

RNAi干扰*Ska2*对H1299细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响

王义涛^{1,2} 蔡伟^{1,2} 朱远远^{1,2} 李溪月^{1,2} 张春冬^{1,2} 王森^{1,2} 雷云龙^{1,2}
张莹^{1,2} 朱慧芳^{1,2} 李轶^{1,2} 卜友泉^{1,2*}

(¹重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室, 重庆 400016; ²重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016)

摘要 *Ska2*(spindle and kinetochore associated complex subunit 2), 又称*FAM33A*(family with sequence similarity 33, member A), 是新近发现的一个与细胞周期调控和肿瘤发生发展紧密相关的基因, 且与该团队前期发现的新基因*PRR11*(proline rich 11)共享一个双向启动子。但是, *Ska2*在肺癌中的具体作用和分子机制仍不清楚。该研究选用肺癌细胞系H1299, 采用RNAi技术构建*Ska2*基因沉默的稳定细胞株, 并进行了细胞表型和潜在分子机制分析。RT-PCR和Western blot结果表明, *Ska2*在mRNA和蛋白质水平上的表达均被有效抑制。细胞增殖、细胞迁移和侵袭实验结果表明, 与对照细胞相比, *Ska2*基因沉默稳定细胞株的细胞增殖能力、细胞迁移和侵袭能力均显著降低。此外, *Ska2*基因被沉默后, *CCNA1*基因的表达显著下调。该研究的结果提示, *Ska2*与其对侧基因*PRR11*的功能高度相关, 可能与*PRR11*共同参与肺癌细胞增殖、迁移和侵袭行为的调节。

关键词 *Ska2*; 细胞增殖; 肺癌; 迁移; 侵袭

The Effects of *Ska2* Silencing on Cellular Proliferation, Migration and Invasion of H1299 Lung Cancer Cells

Wang Yitao^{1,2}, Cai Wei^{1,2}, Zhu Yuanyuan^{1,2}, Li Xiyue^{1,2}, Zhang Chundong^{1,2}, Wang Sen^{1,2},
Lei Yunlong^{1,2}, Zhang Ying^{1,2}, Zhu Huifang^{1,2}, Li Yi^{1,2}, Bu Youquan^{1,2*}

(¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

²Molecular Medicine and Cancer Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract *Ska2* (spindle and kinetochore associated complex subunit 2), also known as *FAM33A* (family with sequence similarity 33, member A), is a recently identified gene involved in both cell cycle regulation and tumorigenesis, and it shares a bidirectional promoter with *PRR11* (proline rich 11). In the present study, we utilized lung cancer cell line H1299 to construct *Ska2*-silenced cell strain by RNAi, and analyzed the cellular phenotype and potential molecular mechanism. The results of RT-PCR and Western blot revealed that *Ska2* was efficiently silenced at both mRNA and protein levels. Phenotypic analysis revealed that the proliferation, migration and invasion activities were significantly inhibited in *Ska2*-silenced stable cell strain compared with those of the control cells. In addition, silencing of *Ska2* resulted in the downregulation of *CCNA1*. Taken together, our results strongly suggested that

收稿日期: 2014-01-21 接受日期: 2014-03-03

国家自然科学基金(批准号: 81171879、81302263)和重庆市科委自然科学基金(批准号: cstc2013jcyjA10043)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485991, E-mail: buyqcn@aliyun.com

Received: January 21, 2014 Accepted: March 3, 2014

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (Grant No.81171879, 81302263) and Natural Science Foundation Project of Chongqing (Grant No.cstc2013jcyjA10043)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485991, E-mail: buyqcn@aliyun.com

网络出版时间: 2014-04-29 16:03 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.05.0020.html>

Ska2 and its neighboring gene *PRR11* had similar functions and might play important roles in regulating the proliferation, migration and invasion of lung cancer cells.

