[23] Srivastava K, Srivastava A, Mittal B. Polymorphisms in ERCC2, MSH2, and OGG1 DNA repair genes and gallbladder cancer risk in a population of Northern India. Cancer, 2010, 116(13): 3160–3169.
[24] 王翔，游思洪，何伟，等. hOGG1 基因 Ser326Cys 位点的多态性与胆管癌的遗传易感性研究. 医学研究生学报，2010，23(11): 1156–1159.
[25] 熊兴东，杨游萍，曾俐琴，等. hOGG1 ser326cys 基因多态性与宫颈癌遗传易感性的关系. 广东医学，2010，31(8): 979–981.
[26] Sterpone S, Cornetta T, Padua L, et al. DNA repair capacity and acute radiotherapy adverse effects in Italian breast cancer patients. Mutat Res, 2010, 684(1–2): 43–48.
[27] Agalliu I, Kwon EM, Salinas CA, et al. Genetic variation in DNA repair genes and prostate cancer risk: results from a population-based study. Cancer Causes Control, 2010, 21(2): 289–300.

（收稿日期：2011–11–27）

SKP2 表达对食管癌细胞辐射敏感性的影响

王小春 刘金剑 王月英 吴红英 李德冠 褚丽萍 刘强 宋娜玲 樊飞跃 孟爱民

【摘要】 目的 探讨 S 期激酶相关蛋白 2(SKP2)高表达和低表达对食管癌细胞辐射敏感性的影响。**方法** 用 Western-blotting 方法筛选 SKP2 低表达和高表达的食管癌细胞系；构建 SKP2 正义表达载体 p-pcDNA™ 3.1/myc-His A-SKP2 和 RNA 干扰载体 SKP2 RNAi，分别转染 SKP2 低表达和高表达的食管癌细胞系，用 5 Gy γ 射线照射各组细胞，通过克隆形成实验检测细胞辐射敏感性的差异。**结果** SKP2 在 4 种食管癌细胞中的表达水平依次为 KYSE510>KYSE450>EC9706>KYSE150。用 p-pcDNA™ 3.1/myc-His A-SKP2 表达载体转染 KYSE150 细胞后 SKP2 表达水平升高，5 Gy γ 射线照射后细胞的克隆形成能力显著高于对照组（F=3.53，P<0.01），表明 SKP2 高表达可以降低食管癌细胞的辐射敏感性。RNA 干扰载体转染 KYSE510 细胞后 SKP2 表达水平降低，5 Gy γ 射线照射后细胞的克隆形成能力显著低于对照组（F=5.23，P<0.05），表明敲降 SKP2 表达可以增加食管癌细胞的辐射敏感性。**结论** SKP2 表达与食管癌细胞的辐射敏感性密切相关，具体机制还需要进一步研究。

【关键词】 食管肿瘤；S 期激酶相关蛋白质类；RNA 干扰；辐射耐受性

Effects of SKP2 expression on radio-sensitivity of esophageal carcinoma

WANG Xiao-chun, LIU Jin-Jian, WANG Yue-ying, WU Hong-ying, LI De-guan, CHU Li-ping, LIU Qiang, SONG Na-ling, FAN Fei-yue, MENG Ai-min. Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Science, Tianjin 300192, China
Corresponding author: WANG Xiao-chun, Email: wxc3188@126.com

【Abstract】 Objective To explore the correlation of S-phase kinase-associated protein 2 (SKP2) expression with radio-sensitivity of esophageal carcinoma. **Methods** Detecting the level of SKP2 in four different esophageal carcinoma cell lines using Western-blotting. Constructing p-pcDNA™ 3.1/myc-His A-SKP2 expression and SKP2 RNAi vector and transfecting SKP2 low or high expression cell, respectively. Clone forming assay was used to detect the cell proliferation ability of different groups after 5 Gy γ-ray irradiation. **Results** The sequence of SKP2 expression level in four different esophageal carcinoma cell line was KYSE510>KYSE450>EC9706>KYSE150. Compared with parent control cells, the clone forming ability of SKP2 high expression cells was significantly increased (F=3.53, P<0.01), showing high SKP2 expression

DOI: 10. 3760 / cma. j. issn. 1673–4114. 2012. 02. 012
基金项目：国家自然科学基金(30901723)；天津市自然科学基金（11JCYBJC13700）；中国医学科学院放射医学研究所学科发展基金(SF1103，1106)
作者单位：300192 天津，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
通信作者：王小春（Email: wxc3188@126.com）

depression the radio-sensitivity of KYSE150 cell. In contrast, the clone forming ability of KYSE510 cell was significantly decreased after SKP2 knock-down (F=5.23, P<0.05), showing low SKP2 expression promoting the radio-sensitivity of KYSE510 cell. **Conclusion** SKP2 expression was correlated with radio-sensitivity of esophageal carcinoma, but further study was needed to explore the molecular mechanism.

