

特异性小干扰 RNA 沉默 Polo 样激酶 1 基因表达对恶性胶质瘤细胞增殖的影响

✍

范钰 朱夫 史德刚

✍

【摘要】 目的 探讨 Polo 样激酶 1(PLK1)基因对胶质瘤细胞增殖的影响和可能机制。方法 根据 PLK1 基因特点,设计并用化学方法合成了 5 个小干扰核糖核酸分子(siRNA)(P1、P2、P3、P4 和 P5)。以这 5 个 siRNA 转染人胶质瘤 TJ905 细胞后,分别采用荧光实时定量 RT-PCR 和 Western blot 检测 PLK1 mRNA 和蛋白表达水平。分别采用 MTT 法和 Western blot 方法检测癌细胞增殖和增殖细胞核抗原(PCNA)蛋白水平,用 TRAP-ELISA 方法检测胶质瘤细胞端粒酶活性。结果 所设计的 5 个 siRNA 均能明显抑制胶质瘤 TJ905 细胞 PLK1 mRNA 水平,以 P4 效果最好。以 P4 转染处理胶质瘤细胞后与脂质体对照组比较,PLK1 基因 mRNA 水平和蛋白水平明显下调,差异有统计学意义(P 均 =0.000)。MTT 结果显示,与脂质体对照组比较 P4 siRNA 转染组癌细胞生长明显受到抑制,且呈浓度依赖性($r=0.868, P=0.000$)。Western blot 结果显示,与脂质体对照组比较 P4 siRNA 转染组 PCNA 蛋白水平明显下降,差异有统计学意义($F=181.36, P=0.000$)。TRAP-ELISA 结果显示,与脂质体对照组比较 P4 siRNA 转染组胶质瘤细胞端粒酶活性明显受到抑制,且呈浓度和时间依赖性($P=0.000$)。结论 PLK1 基因对胶质瘤细胞增殖具有重要的调控作用;以 PLK1 siRNA 转染处理胶质瘤细胞,可明显抑制胶质瘤细胞的恶性增殖,其机制可能与抑制端粒酶活性有关。

【关键词】 神经胶质瘤; Polo 样激酶 1; RNA 干扰; 小干扰 RNA; 端粒酶

【中图分类号】 R739.41 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)01-0005-05

✍

Effects of small interfering RNA targeting polo-like kinase-1 on the proliferation of human glioma cells in vitro FAN Yu*, ZHU Fu*, SHI De-gang. *Cancer Institute, Affiliated People's Hospital, Jiangsu University, Zhenjiang 212002, China

Correspondence author: SHI De-gang, Tel: 13286881806

【Abstract】 Objective To investigate the regulatory role of polo-like kinase-1 (PLK1) gene in the proliferation of human glioma cells. Methods Five small interfering RNAs (siRNAs) targeting PLK1 gene were designed and synthesized according to PLK1 mRNA sequence. After transfection of human glioma TJ905 cells with the siRNAs, real-time RT-PCR and Western blotting were performed to examine the changes in PLK1 gene expression in the cells. The growth of the transfected cells was evaluated by MTT assay and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) protein expression determined using Western blotting. Telomeric repeat amplification protocol-enzyme-linked immunosorbent assay (TRAP-ELISA) was used to detect the changes in telomerase activity of the transfected cells. Results All the five siRNAs were capable of suppressing PLK1 mRNA expression in TJ905 cells, among which the P4 siRNA showed the strongest effect by reducing the PLK1 mRNA level by 93% 48 h after transfection at the concentration of 100 nmol/L. Compared with the oligofecamine control group cells the protein expression of PLK1 in TJ905 cancer cells transfected with P4 siRNA was also significantly down-regulated. Transfection with P4 siRNA resulted in significant dose-dependent inhibitory effects on the proliferation and PCNA protein expression of TJ905 cells as compared to oligofecamine control group. The results of TRAP-ELISA showed obvious time- and dose-dependent inhibition of telomerase

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2009.01.002

基金项目:中国博士后科学基金项目(2003033547)

作者单位:212002 镇江,江苏大学附属人民医院肿瘤研究所(范钰、朱夫);510282 广州,南方医科大学珠江医院肿瘤中心(史德刚)

通信作者:史德刚,电话:13286881806

activity in the transfected cells as compared to oligofecamine control group. Conclusion PLK1 gene plays an important regulatory role in the proliferation of human glioma cells, and RNA interference of PLK1 gene can inhibit the cell proliferation possibly by suppressing the telomerase activity.

