

论著

文章编号:1000-5404(2012)15-1514-04

Nek2 基因沉默对卵巢癌 SKOV3 细胞侵袭能力的影响

范婷婷,唐良菴 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院妇产科)

[摘要] 目的 研究 RNA 干扰 Nek2 表达对卵巢癌 SKOV3 细胞侵袭能力的影响以及相关的分子机制。方法 设计合成 3 条针对 Nek2 基因的 siRNA,转染至 SKOV3 细胞中,采用 Real-time RT-PCR 和 Western blot 技术筛选出抑制效率最高的 Nek2-siRNA 序列,用 Transwell 方法检测转染该序列的 SKOV3 细胞侵袭能力的改变,并用 Western blot 方法检测 Nek2-siRNA 转染后 SKOV3 细胞中 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 蛋白表达的变化。结果 ①RNA 干扰序列 2 对 SKOV3 细胞中 Nek2 的抑制效果最明显;②与未转染组和阴性对照组相比,转染了 Nek2-siRNA 的 SKOV3 细胞侵袭能力明显下降($P < 0.01$);③Western blot 检测表明,与未转染组和阴性对照组相比,Nek2-siRNA 转染 48 h 后 SKOV3 细胞中 MMP-2、MMP-9 的表达明显下调,而 TIMP-1 的表达明显上调($P < 0.01$)。结论 Nek2-siRNA 能有效得沉默 SKOV3 细胞中 Nek2 的表达,通过下调 MMP-2、MMP-9 的表达,上调 TIMP-1 的表达,从而抑制 SKOV3 细胞的侵袭转移。

[关键词] NIMA 相关激酶;RNA 干扰;卵巢癌;侵袭

[中图分类号] R394.3; R73-37; R737.31

[文献标志码] A

Silencing Nek2 via RNAi suppresses invasiveness in ovarian cancer SKOV3 cells

Fan Tingting, Tang Liangdan (Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] Objective To determine the effect of silencing NIMA-related kinase 2 (Nek2) via RNAi on the invasive capacity of ovarian cancer SKOV3 cells. Methods Three pairs of siRNA were designed according to the sequence of Nek2 gene and then synthesized chemically. In 48 h after transfection of the siRNAs into the SKOV3 cells, real-time RT-PCR and Western blotting were performed to detect the expression levels of Nek2 mRNA and protein so as to screen the most effective siRNA. The capacity of invasion were evaluated by Transwell chamber test. Western blotting was used to determine the protein levels of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 after Nek2-siRNA transfection. Results Real-time RT-PCR and Western blotting revealed that Nek2-siRNA notably down-regulated Nek2 expression at both mRNA and protein levels. The cell number of invasion in SKOV3 cells was significantly decreased compared to the control groups ($P < 0.01$). Western blotting revealed that Nek2-siRNA transfection up-regulated the expression level of TIMP-1, down-regulated the expression levels of MMP-2 and MMP-9 in SKOV3 cells significantly ($P < 0.01$). Conclusion Nek2-siRNA transfection can effectively inhibits Nek2 expression, restrains the invasion capacities of ovarian cancer SKOV3 cells through up-regulating TIMP-1 and down-regulating MMP-2 and MMP-9.

[Key words] Nek2; small interfering RNA; ovarian cancer; cell invasiveness

Supported by the Doctoral Fund of Ministry of Education(200806310001) and the Project of Science Research of First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University(YXJJ2009-05). Corresponding author: Tang Liangdan, E-mail: ldtang2002@yahoo.com.cn

卵巢癌的病死率居妇科恶性肿瘤之首,主要因为卵巢癌发病比较隐蔽,70%以上的卵巢癌在诊断时,病变已属晚期(Ⅲ/Ⅳ期)^[1]。目前,从分子生物学水平寻找早期诊断和治疗卵巢癌的标志物已成为研究的热

点。在前期实验中,我们通过反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。

Nek2 属于丝氨酸-苏氨酸激酶,它集中于中心体,通过底物磷酸化调节纺锤体的形成和分离^[2]。近年来的研究表明,Nek2 在多种肿瘤细胞系中高表达,如乳腺癌、宫颈癌、前列腺癌及恶性淋巴瘤等。Hayward

[基金项目] 教育部博士培养基金(200806310001);重庆医科大学附属第一医院医学科学基金(YXJJ2009-05)

