

# ARL2 在宫颈癌组织中的表达及对宫颈癌细胞表型的影响

彭瑞清, 王 杨, 孙 颖, 王 清, 胡志东

**摘要** 目的 探究 ADP-核糖基化样因子 2 (ARL2) 在宫颈癌组织中的表达及对宫颈癌细胞生长、侵袭和迁移能力的影响。方法 分别采用 qRT-PCR 和免疫组化法检测 ARL2 基因和蛋白在宫颈癌组织中的表达情况。利用 RNA 干扰技术沉默 ARL2 (siR-ARL2), 以非特异性序列 (pSilencer 2.1) 转染细胞作为阴性对照。转染宫颈癌细胞 HeLa 和 C33A 细胞, 采用 MTT 实验、集落形成实验、Transwell 侵袭实验以及细胞划痕实验来检测干扰 ARL2 后宫颈癌细胞生长、侵袭以及转移能力的变化。结果 qRT-PCR 和免疫组化分别检测到 ARL2 基因和蛋白在宫颈癌组织中高表达, Western blot 显示转染 siR-ARL2 的实验组中 ARL2 的蛋白表达水平明显降低。在 HeLa 细胞中下降了约 59% ( $t = 5.6, P < 0.05$ ), 在 C33A 细胞中下降了 60% ( $t = 5.3, P < 0.05$ ); siR-ARL2 使 HeLa 和 C33A 细胞生长活性分别下降了 28% 和 22% ( $t = 2.6, 2.3, P < 0.05$ ); siR-ARL2 使 HeLa 和 C33A 细胞的集落形成能力分别下降了 36% 和 60% ( $t = 4.7, 6.2, P < 0.05$ ); siR-ARL2 使 HeLa 和 C33A 细胞侵袭能力分别下降了 49% 和 54% ( $t = 5.2, 5.7, P < 0.05$ ) 并使 HeLa 细胞迁移能力明显下降。结论 ARL2 在宫颈癌组织中高表达, siR-ARL2 抑制了宫颈癌细胞的生长、侵袭和迁移, 可能与子宫颈癌的发生、发展有关。

**关键词** 宫颈癌; ARL2; RNA 干扰; 侵袭; 差异表达

**中图分类号** R 737.33

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2019)11-1712-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.11.010

宫颈癌是妇科常见的肿瘤之一, 是严重威胁女性健康的常见恶性肿瘤。据国际癌症中心统计, 全球每年新发宫颈癌人数约 49.3 万, 死亡 27.4 万, 其中 85% 以上发生在低收入和中等收入国家<sup>[1]</sup>。2015 年中国子宫颈癌新发病例约 9.89 万例, 死亡病例约 3.05 万例<sup>[2]</sup>。目前对于宫颈癌的治疗多采用手术、放疗及辅助化疗等方法, 5 年生存率始终在 50% 左右。因此, 进一步寻找宫颈癌早期的分子标志物及

潜在的治疗分子靶点成为临床的热点。

本实验前期发现 ADP-核糖基化样因子 2 (ADP-ribosylation factor like protein 2, ARL2) 在宫颈癌组织中表达水平明显升高。ARL2 是一种单体的 GTP 结合蛋白, 为 ADP-核糖基化因子 (ADP-ribosylation factor, ARF) 亚家族成员之一<sup>[3]</sup>。ARL 家族广泛的存在于各种真核生物中, 但其结构和功能高度保守, 在生物体中有着重要的病理生理功能<sup>[4]</sup>。在肿瘤领域, ARL2 扮演着癌基因或抑癌基因的角色, 成为治疗的靶点。做为 ARL 家族中比较有代表性的成员, ARL2 的研究虽然有了一些成果, 但 ARL2 在宫颈癌中的研究却少见报道。现采用 RNA 干扰 ARL2 的表达, 探讨其对宫颈癌细胞的生长、侵袭以及迁移能力的调节作用, 以期阐明宫颈癌发生和转移的机制提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

**1.1.1 细胞和组织** HeLa 细胞和 C33A 细胞购自天津赛尔生物技术有限公司; 含 10% 胎牛血清、100 IU/ml 青霉素、100  $\mu$ g/ml 链霉素的 RPMI 1640, 置于细胞培养箱中培养 (培养条件: 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)。15 对经病理学检查确诊的人宫颈癌组织及其对应正常宫颈组织标本为天津医科大学总医院中心实验室保存。