【Key words】 Glioma; Polo-like kinase-1; RNA interference; Small interfering RNA; Telomerase

许多研究发现,85%~90%的肿瘤都有端粒酶的活化表达,而正常细胞(生殖细胞除外)及正常组织几乎没有端粒酶活性,正常细胞向肿瘤细胞转变过程中大多伴随端粒酶的激活,端粒酶的活化可能是恶性肿瘤发生的关键环节及细胞恶化的共同通路^[1,2]。

脑胶质瘤是最常见的恶性肿瘤之一,近年来发病率逐渐增高。研究发现,端粒酶的激活在胶质瘤细胞癌变发生发展中起着重要的作用^[3-7]。因此,采用各种方法及从各种途径抑制端粒酶活性,并探讨其调控的相关机制,将有助于恶性胶质瘤的综合治疗。目前有关基因调控端粒酶活性的研究尚处于起步阶段,如 Polo 样激酶 1(polo-like kinase-1,PLK1)基因与端粒酶激活在胶质瘤中的内在相关性尚未明确。

Polo 样激酶家族包括人 PLK1,Snk,Fnk,Xenopus laevis Plx1,果蝇 Drosophila polo,酵母 PLO1,和出芽酵母 Cdc5^[8]。在低级动物中,该家族成员能控制中心小体功能、染色体分离和胞浆移动^[9-11]。PLK1 是哺乳类该基因家族的重要成员之一。已发现,PLK1 基因在非小细胞肺癌、食管癌,黑素瘤、口咽癌、乳腺癌等多种实体瘤中过度表达^[12,13],且是一个反应癌细胞增殖的重要的预后因子^[10,14]。

本研究借助于 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi)技术,采用针对 PLK1 设计合成的小干扰核糖核酸分子(small interfering RNA, siRNA)转染处理胶质瘤细胞,观察了对细胞增殖、增值细胞核抗原蛋白 (proliferating cell nuclear antigen,PCNA)表达及端粒酶活性的影响,以了解 PLK1 在胶质瘤形成中的可能作用。

材料与方

一、材料

人胶质瘤细胞系 TJ905 购自中国科学院上海生物化学和细胞生物学研究所。根据 PLK1 特点,设计 5 个 siRNA,见表 1(本研究 PLK1 siRNA 序列已申报专利,专利号:377173)。无关 siRNA 正义链序列:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTdTd-3';反义链序列:5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATdTdT-3'。所设计的所有 siRNA 与已知人类基因组序列无重复,由瑞士 Roche 公司合成高纯度的 21 个核苷酸 siRNA。PLK1 和 PCNA 单克隆抗体,购自美国 Santa Cruz 公司。TRIzol,RNase inhibitor,逆转录酶 SSRT II ,Taq 酶和转染试剂脂质体 Oligofectamine 购自美国 Invitrogen 公司。

二、细胞培养及转染处理

胶质瘤 TJ905 细胞在含 10%胎牛血清的 RBMI 1640 培养液,37℃,5%CO₂、饱和湿度环境的条件下连续培养。转染前 1 d,将 1.0×10⁵ 个/mL 对数期生长的细胞接种于 24 孔培养板,1 mL/孔,培养过夜。次日进行转染。基本操作按照说明书进行。细胞分组:脂质体对照组 (Con-A)、无关对照组(Con-B)、siRNA 组 [10%胎牛血清的 RBMI 1640 中含已用脂质体包埋的不同浓度 (3.125,6.25,12.5 nmol/L)的 siRNA],每组 3 个样本。转染后于不同时间(24、48、72 h)采用胰酶消化收取细胞,进行以下试验。

三、PLK1 检测

1. PLK1 mRNA 水平检测:采用荧光实时定量 RT-PCR 检测。应用 Trizol 抽提细胞总 RNA,取总 RNA 1 μg,以 oligo dT 为引物逆转录合成 cDNA 第一链,以此 cDNA 链 2 μL 为模板进行 PCR 扩增,荧光实时定量 RT-PCR 检测步骤参照文献[15]方法进行。PLK1 引物序列为:上游:5'-CAAGCTCATCTTGTGCCACT-3';下游:5'-GAGAAAGGGCTGCC

