

CKS1 表达与食管癌细胞辐射敏感性的关系研究*

杜小娟¹ 王小春^{2△} 贾淑云¹ 姜小军¹ 吕 杨¹

(1 银川市解放军第五医院 消化内科 宁夏 银川 750004;

2 中国医学科学院放射医学研究所 天津市分子核医学重点实验室 天津 300192)

摘要 目的 探讨 CKS1 表达对食管癌细胞辐射敏感性的影响,初步研究其分子机理。方法 用 Western-blotting 方法筛选 CKS1 低表达和高表达的食管癌细胞系 构建 CKS1 正义表达载体 p-pcDNA 3.1/myc-His A-CKS1 和 RNA 干扰载体 CKS1 siRNA,分别转染 CKS1 低表达细胞和高表达细胞,用不同剂量 γ -射线照射各组细胞,克隆形成实验检测细胞辐射敏感性的差异。结果 CKS1 在四种食管癌细胞中的表达水平依次为 EC9706>KYSE510>KYSE450>KYSE150。用 p-pcDNA 3.1/myc-His A-CKS1 表达载体转染 KYSE150 细胞后 CKS1 表达升高,不同剂量 γ -射线照射后细胞的克隆形成能力显著高于母系对照组($P<0.01$)。RNA 干扰载体转染 KYSE510 细胞后 CKS1 表达水平降低,不同剂量 γ -射线照射后细胞的克隆形成能力显著低于母系对照组($P<0.01$)。敲降 CKS1 表达后 DNA 损伤修复相关蛋白 RAD51 表达下降,KU70 表达没有变化。CKS1 过表达后 RAD51 表达升高,KU70 表达没有变化。结论 CKS1 表达与食管癌细胞的辐射敏感性密切相关,可能通过影响 DNA 损伤修复发挥作用。

关键词 CKS1 食管癌 辐射敏感性

中图分类号 R735.1 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 22-4216-04

Effects of CKS1 Expression on Radio-sensitivity of Esophageal Carcinoma*

DU Xiao-juan¹, WANG Xiao-chun^{2△}, JIA Shu-yun¹, JIANG Xiao-jun¹, LV Yang¹

(1 The Fifth Hospital of PLA, Yinchuan, Ningxia, 750004 China;

2 Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Science, Tianjin 300192, China)

ABSTRACT Objective: To explore the correlation of CKS1 expression with radio-sensitivity of Esophageal Carcinoma and its mechanism. **Methods:** Detecting the level of CKS1 in four different Esophageal carcinoma cell lines using western-blotting. Constructing p-pcDNA 3.1/myc-His A-CKS1 expression and CKS1 siRNA vector and transfecting CKS1 low or high expression cell, respectively. Clone forming assay was used to detect the cell proliferation ability of different groups after different doses of γ -ray irradiation. **Results:** The sequence of CKS1 expression level in four different Esophageal Carcinoma cell line was EC9706 > KYSE510 > KYSE450 > KYSE150. Compared with parent control cells, the clone forming ability of CKS1 high expression cells was significantly increased ($P<0.01$). In contrast, the clone forming ability of KYSE510 cell was significantly decreased after CKS1 knock-down ($P<0.01$). RAD51 expression was decreased or increased after CKS1 knock-down or overexpression, respectively. But KU70 expression did not change. **Conclusion:** CKS1 may have effect on radio-sensitivity of Esophageal Carcinoma via DNA damage pathway.

Key words: CKS1; Esophageal Carcinoma; Radio-sensitivity

Chinese Library Classification(CLC): R735.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2012) 22-4216-04

引言

CKS1 是高度保守的 CKS1/Suc1 蛋白家族成员,可以与细胞周期蛋白依赖性激酶相互作用而影响细胞周期的进展^[1]。近年来的研究表明 CKS1 在多种人类恶性肿瘤中高表达,且与肿瘤的发生发展及预后密切相关。但其与肿瘤细胞辐射敏感性的关系的研究还比较少。本研究检测了 CKS1 表达对食管癌细胞辐射敏感性影响,并初步研究了其中的分子机理。

1 材料与方法

1.1 细胞

食管癌 EC9706, KYSE150, KYSE450 和 KYSE510 细胞购自协和医学院细胞中心,培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2 照射条件

Cammacell-10 (Atomic Energy of Canada Lim) 137Cesium γ -射线,剂量率 2.4Gy/min。

1.3 载体构建

CKS1 正义表达载体 p-pcDNATM3.1/myc-His A-CKS1 和 RNA 干扰序列由 Invitrogen 公司合成。转染试剂 Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司。

