

## 靶向 Cdc6 RNAi 抑制舌癌 CAL-27 细胞的增殖

路晓薇, 冯崇锦\*, 郭俊兵, 罗冬元  
(中山大学附属第一医院口腔科, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】应用 RNA 干扰技术, 靶向抑制舌癌细胞中 Cdc6 的表达, 观察舌癌细胞增殖、凋亡等改变, 初步探讨下调 Cdc6 表达抑制舌癌细胞增殖的分子机制。【方法】实验分 4 组: 空白对照组 CON, 阴性对照组 NC, 实验组 KD1 和 KD2。应用前期构建的 Cdc6 的慢病毒载体, 转染舌癌 CAL-27 细胞, 通过 Real time RT-PCR 和 Western blot 法检测 Cdc6 mRNA 及蛋白的表达; 以 MTT 法测定活细胞数并绘制细胞生长曲线; 利用流式细胞仪观察细胞凋亡。【结果】慢病毒载体转染 CAL-27 细胞后, Real time RT-PCR 和 Western blot 实验结果显示: 舌癌 CAL-27 细胞中 Cdc6 的表达明显被抑制, 相对 NC 组, KD1、KD2 组对 Cdc6 基因敲减效率分别为 55.60% 和 64.38%。蛋白表达分别降低 44.44% 和 66.67%; 细胞生长曲线表明, 细胞生长明显减缓, KD1 和 KD2 组细胞生长抑制率分别为 33.68% 和 35.79%; 流式细胞仪检测细胞周期显示: KD1 组、KD2 组两组细胞凋亡率较 NC 组均有显著上升, 分别为 57.55% 和 83.81%。【结论】靶向 Cdc6 慢病毒载体 RNA 干扰能有效抑制舌癌 CAL-27 细胞的 DNA 复制, 阻止舌癌细胞的增殖。

**关键词:** 舌癌; DNA 复制; Cdc6; RNA 干扰; 慢病毒载体

中图分类号: R378 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2011)05-0594-06

## Suppression of Cdc6-targeted RNA Interference on Proliferation of CAL-27 Tongue Cancer Cells

LU Xiao-wei, FENG Chong-jin\*, GUO Jun-bing, LUO Dong -yuan

(Department of Stomatology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】RNAi technique was applied to inhibit the expression of the targeted Cdc6 in the tongue cancer cells to observe the proliferation and apoptosis of the tongue cancer cells. 【Methods】The experiment divides to four groups: CON, NC, KD1, and KD2. Lentiviral vector transfects CAL-27 cells, real-time PCR and Western blot were used to examine the knock-down effects of the RNA interference on the levels of expression of Cdc6 mRNA and protein. The MTT method was used to examine the growth levels of CAL-27 cells. Flow cytometry was used to examine the cell cycle changes and apoptosis rates. 【Results】The real-time PCR and Western blot results showed that KD1 and KD2 targets had significant knock-down effects on the expression of Cdc6. Compared with the NC group, the knockdown efficiencies of KD1 and KD2 on the Cdc6 gene were 33.68% and 35.79%, the levels of expression of Cdc6 protein were reduced by 44.44% and 66.67%, respectively. The cell growth levels in the KD1 and KD2 groups were inhibited, the cell growth inhibition rate in the KD1 and KD2 groups were 34.78% and 36.52%. Compared with the NC group, the apoptosis rates of CAL-27 cells were raised by 57.55% and 83.81% in the KD1 and KD2 groups. 【Conclusions】The Cdc6-targeted lentiviral vector RNAi can effectively inhibit DNA replication of CAL-27 cells, preventing the proliferation of tongue cancer cells.

