

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.02.015

· 基础研究 ·

慢病毒载体介导 *CDK2* 基因沉默对黑素瘤 B16-F1 细胞生物学行为的影响

晋佳路¹,朱仁书¹,谢育媛²,刘红春³(1. 鹤壁职业技术学院 医学院,河南 鹤壁 458030;2. 湖北省食品药品监督管理局 检验研究院,湖北 武汉 430064;3. 郑州大学第一附属医院 检验科,河南 郑州 450052)

[摘要] **目的:**探讨由慢病毒载体 pUL 介导的 pUL-*CDK2*-shRNA3(*CDK2*-shRNA)沉默 *CDK2* 基因后对小鼠黑素瘤 B16-F1 细胞恶性生物学行为的影响,初步探索其作用机制。**方法:**利用重组慢病毒载体 *CDK2*-shRNA 转染 B16-F1 细胞,MTT 法检测其对细胞增殖的影响,DAPI 染色、AnnexinV-FITC/PI 双染流式术检测细胞凋亡情况,流式术检测细胞周期变化,细胞黏附实验、transwell 小室实验分别检测细胞黏附、侵袭和迁移能力变化,Western blotting 检测细胞周期信号通路 RB 蛋白(成视网膜细胞瘤蛋白)、pRB 蛋白、细胞周期相关转录因子 E2F1 及侵袭迁移相关蛋白基质金属酶-2(*MMP-2*)、基质金属酶-9(*MMP-9*) 的表达水平。**结果:**与空白对照组和阴性对照组相比,*CDK2*-shRNA 组细胞相对增殖率、细胞黏附率、细胞侵袭和迁移能力均显著下降(均 $P < 0.05$)。细胞凋亡率显著增加(均 $P < 0.05$) ; G1 期细胞显著增加而 S 期和 G2 期显著降低($P < 0.05$)。细胞周期相关蛋白 pRB、E2F1 明显降低而 RB 显著升高($P < 0.05$),细胞侵袭和迁移相关蛋白 *MMP-2*、*MMP-9* 明显降低($P < 0.05$)。**结论:**慢病毒载体 pUL 介导的 shRNA 沉默 *CDK2* 基因对 B16-F1 细胞恶性生物学行为有显著的抑制作用,其机制主要与细胞周期和细胞侵袭迁移相关蛋白表达变化有关。

[关键词] 黑素瘤;B16-F1 细胞;*CDK2* 基因;sh-RNA;恶性生物学行为;机制

[中图分类号] R730.59; R739.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)02-0243-07

Effects of silenced *CDK2* gene mediated by lentiviral vector on biological behavior of melanoma B16-F1 cells

JIN Jialu¹, ZHU Renshu¹, XIE Yuyuan², LIU Hongchun³(1. Department of Medicine, Hebi Polytechnic College, Hebi 458030, Henan, China; 2. Hubei Institute for Food and Drug Control, Wuhan 430064, Hubei, China; 3. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of silencing *CDK2* gene induced by the recombinant lentiviral vector pUL-*CDK2*-shRNA 3 (*CDK2*-shRNA) on the malignant biological behavior of mouse melanoma B16-F1 cells, and preliminarily investigate its mechanism. **Methods:** Melanoma B16-F1 cells were transfected by recombinant lentivirus vector *CDK2*-shRNA, and effect of which on proliferation of the B16-F1 cells was examined by MTT assay. Apoptosis of the cells was detected by DAPI staining and AnnexinV-FITC/PI staining flow cytometry assay. Cell cycles were evaluated with flow cytometry assay. Cell adhesion assay and transwell chamber experiment were used to detect the changes of adhesion, invasion and migration abilities of the cells, respectively. Expression levels of proteins RB and pRB on signaling pathway, cell cycle related transcription factor E2F1 and migration related protein *MMP-2* and *MMP-9* were detected with Western blotting assay. **Results:** Compared with the blank control and negative control groups, relative proliferation and adhesion rates, migration and invasion abilities of the cells in the *CDK2*-shRNA group significantly decreased ($P < 0.05$); while the apoptosis rate significantly increased ($P < 0.05$); Number of the cells at G1 phase significantly increased, but number of the cells at S and G2 phases significantly decreased ($P < 0.05$); expression of pRB and E2F1 proteins significantly decreased, but expression of RB significantly increased ($P < 0.05$), which were related with cell cycles; and expression of

[基金项目] 河南省科技计划项目(No. 122300410193)和河南省高等学校青年骨干教师资助计划项目(No. 2011GGJS-262)。Project supported by the Henan Provincial Science-Technology Program (No. 122300410193), and the Henan Provincial Program for Key Members of Young Teacher of the Higher Education Institutions (No. 2011GGJS-262)

[作者简介] 晋佳路(1972 -),女,河南省淇县人,副教授,主要从事肿瘤的生物治疗研究, E-mail: 759300027@qq.com

[通信作者] 刘红春(LIU Hongchun, corresponding author), E-mail: xinyunerliu@163.com

MMP-2 and MMP-9 proteins for invasion and migration of the cells significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusions:** Silencing *CDK2* gene mediated by recombinant lentiviral vector pUL-CDK2-shRNA could significantly inhibit malignant biological behavior of the B16-F1 cells, and its mechanism might associate with the expression changes of the proteins for cell cycles, invasion and migration of the cells.

