

• 论 著 •

人 *OVCA1* 基因的克隆及其对卵巢癌细胞生长的抑制作用\*孔繁斗<sup>1</sup>, 赵春艳<sup>2△</sup>, 贾琳钰<sup>1</sup>, 苗小艳<sup>2</sup>, 魏巍<sup>2</sup>, 赵心宇<sup>2</sup>, 杨光<sup>2</sup>, 孙文平<sup>2</sup>  
(大连医科大学: 1. 第一附属医院妇产科, 辽宁 116011; 2. 检验医学院, 辽宁 116044)

**摘要:**目的 克隆人的 *OVCA1* 基因并探讨其对卵巢癌细胞生长的影响。方法 从健康人卵巢组织中提取总 RNA, 采用逆转录酶-聚合酶链反应(RT-PCR)方法扩增 *OVCA1* 基因并克隆。脂质体法将含有 *OVCA1* 质粒和空载体分别转染入 A2780 细胞, G418 筛选稳定转染细胞。MTT 法检测 *OVCA1* 对 A2780 细胞生长的影响。结果 测序证实获得了 *OVCA1* 基因; 过表达 *OVCA1* 的细胞与对照组相比, 生长速度明显减慢( $P < 0.05$ )。结论 得到了 *OVCA1* 基因克隆; *OVCA1* 在体外明显抑制卵巢癌细胞系 A2780 的生长。

**关键词:**基因; 克隆, 生物; 转染; 卵巢肿瘤; *OVCA1*; 细胞生长曲线

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2011.16.008

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2011)16-1805-02

Cloning of human *OVCA1* gene and its in vitro inhibitory effect on ovarian cancer cell growth\*Kong Fandou<sup>1</sup>, Zhao Chunyan<sup>2△</sup>, Jia Lingyu<sup>1</sup>, Miao Xiaoyan<sup>2</sup>, Wei Wei<sup>2</sup>, Zhao Xinyu<sup>2</sup>, Yang Guang<sup>2</sup>, Sun Wenping<sup>2</sup>

(1. Department of Gynecology and Obstetrics, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Liaoning 116011, China; 2. School of Laboratory Medicines, Dalian Medical University, Liaoning 116044, China)

**Abstract: Objective** To clone human *OVCA1* gene and to investigate its effects on the growth of ovarian cancer cells. **Methods** Total RNA was extracted and *OVCA1* gene was amplified by RT-PCR. GFP-tagged-*OVCA1* was cloned by being inserted into pEGFP vector and was confirmed by sequencing. GFP-tagged-*OVCA1* was transfected into A2780 cells and stable expression cells were screened by G418. Cell growth curve was examined by MTT. **Results** The cloned *OVCA1* was confirmed by sequencing. Over-expression of *OVCA1* significantly inhibits cells growth, compared with cells transfected with empty vector and wild type cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** *OVCA1* gene is cloned and the inhibition of it on A2780 cells growth is confirmed.

**Key words:** gene; cloning, organism; transfection; ovarian neoplasms; *OVCA1*; cell growth curve

卵巢癌是妇科常见的恶性肿瘤,其发病率在女性生殖系统恶性肿瘤中列第 3 位,死亡率高居妇科之首,这主要是由于其发病隐匿且缺乏早期诊断方法,确诊时约 70% 已属晚期所致。研究发现在卵巢癌的发生与发展中,17 号染色体全部或部分缺失是一种非常普遍的现象,而定位于高度保守区域 17p13.3 的基因 *OVCA1*(ovarian cancer gene 1) 在卵巢癌细胞中的基因杂合性丢失(loss of heterozygosity, LOH) 频率高达 50%~86%<sup>[1-2]</sup>。Bruening 等<sup>[3]</sup> 的研究表明 *OVCA1* 能明显抑制卵巢癌细胞的生长。在基因敲除鼠中的研究表明 *OVCA1* 在维持动物胚胎发育和正常生长方面也有至关重要的作用<sup>[4]</sup>。但是目前对 *OVCA1* 的生物学功能及其与卵巢癌的关系仍不清楚。为探讨该基因的功能,了解其与卵巢癌之间的关系,本研究克隆人的 *OVCA1* 基因,并初步观察其对卵巢癌细胞系 A2780 生长的作用,现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 人正常卵巢组织提取因子官肌瘤手术具有卵巢切除指征患者的正常卵巢组织总 RNA,离体后立即置于液氮中冷冻并保存备用。卵巢总 RNA 提取按 Trizol(Invitrogen)试剂盒说明操作。

## 1.2 方法

**1.2.1 逆转录酶-聚合酶链反应(RT-PCR)法提取的总 RNA 为模板** 操作按 RNA LA PCRTM Kit (AMV) Takara 试剂盒说明书进行。*OVCA1* 引物序列:上游,5'-ATA CTC GAG (XhoI) AAA TGC CGG AAG GCC TCC TCC T-3';下游,5'-ATA GAA TTC (EcoRI) TCA AGG AGC CAG CGG CGC CAC CTT-3'。PCR 反应条件为 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72

