

干扰 HSPC238 对宫颈癌 HeLa 细胞裸鼠成瘤的促进作用*

钟裕恒, 黄 湘[△], 吴学威, 梁 睿

(南方医科大学附属中山博爱医院产前诊断中心, 广东中山 528403)

摘要:目的 观察干扰 HSPC238 对宫颈癌 HeLa 细胞裸鼠成瘤的影响。方法 将 PLL3.7-HSPC238 干扰载体稳定转染 HeLa 细胞, 然后将细胞接种到 BALB/c 裸鼠前肢腋部皮下, 观察肿瘤出现时间及体积变化。结果 转染了 PLL3.7-HSPC238 干扰载体组的裸鼠肿瘤较对照组生长快, 肿瘤的体积明显大于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 干扰 HSPC238 对宫颈癌 HeLa 细胞裸鼠成瘤具有促进作用。

关键词: HSPC238; HeLa 细胞; 宫颈癌; 裸鼠

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.06.003 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2017)06-0752-02

Promoting effect of interfering HSPC238 on cervical cancer HeLa cell tumorigenesis in nude mice*

ZHONG Yuheng, HUANG Xiang[△], WU Xuewei, LIANG Rui

(Prenatal Diagnosis Center, Affiliated Zhongshan Boai Hospital, Southern Medical University, Zhongshan, Guangdong 528403, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of interfering HSPC238 on cervical cancer HeLa cells tumorigenesis in nude mice. **Methods** PLL3.7-PSMA7 interfering vectors were stably transfected into HeLa cells. Then the cells were subcutaneously inoculated into the anterior limb armpit of the BALB/c nude mice. The appearance time and volume change of tumor were observed. **Results** Compared with control group, the nude mice tumor of the transfected PLL3.7-HSPC238 interfering vector group grew more fast and the volume was bigger, the difference was statistically significant. **Conclusion** Interfering HSPC238 has a promoting effect on cervical cancer HeLa cell tumorigenesis in nude mice.

Key words: HSPC238; HeLa cell; cervical cancer; nude mice

宫颈癌是世界范围内第 2 常见的女性恶性肿瘤^[1], 且近年来发病率有逐年年轻化的趋势^[2]。宫颈癌侵袭能力强^[3], 手术切除预后效果不好, 盆腔内复发率高, 所以宫颈癌仍严重威胁人类健康。研究表明, 持续性高危人乳头瘤病毒 (HPV) 感染是宫颈癌发病的主要原因^[4], 然而宫颈癌的具体发病机制仍然不清楚。笔者前期研究发现, HSPC238 的表达与宫颈上皮内瘤变 (CIN) 的分级存在显著相关性, 随着 CIN 级别升高, 染色程度降低^[5], 而且通过 EdU 增殖实验和 Transwell 侵袭实验发现 HSPC238 能够抑制宫颈癌 HeLa 细胞的增殖和侵袭能力。本研究拟探讨干扰 HSPC238 后对宫颈癌 HeLa 细胞裸鼠成瘤的影响, 从而揭示 HSPC238 在体内对宫颈癌生长的作用。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 从广州中医药大学实验动物中心选取 18 只裸鼠, 在南方医科大学动物中心代为饲养, 实验组和对照组为同体对照。

1.2 仪器与试剂 PLL3.7-HSPC238 干扰载体、siRNA 阴性对照载体和宫颈癌 HeLa 细胞保存于本实验室^[6]。LipofectamineTM2000 试剂、嘌呤霉素抗性质粒 (PMSCV-puro)、嘌呤霉素、DMEM/高糖基础培养基、磷酸钾缓冲液等购自钟鼎生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 质粒稳定转染 HeLa 细胞转染前 24 h 接种于 10 cm 培养皿中, 转染前 2 h 再换用 5 mL H-DMEM 新鲜培养基 (不含抗菌药物), 当细胞融合度为 70%~80%, 分别稀释 5 μg PLL3.7-HSPC238 干扰载体、siRNA 阴性对照载体和 0.25 μg PMSCV-puro 于 1.5 mL H-DMEM 基础培养基中, 然后取 15 μL LipofectamineTM2000 稀释于该培养基中。室温孵育 5 min 后, 分别把各组质粒和 LipofectamineTM2000 混合, 并于室温下孵育 20 min。把上述各组质粒与 LipofectamineTM2000 的混合液加入培养 HeLa 细胞中, 然后 37 °C、5% CO₂ 孵育转染细胞 6 h, 换用新鲜完全培养基继续培养 48 h 后加入 2 μg/mL 嘌呤霉素筛选。当出现克隆后挑出克隆, 扩增培养, 然后将细胞冻存。

