文章编号:1000-5404(2012)21-2141-04

论著

*Sphk*1 基因对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、凋亡和迁移能力的影响

张 彦,郑晓东,唐 鹏,张 毅,姜 军 (400038 重庆,第三军医大学西南医院乳腺中心)

[摘要] **目的** 通过抑制鞘氨醇激酶-1(sphingosine kinase-1,*Sphk*1)基因表达,观察其对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、凋亡和迁移能力的影响。**方法** 使用脂质体 2000 将化学合成的靶向 *Sphk*1 基因的小干扰 RNA(small interfering RNA,siRNA)转入人乳腺癌 MCF-7 细胞。使用流式细胞术(FCM)检测转染效率,荧光定量 RT-PCR(qRT-PCR)和 Western blot 法检测 *Sphk*1 的 mRNA 和蛋白表达水平。利用 CCK-8 法检测细胞的增殖能力,流式细胞术检测细胞凋亡,Transwell 小室法检测细胞迁移能力。**结果** *Sphk*1 siRNA 转染效率达 89%。转染 siRNA 后,MCF-7 细胞的 *Sphk*1 mRNA 和蛋白表达水平均明显下降,以 siRNA-2 效果最为显著($P<0.01$)。转染 *Sphk*1 siRNA-2 后,MCF-7 细胞的增殖和迁移能力明显下降,凋亡细胞比例增加,以上差异均具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 干扰 *Sphk*1 基因表达可有效抑制 MCF-7 细胞的增殖、迁移能力,同时诱导细胞发生凋亡,*Sphk*1 基因可能成为一个潜在的乳腺癌治疗靶标。

[关键词] 乳腺肿瘤;RNA 干扰;siRNA;*Sphk*1
[中图法分类号] R394.2;R730.23;R737.9 [文献标志码] A

*Sphk*1 interference suppresses proliferation, apoptosis and migration in human MCF-7 breast cancer cells

Zhang Yan, Zheng Xiaodong, Tang Peng, Zhang Yi, Jiang Jun (Center of Breast Disease, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of down-regulating sphingosine kinase-1 (*Sphk*1) on the proliferation, apoptosis and migration in human breast cancer MCF-7 cell line. **Methods** The siRNA against *Sphk*1 was chemically synthesized and then transfected into MCF-7 cells using Lipofectamine 2000. Transfection efficiency was examined by flow cytometry (FCM) and the expression levels of *Sphk*1 mRNA and protein were determined by real-time fluorescent quantitative PCR and Western blotting. Cell proliferation and cell apoptosis was assessed by CCK-8 assay and FCM respectively. Cell migration was measured by transwell assay. **Results** The efficiency of siRNA transfection into human MCF-7 cells were 89%. The siRNA against sphk1 gene significantly reduced the mRNA and protein expression of *Sphk*1 in MCF-7 cells ($P<0.05$). The siRNA-2 showed most significant effect ($P<0.01$). The MCF-7 cells transfected with *Sphk*1 siRNA-2 showed a significant decrease of cell proliferation and migration compared to the control cells. Moreover, significant increase of proportion of apoptotic cells were detected in the transfected cells ($P<0.05$). **Conclusion** *Sphk*1 knockdown in breast cancer cells effectively inhibits the proliferation and migration and induces the apoptosis in MCF-7 cells. *Sphk*1 may become a potential target for gene therapy of breast cancer.

[**Key words**] breast cancer; RNA interference; siRNA; *Sphk*1

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81072156). Corresponding author: Jiang Jun, Tel: 86-23-68754160, E-mail: jcbd@medmail.com.cn; Zhang Yi, Tel: 86-23-68765779, E-mail: zy53810@163.com

乳腺癌是严重危害女性健康的恶性肿瘤之一。研究证实乳腺癌的发生一般经历乳腺导管上皮增生——非典型增生——原位癌——浸润性癌一系列恶性转化的过程[1-2]。其中细胞增殖失控是细胞恶性转化的本质。近年研究表明:鞘磷脂的活性代谢产物 1-磷酸鞘氨醇(sphingosine 1 phosphate,S1P)既可以作为细胞内第二信使发挥作用,又可以与细胞表面的特定受体结合而调节细胞的增殖、凋亡、迁移及黏附分子表达等[3-4]。在 S1P 生物合成过程中,鞘氨醇激酶(sphingosine kinase,*Sphk*)起关键限速作用[5-6]。其中 *Sphk*1 是细胞调节 S1P 生成的最主要分子,与多种肿瘤细胞

