

RNA干扰细胞周期蛋白依赖激酶6基因对尤文肉瘤细胞生物学行为的影响

张中卒¹ 黄路² 虞志明¹ 陈翔¹ 韩智敏¹ 杨东¹ 詹平¹ 曹凯¹

1. 南昌大学第一附属医院骨科, 江西 南昌 330006 ;
2. 江西省妇幼保健院儿童保健科, 江西 南昌 330006

[摘要] **背景与目的:** 细胞周期蛋白依赖激酶6(cyclin-dependent kinase 6, CDK6)是一类丝/苏氨酸蛋白激酶, 有实验报道其在尤文肉瘤细胞中呈高表达, 但在尤文肉瘤细胞中的生物学功能及相关机理仍不十分清楚。本研究旨在通过研究小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)沉默CDK6基因表达, 探讨其对尤文肉瘤A673、SK-ES-1细胞生物学行为的影响。**方法:** 将化学合成的CDK6-siRNA转染至A673及SK-ES-1细胞中, 实时荧光定量PCR法检测转染前后细胞中CDK6 mRNA的表达; 蛋白质印迹法(Western blot)检测转染前后细胞CDK6以及CDK6下游因子视网膜母细胞瘤基因(Rb)、磷酸化Rb(P-Rb)的蛋白表达; 分别采用CCK-8法、流式细胞仪、Transwell肿瘤细胞迁移和侵袭实验检测细胞增殖、周期、凋亡、迁移以及侵袭能力的变化。**结果:** 实时荧光定量PCR结果显示, CDK6-siRNA能够明显降低细胞CDK6的表达($P<0.01$)。抑制CDK6表达后细胞的增殖速度明显减缓, 细胞周期分布发生改变, G_0/G_1 期细胞的比例上升, 而S期细胞的比例下降, 细胞的早期凋亡率明显升高($P<0.01$)。各组细胞的迁移能力: untreated组、si-con组及si-CDK6组A673细胞的穿膜细胞数分别为(516.00±58.59)个、(534.00±124.77)个、(192.33±68.92)个, SK-ES-1细胞的穿膜数分别为(371.33±29.67)个、(363.33±60.28)个、(200.00±20.00)个, 差异有统计学意义($P<0.01$); 各组细胞的侵袭能力: untreated组、si-con组及si-CDK6组A673细胞的穿膜细胞数分别为(251.00±42.93)个、(238.67±78.62)个、(94.67±23.03)个, SK-ES-1细胞的穿膜数分别为(310.00±35.36)个、(302.33±41.31)个、(105.00±54.08)个, 差异有统计学意义($P<0.01$)。Western blot检测结果显示, CDK6-siRNA能够明显降低细胞CDK6以及下游因子P-Rb的表达($P<0.01$), 但细胞总Rb表达量无明显变化。**结论:** 针对CDK6基因的特异性小RNA干扰片段能够下调CDK6基因及蛋白的表达, 并抑制尤文肉瘤细胞增殖、侵袭和迁移, 诱导其凋亡。

[关键词] 尤文肉瘤; RNA干扰; 细胞周期蛋白依赖激酶6

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2013.10.002

中图分类号: R73-36 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2013)10-0784-09

Effects of a small interfering RNA targeting CDK6 gene on the biological behaviors of Ewing's sarcoma cells ZHANG Zhong-zu¹, HUANG Lu², YU Zhi-ming¹, CHEN Xiang¹, HAN Zhi-min¹, YANG Dong¹, CAO Kai¹ (1.Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang Jiangxi 330006, China; 2.Department of Child Health and Care, Jiangxi Maternity and Child Health Hospital, Nanchang Jiangxi 330006, China)

Correspondence to: CAO Kai E-mail: osteo.caokai@gmail.com

[Abstract] **Background and purpose:** Cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) is a kind of serine/threonine protein kinase, which has been reported to be over-expressed in the Ewing's sarcoma cells. However, the biological effects and relative mechanisms of CDK6 on Ewing's sarcoma cells are really less known. This study aimed to investigate the effects of CDK6 gene on the biological behaviors of Ewing's carcinoma cells A673 and SK-ES-1, we knocked down CDK6 using a small interfering RNA targeting CDK6. **Methods:** The A673 and SK-ES-1 cells were transfected with a chemical synthesized small interfering RNA which targets CDK6; The real time-PCR and Western blot assays were

performed to detect the mRNA and protein expression levels of CDK6 and its downstream genes Rb and P-Rb in both cells transfected with the siRNAs; The CCK-8, flow cytometry (FCM), migration and invasion assays were performed to identify the proliferation, cell cycle distribution, apoptosis, migration and invasion abilities after the transfection with si-CDK6, respectively. **Results:** The real time-PCR analysis showed the expression of CDK6 was down-regulated in the A673 and SK-ES-1 cells transfected with si-CDK6 ($P<0.01$); Suppression of CDK6 by si-CDK6 inhibited the cell proliferation, induced cell apoptosis and G₀/G₁-Phase cell cycle arrest ($P<0.01$); The cells of A673 migrating through the membrane in untreated group, si-con group and si-CDK6 group were 516.00 ± 58.59 , 534.00 ± 124.77 and 192.33 ± 68.92 , respectively. The numbers of SK-ES-1 cells were 371.33 ± 29.67 , 363.33 ± 60.28 and 200.00 ± 20.00 , respectively. The results showed significant differences in statistics ($P<0.01$); In the invasion assay, the cells of A673 passed through the Matrigel coated membrane in untreated group, si-con group and si-CDK6 group were 251.00 ± 42.93 , 238.67 ± 78.62 and 94.67 ± 23.03 , respectively, and the number of SK-ES-1 cells were 310.00 ± 35.36 , 302.33 ± 41.31 and 105.00 ± 54.08 , respectively. The results showed down-regulation of CDK6 could suppress the cells migration and invasion abilities ($P<0.01$); The Western blot analysis showed the protein levels of CDK6 and its downstream gene phospho-retinoblastoma gene (P-Rb) were down-regulated, while there were no changes in the expression of Rb after transfection. **Conclusion:** CDK6 siRNA specifically and efficiently blocks the constitutively activated CDK6 in human Ewing's sarcoma cells, resulting in inhibition in cell proliferation, migration, invasion and induction of cell apoptosis.