[通信作者] 唐良菴,E-mail: ldtang2002@yahoo.com.cn

等^[3]通过免疫组化发现浸润性乳腺癌细胞能高表达Nek2。Toshio等^[4]发现,在胆管癌腹膜播散动物模型中,抑制Nek2的表达可明显延长小鼠生命。Tsunoda等^[5]发现,用siRNA沉默Nek2的表达不仅能抑制乳腺癌细胞的生长和克隆形成,而且还能抑制乳腺癌细胞的侵袭能力,这可能与Nek2的微管调节作用有关。以上研究结果提示,Nek2不仅与肿瘤细胞的生长有关,也可能与肿瘤的侵袭转移有关。为此,本研究借助于RNA干扰(RNAi)技术,合成Nek2基因的小分子干扰RNA(siRNA),转染至卵巢癌SKOV3细胞,观察其对卵巢癌细胞侵袭能力的影响,并初步探讨其可能的机制,为进一步研究Nek2与卵巢癌发生、发展的关系奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料来源

卵巢浆液性乳头状囊腺癌细胞株SKOV3细胞由第三军医大学大坪医院野战外科研究所馈赠。Nek2抗体、MMP-2抗体、MMP-9抗体、TIMP-1抗体购自Abcam公司。Trizol、Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司。Real-time RT-PCR试剂盒购于Fermentas公司。根据Nek2基因序列,设计3对Nek2-siRNA序列,由上海吉玛公司合成,Nek2-siRNA序列1正义链:5'-GGGCUAGCUAGAAUUAUAATT-3',反义链:5'-UUAUAUUCUAGCUAGCCCTT-3';Nek2-siRNA序列2正义链:5'-GGCACACCUUAUACAUGUTT-3',反义链:5'-ACAUGUAAUAAGGUGUGCCTT-3';Nek2-siRNA序列3正义链:5'-GAUCUGGUAGUGUAAUUAATT-3',反义链:5'-UAAUUAACACUAGCCAGAU-CTT-3',阴性对照与任何编码序列无同源性。

1.2 细胞转染及分组

SKOV3细胞在含10%胎牛血清的RPMI1640培养液中,于37℃、5%CO₂、饱和湿度的条件下培养。取对数生长期细胞用胰酶消化,制成细胞悬液,按30%~50%密度接种细胞于6孔板,培养过夜。转染过程:首先制备siRNA/脂质体复合物,室温放置20min;然后转染细胞,混匀,放入培养箱培养,24h后观察转染情况。

将实验分为3组:转染Nek2-siRNA的SKOV3细胞为干扰组,转染阴性对照序列的SKOV3细胞为阴性对照组,未经任何处理的SKOV3细胞为空白对照组。在转染48h后用胰酶消化收集细胞,进行以下实验。

1.3 Real-time RT-PCR检测Nek2基因表达

收集转染后48h的各组细胞,以Trizol提取细胞总RNA,按照说明书进行逆转录。Nek2基因引物上游序列:5'-CCAGC-CCTGTATTGAGTG-3',下游引物序列:5'-ACTTCCGTCCTT-TAGCA-3',取1个样品的cDNA模板进行β-actin的PCR扩增,产品做10倍比稀释,制成标准模板系列,然后在全定量PCR仪上行PCR。反应条件:95℃10min,95℃15s,53℃30s,72℃30s,40个循环,每个样本重复3次检测。

1.4 Western blot检测NEK2蛋白及转染后的SKOV3细胞中MMP-2、MMP-9和TIMP-1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30μg上样于10%的聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后进行转膜。取出转移好的PVDF膜,判断转移成功后,封闭,加Nek2抗体(1:200)或β-actin抗体(1:1000),4℃过夜。加入二抗(1:5000),室温下摇床上摇90min,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,计算两者的比值即为NEK2蛋白的相对表达水平。

1.5 SKOV3细胞体外侵袭能力检测

50mg/L Matrigel 1:8稀释包被Transwell底部膜的上室面,4℃风干。水化基底膜,下室加入500μl含FBS或趋化因子的培养基。取转染48h后的SKOV3细胞悬液(1×10⁶/ml)200μl加入Transwell小室。培养24h后,用棉签擦去基质胶和上室内的细胞,固定,染色,200倍光镜下随机计数5个视野的穿膜细胞数,取均值。

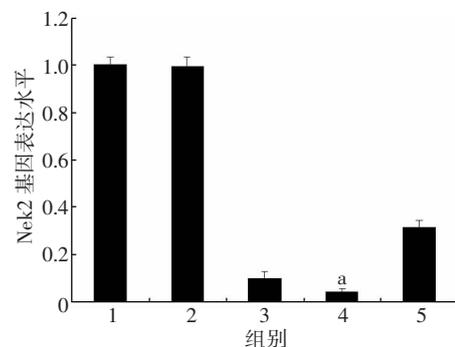
1.6 统计学分析

实验数据采用SPSS 12.0软件进行统计分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 Nek2-siRNA干扰后Nek2基因水平表达的变化

