

RNAi 沉默 Polo-like kinase-1 基因表达对 大肠癌细胞端粒酶活性的影响

倪国华¹ 范钰^{2Δ} 陈坚³ 钱立平³ 林庚金³ 陈功星⁴ 丁佳逸⁴ 郑树⁴

(¹江苏省丹阳市人民医院肿瘤科,江苏 丹阳 212300; ²江苏大学附属人民医院肿瘤研究所化疗科 江苏 镇江 212002;

³复旦大学附属华山医院消化科 上海 200040; ⁴浙江大学肿瘤研究所 浙江 杭州 310009)

【摘要】 目的 探讨 polo-like kinase-1(PLK1)基因对大肠癌细胞增殖和端粒酶活性的影响。方法 根据 PLK1 基因序列特点,设计并用化学方法合成小干扰核糖核酸分子(small interfering RNA, siRNA),转染人大肠癌 SW480 细胞后,分别采用实时定量 PCR 和 Western blot 检测 PLK1 基因 mRNA 和蛋白表达水平。分别采用 MTT 法和 TRAP-ELISA 方法检测 PLK1 基因转染对大肠癌细胞增殖和端粒酶活性的影响。结果 所设计的 5 个 siRNA 均能明显抑制大肠癌 SW480 细胞 PLK1 mRNA 水平,以 P4 效果最好。以 P4 转染处理大肠癌细胞后,PLK1 mRNA 水平和蛋白水平明显下调,且呈浓度和时间依赖性。MTT 和 TRAP-ELISA 方法检测发现,P4 siRNA 转染组细胞增殖和端粒酶活性明显受到抑制,且呈浓度和时间依赖性($P < 0.05$, $P < 0.05$)。结论 PLK1 基因对大肠癌细胞增殖具有重要的调控作用;以 PLK1 siRNA 转染处理大肠癌细胞,可明显抑制大肠癌细胞的恶性增殖,其机制可能与抑制端粒酶活性有关。

【关键词】 大肠肿瘤; polo-like kinase-1; RNA 干扰; 小干扰 RNA; 端粒酶

【中图分类号】 R 735.3⁺4 **【文献标志码】** A

Effects of RNA interference polo-like kinase-1 gene on telomerase activity of human colon cancer cell

NI Guo-hua¹, FAN Yu^{2Δ}, CHEN Jian³, QIAN Li-ping³, LIN Geng-jin³,
CHEN Gong-xing⁴, DING Jia-yi⁴, ZHENG Shu⁴

(¹Department of Oncology, People's Hospital of Danyang, Danyang 212300, Jiangsu Province, China;

²Cancer Institute-Department of Chemotherapy, Affiliated People's Hospital, Jiangsu University,

Zhenjiang 212002, Jiangsu Province, China; ³Department of Gastroenterology, Huashan

Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China; ⁴Cancer Institute, Zhejiang

University, Hangzhou 310009, Zhejiang Province, China)

【Abstract】 Objective To investigate the role of polo-like kinase-1 (PLK1) on proliferation and telomerase activity of human colon cancer cells. **Methods** After SW480 colon cancer cell were transfected with small interfering RNA (siRNA) against PLK1, the real time RT-PCR and Western blot assay were used to examine PLK1 gene expression in all cancer cells. The proliferation and telomerase activity of cancer cells were determined by MTT and telomeric repeat amplification protocol enzyme-linked immunosorbent assay (TRAP-ELISA), respectively. **Results** Expression of PLK1 of SW480 cancer cell transfected with siRNA down-regulated significantly. Transfection of PLK1 siRNA resulted significantly in inhibition of colon cancer cell *in vitro*. The results from TRAP showed that cancer cells exhibited marked apoptosis, in time-and dose-dependent pattern. **Conclusions** RNA interference PLK1 could inhibit proliferation through inducing suppressing telomerase activity of human colon cancer cell.

