

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.17.009

Skp2 基因沉默对 SPC-A-1 肺癌细胞增殖和凋亡的影响

李 胜¹,梅同华^{2△}

(1.重庆市沙坪坝区人民医院内科 400030;2.重庆医科大学附属第一医院呼吸危重病科 400016)

[摘要] **目的** 探讨 S 期激酶相关蛋白 2(Skp2)基因沉默对肺癌细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 将 Skp2 RNA 干扰表达载体转染至 SPC-A-1 肺癌细胞中,G418 筛选获得阳性克隆细胞。通过实时荧光定量(RT-PCR)、蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肺癌细胞中 Skp2 的表达。采用流式细胞术、四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测各组肺癌细胞生长、凋亡情况。**结果** 转染 Skp2 shRNA 表达载体的肺癌细胞中 Skp2 蛋白表达量明显减少,抑制效率分别可达 75.3 ± 5.1 、 70.4 ± 3.2 ;转染 Skp2 shRNA 表达载体的肺癌细胞生长减慢,阻滞于 G₁ 期的增多,S 期细胞减少。Skp2 shRNA 转染质粒组凋亡率较阴性对照组明显增加,细胞凋亡率分别为 $(17.5 \pm 2.8)\%$ 、 $(15.6 \pm 3.1)\%$ 。**结论** 通过特异性沉默 Skp2 基因的表达,可有效降低肺癌细胞中 Skp2 蛋白表达水平,抑制肺癌细胞生长及增加细胞凋亡。

[关键词] 肺肿瘤;凋亡;RNA 干扰;S 期激酶相关蛋白**[中图分类号]** R734.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)17-2334-03**The effect of Skp2 gene silencing on the proliferation and apoptosis of SPC-A-1 lung cancer cells**Li Sheng¹,Mei Tonghua^{2△}

(1. Department of Internal Medicine, the People's Hospital of Shapingba District, Chongqing 400030, China;

2. Department of Respiratory Diseases, the First Affiliated Hospital of

Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of Skp2 gene silencing on the proliferation and apoptosis of SPC-A-1 lung cancer cells. **Methods** Specific small hairpin RNA (shRNA) targeting Skp2 gene was introduced into lung cancer cells by Lipofectamine 2000 and the positive clones were screened by G418. The Skp2 mRNA and protein expression level of lung cancer cells were detected by RT-PCR and Western blot. MTT method and flow cytometry (FCM) analysis were used to observe the effect of RNAi on proliferation of lung cancer cells. Cell apoptosis was analyzed by FCM. **Results** Transfected with Skp2 shRNA expression vector significantly reduced the expression of Skp2 protein in lung cancer cells. Inhibition efficiency was respectively (75.3 ± 5.1) 、 (70.4 ± 3.2) . P27 protein expression was increased significantly in lung cancer cells. The growth of lung cancer cells transfected with Skp2 shRNA was blocked, with G₁ phase cells increased and S phase cells decreased. The apoptosis rate of cancer cells was higher in Skp2 shRNA groups than in control groups. Apoptosis rates were $(17.5 \pm 2.8)\%$ 、 $(15.6 \pm 3.1)\%$ in Skp2 shRNA groups. **Conclusion** Specific inhibition of the expression of Skp2 can slow down the growth of lung cancer cells, increase cell apoptosis.

