

# 靶向干扰 Spy1 表达增强食管癌化疗敏感性的研究

宋仕茂,王 云,骆志国

(湖北大学医学院附属太和医院,湖北 十堰 442000)

**摘 要:** [目的] 探讨抑制 Spy1 表达后食管癌细胞对化疗药物顺铂敏感性的变化。[方法] 在食管癌 Eca-109 细胞中转染靶向 Spy1 的 siRNA, 采用 RT-PCR 和 Western Blot 检测 Spy1 的表达情况; MTT 法检测抑制 Spy1 表达后对 Eca-109 细胞生长和对顺铂化疗敏感性的影响; 流式细胞术检测干扰 Spy1 对细胞周期的影响。[结果] 转染 Spy1 siRNA 后, 食管癌 Eca-109 细胞中 Spy1 的 mRNA 和蛋白水平明显下降; MTT 结果显示顺铂对 Eca-109 细胞的半数抑制浓度 (50% inhibiting concentration,  $IC_{50}$ ) 由  $4.56 \pm 1.23 \mu\text{g/ml}$  降至  $1.12 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$ ; 转染 Spy1 siRNA 联合顺铂  $IC_{50}$  处理使细胞存活率由  $(64.7 \pm 3.8)\%$  降至  $(46.8 \pm 4.2)\%$ ; 细胞周期更多阻滞于  $G_0/G_1$  期 ( $P < 0.05$ )。[结论] 靶向干扰 Spy1 表达可抑制食管癌细胞的生长, 增强顺铂对肿瘤细胞的杀伤作用, 其机制与细胞阻滞于  $G_0/G_1$  期有关。

**关键词:** 食管癌; Spy1; RNA 干扰; 顺铂; 化疗敏感性

中图分类号: R735.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2015)03-0241-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2015.03.A015

## Study on Targeted Depletion of Spy1 Sensitizes Esophageal Cancer Cells to Cisplatin

SONG Shi-mao, WANG Yun, LUO Zhi-guo

(Taihe Hospital, Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China)

**Abstract:** [Purpose] To investigate the siRNA-mediated inhibition of Spy1 gene on the chemosensitivity to cisplatin of Eca-109 cells. [Methods] Eca-109 cells were transfected with Spy1 siRNA. RT-PCR and Western Blot analysis were used to verify the inhibitory effect of siRNA against Spy1. MTT assay was conducted to determine the effects of Spy1 depletion on the chemosensitivity of Eca-109 cells. [Results] Spy1 was down-regulated in Eca-109 cells transfected with specific siRNA. The down-regulation of Spy1 decreased the  $IC_{50}$  values of Eca-109 cells to cisplatin from  $4.56 \pm 1.23 \mu\text{g/ml}$  to  $1.12 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$ . Spy1 depletion combined with cisplatin administration decreased the cell survival rate from  $(64.7 \pm 3.8)\%$  to  $(46.8 \pm 4.2)\%$ . Flow cytometry showed that cell cycle of the Spy1 siRNA group was obviously blocked in  $G_0/G_1$  phase than other groups. [Conclusion] Targeted depletion of Spy1 gene can inhibit proliferation of human esophageal cancer Eca-109 cells, and improve the sensitivity of cells to cisplatin. Induction of  $G_0/G_1$  cell cycle arrest might be a related mechanism.

**Key words:** esophageal carcinoma; Spy1; siRNA; cisplatin; chemosensitivity

食管癌(esophageal carcinoma, EC)是常见的消化道恶性肿瘤之一, 全球范围内每年约有 40 万死亡病例, 其中 90% 以上为食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)<sup>[1]</sup>。目前食管癌 5 年生存率仅为 15%, 2 年生存率约 20%~30%<sup>[2,3]</sup>。化疗是 EC 的主要治疗方式, 临床上大部分 EC 患者在接

