

STIL通过CDK1促进结肠癌细胞增殖

刘继伟¹ 师磊² 彭际奎³ 王燕利³ 黄东琴³ 王永强^{3*}

¹包头医学院, 包头 014040; ²内蒙古自治区人民医院, 临床营养中心, 呼和浩特 010010;

³内蒙古自治区人民医院, 胃肠外科, 呼和浩特 010010)

摘要 该文旨在研究沉默STIL对结肠癌细胞增殖能力的影响及分子机制。构建携带靶向STIL的短发夹RNA(shRNA-STIL, shSTIL)及对照组(shCtrl)慢病毒, 处理结肠癌细胞, 利用嘌呤霉素抗性筛选STIL沉默的稳定转染株细胞。STIL沉默后, 以CCK-8检测细胞增殖情况; 平板克隆检测克隆形成能力; 流式细胞术检测细胞周期分布及凋亡细胞比例的变化。以STIL沉默的结肠癌细胞构建裸鼠皮下移植瘤模型, 观察STIL沉默对裸鼠成瘤能力的影响。与对照组相比, STIL敲减组结肠癌细胞增殖、克隆形成能力显著降低($P<0.05$), 凋亡细胞比例显著增高($P<0.001$), 以及被阻滞于G₂/M期的细胞比例显著增高($P<0.01$); 体内实验显示, 与对照组相比, STIL敲减组瘤体体积显著缩小($P<0.01$), 瘤重显著减轻($P<0.01$); 此外, CDK1与STIL表达呈正相关, CDK1抑制剂可显著削弱STIL过表达结肠癌细胞的增殖及克隆形成能力。STIL通过调控CDK1表达促进结肠癌细胞的增殖。

关键词 结肠癌; STIL; 增殖; 细胞周期; 细胞周期蛋白依赖性激酶1

STIL Promotes the Proliferation of Colon Cancer Cells through Regulating CDK1

LIU Jiwei¹, SHI Lei², PENG Jikui³, WANG Yanli³, HUANG Dongqin³, WANG Yongqiang^{3*}

¹Baotou Medical College, Baotou 014040, China;

²Clinical Nutrition Center, Inner Mongolia Autonomous Region People's Hospital, Hohhot 010010, China;

³Department of Gastrointestinal Surgery, Inner Mongolia Autonomous Region People's Hospital, Hohhot 010010, China)

Abstract This study aims to study the effect of silencing *STIL* on the proliferation of colon cancer cells and its molecular mechanism. The present study constructed lentivirus carrying shRNA (short hairpin RNA) against *STIL* and shCtrl (scrambled shRNA), infected tumor cells with these lentiviruses, and screened *STIL* stably silenced cells using the puromycin resistance. Then, CCK-8 assay was used to detect cell proliferation, colony formation assay was used to detect clonogenicity, and flow cytometry assay was employed to detect cell cycle distribution and proportion of apoptotic cells in shSTIL- and shCtrl-subgroups. The tumor volume and weight were monitored in nude mice which were subcutaneously injected with stably transfected cells. After *STIL* was silenced, the proliferation and clonogenicity of colon cancer cells were significantly inhibited, the proportion of apoptotic cells was significantly increased, and the proportion of cells blocked in G₂/M phase were significantly increased. Moreover, compared with the shCtrl subgroup, the tumor volume and weight in shSTIL group were significantly retarded. In

收稿日期: 2024-09-19

接受日期: 2024-12-16

内蒙古自治区自然科学基金(批准号: 2023LHMS08049)、内蒙古医科大学科技百万工程联合项目[批准号: YKD2020KJBW(LH)068]和内蒙古自治区人民医院院内基金(批准号: 2019YN22)资助的课题

*通信作者。Tel: 18047192719, E-mail: wangyong_qiang@163.com

Received: September 19, 2024

Accepted: December 16, 2024

This work was supported by the Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (Grant No.2023LHMS08049), the Inner Mongolia Medical University Science and Technology Million Project Joint Project [Grant No.YKD2020KJBW(LH)068], and the Hospital Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region People's Hospital (Grant No.2019YN22)

*Corresponding author. Tel: +86-18047192719, E-mail: wangyong_qiang@163.com

addition, STIL positively regulated the expression of CDK1, and CDK1 inhibitors could remarkably attenuate the proliferation and clonal formation of *STIL* overexpressed colon cancer cells. STIL promotes the proliferation of colon cancer cells by regulating the expression of CDK1.

Keywords colorectal cancer; STIL; proliferation; cell cycle; Cyclin-dependent kinase 1

GLOBOCAN 2020数据显示, 结肠癌全球年发病数约为194万、死亡数约为93万, 其发病率、死亡率分别居恶性肿瘤第3位、第2位^[1]。我国结肠癌发病率、死亡率分别位居恶性肿瘤的第3位和第4位^[2]。目前, 靶向EGFR的西妥昔单抗以及靶向VEGF的贝伐珠单抗显著提高了晚期结肠癌患者的生存率, 但仍有患者疗效不佳。因此, 深入探索结肠癌的分子机制, 寻找驱动结肠癌发生发展的基因, 并以此为靶点设计药物, 对于改善晚期结肠癌患者的治疗效果及生存预后具有重要意义。

STIL(SCL/TAL1 interrupting locus)基因是从人类急性淋巴细胞白血病相关染色体重排中克隆而来的, 其cDNA是一个含3 861个核苷酸的开放读码框, 编码含1 287个氨基酸的细胞质蛋白, 分子量约为143 kDa^[3]。*STIL*是有丝分裂中调控中心粒复制和细胞周期的关键因子, 与初级纤毛及纺锤体的形成有关, 是影响胚胎发育的重要基因^[4]。*STIL*在大多数人体组织中呈低表达或不表达, 而在增殖期细胞(包括造血干细胞、胚胎干细胞、对数生长期的细胞以及肿瘤细胞)中表达水平增加。*STIL*在终末分化的细胞中呈高表达属细胞“返祖”现象, 可能与恶性肿瘤发生发展相关^[5]。文献报道, *STIL*在肺癌、乳腺癌、胃癌、胰腺癌、膀胱癌、前列腺癌等实体瘤演变过程中发挥重要作用^[6-11], 而且*STIL*可通过维持肿瘤细胞干性促进结肠癌发生发展^[12]。然而, 作为细胞周期调控因子, *STIL*是否通过加快细胞周期促进结肠癌细胞增殖, 目前尚不清楚。本文利用RNA干扰及流式细胞检测技术, 研究*STIL*影响结肠癌细胞周期分布的作用及分子机制, 为以*STIL*为靶点的结肠癌治疗策略提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞、动物及组织芯片

