

# RNA干扰STK15基因对人结肠癌细胞增殖和凋亡的影响

李晓钟<sup>1</sup> 王晓霞<sup>2</sup> 安奇君<sup>1</sup> 冯建宏<sup>1</sup> 裴毅<sup>3</sup>

1. 山西省人民医院急诊科, 山西 太原 030032;
2. 山西医科大学生物化学与分子生物学教研室, 山西 太原 030001;
3. 山西医学科学院, 山西大医院老年肿瘤科, 山西 太原 030032

[关键词] STK15; RNA干扰; 结肠癌; 凋亡

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2013.06.013

中图分类号: R735.3+5 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2013)06-0467-04

STK15(serine/threonine kinase 15)是一类广泛存在于真核细胞中的丝氨酸/苏氨酸激酶, 通过磷酸化下游特定底物影响G<sub>2</sub>/M期转换, 促进中心体成熟、双极纺锤体建立以及染色体的分离<sup>[1-2]</sup>。许多研究表明, 多种肿瘤中STK15呈高表达状态, 在肿瘤的发生发展过程中发挥着重要作用<sup>[3-8]</sup>。而作为阻断基因表达的RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术为肿瘤基因治疗提供了新的策略和途径<sup>[9]</sup>。因此, 本研究通过将表达靶向STK15的短发夹状双链RNA(shRNA)表达质粒, 稳定转染人结肠癌细胞系SW480, 观察其对STK15表达的抑制作用, 并进一步研究STK15基因沉默与肿瘤细胞增殖和凋亡的关系, 从而揭示利用RNA干扰技术沉默STK15基因的表达, 将为结肠癌的临床治疗提供新的途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

pGPU6/GFP/Neo-STK15质粒由本室构建, 人结肠癌SW480细胞由本室保存, RPMI-1640培养基、胎牛血清购自Hyclone公司, 脂质体转染试剂Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 购自Invitrogen公司, 逆转录及PCR试剂盒购自TAKARA公司, STK15抗体购自Cell Signal公司,  $\beta$ -actin和Caspase-3抗体购自Santa Cruz公司, 增强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂购自北京普利莱基因技术有限公司, 碘化丙啶(PI)染色液、RNase A购自碧云天生物技术有限公司, 四甲基偶氮唑蓝[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2Htetrazolium bromide, MTT] 购

自北京赛默生物科技有限公司, 二甲基亚砜(DMSO)购自Sigma公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

结肠癌细胞系SW480细胞, 常规培养于含10%胎牛血清、100 U/mL的青霉素、100 mg/L链霉素的RPMI-1640培养液中, 置于37 °C、CO<sub>2</sub>体积分数为5%培养箱中培养。

#### 1.2.2 稳定转染

细胞达70%融合时, 用无血清培养基洗3遍, 将20  $\mu$ L Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000和10  $\mu$ g pGPU6/GFP/Neo-STK15质粒或空载体pGPU6/GFP/Neo分别稀释于500  $\mu$ L无血清培养基中, 室温温育5 min。再将稀释的脂质体与质粒DNA混合, 室温温育20 min后将其加入细胞培养皿内, 补充无血清培养基至2 mL。6 h后补加含20%胎牛血清的培养基2 mL, 24 h后换含10%胎牛血清的培养基。48 h后加入G418筛选, 14 d后获得STK15基因沉默的稳定克隆, 并扩大培养。

#### 1.2.3 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测

参照TRIzol说明书提取细胞总RNA。细胞中加入1 mL TRIzol, 移至EP管中, 再加入0.2 mL氯仿, 室温下放置2~3 min后, 12 000 $\times$ g离心15 min, 取上层水相置于新EP管中, 加入0.5 mL异丙醇, 室温下放置10 min, 12 000 $\times$ g离心10 min。弃上清液, 加1 mL 75%乙醇进行洗涤沉淀, 10 000 $\times$ g离心5 min, 弃上清液。沉淀RNA自然干燥后用DEPC水溶解。以RNA为模板, Random 6 mers和Oligo dT 为引物, 在逆转录缓冲液中经逆转录酶