[**Key words**] melanoma; B16-F1 cell; *CDK2* gene; sh-RNA; malignant biological behavior; mechanism

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(2): 243-249. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.02.015]

恶性黑素瘤是最具侵袭性的皮肤肿瘤,早期恶性黑素瘤可以通过手术切除的方式得到缓解;一旦发生转移,虽可应用各种化学药物和生物药物治疗,但预后很差^[1-3],原因是晚期黑素瘤会不可避免地对抗传统的化疗药物产生抵抗。因此,有必要针对黑素瘤的特点寻找新的治疗方案。周期素依赖性蛋白激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)对细胞分裂周期起关键作用,其中CDK2作为CDK家族的重要成员,通过与cyclin A、cyclin E结合形成复合物参与细胞周期发展,它不仅控制早S期DNA合成的起始,而且控制G₁期进入S期^[46]。*CDK2*基因表达水平下调有可能阻止或延缓细胞分裂增殖,从而达到抗肿瘤的目的。研究^[7-8]发现,多种肿瘤细胞高表达*CDK2*,黑素瘤中*CDK2*的表达尤其活跃。课题组前期利用慢病毒载体pRNAT-U6.2/Lenti(pUL)构建了针对3个靶序列位点的重组慢病毒质粒pUL-CDK2-shRNA1、pUL-CDK2-shRNA2、pUL-CDK2-shRNA3和1个阴性对照重组慢病毒质粒pUL-NC-shRNA,发现针对1012~1020靶序列位点的pUL-CDK2-shRNA3(本文中记为CDK2-shRNA)基因沉默效应最为显著^[9]。本研究在前期研究的基础上进行体外实验,探讨CDK2-shRNA重组慢病毒干扰*CDK2*基因表达后对小鼠黑素瘤B16细胞的生长、黏附、侵袭、迁移等恶性生物学行为的影响,并初步探索其作用机制,为寻求治疗黑素瘤的新方法提供实验依据。目前国内文献尚鲜见报道通过抑制*CDK2*基因表达抑制小鼠黑素瘤细胞B16-F1的增殖。

1 材料与方法

1.1 主要材料

黑素瘤B16-F1细胞购自武汉中国典型培养物保藏中心。DMEM培养液、胰蛋白酶购自美国Hyclone公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,四甲基噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、碘化丙啶(PI)购自Sigma公司,AnnexinV-FITC/PI购自南京凯基生物公司,兔抗鼠RB和E2F1抗体、山羊抗鼠pRB抗体购自美国Santa Cruz公司,兔抗鼠MMP-2和MMP-9抗体、山羊抗兔二抗、兔抗山羊二抗购自

英国Abcam公司,ECL化学发光试剂盒购自上海碧云天公司,Transwell小室购自美国Corning公司,Matrigel胶购自美国BD Biosciences公司。

1.2 实验细胞分组

实验细胞分为三组,靶向沉默基因CDK2-shRNA慢病毒重组质粒转染B16-F1细胞为实验组(CDK2-shRNA组),pUL-NC-shRNA慢病毒重组质粒转染B16-F1细胞为阴性对照组(NC-shRNA组),未做任何处理的B16-F1细胞为空白对照组(CON组)。

1.3 MTT法检测CDK2-shRNA对B16-F1细胞的增殖抑制作用

分别取CON组、NC-shRNA组和CDK2-shRNA组B16-F1细胞,接种于96孔板(2×10^5 个/孔),每组设3个复孔,并设一组无细胞空白对照孔。分别于24、48、72和96h加入MTT溶液后用含10%胎牛血清、链霉素(100 mg/ml)和青霉素(100 U/ml)的DMEM培养液,常规培养4h吸去培养液,加入150 μ l DMSO,避光置摇床震荡5 min(150 r/min),置酶标仪检测570 nm处的光密度(D)值,空白孔对照调零,取各组平均D值,计算细胞相对存活率。细胞相对增殖率(%)=(CDK2-shRNA组平均D值-空白对照孔平均D值)/CON组平均D值-空白对照孔平均D值 $\times 100\%$ 。实验重复3次。

1.4 DAPI染色检测细胞核凋亡形态

取CON组、NC-shRNA组和CDK2-shRNA组B16-F1细胞,接种于6孔板(内置盖玻片)(1.5×10^5 个/孔),常规培养48h后弃去培养液,4%多聚甲醛固定20 min,DAPI染色15 min,期间用PBS淋洗。倒置光学显微镜下观察细胞形态,荧光显微镜下观察细胞核形态。

1.5 AnnexinV-FITC/PI双染流式术检测细胞凋亡率

上述三组B16-F1细胞培养48h后用胰酶消化,离心收集各组细胞,预冷PBS洗2次,用Binding buffer重悬,制成单细胞悬液(1×10^6 个/ml)。取0.1 ml细胞悬液,加入5 μ l FITC-AnnexinV和5 μ l PI混匀后,室温避光反应15 min,流式细胞仪检测,Cell Quest软件分析结果。

