

## Eg5 基因对膀胱癌 T24 细胞增殖和迁移的影响

陈杰勋<sup>1</sup>, 于德新<sup>1</sup>, 张志强<sup>1</sup>, 王 铮<sup>2</sup>, 谢栋栋<sup>1</sup>, 王 毅<sup>1</sup>, 张 涛<sup>1</sup>,  
陈 磊<sup>1</sup>, 丁德茂<sup>1</sup>, 邹 慈<sup>1</sup>, 闵 捷<sup>1</sup>, 褚 晗<sup>1</sup>

**摘要** 目的 通过 RNA 干扰阻断 T24 细胞中 Eg5 基因的表达, 研究 Eg5 基因对 T24 细胞增殖和迁移的影响。方法 T24 细胞株分为 3 组: 干扰组、空白对照组、阴性对照组。化学合成针对 Eg5 的小干扰 RNA, 通过脂质体转染至 T24 细胞中, 应用 Western blot 法检测转染后 T24 细胞中 Eg5 蛋白表达, 采用台盼蓝拒染实验检测细胞死亡率, 用噻唑蓝 (MTT) 比色分析法和平板克隆形成实验检测细胞增殖抑制率, 通过细胞划痕实验检测细胞的迁移能力。结果 干扰组 Eg5 蛋白表达显著低于空白对照组和阴性对照组; 干扰组细胞死亡率显著升高, 与空白对照组及阴性对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 干扰组的克隆形成率下降, 与空白对照组和阴性对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); MTT 结果提示, 干扰 Eg5 基因表达后, T24 细胞的增殖率明显下降 ( $P < 0.05$ ); 划痕实验结果显示干扰组细胞迁移能力受到明显抑制 ( $P < 0.05$ )。结论 Eg5 基因在膀胱移行细胞癌起重要作用, 干扰 Eg5 基因能有效抑制 T24 细胞的增殖与迁移, 促进细胞死亡, 以 Eg5 为靶点有望成为膀胱癌基因治疗的新基因靶点。

**关键词** RNA 干扰; Eg5 基因; 膀胱癌

中图分类号 R 737.14

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)06-0748-04

纺锤体驱动蛋白 Eg5 (又称 KSP、KIF11、KNSL1) 最早是从非洲爪蟾卵中克隆出来的驱动蛋白超家族, 属于驱动蛋白 5 家族<sup>[1]</sup>。Eg5 基因位于 10q24.1, 基因组长 6 216 kbp, 含 22 个外显子, 编码分子量为 119 ku、1 057 个氨基酸组成的蛋白质。Eg5 主要在细胞质中表达, 少部分在细胞核中表达, 通过磷酸化来实现其调节纺锤体形成、核糖体转运率等功能, 但过度表达 Eg5 会干扰正常纺锤体的组配和功能独特的平衡力, 导致纺锤体缺失形成、遗传

不稳定和肿瘤发生<sup>[2]</sup>。近来研究<sup>[3-5]</sup>显示 Eg5 在多种恶性肿瘤中呈高表达, 如前列腺癌、肝癌、肺癌等。Ding et al<sup>[6]</sup> 研究发现, 膀胱癌组织 Eg5 表达明显高于正常膀胱组织, 且与预后密切相关, 但具体机制尚不清楚。该研究旨在运用小干扰 RNA (small interfering siRNA) 沉默 Eg5 在膀胱癌 T24 细胞株中表达, 观察其对膀胱癌细胞增殖与迁移的影响。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 人膀胱移行上皮癌 T24 细胞株购于中国典型培养物保藏中心。Eg5 鼠抗人单克隆抗体 (美国 Abcam 公司); 转染脂质体 Lipofectamin 2000 (美国 Invitrogen 公司); RPMI 1640 细胞培养液、胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); 噻唑蓝 (MTT) (美国 Sigma 公司)。3 组针对 Eg5 基因的 siRNA 序列参照文献<sup>[7-9]</sup> 由上海吉玛制药有限公司合成: 干扰 1 组正义链: 5'-CCGAGCUCUCUUAUCAACATT-3', 反义链: 5'-GAUAAGAGAUCGGTT-3'; 干扰 2 组正义链: 5'-CUCAAGACCUGAAGACAAUTT-3', 反义链: 5'-AUU-GUCUUCAGGUCUUCAGTT-3'; 干扰 3 组正义链: 5'-AGGACAACUGCAGCUACUUTT-3', 反义链: 5'-GAGUAGCUGCAGUUGUCCUTT-3'。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及转染分组** 人膀胱移行细胞癌 T24 细胞株在无菌条件下用含 10% 胎牛血清、1% 双抗 (青霉素 + 链霉素) 的 RPMI 1640 培养液中, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下培养。转染前 1 d, 将处于对数生长期的 T24 细胞以  $5 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 6 孔板中; 次日, 当 T24 细胞丰度为 50% ~ 70% 时进行转染。实验将 T24 细胞分为 3 组: ① 干扰组, 分别转染 3 条靶向 Eg5-siRNA; ② 阴性对照组, 转染无关 siRNA; ③ 空白对照组, 只加入转染试剂。转染 5 h 后, 更换含血清及抗生素的培养液继续培养。