表 1 PLK1 siRNA 序列资料

Tab.1 Sequences of the siRNAs targeting PLK1 gene

序列号	正义链序列	反义链序列	攻击范围
P1	GAUUGUGCCUAAGUCUCUG	CAGAGACUUAGGCACAAUCTT	306-326
P2	AGCCUGACUGAGCCUGAG	CUCAGGCUCAGUCAGGGCUTT	499-519
P3	AUUGUGCUUGGCUGCCAGU	ACUGGCAGCCAAGCACAAUTT	539-559
P4	UGAAGAUCUGGAGGUGAAA	UUUCACCUCCAGAUCUUCATT	617-637
P5	AGAGCACAGUUUCGAGGUG	CACCUCGAAACUGUGCUCUTT	739-759

AGGC-3'。

2. PLK1 蛋白水平检测:收集细胞,用预冷的磷酸盐缓冲液洗 2 次,加入细胞裂解液,在冰面上静置 10~20 min,用细胞刮匀浆后 12 000 g,4 ℃离心 10 min,取上清,加入 1/3 体积的 4×上样缓冲液,煮沸 10 min 使蛋白变性。样品蛋白经凝胶电泳分离、电转移至硝酸纤维素膜,室温封闭 1 h 后加入 PLK1 抗体(1:500),4 ℃孵育过夜。漂洗后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1:500),37 ℃孵育 1 h,漂洗后用 ECL 显色,曝光,冲洗胶片。

四、细胞生长检测

转染 48 h 后,收集经转染的癌细胞,常规进行 MTT 试验,观测 PLK1 siRNA 对胶质瘤细胞增殖的影响。

五、细胞 PCNA 蛋白水平检测

提取各组细胞总蛋白,蛋白定量后,以 β-actin 为内参照,常规进行 Western blot 检测,方法同上。

六、端粒酶活性检测

消化收取细胞,经离心、洗涤后,参考文献[16],采用 TRAP-ELISA 方法检测端粒酶活性。

七、统计学方法

采用 SPSS 10.0 软件统计处理。组间比较采用单因素方差分析法,时间效应和剂量效应关系分析采用 Spearman 相关分析法。以 P≤0.05 为差异具有统计学意义。

结 果

一、PLK1 siRNA 的筛选

应用荧光实时定量 RT-PCR 检测 PLK1 mRNA 水平,结果发现,所设计的 5 个 siRNA 均对癌细胞 mRNA 水平有抑制作用,以 P4 效果最好。浓度为 100 nmol/L 的 P4,转染 48 h 后,抑制效果达到 93%。所以,本研究以 P4 为工具研究 PLK1 对胶质瘤细胞增殖和端粒酶活性的影响。(图 1)

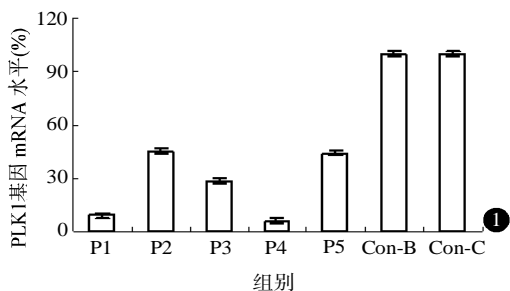
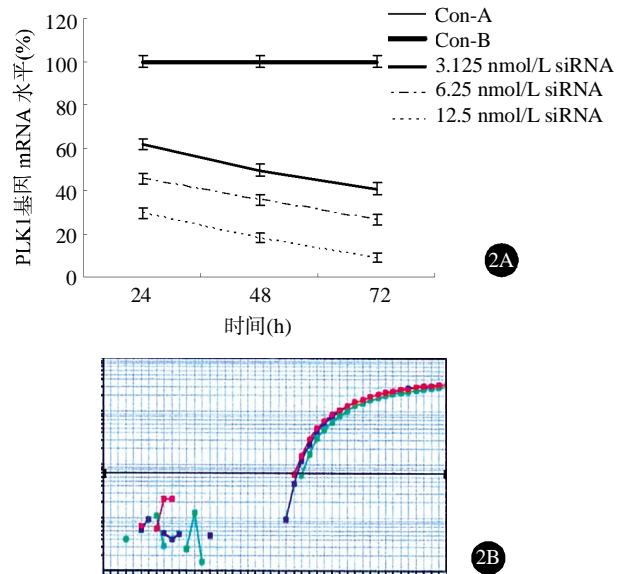


