

人卵巢癌细胞 SKOV3 中壳多糖酶 3 样蛋白 1 的表达和对细胞增殖及侵袭的影响实验研究

杨立芬¹, 何建清¹, 尹立新², 武军¹, 高然¹ (1. 唐山市妇幼保健院妇产科 河北唐山 063000;
2. 唐山市南湖医院急诊科, 河北唐山 063000)

摘要:目的 探讨壳多糖酶 3 样蛋白 1 (chitinase-3-like-protein-1, CHI3L1) 在卵巢癌细胞 SKOV3 中的表达和对 SKOV3 细胞增殖和侵袭的影响。方法 构建 p13.7-CHI3L1 shRNA 重组质粒, 转染卵巢癌细胞 SKOV3, 使得卵巢癌细胞中的 CHI3L1 基因沉默; p13.7-CHI3L1 shRNA 重组质粒转染卵巢癌细胞 SKOV3, 同时转染空载质粒作为阴性对照, 通过 Western Blot 检测 SKOV3 细胞中 CHI3L1 蛋白表达水平; 平板细胞克隆形成试验观察对卵巢癌细胞 SKOV3 增殖的影响; 采用 Transwell 实验检测卵巢癌细胞 SKOV3 侵袭能力的变化。结果 成功构建 p13.7-CHI3L1 shRNA 重组质粒, 转染卵巢癌细胞 SKOV3 后, 观察到大量的绿色荧光细胞, 且和对照组相比, p13.7-CHI3L1 shRNA 转染组卵巢癌细胞 SKOV3 中 CHI3L1 蛋白表达水平下降, 卵巢癌细胞 SKOV3 的克隆数目减少, 侵袭能力下降。结论 卵巢癌细胞 SKOV3 中 CHI3L1 的表达下调, 抑制了 SKOV3 细胞的增殖和侵袭能力。

关键词: 壳多糖酶 3 样蛋白 1; 卵巢癌; 增殖; 侵袭能力

中图分类号: R737.31; R730.43 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2021) 04-031-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.04.007

Expression of Chitinase 3-like Protein 1 in Human Ovarian Cancer Cell Skov3 and Its Effect on Cell Proliferation and Invasion

YANG Li-fen¹, HE Jian-qing¹, YIN Li-xin², WU Jun¹, GAO Ran¹

(1. Department of Obstetrics Gynecology, Tangshan Maternal and Child Health Hospital, Hebei Tangshan 063000, China;

2. Department of Emergency Medicine, Nanhu Hospital of Tangshan City, Hebei Tangshan 063000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of Chitinase-3-like-protein-1 (CHI3L1) in ovarian cancer cell SKOV3, and the effects of CHI3L1 on the proliferation and invasion of ovarian cancer cells. **Methods** The p13.7-CHI3L1 shRNA recombinant plasmid was constructed and transfected into SKOV3, silence the CHI3L1 gene in ovarian cancer cells. The p13.7-CHI3L1 shRNA recombinant plasmid was successfully transfected into SKOV3, and the empty plasmid was transfected as negative control. The expression level of CHI3L1 protein in SKOV3 cells was detected by Western Blot. The proliferation of SKOV3 was observed by the plate cell clone formation test, and the invasion ability of ovarian cancer cells SKOV3 was detected using transwell assay. **Results** The recombinant plasmid of p13.7-CHI3L1 shRNA was successfully constructed, and a large number of green fluorescent cells were observed after transfection of ovarian cancer cells SKOV3. Moreover, compared with the control group, the protein expression level of CHI3L1 in ovarian cancer cells SKOV3 in the transfection group of p13.7-CHI3L1 shRNA was decreased, and the number of clones and invasion ability of ovarian cancer SKOV3 cells were reduced. **Conclusion** Down-regulation of CHI3L1 expression in ovarian cancer cell SKOV3 can inhibit the proliferation and invasion ability.

