

# 沉默 Piwil2 表达对子宫颈癌细胞增殖和衰老的影响

张红丽<sup>1</sup>, 冯定庆<sup>2</sup>, 凌斌<sup>1,3</sup>, 尤青叶<sup>1</sup>, 李兵<sup>1</sup>, 伍娇娇<sup>1</sup>, 赵婷婷<sup>1</sup>

**摘要** 目的 采用 shRNA 沉默 Piwil2 基因的表达, 探讨其对宫颈癌细胞株增殖和衰老特性的影响。方法 通过脂质体 Lipofectamine2000 转染技术和嘌呤霉素筛选, 建立稳转 Sh-piwil2 宫颈癌细胞株, 采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 和 Western blot 法验证沉默效果。采用细胞增殖实验、集落形成实验、细胞周期和细胞衰老等实验观察沉默 Piwil2 表达对宫颈癌细胞生物学特性的影响。结果 建立稳定转染 Sh-piwil2 宫颈癌细胞株, 与对照组相比, 沉默 Piwil2 表达后细胞的增殖和集落形成能力均显著降低 ( $P < 0.05$ ); 细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期比例增加、S 期比例明显下降 ( $P < 0.05$ ), 同时沉默 Piwil2 后细胞衰老数量明显增多 ( $P < 0.05$ )。结论 沉默 Piwil2 基因可发挥抗宫颈癌作用, 推测 Piwil2 基因可作为宫颈癌临床治疗的一个潜在靶点。

**关键词** 宫颈癌; shRNA; Piwil2; 细胞增殖; 细胞衰老

中图分类号 R 737.33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)05-0589-05

宫颈癌是女性生殖系统第一位恶性肿瘤, 目前手术与化疗是主要的治疗手段, 但并发症、副作用等使治疗具有局限性, 迫切需要一种更为有效的方法来达到治愈宫颈癌的目的<sup>[1]</sup>。研究<sup>[2]</sup>证实肿瘤干细胞是肿瘤发生、转移和复发的根源, 因此寻找一种特异性表达在肿瘤干细胞中的基因作为靶点会为宫

颈癌的治疗带来突破。Piwil2 蛋白是 AGO/PIWI 蛋白家族的一种, 正常情况下只表达在睾丸组织中, 另外也可特异性表达在肿瘤细胞和肿瘤干细胞中, 赋予肿瘤干细胞恶性转化能力<sup>[3]</sup>。课题组前期研究<sup>[4]</sup>也证实 Piwil2 可作为宫颈癌干细胞的特异标志物之一。该研究运用 shRNA 沉默宫颈癌细胞株中 Piwil2 基因的表达, 观察对细胞增殖和衰老等特性的影响, 为探讨 Piwil2 基因作为宫颈癌治疗靶点提供基础依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞和试剂** 人宫颈癌 C33A 和 HeLa 细胞由安徽医科大学附属省立医院分子医学重点实验室保存; 实验所需质粒 pGFP-VRS shRNA-piwil2 由美国 Origene 公司构建和合成; 质粒小量提取试剂盒购自美国 Axygen 公司; RNA 提取试剂 TRIzol、DNA 转染试剂 Lipofectamine2000、DMEM 细胞培养液、胎牛血清购自美国 Invitrogen 公司; 细胞衰老 β-半乳糖苷酶试剂购自上海碧云天生物技术有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 质粒的扩增与提取** 将购买的 ShRNA-piwil2 质粒转化 BL21 感受态大肠杆菌, 42 °C 热击、冰浴、摇床、涂板、37 °C 培养 16 h, 挑选卡那霉素阳性菌落, 摇菌, 菌种于 -20 °C 保存。参照 Takara Min-BEST 质粒小量提取试剂盒操作规程提取纯化质粒。

**1.2.2 稳定表达 Sh-piwil2 宫颈癌细胞系的建立** 将宫颈癌 C33A 和 HeLa 细胞以  $2 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板上, 当细胞融合达到 60% ~ 70% 时, 采用 Lipofectamine2000 进行 Sh-piwil2 质粒转染, 转染 6 h

2015-01-12 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81372777、81372779、81072127)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院<sup>1</sup> 妇产科、<sup>2</sup> 分子实验室, 合肥 230001

