

泛素水解酶 22 siRNA 对宫颈癌 CD133⁺ 宫颈癌干细胞增殖和侵袭的影响

靳 荣¹, 李红芳²

(1.天津市第五中心医院妇产科, 天津 300450; 2.兰州市第一人民医院妇产科, 甘肃 兰州 730050)

摘要:【目的】采用 USP22 siRNA 对宫颈癌 CD133⁺CaSki 宫颈癌干细胞进行基因治疗,观察其对 USP22 含量和对增殖侵袭能力的影响,并对其分子生物学机制进行初步探讨。【方法】流式分选获得 CD133⁺ CaSki 宫颈癌干细胞,分为 USP22 组、阴性对照(NC)组、空白对照组(MOCK)组。采用 western blot 法比较各组细胞 USP22 蛋白的含量,MTT 法检测 3 组细胞的增殖能力,Transwell 法检测 3 组细胞的侵袭能力,荧光素酶报告基因实验检测 3 组细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路的活性。【结果】采用流式细胞术分选 CD133 阳性细胞后 CaSki 细胞 CD133 阳性率为 (96.87 \pm 5.31)%,显示流式分选宫颈癌干细胞成功 ($P < 0.05$)。Western blot 检测结果显示,USP22 组 CD133⁺ CaSki 细胞中 USP22 蛋白表达量明显降低。MTT 结果显示 USP22 组细胞增殖能力明显减弱,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。Transwell 实验结果显示 USP22 组 CD133⁺ CaSki 细胞侵袭能力明显受到抑制,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。荧光素酶报告基因实验结果显示,USP22 组 Wnt/ β -catenin 信号通路的转录活性明显降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。【结论】USP22 siRNA 有降低 CD133⁺ CaSki 宫颈癌干细胞内 Wnt/ β -catenin 信号通路活性的作用,进而可以实现对宫颈癌干细胞增殖和侵袭功能的抑制,该治疗方法有望成为宫颈癌基因治疗的新手段。

关键词: 微小 RNA;宫颈癌干细胞;细胞增殖;细胞侵袭;泛素水解酶 22

中图分类号:R737.33

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2016)01-0048-06

Effect of siRNA USP22 on Proliferation and Invasion of CD133⁺ Cervical Cancer Stem Cells

JIN Rong¹, LI Hongfang²

(1.Department of Obstetrics and Gynecology, Tianjin Fifth Central Hospital, Tianjin 300450, China;

2.Department of Obstetrics and Gynecology, First People's Hospital of Lanzhou City, Lanzhou 730050, china)

Corresponding to: JIN Rong, E-mail: jin.rong0815@163.com

Abstract: 【Objective】 CD133⁺CaSki cervical cancer stem cells transfected by USP22 siRNA, observe the content of USP22 and its effect on proliferation and invasion, and its molecular mechanisms are discussed. 【Methods】 Flow sorting obtain CD133⁺CaSki cervical cancer stem cells were divided into USP22 group, negative control (NC) group and blank control (MOCK) group. Western blot was used to compare the content of USP22 protein in each group. The proliferation ability of the 3 groups of cells was detected by MTT assay. Transwell method was used to detect the invasion ability of the 3 groups of cells. Luciferase reporter gene assay was used to detect the activity of Wnt/ β -catenin signaling pathway in 3 groups of cells. 【Results】 The positive rates of CD133 cells after flow sorting were (96.87 \pm 5.31)%, elected cervical cancer stem cells successfully ($P < 0.05$). The expression of USP22 protein in USP22 group was significantly lower than that in MOCK group. MTT results showed that the proliferation ability of USP22 group was significantly decreased, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The number of invasion cells in USP22 group was significantly lower than that in MOCK group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The transcriptional activity of Wnt/ β -catenin signaling pathway in USP22 group was significantly lower than that in MOCK group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). 【Conclusion】 USP22 siRNA can inhibit proliferation and invasion of CD133⁺CaSki cervical cancer stem cells

收稿日期:2014-11-19

基金项目:天津市滨海新区卫生局科研基金(2014BWKY015)

作者简介:靳荣,通信作者,E-mail:jin.rong0815@163.com

by down regulating the transcriptional activity of the β -catenin signaling pathway. This treatment is expected to become the new means of gene therapy in cervical carcinoma.