【Key words】 Esophageal neoplasms; S-phaes kinase-associated proteins; RNA interference; Radiation tolerance

S 期激酶相关蛋白 2(S-phase kinase-associated protein 2, SKP2）是由 Zhang 等[1]在 1995 年首次发现的，随后，Demetrick 等[2]通过荧光原位杂交确定 SKP2 定位于人类 5 号染色体短臂一区三带(5p13)。SKP2 蛋白属 F-box 蛋白家族成员，在蛋白泛素化过程中负责对底物的识别，从而促进靶蛋白通过泛素化-蛋白酶体途径降解[3]。目前已知 SKP2 在细胞周期、细胞凋亡和衰老等调控方面发挥重要作用，但其与肿瘤细胞辐射敏感性的关系报道较少。本研究通过正义转染和 RNA 干扰等方法研究了 SKP2 表达对食管癌细胞辐射敏感性的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞及培养条件

食管癌 EC9706、KYSE150、KYSE450 和 KYSE510 细胞购自北京协和医学院细胞中心，培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液(由天津市津脉基因测绘技术有限公司提供)中，置于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养。

1.2 照射条件

Cammacell-10 （Atomic Energy of Canada Lim）^{137}Cs γ 射线，剂量率为 2.4 Gy/min，总剂量为 5 Gy。

1.3 载体构建

空载体 p-pcDNA™ 3.1/myc-His A、对照载体 Scrambled RNAi、SKP2 正义表达载体 p-pcDNA™ 3.1/myc-His A-SKP2、RNA 干扰载体 SKP2 RNAi 均由美国 Invitrogen 公司合成。转染试剂 Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司。

1.4 Western-blotting

分别提取食管癌和癌旁正常组织的总蛋白，经 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后，将电泳产物转移至硝酸纤维素膜，用 5%脱脂奶粉封闭 1 h。加 SKP2 鼠抗人一抗（美国 Santa Cruz 公司；1:500 稀释），4℃反应过夜。经吐温三羟甲基氨基甲烷缓冲液洗涤后，加羊抗鼠二抗（天津市津脉基因测绘技术有限公司，1:500 稀释），室温培育 1 h，加超敏发光液暗室显影。以 β-actin(美国 Sigma 公司；1:5000 稀释)作为内参蛋白。

1.5 细胞转染和 RNA 干扰

用空载体 p-pcDNA™ 3.1/myc-His A 和正义表达载体 p-pcDNA™ 3.1/myc-His A-SKP2 转染经 Western-blotting 筛选出的SKP2 低表达细胞，用 Scrambled RNAi 对照载体和 SKP2 RNAi 载体转染筛选出的 SKP2 高表达细胞。具体方法为将生长状态良好的细胞于转染前一天接种到六孔板中，16~18 h 后，细胞总面积达到 60%~80%。取 5 μl 转染试剂 Lipofectamine2000 加入 250 μl RPMI 1640 培养液中，同时，将 2 μg 质粒 DNA(美国 Invitrogen 公司)加入另外 250 μl RPMI 1640 培养液中，将两者温和混匀，室温放置 30 min。细胞先用 RPMI 1640 培养液洗 1~2 次，再加入 2 ml RPMI 1640 培养液。然后将上述混合物轻轻加到培养细胞上。37 ℃ 条件下培养 5 h 后，换正常培养液终止转染。24~48 h 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 h 后将细胞按 1:10 传代，然后加入选择抗生素(青霉素和链霉素，美国 Sigma 公司)进行筛选，每隔 2~3 d 换液一次，约 10~14 d 有明显克隆形成，鉴定后保存。

在随后的实验中将细胞分为 3 组，母系对照组(SKP2 低表达或高表达细胞组)、空载转染对照组(Scrambled RNAi 或空载组)和转染组（SKP2 RNAi 或 p-pcDNA™ 3.1/myc-His A-SKP2 组，p-pcDNA™ 3.1/myc-His A-SKP2 组以下简称为：空载+SKP2 组)。

1.6 克隆形成实验

食管癌细胞经转染和 RNA 干扰处理后，再接受 5 Gy γ 射线照射，然后按不同照射剂量接种不同数量的细胞到 60 mm 的培养皿中。细胞连续培养 3 周后用甲醇固定，加吉姆萨染液染色 30 min，流水冲洗，计数≥50 个细胞的克隆数。

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，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SKP2 在 4 种食管癌细胞系中的表达

首先用 Western-blotting 法检测了 4 种食管癌细胞中 SKP2 的表达情况，结果如图 1 所示，SKP2 在 KYSE510 中表达水平最高，在 KYSE150 中表达水平最低，在 EC9706 和 KYSE 450 中的表达水平介于二者之间。