1.6 流式细胞术检测细胞周期

将上述三组胰酶消化,离心收集制备的 B16-F1 单细胞悬液(1×10^6 个/ml), PBS 洗 3 次, 4 °C 预冷的 70% 乙醇固定 30 min, 450 μ l PBS 重悬, 加入 50 μ l RNAase A (2.5 mg/ml) 及 50 μ l PI (1 mg/ml), 室温避光染色 20 min, 流式细胞仪检测 DNA 含量。

1.7 细胞黏附实验

将 matrigel (50 μ g/ml) 加入 6 孔板中 (100 μ l/孔), 均匀铺于底部, 对照孔加等体积 1% BSA, 37 °C 孵育 2 h, 弃上清, 4 °C 保存备用; 收集上述三组 B16-F1 细胞, 制成单细胞悬液, 接种于 6 孔板 (1×10^6 个/孔), 培养 2 h 后弃去培养液, PBS 洗 2 次, 胰酶消化后重新收集细胞。细胞计数, 取 3 个平行复孔的平均数作为黏附细胞数, 按下列公式计算黏附率, 黏附率 (%) = 黏附细胞总数/总细胞数 \times 100%。实验重复 5 次。

1.8 细胞侵袭实验

采用 8 μ m 孔径、6.5 mm 直径的 transwell 小室, 用 matrigel 基质胶包被 transwell 小室的上室, 室温孵育 1 h 后, 去除未结合的 matrigel 基质胶。将上述三组 B16-F1 细胞培养 24 h 后消化和计数, 用无血清 DMEM 制成单细胞悬液, 转移至 Transwell 小室的上室 (2×10^5 个/室), 下室为含 10% FBS 的 DMEM 培养基。常规培养 24 h 后取出小室, 弃去上室液体, PBS 淋洗后, 用棉签将上室中未侵袭的细胞擦去, 用 4% 多聚甲醛固定膜, 用结晶紫染色 5 min, 用手术刀将膜从 Transwell 小室切下, 用中性树脂固定在载玻片上, 在高倍显微镜下随机选取 10 个视野计数, 取均值。实验重复 3 次, 每组各设 3 个复孔。

1.9 细胞迁移实验

采用 transwell 小室, 不加 matrigel 基质胶, 将上述三组 B16-F1 细胞制成无血清 DMEM 单细胞悬液, 转移至 transwell 小室的上室 (1×10^5 个/室)。其他步骤与侵袭实验相同。

1.10 Western blotting 检测 RB、pRB、E2F1、MMP-2、MMP-9 蛋白的表达

提取 48 h 收获的上述三组 B16-F1 细胞的总蛋白, BCA 法定量, 取 30 μ g 不同组别蛋白进行 SDS-PAGE 后转移至 NC 膜, 5% 脱脂奶粉 (用 TBST 溶液配制) 室温封闭 2 h, 加兔抗鼠 RB、E2F1、MMP-2、MMP-9 或山羊抗鼠 pRB 一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜后加山羊抗兔或兔抗山羊二抗室温孵育 2 h, 曝光。应用 Image Quant TL 软件对蛋白印迹条带进行扫描分析。

1.11 统计学处理

采用 SPSS 15.0 统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CDK2-shRNA 对 B16-F1 细胞增殖的抑制作用

分别于 24、48、72 和 96 h 用 MTT 法检测 CDK2-shRNA 对 B16-F1 细胞增殖的抑制作用, 结果 (图 1) 显示, NC-shRNA 组与 CON 组的细胞相对增殖率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), CDK2-shRNA 组与前两组细胞相对增殖率差异显著 ($P < 0.05$), 其 24、48、72 和 96 h 的相对存活率分别为 (60.9 ± 3.5)%、(46.1 ± 3.2)%、(40.6 ± 3.7)% 和 (34.2 ± 4.4)%, 其相对增殖率随时间延长降低, 表现出对 B16-F1 细胞的增殖抑制作用呈时间依赖关系。

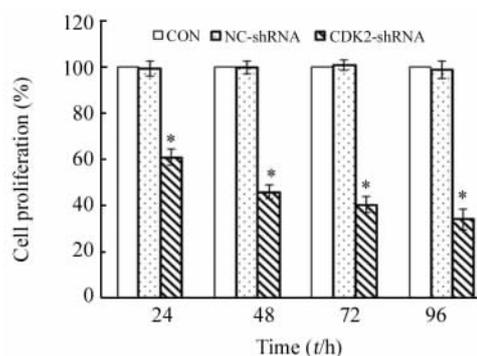


图 1 MTT 检测 CDK2-shRNA 对 B16-F1 细胞增殖的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effect of CDK2-shRNA on the proliferation of B16-F1 cells detected by MTT