Key words: siRNA; cervical cancer stem cells; cell proliferation; cell invasion; USP22

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2016, 37(1):48-53]

宫颈癌是妇产科最常见恶性肿瘤之一, 严重危害我国妇女健康, 目前尚无确切有效的基因治疗方法^[1]。目前认为, 宫颈癌等恶性肿瘤组织中存在的一小群具有干细胞特性的细胞亚群, 是使肿瘤实现无限增殖、侵袭的重要细胞^[2-3]。直接对肿瘤干细胞进行基因治疗, 有望实现良好的抗肿瘤效果^[4]。泛素水解酶 22 (ubiquitin specific processing peptidase 22, USP22) 是一种直接或间接参与哺乳动物细胞增殖, 并与肺癌在内的多种肿瘤的发生、发展密切相关的基因。近年的研究表明, USP22 在多种肿瘤中表达水平异常, 调控 USP22 的表达水平可以产生对恶性肿瘤的抑制效果^[5-6]。但目前 USP22 与宫颈癌干细胞发生发展之间的关系尚无定论^[7]。本研究采用 USP22 siRNA 对宫颈癌 CD133⁺CaSki 宫颈癌干细胞进行基因治疗, 观察其对 USP22 含量和对增殖侵袭能力的影响, 并对其分子生物学机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料来源

1.1.1 细胞系 宫颈癌细胞株 CaSki 购自美国典型微生物菌种保藏中心, 由天津市第五中心医院中心实验室保存。

1.1.2 主要试剂 利用 GenBank 工具确定 USP22 蛋白序列, 设计特异性 siRNA 序列。并设计阴性对照 (negative MOCK) siRNA 序列。USP22 小分子干扰 RNA (USP22-siRNA)、阴性对照 siRNA (NC-siRNA) 质粒由广州爱科生物技术有限公司参考文献报道的方法合成。细胞培养基 RPMI 1640, 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、PBS 液购自美国 HyClone 公司。兔抗人 USP22 抗体、GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶) 蛋白抗体和 CD133-FITC 荧光抗体购自美国 BD 公司。荧光素酶报告基因检测试剂盒 (Luciferase reporter gene assay kit)、Wnt/ β -catenin 信号通路荧光素酶

报告质粒 Top-luc-luciferaseTM Report 试剂盒购自广州爱科生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 CD133⁺ CaSki 细胞的分选、培养、转染及分组 复苏培养 CaSki 宫颈癌细胞株, 用含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基培养。取对数生长期 CaSki 细胞, 胰酶消化、Buffer 清洗后重悬细胞成 1×10^7 /mL。加入 CD133-FITC 荧光抗体避光孵育 1 h 后, 送流式分选后进行培养。于分选前后流式细胞术检测 CD133 阳性细胞率^[8]。细胞融合度达 85% 时, 采用 USP22 mimic、NC-siRNA, 按照脂质载体试剂说明书进行转染, 设立 USP22 组和 NC 组。同时设立 CD133⁺CaSki 细胞空白对照 (MOCK) 组。

1.2.2 蛋白印迹法检测 3 组细胞中功能蛋白的表达 siRNA 转染宫颈癌干细胞 48 h。收集细胞后提取蛋白, 按照常规方法进行 Western-blot, 分析 USP22 和 GAPDH 蛋白的表达。每组细胞实验设 3 个复孔。

1.2.3 MTT 比色法检测 3 组细胞的增殖能力 各 USP22-siRNA 组以 2×10^4 个细胞/孔重悬于 200 μ L 含有 PBS 的完全培养基中。分组进行转染后, 于饱和湿度, 体积分数为 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 条件下培养。分别于 24、48 和 72 h 时间点进行 MTT 检测。检测时每孔加入 20 μ L 0.5% MTT 溶液, 混匀后继续培养 2 h。弃去含 MTT 培养液后, 加入 DMSO 液溶解完全。酶标仪测 490 nm 波长吸光度 (A) 值后计算细胞增殖率。细胞增殖率 = $(A_{\text{转染组}} / A_{\text{control组}}) \times 100\%$ 。每组细胞实验设 3 个复孔。