【Key words】 colon carcinoma cell; polo-like kinase-1; RNA interference; small interfering RNA; telomerase

已有研究发现,85%~90%的肿瘤包括大肠癌中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^[1]。端粒酶的活化可能是恶性肿瘤发生的关键环节之一及细胞恶化的共同通路^[2]。

大肠癌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,端粒酶的激活在大肠黏膜癌变发生发展中起着重要的作用^[3-5]。由正常大肠黏膜发展到大肠癌,端粒酶阳性表达率呈递增趋势^[6,7]。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,将有助于肿瘤的基因治疗。

Polo 激酶家族包括人 polo-like kinase (PLK) 1, 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体功能,染色体分离和胞质移动^[9]。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、黑色素瘤、乳腺癌、结直肠癌、子宫内膜癌^[10] 等许多实体瘤中呈高表达,且是一个反映癌细胞增殖的重要的预后因子^[11]。但目前尚不了解 PLK1 基因

与端粒酶活性在大肠癌中的相关性。

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)转染处理大肠癌细胞,观察了对细胞端粒酶活性的影响,以了解 PLK1 在大肠癌形成中的可能作用。

材料和方法

材料 人大肠癌细胞系 SW480 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)。无关 siRNA 正义链序列:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTdTd-3';反义链序列:5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATdTd-3'。所设计的所有 siRNA 与已知人类基因组序列无重复,由 Roche 公司合成高纯度的 21 nt siRNA。PLK1 抗体,购自 Santa Cruz 公司。TRIzol, RNase inhibitor, 逆转录酶 SSRTII, Taq 酶和转染试剂 Oligofectamine 购自 Invitrogen 公司。TRAP-ELISA 试剂盒,购自 Roche 公司。

表 1 PLK1 siRNA 序列

Tab 1 Sequence of PLK1 siRNA

No.	Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')	Position
P1	GAUUGUGCCUAAGUCUCUGTT	CAGAGACUUAGGCACAAUCTT	306-326
P2	AGCCUGACUGAGCCUGAGTT	CUCAGGCUCAGUCAGGGCUTT	499-519
P3	AUUGUGCUUGGCUGCCAGUTT	ACUGGCAGCCAAGCACAAUTT	539-559
P4	UGAAGAUCUGGAGGUGAAAATT	UUUCACCUCCAGAUCUUCATT	617-637
P5	AGAGCACAGUUUCGAGGUGTT	CACCUCGAAACUGUGCUCUTT	739-759

细胞培养及转染 大肠癌 SW480 细胞在含 10% 胎牛血清的 RBMI 1640 培养液,37 °C、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/mL 呈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。基本操作方法按照说明书进行。细胞分组:(1)空白对照组(Con-A);(2)脂质体对照组(Con-B);(3)无关对照组(Con-C);(4)siRNA 组:10%胎牛血清的 RBMI 1640 中含已用脂质体包埋的不同浓度的 PLK1 siRNA。转染后于不同时间采用胰酶消化收取细胞,进行以下试验。

PLK1 基因检测

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 PCR 检测 and 数据分析步骤参照文献方法进行^[12]。PLK1 引物序列为:上游:5'-CAAG-CTCATCTTGTGCCCACT-3';下游:5'-GAGAA-AGGGCTGCCAGGC-3'。FAM 探针:5'-CCGCT-TCTCGTCGATGTAGGTCACG-3'-TAMRA。以 GAPDH 为内参。PCR 反应条件为:95 °C,预变性 3 min,95 °C 30 s,52 °C 45 s,72 °C 45 s,35 个循环后 72 °C 再延伸 7 min。

蛋白水平检测 以 β-actin 为内参照,常规进行 Western blot 检测。方法简要如下:提取对照组和各实验组细胞总蛋白,蛋白定量后,用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,分离的蛋白电泳转移至 PVDF 膜后,用 5% 脱脂奶的 TBST 室温封闭 2~4 h,加入 PLK1 抗体,4 °C 孵育过夜,以 1:2 000 稀释的酶标二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG)室温孵育 1~2 h,取出膜,保鲜膜封膜,固定在