* $P < 0.05$ vs CON or NC-shRNA group

2.2 CDK2-shRNA 诱导 B16-F1 细胞凋亡

三组细胞培养 48 h 后, DAPI 染色, 倒置显微镜观察发现 CON 组和 NC-shRNA 组细胞生长良好, 细胞形态清晰, CDK2-shRNA 组一些细胞变圆变大甚至破裂 (图 2A)。荧光显微镜观察细胞核形态, 结果显示 CON 组和 NC-shRNA 组细胞染色质在核中分布均一, CDK2-shRNA 组细胞呈现不同程度的凋亡特征, 如核浓缩、片段化以及出现凋亡小体 (图 2B)。

2.3 CDK2-shRNA 显著增加 B16-F1 细胞的凋亡率

检测结果 (图 2C、D) 显示, CON 组和 NC-shRNA 组凋亡率分别为 (6.2 ± 2.4)% 和 (6.3 ± 1.9)%, 两者差异无显著意义 ($P > 0.05$); CDK2-shRNA 组凋亡率比前两组显著升高 [(28.9 ± 3.4)%, $P < 0.05$]。

2.4 CDK2-shRNA 将 B16-F1 细胞阻滞于 G₁ 期
 流式细胞仪检测培养 48h 后三组细胞 DNA 的结果(图 3)显示, 各期细胞数量在 CON 组与 NC-

shRNA 组之间无显著差异 ($P > 0.05$); CDK2-shRNA 组与上述两组相比, G₁ 期细胞显著增加, 而 S 期和 G₂ 期细胞显著减少 ($P < 0.05$)。

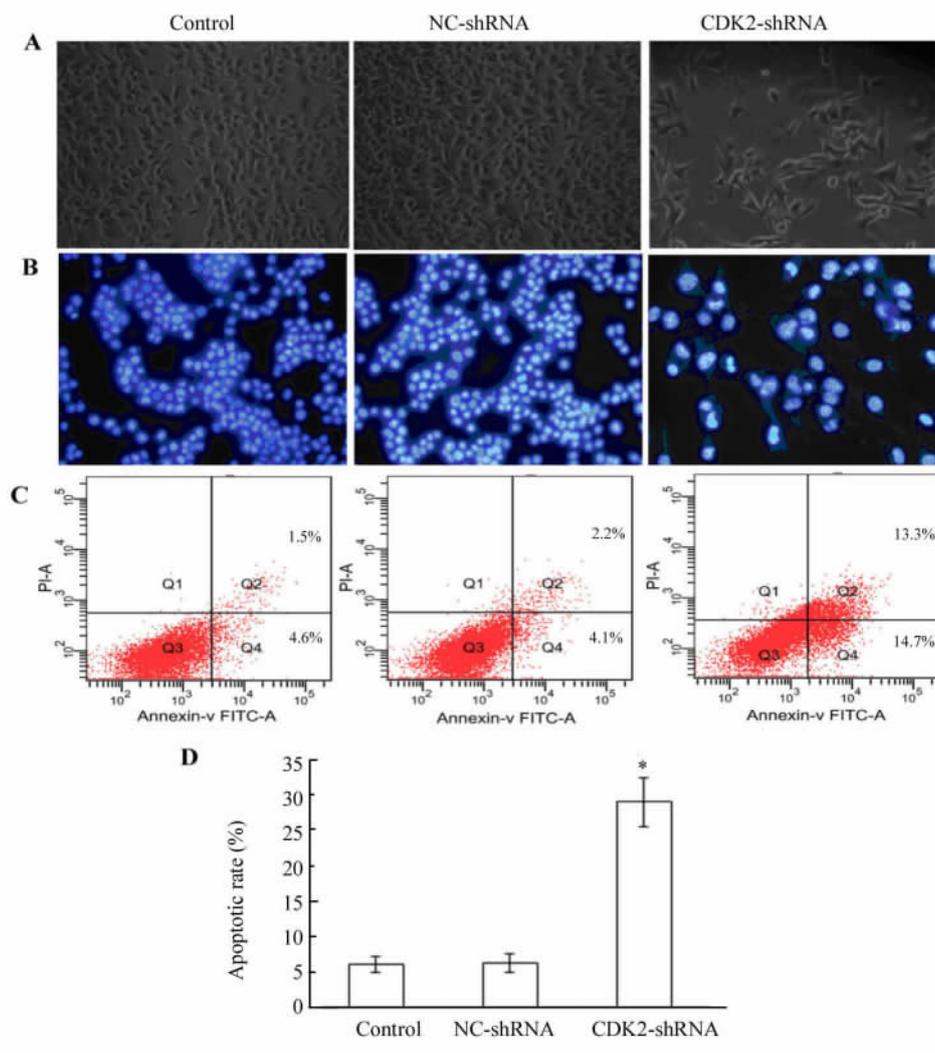


图 2 CDK2-shRNA 对 B16-F1 细胞凋亡的影响

Fig.2 Effect of CDK2-shRNA on apoptosis of B16-F1 cells

A: Cell morphology observed with inverted microscope (×200); B: Nuclear morphology of apoptosis observed with fluorescence microscope (DAPI stain, ×200); C: Apoptosis rate detected by AnnexinV/PI flow cytometry assay
 D: Apoptosis rates of B16-F1 cells in various groups. * $P < 0.05$, vs CON or NC-shRNA groups

