基础研究 文章编号:0253-3626(2010)03-0324-03

siRNA 介导的 Plk1 表达沉默对 COS-7 细胞影响的研究

朱 江[1],洪苏玲[1],柯 霞[1],兰 欢[2],卜友泉[2]
(重庆医科大学 1. 附属第一医院耳鼻咽喉科;2. 分子医学与肿瘤研究中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究(Polo-like kinase 1,Plk1)表达被抑制后对 COS-7 细胞的影响,探讨 Plk1 作为分子靶点用于肿瘤治疗的潜在价值。方法:化学合成法合成特异性的短链 Plk1 siRNA,脂质体转染法将短链 siRNA 分别导入 COS-7 细胞;采用 RT-PCR 和 Western blot 法检测 siRNA 对 Plk1 表达的抑制效果;采用胎盘兰染色结合细胞计数法、FACS 分析 siRNA 介导的 Plk1 表达抑制对 COS-7 癌细胞生长增殖、细胞周期的影响。结果:半定量 RT-PCR 和蛋白质印迹分析结果表明,合成的特异性短链 Plk1 siRNA 在 mRNA 和蛋白质水平上均能高效、特异性地抑制 COS-7 细胞中 Plk1 的表达。细胞生长分析结果表明,siRNA 介导的 Plk1 表达沉默导致 COS-7 细胞的生长增殖受到显著抑制。FACS 分析结果表明,Plk1 表达被抑制后,出现细胞周期停滞,大量细胞呈现 sub-G1 期时相。结论:siRNA 介导的 Plk1 表达沉默显著抑制 COS-7 细胞生长增殖,是一个潜在的肿瘤治疗靶点。

【关键词】Plk1;siRNA;细胞周期;细胞生长
【中国图书分类法分类号】R73 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-12-10

The effects of siRNA-mediated Plk1 depletion on COS-7 cells

ZHU Jiang, et al
(*Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of siRNA-mediated Plk1 depletion on COS-7 cells and the therapeutic potential of Plk1 in cancer treatment. *Methods*: Small interfering RNA (siRNA) were used to specifically deplete Plk1 in COS-7 cells. RT-PCR and immol/Lunoblotting analysis were used to verify the inhibitory effect of siRNA against Plk1. Trypan blue exclusion assay and FACS analysis were conducted to determine the effects of Plk1 depletion on the growth and cell cycle profile of COS-7 cells. *Results*: Synthetic siRNA duplexes against Plk1 were introduced into COS-7 cells, which subsequently resulted in a significant inhibition in Plk1 expression in the cells. Cell growth assay indicated that siRNA-mediated Plk1 depletion significantly inhibited the proliferation of COS-7 cells. FACS analysis revealed that Plk1 depletion caused cell cycle arrest, resulting into large population of sub-G1 cells. *Conclusion*: siRNA-mediated Plk1 depletion significantly inhibited the proliferation of COS-7 cells suggesting the therapeutic potential of Plk1 in cancer treatment.

【Key words】Plk1; siRNA; Cell cycle; Cell growth

Plk(Polo-like kinase)是一类从酵母到人类都高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族[1-5]。在哺乳动物细胞中,Plk 家族成员包括 Plk1、Plk2、Plk3 和 Plk4。在人类 Plk 家族成员中,目前对 Plk1 研究最为透彻。大量研究结果表明,Plk1 参与细胞有丝分裂过程中多个步骤的调节,包括中心体成熟、纺锤体形成以及胞质分裂的进行等[5]。在肿瘤研究中,发现 Plk1 在多种类型肿瘤中呈现过表达,且其表达水平具有重要预后价值[5-7]。将 Plk1 基因外源导入 NIH3T3 成纤维细胞表达后,可以引起 NIH3T3 细胞的恶性转化,恶性转化细胞能在软琼脂上快速生长,并在裸鼠体内形成肿瘤,表明 Plk1 可促进肿瘤的发生和/或发展[8]。另外,最近的一项研究也表明,Plk1 也通过调节细胞外基质而参与肿瘤的侵袭与转移[9]。这些研究结果强烈提示,Plk1 可能是一个非常有效的肿瘤治疗靶点,抑制 Plk1 的表达和/或功能很有可能成为一种有效的肿瘤治疗方法[5]。目前已有多项研究结果表明,Plk1 表达抑制可显著降低多种肿瘤细胞的生长并诱发细胞凋亡[10-14]。为进一步探讨 Plk1 作为分子靶点用于肿瘤治疗的潜在价值,本研究采用 siRNA 技术抑制 Plk1 的表达,并观察了其对体外转化细胞 COS7 的影响。

