

# ING5 在对顺铂不同敏感性的卵巢癌细胞中的表达及其影响

孙正伟<sup>1,2</sup>, 马睿<sup>1,2</sup>, 万安<sup>1</sup>, 徐汉杰<sup>1</sup>, 王慧妍<sup>2</sup>, 周颖<sup>1</sup>, 赵卫东<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 探讨在对顺铂不同敏感性的卵巢癌细胞中生长抑制蛋白 5 (ING5) 的表达情况及其影响。方法 应用 MTT 法分析卵巢癌细胞系 A2780、SKOV-3、HO8910、ES-2 对顺铂的敏感性差异并测定半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 值; Western blot 法检测 ING5 蛋白在卵巢癌细胞系 A2780、SKOV-3、HO8910、ES-2 中的表达水平; 并在 A2780 细胞中应用 ING5 siRNA 沉默 ING5 基因, Western blot 法检测沉默效率, MTT 法检测转染后 A2780 细胞对顺铂敏感性的改变。结果 A2780 细胞对顺铂的敏感性最高, IC<sub>50</sub> 值为 (0.423 ± 0.020) μg/ml; 而 ES-2 细胞对顺铂的敏感性最低, IC<sub>50</sub> 值为 (5.280 ± 0.309) μg/ml ( $P < 0.01$ )。然而, ING5 蛋白在 A2780 细胞中表达最高, 在 ES-2 细胞中表达最低 ( $P < 0.01$ )。ING5 siRNA 显著降低 A2780 细胞对顺铂的敏感性 ( $P < 0.01$ )。结论 ING5 的高表达可能有利于提高卵巢癌细胞对顺铂的敏感性。

**关键词** 卵巢癌细胞; 顺铂; 耐药; 生长抑制蛋白 5

**中图分类号** R 711.75

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2016)01-0056-04

卵巢癌是妇科癌症死亡的主要原因, 主要由于卵巢癌早期难以诊断和在化疗过程中逐渐形成的化疗耐受。标准治疗为肿瘤减灭术和术后以铂类为第一线的化疗。尽管治疗后初期有效率较高, 但频繁复发和逐渐获得的化疗耐受最终导致治疗失败。因此, 卵巢癌患者 5 年总体生存率只有约 30%<sup>[1]</sup>。化疗耐受成为成功治疗卵巢癌的主要障碍, 尤其是铂类耐药。研究卵巢癌耐药的分子机制是提高卵巢癌治疗效果的重要举措。有研究<sup>[2]</sup>表明, 在体内生长抑制蛋白 5 (inhibitor of growth protein 5, ING5) 能够和 p300、p53 相互作用, 在结直肠癌细胞中, 其过表达能够诱导细胞凋亡。目前有关 ING5 的功能研究很少, 该研究通过 Western blot 法检测卵巢癌细胞系中 ING5 的表达, 探讨 ING5 在卵巢癌细胞系中的表达与对顺铂诱导细胞凋亡敏感性之间的关系及其意

义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞系** 人卵巢癌细胞系 ES-2、HO8910、SKOV-3 购自中国科学院上海细胞库; A2780 细胞系购自北京协和肿瘤细胞库。

**1.1.2 主要试剂** 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、Lipofectamine 2000 试剂 (美国 Invitrogen 公司)、RPMI Medium-1640、DMEM、McCoy's 5A (美国 Gibco 公司); MTT (美国 Sigma 公司); 兔抗人 ING5 单克隆抗体、小鼠抗人 GAPDH 抗体、HRP 标记山羊抗鼠/兔抗体 (美国 Abgent 公司); 增强化学发光剂 (ECL) A 液、B 液 (美国 Pierce 公司); ING5 siRNA (广州锐博生物科技有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 人卵巢癌细胞系 ES-2、SKOV-3 用含有 10% FBS 的 McCoy's 5A 培养基培养, HO8910 细胞系用含有 10% FBS 的 DMEM 培养基培养, A2780 细胞系用含有 10% FBS 的 RPMI Medium-1640 培养基培养, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。

**1.2.2 Western blot 法检测蛋白表达** 贴壁的细胞用冰冷的 PBS 冲洗 3 次后, 收集细胞入 EP 管中, 重悬, 加入 1 × 蛋白裂解液。将蛋白样品调整浓度后等量加入 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺电泳分离。在 TanonEPS200 电转系统进行转膜, 将样品蛋白电转至 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。孵育一抗、二抗。然后转入暗室加 ECL 发光液, 曝光显影, 扫描灰度值。