1.3.2 裸鼠移植瘤的建立 取生长状态良好、处于对数生长期的宫颈癌 HeLa 细胞, 用 0.25% 的胰酶消化, 然后用磷酸盐缓冲液洗涤细胞两遍, 再用无血清 1640 培养液重悬细胞, 将细胞浓度调整为每毫升 2×10^7 个。使用医用碘伏消毒小鼠局部皮肤后, 将 PLL3.7-HSPC238 干扰载体组细胞接种在每只 BALB/c 裸鼠左侧前肢腋部, 皮下接种 200 μL 癌细胞悬液, siRNA 阴性对照载体组细胞接种在每只 BALB/c 裸鼠右侧前肢腋部皮下。之后隔 2 d 观察与测量肿瘤的最大直径 (a, cm)

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81101534); 广东省医学科研基金资助项目 (A2013875)。

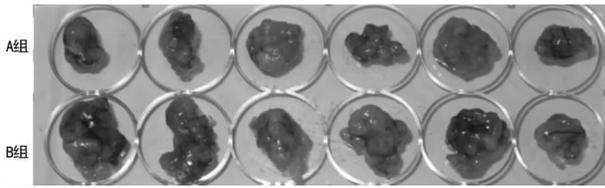
作者简介: 钟裕恒, 女, 在读硕士, 主要从事肿瘤免疫研究。 △ 通信作者, E-mail: 340382761@qq.com。

和最小直径(b, cm)。根据公式:肿瘤体积 $V(\text{cm}^3) = a \times b^2 \times 1/2$ 计算肿瘤的体积大小。饲养直到肿瘤体积过大威胁移植瘤裸鼠生命时,断颈处死裸鼠,最后剥离瘤体。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

干扰 HSPC238 对宫颈癌 HeLa 细胞裸鼠成瘤的影响。转染 PLL3.7-HSPC238 干扰载体组(实验组)的小鼠精神、饮食状况较对照组差,并且肿瘤较对照组生长快。第 18 天 PLL3.7-HSPC238 干扰载体组裸鼠移植瘤的体积为 $(0.857 3 \pm 0.295 1) \text{cm}^3$,对照组裸鼠移植瘤的体积为 $(0.435 8 \pm 0.120 0) \text{cm}^3$,差异有统计学意义($P < 0.05$)。实验组和对照组裸鼠均未发现局部淋巴结和远处脏器的转移。见图 1、2。



注:A 为对照组;B 为实验组。

图 1 接种 HeLa 细胞 18 d 后裸鼠及瘤体外形

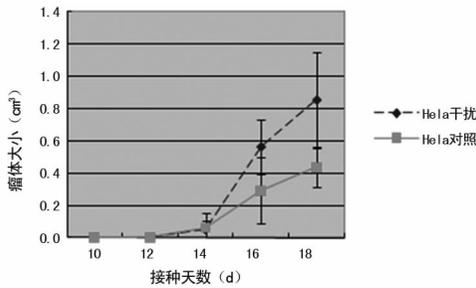


图 2 接种 HeLa 细胞后裸鼠移植瘤的生长曲线

3 讨 论

HSPC238 属于 C3HC4 型锌指蛋白。锌指蛋白是人类最大的转录因子家族之一,转录因子的异常涉及许多疾病及癌症的进展。如转录因子 FOXL2 的表达水平与宫颈病变进展有关^[7],它可以与信号转导分子 smads 相互作用^[8]。锌指蛋白类转录因子 KLF4 在癌症发生过程中具有双重调节作用^[9],而其在宫颈癌中的表达与癌症进展呈负相关^[10]。笔者前期研究发现,HSPC238 能够抑制宫颈癌 HeLa 细胞的增殖和侵袭能力,为此,本研究想要进一步通过体内实验研究 HSPC238 在宫颈癌中所起的作用。