人结肠癌细胞株DLD-1、RKO、HCT-116、SW480、SW620购自中国科学院上海细胞库; 4~5周龄雌性BALB/c裸鼠(体质量18~20 g)购自北京华阜康生物科技有限公司; 结肠癌组织芯片(HColA160Su02)购

自上海芯超生物科技有限公司, 该组织芯片包含100例结肠癌组织以及60例癌旁组织。

1.2 工具慢病毒

靶向*STIL*基因的shRNA慢病毒(lentivirus shRNA-*STIL*, sh*STIL*)购自上海吉凯基因科技有限公司, 该病毒载体为pLKO.1, 使用U6启动子, 包含绿色荧光蛋白基因、嘌呤霉素抗性基因, sh*STIL*靶向序列分别为5'-GGA TGG TAC CTT TCC ACT TTC-3'、5'-GCC CTG TAC TGT AAT GCA TTC-3', 对应的干扰序列分别为sh*STIL*#1、sh*STIL*#2。*STIL*过表达慢病毒购自上海吉凯基因科技有限公司, 其对应的转录本为NM_001048166.1。

1.3 主要试剂

细胞培养用到的RPMI 1640培养基、胎牛血清、胰淀粉酶购自美国Gibco公司; CCK-8细胞增殖检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; 流式凋亡检测试剂盒购自美国eBioscience公司; anti-*STIL*、anti-CDK1抗体购自美国Abcam公司。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养及慢病毒感染 将DLD-1、RKO、HCT-116、SW480、SW620细胞用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液于5% CO₂、37 °C恒温培养箱中培养。待汇合度达40%时, 以*STIL*干扰慢病毒(sh*STIL*#1、sh*STIL*#2)或过表达慢病毒感染细胞, 并利用嘌呤霉素(3 μg/mL)抗性筛选稳转株细胞用于后续实验。

1.4.2 CCK-8实验 取对数生长期RKO、HCT-116各处理组细胞, 按2×10³个/孔的密度接种于96孔板, 每组3个复孔, 分别培养1~5天后, 每孔加入10 μL CCK-8试剂, 继续培养4 h后, 以酶标仪检测各孔在波长为450 nm处的吸光度(*D*)值, 再以时间(天)为横坐标, *D*值为纵坐标, 绘制不同处理组细胞的生长曲线。

1.4.3 克隆形成实验 取对数生长期RKO、HCT-116各处理组细胞, 接种于6孔板(200个/孔)中, 每组3个复孔, 继续培养2周, 当细胞形成肉眼可见的克隆时, 终止培养、并以甲醇在室温下固定细胞15 min, 结晶紫

染色20 min, 室温干燥后, 对形成的细胞克隆拍照, 每组3个重复, 对不同实验组的克隆数目进行统计学分析。

1.4.4 流式细胞实验检测细胞周期分布及凋亡情况 将不同实验组RKO、HCT-116细胞用胰酶于室温下消化5 min, 制成单细胞悬液, 70%乙醇于4 °C固定过夜, 弃乙醇, PBS洗涤2次。先用RNA酶于37 °C处理30 min, 再用碘化丙锭(PI)避光孵育10 min, 上机。采用流式细胞仪测定不同实验组细胞周期时相的分布。

将不同实验组RKO、HCT-116细胞用胰酶于室温下消化5 min, PBS洗涤后, 以100 μ L结合缓冲液重悬, 再加入2.5 μ L Annexin V-APC室温染色, 室温避光孵育10 min后, 上机检测。流式细胞仪检测不同实验组凋亡细胞的百分比。

1.4.5 裸鼠皮下移植瘤实验 动物实验方案经内蒙古自治区人民医院伦理委员会批准(批准号: 202204005K)。4~5周龄BALB/c裸鼠分笼饲养, 分为对照组(shCtrl)、shSTIL#1组、shSTIL#2组, 6只/组。选取对数生长期RKO各实验组细胞, 胰酶于室温下消化5 min后, 用无血清RPMI 1640培养基重悬, 调整细胞浓度为 5×10^6 个/mL, 于裸鼠右侧背部皮下注入100 μ L细胞悬液(5×10^5 个/只), 构建裸鼠皮下移植瘤模型。待瘤体体积达50~100 mm³, 以游标卡尺测量瘤体长径、短径, 1次/3天, 并绘制不同实验组肿瘤生长曲线图; 28天后处死裸鼠, 称重, 分析不同实验组瘤体质量的差异。

1.4.6 Western blot 不同实验组细胞接种于6孔板(2×10^5 个/孔)中, 继续培养24 h, PBS洗涤后, 每孔加入RIPA裂解液于冰上裂解30 min, 4 °C、1 2000 $\times$ g离心15 min后测定蛋白浓度。取20 μ g样品上样于SDS-PAGE凝胶进行电泳(100 mA、1 h), 稳压转膜2 h后, 脱脂奶粉室温封闭1 h, PVDF膜与STIL(1:2 000)抗体、GAPDH(1:4 000)抗体于4 °C杂交过夜; TBST洗涤后, 二抗(1:5 000)室温孵育2 h; 滴加ECL化学发光物于PVDF膜上, 曝光显影。

1.4.7 组织芯片和免疫组化法 75 °C干燥箱烘烤45 min, 二甲苯脱蜡、梯度(100%、95%、80%、75%)乙醇水化后, 将结肠癌组织芯片于高压锅中用柠檬酸钠抗原修复液进行抗原修复, 3%过氧化氢室温下封闭10 min后, 用STIL抗体(1:500)于4 °C孵育过夜。PBS洗涤后, 二抗37 °C孵育1 h, 滴加DAB染色液,