作者介绍:朱 江(1968-),男,副教授,博士,研究方向:头颈肿瘤研究。
通讯作者:洪苏玲,女,教授,E-mail:hsl_prof@163.com。
基金项目:国家自然科学基金(编号:30801356);重庆市教委科学技术研究项目(编号:KJ090305);重庆市卫生局课题(编号:07-2-026)。

1 材料与方法

1.1 材料

COS-7 为本实验室保存,采用 DMEM 培养基培养,培

养基中添加 10%FBS 和青霉素(100 IU/mL)/链霉素(100 μg/ml),培养于 CO_2 培养箱。DMEM、胎牛血清和 Lipofectamine RNAiMAX 试剂购于 Invitrogen 公司;台盼蓝溶液、蛋白酶抑制剂复合物(proteinase inhibitor cocktail)购自 Sigma 公司,Bio-Rad Protein Assay 试剂购自 Bio-Rad 公司,Immol/LobilonTM-P 膜购自 Millipore 公司,ECL Western blotting detection reagents and analysis system 购自 Amersham 公司。对照 siRNA、Plk1 siRNA 购自 Dharmacon 公司。Plk1 抗体购自 Zymed 公司,Actin 抗体购自 Sigma 公司,HRP 标记的二抗购自 Cell Signaling 公司。

1.2 *方法*

1.2.1 瞬时转染 短链 siRNA 转染采用 Lipofectamine RNAiMAX 试剂进行,具体方法参见 Lipofectamine RNAiMAX 使用说明书,主要采用反式转染。转染后 48~72 h 收集细胞,制备细胞裂解液或总 RNA 等进行下一步实验分析。

1.2.2 半定量 RT-PCR

1.2.2.1 RNA 提取 收集经各种实验处理的细胞,参照 RNeasy® Mini Kit 说明书提取细胞总 RNA。利用紫外分光光度计定量并计算 A_{260}/A_{280} 比值。

1.2.2.2 反转录 取 3~5 μg 总 RNA,加 1 μl 3 μg/μl 随机引物,DEPC 双蒸水补足至 12 μl,65℃温育 15 min,冰上冷却后依次加入含有 2 μl DEPC 水、6 μl 5×first strand buffer、6 μl 0.1 mol/L DTT、3 μl 10 mmol/Lol/L dNTPs 和 1 μl Super Script Ⅱ Reverse Transcriptase(200 U/μl)的 premixture 于 42℃温育 90 min,95℃ 5 min 终止反应,cDNA 产物原液直接用作 PCR 模板。

1.2.2.3 PCR 以 GAPDH 作为内参对照,检测 Plk1 基因的表达水平变化。Plk1 和 GAPDH 的上下游引物序列见表 1。

PCR 扩增反应体系组成为 1 μl 10×PCR 缓冲液、1 μl 2.5 mmol/Lol/L dNTPs、20×cDNA 模板 1 μl、0.1 μl Taq 酶(5 U/μl)、10 μmol/L 上下游引物混合液 1 μl, 双蒸水补足至 10 μl。扩增程序为:95℃变性 2 min,然后用逐步程序 95℃ 15 s、60℃ 15 s、72℃ 20 s 完成 19~35 个循环,最后于 72℃延伸 7 min。2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,EB 染色,凝胶成像系统照相。

