

瞬时受体电位 C1 对人卵巢癌细胞 ES-2 增殖和凋亡的影响

高蕾 郁兰芳

【摘要】 目的 探讨瞬时受体电位 C1 (TRPC1) 对人卵巢癌细胞 ES-2 增殖和凋亡的影响。**方法** 利用荧光定量 PCR 检测人卵巢癌细胞 ES-2、SKOV3、OV1 以及 OV2 和正常卵巢上皮细胞 IOSE80 中 TRPC1 的表达水平。设计并合成靶向 TRPC1 的特异性短发卡 RNA (shRNA), 通过脂质体转染 TRPC1 表达最高的人卵巢癌细胞 ES-2 以构建稳定低表达 TRPC1 细胞株 ES-2/shRNA, 通过蛋白免疫印迹法和荧光定量 PCR 检测 shRNA 的干扰效率、MTT 比色法检测干扰后细胞的增殖能力、流式细胞仪检测细胞凋亡情况、蛋白免疫印迹法检测磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶 (p-PI3K)、细胞周期素 D1 (Cyclin D1) 以及 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 的表达水平。**结果** 在 4 种卵巢癌细胞株中, ES-2 的 TRPC1 表达水平最高。特异性靶向转染 TRPC1 shRNA 能够有效下调 ES-2 细胞中 TRPC1 表达水平; ES-2/shRNA 细胞的增殖速度较转染空白载体的 ES-2/Con 及 ES-2 细胞明显减慢 ($P < 0.01$)。ES-2/shRNA 细胞的凋亡率明显高于 ES-2/Con 及 ES-2 细胞 ($P < 0.01$)。TRPC1 干扰组细胞的 p-PI3K、Cyclin D1 以及 Bcl-2 的蛋白表达强度比 ES-2/Con 及 ES-2 明显减弱。**结论** 采用 RNA 干扰技术能够有效沉默 ES-2 细胞的 TRPC1 基因, 并致使其细胞增殖能力下降以及细胞凋亡率升高, 其中可能的机制为通过对细胞因子 PI3K 的调控影响人卵巢癌细胞的增殖和凋亡。

【关键词】 瞬时受体电位 C1; 增殖; 凋亡; 卵巢癌

Effect of TRPC1 on proliferation and apoptosis of human ovarian carcinoma cell ES-2 Gao Lei, Yu Lanfang. Department of Gynaecology & Obstetrics, Haiyan People's Hospital, Jiaxing 314300, China
Corresponding author, Yu Lanfang

【Abstract】 Objective To investigate the effect of transient receptor potential channel 1 (TRPC1) upon the proliferation and apoptosis of human ovarian carcinoma cell ES-2. **Methods** The expression levels of TRPC1 in human ovarian carcinoma cell ES-2, SKOV3, OV1 and OV2, and normal human ovarian epithelial cell IOSE80 were detected by fluorescent quantitative PCR. Specific short hairpin RNA (shRNA) targeting TRPC1 was designed, synthesized, and then transfected into the ES-2 cells with the highest expression of TRPC1 via liposome to construct ES-2/shRNA cell line stably and lowly expressing TRPC1. The interfering efficiency of shRNA was validated by western blot and fluorescent quantitative PCR. The proliferation and apoptosis of ES-2 were detected by using MTT assay and flow cytometry. The expression levels of phosphatidylinositol 3-kinase (p-PI3K), Cyclin D1 and B-cell lymphoma (Bcl-2) were measured by western blot. **Results** Among four human ovarian carcinoma cell lines, ES-2 expressed the highest level of TRPC1. TRPC1-targeted shRNA could effectively down-regulate the expression level of TRPC1 in ES-2 cells. Compared with those of ES-2/Con and ES-2, the proliferation rate of ES-2/shRNA was significantly lower ($P < 0.01$) whereas the apoptosis rate was considerably higher ($P < 0.01$). The expression levels of p-PI3K, Cyclin D1 and Bcl-2 in the shRNA interference group were significantly down-regulated compared with those in the ES-2/Con and ES-2 cells. **Conclusions** RNA interference technique can effectively silence the TRPC1 in ES-2 cells, decrease cell proliferation ability and enhance cell apoptosis, probably by regulating cytokine PI3K to affect the proliferation and apoptosis of human ovarian carcinoma cells.