**Key words:** tongue cancer; DNA replication; Cdc6; RNA interference; lentiviral vector

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(5):594-599]

收稿日期: 2011-03-03

基金项目: 广东省科技计划项目(2009B030801181, 2010B031600047)

作者简介: 路晓薇, 医学硕士, 现在哈尔滨医科大学附属口腔医院工作; \* 通信作者: 冯崇锦, 博士, 教授, 主任医师, E-mail: drfcj@yahoo.com.cn

细胞分裂周期蛋白 6 (cell division cycle protein, Cdc6)是目前研究较多的与人的恶性肿瘤关系最密切的 DNA 复制起始蛋白<sup>[1]</sup>,是真核生物 DNA 复制调控的重要因子,是 DNA 复制和细胞增殖所必需的蛋白。其主要功能是在 G1 期向 S 期过渡中调节 DNA 复制的起始,而且作为细胞周期中 DNA 复制的能量代谢酶,具有促进 ATP 结合与水解的作用,这是人类染色体复制及通过 S 期所必需的。作者前期研究结果显示<sup>[2-3]</sup>:Cdc6 在正常口腔黏膜中不表达或者低表达,而在癌前病变和舌癌组织中表达显著上调且表达量逐渐增强,Cdc6 在舌癌 CAL-27 细胞中也呈高表达。RNA 干扰技术是一种基因沉默技术,本研究应用 RNA 干扰技术,靶向抑制舌癌 CAL-27 细胞中 Cdc6 的表达,观察舌癌细胞增殖、凋亡等改变,初步探讨下调 Cdc6 表达抑制舌癌细胞增殖的分子机制,为舌癌的靶向治疗提供实验依据和新的研究平台。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与分组

采用舌癌 CAL-27 细胞株(ATCC),DMEM、胎牛血清、胰蛋白酶(GIBCO),Cdc6 RNAi 慢病毒载体(上海吉凯),BCA Protein Assay Kit (HyClone-Pierce),Prestained protein marker (中晶),ECL-PLUS/Kit (Amersham),M-MLV 逆转录酶、dNTP、Rnase Inhibitor(Promega)。

实验分 4 组,分别为 CON 组、NC 组、KD1 组、KD2 组,CON 为未感染任何病毒的舌癌 CAL-27 细胞组(Control);NC 为加阴性对照病毒感染的 CAL-27 细胞组(Negative Control);KD1、KD2 为加 RNAi 靶点病毒感染的 CAL-27 细胞组(Knock Down),其中 KD1、KD2 所加入的病毒为前期实验制备的 RNAi 靶点慢病毒,分别含有针对目的基因 Cdc6 RNAi 有效靶点序列<sup>[4]</sup>:5'-GAGATCAGGTTCTGGA CAA-3'和 5'-GGAGAGCTATTGAAATT GT-3'。

### 1.2 CAL-27 细胞慢病毒感染效率测定

将滴度为  $8.0 \times 10^8$  TU/mL 空白病毒原液稀释成  $1 \times 10^8$  TU/mL,在培养过夜的 24 孔板中,按每一梯度转染 3 个孔,分别加入 0.1、1、5、10  $\mu$ L。12 h 后移

去病毒液,加入更换新鲜培养基,放入 37  $^{\circ}$ C 体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中。于 48 h 后观察转染效果:于倒置相差/荧光显微镜下比对成功转导、表达 GFP 的 CAL-27 细胞比例,确定 CAL-27 细胞慢病毒转染效率,即感染复数(multiplicity of infection, MOI)值。

### 1.3 Real-time RT-PCR、Western Blot 检测靶向 Cdc6 慢病毒载体 RNAi 系统敲减效能

感染病毒 3 d 后观察慢病毒基因 GFP 的表达情况,感染效率大于 50%者继续培养,待感染时间达到 5 d 后收集细胞抽提 RNA 进行 real-time RT-PCR、Western Blot 检测实验。

### 1.4 MTT 法检测 CAL-27 细胞生长水平

根据实验分组每组各 3 个复孔,分别在 24 h、48 h、72 h 和 96 h 进行 MTT 检测。

感染病毒 5 d 后,将细胞重悬成细胞悬液接种于 96 孔板,置 37  $^{\circ}$ C 体积分数 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养,培养终止前 4 h 加入 MTT,吸弃培养液后加 DMSO 终止反应,酶标仪 570 nm 检测 OD 值、绘制细胞生长曲线并计算细胞生长抑制率。

