

文章编号:1003-2754(2019)12-1083-03

敲减 CDKL5 对人胶质母细胞瘤细胞生长和细胞周期的影响

张惊宇^{1,2}, 丁 婧², 郑永慧^{1,2}, 初婷婷^{1,2}, 赵琳琳², 杨滨瑞², 高 腾²

摘要: **目的** 探讨敲减周期蛋白依赖型激酶样 5(cyclin-dependent kinase-like 5, CDKL5) 对人胶质母细胞瘤细胞生长和细胞周期的影响, 为胶质母细胞瘤的治疗提供新思路。**方法** 本研究使用人胶质母细胞瘤细胞 U87, 使用慢病毒感染的方法敲减 CDKL5 基因。利用 Western blot 显示 CDKL5 的细胞定位以及特异性的小发卡 RNA 敲减效率。使用血细胞计数法绘制 4 d U87 的细胞生长曲线, 同时利用 MTT 检测细胞活性。使用流式细胞仪技术检测细胞周期。**结果** 在 U87 人胶质母细胞瘤细胞中, CDKL5 在细胞核和细胞质当中都有表达, 我们发现使用 shRNA 敲减 CDKL5 后, 胞质中的 CDKL5 显著减少, 细胞形态也发生明显改变。敲减 CDKL5 同时抑制人胶质母细胞瘤细胞的体外增殖, 引起细胞周期停滞。**结论** 敲减 CDKL5 可以显著抑制人胶质母细胞瘤细胞增殖, 引起细胞周期停滞, 为人胶质母细胞瘤的治疗提供了一个新的理论方法。

关键词: CDKL5; 人胶质母细胞瘤细胞; shRNA; 细胞生长; 细胞周期**中图分类号:** R739.4**文献标识码:** A**开放科学(资源服务)标识码(OSID):**

Effect of CDKL5 knockdown on growth and cell cycle of human glioblastoma cells ZHANG Jingyu, DING Jing, ZHENG Yonghui, et al. (Heilongjiang Academy of Medical Sciences, Harbin 150081, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of CDKL5 knockdown on the cell growth and cycle of human glioblastoma cells, and to provide new strategy for the treatment of glioblastoma. **Methods** In this study, CDKL5 gene was knock down the using lentivirus infection in human glioblastoma U87 cells. Western blot analysis confirmed CDKL5 cell localization and specific small hairpin RNA knockdown efficiency. Hematocyte counting method was used to draw the cell growth curve of U87 for 4 days, and MTT was used to detect cell activity. Cell cycle was detected using flow cytometry. **Results** CDKL5 is expressed in both the nucleus and the cytoplasm in U87 human glioblastoma cells. Our results showed that CDKL5 was significantly reduced in the cytoplasm after shRNA knockdown using shRNA, and the cell morphology also changed significantly. Knockdown CDKL5 also inhibited the growth of human glioblastoma cells in vitro, causing cell cycle arrest. **Conclusion** CDKL5 knockdown can significantly inhibit human glioblastoma cell proliferation and cause cell cycle arrest, providing a new theoretical approach for the treatment of human glioblastoma.

Key words: CDKL5; Human glioblastoma cells; shRNA; Cell growth; Cell cycle

X 染色体连锁基因 CDKL5(cyclin-dependent kinase-like 5, 周期蛋白依赖型激酶样 5) 基因编码一个丝氨酸/苏氨酸激酶, 故又名 STK9(serine-threonine kinase 9)。CDKL5 的基因突变可导致 Rett 综合征等神经类疾病, 因此目前的研究重点聚焦于 CDKL5 在神经元中的功能以及与雷特综合征等神经系统疾病的关联上^[1], 但 CDKL5 基因在胶质瘤^[2]、胃癌^[3]、卵巢癌^[4]、黑色素瘤^[5]和结肠癌^[6]中有错义突变和同义突变。CDKL5 是白血病抗原之一, 经常在成人 T 淋巴细胞白血病中高表达, 可作为肿瘤免疫治疗的靶标^[7]。目前, 对于 CDKL5 的功能性研究较少, CDKL5 的表达随神经瘤细胞的分化而不断上调, 本研究主要敲除人胶质母细胞瘤细胞 U87 中的 CDKL5, 发现敲减后显著抑制 U87 的细胞增殖, 使细胞周期发生停滞, 这可以为之后 CDKL5 作为肿瘤治疗的靶点提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料 载体 pLKD-UBC-GFP-U6-shRNA(纽恩生物科技公司)、细胞培养板(美国 Corning)、所有培养基及添加剂(美国 Gibco)、BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天)、MTT 即 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, 中文名 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(上海生工公司)、细胞周期检测试剂盒(美国, sigma)。