1.2.3 蛋白质印迹分析 吸去培养皿中的培养基,用 1×PBS 将细胞洗涤 2 次,用细胞刮收集细胞,混悬于 RACK1 裂解缓冲液(25 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0,137 mmol/L NaCl,2.7 mmol/L KCl,1% Triton X-100,使用前临时添加适量蛋白酶抑制剂),冰上放置 30 min,超声处理进一步破碎细胞和 DNA。4℃ 14 000 r/min 离心 10 min,收集上清作为细胞裂解液。

采用 Bradford 法检测细胞裂解液中的蛋白质浓度,具体方法参见 Bio-Rad Protein Assay 使用说明。

取适量细胞裂解液,加入 SDS 上样缓冲液(62.5 mmol/L Tris-HCl,pH 6.8,2% β-巯基乙醇,0.01% 溴酚蓝)于 100℃加热变性处理 5 min。6%~15% SDS-PAGE 分离样品中各蛋白质。采用 Semi-dry 法(主要用于中小分子量蛋白)或 Tank 法(主要用于大分子量蛋白)进行转膜,具体方法参见 Immol/LobilonTM-P 膜使用说明。用封阻液(含 5%牛奶的 TBS-T)将转印后的蛋白膜于室温封阻 1h 或 4℃封阻过夜。TBS-T 洗膜 3 次,每次 5 min;加入适量稀释的一抗,室温温育 1 h;TBS-T 洗膜 3 次;加入 1:2 000 稀释的偶联辣根过氧化物酶的二抗,室温温育 1 h;TBS-T 洗膜 3 次。最后采用化学发光法进行检测,具体操作参见 ECL Western blotting detection reagents and analysis system 说明,KODAK 显像系统进行显影。

1.2.4 细胞生长与存活率分析 采用台盼蓝拒染法(Trypan blue exclusion assay)分析 Plk1 表达抑制对食管癌细胞生长和活力的影响。具体方法为,在进行 siRNA 转染时,将细胞以适当密度接种于 6 孔板上,分别在 24、48 和 72 h 收集包括贴壁和漂浮的所有细胞(每个观测点均设置至少 3 个重复),重悬于 PBS,然后取适量细胞悬液与等体积 0.4%台盼蓝溶液混合,在显微镜下对没有被染色的活细胞进行计数。以时间点为纵坐标,以每日细胞总数的增加倍数为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.2.4 流式细胞仪(FACS)分析 收集细胞,用 1×PBS 洗涤,加入 3 ml 乙醇混悬细胞,4℃放置 4 h 以上或过夜。低速离心收集细胞,用 1×PBS 洗涤,加入 500 μl FACS 缓冲液(1×PBS,0.1% BSA,0.01%NaN_3)混悬细胞。再加入 2.5 μl 10 mg/ml 的 RNase,室温放置 15 min。然后加入 25 μl 1 mg/ml 的碘化丙啶(PI),室温避光放置 15 min,流式细胞仪上机分析。

2 结 果

2.1 *Plk1 siRNA 对 Plk1 表达的抑制作用*

本研究中使用的 Plk1 siRNA 购自于 Dharmacon 公司,该 siRNA 实际上是 1 种包含了 4 种针对 Plk1mRNA 编码区不同靶点的短链干扰 siRNA 的混合物,理论上可以实现对 Plk1 表达的最大抑制。半定量 RT-PCR 分析结果表明,在转染后 48 h,与对照组相比,Plk1siRNA 转染组的 Plk1mRNA 水平显著降低,而 GAPDH 内参对照基因的表达则没有变化;同时蛋白质免疫印迹实验也表明, 瞬时转染后 48 h,Plk1 的表达完全受到抑制,而对照组无明显效应,同时 Actin 内参对照基因的表达没有变化,说明本研究所用的 Plk1siRNA 能够特异性的有效抑制细胞内源性 Plk1 的表达(见图 1)。

