

网络出版时间: 2016-6-6 13:52:31 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160606.1352.006.html>

沉默 Ska2 基因对人胶质瘤细胞增殖的影响

贺小军, 马春春, 卞尔保, 王洪亮, 宗 钢, 赵 兵

摘要 目的 采用 siRNA 沉默 Ska2 基因, 探讨其对人胶质瘤细胞生长的影响及其潜在的分子机制。方法 对照组人胶质瘤细胞予以 siRNA 阴性序列转染, 实验组予以 siRNA-Ska2 序列转染。每组细胞转染 48 h 后应用实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 分析 Ska2 mRNA 表达情况。Western blot 法分析 Ska2、PCNA 和 Cyclin D1 蛋白表达情况, MTT 法及细胞克隆实验分析 Ska2 对 A172 细胞增殖及克隆形成能力的影响。结果 qRT-PCR 结果显示实验组 Ska2 mRNA 表达较对照组显著减少 ($P < 0.01$), Western blot 结果显示实验组 Ska2、PCNA 和 Cyclin D1 蛋白表达水平亦较对照组显著降低 ($P < 0.01$), MTT 实验显示实验组中活细胞数明显低于对照组 ($P < 0.05$); 细胞克隆法显示实验组细胞的增殖克隆形成能力明显低于对照组 ($P < 0.01$)。结论 沉默 Ska2 基因、减少人胶质瘤细胞 Ska2 基因的表达能够抑制胶质瘤细胞的增殖。

关键词 Ska2; 胶质瘤; 细胞增殖

中图分类号 R 739.41

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)07-0930-05

纺锤体与动粒相关复合物 (spindle and kineto-

2016-03-23 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (编号: 81402078、81502149);

安徽省自然科学基金项目 (编号: 1508085MH194)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院神经外科, 合肥 230601

作者简介: 贺小军, 男, 硕士研究生;

赵 兵, 男, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zhaopumcmd@yeah.net

chore associated complex, Ska) 包括 Ska1、Ska2 和 Ska3^[1]。Hanisch et al^[2] 发现了 Ska1, 并通过酵母双杂交技术进一步筛选得到一个新的能够与 Ska1 结合的蛋白即 FAM33A, 将其重新命名为 Ska2。近年, Ska 家族的第 3 个成员 Ska3 也几乎同时被发现并报道^[3]。Ska2 是一个最近鉴定的参与细胞周期调控与肿瘤发生发展的新基因^[2,4]。Ska2 在细胞周期中的作用, 目前认为该基因可通过与 Ska1、Ska3 形成 Ska 复合体, 维持有丝分裂中期赤道板和关闭纺锤体检测点, 保证细胞能够“适时”完成有丝分裂中期并进入有丝分裂后期^[2,3]。Hanisch et al^[2] 采用 RNA 干扰技术抑制 Ska2 表达后, 大量细胞被停滞或延迟在有丝分裂中期, 虽然细胞仍能最终完成有丝分裂, 但细胞从有丝分裂前期进入后期所需的时间明显延长。Shi et al^[5] 发现 Ska2 在小细胞肺癌和乳腺癌中呈现表达上调。此外, Ska2 还可通过糖皮质激素受体等途径参与细胞增殖调节和肿瘤发生发展^[7-10]。然而, Ska2 基因在人胶质瘤的作用尚未见文献报道, 该研究旨在探讨 siRNA 沉默 Ska2 后对人胶质瘤 A172 细胞增殖的影响, 为进一步深入研究 Ska2 在胶质瘤中的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂 人胶质瘤细胞株 A172 购自上海生命科学研究院细胞库; 培养基 DMEM、胎牛