计算细胞生长抑制率=(1-实验组平均 OD 值/对照组平均 OD 值) $\times$ 100%。

### 1.5 流式细胞仪检测细胞周期

本实验选用碘化丙啶(PI)单染色法检测细胞凋亡。每组 3 个复孔,感染病毒 5 d 后进行细胞周期检测。将细胞重悬成细胞悬液,接种于 6 孔板。置 37  $^{\circ}$ C 体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。感染后第 14 天收集细胞,离心 5 min,PBS 洗涤细胞沉淀 2 次,700 mL/L 乙醇固定细胞。离心 5 min 去固定液,PBS 重悬。400 目的筛网过滤 1 次,离心 5 min,弃 PBS。1 mL PI 染色,4  $^{\circ}$ C 避光 30 min,进行流式检测。

### 1.6 统计学分析

使用 SPSS 软件 16.0 进行统计学分析。定量资料进行 one-way ANOVA 单因素方差分析,方差不齐者采用秩和检验,样本间的两两比较应用 LSD 方法, $P < 0.05$  被认为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 CAL-27 细胞慢病毒感染效率测定

慢病毒转染 CAL-27 细胞 48 h 后,荧光镜下

检测 GFP 表达情况(图 1), 镜野下, 通过转染荧光细胞比率得出 CAL-27 细胞的慢病毒转染效率; 病毒低浓度 MOI = 1 时, 转染率不足 10%; MOI = 10 时, 转染率介于 10% ~ 20%; 高浓度 MOI = 100, 转

染率达 95% 以上, 但细胞毒作用明显; MOI = 50 时, 转染效率达 95% 左右, 且细胞毒副作用小, 密度改变不明显。故本实验确定最佳转导条件 MOI 为 50。

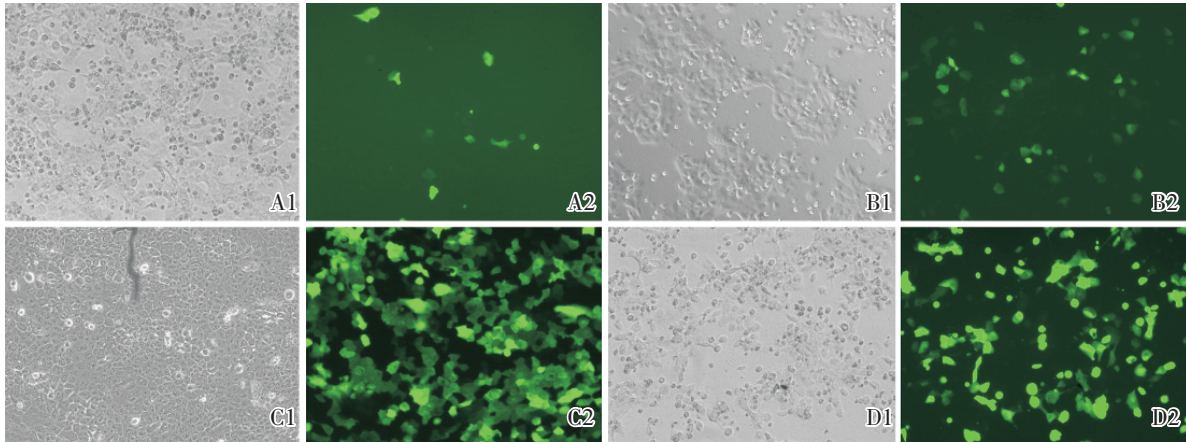


图 1 CAL-27 细胞慢病毒转染效率荧光镜检图

Fig.1 Transfection efficiency of lentivirus in CAL-27 cells test under fluoroscope