Keywords: chitinase 3-like protein 1; ovarian cancer; proliferation; invasion ability

卵巢癌是妇科死亡率最高的恶性肿瘤, 严重威胁女性生命, 卵巢癌具有早期诊断困难、易发生转移的特点^[1-3], 且患者预后不良, 因此深入探讨卵巢癌的致病机制具有重要意义。壳多糖酶 3 样蛋白 1 (chitinase-3-like-protein-1, CHI3L1), 又被称为是一种分泌型糖蛋白, 由肿瘤细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、平滑肌细胞和软骨细胞分泌。研究表明在多种肿瘤的增殖、分化、浸润、血管形成和

侵袭转移过程中起着重要作用^[5-6]。LUO 等^[7]人发现 CHI3L1 过表达与转移相关, 是甲状腺乳头状癌预后不良的一个指标。ANSARI 等^[8]人发现脑脊液中星形细胞 CHI3L1 驱动 HER2+ 乳腺癌皮层转移。据报道 CHI3L1 通过下调 p53 促进结肠癌细胞增殖并提高对西妥昔单抗的敏感性^[9]。但 CHI3L1 在卵巢癌患者中的表达以及其对卵巢癌细胞生物学行为的影响尚不清楚, 因此本文通过构建 p13.7-CHI3L1

基金课题: 2019 年度河北省医学科学研究课题 (编号 20191534)。

作者简介: 杨立芬 (1981-), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 妇科肿瘤及内分泌, E-mail: yking7342@163.com。

shRNA 重组质粒,使得卵巢癌细胞中的 CHI3L1 基因沉默,探讨 CHI3L1 对卵巢癌细胞 SKOV3 增殖、侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 研究对象 人卵巢癌细胞 SKOV3 购自上海冠导生物工程有限公司,并用含 10 g/dl FBS, 100 U/ml 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基进行培养。

1.2 仪器与试剂 BCA 蛋白定量试剂盒、蛋白电泳制胶所需试剂(上海生物工程有限公司);胎牛血清、DMEM 培养基(美国 GIBCO 公司);慢病毒表达载体 PLL3.7、载体质粒(上海生物工程有限公司);PCR 仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Transwell 小室(美国 Corning 公司);荧光显微镜(德国 Leica 公司)等。

1.3 方法

1.3.1 构建 pll3.7-CHI3L1 shRNA 重组质粒: 根据 Genbank 中 CHI3L1 (NM_001276.4) mRNA 序列和 pll3.7 质粒图谱, Xho I 和 Hpa I 限制酶作为酶切位点,设计引物。将引物进行退火,退火条件为 95℃ 5 min, 90℃ 5 min, 85℃ 5 min, 80℃ 5 min, 75℃ 5 min, 70℃ 5 min, 65℃ 5 min, 60℃ 5 min, 退火完成后取适量稀释 500 倍, 4℃ 保存。37℃ 下,在体系中酶切质粒。1% 琼脂糖凝胶电泳,之后胶回收纯化 DNA,将纯化的 DNA 产物保存于 -20℃。在体系中 (pll3.7 线性载体 1 μl、目的基因 7 μl、T4 buffer 1 μl、T4 连接酶 1 μl) 进行胶回收产物连接, 16℃ 水浴过夜。然后将连接产物转化到 DH5α 感受态细胞,成功构建 pll3.7-CHI3L1 shRNA 重组质粒。

1.3.2 细胞转染: 将 SKOV3 细胞种植在 96 孔板中,每孔 DMEM 培养液 100 μl。1 天后,待细胞处于良好的对数生长期状态时进行转染。实验分为 3 组: ①空白对照(非转染组); ②阴性对照(转染空载体); ③ pll3.7-CHI3L1 shRNA 转染组(转染 pll3.7-CHI3L1 shRNA 质粒),在转染试剂中直接加入质粒 DNA,混匀后室温静置 10 min。然后在含细胞和完全培养液里加入转染复合物。置于 37℃, 5ml/dl CO₂, 饱和湿度条件下培养。在荧光显微镜下观察卵巢癌细胞转染效果。