**1.1.2 试剂** RPMI 1640 细胞培养液、胰蛋白酶和胎牛血清 (美国 GIBCO 公司)、脂质体 lipofectamine 2000、兔源抗-GAPDH 抗体、无血清培养基 Opti-MEM (德国 SIGMA-ALDRICH 公司)、兔源抗-ARL2 抗体、HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体 (北京 OFT 公司)、SuperRX 感光胶片 (FUMINGWEI 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 质粒转染** 采用 Lipofectamine 2000 脂质体转染法, 分成两组进行实验: 对照质粒 siR-Ctrl (pSilencer 2.1) 转染、干扰质粒 siR-ARL2 (pSilencer/ARL2-shRNA) 转染。转染前 1 d 1  $\times 10^6$ /ml 传代 HeLa 细胞、2  $\times 10^6$ /ml 传代 C33A 细胞, 待细胞生长至 60% ~ 80% 时, 以转染细胞。

2019-05-23 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81600181); 天津市卫生局科技基金 (编号: 2015KZ115)

作者单位: 天津医科大学总医院检验中心, 天津 300052

作者简介: 彭瑞清, 女, 主管技师;

胡志东, 男, 主任技师, 责任作者, E-mail: hujianchun1217@126.com

**1.2.2 实时荧光定量 PCR 技术检测 ARL2 mRNA 的表达** 采用 TRIzol 试剂(日本 TaKaRa 公司产品)从 15 对宫颈癌组织和正常组织标本中提取总 RNA,所有操作按说明书在去 RNA 酶的条件下进行,分光光度法测定 RNA 浓度;采用 M-MLV 逆转录酶(Promega, Madison, WI)逆转录合成 cDNA。以  $\beta$ -actin 基因作为内参照,按照说明书于 Bio-Rad Real-time PCR 仪上检测 ARL2 mRNA 的表达水平;分别用不同引物进行实时定量 PCR 反应,所用引物全由北京赛维生物技术有限公司化学合成。实时荧光 PCR 反应的循环参数为:① 预变性  $94^{\circ}\text{C}$ 、3 min,② 变性  $94^{\circ}\text{C}$ 、30 s,③ 退火  $56^{\circ}\text{C}$ 、30 s,④ 延伸  $72^{\circ}\text{C}$ 、30 s,②~④步共 40 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算 ARL2 与内参基因  $\beta$ -actin 的表达水平。

**1.2.3 Western blot 法检测 ARL2、GAPDH 蛋白表达** 转染培养 48 h 后,裂解细胞,制备蛋白样品。总蛋白经过电泳分离,半湿电转移形成印迹后,先后将膜置于含对应一抗和二抗的 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h 和避光缓速摇动作用 1.5 h。漂洗 3 次, ECL 显色, ARL2 蛋白的相对含量采用 ARL2 目的蛋白与 GAPDH 内参蛋白积分光密度的比值进行表示。

**1.2.4 免疫组化方法检测 ARL2 蛋白的表达** 5 组宫颈癌组织和癌旁正常组织标本经甲醛固定、石蜡包埋处理后制成厚度为  $4\ \mu\text{m}$  的切片;脱蜡,梯度乙醇水化并用 PBS 冲洗,抗原修复后再次采用 PBS 冲洗切片, DAB 显色,苏木精复染后梯度乙醇脱水,透明后用中性树胶封片。结果判定:切片随机编号,双盲阅片。光学显微镜观察,阳性着色呈棕黄色,根据不同抗原的细胞定位,其棕黄色位于细胞不同的位置。

**1.2.5 MTT 检测细胞生长活性** 以每孔 6 000 个(C33A 细胞每孔 11 000 个)将转染 36 h 的 HeLa 细胞接种至 96 孔板,每组 5 孔,共 3 个孔板。每 24 h 随机选择一组,利用 MTT 法,在 570 nm 波长处测各接种孔的吸光度值( $A_{570}$ )。

**1.2.6 集落形成能力检测** 转染后 48 h,将 HeLa 细胞以每孔 150 个(C33A 以每孔 300 个)接种在 12 孔板上,每组接种 3 个复孔。孵箱中培养 10~12 d,集落形成标准:细胞数  $\geq 50$  个,培养结束条件:集落之间发生互相融合,甲醇固定细胞,室温染色,冲洗后观察。