基金项目: 国家自然科学基金(No: 30973401); 山西省自然科学基金(No: 2009011052)。

通信作者: 王晓霞 E-mail: wxiaoxia99007@yahoo.com.cn

催化生成cDNA。再以cDNA为模板，dNTP为原料，在PCR缓冲液中经Taq酶催化扩增STK15基因，上游引物为：5'-AATGATTGAAGGTCGGATGC-3'；下游引物为：5'-TTCTCTGAGCATTGGCCTCT-3'。以看家基因GAPDH为内参照，其引物为：上游：5'-GCTGAGAACGGGAAGCTTGT-3'；下游：5'-GCCAGGGGTGCTAAGCAGTT-3'。引物由TAKARA公司合成。反应条件为：94℃ 30s变性，58℃ 30s退火，72℃ 30s延伸，共30个循环。PCR扩增结束后，经琼脂糖凝胶电泳鉴定结果。图像分析系统测定灰度值。

#### 1.2.4 蛋白质印迹法(Western blot)检测

细胞中加入蛋白裂解液(50 mmol/L Tris (pH为7.4), 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1 μg/mL Aprotinin, 1 μg/mL leupeptin, 100 μg/mL PMSF), 冰上作用40 min, 12 000×g, 离心20 min, 取上清液即为细胞总蛋白。蛋白加热变性后, 经10% SDS-PAGE电泳分离, 然后电转移至硝酸纤维素膜上。用含5%脱脂奶粉的PBS溶液封闭2 h, 加入兔抗人多克隆一抗STK15(1:1 000)或Caspase-3(1:1 000), 4℃温育过夜。洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的兔抗羊二抗(1:2 000), 室温下温育1 h。ECL法检测目的条带。β-actin作为内参。图像分析系统测定灰度值。

#### 1.2.5 MTT法检测细胞的增殖情况

将对数生长期细胞消化后制成单细胞悬液, 以每孔3 000个接种于96孔培养板上, 置于37℃、CO<sub>2</sub>体积分数为5%培养箱培养, 每组6孔, 分别在第1、3、5、7、9天以MTT法检测其吸光度(A)值。每孔中加入浓度为0.2 mg/mL的MTT液100 μL继续培养3 h, 吸去上清液, 加入DMSO 150 μL/孔, 充分震荡10 min后, 用酶标仪在570 nm波长比色测定每孔A值, 绘制生长曲线。

#### 1.2.6 流式细胞技术检测细胞凋亡率

收集细胞, PBS洗3次, 冷乙醇4℃固定过夜。上机前500×g离心收集细胞, 加入RNase A(1 mg/mL), 37℃水浴30 min, 再加入PI染色液(50 μg/mL), 至4℃避光30 min, 用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率。

#### 1.2.7 统计学处理

应用SPSS 11.5软件进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用t检验分析,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 RT-PCR检测STK15 mRNA表达的抑制情况

pGPU6/GFP/Neo-STK15质粒及空载体pGPU6/GFP/Neo转染细胞, 经G418筛选稳定克隆后, 采用RT-PCR检测STK15 mRNA水平的表达。与对照组相比, 筛选到的两个STK15基因沉默稳定细胞系(将其分别命名为pGPU6-STK15-1和pGPU6-STK15-2)中, STK15 mRNA表达水平明显降低。灰度分析显示, 与对照组相比, pGPU6-STK15-1和pGPU6-STK15-2细胞中STK15 mRNA水平分别下调90%和88%。表明稳定转染pGPU6/GFP/Neo-STK15质粒的细胞中STK15 mRNA的表达明显受到抑制(图1)。

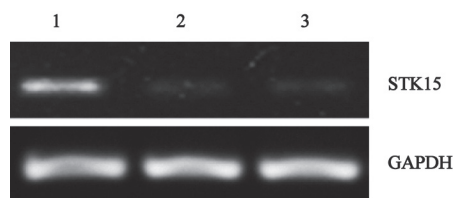


图1 RNAi对STK15 mRNA表达的影响

Fig. 1 Effect of RNAi-STK15 on STK15 mRNA expression

1: Control; 2: pGPU6-STK15-1; 3: pGPU6-STK15-2.