1.2.4 Transwell 法检测 CD133⁺ CaSki 细胞的侵袭能力 Transwell 小室上室加入 40 μ L 稀释后的 Matrigel 胶, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 凝固。将分组转染培养 48 h 后的各组 CD133⁺ CaSki 细胞重悬于无血清培养基中, 接种入 Transwell 小室上室。Transwell 小室下室加入 600 μ L 含 20% PBS 的完全培养基。于饱和湿度, 体积分数为 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 条件下培养

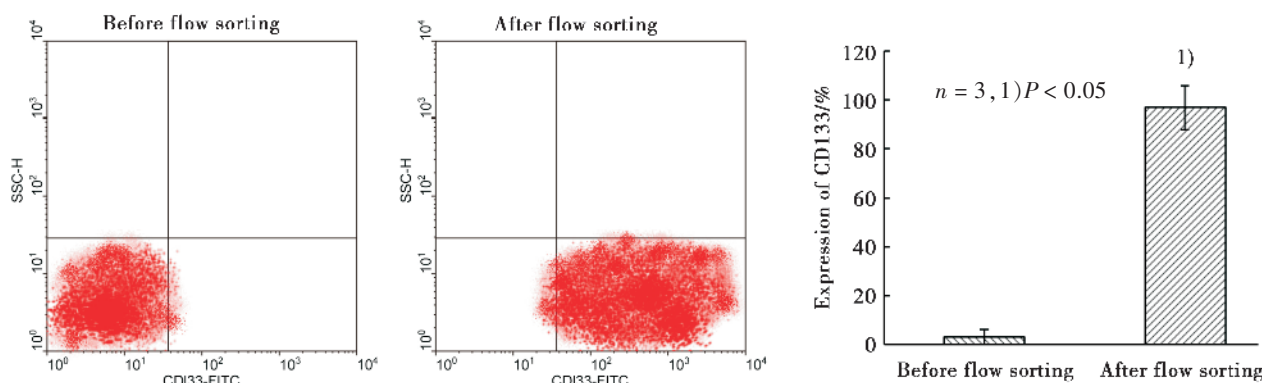


图 1 流式细胞术分选前后 CaSki 细胞 CD133 表达率检测

Fig.1 Expression of CD133 in CaSki cells before and after sorting by flow cytometry

48 h 后取出小室。棉签擦去未穿过膜的宫颈癌细胞,无水乙醇固定 30 min。晾干后行 Giesma 染色,自然干燥后与光镜下观察穿过膜的侵袭细胞数量。每组细胞实验设 3 个复孔。

1.2.5 荧光素酶报告基因实验检测 CD133⁺CaSki 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路活性 各组细胞严格按照试剂盒说明书,采用 Top-luc-luciferaseTM Report 试剂盒处理后,于酶标仪中测定 Wnt/ β -catenin 信号通路荧光素酶活性。每组细胞实验设 3 个复孔。

1.3 统计学处理

应用 SPSS13.0 软件对实验数据进行分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,时间和处理因素不同的 3 组之间的比较采用单因素方差分析,两组之间的比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 流式分选 CaSki 细胞前后 CD133 阳性率的比较

如图 1 所示,采用流式细胞术分选 CD133 阳性细胞前后进行检测,发现分选前后 CaSki 细胞 CD133 阳性率分别为 $(3.11 \pm 0.65)\%$ 和 $(96.87 \pm 5.31)\%$,差异具有统计学意义($t = 18.13, P = 0.011$)。显示流式分选宫颈癌干细胞成功(图 1)。

