

网络出版时间: 2021-2-5 14:30 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210205.1050.020.html>

ASH2L 在上皮性卵巢癌中的表达及其对 SKOV-3 细胞系增殖的影响

孙超, 孙士莹, 詹磊, 卫兵, 王文艳

摘要 目的 探讨混合谱系白血病(MLL)甲基转移酶的核心亚单位 ASH2L 对人上皮性卵巢癌细胞系 SKOV-3 增殖的影响。方法 免疫组化方法检测上皮性卵巢癌组织标本中 ASH2L 蛋白表达的定位。Western blot 法检测卵巢癌组织标本和正常卵巢组织标本中 ASH2L 的表达水平,以及卵巢癌细胞系 SKOV-3 中 ASH2L 的表达水平。采用 ployplus 试剂介导 ASH2L 质粒转染,通过 Western blot 法验证 ASH2L 的转染效率,并利用 CCK-8 法检测转染后 SKOV-3 细胞的增殖情况。结果 ASH2L 蛋白表达定位于卵巢癌组织细胞核内。与正常人的卵巢组织相比,上皮性卵巢癌组织中 ASH2L 蛋白表达水平上调($P < 0.01$),与 293T 细胞系相比,SKOV-3 细胞系中 ASH2L 蛋白表达水平上调($P < 0.05$)。SKOV-3 细胞系在转染 ASH2L 质粒后,细胞中 ASH2L 蛋白的表达升高,与空载质粒转染的 SKOV-3 细胞相比,ASH2L 质粒转染的 SKOV-3 细胞增殖增加($P < 0.01$)。结论 ASH2L 在上皮性卵巢癌中表达升高。高表达的 ASH2L 可促进卵巢上皮性肿瘤细胞 SKOV-3 的增殖。

关键词 ASH2L; 表观遗传学; 上皮性卵巢癌; 细胞增殖

中图分类号 R 711.75

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)03-0445-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.03.021

卵巢癌是妇科常见恶性肿瘤,死亡率位于妇科恶性肿瘤首位。表观遗传学的研究对恶性肿瘤的预防和治疗有着重要的意义。有研究^[1-4]表明:组蛋白 H3K4 甲基化修饰可影响肾癌、肺癌、胰腺癌、乳腺癌及胃癌等多种恶性肿瘤的预后。在哺乳动物体内,混合谱系白血病(mixed lineage leukemia, MLL)甲基转移酶能够参与家族蛋白调节 H3K4 的组蛋白修饰,而 ASH2L 是 MLL 甲基转移酶的核心亚单位之一^[5]。ASH2L 的表达缺失,会使 MLL 复合体进行 H3K4 三甲基化修饰的水平降低^[6]。因此,

ASH2L 的表达会通过甲基化修饰的途径影响细胞的发生发展及癌变。目前尚无关于 ASH2L 在卵巢癌中的相关性研究,该研究旨在观察 ASH2L 在上皮性卵巢癌中的表达及其对卵巢上皮性恶性肿瘤 SKOV-3 增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 人卵巢癌细胞系 SKOV-3 及人肾上皮细胞系 293T(中国科学院上海细胞库),保存于安徽医科大学第二附属医院中心实验室。细胞系用含有 10% 的胎牛血清、1% 链霉素及青霉素的 DMEM 培养基培养,置于 37 °C、5% CO₂ 和饱和湿度的恒温培养箱中。

1.1.2 标本收集 选取 2018 年 3 月—2019 年 7 月因卵巢癌和同期因绝经后子宫良性疾病在安徽医科大学第二附属医院妇科行手术治疗的 20 例患者为研究对象。卵巢癌患者 10 例,因子宫良性疾病行子宫双附件切除的患者 10 例(子宫肌瘤患者 6 例,子宫腺肌症患者 3 例,子宫内膜息肉 1 例)。卵巢癌组患者手术前均未接受辅助化疗;绝经后子宫良性疾病组患者术前未接受性激素治疗。卵巢癌组患者年龄为 42~65(52 ± 6.62)岁;子宫良性疾病组患者年龄为 50~58(53 ± 2.63)岁。卵巢癌组术后卵巢组织病理均为卵巢浆液性乳头状腺癌。子宫良性疾病组患者术后卵巢病理结果均提示卵巢正常。本研究经安徽医科大学第二附属医院伦理委员会同意。