**1.2.2 Western blot 法检测 T24 细胞 Eg5 蛋白的表达** 分别取转染后 72 h 的各组细胞, 预冷 PBS 洗 2 次后提取细胞总蛋白, 经 BCA 法定量蛋白后, 分别

2013-12-20 接收

基金项目: 安徽省高校省级自然科学基金项目 (编号: ZD200907)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学第二附属医院泌尿外科, 合肥 230601

<sup>2</sup> 合肥微尺度物质科学国家实验室, 中国科技大学生命科学院分子细胞遗传学实验室, 合肥 230022

作者简介: 陈杰勋, 男, 硕士研究生;

于德新, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: yudx\_urology@126.com

取各组蛋白 30  $\mu\text{g}$ /孔进行 SDS-PAGE 凝胶电泳 250 mA 恒流 2.5 h 后将蛋白转移至 PVDF, 用含 5% BSA 的 TBST 室温封闭 1 h; 加入相应抗体 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 加入二抗, 室温孵育 1.5 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 最后用增强化学发光 (ECL) 检测信号强度。

**1.2.3 台盼蓝实验检测细胞的死亡率** 取对数生长期细胞调整浓度  $1 \times 10^5$  /ml, 接种于 24 孔培养板中, 分别在转染 24、48、72 h 后收取细胞, 300 r/min 离心 3 min 后以适量体积重悬, 用 0.04% 台盼蓝溶液与等体积细胞悬液混匀 3 min 后计数活细胞和死细胞。细胞死亡率 (%) = 死细胞总数 / (活细胞总数 + 死细胞总数)  $\times 100\%$ 。

**1.2.4 MTT 比色法检测细胞增殖抑制** 将各组细胞以  $2 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板, 体积 200  $\mu\text{l}$ /孔, 每组设置 3 个复孔。分别于转染后 24、48、72、96 h 进行 MTT 检测, 每孔加入 5 g/L 的 MTT 20  $\mu\text{l}$ , 继续培养 4 h, 弃上清液, 加 150  $\mu\text{l}$  二甲基亚砷 (DMSO), 震荡 5 min。经酶联检测仪上于 570 nm 测吸光度 (A) 值, 计算各组细胞增殖抑制率 (IR)。IR (%) = (对照组 A 均值 - 实验组 A 均值) / 对照组 A 均值  $\times 100\%$ 。

**1.2.5 平板克隆形成实验测定细胞增殖能力** 操作按参考文献<sup>[10]</sup>, 即细胞转染后 48 h, 再转染 1 次, 48 h 后将细胞以 960/孔密度接种于 6 孔板, 与培养箱培养 6 d。PBS 洗 2 次, 甲醇固定, 1% 结晶紫染色, 计算克隆数, 各组实验重复 3 次。克隆形成率 = 克隆数 / 接种细胞数  $\times 100\%$ 。

