

改变IFT57表达水平对结肠癌SW480细胞增殖的影响及其分子机制

吴 剑^{1,2} 贾亚春¹ 彭 琳¹ 聂睿智¹ 王 萌¹ 李诗琴¹ 王 伟¹ 陈扬辉¹ 吴君颖¹ 潘泽政^{1*}
(¹南昌大学医学院, 南昌 330006; ²江西医学高等专科学校, 上饶 334000)

摘要 IFT57是一种纤(鞭)毛内转运蛋白,其功能与信号通路的转导相关。该研究通过改变IFT57表达水平后,观察其对结肠癌SW480细胞增殖能力的影响,探讨IFT57基因改变SW480增殖能力的分子机制。首先,构建IFT57过表达及干扰质粒,分别转染结肠癌SW480细胞株后,采用Real-time PCR及Western blot技术检测Hedgehog信号通路关键转录因子*Gli1*、主要靶基因*CyclinD1*的表达水平变化;采用CCK-8法及BrdU法检测SW480活性及增殖能力的情况。成功构建了IFT57高表达质粒及3个shRNA质粒并筛选出干扰效率最高的1个($P<0.05$)。将IFT57过表达质粒转染SW480细胞株后,Hedgehog信号通路活性升高,细胞活性和增殖能力增强($P<0.05$);当沉默IFT57表达后,Hedgehog信号通路活性下降,细胞的活性及增殖能力降低($P<0.05$)。以上结果提示,IFT57表达水平可影响结肠癌SW480细胞株活性及增殖能力,其可能机制是通过调控Hedgehog信号通路活性来影响SW480细胞的增殖活力。

关键词 结肠癌细胞; IFT57; Hedgehog信号通路; 细胞增殖

The Effect of IFT57 Expression Level Change on the Proliferation of Colon Carcinoma SW480 Cells and Its Molecular Mechanism

Wu Jian^{1,2}, Jia Yachun¹, Peng Lin¹, Nie Ruizhi¹, Wang Meng¹, Li Shiqin¹, Wang Wei¹,
Chen Yanghui¹, Wu Junying¹, Pan Zezheng^{1*}
(¹Medical College, Nanchang University, Nanchang 330006, China;
²Medical Laboratory Staff Room of Jiangxi Medical College, Shangrao 334000, China)

Abstract IFT57 is one of intraflagellar transport protein in cilia, whose function is implicated with the conduction of signaling pathway. The aim of this study was to investigate the effect on viability and proliferation of colon carcinoma SW480 and explore the possible molecular mechanism when the expression level of IFT57 was altered in SW480 cells. We altered the expression level of IFT57 in SW480 cells by transfecting pcDNA3.1-IFT57 or shRNA pcDNA6.2-IFT57. The key molecular *Gli1* and target gene *CyclinD1* of Hedgehog signaling pathway were detected by Real-time PCR and Western blot. The cell viability and proliferation of SW480 were determined by CCK-8 and BrdU assay, respectively. The results showed that the activity of Hedgehog signaling pathway had been changed along with the expression level of IFT57 ($P<0.05$). The viability and proliferation of SW480 were increased along with the elevated expression level of IFT57 ($P<0.05$), and SW480 was inhibited after the decreased

收稿日期: 2015-11-25 接受日期: 2016-01-22

江西省自然科学基金(批准号: 20142BAB205069、20142BAB205002)和江西省卫生厅科技计划(批准号: 20121156)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0791-86360581, E-mail: panzz@ncu.edu.cn

Received: November 25, 2015 Accepted: January 22, 2016

This work was supported by the Natural Science Foundation of Jiangxi Province (Grant No.20142BAB205069, 20142BAB205002) and Program of the Department of Public Health of Jiangxi Province (Grant No.20121156)

*Corresponding author. Tel: +86-791-86360581, E-mail: panzz@ncu.edu.cn

网络出版时间: 2016-03-11 16:13:13 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160311.1613.002.html>

expression level of IFT57 ($P < 0.05$). Our results indicated that IFT57 could alter the viability and proliferation of SW480, and the possible molecular mechanism might alter the activity of Hedgehog signaling pathway to contribute the viability and proliferation ability of SW480 cells.

Keywords colon carcinoma; IFT57; Hedgehog pathway; cell proliferation

Hedgehog(Hh)蛋白质首次被发现于果蝇体内, 现已证实哺乳动物中存在3种Hh同源蛋白质, 这些蛋白质通过Hh信号通路参与胚胎期的细胞增殖与分化、组织发育及疾病发生等^[1]。经典的Hh信号通路由4个核心组分组成: 分泌性蛋白配体Hh、膜受体复合物Ptch和Smo、核转录因子Gli及通路靶基因(如Hh、CyclinD1、Bcl-2)等^[2]。Hh信号通路的活性主要由转录因子Gli决定, 在哺乳动物中, 已发现3种Gli蛋白: Gli1、Gli2及Gli3。其中, Gli1主要起转录激活作用, Gli2具有转录激活与抑制双重功能, 而Gli3主要起转录抑制作用^[3]。因此, 当Gli1表达水平升高时, 意味着Hh通路活性的激活, 典型的Hh信号通路通过对转录因子Gli的作用, 调控靶基因的表达水平而发挥功能^[4]。