[Key words] lung neoplasms; apoptosis; RNA interference; S-phase kinase associated protein

S 期激酶相关蛋白 2(S phase kinase associated protein 2, Skp2)是泛素蛋白酶降解过程中一种重要蛋白组成部分,参与周期蛋白的泛素化降解,与细胞周期调节障碍密切相关的可疑癌蛋白,在细胞增殖生长中发挥重要作用^[1]。越来越多的研究发现 Skp2 具有癌基因的潜能,其表达水平及活性与肿瘤发生、发展及生物学性状有关^[2-4]。为了研究 Skp2 在肺癌生长、增殖中的作用,本实验通过构建 Skp2 shRNA 表达质粒,抑制 Skp2 基因表达,观察其对肺癌细胞生物学活性的影响,为肺癌治疗找到新的分子靶点。

1 材料与方

1.1 材料 Skp2 RNA 干扰重组质粒表达载体购于武汉晶赛生物技术公司;SPC-A-1 肺癌细胞由上海细胞库提供;兔抗人 Skp2 抗体、鼠抗人 P27 抗体购于 Santa Cruz 公司,羊抗兔抗体、羊抗鼠抗体购于北京中山公司;Annexin V-FITC 试剂盒购于晶美生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、转染、细胞筛选 SPC-A-1 肺癌细胞培养于 RPMI 培养基。转染前 1 d,接种于 24 孔培养板,用无血清、无抗生素培养基稀释 Skp2 RNA 干扰表达载体质粒及脂质体。将 3 种重组质粒 Skp2 shRNA-1、Skp2 shRNA-2、Skp2 shRNA-HK(空质粒对照)分别转染至肺癌细胞内,每周换液 2 次,取阳性克隆肺癌细胞进行扩增培养。

1.2.2 实验分组 将 4 组肺癌细胞分为转染质粒组 Skp2 shRNA-1 组,Skp2 shRNA-2 组,Skp2 shRNA-HK 组及无质粒的阴性对照组进行研究。

1.2.3 肺癌细胞生长曲线检测 将 4 组实验组细胞分别接种于 96 孔培养板中,移至细胞培养箱中培养,按四甲基偶氮唑盐(MTT)法加入噻唑蓝溶液后继续孵育 4 h 后,再加入二甲亚砜,酶联免疫检测仪读取各孔光吸收数值。分别绘制各组细胞生长曲线。每组实验重复 3 次。每日取 1 块板检测,连续检测 7 d。绘制各组细胞生长曲线。实验重复 3 次。

1.2.4 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测 4 组肺癌细胞内

Skp2 mRNA 水平 分别收集 4 组 (5×10^6 个/组) 肺癌细胞, 按照 RT-PCR 试剂盒说明书操作, 检测各组 Skp2 mRNA 水平。细胞内 Skp2 mRNA 的相对表达水平以 Skp2 与 β -actin 条带灰度值的比值计算。各组实验重复 3 次。

1.2.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测各组肺癌细胞 Skp2、P27 蛋白表达 提取 4 组肺癌细胞总蛋白, 经凝胶电泳、转膜、封闭, 分别加入特异性针对 Skp2、P27、 β -actin 的一抗抗体, 再加入稀释后的二抗, 最后通过化学发光底物显色。对显色结果进行图像分析, Skp2、P27 蛋白的相对表达水平以 Skp2、P27 与 β -actin 灰度值的比值表示。实验重复 3 次。

1.2.6 流式细胞术检测细胞周期 分别收集 4 组细胞, 每组细胞数为 1×10^7 个, 用 70% 乙醇固定 24 h, 加入 RNA 酶, 37 °C 反应 1 h。加入碘化丙啶溶液染色 30 min 后, 在流式细胞仪上进行检测。实验重复 3 次。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡情况 分别收集实验 4 组细胞, 每组设 6 孔, 收集转染 24 h 后的细胞, 按照凋亡试剂盒说明进行操作。流式细胞术检测记录各组凋亡比例, 实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肺癌细胞生长曲线 MTT 法结果显示, Skp2 shRNA-1 组、Skp2 shRNA-2 组细胞生长、增殖速度慢于 Skp2 shRNA-HK 组及阴性对照组, 细胞生长曲线见图 1。

