

RNA 干扰抑制 Skp2 表达对人喉癌细胞系 Hep-2 的影响

刘江涛, 谭立君, 李慧军, 袁慧钧, 吴 强
(哈尔滨医科大学附属第一医院, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘 要: [目的] 研究 RNA 干扰抑制 Skp2 表达对喉癌鳞状细胞 p27 表达、细胞增殖和凋亡的作用。[方法] 利用脂质体将重组质粒转染 Hep-2 细胞, 用慢病毒系统建立干扰 Skp2 基因的稳定细胞株; 荧光实时定量 PCR 和 Western blot 法检测转染细胞株中 Skp2 和 p27 mRNA 及其蛋白表达; 采用 MTT 法和流式细胞仪检测转染细胞的增殖和凋亡情况。[结果] 通过慢病毒 siRNA 技术, Skp2 可持续稳定抑制 Hep2 喉癌细胞, siRNA 可诱导抑制 Skp2, 增加 p27 表达, 降低细胞增殖, 增加喉癌细胞的凋亡。[结论] 靶向 Skp2 基因的 siRNA 对 Hep-2 细胞的抑制作用可能是通过上调 p27 基因水平来实现的, Skp2 是基因疗法治疗喉癌的有利靶点。
关键词: 喉鳞状细胞癌; 细胞 S 期激酶相关蛋白 2; RNA 干扰; 慢病毒
中图分类号: R739.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2016)01-0063-07
doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2016.01.A012

Effect of RNA Interference Inhibiting Skp2 Expression on Human Laryngeal Carcinoma Cell Line Hep-2

LIU Jiang-tao, TAN Li-jun, LI Hui-jun, et al.

(The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of RNA interference Skp2 suppression on p27 expression, cellular proliferation, apoptosis in human laryngeal carcinoma cell line Hep-2. [Methods] Recombinant plasmids were transfected into Hep-2 cell with liposome. To construct the stable cell line interfered Skp2 gene with lentivirus system. Fluorescent realtime quantitated PCR and Western blot were used to detect expression of mRNA and protein Skp2 and p27 in transfected cell lines. MTT and flow cytometer were used to detect the proliferation and apoptosis in transfected cell lines. [Results] Skp2 was stably suppressed in Hep2 laryngeal carcinoma cells by lentivirus siRNA technology. The siRNA-induced suppression of Skp2 increased p27 expression, decreased cellular proliferation and increased apoptosis in human laryngeal carcinoma cells. [Conclusion] The inhibition effect of siRNA targeting Skp2 on Hep-2 cell are probably derived from the increased expression of p27 gene, Skp2 is a viable target in the gene therapy treatment for human laryngeal carcinoma.

Key words: laryngeal squamous cell carcinoma; S-phase kinase associated protein 2; RNA interference; lentivirus

细胞 S 期激酶相关蛋白 2(S-phase kinase-associated protein 2, Skp2) 基因是最近发现的癌基因, 与肿瘤的增殖、分化有关^[1-3]。有研究显示 Skp2 表达增加参与喉黏膜上皮细胞的恶性转化过程, 是喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)发

生的早期分子事件^[4,5]。同时, Skp2 表达的上调可能通过泛素—蛋白酶体途径导致 p27 表达减少, 使其不能有效发挥细胞周期负调控因子的抑癌作用, 促使癌细胞获得更高的侵袭转移能力^[6]。因此, 我们推测 Skp2 可能是喉部恶性肿瘤基因治疗的靶点。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是新近发展起来的一种封闭基因表达的有效方法, 它比反义寡核研究证实化学合成 siRNA(small interfering RNA)能高效地

收稿日期: 2015-07-10; 修回日期: 2015-09-08
基金项目: 黑龙江省教育厅基金项目(11521193)
通讯作者: 刘江涛, E-mail: ljt89103@aliyun.com

介导 RNAi 作用,但作用持时间短,而采用 siRNA 表达载体尤其是慢病毒载体的方法能有效延长作用时间^[10-12]。在以 *Skp2* 为靶向基因,应用 siRNA 技术研究将载体转染黑色素细胞系、人口腔鳞癌细胞株、肺癌细胞株、T98G 恶性胶质瘤细胞株成功地减少了 *Skp2* 蛋白表达,同时增加了 p27 表达;肿瘤细胞的生长和侵袭性都受到了抑制,而凋亡增加^[5,6,13,14]。本课题的主要目的是通过体外实验观察应用 RNA 干扰技术抑制癌基因 *Skp2* 对人喉癌细胞系 Hep-2 细胞的增殖、细胞凋亡以及对抑癌基因 p27 表达的影响,为今后应用该技术研究和治疗喉癌提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 细 胞