[**Key words**] Ewing's sarcoma; RNA interference; CDK6

尤文肉瘤(Ewing's sarcoma)是常见的恶性骨肿瘤之一,好发于儿童及青少年四肢长骨的骨干。该病具有恶性程度高、病程短、转移率高、复发快的特点,预后极差^[1]。细胞周期蛋白依赖激酶6(cyclin-dependent kinase 6, CDK6)是一类丝/苏氨酸蛋白激酶,通过与细胞周期蛋白D(cyclin D, CCND)结合形成复合物,使视网膜母细胞瘤基因(retinoblastoma gene, Rb)发生磷酸化而促使E2F复合物分离,驱动细胞由G₁期进入S期,促进细胞增殖,介导了细胞周期的调控^[2]。Luce等^[3]实验中发现,在尤文肉瘤细胞株中存在CDK4/6、Rb、E2F1的高表达,提示阻断CDK6可能起到抗肿瘤的作用。本实验通过靶向RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术阻断CDK6-pRb信号的激活,并探讨CDK6-siRNA对尤文肉瘤细胞生物学行为的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系

尤文肉瘤A673、SK-ES-1细胞均购自美国ATCC细胞库。

1.1.2 主要试剂

新生胎牛血清购于PAA公司; RPMI-1640

培养基、McCoy 5A培养基、0.25%胰酶购自Invitrogen公司; DharmaFECT 1 transfection reagents转染试剂、si-CDK6/si-control购自Thermo公司。细胞计数试剂盒(cell counting kit, CCK-8)购自Dojindo公司; PE Annexin-V凋亡检测试剂盒1, Transwell小室(8.0 μm孔径)以及Matrigel胶购自美国BD公司; CDK6、Rb及磷酸化Rb(P-Rb)的一抗购自Cell signal technology公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠、山羊抗兔HRP标记的二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; X线片为柯达公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与转染

A673及SK-ES-1细胞在含有10%胎牛血清、10 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的培养基中(A673细胞使用RPMI-1640培养基; SK-ES-1细胞使用McCoy 5A培养基), 37 °C、CO₂体积分数为5%及90%饱和湿度的条件下培养。转染前1 d, 以适合的密度传代细胞, 取对数生长期的细胞进行转染。将化学合成的CDK6 siRNA按照DharmaFECT 1 transfection reagents转染试剂说明书分别转染至A673、SK-ES-1细胞中, 实验分为3组: si-CDK6组(转染si-CDK6)、si-con组(转染si-CDK6-control)、untreated组(仅加入脂质体), 转染后6 h换新鲜完全培养基, 继续

培养以用于后续实验。

1.2.2 实时定量PCR检测转染前后CDK6表达量的变化

转染换液后48 h, 运用TRIzol法分别提取3组细胞的总RNA, 根据逆转录试剂盒使用说明将RNA逆转录成cDNA, 再以cDNA为模板, 应用PRISM 7000型定量PCR仪(Applied Biosystems)进行定量PCR检测, 以GAPDH作为内参。检测引物设计如下: CDK6顺义链5'-GGACTTTCTTCATTCACACCG-3', CDK6反义链5'-GACCACTGAGGT TAGGCCA-3', GAPDH顺义链5'-TCAACGACCACTT TGTCAAGCTCA-3', GAPDH反义链5'-GCTGGTGGTCCAGGGGTCTTACT-3'。PCR反应条件: 95 °C 变性30 s后95 °C延伸5 s, 60 °C延伸20 s, 共40个循环, PCR扩增结束后绘制熔解曲线, 对目的基因的表达采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法行相对定量分析。

1.2.3 CCK-8法检测细胞增殖活性

转染换液后16 h, 0.25%胰酶消化收集细胞, 离心后重悬于新鲜完全培养基, 铺于96孔板中, 0.8×10^3 个/孔(100 μ L/孔), 每个处理组设置5个复孔, 待细胞贴壁后测定细胞活性(0 h), 然后每隔24 h采用CCK-8试剂盒检测1次细胞活性。CCK-8试剂盒里的WST-8试剂与线粒体内的脱氢酶还原生成橙黄色的晶体, 细胞活性越强, 颜色越深。在检测前2 h在每孔加入10 μ L CCK-8液, 37 °C温育2 h后, 用自动酶标平板阅读仪于450 nm波长处读取吸光度(A)值, 设定650 nm作为参比波比, 并扣除参比A值。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期变化

转染换液后16 h, 更换为无血清培养基, 将细胞饥饿24 h后加入完全培养基, 培养36 h后胰酶消化收集细胞, 用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤2遍。再将细胞重悬于100 μ L PBS中, 缓慢加入到400 μ L预冷的无水乙醇中, 室温固定1 h后离心去乙醇。PBS洗涤细胞2遍后再次重悬于100 μ L PBS, 加入50 μ g/mL的PI和100 μ g/mL