受治疗的早期均对常用的化疗药物敏感, 但经过数个疗程之后, 部分患者可出现对某些化疗药物的敏感性降低, 而加大用药剂量常常会引起强烈的药物毒副作用, 不宜常规采用, 因此寻找新的治疗方法来增强化疗药物疗效有望解决这一难题<sup>[4,5]</sup>。

Spy1 是一个细胞周期调节蛋白, 它能够结合并活化周期蛋白依赖性激酶 2(cyclin-dependent kinase 2, CDK2), 调节细胞周期  $G_1/S$  期的进程, 促进细胞增

收稿日期: 2014-06-10; 修回日期: 2014-08-15

E-mail: he2230035@126.com

殖<sup>[6]</sup>。同时研究发现,在化疗药物诱导的 293T 细胞 DNA 损伤中,Spy1 的过表达促进 DNA 受损的细胞进入 S 期,参与 DNA 修复,从而增加细胞的存活率<sup>[7]</sup>。本研究采用 RNA 干扰(RNA interfering,RNAi)技术抑制 Spy1 蛋白的表达,观察对人 EC 细胞 Eca-109 的顺铂(cisplatin,CDDP)化疗敏感性的影响,为研发 EC 的新治疗靶点提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

EC 细胞株 Eca-109 购自中国科学院上海细胞生物研究所。RPMI 1640 细胞培养液、胰蛋白酶、胎牛血清(FCS,美国 Gibco 公司),Trizol 总 RNA 提取试剂、脂质体转染试剂 Lipo-fectamine 2000(美国 Invitrogen 公司),兔抗 Spy1 多克隆抗体(美国 Novus Biologicals 公司)、鼠抗  $\beta$ -actin 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),Western Blot 二抗试剂盒、碘化丙啶(PI,美国 Invitrogen 公司),RT-PCR 试剂盒、MTT、琼脂糖、丙烯酰胺、N-N-亚甲基双丙烯酰胺和硝酸纤维素膜等均购自天根生化科技(北京)有限公司。

### 1.2 RNA 干扰的设计和合成

根据 Spy1 mRNA 序列 (GenBank accession NP\_001008779),采用 Qiagen 公司在线设计软件结合 siRNA 设计基本原则设计针对 Spy1 mRNA 不同作用靶位的 3 对 siRNA,其序列为:siRNA1 sense:5'-GAGGGCUAAAUUUACUAUA-3',anti-sense:5'-UAUAGUAAAUUUAGCCCUC-3';siRNA2 sense:5'-CUGGGAUAGAAUUGACUAU-3',anti-sense:5'-AUAGUCAAUUCUAUCCAG-3';siRNA3 sense:5'-GGACAUAUAGGUGAUCCU-3',anti-sense:5'-AGGAUCACCUAUUAUGUCC-3'。同时设计无关对照 siRNA,其序列为:sense:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3',anti-sense:5'-ACGUGACACGUUCGGAGAA-3'。所有 siRNA 均由上海英骏生物制药公司合成。

### 1.3 细胞培养和转染

收集对数期生长的 Eca-109 细胞,分别以  $2 \times 10^4$ /孔、 $5 \times 10^5$ /孔接种 96 孔板、6 孔板,加入无双抗含血清的 RPMI 1640 培养液培养,当细胞融合度接近 70%时用于转染,具体步骤参照脂质体 Lipofectamine2000 说明书进行,siRNA 的转染剂量均采用

终浓度 100nmol/L。

### 1.4 RT-PCR

提取转染 72h 后各组细胞的总 RNA,并逆转录为 cDNA。Spy1 引物:F:5'-CCCATTACTCTGAAGCGTCCTA-3';R:5'-CATTTTCTTTTTTGATT-3'。反应条件:94℃,5min;94℃,45s,47.5℃ 45s,72℃,30s,30 cycles;72℃延伸 10min。作为内参照的 GAPDH:F:5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3';R:5'-TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT-3'。扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定,采用凝胶成像仪行灰度扫描,用 Spy1/GAPDH 灰度扫描值表示 Spy1 mRNA 的相对表达量。

