

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.01.005

## siRNA 沉默 *CCL18* 的表达抑制卵巢上皮癌 SKOV3 细胞的侵袭和迁移

张玮, 杨莹珠, 李力, 王琪(广西医科大学附属肿瘤医院 妇瘤科 广西区域性高发肿瘤重点实验室, 广西南宁 530021)

**[摘要]** **目的:**探讨体外沉默 *CCL18* 基因的表达对卵巢上皮癌 SKOV3 细胞侵袭和迁移的影响。**方法:**化学合成 3 对靶向 *CCL18* 的 siRNA (CCL18-siRNA61、CCL18-siRNA127、CCL18-siRNA224), 体外转染至 *CCL18* 阳性的 SKOV3 细胞, RT-PCR 检测 SKOV3 细胞中 *CCL18* mRNA 的表达, 选取其中干扰效率最好的序列, 构建靶向 *CCL18* 的干扰质粒 pSilencer4.1-CCL18-siRNA61。pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 质粒转染 SKOV3 细胞后, MTT 法测定 SKOV3 细胞的增殖, 流式细胞术检测细胞的细胞周期, 采用 Transwell 法、Migration 法以及 Fibronectin 黏附法分别测定细胞的体外侵袭、迁移、黏附能力。**结果:**3 对靶向 *CCL18* 的 siRNA 中 CCL18-siRNA61 干扰效果最好, 进而成功构建靶向 *CCL18* 的 pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 干扰质粒, pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 质粒转染可显著下调 SKOV3 细胞中 *CCL18* mRNA 的表达。pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 质粒转染不影响 SKOV3 细胞的增殖, 但 pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 质粒转染组 SKOV3 细胞中(S + G<sub>2</sub> + M)期细胞比例明显低于对照质粒 pSilencer4.1-Ctrl-siRNA 转染组[(19.71 ± 4.4)% vs (26.45 ± 7.91)% ,  $P < 0.05$ ]; 且与 pSilencer4.1-Ctrl-siRNA 质粒转染相比, pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 质粒转染可有效抑制 SKOV3 细胞的侵袭、迁移和黏附能力[(9.91 ± 3.41)% vs (23.75 ± 6.81)% , (16.80 ± 8.71)% vs (31.74 ± 11.23)% , (6.73 ± 4.33)% vs (17.53 ± 6.54)% ; 均  $P < 0.05$ ]。**结论:**siRNA 沉默 *CCL18* 的表达可抑制卵巢上皮癌细胞株 SKOV3 的侵袭、迁移和黏附能力。

**[关键词]** 卵巢上皮癌; SKOV3 细胞; *CCL18* 基因; siRNA; 侵袭; 迁移; 黏附

**[中图分类号]** R737.31; R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2013)01-0030-07

## siRNA silencing *CCL18* expression inhibits invasion and migration of ovarian epithelial carcinoma SKOV3 cells

Zhang Wei, Yang Yingzhu, Li Li, Wang Qi (Department of Gynecology Oncology, Key Laboratory of Regional High Incidence Tumors in Guangxi, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of *in vitro* silencing *CCL18* gene expression on invasion and metastasis of ovarian epithelial carcinoma SKOV3 cells. **Methods:** Three pairs of siRNAs targeting *CCL18* (CCL18-siRNA61, CCL18-siRNA127, CCL18-siRNA224) were chemically synthesized, and were transfected into *CCL18*-positive SKOV3 cells *in vitro*. RT-PCR was used to detect the expression of *CCL18* mRNA in SKOV3 cells. The siRNA sequence with the best interference efficiency was selected to construct interference plasmid targeting *CCL18*, named pSilencer4.1-CCL18-siRNA61. After transfection of pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 plasmid, the proliferation of SKOV3 cells was detected by MTT assay, the cell cycle was detected by flow cytometry, and the cell invasion, migration and adhesion capacity *in vitro* was determined by Transwell assay, Migration assay and Fibronectin adhesion method, respectively. **Results:** CCL18-siRNA61 showed the best interference efficiency in the three *CCL18*-siRNAs. The interference plasmid pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 was then successfully constructed. The expression of *CCL18* mRNA was significantly decreased after pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 transfection. The proliferation of SKOV3 cells was not affected by pSilencer4.1-CCL18-

**[基金项目]** 广西科技厅重点研究项目资助(No. 2010GXNSFD013053), 广西科技厅攻关研究项目资助(No. 1140003A-34)。Project supported by the Key Research Project of Science and Technology Bureau of Guangxi Zhuang Autonomous Region(No. 2010GXNSFD013053), and the Key Research Program of Science and Technology Bureau of Guangxi Zhuang Autonomous Region(No. 1140003A-34)