[基金项目] 国家自然科学基金(81072156)
[通信作者] 姜 军,电话:(023)68754160,E-mail:jcbd@medmail.com.cn
张 毅,电话:(023)68765779,E-mail:zy53810@163.com

的过度增殖有关。本研究以 *Sphk*1 基因作为靶点,利用 RNA 干扰(RNA interference RNAi)技术,设计作用于 *Sphk*1 基因的 siRNA,并转染人乳腺癌 MCF-7 细胞,检测干扰 *Sphk*1 对乳腺癌细胞增殖、凋亡及迁移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂

人乳腺癌 MCF-7 细胞(购自中科院上海细胞库)。DMEM(高糖)培养基(购自 Hyclone 公司),胎牛血清(购自 Gibco 公司),Lipofectamine2000 转染试剂(购自 Invitrogen 公司),RNAiso-Plus 和 qPCR 试剂盒(购自 TaKaRa 公司),CCK-8(购自碧云天公司),兔抗人 *Sphk*1 单克隆抗体及 GAPDH(购自 Epitomics 公司),siRNA(由上海吉玛合成),PCR 引物(由上海生工公司合成)。Binding Buffer、Annexin V-FITC 和碘化丙锭(购自碧云天生物公司)。流式细胞仪选用美国 BD 公司的产品。

1.2 细胞培养及传代

MCF-7 细胞培养于含有 10% 胎牛血清的 DMEM(高糖)培养液,在 37℃,5% CO_2 的孵育箱中培养,常规用 0.25% 胰酶消化传代。实验所用细胞均处于对数生长期。

1.3 siRNA 的设计

根据 GenBank 提供的 *Sphk*1 基因的 cDNA 序列(序列号:NM_001142601.1, NM_001142602.1, NM_021972.3, NM_182965.2),利用 Ambion 公司网站上的在线设计软件设计并参阅文献[7]的设计思路,设计 3 条 siRNA 靶序列 *Sphk*1 siRNA-1、*Sphk*1 siRNA-2、*Sphk*1 siRNA-3 及 1 条 *Sphk*1 siRNA-NC 序列(携带 FAM 绿色荧光标记)作为阴性对照。由上海吉玛公司合成。经 Blast 软件进行同源性比对分析确定靶序列特异性,无效序列在人类基因组中无相同序列(表 1)。

表 1 设计用于干扰 MCF-7 细胞 *Sphk*1 基因表达的 siRNA 序列

基因	序列(5′→3′)
*Sphk*1 siRNA-1	正义链 GCA GGC AUA UCG AGU AUG ATT
	反义链 UCA UAC UCC AUA UGC CUG CTT
*Sphk*1 siRNA-2	正义链 GUG CAC CCA AAC UAC UUC UTT
	反义链 AGA AGU AGU UUG GGU GCA CTT
*Sphk*1 siRNA-3	正义链 GAG GCU GAA AUC UCC UUC ATT
	反义链 UGA AGG AGA UUU CAG CCU CTT
*Sphk*1 siRNA-NC	正义链 UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT
	反义链 ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT

1.4 分组与转染

将 MCF-7 细胞以 1×10^3/孔、5×10^3/孔浓度分别接种于 96 孔板和 6 孔板用于不同实验,待培养密度达到 30% ~80% 汇合时进行 siRNA 的转染。转染采用 Lipofectamine 2000 转染试剂进行,严格按试剂说明书操作。siRNA 有效靶点筛选实验分组:A 组:*Sphk*1 siRNA-1;B 组:*Sphk*1 siRNA-2;C 组:*Sphk*1 siRNA-3;D 组(阴性对照组):NC 序列;E 组(空脂质体组):只加脂质体 2000;F 组(未转染组):未进行转染的细胞。细胞增殖、凋亡及迁移能力检测实验分组进行。实验重复 3 次。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测 *sphk*1 mRNA 表达水平