**1.2.7 体外侵袭检测** 选用孔径为  $8\ \mu\text{m}$  的 24 孔 Transwell 小室, Matrigel 凝胶用无血清 RPMI 1640 稀释成为 2 mg/ml, 包被 Transwell 小室的上室部,在滤

膜上表面加入  $40\ \mu\text{l}$ , 培养形成胶状。取  $5 \times 10^4$  个转染后的 HeLa 细胞( $1.5 \times 10^5$  个转染后的 C33A 细胞)置于 1.5 ml EP 管中,  $2\ 000\ \text{r}/\text{min}$  离心 5 min, 并以  $200\ \mu\text{l}$  RPMI 1640 培养液重悬细胞后加入 Transwell 小室中的上室, 并将  $600\ \mu\text{l}$  的胎牛血清培养液加入到下室。 $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 24 h, 将未穿过滤膜的肿瘤细胞去除, 甲醇中固定 1 min, 染色后揭下滤膜, 采用封片剂将其封于载玻片上, 使用显微镜统计穿过小室底膜的细胞数量, 方法如下: 每室随机选取 5 个视野并拍照计数穿过小室底膜的细胞, 计算得出平均值。重复实验 3 次。

**1.2.8 划痕实验** 选取 24 孔板, 每个孔内接种 HeLa 细胞数约为  $6 \times 10^4$  个, 转染后培养 24 h, 用移液枪头贴着直尺, 垂直于板底呈一字型划痕, 分别在划痕后的 0、24、48 h 显微镜下测量划痕的宽度。重复实验 3 次。

**1.3 统计学处理** 采用统计软件 SPSS 12.0 进行统计分析, 计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 划痕实验数据组间比较采用方差分析, 并给出  $F$  值, 其余采用  $t$  检验, 并给出  $t$  值。  $P < 0.05$  时为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 ARL2 在人体宫颈癌组织和癌旁组织中的差异性表达** 实时定量 PCR 结果显示, 在 15 对宫颈癌组织中, ARL2 表达水平与癌旁正常组织比较升高了 3.2 倍( $P < 0.05$ ), 见图 1。

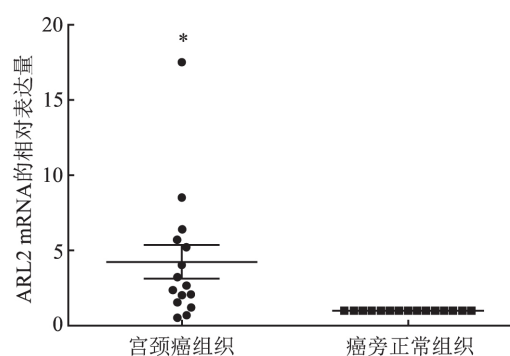


图 1 ARL2 mRNA 在 15 对宫颈癌和癌旁组织中的差异性表达  
与癌旁正常组织比较: \*  $P < 0.05$

**2.2 免疫组化方法检测结果** ARL2 在 5 组宫颈癌组织中表达阳性(阳性率为 83.3%), 癌旁正常组织中均为阴性, 表明 ARL2 在宫颈癌组织中的表达水平明显高于癌旁正常组织, 见图 2。

**2.3 Western blot 法检测 ARL2 蛋白的表达** 由图 3 可以看出, 与转染 siR-Ctrl 组比较, RNA 干扰 48

h 后 siR-ARL2 组有较明显的降低, siR-ARL2 组中蛋白表达水平在 HeLa 细胞中下降了约 59% [(1.00 ± 0.07) vs (0.41 ± 0.06)], 在 C33A 细胞中下降了 60% [(1.00 ± 0.11) vs (0.40 ± 0.05)], 差异有统计学意义 ( $t = 5.6, 5.3, P < 0.05$ )。提示 RNA 干扰 ARL2 后, 其在宫颈癌细胞中表达明显下降, 证明干扰质粒是能有效抑制宫颈癌细胞中 ARL2 基因的表达的。