A1: The lentiviral vector transfects CAL-27 cells when MOI = 1; A2: transfection efficiency of lentivirus in CAL-27 cells when MOI = 1 test under fluoroscope; B1: The lentiviral vector transfects CAL-27 cells when MOI = 10; B2: transfection efficiency of lentivirus in CAL-27 cells when MOI = 10 test under fluoroscope; C1: The lentiviral vector transfects CAL-27 cells when MOI = 50; C2: transfection efficiency of lentivirus in CAL-27 cells when MOI = 50 test under fluoroscope; D1: The lentiviral vector transfects CAL-27 cells when MOI = 100; D2: transfection efficiency of lentivirus in CAL-27 cells when MOI = 100 test under fluoroscope. × 200

### 2.2 Real time PCR 检测靶向 Cdc6 慢病毒载体 RNAi 系统敲减效能

荧光镜检镜下 NC、KD1 及 KD2 组可见密集绿色荧光细胞, 提示慢病毒载体系统可有效转导目的细胞, 转基因标志 GFP 得到充分表达 (图 2), 证明 Cdc6 shRNA 表达框架转导入 CAL-27 细胞。

从 real-time PCR 结果可以看出(图 3): 转染后第 5 天, NC 组较 CON 组无统计学差异 ( $P = 0.099 > 0.05$ ); KD1 和 KD2 组在 CAL-27 细胞中对 Cdc6 基因的表达均有显著敲减效果。相对 NC 组, KD1 组对 Cdc6 基因敲减效率约为 55.60% ( $P < 0.001$ ), KD2 组约为 64.38% ( $P < 0.001$ )。

### 2.3 Western blot 检测靶向 Cdc6 慢病毒载体对舌癌细胞 CAL-27 的敲减效能

以  $\beta$ -Actin 作为内参对照, Western Blot 检测慢病毒 RNAi 载体转染 CAL-27 细胞后第 5 天, Cdc6 蛋白表达条带 (图 4)。可见, KD1、KD2 组 Cdc6 蛋白量均有不同程度下降, 而内参蛋白无明显

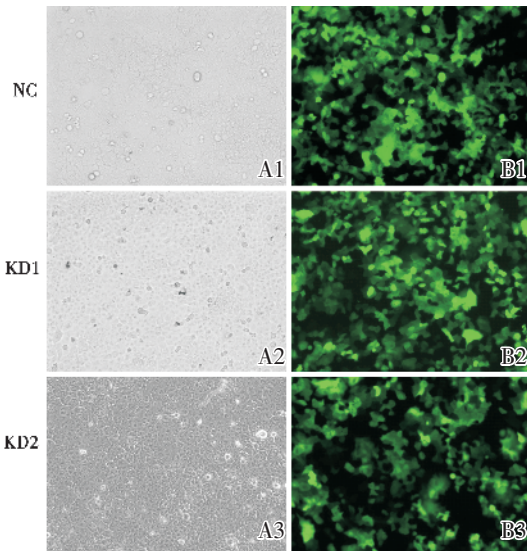


图 2 Real time PCR CAL-27 细胞样本荧光镜检图

Fig.2 GFP expression of CAL-27 cells samples for Real time PCR under fluoroscope

A1: the CAL-27 cells sample in the NC group; A2: GFP expression of CAL-27 cells sample in the NC group; B1: the CAL-27 cells sample in the KD1 group; B2: GFP expression of CAL-27 cells sample in the KD1 group; C1: the CAL-27 cells sample in the KD2 group; C2: GFP expression of CAL-27 cells sample in the KD2 group. × 200