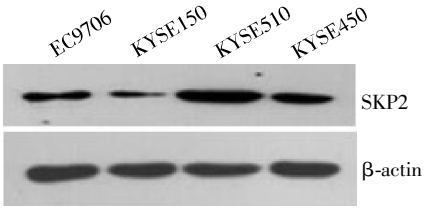
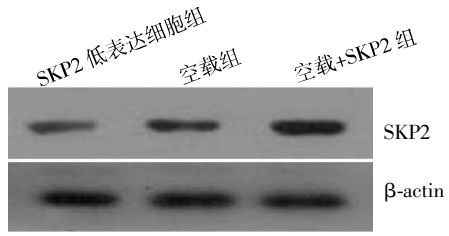


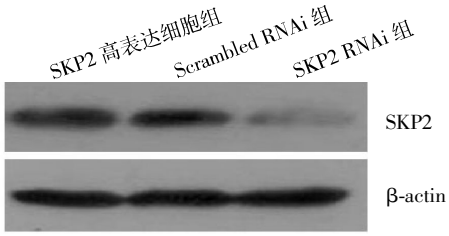
图1 Western-blotting 检测 SKP2 在 4 种食管癌细胞系中的表达 图中，SKP2 为 S 期激酶相关蛋白，SKP2 的表达水平高低依次为 KYSE510>KYSE450>EC9706>KYSE150。

2.2 正义转染和 RNA 干扰效果

用 SKP2 正义表达载体 p-pcDNA™ 3.1/myc-His A-SKP2 转染 SKP2 低表达细胞 KYSE150，筛选稳定克隆后检测 SKP2 表达，结果如图 2a 所示，正义转染后 SKP2 表达水平显著升高，表明转染成功。用 SKP2 RNAi 载体转染 SKP2 高表达细胞 KYSE510 后，结果如图 2b 所示，敲降后 SKP2 表达降低，表明 RNA 干扰成功。



2a

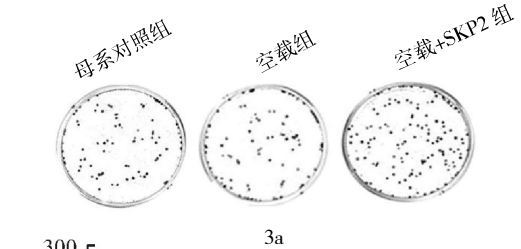


2b

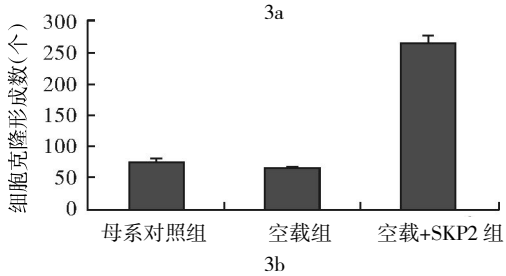
图 2 正义转染和 RNA 干扰后 SKP2 的表达情况 图中，SKP2 为 S 期激酶相关蛋白。图 2a：正义转染后 SKP2 表达水平升高。图 2b：RNA 干扰后 SKP2 表达水平降低。

2.3 SKP2 表达对食管癌细胞辐射敏感性的影响

正义转染和 RNA 干扰后，用 5 Gy γ 射线照射细胞，结果显示，空载+SKP2 组细胞的克隆形成能力显著高于对照组（$F=3.53$，$P<0.01$）（图 3），表明 SKP2 高表达可以提高食管癌细胞的辐射抵抗能力。敲降 SKP2 表达后，SKP2 RNAi 组细胞的克隆形成能力显著低于对照组（$F=5.23$，$P<0.05$）（图 4），表明 SKP2 低表达可以增加食管癌细胞的辐射敏感性。

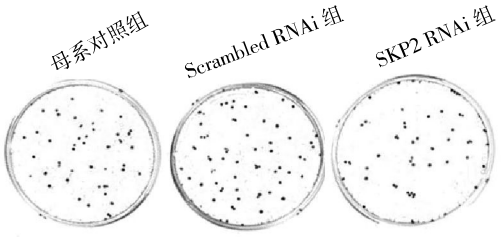


3a

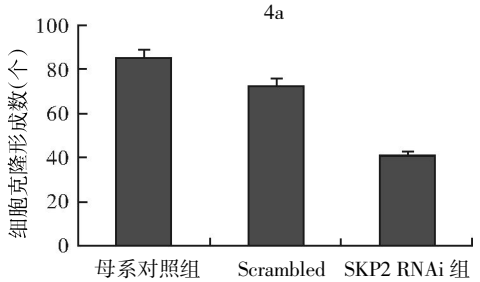


3b

图 3 正义转染后的 SKP2 低表达细胞经 5 Gy γ 射线照射的结果 图中，SKP2 为 S 期激酶相关蛋白。图 3a 示经 5 Gy γ 射线照射后，空载 +SKP2 组细胞的克隆形成能力显著高于对照组；图 3b 示 3 次独立重复实验结果统计。