<sup>3</sup> 卫生部中日友好医院妇产科, 北京 100086

作者简介: 张红丽, 女, 硕士研究生;

凌斌, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: lingbin.ling@gmail.com

*in vitro* was built through SH-SY5Y cells' s exposure to 200 μmol/L MPP<sup>+</sup>. Cultured SH-SY5Y cells were respectively exposed to 200 μmol/L MPP<sup>+</sup> and 200 μmol/L MPP<sup>+</sup> combined 0.1 μmol/L 6-hydroxy-4H-indazole, then the variations of activity of glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β), cyclin dependent kinase 5 (CDK5) and caspase-3 were determined by Western blot. **Results** 200 μmol/L MPP<sup>+</sup> increased the activity of GSK-3β, CDK5 and caspase-3 in SH-SY5Y cells. 200 μmol/L MPP<sup>+</sup> combined 0.1 μmol/L 6-hydroxy-4H-indazole inhibited the activity of GSK-3β, CDK5 and caspase-3 in SH-SY5Y cells. **Conclusion** 6-hydroxy-4H-indazole decreases the activity of GSK-3β, CDK5 and caspase-3 to protect SH-SY5Y cells from MPP<sup>+</sup>-induced toxicity.

**Key words** 6-hydroxy-4H-indazole; SH-SY5Y cells; MPP<sup>+</sup>; GSK-3β; CDK5; caspase-3

后更换完全培养基。嘌呤霉素持续压力筛选出阳性细胞克隆, 荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 表达情况。

**1.2.3 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 Piwil2 mRNA 的表达水平** 取对数生长期的宫颈癌细胞, 采用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法提取细胞总 RNA, 再反转录成 cDNA 稳定保存。采用 qRT-PCR 检测 Piwil2 mRNA 的相对表达水平。Piwil2 基因上、下游引物序列分别为 5'-GTGCCAGAAACCGTTGAATC-3'、5'-TTGTGTTTCTGTGCGTCGTT-3', 扩增产物大小为 102 bp; 内参 GAPDH 基因的上、下游引物序列分别为 5'-GGACCTGACCTGCCGTCTAG-3', 5'-TAGCCCAGGATGC-CCTTGAG-3' 扩增产物大小为 99 bp。

**1.2.4 Western blot 法检测 Piwil2 蛋白的表达水平** 收集细胞, 将细胞裂解后提取总蛋白, 用 BCA 法进行蛋白定量, 加入 SDS 煮沸变性, 取 60 μg 蛋白上样, 经 10% SDS-PAGE 胶 110 V 恒压电泳 1.5 h 分离, 200 mA 恒流转膜 30 min, 5% 脱脂奶粉封闭 60 min, 分别加入兔抗人 Piwil2 抗体 (稀释度 1:800) 和兔抗人 GAPDH 抗体 (稀释度 1:2000) 4℃ 孵育过夜, TBS-T 洗膜, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (稀释比例为 1:1000) 室温孵育 2 h, TBS-T 洗膜, 暗室压片显影。

**1.2.5 CellTiter96® Aqueous 细胞增殖法检测宫颈癌细胞增殖情况** 将对数生长期的细胞以  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板中, 分别于 24、48、72、96 h 加入 CellTiter96® Aqueous 单溶液 40 μl, 37℃ 避光孵育 2 h, 于酶标仪 490 nm 波长处检测吸光度值 (optical density, OD<sub>490</sub>)。

**1.2.6 细胞集落形成实验** 取对数生长期细胞, 制成单细胞悬液, 按每孔 500 个细胞接种于 6 孔板内, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养, 每隔 3 d 换 1 次液, 3 个星期后终止培养, 4% 多聚甲醛固定, 0.1% 结晶紫染色, 拍照, 显微镜下计算超过 50 个细胞的克隆数。

**1.2.7 流式细胞仪检测宫颈癌细胞周期的变化** 细胞离心弃上清液后, 缓慢加入预冷的 70% 乙醇溶液, -20℃ 固定过夜, 次日离心弃乙醇, PBS 水化 15 min, 加入碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染液, 室温孵育 30 min 后上机检测。

