

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.11.007

沉默 Nek2 基因对卵巢癌 SKOV3 细胞周期的影响*

范婷婷¹, 唐良菡^{2△}

(1. 重庆市合川区人民医院妇科, 重庆合川 401520; 2. 重庆医科大学附属第一医院妇产科, 重庆 400016)

[摘要] **目的** 研究 RNA 干扰 NIMA 相关激酶 2(Nek2) 表达对卵巢癌细胞 SKOV3 细胞周期的影响及其相关的分子机制。**方法** 将针对 Nek2 基因的 siRNA 转染至 SKOV3 细胞中, 采用流式细胞技术检测 SKOV3 细胞周期变化, 并用 Western blot 技术检测 Nek2-siRNA 转染入卵巢癌 SKOV3 细胞 48 h 后, 与细胞周期相关的因子 cyclinB1、CDK1 及 P27 蛋白表达水平以及 ERK1/2 磷酸化水平的变化。**结果** 空白对照组、阴性对照组和 RNA 干扰组中处于 G₂/M 期的细胞比例分别为 13.72%、12.27% 和 1.56%, 与两对照组比较, 处于 G₂/M 期的干扰组细胞明显减少 ($P < 0.05$)。Nek2 基因沉默后, 与两对照组比较, SKOV3 细胞内 cyclinB1 和 CDK1 的蛋白表达水平明显下降, P27 的蛋白表达水平明显上调, SKOV3 细胞内 ERK1/2 磷酸化水平明显下降 ($P < 0.05$)。**结论** 沉默 Nek2 基因, 可阻止卵巢癌 SKOV3 细胞启动有丝分裂, 从而抑制其增殖。

[关键词] RNA 干扰; 卵巢肿瘤; 细胞周期; NIMA 相关激酶**[中图分类号]** R737.31**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)11-1463-03

Effect of silencing Nek2 gene on cell cycle of ovarian cancer SKOV3 cells*

Fan Tingting¹, Tang Liangdan^{2△}

(1. Department of Gynecology, Hechuan District People's Hospital, Chongqing 401520, China; 2. Department of Gynecology and Obstetrics, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of silencing Nek2 via RNAi on cell cycle of ovarian cancer SKOV3 cells and the related molecular mechanism. **Methods** The Nek2-siRNA was transfected into the ovarian cancer SKOV3 cells. The change of cell cycle of SKOV3 cells at 48 h after transfection was examined by the flow cytometry technique; Western blot assay was used to determine the change of level of the cell cycle related factors cyclinB1, CDK1, P27 and the phosphorylation level of the ERK1/2 after Nek2-siRNA transfection for 48 h. **Results** The flow cytometry detection results showed that the proportion of the cells in G₂/M stage in the blank control group, negative control group and RNAi group was 13.72%, 12.27% and 1.56% respectively. Compared with the control group, the number of the cells in G₂/M stage in the transfected group was reduced obviously ($P < 0.05$). The Western blot detection results showed that compared with the control group, the expression of cyclinB1 and CDK1 protein in SKOV3 cells was significantly reduced, the expression of P27 was increased after silencing Nek2 and the phosphorylation level of ERK1/2 in SKOV3 cells was significantly reduced after silencing Nek2 gene ($P < 0.05$). **Conclusion** Silencing Nek2 gene might block the ovarian cancer cell line SKOV3 initiating mitosis, thus inhibit their proliferation.