°C 1.5 min。

**1.2.2 pMD18-T-*OVCA1* 质粒的构建及鉴定** PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳、回收纯化,纯化后的 DNA 片段与 pMD18-T Vector 进行酶切、连接、转化,在含 IPTG、X-gal 和氨苄西林的培养基上培养。选取阳性菌落培养、提取质粒、限制性内切酶酶切初步鉴定后测序鉴定。

**1.2.3 pEGFP-*OVCA1* 质粒的构建及鉴定** 分别用 *XhoI* 和 *EcoRI* 双酶切载体 pEGFP-C1 和质粒 pMD18-T-*OVCA1* 后,琼脂糖凝胶电泳、回收纯化、连接、转化、酶切鉴定后,测序鉴定。

**1.2.4 细胞转染及稳定表达细胞的筛选** A2780 细胞购自于中国医学科学院肿瘤医院药物研究所。转染按试剂盒 Lipofectin 2000(Invitrogen)说明操作。转染 24 h 后,加入 G418(终浓度为 600 μg/mL)筛选。

**1.2.5 细胞生长曲线制备** 分别取对数生长期的细胞 A2780、A2780-GFP(转染空质粒的细胞)和 A2780-*OVCA1*(转染 *OVCA1* 重组质粒的细胞),以  $4 \times 10^3$ /孔的细胞数接种于 96 孔板。每组设 8 个平行孔,分别常规培养 1、2、3、4、5 d。采用 MTT 法测定 3 组细胞在 595 nm 波长处的吸光度值,绘制生长曲线。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 10.0 统计软件对实验结果进行单因素方差分析。

## 2 结 果

2.1 GFP-*OVCA1* 重组质粒的构建

**2.1.1 卵巢组织总 RNA 的提取及 *OVCA1* cDNA 的扩增** 按实验方法中的描述从卵巢组织中提取总 RNA,RT-PCR 扩增 *OVCA1* 基因,见图 1、2。

\* 基金项目:辽宁省教育厅基金资助项目(2004F053)。△ 通讯作者, E-mail: cyzhaok@yahoo.com.cn。

**2.1.2 重组质粒 PMD18-T-OVCA1 的酶切鉴定** 将 RT-PCR 扩增产物与 PMD18-T 质粒连接、转化后,从抗菌剂筛选平板上挑取 6 个菌落,液体培养后提取质粒 DNA 并行 *Xho* I / *Eco*R I 双酶切,琼脂糖凝胶电泳,可见至少两个相对分子质量的片段。说明 6 个克隆至少含有两个不同的基因片段。

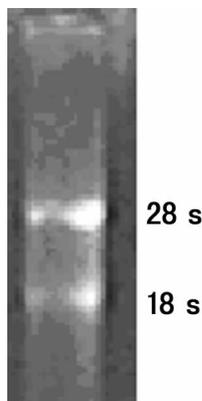


图 1 卵巢组织总 RNA 的提取

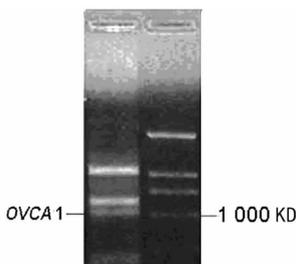
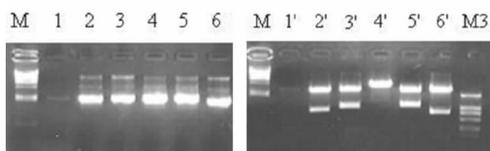


图 2 RT-PCR 扩增 OVCA1 基因



M:DNA 相对分子质量标准( $\lambda$ -Hind III digest);M3:DL2000 DNA Maker;1~6:来自六个克隆的重组质粒 DNA;1'~6':1~6 号质粒经 *Eco*R I / *Xho* I 双酶切后的 DNA 片段。

图 3 重组质粒 PMD18-T-OVCA1 的酶切鉴定

**2.1.3 测序鉴定** 将不同相对分子质量的 5、6 号克隆质粒进行 DNA 测序,与 Gene Bank 比较,5 号克隆为 *OVCA1* 基因。

**2.1.4 重组质粒 pEGFP-OVCA1 的酶切鉴定** 5 号质粒酶切后,将 *OVCA1* 基因插入 pEGFP-C1 载体,克隆后提取质粒 DNA 进行 *Xho* I / *Eco*R I 双酶切,琼脂糖凝胶电泳结果显示所选克隆为阳性。

**2.2 稳定表达 pEGFP-OVCA1 细胞筛选** A2780 细胞分别转染 GFP-OVCA 和空载体后,G418 筛选稳定表达细胞。荧光显微镜下观察 A2780-GFP 细胞和 A2780-OVCA 细胞可见绿色荧光,而 A2780 细胞未见绿色荧光。