**1.2.3 MTT 法检测顺铂 IC<sub>50</sub> 值** 取处于对数生长期的细胞, 经胰酶消化后接种于 96 孔板中。待细胞贴壁后, 分别给予所确定的 5 个梯度浓度 (0.032、0.16、0.8、4、20 μg/ml) 的顺铂处理。孵育 72 h 后, 每孔加入 5 mg/ml 15 μl MTT 试剂, 在培养箱内继续孵育 4 h。去除培养基, 加入 150 μl DMSO 溶解甲瓩, 摇床轻轻摇晃 10 min, 完全溶解甲瓩。使用酶标仪于 570 nm 波长测吸光度 (optical density, OD) 值。通过 Msvbvm50 软件计算使细胞抑制率为 50% 时的

2015-10-20 接收

基金项目: 安徽省科技厅年度重点科研项目 (编号: 1301043053)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学附属省立医院妇产科, 合肥 230001

<sup>2</sup>安徽省肿瘤医院妇科, 合肥 230000

作者简介: 孙正伟, 男, 硕士研究生;

赵卫东, 男, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: victorzhaoh@163.com

顺铂浓度。实验重复 3 次。

**1.2.4 siRNA 瞬时转染** 转染的前 1 d, 根据实验要求准备细胞、双无培养基。用不含血清的配套培养基稀释 Lipofectamine 2000 轻轻混合, 室温孵育 5 min。用不含血清的培养基稀释 ING5 siRNA, 轻轻混合, 阴性对照 (negative control, NC) 用无关序列寡聚物。稀释好的 Lipofectamine 2000 经过 5 min 孵育后, 分别与上述 ING5 siRNA 及 NC 轻轻混和, 室温静置 20 min 以形成核酸-Lipo2000 混合物。将核酸-Lipo2000 混合物加入含有细胞和培养液的细胞培养板中, 轻轻使之混合均匀。置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 6 h 后除去转染试剂, 加完全培养基培养至检测时间, 实验重复 3 次。

**1.3 统计学处理** 采用 GraphPad Prism 6.0 统计软件进行分析, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 检验水准  $\alpha = 0.01$ 。4 种卵巢癌细胞系对顺铂的 IC<sub>50</sub> 值及 ING5 蛋白的表达水平的比较均采用单因素方差分析。A2780 细胞中转染 ING5 siRNA 和 NC 后比较 ING5 蛋白表达水平及 IC<sub>50</sub> 差异均采用 *t* 检验。

## 2 结果

**2.1 MTT 法检测 ES-2、HO8910、SKOV-3、A2780 细胞系对顺铂的 IC<sub>50</sub> 值** A2780 细胞对顺铂的 IC<sub>50</sub> 值最低为 (0.423 ± 0.020) μg/ml, 其次是 SKOV-3 (0.833 ± 0.028) μg/ml、HO8910 (1.737 ± 0.032) μg/ml, 对顺铂的 IC<sub>50</sub> 值最高的是 ES-2 细胞为 (5.280 ± 0.309) μg/ml, 大约是 A2780 细胞 IC<sub>50</sub> 值的 12.48 倍。与 A2780 细胞 IC<sub>50</sub> 值比较, 差异均有统计学意义 ( $F = 199.9, P < 0.01$ )。

**2.2 ING5 蛋白在 ES-2、HO8910、SKOV-3、A2780 细胞系中的表达** A2780 细胞 ING5 蛋白表达最高, 其次是 HO8910、SKOV-3, 而 ES-2 细胞 ING5 蛋白表达最低, 明显低于 A2780 细胞。与 A2780 细胞 ING5 蛋白表达水平比较, 差异均有统计学意义 ( $F = 367.7, P < 0.01$ )。见图 1。

**2.3 ING5 siRNA 降低了 A2780 细胞系对顺铂的敏感性** 分别在 A2780 细胞中转染 ING5 siRNA 和 NC, Western blot 法检测 ING5 蛋白的表达, 与 NC 相比, 转染 ING5 siRNA 组中 ING5 蛋白的表达明显下调 ( $t = 9.151, P < 0.01$ )。见图 2。MTT 法检测转染 ING5 siRNA 和 NC 后 A2780 细胞对顺铂敏感性的变化, 结果表明, 与 NC (IC<sub>50</sub>: 1.020 ± 0.187 μg/ml) 相比, 转染 ING5 siRNA 后, A2780 细胞对顺铂的敏感性 (IC<sub>50</sub>: 7.057 ± 0.207 μg/ml) 显著下调