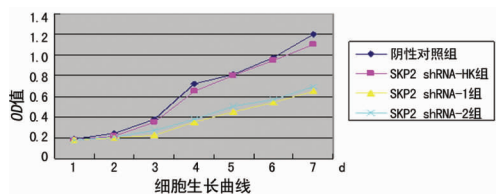
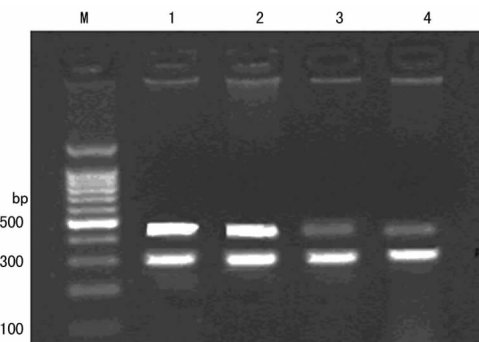


图 1 4 组肺癌细胞的生长曲线

2.2 肺癌细胞内 Skp2、P27 mRNA 表达情况 RT-PCR 检测 4 组肺癌细胞转染前后 Skp2、P27 mRNA 的表达: Skp2 shRNA-1 组、Skp2 shRNA-2 组的 Skp2 mRNA 的表达产物明显弱于 Skp2 shRNA-HK 组、阴性对照组。Skp2 shRNA-1 组、Skp2 shRNA-2 组肺癌细胞 mRNA 与阴性对照组比较, 抑制率分别达到 $(74.2 \pm 5.3)\%$ 、 $(61.5 \pm 3.4)\%$, 见图 2。

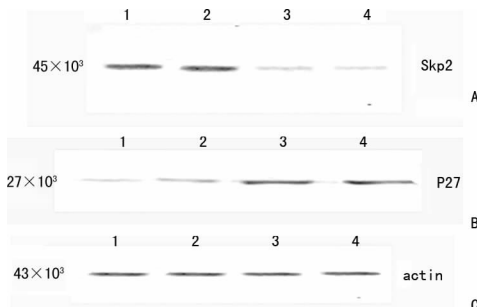


M: 标准参考物; 1: 阴性对照组; 2: Skp2 shRNA-HK 组; 3: Skp2 shRNA-1 组; 4: Skp2 shRNA-2 组。

图 2 Skp2 shRNA 对肺癌细胞内 Skp2 mRNA 表达水平的影响

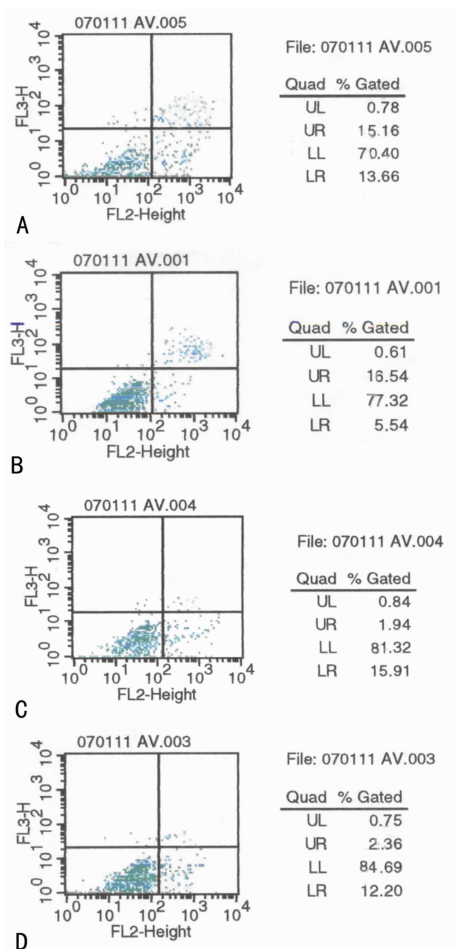
2.3 各组肺癌细胞内 Skp2、P27 蛋白表达情况 与阴性对照

组比较, Skp2 shRNA-1 组、Skp2 shRNA-2 组细胞内 Skp2 蛋白表达明显受到抑制, 其抑制率分别达到 $75.3 \pm 5.1\%$ 、 $70.4 \pm 3.2\%$, 而转染重组质粒组 shRNA-1、shRNA-2 细胞内 P27 蛋白表达水平明显增加, 上升幅度为 $73.6 \pm 4.6\%$ 、 $67.2 \pm 2.6\%$, 而各组间的 β -actin 表达无明显差异, 见图 3。