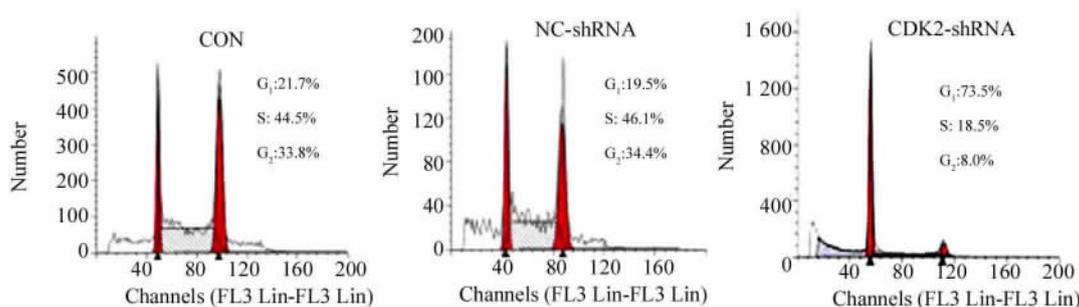


图 3 CDK2-shRNA 干扰基因表达后流式细胞术检测细胞周期变化

Fig.3 Change of cell cycle after silence of CDK2 gene detected by flow cytometry

2.5 CDK2-shRNA 对 B16-F1 细胞黏附率的影响

细胞黏附试验结果(图 4)显示, CON 组和 NC-shRNA 组的细胞黏附率分别为(30.41 ± 1.79)% 和 (31.21 ± 1.82)%, 无显著差异 ($P > 0.05$)。CDK2-shRNA 组细胞黏附率显著比上述两组明显降低 [(20.77 ± 1.22)%, $P < 0.05$], 说明 CDK2 基因沉默可以降低癌细胞黏附基底膜的能力。

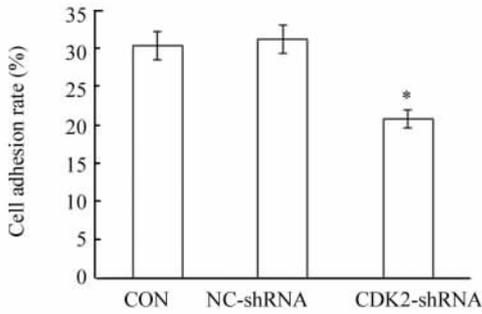


图 4 CDK2-shRNA 对 B16-F1 细胞黏附率的影响
 Fig. 4 Effect of CDK2-shRNA on adhesion rate of B16-F1 cells
 * $P < 0.05$ vs CON or NC-shRNA groups

2.6 CDK2-shRNA 对细胞侵袭和迁移能力的影响

体外细胞侵袭实验结果(图 5)显示, 三组细胞均能穿过 matrigel 滤膜, CON 组和 NC-shRNA 组穿膜细胞数分别为(42.00 ± 4.45)个和(41.50 ± 4.36)个, 两者无显著差异 ($P > 0.05$), CDK2-shRNA 组穿膜细胞数为(24.00 ± 3.28)个, 较前两组显著降低 ($P < 0.05$)。体外细胞迁移实验结果显示, CON 组和 NC-shRNA 组穿膜细胞数分别为(56.16 ± 6.45)个和(55.50 ± 5.36)个, 无显著差异 ($P > 0.05$), 而 CDK2-shRNA 组穿膜细胞数为(29.10 ± 6.28)个, 较前两组显著降低 ($P < 0.05$)。上述结果说明, CDK2 基因沉默后细胞侵袭和迁移潜能显著降低。

2.7 CDK2-shRNA 对 RB、pRB、E2F1、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果(图 6)显示, CON 组与 NC-shRNA 组相比, 细胞周期调控因子 RB、pRB、E2F1 及迁移侵袭相关蛋白 MMP-2、MMP-9 的表达无显著差异 ($P > 0.05$); CDK2-shRNA 组与前两组相比, 细胞 RB、pRB、E2F1、MMP-2、MMP-9 蛋白的表达有显著差异 ($P < 0.05$), 其中 RB 蛋白表达上调(49.0 ± 2.1)%, 而 pRB、E2F1、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达分别下调(17.3 ± 3.2)%、(51.3 ± 4.5)%、(40.3 ± 3.7)% 和(45.9 ± 4.2)% ($P < 0.05$)。