### 2.2 Western blot检测STK15蛋白表达的抑制情况

与对照组相比, pGPU6-STK15-1和pGPU6-STK15-2细胞系中, STK15蛋白表达水平明显降低。灰度分析显示, 与对照组相比, pGPU6-STK15-1和pGPU6-STK15-2细胞中STK15蛋白水平分别下调89%和85%。表明稳定转染pGPU6/GFP/Neo-STK15质粒的细胞中STK15蛋白的表达也受到明显抑制(图2)。

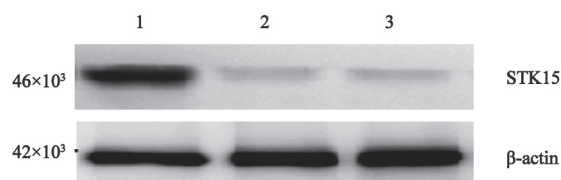


图2 RNAi对STK15蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of RNAi-STK15 on STK15 protein expression

1: Control; 2: pGPU6-STK15-1; 3: pGPU6-STK15-2

### 2.3 RNAi-STK15对SW480细胞增殖的影响

与对照组相比, pGPU6-STK15-1和pGPU6-STK15-2细胞系的增殖能力明显降低, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。表明STK15基因沉默能抑制肿瘤细胞的增殖(图3)。

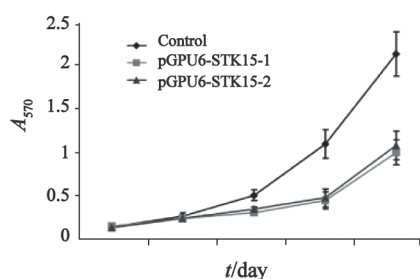


图3 RNAi-STK15对SW480细胞增殖的影响

Fig. 3 Effect of RNAi-STK15 on SW480 cell proliferation

#### 2.4 RNAi-STK15对SW480细胞凋亡的影响

流式细胞技术分析显示, 对照组细胞的凋亡率为3.8%, pGPU6-STK15-1和pGPU6-STK15-2细胞系的凋亡率分别为12.9%和11.8%(图4A), 重复实验3次后经统计分析, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。Western blot分析显示, 与对照组相比, pGPU6-STK15-1和pGPU6-STK15-2细胞系中, Caspase-3酶原蛋白表达量明显降低, 而Caspase-3剪切带表达明显增加(图4B)。表明STK15基因沉默能促进肿瘤细胞的凋亡。