暗盒内,曝光 30 s,在 X 光片上作好标记。

细胞增殖检测 以不同浓度(12.5 nmol/L、25.0 nmol/L、50 nmol/L)的 PLK1 siRNA 转染大肠癌细胞 48 h 后,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μ L,继续培养 4 h,去上清。每孔加入二甲基亚砷 0.1 mL,摇床上摇动约 15 min,用酶标仪在波长 570 nm 处计数各孔吸光度值(D 值)。细胞生长抑制率(inhibition ratio, IR) = (1 - 转染组试验孔 D 值)/空白对照孔 D 值 \times 100%。

细胞端粒酶活性检测 消化收取细胞,采用 TRAP-ELISA 方法检测端粒酶活性。具体方法如下:转染不同时间后,用胰酶消化待测细胞;台盼蓝染色,调整细胞浓度,取细胞于 Eppendorf 管内;3 000 g、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min;弃上清,4 $^{\circ}$ C PBS 洗涤 2 次,离心;冰上加裂解液 200 μ L,反应 30 min;16 000 g、4 $^{\circ}$ C 离心 20 min,吸取 175 μ L 上清分 3 管,于 Eppendorf 管液氮中保存;取 2 μ L 上清,加 TRAP 反应液 25 μ L、DEPC 水 23 μ L;25 $^{\circ}$ C 反应 30 min,94 $^{\circ}$ C 反应 5 min,灭活端粒酶;PCR 扩增:94 $^{\circ}$ C 30 s;50 $^{\circ}$ C 30 s;72 $^{\circ}$ C 90 s;循环 33 次;取 5 μ L 扩增产物,加 20 μ L 变性液,室温反应 10 min;加杂交液 225 μ L,并充分混匀;取混合液 100 μ L 加入 MTP 包被的微量反应板中,置于 37 $^{\circ}$ C、300 r/min 摇床孵育 2 h;弃上清,PBS 清洗 3 次;每孔加 100 μ L 抗地高辛过氧化物酶,室温、300 r/min 摇床孵育 30 min;弃液体,加清洗液洗涤 5 次;加 100 μ L 底物,室温、300 r/min 摇床孵育 10~20 min,端粒酶阳性者,液体颜色由透明逐渐变蓝;弃底物液,每孔加 100 μ L 终止液,颜色由蓝变黄;30 min 内,以蒸馏水调零,在酶标仪上测定光密度值($D_{450-690\text{ nm}}$)。阴性对照于检测前经 85 $^{\circ}$ C 处理。

统计方法 采用 SPSS 10.0 软件分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

结 果

PLK1 siRNA 的筛选 为抑制 PLK1 mRNA 表达,本研究根据 PLK1 基因特点,设计并用化学方法合成 siRNA,以脂质体为载体转染大肠癌 SW480 细胞,48 h 后,收集细胞,采用荧光实时定量 PCR 方法检测 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 对大肠癌细胞增殖和端粒酶活性的影响。

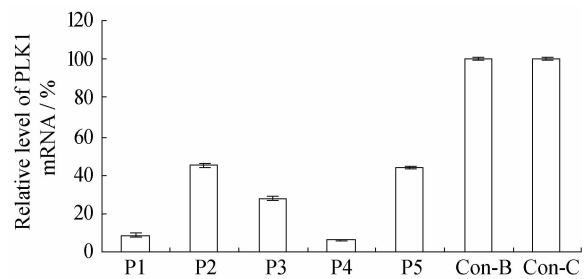


图 1 5 个 siRNAs(100 nmol/L)转染对大肠癌 SW480 细胞 PLK1 mRNA 水平的影响

Fig 1 Effects of five siRNAs(100 nmol/L) on PLK1 mRNA level of human colon cancer SW480 cell

P4 siRNA 对大肠癌细胞 PLK1 mRNA 和蛋白水平的抑制 本研究采用 P4 siRNA 转染大肠癌 SW480 细胞后,分别采用定量 PCR 和 Western blot 检测 PLK1 基因 mRNA 和蛋白水平。结果发现,与 Con-A、B 和 2 对照组细胞相比较,P4 siRNA 组 PLK1 基因 mRNA 和蛋白水平明显下调($P < 0.05$, $P < 0.05$)(图 2a, b)。