### 1.5 Western Blot

收集培养瓶中 siRNA 转染 72h 后各组细胞,PBS 洗涤 2 次,加入裂解缓冲液置冰上裂解 30min,4℃ 12 000r/min 离心 10min,收集上清液,采用 BCA 法测各样本蛋白含量。各组取 50 $\mu$ g 样品上样行 10%SDS-PAGE 电泳(80V 恒压 30min,120V 恒压 50min),将蛋白转移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 2h,加入兔抗 Spy1 抗体(1:500)、鼠抗  $\beta$ -actin 抗体(1:1000),置 4℃冰箱过夜,次日 TBST 洗涤 5 min $\times$ 3 次,加羊抗兔 IgG-HRP(1:1000)、羊抗鼠 IgG-HRP(1:1000)室温孵育 2h,TBST 洗涤 5 min $\times$ 3 次,化学发光法显影。

### 1.6 MTT 检测

Eca-109 细胞以  $2 \times 10^4$ /孔接种 96 孔板,将细胞分成 4 组:第 1 组 3 孔细胞为空白对照;第 2~4 组每组 15 孔细胞,第 2 组转染对照 RNA,第 3 组转染 Spy1 siRNA,第 4 组为未转染细胞,转染 24h 后,第 2~4 组细胞加入不同质量浓度的 CDDP(0.4、2、10、50、100 $\mu$ g/ml,每个浓度梯度设置 3 复孔),继续培养 68h,每孔加入 MTT(5mg/mL)20 $\mu$ l,置培养箱继续培养 4h,弃上清,每孔加入 DMSO 150 $\mu$ l,37℃震荡 20min,充分溶解 MTT 还原产物,于酶标仪上测定每组细胞 570nm 处的吸光度值(OD 值)。根据公式计算细胞存活率=(实验组 OD 值/对照组 OD 值) $\times$ 100%。采用 Prism 4.0 统计软件计算半数抑制浓度(50% inhibiting concentration,IC<sub>50</sub>)。

### 1.7 流式细胞术

收集培养瓶中 siRNA 转染 72h 后各组细胞,PBS 洗 3 次,75%乙醇固定过夜,去固定液,PBS 重悬,加 RNA 酶 (20 $\mu$ g/ml)37℃水浴 30min,加 PI(50

μg/ml)4℃避光 30min,用 400 目尼龙网过滤细胞,1h 内上流式细胞仪分析细胞 DNA 含量分布。

## 1.8 统计学处理

采用 SPSS 15.0 统计学软件分析数据,组间比较采用单因素方差分析结合多重比较。 $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