将 MCF-7 细胞按上述最佳转染序列进行转染。分组同 1.4。转染 48 h 后,提取细胞总 RNA,按 TaKaRa 说明书操作进行 PCR 反应。*Sphk*1 及 GAPDH 引物序列(5′→3′):*Sphk*1 上游 CAA TGA AGA CCT CCT GAC CAA;*Sphk*1 下游 CAG ACG CCG ATA CTT CTC ACT。GAPDH 上游 CTT TGG TAT CGT GGA AGG ACT C,下游 GTA GAG GCA GGG ATG ATG TTC T。反转录条件:37 ℃ 15 min→85 ℃ 5 s→4 ℃ 5 min。qRT-PCR 反应条件:95 ℃ 1:30 →(95 ℃ 5 s→60 ℃ 30 s) ×39→65 ℃ 1 s。实验重复 3 次,根据 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 法计算相对表达量并进行统计。

1.6 Western blot 检测 Sphk1 蛋白表达水平

分组同 1.4,转染 48 h 后,用细胞裂解液提取各组细胞上清总蛋白,Bradford 法测浓度。取 50 μg 蛋白行 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳转 PCDF 膜,用含 5% 脱脂奶粉封闭液室温封闭 4 h,加 1∶1 000 稀释的一抗 37 ℃孵育 4 h,TBST 漂洗后加 1∶2 500 稀释的二抗 37 ℃孵育 2 h 后,加 ECL 显色试剂在暗室中进行曝光和显影。通过对胶片进行扫描,比较各组灰度变化。实验重复 3 次。

1.7 CCK-8 法检测细胞增殖,筛选最佳转染序列和作用时间

分组同 1.4。于转染后 12、24、36、48 h 进行 CCK-8 细胞增殖实验。按试剂说明书操作,每组设 5 个复孔,另设 5 个复孔只加 DMEM 培养液和 CCK-8 液做调零孔。通过 Thermo Varioc-kan 多功能读数仪测定波长 450 nm 处光密度值[D(450)]。以检测时间为 X 轴,D(450)为 Y 轴绘制细胞增殖曲线。实验重复 3 次。根据 CCK-8 结果进行统计学分析,筛选出对细胞生长抑制程度最高的转染序列和作用时间。

1.8 流式细胞术测定细胞凋亡

取生长良好的 MCF-7 细胞,以 2×10^5 个细胞终浓度培养于 6 孔板,按预设实验分组分别处理细胞。细胞培养 48h 后收集细胞,冷 PBS 洗涤,4 ℃ 1 000 r/min 离心 5 min。弃上清,将细胞悬浮于 500 μl 的 Binding Buffer 中,加入 5 μl Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μl 碘化丙锭(PI)轻轻混匀;室温、避光、反应 10 min。1 h 内进行流式细胞仪检测并分析结果。实验重复 3 次。

1.9 细胞迁移功能检测

实验分 siRNA 组和未转染组。使用含 0.1% BSA 的无血清培养基混悬、稀释,然后细胞计数,使得细胞数为 2×10^5/ml,分别吸取 100 μl 细胞悬液加入 Transwell 小室的上室,下室中加入含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基。37 ℃ 5% CO_2 细胞培养箱培养 12 h,取出上室,自然风干,多聚甲醛固定 15 min,PBS 清洗 2 min,0.1% 结晶紫染色,在光镜下(200 倍)观察,随机选取 5 个视野的细胞进行计数,结果取均值。实验重复 3 次。

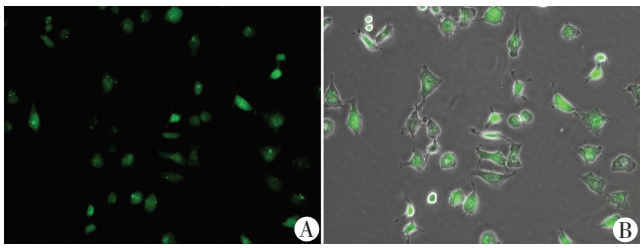
1.10 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组数据比较采用单因素方差分析,2 组数据均值比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 siRNA 转染效率评价

荧光显微镜观察转染,siRNA 转染效率大于 80%(图 1)。流式细胞术检测转染效率结果同样显示:与对照组相比,siRNA 组的转染效率达 89%。

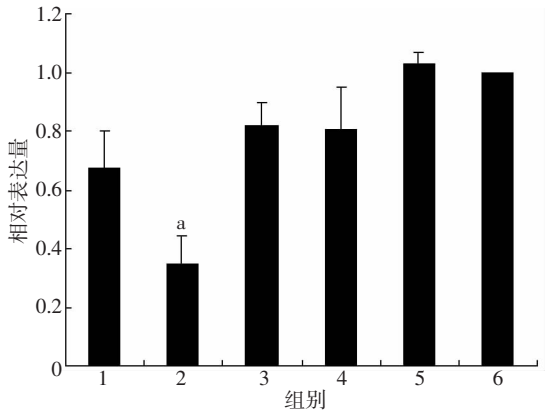


A:荧光;B:荧光与白光合成

图 1 MCF-7 细胞转染 siRNA 后情况 (荧光显微镜 ×400)

