

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.03.002

RNAi 抑制 GSK-3 β 基因表达增强卵巢癌 SKOV3 细胞对紫杉醇敏感度的研究

赵天皎¹,董星河²,王明勇³,董庆彦¹

Enhancing Sensibility of Ovarian Cancer Cell Line SKOV3 to Paclitaxel by Inhibiting Gene GSK-3 β with RNA Interference

ZHAO Tian-jiao¹, DONG Xing-he², WANG Ming-yong³, DONG Qing-yan¹

1. Department of Gynecology and Obstetrics, Puyang City Oil Field General Hospital, Puyang 457001, China; 2. Department of Neurosurgery; 3. Department of Medical Laboratory, Xinxiang Medical College

Abstract: Objective To construct the specific short hairpin interfering vector of gene GSK-3 β and study its suppressing effect to understand mechanisms of enhancing sensibility of ovarian cancer cell line SKOV3 to taxol. **Methods** Design and construct specific short hairpin interfering vector of gene GSK-3 β and transfect it into SKOV3 cell line for screening stable cell lines. Detect RNAi suppressing efficacy using RT-PCR and Western blot. Compare the different apoptosis ratio and cell sensibility to taxol before and after interfering gene GSK-3 β by FACS. **Results** The interfering vector pGSK3 β -shRNA was constructed successfully. The expression of mRNA and protein of gene GSK-3 β in stable cell line transfected with vector pGSK3 β -shRNA was obviously lower than that in cells before transfected by RT-PCR and Western blot. Moreover, FACS results demonstrated the apoptosis ratio after 24h treatment of taxol was obviously increased and sensitivity was better in cells after transfected than before with significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion** The constructed vector pGSK3 β -shRNA had a specific and high effective inhibiting effect on gene GSK-3 β . It could enhance the sensibility of ovarian cancer cell line SKOV3 to taxol and promote tumor cell apoptosis by inhibiting gene GSK-3 β .

Key words: Ovarian cancer; RNA interference; GSK-3 β ; Cell apoptosis

摘要:目的 构建 GSK-3 β 基因特异性短发卡状 (shRNA) 干扰载体, 观察 RNA 干扰技术对卵巢癌 SKOV3 细胞 GSK-3 β 基因表达的抑制作用, 并且探讨促进紫杉醇药物敏感度的机制。**方法** 设计合成并构建针对 GSK-3 β mRNA 的特异性 shRNA 干扰质粒, 将干扰质粒转染 SKOV3 细胞。筛选稳定转染的单细胞扩大培养, 应用 RT-PCR、Western blot 方法检测各组细胞 GSK-3 β 表达抑制情况。流式细胞学检测法 (FACS) 检测细胞凋亡率。比较抑制 GSK-3 β 基因前后卵巢癌 SKOV3 细胞抵抗紫杉醇药物的差异。**结果** 成功构建 pGSK3 β -shRNA 干扰载体。SKOV3 细胞转染 pGSK3 β -shRNA 干扰载体后, RT-PCR、Western blot 方法显示, 转染后 GSK-3 β mRNA 和蛋白表达均显著下降。FACS 检测结果显示, 转染 pGSK3 β -shRNA 干扰载体, 不同浓度紫杉醇作用 24h 后, 卵巢癌 SKOV3 细胞对紫杉醇敏感度都有显著性提高。细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.05$)。**结论** 运用 RNAi 技术构建的 pGSK3 β -shRNA 干扰载体能特异、高效抑制靶基因 GSK-3 β 表达; 降低卵巢癌细胞中 GSK-3 β 基因表达水平, 能增强卵巢癌细胞对紫杉醇的敏感度, 促进肿瘤细胞凋亡。

关键词: 卵巢癌; RNA 干扰; GSK-3 β ; 细胞凋亡

中图分类号: R737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)03-0247-03

0 引言

糖原合酶激酶 (GSK-3 β) 是一个丝氨酸/苏氨酸激酶, 可磷酸化很多底物, 进而发挥调节细胞增殖、凋亡等重要的细胞功能^[1]。近几年有研究表明,

GSK-3 β 可以促进卵巢癌细胞的体外增殖效应, 并且在癌症组织中 GSK-3 β 蛋白表达明显高于正常组织, 但关于卵巢癌药物敏感度的研究较少。本研究拟探讨抑制 GSK-3 表达对卵巢癌细胞周期的影响和对紫杉醇药物敏感度变化的作用。