**1.2.8 β-半乳糖苷酶染色法检测细胞衰老** 收集

两组细胞离心后重悬, 以  $1 \times 10^6$  个/孔接种于 6 孔板中, 贴壁 24 h 后用细胞衰老试剂盒染色, 显微镜下观察细胞衰老情况并计数其比例。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 模块分析用 *t* 检验, 数值均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 每组实验重复 3 次。

**2 结果**

**2.1 shRNA 稳转 C33A 和 HeLa 细胞对 Piwil2 表达的影响** 转染 shRNA 的细胞可见绿色荧光, 见图 1; qRT-PCR 和 Western blot 法显示, 沉默 Piwil2 组与对照组相比, 其 Piwil2 mRNA 和蛋白表达水平均降低 ( $t = 9.526, 1.628, P < 0.05$ ), 见图 2。以上实验证明成功建立稳定转染 Sh-piwil2 宫颈癌细胞株。

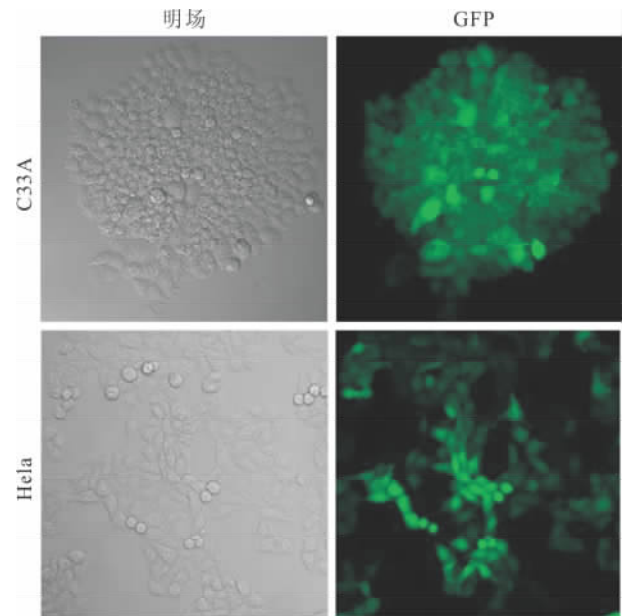


图 1 稳定表达 Sh-piwil2 的宫颈癌 C33A 和 HeLa 细胞系 ×20

**2.2 沉默 Piwil2 表达抑制 C33A 和 HeLa 细胞增殖能力** 细胞增殖实验显示, 分别从 72 h 和 48 h 开始, 沉默 Piwil2 组细胞增殖均较对照组缓慢, 差异均有统计学意义 ( $t = 6.943, 5.167, P < 0.05$ ), 见图 3。集落形成实验的结果表明, 沉默 Piwil2 组的 C33A 和 HeLa 细胞的每孔集落形成数分别为 ( $64.67 \pm 5.86$ ) 个/孔、( $88.87 \pm 6.62$ ) 个/孔, 较对照组 ( $327.67 \pm 16.56$ ) 个/孔、( $399.01 \pm 16.09$ ) 个/孔有明显减少, 差异均有统计学意义 ( $t = 25.93, 29.44, P < 0.05$ ), 见图 4。实验表明与对照组相比, 沉默 Piwil2 组细胞的增殖能力下降。

**2.3 沉默 Piwil2 的表达对宫颈癌细胞周期的影响**

流式细胞仪检测结果显示,与对照组比较,沉默 Piwil2 组 C33A 和 HeLa 细胞的  $G_0/G_1$  期比例增加( $t = 10.90、11.36, P < 0.01$ ), S 期比例减少( $t = 16.15、28.59, P < 0.01$ ),  $G_2/M$  变化不明显,见表 1。证明沉默 Piwil2 的表达可使细胞发生周期阻滞,从而抑制细胞增殖。