收稿日期:2019-10-09; 修订日期:2019-11-30

基金项目: 哈尔滨市科技创新人才研究专项基金(No. 2017RAXQJ045)

作者单位:(1. 黑龙江省医学科学院, 黑龙江 哈尔滨 150081; 2. 哈尔滨医科大学附属第四医院神经内科, 黑龙江 哈尔滨 150001)

通讯作者: 张惊宇, E-mail: zhangjingyuyx@163.com

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人胶质母细胞瘤细胞系 U87 使用 MEM 培养基,添加 10% 胎牛血清、1% Glutamax 和 1% 青霉素 + 链霉素、1% 非必需氨基酸和 1% (1 mmol) 丙酮酸钠。细胞均置于 37 °C 恒温培养箱中培养,湿度 100%, CO₂ 浓度 5%。

1.2.2 质粒构建 利用慢病毒感染人胶质母细胞瘤细胞 U87 同时导入 CDKL5 shRNA, 构建 CDKL5 shRNA 所用的载体为 pLKD-UBC-GFP-U6-shRNA。实验涉及的 shRNA 序列为 shCDKL5 R: 5'-3' CCGGGGAGCCTATGAGTTGTAC TTCAAG; F: 5'-3' AGAGTACAACCTCATAGGCTCTTTTGTG。质粒委托纽恩生物技术公司包装制成慢病毒颗粒浓缩液。

1.2.3 蛋白免疫印迹 分别提取细胞蛋白和组织蛋白, BCA 定量后(碧云天)进行蛋白免疫印迹检测, 上样量为 45 μg/孔。蛋白质经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移到硝酸纤维素膜(NC 膜)上(200 mA 电流, 室温转膜 2 h), 用含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T 室温封闭 2 h, 将稀释后的一抗稀释液敷于膜上, 4 °C 过夜。清洗一抗 3 遍后, 1000: 1 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 1 h, 清洗二抗后, 用 ECL 化学发光反应进行显色。在暗室中将 X 光片放入膜上曝光, 再进行显影、定影反应。将胶片进行扫描, 用 Image J 软件测定蛋白条带灰度, 复制数据到 Excel 表中分析蛋白表达量差异。

1.2.4 MTT 分析 MTT 粉末用 D' Hanks 配成 5 mg/ml 的溶液, 滤膜过滤, 4 °C 避光保存。慢病毒感染 4 d 后, 消化细胞, 通过细胞计数, 制备 1 × 10⁴/ml 的细胞悬液。在 96 孔培养板的每孔中加入 150 μl 悬液, 即 1500 个细胞/孔。自 4 h 细胞贴壁始, 每隔 24 h

在一个培养板的每个孔中加入 15 μl 的 MTT 溶液, 共 5 d。37 °C 孵育 4 h。吸去培养基, 加入 150 μl DM-SO, 在酶标仪测定 490 nm 波长下的吸光值。此绝对吸光值减去对应 DMSO 的吸光值, 为相对吸光值。

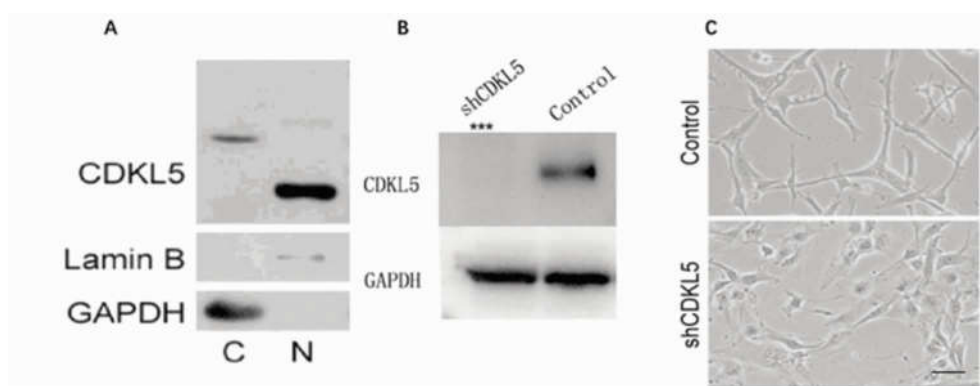
1.2.5 细胞周期分析 收集细胞加入 2 ml -20 °C 预冷的 70% 乙醇, 重悬, -20 °C 固定过夜。离心后弃上清, 用 50 μg/ml (Thermo Scientific 公司) 重悬细胞沉淀, 37 °C 孵育 30 min。1 mg/ml 的碘化丙啶储存液(Sigma-Aldrich 公司)按 1: 20 加入到细胞悬液中, 37 °C 避光孵育 30 min。用 BD FACSCalibur 流式细胞仪(BD Bioscience 公司)检测, 每个样品检测 10000 个细胞。FlowJo 软件分析 DNA 倍体 (FLH2 通道荧光强度) 和细胞数, 即细胞周期分布。