A: Skp2 蛋白表达; B: P27 蛋白表达; C: 内参蛋白表达; 1: 阴性对照组; 2: Skp2 shRNA-HK 组; 3: Skp2 shRNA-1 组; 4: Skp2 shRNA-2 组。

图 3 shRNA 对肺癌细胞内 Skp2、P27 蛋白表达水平的影响



A: Skp2 shRNA-1 组; B: Skp2 shRNA-2 组; C: Skp2 shRNA-HK 组; D: 阴性对照组。

图 4 Annexin V-FITC 法对各组细胞凋亡率检测

2.4 各组细胞周期的检测 流式细胞术检测结果表明, Skp2 shRNA-1 组、Skp2 shRNA-2 组进入 S 期细胞比例平均为 $(22.42 \pm 1.52)\%$ 、 $(20.34 \pm 1.87)\%$, 低于阴性对照组和 Skp2 shRNA-HK 组进入 S 期的细胞比例 $(30.53\% \pm 2.31)\%$,

(29.43±2.24)%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 Skp2 shRNA-1 组、Skp2 shRNA-2 组停滞于 G₀/G₁ 期细胞百分数分别为 (67.35±2.55)%、(69.43±2.23)%, 较阴性对照组及 Skp2 shRNA-HK 组 (56.52±2.33)%、(55.34±2.16)% 明显增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而阴性对照组和 Skp2 shRNA-HK 组进入 S 期的细胞比例无明显差别 ($P > 0.05$), 见表 1。

2.5 各组细胞凋亡率检测 Annexin V-FITC 法检测结果表明, Skp2 shRNA-1 组、Skp2 shRNA-2 组细胞凋亡率与阴性对照组及 Skp2 shRNA-HK 组相比, 两组细胞的凋亡指数出现不同程度的增加, 细胞凋亡率分别高达 (17.5±2.8)%、(15.6±3.1)%, 而阴性对照组的细胞凋亡率为 (2.1±0.4)%, Skp2 shRNA-HK 组仅为 (2.3±0.3)%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4。

表 1 流式细胞技术检测各组细胞周期改变 ($\bar{x} \pm s, \%$)

| 组别 | G ₀ /G ₁ 期 | S 期 |
|-----------------|----------------------------------|--------------------------|
| 阴性对照组 | 56.52±2.33 | 30.53±2.31 |
| Skp2 shRNA-HK 组 | 55.34±2.16 ^a | 29.43±2.24 ^a |
| Skp2 shRNA-1 组 | 67.35±2.55 ^{bc} | 22.42±1.52 ^{bc} |
| Skp2 shRNA-2 组 | 69.43±2.23 ^{bc} | 20.34±1.87 ^{bc} |

^a: $P > 0.05$, 与阴性对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与对照组相比; ^c: $P < 0.05$, 与 Skp2-shRNA-HK 组比较。