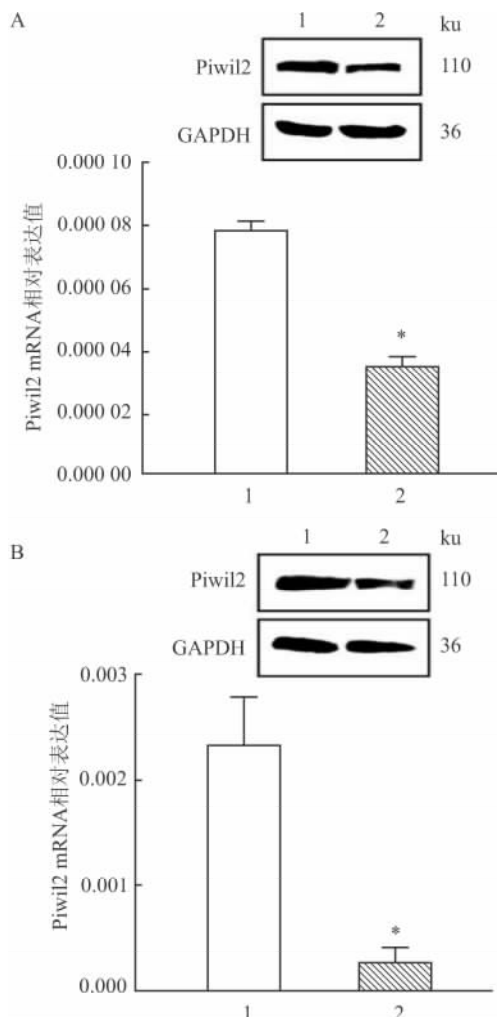


图 2 qRT-PCR 与 Western blot 法检测 shRNA 沉默 Piwil2 的效果  
A: C33A 细胞; B: HeLa 细胞; 1: 对照组; 2: 沉默 Piwil2 组; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$

表 1 细胞周期实验统计学结果

细胞周期	对照组		沉默 Piwil2 组	
	C33A	HeLa	C33A	HeLa
$G_0/G_1$	46.64 ± 1.20	46.63 ± 1.47	55.67 ± 0.29**	66.37 ± 1.51**
S	45.23 ± 1.3	48.86 ± 0.61	35.67 ± 0.68 $\Delta\Delta$	29.30 ± 1.01 $\Delta\Delta$
$G_2/M$	8.13 ± 0.53	4.5 ± 0.88	8.77 ± 1.07	4.33 ± 0.65

与对照组比较: \*\*  $P < 0.01, \Delta\Delta P < 0.01$

2.4 沉默 Piwil2 基因促进宫颈癌细胞衰老  $\beta$ -半乳糖苷酶染色检测细胞衰老情况,结果显示沉默 Pi-

wil2 组表达的 C33A 和 HeLa 细胞其细胞衰老程度 [(49.02 ± 2.01)%、(41.33 ± 5.87)%] 均较对照组 [(24.67 ± 3.51)%、(14.67 ± 2.52)%] 增加,差异有统计学意义( $t = 10.43、7.428, P < 0.05$ ),表明沉默 Piwil2 基因表达可以抑制细胞的增殖,使细胞衰老数增加,见图 5。