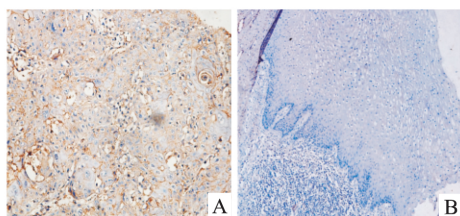


图2 ARL2 在宫颈癌组织和癌旁组织中的表达差异 DAB 染色 ×100  
A: 宫颈癌组织; B: 癌旁组织

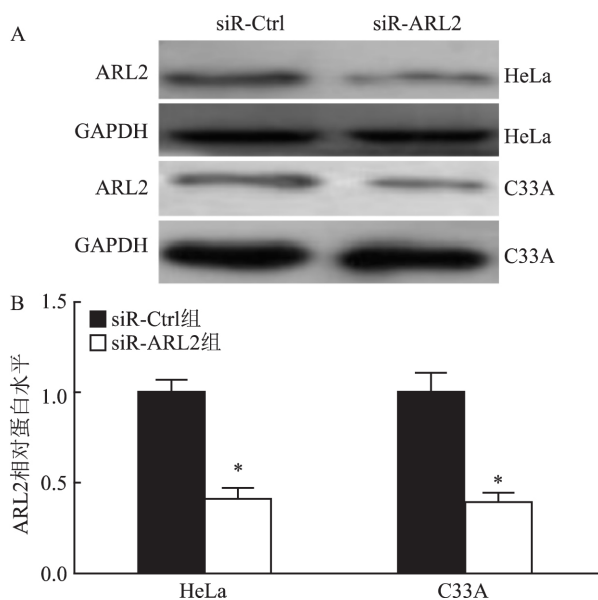


图3 Western blot 法检测 siR-ARL2 质粒的有效性

A: 瞬转 siR-ARL2 质粒及其对照后 ARL2 蛋白表达水平代表图;  
B: 定量分析图; 与 siR-Ctrl 组比较: \*  $P < 0.05$

**2.4 RNA 干扰后细胞生长活性的变化** 从 MTT 实验结果可以看出, 与对照组比较, 转入 siR-ARL2 及其对照后, 细胞的生长活性有明显的减弱, 如图 4 所示, HeLa 细胞下降了约 28% [(1.00 ± 0.05) vs (0.72 ± 0.04)], C33A 细胞中下降了约 22% [(1.00 ± 0.06) vs (0.78 ± 0.04)], 差异有统计学意义 ( $t = 2.6, 2.3, P < 0.05$ )。提示 RNA 干扰 ARL2 基因后减弱了宫颈癌细胞的生长活性。

**2.5 RNA 干扰后宫颈癌细胞集落形成能力的变化**

在 HeLa 细胞和 C33A 细胞中转染 siR-ARL2 及 siR-Ctrl 后分别进行集落形成实验, 如图 5 所示, 与转染 siR-Ctrl 的对照组比较, 转染 siR-ARL2 组的细胞集落形成率明显下降, HeLa 细胞下降了约 36% [(66.00 ± 0.73) vs (42.33 ± 0.21)],  $t = 4.7, P < 0.05$ , C33A 细胞中下降了约 60% [(35.60 ± 0.39) vs (14.30 ± 0.31)],  $t = 6.2, P < 0.05$ , 说明 siR-ARL2 抑制宫颈癌细胞的集落形成能力。