Real-time RT-PCR分析表明人卵巢癌细胞株SKOV3中Nek2基因在mRNA水平高表达。RNA干扰48h后,Nek2在mRNA水平的表达受到明显的抑制,其中干扰组2(Nek2-siRNA序列2)与空白对照组相比的抑制最为明显($P < 0.01$)。空白对照组与阴性对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图1。



1:空白对照组;2:阴性对照组;3~5:干扰组1~3 a: $P < 0.01$,与空白对照组比较

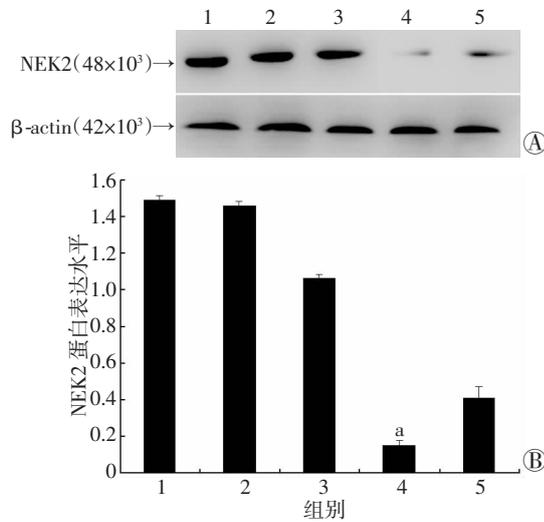
图1 Real-time RT-PCR检测Nek2在SKOV3细胞中的表达

2.2 Nek2-siRNA干扰后NEK2蛋白水平表达的变化

Western blot分析表明卵巢癌细胞株SKOV3中NEK2蛋白呈高表达,RNA干扰48h后,NEK2的蛋白表达水平显著降低,其中干扰组2(Nek2-siRNA序列2)与空白对照组相比,蛋白表达水平的下降最为明显($P < 0.01$)。空白对照组与阴性对照组

相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图2。

Real time RT-PCR 和 Western blot 检测结果表明,干扰组2 (Nek2-siRNA 序列2)对NEK2在卵巢癌细胞株SKOV3中的表达抑制效果最为明显,因此后续实验选择Nek2-siRNA序列2作为干扰组。



1:空白对照组;2:阴性对照组;3~5:干扰组1~3 A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 a: $P<0.01$,与空白对照组比较

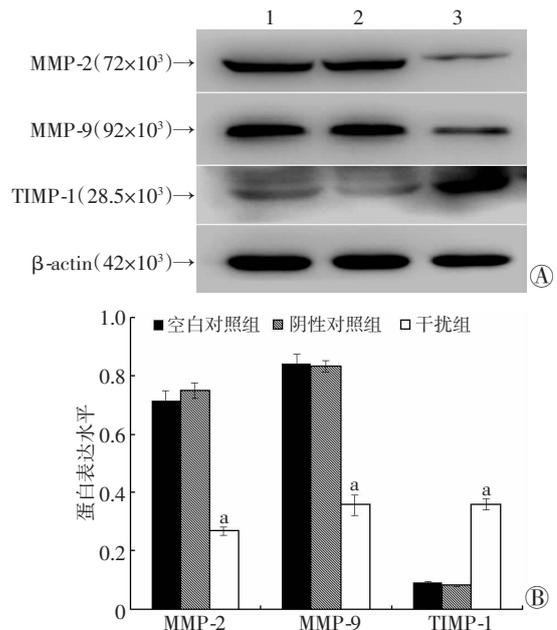
图2 Western blot 检测 NEK2 在 SKOV3 细胞中的表达

2.3 Nek2-siRNA 对卵巢癌细胞株 SKOV3 侵袭能力的影响

在Nek2-siRNA转染后72h,通过侵袭实验来检测SKOV3细胞侵袭能力的变化,结果显示:空白对照组、阴性对照组和干扰组的穿膜细胞数分别为(340.0 ± 17.3)、(329.3 ± 13.6)、(27.3 ± 5.1),干扰组与空白对照组相比侵袭细胞数明显下降($P<0.01$),而空白对照组与阴性对照组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图3。