# 2 结 果

## 2.1 Spy1siRNA 对 EC 细胞 Spy1 表达的影响

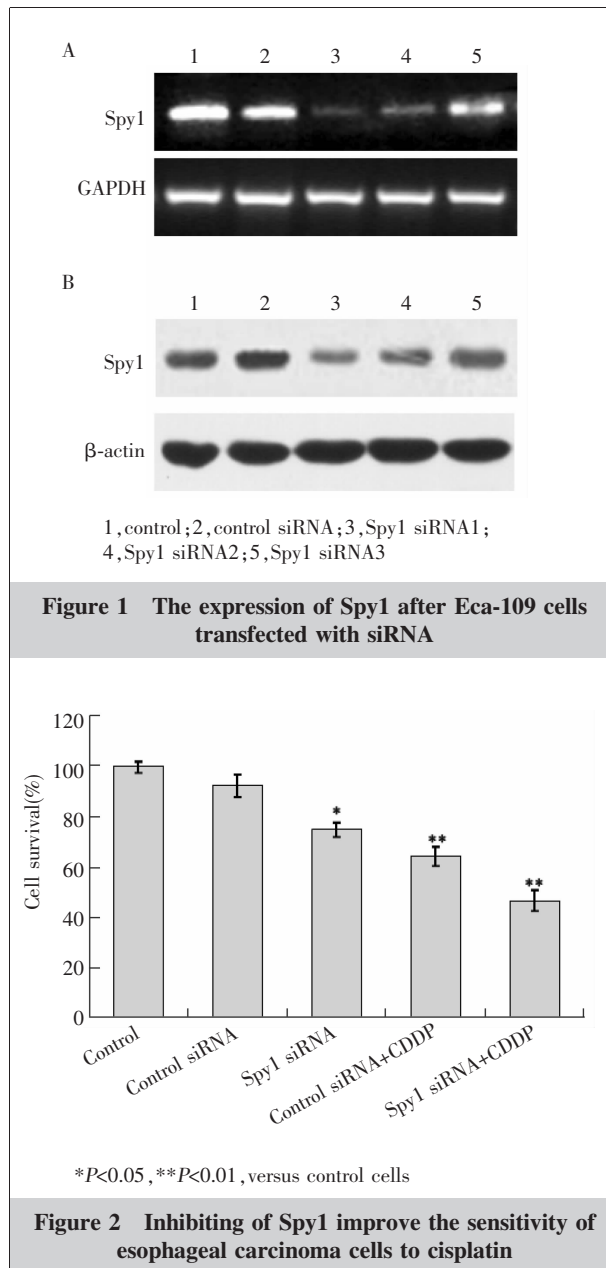
在 Eca-109 细胞中分别转染 3 对靶向 Spy1 的 siRNA,RT-PCR 检测 Spy1 mRNA 水平的表达,灰度扫描结果显示 siRNA1、siRNA2 和 siRNA3 转染细胞后 Spy1 mRNA 的相对表达水平分别为对照组的  $(12.2\pm3.6)\%$ 、 $(28.4\pm1.8)\%$  和  $(58.5\pm6.4)\%$  (Figure 1A),表明靶向 Spy1 的 siRNA 能显著性降低 Eca-109 细胞 Spy1 mRNA 的含量。Western Blot 检测 siRNA 转染后 Eca-109 细胞中 Spy1 蛋白水平的表达,结果显示 3 对 siRNA 均能抑制 Spy1 的蛋白表达(Figure 1B,Table 1),与 mRNA 水平结果相似,siRNA1 的干扰效果最显著,故以下均以 Spy1 siRNA1 行后续研究。

## 2.2 抑制 Spy1 表达对 CDDP IC<sub>50</sub> 的影响

未转染组、转染对照 siRNA 组、转染 Spy1 siRNA 组的 CDDP IC<sub>50</sub> 分别为  $4.56\pm1.23$ 、 $4.02\pm0.76$ 、 $1.12\pm0.09\mu\text{g/ml}$ ,与未转染细胞组相比,转染 Spy1 siRNA 组 CDDP IC<sub>50</sub> 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

## 2.3 CDDP IC<sub>50</sub> 对不同处理细胞生存率的影响

Eca-109 细胞转染 Spy1 siRNA 24h 后,采用上述 CDDP IC<sub>50</sub> 处理,72 h 后检测各组细胞存活率。结果显示:未转染组、转染对照 siRNA 组、Spy1 siRNA 组、转染对照 siRNA 组+CDDP 组、Spy1 siRNA 组+CDDP 组的细胞存活率分别为  $(100\pm2.2)\%$ 、 $(92.4\pm4.6)\%$ 、 $(75.2\pm2.8)\%$ 、 $(64.7\pm3.8)\%$ 、 $(46.8\pm4.2)\%$  (Figure 2)。CDDP 的处理明显降低了 Eca-109 细胞的存活率,