【Key words】 Transient receptor potential channel 1; Proliferation; Apoptosis; Ovarian carcinoma

在女性生殖器官恶性肿瘤中, 卵巢癌发病率占第 3 位, 然而病死率一直位居首位。究其原因, 大多数卵巢癌发病隐匿, 约 75% 的患者在发现时已属于晚期。针对晚期卵巢癌, 癌细胞减灭术加紫杉醇或铂类联合化学治疗, 能暂时缓解疾病进展, 但是肿瘤复发率却在 80% 以上^[1-4]。因此, 迫切需要寻找卵巢癌的治疗新方法。随着分子生物学的飞速发展, 分子靶向治疗已成为当今卵巢癌防治研究的热点。瞬时受体电位 C1 (TRPC1) 是瞬时受体电位通道蛋白 (TRP) 家族中的一员, 可通过调节钙离子内流参与细胞多种生理及病理活动。既往研究表明, TRP 与多种肿瘤的发生及预后密切相关^[5-6]。本研究拟采用特异性靶向 TRPC1 的短发夹 RNA (shRNA) 转染卵巢癌细胞株 ES-2, 筛选并构建低表达 TRPC1 的稳定细胞株, 通过对比转染空载体的对照组细胞, 观察 TRPC1 基因表达变化对 ES-2 细胞增殖和凋亡的影响, 初步探讨 TRPC1 在人卵巢癌细胞中的分子作用机制。

材料与方法

一、细胞培养

人卵巢癌细胞株 ES-2、SKOV3、OV1 以及 OV2 与正常卵巢上皮细胞株 IOSE80 购自中国科学院上海细胞库。5 株细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中, 并置于 5% CO₂ 以及 37℃ 培养箱内培养。倒置显微镜下观察细胞生长情况, 待细胞长至约 80% 用含依地酸二钠 (EDTA) 的胰酶消化并传代培养。取对数生长期的细胞进行实验。

二、TRPC1 的特异性 shRNA 转染

TRPC1 shRNA 购自美国 Santa Cruz 公司 (Cat. sc-270467-SH)。采用脂质体转染技术, 具体操作流程参照英韦创津公司的 Lipofectamine²⁰⁰⁰ 产品说明书。转染 48 h 后加入筛选抗生素 G418, 浓度为 400 μg/ml, 维持培养 6 d 后, G418 浓度改为 200 μg/ml; 细胞扩增后, 提取蛋白和 RNA, 进行荧光定量 PCR 和蛋白免疫印迹法鉴定。

三、TRPC1 mRNA 表达水平的检测

采用荧光定量 PCR 法检测。稳定转染后, 用 Trizol 提取总 RNA, 计算各组 RNA 浓度和纯度, 根据试剂盒说明书进行逆转录反应: 42℃ 反应 60 min, 95℃ 5 min, 4℃ 5 min。荧光定量 PCR: 将反应管置入 ABI7500 系统中, 设置反应条件为: 95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 60℃ 20 s, 共 45 个循环。引物序列如下: TRPC1 上游 5'-GATGTGCTTGGGA-

GAAATGC-3', 下游 5'-CAAGACGAAACCTGGAATGC-3', 长度 232 bp; 内参 GAPDH 上游 5'-ACCA-CAGTCCATGCCATCAC-3', 下游 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3', 长度 452 bp。该实验重复 3 次。

四、TRPC1 蛋白表达水平的检测

采用蛋白免疫印迹法检测。TRPC1、磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶 (p-PI3K)、细胞周期素 D1 (Cyclin D1)、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 以及 GAPDH 抗体均购自美国 abcam 公司。提取细胞总蛋白后, 采用 BCA 法定量计算总蛋白浓度, 蛋白质凝胶电泳后转膜, 室温封闭 1 h, 加入第一抗体 (TRPC1、p-PI3K、Cyclin D1 以及 Bcl-2), 4℃ 孵育过夜, 加入二抗, 室温孵育 1 h。采用化学发光法检测相关蛋白表达并进行灰度分析。该实验重复 3 次。