1.3.3 Western Blot: 配制细胞裂解液,制备 CHI3L1 蛋白样品,测定蛋白质浓度。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE): 分别制备浓缩胶和分离胶,上样进行电泳。电泳分离 CHI3L1 蛋白后转膜,用封闭液(5g/dl 脱脂奶粉+TBST)进行封闭,室温静置 1h。一抗杂交: 加入 1 ml 封闭液,再加适量的一抗, 4℃ 孵育过夜。室温下,将膜在磷酸盐缓冲液中浸洗 3 次, 10 min/次。

步骤同一抗杂交,取出膜,转移至塑料自封袋中,加入二抗,室温孵育 1 h,然后再将膜在磷酸盐缓冲液中浸洗 3 次, 10 min/次。将混合后的检测试剂均匀加至杂交膜上,反应 3~5 min。用薄膜覆盖杂交膜,赶出多余发光液,在暗房中压片、显影。通过 Western Blot 检测 CHI3L1 蛋白的表达。

1.3.4 平板细胞克隆形成试验: 用 0.25% 胰蛋白酶来消化对数生长期的各组细胞,把细胞悬浮在 10g/dl 胎牛血清的 DMEM 培养液中。把细胞接种到培养液中,并在 5 ml/dl CO₂, 37℃, 饱和湿度下培养,直至出现肉眼可见的克隆。弃上清, PBS 浸洗,之后 4g/dl 多聚甲醛固定 15 min, 0.1g/dl 结晶紫染色 10~30 min, 观察实验结果。

1.3.5 Transwell 实验: 制作细胞悬液(制备细胞悬液前先让细胞撤血清饥饿 12~24 h, 去除血清的影响)。消化细胞,终止消化后离心弃去培养液,用无血清培养液重悬。将细胞悬液加入到 Transwell 小室,下室一般加入含血清的培养液,上室加入不含血清的培养液。常规培养 12~48 h 后观察细胞侵袭能力。取出 Transwell 小室,弃去孔中培养液,用无钙的 PBS 清洗 2 次,用棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞, 4 g/dl 多聚甲醛固定 30 min, 风干。用 0.1g/dl 结晶紫染色 30~60 min, 用 PBS 洗 3 次,用棉签轻轻擦掉上室水分。显微镜下随机五个视野观察细胞。

1.4 统计学分析 通过 SPSS 20.0 软件对结果进行统计学分析,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pll3.7-CHI3L1 shRNA 重组质粒的构建及转染效率检测 在荧光显微镜下观察 pll3.7-CHI3L1 shRNA 重组质粒转染卵巢癌细胞 48h 后的绿色荧光效果,观察结果见图 1。观察到大量的绿色荧光细胞,说明 pll3.7-CHI3L1 shRNA 重组质粒成功转染卵巢癌细胞,且转染效率较高。

2.2 Western Blot 检测 pll3.7-CHI3L1 shRNA 重组质粒转染 SKOV3 细胞后 CHI3L1 的表达情况 在 pll3.7-CHI3L1 shRNA 转染卵巢癌细胞 SKOV3 以沉默 CHI3L1 基因,转染空载质粒作为阴性对照组(negative control, NC)。转染 48 h 后收集 SKOV3 细胞。首先通过 qPCR 检测转染 pll3.7-CHI3L1 shRNA 重组质粒后 CHI3L1 mRNA 的变化,结果显示和空白对照组相比 (1.06 ± 0.56),转染 NC 对 CHI3L1 mRNA 水平几乎无影响 (1.03 ± 0.74),转染 pll3.7-CHI3L1 shRNA 重组质粒后 CHI3L1 mRNA 的水平下降 (0.41 ± 0.23)。Western Blot 检测 CHI3L1 蛋白表达水平,结果见图 2。与空白对

照组 (1.12 ± 0.47) 和阴性对照组 (0.98 ± 0.54) 相比, pll3.7-CHI3L1 shRNA 转染卵巢癌细胞 SKOV3 后, SKOV3 细胞中 CHI3L1 蛋白表达水平下降 (0.23 ± 0.41)。