Key words *Ska2*; cell proliferation; lung cancer; migration; invasion

Ska2(spindle and kinetochore associated complex subunit 2), 又称*FAM33A*(family with sequence similarity 33, member A), 是新近发现的一个与细胞周期调控和肿瘤发生发展密切相关的基因^[1-2]。关于*Ska2*在细胞周期中的作用, 目前认为该基因可通过与*Ska1*和*Ska3*形成*Ska*复合体, 维持有丝分裂中期赤道板和关闭纺锤体检测点, 保证细胞能够“适时”地完成有丝分裂中期并进入有丝分裂后期^[2-3]。研究结果表明, 采用RNAi技术抑制*Ska2*表达, 可导致纺锤体检测点不能及时关闭, 大量细胞被停滞或延迟在有丝分裂中期^[4]。此外, *Ska2*还可通过参与糖皮质激素受体的相关信号通路的调节而影响细胞周期、细胞增殖及肿瘤形成等生物学过程^[5-9]。

关于*Ska2*与肿瘤的关系, 目前已经发现, *Ska2*在多种肿瘤尤其是小细胞肺癌和乳腺癌中表达异常, 提示其参与肺癌、乳腺癌等多种肿瘤的发生发展过程^[4,10-11]。然而, *Ska2*在肺癌发生发展中的具体作用和分子机制仍不清楚。本研究通过RNAi方法构建*Ska2*低表达的H1299稳定细胞株, 分析干扰*Ska2*后对H1299细胞增殖、迁移及侵袭的影响, 为进一步深入探索*Ska2*在肺癌及细胞周期中的作用及分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株与菌株

人非小细胞肺癌细胞株H1299购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库, 菌株DH5 α 由重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心保存。

1.2 主要试剂

RPMI1640培养基和胎牛血清均购自GIBCO公司。0.25%的胰蛋白酶购自Hyclone公司。*Hpa* I及*Xho* I内切酶购自东洋纺(上海)生物科技有限公司(TOYOBO)。脂质体转染试剂LipofectamineTM 2000购自Invitrogen公司。总RNA提取试剂盒Total RNA Kit I及质粒小提试剂盒Plasmid Mini Kit I均购自Omega Bio-Tek公司。反转录试剂PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit和荧光定量PCR试剂SYBR[®] PremixEx TaqTM均购自TaKaRa公司。GAPDH

多克隆抗体购自杭州贤至生物科技有限公司。HRP标记的羊抗兔二抗购自Cell Signaling公司。兔抗人*Ska2*多克隆抗体购自Santa Cruz公司。Super Singal West Dura发光试剂盒购自Thermo Scientific公司。Cell Counting Kit-8购自东仁化学科技(上海)有限公司。Transwell(8 μ m)小室购自Millipore公司。

1.3 细胞培养

H1299细胞采用RPMI 1640培养基(含10%胎牛血清), 于CO₂培养箱(37 $^{\circ}$ C、5% CO₂)中静置培养。当细胞生长状态良好并且融合度达到80%左右时, 使用0.25%的胰蛋白酶消化进行细胞传代或其他实验。

1.4 RNAi载体构建及慢病毒包装

以*Ska2* mRNA序列为模板, 通过Thermo公司的软件在线设计针对*Ska2*的siRNA。经多种评分标准比较, 最终确定*Ska2* siRNA的靶向序列为: 5'-GGC TGG AAT ATG AAA TCA A-3'; 阴性对照control siRNA的序列为: 5'-TTC TCC GAA CGT GTC ACG T-3'。由此设计发夹序列, 发夹序列两端分别包含*Hpa* I及*Xho* I的酶切位点。*Ska2*发夹序列寡核苷酸链的正义链和反义链序列分别为: 5'-TCA GGC TGG AAT ATG AAA TCA ACT CGA GTT GAT TTC ATA TTC CAG CCT GTT TTT TC-3'和5'-TCG AGA AAA AAC AGG CTG GAA TAT GAA ATC AAC TCG AGT TGA TTT CAT ATT CCA GCC TGA-3'; 阴性对照发夹序列寡核苷酸链的正义链和反义链序列分别为: 5'-TCA TTC TCC GAA CGT GTC ACG TCT CGA GAC GTG ACA CGT TCG GAG AAT GTT TTT TC-3'和5'-TCG AGA AAA AAC ATT CTC CGA ACG TGT CAC GTC TCG AGA CGT GAC ACG TTC GGA GAA TGA-3'。委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成DNA寡核苷酸链, 退火形成双链, 然后直接连入经*Hpa* I、*Xho* I双酶切后的GV118载体上, 分别命名为GV118-sh*Ska2*、GV118-shNC, 将连接的产物转化DH5 α 感受态细胞, 阳性重组子最后均经测序验证确认。