五、MTT 比色法检测细胞增殖能力

取对数生长期的稳定转染 TRPC1 特异性 shRNA 的 ES-2 细胞, 经胰酶消化后, 对其进行细胞计数, 以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔培养板中, ES-2/shRNA、ES-2/Con 及 ES-2 细胞分别设置 3 个复孔, 并设空白对照孔 (不加 shRNA, 仅加培养基), 分别培养 24、48、72 h。用 MTT 法检测 570 nm 波长处各个小孔的光密度 (OD) 值, 并绘制生长曲线。

六、细胞凋亡实验

ES-2/shRNA、ES-2/Con 及 ES-2 细胞分别接种于 6 孔板的小孔中: 弃 RPMI1640 培养基, 使用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗细胞, 胰酶消化细胞, 收集于小离心管中, 低速离心 5 min, 弃上清液。按 Annexin V-FITC/PI 双染凋亡试剂盒说明书操作, 完成后用流式细胞仪检测。实验重复 3 次。

七、统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据统计。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 体外细胞增殖能力的组间比较采用重复测量资料的方差分析; mRNA、蛋白定量及凋亡能力的组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、细胞 TRPC1 mRNA 表达水平

相对于正常卵巢上皮细胞 IOSE80 (设定为 1), 4 株人卵巢癌细胞 (ES-2、SKOV3、OV1 以及 OV2 细胞) 的 TRPC1 mRNA 的相对表达量分别为 5.02 ± 0.08 、 3.23 ± 0.05 、 1.78 ± 0.08 、 $2.13 \pm$

0.04, 见图 1。因 ES-2 的 TRPC1 mRNA 表达水平最高, 故选择 ES-2 作为研究对象进行下一步实验。

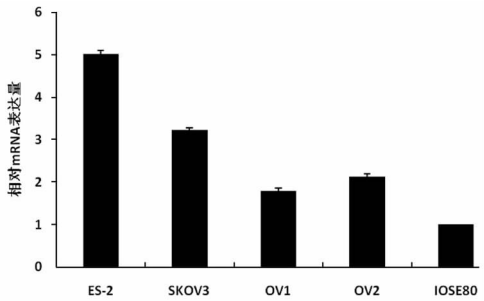


图1 TRPC1 mRNA 在 4 株人卵巢癌细胞和 1 株正常卵巢上皮细胞中的表达水平

二、特异性靶向 TRPC1 shRNA 稳定转染 ES-2 细胞后 TRPC1 的表达

特异性靶向 TRPC1 稳定转染 ES-2 细胞后, 使用 PCR 及蛋白免疫印迹法验证沉默效率。结果显示, 转染 TRPC1 shRNA 的 ES-2 细胞 (ES-2/shRNA)、转染空载体的 ES-2 细胞 (ES-2/Con)、未转染的 ES-2 细胞间 TRPC1 mRNA 及蛋白表达水平比较差异有统计学意义 (F 分别为 48.374、42.542, P 均 <0.001); 与未转染及转染空载体的 ES-2 细胞相比, 转染 TRPC1 shRNA 的 ES-2 细胞 mRNA (t 分别为 10.453、9.649, P 均 <0.01 , 图 2B) 及蛋白表达水平均明显降低 (t 分别为 9.488、8.845, P 均 <0.01 , 图 2C)。