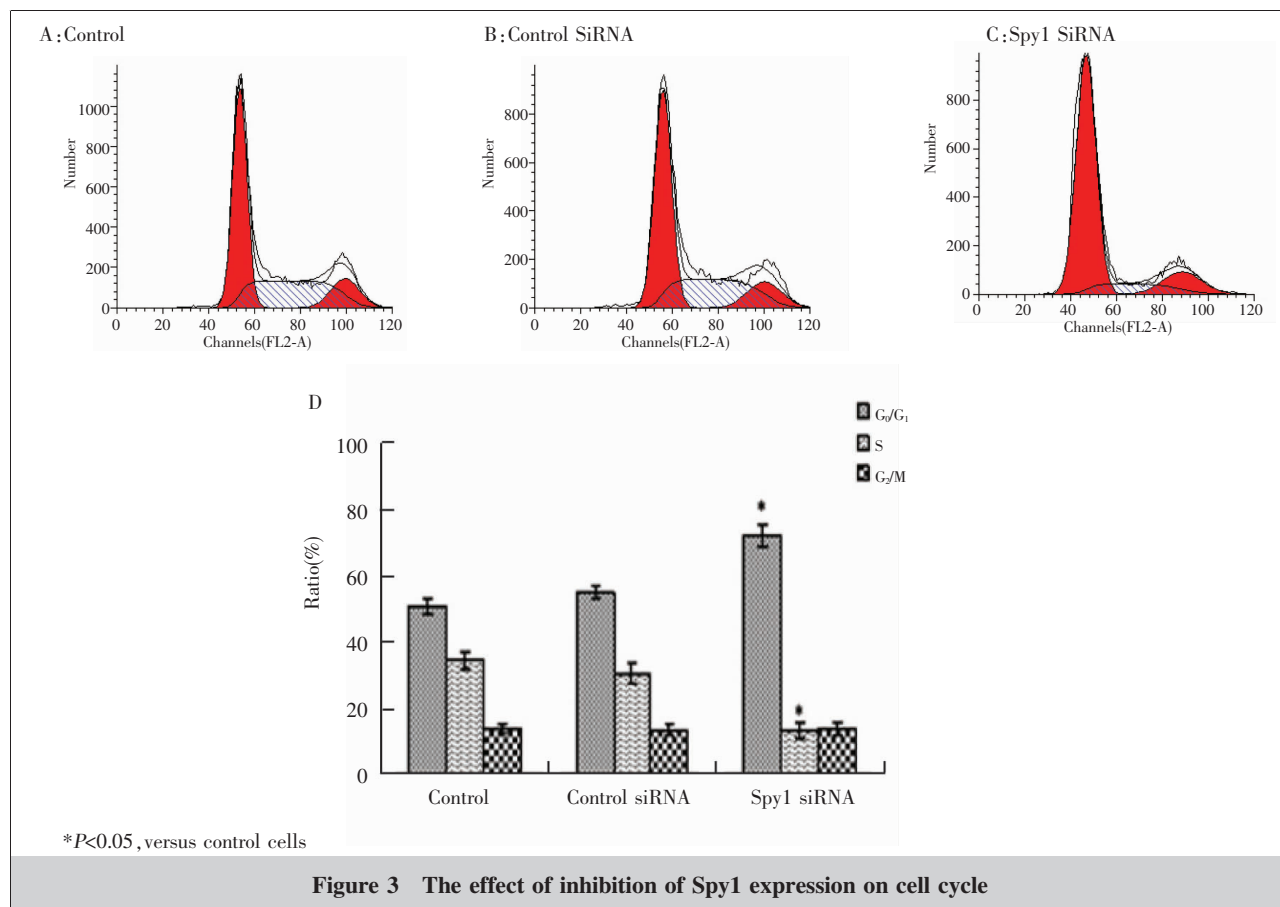
联合干扰 Spy1 的表达能更大幅度降低细胞的存活率 ( $P<0.01$ ),表明抑制 Spy1 表达可增强 CDDP 对 ECS 细胞的杀伤作用。

## 2.4 Spy1siRNA 对 EC 细胞周期的影响

流式细胞术结果显示 Spy1 siRNA 组细胞与其他两组相比明显 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期比率增高 ( $P<0.05$ ),而 S 期比率降低 ( $P<0.05$ );G<sub>2</sub>/M 期差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )(Figure 3)。