对已构建好的GV118-sh*Ska2*和GV118-shNC重组质粒以及pHelper1.0和pHelper2.0包装质粒进行高

纯度无内毒素抽提,然后将GV118-shRNA-Ska2和GV118-shNC分别与包装质粒(pHelper1.0和pHelper2.0)共转染293T细胞,转染后8 h换为完全培养基。培养48 h后,收集富含病毒颗粒的细胞上清液,对其浓缩后得到高滴度的慢病毒浓缩液,在293T细胞中测定并标定病毒滴度。

1.5 shRNA靶向干扰Ska2单克隆细胞株的筛选

用10 μ L的重组病毒液感染6孔板H1299细胞(细胞融合度80%左右),设LV-shRNA-Ska2组和LV-shRNA-NC组,病毒感染时在培养基中加入5 μ g/mL polybrene, 12 h后换为正常培养基,于24 h消化细胞计数,采用逐级稀释的方法制成100/mL细胞悬液。取10 μ L细胞悬液接种至96孔板中,同时加入90 μ L的完全培养基。培养7 d时观察各孔细胞,寻找有单个细胞团且有荧光的孔,待细胞长满后接种至12孔板,再传至6孔板,逐步扩大并保种。

1.6 总RNA提取和反转录

使用Total RNA Kit I提取细胞总RNA,经Nano-Drop Spectrophotometer测定其浓度和 D_{260}/D_{280} 比值,同时采用普通琼脂糖凝胶电泳对RNA质量进行快速分析。而后,取500 ng总RNA,使用PrimeScript1st Strand cDNA Synthesis Kit对RNA进行反转录。

1.7 RT-PCR检测

采用荧光试剂SYBR[®] PremixEx Taq[™]进行定量PCR检测,用于荧光定量PCR引物见表1。反应体系为10 μ L。反转录的cDNA产物稀释20倍作为模板,每组样品设置3个重复。扩增程序为:95 $^{\circ}$ C预变性2 min;94 $^{\circ}$ C变性10 s,60 $^{\circ}$ C退火10 s,72 $^{\circ}$ C延伸20 s,共40个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析定量PCR的结果^[12]。

1.8 蛋白提取和Western blot

收集细胞用1 \times PBS清洗两次,加入Western细胞裂解液在冰上裂解30 min。于4 $^{\circ}$ C、16 000 \times g离心10 min,收集上清液,采用BCA法测定蛋白浓度。将得到的蛋白溶液和上样缓冲液按1:5比例混合,95 $^{\circ}$ C水浴5 min,制备细胞总蛋白样品。采用10% SDS-PAGE分离胶电泳分离细胞总蛋白(蛋白上样量为20 μ g),采用湿转方法将蛋白从SDS-PAGE转移至PVDF膜,电转结束后,将PVDF膜置于含5%(m/v)脱脂奶粉的TBST溶液中,室温封闭1 h;而后将PVDF膜置于抗Ska2多克隆抗体稀释液(稀释比例1:300)中,4 $^{\circ}$ C孵育过夜, TBST洗脱30 min;将洗脱后的膜置于HRP标记的羊抗兔二抗稀释液(稀释比例1:5 000)

表1 RT-PCR引物序列

Table 1 List of primer sequences used for RT-PCR analysis

基因名称	引物序列
Gene name	Primer sequences
GAPDH	F833: 5'-ACC TGA CCT GCC GTC TAG AA-3'
	R1060: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'
Ska2	F1427: 5'-TTT GGT TCC TGA TGG CTT TC-3'
	R1665: 5'-GCA GGT TCT CCC CTA TCT CC-3'
CCNA1	F493: 5'-ACC CCA AGA GTG GAG TTG TG-3'
	R690: 5'-GGA AGG CAT TTT CTG ATC CA-3'
CDC2	F754: 5'-CCA TGG GGA TTC AGA AAT TG-3'
	R983: 5'-CCA TTT TGC CAG AAA TTC GT-3'
MAP4K4	F3354: 5'-ATC AAA CCC CAT GCA ATC AT-3'
	R3587: 5'-CAC ACC ATC CAA GTG ACC AG-3'
RRM1	F758: 5'-GTT GTA TTC GGG CTA CTG G-3'
	R973: 5'-CAC GCT GCT CTT CCT TTC-3'
DHRS2	F918: 5'-GCC CTA CAT GGA GAA CAG GA-3'
	R1146: 5'-CAT TCC CAT GAA ACC AAT CC-3'
EPB41L3	F2813: 5'-CGC TAA AGC TGT CCT GGA AC-3'
	R2984: 5'-TAC TCC TCC CGG TGA AAC AC-3'
NFIB	F138: 5'-GAA GCG AAT GTC AAA GGA-3'
	R333: 5'-CTG GTC GGG ATT GGA TAA-3'