3 讨 论

细胞周期障碍在肿瘤发生、发展中的作用日益受到重视, 而泛素蛋白酶体系统功能的异常将导致细胞周期发生障碍, 与肿瘤的发生密切相关^[5]。Skp2 是细胞周期的关键调节因子, 属于泛素蛋白连接酶 F-box 底物识别亚基, 能够特异性地识别各种磷酸化蛋白底物, 并介导其泛素化降解^[6]。Skp2 在细胞周期进程、细胞增殖调控方面发挥重要作用, 是细胞进入 S 期所必需因子, Skp2 在 S 期时水平较高, 对细胞周期的转换发挥重要作用^[7]。在细胞周期蛋白的泛素蛋白降解过程中, Skp2 主要通过特异性识别底物, 促进底物蛋白泛素化降解而发挥作用。目前发现, E2F、myc、cyclinE、cyclinA、CDC25B, 以及细胞周期负性调控因子 P27、P21 及 P57 等都是通过 Skp2 参与的途径进行降解。Skp2 通过调节细胞周期蛋白因子的泛素化降解, 促进细胞周期发生转换, 从而参与细胞增殖与凋亡的调控, 在癌症的发生、发展中发挥重要作用。研究发现, 正常细胞中 Skp2 是低水平表达的, 而在绝大多数恶性肿瘤如乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、肺癌、胃癌, 以及淋巴瘤等肿瘤中均发现有异常高的表达, 与肿瘤的恶性程度、侵袭性、转移、预后密切相关, 具有癌基因的特性。研究表明 Skp2 促癌机制与其诱导细胞增殖、抑制凋亡、增强肿瘤的侵袭性及转移活性等多方面的特性有关^[2-4]。由于 Skp2 基因在肿瘤细胞中的特异性表达, 并与肿瘤的发生、发展和转移密切相关, 因此可能成为肿瘤基因治疗新的靶点。

本实验通过 Skp2 shRNA 质粒转染肺癌细胞, 研究 Skp2 在肺癌发生、发展中的作用, 检测各组肺癌细胞周期的变化, 观察其对细胞增殖、凋亡的影响。实验结果表明, 转染 Skp2 shRNA 重组质粒的细胞组与对照组比较, 进入 S 期的细胞比例减少, 而停滞在 G₀/G₁ 期细胞比例增加, 沉默 Skp2 表达阻滞了细胞生长、增殖。本实验观察到转染 Skp2 shRNA 重组质

粒肺癌细胞内 Skp2 蛋白表达下调同时, P27 蛋白表达水平反而上升, 也间接证实 Skp2 可能通过下调 P27 蛋白表达而在促进细胞增殖中发挥重要作用。关于 Skp2 对细胞周期影响的具体机制仍不清楚, 可能通过抑制 Skp2 表达, Skp2 对负性周期调控因子 P27、P21、P57 泛素化蛋白降解作用减弱, 使上述周期调控因子在细胞内水平的增加, 从而抑制了细胞增殖^[8-9]。

许多资料表明, 肿瘤细胞之所以能在机体内迅速增殖与细胞凋亡机制受到了抑制有关。为进一步探讨 Skp2 在肿瘤细胞中的抗凋亡作用, 笔者检测了转染重组质粒肺癌细胞的凋亡情况。Annexin V-FITC 检测结果表明转染质粒组的凋亡指数出现不同程度的增加。结果表明抑制 Skp2 蛋白的表达能促进 SPC-A-1 肺癌细胞的凋亡的发生, 提示 Skp2 在肿瘤细胞抗凋亡方面发挥作用。目前 Skp2 对抗凋亡方面的作用机制, 有学者也进行了相关研究和探讨^[10-13]。抑制癌细胞 Skp2 表达后, 发现肿瘤细胞凋亡增加, 细胞碎片增多, 认为细胞凋亡增加与下调 Skp2 表达后, 从而减少了对 P27、P53、P21 等细胞周期调节蛋白泛素化蛋白降解, 上调了上述周期调节蛋白表达水平, 激活了细胞内凋亡途径中的重要凋亡因子 caspase-3、caspase-8、caspase-9 活性及增加其水平有关。

本实验通过采用 RNAi 技术沉默肺癌细胞内 Skp2 基因表达, 进而下调 Skp2 蛋白表达, 增加细胞内周期蛋白 P27 水平, 抑制肺癌细胞的生长, 增加了细胞凋亡发生。以 Skp2 基因为靶点的基因治疗有望在不久的将来应用于肿瘤的治疗, 为肺癌的治疗提供新的切入点。