图 1 5 个 siRNAs(100 nmol/L)转染对胶质瘤 TJ905 细胞 PLK1 mRNA 水平的影响

Fig.1 Effects of the 5 siRNAs (100 nmol/L) on PLK1 mRNA expression in human glioma TJ905 cells

二、P4 siRNA 对胶质瘤细胞 PLK1 mRNA 和蛋白水平的抑制

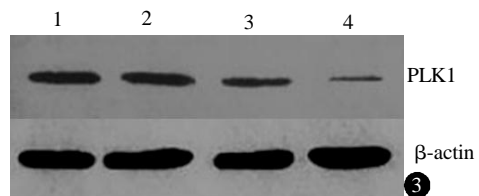
本研究采用 P4 siRNA 转染胶质瘤 TJ905 细胞后,分别采用荧光实时定量 RT-PCR 和 Western blot 检测 PLK1 mRNA 和蛋白水平。结果发现,与 Con-A 组细胞相比较,P4 siRNA 组 PLK1 mRNA 和蛋白水平明显下调 (F=236.78, P = 0.000; F=206.39, P = 0.000)。(图 2,3)



2A:定量 RT-PCR 结果;2B:PLK1 定量 RT-PCR 图形

图 2 P4 siRNA 转染对胶质瘤 TJ905 细胞 PLK1 mRNA 水平的影响

Fig.2 Effect of P4 siRNA on PLK1 mRNA expression in TJ905 cells



1 为 Con-A 组; 2~4 分别为 3.125、6.25、12.5 nmol/L siRNA 组

图 3 P4 siRNA 转染 24 h 对胶质瘤 TJ905 细胞 PLK1 蛋白水平的影响

Fig.3 Effect of P4 siRNA on PLK1 protein expression in TJ905 cells after 24 h

三、siRNA 转染对胶质瘤细胞增殖的影响

应用 MTT 检测 siRNA 转染对 TJ905 细胞增殖的影响。MTT 结果显示,P4 转染组癌细胞生长明显受到抑制,且呈浓度依赖性(r=0.868, P=0.000)。(图 4)

四、P4 siRNA 转染对胶质瘤细胞 PCNA 蛋白水平的影响

进一步采用 Western blot 方法检测胶质瘤细胞 PCNA 蛋白水平,结果显示,转染组胶质瘤细胞 PCNA 蛋白明显下调(F=181.36, P=0.000)。(图 5)

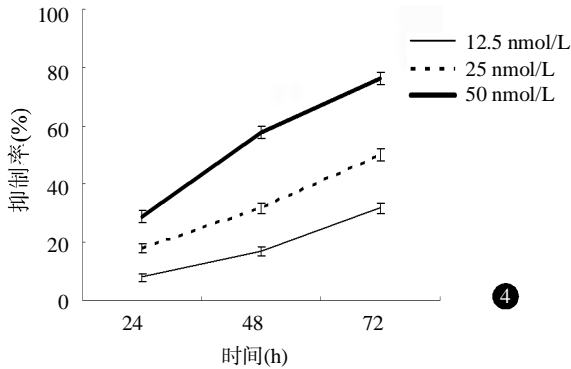
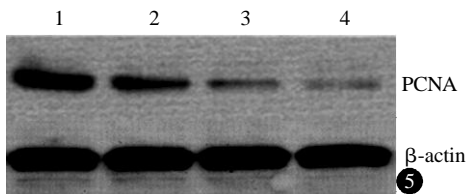


图 4 P4 siRNA 转染对胶质瘤 TJ905 细胞增殖的影响

Fig.4 Effect of transfection with P4 siRNA on the proliferation of human glioma TJ905 cells



1为 Con-A 组; 2~4 分别为 3.125、6.25、12.5 nmol/L siRNA 组

图 5 P4 siRNA 转染对胶质瘤 TJ905 细胞 PCNA 蛋白水平的影响 (24 h)

Fig.5 Effect of P4 siRNA transfection on PCNA protein expression in TJ905 cells (24 h)