中,室温孵育1.5 h后, TBST洗脱30 min;使用Super Singal West Dura发光试剂盒检测, X胶片曝光。以GAPDH作为内参蛋白,使用一抗为GAPDH兔多抗(稀释比例1:2 000)^[13]。

1.9 细胞增殖检测

收集对数生长期的H1299细胞,以2 000/孔的密度接种至96孔板。采用Cell Counting Kit-8试剂测定0, 24, 48, 72 h吸光度值:10 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1 h后,于450 nm波长下测定对应孔的吸光度值(D),以0 h对应的测定值作为基准,绘制增殖柱形图。

1.10 细胞的迁移和侵袭分析

收集对数生长期的H1299细胞,以 1.0×10^5 /孔的密度接种至6孔板,于细胞培养箱(37 $^{\circ}$ C、5% CO₂)中培养36 h后, PBS洗两次,换用无血清的RPMI 1640培养基,置于细胞培养箱孵育12 h后,胰酶消化计数;将计数后的细胞用无血清的培养基重悬,调整细胞浓度为 1×10^5 /mL。将Transwell小室置于24孔板中,并向Transwell小室下层加入500 μ L的含10% FBS的RPMI 1640培养基,取100 μ L的细胞悬液加入Transwell小室上层,而后将24孔板置于细胞培养箱(37 $^{\circ}$ C、5% CO₂)静置培养24 h。取出小室, PBS洗两次后用甲醇固定10 min, 0.5%结晶紫染色20 min,用棉签擦去上层未迁移细胞,将迁移细胞随机选取5

个独立视野(100×), 计数。侵袭实验操作同迁移实验, 在进行实验前12 h需用Matrigel包被Transwell小室。

1.11 数据统计

实验数据以 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 形式表示, 采用SPSS 17.0软件进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 H1299稳定细胞株的构建及*Ska2*表达水平检测

构建的RNAi载体GV118-sh*Ska2*和GV118-shNC均经测序确认无误, 进一步和包装质粒共转染239细胞制备慢病毒滴度。经检测, LV-shRNA-*Ska2*组滴度为 4×10^8 TU/mL, LV-shRNA-NC组滴度为 3×10^8 TU/mL。用这两组慢病毒感染细胞后构建H1299稳转细胞株, 设LV-shRNA-*Ska2*组与LV-shRNA-NC组, 两组分别筛选到4个单克隆细胞株。经过细胞的形态、增殖及PCR验证后最终确定一株用于后续实验。定量RT-PCR和Western blot检测结果显示, LV-shRNA-*Ska2*组中*Ska2*的mRNA和蛋白质表达水平显著低于LV-shRNA-NC阴性对照组(图1), 说明细胞中内源性*Ska2*的表达得到有效抑制, 成功获得了*Ska2*基因沉默稳定单克隆细胞株, 可以用于下一步的细胞表型分析。

2.2 *Ska2*基因沉默对细胞增殖的影响

我们首先采用Cell Counting Kit-8试剂检测将*Ska2*沉默后H1299的增殖变化。结果显示, LV-shRNA-*Ska2*组细胞的增殖能力在48 h时显著低于LV-

