

膜辅助蛋白致宫颈癌细胞免疫逃逸机制探讨

陈正林¹, 顾平清², 高玲娟^{2*}

(¹江苏省省级机关医院检验科, 江苏 南京 210024; ²南京医科大学附属南京妇幼保健院检验科, 江苏 南京 210004)

[摘要] 目的:探讨膜辅助蛋白(membrane cofactor protein, MCP)与宫颈癌细胞免疫逃逸之间的关系,揭示 MCP 在宫颈癌发生、发展中的作用。方法:以宫颈癌细胞系 ME180、宫颈癌组织和癌旁正常组织为材料,采用 real-time PCR 和 Western blot 检测 MCP 基因 mRNA 和蛋白质表达水平;利用小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA)沉默 MCP 基因表达后,四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检查宫颈癌细胞的增殖,以 Transwell 评估宫颈癌细胞的迁移能力。结果:MCP 的表达在宫颈癌组织中明显高于其配对的癌旁正常组织,抑制 MCP 基因的表达能显著降低 ME180 细胞的增殖、迁移能力。结论:MCP 在宫颈癌细胞中的高表达可能是肿瘤细胞免疫逃逸的重要机制,在宫颈癌的发生发展中发挥重要作用。

[关键词] 膜辅助蛋白;宫颈癌

[中图分类号] Q786

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)02-164-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20130204

Role of membrane cofactor protein in regulating survival of human cervical cancer cells

Chen Zhenglin¹, Gu Pingqing², Gao Lingjuan^{2*}

(¹Clinical Laboratory, Jiangsu Provincial Official Hospital, Nanjing 210024; ²Department of Clinical Laboratory, Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of membrane cofactor protein (MCP) on the survival of human cervical ovarian cancer cell. **Methods:** The expression of MCP mRNA and protein was explored by real-time PCR and Western blot, meanwhile, the effect of MCP on the migration and proliferation of ME180 cell was measured by Transwell and methyl thiazolyl tetrazolium respectively. The augment of human cervical ovarian cancer cells was detected by using MTT method, and the migration of such cells were evaluated by Transwell. **Results:** The results showed that the expression of MCP significantly increased in human cervical cancer tissue, which contributed to increasing the cells migration and augment the number of ME180 cells. **Conclusion:** The high expression of MCP in human cervical ovarian cancer cells might be the key mechanism of the survival of such cells, and play a vital role in the promotion process.

[Key words] membrane cofactor protein; cervical ovarian cancer

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(2): 164-167]

宫颈癌是世界范围内危害女性生殖健康的常见恶性肿瘤,占世界女性恶性肿瘤的第 2 位、发展中国家恶性肿瘤的第 1 位^[1-2]。虽然机体对肿瘤细胞有一系列的免疫防御机制,但宫颈癌仍能发生免疫逃逸^[3]。因此深入研究免疫防御系统对宫颈癌发生的影响及其作用机制开始成为预防医学领域疾病早期防治的一个热点研究内容^[4]。膜辅助蛋白(membrane cofactor

protein, MCP)作为重要的抑制补体攻膜复合物形成的补体调节蛋白^[5],可有效控制补体的活化,保护宿主细胞免受补体介导的杀伤,防止同源补体对自身组织细胞的溶破^[6-7],其在肿瘤组织中的异常表达可能是肿瘤发生的生化基础之一^[8]。本文探讨 MCP 在宫颈癌中的表达及其生物学意义。

1 材料与方法

1.1 材料

收集 2008 年 1 月~2010 年 12 月南京医科大学附属南京妇幼保健院宫颈癌手术患者 30 例,病理诊

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81000251)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: lj2011g@163.com

断明确。所有标本由癌组织及距癌组织 5 cm 以上的癌旁正常组织(经病理确证无癌细胞浸润)配对组成。手术取材后立即置于 -80°C 冻存备用。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

宫颈癌细胞系 ME180 购于中国典型培养物保藏中心。细胞贴壁生长,接种于完全营养液(含 15%胎牛血清,100 U/ml 青霉素,100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素,非必需氨基酸 10 ml/L 及 MEM,pH7.2)中,置于含 5% CO_2 、饱和湿度、 37°C 的培养箱中培养,每 1~2 d 换液 1 次。