**[作者简介]** 张玮(1959-), 女, 北京人, 副研究员, 主要从事妇科肿瘤方面的研究。Email: zw1125@126.com

**[通信作者]** 王琪(Wang Qi, corresponding author), E-mail: qi\_catcat@163.com

**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130116.0827.007.html>

siRNA61 transfection. However, the proportion of SKOV3 cells in phase ( S + G<sub>2</sub> + M ) in the pSilencer4. 1-CCL18-siRNA61 transfection group was significantly lower than that in the pSilencer4. 1-Ctrl-siRNA transfection group ( [ 19.71 ± 4.4 ]% vs [ 26.45 ± 7.91 ]%,  $P < 0.05$  ). The invasion, migration and adhesion capacity of SKOV3 cells was effectively inhibited in the pSilencer4. 1-CCL18-siRNA61 transfection group compared with that in the pSilencer4. 1-Ctrl-siRNA transfection group ( [ 9.91 ± 3.41 ]% vs [ 23.75 ± 6.81 ]%, [ 16.80 ± 8.71 ]% vs [ 31.74 ± 11.23 ]%, [ 6.73 ± 4.33 ]% vs [ 17.53 ± 6.54 ]%,  $P < 0.05$  ), respectively. **Conclusion:** siRNA silencing *CCL18* expression can inhibit the invasion, adhesion and migration capacity of ovarian epithelial cancer cell line SKOV3.

[ **Key words** ] epithelial ovarian carcinoma; SKOV3 cell; *CCL18* gene; siRNA; invasion; migration; adhesion

[ Chin J Cancer Biother, 2013, 20(1): 30-36 ]

卵巢上皮癌为妇科常见恶性肿瘤,起病隐匿,且易发生早期转移,约 70% 的患者初诊时已为晚期<sup>[1]</sup>。已有研究<sup>[2]</sup>证实, I 期卵巢癌患者 5 年生存率为 90%,而 III 期患者降至 30% ~ 40%。IV 期患者则仅为 10%。因此,早诊早治是提高卵巢癌患者生存率的重要途径。虽然新的卵巢肿瘤标记物及诊断手段层出不穷,但由于卵巢恶性肿瘤早期症状不明显,对于无症状、无家族史的妇女进行卵巢癌早期诊断的手段仍然不尽人意,血清 CA125 对 I 期卵巢癌诊断的特异性、敏感性也仅有 25% ~ 30%<sup>[3-4]</sup>。因此,早期诊断对于改善卵巢癌患者的预后有着极其重要的意义。血清中蛋白部分来源于组织细胞的分泌和代谢产物,组织细胞发生病理改变时,其细胞内改变的成分包括肽类、蛋白质、酶类和代谢产物等分泌到血液中<sup>[5]</sup>。本课题组前期采用 SELDI 蛋白质芯片技术筛选卵巢上皮癌患者血清和正常对照血清中差异表达的蛋白,发现趋化因子配体 18 ( CC-chemokine ligand 18, *CCL18* )在卵巢癌患者血清中的表达量和阳性表达率明显升高;肿瘤组织显微切割单细胞实验<sup>[5-6]</sup>也证实,肿瘤细胞可分泌 *CCL18*,且出现转移的肿瘤组织中 *CCL18* 蛋白表达水平有增高的趋势,说明 *CCL18* 可能对卵巢癌的浸润、转移起重要作用。因此,本课题通过 siRNA 干扰卵巢上皮癌细胞株 SKOV3 中 *CCL18* 的表达,研究 *CCL18* 在卵巢上皮癌浸润、转移中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株及主要试剂

*CCL18* 阳性卵巢癌细胞株 SKOV3 由本实验室保存,用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。实验所用细胞均为对数生长期,细胞消化传代约为 10 ~ 25 代。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由本实验室保存。pSilencer4. 1-CMV neo 载

体购自 Ambion 公司,限制性内切酶 *Bam*H I, *Hind* III 和 T4 DNA 连接酶购自 MBI Fermentas 公司,质粒提取试剂盒购自北京 Tiangen 有限公司,Lipofectamine™ 2000 购自美国 Invitrogen 公司,纤黏连蛋白 ( fibronectin )和 Matrigel 胶购自北京大学生物中心,Tanswell 小室胶购自美国 Corning Costar 公司。

### 1.2 靶向 *CCL18* 的 *CCL18*-siRNA 的设计与合成

设计 3 对靶向 *CCL18* 基因的 siRNA ( 表 1 ),在 GenBank 表达序列标签数据库中用 BLAST 检索,确认所设计 siRNA 序列均是 *CCL18* 基因的特异性干扰片段。另合成 1 对荧光标记的与 *CCL18* 基因无关的阴性对照 siRNA,以及 1 对针对 *GAPDH* 基因的阳性对照 siRNA。siRNA 由上海吉玛制药技术有限公司合成。