1.1.3 感受态细胞 DH5α(上海生工生物工程股份有限公司)保存于安徽医科大学第二附属医院中心实验室,置于 -80 °C 冰箱中。

1.1.4 主要试剂 ASH2L 抗体(美国 BETHYL 公司);β-actin 多克隆抗体、山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗、ECL 发光试剂盒(美国 affinity 公司);PVDF 膜(上海 Biosharp 公司);胎牛血清、高糖 DMEM 液体培养基(美国 Gibco 公司);免疫组化试剂盒(武汉赛维生物技术有限公司);ASH2L 质粒及空载质粒(美国 Addgene 公司);质粒提取试剂盒(广州

2020-10-28 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81801511);中国博士后科学基金(编号:2016M592038)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院妇产科,合肥 230601

作者简介: 孙超,男,硕士研究生;

王文艳,女,主任医师,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: wenyana@autumn.sina.com

美基生物科技有限公司); jetPRIME[®] 试剂(法国 polyplus-transfection 公司); CCK-8 试剂盒(上海七海复泰生物科技有限公司)。

1.1.5 主要仪器 Heraeus CO₂ 恒温培养箱(德国 Heraeus 公司); 酶标仪(上海科华实验系统有限公司); 高速低温离心机(美国 Eppendorf 公司); CU420 型电热恒温水箱(上海恒科仪器有限公司); 电泳仪、显影仪(上海天能科技有限公司); IMPLN 超微量分光光度计(江苏万科科教仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化 收集上皮性卵巢癌组织,制成石蜡切片并脱蜡,放入修复盒中浸润于柠檬酸抗原修复缓冲液,在微波炉内加温抗原修复,使用 3% 过氧化氢阻断内源性的过氧化物酶,血清封闭后加入一抗,复温后加入对应的二抗,室温下孵育 50 min,滴加链亲和素-过氧化物酶溶液,室温孵育 10 min,加入现配的 DAB 染液,避光约 10 min 后显微镜观察染色情况。

1.2.2 Western blot 实验 提取组织或细胞系的总蛋白,利用 BCA 法进行蛋白定量,在制好的凝胶板孔中加入样品和 Marker,而后依次进行电泳、切胶、转膜。转膜过后,对带有蛋白的 PVDF 条带依次进行室温下 5% 脱脂牛奶封闭、洗膜,4 ℃ 下一抗过夜孵育、洗膜,室温下二抗封闭 1 h、洗膜,最后利用显影仪进行 ECL 显色,并对图像进行处理与分析。

1.2.3 转化及质粒扩增 将质粒样本加入到感受态细胞 DH5 α 中进行转化,接种于 LB 培养基中并于 37 ℃ 过夜培养,在培养基中挑取单克隆菌落放入含抗生素的 LB 培养液中 37 ℃、200 ~ 250 r/min 条件下过夜摇菌培养,最后利用质粒提取试剂盒对菌液中的质粒进行提取,并测量浓度。

1.2.4 质粒转染 当 6 孔板中培养细胞覆盖率满意时,以质粒悬液:缓冲液:jetPRIME[®] 试剂 = 1 : 100 : 2 的比例配制转染混合物,并孵育 10 ~ 15 min,将 6 孔板中的培养基清洗并更新,孵育结束后将转染混合物加入其中,置于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中,24 h 后更换培养基,并继续放入培养箱中培养,留用于后续实验。

1.2.5 CCK-8 实验 在细胞系转染后的 24、48、72 h 分别对 6 孔板中的各组细胞进行消化,并计数。将适当浓度的细胞悬液接种于 96 孔板中(100 μ l/孔),另有孔加入相应量不含细胞的培养基作为空白对照。待细胞贴壁后,将 10 μ l 的 CCK-8 溶液加入到孔中,在培养箱内孵育 4 h,经过酶标仪 450 nm

处测量吸光度的值,反复测量 3 次,取实验结果的平均值作为最终结果。

1.3 统计学处理 通过 Graphpad Prime 7.0 软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。相关试验研究数据均独立重复 3 次后取平均值。独立两组均数比较采用 t 检验分析或单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化实验检测 ASH2L 在细胞中的表达定位 在上皮性卵巢癌组织中,ASH2L 的表达定位于细胞核中(图 1)。