[Key words] RNA interference; ovarian neoplasms; cell cycle; NIMA-related kinase

近年来, 抗体芯片技术为肿瘤的早期诊断、肿瘤标志物的筛选鉴定以及药物治疗等方面提供了新的研究平台, 尤其在对肿瘤标志物的筛选和鉴定中运用最为广泛。在前期实验中, 本课题组通过反向捕获抗体芯片技术筛查发现 NIMA 相关激酶 2(NIMA-related kinase2, Nek2) 在卵巢癌中高表达, 且 NEK2-siRNA 能有效抑制 SKOV3 细胞中 Nek2 的表达。由于 Nek2 是细胞周期 Nek 家族成员之一, 在细胞周期中, 其表达及活性高度保守。因此, 本实验将利用 NEK2-siRNA 进一步研究 Nek2 基因与卵巢癌 SKOV3 细胞周期的关系。

1 材料与方 法

1.1 材料 卵巢浆液性乳头状囊腺癌细胞株 SKOV3 由第三军医大学大坪医院野战外科研究所馈赠。Nek2、P27、cyclinB1、CDK1 一抗均购自 Abcam 公司。Trizol、Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。根据 Nek2 基因序列, 由上海吉玛

公司设计合成 Nek2-siRNA 序列, 上游引物: 5'-GGC ACA CCU UAU UAC AUG UTT-3', 下游引物: 5'-ACA UGU AAU AAG GUG UGC CTT-3'。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染及分组 (1) 细胞转染: 在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的条件下, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液培养 SKOV3 细胞。用胰酶消化对数生长期细胞, 制备成细胞悬液, 将细胞按 30%~50% 密度接种于 6 孔板, 培养过夜。转染过程: 首先制备 siRNA/脂质体复合物, 于室温放置 20 min; 然后转染细胞, 混匀后放入培养箱中培养, 24 h 后观察转染情况。(2) 细胞分组: 将实验细胞分为 3 组, 转染 Nek2-siRNA 的 SKOV3 细胞为干扰组, 转染阴性对照序列的为阴性对照组, 未经任何处理的为空白对照组。转染 48 h 后, 用胰酶消化收集细胞, 进行以下实验。

1.2.2 流式细胞仪检测细胞周期 转染 48 h 后收集细胞,使每个样本细胞约为 1×10^6 个。弃上清液,于离心管中加入 70% 的预冷乙醇 1 mL,吹打均匀,4 °C 固定 12 h 以上。检测前 1 000 r/min 离心 5 min,吹散细胞后用 30D 尼龙滤过膜过滤,减少聚在一起的细胞。用 0.5 mL PBS 重悬细胞,加入 RNA 酶,使其终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,37 °C 孵育 30 min,冰浴终止酶作用。加入 5 μL 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 碘化丙啶(PI)溶液,室温中避光染色 30 min,最后采用流式细胞仪检测细胞周期,实验重复 3 次。

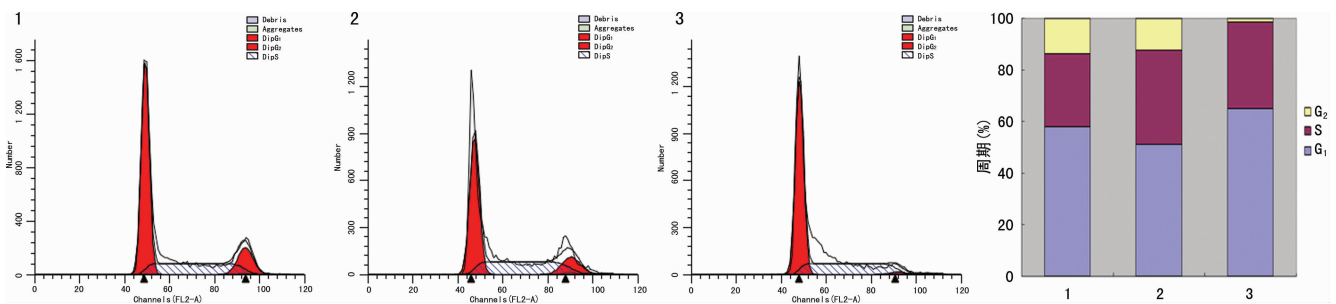
1.2.3 Western blot 法检测转染后的 SKOV3 细胞中 P27、cyclinB1、CDK1 及 pERK1/2 蛋白表达的变化 提取各组总蛋白,进行蛋白定量,取等量样本 30 μg 上样于 10% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后转膜。取出转移好的 PVDF 膜,确定转膜成功后,封闭,加一抗(1:200)或 β -actin 抗体(1:1 000),4 °C 孵