1.4 细胞转染

* 基金项目 国家自然科学基金(30901723) 天津市自然科学基金(11JCYBJC13700) 放射所发展基金(SF1103、1106)

作者简介 杜小娟(1977),女,本科,主治医师,研究方向 消化疾病方面的治疗,电话 13389500940

△通讯作者 王小春(1979),男,博士,副研究员,硕士生导师,研究方向为肿瘤分子机理及辐射敏感性,E-mail: wxc3188@126.com

(收稿日期 2012-03-11 接受日期 2012-04-08)

生长良好的细胞于转染前一天接种到六孔板中,经 16~18 小时后,细胞总面积达到 60~80%。取 5 μ L 转染试剂加入 250 μ L RPMI 1640,同时,将 2 μ g 质粒 DNA 加入另外 250 μ L RPMI 1640。将两者温和混匀,室温放置 30 分钟。细胞先用 RPMI 1640 洗一至两次,加入 2 mL RPMI 1640。然后将上述混合物轻轻加到培养细胞上。37 $^{\circ}$ C 培养 5 小时后,换正常培养液终止转染。24~48 小时后收集细胞,检测其瞬时表达情况。如果需筛选稳定细胞株,在 48 小时后将细胞按 1:10 传代,然后加入选择抗生素进行筛选,每隔 2~3 天换液一次,约 10~14 天左右有明显克隆形成,鉴定后保存。

1.5 Western-blotting

分别提取食管癌和癌旁正常组织的总蛋白,经 12% SDS-PAGE 分离后,将电泳产物转移至硝酸纤维素膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h。加 CKS1 鼠抗人一抗 (Santa Cruz 1:500 倍稀释) 4 $^{\circ}$ C 反应过夜。TTBS 洗涤后,加二抗(羊抗鼠,1:500 倍稀释),室温培育 1 h,加 ECL 发光液暗室显影。以 β -actin (Sigma,1:5000 稀释) 作为内参蛋白。

1.6 克隆形成实验

食管癌细胞接受不同剂量 γ -射线照射后,按不同照射剂量接种不同细胞数量到 60mm 培养皿。细胞连续培养 3 周后用甲醇固定,加吉姆萨染液染色 30 分钟,流水冲洗,计数细胞数 ≥ 50 的克隆个数。

1.7 统计学分析

用 SPSS16.0 统计软件进行分析。多组间比较用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 CKS1 在四种食管癌细胞系中的表达

我们首先用 Western-blotting 方法检测了四种食管癌细胞中 CKS1 的表达情况,结果如图 1 所示,CKS1 在 EC9706 中表达最高,在 KYSE150 中表达最低,KYSE510 和 KYSE 450 中的表达介于二者之间。

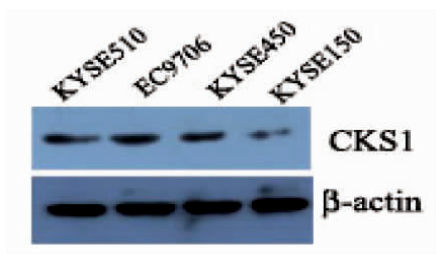


图 1 Western-blotting 检测 CKS1 在四种食管癌细胞系中的表达 CKS1 表达顺序依次为 EC9706>KYSE510>KYSE450 >KYSE150

Fig.1 Western-blotting for CKS1 expression in the four esophageal cancer cell lines. Expression order of CKS1 EC9706> KYSE510> KYSE450> KYSE150

2.2 正义转染和 RNA 干扰效果

用 CKS1 表达载体 p-pcDNATM 3.1/myc-His A-CKS1 转染 CKS1 低表达细胞 KYSE150, 筛选稳定克隆后检测 CKS1 表达,结果如图 2A 所示,正义转染后 CKS1 表达水平显著升高,表明转染成功。用 CKS1 siRNA 载体转染 CKS1 高表达细胞

EC9706 后,结果如图 2B 所示,敲降组 CKS1 表达降低,表明 RNA 干扰成功。

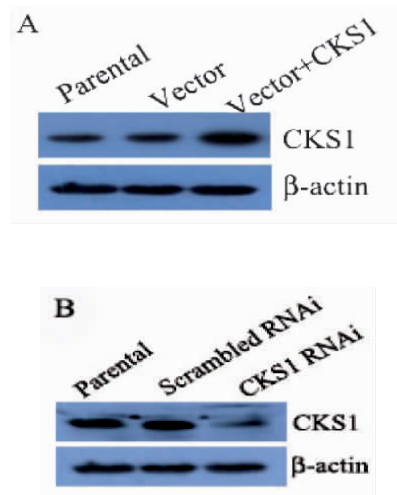


图 2 A, 正义转染后 CKS1 表达升高。B, RNA 干扰后 CKS1 表达降低

Fig.2 A, CKS1 expression is elevated after transfection. B, CKS1 expression decreased after RNA interference