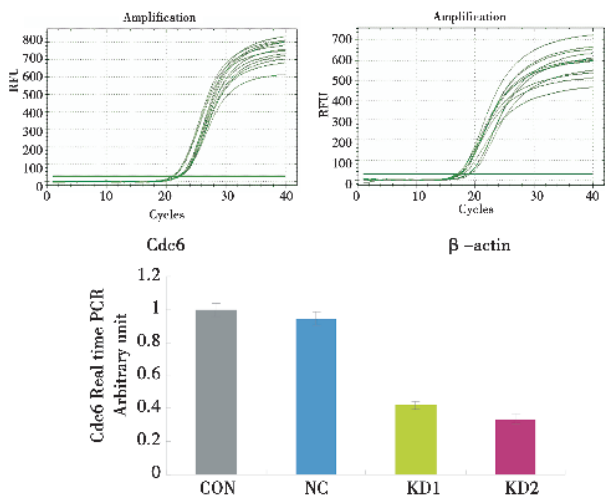


图 3 CAL-27 细胞 Cdc6 real-time PCR 目的基因 Cdc6 扩增曲线及定量数值分析  
Fig.3 Cdc6 amplification curve and quantitative analysis of CAL-27 cells by real-time PCR

显变化。以 Quantity One v4.6 软件扫描各组别的蛋白条带, 得到灰度值, 经内参校正得到各组 Cdc6 蛋白相对表达量 (图 4); CON 组与 NC 组 Cdc6 蛋白表达水平的差异无统计学意义 ( $P = 0.078, > 0.05$ ); KD1 组较 NC 组 Cdc6 蛋白表达降低 44.44% ( $P < 0.001$ ), KD2 组较 NC 组 Cdc6 蛋白表达降低 66.67% ( $P < 0.001$ )。

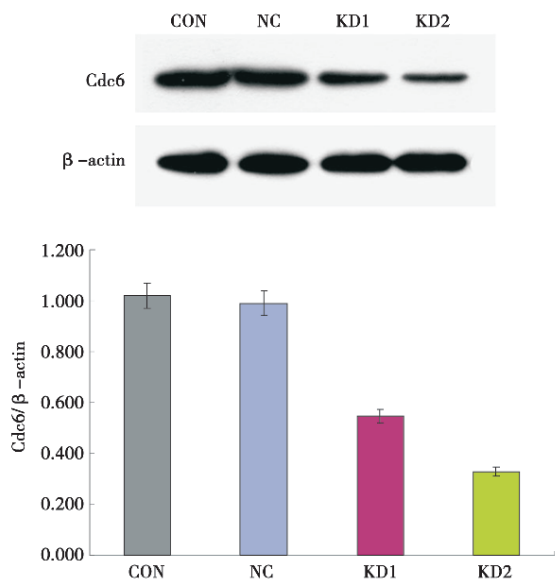


图 4 慢病毒 RNAi 载体介导 CAL-27 细胞 Cdc6 蛋白表达的 Western blot 分析  
Fig.4 Western blot analysis of Cdc6 protein in CAL-27 cells transfected by lentiviral RNAi vector

## 2.4 MTT 法对 CAL-27 细胞生长水平检测

感染病毒 5 d 后, 用 MTT 法检测 CAL-27 细胞生长水平 (图 5); 其中 KD1 及 KD2 组细胞生长水平较 NC 组明显抑制 ( $P < 0.001$ ), KD1 细胞生长抑制率为 33.68%, KD2 细胞生长抑制率为 35.79%。NC 组对 CAL-27 细胞生长水平较 CON 组无明显抑制作用 ( $P = 0.084, > 0.05$ )。