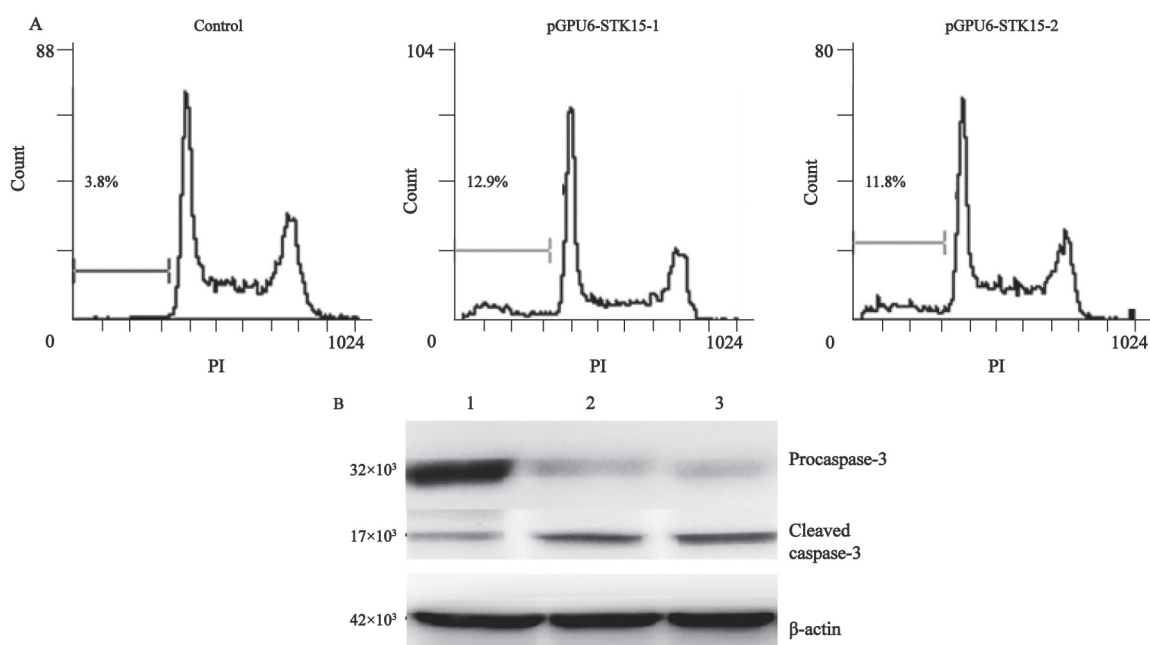


图4 RNAi-STK15对SW480细胞凋亡的影响

Fig. 4 Effect of RNAi-STK15 on SW480 cell apoptosis

1: Control; 2: pGPU6-STK15-1; 3: PGPU6-STK15-2.

### 3 讨论

结肠直肠癌是较为常见的消化道恶性肿瘤之一, 其发病率有逐渐上升的趋势。目前治疗方法仍以传统的放化疗和手术治疗为主, 但预后较差。因此, 寻求有效的结肠直肠癌治疗方法至关重要。

人类STK15基因, 又称BTAK、ARK1、AIK1、STK6、Aurora-A、Aurora-2, 编码一含403个氨基酸的蛋白质, 相对分子质量为 $46 \times 10^3$ , 属于丝/苏氨酸激酶家族成员<sup>[1-2]</sup>。许多研究表明STK15是一种潜在的癌基因, 在多种肿瘤中呈高表达状态, 并在肿瘤的发生、发展过程中起到了重要的作用<sup>[3-8]</sup>。Bischoff等<sup>[8]</sup>研究表明,

STK15在结肠癌中也存在高表达。因此, 抑制STK15基因的表达将可能为结肠癌的治疗提供新的思路。RNA干扰技术是利用双链RNA特异性地降解具有同源序列的mRNA, 从而阻断相应基因的表达<sup>[9]</sup>。由于其介导了精确的基因沉默, 因此, 通过RNA干扰抑制癌基因的表达成为了一种新的治疗策略。研究报道, RNA干扰介导的沉默STK15基因的表达能抑制食管癌<sup>[10]</sup>和乳腺癌<sup>[11]</sup>等肿瘤细胞的增殖, 促进肿瘤细胞凋亡。而关于STK15基因干扰后对结肠癌细胞SW480增殖和凋亡的影响鲜见文献报道。