五、PLK1 siRNA 转染对胶质瘤细胞端粒酶活性的影响

为探讨 PLK1 基因对胶质瘤细胞 TJ905 细胞端粒酶活性的影响,本研究采用 TRAP-ELISA 法检测 P4 转染后的胶质瘤细胞端粒酶活性。结果发现,胶质瘤 TJ905 细胞经 P4 siRNA 转染处理后,端粒酶活性明显受到抑制,且呈浓度和时间依赖性 ($r=0.819, P=0.000; r=0.836, P=0.000$)。(图 6)

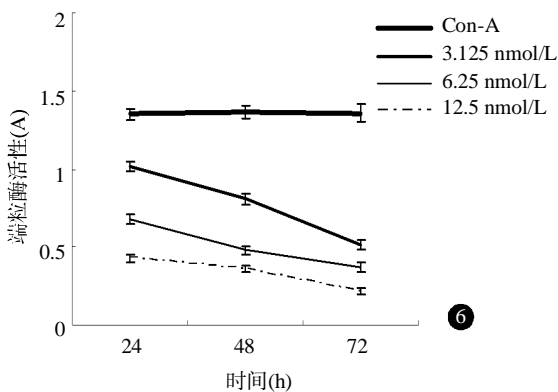


图 6 P4 siRNA 对胶质瘤 TJ905 细胞端粒酶活性的抑制

Fig.6 Changes in telomerase activity of human glioma TJ905 cells transfected with P4 siRNA

讨 论

端粒酶活化是大多数肿瘤发生的关键环节及细胞恶化的必经之路,因而端粒酶不但已成了当今新的肿瘤标志物,而且已成为肿瘤基因治疗中一个新的理想靶点。所以,采用各种方法及从各种途径抑制端粒酶活性,并探讨其调控的相关机制,将有助于恶性肿瘤的综合治疗。

既往抑制端粒酶活性的研究主要从阻断端粒酶 RNA 的模板作用和阻断端粒酶蛋白催化亚基的功能以抑制端粒酶活性方面考虑,然而通过对肿瘤细胞内调节机制的调控来抑制端粒酶活性的研究较少。研究发现,许多在肿瘤恶性增殖中起重要作用的基因与端粒酶的激活有重要关系^[15,17,18]。但有关基因调控端粒酶活性的研究尚属起步阶段,如 PLK1 基因在胶质瘤细胞中端粒酶活性调控的可能作用尚不明。

在基因治疗领域中, RNAi 相关技术早已引起了广泛的注意。RNAi 是近年来发现的一种调节 mRNA 的生物学现象,能够使基因表达的 mRNA 被相应的双链 RNA 分子敲除,其效果要远强于正义和反义 RNA^[19]。人工化学合成的 siRNA 也可以在哺乳动物细胞中直接触发 RNAi 而抑制特定基因的表达^[20]。作为一种简单、有效的代替基因敲除的工具, RNAi 和 siRNA 相关技术的应用不但加快了功能基因组学领域的研究步伐,也推动了疾病基因治疗的研究,在抵御病毒感染、抑制突变基因表达以及筛选药物作用靶点等方面有广阔的应用前景。

本研究针对 PLK1 mRNA 特点,设计并采用化学方法合成了 5 个 PLK1 siRNA,分别转染胶质瘤 TJ905 细胞后,采用定量 PCR 和 Western blot 检测 PLK1 mRNA 和蛋白水平。结果发现,这 5 个 siRNA 均对胶质瘤细胞 PLK1 mRNA 和蛋白水平有抑制作用,其中以 P4 效果最好。进一步研究发现,P4 siRNA 转染可明显下调 PLK1 mRNA 和蛋白水平。

PLK1 基因表达下调后,本研究分别采用 MTT 法和 Western blot 检测胶质瘤细胞生长和 PCNA 蛋白表达情况,以了解 P4 siRNA 转染对胶质瘤细胞增殖的影响。结果显示,胶质瘤细胞增殖明显受到抑制,PCNA 蛋白水平明显下调。

癌细胞的增殖与端粒酶的激活密切相关,我们尝试从端粒酶活性角度探讨了 PLK1 基因调控癌细胞增殖的机制。细胞转染 P4siRNA 不同时间后,收集细胞,采用 TRAP-ELISA 方法检测了细胞端粒酶活性,结果发现,转染组细胞端粒酶活性明显受到抑