2.3 CKS1 表达对食管癌细胞辐射敏感性的影响

用 p-pcDNA 3.1/myc-His A-CKS1 正义转染 KYSE150 细胞,以 KYSE150 母系和空载作为对照,0、2、4、6、8 Gy γ -射线照射各组细胞,克隆形成实验检测细胞存活分数,发现在 6 Gy 和 8 Gy γ -射线照射后 CKS1 高表达组细胞的存活分数显著高于对照组 ($P < 0.01$) (图 3),表明 CKS1 高表达可以增加食管癌细胞的辐射抵抗能力。

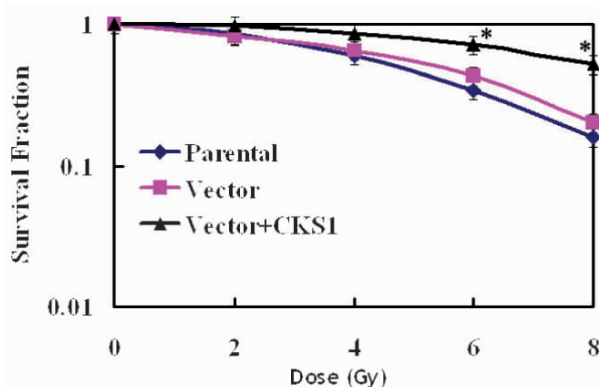


图 3 6 Gy 和 8 Gy γ -射线照射细胞后,CKS1 高表达组细胞的存活分数显著高于对照组,* $P < 0.01$

Fig.3 After 6Gy and 8Gy γ -ray irradiated cells, cell survival fraction in high expression of CKS1 group was significantly higher than those in the control group, * $P < 0.01$

用 RNA 干扰技术敲降 EC9706 细胞中 CKS1 表达后,EC9706 母系和 Scrambled RNAi 作为对照,0、2、4、6、8 Gy γ -射线照射各组细胞,克隆形成实验检测细胞存活分数,发现在 6 Gy 和 8 Gy γ -射线照射后 CKS1 敲降组细胞的存活分数显著低于对照组 ($P < 0.01$) (图 4),表明 CKS1 低表达可以增加食管癌细胞的辐射敏感性。

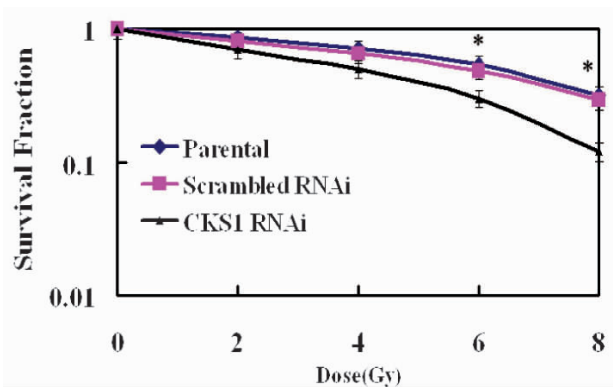


图4 6 Gy 和 8 Gy γ -射线照射细胞后,CKS1 低表达组细胞的存活分数显著低于对照组,* P<0.01

Fig.4 After 6Gy and 8Gy γ -ray irradiated cells, cell survival fraction in low expression of CKS1 group was significantly lower than those in the control group, * P < 0.01

2.4 CKS1 表达对 DNA 损伤修复相关蛋白 RAD51 和 KU70 表达的影响

用 p-pcDNA 3.1/myc-His A-CKS1 正义转染 KYSE150 细胞,以 KYSE150 母系和空载作为对照,检测 CKS1 高表达对 RAD51 和 KU70 表达的影响,发现 CKS1 高表达细胞 RAD51 表达升高,KU70 表达没有明显变化(图 5A)。

用 RNA 干扰技术敲降 EC9706 细胞中 CKS1 表达后,EC9706 母系和 Scrambled RNAi 作为对照,检测敲降 CKS1 对 RAD51 和 KU70 表达的影响,发现 CKS1 低表达细胞 RAD51 表达也降低,KU70 表达同样没有明显变化(图 5B)。

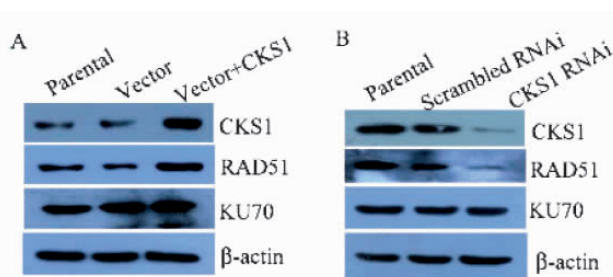


图5 CKS1 表达对 RAD51 和 KU70 表达的影响。A, CKS1 高表达细胞 RAD51 表达升高,KU70 表达没有明显变化。B,敲降 CKS1 表达后 RAD51 表达降低,KU70 表达没有明显变化

Fig.5 Impack of RAD51 and KU70 expression from expression of CKS1.