( $t = 37.030, P < 0.01$ )。

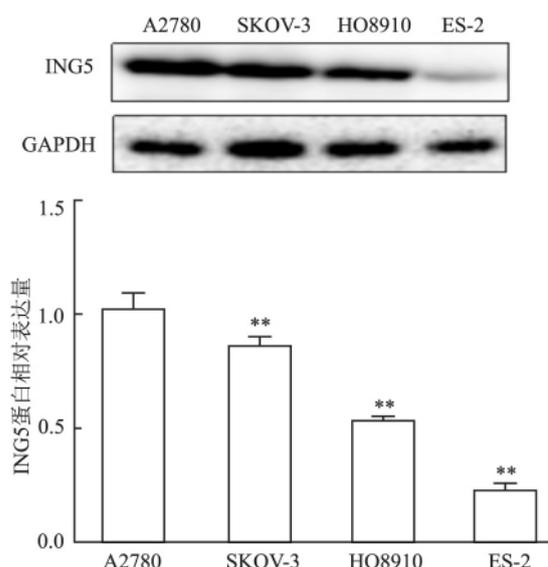


图1 Western blot 法检测 ING5 蛋白在 ES-2、HO8910、SKOV-3、A2780 细胞系中的表达  
与 A2780 比较: \*\*  $P < 0.01$

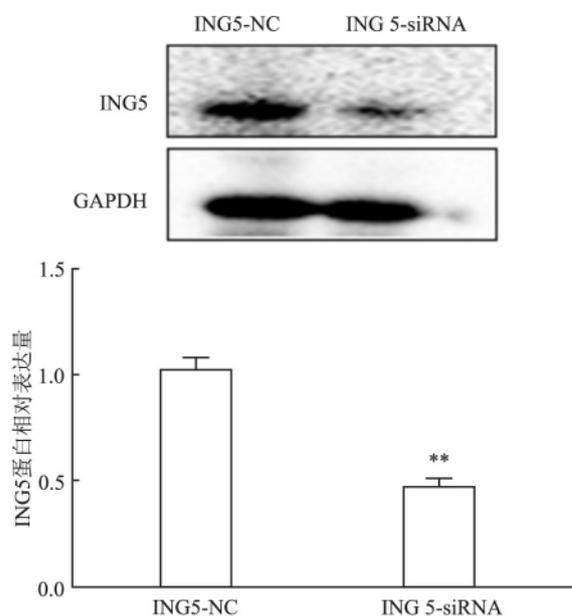


图2 Western blot 法检测 ING5 蛋白在转染 ING5-NC、ING5-siRNA 的 A2780 细胞系中的表达  
与 ING5-NC 组比较: \*\*  $P < 0.01$

## 3 讨论

卵巢癌是所有妇科肿瘤中死亡率最高的, 因为其通常只有在晚期才能得到确诊, 并且患者的预后取决于其对化疗药物的敏感性。然而, 原发或者逐渐获得的化疗耐受, 特别是对铂类耐受限制了治疗的效果。虽然药物抗性的发展过程似乎是多因素的, 但药物抗性的获得主要是由于细胞凋亡的失活, 这也通常被认为是肿瘤的标志之一。这表明重新激

活凋亡反应可能是对抗化疗耐受的有效方法<sup>[3-4]</sup>。从酵母菌到人类,生长抑制蛋白(inhibitor of growth protein, ING)在进化上都是高度保守的同源蛋白<sup>[5]</sup>。5个不同的ING基因座分布于小鼠和人类的整个基因组中<sup>[6]</sup>。其中ING5基因是II型抑癌基因ING家族的5个不同成员之一<sup>[7]</sup>。ING5蛋白含有一个同源结构域,其是ING蛋白家族的一个高度保守的区域,该区域与染色质重塑激活有关<sup>[7-8]</sup>。Doyon et al<sup>[9]</sup>证明ING5的同源结构域能够促进局部组蛋白乙酰转移酶的激活,刺激染色质重塑以及调节基因的表达。Shiseki et al<sup>[2]</sup>发现在结直肠癌细胞中过表达ING5导致细胞集落形成减少,S期比例下降以及凋亡增加。最近的研究<sup>[10]</sup>显示在口腔鳞状细胞癌中ING5 mRNA发生突变和下调,表明其是一种抑癌基因。