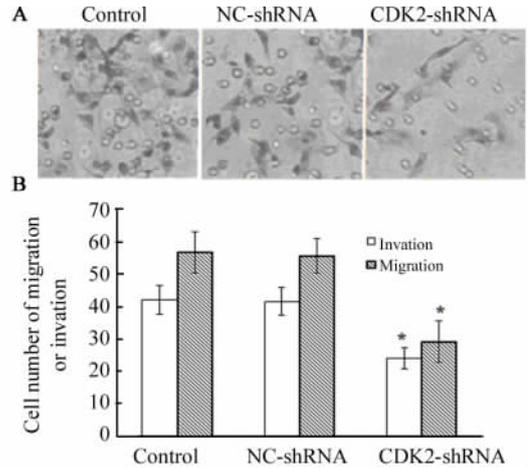


图 5 Transwell 小室检测 CDK2-shRNA 对 B16-F1 细胞侵袭和迁移能力的影响
 Fig. 5 Effects of CDK2-shRNA on the invasion and migration of B16-F1 cells by transwell chamber test
 A: Migration assay (H-E staining, ×200);
 B: Chart of cell number of transmembrane by migration and invasion assay
 * $P < 0.05$, vs control or NC-shRNA group

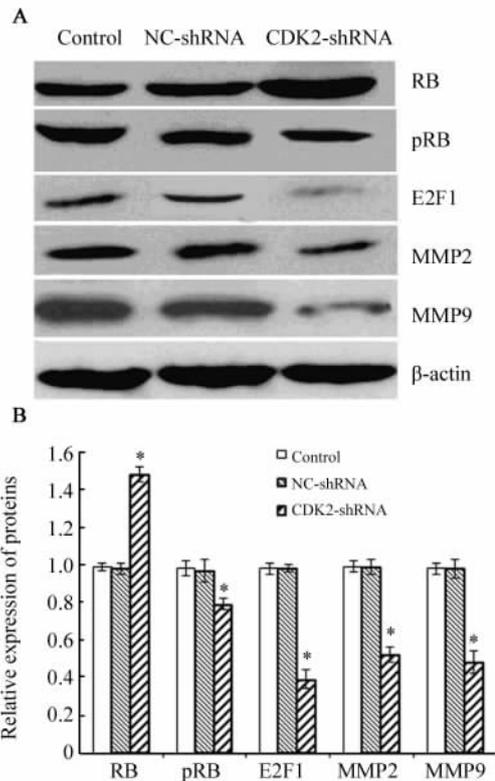


图 6 CDK-shRNA 对细胞周期调控因子(RB、pRB、E2F1) 及迁移侵袭相关蛋白(MMP-2、MMP-9)表达的影响
 Fig. 6 Effects of CDK-shRNA on the expressions of proteins RB, pRB, E2F1, MMP-2 and MMP-9
 A: The bands of proteins in western blotting image
 B: Statistical histograms of proteins
 * $P < 0.05$ vs control or NC-shRNA groups

3 讨论

肿瘤细胞的失控性增殖是其重要恶性生物学特征之一,与细胞周期的调控紊乱密切相关^[10]。细胞周期的调控是一个十分复杂的网络,在细胞周期进程中G1/S转折是重要的调控点,肿瘤的发生和G1/S期调控点的失调密切相关。而CDK2是G1/S转折点调控最重要的激酶之一,其机制主要是CDK2与Cyclin E结合而活化,使RB蛋白磷酸化而失活,磷酸化的pRB与转录因子E2F1功能分离,导致释放E2F1,启动靶基因转录和DNA复制,细胞周期由G1期进入S期,进而引起细胞增殖^[11-12]。有研究^[7-8]表明,在多种肿瘤中CDK2均异常表达,说明CDK2和肿瘤的发生与发展密切相关。如果能够干扰CDK2基因的表达,使肿瘤细胞的CDK2蛋白表达水平下降,干扰肿瘤细胞周期,将影响肿瘤细胞的增殖。已有实验^[13]证明CDK2蛋白对黑素瘤的增殖是必要的,其缺失会抑制黑素瘤的生长和细胞周期进展。近年有报道^[14]利用慢病毒介导的CDK2-shRNA促进黑素瘤细胞A375凋亡而抑制A375细胞增殖。因此,沉默CDK2基因的表达治疗黑素瘤可以作为有益的探索。本实验利用MTT法检测到CDK2基因沉默24、48、72和96h后,CDK2-shRNA组B16-F1细胞相对增殖率比CON组和NC-shRNA组显著降低($P < 0.05$),说明基因沉默后细胞增殖受到抑制。流式细胞仪检测细胞周期,发现CDK2-shRNA组与CON组和NC-shRNA组相比,G1期细胞显著增加,S期和G2期细胞显著降低,说明CDK2基因沉默后细胞周期G1期到S期发育阻滞。DAPI染色检测细胞核凋亡情况,发现CDK2基因沉默后细胞核呈现不同程度的凋亡特征如核浓缩、片段化以及凋亡小体出现;AnnexinV-FITC/PI双染法进一步检测细胞凋亡率,发现CDK2-shRNA组细胞凋亡率比CON组和NC-shRNA组显著升高($P < 0.05$)。检测细胞周期信号通路RB、pRB、E2F1因子的表达,发现CDK2-shRNA组与CON组和NC-shRNA组相比, RB表达显著升高($P < 0.05$),pRB和E2F1的表达显著降低($P < 0.05$),说明去磷酸化的RB升高,释放的E2F1降低,靶基因转录受阻,阻止细胞周期由G1期进入S期,是抑制细胞增殖的可能机制之一。以上实验结果表明,利用CDK2-shRNA沉默CDK2基因后,使B16-F1细胞的细胞周期发生G1向S期的阻滞,细胞凋亡率增加从而导致细胞生长受到抑制。