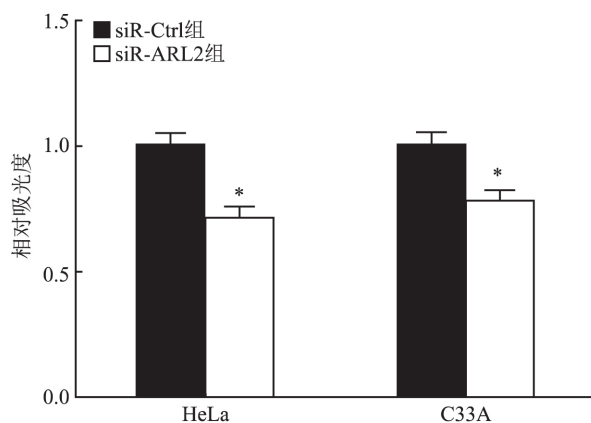


图4 MTT 实验分析 siR-ARL2 对宫颈癌生长活性的影响  
与 siR-Ctrl 组比较: \*  $P < 0.05$

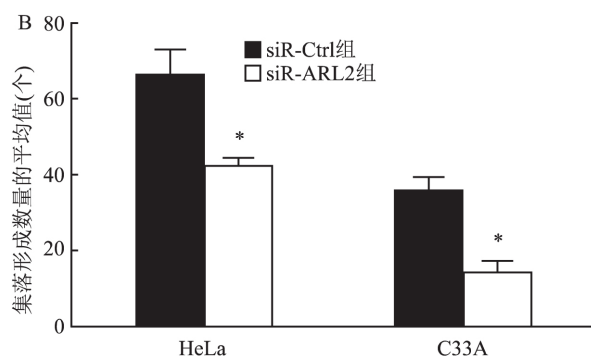
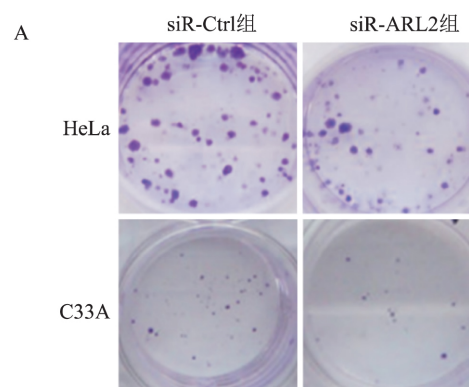


图5 集落形成实验分析 siR-ARL2 对宫颈癌集落形成的影响  
A: 各组细胞集落形成结晶紫染色代表图; B: 结晶紫染色后集落计数的定量分析; 与 siR-Ctrl 组比较: \*  $P < 0.05$

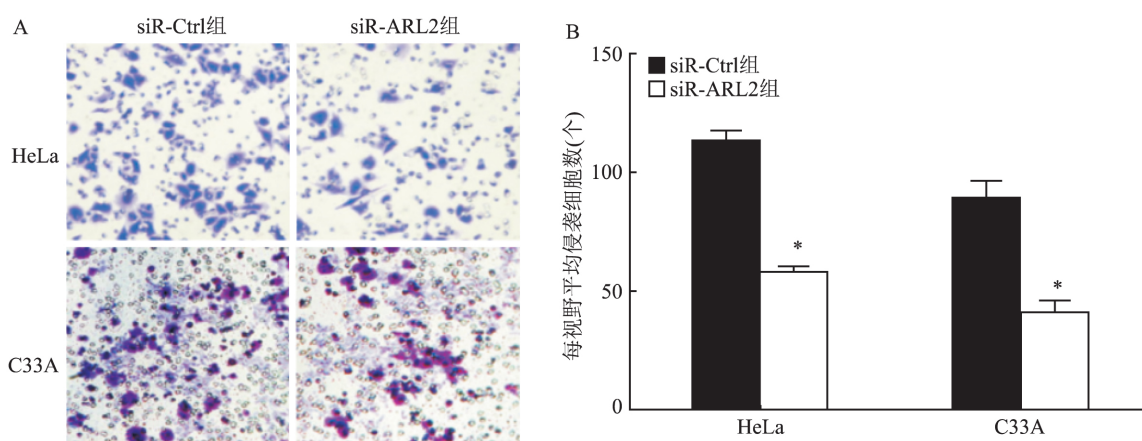


图6 Transwell 侵袭实验检测 siR-ARL2 对宫颈癌细胞侵袭能力的影响

A: 显微镜下侵袭实验每组的代表图  $\times 400$ ; B: 显微镜下每个视野平均侵袭细胞数的定量分析; 与 siR-Ctrl 组比较: \*  $P < 0.05$