纤(鞭)毛是基于微管组成的细胞表面细微突出结构, 由基底部向顶部生长, 存在于体内几乎所有类型的细胞, 其重要功能之一是感受细胞外来信号并进行信号转导。Kozminski等^[5]观察到在衣滴虫目的鞭毛上有颗粒沿着鞭毛由基底部向顶部移动并最终回到底部, 并随之把这种特殊的运输物质方式命名为纤(鞭)毛内转运(intraflagellar transport, IFT), 而把这种颗粒命名为IFT蛋白复合物。IFT蛋白质目前发现至少有20种以上, 分为IFT-A和IFT-B两种复合物, 其功能是沿轴丝微管进行双向物质运输: 基底至纤(鞭)毛顶端的正向运输和顶端到基底的逆向运输。在机体发育、细胞增殖与分化等过程中, IFT复合物参与了细胞内的各种蛋白质或分子的运输, 是各种信号通路的感知中心, 调控着各种信号通路的转导, 其中比较典型的有Hh信号通路和Wnt信号通路^[6]。IFT出现功能缺陷时可引起各种纤(鞭)毛疾病, 是许多类型肿瘤发生发展的重要决定因素^[7-8]。

研究表明, 在多种肿瘤中存在Hh信号通路的异常激活现象。结肠癌是恶性程度较高、预后较差的消化道肿瘤之一, 随着膳食中肉类食物摄入的增加及食品添加剂的广泛使用, 结肠癌在我国的发病率直线上升。研究证实, 成年的结肠组织中Hh组分活性较低^[9], 但在结肠癌细胞中却检测到Hh组分的异

常高表达现象, 因此推测Hh信号通路的活化与结肠癌的发生发展有密切关联^[10-11]。鉴于IFT在信号转导中的重要作用, 其功能的异常有可能引起Hh信号通路的活性改变, 从而影响肿瘤的发生发展。IFT57是IFT蛋白复合物IFT-B的组成元件之一, 广泛表达于真核生物细胞中, 其对纤(鞭)毛的维持和对IFT颗粒的双向运输是必需的。Houde等^[12]研究发现, IFT57是Hh信号通路的重要组成成分之一, 对Shh信号介导的神经管发育是必需的, 当缺乏IFT57时, Hh信号通路受到较大损伤。在针对人类基因组广谱RNAi分析后发现, 当抑制IFT57表达后, Hh信号通路活性受到抑制^[13]。为进一步探讨IFT57是否通过Hh信号通路影响肿瘤的发生发展, 我们利用结肠癌细胞株, 采用IFT57过表达质粒及shRNA干扰质粒转染细胞后, 观察Hh组分的表达改变及对细胞活性或增殖能力的影响。目前, 针对IFT57基因的研究较少, 本研究将有助于加深对IFT57功能的认识, 为进一步拓展IFT57的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 人类结肠癌细胞株HT-29、SW480、HCT116购自中国典型培养物保藏委员会细胞库。

1.1.2 主要试剂 DMEM培养基、胎牛血清购自Solarbio公司。胰蛋白酶购自Gibco公司。RIPA蛋白裂解液购自Beyotime公司。质粒pcDNA3.1/myc-His、pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR、pcDNA6.2-GW/EmGFP-Con和Trizol试剂购自Life Technology公司。兔抗人IFT57、CyclinD1、Gli1、GAPDH抗体购自Boster公司。BrdU抗体及BCA蛋白定量试剂盒购自Boster公司。RT-PCR及Real-time PCR试剂盒购自TaKaRa公司。DNA内切酶及连接酶、蛋白预染Marker等购自Fermentas公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 实验所用3株细胞均用含10%胎牛血清的DMEM培养基于37 °C、5% CO₂恒温培养

箱常规培养, 细胞密度达80%~90%时进行传代。

1.2.2 质粒构建 根据IFT57基因(NM_018010)的Coding sequence(CDS)设计引物, 克隆全长CDS, 按常规基因克隆技术, 采用质粒pcDNA3.1/myc-His构建IFT57高表达载体, 命名为pcDNA3.1-IFT57; 根据Life Technology公司在线软件设计3条shRNA干扰片段, 用于沉默IFT57的mRNA表达, 采用pcDNA6.2-GW/EmGFP构建3个干扰质粒pcDNA6.2-IFT57, 分别命名为IFT57-363、IFT57-755、IFT57-1043。DNA序列见表1。

1.2.3 最佳干扰质粒筛选 人胚肾293T细胞传代铺6孔板, 使转染实验前细胞密度达50%~60%。4个质粒(3个pcDNA6.2-IFT57质粒及pcDNA6.2-Con质粒)与pcDNA3.1-IFT57按3:1(6 μg:2 μg)的比例, 采用磷酸钙沉淀法共转染293T细胞, 24 h后更换新鲜培养基。继续培养48 h后, 收集细胞, 提取总蛋白, Western blot检测IFT57的蛋白质水平, 从中筛选最佳干扰质粒, 实验重复3次。

