

RSK4 对结直肠癌细胞增殖的影响

邓野,蔡君,王炫,王梦,张森,杨永华,喻世华,付国权,杨继元
(长江大学附属第一人民医院,湖北荆州 434000)

摘要: [目的] 探讨 RSK4(p90 ribosomal protein S6 kinase4)在结直肠癌细胞的表达情况及其生物学作用。[方法] 挑选结直肠癌细胞株 SW480 和 HCT116,用 Lipofectamin 2000 技术将 RSK4 基因转染至细胞核内,建立结直肠癌 RSK4 基因高表达细胞系,用 RT-PCR 及 WB 证实了 RSK4 在结直肠癌细胞 SW480 和 HCT116 转染成功,采用 MTT、流式细胞仪技术检测转染 RSK4 后对结直肠癌细胞增殖的影响。[结果] RSK4 在结直肠癌细胞呈低表达,转染成功后对结直肠癌细胞有明显的抑制作用,并使 S 期细胞所占的比例下降, G₀/G₁ 期比例上升 ($P < 0.05$)。[结论] RSK4 基因在结直肠癌细胞株中呈低表达,转染 RSK4 后可抑制肿瘤细胞生长,有可能为一个潜在的抑癌基因。

关键词: RSK4;结直肠肿瘤;抑癌基因

中图分类号: R735.37 文献标识码: A 文章编号: 1671-170X(2018)04-0341-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.04.B010

Effect of RSK4 on Proliferation of Colorectal Cancer Cells

DENG Ye, CAI Jun, WANG Xuan, et al.

(First Affiliated Hospital of Yangtze University, Jingzhou 434000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effects of RSK4(P90 Ribosomal Protein S6) in colorectal cancer cells. [Methods] RSK4 gene was transfected into colorectal cancer SW480 and HCT116 cells by Lipofectamin 2000. The expression of RSK4 in wild and transtected SW480 and HCT116 cells was confirmed by RT-PCR and Western blot. Cell proliferation was detected by MTT and flow cytometry. [Results] RSK4 was lowly expressed in wild SW480 and HCT116 cells, while RSK4 was over-expressed in transfected cells. MTT assay showed that the proliferation was significantly inhibited in RSK4-transfected colorectal cancer cells. Flow cytometry revealed that S phase cells decreased and G₀/G₁ cells increased significantly in transfected colorectal cancer cells ($P < 0.05$). [Conclusion] Low expression of RSK4 gene is detected in colorectal cancer cells, and transfection of RSK4 inhibits cancer cell proliferation, which indicates that RSK4 may be a tumor suppressor gene in colorectal cancer.

Subject words: RSK4; colorectal cancer; tumor suppressor genes

RSK4 是近期新发现的位于 X 染色体上的连锁基因^[1-5],是 Ras-Raf-ERK 的下游基因,位于细胞浆中,在各种细胞因子的刺激下,可从细胞浆到达细胞核中,发挥其生物学特点。在我们前期的实验中,已经证实 RSK4 在结直肠癌中呈低表达状态,并用免疫组织化学的方法初步探讨了 RSK4 蛋白的表达与结直肠癌淋巴结转移、肿瘤分级、临床分期密切相关^[6], RSK4 低表达患者的生存时间较长。为分析 RSK4 是

如何抑制结直肠癌细胞生长的,我们挑选结直肠癌细胞株 SW480 和 HCT116,用 Lipofectamin 2000 技术将 RSK4 基因转染至细胞核内,建立结直肠癌 RSK4 高表达细胞系,初步阐明 RSK4 基因对结直肠癌细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人结直肠癌细胞系 SW480、HCT116 由本单位保存,分别培养于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,置含 5% CO₂、95%空气的培养箱中,在

基金项目: 2015 年湖北省卫计委一般项目(WJ2015MB212)

通讯作者: 杨继元,教授,博士;长江大学附属第一人民医院肿瘤科,湖北省荆州市沙市区金龙路 40 号(434000);E-mail: 529369023@qq.com

收稿日期: 2017-01-10;修回日期: 2017-05-31

37℃、95%湿度下传代培养。每 2~3d 更换一次培养基,当细胞生长状态良好、密度在 80%~90%时进行细胞收集。

1.2 瞬时细胞转染

转染质粒用无内毒素质粒提取试剂盒,提取参照 Lipofectamine™2000 说明书的转染程序。转染前 1d 将 5×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板内。每孔 4μg 质粒,10μl Lipofectamine™2000 转染细胞,同时设未转染对照组,4~6h 后更换含胎牛血清的完全培养基继续培养。