**2.3 OVCA1 对 A2780 细胞增殖的影响** A2780-OVCA 细胞第 3 天起生长速度(第 3 天  $0.63 \pm 0.040$ ,第 4 天  $0.838 \pm 0.177$ ,第 5 天  $0.785 \pm 0.046$ )明显慢于 A2780 细胞(第 3 天  $0.819 \pm 0.136$ ,第 4 天  $1.107 \pm 0.161$ ,第 5 天  $1.182 \pm 0.131$ )和 A2780-GFP 细胞(第 3 天  $0.808 \pm 0.560$ ,第 4 天  $1.068 \pm 0.132$ ,第 5 天  $1.100 \pm 0.069$ ),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。而 A2780 和 A2780-GFP 细胞生长无明显差异。

**3 讨论**

基因的改变(癌基因的激活和抑癌基因的丢失)与肿瘤的

发生及演变有密切的关系。研究发现,约有 30% 以上的卵巢癌发生 6、9、13、17、18、19、22、X 染色体的等位基因丢失<sup>[5]</sup>,尤以 17 号染色体短臂上的 LOH 最为常见,丢失频率为 42%~81%<sup>[1-2,6]</sup>。卵巢癌细胞中 17p13.3 染色体的 LOH 频率高达 50%~86%<sup>[1-2]</sup>,其丢失频率高于众所周知的位于 17p13.1 上的 *p53* 基因<sup>[7]</sup>,表明染色体 17p13.3 在卵巢癌的发生、发展中具有重要作用。

*OVCA1* 基因是 1996 年发现的定位于 17p13.3 的一个抑癌基因<sup>[8]</sup>。临床研究资料显示 *OVCA1* 基因部分或全部丢失先于 *p53*、*BRCA1* 等与癌症尤其是晚期癌症关系密切的基因的改变,故认为 *OVCA1* 可能参与卵巢癌的早期发生过程<sup>[9-10]</sup>。

为了研究 *OVCA1* 对卵巢癌细胞的作用,本研究克隆人的 *OVCA1* 基因,将其定向克隆于带有编码绿色荧光蛋白的 pEGFP 质粒中。同时选用低表达 *OVCA1* 的卵巢癌细胞系 A2780,将 *OVCA1* 基因导入卵巢癌细胞 A2780 后,经 G418 筛选得到稳定表达 *OVCA1* 的 A2780 细胞。通过 MTT 法观察 *OVCA1* 对卵巢癌细胞 A2780 生长的影响。结果显示,A2780-*OVCA1* 细胞的生长速度明显低于两对照组细胞( $P < 0.05$ )。Phillips 等<sup>[1]</sup>研究发现过表达 *OVCA1* 的卵巢癌细胞集落形成能力下降 50%~60%。进一步研究显示,过表达 *OVCA1* 后细胞内 cyclinD1 降解加快<sup>[3]</sup>。Chen 和 Behringer<sup>[4]</sup>通过建立 *OVCA1* 基因敲除老鼠模型研究发现,该基因敲除的老鼠在生长过程中或者在出生后不久即死亡,提示该基因在维持动物正常生长中具有重要作用。*OVCA1*、*p53* 双杂合子缺失较单一 *p53* 杂合子缺失的个体,肿瘤形成速度快且肿瘤的发生率高,显示其与 *p53* 基因之间的重要关系。但是关于 *OVCA1* 基因的生物学作用及其与卵巢癌发生、发展关系仍不清楚,有待于进一步研究。

**参考文献**

- [1] Phillips NJ, Ziegler MR, Radford DM, et al. Allelic deletion on chromosome 17p13.3 in early ovarian cancer [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(3): 606-611.
- [2] Phillips N, Ziegler M, Saha B, et al. Allelic loss on chromosome 17 in human ovarian cancer [J]. *Int J Cancer*, 1993, 54(1): 85-91.
- [3] Bruening W, Prowse AH, Schultz DC, et al. Expression of *OVCA1*, a candidate tumor suppressor, is reduced in tumors and inhibits growth of ovarian cancer cells [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(19): 4973-4983.
- [4] Chen CM, Behringer RR. *OVCA1* regulates cell proliferation, embryonic development, and tumorigenesis [J]. *Genes Dev*, 2004, 18(3): 320-332.
- [5] Li AJ, Karlan BY. Genetic factors in ovarian carcinoma [J]. *Current Oncology Reports*, 2001, 3(1): 27-32.
- [6] Foulkes WD, Black DM, Stamp GW, et al. Very frequent loss of heterozygosity throughout chromosome 17 in sporadic ovarian carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 1993, 54(2): 220-225.
- [7] Jensen MR, Helin K. *OVCA1*: emerging as a bona fide tumor suppressor [J]. *Genes Dev*, 2004, 18(3): 245-248.
- [8] Schultz DC, Vanderveer L, Berman DB, et al. Identification of two candidate tumor suppressor genes on chromosome 17p13.3 [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(9): 1997-2002.
- [9] Phillips NJ, Zeigler MR, Deaven LL. A cDNA from the ovarian cancer critical region of deletion on chromosome 17p13.3 [J]. *Cancer Lett*, 1996, 102(1/2): 85-90.
- [10] Wiper DW, Zanotti KM, Kennedy AW, et al. Analysis of allelic imbalance on chromosome 17p13 in stage I and stage II epithelial ovarian cancers [J]. *Gynecol Oncol*, 1998, 71(1): 77-82.