人喉癌 Hep-2 细胞购自中科院细胞库。在 5% CO₂ 37℃条件下,于 10%FBS(GIBCO)+青霉素/链霉素(Invitrogen,USA)的 DMEM(GIBCO,USA)培养基中常规培养。

1.2 人 *Skp2* 基因的 RNAi 载体构建和转染

根据 siRNA 设计原则和 GeneBank 中报道的 *Skp2* 的核苷酸序列(No.NM005983),利用 Invitrogen 公司在线设计软件 siRNA WizardTM 设计 siRNA1、siRNA2、siRNA3、siRNA4 四条针对 *Skp2* 基因 cds 区的 siRNA 序列(Table 1),同时设计一条序列 Negative 用于对照组实验,通过 BLAST 验证该序列对于任何基因无干扰效果。并将其定向克隆入真核表达载体 pSIH1-H1-copGFP shRNA Vector(System Biosciences,USA),获得 5 个重组质粒:pSIH1-negative、pSIH1-siRNA1、pSIH1-siRNA2、pSIH1-siRNA3、pSIH1-

siRNA4。利用脂质体 2000(10μl)将重组质粒(4μg)转染 Hep-2 细胞。

1.3 实时定量 PCR 检测 *Skp2* mRNA 表达

按照产品说明书,用 Trizol 试剂提取转染前后细胞总 RNA,再用 3g 总 RNA 合成 cDNA(Promega, USA)。实时 PCR 反应体系包括 1μl 几个梯度稀释的 DNA 模板制作标准曲线以及 1μlcDNA 样品、10μM 的 PCR 特异引物 F (5' GGATGTGACTGGTCGGTTGC 3') 和 R (5' GACAGTATGCCGTGGAGGGT 3') (Molecular Probes,USA)。GAPDH 和 *Skp2* 的 PCR 反应条件是 95℃,5min;30 或 35 个 PCR 循环 [95℃,10s;58℃,15s;72℃,20s;85℃或 84℃(收集荧光),5s]。为了建立 PCR 产物的熔解曲线,扩增反应结束后继续从 72℃ 缓慢加热到 99℃ (每 5s 升高 1℃)。读取 CT 值,进行记录分析。根据绘制的梯度稀释 DNA 标准曲线,各样品目的基因和内对照基因的浓度结果直接由机器生成。每个样品的目的基因浓度除以其内对照基因的浓度,即为此样品此基因的校正后的相对含量。

1.4 构建稳定表达 *Skp2* 基因的 Hep-2 细胞株

选取抑制 *Skp2* mRNA 效率最高的质粒 pSIH-siRNA3 和作为阴性对照的质粒 pSIH-negative 进行假病毒颗粒的包装,实验过程参照 SBI 慢病毒包装系统 pPACKH1-Lentivector Packaging Kit 的操作手册进行,由上海康成生物工程有限公司协助完成。

1.5 慢病毒感染 Hep-2 细胞建立干扰 *Skp2* 基因的稳定细胞株

Hep-2 细胞接种于 24 孔板的五孔中,每孔接种 1×10⁵ 个;并分别加入 0、0.25、0.5、0.75、1ml 病毒液感染。最后每孔中均加入 Polybrene 多聚体复合物,终浓度为 16μg/ml,37℃、5%CO₂ 培养箱内培养 12h

Table 1 *Skp2* siRNA sequences

Name	Sequence
Negative	5' -GATCC TTCTCCGAACGTGTCACGT CTTCTGTCAGA ACGTGACACGTTCCGAGAA TTTT G -3' 3' - G AAGAGGCTTGCACAGTGCA GAAGGACAGTCT TGCAGTGTGCAAGCCTCTT AAAAA CTAA -5'
siRNA1	5' -GATCC TCTTAGCGGCTACAGAAAG CTTCTGTCAGA CTTTCTGTAGCCGCTAAGA TTTT G -3' 3' - G AGAATCGCCGATGCTTTT GAAGGACAGTCT GAAAGACATCGGCGATTCT AAAAA CTAA -5'
siRNA2	5' -GATCC GACTTTGTGATTGTCGCA CTTCTGTCAGA TGCGGACAATCACAAAGTC TTTT G -3' 3' - G CTGAAACACTAACAGGCGT GAAGGACAGTCT ACGCCTGTTAGTGTTCAG AAAAA CTAA -5'
siRNA3	5' -GATCC GGTCTCTGGTGTTFGTAAG CTTCTGTCAGA CTTACAAACACCAGAGACC TTTT G -3' 3' - G CCAGAGACCACAAACATTC GAAGGACAGTCT GAATGTTTGTGGTCTCTGG AAAAA CTAA -5'
siRNA4	5' -GATCC GTTGCAGAATCTAAGCCTG CTTCTGTCAGA CAGGCTTAGATTCTGCAAC TTTT G -3' 3' - G CAACGTCTTAGATTCCGAC GAAGGACAGTCT GTCCGAATCTAAGACGTTG AAAAA CTAA -5'