1.3 RT-PCR 法检测结直肠癌细胞株 SW480、HCT116 中 RSK4 mRNA 表达

按 Trizol 法提取细胞总 RNA,取每种细胞总 RNA 3μg,依照 cDNA 第一链合成逆转录试剂盒说明书进行逆转录。根据 Genbank 报道的 RSK4 基因序列结合文献,利用 Primer 5.0 软件设计引物。每种细胞重复 3 次,每种细胞转染前后 RSK4 mRNA 为 3 次实验的平均值。

1.4 WB 法检测结直肠癌细胞株 SW480、HCT116 中 RSK4 蛋白的表达情况

转染 72h 后,收集一部分细胞提取总蛋白,操作步骤按照 RIPA 裂解液使用说明进行,并用 BCA 法测定蛋白浓度,将提取的总蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳后,湿法转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭,依次与鼠抗 RSK4 单克隆抗体和羊小鼠二抗 (1:2000) 反应后,加入 ECI 发光底物,浮浴后曝光。

1.5 MTT 法检测转染前后细胞生长情况

将对数生长的细胞 (未转染组,空白组质粒组,转染成功组) 接种于培养皿中,于 12h,24h,48h,72h,96h 后用酶标仪检测 450nm 处的吸光度,计算细胞的抑制率,细胞抑制率=(空白对照组 OD 值-实验组 OD 值)/空白对照组 OD 值 $\times 100\%$ 。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期

用胰酶消化处理对数生长期的细胞,收集 10^6 个细胞悬浮于 PBS 中制成单细胞悬液,用预冷至 -20℃ 的乙醇固定,4℃ 过夜,2000r/min 离心洗涤,加入 PI 染液,4℃ 避光保存 30min,保存 30min,流式细胞仪进行细胞周期分析。

1.7 统计学处理

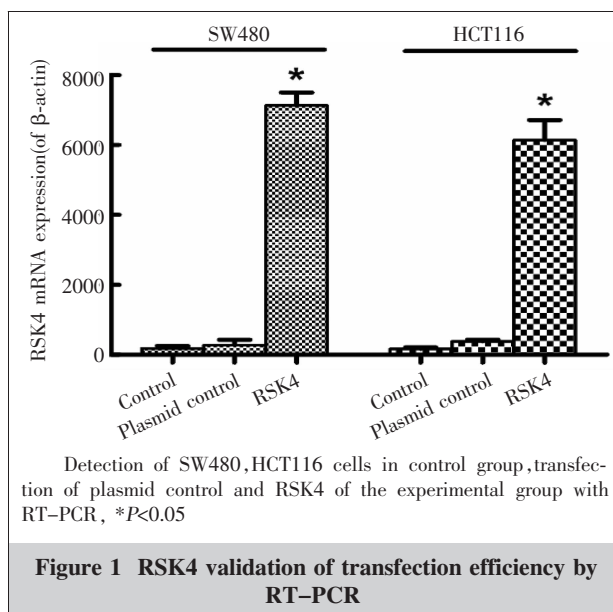
采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,采用 Student-t 检验分析正常细胞、转染空质粒及转染

RSK4 基因结直肠癌细胞之间的细胞活性、基因转录水平或蛋白水平表达的差异性,结果用均数 $\pm$ 标准差表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 RSK4 mRNA 及蛋白表达情况

利用实时荧光定量 PCR 法检测结直肠癌细胞株 SW480 和 HCT116 中 RSK4 的表达,结果显示结直肠癌细胞中 RSK4 的表达水平明显减少,含量极低。见 Figure 1。