2.2 *Plk1 表达抑制对 COS-7 细胞生长的影响*

我们首先分析了 Plk1 表达抑制对 COS-7 细胞生长和活力的影响。在 Plk1 siRNA 转染后 24、48 和 72 h 后,分别收集细胞,采用台盼蓝拒染法分析 Plk1 表达抑制后对细胞生长的影响。结果显示,与对照 siRNA 转染组相比,在 Plk1 siRNA 转染组中,细胞生长在 24 h 后即受到明显抑制,48 h 后大量细胞开始出现死亡,且随着时间延长其效应越发明显(见图 2)。这些结果表明,Plk1 表达抑制能显著抑制 COS-7 细胞的生长。

表 1　半定量 RT-PCR 实验使用的引物序列

基因名称	引物序列
Plk1	Forward: 5'-GGCAACCTTTTCCTGAATGA-3'
	Reverse: 5'- AATGGACCACACATCCACCT-3'
GAPDH	Forward: 5'-ACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3'
	Reverse): 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

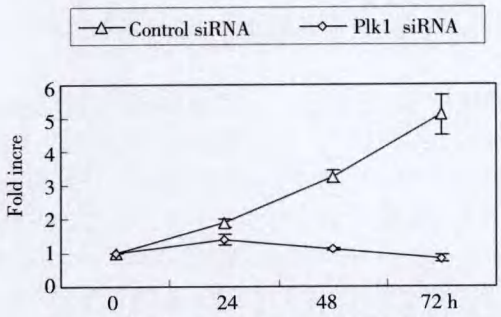


图 2　Plk1 表达抑制对 COS-7 细胞生长的影响



图 1　siRNA 介导的 Plk1 表达抑制

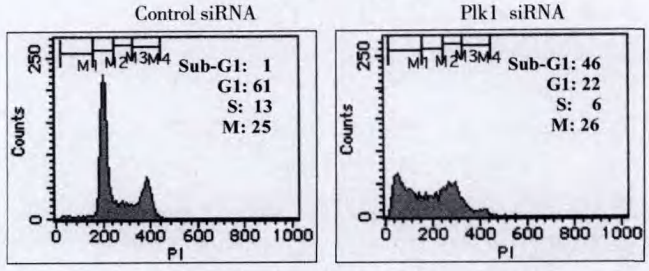


图 3　Plk1 表达抑制对 COS-7 细胞周期的影响

2.3　Plk1 表达抑制对细胞周期的影响

同时，我们在转染 siRNA 72 h 后，使用流式细胞术分析了 Plk1 表达抑制对 COS-7 细胞周期的影响。结果表明，与对照组细胞相比，Plk1siRNA 转染组细胞的细胞周期出现明显阻滞，有大量细胞处于 sub-G1 期时相（见图 3）。另外，通过对细胞生长的实时观测表明，在转染后 48、72 h，对照 siRNA 转染组中的细胞仍为正常的贴壁生长，并表现为密集汇合的生长特点，而 Plk1siRNA 转染组中大量细胞开始死亡、裂解，在显微镜下可观察到大量死亡的细胞碎片（结果未示）。

3　讨　论

Plk1 在多种不同类型的癌症中均呈现过表达且具重要预后价值，表明 Plk1 不仅参与肿瘤的发生发展，而且也是一个潜在的肿瘤治疗靶点[5]。已经有多个研究小组使用不同的肿瘤细胞系如食管癌、宫颈癌、肺癌等，采用反义寡核苷酸技术或 RNA 干扰技术抑制 Plk1 的表达，发现 Plk1 被抑制表达后，各种肿瘤细胞的生长生长增殖明显受到抑制，出现有丝分裂灾难（如 M 期停滞、有丝分裂缺陷等），最终导致大规模的细胞凋亡[10-14]。