**Table 1 The ratio of Spy1 to β-actin after Eca-109 cells transfected with siRNA**

| Group         | Spy1           | β-actin        | Ratio(%)   | Relative ratio(%) |
|---------------|----------------|----------------|------------|-------------------|
| Control       | 2632.67±106.55 | 8834.55±143.33 | 29.80±0.23 | 100               |
| Control siRNA | 2824.19±98.43  | 8964.26±164.42 | 31.56±0.07 | 105.91±0.03       |
| Spy1 siRNA1   | 483.46±53.33   | 8916.07±158.76 | 5.42±0.03  | 18.19±0.01        |
| Spy1 siRNA2   | 955.63±102.14  | 8900.51±146.58 | 10.74±0.08 | 36.04±0.35        |
| Spy1 siRNA3   | 1482.42±153.67 | 8858.34±165.82 | 16.73±0.15 | 56.16±0.06        |



### 3 讨 论

顺铂(CDDP)是目前 EC 综合治疗方案中常用的基本化疗药物<sup>[8]</sup>,但由于缺乏对肿瘤细胞靶向性,故限制了CDDP应用的时间和剂量,临床上经常遇到的难题就是因为剂量限制毒性而导致化疗延期甚至中断。因此,迫切需要寻找新的补充治疗方法来提高 EC 细胞对 CDDP 化疗的敏感性。

恶性肿瘤发生与染色体的异常、基因功能缺失、癌基因的激活和抑癌基因失活等因素密切相关。肿瘤的基因治疗是通过修复、纠正突变基因的表达或增强正常抑癌基因的表达来调控肿瘤细胞的增殖与调控、转移与侵袭以及药物敏感性与耐药性等。RNA 干扰是目前沉默目的基因治疗的主要方法。

Spy1 是近年来新发现的一个细胞周期调节蛋白,它能够结合并活化 CDK2,促进多种细胞增殖和生存<sup>[6]</sup>。研究发现 Spy1 参与了多种肿瘤的发生,包括乳腺癌<sup>[9]</sup>、肝癌<sup>[10,12]</sup>、胶质瘤<sup>[13]</sup>、淋巴瘤<sup>[14]</sup>等。

Golipour 等<sup>[15]</sup>发现 Spy1 表达水平与乳腺发育密切相关,Spy1 的异常表达能够使乳腺过早发育并导致腺体形态的改变,提示 Spy1 的过表达加速了肿瘤的生成。在化疗药物诱导的 293T 细胞 DNA 损伤中, Spy1 的过表达促进 DNA 受损的细胞进入 S 期,参与 DNA 的修复,从而增加细胞的存活率<sup>[7]</sup>。

本研究设计并合成了 3 对靶向 Spy1 的 siRNA,转染 EC 细胞后均可特异性地下调 Spy1 基因的表达,说明了 Spy1 在 EC 细胞中表达较高。3 对的 siRNA 中以第一对 siRNA 效果最强,与其作用于 mRNA 的位点相关<sup>[16]</sup>。接着,我们观察抑制 Spy1 表达对 CDDP 化疗的敏感性的影响,发现干扰 Spy1 基因表达后,CDDP 的 IC<sub>50</sub> 显著性降低,提示靶向干扰 Spy1 基因可减少 CDDP 的用量,以减轻其对正常组织的细胞毒性;同样地,采用 CDDP 联合处理细胞后,与对照组相比,Spy1 siRNA 组细胞存活率大幅度降低,提示靶向干扰 Spy1 基因可增强 CDDP 的抗肿瘤效果。研究发现干扰 Spy1 表达可将更多细胞阻

滞于细胞周期的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,我们推测与其增强 CDDP 疗效的机制有关。

综上,靶向干扰 Spy1 可明显增强 CDDP 对 Eca-109 细胞的杀伤作用,降低肿瘤细胞的存活率,推测与细胞周期阻滞有关,提示今后可将联合应用于 EC 患者的临床治疗中,增强抗肿瘤的效果,改善患者的预后,但本研究仅为体外实验,若应用于临床仍需要进一步深入研究。