表 1 *CCL18* 基因 siRNA 序列

Tab. 1 The siRNA sequences of *CCL18* gene

siRNA	Sequence
CCL18-siRNA61	5'-ACAAGUUGGUACCAACAAA-3'
CCL18-siRNA127	5'-CAUAGUUGACUAUUCUGAA-3'
CCL18-siRNA224	5'-AGAAGUGGGUCCAGAAAUA-3'
GAPDH positive	5'-GUAUGACAACAGCCUCAAG-3'
Negative control	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3'

### 1.3 *CCL18*-siRNA 瞬时转染 SKOV3 细胞及最佳干扰片段的选择

将 SKOV3 细胞按每孔细胞数  $2 \times 10^5$  个接种到 6 孔培养板;24 h 后,细胞的汇合度达到 80% ~ 85% 时进行转染。在 250  $\mu$ l RPMI 1640 无血清无抗生素的培养基中加入 20  $\mu$ l 的 *CCL18*-siRNA 寡聚物,轻轻混匀,再加入 5  $\mu$ l Lipofectamine™ 2000,轻轻混匀后,室温下孵育 5 min;将 *CCL18*-siRNA-Lipofectamine™ 2000 复合物加入培养板中,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 6 h,

更换含血清的 RPMI 1640 培养基, 继续培养 24 h。采用 TRIzol 试剂一步法提取转染后 SKOV3 细胞的 RNA, 并逆转录为 cDNA, 以 RT-PCR 法检测 CCL18-siRNA 转染后 SKOV3 细胞中 CCL18 mRNA 的表达, 其反应条件为: 95 °C 预变性 5 min、95 °C 变性 30 s、58 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 45 s, 共 32 循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。管家基因  $\beta$ -actin 上游引物: 5'-GATGACCCAGATCATGTTT-3', 下游引物: 5'-TGGAGTTGAAGGTAGTTTCG-3', 引物由上海生物工程有限公司合成, 扩增序列长度为 491 bp。

#### 1.4 构建重组 pSilencer4.1-CMV neo-CCL18-siRNA61 干扰质粒

以 TTCAAGAGA 为 loop 环, loop 环两端设计带有 BamH I、Hind III 黏性末端且能表达 CCL18-shRNA 的寡核苷酸序列, 同时设计 1 对与 CCL18 基因碱基组成相同但排列顺序不同, 并且与其他基因无同源性的阴性对照序列 (negative control siRNA, NC-siRNA)。CCL18-siRNA 正义序列: 5'-GATCCATAGTTGACTATTCTGAATTCAAGAGATTCAGAA TAGTCAACTATGCTA-3', 反义序列: 5'-AGCTTAGCATAGTTGACTATTCTGAAAAGTTCTCTTTCAGAATA GTCAACTATGG-3'; Ctrl-siRNA 正义序列: 5'-GATCCTTACTGAATTCGCTAGAATTTCAAGAGAATTCTAG CGAATTCAGTAACTA-3', 反义序列: 5'-AGCTTAGT TACTGAATTCGCTAGAATAAGTTCTCTATTCTAGCGA ATTCAGTAAAG-3'。所有序列由上海生物工程有限公司合成。插入片段溶解及退火配成双链, 同时将 pSilencer4.1-CMV neo 质粒用 BamH I 和 Hind III 双酶切, 采用 T4 DNA 连接酶连结退火双链和线性化 pSilencer4.1-CMV neo 质粒。转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 并依次置 LB 和 AMP (+) 的琼脂糖平板培养, 37 °C 振荡培养。以质粒提取试剂盒提取质粒 pSilencer4.1-CMV neo-CCL18-siRNA61 (简称为 pSilencer4.1-CCL18-siRNA61)。重组干扰质粒 pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 经 BamH I 和 Hind III 双酶切后, 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳和凝胶成像分析系统分析。重组 pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 干扰质粒送北京诺赛基因组研究中心有限公司进行测序, 用 vector NTI Suite 7.1 软件将测序所得序列与原设计的寡核苷酸序列进行比对分析。

#### 1.5 pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 质粒稳定转染 SKOV3 细胞

采用脂质体法将 pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 质粒或对照组质粒 pSilencer4.1-CMV neo-Ctrl-

siRNA (简称 pSilencer4.1-Ctrl-siRNA) 转染入 SKOV3 细胞, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 6 h 后, 更换含 20% 血清的 RPMI 1640 培养基培养 24 h, 更换常规培养基, 继续培养 48 h。荧光显微镜下观察转染效率。2~3 d 后更换含 G418 的培养基至筛选出稳定转染的 SKOV3 细胞克隆, 并命名为 CCL18-siRNA61-SKOV3 细胞和 Ctrl-siRNA-SKOV3 细胞。