**1.2.6 划痕愈合实验检测细胞的迁移能力** 细胞转染 24 h 后, 将细胞以  $5 \times 10^5$  个/孔接种到 6 孔板中, 细胞丰度为 95% 时, 使用 20  $\mu\text{l}$  枪头在单层细胞表面划痕, PBS 漂洗 2 次, 更换 RPMI 1640 培养基, 继续培养 12 h, 分别在划痕后的 0、6、12 h 拍照观察细胞的相对迁移能力。细胞迁移距离 = (0 h 划痕距离 - 12 h 划痕距离)。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 统计软件分析, 计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组比较采用单因素方差分析。

## 2 结果

**2.1 siRNA 干扰对 T24 细胞中 Eg5 表达的影响** 转染 72 h 后, Western blot 检测结果显示 5 组细胞均不同程度表达 Eg5, 3 组特异性干扰组明显低于空

白对照组, 且干扰 3 组的 Eg5 表达相对强度明显低于干扰 1、2 两组, 见图 1。选用沉默效率最高的干扰组进行后续实验。

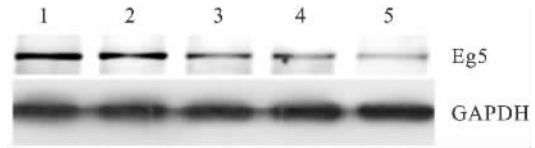


图1 siRNA 转染对 T24 细胞中 Eg5 蛋白水平的影响

1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: 干扰 1 组; 4: 干扰 2 组; 5: 干扰 3 组

**2.2 siRNA 干扰对 T24 细胞死亡的影响** 与空白对照组和阴性对照组细胞比较, Eg5 基因瞬时转染到 T24 细胞后, 对细胞死亡产生了促进作用, 表现为在转染后 24、48、72 h, 干扰组细胞死亡率高于空白对照组, 差异有统计学意义 (*t* 值分别为 -4.48、-22.61、-26.36,  $P < 0.05$ )。而空白对照组和阴性对照组比较, 差异无统计学意义 (*t* 值分别为 -2.01、-2.95、-1.91,  $P > 0.05$ )。见表 1。

表1 siRNA 干扰后不同时间 T24 细胞死亡率的变化 (%  $n=3 \bar{x} \pm s$ )

组别	时间 (h)		
	24	48	72
空白对照	2.307 0 $\pm$ 0.648 9	3.171 4 $\pm$ 0.351 4	4.342 6 $\pm$ 0.967 2
阴性对照	2.213 5 $\pm$ 0.476 6	4.182 0 $\pm$ 0.478 1	5.601 6 $\pm$ 0.605 6
干扰	4.755 0 $\pm$ 0.717 0 <sup>#</sup>	15.896 0 $\pm$ 0.909 1 <sup>#</sup>	40.151 0 $\pm$ 2.145 0 <sup>#</sup>

与空白对照组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$

**2.3 siRNA 干扰后对 T24 细胞增殖的影响** MTT 实验结果显示, T24 细胞行 Eg5 基因干扰后 24 ~ 96 h, 与空白对照组细胞比较吸光度 A 值降低, 阴性对照组 T24 细胞 24 ~ 96 h 增殖抑制率分别为 0.72%、0.83%、1.25%、0.78%, 干扰组 T24 细胞的 24 ~ 96 h 增殖抑制率分别为 5.91%、22.82%、38.50%、41.27%, 对应时程组间增殖抑制率比较差异均有统计学意义 (*F* 值分别为 113.6、214.7、247.3、517.2,  $P < 0.05$ ), 见图 2。平板克隆形成抑制的结果与此一致, 干扰组的细胞克隆形成能力明显比空白对照组减弱, 干扰组的克隆形成率为 (8.2  $\pm$  0.08)%, 空白对照组、阴性对照组的克隆形成率分别为 (23.61  $\pm$  0.36) %、(22.68  $\pm$  0.26) %, 差异有统计学意义 (*F* = 84.87,  $P < 0.05$ ), 见图 3。