后更换新的培养基。病毒感染 24h 后,目的细胞出现荧光,其中加入 1ml 病毒液的实验组细胞感染效率达到 90%以上,扩大培养,用于后续实验。

1.6 Western blot 法检测 Skp2 和 p27 蛋白表达

按上海康成生物工程有限公司的 Cell & Tissue total protein extraction kit,制作 Hep2, Hep2-siRNA, Hep2-neg 三组细胞的裂解液 (5×10⁶ 细胞加入 100μl 裂解液)。4℃裂解 4h, 4℃ 1000rpm/min 离心 20min。用 50μg 的蛋白裂解液在 10% SDS-聚丙烯酰胺电泳上分离后转移到 PVDF 膜上。PVDF 膜在 5% BSA 溶液中室温孵育 1h 以封闭膜上的非特异结合。加入 1:500 稀释的兔抗人 Skp2 (Invitrogen)、兔抗人 p27 (Lavision, USA)、鼠抗人 GAPDH (KangChen Bio-tech) 和 1:1000 稀释的鼠抗人抗体 (KangChen Bio-tech), 4℃孵育过夜。TBS/T 洗膜, 加入 1:5000 稀释的辣根过氧化物酶标记二抗 (KangChen Bio-tech), 37℃孵育 1h。最后用 KCTM 化学发光试剂盒检测结果 (KangChen Bio-tech)。

1.7 噻唑蓝 (MTT) 检测细胞增殖

取 Hep2, Hep2-neg 和 Hep2-siRNA 对数生长期细胞 (1×10⁵ 个细胞/ml) 接种于 96 孔培养板 (50μl/孔), 在 37℃、5%CO₂ 及饱和湿度条件下按规定时间培养。然后将培养液换成无血清 D-MEM 200μl/孔, 加 20μl/孔 MTT 培养 4h, 吸弃细胞上清, 每孔加 150μl DMSO, 充分溶解结晶物。选择 492nm 波长, 在酶标仪上测定各孔光吸收值, 绘制细胞生长曲线。

1.8 流式细胞仪检测细胞凋亡率

收集 Hep2, Hep2-neg 和 Hep2-siRNA 对数生长期细胞, 用胰酶细胞消化液消化细胞。取 1×10⁶ 个制备的重悬细胞, 加入 195μl Annexin V-FITC 结合液重悬细胞。加入 5μl Annexin V-FITC, 轻轻混匀。室温避光孵育 10min。离心后弃上清, 加入 190μl Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。加入 10μl 碘化丙啶 (PI) 染色液, 轻轻混匀, 冰浴避光放置。流式细胞仪检测, CellQuest 软件系统收获细