的RNase A, 4 °C避光温育30 min, 补加400 μ L PBS过滤后480 nm波长进行流式周期检测。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡变化

细胞转染后48 h(3%血清培养), 用不含EDTA的胰酶消化贴壁细胞, PBS洗涤细胞2遍。将 5×10^5 个细胞重悬于100 μ L结合缓冲液中。加入5 μ L PE标记的 Annexin V和5 μ L 7-AAD染料, 轻轻混匀后室温避光反应15 min。补加200 μ L结合缓冲液, 1 h内进行流式细胞仪检测。

1.2.6 Transwell肿瘤迁移实验

细胞转染24 h后, 将培养小室插入到24孔板中, 取 2×10^5 个转染后细胞重悬于200 μ L无血清的培养基中, 将细胞混合液缓慢加入到小室的上层; 小室的下层中加入含20%的FBS培养基作为趋化因子, 37 °C、CO₂体积分数为5%的条件下培养24 h后, 取出小室, 吸出小室中培养基, 小心擦去上层细胞, PBS洗2次, 倒置晾干, 甲醇室温固定10 min, 倒置晾干, 0.1%结晶紫染色5 min, 清水轻轻浸洗数次, 倒置晾干, 刀片揭膜, 中性树胶封片。镜下观察, 随机计数6个视野, 计算结晶紫染色细胞数, 即为穿膜细胞。

1.2.7 体外侵袭实验检测细胞侵袭能力变化

将冻存于-20 °C的Matrigel胶4 °C过夜融化, 用4 °C预冷的无血清培养基稀释Matrigel至1 mg/mL, 冰上操作。将40 μ L稀释后的Matrigel胶包被小室多聚碳酸酯膜的上室面, 37 °C温育4~5 h, 胶凝固后备用; 转染换液后24 h, 取 4×10^5 个细胞重悬于200 μ L无血清的培养基中, 将细胞混合液加入到Matrigel胶的上层; 小室的下层中加入含20% FBS的培养基作为趋化因子。CO₂体积分数为5%、37 °C条件下培养24 h后, 取出小室, 吸出小室中培养基, 小心擦去上层细胞, PBS洗2次, 倒置晾干, 甲醇室温固定10 min, 倒置晾干, 0.1%结晶紫染色5 min, 用蒸馏水轻轻浸洗数次, 倒置晾干, 刀片揭膜, 中性树胶封片。显微镜下随机计数6个视野穿膜细胞并进行统计。

1.2.8 蛋白质印迹法(Western blot)检测细胞中相关蛋白水平变化

提取各组细胞中的总蛋白并用BCA法测蛋白浓度,取30 μg 蛋白行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),湿转硝酸纤维素膜(PVDF膜)后5%脱脂牛奶封闭1 h,分别与CDK6(1:1 200)、Rb(1:1 200)、P-Rb(1:800)、GAPDH(1:60 000)蛋白特异性一抗稀释液4 $^{\circ}\text{C}$ 温育过夜,采用TBST缓冲液漂洗5次,每次5 min,加入相应浓度的辣根过氧化物酶标记的二抗稀释液,室温1 h,采用TBST缓冲液漂洗5次,每次5 min,用ECL化学发光剂反应,暗室下显影。

1.3 统计学处理

所有检测方法均设3份平行试验,采用SPSS 15.0软件进行统计学处理。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间数据比较采用 t 检验分析,两组以上数据比较采用方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CDK6在尤文肉瘤A673、SK-ES-1细胞中的表达

实时荧光定量PCR检测结果显示,si-

CDK6组A673细胞中CDK6的mRNA表达水平与untreated组及si-con组相比,分别下降约93.4%($P<0.001$)和93.3%($P<0.001$);SK-ES-1细胞中CDK6的mRNA表达水平较untreated组及si-con组下降约85.2%($P<0.001$)和84.6%($P<0.001$),而si-con组和untreated组A673及SK-ES-1细胞的CDK6表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),表明转染后,CDK6在两组细胞中表达明显受到抑制(图1)。

2.3 si-CDK6抑制尤文肉瘤A673、SK-ES-1细胞增殖

本研究运用CCK-8法,分别检测了细胞0、24、48、72、96 h各组细胞的增殖活性,并绘制了细胞生长曲线。转染24 h,3组A673与SK-ES-1细胞的增殖活性差异无统计学意义($P>0.05$),而转染48 h,si-CDK6组细胞增殖活性明显下降,差异有统计学意义($P<0.01$),untreated组和si-con组细胞增殖活性差异无统计学意义($P>0.05$,图2)。