2.2 荧光定量 RT-PCR 检测 *Sphk*1 mRNA 表达水平

使用荧光定量 RT-PCR 检测 *Sphk*1 mRNA 表达,多重比较结果显示:siRNA-1、siRNA-2 与 siRNA-3 相比,差异有统计学意义($P<0.05$);其中 siRNA-1 和 siRNA-2 序列对 *Sphk*1 都有较明显抑制作用,以 siRNA-2 的抑制效果最强,与未转染组差异有统计学意义($P<0.01$),而 siRNA-3 与未转染组相比,差异无统计学意义($P>0.05$,图 2)。表明 siRNA-2 转染 MCF-7 细胞后显著抑制了 *Sphk*1 的表达。



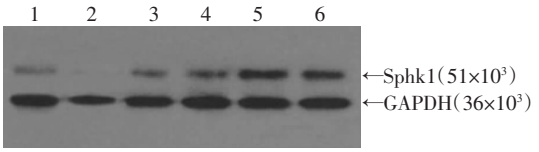
1:siRNA-1 组;2:siRNA-2 组;3:siRNA-3 组;4:阴性对照组;5:空脂质体组;6:未转染组

a:$P<0.01$,与未转染组比较

图 2 qRT-PCR 检测 MCF-7 转染 siRNA 48 h 后各组细胞 *Sphk*1 的 mRNA 表达水平

2.3 Western blot 检测 Sphk1 蛋白表达水平

siRNA-2 组蛋白表达量较未转染组明显下降($P<0.05$),结果见图 3。

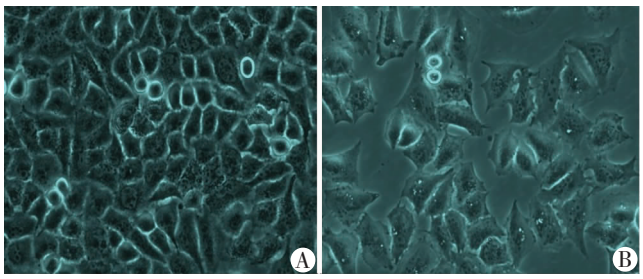


1:siRNA-1 组;2:siRNA-2 组;3:siRNA-3 组;4:阴性对照组;5:空脂质体组;6:未转染组

图 3 siRNA 转染 MCF-7 细胞 48 h 后 Sphk1 的蛋白表达情况

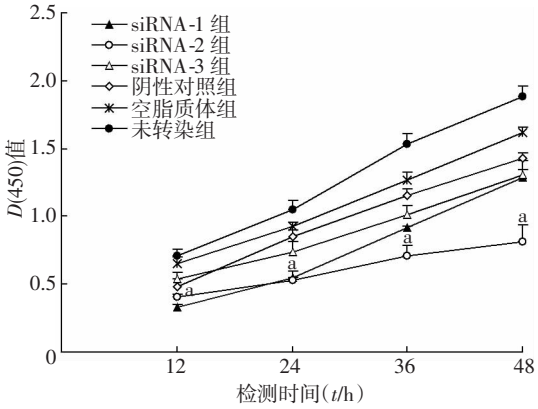
2.4 CCK-8 法检测细胞增殖

转染 48 h 后,镜下观察发现转染组细胞开始出现形态上的变化,表现为细胞轮廓稍有萎缩,漂浮物变多(图 4)。进一步使用 CCK-8 法检测,结果显示:各转染组与未转染组相比,*Sphk*1 siRNA-2 序列转染后 48 h 的光密度值显著降低,与未转染组之间的差异具有统计学意义($P<0.05$,图 5)。进一步验证了 qRT-PCR 及 Western blot 筛选的结果。