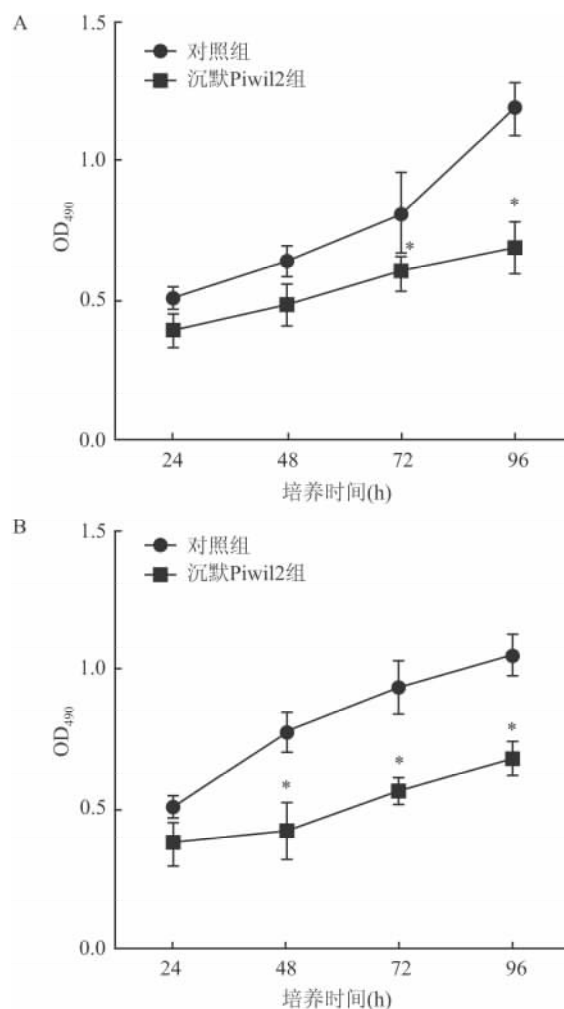


图 3 细胞增殖实验检测沉默 Piwil2 表达对 C33A 和 HeLa 增殖能力的影响

A: C33A 细胞; B: HeLa 细胞; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$

### 3 讨论

Piwil2 基因位于人的第 8 号染色体和鼠的第 14 号染色体上,可表达于不同种属睾丸组织的生殖干细胞中,而在其他正常组织中很少表达。Piwil2 蛋白分子量为 110 ku 左右,属于一种进化高度保守的碱性蛋白,包括 PAZ 和 PIWI 两种结构域,可与长度为 25 ~ 31nt 的 Piwi 相关 RNA 相互作用结合,通过 DNA 甲基化、组蛋白修饰等表观遗传修饰机制介导