1.2.2 pGenesil-MCP siRNA 重组载体的构建

质粒 pGenesil-1 含耐卡那霉素 Kanar 基因、抗新霉素 Neor 基因及人 U6 启动子(购自武汉晶赛生物工程技术有限公司)。根据小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA)设计原则,选定 MCP siRNA 特异性序列如下:5'-GCCGCGCGCGGAAGACCGTG-3'。取等量 100 mmol/L 的 DNA 合成片段,分别在 50 μl 退火缓冲液中加热到 95°C ,5 min,然后缓慢降至室温,得到双链 DNA。合成的 DNA 片段两端设计有 BamH I 和 Hind III 酶切位点,便于与 pGenesil-1 载体克隆连接。另外,为了便于酶切鉴定,在转录终止信号“TTTTTT”后设计了 Sal I 酶切位点。将质粒 pGenesil-1 用 BamH I + Hind III 双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳回收大片段。将线性化的 pGenesil-1 和合成的 siRNA 在 T₄ DNA 连接酶的作用下, 22°C 水浴反应过夜;各取 5 μl 连接产物转化感受态细胞 DH5 α ,涂布于含卡那霉素(终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的 LB 平板上, 37°C 恒温箱培养过夜;从每个培养皿上各挑取 4 个单克隆菌落接种于 3 ml 含卡那霉素(终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的 LB 培养液中, 37°C ,250 r/min 恒温摇床培养过夜;用质粒纯化试剂盒提取质粒,并用 Sal I 做酶切,1%琼脂糖凝胶电泳鉴定;筛选的阳性克隆质粒经武汉晶赛生物工程技术有限公司 DNA 测序分析,以证实目的 DNA 片段克隆入 pGenesil-1 中。

1.2.3 实验细胞分组及处理

将培养的宫颈癌细胞系 ME180 分做 4 种处理:
① MCP siRNA 组:取培养的宫颈癌细胞系 ME180,50%~70%融合,弃去培养液,用不完全营养液洗细胞 3 次。加 1.5 ml 转染混合液(不完全营养液稀释 3.0 μg pGenesil-MCP siRNA 至 100 μl ;不完全营养液稀释 8.0 μl 脂质体至 100 μl ,室温放置 30 min。混合上述两种液体,放置室温下 25 min)于宫颈癌细胞系 ME180 上。于 37°C 5% CO_2 孵箱转染 6 h,加入完全培养液,继续培养 60 h;
② Negative siRNA

组:除使用 Negative pGenesil-MCP siRNA 外,余同上;
③ 空载体组:除使用空载体外,余同上;
④ PBS 组:宫颈癌细胞系 ME180 仅用 PBS 处理。

1.2.4 real-time PCR

实验设置提取空白对照(以水代替样品提取 DNA)、PCR 反应试剂空白对照(以水代替 DNA 模板)和阳性对照。实时荧光 PCR 反应在 Mx 3000p real-time PCR 检测仪上进行,反应参数为 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 23 s, 63°C 25 s, 72°C 10 s,共 40 个循环;最后 72°C 延伸 10 min;在 60°C 进行单点荧光检测。选择荧光检测模式 FAM 荧光,基线调整取 3~15 个循环的荧光信号平均值,以荧光增长曲线超过阈值线,并呈良好的对数增长,判断为阳性。实验数据以公式 $\text{Ct}_{\beta\text{-actin}}/\text{Ct}_{\text{目标基因}}$ 进行计算。

1.2.5 免疫印迹

提取癌组织及癌旁正常组织的胞浆蛋白,每个样本取 100 μg 总蛋白上样。湿法电转移至硝酸纤维素膜后,室温封闭 1~2 h,置于抗 MCP 或 β -actin 单克隆抗体(购自美国 Santa Cruz 公司)的稀释液中孵育 1 h。将膜放入抗小鼠二抗(购自美国 Cell Signaling 公司)的稀释液室温孵育 1 h,显色液显色。以 Bio-Rad 凝胶成像分析仪进行灰度扫描分析目的蛋白的表达。

1.2.6 ME180 细胞增殖及活性检测

四甲偶氮唑盐(MTT)比色法:调整细胞密度至 $(5\sim 10)\times 10^4$ 个/ml;细胞接种到 96 孔板,每孔体积 200 μl ;至细胞单层铺满孔底,每孔加 20 μl MTT 溶液(5 mg/ml,用 PBS 配制,pH7.4),继续孵育 4 h,终止培养。每孔加 150 μl DMSO,振荡 10 min,使结晶物充分溶解。选择 490 nm 波长,在酶联免疫监测仪上测定各孔光吸收值,记录结果。