1.2.4 检测IFT57表达对Hh通路的影响 收集对数生长期结肠癌细胞, 调整细胞密度铺板于6孔板, 24 h后细胞密度约为50%~60%。设置4组细胞: pcDNA3.1-Con组、质粒pcDNA3.1-IFT57组、pcDNA6.2-Con组和pcDNA6.2-IFT57组。采用脂质体法转染细胞, 质粒转染量均为2 μg/孔, 6~24 h后更

换正常培养基, 继续培养细胞48 h, 提取总RNA及蛋白质, 检测Hh通路重要组分*Gli1*、靶基因*CyclinD1*的表达情况, 实验重复3次。

1.2.5 细胞总RNA提取及逆转录 转染48 h后收集细胞, 采用Trizol法提取总RNA: 6孔板中按1 mL/孔加入Trizol, 充分溶解细胞后, 按常规方法提取总RNA, 最后用无核酶水溶解RNA, 定量备用。逆转录前, 采用TaKaRa公司的PrimeScript Kit with gDNA Eraser试剂去除残留的基因组DNA, 再逆转录生成cDNA, -20 °C保存。

1.2.6 Real-time PCR 采用TaKaRa公司的SYBR Premix试剂, 引物终浓度为0.4 μmol/L, cDNA用量为1~10 ng。反应条件: 启动温度95 °C 30 s; 二步法PCR, 共40个循环, 95 °C 5 s, 60 °C 60 s, 实验重复3次。引物序列见表2。

1.2.7 蛋白液收集及Western blot 转染48 h后收集细胞, 采用RIPA Buffer裂解细胞: 冰上放置15 min, 细胞刮收集细胞, 4 °C、12 000 r/min离心15 min, 吸取上清蛋白液, BCA定量后, 按比例添加6×Protein Loading Buffer, 沸水煮3~5 min, 进行SDS-PAGE胶电泳, 常规Western blot, 实验重复3次。

1.2.8 CCK-8检测细胞活性 细胞培养至对数期后, 细胞按约1 200/孔铺板于96孔平底培养板, 24 h后进行转染实验。实验分为2组: IFT57高表达组,

表1 IFT57克隆PCR引物及干扰片段DNA序列

Table 1 DNA sequences used for PCR or RNAi of IFT57

基因 Gene	DNA序列(5'→3') DNA sequence (5'→3')	基因编号 Gene number
IFT57	Forward: GCG CGG ATC CAT GAC TGC TGC TCT GGC Reverse: CCG GAA TTC ATA AAA GCC TGT TGC TGG TTC	NM_018010
IFT57-363	CTC TTG CTG CTT GGT TGA TTA	NM_018010
IFT57-755	ATG AAC GAG ACT GCC AAA CAA	NM_018010
IFT57-1043	CAA GAA TAT CGT GCA GCT CAA	NM_018010

表2 Real-time PCR的引物序列

Table 2 Primer sequences used for Real-time PCR

基因 Genes	引物序列(5'→3') Primer Sequence (5'→3')	基因编号 Gene number
IFT57	Forward: TCT TGA TTG CTT CGC TGA AGA A Reverse: GCA GTC TCG TTC ATA TCC AAG TG	NM_018010
<i>Gli1</i>	Forward: AGC GTG AGC CTG AAT CTG TG Reverse: CAG CAT GTA CTG GGC TTT GAA	NM_005269
<i>CyclinD1</i>	Forward: GCT GCG AAG TGG AAA CCA TC Reverse: CCT CCT TCT GCA CAC ATT TGA A	NM_053056
<i>GADPH</i>	Forward: GGA GCG AGA TCC CTC CAA AAT Reverse: GGC TGT TGT CAT ACT TCT CAT GG	NM_002046

以pcDNA3.1-Con作为对照组, pcDNA3.1-IFT57按5 ng/孔、10 ng/孔、20 ng/孔及40 ng/孔浓度转染细胞; IFT57干扰组, 以pcDNA6.2-Con作为对照组, pcDNA6.2-IFT57按10 ng/孔、20 ng/孔、40 ng/孔及80 ng/孔浓度转染细胞, 每孔设置5个复孔。培养72 h后, 按每孔添加10 μ L CCK溶液, 培养箱孵育2~4 h, 酶标仪450 nm处测吸光值(D), 实验重复3次。

1.2.9 BrdU法检测细胞增殖 结肠癌细胞按1 200/孔铺96孔板, 24 h后进行转染细胞, 实验分组同1.2.7。转染后培养72 h, 加入BrdU(终浓度100 μ mol/L)继续培养12 h, PBS洗后70%乙醇固定1 h, 加入BrdU一抗4 $^{\circ}$ C过夜, 之后按常规操作, 最后450 nm处测吸光值(D), 分别以空载质粒为对照组, 检测结肠癌细胞增殖情况, 实验重复3次。

1.3 统计学处理

应用SPSS 18.0统计软件进行数据分析, 计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 行方差分析, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结肠癌细胞系表达IFT57及Hh信号通路重要组分的检测

从3株结肠癌细胞HT-29、SW480和HCT116中分别提取总RNA及蛋白质, 通过Real-time PCR及Western blot检测IFT57、Gli1、CyclinD1各自