2.3 低表达CDK6后尤文肉瘤A673、SK-ES-1细胞周期分布发生改变

流式细胞术分析显示,低表达CDK6后细胞的周期分布发生改变,si-CDK6组A673细胞

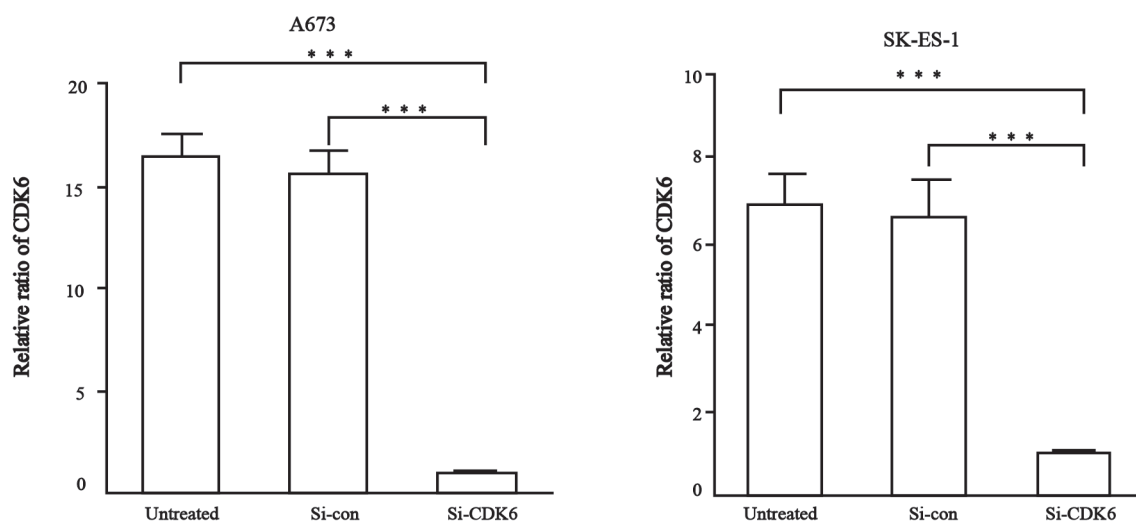


图1 Real time-PCR检测CDK6在尤文肉瘤A673、SK-ES-1细胞中的表达

Fig. 1 The expressions of CDK6 in A673 and SK-ES-1 cells were detected by real time PCR

Si-CDK6: Transfected with si-CDK6; Si-con: Transfected with si-CDK6-control; Untreated: Transfected with liposome; ***: $P<0.001$ vs untreated or si-con.

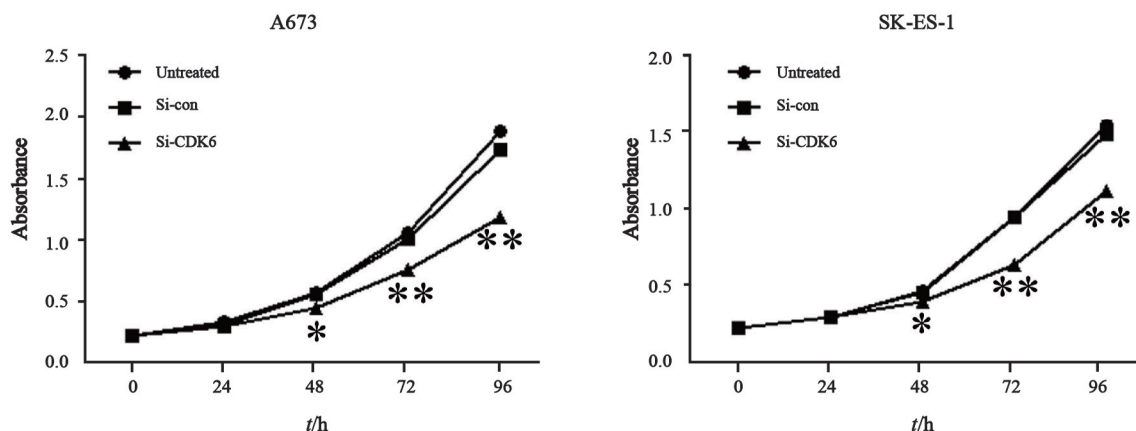


图2 CCK-8法检测转染后A673以及SK-ES-1细胞的增殖活性

Fig. 2 The cell proliferations of A673 and SK-ES-1 were detected by CCK-8 assay after transfection

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ vs untreated or si-con.

中 G_0/G_1 期比例为 $(65.40 \pm 0.79)\%$, 较untreated组 $(50.11 \pm 1.40)\%$ 和si-con组 $(51.31 \pm 1.46)\%$ 明显升高 $(P < 0.001)$, 而S期细胞 $(27.48 \pm 0.96)\%$ 较untreated组 $(42.59 \pm 2.00)\%$ 和si-con组 $(39.86 \pm 2.10)\%$ 则明显减少 $(P < 0.001)$, untreated组与si-con组差异无统计学意义 $(P > 0.05)$ 。SK-ES-1细胞周期实验结果类似。表明si-CDK6能明显抑制A673以及SK-ES-1细胞从 G_1 期进入S期, 阻滞细胞的周期进程

(图3)。

2.4 低表达CDK6后各组尤文肉瘤A673、SK-ES-1细胞凋亡率比较

si-CDK6组A673细胞凋亡率为 $(30.13 \pm 4.21)\%$, 较untreated组 $(15.40 \pm 1.99)\%$ 和si-con组 $(16.17 \pm 2.12)\%$ 明显升高 $(P < 0.01)$, SK-ES-1细胞凋亡率为 $(41.60 \pm 3.77)\%$, 也较untreated组 $(23.67 \pm 2.85)\%$ 和si-con组