镜下观察显色情况, 被染部位呈棕黄色颗粒, 再以苏木素染细胞核, 常规梯度(75%、80%、95%、100%)乙醇脱水、二甲苯透明、室温下干燥、中性树脂封片。包含160例样本的组织芯片通过数字化扫描采集图像信息, 生成的文件用Aperio ImageScore软件打开, 观察不同放大倍数下的图片。免疫组化结果由2名病理科医生判定, 以阳性面积百分比与染色强度的乘积作为分值, 并根据中位值将样本分为STIL高表达组、低表达组。

1.4.8 TCGA结肠癌数据生信分析 从TCGA数据库下载结肠癌转录组数据, 该转录组数据包含568例结肠癌组织和44例癌旁正常组织, 分析结肠癌、癌旁组织中STIL的表达情况; 采用Spearman相关系数分析结肠癌组织中STIL、CDK1的表达是否存在相关性。

1.4.9 统计学方法 应用SPSS 22.0软件进行实验数据分析, 计量资料采用 t 检验(正态分布)或秩和检验(非正态分布), 计数资料比较采用 χ^2 检验或fisher精确检验。 $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 STIL在结肠癌及癌旁组织中的表达水平

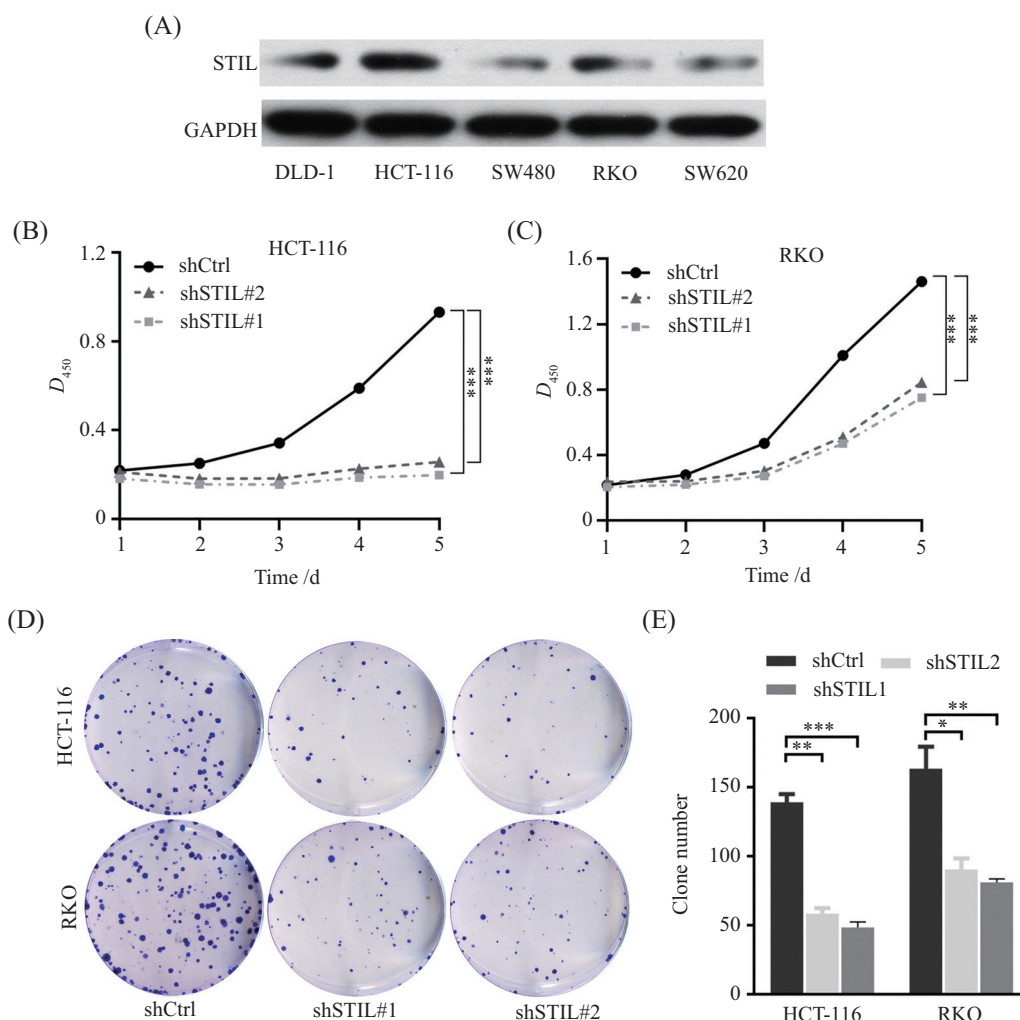
为筛选STIL高表达的结肠癌细胞株作为工具细胞, 我们首先采用Western blot法检测5株结肠癌细胞(DLD-1、HCT-116、SW480、RKO、SW420)中STIL的表达水平。结果显示, STIL在RKO和HCT-116细胞株中呈高表达(图1A)。

2.2 沉默STIL抑制结肠癌细胞增殖能力

我们先采用靶向STIL的shRNA慢病毒、阴性对照慢病毒处理对数生长期RKO、HCT-116细胞, 再采用CCK-8、克隆形成实验, 检测不同处理组细胞的增殖、克隆形成能力。结果显示, 与对照组相比, 沉默STIL后, RKO、HCT-116细胞的增殖活性显著降低($P < 0.05$)(图1B和图1C)。平板克隆实验也显示, 与对照组相比, 沉默STIL后, RKO和HCT-116细胞形成克隆的能力显著降低($P < 0.05$)(图1D和图1E)。

2.3 沉默STIL诱导细胞周期阻滞在G₂/M期并促进细胞凋亡

我们采用流式细胞术检测STIL沉默对结肠癌细胞周期分布和凋亡的影响。结果显示, 与对照组相比, shSTIL#1、shSTIL#2处理组RKO和HCT-116凋亡细胞比例显著增高($P < 0.05$, 图2)。RKO/shSTIL#1、RKO/



A: STIL在不同结肠癌细胞株中表达的Western blot图; B、C: HCT-116、RKO细胞不同处理组(*STIL*干扰组、对照组) CCK-8增殖曲线图; D: HCT-116、RKO细胞不同处理组(*STIL*干扰组、对照组)克隆结晶紫染色图; E: HCT-116、RKO细胞不同处理组克隆对应统计图。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: Western blot of STIL expression in different colon cancer cell lines; B,C: CCK-8 proliferation curves of HCT-116 and RKO cells in different treatment groups (*STIL* interference groups and control group); D: HCT-116 and RKO cell clones in different treatment groups (*STIL* interfering groups and control group) were stained with crystal violet; E: statistical graphs of clone numbers of differently treated HCT-116 and RKO cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图1 干扰*STIL*表达抑制结肠癌细胞的增殖能力