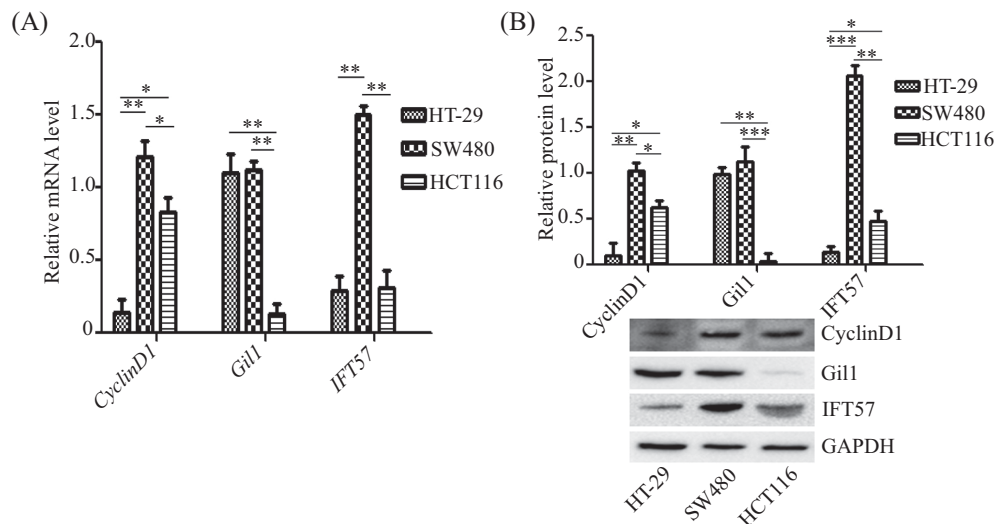
的mRNA及蛋白质水平(图1)($P<0.05$)。结果显示, IFT57均表达于3株细胞, 但以SW480细胞株表达最高。Hh重要组分中, Gli1、CyclinD1表达在SW480最强。

2.2 筛选IFT57 mRNA最佳干扰片段

我们提取了结肠癌细胞株总RNA, 以逆转录后的cDNA为模板, 扩增IFT57全长CDS, 克隆入pcDNA3.1/myc-His, 构建IFT57高表达载体, 经琼脂糖电泳及酶切鉴定(图2A), 成功构建了重组质粒。另外, 成功构建了针对IFT57基因mRNA的3个干扰质粒, 经测序确认正确后与pcDNA3.1-IFT57共转染293T细胞。结果显示, 3个干扰质粒对IFT57 mRNA均有沉默效果, 但沉默效果差异较大, 其中IFT57-363沉默效果最好, 达80%以上, 而IFT57-755的沉默效果较差, 只有20%左右(图2B和图2C)($P<0.05$)。

2.3 改变IFT57表达水平对Hh通路的影响

我们选用SW480细胞株作为研究对象, 通过转染pcDNA3.1-IFT57过表达质粒组及IFT57-363干扰质粒组, 在改变IFT57表达水平后, Hh重要组分Gli1、CyclinD1的表达水平也发生了相应改变(图3)。与pcDNA3.1-Con组相比, 质粒pcDNA3.1-IFT57组对Hh通路活性有一定影响, 在IFT57蛋白质水平表达上调后, Gli1和CyclinD1的表达水平也呈现上升趋势(图3A和图3B)($P<0.05$)。与之相对应, 与pcDNA6.2-Con组相比, IFT57-363干扰组对Hh通路活性有一定的抑制,

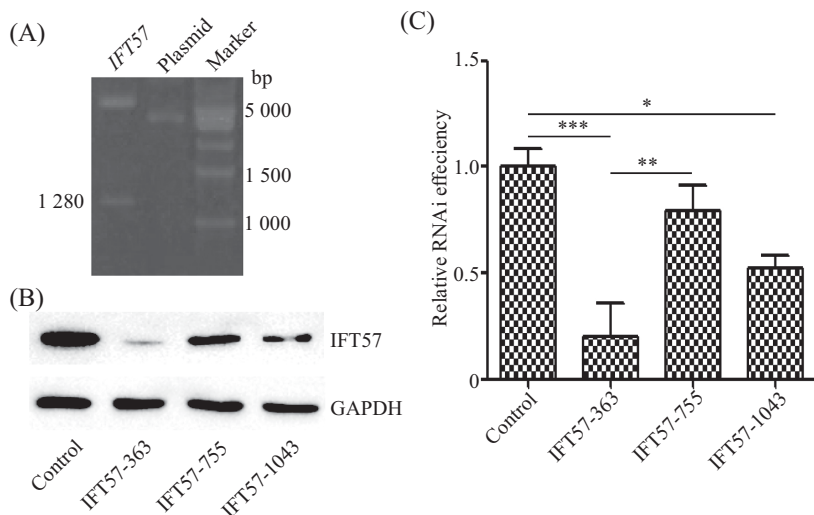


A: Real-time PCR检测IFT57、Gli1及CyclinD1在3株细胞中mRNA的相对表达水平; B: Western blot检测IFT57、Gli1及CyclinD1在3株细胞中的蛋白相对表达水平。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: the mRNA expression level of IFT57, Gli1 and CyclinD1 in three kinds of colon carcinoma cells by Real-time PCR; B: the protein expression level of IFT57, Gli1 and CyclinD1 in three kinds of colon carcinoma cell by Western blot. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图1 结肠癌细胞株HT-29、SW480和HCT116中IFT57、Gli1及CyclinD1的表达情况