#### 1.6 MTT 法检测 CCL18-siRNA61-SKOV3 细胞的增殖

用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液制备单细胞悬液, 96 孔板每孔接种  $1 \times 10^4$  个细胞, 每孔体积 200  $\mu$ l, 设 3 复孔。接种细胞置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养, 每天 (至第 7 天) 每组取 3 孔, 每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/ml, 用 PBS 配制, pH = 7.4) 20  $\mu$ l。继续孵育 4 h 后去上清液, 每孔加入 150  $\mu$ l DMSO, 振荡 10 min, 选择 492 nm 波长在酶联免疫检测仪上测定各孔光密度 (D 值), 绘制细胞生长曲线。实验重复 3 次。

#### 1.7 流式细胞术检测 CCL18-siRNA61-SKOV3 细胞的细胞周期

将转染后 SKOV3 细胞用 0.25% 胰酶消化后, PBS 洗涤细胞, 加入 1 ml 预冷的 70% 乙醇, 4 °C 固定过夜; PBS 洗涤 2 次, 将 PBS 配制成  $1 \times 10^6$ /ml 的细胞悬液; 以 1:1 的比例加入溴化乙锭, 4 °C 下避光孵育 30 min; 每种细胞检测  $1 \times 10^4$  个细胞, 流式细胞术分析其 DNA 含量, Multicycle 软件分析 G<sub>0</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、S 各期细胞数及其所占比例。

#### 1.8 Transwell 法检测 CCL18-siRNA61-SKOV3 细胞的侵袭、迁移及黏附能力

分别采用 Transwell 小室法、Matrigel 侵袭法和 Fibronectin 黏附法, 按试剂盒说明书操作, 检测各组 SKOV3 细胞的侵袭、迁移和黏附能力。Transwell 小室法直接使用 Transwell 小室, 而 Matrigel 侵袭法和 Fibronectin 黏附法则分别用 50  $\mu$ l 含 5  $\mu$ g Fibronectin 的 PBS 处理 Transwell 小室的聚碳酸酯膜 (8  $\mu$ m 孔径) 下表面, 室温下过夜干燥, 然后将 Matrigel 用冷的无血清 RPMI 1640 培养基稀释成 1.25 mg/ml, 加入滤膜上表面 (50  $\mu$ g/滤膜), 37 °C 孵育 4~5 h 后, 用无血清培养液轻洗形成胶状的 Matrigel。三种方法检测的细胞均用含 1% FBS 的 RPMI 1640 配制成  $1 \times 10^6$ /ml 的细胞悬液, 并取 100  $\mu$ l 加入上室; 取 600  $\mu$ l 含 10% FBS 的 RPMI 1640 加入下室, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培 20 h, 然后分别检测上、下室细胞的吸光度值 (D 值)。迁移率 (%) = 下表面细胞  $D_{450}$ /上表面细胞  $D_{450} \times 100\%$ ; 侵袭率 (%) = 下表面细胞  $D_{450}$ /上表面细胞  $D_{450} \times 100\%$ ; 黏附率 (%) =

下表面细胞  $D_{450}$ /上表面细胞  $D_{450} \times 100\%$ 。

### 1.9 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,计量资料以单因素方差分析(One-way ANOVA)进行统计处理,方差不齐者以 Karuskal-wallis 方法进行分析, $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CCL18-siRNA61 为最佳下调 *CCL18* mRNA 表达的 siRNA 片段

化学合成 3 对靶向 *CCL18* 的 siRNA (CCL18-siRNA61、CCL18-siRNA127、CCL18-siRNA224),体外转染至 SKOV3 细胞中,RT-PCR 法检测转染后 SKOV3 细胞中 *CCL18* mRNA 的表达,选取其中干扰效率最好的序列。结果显示(表 2,图 1),CCL18-siRNA61 转染对 SKOV3 细胞中 *CCL18* mRNA 表达的下调作用最显著( $P < 0.05$ ),提示 CCL18-siRNA61 可作为构建 *CCL18* 干扰质粒的最佳 siRNA 片段。

表 2 不同 CCL18-siRNA 转染后 SKOV3 细胞中 *CCL18* mRNA 的表达( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Expression of *CCL18* mRNA in SKOV3 cells transfected with different CCL18-siRNAs ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	<i>CCL18</i> mRNA	<i>P</i>
Untransfected	0.0110 ± 0.0058	
NC-siRNA	0.0172 ± 0.0078	0.750
CCL18-siRNA61	0.0004 ± 0.0002	0.000
CCL18-siRNA127	0.0009 ± 0.0003	0.001
CCL18-siRNA224	0.0038 ± 0.0012	0.047

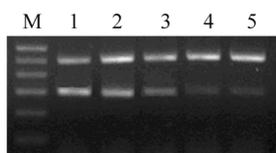


图 1 不同 CCL18-siRNA 转染下调 SKOV3 细胞中 *CCL18* mRNA 的表达( $\bar{x} \pm s$ )