survivin promoter, replication-competent adenovirus was constructed. The recombinant adenoviruses (T-ZD55-CD133-siRNA) were verified by PCR and sequencing. The effect of T-ZD55-CD133-siRNA on CD133 expression in Hep3B cells was detected by qRT-PCR. The expression of E1A was detected by Western blot. The antitumor potential of replication-competent adenovirus in Hep3B cells were evaluated by CCK-8 assay and cell apoptosis was detected by Flow cytometry. **Results** Replication-competent adenovirus were constructed successfully. Western blot analyses indicated that T-ZD55-CD133-siRNA might express E1A in adenovirus-infected Hep3B cells. T-ZD55-CD133-siRNA were more effective to inhibit CD133 mRNA expression and Hep3B cells proliferation. Apoptosis was significantly increased in the interference group compared with the control group. **Conclusion** Survivin-T-ZD55-CD133-siRNA expressing CD133-siRNA can inhibit CD133 expression and may be used for further investigation of gene therapy for liver cancer.

Key words liver cancer; cancer stem cell; CD133; cell proliferation; gene expression

血清、胰酶消化液均购自美国 Hyclone 公司; 脂质体 Lipofectamine 2000、TRIzol 均购自美国 Invitrogen 公司; Ska2 抗体购自英国 Abcam 公司; PCNA、Cyclin D1 抗体购自北京博奥生物公司; 反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) 购自日本 TaKaRa 公司; 7900 型荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司; 20 μ l 的反应体系包括 10 μ l 2 $\times$ SYBR Green PCR Master Mix 购自美国 ABI 公司; 5' 和 3' 端引物(3 μ mol/L) 各 1 μ l 和 1 μ l 的 cDNA 模板、7 μ l dd H₂O 购自上海生物科技有限公司; 兔抗人 Ska2、羊抗人 β -actin 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG、兔抗羊 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; ECL 购自美国 Thermo Fisher 公司; FlexCycler 多功能 PCR 仪购自德国 Jena 公司; MTT 试剂购自美国 Sigma 公司; SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、DMSO 试剂、Western 一抗稀释液及 RIPA 裂解液(强) 均购自上海碧云天公司; NanoPhotometer Pearl 330 购自德国 IMPLLEN 公司; siRNA 寡核苷酸片段由上海吉玛公司合成; Ska2 引物由上海生物工程公司合成。siRNA-Ska2 序列和 siRNA 阴性对照序列见表 1。

表 1 引物序列

项目	序列(5'-3')
siRNA-Ska2	F: GAAAUCAAGACUAAUCAUCTT
	R: GAUGAUUAGUCUUGAUUUCTT
siRNA-阴性对照	F: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	R: ACGUGACACGUUCGGAGAATT

1.2 方法

1.2.1 细胞转染 购买 50 代以内人胶质瘤细胞株 A172, 将其培养于含 10% 新生胎牛血清 DMEM 培养液中, 恒温恒湿培养箱设定参数为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 浓度。取对数生长期 A172 细胞, 用 0.25% 胰酶消化液消化, 800 r/min 离心 5 min, 取适量培养基制成细胞悬液并计数, 按 40×10^4 个/瓶接种于培养瓶中; 接种 24 h 后, 待培养瓶中细胞汇合达约 70% 时即可进行脂质体 Lipofectamine 2000 介导的转染。第一组予以 siRNA 阴性对照序列(对照组)、第二组予以 siRNA-Ska2 序列(实验组) 进行转染, 以此建立细胞模型。

1.2.2 qRT-PCR 检测 A172 细胞中 Ska2 mRNA 表达变化 细胞转染后, 提取实验组及对照组细胞总 RNA, 分别将其逆转录成 cDNA。用 7900 型荧光定量 PCR 仪进行反应扩增, Ska2 上游引物: 5'-

CCGCTTTAAACCAGTTGCTG-3', 下游引物: 5'-CTCTGCCCGCAGTTTCTCTT-3'; GAPDH 上游引物: 5'-AGCAAGAGCACAAGAGGAAG-3', 下游引物: 5'-GGTTGAGCACAGGGTACTTT-3'。反应条件如下: 95 $^{\circ}$ C 预热 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s; 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 共 45 个循环。并于反应结束后记录实验组和对照组结果。以 GAPDH 作为内参, 相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值, 以对照组 mRNA 表达量的均数为 1, 计算出实验组 mRNA 的相对表达量。