Fig.1 Knockdown of *STIL* expression inhibited the proliferation of colon cancer cells

shSTIL#2和HCT-116/shSTIL#1、HCT-116/shSTIL#2细胞G₀/G₁期比例显著低于对照组,而在G₂/M期的细胞比例显著高于对照组($P < 0.05$,图3)。这些数据表明,沉默*STIL*后,细胞周期被阻滞于G₂/M期,细胞凋亡增加。

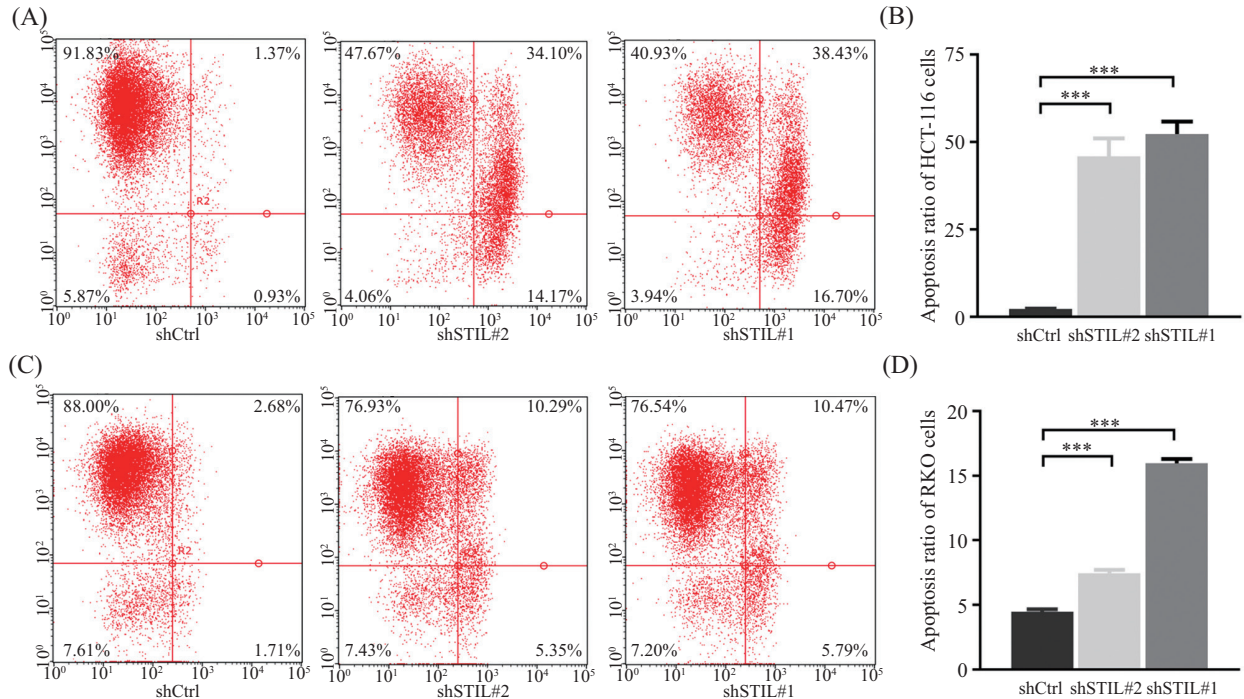
2.4 沉默*STIL*抑制裸鼠皮下移植瘤的生长

为明确*STIL*在结肠癌进展中的作用,我们利用RKO不同实验组细胞构建裸鼠皮下移植瘤模型,观察沉默*STIL*对裸鼠瘤体体积、质量的影响。结果显示,与对照组相比,shSTIL#1、shSTIL#2组肿瘤生长被显著抑制($P < 0.05$,图4A)。此外,shSTIL#1、shSTIL#2组

肿瘤的重量显著低于对照组($P < 0.05$,图4B和图4C)。因此,*STIL*敲减后,瘤体体积显著缩小,重量显著减轻。

2.5 *STIL*通过上调CDK1促进结肠癌细胞的增殖

文献报道,CDK1竞争性抑制PLK4(Polo like kinase 4)与*STIL*的结合,抑制*STIL*向中心粒募集直至有丝分裂结束^[12]。为此,我们通过Western blot检测*STIL*与CDK1的相关性,结果显示,*STIL*过表达后CDK1亦随之升高(图5A);我们进一步利用TCGA结肠癌转录组数据,分析二者相关性,结果显示,*STIL*和CDK1的相关系数高达0.61($P < 0.001$)(图5B)。