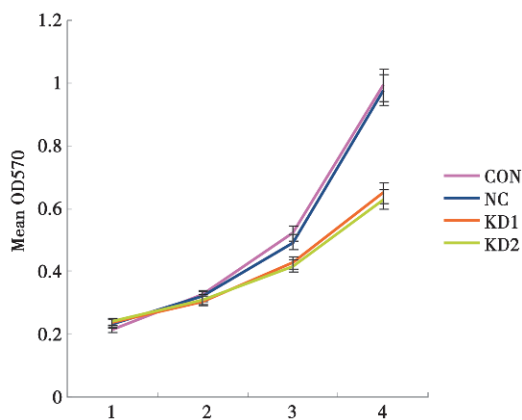


图 5 MTT 法检测 CAL-27 细胞增殖  
Fig.5 Cell multiplication in CAL-27 cells by MTT

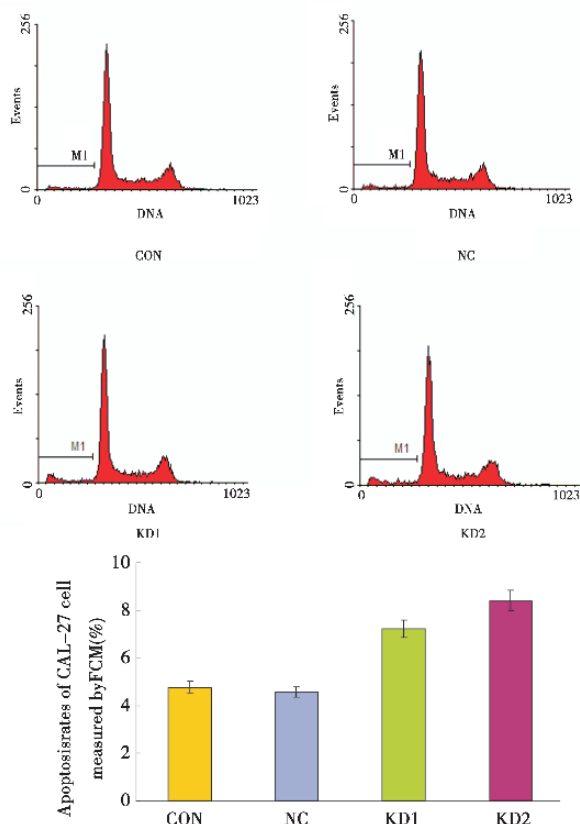


图 6 流式细胞仪检测 CAL-27 细胞凋亡  
Fig.6 Apoptosis rates change in CAL-27 cells by flow cytometry analysis

## 2.5 流式细胞仪检测细胞周期改变

转导第 5 天,NC 组与 CON 组比较细胞凋亡率差异无统计学意义( $P = 0.522, > 0.05$ );而 KD1 组、KD2 组两组舌癌细胞 CAL-27 细胞凋亡率较 NC 组均有显著上升( $P < 0.001$ ),分别为 57.55% 和 83.81%(图 6)。

## 3 讨 论

细胞分裂周期蛋白 Cdc6 是细胞周期调控的主要因子之一<sup>[1,5]</sup>,在 DNA 复制起始中起着重要作用,是复制允许因子(licensing factor)—复制前复合物 Pre-RC 的重要形成部份,Pre-RC 由 ORC、Cdc6、Cdt1、Mcm 等形成<sup>[6]</sup>。哺乳动物 G1 期细胞中 ORC 首先结合到染色质 DNA 复制起始原点(Origin)上,募集 Cdc6 和 Cdt1 与染色质结合,通过 Cdc6 N 端非催化区域与 Cdt1 相结合后,Cdt1 和 Cdc6 相互依赖募集 Mcm 于染色体上,完成复制前复合物 Pre-RC 的装载。在 G1/S 交界处,Pre-RC 在激酶 CDK 和 Cdc7/Dbf4 作用下形成起始前复合物 Pre-IC,Pre-IC 进而触发 DNA 复制的启动<sup>[7]</sup>。

作为 DNA 复制起始和 S-G2/M 检查点的关键调节物,Cdc6 参与 S-G2/M 期检查点(check-point)的调控,协调细胞由 S 期向 M 期的进程,防止细胞在 S 期尚未完成 DNA 复制之前就进入有丝分裂 M 期,其表达需要严格的调控,确保细胞周期正常进行<sup>[8]</sup>。许多研究表明,Cdc6 表达的增加会导致 DNA 合成增加,Cdc6 可作为细胞增殖的标志物。另一方面,失去 Cdc6 的表达,会引起染色体的丢失和产生不正常的子代细胞<sup>[9]</sup>。鉴于 Cdc6 在 DNA 复制起始及 S-M 期协调中的重要作用,Cdc6 水平调控紊乱将可能会导致细胞周期改变,细胞凋亡受阻并出现异常增殖<sup>[10]</sup>。有报道 55% 的脑肿瘤和 50% 非小细胞肺癌中存在 Cdc6 蛋白的高表达<sup>[11-12]</sup>,此外,在宫颈癌、Mantle 细胞淋巴瘤中均有 Cdc6 高表达<sup>[13-14]</sup>。