育过夜。加入二抗(1:5 000),室温下脱色摇床上摇动封闭 90 min,化学发光显影。最后利用柯达数字科学图像分析软件测定蛋白印迹条带净灰度值,以 β -actin 为内参照,计算二者的比值即为目的蛋白的相对表达水平。

1.3 统计学处理 实验数据采用 SPSS12.0 软件进行统计分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用 One-Way ANOVA 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

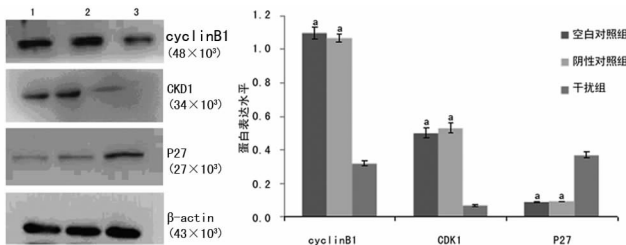
2 结 果

2.1 Nek2-siRNA 干扰后对卵巢癌 SKOV3 细胞周期的影响 转染 Nek2-siRNA 48 h 后,用流式细胞仪检测 SKOV3 细胞周期结果表明,抑制 Nek2 的表达后,空白对照组、阴性对照组和干扰组处于 G_2/M 期的细胞比例分别为:13.72%、12.27%和 1.56%,干扰组细胞在 $S \rightarrow G_2$ 转换时受到抑制,处于 G_2/M 期的干扰组细胞明显减少, ($P < 0.05$),见图 1。



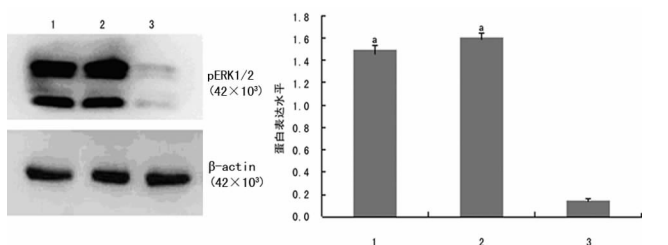
1. 空白对照组;2. 阴性对照组;3. 干扰组。

图 1 流式细胞仪检测细胞周期 ($n=3$)



1. 空白对照组;2. 阴性对照组;3. 干扰组;^a: $P < 0.05$, 与干扰组比较。

图 2 3 组 SKOV3 细胞中 cyclinB1 等表达比较 ($n=3$)



1: 空白对照组;2: 阴性对照组;3: 干扰组;^a: $P < 0.05$, 与干扰组比较。

图 3 3 组 SKOV3 细胞中 pERK1/2 表达比较 ($n=3$)

2.2 NEK2-siRNA 干扰后 SKOV3 细胞中 cyclinB1、CDK1 和 P27 蛋白表达的变化 Nek2-siRNA 转染 SKOV3 细胞 48 h 后,cyclinB1、CDK1 的表达明显下调,P27 的表达明显上调 ($P < 0.05$),见图 2。

2.3 NEK2-siRNA 干扰后 SKOV3 细胞中磷酸化 ERK1/2 (pERK1/2) 表达的变化 Nek2-siRNA 转染 SKOV3 细胞 48 h 后,与空白、阴性对照组比较,pERK1/2 的表达水平明显降低 ($P < 0.05$),见图 3。

3 讨 论

Nek2 是 Nek 家族成员之一,目前该家族拥有 11 个家族成员(Nek1~11),它们具有相似的催化序列,其中因 Nek2 与 NIMA 的同源性最高而备受关注。Nek2 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,定位于中心体,有着激酶区域的氨基末端以及未催化调节区域的羧基末端,并通过磷酸化 C-Nap1、rootletin、Nlp 等底物调节纺锤体的形成和分离^[1-2]。