**2.4 siRNA 干扰后对 T24 细胞迁移能力的影响** 划痕实验表明, 空白对照组、阴性对照组、干扰组的迁移距离分别为 (593.59  $\pm$  1.73)、(588.97  $\pm$  5.86)、(434.56  $\pm$  8.39)  $\mu\text{m}$ , 干扰组与空白对照组、

干扰组与阴性对照组两两比较差异均有统计学意义 ( $t$  值分别为 32.16、26.13  $P < 0.05$ ) ,见图 4。

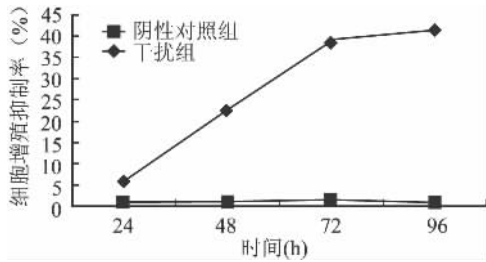


图2 MTT 法检测转染后各时点 T24 细胞增殖抑制率

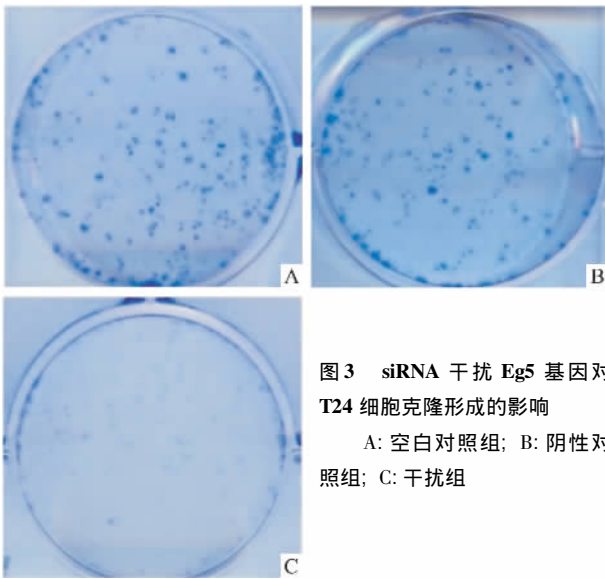


图3 siRNA 干扰 Eg5 基因对 T24 细胞克隆形成的影响  
A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: 干扰组

### 3 讨论

膀胱癌亦存在较高的复发率 ,寻找一种新的治

疗方法已成为一个重要课题 ,而近年以 siRNA 为基础的基因治疗成为膀胱癌新治疗手段的研究热点。

本研究结果显示 T24 膀胱癌移行细胞株中存在 Eg5 阳性表达 ,且移行细胞癌是膀胱癌中最常见的肿瘤类型 ,故以 T24 膀胱癌移行细胞株为研究对象具有一定代表性。在采用 siRNA 沉默 Eg5 基因后进行的 Western blot 实验中 ,T24 细胞中 Eg5 的蛋白水平明显下降 ,说明本实验设计序列具有特异性。

诱导细胞死亡是癌症治疗的一种手段。抗微管一直是被认为是诱导肿瘤细胞死亡的有效方法 ,但传统抗微管药(如紫杉烷类及长春新碱类)因会结合轴突微管引起明显的周围神经病变等毒副作用 ,因此 Eg5 作为抗微管的新靶点已成为热点。有学者<sup>[11]</sup> 研究发现 ,对多西他赛耐药的前列腺癌细胞对 Eg5 抑制剂 STLC 仍然敏感 ,STLC 对前列腺癌细胞杀伤作用不受 P-糖蛋白水平的影响。本实验采用台盼蓝实验结果显示下调 Eg5 基因能促进膀胱癌 T24 细胞的死亡且存在时间依赖性 ,即随时间延长 ,细胞死亡率逐渐增加 ,并且作用在 72 h 达最大。