胞, ModFit LT for Mac V3.0 软件系统分析凋亡率。

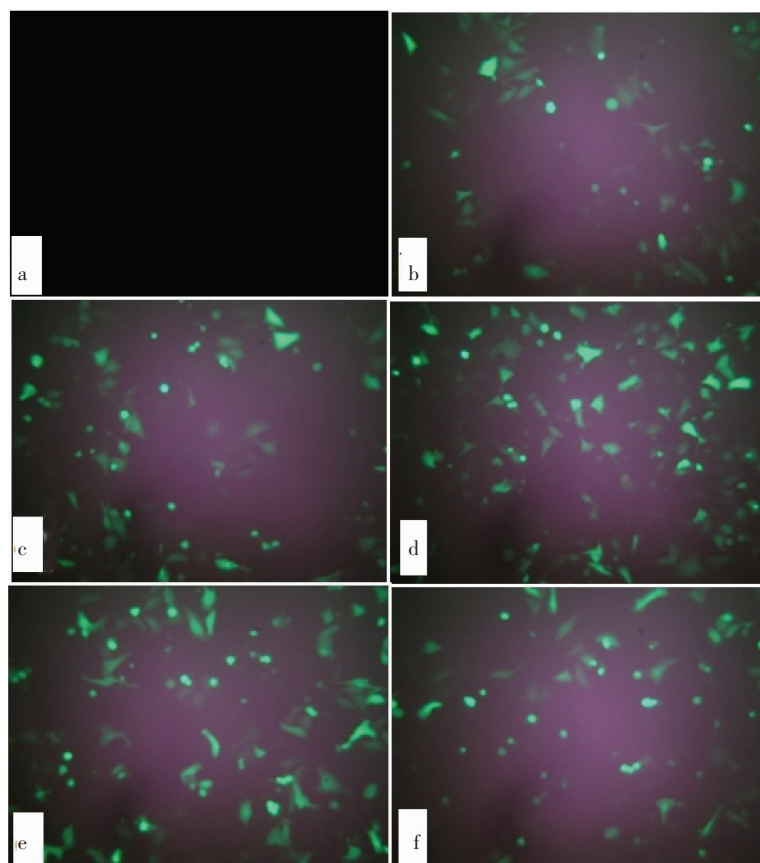
1.9 统计学处理

数据分析采用 SPSS 11.5 统计软件处理。多组间比较采用方差分析, 用 Student-Newman-Keuls 法检验进行组间两两比较。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒转染 Hep-2 细胞后抑制 Skp2 基因的表达

转染质粒 48h 后 Hep-2 细胞呈绿色荧光胞, 各组荧光强度和亮度无明显差异, A, B 组空白实验组无荧光。细胞转染效率在 50%左右 (Figure 1)(×250)。转染细胞 PCR 检测结果显示, siRNA3 抑制



a: Negative control transfected group A[mock-transfected cells(medium only) group B mock-transfected cells(medium+Lipofectamine 2000 reagent control).
b: siRNA-negative-transfected cells(designed for poor homology to any gene).
c: Cells transfected with group D Skp2-specific siRNA.
d: Cells transfected with group E Skp2-specific siRNA.
e: Cells transfected with group F Skp2-specific siRNA.
f: Cells transfected with group G Skp2-specific siRNA.

Figure 1 Representative micrographs of control and transfected cells

SKp2 基因程度明显大于其他 siRNAs,故选择该质粒应用于后续实验。

2.2 用慢病毒系统建立干扰 Skp2 基因的 稳定细胞株

含有 pSIH-siRNA3 和 pSIH-negative 质粒的慢病毒原液 1ml 感染的 Hep-2 细胞,转染效率为 90%以上,达到稳定转染的目的(图 2a,b)。

应用实时定量 PCR 检测 Hep2, Hep2-siRNA, Hep2-neg 三组细胞中的 Skp2 mRNA 和 p27 mRNA 表达量的变化,结果显示 Hep2-siRNA 细胞中 Skp2 mRNA 表达量较 Hep2 组细胞中的表达量相比下调了 74%, 而 p27 mRNA 表达量上调了 38%,Hep2 组和 Hep2-neg 组 SKp2 mRNA 及 p27 mRNA 表达无明显差异(Table 2)。

应用 Western blot 法检测 Hep2, Hep2-siRNA, Hep2-neg 三组细胞中的 Skp2 和 p27 蛋白表达量的变化,结果后显示 Hep2-siRNA 细胞中 Skp2 蛋白表达量较 Hep2 组细胞中的表达量相比下调了约 76%, p27 蛋白表达量则上调了约 89%,Hep2 组和 Hep2-neg 组 Skp2 和 p27 蛋白表达无统计学差异(Figure 3, Table 3)。

2.3 抑制 Skp2 降低细胞增殖

Hep2、Hep2 - siRNA 和 Hep2-neg 三种细胞在相应的研究时间点分析细胞增殖 (Table 4, Figure 4)。携带阳性 siRNA 质粒的慢病毒载体转染 Hep-2 细胞 (Hep2-siRNA 组)后,与未转染组(Hep2 组)及转染阴性质粒组 (Hep2-neg