收稿日期: 2010-03-01; 修回日期: 2010-06-21

作者单位: 1. 457001 河南濮阳, 濮阳油田总医院妇产科, 2. 神经外科; 3. 新乡医学院检验系

作者简介: 赵天皎 (1976-), 女, 本科, 主治医师, 主要从事妇科肿瘤的研究

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人卵巢癌细胞株 SKOV3 购自美国标准生物品

收藏中心(ATCC)。用含体积分数 10 % 胎牛血清的 McCoy's 5A(Gibico)培养液在饱和湿度、37℃、5% CO₂条件下贴壁培养,0.25% 胰蛋白酶消化传代,调整细胞浓度,接种于无菌六孔板。

1.2 干扰载体 pGSK3β-shRNA 构建

根据 GenBank 提供的 GSK-3β 基因序列,通过基因序列比对,挑选出一条长为 19 个碱基特异性寡核苷酸序列(GAGAGTGATCATGTCAGGG),合成其发卡样两端配对 shRNA 寡核苷酸(GAGAGTGATCATGTCAGGGTTCAAGAGACCCTGACATGATCACTCTCTTTTTT)及其互补链,其中包含 U6 启动子。经过退火体外合成双链 shRNA 片段,连接到经过 EcoR I 和 BamH I 双酶切的 pCEGFP-C1 载体中。转化、挑取单克隆菌落,小量扩增,收集菌液,使用试剂盒小量提取质粒 DNA。EcoR I 和 BamH I 双酶切后,1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

1.3 细胞转染和稳筛

脂质体 Lipofectamine 2000 购于美国 Invitrogen 公司。具体操作按照试剂说明书进行。细胞转染在六孔板中,转染载体后 24h 传代,使细胞融合度为 30%。细胞贴壁后加入 G418,浓度为 300 μg/ml,持续作用 2 周后,减低浓度到 100 μg/ml,再持续作用 1 周。剩余的细胞在荧光显微镜下观察,流式细胞仪检测绿色荧光发光率达到 90% 以上,说明细胞转染载体后稳筛成功,见图 1。

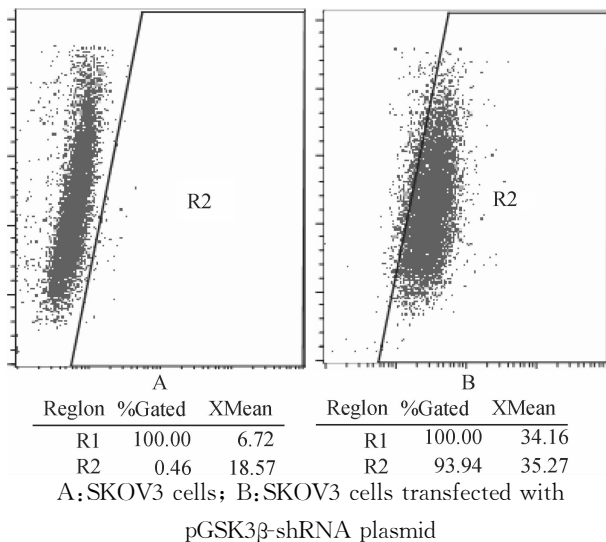


图 1 FACS 检测不同细胞株绿色荧光强度

Figure 1 The intensity of green fluorescence detected by FACS

1.4 RT-PCR 检测 GSK-3β mRNA 表达

分别收集 SKOV3 及稳筛载体后的细胞,用 Trizol(Invitrogen)提取细胞总 RNA,4 g RNA 合成 cDNA。PCR 条件: 95℃ 5 min; 94℃ 1 min; 56℃ 30s; 72℃ 30s 30 个循环,72℃ 延伸 10 min。

GSK-3β 上游引物: CCGGGTTCATGTCCCG-GCGAAT,下游引物: AGGCTGCTGCACCGGCTT-GCAGCT。共进行 3 次试验。以 GSK-3β 和 β-actin 积分灰度值的比值作为 GSK-3β mRNA 相对表达量。

1.5 Western blot

分别收集 SKOV3 及稳筛载体后的细胞,用含蛋白酶抑制剂的裂解液于冰上裂解细胞,用 Bio-rad 法测定蛋白浓度。取 50 μg 蛋白用 10% 的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,半干转法将蛋白转到 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉和 0.1% Tween-20 的 Tris 缓冲液于室温封闭 1 h,抗 GSK-3β 的兔多抗(1:500)、抗 GAPDH 的鼠单抗(1:1000)4℃ 过夜。0.05% TBST 洗膜,二抗(1:500)37℃ 孵育 1 h,用 0.05% TBST 洗膜,BCIP/NBT 试剂盒显色 20 min。共进行 3 次试验,以 GSK-3β 和 β-actin 条带积分灰度值的比值作为 GSK-3β 蛋白相对表达量。