肿瘤形成的特点之一是细胞增殖不受机体调控以及形成大量非整倍体细胞。Marra et al<sup>[12]</sup> 将特异性 Eg5 基因用电穿孔方法分别在 0、15 d 导入卵巢癌细胞 SKOV-3 成瘤的裸鼠中 ,与对照组比较实验组中裸鼠肿瘤的生长得到明显抑制 ,且大部分肿瘤细胞被抑制在亚 G1 期。克隆形成能力反映细胞群体依赖性和增殖能力两个重要特征 ,更倾向于反映肿瘤细胞的“接触不抑制”特征 ,是反映肿瘤恶性程度的重要指标。本实验结果显示 ,与空白对照组和

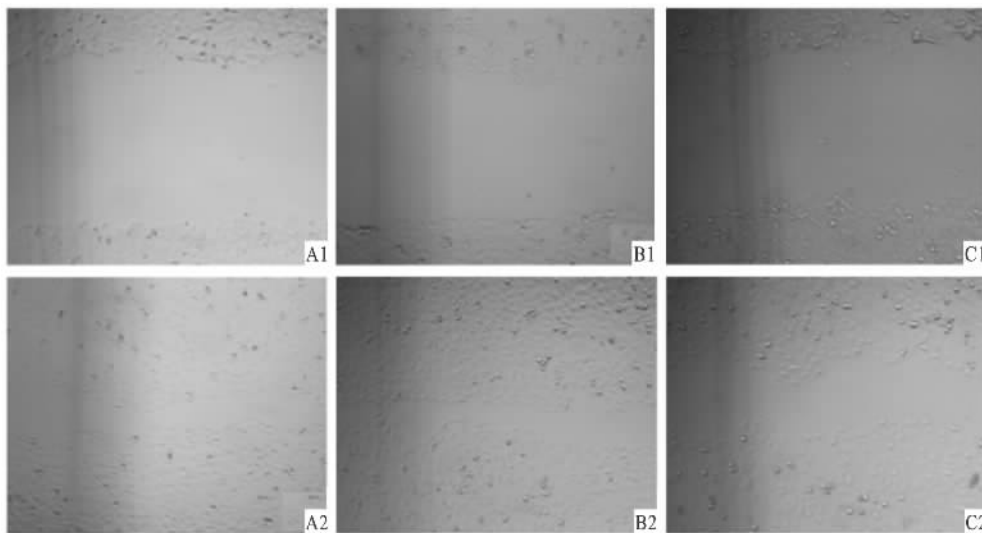


图4 siRNA 干扰 Eg5 基因对 T24 细胞迁移的影响 ×10  
A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: 干扰组; 1: 0 h; 2: 12 h

阴性对照组相比, RNAi 干扰 Eg5 基因表达后, 膀胱癌细胞克隆数目和 MTT 吸光值明显下降, 这表明沉默 Eg5 基因在 T24 细胞中表达能抑制 T24 细胞的增殖能力, 可能与抑制细胞的过度有丝分裂、减少其产生非整倍体细胞、调控细胞周期有关。

肿瘤细胞的发生是多因素、多步骤、多阶段的, 肿瘤细胞的转移是肿瘤恶性生物学行为的主要特征, 是引起肿瘤治疗失败和死亡的主要原因。Sun et al<sup>[13]</sup> 研究发现, dimethylenastron (一种 Eg5 抑制剂) 可以明显抑制高表达 Eg5 基因胰腺癌细胞的迁移和侵袭能力。本研究采用划痕实验检测 siRNA 沉默 Eg5 基因对 T24 细胞迁移的影响, 结果表明下调 Eg5 蛋白表达后可显著抑制 T24 细胞的迁移能力。肿瘤的转移能力与其诱导降解细胞外基质、基底膜的多种酶相关<sup>[14]</sup>, 而 Eg5 有可能上调此类相关酶类物质从而促进 T24 细胞侵袭转移。