参考文献

- [1] Chan CH, Lee SW, Wang J, et al. Regulation of Skp2 expression and activity and its role in cancer progression [J]. ScientificWorldJournal, 2010(10):1001-1015.
- [2] Wang Z, Gao D, Fukushima H, et al. Skp2: a novel potential therapeutic target for prostate cancer [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1825(1): 11-17.
- [3] Zhang B, Ji LH, Liu W, et al. Skp2-RNAi suppresses proliferation and migration of gallbladder carcinoma cells by enhancing p27 expression [J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(30):4917-4924.
- [4] Chan CH, Morrow JK, Zhang S, et al. Skp2: a dream target in the coming age of cancer therapy [J]. Cell Cycle, 2014, 13(5):679-680.
- [5] Hershko DD. Oncogenic properties and prognostic implications of the ubiquitin ligase Skp2 in cancer [J]. Cancer, 2008, 112(7):1415-1424.
- [6] Bochi OV, Irimie A, Pichler M, et al. The role of Skp2 and its substrate CDKN1B (p27) in colorectal cancer [J]. J Gastrointest Liver Dis, 2015, 24(2):225-234.
- [7] Luo J, Zhou Y, Wang B, et al. Immunohistochemically detected expression of Skp2, p27 (kip1), and p-p27 (Thr187) in patients with cholangiocarcinoma [J]. Tumour Biol, 2015, 36(7):5119-5125.
- [8] Fagan-Solis KD, Pentecost BT, Gozgit JM, et al. SKP2 overexpression is associated with increased serine 10 phosphorylation of p27 (pSer10p27) (下转第 2339 页)

开始升高,并持续至恢复血流灌注 12 h;而氧自由基爆发引起脂质过氧化反应,使得组织 MDA 水平在再灌注 6 h 左右开始升高,到 12 h 也未下降。另一方面,骨骼肌的湿质量/干质量也客观反映了肌肉的水肿程度,IR 组各时段肌肉湿质量/干质量均高于 C 组。丙泊酚作为临床常用麻醉药物,众多实验证明其对肢体及多脏器的 IRI 具有保护作用。本实验中,P 组大鼠血清 NF- κ B、TNF- α 的表达,与 IR 组比较,在再灌注各时段均有不同程度的下降,提示药物对炎症因子的释放存在抑制作用;其次,与 IR 组相比,P 组中 MDA 的水平较低,而 SOD 的表达则较 IR 组升高,提示丙泊酚能够降低 IRI 后肌肉组织 MDA 水平,并增强 SOD 活性,表明丙泊酚可有效抑制 IRI 损伤所导致的氧自由基爆发效应,清除氧自由基,抑制脂质过氧化反应;此外,对比肌肉组织湿质量/干质量,说明丙泊酚组骨骼肌组织较 IRI 组水肿程度有所减轻。

综上所述,丙泊酚对 IRI 损伤的肢体具有保护作用,与其能遏制炎症因子表达、减轻氧自由基损害有关。但是,IRI 损伤是一个多因素、多机制、多途径综合作用的结果,临床治疗应更具针对性。本研究证实了丙泊酚对肢体 IRI 损伤防治的有效性,有关药物的剂量及用药的时间还需细化与更进一步探讨。

参考文献

- [1] Mccord JM. Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury[J]. N E J Med, 1985, 312(3): 159.
- [2] Esposito E, Cuzzocrea S. TNF-alpha as a therapeutic target in inflammatory diseases, ischemia-reperfusion injury and trauma [J]. Curr Med Chem, 2009, 16 (24): 3152-3167.
- [3] Wang Z, Kou D, Li Z, et al. Effects of propofol-dexametomidine combination on ischemia reperfusion-induced cerebral injury [J]. Neuro Rehabilitation, 2014, 35 (4): 825-834.
- [4] 郑海燕. 丙泊酚麻醉对围手术期肝缺血再灌注损伤患者血浆一氧化氮/内皮素-1 和炎症细胞因子的影响[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(23): 3995-3997.