2.2 CD133⁺CaSki 细胞 USP22 蛋白含量的比较

Western blot 检测结果显示,USP22 组细胞中

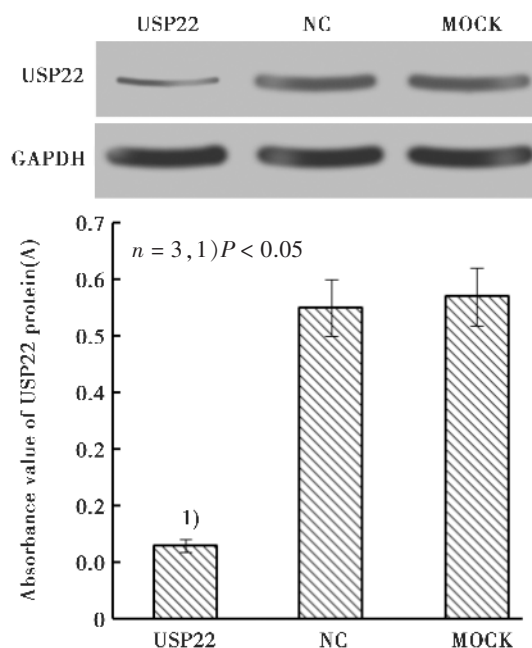


图 2 USP22-siRNA 对 CaSki 细胞 USP22 蛋白含量的影响

Fig.2 The inhibition of USP22-siRNA on the expression of USP22 protein in CaSki cells

USP22 蛋白的表达条带较 MOCK 组明显减弱,而 NC 组的表达与 MOCK 组相比无明显差异。USP22 组细胞的 USP22 蛋白表达量明显降低(图 2)。

2.3 CD133⁺CaSki 细胞增殖能力的比较

MTT 结果显示,USP22 组细胞在转染 24 h 后增殖能力明显减弱,随着时间的增加,在 48 和 72 h 时,增殖能力的减弱更加明显 ($F = 10.889, P =$

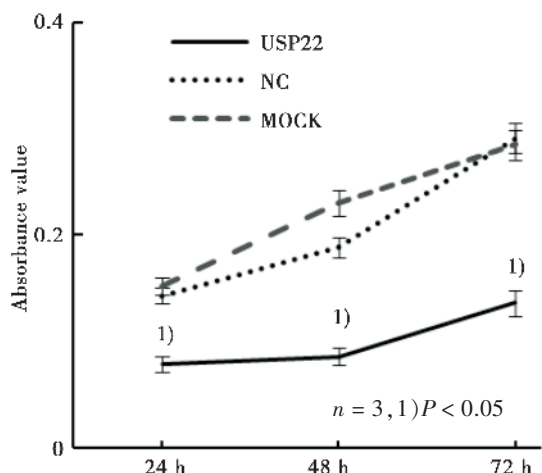


图 3 USP22-siRNA 对 CaSki 细胞增殖的影响

Fig.3 Effect of USP22-siRNA on proliferation of CaSki cells

0.028)。但是各时间点 MOCK 组和 NC 组的增殖能力相比无统计学差异 ($P = 0.054$, 图 3)。

2.4 CD133⁺CaSki 细胞侵袭能力的比较

Transwell 实验结果显示, USP22 组 CD133⁺

CaSki 细胞侵袭能力明显受到抑制, 表现为过膜细胞数量 9.0 ± 3.6 明显少于 MOCK 组的 38.4 ± 9.7 , 差异具有统计学意义 ($F = 14.423$, $LSD-t = -9.66$, $P = 0.009$)。NC 组的过膜细胞数量 36.5 ± 5.1 与 MOCK 组差异无统计学意义 ($LSD-t = 0.36$, $P = 0.077$; 图 4)。

2.5 CD133⁺CaSki 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路活性的比较

荧光素酶报告基因实验结果显示, USP22 组 Wnt/ β -catenin 信号通路的转录活性明显降低 ($F = 18.927$, $P = 0.015$)。NC -siRNA 与 MOCK 组 Wnt/ β -catenin 信号通路的转录活性差异无统计学意义 ($P = 0.207$, 图 5)。