### 参考文献

- [1] Le Guellec R, Paris J, Couturier A, et al. Cloning by differential screening of a Xenopus cDNA that encodes a kinesin-related protein [J]. Mol Cell Bio, 1991, 11(6): 3395-8.
- [2] Castillo A, Morse H C 3rd, Godfrey V L, et al. Overexpression of Eg5 causes genomic instability and tumor formation in mice [J]. Cancer Res, 2007, 67(21): 10138-47.
- [3] Saijo T, Ishii G, Ochiai A, et al. Eg5 expression is closely correlated with the response of advanced non-small cell lung cancer to antimetabolic agents combined with platinum chemotherapy [J]. Lung Cancer, 2006, 54(2): 217-25.
- [4] 卢正磊, 任维华, 蒺卫东, 等. 驱动蛋白 Eg5 在肝细胞癌中的表达及其意义 [J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(9): 1091-4.
- [5] Xing N D, Ding S T, Saito R, et al. A potent chemotherapeutic strategy in prostate cancer: S-(methoxytrityl)-L-cysteine, a novel Eg5 inhibitor [J]. Asian J Androl, 2011, 13(2): 236-41.
- [6] Ding S, Xing N, Lu J, Zhang H, et al. Overexpression of Eg5 predicts unfavorable prognosis in non-muscle invasive bladder urothelial carcinoma [J]. Int J Urol, 2011, 18(6): 432-8.
- [7] Koller E, Propp S, Zhang H, et al. Use of a chemically modified antisense oligonucleotide library to identify and validate Eg5 (kinesin-like 1) as a target for antineoplastic drug development [J]. Cancer Res, 2006, 66(4): 2059-66.
- [8] Rello-Varona S, Vitale I, Kepp O, et al. Preferential killing of tetraploid tumor cells by targeting the mitotic kinesin Eg5 [J]. Cell Cycle, 2009, 8(7): 1030-5.
- [9] Matsuda M, Yamamoto T, Matsumura A, et al. Highly efficient eradication of intracranial glioblastoma using Eg5 siRNA combined with HVJ envelope [J]. Gene Ther, 2009, 16(12): 1465-76.
- [10] Franken N A, Rodermond H M, Stap J, et al. Clonogenic assay of cells *in vitro* [J]. Nat Protoc, 2006, 1(5): 2315-9.
- [11] Wiltshire C, Singh B L, Stockley J, et al. Docetaxel-resistant prostate cancer cells remain sensitive to S-trityl-L-cysteine-mediated Eg5 inhibition [J]. Mol Cancer Ther, 2010, 9(6): 1730-9.
- [12] Marra E, Palombo F, Ciliberto G, et al. Kinesin spindle protein siRNA slows tumor progression [J]. J Cell Physiol, 2013, 228(1): 58-64.
- [13] Sun X D, Shi X J, Sun X O, et al. Dimethylenastron suppresses human pancreatic cancer cell migration and invasion *in vitro* via allosteric inhibition of mitotic kinesin Eg5 [J]. Acta Pharmacol Sin, 2011, 32(12): 1543-8.
- [14] 张志强, 于德新, 黄韵, 等. 小干扰 RNA 沉默血管内皮生长因子对 ACHN 肾癌细胞黏附、侵袭及迁移的影响 [J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(11): 1947-9.

## Eg5 gene affects cell proliferation and migration of bladder carcinoma cells

Chen Jiexun, Yu Dexin, Zhang Zhiqiang, et al

(Dept of Urology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

**Abstract Objective** To observe the bionomics effects of Eg5 gene on human T24 tumor cell line. **Methods** T24 cells were divided into three groups: the Eg5-siRNA group, the blank control group, the negative group. The expression of Eg5 was detected by Western blot. The rate of cell death was determined by Tyrpan blue staining assays. The proliferation of T24 cells was determined by methyl thiazol tetrazolium (MTT) assay and plate clone formation assay. The migration of T24 cells was analyzed by scratch test. **Results** Western blot analysis showed that T24 cells with Eg5-siRNA transfected decreased the Eg5 gene expression. In contrast to the control group, Eg5-siRNA induced markedly the T24 cells death. The ability of proliferation and migration of T24 cells treated with Eg5-siRNA was decreased as compared with the blank control group and the negative group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Silencing Eg5 can regulate the malignant biological behaviors of bladder cancer cell line T24 effectively and may become a novel gene therapeutic strategy for bladder cancer.

**Key words** RNA interference; Eg5 gene; bladder carcinoma