2.4 转染后 SKOV3 细胞中 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 蛋白表达的变化

Nek2-siRNA 转染 SKOV3 细胞 48 h 后, MMP-2、MMP-9 的表达明显下调, TIMP-1 的表达明显上调。见图4。

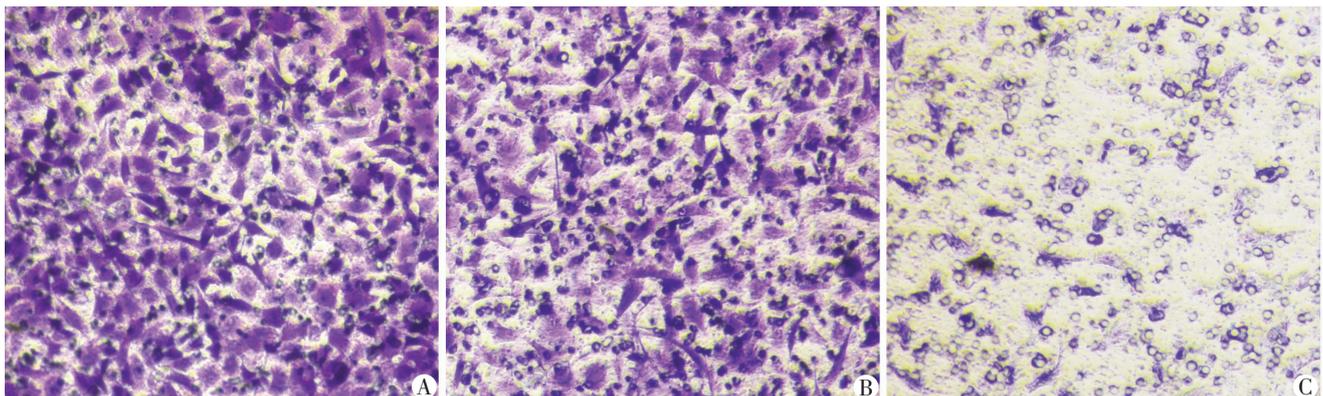


1:空白对照组;2:阴性对照组;3:干扰组;A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 a: $P<0.01$,与空白对照组比较

图4 Western blot 检测 SKOV3 细胞中 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 蛋白的表达

3 讨论

Nek 激酶(NIMA-related kinase)为哺乳动物细胞中NIMA相关激酶,包括11个家族成员(Nek1~11),其中Nek2与NIMA的同源性最高而备受关注,其相对分子质量为(44~48) × 10³。随着对Nek2研究的深入,发现它与多种肿瘤的发生、发展密切相关。目前,该基因在卵巢癌细胞侵袭转移中的作用及相关分子机制尚不完全清楚,为此实验针对Nek2基因序列设计合成了3条siRNA序列,并分别转染卵巢癌细胞株SKOV3细胞。转染48h后,分别从基因水平和蛋白水平检测Nek2的表达情况,结果表明:在未转染Nek2-siRNA的空白对照组中Nek2高表达,而转染了Nek2-



A:空白对照组;B:阴性对照组;C:干扰组

图3 Transwell 法检测 SKOV3 细胞侵袭能力的改变 (结晶紫染色 ×200)

siRNA 的 SKOV3 细胞中 Nek2 表达受到明显抑制,其中序列 2 的抑制效果最为明显。这说明该条 RNA 干扰序列可作为进一步研究 Nek2 在卵巢癌发生、发展中的作用的有效工具。

侵袭和转移是恶性肿瘤的基本特征,也是其复发和致死的主要原因。本研究利用体外侵袭实验 Transwell 方法检测转染前后 SKOV3 细胞侵袭能力的变化。结果表明,转染了 Nek2-siRNA 的细胞与未转染组比较,侵袭能力明显下降。这说明 Nek2 基因在卵巢癌的侵袭转移行为中扮演重要作用。

肿瘤的浸润包括:黏附、降解和移动,其中癌细胞对细胞外基质的降解和血管基底膜的破坏是肿瘤浸润转移的先决条件,而这一降解过程依靠蛋白水解酶,包括丝氨酸蛋白酶类、半胱氨酸蛋白酶类和基质金属蛋白酶类(matrix metalloproteinase, MMPs)^[6]。MMP-2、MMP-9 是 MMPs 中两个重要成员,它们高表达降解基底膜主要成分 IV 型胶原,促进癌细胞的侵袭转移,还能促进肿瘤血管的生成,从而加速肿瘤的生长和转移^[7-8]。金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMPs)为 MMPs 的拮抗物,其家族成员有 TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、TIMP-4,它们具有共同的结构特征,通过与 MMPs 形成复合物来抑制 MMPs 的基质蛋白分解作用。

