1 LC3 in nonautophagic cytoplasmic vacuolation death of cancer cells [J]. *Oncogene*, 2009, 28(28):2556-2568
- [14] Lu Z, Luo RZ, Lu Y, et al. The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells [J]. *Clin Invest*, 2008, 118(12):3917-3929
- [15] Bao JJ, LeXF, WangRY, et al. Reexpression of the tumor suppressor gene ARHI induces apoptosis in ovarian and breast cancer cells through a caspase-independent calpain dependent pathway [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(24):7264-7272

[收稿日期] 2013-03-03