A, Expression of RAD51 in cell was increased when CKS1 high expressed, but expression of KU70 did not change significantly. B, When knocking down CKS1, expression of RAD51 reduced while expression of KU70 did not change significantly

3 讨论

我国是世界上食管癌高发区,发病率和死亡率均居世界之首,每年全世界新诊断的 30 万食管癌患者中,1/2 以上发生在中国^[2]。放射治疗是食管癌的主要治疗手段之一,我国的食管癌患者以鳞状细胞癌为主,对放射治疗相对比较敏感。但不同食管癌患者放射治疗的效果存在很大差异,其中的一个重要原因是肿瘤组织对射线作用的敏感性不同,因此,寻找与食管癌辐

射敏感性相关的生物标志物,阐明其分子机理对指导食管癌的个体化放射治疗,提高患者生存质量有重要意义。

CKS1 是高度保守的 CKS1/Suc1 蛋白家族成员,可以与细胞周期蛋白依赖性激酶相互作用而影响细胞周期的进展。近年来的研究表明 CKS1 在多种人类恶性肿瘤中高表达,且与肿瘤的发生发展及预后密切相关,可能作为肿瘤治疗的新靶点。Shen 等利用免疫组化方法检测发现 CKS1 在肝癌组织中高表达,而且 CKS1 的表达与肝癌侵袭性有显著的相关性^[3]。Zototar 等研究发现 CKS1 在非小细胞肺癌组织中高表达,统计分析表明 CKS1 表达与病人不良预后显著相关^[4]。Nagler 等检测了 64 例唾液腺癌中 CKS1 的表达,发现 47% 的病例中存在 CKS1 的高表达,而且其表达与 SKP2、Ki67 和 p53 的表达呈显著正相关,与 p27 表达呈显著负相关。进一步的统计学分析发现 CKS1 表达与唾液腺癌的淋巴结转移及病人的生存期成显著的负相关^[5]。Slotky 等发现 CKS1 的表达与肿瘤分化程度和病人生存期有显著相关性^[6]。Shapira 等报道在结直肠癌中,SKP2 与 CKS1 的表达与肿瘤分化程度和 P27 的表达呈显著负相关,与结直肠癌病人的不良预后有显著相关性^[7]。此外,在其他肿瘤,如胃癌和前列腺癌等中也发现 CKS1 表达与淋巴结转移和病人预后有显著相关性^[3,5,8-12]。国内对 CKS1 在肿瘤中表达水平的研究只有赵勇等发现胃癌和结直肠组织中 CKS1 高表达,其表达与肿瘤分化程度相关,而与肿瘤浸润深度、淋巴结转移和临床分期没有相关性^[13]。我们以前的研究结果发现 CKS1 在乳腺癌中高表达,而且与乳腺癌的侵袭转移相关^[14]。

关于 CKS1 在肿瘤中的功能,报道较多的是其对肿瘤细胞周期的影响。众所周知,p27 具有抑制细胞周期进展的功能。p27 在 G1 和 S 期的泛素化降解是由 SCFSKP2 泛素连接酶复合物介导的^[15]。而 CKS1 对于该复合物对 p27 的识别和连接是必须的,所以 CKS1 的高表达对细胞周期有抑制作用^[16]。鉴于 CKS1 在细胞周期调节中的重要作用,我们推测其表达可能对肿瘤细胞的辐射敏感性有一定的影响。为此,我们构建了 CKS1 表达载体,转染 CKS1 低表达细胞后检测了细胞辐射敏感性的变化,发现 CKS1 高表达可以显著增加食管癌细胞的辐射抵抗能力。相反,用 RNA 干扰技术敲降 CKS1 高表达食管癌细胞 CKS1 的表达后,细胞的辐射敏感性显著增加。这些结果表明 CKS1 表达可以影响食管癌细胞的辐射敏感性。