要因子,其通过与中心体蛋白的相互作用参与微管组装并维持微管稳定,进而维持中心体的稳定^[3];通过磷酸化 C-Nap1、rootletin、Nlp 等底物调节纺锤体的形成和分离^[1-2];通过磷酸化高迁移率族蛋白(high-mobility group protein A2, HMG A2)参与染色质的凝集;通过与 Hec1、Mad1、Mda2 的相互作用控制纺锤体检查点^[4-5]。Nek2 表达水平具有周期依赖性, G_1 时期 Nek2 表达水平很低,但在 G_1/S 间期其表达水平迅速上升 3~4 倍,并且在整个 S 期和 G_2 期都保持这种高表达水平,一旦进入 M 期,Nek2 的表达水平迅速降低^[6]。由于 Nek2 的表达与细胞周期进程密切相关,本实验利用流式细胞技术来探索 Nek2 基因沉默后对 SKOV3 细胞周期的影响。本检测结果发现,与两对照组比较,Nek2 表达的下降导致细胞周期分布出现异常,干扰组细胞在 $S \rightarrow G_2$ 转换时受到抑制,处于 G_2/M 期细胞明显减少。本结果表明,基因沉默 Nek2 可使 SKOV3 细胞进入 G_2/M 期受阻,导致细胞最后不能顺利通过有丝分裂期,进入下一个细胞周期,从而使细胞增殖能力降低。

近年来的研究表明,Nek2 是协调中心体结构和功能的重

有研究发现, Nek2 定位于中心体并参与调节有丝分裂^[7], 其在 S 期和 G₂ 期保持高表达水平, 具有明显的周期依赖性^[6]。结合流式检测结果可知, 抑制 Nek2 的表达对 SKOV3 细胞进入 G₂/M 期有明显影响。因此, 本实验选择 cyclinB1、CDK1 和 P27 进行 Western blot 检测, 初步探讨 Nek2 影响细胞周期的有关机制。实验结果表明, Nek2-siRNA 转染 SKOV3 细胞 48 h 后, cyclinB1 和 CDK1 的蛋白表达水平较空白对照组明显下降, P27 的蛋白表达水平明显上调。根据结果可推测, Nek2 基因沉默后, 通过对 G₂/M 检查点关键因子 cyclinB1 和 CDK1 以及对抑癌基因 P27 的调控, 抑制 SKOV3 细胞进入 G₂/M 期, 从而不能启动有丝分裂, 无法进入下一个细胞周期, 因此抑制了细胞增殖。Scott 等^[8]对浆液性卵巢肿瘤组织进行研究发现, cyclinB1 的表达水平随着卵巢肿瘤恶性程度的增加而增加。有研究证明, cyclinB1 在多种恶性肿瘤中高表达, 如胃癌、乳腺癌、淋巴瘤等^[9-11], 由此可知 cyclinB1 与肿瘤的发生、发展密切相关。因此, 本实验认为可通过 Nek2 基因沉默使 SKOV3 细胞中 cyclinB1 的表达水平下降, 从而达到抑制肿瘤细胞生长的目的。

细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated protein kinase, ERK)是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族成员之一, 细胞内许多信号因子最终都是通过磷酸化 ERK 来发挥作用, 可以说 ERK 是调节细胞生长发育的信号网络核心, 调控着细胞的增殖、分化和凋亡等重要的生物学过程^[12]。近年来的研究证明 ERK 信号通路不仅参与对细胞周期 G₁/S 的调节, 而且参与对 G₂/M 期调控^[13-14]。为研究 Nek2 通过何种信号转导通路来调控 SKOV3 细胞的各种生物学行为, 本实验对 ERK1/2 的磷酸化水平进行检测, 结果表明, Nek2-siRNA 转染入 SKOV3 细胞 48 h 后, 与空白对照组比较, pERK1/2 的表达水平明显降低, 说明 Nek2 依赖 ERK 信号通路发挥作用。