1.2.3 Western blot 法检测 A172 细胞中 Ska2、PCNA 和 Cyclin D1 蛋白表达情况 细胞转染后, 提取实验组及对照组细胞总蛋白, 用 BCA 试剂检测各组蛋白浓度并定量。取 20 μ g 蛋白行 SDS-PAGE 凝胶电泳(浓缩胶浓度 5%, 分离胶浓度 8%), 电转 30 min 后转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h; 加入一抗为兔抗人 Ska2 抗体(1 : 1 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗膜; 加入二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1 : 10 000), 室温轻摇 1 h, 洗膜; 加入 ECL 反应液, 暗室显影、定影后扫描。以 β -actin 作为参照。

1.2.4 MTT 法检测 A172 细胞生长 细胞培养和处理同前, 将对照组正常 A172 细胞及实验组转染后 A172 细胞按 1×10^4 /孔接种于 96 孔板, 每组设复孔 5 个, 作常规培养。分别取培养后 0、12、24、48、72 h 5 个时间点的培养板, 弃去培养基, 每孔依次加入 MTT(5 mg/ml) 10 μ l, 继续孵育 4 h 后吸尽每孔中的培养液; 加入 DMSO 150 μ l /孔, 于水平摇床上振荡 6 min, 测定 492 nm 的吸光度 (absorbance, A) 值。以时间为横坐标, 细胞存活率为纵坐标, 绘制细胞生长曲线图。存活率(%) = 实验组细胞 A 值 / 对照组细胞 A 值 $\times 100\%$ 。

1.2.4 细胞克隆实验检测细胞增殖 细胞培养和处理同前, 将转染后的 A172 细胞按 200 个/孔接种于 6 孔板, 设为实验组; 取相同数目的正常 A172 细胞接种于 6 孔板, 设为对照组; 每组各设 3 个复孔进行常规培养。每孔加入培养基 2 ml, 每 3 d 换液并观察细胞增殖情况, 10 d 后弃培养基, 每孔加入 4% 多聚甲醛 1 ml 固定 30 min 后, 再加入美兰染料 0.8 ml 染色, 20 min 后弃去染料, 轻轻漂洗数次后晾干, 在显微镜下观察并进行拍照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验或方差分析。

2 结果

2.1 A172 细胞 Ska2 基因表达 qRT-PCR 结果显示,实验组 Ska2 mRNA 水平的表达量明显低于对照组,差异有统计学意义($t = 7.28, P < 0.01$),见图 1。

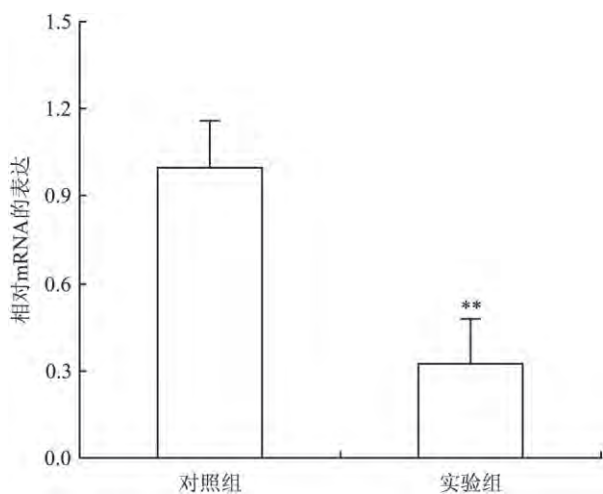


图1 实验组与对照组 Ska2 mRNA 的表达情况
与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.2 A172 细胞 Ska2 蛋白表达变化 Western blot 结果显示,两组内参 β -actin 蛋白的表达相近,而与对照组比较,实验组 Ska2 蛋白表达明显减少($t = 9.12, P < 0.01$),见图 2。