Fig. 1 Down-regulation expression of *CCL18* mRNA in SKOV3 cells after transfected with different CCL18-siRNAs ( $\bar{x} \pm s$ )

M: DNA Marker; 1: CCL18-siRNA61;  
2: CCL18-siRNA127; 3: CCL18-siRNA224;  
4: Untransfected; 5: NC-siRNA

### 2.2 成功构建 pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 重组质粒

pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 重组质粒经 *Bam*H I/*Hind* III 双酶切后,进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,可见酶切后 pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 呈线性条带(双酶切所切下的小片段为 55 bp,在 0.8% 琼脂糖凝胶电泳中不能显现),未见其他杂带,而空载质粒组则见 3 条带,提示 pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 重组质粒构建成功(图 2)。测序(图 3)结果显示 pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 和对照 pSilencer4.1-Ctrl-siRNA 质粒中插入的片段与设计片段完全符合,进一步证实重组载体 pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 构建成功。

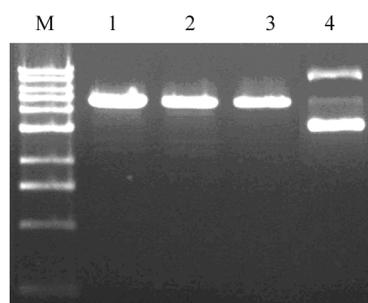


图 2 pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 质粒 *Bam*H I/*Hind* III 双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 plasmid by *Bam*H I/*Hind* III double digestion

M: Marker; 1-3: pSilencer4.1-CCL18-siRNA61; 4: pSilencer4.1

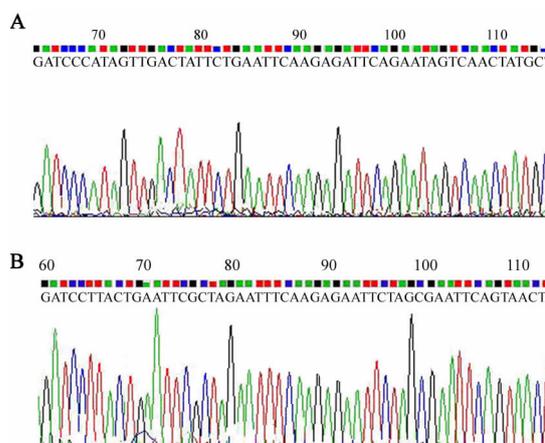


图 3 重组质粒 pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 (A) 和 pSilencer4.1-Ctrl-siRNA (B) 的测序图谱

Fig. 3 Sequencing maps of recombinant plasmids pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 (A) and pSilencer4.1-Ctrl-siRNA (B)

2.3 pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 转染下调 SKOV3 细胞中 CCL18 mRNA 的表达

RT-PCR 结果(图 4)发现, pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 转染后 CCL18-siRNA61-SKOV3 细胞中 CCL18 mRNA 表达量明显降低, 而 pSilencer4.1-Ctrl-siRNA 转染不能沉默 SKOV3 细胞中 CCL18 mRNA 的表达。因此, pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 转染可特异性下调 SKOV3 细胞中 CCL18 mRNA 的表达。

2.4 pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 转染对 SKOV3 细胞增殖的影响

MTT 检测结果(图 5)显示, pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 转染后, CCL18-siRNA61-SKOV3 细胞的生长速度虽有降低趋势, 但与 pSilencer4.1-Ctrl-siRNA 转染组、空质粒转染组和未转染组相比, 差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。因此, pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 转染不影响 SKOV3 细胞的增殖。

2.5 pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 转染对 SKOV3 细胞周期的影响

流式细胞术检测结果(表 3)显示, pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 转染后, CCL18-siRNA61-SKOV3 细胞的(S + G<sub>2</sub> + M)期细胞所占比例明显降低, 与未转染组、pSilencer4.1-Ctrl-siRNA 转染组和空质粒转染组相比, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 而各对照组间(S + G<sub>2</sub> + M)期细胞的比例无明显变化( $P > 0.05$ , 表 3)。结果提示, pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 转染下调 SKOV3 细胞中 CCL18 mRNA 的表达, 可导致(S + G<sub>2</sub> + M)期 SKOV3 细胞的比例下降。

2.6 pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 转染抑制 SKOV3 细胞的侵袭、迁移和黏附能力

结果(表 4)可见, pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 转染组 SKOV3 细胞的侵袭、迁移和黏附能力显著降低, 与未转染组、pSilencer4.1-Ctrl-siRNA 转染组、空质粒转染组 SKOV3 细胞相比, 差异均有统计学意义

( $P < 0.05$ ); 而其他各对照细胞间差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。结果提示, pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 转染下调 CCL18 mRNA 的表达, 可导致 SKOV3 细胞体外侵袭、迁移和黏附能力的降低。