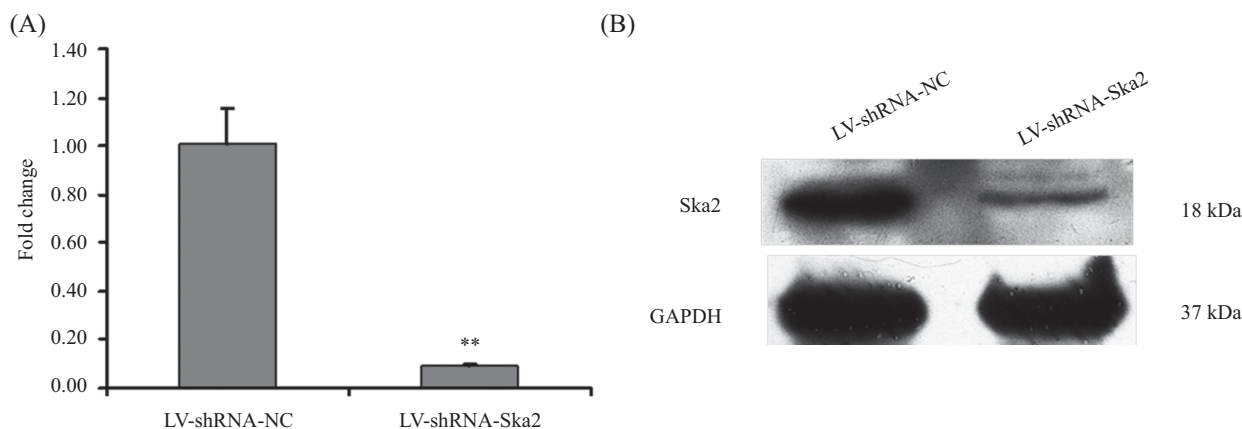
shRNA-NC组($P < 0.05$), 在72 h差异更为显著($P < 0.01$) (图2)。此结果提示, *Ska2*参与H1299细胞的生长与增殖的调节。

2.3 *Ska2*基因沉默对H1299细胞迁移和侵袭能力的影响

我们进一步通过Transwell小室实验分析了*Ska2*沉默后对H1299细胞的迁移和侵袭能力的影响。与*Ska2*未沉默的对照组LV-shRNA-NC比较, *Ska2*沉默后的LV-shRNA-*Ska2*组迁移和侵袭能力均显著降低(图3)。这些结果进一步提示, *Ska2*不仅参与非小细胞肺癌的增殖过程, 还可能参与肺癌细胞的侵袭和转移过程。

2.4 *Ska2*基因沉默对细胞周期相关基因表达的影响

*Ska2*与我们课题组前期发现的肿瘤相关新基因*PRR11*组成一个共享双向启动子的“头对头”基因对, 因此, 我们推测*Ska2*和*PRR11*功能相关, 即两者在肺癌细胞H1299中的作用及机制是相似的^[14-16]。我们前期的研究已发现, 抑制*PRR11*表达后可导致*RRM1*(ribonucleotide reductase M1)、*DHRS2*(dehydrogenase/reductase SDR family member 2)、*MAP4K4*(mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4)、*NFIB*(nuclear factor I/B)和*EPB4L3*(erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3)等多个参与细胞周期和肿瘤发生发展的关键基因的表达发生显著的升高或降低, 因此, 很有必要分析*Ska2*基因沉默后这些基因是否发生类似的变化^[17]。RT-PCR结果表明, 干扰*Ska2*表达后可导

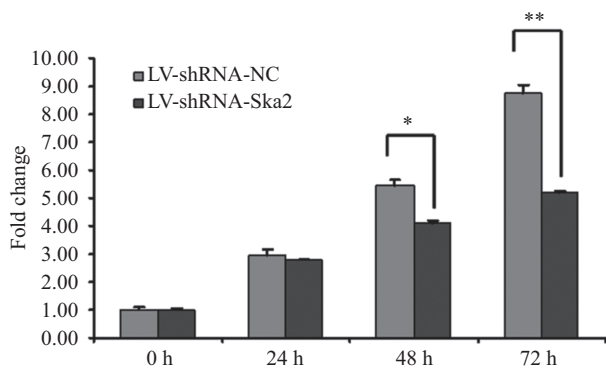


A: RT-PCR检测*Ska2*的mRNA表达水平, $**P < 0.01$, 与LV-shRNA-NC组比较; B: Western blot检测*Ska2*的蛋白质表达水平。

A: determination of *Ska2* mRNA levels by RT-PCR, $**P < 0.01$ compared with LV-shRNA-NC group; B: determination of *Ska2* protein levels by Western blot.

图1 稳定细胞株中*Ska2*的表达

Fig.1 Determination of *Ska2* expression levels in *Ska2*-silenced stable cells

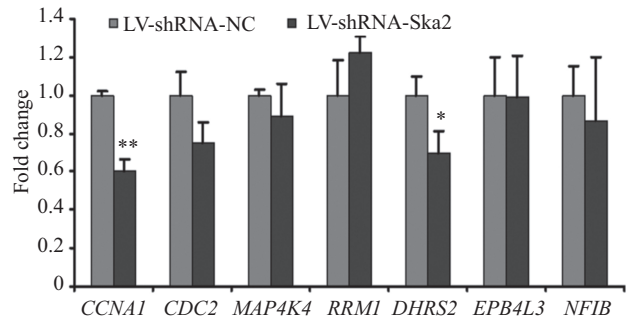


LV-shRNA-Ska2和LV-shRNA-NC单克隆细胞株,以2 000/孔铺于96孔板中,采用Cell Counting Kit-8试剂分别在0, 24, 48, 72 h检测细胞增殖变化。 $*P<0.05$, $**P<0.01$,与LV-shRNA-NC组比较。