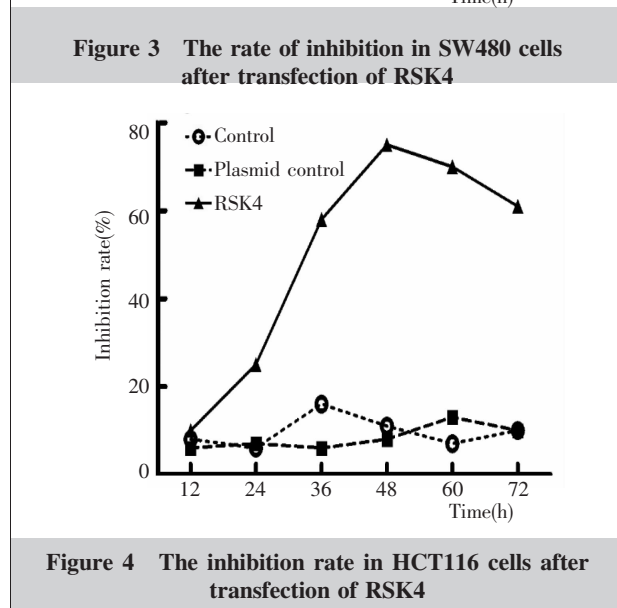
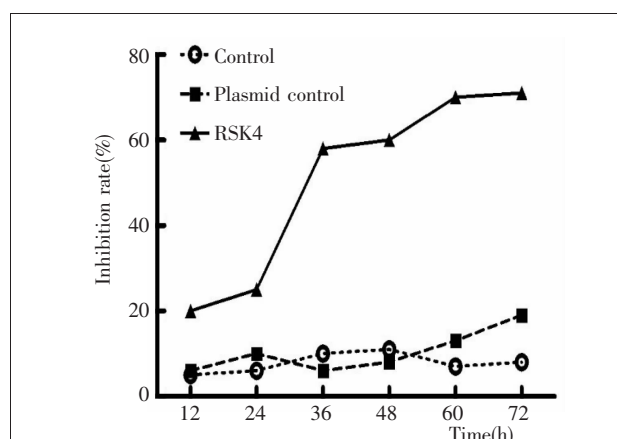
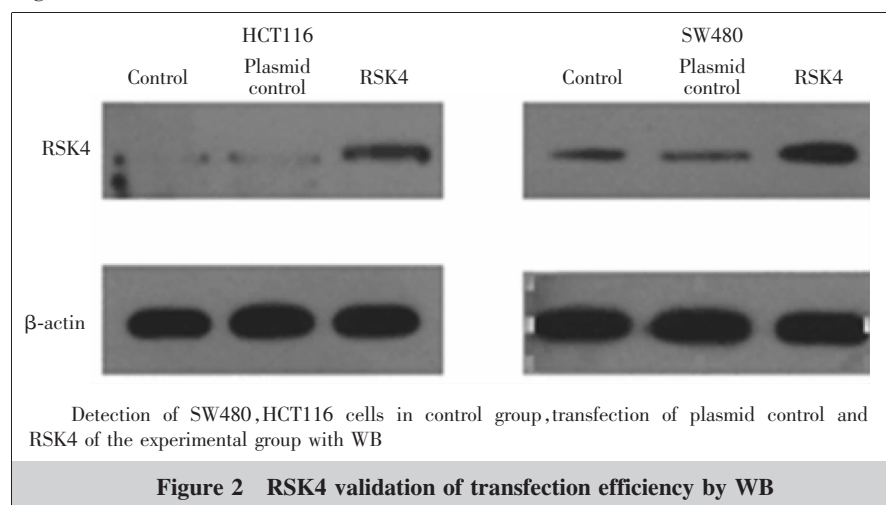


用 Lipofectamin 2000 转染技术,将 RSK4 基因转染结直肠癌细胞株 SW480 和 HCT116,48h 后通过 Real-time PCR 验证转染效率。结果显示,与正常细胞空白质粒组相比,在 RSK4 转染的细胞中,RSK4 的表达水平显著升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Western blot 结果表明,正常 SW480 和 HCT116 细胞,转染空白质粒蛋白条带较浅,提示 RSK4 蛋白低表达,而转染干扰后细胞 RSK4 蛋白条带明显变深,提示干扰后蛋白表达升高。见 Figure 2。

2.2 RSK4 过表达对结直肠癌细胞的生长的影响

在 SW480 及 HCT116 细胞中转染 RSK4 基因后,用 MTT 法检测正常细胞、转染空白质粒细胞及转染 RSK4 基因的细胞抑制率情况,结果显示,RSK4 过表达可以明显抑制结直肠癌细胞的体外生

长,这种抑制效果在 48h 和 60h 在 60%~70%左右,而正常细胞和空白质粒组在 10%左右,差异有统计学意义($P<0.05$),而后期抑制效果达到平台期。见 Figure 3~4。



2.3 RSK4 过表达对结直肠癌细胞 DNA 合成周期比例的影响

正常细胞组、转染空白质粒组和转染 RSK4 组细胞培养 72h 后,进行碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色,结果显示,转染 RSK4 后,SW480 和 HCT116 细胞的 S 期细胞比例下降, G_0/G_1 期细胞显著上升,差异有统计学意义($P<0.05$)。见 Table 1~2, Figure 5。