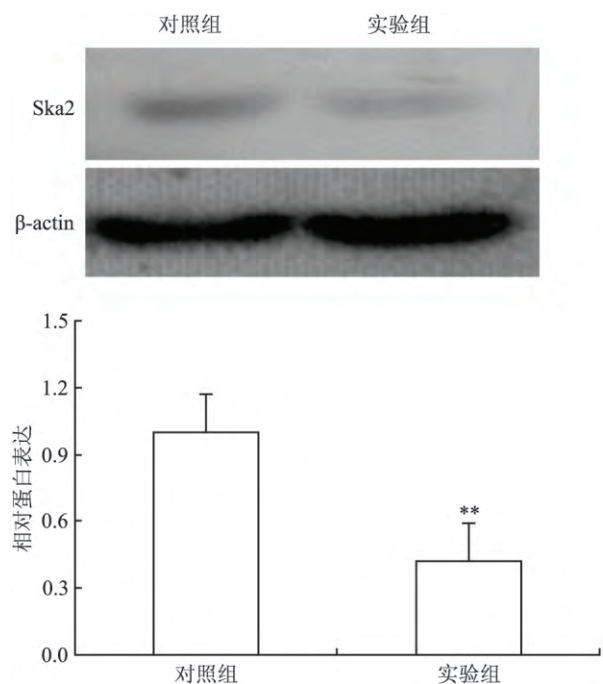


图2 Ska2 蛋白的表达情况
与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.3 Ska2 基因对 A172 细胞增殖的影响 MTT 实验结果显示,与对照组比较,实验组在转染 0、12、24 h 时 A172 细胞生长差异无统计学意义,但转染 48 h 及 72 h 后,实验组 A172 细胞较对照组生长明显受抑制($t = 8.27, P < 0.05$),见图 3。

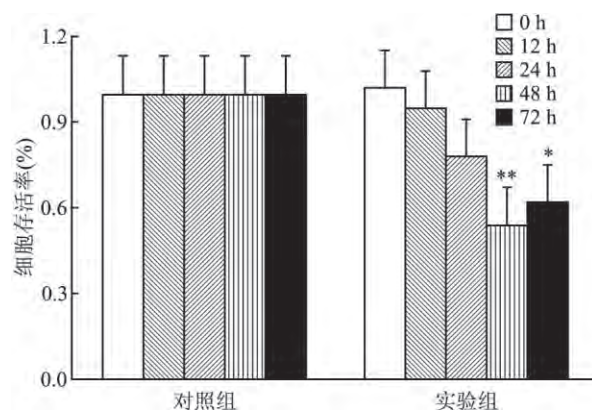


图3 不同时间点 A172 细胞增殖生长情况
与对照组同一时间比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 Ska2 基因对 A172 细胞增殖克隆形成能力的影响 10 d 后将做细胞克隆实验的 6 孔板放置在显微镜下,观察实验组与对照组细胞克隆增殖的情况。与对照组比较,实验组细胞增殖明显受到抑制($t = 10.45, P < 0.01$),见图 4。