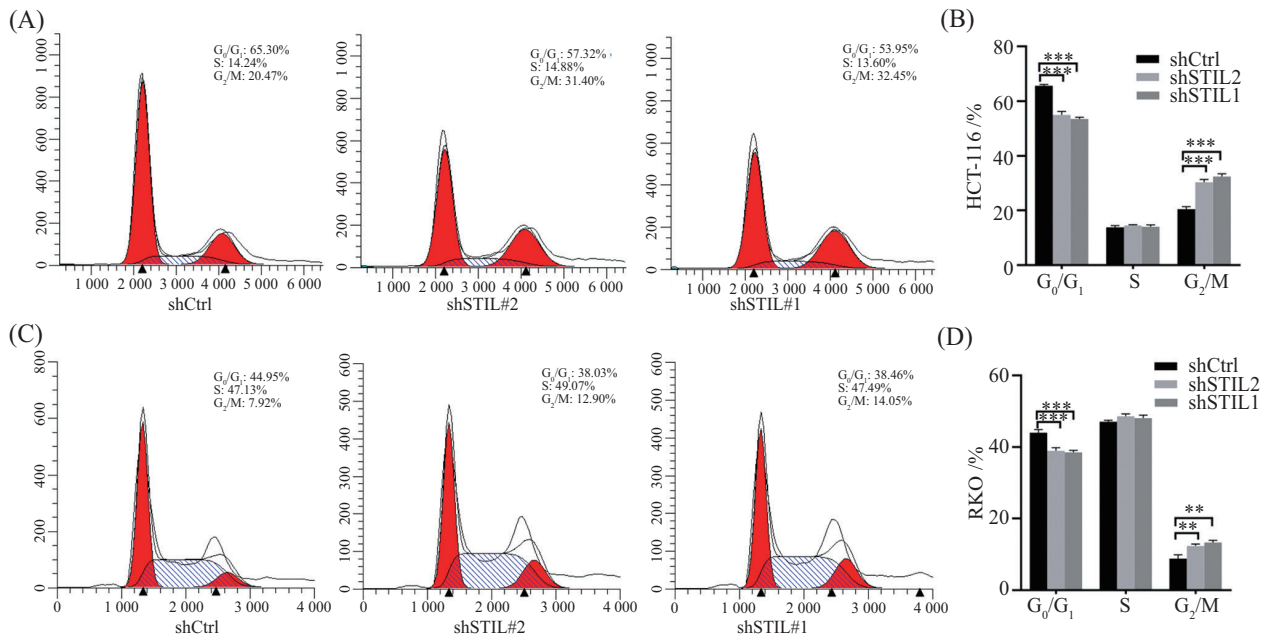


A,C: HCT-116、RKO不同处理组(*STIL*干扰组、对照组)细胞流式凋亡分析图(单标法,左上、右上、右下、左下象限分别显示活细胞、早期凋亡细胞、晚期凋亡细胞及死亡细胞)。B,D: HCT-116、RKO不同处理组(*STIL*干扰组、对照组)细胞凋亡比例统计图。*** $P<0.001$ 。

A,C: flow cytometry analysis of HCT-116 and RKO cells in different treatment groups (*STIL* interference groups and control group) (single standard method, upper left, upper right, lower right and lower quadrant showed live cells, early apoptotic cells, late apoptotic cells and dead cells, respectively). B,D: statistical charts illustrating apoptotic ratio of HCT-116 and RKO cells in different treatment groups (*STIL* interference groups and control group). *** $P<0.001$.

图2 干扰*STIL*表达促进结肠癌细胞凋亡

Fig.2 Knockdown of *STIL* expression promoted apoptosis of colon cancer cells

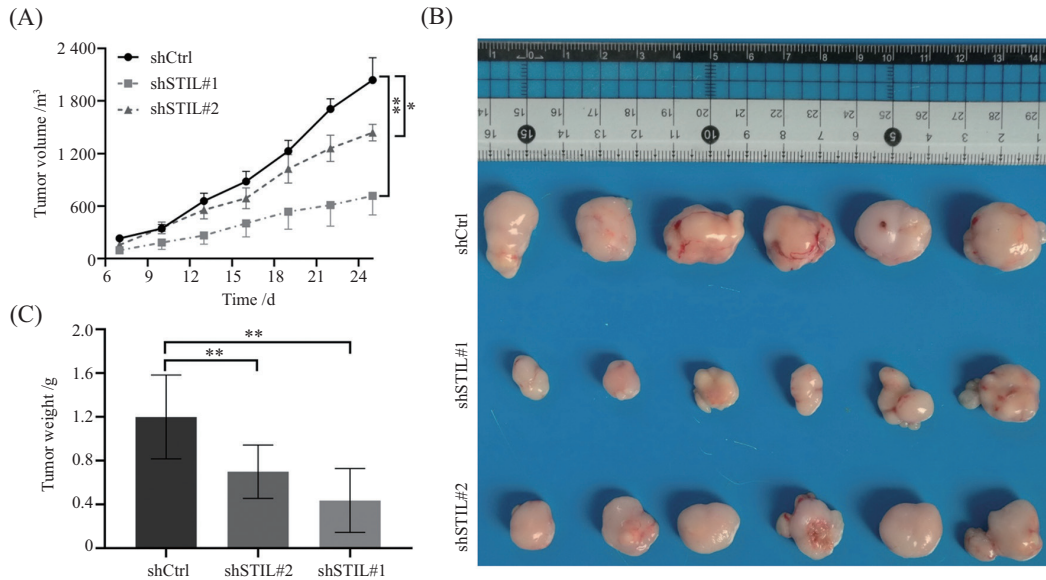


A,C: HCT-116、RKO不同处理组细胞周期流式直方图。B,D: HCT-116、RKO不同处理组细胞周期分布统计图。** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A,C: cell cycle analysis of HCT-116 and RKO cells in different treatment groups. B,D: cell cycle distribution statistics of HCT-116 and RKO cells in different treatment groups. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图3 干扰*STIL*表达阻滞结肠癌细胞于G₂/M期