有研究发现 MMP-2 在卵巢癌转移中是一种早期反应蛋白,当肿瘤细胞黏附时,MMP-2 表达增加,基质蛋白分解作用也增强;在体内实验中抑制 MMP-2 的表达可以明显减少转移灶的数量^[9]。Sakata 等^[10]对基质金属蛋白酶在卵巢癌病例中的表达进行研究,发现 MMP-2、MT1-MMP、TIMP-2 的过表达及 TIMP-1 的下调与卵巢癌的分级有一定关系,淋巴结转移病例中 MMP-9 的表达要高于无淋巴结的转移的病例,并且所有 MMP-9 阳性区域,其 TIMP 的表达都是阴性,提示 MMP-9 的过表达和 TIMP-1 的低表达可能促进了卵巢癌发生淋巴结转移。

为阐明 Nek2 参与卵巢癌细胞侵袭转移的相关分子机制,本研究检测了 Nek2-siRNA 转染前后 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 蛋白表达水平的变化,结果表明 Nek2-siRNA 转染 48 h 后,MMP-2、MMP-9 的表达明显下降,而 TIMP-1 的表达显著上调。有研究^[11-12]发现 Nek2 能维持细胞微管网状结构的稳定性,而细胞微管结构与胞内 MMP-2、MMP-9 和 TIMP 的囊泡运输和分泌有关^[13]。Schnaeker 等^[14]对 MMPs 在黑色素瘤细胞内的储存、运输和胞吐进行研究,发现抑制微管功能可下调 MMP-2 和 MMP-9 的分泌,从而减弱细胞的侵袭能力。由此推测,通过抑制 Nek2 的表达可影响细胞微管结构的稳定性,调节胞内 MMPs 及 TIMPs 的囊泡

运输和分泌,从而抑制卵巢癌细胞的侵袭和转移。

综上所述,Nek2 参与了卵巢癌的侵袭转移,通过 Nek2-siRNA 下调其表达可以明显抑制卵巢癌细胞的侵袭能力,这可为研究卵巢癌侵袭转移的抑制剂打下理论基础。同时可通过对 Nek2 基因的进一步研究,可为临床监测卵巢癌进展和预后评估提供实验依据。

参考文献:

- [1] Marsden D E, Friedlander M, Hacker N F. Current management of epithelial ovarian carcinoma: a review [J]. *Semin Surg Oncol*, 2000, 19 (1): 11 - 19.
- [2] Whelligan D K, Solanki S, Taylor D, *et al.* Aminopyrazine inhibitors binding to an unusual inactive conformation of the mitotic kinase Nek2: SAR and structural characterization [J]. *J Med Chem*, 2010, 53 (21): 7682 - 7698.
- [3] Hayward D G, Clarke R B, Faragher A J, *et al.* The centrosomal kinase Nek2 displays elevated levels of protein expression in human breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(20): 7370 - 7376.
- [4] Kokuryo T, Senga T, Yokoyama Y, *et al.* Nek2 as an effective target for inhibition of tumorigenic growth and peritoneal dissemination of cholangiocarcinoma [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(20): 9637 - 9642.
- [5] Tsunoda N, Kokuryo T, Oda K, *et al.* Nek2 as a novel molecular target for the treatment of breast carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100 (1): 111 - 116.
- [6] Naduk-Kik J, Hrabec E. The role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of diabetes mellitus and progression of diabetes retinopathy [J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2008, 62: 442 - 450.
- [7] Lamar J M, Pumiglia K M, DiPersio C M. An immortalization-dependent switch in integrin function up-regulates MMP-9 to enhance tumor cell invasion [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(18): 7371 - 7379.
- [8] Amalinei C, Caruntu I D, Giusca S E, *et al.* Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2010, 51(2): 215 - 228.
- [9] Kenny H A, Lengyel E. MMP-2 functions as an early response protein in ovarian cancer metastasis [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(5): 683 - 688.
- [10] Sakata K, Shigemasa K, Nagai N, *et al.* Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, MT1-MMP) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in common epithelial tumors of the ovary [J]. *Int J Oncol*, 2000, 17(4): 673 - 681.
- [11] Fry A M. The Nek2 protein kinase: a novel regulator of centrosome structure [J]. *Oncogene*, 2002, 21(40): 6184 - 6194.
- [12] 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.
- [13] Sbai O, Ferhat L, Bernard A, *et al.* Vesicular trafficking and secretion of matrix metalloproteinases-2, -9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in neuronal cells [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2008, 39 (4): 549 - 568.
- [14] Schnaeker E M, Ossig R, Ludwig T, *et al.* Microtubule-dependent matrix metalloproteinase-2/matrix metalloproteinase-9 exocytosis: prerequisite in human melanoma cell invasion [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(24): 8924 - 8931.

(收稿:2011-12-15;修回:2012-01-05)

(编辑 吴培红)