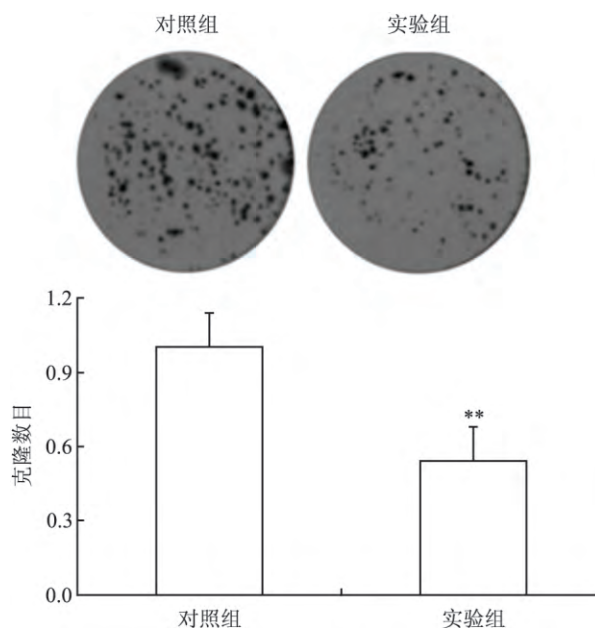


图4 细胞克隆增殖形成情况 $\times 100$
与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.5 A172 细胞中 PCNA 和 Cyclin D1 蛋白表达变化 Western blot 结果显示,两组内参 β -actin 蛋白

的表达相近,而与对照组比较,实验组 PCNA 和 Cyclin D1 蛋白的表达明显减少($t = 12.13, P < 0.01$),见图 5。

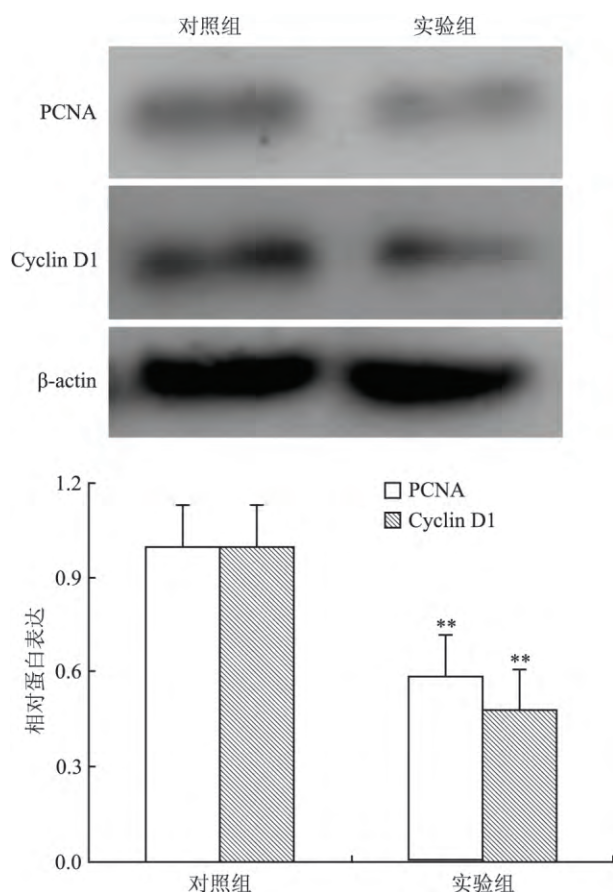


图 5 PCNA 与 Cyclin D1 蛋白的表达情况
与对照组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

胶质细胞瘤是人脑组织中最常见的原发性恶性肿瘤,有高度侵袭性、神经破坏性,被认为是人类最致命的癌症之一^[1]。人类对恶性胶质细胞瘤的发病机制尚不清楚,其治疗策略相对有限,目前最主要的治疗手段是手术联合放化疗,但治疗效果仍然不甚理想。因此,研究胶质瘤基因改变的分子机制有助于从根源上发现与肿瘤相关的基因位点,通过阻断和促进某位点基因的表达情况来说明此位点对胶质瘤致瘤性的影响。无限、不受控制地增殖是肿瘤细胞的特性,通过阻断肿瘤细胞无限增殖的致癌基因无疑是研究的热点。

Ska2 是细胞分裂过程中必不可少的调控因子。文献^[6,12-13]证实 Ska2 参与肺癌、乳腺癌等多种肿瘤发生发展过程。本实验采用 siRNA 沉默 Ska2,探究其对 A172 增殖的影响,将胶质细胞