1.3 统计学分析 SPSS 18.0 软件进行统计学处理, *t* 检测分析组间的显著性差异。P < 0.05 表示有显著性差异。

2 结果

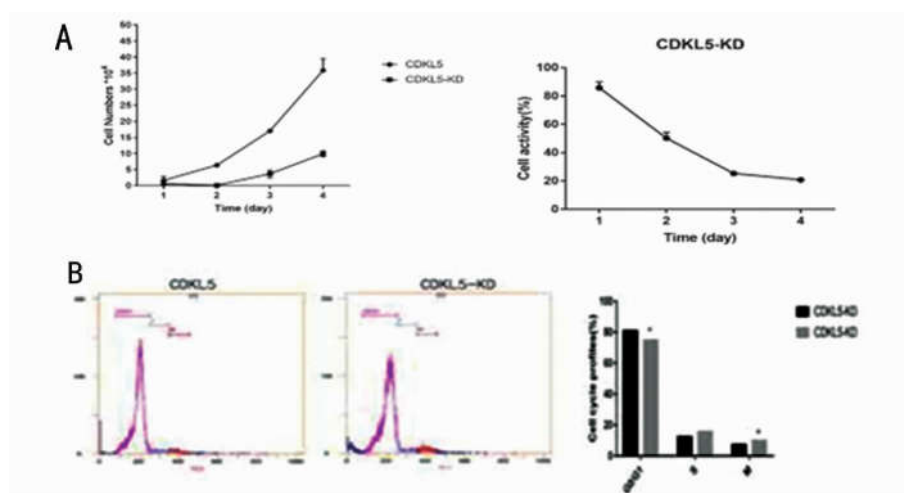
2.1 CDKL5 在人胶质母细胞瘤细胞系 U87 中的表达情况 由结果所示, 在 U87 细胞系中 CDKL5 分为 2 个亚型, 在细胞核和胞质中均有表达(见图 1A); 通过 shRNA 敲减 CDKL5 的可以有效降低细胞质内的 CDKL5 的表达(见图 1B); 敲减 CDKL5 后细胞形态发生显著变化, 由原来长梭形变得不规则(见图 1C)。

2.2 敲减 CDKL5 抑制胶质母细胞瘤细胞的体外生长 通过血细胞计数, 我们发现, 敲减 CDKL5 会显著抑制细胞增殖, MTT 分析显示, 敲减 CDKL5 抑制 U87 细胞的活性降低(见图 2A); 流式细胞术实验显示, 敲减 CDKL5 后 U87 细胞的进程被阻止在 G2/M 期(见图 2B)。



A. 胶质母细胞瘤细胞中不同 CDKL5 蛋白亚型在细胞浆和细胞核中的分布; B. 蛋白免疫印迹检测人胶质母细胞瘤细胞系 U87 中 CDKL5 蛋白的表达。细胞表达有对照 shRNA (Control) 或敲减 CDKL5 的 shRNA (shCDKL5); C. 敲减 CDKL5 引起胶质母细胞瘤细胞形态的改变。放大倍数, ×200; 标尺, 50 μm