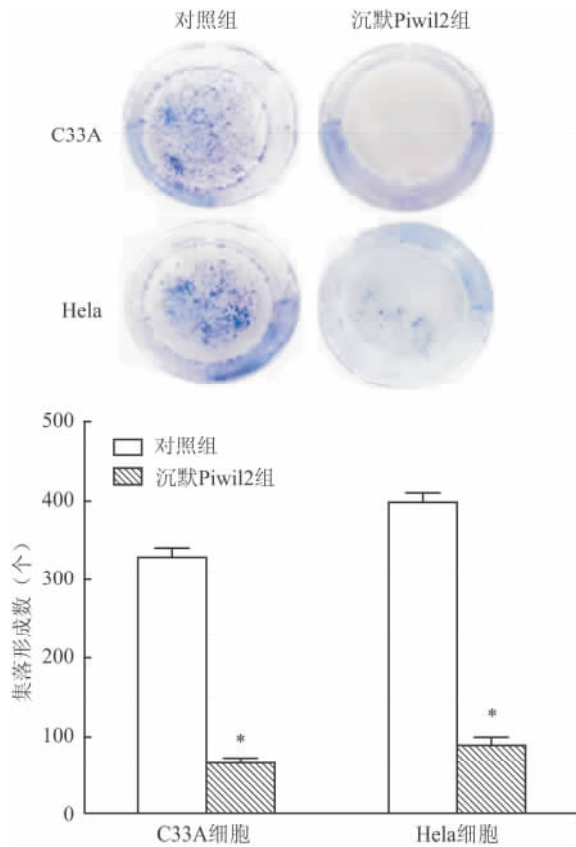


图4 集落形成实验检测沉默 Piwil2 对 C33A 和 HeLa 细胞增殖情况的影响  
与相应细胞对照组比较: \* P < 0.05

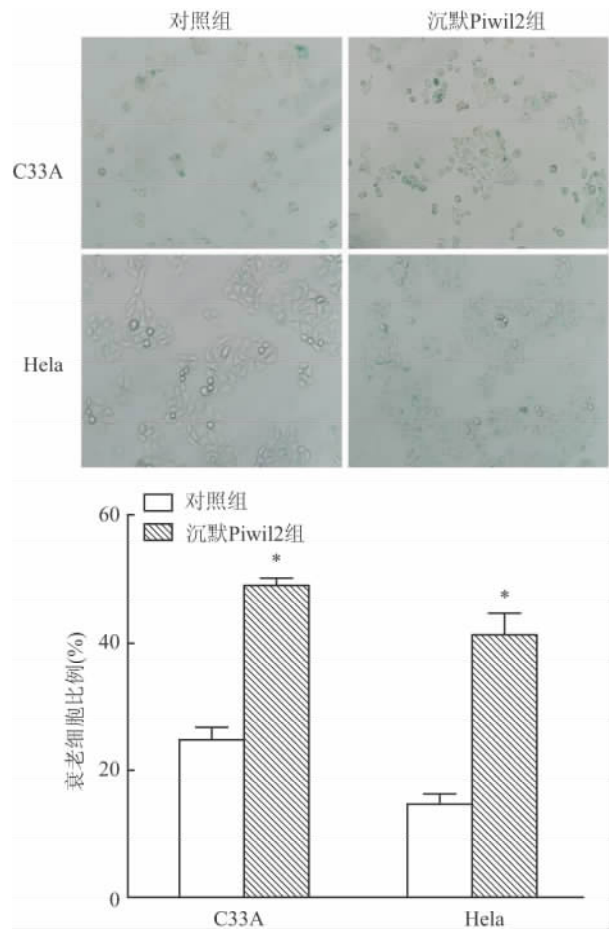


图5 β-半乳糖苷酶染色检测沉默 Piwil2 对 C33A 和 HeLa 细胞衰老的影响 ×20  
与对照组比较: \* P < 0.05

转座子基因沉默,保护生殖干细胞基因组的稳定性和完整性,对生殖干细胞的自我更新、配子和胚胎的发育具有重要的作用<sup>[5-6]</sup>。由于 Piwil2 基因可特异性的表达在肿瘤干细胞和肿瘤前体细胞中,因此其可能与小 RNA 相互作用,从而在肿瘤的表现遗传学修饰中发挥重要作用。研究<sup>[7]</sup>显示 Piwil2 表达增加和 DNA 高甲基化呈正相关,导致相应抑癌基因如细胞色素依赖激酶的表达沉默,而用 DNA 甲基化酶抑制剂可减少肿瘤整体的甲基化水平而抑制肿瘤的增殖。另外 Piwil2 表达增加可以上调 Stat3 和 Bel 基因表达,抑制 p53 蛋白的表达,同时 Piwil2 可以和 NF-κB 共同表达在细胞核中,使细胞从 G<sub>0</sub>/M 期进入 S 期,促进肿瘤恶性增殖,而抑制 Piwil2 表达可恢复 p53 的水平使肿瘤细胞的 G<sub>2</sub>/M 期细胞减少,使肿瘤增殖抑制<sup>[8]</sup>。p53 与 NF-κB 信号通路通常与细胞衰老途径等密切相关,这些都说明 Piwil2 基因作为一种癌基因在促进肿瘤增殖中具有重要的作用,但其具体作用机制还有待于进一步的研究和论证。

为了研究 Piwil2 基因在宫颈癌中的具体作用,

本实验运用 shRNA 转染宫颈癌细胞特异性沉默 Piwil2 基因的表达,观察细胞生物学特性的变化。结果显示转染 shRNA 后 Piwil2 的表达水平明显降低,说明建立稳定转染 Sh-piwil2 的宫颈癌细胞。细胞增殖实验表明沉默 Piwil2 组细胞的增殖能力较对照组明显下降,其中 C33A 细胞在 72 h 可发生明显的增殖抑制,而 HeLa 细胞在 48 h 即可发生明显的抑制,这可能与两组细胞转染沉默的效率不同有关;集落形成实验亦显示沉默 Piwil2 后两组宫颈癌细胞的集落形成数均较对照组明显减少,表明抑制 Piwil2 表达可以抑制宫颈癌细胞的增殖。用流式细胞仪检测分析细胞周期的变化,可以看出两组 Sh-piwil2 宫颈癌细胞的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期比例明显上升,S 期的比例减少,而 G<sub>2</sub>/M 则变化不明显,从而进一步证明沉默 Piwil2 可以使细胞周期阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,继之细胞衰老实验证明沉默 Piwil2 组细胞的衰老数增多,表明沉默 Piwil2 基因可以抑制细胞的增殖,从而导致

细胞的衰老,使宫颈癌细胞恶性生物学行为发生一定程度的逆转。

综上所述,本研究证实 Piwil2 基因在宫颈癌发生发展中具有重要作用,运用 shRNA 可以特异性沉默 Piwil2 的表达,从而抑制细胞的增殖,使细胞衰老增多。这与前期实验研究<sup>[9]</sup>显示 Piwil2 基因过表达可以导致细胞生物学行为发生恶性转化的结论相符合,并且进一步证明 Piwil2 表达增加与肿瘤细胞衰老呈负相关。另外抑制 Piwil2 蛋白表达可以抑制肿瘤的侵袭和转移,并且可以增加肿瘤细胞对顺铂的敏感性<sup>[10-11]</sup>,由此推测 Piwil2 基因有可能作为宫颈癌临床治疗的一个潜在作用靶点,这为后续的基础研究和进一步临床治疗研究提供了理论依据。