## 参考文献:

- [1] Holmes RS,Vaughan TL. Epidemiology and pathogenesis esophageal cancer[J].Semin Radiat Oncol,2007,17(1):2-9.
- [2] Parkin DM,Bray F,Ferlay J,et al. Global cancer statistics,2002[J]. CA Cancer J Clin,2005,55(2):74-108.
- [3] Jemal A,Siegel R,Ward E,et al. Cancer statistics,2008 [J].CA Cancer J Clin,2008,58(2):71-96.
- [4] Katada T,Ishiguro H,Kimura M,et al. GP73 contributes to the sensitivity of cisplatin in esophageal cancer [J]. Esophagus,2009,6(3):173-176.
- [5] Wu X,Lu C,Chiang SS,et al. Pharmacogenetics in esophageal cancer[J]. Semin Oncol,2005,32(6 Suppl 9): S87-S89.
- [6] Porter LA,Dellinger RW,Tynan JA,et al. Human Speedy: a novel cell cycle regulator that enhances proliferation through activation of Cdk2 [J]. J Cell Biol,2002,157(3): 357-366.
- [7] Barnes EA,Porter LA,Lenormand JL,et al. Human Spy1 promotes survival of mammalian cells following DNA damage [J].Cancer Res,2003,63(13):3701-3707.
- [8] Miyahara Y,Yoshida S,Motoyama S. Effect of cis-diammine dichloroplatinum on vascular endothelial growth factor expression in uterine cervical carcinoma [J]. Eur J Gynaecol Oncol,2004,25(1):33-39.
- [9] Zucchi I,Mento E,Kuznetsov VA,et al. Gene expression profiles of epithelial cells microscopically isolated from a breast-invasive ductal carcinoma and a nodal metastasis [J]. Proc Natl Acad Sci,2004,101(52):18147-18152.
- [10] Ke Q, Ji J, Cheng C, et al. Expression and prognostic role of Spy1 as a novel cell cycle protein in hepatocellular carcinoma[J].Exp Mol Pathol,2009,87(3):167-172.
- [11] Ke J, Ke Q, Lu MD, et al. The expression and significant of Spy1 in the hepatocellular carcinoma(HCC) [J]. Jiangsu Medical Journal,2009,35(5):516-518. [柯靖,柯青,陆牡丹,等. 肝细胞肝癌中 Spy1 蛋白的表达及其临床意义 [J]. 江苏医药,2009,35(5):516-518.]
- [12] Ke J, Ke Q, Lu MD, et al. Expression and relationship of p27kip1 and Spy1 during the proliferation process of hepatocellular carcinoma cell HuH7[J]. Suzhou University Journal of Medical Science,2009,29(4):628-631. [柯靖,柯青,陆牡丹,等. p27kip1 和 Spy1 在肝癌细胞 HuH7 增殖过程中的表达变化及其相互关系 [J]. 苏州大学学报:医学版,2009,29(4):628-631.]
- [13] Zhang L, Shen A, Ke Q, et al. Spy1 is frequently overexpressed in malignant gliomas and critically regulates the proliferation of glioma cells[J]. J Mol Neurosci,2012,47(3):485-494.
- [14] Hang Q, Fei M, Hou S, et al. Expression of Spy1 protein in human non-Hodgkin's lymphomas is correlated with phosphorylation of p27 Kip1 on Thr187 and cell proliferation[J]. Med Oncol,2012,29(5):3504-3514.
- [15] Golipour A, Myers D, Seaqroves T, et al. The Spy1/RINGO family represents a novel mechanism regulating mammary growth and tumorigenesis [J]. Cancer Res,2008,68(10): 3591-3600.
- [16] Leung RK, Whittaker PA. RNA interference:from gene silencing to gene-specific therapeutics [J]. Pharmacol Ther, 2005,107(2):222-239.