本研究通过MTT法检测ES-2、HO8910、SKOV-3、A2780卵巢癌细胞系对顺铂的相对IC<sub>50</sub>值,发现对顺铂的IC<sub>50</sub>值由低到高的顺序为A2780、SKOV-3、HO8910、ES-2,并且ES-2的IC<sub>50</sub>值大约为A2780的12.48倍。进一步通过Western blot检测ING5蛋白在ES-2、HO8910、SKOV-3、A2780细胞系中的表达情况,结果ING5的表达由高到底的顺序为A2780、SKOV-3、HO8910、ES-2。结果显示高表达ING5的A2780细胞对顺铂最敏感,于是通过在A2780细胞中转染ING5 siRNA及NC并分别检测对顺铂的IC<sub>50</sub>值,与NC相比,转染ING5 siRNA后,A2780细胞对顺铂的耐受性明显升高,差异有统计学意义。而最近的研究<sup>[11]</sup>表明,ING5在多药敏感的膀胱癌细胞系5637中高表达,在多药耐受的膀胱癌细胞系H-bc中低表达。在5637中沉默ING5后导致其敏感性降低,而在H-bc中过表达ING5后使其敏感性提高。本研究结论与其相类似。有研究<sup>[11]</sup>显示,ING5在膀胱癌细胞系中是miR-193a-3p的直接下游靶点,并且参与DNA损伤反应信号通路的调节。ING5在卵巢癌细胞系中的调节机制和参与的信号通路有待进一步研究。故针对本研究的不

足之处,下一步的研究重点是在低表达ING5蛋白的卵巢癌细胞系中过表达ING5后检测其对顺铂耐药性的影响,同时,寻找在卵巢癌细胞系中调节ING5的miRNAs基因并作进一步的机制研究。

综上所述,ING5能够促进卵巢癌细胞系A2780对顺铂的敏感性,这可能为临床检测卵巢癌患者预后及对顺铂的敏感性提供了新的分子标志物,为克服卵巢癌顺铂耐受提供了新思路。

## 参考文献

- [1] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60(5): 277-300.
- [2] Shiseki M, Nagashima M, Pedoux R M, et al. p29ING4 and p28ING5 bind to p53 and p300, and enhance p53 activity [J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 2373-8.
- [3] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-74.
- [4] Fesik S W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(11): 876-85.
- [5] He G H, Helbing C C, Wagner M J, et al. Phylogenetic analysis of the ING family of PHD finger proteins [J]. *Mol Biol Evol*, 2005, 22(1): 104-16.
- [6] Coles A H, Jones S N. The ING gene family in the regulation of cell growth and tumorigenesis [J]. *J Cell Physiol*, 2009, 218(1): 45-57.
- [7] Russell M, Berardi P, Gong W, et al. Grow-ING, Age-ING and Die-ING: ING proteins link cancer, senescence and apoptosis [J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(7): 951-61.
- [8] Soliman M A, Riabowol K. After a decade of study-ING, a PHD for a versatile family of proteins [J]. *Trends Biochem Sci*, 2007, 32(11): 509-19.
- [9] Doyon Y, Cayrou C, Ullah M, et al. ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation [J]. *Mol Cell*, 2006, 21(1): 51-64.
- [10] Cengiz B, Gunduz E, Gunduz M, et al. Tumor-specific mutation and downregulation of ING5 detected in oral squamous cell carcinoma [J]. *Int J Cancer* 2010, 127(9): 2088-94.
- [11] Li Y, Deng H, Lv L, et al. The miR-193a-3p-regulated ING5 gene activates the DNA damage response pathway and inhibits multi-chemoresistance in bladder cancer [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(12): 10195-206.

## Expression and influence of ING5 on cisplatin sensitivity in different ovarian cancer cells

Sun Zhengwei<sup>1,2</sup>, Ma Rong<sup>1,2</sup>, Wan An<sup>1</sup>, et al

<sup>1</sup>Dept of Obstetrics and Gynecology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

<sup>2</sup>Dept of Gynecologic Tumor, Anhui Cancer Hospital, Hefei 230000

**Abstract Objective** To investigate the expression level and effect of inhibitor of growth protein 5(ING5) in

网络出版时间: 2015-12-30 14:38 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20151230.1438.028.html>