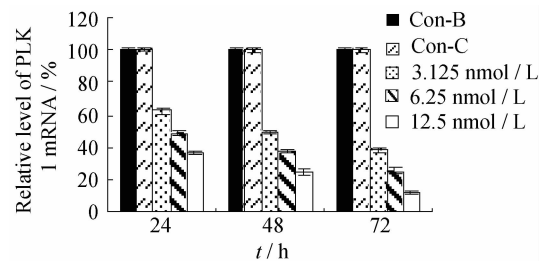


图 2a P4 siRNA 转染对大肠癌细胞 PLK1 mRNA 水平的影响

Fig 2a Effects of P4 siRNA on PLK1 mRNA level of human colon cancer cell

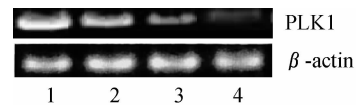


图 2b P4 siRNA 转染对大肠癌细胞 PLK1 蛋白水平的影响(24 h)

Fig 2b Effects of P4 siRNA on PLK1 protein level of human colon cancer cell (24 h)

1: Con-A; 2, 3, 4: siRNA, 3.125, 6.25, 12.5 nmol/L

siRNA 转染对大肠癌细胞增殖的影响 接着,我们观察了 siRNA 转染对 SW480 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($P < 0.05$)(图 3)。

PLK1 siRNA 转染对大肠癌细胞端粒酶活性的影响 为探讨 PLK1 基因对大肠癌细胞 SW480 细胞端粒酶活性的影响,本研究采用 TRAP-ELISA 法检测 P4 转染后的大肠癌细胞端粒酶活性。结果发现,大肠癌 SW480 细胞经 P4 siRNA 转染处理

后,端粒酶活性明显受到抑制,且呈作用浓度和时间依赖性。见表 2。

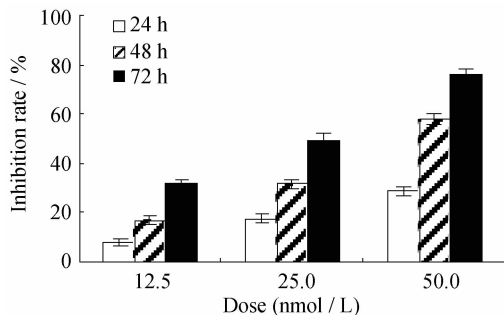


图 3 P4 siRNA 转染对大肠癌 SW480 细胞增殖的影响

Fig 3 Effects of transfection with P4 siRNA on proliferation of human colon cancer SW480 cell

表 2 P4 siRNA 对大肠癌 SW480 细胞端粒酶活性的抑制

Tab 2 Suppression of P4 siRNA on telomerase activity of human colon cancer SW480 cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Groups	24 h	48 h	72 h
Con-A	1.378 ± 0.036	1.375 ± 0.028	1.369 ± 0.033
Con-B	1.369 ± 0.029	1.368 ± 0.028	1.366 ± 0.028
3.125 nmol/L	1.181 ± 0.027	0.898 ± 0.026	0.667 ± 0.026
6.25 nmol/L	0.928 ± 0.028	0.718 ± 0.027	0.436 ± 0.022
12.5 nmol/L	0.719 ± 0.026	0.506 ± 0.025	0.218 ± 0.023

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,采用某种方法抑制这些基因表达,可在一定程度上抑制细胞端粒酶活性^[12,13]。但有关基因调控端粒酶活性的研究尚属起步阶段,如 PLK1 基因在大肠癌细胞中端粒酶活性调控的可能作用尚不明了。

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^[14]。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^[15]。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,分别转染大肠癌 SW480 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 均对大肠癌细胞 PLK1 mRNA 和蛋白水平有抑制作用,其中以 P4 效果最好。进一步以不同浓度的 P4 siRNA 转染大肠癌 SW480 细胞,发现癌细胞 PLK1 mRNA 和蛋白水平明显下调;浓度为 3.125 nmol/L 的 PLK1 siRNA 转染即可明显下调大肠癌 SW480 细胞 PLK1 基因表达水平,效果明显优于反义寡核苷酸^[18],提示了 siRNA 的高效性,也说明本研究所设计的 siRNA 可作为研究 PLK1 基因功能的有力工具。