LV-shRNA-Ska2 and LV-shRNA-NC cells were plated into 96-well plates at the density of 2 000 cells/well. Cellular proliferation was detected at 0, 24, 48, 72 h by Cell Counting Kit-8. $*P<0.05$, $**P<0.01$ compared with LV-shRNA-NC group.

图2 细胞增殖分析

Fig.2 Cell proliferation assay

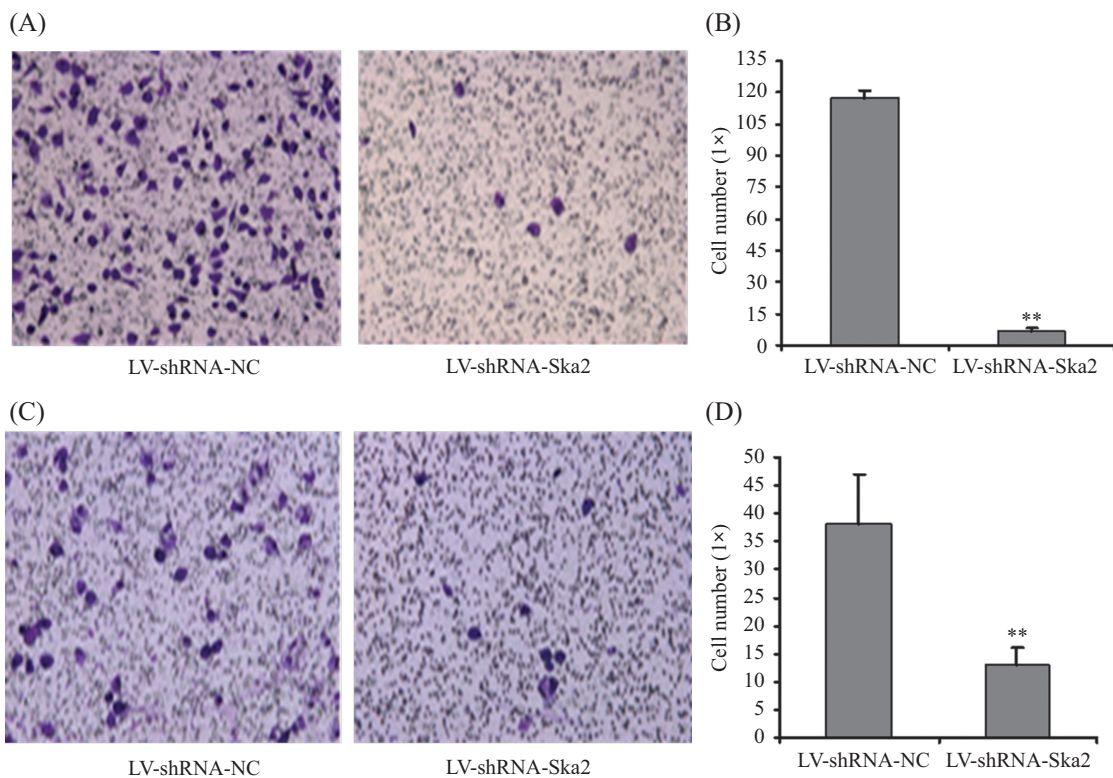


RT-PCR检测Ska2干扰的稳定细胞中*CCNA1*、*CDC2*、*MAP4K4*等基因的mRNA表达水平, $*P<0.05$, $**P<0.01$,与LV-shRNA-NC组比较。

Determination of *CCNA1*, *CDC2*, *MAP4K4*, etc. mRNA levels in Ska2 silenced stable cells by RT-PCR, $*P<0.05$, $**P<0.01$ compared with LV-shRNA-NC group.