本研究表明, 通过将STK15基因的shRNA真核表

达质粒pGPU6/GFP/Neo-STK15转染人结肠癌细胞系SW480, RT-PCR及Western blot均证实RNAi有效沉默了STK15基因的mRNA及蛋白表达。而且MTT实验证实, STK15基因沉默能抑制肿瘤细胞的增殖。同时流式细胞技术分析证实, STK15基因沉默能促进肿瘤细胞的凋亡。我们进一步通过检测Caspase-3的表达分析了STK15基因沉默对凋亡的影响。Caspase-3是一类天冬氨酸残基特异性的半胱氨酸蛋白酶, 在细胞凋亡过程中起关键作用。Caspase-3在Caspase家族诱导的蛋白酶级联反应中处于最后效应阶段, 活化后的Caspase-3促进凋亡小体形成, 是细胞凋亡最终的执行者<sup>[12]</sup>。相对分子质量为 $32 \times 10^3$ 的Caspase-3酶原在活化过程中从Asp28~Ser29和Asp175~Ser176两处被剪切, 从而裂解形成P17和P10两个片段<sup>[13]</sup>。因此, 通过检测Caspase-3表达的变化可以反映细胞的凋亡情况。本研究表明, 与对照组相比, STK15基因沉默组中Caspase-3酶原蛋白表达明显降低, 而Caspase-3剪切带明显增加, 提示Caspase-3活化, 从而进一步证明STK15基因沉默能促进肿瘤细胞凋亡。

综上所述, 通过将靶向STK15的shRNA真核表达载体导入细胞可以高效特异地沉默人结肠癌细胞中STK15的表达。而STK15的表达沉默可以抑制肿瘤细胞的增殖, 促进肿瘤细胞凋亡。因此, 本研究不仅提示了STK15有望成为结直肠癌基因治疗中的新靶点, 而且通过应用RNA干扰的方法抑制STK15基因的表达将可能成为基因治疗的新途径。

#### [参 考 文 献]

- [1] MARUMOTO T, ZHANG D, SAYA H. Aurora-A- a guardian of poles [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(1): 42-50.
- [2] GREEN M R, WOOLERY J E, MAHADEVAN D. Update on aurora kinase targeted therapeutics in oncology [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2011, 6(3): 291-307.
- [3] ZHOU H, KUANG J, ZHONG L, et al. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation [J]. *Nat Genet*, 1998, 20(2): 189-193.
- [4] WANG X, LU N, NIU B, et al. Overexpression of Aurora-A enhances invasion and matrix metalloproteinase-2 expression in esophageal squamous cell carcinoma cells [J]. *Mol Cancer Res*, 2012, 10(5): 588-596.
- [5] LASSUS H, STAFF S, LEMINEN A, et al. Aurora-A overexpression and aneuploidy predict poor outcome in serous ovarian carcinoma [J]. *Gynecol Oncol*, 2011, 120(1): 11-17.
- [6] XU H T, MA L, QI F J, et al. Expression of serine threonine kinase 15 is associated with poor differentiation in lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma [J]. *Pathol Int*, 2006, 56(7): 375-380.
- [7] KUMANO M, MIYAKE H, TERAOKAWA T, et al. Suppressed tumour growth and enhanced chemosensitivity by RNA interference targeting Aurora-A in the PC3 human prostate cancer model [J]. *BJU Int*, 2010, 106(1): 121-127.
- [8] BISCHOFF J R, ANDERSON L, ZHU Y, et al. A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers [J]. *EMBO J*, 1998, 17(11): 3052-3065.
- [9] RAMACHANDRAN P V, IGNACIMUTHU S. RNA interference as a plausible anticancer therapeutic tool [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(6): 2445-2452.
- [10] WANG X, DONG L, XIE J, et al. Stable knockdown of Aurora-A by vector-based RNA interference in human esophageal squamous cell carcinoma cell line inhibits tumor cell proliferation, invasion and enhances apoptosis [J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(19): 1852-1859.
- [11] LONG M, YIN G, LIU L, et al. Adenovirus-mediated Aurora A shRNA driven by stathmin promoter suppressed tumor growth and enhanced paclitaxel chemotherapy sensitivity in human breast carcinoma cells [J]. *Cancer Gene Ther*, 2012, 19(4): 271-281.
- [12] MACKENZIE S H, CLARK A C. Death by caspase dimerization [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 747: 55-73.
- [13] IGNEY F H, KRAMMER P H. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(4): 277-288.

(收稿日期: 2012-12-27 修回日期: 2013-03-18)