制。由此说明,采用 siRNA 下调胶质瘤细胞 PLK1 表达后,可抑制胶质瘤细胞端粒酶活性。✓

本研究提示,PLK1 基因高表达可能在胶质瘤细胞增殖中起着重要的作用,而以 RNAi 相关技术下调 PLK1 表达,可有效地抑制胶质瘤细胞恶性增殖,其机制可能与抑制端粒酶活性有关。✓

参 考 文 献

- [1] Raynaud CM, Sabatier L, Philipot O, et al. Telomere length, telomeric proteins and genomic instability during the multistep carcinogenic process[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2008, 66(2): 99-117.✓
- [2] Sampedro Camarena F, Cano Serral G, Sampedro Santaló F. Telomerase and telomere dynamics in ageing and cancer: current status and future directions [J]. Clin Transl Oncol, 2007, 9 (3): 145-154.✓
- [3] Wang L, Wei Q, Wang LE, et al. Survival prediction in patients with glioblastoma multiforme by human telomerase genetic variation[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(10): 1627-1632.✓
- [4] Boldrini L, Pistolesi S, Gisfredi S, et al. Telomerase activity and hTERT mRNA expression in glial tumors[J]. Int J Oncol, 2006, 28 (6): 1555-1560.✓
- [5] Falchetti ML, Fiorenzo P, Mongiardi MP, et al. Telomerase inhibition impairs tumor growth in glioblastoma xenografts [J]. Neurol Res, 2006, 28(5): 532-537.✓
- [6] Aoki H, Iwado E, Eller MS, et al. Telomere 3' overhang-specific DNA oligonucleotides induce autophagy in malignant glioma cells[J]. FASEB J, 2007, 21(11): 2918-2930.✓
- [7] Maes L, Van Neste L, Van Damme K, et al. Relation between telomerase activity, hTERT and telomere length for intracranial tumours[J]. Oncol Rep, 2007, 18(6): 1571-1576.✓
- [8] Petronczki M, Lénárt P, Peters JM. Polo on the Rise-from Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1 [J]. Dev Cell, 2008, 14(5): 646-659.✓
- [9] Van de Weerd BC, Medema RH. Polo-like kinases: a team in control of the division[J]. Cell Cycle, 2006, 5(8): 853-864.✓
- [10] Martin BT, Strebhardt K. Polo-like kinase 1: target and regulator of transcriptional control[J]. Cell Cycle, 2006, 5(24): 2881-2885.✓
- [11] Randall CL, Burkard ME, Jallepalli PV. Polo kinase and cytokinesis initiation in mammalian cells: harnessing the awesome power of chemical genetics[J]. Cell Cycle, 2007, 6(14): 1713-1717.✓
- [12] Reagan-Shaw S, Ahmad N. Polo-like kinase (Plk) 1 as a target for prostate cancer management [J]. IUBMB Life, 2005, 57 (10): 677-682.✓
- [13] Strebhardt K, Ullrich A. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(4): 321-330.✓
- [14] Fan Y, Zheng S, Xu ZF, et al. Apoptosis induction with polo-like kinase-1 antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide of colon cancer cell line SW480[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(29): 4596-4599.✓
- [15] 范钰, 郑树, 赵刚. 脂质体介导的 cripto 反义寡核苷酸抑制结肠癌细胞端粒酶活性[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(4): 761-765.✓
- [16] Panarese S, Brunetti B, Sarli G. Evaluation of telomerase in canine mammary tissues by immunohistochemical analysis and a polymerase chain reaction-based enzyme-linked immunosorbent assay[J]. J Vet Diagn Invest, 2006, 18(4): 362-368.✓
- [17] Konnikova L, Simeone MC, Kruger MM, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in human cancer and primary cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(15): 6516-6520.✓
- [18] Mei YP, Zhu XF, Zhou JM, et al. siRNA targeting LMP1-induced apoptosis in EBV-positive lymphoma cells is associated with inhibition of telomerase activity and expression [J]. Cancer Lett, 2006, 232(2): 189-198.✓
- [19] Masiero M, Nardo G, Indraccolo S, et al. RNA interference: implications for cancer treatment[J]. Mol Aspects Med, 2007, 28 (1): 143-166.✓
- [20] Masiero M, Nardo G, Indraccolo S, et al. RNA interference: implications for cancer treatment[J]. Mol Aspects Med, 2007, 28 (1): 143-166.✓

(收稿日期:2008-04-26)✓

(本文编辑:薛杉)