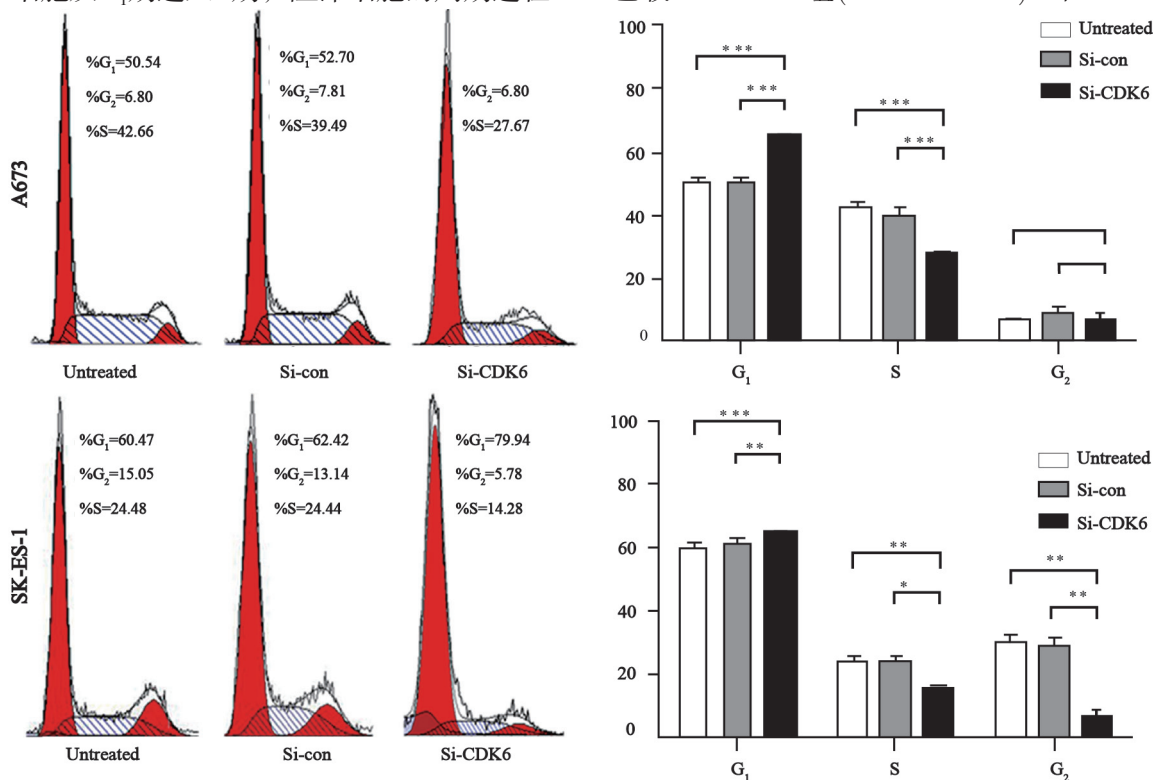


图3 流式细胞术检测转染后A673以及SK-ES-1细胞的周期变化

Fig. 3 Cell cycle distributions of A673 and SK-ES-1 cells were detected by flow cytometry after transfection

** : $P < 0.01$; *** : $P < 0.001$ vs untreated or si-con.

(24.93±2.77)%明显升高($P<0.01$)。untreated组和si-con组差异均无统计学意义($P>0.05$)。表明si-CDK6能促进尤文肉瘤A673、SK-ES-1细胞的凋亡(图4)。

2.5 si-CDK6抑制尤文肉瘤A673、SK-ES-1细胞的迁移

Transwell迁移实验结果显示, si-CDK6组A673、SK-ES-1细胞穿膜数分别为(192.33±68.92)个和(200.00±20.00)个, 较untreated组 [(516.00±58.59)个、(371.33±29.67)个] 和si-con组 [(534.00±124.77)个、(363.33±60.28)个] 明显减少, 差异均有统计学意义($P<0.05$, 图5)。而si-con组和untreated组差

异均无统计学意义($P>0.05$)。表明si-CDK6能抑制尤文肉瘤A673、SK-ES-1细胞的迁移。

2.6 si-CDK6抑制尤文肉瘤A673、SK-ES-1细胞的侵袭

Matrigel侵袭实验结果显示, si-CDK6组A673及SK-ES-1细胞穿膜数分别为(94.67±23.03)个和(105.00±54.08)个, 较untreated组 [(251.00±42.93)个、(310.00±35.36)个] 和si-con组 [(238.67±78.62)个、(302.33±41.31)个] 明显减少, 差异均有统计学意义($P<0.05$, 图6)。而si-con组和untreated组组间差异均无统计学意义($P>0.05$)。表明si-CDK6能抑制尤文肉瘤A673、SK-ES-1细胞的侵袭。