1.6 流式细胞仪分析细胞凋亡率

细胞接种于无菌六孔板。细胞分组为:未转染细胞 + 紫杉醇、转染空白质粒细胞 + 紫杉醇、转染质粒 pGSK3β-shRNA 细胞 + 紫杉醇。收集细胞,PBS 洗两遍,调整细胞浓度为 1 × 10⁶/ml。紫杉醇作用浓度分别为 3,10,20,25,30 nmol/L,作用 24 h。凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技有限公司。具体操作按照试剂盒说明书进行,用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。另设未经紫杉醇作用的 SKOV3 细胞和只转染干扰质粒 pGSK3β-shRNA 未使用紫杉醇稳筛细胞作为对照。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

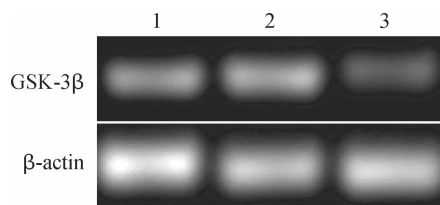
2 结果

2.1 FACS 检测未转染 SKOV3 及转染 pGSK3β-shRNA 质粒后稳筛细胞株绿色荧光细胞比例

结果显示,未转染细胞 SKOV3 绿色荧光细胞比例为 0.46,转染 pGSK3β-shRNA 质粒后稳筛细胞株绿色荧光细胞阳性率 93.94%,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明稳筛细胞株成功,见图 1。

2.2 GSK-3β mRNA 的表达水平

运用半定量 RT-PCR 技术在 mRNA 水平检测,结果显示,转染 pGSK3β-shRNA 干扰载体的稳筛细胞株中 GSK-3β mRNA 表达明显低于未转染组和空白质粒细胞和转染空载体组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。



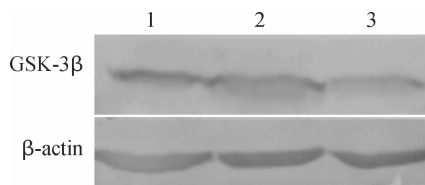
Lane 1; SKOV3 cells; Lane 2; SKOV3 transfected with negative plasmid; Lane 3; SKOV3 transfected with pGSK3β-shRNA plasmid

图 2 RT-PCR 检测各细胞株 GSK-3β mRNA 表达

Figure 2 Expression of GSK-3β mRNA in different cell lines detected by RT-PCR

2.3 GSK-3β 蛋白的表达水平

采用 Western blot 技术检测蛋白水平表达,结果显示,转染 pGSK3β-shRNA 干扰载体的稳筛细胞株中 GSK-3β 蛋白表达明显低于未转染组和空白质粒细胞,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 3。



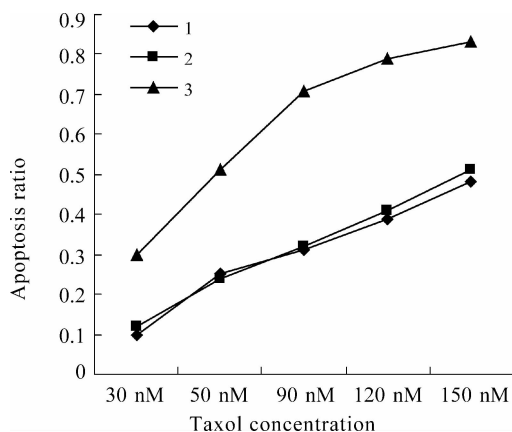
1; SKOV3 cells; 2; SKOV3 transfected with empty vector plasmid; 3; SKOV3 transfected with pGSK3β-shRNA plasmid

图 3 Western blot 检测各组细胞株 GSK-3β 蛋白表达

Figure 3 Expression of GSK-3β protein in different cell lines detected by Western blot

2.4 转染 pGSK3β-shRNA 后的细胞凋亡率

流式细胞仪检测结果显示,转染了 pGSK3β-shRNA 并加用紫杉醇作用 24 h 后的细胞凋亡率明显升高,与未转染 + 紫杉醇的细胞、转染空白质粒 + 紫杉醇的细胞比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 4。



1; SKOV3 cells + taxol; 2; SKOV3 transfected with empty vector plasmid + taxol; 3; SKOV3 transfected with pGSK3β-shRNA plasmid + taxol