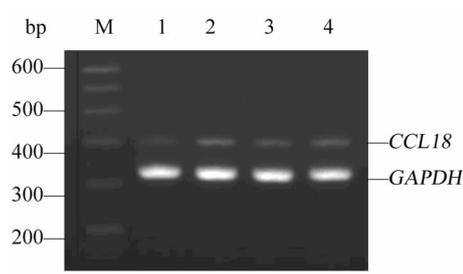


图 4 pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 转染后 SKOV3 细胞中 CCL18 mRNA 的表达

Fig. 4 Expression of CCL18 mRNA in SKOV3 cells after pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 transfection

M: DNA Marker; 1: pSilencer4.1-CCL18-siRNA61; 2: pSilencer4.1; 3: pSilencer4.1-Ctrl-siRNA; 4: Untransfected

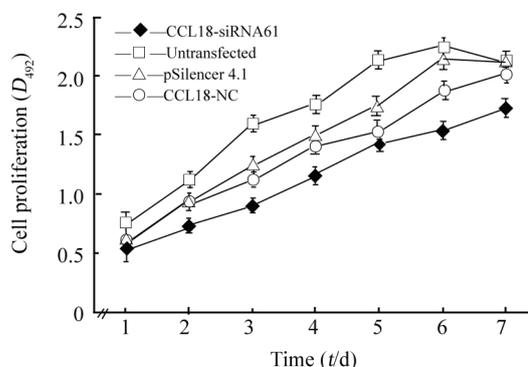


图 5 pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 转染对 SKOV3 细胞增殖的影响

Fig. 5 Effect of pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 transfection on proliferation of SKOV3 cells

表 3 pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 转染对 SKOV3 细胞周期的影响( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Tab. 3 Effect of pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 transfection on cell cycle of SKOV3 cells ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Group	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	S + G <sub>2</sub> + M
Untransfected	72.94 ± 23.3	24.23 ± 3.7	2.83 ± 0.8	27.06 ± 4.8
pSilencer4.1	70.98 ± 20.7	25.08 ± 6.0	3.94 ± 0.7	29.02 ± 6.1
pSilencer4.1-Ctrl-siRNA	73.55 ± 19.4	24.11 ± 6.8	2.34 ± 0.6	26.45 ± 7.9
pSilencer4.1-CCL18-siRNA61	80.29 ± 17.9	18.02 ± 5.9	1.69 ± 0.6	19.71 ± 4.4*

\*  $P < 0.05$  vs other groups

表 4 pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 转染对 SKOV3 细胞侵袭、迁移和黏附的影响(  $\bar{x} \pm s, \%$  )Tab. 4 Effects of pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 transfection on invasion, migration and adhesion of SKOV3 cells (  $\bar{x} \pm s, \%$  )

Group	Invasion	Migration	Adhesion
Untransfected	22.52 ± 3.70	35.66 ± 10.40	15.72 ± 3.31
pSilencer4.1	20.70 ± 4.63	26.54 ± 9.73	11.30 ± 5.20
pSilencer4.1-Ctrl-siRNA	23.75 ± 6.81	31.74 ± 11.23	17.53 ± 6.54
pSilencer4.1-CCL18-siRNA61	9.91 ± 3.41*	16.80 ± 8.71*	6.73 ± 4.33*

\*  $P < 0.05$  vs other groups

### 3 讨论

CCL18 是一种炎性小分子蛋白, CCL18 过表达与肿瘤生长和发展有关, 并有可能成为恶性肿瘤诊断和判断预后的指标<sup>[7-9]</sup>。本课题组前期研究<sup>[6]</sup>已运用质谱技术结合蛋白质芯片分析了卵巢癌患者、卵巢良性病变患者和健康人血清差异蛋白表达谱, 建立了卵巢癌诊断模型, 筛选出 31 个潜在的血清蛋白标志物, 其中的 CCL18 对临床卵巢癌预后判断具有重要意义。肿瘤细胞可分泌 CCL18, CCL18 mRNA 在恶性肿瘤组织中的表达量和阳性表达率明显升高<sup>[7-9]</sup>, 但 CCL18 在卵巢癌发生、发展中的确切作用尚不得而知。