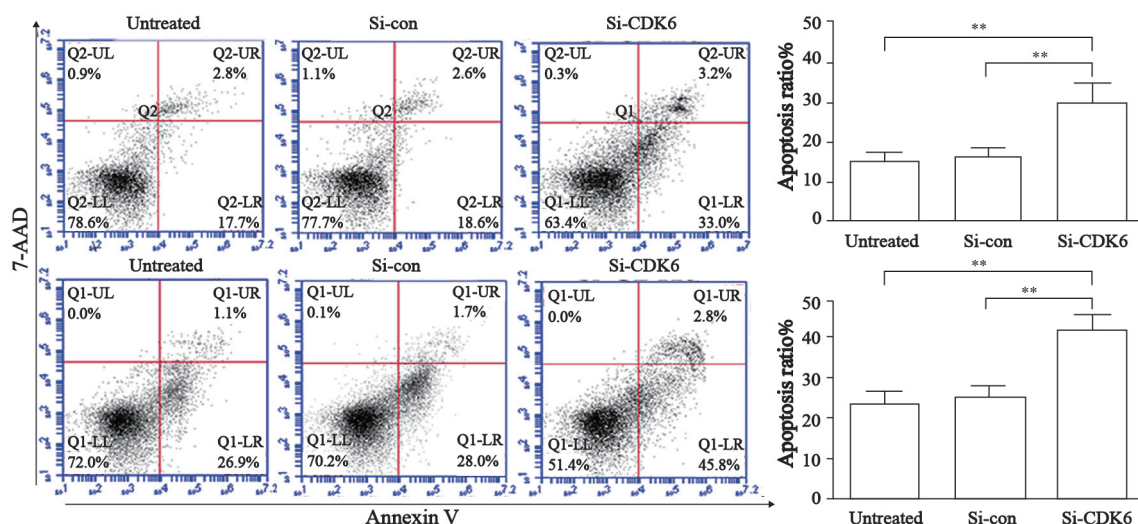


图4 流式细胞术检测转染后A673以及SK-ES-1细胞凋亡变化

Fig. 4 The apoptosis rates of A673 and SK-ES-1 cells were detected by flow cytometry after transfection

** : $P<0.01$ vs untreated or si-con.

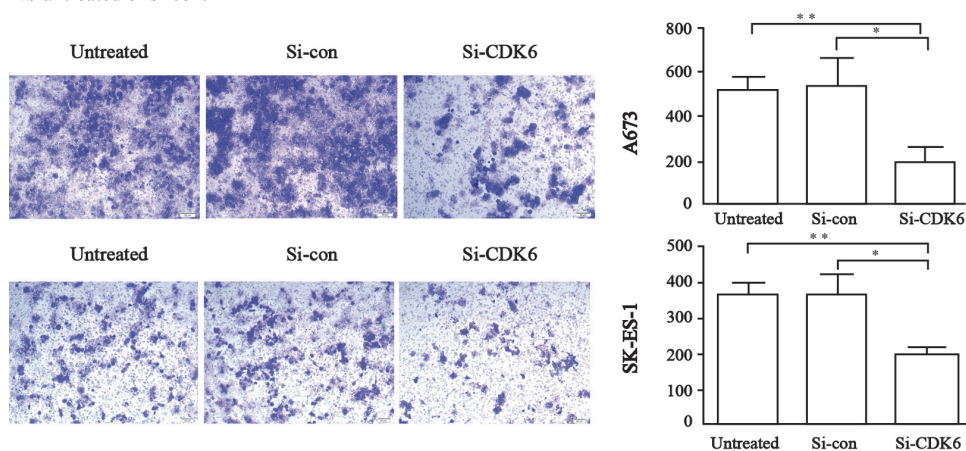


图5 Transwell迁移实验检测转染后A673及SK-ES-1细胞迁移能力的变化

Fig. 5 Transwell assays were performed to detect the migratory abilities of A673 and SK-ES-1 cells after transfection

* : $P<0.05$; ** : $P<0.01$ vs untreated or si-con.

(×100 stained with crystal violet)

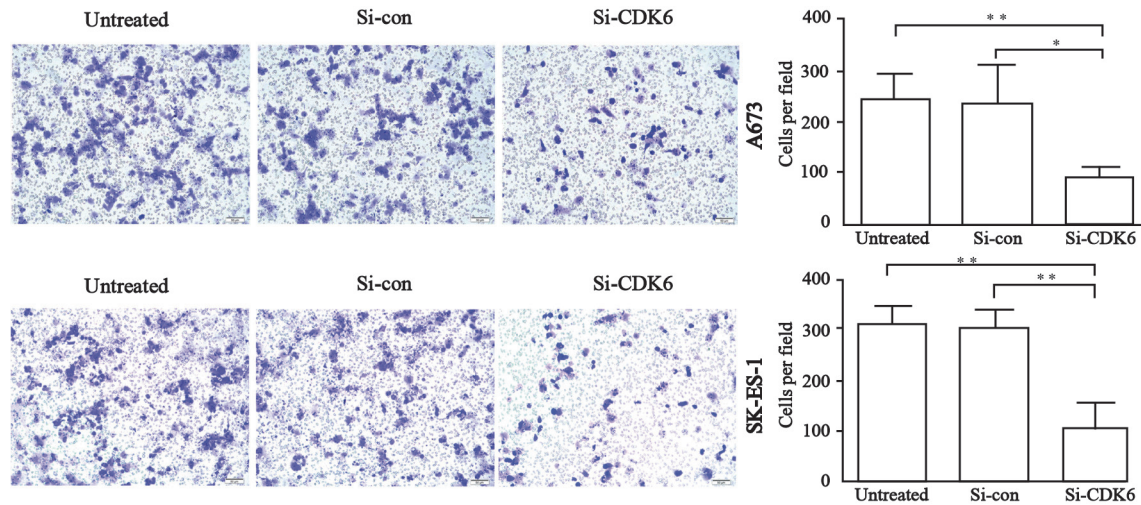


图6 Matrigel侵袭实验检测转染后A673及SK-ES-1细胞侵袭能力的变化

Fig. 6 Matrigel invasion assays were performed to detect the invasive abilities of A673 and SK-ES-1 cells after transfection

($\times 100$ stained with crystal violet)

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ vs untreated or si-con.