## Ad-BMP-2/BMSCs/DBM 对兔股骨头坏死修复的实验研究

石正松 李强 宁寅宽 蔡伟良 李诗鹏

**摘要** 目的 应用聚合酶链式反应(RT-PCR)、电镜扫描(SEM)和X射线能谱分析技术(EDS)评价腺病毒-骨形态发生蛋白-2/骨髓间充质干细胞/脱钙松质骨(Ad-BMP-2/BMSCs/DBM)对兔股骨头坏死的治疗效果,为临床治疗股骨头坏死探索新途径。方法 ①采用髓芯减压联合液氮冰冻法制备兔股骨头坏死模型;②将造模成功的兔子随机均等分为A、B、C、D组( $n=12$ ),A组不植入材料,为造模组,B、C、D分别植入DBM、DBM/BMSCs、BMP-2/BMSCs/DBM;③术后4、8、12周各组分别处死4只兔子,运用RT-PCR、SEM、EDS检测股骨头BMP-2表达量、表面形貌和钙磷比(Ca/P),观察股骨头的修复情况。结果 RT-PCR结果显示各时间点BMP-2表达量A组<B组<C组<D组( $P<0.05$ );SEM显示A组未见钙化沉积,B、C组可见钙化沉积及低钙性类骨质,D组新生骨改建成熟,与正常骨组织无明显差异。EDS显示Ca/P A组<B组<C组<D组,D组Ca/P与正常股骨头Ca/P无明显差异。结论 BMP-2/BMSCs/DBM植入体内后能够诱导BMSCs向成骨方向分化,对兔股骨头坏死具有较好的修复效果,在治疗股骨头坏死方面展现出良好的应用前景。

**关键词** 股骨头坏死;骨髓间充质干细胞;骨形态发生蛋白2;RT-PCR;电镜扫描;能谱分析

中图分类号 R 687.34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)01-0059-05

股骨头坏死(osteonecrosis of femoral head, ONFH)确切病因不明,目前公认的致病因素有13种<sup>[1]</sup>,是在不同病因下股骨头血液供应障碍,引起软骨下骨变性、坏死,继而造成股骨头塌陷,最终引发髋关节退行性、破坏性改变的一种疾病。有文献<sup>[2]</sup>表明ONFH已经替代了髋关节结核,跃居髋关节疾病首位<sup>[3]</sup>,并且ONFH有了年轻化趋势。目前对于ONFH的治疗方法有多种,例如中医疗法、体外微波冲击治疗、髓芯减压<sup>[4]</sup>、髋关节置换等<sup>[5]</sup>,但是这些均不是理想而合理的治疗方法,探寻更为有效的治疗手段势在必行。骨组织工程的发展在治疗ONFH方面展现了良好的前景,并逐渐成为研究热点。种子细胞、支架材料、细胞调控因子是骨组织工程学的3个基本要素。但是究竟采用何种种子细胞最好,选取哪种支架材料为宜,如何解决细胞调控因子持续表达的问题,国内外尚无定论<sup>[6]</sup>。该实验通过腺病毒介导人骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein, BMP-2)转染骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)复合脱钙松质骨(demineralized bone matrix, DBM)的方式构建组织

2015-09-30 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31160199);广西自然科学基金(编号:2014jjAA40064)

作者单位:桂林医学院附属医院急诊创伤外科 桂林 541001

作者简介:石正松,男,硕士研究生;

李强,男,主任医师,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: li.q12251970@163.com

ovarian cancer cell which has different sensitivity to cisplatin. **Methods** MTT method was used to analyze the sensitivity of difference in ovarian cancer cell line A2780, SKOV-3, HO8910, ES-2 to cisplatin and to determine the 50% inhibiting concentration (IC50) value; the expression level of ING5 protein in A2780, SKOV-3, HO8910 and ES-2 cells was determined by Western blot; siRNA against ING5 was used to silence ING5 gene and the knockdown efficiency was verified by Western blot, and the change of the sensitivity to cisplatin in A2780 cells after transfection was detected by MTT method. **Results** A2780 was the most resistant cell line to cisplatin, which IC50 value was  $(0.423 \pm 0.020) \mu\text{g/ml}$ ; ES-2 was the most resistant cell line to cisplatin, with IC50 value of  $(5.280 \pm 0.309) \mu\text{g/ml}$  ( $P < 0.01$ ). However, ING5 protein level was the highest in A2780 cells, but the lowest in ES-2 cells ( $P < 0.01$ ). Knockdown of the ING5 by siRNA significantly reduced the sensitivity of A2780 cells to cisplatin ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** High expression of ING5 might improve the sensitivity of ovarian cancer cells to cisplatin.

**Key words** ovarian cancer cells; cisplatin; drug resistance; ING5