瘤 Ska2 基因沉默作为实验组,同时建立仅予以 siRNA 阴性对照序列的对照组与之相比较。对两组细胞进行实验后,首先 qRT-PCR 和 Western blot 结果均证实 Ska2-siRNA 可明显抑制胶质瘤细胞中 Ska2 mRNA 转录和蛋白表达。随后,验证 Ska2 是否影响胶质瘤细胞的增殖。MTT 实验结果提示实验组在转染 Ska2-siRNA 后,细胞增殖生长显著受到抑制;克隆实验结果证实了实验组细胞增殖克隆形成能力显著受到抑制。实验结果均支持沉默 Ska2 后,可以抑制胶质瘤细胞的增殖活性。由此可见 Ska2 基因是一种重要潜在的原癌基因,在促进肿瘤增殖生长中有重要作用。

文献^[2]报道 Ska2 可通过参与糖皮质激素受体相关信号通路来调节细胞增殖。糖皮质激素因能抑制肿瘤细胞生长而被广泛用作肿瘤化疗药物。某些小细胞肺癌细胞也因本身糖皮质激素受体缺陷而表现出对糖皮质激素的耐药性^[4]。Ska2 通过与糖皮质激素受体的直接相互作用而调节糖皮质激素受体的功能及糖皮质激素的细胞增殖抑制作用。过表达 Ska2 可导致 Dex 激活的糖皮质激素受体转录激活活性得到进一步增强;而采用 RNAi 技术抑制 Ska2 的表达后, Dex 激活的糖皮质激素受体转录激活活性和细胞增殖抑制能力均显著削弱或丧失^[2]。此外,敲减糖皮质激素受体 β 可特异性的抑制胶质瘤细胞增殖的能力^[3]。

为进一步深入研究 Ska2 是如何调控胶质瘤细胞增殖分子机制,本研究检测了增殖相关蛋白 Cyclin D1 与 PCNA 在实验组和对照组中的表达情况。Western blot 结果提示敲减 Ska2 基因后,实验组增殖相关蛋白 PCNA 与 Cyclin D1 的表达含量与对照组比较明显抑制。以上实验结果说明沉默 Ska2 基因从而抑制胶质瘤细胞的增殖可能与减少了增殖相关蛋白 Cyclin D1 与 PCNA 的表达有关。

结合本次研究结果及 Ska2 对肺癌、乳腺癌等多种肿瘤的表达情况综合考虑, Ska2 基因与胶质瘤发生、发展密切相关。siRNA 特异性沉默 Ska2 基因后,明显抑制了胶质瘤细胞 A172 的增殖活性,因此 Ska2 基因可能是治疗胶质瘤及其他肿瘤潜在的理想靶点。然而对于 Ska2 基因在胶质瘤细胞中的确切作用机制、作用途径及 Ska2 基因与其他和胶质瘤相关的基因相互作用的关系尚有待于进一步阐明。