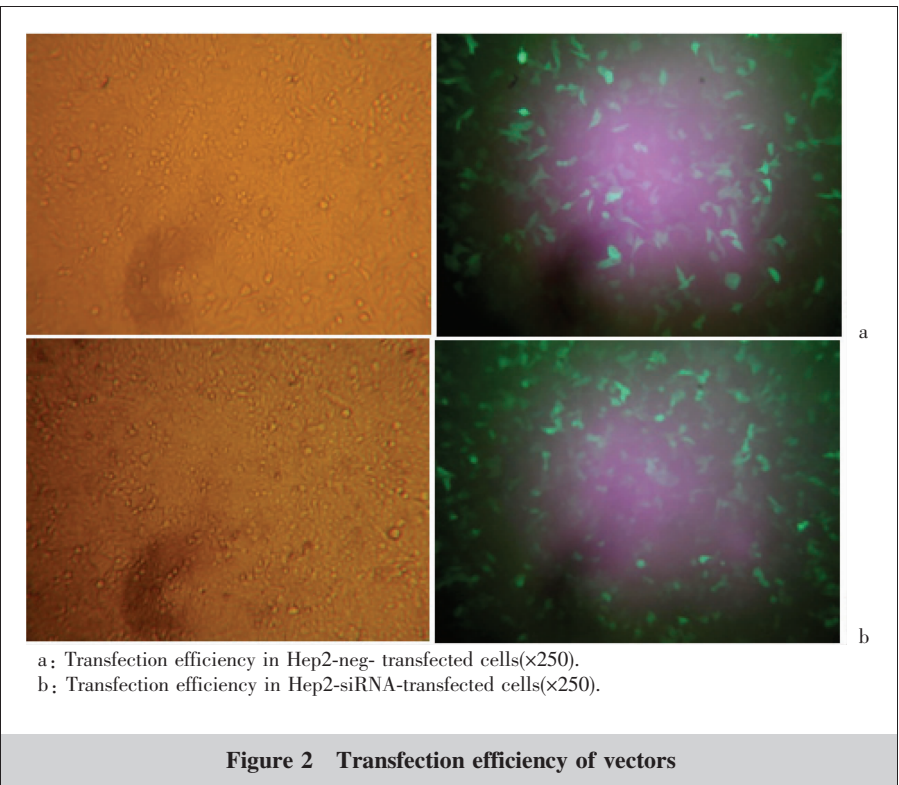


Table 2 Effect of Skp2-siRNA on Skp2 mRNA and p27mRNA expression			
Index	Hep2	Hep2-neg	Hep2-siRNA
Skp2/GAPDH mRNA	1	0.98	0.26
P27/GAPDH mRNA	1	1.02	1.38

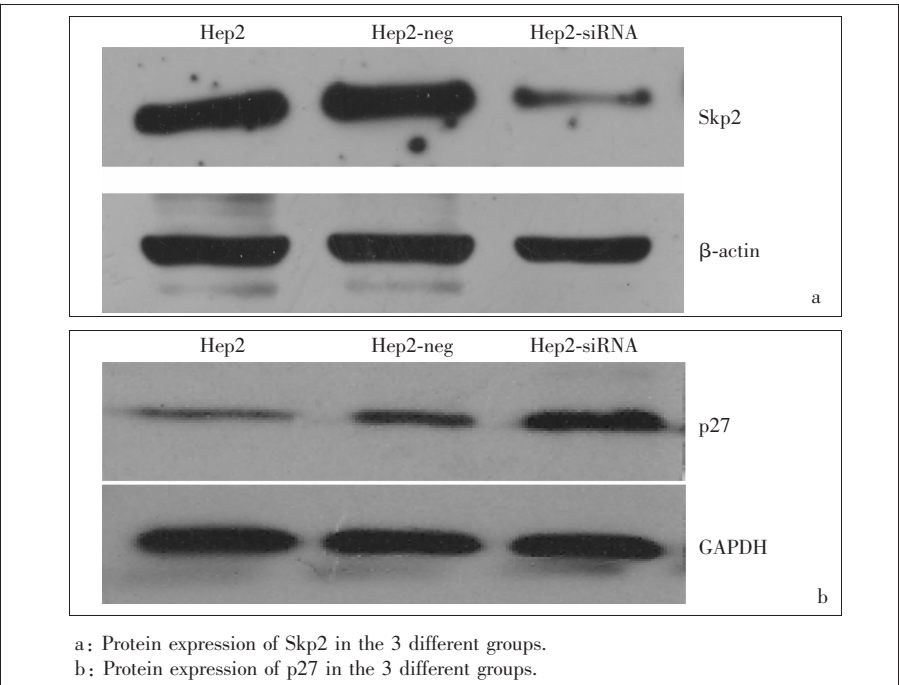


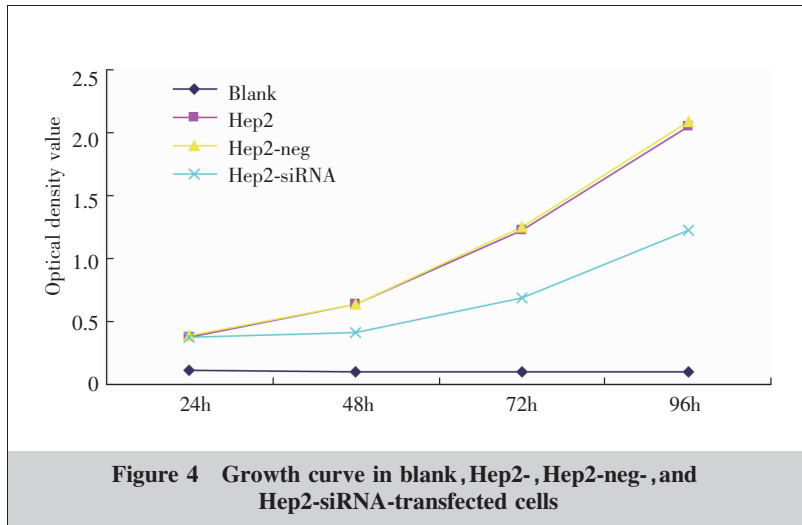
Table 3 Comparison on protein expression of Skp2 and p27 in 3 different groups