Fig.3 Knockdown of *STIL* expression arrested colon cancer cells in G₂/M stage

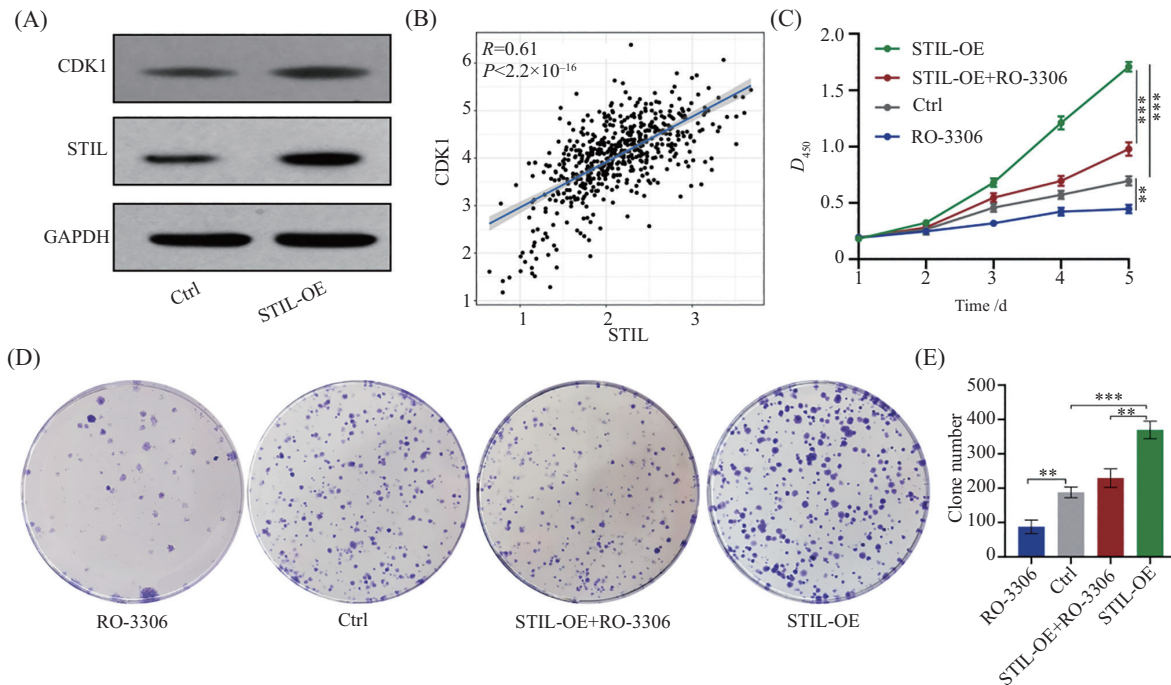


A: *STIL*干扰组、对照组结肠癌细胞皮下移植瘤生长曲线图; B: *STIL*干扰组、对照组皮下移植瘤切除瘤体图(6只/组); C: *STIL*干扰组、对照组瘤体称重统计图。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: subcutaneous tumor growth curves of colon cancer cells in *STIL* interference groups and control group; B: tumor body images of subcutaneous graft in *STIL* interference groups and control group (6 individuals/group); C: tumor weight statistics of *STIL* interference groups and control group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图4 干扰*STIL*表达抑制结肠癌细胞裸鼠皮下移植瘤生长

Fig.4 Knockdown of *STIL* expression inhibited the growth of subcutaneous tumor grafts in nude mice

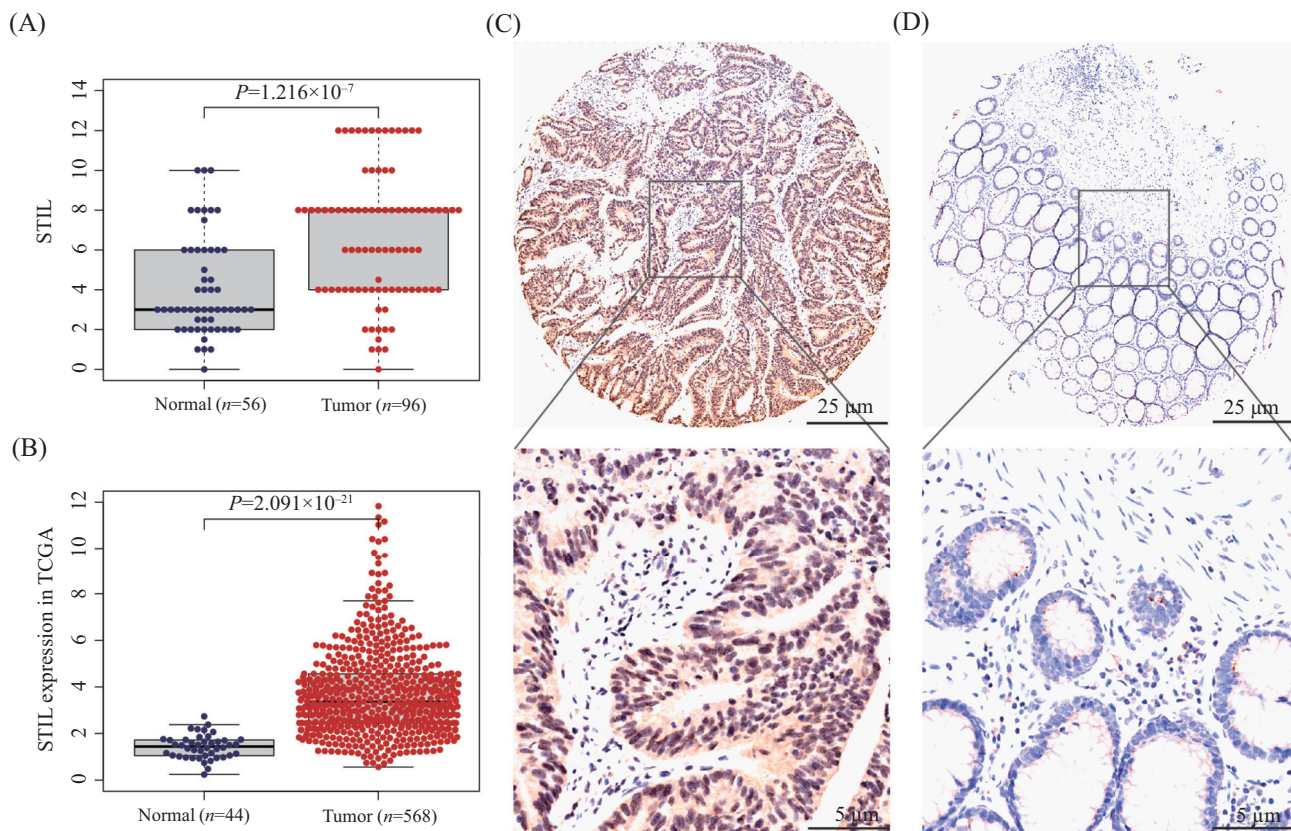


A: *STIL*过表达组、对照组*STIL*表达Western blot图; B: TCGA结肠癌病例中*STIL*、*CDK1*表达相关性图; C: *STIL*过表达组、*CDK1*抑制剂(RO-3306)、联合组及对照组CCK-8增殖曲线图; D: *STIL*过表达组、*CDK1*抑制剂(RO-3306)、联合组及对照组细胞克隆形成结晶紫染色图; E: *STIL*过表达组、*CDK1*抑制剂(RO-3306)、联合组及对照组细胞克隆数统计图。** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: Western blot of *STIL* expression in *STIL* overexpression group and control group; B: correlation graph of *STIL* and *CDK1* expression in TCGA colorectal cancer cases; C: proliferative curves of CCK-8 in *STIL* overexpression group, *CDK1* inhibitor (RO-3306), combination group and control group; D: Crystal violet staining patterns were formed in *STIL* overexpression group, *CDK1* inhibitor (RO-3306), combination group and control group; E: statistical map of cell clone number in *STIL* overexpression group, *CDK1* inhibitor (RO-3306), combination group and control group. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图5 *STIL*通过上调*CDK1*促进结肠癌细胞增殖

Fig.5 Promotion of colon cancer cell proliferation by *STIL* via up-regulating *CDK1*



A: 组织芯片中STIL在结肠癌及癌旁组织表达差异统计图; B: STIL在TCGA结肠癌及癌旁正常组织中表达差异统计图; C: 低倍镜、高倍镜下结肠癌组织中STIL染色免疫组化图; D: 低倍镜、高倍镜下结肠癌对应癌旁组织中STIL免疫组化图。

A: statistical map of STIL expression difference between colon cancer and adjacent tissues in tissue microarray; B: statistical map of STIL expression difference in TCGA colorectal cancer and adjacent normal tissues; C: immunohistochemical images of STIL staining in colorectal cancer tissues at low and high magnification; D: immunohistochemical maps of STIL in the adjacent tissues of colorectal cancer at low and high magnification.