既然 Cdc6 的过表达可能导致细胞 DNA 的异常复制,引起细胞恶性增殖,那么抑制或下调 Cdc6 的表达水平,是否可以抑制肿瘤细胞的增殖?Feng 等<sup>[15]</sup>采用反义核苷酸和 RNA 干扰技术特

异的干扰人的复制起始蛋白 Cdc6、Mcm2 与 Cdc45 的 mRNA,发现目的基因被有效而又特异的沉默,从而使 DNA 复制与细胞增殖受到抑制,沉默掉这些基因后,在 P53 阳性和阴性癌细胞中能发生凋亡,而在正常细胞中却不会发生。癌细胞进入不可完成的 S 期而凋亡,但正常细胞却主要停留在 G1 期而避免凋亡。本研究应用 Cdc6 慢病毒载体,靶向抑制舌癌细胞 CAL-27 中 Cdc6 的表达,从而特异的沉默了舌癌细胞 CAL-27 中 Cdc6 的 mRNA 转录与其蛋白的表达,与 NC 组相比,KD1、KD2 组对 Cdc6 基因敲减效率分别为 55.60% 和 64.38%,蛋白表达分别降低了 44.44% 和 66.67%。Lau 等<sup>[16]</sup>采用 RNA 干扰技术在宫颈癌 HeLa 细胞中研究沉默 Cdc6 对细胞周期改变的影响,发现在 G1 期沉默 Cdc6,将中断细胞由 G1 期向 S 期的转换,细胞堆积在 SubG1 期,而 S 期细胞减少,细胞凋亡增加;在 S 期(即 S-G2/M 期)沉默 Cdc6,只是延迟 DNA 复制,并没有明显影响细胞由 S 期进入 M 期,但最后细胞却因为纺锤体的形成和染色体的分离受到影响,最终导致细胞死亡。本研究结果也显示,在靶向抑制舌癌细胞 CAL-27 中 Cdc6 的表达后各实验组细胞周期发生改变,并于短期内出现了细胞凋亡,Day5thCAL-27 细胞 KD1 组、KD2 组两组细胞凋亡率较 NC 组均有显著上升,分别为 57.55% 和 83.81%。从细胞生长曲线也可看出:实验组细胞生长水平较对照组明显受到抑制,KD1 和 KD2 组细胞生长抑制率分别为 33.68% 和 35.79%。另外,Feng 等<sup>[17]</sup>的研究也表明,人类神经母细胞瘤细胞株 LA-N-2 细胞和 CHLA255 细胞中存在高表达 Cdc6,采用 RNA 干扰技术敲减 Cdc6 细胞后发现 S 期细胞减少,凋亡增加,并发现 Cyclin E、Cyclin A 和 Cdc25C 表达减少,而 CDK 酶抑制物 P27 kip1 增加。以上研究说明,抑制 Cdc6 的表达,可以抑制 DNA 复制,从而抑制肿瘤细胞的增殖。

综上所述,本实验的研究结果证明了靶向 Cdc6 RNA 干扰慢病毒载体能有效抑制舌癌细胞 CAL-27 中 Cdc6 水平的表达,从而抑制肿瘤细胞的增殖,促进了舌癌细胞的凋亡,显现了高效的抑瘤效应。由此可见,DNA 复制起始蛋白 Cdc6 有望