3 讨论

结直肠癌的发病率在发达国家及发展中国家呈逐年上升趋势,是全球第三常见的恶性肿瘤,其死亡率居全球恶性肿瘤第 4 位^[7]。近年来,尽管手术方式有了长足进步,放、化疗手段在不断更新,各种检测方法、生物治疗、靶向治疗等新方法不断涌现,但结直肠癌疗效没有革命性的提高,其 5 年生存率约在 50%~60%。怎样选择相对特异性分子靶点的药物来攻击肿瘤成为目前研究的难点。随着结直肠癌发生发展和转移过程中分子生物学机制的不断的研究和深入。虽然贝伐单抗和西妥昔单抗取得一定疗效^[8-13],但均遇到瓶颈。寻找结直肠癌新的靶点迫在眉睫^[14]。

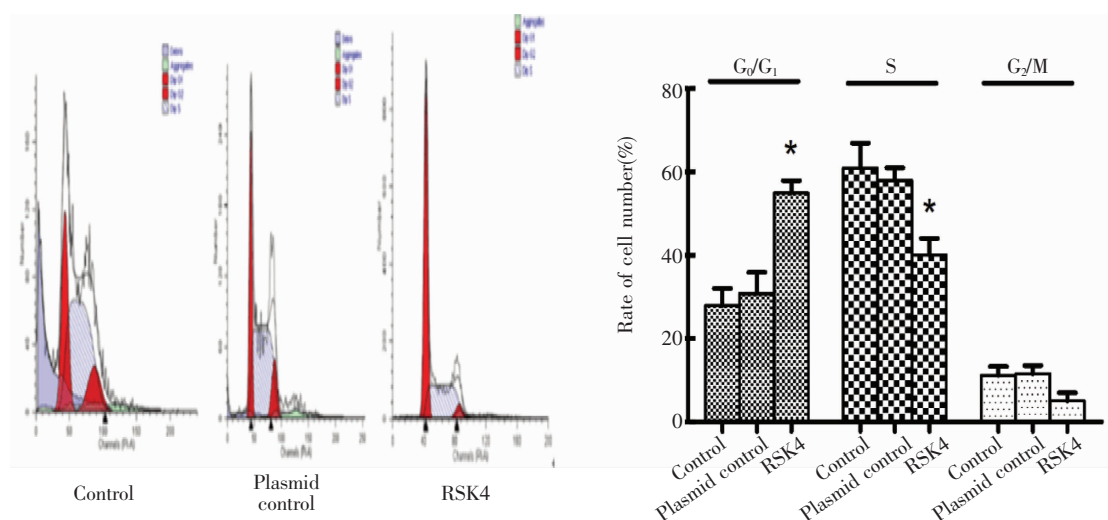
信号通路 Raf-MEK-ERK 是目前结直肠癌研究的热点,P90 核糖体 S6 激酶 (ribosomal S6 kinase, RSK)属于苏氨酸丝氨酸激酶家族,是其下游重要的靶点物质。RSK4 是位于 X 染色体上的连锁基因,X

Table 1 SW480 cell cycle of each group in 72 hour (n=3)

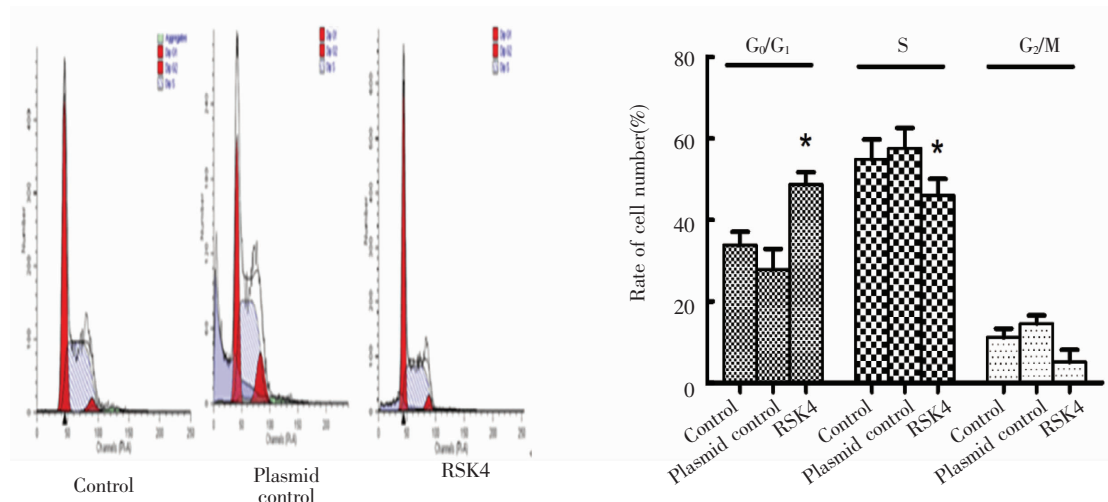
Groups	Cell cycle (%)		
	G_0/G_1	S	G_2/M
Control	27.91±4.1	60.91±5.9	11.17±2.1
Plasmid control	30.82±5.1	57.64±3.0	11.54±2.0
RSK4	54.9±3.0	40.05±4.0	5.05±2.0