本研究以 siRNA 沉默卵巢上皮癌 SKOV3 细胞中 CCL18 的表达, 探讨其对卵巢上皮癌细胞生长、侵袭和迁移的影响。生长曲线结果提示, pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 转染组 SKOV3 细胞的生长虽出现轻度抑制, 但与未转染组、pSilencer4.1-Ctrl-siRNA 转染组和空质粒转染组的差异没有统计学意义。而细胞周期检测结果显示, pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 转染组 SKOV3 细胞的(S + G<sub>2</sub> + M) 期细胞比例为(19.71 ± 4.4)%, 与未转染组、pSilencer4.1-Ctrl-siRNA 转染组和空质粒转染组细胞相比明显增加( $P < 0.05$ )。恶性肿瘤细胞的一个显著特征是染色体畸形, 包括整倍体和非整倍体。既然 CCL18 对 SKOV3 细胞生长的影响不大, 而对 SKOV3 细胞的细胞周期有明显影响, 因而可以推测 CCL18 基因对 SKOV3 细胞增殖的影响主要可能体现在细胞染色体的改变, 从而出现非整倍体(异倍体)<sup>[10-11]</sup>。当然, 本实验中仅检测了 7 d 的 SKOV3 细胞生长曲线, 不能完全说明 SKOV3 细胞的生长特性, 需要更多的后续实验验证。

CCL18 为一炎性趋化因子, 由于炎性微环境对肿瘤的发生、发展特别是肿瘤细胞的浸润、转移至关

重要<sup>[12-13]</sup>, 因而作为炎性趋化因子的 CCL18 有可能在卵巢癌细胞的浸润、转移中起重要作用。本研究结果显示, pSilencer4.1-CCL18-siRNA61 转染组 SKOV3 细胞的侵袭、迁移和黏附能力均显著降低( $P < 0.05$ ); 而未转染组、转染阴性对照组和转染空质粒组细胞间差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。已有研究<sup>[14-15]</sup>发现, 在肿瘤转移淋巴结中, CCL18 表达阳性率明显高于未转移的淋巴结, 且 CCL18 表达与肿瘤浸润深度呈正相关, 这与本研究的结果一致。还有研究<sup>[16-18]</sup>证实, CCL18 主要由激活的巨噬细胞分泌, 可趋化幼稚 T 细胞和未成熟树突状细胞, 并诱导 CD4<sup>+</sup>T 细胞转化成为调节性 T 细胞, 后者主要分泌 IL-10, 而 IL-10 可负向调控单核-巨噬细胞的产生<sup>[19-21]</sup>。本研究结果提示, 恶性肿瘤细胞可诱导基因突变, 导致 CCL18 异常高表达, 激活上述的免疫连锁反应, 使 MHC II 类分子的表达下降, 抑制了机体对肿瘤细胞的免疫力, 肿瘤细胞得以逃逸而继续生长并转移。当然, 本研究仍仅限于体外研究, CCL18 与卵巢癌关系的研究需要进一步通过动物模型和大量的临床试验进行验证, 以加深对 CCL18 与卵巢癌发生、发展关系的认识。

### [参考文献]

- [1] Shaaban A, Rezvani M. Ovarian cancer: Detection and radiologic staging [J]. Clin Obstet Gynecol, 2009, 52(1): 73-93.
- [2] Chen WQ, Zhang SW, Zou XN, et al. Cancer incidence and mortality in China [J]. Chin J Cancer Res, 2011, 23(1): 3-9.
- [3] Garcia AA, Blessing JA, Lenz HJ, et al. Phase II clinical trial of capecitabine in ovarian carcinoma recurrent 6-12 months after completion of primary chemotherapy with exploratory TS, DPD, and TP correlates: A gynecologic oncology group study [J]. Gynecol Oncol, 2005, 96(3): 810-817.
- [4] Cerado I, SoMa R, Andrea L, et al. Ultrasound physical examination, and CA125 measurement for the detection of recurrence after conservative surgery for early borderline ovarian tumors [J]. Gynecol Oncol, 2001, 81(1): 63-66.