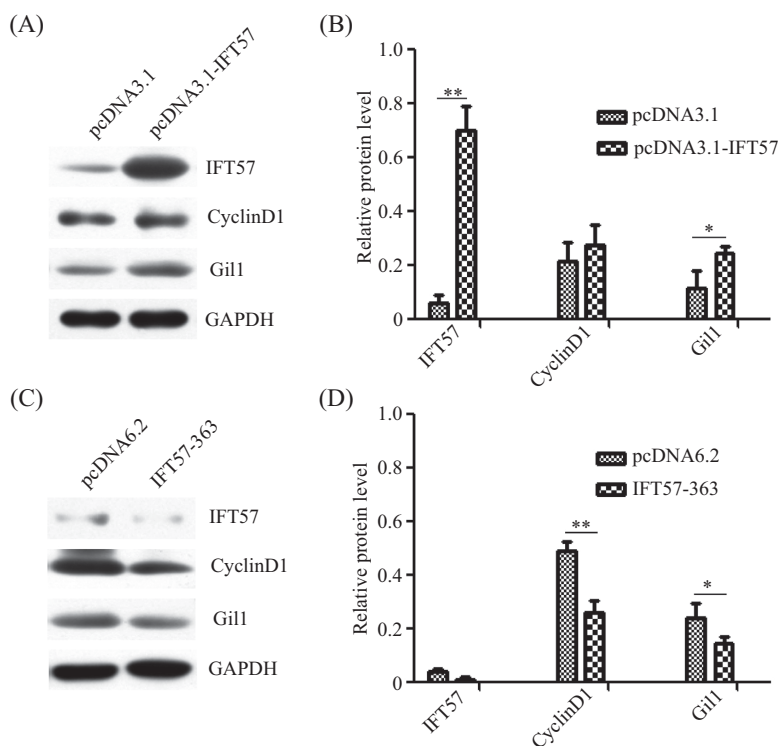
Fig.1 The mRNA and protein levels of IFT57, Gli1 and CyclinD1 in colon carcinoma cell HT-29, SW480 and HCT116



A: *IFT57*过表达质粒的构建及酶切鉴定; B,C: Western blot检测IFT57被沉默后的相对表达量。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。
A: the construction and identification of *IFT57* over expression plasmid; B,C: the protein relative expression of *IFT57* after RNAi by Western blot. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图2 最佳IFT57干扰片段的筛选

Fig.2 The selection of highest silencing efficiency sequence for *IFT57*



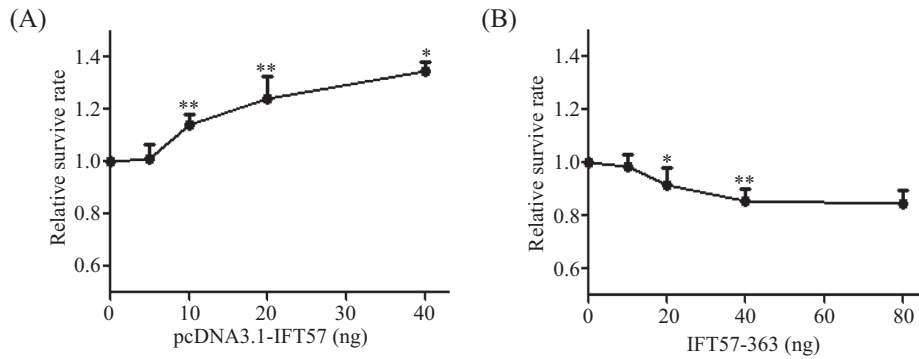
A: 转染pcDNA3.1-IFT57质粒后, Western blot检测Gli1、CyclinD1蛋白质在SW480细胞内的表达情况; B: A的灰度值相对分析; C: 转染IFT57-363质粒后, Western blot检测Gli1、CyclinD1蛋白质在SW480细胞内的表达情况; D: C的灰度值相对分析。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
A: the protein level of Gli1, CyclinD1 were detected by Western blot after transfected pcDNA3.1-IFT57 into SW480; B: the relative gray value analysis of A; C: the protein level of Gli1, CyclinD1 were detected by Western blot after transfected IFT57-363 into SW480; D: the relative gray value analysis of C. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图3 改变IFT57基因表达后对Hedgehog信号通路的影响

Fig.3 The activity of Hedgehog signaling pathway changed after altered *IFT57* gene expression level in SW480 cells