Index	Hep2	Hep2-neg	Hep2-siRNA
Skp2/GAPDH protein	1	1.05	0.24
P27/GAPDH protein	1	1.17	1.89

Table 4 Optical density(proliferation) in blank, Hep2-, Hep2-neg-, and Hep2-siRNA-transfected cells

Time(h)	Optical density				
	Blank	Hep2	Hep2-neg ^a	Hep2-siRNA ^a	P value
0	0	0	0	0	-
24	0.109	0.378 ± 0.004	0.383 ± 0.004	0.376 ± 0.004	0.177
48	0.106	0.634 ± 0.004	0.636 ± 0.004	0.416 ± 0.003	< 0.001 ^b
72	0.097	1.226 ± 0.021	1.243 ± 0.005	0.691 ± 0.026	< 0.001 ^b
96	0.099	2.044 ± 0.010	2.089 ± 0.012	1.220 ± 0.012	< 0.001 ^b
120	0.092	2.326 ± 0.058	2.241 ± 0.002	2.157 ± 0.015	0.003 ^b

^a P=0.004 indicates that optical density was lower in the Hep2 group when compared with the Hep2-siRNA group, and P=0.005 indicates that optical density was higher in the Hep2-neg group when compared with the Hep2-siRNA group. ^b P<0.05 indicates that optical density was significantly different for each specific time point in the Hep2, Hep2-neg, and Hep2-siRNA groups.



组)比较,细胞增殖明显减慢($P<0.01$),而阴性质粒转染组细胞与未转染组相比,细胞增殖无明显变化($P>0.05$)。

2.4 细胞凋亡检测结果

应用流式细胞仪检测显示:Hep2组、Hep2-neg组和Hep2-siRNA组的凋亡率分别为 $(2.86\pm0.21)\%$ 、 $(3.58\pm0.16)\%$ 和 $(16.64\pm0.17)\%$,经方差分析三组间凋亡率差异有统计学意义($P<0.01$),干扰组与其他两组比较细胞凋亡率明显增加($P<0.01$),非特异干扰组和空白组之间细胞凋亡率差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

喉癌是危害人体健康和生命的恶性肿瘤。深入探讨喉癌的发生机制,寻找利用基因干预的手段进行治疗是目前喉癌研究的热点。

Skp2是新近发现的一种癌基因,在多种肿瘤中表达增高。该基因定位于人5号染色体短臂上(5p13),分子量约45kD。Skp2由F-box序列、“Linker”序列、蛋白-蛋白相互作用模块如亮氨酸重复序列结构域(leucine-rich repeat, LRR)依次连接构成,是DNA复制所必需的F-box蛋白家族成员,与Skp1、Cullin及Roc1/Rbx1形成多功能E3泛素连接酶(简称SCF Skp2复合体),参与泛素-蛋白酶体降解途径^[1,15,16]。Skp2是SCF Skp2复合体的底物识别亚基,能利用其底物特异性接头将各种底物蛋白招募到核心泛素化复合体上,使底物发生相应的泛素化降解^[1]。目前研究表明Skp2能够对多种细胞周期调控蛋白进行降解,从而调控细胞周期及细胞增殖和细胞凋亡,与肿瘤发生发展密切相关。Nakayama等^[17]培养了Skp2-/-鼠的细胞发现Skp2-/-细胞中表现出多倍体和中心体过度累积,并且出现细胞增殖速度的降低和凋亡增加。许多研究发现Skp2表达水平在多种转化细胞

中明显升高。许多细胞周期调节因子及转录因子泛素化降解必须Skp2参与,如cyclinA、cyclinB、cyclinE、cyclinD1、CDC25B、p21、p27、p53、p57、E2F和hOrclP等^[3,17,18]。因该基因能降解一种主要的CKI-p27,使其在肿瘤中的作用被日益关注。临床研究显示在结肠癌、胃癌、肺癌、卵巢癌和乳腺癌等多种恶性肿瘤中Skp2高表达^[19-23],且与抑癌基因p27表达呈负相关。