3 讨 论

与一般宫颈癌细胞相比, 宫颈癌干细胞具有更强的增殖、侵袭潜能, 在宫颈癌发生、发展、增殖、侵袭过程中发挥重要作用^[9-10]。如果可以通过

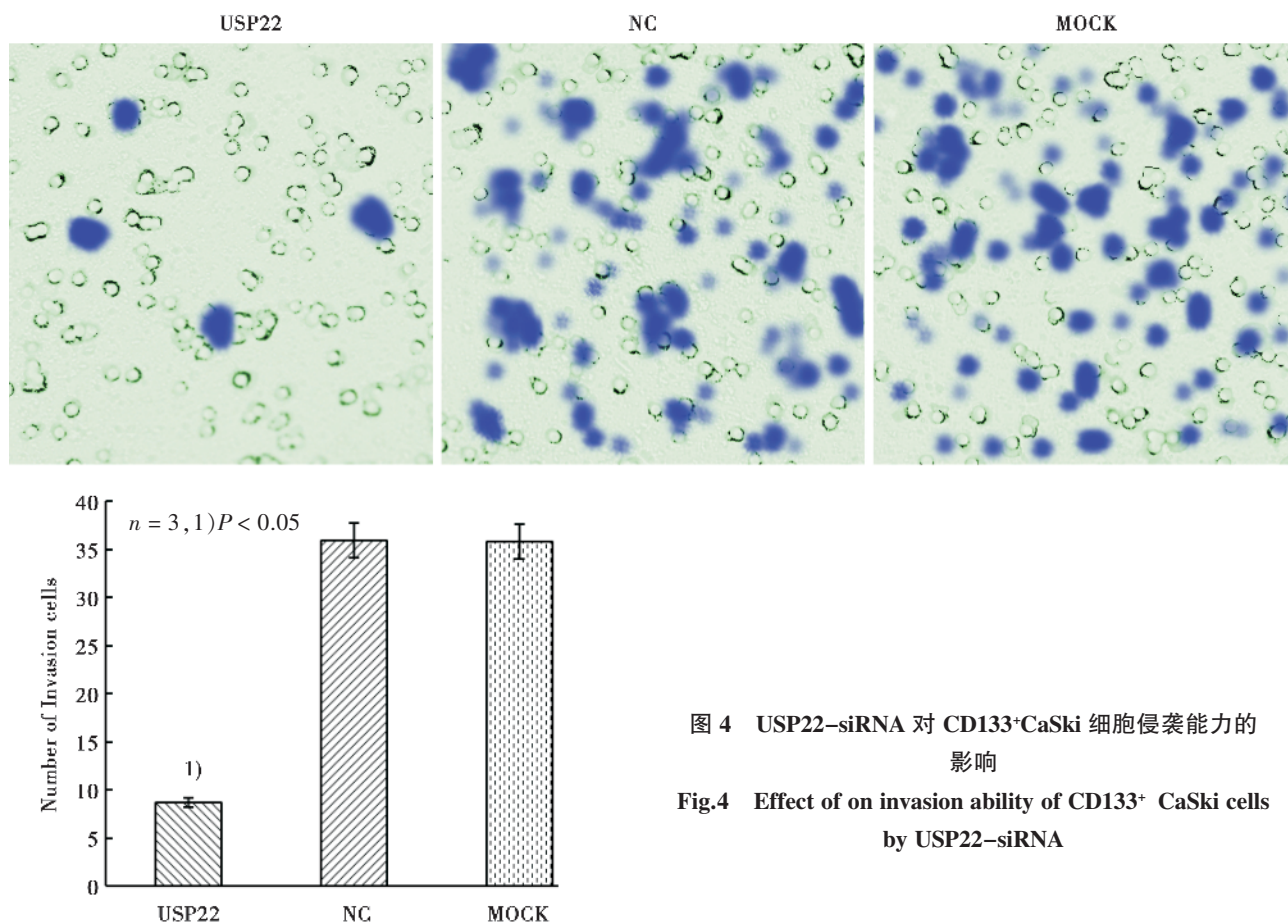


图 4 USP22-siRNA 对 CD133⁺CaSki 细胞侵袭能力的影响

Fig.4 Effect of on invasion ability of CD133⁺ CaSki cells by USP22-siRNA

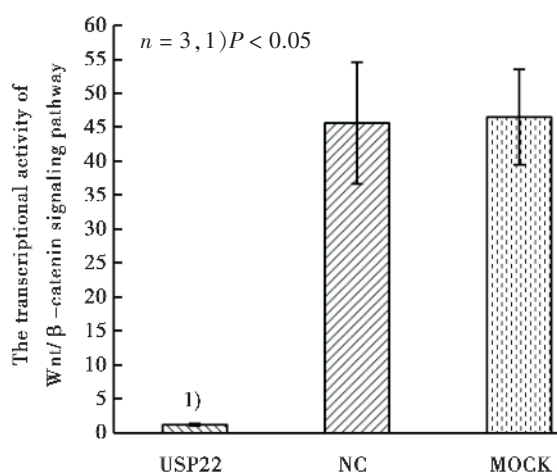


图 5 USP22-siRNA 对 CD133⁺ CaSki 细胞 Wnt/β-catenin 信号通路转录活性的影响

Fig.5 Effect of USP22-siRNA on the transcriptional activity of Wnt/β-catenin signaling pathway in CD133⁺ CaSki cells

基因治疗手段靶向化抑制宫颈癌干细胞特定基因的表达及增殖、侵袭等功能,即有望实现对宫颈癌的有效抑制,进而开发出有效的临床治疗手段^[11]。CD133 蛋白是一种广泛存在于包括宫颈癌、肺癌和肝癌等肿瘤干细胞表面的特异性表面分子标志,在干细胞的识别中具有不可替代的作用^[12-13]。所以,本研究采用通用的以 CD133 流式分选技术进行宫颈癌 CaSki 细胞中宫颈癌干细胞的分选。结果显示,分选后获得的宫颈癌干细胞 CD133 阳性率达到 $(96.87 \pm 5.31)\%$,分选效果满意。

USP22 是一种特异性的泛素水解酶,定位于人类染色体的 17p11.2 位点,包含 14 个外显子及一个 1 500 bp 左右大小的开放读码框,可编码 525 个氨基酸^[14]。USP22 蛋白分子质量约 60 ku,一般表达于细胞核,主要功能为从大蛋白上移除泛素分子^[15]。