2.7 si-CDK6后CDK6、P-Rb、Rb蛋白的表达

Western blot检测显示, 转染si-CDK6后细胞中CDK6的蛋白表达水平下降, 同时CDK6下游靶基因P-Rb的表达也下降, 但是总Rb的蛋白水平无明显变化(图7)。

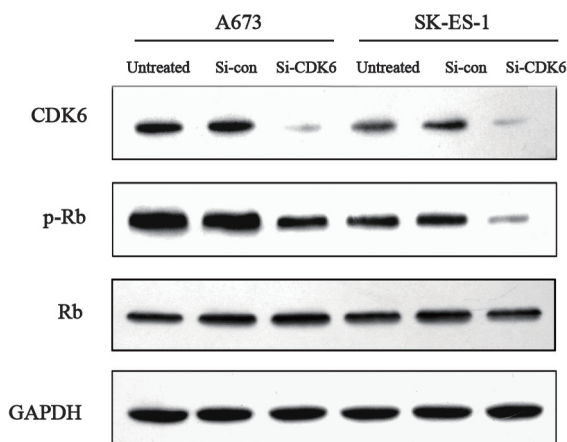


图7 Western blot 检测CDK6干扰后相关蛋白的表达

Fig.7 Western blot assay was performed to detect the expression of relevant proteins after si-CDK6 transfection

3 讨论

细胞周期的紊乱是肿瘤发生的基本特性之一, 其中发挥重要调控作用的就是细胞周期依赖蛋白激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)家族。CDKs是一类丝/苏氨酸蛋白激酶, 共由11

个家族成员构成, 最主要的有CDK1、CDK2、CDK3、CDK4和CDK6^[4], 这些蛋白激酶共同调节了细胞有序的周期活动。其中CDK4和CDK6在调控细胞向增殖和分化过程中发挥重要作用, CDK6与周期蛋白D(cyclin D, CCND)结合后, Rb被磷酸化。P-Rb作用于核内E2F/DP复合物, 使得E2F与DP失偶联, 脱离后的E2F作用于下游转录因子, 促使细胞由G₁期向S期转化^[5]。CDK6表达增加, P-Rb生成增多, 将加速细胞由G₁期进入S期, 促进细胞的增殖, 导致肿瘤的发生。目前, 在多种肿瘤组织中均检测到了CDK6的表达失衡, 如胶质母细胞瘤和淋巴系统的恶性肿瘤等^[6-8]。最近实验发现, CDK6除了磷酸化Rb外, 还能磷酸化核转录因子(nuclear factor-kappaB, NF- κ B)的536位丝氨酸(Ser), 降低其活性^[9]。NF- κ B是体内重要的核转录激活因子, 能够调控细胞多种生物学过程相关基因的表达, 包括炎症反应、免疫反应以及肿瘤发生等^[10], 表明CDK6在生物学进程中可能发挥着更加重要的生物学作用。Luce等^[3]实验中发现尤文肉瘤细胞株中存在CDK6、P-Rb和E2F的高表达, 提示CDK6在尤文肉瘤中可能发挥重要的作用。

为研究CDK6基因在尤文肉瘤生物学过程中的可能作用, 本实验将化学合成的CDK6 siRNA转染至尤文肉瘤细胞株内, 经RT-PCR及Western

blot技术验证,其能有效地阻断细胞中CDK6基因表达。随后对细胞进行生物学行为的检测,比较转染前后细胞生物学行为的变化。结果显示,拮抗CDK6表达后,细胞的增殖活性明显下降,细胞的周期分布发生改变,处于G₁期细胞比例增加,而处于S期的细胞比例下降,细胞的凋亡比例增加。此外,体外侵袭和迁移实验显示,沉默CDK6基因表达可明显降低尤文肉瘤细胞的侵袭和迁移能力。提示CDK6在尤文肉瘤中充当癌基因的作用,拮抗CDK6有可能成为肿瘤诊治的新靶点。

为了进一步探讨CDK6在细胞中可能的作用机制,我们检测了CDK6下游因子Rb及P-Rb在细胞表达量的变化。实验结果显示,拮抗CDK6后细胞中P-Rb的表达量下降,但是总Rb无明显变化。提示拮抗尤文肉瘤细胞中CDK6表达所导致的增殖活性下降可能与其抑制Rb磷酸化相关。另外,实验还发现拮抗CDK6后,细胞的侵袭及迁移能力均下降,这可能与CDK6能够调节细胞的运动相关,Fahraeus等^[11]实验发现,在细胞的伸展过程中,CDK6蛋白由胞浆向细胞膜边缘沉积。Liu等^[12]的研究证实,运用药物拮抗前列腺癌细胞中CDK6的表达,通过激活转化生长因子 β (transforming growth factor, TGF)诱导细胞由上皮向间叶组织分化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),这在肿瘤的侵袭与转移过程中发挥重要的作用。但是其对尤文肉瘤细胞侵袭及迁移能力影响的具体作用机制还有待更深入的研究。

拮抗CDK6基因表达具有较强的抑癌作用。PD0332991是第一个进入临床实验的CDK6抑制剂,其通过抑制CDK6对Rb的磷酸化作用,抑制肿瘤细胞的周期进程,但是只能作用于Rb表达阳性的肿瘤细胞,对Rb表达缺失的细胞没有影响^[13]。同时临床I期的实验结果显示,PD0332991在治疗Rb稳定表达的肿瘤患者中,25%的患者出现了剂量限制范围内的不良反应^[14]。所以寻找到一种特异性强,不良反应小的拮抗CDK6的方式是肿瘤治疗的新思路。RNA干扰(RNAi)作为成熟的基因研究技术,通

过双链RNA介导同源靶基因的特异性降解,导致转录后基因沉默^[15]。该技术操作简单,能够高效、特异地抑制靶基因的表达,并且其干扰的效应呈现明显的剂量和时间依赖性,具有分子药理学特点^[16]。所以本研究使用CDK6-siRNA片段干扰细胞中CDK6基因表达,其靶向明确,并且不依赖于细胞中Rb基因的表达,有望成为新型的尤文肉瘤治疗方式,但是其可能存在的不良反应还需大量的动物和临床实验进行验证。