图 4 FACS 检测不同细胞株在不同浓度 Taxol 作用下的凋亡率

Figure 4 Apoptosis ratio in different cell lines with different concentration Taxol tested by FACS

3 讨论

恶性肿瘤的一个显著特点就是糖代谢率的升高^[2],糖原合酶激酶 GSK-3β 因兼有调节葡萄糖代谢和调节其他转录因子、结构蛋白活性等多种功能,许多学者对其与肿瘤发展的关系进行了广泛研究。有关 GSK-3β 与卵巢癌药物耐受相关性的研究鲜见报道。

卵巢癌化疗耐药是临床上较为棘手的问题,常常导致治疗失败,因此寻找有效的化疗增敏剂成为临床科研的热点。引起肿瘤细胞耐药的机制很多,目前研究较多的是对凋亡信号通路的干预,提高肿瘤细胞对药物的敏感度。糖原合酶激酶 GSK-3β 是一个在进化上高度保守并且广泛表达的丝氨酸/苏氨酸激酶,除了可抑制糖原合成、促进糖代谢以外,还可以磷酸化一系列底物,包括代谢相关蛋白、信号转导通路蛋白^[3]、结构蛋白和一些转录因子^[4-5],从而影响细胞的生存与凋亡、运动与迁移^[6-7]。因此, GSK-3β 与肿瘤的发生发展存在着密切的关系^[8-9]。

RNAi 是由双链 RNA 介导的、在转录后 mRNA 水平关闭相应基因表达的过程。RNAi 的发现为人们提供了特异性阻断基因表达的新方法^[10]。本研究中我们设计了一对 GSK-3β 短发卡状干扰片段并通过分子克隆技术构建重组质粒 pGSK3β-shRNA,经 Lipofectamine 2000 转染卵巢癌细胞株 SKOV3,并利用 G418 筛选出稳定转染的细胞株。结果显示,shRNA 在转染细胞中发挥了重要的干扰作用,靶基因 GSK-3β 表达受到有效的抑制。这说明我们构建的 pGSK3β-shRNA 干扰质粒在卵巢癌细胞株 SKOV3 中特异地抑制 GSK-3β 基因的表达。随后经过化疗药物处理,细胞凋亡率明显增高。表明下调 GSK-3β 后,细胞对紫杉醇诱导的凋亡的抵抗力明显降低,进一步证明 GSK-3β 在介导化疗药物诱导的肿瘤细胞凋亡中发挥了重要作用。其在卵巢癌中介导了细胞存活通路的信号转导,使卵巢癌细胞能抵抗化疗药物诱导的凋亡;我们通过 RNAi 特异降低 GSK-3β 表达水平,能增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感度,促进细胞凋亡,有助于提高化疗疗效。GSK-3β 可能参与多种细胞内信号通路的调节,降低 GSK-3β 的表达,可通过多条途径共同作用促进细胞凋亡。因此,将 GSK-3β 作为治疗肿瘤细胞的新靶点,是肿瘤治疗中极具前景的一个方法。本文对 GSK-3β 只做了初浅的探讨,还应进一步在体外研究这个基因的功能、与其他基因相互作用的机制及体内实验的效果等等,相关实验已经在开展之中。

(下转第 253 页)

加入钙离子阻断剂均可延缓细胞容积减小的发生,提示细胞外 Ca^{2+} 内流可能在触发细胞凋亡早期细胞容积减小中起重要作用。

一般认为细胞外 Ca^{2+} 进入细胞内的途径有钠-钙交换机制、通道等,在 AVD 进程中细胞外 Ca^{2+} 是通过什么途径进入细胞是本课题的另一研究内容。本实验结果证明,钙通道阻断剂 Nifedipine 延缓 AVD 的发生,提示 Ca^{2+} 通过钙通道途径进入细胞而起作用。去除细胞外的 Ca^{2+} 或阻断钙离子内流虽然延缓 AVD 的发生,但不会影响最终容积减小的程度,提示 Ca^{2+} 信号途径可能在细胞凋亡早期对钾通道和氯通道的激活有重要调节作用,但不是通道激活所必须的条件。

综上所述,顺铂在诱导细胞凋亡早期,诱导 AVD 的发生, Ca^{2+} 信号途径参与了细胞 AVD 过程。有关 Ca^{2+} 影响 AVD 的具体细节有待进一步探讨。

参考文献

[1] Chen LX, Zhu YL, Jacob TJ, et al. Roles of volume-activated Cl^- currents and regulatory volume decrease in the cell cycle and proliferation in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Cell Prolif, 2007, 40(2):253-267.
 [2] Zuo W, Zhu L, Bai Z, et al. Chloride channels involve in hydrogen peroxide-induced apoptosis of PC12 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 387(4): 666-670.
 [3] 范爱辉,陈丽新,毛建文. 氯通道在顺铂诱导的鼻咽癌细胞凋亡性容积减小中的作用[J]. 山东医药, 2006, 27(12): 1804 - 1806.