A:未转染组;B:转染组

图 4 siRNA 转染 48 h 后 MCF-7 细胞形态变化 (倒置显微镜 ×400)



a:$P<0.05$,与未转染组比较

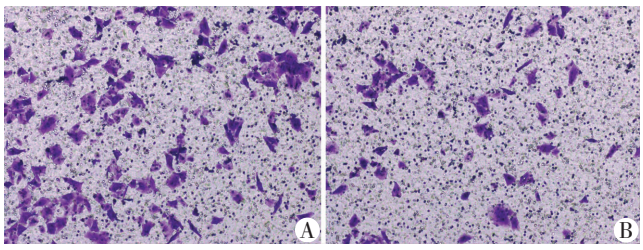
图 5 不同 *Sphk*1 siRNA 靶序列对 MCF-7 细胞生长曲线

2.5 流式细胞术检测抑制后细胞凋亡率

MCF-7 细胞经转染 siRNA-2 48 h 后凋亡率[(5.52 ± 2.66)%]较之与对照组[(2.34 ± 1.46)%]显著增高($P<0.05$)。

2.6 细胞迁移功能检测

Transwell 体外细胞迁移实验结果(图 6)显示,siRNA-2 干扰组细胞视野迁移的细胞数为(138.00 ± 42.38)个,而未转染组的迁移细胞数分别为(240.00 ± 58.31)个。siRNA-2 组的细胞迁移能力显著降低($P<0.05$)。



A:未转染组;B:siRNA 组

图 6 转染 siRNA-2 后对 MCF-7 细胞迁移能力的影响
(结晶紫 ×200)

3 讨论

*Sphk*1 不但是鞘脂代谢平衡的关键酶,还是调控细胞生命活性的一个重要的代谢酶[8]。*Sphk*1 是细胞调节 S1P 生成的最重要分子,与多种肿瘤细胞的过度

增殖有关。同时,在众多的动物移植模型研究中发现,过表达 *Sphk*1 具有促进肿瘤的生长,血管生成和化疗耐药作用;反之,干扰 *Sphk*1 表达则具有抑制肿瘤的生长,血管生成和化疗耐药作用[9-10]。此外,还有研究[11-12]表明,*Sphk*1 与糖尿病以及动脉粥样硬化等疾病有密切关系。

已有的研究[13]表明,*Sphk*1 的 mRNA 表达水平在多种肿瘤组织中都明显要高于正常的组织,如结肠癌、胃癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌等。在乳腺癌方面的研究也发现,*Sphk*1 在正常乳腺组织中无表达,在非典型增生组织中有弱表达,而在乳腺癌中强表达,表明 *Sphk*1 在乳腺癌发生过程中可能发挥了重要的作用[14]。还有研究[15]发现,瘤体低表达 *Sphk*1 的乳腺癌患者的转移风险也较低。有实验显示,抑制了 *Sphk*1 表达活性后可以抑制细胞增殖并促进细胞发生凋亡[16]。近期的研究[17]也表明,抑制 *Sphk*1 的表达会导致肝癌细胞的迁移能力显著降低。本研究也发现通过抑制 *Sphk*1 的表达,人乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖活性明显受到抑制,同时细胞迁移能力也显著降低。利用流式细胞仪对 *Sphk*1 干扰前后细胞凋亡检测,发现抑制 *Sphk*1 表达后凋亡比例增加,表明 *Sphk*1 基因可能在乳腺癌细胞凋亡调控中具有重要作用。本研究结果提示 *Sphk*1 基因在乳腺癌细胞增殖、迁移及细胞凋亡中的作用表明其在乳腺癌发生、发展中可能发生调控作用,其调控机制目前尚未完全清楚。已有研究发现,*Sphk*1 在细胞内神经酰胺(Cer)、鞘氨醇(Sp)和 S1P 三者之间的动态平衡中发挥极为关键的作用。*Sphk*1 的活性降低会导致细胞内 Cer、Sp 水平升高,S1P 水平降低,从而导致细胞生长受到抑制及诱导细胞凋亡。反之,*Sphk*1 表达增强则会降低 Cer、Sp 水平,上调 S1P 水平,促进细胞增殖,对抗细胞凋亡。而外源性的 S1P 也可通过 G 蛋白偶联受体途径激活细胞内的 MAPK 等信号途径产生抑制细胞凋亡的作用。此外,Radeff 等[18]进行胶质瘤细胞增殖实验发现,*Sphk*1 能够刺激细胞增殖,且 cyclinD1 表达随 *Sphk*1 活性强弱发生改变。据此我们认为在乳腺癌发生、发展中 *Sphk*1/S1P 信号通路也可能作为 cyclinD1 上游信号,通过活化 cyclinD1 进而调控细胞周期,从而对细胞增殖、迁移及凋亡产生调控作用。然而 *Sphk*1/S1P 通路活化后通过什么机制活化 cyclinD1 基因,促进 cyclinD1 过度表达,进而对乳腺癌细胞周期发挥调控作用有待进一步研究。