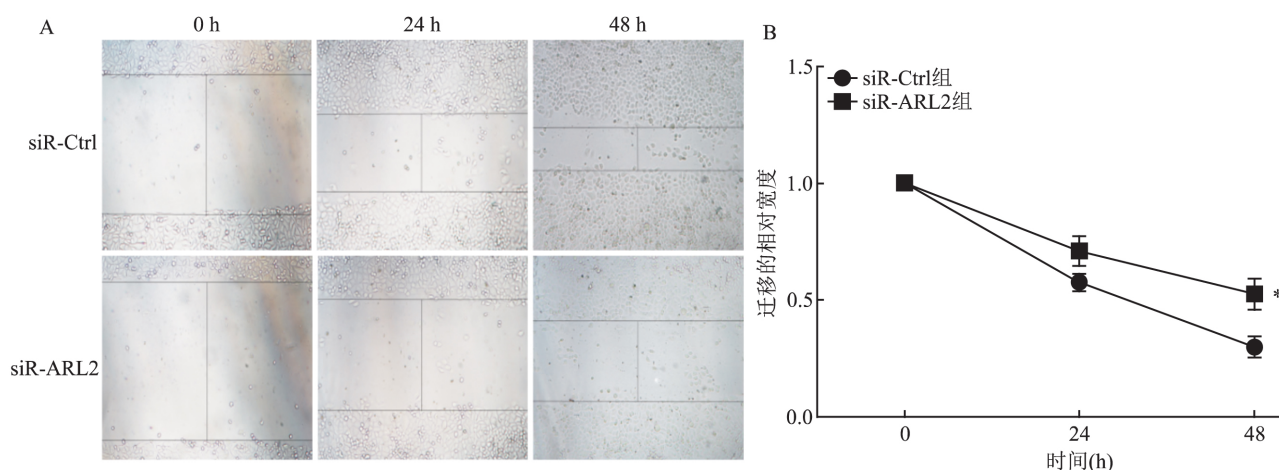


图7 HeLa 细胞在转染不同的质粒下迁移的距离图

A: 显微镜下细胞划痕实验每组不同时间的代表图; B: 划痕宽度的相对定量分析; 与 siR-Ctrl 组比较: \*  $P < 0.05$

**2.6 干扰 ARL2 后宫颈癌细胞侵袭能力分析** 分别在 HeLa 细胞和 C33A 细胞中转染 siR-Ctrl 及 siR-ARL2 后进行 Transwell 侵袭实验, 结果与对照组比较, 实验组中宫颈癌细胞的侵袭能力受到了非常大的抑制, HeLa 细胞下降了约 49% [(113.00  $\pm$  3.83) vs (58.00  $\pm$  2.41)  $t = 5.2$ ,  $P < 0.05$ ], C33A 细胞中下降了约 54% [(89.00  $\pm$  4.50) vs (41.00  $\pm$  1.92),  $t = 5.7$ ,  $P < 0.05$ ], 说明 siR-ARL2 能够抑制宫颈癌的侵袭。见图 6。

**2.7 siR-ARL2 后宫颈癌细胞迁移能力的变化** RNA 干扰后的细胞划痕实验显示, HeLa 细胞转染干扰质粒细胞划痕后 24 h 及 48 h 迁移的距离明显大于转染对照组迁移的距离 ( $F = 19.75$ ,  $P < 0.05$ )。提示 RNA 干扰 ARL2 后 HeLa 细胞的迁移能力降低。见图 7。

### 3 讨论

宫颈癌居妇科恶性肿瘤病死率前列, 尽管早期宫颈癌预后较好, 但是仍有许多患者死于宫颈癌的转移和复发<sup>[5]</sup>。全世界每年约有 500 000 新发宫颈癌病例, 超过 1/3 的患者死亡<sup>[6]</sup>。近年来, 尽管宫颈癌手术治疗的效果逐渐得到改善, 但癌细胞的侵袭和转移严重影响了相关治疗的效果, 在分子水平上寻找肿瘤靶向治疗已逐渐被临床实践所认识。

ARL2 是一种 GTP 酶, 它能快速结合 GTP 或 GDP 分子, 不依赖于脂类<sup>[7]</sup>, 当与 GTP 或 GDP 结合时, ARL2 在不同条件扮演不同的角色。ARL2 以 ARL2-GDP 的形式结合微管蛋白辅助因子 D (tubulincofactor D, TBCD) 并调节微管动力学<sup>[8]</sup>。ARL2-GTP 与 ARL2 结合因子 (BART) 形成线粒体复合

体<sup>[9]</sup> 维持线粒体形态、运动、ATP 水平和线粒体融合。

Long et al<sup>[10]</sup> 通过荧光素酶报告证实 在结肠癌中 miR-214 通过与 ARL2 3'UTRs 结合调控 ARL2 表达, Western blot 和 qRT-PCR 也证实 miR-214 抑制 ARL2 的蛋白和 mRNA 表达, 与 ARL2 siRNA 作用相似, 这些结果表明 miR-214 通过 ARL2 的 3'UTRs 直接负调控 ARL2, 抑制结肠癌细胞的生长和转移, 进而促进癌细胞死亡。在胰腺癌细胞中, ARL2-GTP 通过诱导肌动蛋白-细胞骨架重排从而抑制 Ras 同源物基因家族成员 A ( Ras homolog family member A, RhoA) 的活性, 促进胰腺癌细胞侵袭。而 BART 可与 ARL2-GTP 结合, 抑制 ARL2 的功能, 减少肌动蛋白细胞骨架的重排, 增加胰腺癌细胞中活性 RhoA 的含量, 进而抑制肿瘤细胞的侵袭性<sup>[11]</sup>。在乳腺癌细胞中, 高表达 ARL2 的乳腺癌细胞中蛋白磷酸酶 PP2A 催化亚单位 ( PP2Ac) 含量显著增加, 低表达 ARL2 乳腺癌细胞中 PP2Ac 含量显著降低, 与对照组比较, 两组细胞中 PP2Ac 基因水平无显著性差异<sup>[12]</sup>。本文通过 siRNA 诱导的 RNA 干扰显著抑制了 ARL2 基因的表达, 降低了宫颈癌细胞的生长、侵袭以及迁移能力, 逆转了宫颈癌细胞的恶性表型, 尽管其内在的具体分子机制尚不明确, 但是为宫颈癌的基因诊断以及后期的基因治疗提供了新的思路和方法。