在本研究中，我们采用 RNA 干扰技术，探讨 Plk1 表达被沉默后对 COS-7 细胞的影响。结果表明，Plk1 表达被抑制后，细胞生长显著受到抑制，大致大规模的细胞凋亡，大量细胞进入 sub-G_1 期。COS-7 细胞是一种经过 SV40 转化的非洲绿猴肾成纤维细胞，具有癌细胞的一些一般特性。因此，我们的结果就强烈提示，Plk1 的表达抑制不仅能抑制多种肿瘤细胞的生长抑制和诱发凋亡，而且还可以抑制一些恶性转化的永生化细胞。已有研究结果表明，Plk1 表达抑制后对乳腺上皮细胞等正常细胞的生长影响极小[15]。这就说明，Plk1 是一个应用前景非常好的抗肿瘤治疗药物新靶点，可以设计出能抑制 Plk1 表达或酶活性的各种药物分子用于肿瘤治疗。本研究为进一步研究和开发以 Plk1 为靶点的肿瘤治疗药物奠定了坚实的基础。

参　考　文　献

[1] Parkin D M, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002 [J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108.

[2] Donaldson MMOL/L, Tavares A A, Hagan I M, et al. The mitotic roles of Polo-like kinase[J]. Cell Sci, 2001, 114(13): 2357-2358.

[3] Glover D M, Hagan I M, Tavares A A. Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis[J]. Genes Dev, 1998, 12(24): 3777-3787.

[4] Golsteyn R M, Schultz S J, Bartek J, et al. Cell cycle analysis and chromosomal localization of human Plk1, a putative homologue of the mitotic kinases Drosophila polo and Saccharomyces cerevisiae Cdc5[J]. Cell Sci, 1994, 107(6): 1509-1517.

[5] Strebhardt K, Ullrich A. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(4): 321-330.

[6] Takai N, Hamanaka R, Yoshimatsu J, et al. Polo-like kinases (Plks) and cancer[J]. Oncogene, 2005, 24(2):287-91.

[7] Tokumitsu Y, Mori M, Tanaka S, et al. Prognostic significance of polo-like kinase expression in esophageal carcinoma[J]. Int J Oncol, 1999, 15(4): 687-692.

[8] Smith M R, Wilson M L, Hamanaka R, et al. Malignant transformation of mammol/Lalian cells initiated by constitutive expression of the polo-like kinase[J]. Biochem. Biophys. Res. Commol/Lun, 1997, 234(2): 397-405.

[9] Rizki A, Mott J D, Bissell M J. Polo-like kinase 1 is involved in invasion through extracellular matrix[J]. Cancer Res, 2007, 67(23): 11106-11110.

[10] Liu X, Erikson R L. Polo-like kinase (Plk)1 depletion induces apoptosis in cancer cells[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100(10): 5789-5794.

[11] Spänkuch-Schmitt B, Bereiter-Hahn J, Kaufmann M, et al. Effect of RNA silencing of polo-like kinase-1 (PLK1) on apoptosis and spindle

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)03-0327-05

细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95-EgA31 疫苗免疫小鼠后 Th1/Th2 型免疫应答的动态观察

周必英,陈雅棠,李文桂,杨梅
(重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:动态观察细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*,Eg)重组双歧杆菌(Bb)-Eg95-EgA31 疫苗免疫小鼠后 Th1/Th2 型免疫应答的变化。方法:将 5×10^8 克隆形成单位(CFU)和 5×10^5CFU 疫苗分别采用口服灌胃和鼻腔内接种免疫 BALB/c 鼠,在免疫后 2、4、6、8、10、12、14、16、18 和 20 周各剖杀 4 只小鼠,收集血清,用 ELISA 法测定血清 IgG 及其亚类和 IgE 水平;无菌取脾,用 ELISA 法检测脾淋巴细胞培养上清液中 IFN-γ、IL-12、TNF-α 和 IL-10 水平。结果:口服免疫组小鼠血清 IgG、IgG2a、IgG2b、IgG1、IgG3 和 IgE 水平分别在免疫后 8~10 周、2~20 周、2~20 周、4~8 周、6~12 周和 10 周显著升高,脾淋巴细胞培养上清液中 IFN-γ、IL-12、TNF-α 和 IL-10 水平分别在免疫后 2~16 周、2~12 周、2~6 周和 4~12 周显著升高;鼻腔内接种组小鼠血清 IgG、IgG2a、IgG2b、IgG1、IgG3 和 IgE 水平分别在免疫后 4~10 周、4~20 周、2~20 周、2~12 周、4~12 周和 10~12 周显著升高,脾淋巴细胞培养上清液中 IFN-γ、IL-12、TNF-α 和 IL-10 水平分别在免疫后 2~8 周、2~12 周、2~8 周和 6~16 周显著升高。结论:细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95-EgA31 疫苗可诱导小鼠产生 1 个 Th1/Th2 混合型免疫应答。口服免疫和鼻腔内接种是两种较好的免疫途径,且前者优于后者。