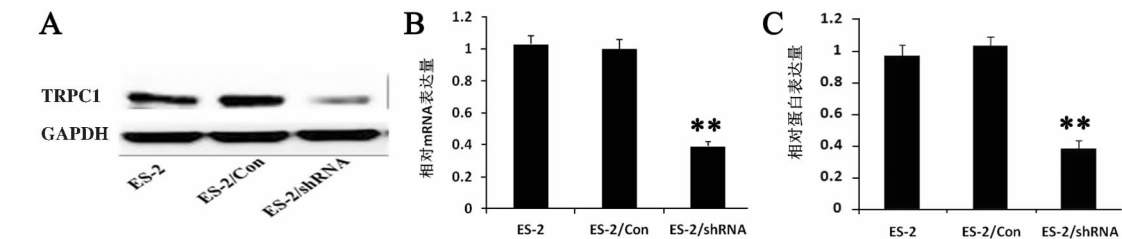


图2 shRNA 明显抑制 ES-2 细胞的 TRPC1 表达

A: 蛋白免疫印迹法检测结果; B: mRNA 定量结果; C: 蛋白定量结果; 与 ES-2 及 ES-2/Con 细胞比较, ** $P < 0.01$

三、TRPC1 基因沉默对 ES-2 细胞增殖能力的影响

ES-2/shRNA、ES-2/Con、ES-2 的增殖速度比较差异均有统计学意义 ($F = 53.251$, $P < 0.001$), ES-2/shRNA 细胞的增殖速度比 ES-2/Con 及 ES-2 细胞明显减慢 (F 分别为 48.857、37.413, P 均 < 0.001), ES-2/Con 与 ES-2 细胞的增殖速度比较差异无统计学意义 ($F = 0.645$, $P = 0.481$), 见图 3。

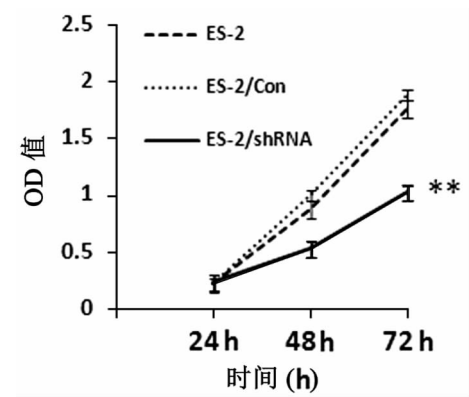


图3 TRPC1 对 ES-2 细胞体外增殖能力的影响 与 ES-2 及 ES-2/Con 细胞比较, ** $P < 0.01$

四、TRPC1 基因沉默对 ES-2 细胞凋亡的影响

ES-2、ES-2/Con 和 ES-2/shRNA 细胞的凋亡率分别为 $(17.2 \pm 3.4)\%$ 、 $(18.3 \pm 2.5)\%$ 、 $(34.1 \pm 4.7)\%$, 3 组细胞的凋亡率比较差异有统计学意义 ($F = 32.220$, $P < 0.001$)。ES-2/shRNA 细胞凋亡率明显高于 ES-2 及 ES-2/Con 细胞 (t 分别为 5.046、5.141, P 均 < 0.01)。ES-2 细胞凋亡率与 ES-2/Con 细胞比较差异无统计学意义 ($t = 0.451$, $P = 0.675$), 见图 4。

五、TRPC1 基因沉默对 ES-2 细胞的 PI3K、Cyclin D1 以及 Bcl-2 表达强度的影响

ES-2/shRNA 细胞的 Cyclin D1、Bcl-2、p-PI3K 的表达均较 ES-2 和 ES-2/Con 细胞减弱, 见图 5。

讨 论

卵巢癌是一种常见的妇科恶性肿瘤。由于卵巢癌早期缺少症状, 症状缺乏特异性, 筛查的作用有限, 因此早期诊断比较困难, 多数患者在就诊时已为晚期, 而晚期病例的疗效欠佳。因此, 卵巢癌的早期诊断显得非常重要^[7]。钙离子是细胞内信号传导过程中重要的第二信使, 细胞内钙离子平衡的