### 参考文献

- [1] Duenas-Gonzalez A, Campbell S. Global strategies for the treatment of early-stage and advanced cervical cancer [J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2016, 28( 1) : 11 - 7.
- [2] de Arellano A R, Lopez-Pulido E I, Martinez-Neri P A, et al.

- STAT3 activation is required for the antiapoptotic effects of prolactin in cervical cancer cells [J]. *Cancer Cell Int*, 2015, 15: 83.
- [3] Li S, Li C, Fang Z. MicroRNA 214 inhibits adipocyte enhancer-binding protein 1 activity and increases the sensitivity of chemotherapy in colorectal cancer [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17( 1) : 55 - 62.
- [4] Liu F, Lou K, Zhao X, et al. miR-214 regulates papillary thyroid carcinoma cell proliferation and metastasis by targeting PSMD10 [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42( 6) : 3027 - 36.
- [5] Tian C, Wu H, Li C, et al. Downregulation of FoxM1 by miR-214 inhibits proliferation and migration in hepatocellular carcinoma [J]. *Gene Ther*, 2018, 25( 4) : 312 - 9.
- [6] 王圣坦, 朱根海, 洪 澜, 等. 长链非编码 CCAT1 靶向 miR-219a 对宫颈癌 Hela 细胞生长、侵袭和迁移的调节作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53( 8) : 1348 - 53.
- [7] Peng R, Men J, Ma R, et al. miR-214 down-regulates ARL2 and suppresses growth and invasion of cervical cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 484( 3) : 623 - 30.
- [8] Chandrasekaran K S, Sathyanarayanan A, Karunakaran D. Reply: Comment on MicroRNA-214 suppresses growth, migration and invasion through a novel target, high mobility group AT-hook 1, in human cervical and colorectal cancer cells [J]. *Br J Cancer*, 2017, 116( 3) : e8.
- [9] Newman L E, Schiavon C R, Turn R E, et al. The ARL2 GTPase regulates mitochondrial fusion from the intermembrane space [J]. *Cell Logist*, 2017, 7( 3) : e1340104.
- [10] Long L M, He B F, Huang G Q, et al. MicroRNA-214 functions as a tumor suppressor in human colon cancer via the suppression of ADP-ribosylation factor-like protein 2 [J]. *Oncol Lett*, 2015, 9( 2) : 645 - 50.
- [11] 王昱霖. ARL2 在肿瘤发生发展中作用的研究进展 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25( 6) : 652 - 5.
- [12] Wang J M, Ju B H, Pan C J, et al. MiR-214 inhibits cell migration, invasion and promotes the drug sensitivity in human cervical cancer by targeting FOXM1 [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9( 8) : 3541 - 57.

## Expression of ARL2 in cervical cancer tissues and its effect on cervical cancer cell phenotype

Peng Ruiqing, Wang Yang, Sun Ying, et al

( Laboratory Center, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052)

**Abstract Objective** To investigate the expression of ADP - ribosylation - like factor 2 ( ARL2) in cervical cancer tissues and its effect on the growth, invasiveness and migration of cervical cancer cells. **Methods** The expression of ARL2 in cervical cancer tissues was detected by qRT-PCR and immunohistochemistry. ARL2 ( si-ARL2) was silenced by RNA interference, HeLa and C33A cells were transfected with non-specific sequence ( pSi-lencer 2. 1) as negative control, MTT assay, colony formation assay, Matrigel invasion assay and wound healing assay were used to detect the growth, invasion and migration of cervical cancer cells after ARL2 interference.