综上所述, 使用 RNAi 技术特异性沉默 Nek2 基因能够有效抑制细胞周期相关因子 cyclinB1 和 CDK1 的蛋白表达, 同时使 P27 蛋白表达增加, 从而抑制 SKOV3 细胞进入 G₂/M 期, 使其无法启动有丝分裂, 因此抑制了细胞增殖。根据以上研究结果可推测, 通过对 Nek2 基因进一步的深入研究, 使其有望成为临床上监测卵巢癌发生、发展以及评估预后的新的标记物。Nek2 基因及其信号转导通路中的相关因子可作为抑制卵巢癌转移和复发的重要靶点。

参考文献

[1] Bahe S, Stierhof YD, Wilkinson CJ, et al. A Rootletin forms centriole-associated filaments and functions in centrosome cohesion[J]. *J Cell Biol*, 2005, 171(1): 27-33.

[2] Rapley J, Baxter JE, Blot J, et al. Coordinate regulation of the mother centriole component Nlp by Nek2 and Plk1 protein kinases [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(4): 1309-1324.

[3] Jeong Y, Lee J, Kim K, et al. Characterization of NIP2/centrobin, a novel substrate of Nek2, and its potential role in microtubule stabilization[J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt

12): 2106-2116.

[4] Di Agostino S, Fedele M, Chieffi P, et al. Phosphorylation of high-mobility group protein A2 by Nek2 kinase during the first meiotic division in mouse spermatocytes[J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(3): 1224-1232.

[5] Chen Y, Riley DJ, Zheng L, et al. Phosphorylation of the mitotic regulator protein Hec1 by Nek2 kinase is essential for faithful chromosome segregation [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(51): 49408-49416.

[6] Hames RS, Fry AM. Alternative splice variants of the human centrosome kinase Nek2 exhibit distinct patterns of expression in mitosis[J]. *Biochem J*, 2002, 361(Pt 1): 77-85.

[7] Hayward DG, Newbatt Y, Pickard L, et al. Identification by high-throughput screening of viridin analogs as biochemical and cell-based inhibitors of the cell cycle-regulated Nek2 kinase [J]. *J Biomol Screen*, 2010, 15(8): 918-927.

[8] Scott IS, Heath TM, Morris LS, et al. A novel immunohistochemical method for estimating cell cycle phase distribution in ovarian serous neoplasms: implications for the histopathological assessment of paraffin-embedded specimens[J]. *Br J Cancer*, 2004, 90(8): 1583-1590.

[9] Yasuda M, Takesue F, Inutsuka S, et al. Overexpression of cyclin B1 in gastric cancer and its clinicopathological significance; an immunohistological study [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2002, 128(8): 412-416.

[10] Suzuki T, Urano T, Miki Y, et al. Nuclear cyclin B1 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor [J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(5): 644-651.

[11] Bai M, Vlachonikolis J, Agnantis NJ, et al. Low expression of P27 protein combined with altered p53 and Rb/p16 expression status is associated with increased expression of cyclin A and cyclin B1 in diffuse large B-cell lymphomas [J]. *Mod Pathol*, 2001, 14(11): 1105-1113.

[12] Murphy LO, Blenis J. MAPK signal specificity: the right place at the right time [J]. *Trends Biochem Sci*, 2006, 31(5): 268-275.

[13] Pan TL, Wang PW, Leu YL, et al. Inhibitory effects of *Scutellaria baicalensis* extract on hepatic stellate cells through inducing G₂/M cell cycle arrest and activating ERK-dependent apoptosis via Bax and caspase pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139(3): 829-837.

[14] Xu Y, Liu L, Qiu X, et al. CCL21/CCR7 promotes G₂/M phase progression via the ERK pathway in human non-small cell lung cancer cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e21119.