在肿瘤的恶性生物学行为中,侵袭和转移是肿瘤最重要的恶性标志,肿瘤细胞侵袭转移包括黏附、降解、移动三个阶段^[15-16]。首先是肿瘤细胞与基底膜成分的异质性黏附能力增高,脱离原发瘤群体,通过其表面受体与基底膜及细胞外间质(ECM)的成分特异性

结合;然后通过自身分泌的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)降解基底膜及ECM中的蛋白成分,解除其对癌细胞的阻隔而向周围间质中的缺损区浸润生长;最后小部分增殖能力强的肿瘤细胞进入循环系统向远处靶器官转移,并不断增生形成继发瘤。目前已发现的MMPs有20多种,其中以IV型胶原酶MMP-2和MMP-9与肿瘤侵袭转移的关系最为密切,IV型胶原酶MMP-2和MMP-9可以降解IV、V型胶原、明胶、弹力蛋白、层黏连蛋白等成分,破坏基底膜的完整性^[17-19]。研究发现,MMP2、MMP-9过表达与多种类型肿瘤的恶性程度都呈正相关。皮肤黑素瘤是一种高度侵袭性和转移性的肿瘤,基底膜和细胞外基质的降解是黑素瘤细胞迁移、侵袭和转移的一个重要步骤。基质金属蛋白酶及其组织抑制剂在这些复杂的多步骤过程中起关键作用^[20]。本实验利用细胞黏附实验、transwell小室实验分别检测了CDK2-shRNA沉默CDK2基因后B16-F1细胞黏附、侵袭、迁移能力的变化,结果发现CDK2-shRNA组细胞黏附率比CON组和NC-shRNA组显著减少($P < 0.05$);三组细胞均能够穿过Matrigel滤膜,但是CDK2-shRNA组穿膜细胞数比CON组和NC-shRNA组显著减少($P < 0.05$);检测到CDK2基因沉默后,CDK2-shRNA组细胞中MMP2、MMP-9蛋白表达比CON组和NC-shRNA组显著降低($P < 0.05$)。以上结果说明CDK2基因沉默后通过降低MMP2、MMP-9的表达显著降低细胞侵袭迁移能力。

本研究通过干扰黑素瘤B16-F1细胞中CDK2基因的表达,发现CDK2基因沉默后,B16-F1细胞周期发生从G1向S期发展阻滞,细胞凋亡率增加,细胞生长受到抑制;细胞中MMP2、MMP-9的表达显著降低,从而导致细胞黏附、侵袭、迁移能力显著减少。本研究为RNA干扰技术用于黑素瘤的基因治疗奠定了实验基础。

[参考文献]

- [1] JOHNSON D B, SOSMAN J A. Therapeutic advances and treatment options in metastatic melanoma [J]. JAMA Oncol, 2015, 1(3): 380-386. DOI:10.1001/jamaoncol.2015.0565.
- [2] TRINH V A. Current management of metastatic melanoma [J]. Am J Health Syst Pharm, 2008, 65(24 Suppl 9): S3-S8. DOI: 10.2146/ajhp080460.
- [3] 雷星, 宋扬, 曲彦隆. CD146与黑素瘤相关性的研究进展 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(2): 157-160.
- [4] CHOHAN T A, QIAN H, PAN Y, et al. Cyclin-dependent kinase-2 as a target for cancer therapy: progress in the development of CDK2 inhibitors as anti-cancer agents [J]. Curr Med Chem, 2015, 22(2): 237-263. DOI:10.2174/0929867321666141106113633.
- [5] ASGHAR U, WITKIEWICZ A K, TURNER N C, et al. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy [J]. Nat Rev Drug Discov, 2015, 14(2): 130-146. DOI:10.1038/nrd4504.