在对喉癌的近期研究结果显示,应用免疫组化技术检测发现在喉癌标本中,癌旁正常喉黏膜→癌前不典型增生→喉鳞状细胞癌(LSCC)的癌变进展

过程中,Skp2 阳性率逐渐上升,且后两者的阳性率显著性高于前者,提示 Skp2 表达增加参与喉黏膜上皮细胞的恶性转化过程,Skp2 表达上调可能是 LSCC 发生的早期分子事件。同时,Skp2 表达与临床分期及淋巴结转移呈正相关,表明该基因表达上调可能与 LSCC 的侵袭转移能力密切相关^[4]。另一项研究中发现,正常喉黏膜 p27 表达强度高于 LSCC 组织,无颈淋巴结转移组 p27 水平高于有颈淋巴结转移组,且 Skp2 与 p27 蛋白表达强度呈负相关,提示在 LSCC 的进展过程中,Skp2 蛋白表达的上调可能通过泛素—蛋白酶体途径导致 p27 蛋白表达减少,使其不能有效发挥细胞周期负调控因子的抑癌作用,使得癌细胞具有更高的侵袭转移能力。由于在临床标本中 Skp2 与喉癌的发生发展以及预后密切相关,所以我们推测 Skp2 可能是喉部恶性肿瘤基因治疗的靶点。

RNA 干扰技术是通过双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 来阻断目的基因的表达。化学合成的 siRNA 在细胞内起作用的时间较短,不能长时间抑制靶向基因的表达。以质粒为载体导入到细胞内,经转录后形成的 shRNA 能有效地对抗细胞内核酸酶的降解,可以发挥较为持续的抑制作用^[12]。如果以病毒为载体则能进一步提高转染效率^[11],同时便于进行实验动物的体内研究。慢病毒 (lentivirus) 载体是由人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 改建而来^[10],该病毒系统由两部分组成,即包装成分和载体成分。其包装成分由 HIV-1 基因组去除了包装、逆转录和整合所需的顺式作用序列而构建。由于慢病毒的感染效率高、激发免疫反应的作用弱,因此成为携带干扰 RNA 理想载体。在本研究中,为了最大限度降低其通过重组产生有复制能力野生病毒的可能性,我们的重组病毒生产采用了美国 SBI 公司的三质粒慢病毒包装系统,具有较高的可靠性。

本实验根据 siRNA 设计原则和细胞 S 期激酶相关蛋白 2 (Skp2) 的核苷酸序列,设计出针对其 mRNA 靶位点的 siRNA 寡核苷酸序列,利用基因重组技术在体外构建了四个靶向 Skp2 的 pSIH1-siRNA 载体,通过质粒介导转染 Hep-2 细胞后经荧光实时定量 PCR 检测细胞内 skp2 mRNA 的含量,表明转染针对 Skp2 的 pSIH1-siRNA 质粒细胞中 Skp2

mRNA 含量均有不同程度的减少,其中转染 pSIH1-siRNA3 质粒的细胞表达量可下调约 48%,但质粒转染的效率不高,仅为 50% 左右。为提高转染效率,获得能够稳定传代并携带高效靶向 Skp2 的 siRNA 的 Hep-2 细胞株,我们又利用慢病毒包装系统将筛选出的高效干扰质粒和阴性质粒进行包装后重新进行转染,发现其效率可达到 90% 以上,且细胞能够稳定传代培养,说明以慢病毒为载体的包装系统与普通质粒载体相比,其转染效率明显提高。本研究还发现,慢病毒感染 Hep-2 后细胞的生长和增殖能力并无明显变化,这表明应用慢病毒进行生物治疗是可行的。

本实验结果表明通过慢病毒介导转染 pSIH1-siRNA3 细胞的 Skp2 mRNA 和蛋白的表达量较转染 pSIH-negative 细胞和未转染细胞明显减少,而转染 pSIH-negative 细胞和未转染细胞中 Skp2 mRNA 和蛋白比较无明显变化,说明表达载体 pSIH1-siRNA3 具有特异性封闭 Skp2 mRNA 和蛋白的作用;同时,转染 pSIH1-siRNA3 细胞的 p27 mRNA 和蛋白的表达量较转染 pSIH-negative 细胞和未转染细胞显著性增加,而转染 pSIH-negative 细胞和未转染细胞中 p27 mRNA 和蛋白比较无明显变化,说明表达载体 pSIH1-siRNA3 抑制 Skp2 mRNA 和蛋白的作用可能是通过上调 p27 基因的表达来实现的。该载体转染 Hep-2 后,细胞体外生长受到显著性抑制,并且出现明显凋亡的改变,进一步证实了 siRNA 对靶基因的抑制效果。

实验结果提示,Skp2 siRNA 慢病毒表达载体特异性抑制 Hep-2 细胞 Skp2 的表达和在体外抑制细胞生长增殖并诱导凋亡是平行的,应用 RNA 干扰技术可以抑制 Skp2 基因的表达从而抑制喉鳞癌细胞 Hep-2 的生长,为喉癌的基因治疗提供了一条新的策略。但其作用的具体机制以及与其他癌基因、抑癌基因和凋亡相关基因的关系尚不清楚,靶向 Skp2 基因的 siRNA 载体能否在体内抑制 Skp2 的表达,从而抑制喉癌的生长还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Ganoth D, Bornstein G, Ko TK, et al. The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF(Skp2)-mediated ubiquitinylation of p27[J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(3): 321-324.