- [ 5 ] Adam BL, Qu Y, Davis JW, et al. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men [ J ]. *Cancer Res*, 2002, 62( 13 ): 3609-3614.
- [ 6 ] 王琪, 李力, 黎丹戎, 等. 应用飞行时间质谱技术结合蛋白芯片筛选卵巢癌患者的血清标志物 [ J ]. *中华妇产科杂志*, 2006, 41( 8 ): 544-549.
- [ 7 ] Wang Q, Li D, Zhang W, et al. Evaluation of proteomics-identified CCL18 and CXCL1 as circulating tumor markers for differential diagnosis between ovarian carcinomas and benign pelvic masses [ J ]. *Int J Biol Markers*, 2011, 26( 4 ): 262-273.
- [ 8 ] Plönes T, Krohn A, Burger M, et al. Serum level of CC-Chemokine ligand 18 is increased in patients with non-small cell lung cancer and correlates with survival time in adenocarcinomas [ J ]. *PLoS One*, 2012, 7( 7 ): e41746-e41752.
- [ 9 ] Goodison S, Chang M, Dai Y, et al. A multi-analyte assay for the non-invasive detection of bladder cancer [ J ]. *PLoS One*, 2012, 7( 10 ): e47469-e47454.
- [ 10 ] Chen J, Yao Y, Gong C, et al. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PITPNM3 [ J ]. *Cancer Cell*, 2011, 19( 4 ): 541-555.
- [ 11 ] Urquidi V, Kim J, Chang M, et al. CCL18 in a multiplex urine-based assay for the detection of bladder cancer [ J ]. *PLoS One*, 2012, 7( 5 ): e37797-e37803.
- [ 12 ] Schoupe E, de Baetselier P, van Ginderachter JA, et al. Instruction of myeloid cells by the tumor microenvironment: Open questions on the dynamics and plasticity of different tumor-associated myeloid cell populations [ J ]. *Oncoimmunology*, 2012, 1( 7 ): 1135-1145.
- [ 13 ] Kipanyula MJ, Seke Etet PF, Vecchio L, et al. Signaling pathways bridging microbial-triggered inflammation and cancer [ J ]. *Cell Signal*, 2012, 25( 2 ): 403-416.
- [ 14 ] 吴江宏, 王亚农, 欧周罗, 等. 胃癌患者术前外周血 CCL18 的检测及其意义 [ J ]. *中国癌症杂志*, 2006, 16( 10 ): 835-837.
- [ 15 ] Nariña D, Seclaman E, Ursioni S, et al. Expression of CCL18 and interleukin-6 in the plasma of breast cancer patients as compared with benign tumor patients and healthy controls [ J ]. *Rom J Morphol Embryol*, 2011, 52( 4 ): 1261-1267.
- [ 16 ] Chenivresse C, Chang Y, Azzaoui I, et al. Pulmonary CCL18 recruits human regulatory T cells [ J ]. *J Immunol*, 2012, 189( 1 ): 128-137.
- [ 17 ] Chang Y, de Nadai P, Azzaoui I, et al. The chemokine CCL18 generates adaptive regulatory T cells from memory CD4<sup>+</sup> T cells of healthy but not allergic subjects [ J ]. *FASEB J*, 2010, 24( 12 ): 5063-5072.
- [ 18 ] Bonecchi R, Locati M, Mantovani A. Chemokines and cancer: A fatal attraction [ J ]. *Cancer Cell*, 2011, 19( 4 ): 434-435.
- [ 19 ] Romero I, Martinez M, Garrido C, et al. The tumour suppressor Fhit positively regulates MHC class I expression on cancer cells [ J ]. *J Pathol*, 2012, 227( 3 ): 367-379.
- [ 20 ] Jin G, Kawsar HI, Hirsch SA, et al. An antimicrobial peptide regulates tumor-associated macrophage trafficking via the chemokine receptor CCR2, a model for tumorigenesis [ J ]. *PLoS One*, 2010, 5( 6 ): e10993-e11006.
- [ 21 ] Harlin H, Kuna TV, Peterson AC, et al. Tumor progression despite massive influx of activated CD8<sup>+</sup> T cells in a patient with malignant melanoma ascites [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2006, 55( 10 ): 1185-1197.
- [ 收稿日期 ] 2012-09-27 [ 修回日期 ] 2012-11-24  
[ 本文编辑 ] 周玲琳

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 《中国肿瘤生物治疗杂志》关于抵制学术不端行为的声明

中国广大科技工作者坚持严谨求实、刻苦钻研、勇于创新的科学精神,取得了举世瞩目的科技成果,代表了中国科技工作者的主流。然而,近年来少数科技人员出现了抄袭剽窃、伪造数据、篡改数据、虚假署名、一稿多投等学术不端行为,影响了科技期刊的正常出版工作,给作者及其所在单位甚至我们国家带来非常负面的影响。《中国肿瘤生物治疗杂志》是中国肿瘤生物治疗领域惟一的高级学术刊物,一贯坚持“学术至上,质量第一”的原则,坚决抵制学术不端行为,努力维护学术纯洁性。为维护学术道德、保证期刊质量和学术声誉,本刊特作以下声明:

1. 作者投稿时须作出稿件无学术不端行为的声明。

2. 稿件审查过程中,本刊编辑部将采用“学术不端文献检测系统”,通过大量国内外学术文献的全文比对,对稿件进行学术不端行为的检查。

3. 本刊已加入“《中国学术文献网络出版总库》删除学术不端文献系统”,该系统协助本刊对已发表论文的学术不端行为进行全面复核。

4. 已发表的论文一经查实有学术不端行为,本刊将立即删除,第一时间刊登撤销声明,终止该论文在各相关数据库、文摘库中的传播,尽快消除不良影响。同时,视情节轻重给该文作者以下处理:书面警告,通知作者所在单位,在本领域相关期刊间通报,2年内本刊不刊登有其署名的稿件,相关学术责任人(通讯作者)署名的其他稿件延缓审稿和刊登等。

(本刊编辑部)