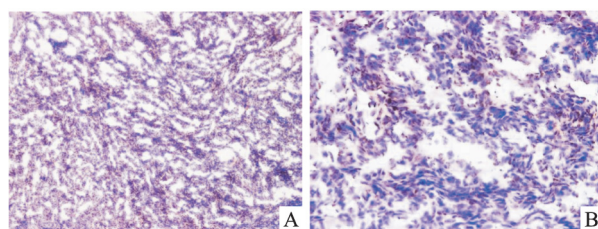


图 1 卵巢组织免疫组化染色

A: $\times 100$; B: $\times 400$

2.2 Western blot 实验检测组织中 ASH2L 蛋白的表达 提取组织的总蛋白,Western blot 方法检测上皮性卵巢癌组织和正常卵巢组织中 ASH2L 蛋白的表达量,结果显示:上皮性卵巢癌组织的 ASH2L 蛋白表达水平高于正常卵巢组织(图 2),两组间比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。

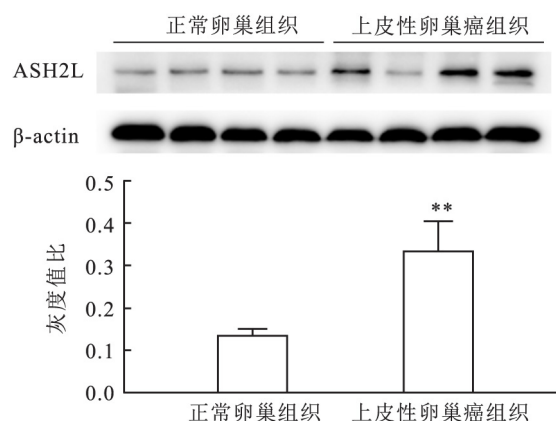


图 2 Western blot 法检测各组组织中蛋白表达情况

与正常卵巢组织比较: ** $P < 0.01$

2.3 Western blot 实验检测细胞系中 ASH2L 蛋白的表达 分别培养人卵巢癌细胞系 SKOV-3 及人肾上皮细胞系 293T,提取两种细胞系的总蛋白,Western blot 方法检测 SKOV-3 和 293T 细胞系中 ASH2L 蛋白的表达量,结果显示:SKOV-3 细胞系中 ASH2L

蛋白的表达水平高于 293T 细胞(图 3), 两组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

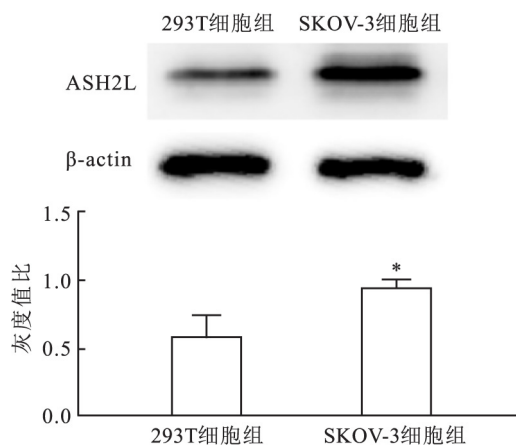


图3 Western blot 法检测细胞系中蛋白表达情况
与 293T 细胞组比较: * $P < 0.05$

2.4 CCK-8 实验检测转染质粒后细胞系的增殖情况 对 SKOV-3 细胞分别进行 ASH2L 质粒转染和空载质粒转染, 采用 Western blot 方法检测转染后 ASH2L 蛋白的表达量, 验证 SKOV-3 细胞中的转染效率。结果显示, 与转染空载质粒的 SKOV-3 细胞相比, 转染 ASH2L 质粒的 SKOV-3 细胞中 ASH2L 蛋白明显高表达, 差异有统计学意义($P < 0.01$, 图 4)。在 SKOV-3 成功转染后的 24、48、72 h, 转染空载质粒和转染 ASH2L 质粒的 SKOV-3 细胞对比研究, 采用 CCK-8 实验验证, 结果显示转染后 24、48 和 72 h, ASH2L 转染组较空载转染组的细胞增殖能力均有所增加, 且两组间的细胞增殖差异随着时间的延长逐渐增加(图 5), 组间差异有统计学意义($P < 0.01$)。