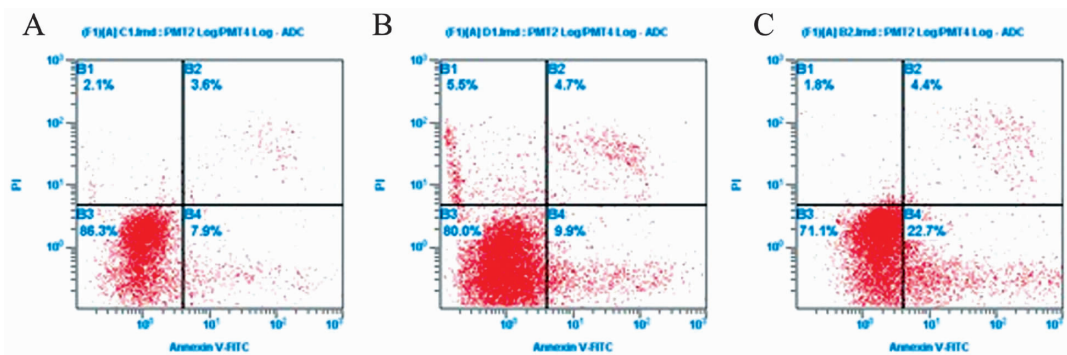


图4 TRPC1 对 ES-2 细胞凋亡率的影响

A: ES-2 细胞; B: ES-2/Con 细胞; C: ES-2/shRNA 细胞

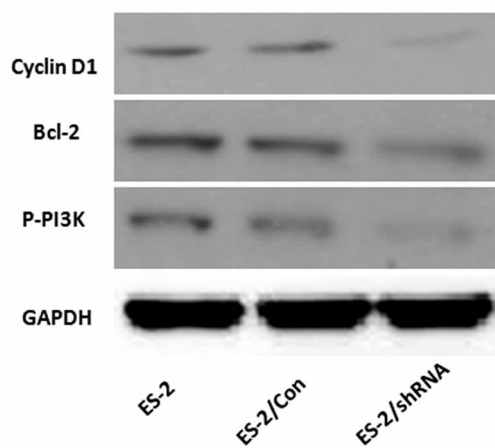


图5 TRPC1 对 ES-2 细胞中 PI3K、Cyclin D1 以及 Bcl-2 表达的影响

紊乱参与肿瘤细胞的多种生物学行为,如肿瘤的生长、转移、侵袭和分化,是恶性肿瘤细胞发生、发展的重要因素^[8]。TRP 可通过介导钙离子内流调节肿瘤细胞的生物学行为。TRPC1 是一种非选择性的阳离子通道,已被证实在前列腺癌、肺癌及乳腺癌等多种恶性肿瘤中表达升高,并预示预后较差^[9-12]。本研究表明,在人卵巢癌细胞中,TRPC1 表达升高;通过 RNA 干扰法成功构建 TRPC1 低表达的 ES-2 细胞株后,发现 ES-2/shRNA 细胞的增殖能力较 ES-2/Con 和 ES-2 细胞下降。此外,ES-2/shRNA 细胞的凋亡率比 ES-2/Con 和 ES-2 细胞升高。由此推测,TRPC1 可能是卵巢癌的促癌基因。

PI3K/蛋白激酶 B (AKT) 信号通路已被证实和肿瘤的发生、发展密切相关。PI3K 作为 PI3K/AKT 通路中重要的调节因子,其在肿瘤细胞增殖和凋亡过程中起着关键作用^[13-14]。一方面,PI3K 对 Cyclin D1 有着间接调节作用,其磷酸化之后可活化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 从而增加 Cyclin D1 mRNA 翻译,进而促进细胞增殖;另一方面,PI3K 磷酸化后活化 AKT 能够直接磷酸化促

凋亡分子 BAD,而磷酸化的 BAD 与 Bcl-2 发生聚集,从而使游离的 Bcl-2 发挥抗凋亡作用;此外,PI3K 还能通过磷酸化 forkhead 家族转录因子,从而抑制凋亡相关基因如 Fas-L、IGFBP1 和 Bim 的转录^[15]。因此,我们推测 TRPC1 调控人卵巢癌细胞的增殖以及凋亡可能与 PI3K/AKT 通路相关。