1.2.7 细胞迁移实验

细胞体外侵袭能力的测定在重建基底膜的 8 μm 孔径的聚碳酸酯膜 Transwell 小室(24 孔板);在 Transwell 小室的下室中预先加入 600 μl 20% FBS 的 MEM 培养基, 37°C 平衡 1 h;将不同宫颈癌细胞株的细胞用 PBS 洗 3 次;消化后重悬于含 10% FBS 的 MEM 培养基中,取细胞悬液 100 μl 加入至上室。 37°C 、5% CO_2 条件下培养 24 h;取出 Transwell 小室,用棉棒擦净未穿透微孔滤膜的细胞;PBS 冲洗后用 4% 福尔马林固定,行姬姆萨染色;在 200 倍显微镜下计数滤膜下表面的细胞数,随机计数 5 个视野中的细胞数目;以迁移细胞的数目来表示肿瘤细胞的迁移能力。

1.3 统计学方法

所得数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS11.5 统计软件进行统计学分析, 其中宫颈癌组织与宫颈癌旁组织比较采用配对 t 检验; 各质粒转染组与 PBS 组之间采用 t 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 宫颈癌和癌旁正常组织中 MCP 的表达水平

real-time PCR 结果显示, 30 例宫颈癌组织中, MCP mRNA 的表达明显高于其相对应的宫颈癌旁组织, 相对比值分析显示, 宫颈癌组织中 MCP 的表达与宫颈癌旁组织存在显著性差异 ($P < 0.01$, 表 1)。

灰度扫描蛋白相对比值 (MCP/ β -actin) 分析发现, 宫颈癌组织中 MCP 蛋白明显增多, 与相应的宫颈癌旁组织比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1)。

表 1 宫颈癌及癌旁组织中 MCP mRNA 和 MCP 蛋白的表达水平相对比值分析

组别	n	MCP mRNA	MCP 蛋白
宫颈癌组织	30	0.95 \pm 0.14**	0.81 \pm 0.11*
癌旁组织	30	0.22 \pm 0.18	0.36 \pm 0.12

与宫颈癌旁组织比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.2 沉默 MCP 对宫颈癌细胞株 ME180 增殖及迁移的影响

ME180 宫颈癌细胞融合度达到 80% 时, 分别施加 MCP siRNA、Negative siRNA、空载体以及 PBS 作用后, 以 MTT 比色法检测不同施加因素下, ME180 宫颈癌细胞增殖情况。结果显示, MCP siRNA 组与 PBS 组比较, 细胞增殖率明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$, 表 2), 但 Negative siRNA 组、空载体组与 PBS 组比较无显著差异 ($P > 0.05$)。

本研究同时还检测了宫颈癌细胞的迁移情况, 结果显示, MCP siRNA 组细胞数与 PBS 组比较明显减少, 差异具有显著性 ($P < 0.01$), 但 Negative siRNA 组、空载体组与 PBS 比较, 其差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

MCP 是一种广泛分布于组织细胞表面的糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚固糖蛋白, 具有多种重要的免疫功能, 其最重要的功能是作为补体系统终末阶段

表 2 各组宫颈癌细胞增殖水平与细胞迁移情况比较

组别	细胞增殖率(%)	迁移细胞数(个)
MCP siRNA	32 \pm 3**	158 \pm 23**
Negative siRNA	55 \pm 4	386 \pm 24
空载体	60 \pm 4	406 \pm 27
PBS	71 \pm 6	470 \pm 30

与 PBS 组比较, ** $P < 0.01$ 。

的调节蛋白, 以同源限制的方式抑制补体攻膜复合物(MAC)的装配, 以保护宿主细胞免受补体溶解破裂^[9-10]。许多研究表明在多种生殖系统肿瘤细胞中发现 MCP 的过表达, 提示 MCP 可能与肿瘤细胞逃脱免疫监视相关^[11]。Murray 等^[12]用免疫组织化学等方法对 54 例恶性子宫内膜组织中补体调节蛋白的表达进行检测, 发现恶性子宫内膜组织高表达 MCP, 并推测这是恶性子宫内膜组织之所以能逃避补体攻击所致细胞溶解的原因, 并由此间接促进其致癌作用。这说明在生殖道细胞中, 若 MCP 等补体调节蛋白超量表达, 就会使癌变细胞逃脱机体的监视而无限增殖。

为了进一步明确 MCP 的表达与宫颈癌的关系, 本研究通过 real-time PCR 检测了 MCP mRNA 转录水平, 并应用免疫印迹对 MCP 蛋白的表达水平进行测定。结果发现, MCP mRNA 和 MCP 蛋白在宫颈癌组织中较癌旁正常组织的表达量明显升高, 提示宫颈癌的发生、增殖、迁移可能与 MCP 的高表达有密切的联系。