下调 PLK1 基因表达后,我们分别检测了 PLK1 siRNA 转染对大肠癌细胞增殖和端粒酶活性的影响。结果发现, P4 siRNA 可明显抑制大肠癌细胞在体外增殖。说明该 siRNA 发挥了有效的体内外抑瘤效应。

癌细胞的增殖与端粒酶的激活密切相关^[19],我们尝试从端粒酶活性角度探讨了 PLK1 siRNA 发挥抑瘤效应的可能机制。细胞转染不同时间后,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,且呈时间和浓度依赖性。本结果提示,采用 siRNA 下调大肠癌细胞 PLK1 表达后,可抑制大肠癌细胞端粒酶活性。

本研究提示, PLK1 基因高表达可能在大肠癌细胞增殖中起着重要的作用,而以 RNAi 技术下调 PLK1 表达,可有效地抑制大肠癌细胞恶性增殖,其机制可能与抑制端粒酶活性有关。

参 考 文 献

- [1] Boukamp P, Popp S, Krunic D. Telomere-dependent chromosomal instability[J]. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 2005, 10(2): 89-94.
- [2] 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.
- [3] Tang R, Cheng AJ, Wang JY, et al. Close correlation between

- telomerase expression and adenomatous polyp progression in multistep colorectal carcinogenesis[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(18):4 052 - 4 054
- [4] Engelhardt M, Drullinsky P, Guillem J, *et al.* Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 1997, 3(11):1 931 - 1 941.
- [5] Mizumoto I, Ogawa Y, Niiyama H, *et al.* Possible role of telomerase activation in the multistep tumor progression of periampullary lesions in patients with familial adenomatous polyposis[J]. *Am J Gastroenterol*, 2001, 96(4): 1 261 - 1 265.
- [6] Boldrini L, Faviana P, Gisfredi S, *et al.* Evaluation of telomerase in the development and progression of colon cancer[J]. *Int J Mol Med*, 2002, 10(5):589 - 592.
- [7] Yoshida R, Kiyozuka Y, Ichiyoshi H, *et al.* Change in telomerase activity during human colorectal carcinogenesis[J]. *Anticancer Res*, 1999, 19(3B):2 167 - 2 172.
- [8] van de Weerd BC, Medema RH. Polo-like kinases: a team in control of the division[J]. *Cell Cycle*, 2006, 5(8):853 - 864.
- [9] van Vugt MA, Medema RH. Getting in and out of mitosis with Polo-like kinase-1[J]. *Oncogene*, 2005, 24(17): 2 844 - 2 859.
- [10] Takai N, Hamanaka R, Yoshimatsu J, *et al.* Polo-like kinases (Plks) and cancer[J]. *Oncogene*, 2005, 24(2):287 - 291.
- [11] Yuan J, Horlin A, Hock B, *et al.* Polo-like kinase, a novel marker for cellular proliferation[J]. *Am J Pathol*, 1997, 150(4):1 165 - 1 172.
- [12] 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.
- [13] 范钰, 林庚金, 钱立平, 等. bcl-2 mRNA 反义寡核苷酸对胃癌 SGC-7901 细胞端粒酶活性的影响[J]. *复旦学报: 医学科学版*, 2001, 28(6):483 - 485.
- [14] Bahadori M. New Advances in RNAs[J]. *Arch Iran Med*, 2008, 11(4):435 - 443.
- [15] Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference[J]. *Nat Rev Genet*, 2007, 8(3):173 - 184.
- [16] 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):4 596 - 4 599.
- [17] 林庚金, 范钰, 钱立平, 等. 大鼠胃黏膜癌变过程中细胞增殖与端粒酶活性关系[J]. *复旦学报: 医学科学版*, 2002, 29(6): 451 - 453.

(收稿日期:2008-02-21;编辑:沈玲)