参考文献

- Jeyaparakash A A, Santamaria A, Jayachandran U, et al. Structur-

- al and functional organization of the ska complex, a key component of the kinetochore-microtubule interface [1]. *Mol Cell*, 2012, 46(3): 274 – 86.
- [2] Hanisch A, Sillje H H, Nigg E A. Timely anaphase onset requires a novel spindle and kinetochore complex comprising Ska1 and Ska2 [1]. *EMBO J*, 2006, 25(23): 5504 – 15.
- [3] Williams G H, Stoeber K. The cell cycle and cancer [1]. *J Pathol*, 2012, 226(2): 352 – 64.
- [4] 杜 刚, 卜友泉, 杨正梅, 等. 人 FAM33A 基因启动子的克隆与鉴定 [1]. *医学分子生物学杂志*, 2009, 6(3): 219 – 24.
- [5] Chan Y W, Jeyaparakash A A, Nigg E A, et al. Aurora B controls kinetochore-microtubule attachments by inhibiting ska complex-kmn network interaction [1]. *J Cell Biol*, 2012, 196(5): 563 – 71.
- [6] Shi W, Gerster K, Alajez N M, et al. MicroRNA-301 mediates proliferation and invasion in human breast cancer [1]. *Cancer Res*, 2011, 71(8): 2926 – 37.
- [7] 谢濛宇, 张 莹, 张春冬, 等. Ska2/FAM33A: 一个参与细胞周期调控与肿瘤发生的新基因 [1]. *中国细胞生物学学报*, 2013, 35(2): 234 – 9.
- [8] Bertrand F E, Steelman L S, Chappell W H, et al. Synergy between an IGF-1R antibody and Raf/MEK/ERK and PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in suppressing IGF-1R-mediated growth in hematopoietic cells [1]. *Leukemia*, 2006, 20(7): 1254 – 60.
- [9] Boks M P, Rutten B P, Geuze E, et al. Ska2 methylation is involved in cortisol stress reactivity and predicts the development of post-traumatic stress disorder (ptsd) after military deployment [1]. *Neuropsychopharmacology*, 2016, 41(5): 1350 – 6.
- [10] Wang Y, Zhang Y, Zhang C, et al. The gene pair prr11 and ska2 shares a nf- γ -regulated bidirectional promoter and contributes to lung cancer development [1]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1849(9): 1133 – 44.
- [11] Thakkar J P, Dolecek T A, Horbinski C, et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma [1]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014, 23(10): 1985 – 96.
- [12] Rice L, Waters C E, Eccles J, et al. Identification and functional analysis of SKA2 interaction with the glucocorticoid receptor [1]. *J Endocrinol*, 2008, 198(3): 499 – 509.
- [13] Lu Z, Li Y, Takwi A, et al. miR-301a as an NF- κ B activator in pancreatic cancer cells [1]. *EMBO J*, 2011, 30(1): 57 – 67.
- [14] Patki M, Gadgil S, Huang Y, et al. Glucocorticoid receptor status is a principal determinant of variability in the sensitivity of non-small-cell lung cancer cells to pemetrexed [1]. *J Thorac Oncol*, 2014, 9(4): 519 – 26.
- [15] Wang Q, Lu P H, Shi Z F, et al. Glucocorticoid receptor β acts as a co-activator of T-Cell factor 4 and enhances glioma cell proliferation [1]. *Mol Neurobiol*, 2015, 52(3): 1106 – 18.

Effects of Ska2 silencing on the cell proliferation of human glioma cells

He Xiaojun, Ma Chunchun, Bian Erbao, et al

(*Dept of Neurosurgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601*)

Abstract Objective To analyze the effects of Ska2 after siRNA silencing on human glioma cells growth and its potential molecular mechanisms. **Methods** The cultured human glioblastoma cell line A172 was divided into two different groups: the control group and the experimental group. The control group was treated with siRNA negative sequence transfection; the experimental group with siRNA-Ska2 sequence transfection. 48 hours later, the expressions of Ska2 mRNA was analyzed by qRT-PCR. The protein expressions of Ska2, PCNA, and CyclinD1 were analyzed by Western blot. The proliferation ability and the colony-formation ability of cell were investigated through MTT Assay and cell cloning Assay. **Results** qRT-PCR analysis showed that mRNA expression in Ska2 of the experimental group was significantly reduced compared with the control group($P < 0.01$); Western blot indicated a great decline of Ska2 in PCNA and CyclinD1 protein expression in the experimental group($P < 0.01$); MTT Assay revealed that the number of viable cell was lower than that of the control group($P < 0.05$); cloning experiment indicated that colony-formation ability was weaker than that of the control group($P < 0.01$). **Conclusion** Silencing of Ska2 and reducing the gene expression of Ska2 in human glioma cells inhibit cell proliferation.

Key words Ska2; glioma; cell proliferation