*Sphk*1 基因具有促进肿瘤细胞生长,抑制凋亡等作用,在肿瘤发生、发展中发挥了重要作用,通过深入探讨 *Sphk*1 在肿瘤发生、发展中的调控机制,将 *Sphk*1/S1P 信号通路作为靶点进行靶向治疗,可能成为肿瘤治疗的一个有效的治疗策略。

参考文献:

[1] Clark C J, Whang S, Paige K T. Incidence of precancerous lesions in breast reduction tissue: a pathologic review of 562 consecutive patients [J]. Plast Reconstr Surg, 2009, 124(4): 1033-1039.

[2] Graesslin O, Antoine M, Chopier J, *et al*. Histology after lumpectomy in women with epithelial atypia on stereotactic vacuum-assisted breast biopsy[J]. Eur J Surg Oncol, 2010, 36(2): 170-175.

[3] Pappu R, Schwab S R, Cornelissen I, *et al*. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate[J]. Science, 2007, 316(5822): 295-298.

[4] Okada T, Kajimoto T, Jahangeer S, *et al*. Sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate signalling in central nervous system[J]. Cell Signal, 2009, 21(1): 7-13.

[5] Ader I, Malavaud B, Cuvillier O. When the sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate pathway meets hypoxia signaling: new targets for cancer therapy[J]. Cancer Res, 2009, 69(9): 3723-3726.

[6] Marsolais D, Rosen H. Chemical modulators of sphingosine-1-phosphate receptors as barrier-oriented therapeutic molecules[J]. Nat Rev Drug Discov, 2009, 8(4): 297-307.

[7] 张淼, 郭燕丽, 王洛夫, 等. 靶向于雄激素受体的 siRNA 筛选及效能评价[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(23): 2459-2462.

[8] Takabe K, Paugh S W, Milstien S, *et al*. "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets [J]. Pharmacol Rev, 2008, 60(2): 181-195.

[9] Pyne N J, Pyne S. Sphingosine 1-phosphate and cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10(7): 489-503.

[10] Guan H, Song L, Cai J, *et al*. Sphingosine kinase 1 regulates the Akt/FOXO3a/Bim pathway and contributes to apoptosis resistance in glioma cells[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e19946.

[11] Summers S A. Sphingolipids and insulin resistance: the five Ws[J]. Curr Opin Lipidol, 2010, 21(2): 128-135.

[12] Deevska G M, Nikolova-Karakashian M N. The twists and turns of sphingolipid pathway in glucose regulation[J]. Biochimie, 2011, 93(1): 32-38.

[13] Johnson K R, Johnson K Y, Crellin H G, *et al*. Immunohistochemical distribution of sphingosine kinase 1 in normal and tumor lung tissue[J]. J Histochem Cytochem, 2005, 53(9): 1159-1166.

[14] 张毅, 周艳, 王姝姝, 等. 鞘氨醇激酶 1 在乳腺不典型增生及乳腺癌中的表达及意义[J]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2010, 4(2): 200-205.

[15] Ruckhaberle E, Rody A, Engels K, *et al*. Microarray analysis of altered sphingolipid metabolism reveals prognostic significance of sphingosine kinase 1 in breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2008, 112(1): 41-52.

[16] Xia P, Wang L, Gamble J R, *et al*. Activation of sphingosine kinase by tumor necrosis factor-alpha inhibits apoptosis in human endothelial cells[J]. J Biol Chem, 1999, 274(48): 34499-34505.

[17] Bao M, Chen Z, Xu Y, *et al*. Sphingosine kinase 1 promotes tumour cell migration and invasion via the S1P/EDG1 axis in hepatocellular carcinoma[J]. Liver Int, 2012, 32(2): 331-338.

[18] Radeff-Huang J, Seasholtz T M, Chang J W, *et al*. Tumor necrosis factor-alpha-stimulated cell proliferation is mediated through sphingosine kinase-dependent Akt activation and cyclin D expression[J]. J Biol Chem, 2007, 282(2): 863-870.

(**收稿**:2012-08-02;**修回**:2012-09-25)

(编辑 汪勤俭)