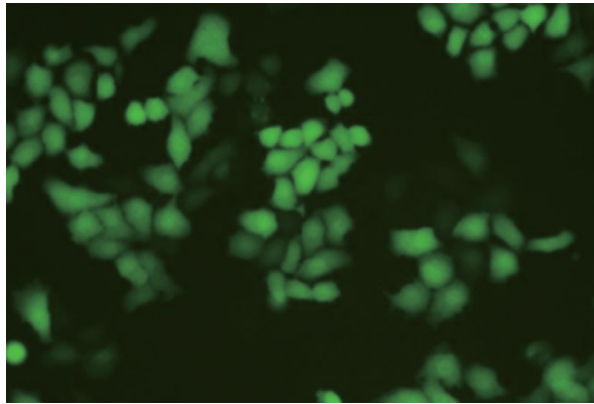


图1 pll3.7-CHI3L1 shRNA 重组质粒转染卵巢癌细胞

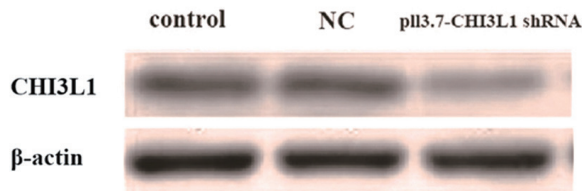


图2 Western Blot 检测 pll3.7-CHI3L1 shRNA 转染 SKOV3 细胞后 CHI3L1 蛋白表达水平

2.3 平板细胞克隆形成试验检测 pll3.7-CHI3L1 shRNA 对卵巢癌细胞 SKOV3 增殖的影响 通过平板细胞克隆形成试验检测 pll3.7-CHI3L1 shRNA 对卵巢癌细胞 SKOV3 增殖的影响, 结果见图3。与空白对照组 (1.05 ± 0.49) 和阴性对照组 (1.09 ± 0.72) 相比, 转染 pll3.7-CHI3L1 shRNA 后的卵巢癌细胞 SKOV3 的细胞克隆数减少, 细胞相对克隆形成率降低 (0.28 ± 0.46)。说明 pll3.7-CHI3L1 shRNA 能抑制卵巢癌细胞 SKOV3 的增殖。

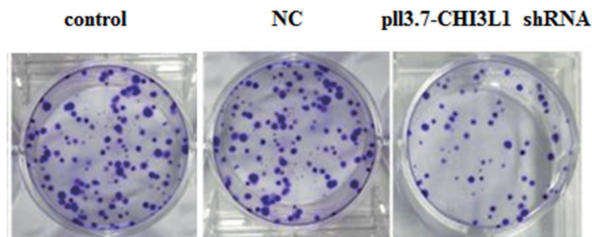


图3 平板细胞克隆形成试验检测 pll3.7-CHI3L1 shRNA 对卵巢癌细胞 SKOV3 增殖的影响

2.4 Transwell 实验检测 pll3.7-CHI3L1 shRNA 对卵巢癌细胞 SKOV3 侵袭能力的影响 通过 Transwell 实验检测 pll3.7-CHI3L1 shRNA 对卵巢癌细胞 SKOV3 侵袭能力的影响, 结果见图4。与空白对照组 (0.94 ± 0.52) 和阴性对照组 (0.92 ± 0.81) 相比,