# 鼠源 GFP-VNN1 重组质粒的构建及其功能研究

李琳<sup>1</sup> 李俊<sup>2</sup>

**摘要** 目的 构建鼠源绿色荧光蛋白-重组人血管非炎症因子1基因(GFP-VNN1)重组质粒,并观察其对小鼠巨噬细胞RAW264.7细胞因子分泌及细胞凋亡的影响。方法 从RAW264.7细胞中获得总RNA,逆转录得到cDNA,用Hind III和BamH I限制性内切酶双酶切后连接至绿色荧光蛋白(GFP)载体上。表达载体经限制性内切酶酶切和DNA序列分析正确后转染至RAW264.7细胞中,ELISA试剂盒及Western blot法检测细胞因子肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白细胞介素-6(IL-6)分泌,流式细胞术检测细胞凋亡。结果 阳性克隆经双酶切法鉴定可见VNN1基因片段,重组质粒GFP-VNN1可以显著促进细胞因子TNF- $\alpha$ 和IL-6的分泌及RAW264.7细胞的凋亡。结论 表明成功构建重组GFP-VNN1质粒,其能促进细胞因子分泌及细胞凋亡。

**关键词** 重组人血管非炎症因子1基因;绿色荧光蛋白;RAW264.7细胞;基因表达;细胞因子;细胞凋亡

**中图分类号** R 392.5

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2019)11-1717-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.11.011

重组人血管非炎症因子1基因(Vannin-1, VNN1)是一种位于细胞膜上的糖基磷脂酰肌醇

(glycosylphosphatidylinositol, GPI)-锚定蛋白,具有泛酰巯基乙胺酶活性,表达于人类及小鼠的多种组织中,其中肾脏、胸腺和脾等免疫组织具有较高的mRNA表达量<sup>[1]</sup>。多项研究<sup>[2-4]</sup>显示VNN1可以通过调控氧化应激反应标志物活性氧簇(ROS)、抗氧化剂谷胱甘肽(GSH)、cysteamine及抗氧化蛋白过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (PPAR- $\gamma$ )等分子或蛋白参与氧化应激反应,提示以VNN1基因为靶点的治疗未来有可能逆转氧化应激及炎症相关性疾病的进展。本实验拟通过体外构建能够稳定表达VNN1蛋白的重组质粒,并观察其转染RAW264.7细胞后对细胞因子分泌及细胞凋亡的影响,为深入探讨其参与免疫相关性疾病的分子机制奠定实验基础。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞系及主要实验材料** RAW264.7细胞系、绿色荧光蛋白(GFP)及DH5 $\alpha$ 感受态细胞由安徽省天然药物活性研究重点实验室保存。总RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒(美国Thermo公司);高糖DMEM液体培养基、胎牛血清(FBS)(美国Gibco公司);凝胶纯化试剂盒、限制性内切酶、T4 DNA marker、DNA连接酶(日本TaKaRa公司);Lipofectamine 2000、Opti-MEM、TRIzol Reagent(美国Invitrogen公司);流式试剂盒(上海贝博公司);小鼠酶联免疫分析(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技

2019-06-18 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81770609)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学第一附属医院药剂科,合肥 230022

<sup>2</sup>安徽医科大学药学院,合肥 230032

作者简介:李琳,女,硕士,初级药师;

李俊,男,博士,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: lijun@ahmu.edu.cn

**Results** Expression of ARL2 was significantly higher in cervical cancer tissues. By construct to the NC group, the protein expression was decreased by 59% ( $t = 5.6, P < 0.05$ ) in HeLa cells and 60% ( $t = 5.3, P < 0.05$ ) in C33A cells, respectively. MTT assay revealed that cell growth was inhibited, the inhibitory rate was 28% ( $t = 2.6, P < 0.05$ ) in HeLa cells and 22% ( $t = 2.3, P < 0.05$ ) in C33A cells. siR-ARL2 reduced the colony forming ability of HeLa and C33A cells by 36% and 60%, respectively ( $t = 4.7, 6.2, P < 0.05$ ). Invasion and migration were significantly reduced as well, the inhibitory rate on invasion was 49% ( $t = 5.2, P < 0.05$ ) in HeLa cells and 54% ( $t = 5.7, P < 0.05$ ) in C33A cells, and inhibited the migration in HeLa cells. **Conclusion** Expression of ARL2 is significantly higher in cervical cancer tissues. Knockdown of ARL2 markedly inhibited cervical cancer cell proliferation, migration and invasion, and may play an important role in the development of cervical cancer.

**Key words** cervical cancer; ARL2; RNA interference; invasion; relative expression