USP22 蛋白末端的氨基末端存在的锌指序列是其实现与靶蛋白结合和相互作用的重要结构^[16]。诸多研究表明,USP22 的表达水平与肿瘤的恶性程度、增殖、转移及预后相关,上调肿瘤细胞的 USP22 表达可促进肿瘤的增殖,而抑制 USP22 基因的表达则可以抑制细胞的增殖和侵袭,并促进凋亡^[17]。USP22 有望成为对宫颈癌干细胞进行基因治疗的良好靶点^[18]。本研究通过导入外源性 USP22 siRNA,降低宫颈癌干细胞内的

USP22 水平,实现对宫颈癌 CD133⁺宫颈癌干细胞增殖和侵袭的抑制,并初步明确了其起效机制。

本团队在研究中首先对宫颈癌 CaSki 细胞进行流式分选,高效筛选出 CD133⁺ CaSki 宫颈癌干细胞进行研究。进而对筛选出的宫颈癌干细胞采用 USP22 siRNA 进行基因治疗,证明了 USP22 siRNA 可以有效抑制宫颈癌干细胞中 USP22 基因的表达,明显降低 USP22 蛋白含量。为了进一步明确抑制 USP22 表达对宫颈癌干细胞增殖和侵袭能力的影响,我们进一步进行了 MTT 实验和 Transwell 实验对其进行考察。实验结果表明,USP22 基因表达被抑制后,CD133⁺ CaSki 宫颈癌干细胞的增殖能力明显减弱,侵袭能力也收到明显抑制。

为了明确 USP22 siRNA 抑制宫颈癌干细胞增殖、侵袭的分子通路机制,笔者对各实验组细胞中 Wnt/β-catenin 信号通路的活性进行了考察,发现 USP22 基因的表达水平降低与 Wnt/β-catenin 信号通路的活性降低密切相关。既往已有大量研究证实,Wnt/β-catenin 信号通路可以通过其活性的变化,实现对在宫颈癌等恶性肿瘤增殖、侵袭能力的调节^[19-20]。结合本研究结果,我们可以推论,USP22 siRNA 对宫颈癌干细胞增殖和侵袭的抑制功能可能是通过对 Wnt/β-catenin 信号通路的活性进行抑制发挥的。