图4 细胞周期及肿瘤相关基因的表达检测

Fig.4 Determination of expression of cell cycle and tumor related genes



A: 光镜下观察迁移实验中穿过小室的细胞数量变化(100 \times); B: 细胞迁移实验细胞数量统计分析; C: 光镜下观察侵袭实验中穿过小室的细胞数量变化(100 \times); D: 细胞侵袭实验细胞数量统计分析。 $**P<0.01$,与LV-shRNA-NC组比较。

A: the number of cells that penetrating through the membrane in cell migration assay (100 \times); B: statistical analysis of cell migration assay; C: the number of cells that penetrating through the membrane in cell invasion assay (100 \times); D: statistical analysis of cell invasion assay. $**P<0.01$ compared with LV-shRNA-NC group.

图3 细胞迁移和侵袭能力分析

Fig.3 Cell migration and invasion assays

致*CCNA1*(cyclin A1)和*DHRS2*两个基因显著下调,而对*CDC2*、*RRM1*、*EPB4L3*和*NFIB*基因的表达没有明显影响(图4)。

3 讨论

在本研究中,我们采用RNAi技术构建了*Ska2*基因沉默的稳定细胞株,发现*Ska2*沉默后可导致肺癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力均明显下降。

*Ska2*是新近发现的与细胞周期调控和肿瘤的发生发展均密切相关的一个新基因^[1-2]。非常有趣的是,*Ska2*基因和我们前期发现的基因*PRR11*^[17]均定位于染色体17q23区,两者共享一个独特的双向启动子,以“头对头(head-to-head)”的方式排列形成一个基因对(gene pairs)。据推测,在人基因组中,至少有约10%的基因以这种“头对头”基因对方式进行排列组构,这种基因组方式不同于经典的真核生物基因组,类似于原核生物基因的比较紧凑、经济节约的组构方式^[14-16]。现有的研究表明,“头对头”基因对中的两个基因在功能上往往是密切相关的^[14-16]。*Ska2*基因和*PRR11*基因很可能也正是这样的一个功能相关的基因对。我们的前期研究发现,*PRR11*在细胞周期和肿瘤发生发展过程中均具有重要的作用。*PRR11*在细胞周期中呈现规律性表达,在肺癌组织中表达异常上调,且*PRR11*的表达水平与肺癌的临床分级分期和预后密切相关;采用RNAi技术抑制*PRR11*表达后,可导致细胞出现明显的S期阻滞和增殖抑制以及肺癌细胞的迁移和侵袭能力的显著降低^[17]。而关于*Ska2*基因在细胞周期中的作用,已发现它主要调控M期的进程,*Ska2*沉默后出现明显的M期阻滞^[4]。本研究的数据表明,*Ska2*基因沉默后,肺癌细胞的迁移及侵袭能力也明显减弱。综合这些研究结果不难发现,*Ska2*和*PRR11*两个基因的功能既具有一定的相关性,也有一些不同之处,非常值得深入研究。

此外,关于*Ska2*和*PRR11*两个基因的分子机制的初步研究数据也提示,两者发挥功能的具体机制也有所不同。我们前期发现,*PRR11*基因沉默后,*CCNA1*、*RRM1*、*MAP4K4*和*DHRS2*四个基因的表达均呈现显著的变化(升高或降低),而这四个基因在细胞周期进程中均具有重要作用,强烈提示*PRR11*极有可能是通过调节这四个基因的表达而参与细胞周期进程的^[17]。但本研究发现,*Ska2*基因沉

默后,仅*CCNA1*基因表达下调,而其他三个基因的表达没有变化。此外,我们前期也发现,*PRR11*基因沉默后,*NFIB*和*EPB4L3*基因的表达也有明显变化,这两个基因以及前述的*CCNA1*、*RRM1*、*MAP4K4*和*DHRS2*四个基因都已证实参与细胞癌变,且*EPB4L3*和*MAP4K4*还与癌细胞的迁移侵袭密切相关^[17]。本研究则发现,*Ska2*基因沉默后,*EPB4L3*和*MAP4K4*基因的表达没有明显变化,提示*Ska2*可能通过不同的通路调节癌细胞的迁移和侵袭,具体的分子机制仍有待进一步研究。

综上所述,本研究构建了*Ska2*基因沉默的稳定细胞株,初步证实了*Ska2*基因在肺癌细胞增殖、迁移及侵袭行为中的作用,为深入研究*Ska2*在细胞周期和肺癌中的具体作用和分子机制奠定了基础。

参考文献 (References)