在沉默IFT57的mRNA后, Gli1和CyclinD1表达水平出现降低现象(图3C和图3D)($P < 0.05$)。

2.4 IFT57表达水平改变对结肠癌细胞活性影响
IFT57蛋白质水平改变后, 对SW480细胞株的活

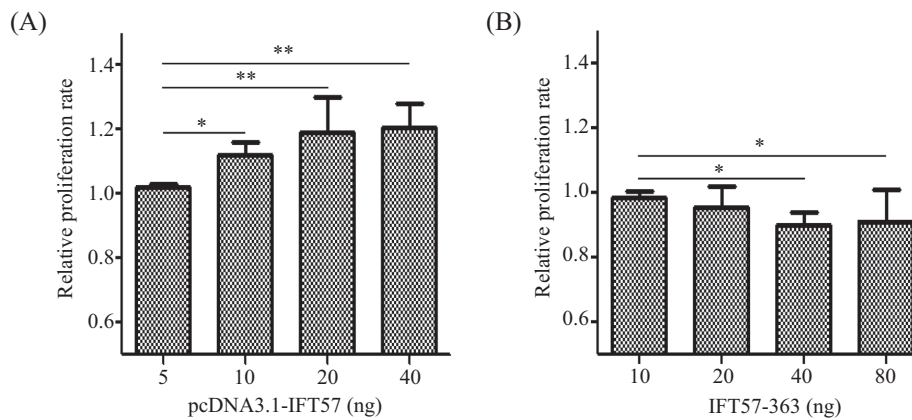


A: 转染pcDNA3.1-IFT57质粒后, CCK-8法检测对SW480细胞的生存率的影响; B: 转染IFT57-363质粒后, CCK-8法检测对SW480细胞的生存率的影响。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组比较。

A: the relative survive rate of SW480 cells was detected by CCK-8 after transfected pcDNA3.1-IFT57 into SW480; B: the relative survive rate of SW480 cells was detected by CCK-8 after transfected IFT57-363 into SW480. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

图4 CCK-8法检测SW480细胞的活性

Fig.4 The viability of SW480 determined by CCK-8



A: 转染pcDNA3.1-IFT57质粒后, BrdU法检测对SW480细胞的增殖能力的影响; B: 转染IFT57-363质粒后, BrdU法检测对SW480细胞的增殖能力的影响。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: the relative proliferation rate of SW480 cells was detected by BrdU after transfected pcDNA3.1-IFT57 into SW480; B: the relative proliferation rate of SW480 cells was detected by BrdU after transfected IFT57-363 into SW480. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图5 IFT57对SW480细胞的增殖能力的影响

Fig.5 The effect of IFT57 on the proliferation ability in SW480 cells

性有一定影响(图4)。pcDNA3.1-IFT57加入量为5 ng组对细胞活性影响不大,但10 ng组对细胞活性有一定提高,而20 ng、40 ng组对细胞活性增强有显著提升(图4A)($P < 0.05$)。IFT57-363干扰质粒加入量为10 ng组对细胞活性有轻微影响,而20 ng组、40 ng组抑制细胞活性明显,80 ng组抑制率与40 ng组持平(图4B)($P < 0.05$)。

2.5 IFT57表达水平改变对结肠癌细胞增殖的影响

我们通过BrdU实验检测了结肠癌细胞株的增殖能力。pcDNA3.1-IFT57加入量为5 ng组对细胞增殖影响不大,但10 ng组、20 ng组对细胞增殖有一定促进作用,而40 ng组对细胞的增殖达到一定的峰值(图5A)($P < 0.05$)。IFT57-363干扰质粒加入量为10 ng组、20 ng组对细胞增殖抑制作用不明显,40 ng组抑

制细胞增殖率降至91%左右,80 ng组抑制率与40 ng组相似(图5B)($P < 0.05$)。

3 讨论

作为经典的信号通路之一, Hh信号通路对细胞结构的发育和维持起着至关重要的作用, Hh可以维持正常细胞的增殖及分化,一旦机体出现信号通路失调,则可引起多种类型的肿瘤,比如典型的有结肠癌^[14-15]、胰腺癌^[16]、基底细胞癌^[17]、神经胶质瘤^[18]和乳腺癌^[19-20]等。纤(鞭)毛通常被认为是原始运动纤毛的退化器官,因此没有任何功能。但近年来研究发现,纤(鞭)毛参与了细胞内信号转导等一系列细胞过程^[21-22],而Hh信号转导需要纤(鞭)毛的参与^[23],两者中任何一个出现异常将导致许多疾病的发生。纤(鞭)

毛的组装、维持和解聚主要由IFT颗粒执行, IFT颗粒沿着轴丝微管进行双向物质运输而行使功能。研究表明, 在哺乳动物细胞中, Hh通路成分Ptch、Smo及下游转录因子Gli均存在于纤(鞭)毛上, 在没有Hh时, Ptch聚集在纤(鞭)毛, 防止Smo进入纤(鞭)毛; 当存在Hh时, 可以与Ptch结合并促使其离开纤(鞭)毛, Smo得以进入纤(鞭)毛并启动下游基因的表达^[24]。IFT蛋白质颗粒是Hh通路成分进出纤(鞭)毛所必需的, 因此IFT颗粒的功能与Hh信号转导通路关系密切。

作为IFT蛋白复合物IFT-B的亚基之一, IFT57对维持纤(鞭)毛的长度及功能具有重要作用^[25-27], 其功能的异常与一些疾病的发生相关^[28-29], 此外, IFT57也被发生在神经胶质瘤中发挥作用^[30]。鉴于Hh信号通路在结肠癌中存在高度活化现象, 我们以结肠癌细胞株作为研究对象, 通过改变IFT57基因在细胞中的表达水平, 探讨IFT57与Hh信号通路之间的关联。