- [2] Zhang H, Kobayashi R, Galaktionov K, et al. p19Skp1 and p45Skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase[J]. *Cell*, 1995, 82(6):915-925.
- [3] Bochiš OV, Irimie A, Pichler M, et al. The role of Skp2 and its substrate CDKN1B(p27) in colorectal cancer[J]. *J Gastrointest Liver Dis*, 2015, 24(2):225-234.
- [4] Dong Y, Sui L, Watanabe Y, et al. S-phase kinase-associated protein 2 expression in laryngeal squamous cell carcinomas and its prognostic implications [J]. *Oncol Rep*, 2003, 10(2):321-325.
- [5] Kudo Y, Kitajima S, Ogawa, et al. Small interfering RNA targeting of S phase kinase-interacting protein 2 inhibits cell growth of oral cancer cells by inhibiting p27 degradation [J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(3):471-476.
- [6] Hershko DD. Oncogenic properties and prognostic implications of the ubiquitin ligase Skp2 in cancer [J]. *Cancer*, 2008, 112(7): 1415-1424.
- [7] Hannon GJ. RNA interference[J]. *Nature*, 2002, 418(6894): 244-251.
- [8] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 1998, 391(6669):806-811.
- [9] McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs [J]. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(10): 737-747.
- [10] Nishitsuji H, Ikeda T, Miyoshi H, et al. Expression of small hairpin RNA by lentivirus-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary non-dividing cells[J]. *Microbes Infect*, 2004, 6(1): 76-85.
- [11] Liu CM, Liu DP, Dong WJ, et al. Retrovirus vector-mediated stable gene silencing in human cell [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313(3): 716-720.
- [12] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. *Science*, 2002, 296(5567):550-553.
- [13] Sumimoto H, Hirata K, Yamagata S, et al. Effective inhibition of cell growth and invasion of melanoma by combined suppression of BRAV (V599E) and Skp2 with lentiviral RNAi [J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(2):472-476.
- [14] Lee SH, McCormick F. Downregulation of Skp2 and p27/Kip 1 synergistically induces apoptosis in T98G glioblastoma cells[J]. *J Mol Med(Berl)*, 2005, 83(4):296-307.
- [15] Wirbelauer C, Sutterlüty H, Blondel M, et al. The F-box protein Skp2 is a ubiquitylation target of a Cul1-based core ubiquitin ligase complex: evidence for a role of Cul1 in the suppression of Skp2 expression in quiescent fibroblasts [J]. *EMBO J*, 2000, 19(20):5362-5375.
- [16] Mornato M, Nishida T, Honda R, et al. Modification of cullin-1 by ubiquitin-like protein Nedd8 enhances the activity of SCF(skp2) toward p27(kip1) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 270(3):1093-1096.
- [17] Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, et al. Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27 (Kip1), polyploidy and centrosome overduplication [J]. *EMBO J*, 2000, 19(9):2069-2081.
- [18] Kamura T, Hara T, Kotoshiba S, et al. Degradation of p57Kip2 mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitylation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(18):10231-10236.
- [19] Ma XM, Liu JH, Guo JW, et al. Correlation of SKp2 expression in gastric carcinoma to expression of p27 and PTEN [J]. *Ai Zheng*, 2006, 25(1):56-61. [马秀梅, 刘江惠, 郭建文, 等. 胃癌组织 Skp2 表达的意义及其与 P27、PTEN 表达的关系[J]. *癌症*, 2006, 25(1):56-61.]
- [20] Takanami I. The prognostic value of overexpression of SKp2 mRNA in non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Rep*, 2005, 13(4):727-731.
- [21] Shapira M, Ben-izhak O, Linn S, et al. The prognostic impact of the ubiquitin ligase subunits Skp2 and Cks1 in colorectal carcinoma[J]. *Cancer*, 2005, 103(7):1336-1346.
- [22] Sui L, Dong Y, Watanabe Y, et al. Clinical significance of Skp2 expression, alone and combined with Jab 1 and p27 in epithelial ovarian tumors [J]. *Oncol Rep*, 2006, 15(4):765-771.
- [23] Traub F, Mengel M, Lück HJ, et al. Prognostic impact of Skp2 and p27 in human breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2006, 99(2):185-191.