为了验证以上猜测,本研究检测了人卵巢癌细胞 ES-2 细胞在 TRPC1 下调后,p-PI3K、CyclinD1 以及 Bcl-2 的表达水平均比 2 个对照组明显下降。提示了 TRPC1 调节人卵巢癌细胞的恶性行为的部分机制可能是通过对 PI3K/AKT 信号通路的调控,从而调节增殖以及凋亡相关因子的表达水平。然而值得注意的是,肿瘤发生、发展与多条信号通路相关,且这些信号通路之间可能还存在着交叉作用,下一步我们将对 TRPC1 在卵巢癌中的分子机制进行更全面及深入的研究。

综上所述,本研究探讨了 TRPC1 对人卵巢癌细胞增殖及凋亡的影响,发现 TRPC1 可通过活化 PI3K 等因子促进肿瘤细胞的增殖及抑制其凋亡。这为进一步揭示 TRPC1 基因与卵巢癌的关系提供新的实验依据,更为进一步探索卵巢癌发生、发展的分子机制提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, Ledermann JA. Ovarian cancer. *Lancet*, 2014, 384 (9951): 1376-1388.
- [2] Vargas AN. Natural history of ovarian cancer. *Encancermedical-science*, 2014, 8: 465.
- [3] Devouassoux-Shisheboran M, Genestie C. Pathobiology of ovarian carcinomas. *Chin J Cancer*, 2015, 34 (1): 50-55.
- [4] Luvero D, Milani A, Ledermann JA. Treatment options in recurrent ovarian cancer: latest evidence and clinical potential. *Ther Adv Med Oncol*, 2014, 6 (5): 229-239.
- [5] Han H, Yi F. New insights into TRP channels: Interaction with pattern recognition receptors. *Channels (Austin)*, 2014, 8

- (1): 13-19.
- [6] Liu C, Montell C. Forcing open TRP channels: Mechanical gating as a unifying activation mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 460 (1): 22-25.
- [7] Mahajan N. Fertility preservation in female cancer patients: An overview. *J Hum Reprod Sci*, 2015, 8 (1): 3-13.
- [8] Farfariello V, Iamshanova O, Germain E, Fliniaux I, Prevarskaya N. Calcium homeostasis in cancer: A focus on senescence. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1853 (9): 1974-1979.
- [9] Ouadid-Ahidouch H, Dhennin-Duthille I, Gautier M, Sevestre H, Ahidouch A. TRP calcium channel and breast cancer: expression, role and correlation with clinical parameters. *Bull Cancer*, 2012, 99 (6): 655-664.
- [10] 张骏, 朱震, 李雄伟, 张忠夫. SiRNA 沉默 TRPC1 基因对肺腺癌 A549 细胞增殖和侵袭的影响. *中华医学杂志*, 2013, 93 (28): 2241-2243.
- [11] He B, Liu F, Ruan J, Li A, Chen J, Li R, Shen J, Zheng D, Luo R. Silencing TRPC1 expression inhibits invasion of CNE2 nasopharyngeal tumor cells. *Oncol Rep*, 2012, 27 (5): 1548-1554.
- [12] Asghar MY, Magnusson M, Kemppainen K, Sukumaran P, Löf C, Pulli I, Kalhori V, Törnquist K. Transient receptor potential canonical 1 (TRPC1) channels as regulators of sphingolipid and VEGF receptor expression: implications for thyroid cancer cell migration and proliferation. *J Biol Chem*, 2015, 290 (26): 16116-16131.
- [13] Davis WJ, Lehmann PZ, Li W. Nuclear PI3K signaling in cell growth and tumorigenesis. *Front Cell Dev Biol*, 2015, 3: 24.
- [14] 廖山婴, 朱小波, 王蓓蓓, 马娟, 沙卫红. PPAR γ 、PTEN、Akt 在胃癌中的表达及其与胃癌生物学行为的关系. *新医学*, 2014, 45 (2): 394-398.
- [15] Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833 (12): 3448-3459.

(收稿日期: 2015-08-02)

(本文编辑: 林燕薇)