本文选用了HT-29、SW480、HCT116等3株人结肠癌细胞株进行实验。首先, 检测了IFT57及Hh通路关键分子Gli1、CyclinD1在3株细胞中的表达情况。结果显示, IFT57在3株结肠癌细胞中都有表达, 但以SW480表达相对最高; Hh通路重要组分在3株细胞中的表达水平各有差异。综合考虑, 后续实验选择IFT57表达最高及Hh组分表达相对完整的SW480细胞株进行研究。

根据IFT57的CDS, 我们构建了pcDNA3.1-IFT57高表达质粒(图2A)及pcDNA6.2-IFT57干扰质粒。通过转染293T细胞观察干扰质粒对IFT57的沉默效果, 结果显示, 3个质粒都能够下调IFT57的mRNA水平, 但以IFT57-363对IFT57的mRNA降解效果最好, 达到了80%左右, 因此, 我们选择IFT57-363作为干扰质粒进行接下来的研究。

为了观察IFT57是否对Hh信号通路有影响, 我们将IFT57过表达质粒及干扰质粒共转染IFT57表达相对最高的结肠癌SW480细胞株。转染48 h后, 提取总蛋白质, 结果显示, IFT57在细胞中过表达后, Hh信号通路中Gli1的表达水平呈现一定的升高, CyclinD1的表达水平却未见明显升高。导致这种现象的原因可能是由于将表达IFT57质粒转染入细胞内后, 细胞内IFT57蛋白质水平明显升高, 而IFT57作为一种纤毛转运蛋白, 参与了细胞内信号通路的转导, 因而对Hh信号通路起激活作用, 其直接作用表

现为Gli1转录因子的表达水平明显增高; CyclinD1作为Hh信号通路的靶基因之一, 当通路被激活后, 也会有一定程度的表达上升, 但表达水平上升未必与通路的活化之间呈正比例关系。相反, 通过RNA干扰技术沉默IFT57的表达后, 对通路也存在抑制作用, 表现为Gli1、CyclinD1的相应降低。结果证实了IFT57作为一种运输蛋白, 在Hh通路的转导过程中发挥了重要的作用, 而且对整个通路是起着正调控的作用。

随后, 通过CCK-8比色法检测SW480的活性和BrdU法检测SW480的增殖情况, 结果显示, SW480的活性和增殖能力相应增强。虽然在SW480细胞过表达IFT57后, CyclinD1的表达水平未见明显升高, 但由于与细胞增殖相关的基因主要有CyclinD1、CyclinD2、FOXM1、Bcl-2、FOX2等, 这些靶基因产物在Hedgehog信号通路调控细胞增殖与分化中都起到重要作用。而且, 细胞的活性与增殖能力与多个细胞周期蛋白表达上升有关, 是多个基因产物共同作用的结果。因此, Hh信号通路在活化后有可能也增强了其它靶基因的表达, 虽然CyclinD1表达水平未明显上升, 但多个靶基因被激活后, 仍可能最终增强了细胞的活性和增殖能力。总之, 本研究结果显示, 转运蛋白IFT57表达水平的改变, 影响了SW480细胞株的活性和增殖能力。

综上所述, 本研究实验发现, IFT57在3株结肠癌细胞株中均有表达, 作为纤(鞭)毛的内源性运输蛋白质之一, IFT57表达水平可以影响Hh信号通路的活性, 其机制之一有可能是通过调控Hh信号通路的活性从而影响结肠癌SW480细胞的活性和增殖能力, 有助于为深入研究IFT57蛋白质功能提供基础。

参考文献 (References)

- 1 Villavicencio EH, Walterhouse DO, Iannaccone PM. The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. *Am J Hum Genet* 2000; 67(5): 1047-54.
- 2 Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: Functions and mechanisms. *Gene Dev* 2008; 22(18): 2454-72.
- 3 Falkenstein KN, Vokes SA. Transcriptional regulation of graded Hedgehog signaling. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 33: 73-80.
- 4 Humke EW, Dorn KV, Milenkovic L, Scott MP, Rohatgi R. The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between suppressor of fused and the Gli proteins. *Gene Dev* 2010; 24(7): 670-82.
- 5 Kozminski KG, Johnson KA, Forscher P, Rosenbaum JL. A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(12): 5519-23.