细胞核 DNA 双链断裂是辐射引起的主要损伤之一,因此 DNA 损伤修复能力对细胞的辐射敏感性有重要影响^[17]。同源重组和非同源末端连接是双链 DNA 断裂的主要修复形式,而 RAD51 和 KU70 分别是参与同源重组和非同源末端连接修复的重要蛋白^[18,19],因此我们检测了 CKS1 表达对这两个蛋白的影响,结果发现 CKS1 可以影响 RAD51 的表达,提示 CKS1 可能影响辐射诱导的食管癌细胞 DNA 损伤后的同源重组修复,从而影响细胞的辐射敏感性。本研究结果提示 CKS1 的表达水平与食管癌细胞的辐射敏感性密切相关,CKS1 可能作为食管癌辐射敏感性的生物标志物及个体化放射治疗的靶点。

参考文献(References)

- [1] Lin DC, Du XL, Wang MR. Protein alterations in ESCC and clinical implications: a review[J]. Dis Esophagus 2009, 22(1):9-20
- [2] D. Ganoh, G. Bornstein, T. K. Ko, et al. The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF (Skp2)-mediated ubiquitinylation of p27, Nat[J]. Cell Biol, 2001, 3(3):321-324
- [3] Shen DY, Fang ZX, You P, et al. Clinical significance and expression of cyclin kinase subunits 1 and 2 in hepatocellular carcinoma[J]. Liver Int, 2010, 30(1):119-125
- [4] Zolota VG, Tzelepi VN, Leotsinidis M, et al. Histologic-Type Specific Role of Cell Cycle Regulators in Non-Small Cell Lung Carcinoma[J]. J Surg Res, 2010, 164(2):256-265
- [5] Nagler RM, Ben-Izhak O, Ostrovsky D, et al. The expression and prognostic significance of Cks1 in salivary cancer[J]. Cancer Invest, 2009, 27(5):512-520
- [6] Merav Slotky, Maanit Shapira. Ofer Ben-Izhak, et al. The expression of the ubiquitin ligase subunit Cks1 in human breast cancer [J]. Breast Cancer Research, 2005, 7:737-744
- [7] Maanit Shapira, Shai Linn, Boris Futerman, et al. The prognostic impact of the ubiquitin ligase subunits skp2 and cks1 in coltrectal carcinoma [J]. Cancer, 2005, 103(7):1336-1346
- [8] Jost, M., Huggett, T.M., et al. Matrix-independent survival of human keratinocytes through an EGF receptor/MAPK-kinase-dependent pathway[J]. Mol Biol Cell, 2001, 12(5):1519-1527
- [9] Yamaki N, Negishi M, Katoh H. RhoG regulates anoikis through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism [J]. Exp Cell Res., 2007, 313(13):2821-2832
- [10] Lan Y, Zhang Y, Wang J, et al. Aberrant expression of Cks1 and Cks2 contributes to prostate tumorigenesis by promoting proliferation and inhibiting programmed cell death[J]. Int J Cancer, 2008, 123: 543-551
- [11] Liu Z, Fu Q, Lv J, et al. Prognostic implication of p27Kip1, Skp2 and Cks1 expression in renal cell carcinoma: a tissue microarray study[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2008, 15; 27:51
- [12] Kawakami K, Enokida H, Tachiwada T, et al. Increased SKP2 and C-KS1 gene expression contributes to the progression of human urothelial carcinoma [J]. J Urol, 2007, 178(1):301-307
- [13] Zhao Yong, Gao Jian-fei, Rao Zhi-guo, et al. Corrdation of Cks1 Skp2 and P27kip1 Protein Expression in Gastric Cancer[J]. Cancer Research on Prevention and Treatment, 2007, 34(2):118-120
- [14] Wang XC, Tian J, Tian LL, et al. Role of Cks1 amplification and overexpression in breast cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun. 2009, 379(4):1107-1113
- [15] A. Hershko, A. Ciechanover, The ubiquitin system[J]. Annual review of biochemistry, 1998, 425-479
- [16] D. Ganoh, G. Bornstein, T.K. Ko, et al. Hershko, The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF(Skp2)-mediated ubiquitinylation of p27[J]. Nature cell biology, 2001, 321-324
- [17] Hazawa M, Hosokawa Y, Monzen S, et al. Regulation of DNA damage response and cell cycle in radiation-resistant HL60 myeloid leukemia cells[J]. Oncol Rep, 2012, 28(1):55-61
- [18] Tashiro S, Sun J. Ionizing radiation-induced DNA damage and repair [J]. Nihon Rinsho, 2012, 70(3):383-387
- [19] Basu B, Yap TA, Molife LR, et al. Targeting the DNA damage response in oncology: past, present and future perspectives[J]. Curr Opin Oncol, 2012, 24(3):316-324