BALB/c 裸鼠是免疫功能缺陷小鼠,是研究肿瘤生长和转移的理想动物模型,因其对异体移植的免疫排斥作用很小,可接受异系、异种肿瘤移植^[11]。本实验中选用 BALB/c 裸鼠作为动物模型,研究干扰 HSPC238 后对宫颈癌 HeLa 细胞裸鼠成瘤的作用。结果发现干扰 HSPC238 能促进 HeLa 细胞在裸鼠体内的成瘤过程。这与笔者前期研究结果一致。笔者前期通

过裸鼠实验证实干扰 HSPC238 能够抑制肝癌细胞在裸鼠体内的成瘤过程^[12]。至于 HSPC238 在宫颈癌中是否像在肝癌中一样,通过 MAPK 途径抑制宫颈癌细胞的增殖和侵袭,过表达 HSPC238 是否也能延缓肝癌细胞的细胞周期,且同样与 4 种肿瘤相关蛋白(MT2A、HO-1、RPS27A 和 Ubb)发生相互作用,还需要进行后续的实验。如果实验结果一致,对于更进一步证明 HSPC238 在肿瘤中所起的作用具有重要的意义。

参考文献

- [1] Emal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] 李雪,孔为民,韩超,等.首都医科大学附属北京妇产医院 1992-2011 年间宫颈癌发病趋势分析[J/CD]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版), 2013, 9(3): 310-314.
- [3] Liao SY, Darcy KM, Randall LM, et al. Prognostic relevance of carbonic anhydrase-IX in high-risk, early-stage cervical cancer: a Gynecologic Oncology Group study[J]. Gynecol Oncol, 2010, 116(3): 452-458.
- [4] Hoory T, Monie A, Gravitt P, et al. Molecular epidemiology of human papillomavims[J]. J Formos Med Assoc, 2008, 107(3): 198-217.
- [5] 钟裕恒,黄湘,陈敬林,等. HSPC238 在宫颈上皮内瘤变和宫颈癌中的表达与意义[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 17(2): 235-238.
- [6] 谭家余,黄湘,陈敬林,等. HSPC238 对 HMOX1、RPS27a、MT2A、UBB 调节的初步研究[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(4): 509-512.
- [7] 王娟娟,朱安颖,张英辉,等. FOXL2 在正常宫颈及宫颈癌组织中的表达及临床意义[J]. 中国计划生育和妇产科, 2015, 7(9): 22-24.
- [8] Blount AL, Schmidt K, Justice NJ, et al. FoxL2 and Smad3 coordinately regulate follistatin gene transcription[J]. J Biol Chem, 2009, 284(12): 7631-7645.
- [9] Naranjo Gomez JM, Val Bernal JF, Garcia Arranz P, et al. Alterations in the expression of p53, KLF4, and p21 in neuroendocrine lung tumors[J]. Arch Pathol Lab Med, 2014, 138(7): 936-942.
- [10] 宋晖,魏莉,李佳,等. KLF4 在宫颈癌中的表达与临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(1): 109-111.
- [11] 叶燕丽,周昕熙,王莲桂. 裸小鼠的繁殖及在肿瘤学中的应用[J]. 实验动物科学与管理, 2005, 22(1): 6-8.
- [12] Wang S, Huang X, Li Y, et al. RN181 suppresses hepatocellular carcinoma growth by inhibition of the ERK/MAPK pathway[J]. Hepatology, 2011, 53(6): 1932-1942.