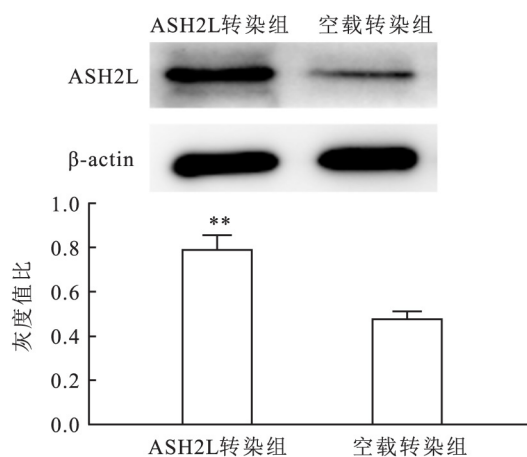


图4 Western blot 实验检测转染后细胞蛋白表达情况
与空载转染组比较: ** $P < 0.01$

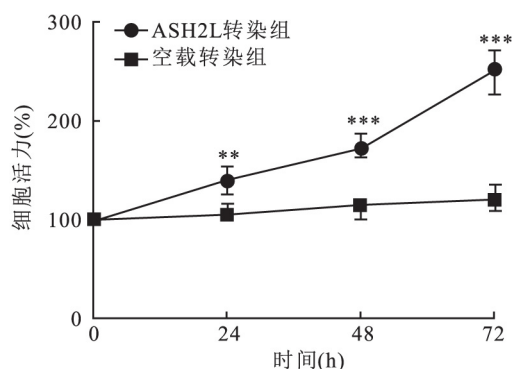


图5 CCK-8 检测细胞系增殖情况
与空载转染组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3 讨论

研究^[9]指出: 血清中游离甲基化 DNA 的表达水平可以反映肿瘤组织的增生状态, 可作为肿瘤早期诊断的标志物之一, 而多重巢式特异性甲基化 PCR 检测可作为潜在的上皮性卵巢癌早期诊断的方法之一。

DNA 的不同修饰可以使染色体的结构和功能发生改变, 进而导致基因表达以及细胞行为的改变。在人类肿瘤基因图谱的研究^[10]中: 哺乳动物蛋白 H3K4 甲基转移酶即 MLL 复合物的家族特异性基因异常与多种恶性肿瘤的发生发展、转移相关。MLL 酶以腺苷甲硫氨酸为甲基供体, 将甲基转移至组蛋白 H3K4e-氨基上, 完成 H3K4 的甲基化修饰, 可分为 MLL 和 SET1 A/B 两类甲基化酶。MLL 复合物的核心蛋白包括 WDR5、RbBP5、ASH2L 及 DPY30。相关研究发现: 敲除 MLL 复合物中的 ASH2L 核心蛋白, 可导致 MLL 复合物酶活性的降低。

有文献^[11]表明, 肿瘤细胞增殖过程中有 ASH2L 的参与: 癌蛋白 MYC 可与 ASH2L 发生相互作用^[11]; 乳腺癌、胰腺癌、喉癌肝癌、宫颈癌、结肠癌及皮肤黑色素瘤等肿瘤中均存在 ASH2L 的高表达^[10-11]; Qi et al^[12]的研究表明, 乳腺癌标本及相关癌细胞系内, 存在 ASH2L 的高表达, 且 ASH2L 的表达水平与 ERα 相关; Cheng et al^[13]研究显示, 肺癌的恶性程度受 MMP9 和 ASH2L 的表达水平调控, 抑制 ASH2L 的表达可以有效促进 MMP9 介导的肿瘤细胞的浸润和迁移。ASH2L 蛋白表达通过表观遗传学机制间接地影响着恶性肿瘤的发生发展, 该研究表明 ASH2L 在上皮性卵巢癌中表达升高, 高表达的 ASH2L 可促进卵巢上皮性肿瘤细胞 SKOV-3 的增殖, 这表明 ASH2L 与卵巢癌同样有着密切的联系, 参与它的发生发展, 而其中的具体机制还需要将