Table 2 HCT116 cell cycle of each group in 72 hour (n=3)

Groups	Cell cycle (%)		
	G_0/G_1	S	G_2/M
Control	33.91±3.2	54.91±4.9	11.17±2.1
Plasmid control	27.82±5.1	57.64±5.0	14.54±2.0
RSK4	48.8±3.0	46.1±4.0	5.1±3.0



Flow cytometry detected that S phase cells decreased significantly, G₀/G₁ cells increased significantly in SW480 cell line (*P<0.05)



Flow cytometry detected that S phase cells decreased significantly, G₀/G₁ cells increased significantly in HCT116 cell line (*P<0.05)

Figure 5 The effect of RSK4 on cell cycle

染色体连锁的癌基因和抑癌基因是在个体基因水平调控的,RSK4抑制ERK对特异靶点的转录激活,从而抑制细胞生长^[15]。Lopez-Vicente等^[16]报道RSK4在结肠癌和肾癌中表达均下调。在亚细胞水平,RSK1~3呈现在静止细胞的胞浆中,如受到刺激,相当一部分蛋白可以转到细胞核内,RSK4主要在胞浆中,在丝列原的刺激下,并未见其转到核内。目前RSK4在结直肠癌的基础与临床研究较少,搜索国内外文献,仅有一篇相关报道^[2]。

本研究前期实验表明,RSK4蛋白在结直肠癌癌旁组织中呈高表达状态,在结直肠癌中呈特异性低表达^[6]。RSK4有可能成为结直肠癌早期诊断、预

后判断及指导治疗的重要生物标志物之一。我们用RT-PCR检测SW480、HCT116细胞中RSK4的表达情况,结果发现RSK4在这两株细胞中呈低表达或未检测到,按照条件优化后将质粒转染细胞成功48h后,观察荧光表达的情况,转染效率达到了60%左右。我们通过转染RSK4到不同的结直肠癌细胞SW480和HCT116中,进而探索RSK4在结直肠癌中的特异性生物学功能。在转染RSK4基因48~60h,SW480细胞抑制率达70%左右,而正常细胞和空白质粒组在10%左右,差异有统计学意义(P<0.05),后期抑制效果达到平台期。在HCT116细胞中,转染RSK4基因后,细胞生长较慢,在60h达到

60%左右,而正常细胞和空白质粒组细胞生长良好。说明 RSK4 过表达可以明显抑制结直肠癌细胞的体外生长。为了进一步分析转染 RSK4 基因后对结直肠癌细胞周期的影响,我们利用流式细胞仪检测了各细胞周期的情况。结果显示,正常细胞和转染空白质粒的细胞 S 期细胞比例在 57%左右,转染 RSK4 基因后,SW480 和 HCT116 细胞的 S 期细胞比例在 40%左右,明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。而转染 RSK4 基因后, G_0/G_1 期细胞显著上升,差异亦具有统计学意义($P<0.05$)。说明 RSK4 基因抑制肿瘤细胞生长是通过阻碍细胞蛋白合成起作用的,有可能为一个潜在的抑癌基因。

有研究表明 RSK4 还通过负调控受体酪氨酸激酶(RTK)信号在胚胎形成的过程中起抑制作用,抑制 Ras-ERK 信号转导和细胞增殖,因此 RSK4 在大部分快速生长的细胞内表达量是很低的,上调其在细胞内的表达水平可抑制细胞生长,与我们的研究类似。Thakur 等^[3]发现,外源性 RSK4 表达虽不影响乳腺癌细胞生长,上调 claudin-2 同时下调 CXCR4 表达,降低肿瘤细胞的侵袭转移,增加乳腺癌细胞对 5-Fu 的敏感性。但也有相反的报道,在乳腺癌中发现一些 X-连锁基因的异常表达(包括 RSK4),说明异常 RSK4 有致癌作用^[3]。Dewdney 等^[17]报道 RSK4 在正常子宫内膜内表达,而在子宫内膜癌中表达较少或者缺失,与正常子宫内膜相比,RSK4 在子宫内膜癌细胞株和子宫内膜癌中高度甲基化,其是否为子宫内膜癌的抑癌基因,尚不肯定。Sun 等^[18]对编码 RSK4 的基因进行了系列的研究,提示 RSK 是癌基因或者抑癌基因取决于很多因素。