[4] Lang F, Shumilina E, Ritter M, et al. Ion channels and cell volume in regulation of cell proliferation and apoptotic cell death [J]. Contrib Nephrol, 2006, 152:142-160.
 [5] Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, et al. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(17): 9487-9492.
 [6] Okada Y, Maeno E, Shimizu T, et al. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD) [J]. J Physiol, 2001, 532(Pt1): 3-16.
 [7] 阳小雅,王立伟,朱林燕,等. 顺铂激活的低分化鼻咽癌细胞氯电流[J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(4): 666 - 669.
 [8] Alenghat FJ, Ingber DE. Mechanotransduction: all signals point to cytoskeleton, matrix, and integrins [J]. Sci STKE, 2002, 2002(119):pe6.
 [9] Feranchak AP, Berl T, Capasso J, et al. p38 MAP kinase modulates liver cell volume through inhibition of membrane Na^+ permeability [J]. J Clin Invest, 2001, 108(10): 1495-1504.
 [10] 林如峰,陆化,刘澎,等. 蛋白酶体抑制剂 PS-341 诱导 U266 细胞凋亡与胞浆内 $[Ca^{2+}]$ 变化的关系[J]. 肿瘤防治研究, 2007, 34(11): 822-824.
 [11] Kim JA, Kang YS, Lee YS. Role of Ca^{2+} -activated Cl^- channels in the mechanism of apoptosis induced by cyclosporin A in a human hepatoma cell line [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 309(2): 291-297.
 [12] 和树同,朱林燕,杨林杰,等. 钙依赖性钾通道在鼻咽癌细胞调节性容积回缩中起重要作用[J]. 生理学报, 2009, 61(5): 485-492.
 [13] 王军,臧益民,徐洪涛. 钙激活性钾通道是人小肠上皮细胞的容积调节性通道[J]. 心脏杂志, 2002, 14(2): 100-104.

[编辑:刘红武;校对:贺文]

(上接第 249 页)

参考文献:

[1] Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multitasking kinase[J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt 7): 1175-1186.
 [2] Woodgett JR. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A [J]. EMBO J, 1990, 9(8): 2431-2438.
 [3] Mamaghani S, Patel S, Hedley DW. Glycogen synthase kinase-3 inhibition disrupts nuclear factor- κ B activity in pancreatic cancer, but fails to sensitize to gemcitabine chemotherapy[J]. BMC Cancer, 2009, 9:132
 [4] Cohen P, Frame S. The renaissance of GSK3[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, 2(10): 769-776.
 [5] Belkhir A, Dar AA, Zaika A, et al. t-Darpp promotes cancer cell survival by up-regulation of Bcl2 through Akt-dependent mechanism[J]. Cancer Res, 2008, 68(2): 395-403.
 [6] Rask K, Nilsson A, Brännström M, et al. Wnt-signalling

pathway in ovarian epithelial tumours; increased expression of beta-catenin and GSK3 beta [J]. Br J Cancer, 2003, 89(7): 1298-1304.
 [7] Chang W, Goodarzi MO, Williams H, et al. Adipocytes from women with polycystic ovary syndrome demonstrate altered phosphorylation and activity of glycogen synthase kinase 3 [J]. Fertil Steril, 2008, 90(6): 2291-2297.
 [8] Ougolkov AV, Fernandez-Zapico ME, Savoy DN, et al. Glycogen synthase kinase-3 β participates in nuclear factor κ B-mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cancer cells [J]. Cancer Res, 2005, 65(6): 2076-2081.
 [9] Rask K, Nilsson A, Brännström M, et al. Wnt-signalling pathway in ovarian epithelial tumours; increased expression of β -catenin and GSK3 beta [J]. Br J Cancer, 2003, 89(7): 1298-1304.
 [10] Izquierdo M. Short interfering RNAs as a tool for cancer gene therapy [J]. Cancer Gene Ther, 2005, 12(3): 217-227.

[编辑:黄园玲;校对:贺文]