- [5] Wanderer AA. Proposed pathobiologic mechanisms of hypoxia-ischemia-reperfusion in corticosteroid-resistant neutrophilic asthma and consideration of interleukin 1 targeted therapy[J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2011, 106 (1): 69-72.
- [6] Schmidt CA, Rancic Z, Lachat ML, et al. Hypothermic, initially oxygen-free, controlled limb reperfusion for acute limb ischemia[J]. Ann Vasc Surg, 2015, 29(3): 560-572.
- [7] Higuchi Y, Kawakami S, Hashida M. Development of cell-selective targeting systems of NF kappaB decoy for inflammation therapy[J]. Yakugaku Zasshi, 2008, 128(2): 209-218.
- [8] Dabhi B, Mistry KN. In silico analysis of single nucleotide polymorphism (SNP) in human TNF- α gene [J]. Meta Gene, 2014(2): 586-595.
- [9] Niu X, Huang WH, De Boer B, et al. Iron-induced oxidative rat liver injury after non-heart-beating warm ischemia is mediated by tumor necrosis factor α and prevented by deferoxamine[J]. Liver Transpl, 2014, 20(8): 904-911.
- [10] Ozsoy M, Gonul Y, Bal A, et al. Effect of IL-18 binding protein on hepatic ischemia-reperfusion injury induced by infrarenal aortic occlusion[J]. Ann Surg Treat Res, 2015, 88(2): 92-99.
- [11] Faghihi M, Alizadeh AM, Khori V, et al. The role of nitric oxide, reactive oxygen species, and protein kinase C in oxytocin-induced cardioprotection in ischemic rat heart[J]. Peptides, 2012, 37(2): 314-319.
- [12] 张良, 代维, 高志明, 等. 血必净注射液和丹参注射液治疗兔肢体缺血再灌注损伤的比较研究[J]. 重庆医学, 2013, 42(31): 3724-3731.
- [13] Bajpai A, Verma AK, Srivastava M, et al. Oxidative stress and major depression[J]. J Clin Diagn Res, 2014, 8(12): 4-7.

(收稿日期: 2015-12-23 修回日期: 2016-02-26)

(上接第 2336 页)

- in triple-negative breast cancer[J]. J Cell Physiol, 2014, 229(9): 1160-1169.
- [9] Sorbye SW, Kilvaer TK, Valkov A, et al. Prognostic impact of Skp2, ER and PGR in male and female patients with soft tissue sarcomas[J]. BMC Clin Pathol, 2013, 13 (1): 9.
- [10] Caraballo JM, Acosta JC, Cortés MA, et al. High p27 protein levels in chronic lymphocytic leukemia are associated to low Myc and Skp2 expression, confer resistance to apoptosis and antagonize Myc effects on cell cycle[J]. Oncotarget, 2014, 5(13): 4694-4708.
- [11] Chen XM, Bai Y, Zhong YJ, et al. Wogonin has multiple anti-cancer effects by regulating c-Myc/SKP2/Fbw7 α and

HDAC1/HDAC2 pathways and inducing apoptosis in human lung adenocarcinoma cell line A549[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e79201.

- [12] Barré B, Perkins ND. The Skp2 promoter integrates signaling through the NF-kappaB, p53, and Akt/GSK3beta pathways to regulate autophagy and apoptosis[J]. Mol Cell, 2010, 38(4): 524-538.
- [13] Wang J, Huang Y, Guan Z, et al. E3-ligase Skp2 predicts poor prognosis and maintains cancer stem cell pool in nasopharyngeal carcinoma [J]. Oncotarget, 2014, 5 (14): 5591-5601.

(收稿日期: 2015-12-18 修回日期: 2016-03-02)