【关键词】细粒棘球绦虫;重组 Bb-Eg95-EgA31 疫苗;免疫球蛋白;Th1;Th2;细胞因子
【中图图书分类法分类号】R383.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-09-21

Dynamic observation on Th1/Th2 type immune response in mice immunized with recombinant Bb-Eg95-EgA31 vaccine of *Echinococcus granulosus*

ZHOU Bi-ying, et al
(*Institute of Infectious and Parasitic Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To dynamically observe changes of Th1/Th2 type immune responses in mice immunized with recombinant *Bifidobacteria bifidum* (Bb)-Eg95-EgA31 vaccine of *Echinococcus granulosus* (Eg). *Methods*: BALB/c mice were vaccinated by 5×10^8 colony forming unit (CFU) orally and 5×10^5CFU intranasally respectively. Mice were killed on week 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 after immunization respectively, sera were collected to measure the levels of IgG, its subclasses and IgE by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); Spleens were removed to determine the levels of IFN-γ, IL-12, TNF-α and IL-10 of splenocyte culture supernatant by ELISA. *Results*: Oral immunization mice showed higher levels of IgG, IgG2a, IgG2b, IgG1, IgG3 and IgE on the 8~10th week, 2~20th week, 2~20th week, 4~8th week, 6~12th week and 10th week respectively, while IFN-γ, IL-12, TNF-α and IL-10 on the 2~16th week, 2~12th week, 2~6th week and 4~12th week post vaccination respectively; Intranasal immunization mice showed higher levels of IgG, IgG2a, IgG2b, IgG1, IgG3 and IgE during the 4~10th week, 4~20th week, 2~20th week, 2~12th week, 4~12th week and 10~12th week respectively, while IFN-γ, IL-12, TNF-α and IL-10 on the 2~8th week, 2~12th week, 2~8th week and 6~16th week

作者介绍:周必英(1974-),女,副教授,博士,研究方向:病原微生物的分子免疫学研究。
通讯作者:李文桂,男,研究员,E-mail:li_wengui@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金(编号:30801052 和 30671835)。

formation in human cancer cells[J]. Natl. Cancer Inst, 2002, 94(24): 1863-1877.

[12] Reagan-Shaw S, Ahmad N. Silencing of polo-like kinase (Plk) 1 via siRNA causes induction of apoptosis and impairment of mitosis machinery in human prostate cancer cells: implications for the treatment of prostate cancer[J]. FASEB J, 2005, 19(6): 611-613.

[13] Bu Y, Yang Z, Li Q, Song F. Silencing of polo-like kinase (Plk) 1 via siRNA causes inhibition of growth and induction of apoptosis in human esophageal cancer cells[J]. Oncology, 2008, 74(3-4): 198-206.

[14] Liu X, Erikson R L. Activation of Cdc2/cyclin B and inhibition of centrosome amplification in cells depleted of Plk1 by siRNA [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(13): 8672-8676.

[15] Liu X, Lei M, Erikson R L. Normal cells, but not cancer cells, survive severe Plk1 depletion[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(6): 2093-2108.

(责任编辑:冉明会)