来更多的思考和实验来探索。

参考文献

- [1] Elsheikh S E, Green A R, Rakha E A, et al. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(9): 3802–9.
- [2] Seligson D B, Horvath S, McBrien M A, et al. Global levels of histone modifications predict prognosis in different cancers [J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(5): 1619–28.
- [3] Ellinger J, Kahl P, Mertens C, et al. Prognostic relevance of global histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in renal cell carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(10): 2360–6.
- [4] Zhen L, Gui-lan L, Ping Y, et al. The expression of H3K9Ac, H3K14Ac, and H4K20TriMe in epithelial ovarian tumors and the clinical significance [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2010, 20(1): 82–6.
- [5] Malik S, Bhaumik S R. Mixed lineage leukemia: histone H3 lysine 4 methyltransferases from yeast to human [J]. *FEBS J*, 2010, 277(8): 1805–21.
- [6] Wan M, Liang J, Xiong Y, et al. The trithorax group protein Ash2l is essential for pluripotency and maintaining open chromatin in embryonic stem cells [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(7): 5039–48.
- [7] 张青, 魏建军, 孔北华. 表观遗传学修饰在妇科肿瘤诊断中的应用价值研究 [J]. *中国医师协会妇产科医师大会*, 2015: 485–9.
- [8] Kandath C, McLellan M D, Vandin F, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types [J]. *Nature*, 2013, 502(7471): 333–9.
- [9] Ullius A, Luscher-Firzlaff J, Costa I G, et al. The interaction of MYC with the trithorax protein ASH2L promotes gene transcription by regulating H3K27 modification [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(11): 6901–20.
- [10] Magerl C, Ellinger J, Braunschweig T, et al. H3K4 dimethylation in hepatocellular carcinoma is rare compared with other hepatobiliary and gastrointestinal carcinomas and correlates with expression of the methylase Ash2 and the demethylase LSD1 [J]. *Hum Pathol*, 2010, 41(2): 181–9.
- [11] Luscher-Firzlaff J, Gawlista I, Vervoorts J, et al. The human trithorax protein hASH2 functions as an oncoprotein [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(3): 749–58.
- [12] Qi J, Huo L, Zhu Y T, et al. Absent, small or homeotic 2-like protein (ASH2L) enhances the transcription of the estrogen receptor alpha gene through GATA-binding protein 3 (GATA3) [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(45): 31373–81.
- [13] Cheng X, Yang Y, Fan Z, et al. MKL1 potentiates lung cancer cell migration and invasion by epigenetically activating MMP9 transcription [J]. *Oncogene*, 2015, 34(44): 5570–81.

Expression of ASH2L in epithelial ovarian cancer and effect of ASH2L on the proliferation of SKOV-3 cell line

Sun Chao, Sun Shiyang, Zhan Lei, et al

(Dept of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To explore the effect of ASH2L, an important component of the core subunit of the mixed lineage leukemia (MLL) methyl transferase complex, on the proliferation of ovarian epithelial carcinoma cell line SKOV-3. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the localization of ASH2L protein expression in epithelial cancer tissue specimens. Western blot was used to detect the expression level of ASH2L in ovarian cancer tissue samples and normal ovarian tissue samples, and the expression level of ASH2L in ovarian malignant tumor cell lines. Polyplus reagent was used to mediate ASH2L plasmid transfection, the transfection efficiency of ASH2L was verified by Western blot, and the proliferation of SKOV-3 cells after transfection was detected by CCK-8 method. **Results** The expression of ASH2L was located in the nucleus of ovarian cancer tissues. Compared with normal ovarian tissues, the expression level of ASH2L protein in ovarian epithelial cancer tissues was up-regulated ($P < 0.01$). Compared with 293T cell line, the expression level of ASH2L protein in SKOV-3 cell line was up-regulated ($P < 0.05$). After SKOV-3 cell line was transfected with ASH2L plasmid, the expression of ASH2L protein in the cells increased. Compared with SKOV-3 cells transfected with empty plasmid, the proliferation of SKOV-3 cells transfected with ASH2L plasmid increased ($P < 0.01$). **Conclusion** ASH2L is highly expressed in epithelial ovarian cancer. Increased expression of ASH2L can promote the proliferation of ovarian epithelial tumor cells SKOV-3.

Key words ASH2L; epigenetics; epithelial ovarian cancer; cell proliferation