- 6 Pedersen LB, Rosenbaum JL. Intraflagellar transport (IFT) role in ciliary assembly, resorption and signalling. *Curr Top Dev Biol* 2008; 85: 23-61.
- 7 Clement CA, Larsen LA, Christensen ST. Using nucleofection of siRNA constructs for knockdown of primary cilia in P19.CL6 cancer stem cell differentiation into cardiomyocytes. *Method Cell Biol* 2009; 94: 181-97.
- 8 Ko HW. The primary cilium as a multiple cellular signaling scaffold in development and disease. *BMB Rep* 2012; 45(8): 427-32.
- 9 van Den Brink GR, Peppelenbosch MP. Expression of hedgehog pathway components in the adult colon. *Gastroenterology* 2006; 130(2): 619.
- 10 Yoshimoto AN, Bernardazzi C, Carneiro AJ, Elia CC, Martinusso CA, Ventura GM, *et al.* Hedgehog pathway signaling regulates human colon carcinoma HT-29 epithelial cell line apoptosis and cytokine secretion. *PLoS One* 2012; 7(9): e45332.
- 11 Cai X, Yu K, Zhang L, Li Y, Li Q, Yang Z, *et al.* Synergistic inhibition of colon carcinoma cell growth by Hedgehog-Gli1 inhibitor arsenic trioxide and phosphoinositide 3-kinase inhibitor LY294002. *Oncotargets Ther* 2015; 8: 877-83.
- 12 Houde C, Dickinson RJ, Houtzager VM, Cullum R, Montpetit R, Metzler M, *et al.* Hipp1 is essential for node cilia assembly and Sonic hedgehog signaling. *Dev Biol* 2006; 300(2): 523-33.
- 13 Jacob LS, Wu X, Dodge ME, Fan CW, Kulak O, Chen B, *et al.* Genome-wide RNAi screen reveals disease-associated genes that are common to Hedgehog and Wnt signaling. *Sci Signal* 2011; 4(157): ra4.
- 14 Wang H, Ke F, Zheng J. Hedgehog-glioma-associated oncogene homolog-1 signaling in colon cancer cells and its role in the celecoxib-mediated anti-cancer effect. *Oncol Lett* 2014; 8(5): 2203-08.
- 15 Wang ZC, Gao J, Zi SM, Yang M, Du P, Cui L. Aberrant expression of sonic hedgehog pathway in colon cancer and melanosis coli. *J Digest Dis* 2013; 14(8): 417-24.
- 16 Qin Y, Ma Z, Dang X, Li W, Ma Q. Effect of resveratrol on proliferation and apoptosis of human pancreatic cancer MIA PaCa-2 cells may involve inhibition of the Hedgehog signaling pathway. *Mol Med Rep* 2014; 10(5): 2563-7.
- 17 Otsuka A, Dreier J, Cheng PF, Nageli M, Lehmann H, Felderer L, *et al.* Hedgehog pathway inhibitors promote adaptive immune responses in basal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2015; 21(6): 1289-97.
- 18 Yan GN, Lv YF, Yang L, Yao XH, Cui YH, Guo DY. Glioma stem cells enhance endothelial cell migration and proliferation via the Hedgehog pathway. *Oncol Lett* 2013; 6(5): 1524-30.
- 19 Bao C, Namgung H, Lee J, Park HC, Ko J, Moon H, *et al.* Daidzein suppresses tumor necrosis factor-alpha induced migration and invasion by inhibiting hedgehog/Gli1 signaling in human breast cancer cells. *Journal Agr Food Chem* 2014; 62(17): 3759-67.
- 20 Zhuang Z, Wang K, Cheng X, Qu X, Jiang B, Li Z, *et al.* LKB1 inhibits breast cancer partially through repressing the Hedgehog signaling pathway. *PLoS One* 2013; 8(7): e67431.
- 21 Eguether T, San Agustin JT, Keady BT, Jonassen JA, Liang Y, Francis R, *et al.* IFT27 links the BBSome to IFT for maintenance of the ciliary signaling compartment. *Dev Cell* 2014; 31(3): 279-90.
- 22 Kornberg TB. The contrasting roles of primary cilia and cytonemes in Hh signaling. *Dev Biol* 2014; 394(1): 1-5.
- 23 Kim J, Hsia EY, Brigui A, Plessis A, Beachy PA, Zheng X. The role of ciliary trafficking in Hedgehog receptor signaling. *Sci Signal* 2015; 8(379): ra55.
- 24 Milenkovic L, Weiss LE, Yoon J, Roth TL, Su YS, Sahl SJ, *et al.* Single-molecule imaging of Hedgehog pathway protein Smoothed in primary cilia reveals binding events regulated by Patched1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(27): 8320-5.
- 25 Sarmah B, Winfrey VP, Olson GE, Appel B, Wente SR. A role for the inositol kinase Ipk1 in ciliary beating and length maintenance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(50): 19843-8.
- 26 Omori Y, Chaya T, Katoh K, Kajimura N, Sato S, Muraoka K, *et al.* Negative regulation of ciliary length by ciliary male germ cell-associated kinase (Mak) is required for retinal photoreceptor survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(52): 22671-6.
- 27 Krock BL, Perkins BD. The intraflagellar transport protein IFT57 is required for cilia maintenance and regulates IFT-particle-kinesin-II dissociation in vertebrate photoreceptors. *J Cell Sci* 2008; 121(Pt 11): 1907-15.
- 28 Sukumaran S, Perkins BD. Early defects in photoreceptor outer segment morphogenesis in zebrafish *ift57*, *ift88* and *ift172* intraflagellar transport mutants. *Vision Res* 2009; 49(4): 479-89.
- 29 Karam A, Tebbe L, Weber C, Messaddeq N, Morle L, Kessler P, *et al.* A novel function of Huntingtin in the cilium and retinal ciliopathy in Huntington's disease mice. *Neurobiol Dis* 2015; 80: 15-28.
- 30 Gdynia G, Lehmann-Koch J, Sieber S, Tagscherer KE, Fassel A, Zentgraf H, *et al.* BLOC1S2 interacts with the HIPPI protein and sensitizes NCH89 glioblastoma cells to apoptosis. *Apoptosis* 2008; 13(3): 437-47.