- [6] ALEEM E, BERTHET C, KALDIS P. CDK2 as a master of S phase entry: fact or fake? [J]. *Cell Cycle*, 2004, 3(1): 35-37. DOI:10.4161/cc.3.1.632.
- [7] KISZNER G L, WICHMANN B, NEMETH I B, et al. Cell cycle analysis can differentiate thin melanomas from dysplastic nevi and reveals accelerated replication in thick melanomas [J]. *Virchows Arch*, 2014, 464(5): 603-612. DOI: 10.1007/s00428-014-1570-1.
- [8] ABDULLAH C I, WANG X, BECKER D. Expression analysis and molecular targeting of cyclin-dependent kinases in advanced melanoma [J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(6): 977-988. DOI:10.4161/cc.10.6.15079.
- [9] 晋佳路, 朱仁书, 谢育媛, 等. CDK2 shRNA 慢病毒载体的构建及其基因沉默效应研究 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(16): 4483-4485. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2015.16.028.
- [10] 詹启敏, 陈杰. 细胞周期与肿瘤转化医学 [J]. *中国肿瘤临床*, 2014, 47(1): 1-7. DOI: 10.3969/j.issn.1000-8179.20132205.
- [11] 冯作化. 医学分子生物学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 172-174.
- [12] SCHAAL C, PILLAI S, CHELLAPPAN S P. The Rb-E2F transcriptional regulatory pathway in tumor angiogenesis and metastasis [J]. *Adv Cancer Res*, 2014, 121: 147-82. DOI:10.1016/b978-0-12-800249-0.00004-4.
- [13] DU J, WIDLUND H R, HORSTMANN M A, et al. Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF [J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(6): 565-576. DOI:10.1016/j.ccr.2004.10.014.
- [14] 刘厚广, 刘卓, 姜颖, 等. 慢病毒介导的 CDK2-shRNA 促进黑素瘤细胞 A375 凋亡 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(22): 6345-6347. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2015.22.012.
- [15] ARVELO F, SOJO F, COTTE C. Tumour progression and metastasis [J/OL]. *Ecancermedalscience*, 2016, 10: 617 [2015-10-05] <http://ecancer.org/journal/10/617-tumor-progression-and-metastasis.php>. DOI: 10.3332/ecancer.2016.617.
- [16] WITTEKIND C, NEID M. Cancer invasion and metastasis [J]. *Oncology*, 2005, 69(Suppl 1): 14-16. DOI: 10.1159/000086626.
- [17] APTE S S, PARKS W C. Metalloproteinases: a parade of functions in matrix biology and an outlook for the future [J]. *Matrix Biol*, 2015, 44-46: 1-6. DOI:10.1016/j.matbio.2015.04.005.
- [18] LIU Y, XU B, WU N, et al. Association of MMPs and TIMPs with the occurrence of atrial fibrillation: a systematic review and Meta-analysis [J]. *Can J Cardiol*, 2015. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1016/j.cjca.2015.08.001.
- [19] WELLS J M, GAGGAR A, BLALOCK J E. MMP generated matrilines [J]. *Matrix Biol*, 2015, 44-46: 122-129. DOI: 10.1016/j.matbio.2015.01.016.
- [20] HOFMANN U B, WESTPHAL J R, VAN MUIJEN G N, et al. Matrix metalloproteinases in human melanoma [J]. *J Invest Dermatol*, 2000, 115(3): 337-44. DOI:10.1046/j.1523-1747.2000.00068.x.

[收稿日期] 2015 - 10 - 06

[修回日期] 2016 - 02 - 24

[本文编辑] 宋关鸿

· 科技动态 ·

NF- κ B 通过清除受损线粒体抑制炎症小体的活化

巨噬细胞在炎症中起着重要的作用,通过模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)识别各种病原体,调控免疫应答和炎症反应。固有免疫 PRRs 中的 NOD 样受体(Nod-like receptors, NLRs),分布于细胞质中,主要识别病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)和损伤相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMPs)。NLRP(nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing proteins)是 NLRs 中最大的亚家族,很多 NLRP 活化后会形成炎症小体(inflammasome)。NLRP3 炎症小体可以通过离子通道、溶解体破坏和活性氧(ROS)途径活化,进而招募 Caspase-1 前体,使相邻的 2 个 Caspase-1 前体发生水解,产生具有酶活性的 Caspase-1,对 IL-1 β 前体和 IL-18 前体进行切割,转化为活性形式,释放大量的 IL-1 β 和 IL-18,引起炎症。

2016 年 2 月美国科学院院士 Michael Karin 研究小组的研究结果发表在 *Cell* 上,阐述了机体在炎症过程中一种叫做 p62/SQSTM1 的蛋白发挥了抑制炎症的作用。在巨噬细胞中,当受到毒素和诸如二氧化硅、石棉、胆固醇等微晶体一类的微粒刺激,会引起巨噬细胞线粒体损伤,释放信号激活 NLRP3 炎症小体,活化 Caspase-1,从而大量生成 IL-1 β 。同时,当外来微生物刺激巨噬细胞时,能够激活 IKK β /NF- κ B 通路使 p62/SQSTM1 的表达升高,这一蛋白可覆盖在释放炎症小体激活信号的受损线粒体的表面,使之被 E3 泛素连接酶 Parkin 识别,继而线粒体外膜发生多聚泛素链修饰,并与 P62 的 UBA 结构域结合,产生线粒体自噬从而清除受损线粒体。一旦这些受损的线粒体被清除,NLRP3 炎症小体就会失活,抑制 IL-1 β 生成,防止过度炎症的产生。因此,巨噬细胞可通过“NF- κ B-p62-自噬”路径的调控维持机体稳态以及组织修复。

Michael Karin 研究小组长期以来一直关注遗传或者环境因子引起的线粒体损伤相关疾病,而这些疾病都与低水平的慢性炎症相关。因此,P62 清除受损线粒体从而抑制炎症的作用,有可能为预防线粒体损伤引起的相关疾病提供新靶点。

[林炫 摘译,钱程 审阅. ZHONG Z, UMEMURA A, SANCHEZ-LOPEZ E, et al. *Cell*, 2016, 164(5): 896-910. DOI: 10.1016/j.cell.2015.12.057]