综上所述,本研究结果表明,运用特异性的siRNA能够有效地沉默CDK6基因的表达,为研究其功能提供一个理想的技术平台;拮抗CDK6基因在尤文肉瘤细胞中的表达能明显抑制细胞的增殖,诱导G₁期细胞停滞及凋亡,降低细胞的侵袭和迁移能力,为进一步开展尤文肉瘤的基因治疗提供了理论基础。

[参 考 文 献]

- [1] POTRATZ J, DIRKSEN U, JURGENS H, et al. Ewing sarcoma: clinical state-of-the-art [J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2012, 29(1): 1-11.
- [2] OSCAR M T, SILVIA M L, VICENTE N. Roscovitine is an effective inducer of apoptosis of Ewing's sarcoma family tumor cells in vitro and in vivo [J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 9320-9327.
- [3] LUCE D, CATHERINE D O, THOMAS M, et al. Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates P57 KIP2 and c-Myc expression [J]. *Oncogene*, 2001, 20(25): 3258-3265.
- [4] PINES J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations [J]. *Adv Cancer Res*, 1995, 66: 181-212.
- [5] LEONARD J P, LACASCE A S, SMITH M R, et al. Selective CDK4/6 inhibition with tumor responses by PD0332991 in patients with mantle cell lymphoma [J]. *Blood*, 2012, 119(20): 4597-4607.
- [6] GROSSEL M J, HINDS P W. Beyond the cell cycle: a new role for Cdk6 in differentiation [J]. *J Cell Biochem*, 2006, 97(3): 485-493.
- [7] WIEDEMEYER W R, DUNN I F, QUAYLE S N, et al. Pattern of retinoblastoma pathway inactivation dictates response to CDK4/6 inhibition in GBM [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(25): 11501-11506.
- [8] NAGEL S, LEICH E, QUENTMEIER H, et al. Amplification at 7q22 targets cyclin-dependent kinase 6 in T-cell lymphoma [J]. *Leukemia*, 2008, 22(2): 387-392.

- [9] BUSS H, HANDSCHICK K, JURRMANN N, et al. Cyclin-dependent kinase 6 phosphorylates NF- κ B P65 at serine 536 and contributes to the regulation of inflammatory gene expression [J] . PloS One, 2012, 7(12): e51847.
- [10] HAYDEN M S, GHOSH S. Shared principles in NF- κ B signaling [J] . Cell, 2008, 132(3): 344-362.
- [11] FAHRAEUS R, LANE D P. The p16(INK4a) tumour suppressor protein inhibits alphavbeta3 integrin-mediated cell spreading on vitronectin by blocking PKC-dependent localization of alphavbeta3 to focal contacts [J] . EMBO J, 1999, 18(8): 2106-2118.
- [12] LIU F, KORC M, et al. Cdk4/6 inhibition induces epithelial-mesenchymal transition and enhances invasiveness in pancreatic cancer cells [J] . Mol Cancer Ther, 2012, 11(10): 2138-2148.
- [13] FRY D W, HARVEY P J, KELLER P R, et al. Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts [J] . Mol Cancer Ther, 2004, 3(11): 1427-1438.
- [14] SCHWARTZ G K, LORUSSO P M, DICKSON M A, et al. Phase I study of PD 0332991, a cyclin-dependent kinase inhibitor, administered in 3-week cycles (Schedule 2/1) [J] . Brit J Cancer, 2011, 104(12): 1862-1868.
- [15] FIRE A, XU S, MONTGOMERY M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in caenorhabditis elegans [J] . Nature, 1998, 391(6669): 806-811.
- [16] BARBARA A K, KRITON K, MARTIN T, et al. Inhibition of telomerase activity in human cancer cells by RNA interference [J] . Mol Cancer Ther, 2003, 2(3): 209-216.

(收稿日期: 2013-06-14 修回日期: 2013-09-08)

《中国癌症杂志》2013年征订启事

《中国癌症杂志》是由国家教育部主管、复旦大学附属肿瘤医院主办的全国性肿瘤学术期刊, 读者对象为从事肿瘤基础、临床防治研究的中高级工作者。主要报道内容: 国内外研究前沿的快速报道、专家述评、肿瘤临床研究、基础研究、文献综述、学术讨论、临床病理讨论、病例报道、讲座和简讯等。《中国癌症杂志》已入选中文核心期刊、中国科技核心期刊及全国肿瘤类核心期刊, 并为中国科技论文统计源期刊, 先后被“中国期刊网”、“万方数据——数字化期刊群”和“解放军医学图书馆数据库(CMCC)”等收录。

《中国癌症杂志》为月刊, 大16开, 80页铜版纸(随文彩图), 每月30日出版, 单价8元, 全年96元。国际标准刊号1007-3639, 国内统一标准刊号CN31-1727/R, 邮发代号4-575。

读者可在当地邮局订阅, 漏订者可直接向本刊编辑部订阅。

也欢迎广大作者来稿。

主 编: 沈镇宙

主 任: 秦 娟

联系地址: 上海市东安路270号复旦大学附属肿瘤医院内

《中国癌症杂志》编辑部

邮 编: 200032

电 话: 021-64188274; 021-64175590 × 3574

网 址: www.china-oncology.com

电子邮件: zgaz@163.com