- 1 杜刚,卜友泉,杨正梅,兰欢,崔涛,镇磊,等.人FAM33A基因启动子的克隆与鉴定.医学分子生物学杂志(Du Gang, Bu Youquan, Yang Zhengmei, Lan Huan, Cui Tao, Zhen Lei, et al. Cloning and identification of human FAM33A Promoter. Journal of Medical Molecular Biology) 2009; 6(3): 219-24.
- 2 Hanisch A, Sillje HH, Nigg EA. Timely anaphase onset requires a novel spindle and kinetochore complex comprising Ska1 and Ska2. EMBO J 2006; 25(23): 5504-15.
- 3 Jeyaprasanth AA, Santamaria A, Jayachandran U, Chan YW, Benda C, Nigg EA, et al. Structural and functional organization of the ska complex, a key component of the kinetochore-microtubule interface. Mol Cell 2012; 46(3): 274-86.
- 4 Shi W, Gerster K, Alajez NM, Tsang J, Waldron L, Pintilie M, et al. MicroRNA-301 mediates proliferation and invasion in human breast cancer. Cancer Res 2011; 71(8): 2926-37.
- 5 谢濛宇,张莹,张春冬,卜友泉. Ska2/FAM33A: 一个参与细胞周期调控与肿瘤发生的新基因.中国细胞生物学学报(Xie Mengyu, Zhang Ying, Zhang Chundong, Bu Youquan. Ska2/FAM33A: A novel gene implicated in cell cycle and tumorigenesis. Chinese Journal of Cell Biology) 2013; 35(2): 234-9.
- 6 Bertrand FE, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Shelton JG, White ER, et al. Synergy between an IGF-1R antibody and Raf/MEK/ERK and PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in suppressing IGF-1R-mediated growth in hematopoietic cells. Leukemia 2006; 20(7): 1254-60.
- 7 Cui QL, Almazan G. IGF-1-induced oligodendrocyte progenitor proliferation requires PI3K/Akt, MEK/ERK, and Src-like tyrosine kinases. J Neurochem 2007; 100(6): 1480-93.
- 8 Menu E, Kooijman R, van Valckenborgh E, Asosingh K, Bakus M, van Camp B, et al. Specific roles for the PI3K and the MEK/ERK pathway in IGF-1-stimulated chemotaxis, VEGF secretion and proliferation of multiple myeloma cells: Study in the 5T33MM model. Br J Cancer 2004; 90(5): 1076-83.
- 9 Zheng WH, Quirion R. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) induces the activation/phosphorylation of Akt kinase and cAMP

- response element-binding protein (CREB) by activating different signaling pathways in PC12 cells. *BMC Neurosci* 2006; 7: 51.
- 10 Rice L, Waters CE, Eccles J, Garside H, Sommer P, Kay P, *et al.* Identification and functional analysis of SKA2 interaction with the glucocorticoid receptor. *J Endocrinol* 2008; 198(3): 499-509.
- 11 Lu Z, Li Y, Takwi A, Li B, Zhang J, Conklin DJ, *et al.* miR-301a as an NF-kappaB activator in pancreatic cancer cells. *EMBO J* 2011; 30(1): 57-67.
- 12 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-8.
- 13 张春冬, 王义涛, 张莹, 李轶, 朱慧芳, 蔡伟, 等. 抑制PRR11基因表达对H1299细胞周期的影响. *中国细胞生物学学报* (Zhang Chundong, Wang Yitao, Zhang Ying, Li Yi, Zhu Huifang, Cai Wei, *et al.* RNAi-mediated PRR11 depletion influences cell cycle regulation in lung cancer H1299 cells. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2013; 35(8): 1133-40.
- 14 Clay Wakano, Jung S, Byun, Li-Jun Di, Kevin Gardner. The dual lives of bidirectional promoters. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1819: 688-93.
- 15 Adachi N, Lieber MR. Bidirectional gene organization: A common architectural feature of the Human genome. *Cell* 2002; 109: 807-9.
- 16 Zanutto E, Shah ZH, Jacobs HT. The bidirectional promoter of two genes for the mitochondrial translational apparatus in mouse is regulated by an array of CCAAT boxes interacting with the transcription factor NF-Y. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(2): 664-77.
- 17 Ji Y, Xie M, Lan H, Zhang Y, Long Y, Weng H, *et al.* PRR11 is a novel gene implicated in cell cycle progression and lung cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45(3): 645-56.