4a



4b

图 4 RNA 干扰后的 SKP2 高表达细胞经 5 Gy γ 射线照射的结果 图中，SKP2 为 S 期激酶相关蛋白。图 4a 示 5 Gy γ 射线照射后，SKP2 RNAi 组细胞的克隆形成能力显著低于对照组；图 4b 示 3 次独立重复实验结果统计。

3 讨论

食管癌是常见的世界十大恶性肿瘤之一，近年来新增患者超过30万人/年，并且大多发生于发展中国家，中国是世界上食管癌高发区，发病率和病死率均居世界之首，每年全世界新诊断出的30万食管癌患者中，1/2以上发生在中国[4]。放射治疗是食管癌的主要治疗手段之一，但不同患者对放射治疗的敏感性存在差异，在相同的放射治疗剂量下，有的患者有效，有的患者无效，还有的患者可能出现严重的不良反应，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有重要意义。

SKP2具有癌基因的潜能，在人类多种恶性肿瘤中高表达，且与肿瘤的发生、发展和预后密切相关，可能作为肿瘤治疗的新靶点。如Gstaiger等[5]研究发现，SKP2的表达水平从口腔上皮不典型增生到鳞癌逐渐升高，而且SKP2的表达与p27表达呈负相关，集落形成和裸鼠成瘤实验表明，SKP2与人Ras基因共同转染具有很强的恶性转化能力。Yokoi等[6]的研究表明，在25个非小细胞肺癌细胞系中，5个细胞系有SKP2的扩增，11个细胞系SKP2转录水平升高，而且在60例非小细胞肺癌肿瘤标本中，SKP2的表达显著高于正常对照组，SKP2高表达与淋巴结转移、临床分期、分化不良显著相关。在包括前列腺癌[7]、乳腺癌[8]、胃癌[9]、结直肠癌[10]等在内的其他肿瘤中，SKP2高表达也与患者的不良预后相关。但目前关于SKP2与肿瘤辐射敏感性关系的报道还较少。

鉴于SKP2在细胞周期和细胞凋亡调节中的重要作用，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SKP2表达载体，转染SKP2低表达细胞后检测了细胞辐射敏感性的变化，发现SKP2高表达可以显著提高食管癌细胞的辐射抵抗能力。相反，用RNA干扰技术敲降SKP2高表达食管癌细胞SKP2的表达后，细胞的辐射敏感性显著增加。这些结果证实SKP2的表达水平与食管癌细胞的辐射敏感性密切相关，SKP2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，今后还需要进一步进行分子机理的研究。

参 考 文 献

[1] Zhang H, Kobayashi R, Galaktionov K, et al. p19Skp1 and p45Skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase. Cell, 1995, 82(6): 915–925.

[2] Demetrick DJ, Zhang H, Beach DH. Chromosomal mapping of the genes for the human CDK2/cyclin A-associated proteins p19 (SKP1A and SKP1B) and p45(SKP2). Cytogenet Cell Genet, 1996, 73(1-2): 104–107.

[3] Wang Z, Gao D, Fukushima H, et al. Skp2: A novel potential therapeutic target for prostate cancer. Biochim Biophys Acta, 2012, 1825(1): 11–17.

[4] Lin DC, Du XL, Wang MR. Protein alterations in ESCC and clinical implications: a review. Dis Esophagus, 2009, 22(1): 9–20.

[5] Gstaiger M, Jordan R, Lim M, et al. Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(9): 5043–5048.

[6] Yokoi S, Yasui K, Saito-Ohara F, et al. A novel target gene, SKP2, within the 5p13 amplicon that is frequently detected in small cell lung cancers. Am J Pathol, 2002, 161(1): 207–216.

[7] Arbini AA, Greco M, Yao JL, et al. Skp2 overexpression is associated with loss of BRCA2 protein in human prostate cancer. Am J Pathol, 2011, 178(5): 2367–2376.

[8] Wang Z, Fukushima H, Inuzuka H, et al. Skp2 is a promising therapeutic target in breast cancer. Front Oncol, 2012, 1(57): pii18702.

[9] Ma XM, Liu Y, Guo JW, et al. Relation of overexpression of S phase kinase-associated protein 2 with reduced expression of p27 and PTEN in human gastric carcinoma. World J Gastroenterol, 2005, 11(42): 6716–6721.

[10] Fujita T, Liu W, Doihara H, et al. Regulation of Skp2-p27 axis by the Cdh1/anaphase-promoting complex pathway in colorectal tumorigenesis. Am J Pathol, 2008, 173(1): 217–228.

（收稿日期：2012-02-04）