图6 STIL在结肠癌及癌旁组织中表达

Fig.6 STIL expression in colorectal cancer and adjacent tissues

CDK1与恶性肿瘤发生发展密切相关,特别是在肝细胞癌中,CDK1可经多条通路促进肿瘤进展,是肝癌的潜在治疗靶点^[22]。STIL是否通过CDK1促进肿瘤细胞增殖,目前尚无报道。为此,我们利用CDK1抑制剂(RO-3306)处理STIL过表达的细胞,观察STIL促进肿瘤细胞生长的能力能否被CDK1抑制剂削弱,结果显示,STIL过表达组细胞增殖能力显著高于对照组($P<0.001$),而联合处理组(STIL-OE+RO-3306)细胞增殖活性显著低于过表达组($P<0.001$)(图5C)。同样,STIL过表达组细胞形成克隆的能力显著增高于对照组($P<0.001$),而联合处理组(STIL-OE+RO-3306)细胞形成克隆的能力显著低于过表达组($P<0.01$)(图5D和图5E)。

2.6 STIL在结肠癌组织芯片中的表达情况

结肠癌组织芯片抗原修复后有4例脱片,染色结果由病理科医师评分,STIL主要表达于肿瘤组

织的细胞质、细胞核,而在正常组织中STIL主要表达于细胞质。组织芯片中癌组织($n=96$)染色强度与染色阳性率乘积为 6.74 ± 3.14 ,而癌旁组织($n=56$)为 4.11 ± 2.5 ,经Wilcoxon非参数检验,发现差异具有统计学意义($P<0.05$)(图6A)。TCGA结肠癌转录组数据差异分析结果亦证实,肿瘤组织中STIL表达水平显著高于癌旁组织(图6B)。典型的免疫组化图显示,STIL在结肠癌组织中的表达水平显著高于癌旁组织(图6C和图6D)。

3 讨论

细胞生长、分裂是一个高度复杂且精确的过程,细胞内有严格调控增殖的监控系统,包括细胞周期检查点(G_1/S 、 G_2/M)及纺锤体组装检查点。细胞周期检查点的作用是,周期异常或环境变化时,阻滞周期进程,同时启动DNA修复、细胞凋亡,以维持染色

体稳定性。STIL作为细胞周期正向调控蛋白,在有丝分裂期富集于中心体,加快G₂/M周期进程,促进细胞分裂^[13]。然而,STIL异常表达易引起细胞生长、分裂失调,诱发癌变。目前文献报道,STIL在众多实体瘤中呈高表达,可能是肿瘤的驱动基因^[6-12],这与我们的研究一致。因此,靶向STIL的策略包括单克隆抗体、抗体偶联化疗药物、小分子干扰RNA等有望成为肿瘤治疗的新方法。

STIL在肿瘤演变过程中的作用及分子机制与肿瘤类型有关。WANG等^[6]报道,STIL通过HIF1 α -STIL-FOXM1轴、上皮间质转化通路促进肺腺癌细胞的增殖、转移。WANG等^[7]报道,STIL通过与KLF6结合促进三阴乳腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭。STIL可经PI3K/AKT/mTOR通路促进胃癌、膀胱癌、前列腺癌细胞的生长及增殖^[8,10-11]。另据报道,STIL高表达与膀胱癌患者不良预后有关,STIL通过维持AURKA(aurora kinase A)稳定抑制原发性鞭毛形成,激活Shh(Sonic hedgehog)信号通路,促进细胞增殖^[14]。KASAI等^[9]发现,STIL在胰腺上皮内瘤变和胰腺导管腺癌中呈高表达。STIL与融合抑制因子(suppressor of fused, SUFU)结合并抑制其活性,SUFU影响转录因子GLI1的活性及核定位,而GLI1调控干细胞的增殖。因此,STIL通过与SUFU结合,解除SUFU对转录因子GLI1的抑制,使得GLI1进入细胞核,促进胰腺癌细胞的增殖。PRADHAN等^[12]研究显示,STIL调控干性标记物CD44、CD133的表达,不依赖Shh通路,而且STIL调控药物外排蛋白ABCB1、ABCG2的表达,与结肠癌细胞耐药形成相关。本研究显示STIL调控CDK1表达,加快细胞周期进程,促进结肠癌细胞的增殖,这与PRADHAN等^[12]研究互为补充,证实STIL通过不同分子机制诱发结肠癌。

细胞周期进程由细胞周期蛋白(Cyclins)、细胞周期蛋白依赖性激酶(Cyclin dependent kinase, CDKs)、CDK抑制剂(CDK inhibitors, CKIs)调控。其中,CDKs是一组丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,通过与细胞周期蛋白结合形成二聚体,磷酸化底物蛋白,驱动细胞周期和有丝分裂进程^[15]。不同Cyclin-CDK复合物在细胞周期的特定阶段被激活并磷酸化其靶蛋白。各细胞周期蛋白表达水平升高或活性异常,可引起不受控制的细胞增殖,诱发肿瘤^[23]。至今为止,多种周期蛋白和CDKs被确认在细胞周期调控进程中发挥重要作用。细胞周期分4个阶段:G₁期、