转染 pll3.7-CHI3L1 shRNA 后的卵巢癌细胞 SKOV3 的侵袭能力下降 (0.25 ± 0.61)。

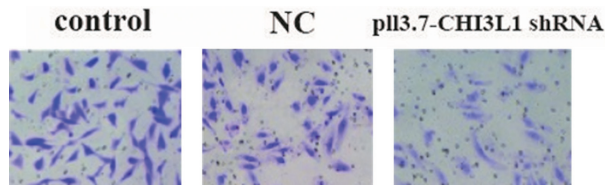


图4 Transwell 实验检测 pll3.7-CHI3L1 shRNA 对卵巢癌细胞 SKOV3 侵袭能力的影响

3 讨论

壳多糖酶3样蛋白1 (CHI3L1), 又名几丁质酶3样蛋白1, 是一种分泌型糖蛋白, 分子量约40kDa, 人类是由 CHI3L1 基因编码。CHI3L1 基因位于人类1号染色体q32的高度保守区域, 含有10个外显子, 基因组长度约10.9 kb, 编码383个氨基酸^[10]。有研究揭示: CHI3L1 是一种调控细胞增殖、分化的生长因子, 能促进肿瘤细胞增殖、分化; CHI3L1 能促进肿瘤细胞运动和肿瘤侵袭能力; CHI3L1 是血管平滑肌细胞的黏附和迁移因子, 可以促进血管生成和组织重塑, 而肿瘤血管生成对肿瘤的生长至关重要。有研究表明 HCC 组血清 CHI3L1 均显著高于慢性乙型肝炎组和健康体检组, 对 HCC 均具有很高的诊断效能^[11]。另外发现血清 CHI3L1 在肝硬化中具有很好的诊断效能^[12]。表明 CHI3L1 蛋白可能对肿瘤细胞的生物学行为产生影响。

RNA 干扰技术是利用同源性双链 RNA 诱导 mRNA 水平上目标基因的沉默, 从而起到抑制蛋白产物表达的目的。利用 RNA 干扰技术分析基因功能, 探讨肿瘤的基因靶向治疗。LIBREROS 等^[13] 人研究发现: 利用 RNA 干扰技术可以抑制乳腺癌细胞中 CHI3L1 的表达, 引起趋化因子配体-2、巨噬细胞炎性蛋白-2、基质金属蛋白酶-9 等的分泌减少, 从而减弱肿瘤细胞的增殖和侵袭能力。另外也有学者研究发现: 应用 RNA 干扰技术沉默 CHI3L1 基因, 能抑制 CHI3L1 蛋白的表达, 从而达到抑制胶质瘤细胞的增殖及侵袭能力的目的^[14]。本文成功构建 pll3.7-CHI3L1 shRNA 重组质粒, 并发现下调 CHI3L1 蛋白表达能够抑制卵巢癌细胞 SKOV3 的增殖。同时本文通过 Transwell 实验来检测结果表明: CHI3L1 蛋白表达水平下调可以抑制卵巢癌细胞 SKOV3 的侵袭能力, 表明 CHI3L1 在 SKOV3 细胞中发挥的是癌基因的作用。

综上所述, 沉默卵巢癌细胞 SKOV3 中 CHI3L1 基因, 可以抑制卵巢癌细胞 SKOV3 的增殖和侵袭能力。因此, 本研究为卵巢癌的基因靶向治疗提供

了一个新的思路, CHI3L1 有可能作为卵巢癌靶向治疗的有效基因靶标。另外, KAWADA 等^[15] 人的研究发现, 在结肠癌细胞中, CHI3L1 主要通过激活胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 和 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 信号通路而产生诱导白介素 -8 和单核细胞趋化蛋白 -1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) 分泌的。还有文献报道 CHI3L1 通过 MAPK/ERK 和 PI3K/AKT 磷酸化在食物过敏中 Th2 炎症和 M2 巨噬细胞极化中发挥关键作用^[16]。在胶质母细胞瘤中, 星形胶质细胞增生释放促癌 CHI3L1, 激活了 MAPK 信号通路^[17]。细胞内信号通路有很多, 考虑到 CHI3L1 在其它肿瘤中的作用机制, 我们猜想 CHI3L1 调控卵巢癌细胞发展的机制也可能是通过信号通路实现的, 但是具体作用方式还需要进一步探索。

参考文献:

- [1] TAYLOR S E, WIELD A, FANG Yusi, et al. Endocrine biomarkers in low-grade serous ovarian cancers(LGSC) and serous ovarian tumors of low malignant potential(LMP)[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2020, 38(suppl 15): e18045.
- [2] SHI Yuchuan, HE Runhua, YANG Yu, et al. Circular RNAs: novel biomarkers for cervical, ovarian and endometrial cancer (review)[J]. *Oncology Reports*, 2020, 44(5): 1787-1798.
- [3] 黄梨, 龙佑梅, 付义霞, 等. 紫檀芪对卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡和糖酵解的影响及机制研究 [J]. *实用肿瘤学杂志*, 2019, 33(6): 502-507.
HUANG Li, LONG Youmei, FU Yixia, et al. Effect of pterostilbene on apoptosis and glycolysis of ovarian cancer SKOV3 cells and its mechanism [J]. *Practical Oncology Journal*, 2019, 33(6): 502-507.
- [4] CHIANG Y C, LIN H W, CHANG C F, et al. Overexpression of CHI3L1 is associated with chemoresistance and poor outcome of epithelial ovarian carcinoma.[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(37): 39740-39755.
- [5] SU C W, CHEN M K, HUNG W C, et al. Functional variant of CHI3L1 gene is associated with neck metastasis in oral cancer[J]. *Clinical Oral Investigations*, 2019, 23(6): 2685-2694.
- [6] WANG Y, ZHONG M, WANG W, et al. CHI3L1 regulates APAP-induced liver injury by promoting macrophage infiltration[J]. *European review for medical and pharmacological sciences*, 2019, 23(11): 4996-5003.
- [7] LUO Dingyuan, CHEN Haibo, LUO Penghui, et al. CHI3L1 overexpression is associated with metastasis and is an indicator of poor prognosis in papillary thyroid carcinoma[J]. *Cancer Biomarkers: Section A of Disease Markers*, 2017, 18(3): 273-284.
- [8] ANSARI K I, BHAN A, LIU Xueli, et al. Astrocytic IGFBP2 and CHI3L1 in cerebrospinal fluid drive cortical metastasis of HER2+breast cancer[J]. *Clinical & Experimental Metastasis*, 2020, 37(3): 401-412.
- [9] LIU Kaitai, JIN Ming, YE Shuang, et al. CHI3L1 promotes proliferation and improves sensitivity to cetuximab in colon cancer cells by down - regulating p53[J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2020, 34(1): e23026.
- [10] KAINULAINEN H. CHI3L1--a novel myokine[J]. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 2016, 216(3): 260-261.
- [11] 张巧娣, 谢而付, 凌芸, 等. 壳多糖酶 3 样蛋白 1 与甲胎蛋白在肝细胞癌诊断中的比较 [J]. *现代检验医学杂志*, 2017, 32(1): 45-47, 52.
ZHANG Qiaodi, XIE Erfu, LING Yun, et al. Comparative diagnostic value of chitinase 3-like 1 protein and AFP in the diagnosis of hepatocellular carcinoma [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2017, 32(1): 45-47, 52.
- [12] 石玉如, 岳莉, 赵长城, 等. 血清壳多糖酶 3 样蛋白 1 检测在不同肝脏疾病中的应用价值 [J]. *现代检验医学杂志*, 2017, 32(6): 39-42.
SHI Yuru, YUE Li, ZHAO Changcheng, et al. Clinical application value of chitinase-3-like protein 1 in patients with different liver diseases [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2017, 32(6): 39-42.
- [13] LIBREROS S, GARCIA-AREAS R, SHIBATA Y, et al. Induction of proinflammatory mediators by CHI3L1 is reduced by chitin treatment: decreased tumor metastasis in a breast cancer model[J]. *International Journal of Cancer*, 2012, 131(2): 377-386.
- [14] KU B M, LEE Y K, RYU J, et al. CHI3L1 (YKL-40) is expressed in human gliomas and regulates the invasion, growth and survival of glioma cells[J]. *International Journal of Cancer*, 2011, 128(6): 1316-1326.
- [15] KAWADA M, SENO H, KANDA K, et al. Chitinase 3-like 1 promotes macrophage recruitment and angiogenesis in colorectal cancer[J]. *Oncogene*, 2012, 31(26): 3111-3123.
- [16] KIM E G, KIM M N, HONG JY, et al. Chitinase 3-Like 1 contributes to food allergy via M2 macrophage polarization[J]. *Allergy Asthma & Immunology Research*, 2020, 12(6): 1012-1028.
- [17] WURM J, BEHRINGER S P, RAVI V M, et al. Astroglial release of Pro-Oncogenic chitinase 3-Like 1 causing MAPK signaling in glioblastoma[J]. *Cancers*, 2019, 11(10): 1437.

收稿日期: 2021-01-30

修回日期: 2021-03-18