成为治疗舌癌的新靶点,而其相关机制的进一步深入研究将为舌癌的基因治疗带来新的希望,并形成以肿瘤细胞“DNA 复制沉默”为主的肿瘤内环境,建立新的肿瘤治疗模式。

#### 参考文献:

- [1] Borlado LR, Méndez J. CDC6: from DNA replication to cell cycle checkpoints and oncogenesis [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(2): 237-243.
- [2] Feng CJ, Li HJ, Li JN, et al. Expression of Mcm7 and Cdc6 in oral squamous cell carcinoma and precancerous lesions [J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(6A): 3763-3769.
- [3] Li JN, Feng CJ, Lu YJ, et al. mRNA expression of the DNA replication-initiation proteins in epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of the tongue [J]. *BMC Cancer*, 2008, 30(8): 395-400.
- [4] 冯崇锦,路晓薇,廖贵清,等.靶向细胞分裂周期蛋白6 RNAi 慢病毒载体的构建[J]. *中华口腔医学研究杂志*, 2010, 4(5): 24-28.
- [5] Yoshida K, Sugimoto N, Iwahori S, et al. CDC6 interaction with ATR regulates activation of a replication checkpoint in higher eukaryotic cells [J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(9): 225-235.
- [6] Takeda DY, Shibata Y, Parvin JD, et al. Recruitment of ORC or CDC6 to DNA is sufficient to create an artificial origin of replication in mammalian cells [J]. *Genes Dev*, 2005, 19(23): 2827-2836.
- [7] Cook JG, Chasse DA, Nevins JR. The regulated association of Cdt1 with minichromosome maintenance proteins and Cdc6 in mammalian cells [J]. *Biol Chem*, 2004, 279(9): 9625-9633.
- [8] Ofir Y, Sagee S, Guttman-Raviv N, et al. The role and regulation of the preRC component Cdc6 in the initiation of premeiotic DNA replication [J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(5): 2230-2242.
- [9] Kundu LR, Kumata Y, Kakusho N, et al. Deregulated Cdc6 inhibits DNA replication and suppresses Cdc7-mediated phosphorylation of Mcm2-7 complex [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(16): 5409-5418.
- [10] Yim H, Erikson RL. Regulation of the final stage of mitosis by components of the pre-replicative complex and a polo kinase [J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(9): 1374-1377.
- [11] Karakaidos P, Taraviras S, Vassiliou LV, et al. Overexpression of the replication licensing regulators hCdt1 and hCdc6 characterizes a subset of non-small-cell lung carcinomas: synergistic effect with mutant p53 on tumor growth and chromosomal instability: evidence of E2F-1 transcriptional control over hCdt1 [J]. *Am J Pathol*, 2004, 165(4): 1351-1365.
- [12] Ohta S, Koide M, Tokuyama T, et al. Cdc6 expression as a marker of proliferative activity in brain tumors [J]. *Oncol Rep*, 2001, 8(7): 1063-1066.
- [13] Bonds L, Baker P, Gup C, et al. Immunohistochemical localization of cdc6 in squamous and glandular neoplasia of the uterine cervix [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2002, 126(10): 1164-1168.
- [14] Pinyol M, Salaverria I, Bea S, et al. Unbalanced expression of licensing DNA replication factors occurs in a subset of mantle cell lymphomas with genomic instability [J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(12): 2768-2774.
- [15] Feng D, Tu Z, Wu W, et al. Inhibiting the expression of DAN replication-initiation proteins induces apoptosis in human cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(9): 7356-7364.
- [16] Lau E, Zhu C, Abraham RT. The functional role of Cdc6 in S-G2/M in mammalian cells [J]. *EMBO Rep*, 2006, 4(7): 425-430.
- [17] Feng L, Barnhart JR, Seeger RC, et al. Cdc6 knockdown inhibits human neuroblastoma cell proliferation [J]. *Mol Cell Biochem*, 2008, 11(1-2): 189-197.

(编辑 王晓鹰)