### 参考文献

- [1] Klopp A H, Eifel P J. Chemoradiotherapy for cervical cancer in 2010 [J]. *Curr Oncol Rep* 2011, 13(1): 77-85.
- [2] Gao J X. Cancer stem cells: the lessons from pre-cancerous stem cells [J]. *J Cell Mol Med* 2008, 12(1): 67-96.
- [3] Lee J H, Jung C, Javadian-Elyaderani P, et al. Pathways of proliferation and antiapoptosis driven in breast cancer stem cells by stem cell protein piwil2 [J]. *Cancer Res* 2010, 70(11): 4569-79.
- [4] Feng D, Peng C, Li C, et al. Identification and characterization of

- cancer stem-like cells from primary carcinoma of cervix uteri [J]. *Oncol Rep* 2009, 22(5): 1129-34.
- [5] Di Giacomo M, Comazzetto S, Saini H, et al. Multiple epigenetic mechanisms and the piRNA pathway enforce LINE1 silencing during adult spermatogenesis [J]. *Mol Cell* 2013, 50(4): 601-8.
- [6] Ferreira H J, Heyn H, Garcia del Muro X, et al. Epigenetic loss of the PIWI/piRNA machinery in human testicular tumorigenesis [J]. *Epigenetics* 2014, 9(1): 113-8.
- [7] Siddiqi S, Mills J, Matushansky I. Epigenetic remodeling of chromatin architecture: Exploring tumor differentiation therapies in mesenchymal stem cells and sarcomas [J]. *Curr Stem Cell Res Ther* 2010, 5(1): 63-73.
- [8] Lu Y, Zhang K, Li C, et al. Piwil2 suppresses p53 by inducing phosphorylation of signal transducer and activator of transcription3 in tumor cells [J]. *PLoS One* 2012, 7(1): e30999.
- [9] 李跃波,冯定庆,凌斌,等. Piwil2 基因表达诱导 NIH3T3 细胞恶性转化 [J]. *安徽医科大学学报* 2013, 48(5): 467-70.
- [10] Li D, Sun X, Yan D, et al. Piwil2 modulates the proliferation and metastasis of colon cancer *via* regulation of matrix metalloproteinase 9 transcriptional activity [J]. *Exp Biol Med* 2012, 237(10): 1231-40.
- [11] Wang Q E, Han C, Milum K, et al. Stem cell protein Piwil2 modulates chromatin modifications upon cisplatin treatment [J]. *Mutat Res* 2011, 708(1-2): 59-68.

## Silencing of Piwil2 expression on the proliferation and senescence of cervical cancer cells

Zhang Hongli<sup>1</sup>, Feng Dingqing<sup>2</sup>, Ling Bin<sup>1,3</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Obstetrics and Gynecology, <sup>2</sup>Molecular Laboratory, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001; <sup>3</sup>Dept of Obstetrics and Gynecology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100086)

**Abstract Objective** To explore the effect of silencing Piwil2 gene by shRNA on the proliferation and senescence of cervical cancer cells. **Methods** Constructed the stable Sh-piwil2 cervical cancer cells *via* Lipofectamine2000 mediation and puromycin selection. The efficiency of transfection was confirmed by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot. Cell proliferation assay, colony forming assay, cell cycle assay and cell senescence assay were detected the influence of silencing Piwil2 gene on the biological behavior of cervical cancer cells. **Results** The stable Sh-piwil2 cervical cancer cells were constructed. Compared with the Vector groups, the growth and colony forming rate were significantly decreased. Moreover, the cell cycle was arrested in the G0/G1 phase and the cell senescence was increased through silence the expression of Piwil2 gene. **Conclusion** Silencing Piwil2 gene can effectively suppress cell proliferation of cervical cancer cells. We speculate that Piwil2 gene may become a potential target in clinical therapy for cervical cancer.

**Key words** cervical cancer; shRNA; Piwil2; cell proliferation; cell senescence