RNAi 技术是近年来发展起来的沉默基因的新技术, 其具有快速、高效地抑制特异性基因表达的特点^[13-14], 由于 siRNA 具有高效敲除基因表达的作用, 已被广大科学工作者用作研究基因功能及基因治疗的工具^[15]。本课题组利用 RNAi 技术设计了针对 MCP mRNA 的干扰序列并构建了 pGenesil-MCP siRNA 重组载体, 将该质粒载体转染宫颈癌 ME180 细胞, 实验结果显示, MCP siRNA 能明显减少宫颈癌细胞 ME180 的增殖效应, 抑制效果明显高于 Negative siRNA。同期检测 ME180 细胞的迁移能力, MCP siRNA 组的迁移能力也呈显著下降, 这些结果提示, 体外实验证实了 pGenesil-MCP siRNA 重组载体沉默 MCP 的效应, 并且也说明了 MCP 在肿瘤细胞生长及肿瘤逃逸中的作用, 为肿瘤的免疫逃逸和靶向治疗研究提供了一个全新的理念及实验依据, 具有重要的理论价值及广阔的应用前景。

[参考文献]

- [1] Govindappagari S, Schiavone MB, Wright JD. Cervical neoplasia[J]. Clin Obstet Gynecol, 2011, 54(4): 528-536
- [2] Clare J, Edwards D, Bagnall H, et al. The use of cervical screening history data to interpret cervical cancer incidence trends[J]. J Public Health (Oxf), 2008, 30(2): 171-177
- [3] Patel S, Chiplunkar S. Host immune responses to cervical cancer[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2009, 21(1): 54-59
- [4] Frag A, Stentella P, De Ioris A, et al. Young women, cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus: risk factor for persistence and recurrence[J]. Cancer Lett, 2003, 196(2): 127-134
- [5] Fishelson Z, Donin N, Zell S. Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory (mCRPs) in tumors[J]. Mol Immunol, 2003, 40(2-4): 109-123
- [6] Piccoli AK, Alegretti AP, Schneider L, et al. Expression of complement regulatory proteins CD55, CD59, CD35, and CD46 in rheumatoid arthritis[J]. Rev Bras Reumatol, 2011, 51(5): 503-510
- [7] Kolev M, Towner L, Donev R. Complement in cancer and cancer immunotherapy[J]. Arch Immunol Ther Exp, 2011, 59(6): 407-419
- [8] Murray KP, Mathure S, Kaul R, et al. Expression of complement regulatory protein-CD35, CD46, CD55, and CD 59-in benign and malignant endometrial tissue[J]. Gynecol Oncol, 2000, 76(2): 176-182
- [9] Alegretti AP, Schneider L, Piccoli AK, et al. The role of complement regulatory proteins in peripheral blood cells of patients with systemic lupus erythematosus[J]. Cell Immunol, 2012, 277(1-2): 1-7
- [10] Piccoli AK, Alegretti AP, Schneider L, et al. Expression of complement regulatory proteins CD55, CD59, CD35, and CD46 in rheumatoid arthritis[J]. Rev Bras Reumatol, 2011, 51(5): 503-510
- [11] Cui W, Zhao Y, Shan C, et al. HBXIP upregulates CD46, CD55 and CD59 through ERK1/2/NF- κ B signaling to protect breast cancer cells from complement attack[J]. FEBS Lett, 2012, 586(6): 766-771
- [12] Murray KP, Mathure S, Kaul R, et al. Expression of complement regulatory proteins-CD35, CD46, CD55, and CD 59-in benign and malignant endometrial tissue[J]. Gynecol Oncol, 2000, 76(2): 176-182
- [13] 康磊, 王荣福. 核素示踪技术在小干扰RNA显像对研究进展[J]. 北京大学学报:医学版, 2010, 42(5): 616-618
- [14] Dykxhoorn DM, Lieberman J. Knocking down disease with siRNA[J]. Cell, 2006, 126(2): 231-235
- [15] Yao B, Li S, Chan EK. Function of GW182 and GW bodies in siRNA and miRNA pathways[J]. Adv Exp Med Biol, 2013, 768: 71-96

[收稿日期] 2012-08-16

本刊现已启用网上稿件管理系统, 作者登陆
<http://jnm.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件
审理情况。