RSK4 是一个 X-连锁基因,虽然其功能还不完全清楚,已有大量的数据表明癌细胞高表达 RSK4 降低细胞增殖分裂、促进细胞凋亡。由于 RSK4 在信号传导途径中参与多个信号通路,是多个生长信号通路的共同底物,因此,RSK4 的研究可能对恶性肿瘤的治疗有突破性的潜力,成为新的治疗靶点,值得进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Li Q, Jiang Y, Wei W, et al. Frequent epigenetic inactivation of RSK4 by promoter methylation in cancerous and non-cancerous tissues of breast cancer [J]. Med Oncol, 2014, 31(1): 793.
- [2] Lopez-Vicente L, Pons B, Coch L, et al. RSK4 inhibition results in bypass of stress-induced and oncogene-induced senescence[J]. Carcinogenesis, 2011, 32(4): 470-476.
- [3] Thakur A, Rahman KW, Wu J, et al. Aberrant expression of X-linked genes RbAp46, Rsk4, and Cldn2 in breast cancer[J]. Mol Cancer Res, 2007, 5(2): 171-181.
- [4] Myers AP, Corson LB, Rossant J, et al. Characterization of mouse Rsk4 as an inhibitor of fibroblast growth factor-RAS-extracellular signal-regulated kinase signaling[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(10): 4255-4266.
- [5] Yntema HG, van den Helm B, Kissing J, et al. A novel ribosomal S6-kinase (RSK4; RPS6KA6) is commonly deleted in patients with complex X-linked mental retardation [J]. Genomics, 1999, 62(3): 332-343.
- [6] Cai J, Ma H, Huang F, et al. Low expression of RSK4 predicts poor prognosis in patients with colorectal cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(8): 4959-4970.
- [7] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [8] Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2009, 360(14): 1408-1417.
- [9] Yang JC, Haworth L, Sherry RM, et al. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer [J]. N Engl J Med, 2003, 349(5): 427-434.
- [10] Mishima H, Oba K, Sakamoto J, et al. FOLFIRI plus bevacizumab 5 mg/kg versus 10 mg/kg as second-line therapy in patients with metastatic colorectal cancer who have failed first-line bevacizumab plus oxaliplatin-based therapy: a randomized phase III study (EAGLE Study) [J]. Jpn J Clin Oncol, 2012, 42(2): 134-138.
- [11] Petrelli F, Borgonovo K, Cabiddu M, et al. FOLFIRI-bevacizumab as first-line chemotherapy in 3500 patients with advanced colorectal cancer: a pooled analysis of 29 published trials[J]. Clin Colorectal Cancer, 2013, 12(3): 145-151.
- [12] Heinemann V, Stintzing S. FOLFIRI with cetuximab or bevacizumab; FIRE-3-authors' reply [J]. Lancet Oncol, 2014, 15(3): e583-e584.
- [13] Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial[J]. Lancet Oncol, 2014, 15(10): 1065-1075.
- [14] Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homiczko K, et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy[J]. Nat Med, 2013, 19(5): 619-625.
- [15] Dummiller BA, Hauge C, Silber J, et al. Functional characterization of human RSK4, a new 90-kDa ribosomal S6 kinase, reveals constitutive activation in most cell types[J]. J Biol Chem, 2005, 280(14): 13304-13314.
- [16] Lopez-Vicente L, Armengol G, Pons B, et al. Regulation of replicative and stress-induced senescence by RSK4, which is down-regulated in human tumors [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(14): 4546-4553.
- [17] Dewdney SB, Rimel BJ, Thaker PH, et al. Aberrant methylation of the X-linked ribosomal S6 kinase RPS6KA6 (RSK4) in endometrial cancers [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(8): 2120-2129.
- [18] Sun Y, Cao S, Yang M, et al. Basic anatomy and tumor biology of the RPS6KA6 gene that encodes the p90 ribosomal S6 kinase-4[J]. Oncogene, 2012, 32(14): 1794-1810.