DNA合成期(S)、G₂期和分裂期(M)。其中,G₂/M期转换主要受CDK1调控,CDK1本身不具有蛋白激酶活性,当Cyclin B累积到一定程度时,两者结合形成复合体,CDK1被激活,驱动细胞进入有丝分裂期^[24]。在有丝分裂后期,Cyclin B被降解,CDK1活性降低,细胞重新进入G₁期。因此,CDK1异常表达或功能失调,可加快细胞周期进程,从而诱发癌变。文献报道,CDK1在肝癌、食管癌、结肠癌、肾细胞癌、胃肠道间质瘤及胰腺癌呈高表达^[16-21]。而且,CDK1是肝癌演变的必要基因,敲除CDK1的小鼠则不会形成肝癌^[22]。因此,CDK1有望成为肿瘤治疗的潜在靶点^[25]。目前国内外尚无STIL通过调控CDK1表达促进结肠癌发生及进展的报道,本研究使用CDK1抑制剂处理STIL高表达的结肠癌细胞,结果显示,结肠癌细胞的增殖活性被显著抑制,说明STIL通过调控CDK1表达,促进结肠癌的发生发展。然而,STIL如何调控STIL表达仍需进一步研究。

总之,本研究揭示了STIL通过上调CDK1促进细胞周期进程,抑制细胞凋亡,从而促进结肠癌细胞增殖的新机制。既往文献报道,STIL与结肠癌细胞干性及结肠癌化疗耐药密切相关。因此,STIL可能成为结肠癌治疗的新靶点。

参考文献 (References)

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-49.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-32.
- [3] APLAN P D, LOMBARDI D P, KIRSCH I R. Structural characterization of SIL, a gene frequently disrupted in T-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. Mol Cell Biol, 1991, 11(11): 5462-9.
- [4] ARQUINT C, SONNEN K F, STIERHOF Y D, et al. Cell-cycle-regulated expression of STIL controls centriole number in human cells [J]. J Cell Sci, 2012, 125(Pt 5): 1342-52.
- [5] IZRAELI S, COLAIZZO-ANAS T, BERTNESS V L, et al. Expression of the SIL gene is correlated with growth induction and cellular proliferation [J]. Cell Growth Differ, 1997, 8(11): 1171-9.
- [6] WANG Y W, CHEN S C, GU D L, et al. A novel HIF1 α -STIL-FOXM1 axis regulates tumor metastasis [J]. J Biomed Sci, 2022, 29(1): 24.
- [7] WANG M, PAN B, HU Y, et al. STIL facilitates the development and malignant progression of triple-negative breast cancer through activation of Fanconi anemia pathway via interacting with KLF16 [J]. Transl Oncol, 2024, 46: 102010.
- [8] WANG J, ZHANG Y, DOU Z, et al. Knockdown of STIL suppresses the progression of gastric cancer by down-regulating the

- IGF-1/PI3K/AKT pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(8): 5566-75.
- [9] KASAI K, INAGUMA S, YONEYAMA A, et al. SCL/TAL1 interrupting locus derepresses GLI1 from the negative control of suppressor-of-fused in pancreatic cancer cell [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(19): 7723-9.
- [10] YU H, CHEN L, WANG X, et al. STIL promotes tumorigenesis of bladder cancer by activating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and targeting C-Myc [J]. *Cancers*, 2022, 14(23): 5777.
- [11] WU X, XIAO Y, YAN W, et al. The human oncogene SCL/TAL1 interrupting locus (STIL) promotes tumor growth through MAPK/ERK, PI3K/Akt and AMPK pathways in prostate cancer [J]. *Gene*, 2019, 686: 220-7.
- [12] PRADHAN T, KUMAR V, SURYA H E, et al. STIL endows oncogenic and stem-like attributes to colorectal cancer plausibly by Shh and Wnt signaling [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 581671.
- [13] LI J, YANG Z, QI Y, et al. STIL acts as an oncogenic driver in a primary cilia-dependent manner in human cancer [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 804419.
- [14] LI J, QI Y, LI B, et al. STIL/AURKA axis promotes cell proliferation by influencing primary cilia formation in bladder cancer [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 281.
- [15] MALUMBRES M, BARBACID M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(3): 153-66.
- [16] 潘剑锋, 尚方正, 马荣, 等. 周期蛋白和周期蛋白依赖性激酶及相关激酶抑制剂在细胞周期进程中的调控机制研究进展[J]. *生物工程学报*(PAN J F, SHANG F Z, MA R, et al. Advances of the regulatory mechanism of cyclin, cyclin-dependent kinases and related kinase inhibitors in cell cycle progression [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*), 2023, 39(4): 1525-47.
- [17] BOUTROS R, LOBJOIS V, DUCOMMUN B. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets [J]? *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(7): 495-507.
- [18] ITO Y, TAKEDA T, SAKON M, et al. Expression and prognostic role of cyclin-dependent kinase 1 (cdc2) in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncology*, 2000, 59(1): 68-74.
- [19] HANSEL D E, DHARA S, HUANG R C, et al. CDC2/CDK1 expression in esophageal adenocarcinoma and precursor lesions serves as a diagnostic and cancer progression marker and potential novel drug target [J]. *Am J Surg Pathol*, 2005, 29(3): 390-9.
- [20] SUNG W W, LIN Y M, WU P R, et al. High nuclear/cytoplasmic ratio of Cdk1 expression predicts poor prognosis in colorectal cancer patients [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 951.
- [21] HONGO F, TAKAHA N, OISHI M, et al. CDK1 and CDK2 activity is a strong predictor of renal cell carcinoma recurrence [J]. *Urol Oncol*, 2014, 32(8): 1240-6.
- [22] NISHIDA T, MATSUSHIMA T, TSUJIMOTO M, et al. Cyclin-dependent kinase activity correlates with the prognosis of patients who have gastrointestinal stromal tumors [J]. *Ann Surg Oncol*, 2015, 22(11): 3565-73.
- [23] PIAO J, ZHU L, SUN J, et al. High expression of CDK1 and BUB1 predicts poor prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Gene*, 2019, 701: 15-22.
- [24] DIRIL M K, RATNACARAM C K, PADMAKUMAR V C, et al. Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) is essential for cell division and suppression of DNA re-replication but not for liver regeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(10): 3826-31.
- [25] WANG Q, BODE A M, ZHANG T. Targeting CDK1 in cancer: mechanisms and implications [J]. *NPJ Precis Oncol*, 2023, 7(1): 58.