综上所述,USP22 siRNA 有降低 CD133⁺ CaSki 宫颈癌干细胞内 Wnt/β-catenin 信号通路活性的作用,进而可以实现对宫颈癌干细胞增殖和侵袭功能的抑制,该治疗方法有望成为宫颈癌基因治疗的新手段。

参考文献

- [1] LIU W, GAO Q, CHEN K, et al. Hiwi facilitates chemoresistance as a cancer stem cell marker in cervical cancer[J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(5): 1853-1860.
- [2] AGUILAR C, AGUILAR C, LOPEZ-MARURE R, et al. Co-stimulation with stem cell factor and erythropoietin enhances migration of c-Kit expressing cervical cancer cells through the sustained activation of ERK1/2[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(5): 1895-1902.
- [3] VILLANUEVA-TOLEDO J, PONCIANO-GOMEZ A, ORTIZ-SANCHEZ E, et al. Side populations from

- cervical-cancer-derived cell lines have stem-cell-like properties [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(4): 1993-2004.
- [4] YANG Y, WANG Y, YIN C, et al. Clinical significance of the stem cell gene Oct-4 in cervical cancer [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(6): 5339-5345.
- [5] XIAO H, TIAN Y, YANG Y, et al. USP22 acts as an oncogene by regulating the stability of cyclooxygenase-2 in non-small cell lung cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 460(3): 703-708.
- [6] NING Z, WANG A, LIANG J, et al. USP22 promotes epithelial-mesenchymal transition via the FAK pathway in pancreatic cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(4): 1451-1458.
- [7] ORGANISTA -NAVA J, GOMEZ -GOMEZ Y, GARIGLIO P. Embryonic stem cell-specific signature in cervical cancer [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(3): 1727-1738.
- [8] GU W, YEO E, MCMILLAN N, et al. Silencing oncogene expression in cervical cancer stem-like cells inhibits their cell growth and self-renewal ability [J]. *Cancer Gene Ther*, 2011, 18(12): 897-905.
- [9] TIAN Y, DING W, WANG Y, et al. Ubiquitin B in cervical cancer: Critical for the maintenance of cancer stem-like cell characters [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e84457.
- [10] LOPEZ J, POITEVIN A, MENDOZA -MARTINEZ V, et al. Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 48.
- [11] WANG K, ZENG J, LUO L, et al. Identification of a cancer stem cell-like side population in the HeLa human cervical carcinoma cell line [J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(6): 1673-1680.
- [12] WANG L, GUO H, YANG L, et al. Morusin inhibits human cervical cancer stem cell growth and migration through attenuation of NF-kappaB activity and apoptosis induction [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 379(1-2): 7-18.
- [13] LIAO T, KAUFMANN AM, QIAN X, et al. Susceptibility to cytotoxic T cell lysis of cancer stem cells derived from cervical and head and neck tumor cell lines [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2013, 139(1): 159-170.
- [14] YANG DD, CUI BB, SUN LY, et al. The co-expression of USP22 and BMI-1 may promote cancer progression and predict therapy failure in gastric carcinoma [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2011, 61(3): 703-710.
- [15] SCHRECENGOST RS, DEAN JL, GOODWIN JF, et al. USP22 regulates oncogenic signaling pathways to drive lethal cancer progression [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(1): 272-286.
- [16] ZHANG Y, YAO L, ZHANG X, et al. Elevated expression of USP22 in correlation with poor prognosis in patients with invasive breast cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(8): 1245-1253.
- [17] HU J, LIU YL, PIAO SL, et al. Expression patterns of USP22 and potential targets BMI-1, PTEN, p-AKT in non-small-cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2012, 77(3): 593-599.
- [18] LIU YL, YANG YM, XU H, et al. Aberrant expression of USP22 is associated with liver metastasis and poor prognosis of colorectal cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2011, 103(3): 283-289.
- [19] YOSHIDA N, KINUGASA T, OHSHIMA K, et al. Analysis of Wnt and beta-catenin Expression in Advanced Colorectal Cancer [J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(8): 4403-4410.
- [20] MERHI A, DE MEES C, ABDO R, et al. Wnt/beta-Catenin signaling regulates the expression of the ammonium permease gene RHBG in human cancer cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e128683.

(编辑 徐 杰)