图1 CDKL5 在人胶质母细胞瘤细胞系 U87 中的表达



A. 血细胞技术法分析细胞增殖和 MTT 法检测细胞活性; B. 流式细胞仪检测细胞周期分布

图 2 敲减 CDKL5 抑制胶质母细胞瘤细胞的体外生长

3 讨论

此前研究发现,神经母细胞瘤中的 CDKL5 是抑癌蛋白。神经母细胞瘤 SH-SY5Y 中,过表达 CDKL5 将细胞周期阻滞在 G0/G1 期而抑制细胞增殖,同时促进细胞向神经元方向分化,而敲减 CDKL5 则产生相反的表型^[8~10]。然而,此研究的初衷并非为了考察肿瘤中 CDKL5 的表达和功能,而是仍然关注 CDKL5 与神经疾病的关系。我们认为这些结果表明 CDKL5 能促进神经前体细胞的分化和神经元的成熟,并结合文献推测 CDKL5 可能通过阻滞细胞周期、抑制细胞周期蛋白来促进分化的^[11~13]。或许是胶质细胞中 CDKL5 低表达的缘故,至今未有研究关注 CDKL5 对胶质细胞成熟的影响和在胶质瘤发展中的作用。本研究发现,CDKL5 蛋白具有多个亚型,前期也有相关报道,CDKL5 的亚型分类与定位^[14,15]。我们发现亚型之一的 CDKL585 在胶质母细胞瘤细胞 U87 的细胞质中高表达,敲减 CDKL5 后抑制胶质母细胞瘤细胞的增殖。后期我们可以检测在神经胶质母细胞瘤组织中 CDKL5 的表达情况与肿瘤特性的相关性,我们的研究可以为以后胶质母细胞瘤的治疗提供新的理论基础。

[参考文献]

- [1] Kadam SD, Sullivan BJ, Goyal A, et al. Rett Syndrome and CDKL5 deficiency disorder: from bench to clinic [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (20) : 5098.
- [2] McLendon R, Friedman A, Bigner D, et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways [J]. *Nature*, 2008, 455 (7216) : 1061-1068.
- [3] Zang ZJ, Ong CK, Cutcutache I, et al. Genetic and structural variation in the gastric cancer kinome revealed through targeted deep sequencing [J]. *Cancer Research*, 2011, 71 (1) : 29-39.
- [4] Bell D, Berchuck A, Birrer M, et al. Integrated genomic analyses of o-

varian carcinoma [J]. *Nature*, 2011, 474 (7353) : 609-615.

- [5] Van Haaften G, Dalglish GL, Davies H, et al. Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer [J]. *Nature Genetics*, 2009, 41 (5) : 521-523.
- [6] Sjoblom T, Jones S, Wood LD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers [J]. *Science*, 2006, 314 (5797) : 268-274.
- [7] Kawahara M, Hori T, Matsubara Y, et al. Cyclin-dependent kinase-like 5 is a novel target of immunotherapy in adult T-cell leukemia [J]. *J Immunother*, 2007, 30 (5) : 499-505.
- [8] Varghese RT, Liang Y, Guan T, et al. Survival kinase genes present prognostic significance in glioblastoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (15) : 20140-20151.
- [9] Canning P, Park K, Goncalves J, et al. CDKL family kinases have evolved distinct structural features and ciliary function [J]. *Cell Reports*, 2018, 22 (4) : 885-894.
- [10] Nawaz MS, Giarda E, Bedogni F, et al. CDKL5 and shootin1 interact and concur in regulating neuronal polarization [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (2) : e0148634.
- [11] Munoz IM, Morgan ME, Peltier J, et al. Phosphoproteomic screening identifies physiological substrates of the CDKL5 kinase [J]. *The EMBO Journal*, 2018, 37 (24) : 101-120.
- [12] Liu W, Li J, Song YS, et al. Cdk5 links with DNA damage response and cancer [J]. *Molecular Cancer*, 2017, 16 (1) : 60.
- [13] Valli E, Trazzi S, Fuchs C, et al. CDKL5, a novel MYCN-repressed gene, blocks cell cycle and promotes differentiation of neuronal cells [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2012, 1819 (11-12) : 1173-1185.
- [14] Barbiero I, Valente D, Chandola C, et al. CDKL5 localizes at the centrosome and midbody and is required for faithful cell division [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7 (1) : 6228.
- [15] Okuda K, Takao K, Watanabe A, et al. Comprehensive behavioral analysis of the Cdk5 knockout mice revealed significant enhancement in anxiety- and fear-related behaviors and impairment in both acquisition and long-term retention of spatial reference memory [J]. *PLoS One*, 2018, 13 (4) : e0196587.