

【实验研究】

纺锤体动粒相关复合体-1(SKA1)促进葡萄膜黑色素瘤细胞增殖的分子机制研究[△]

凌峰 张勇 辛向阳

1.3 实时荧光定量 PCR、Western blot 检测

使用 Trizol 试剂分别提取 A-375、MUM-2B 和 MUM-2C 细胞总 RNA, 依据说明书逆转录成 cDNA, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测, 反应体系: SYBR premixer

Taq 6.0 μL 、上下游引物各 0.5 μL 、cDNA 模板 1.0 μL 、RNase-Free H_2O 4.0 μL ，以 GAPDH 作为内参，SKA1 相对表达量通过 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 或 ΔCt 计算获得。

RIPA 细胞裂解液提取 SKA1 敲减组、对照组（转染 shCtrl）的 MUM-2B 细胞总蛋白，以 BCA 试剂盒测定蛋白浓度，取 30 μg 总蛋白上样于 SDS-PAGE 凝胶，电泳后电转至 PVDF 膜，分别与 SKA1 抗体（1：1000，北京博奥森）和 GAPDH（1：500，Santa Cruz Biotechnology 公司，美国）4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，漂洗后与 HRP 标记的二抗（1：2000，Santa Cruz Biotechnology 公司，美国）室温孵育 2 h，化学发光试剂显影，然后采用 Quantity one 扫描软件分析。

1.4 MTT 检测细胞增殖 取对数生长期的 SKA1 敲减组和对照组 MUM-2B 细胞，于 96 孔板中按每孔 3000 个细胞铺板，在培养后不同时间点（1 d、2 d、3 d、4 d、5 d）加入 20 μL 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT 试剂于孔中，反应 4 h，持续振荡 6 min，酶标仪检测 490 nm/570 nm 处光密度。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡 慢病毒转染 MUM-2B 细胞 48 h 后，用 2.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶消化离心 SKA1 敲减组和对照组 MUM-2B 细胞，制成单细胞悬液，细胞浓度为 2×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。800 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min，弃上清，加 5 mL PBS 重悬细胞，重复 2 次后离心，弃上清，最后重悬细胞于 0.5 mL PBS 中。用低速振荡器边振荡边加入 5 mL 预冷的含体积分数 70% 乙醇，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。第二日将固定好的细胞以 1000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min，弃上清，PBS 清洗后重悬细胞。加入 5 μL （10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ）的 RNaseA，37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 1 h，加入终浓度 50 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 碘化丙啶，4 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色过夜，使用流式细胞仪分析软件 Guava InCyte 分析。

1.6 Caspase-3/7 法检测细胞凋亡 SKA1 敲减组、对照组细胞计数后，按每孔 1×10^4 个细胞加入 96 孔板，细胞继续培养 2 d，每孔中加入 Caspase-Glo 反应液 100 μL ，500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min，再室温孵育 1 h，酶标仪检测仪器测定信号强度。

1.7 基因表达谱芯片分析 提取 SKA1 敲减组和对照组 MUM-2B 细胞的 RNA，反转录成 cDNA，进行表达谱芯片检测。再采用 R limma 包筛选差异表达基因，并对差异基因进行 GO（Gene Ontology）和 KEGG（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes）富集分析，初步探索 SKA1 促进 UM 细胞增殖的分子机制。

1.8 SKA1 生存分析 从 TCGA GDC 网站（<https://portal.gdc.cancer.gov/>）分别下载 UM 转录组、临床数据文件，利用定制化 perl 脚本将下载的 UM 样本文件整理成基因转录组矩阵文件、临床文件；再将转录组、临床文件合并，采用 R“survminer”和“survival”包，绘制 Kaplan-Meier 生存曲线图。依据 SKA1 表达中位值将 UM 样本分为 SKA1 高、低表达组，利用基因集富集分析（Gene set enrichment analysis）软件，解析与 SKA1 表达水平与各信号通路状态

（激活、抑制或无变化）的关系。

1.9 统计学方法 使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料以均数 \pm 标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，组间比较采用 t 检验，计数资料采用 χ^2 检验。检验水准： $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 SKA1 敲减序列的筛选 以 qRT-PCR 检测 SKA1 在不同黑色素瘤细胞株中的表达，相对表达量以 $-\Delta\text{Ct}$ 表示，结果显示，SKA1 在 A-375、MUM-2B 和 MUM-2C 细胞株的表达丰度均高（图 1A），但在细胞培养过程中，A-375、MUM-2C 生长状态差，经检验为支原体污染，遂采用 MUM-2B 细胞用于后续实验。qRT-PCR 检测 MUM-2B 各处理组 SKA1 表达，结果显示，与 shCtrl 组相比，SKA1 敲减组表达显著降低（ $P < 0.01$ ），shSKA1-1、shSKA1-2、shSKA1-3 各敲减组的敲减效率分别为 78.86%、62.71%、57.83%。因此，shSKA1-1 用于后续细胞表型功能实验（图 1B）。

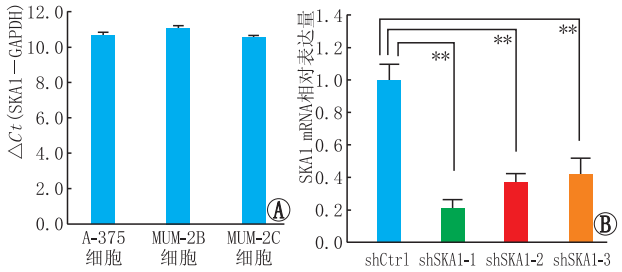


图1 SKA1 在三种细胞株的表达丰度及靶向 SKA1 敲减序列的筛选 A:SKA1 在三种细胞株中的表达丰度；B:SKA1 不同敲减靶点的敲减率（** $P < 0.01$ ）。

2.2 SKA1 对 MUM-2B 细胞增殖的影响 MTT 检测结果显示，对照组 MUM-2B 细胞培养 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d 时光密度分别为 0.20 ± 0.00 、 0.36 ± 0.01 、 0.61 ± 0.02 、 0.98 ± 0.02 、 1.25 ± 0.03 ；SKA1 敲减组 MUM-2B 细胞培养 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d 时光密度分别为 0.15 ± 0.00 、 0.20 ± 0.04 、 0.25 ± 0.02 、 0.37 ± 0.01 、 0.41 ± 0.05 ；与对照组相比，SKA1 敲减组 MUM-2B 细胞培养 3 d、4 d、5 d 的光密度均显著降低（均为 $P < 0.01$ ），说明 SKA1 敲减后 MUM-2B 细胞增殖活性被显著抑制（图 2）。

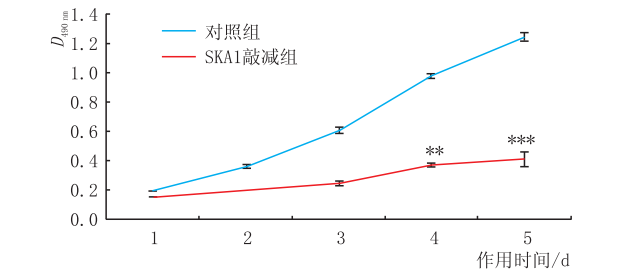


图2 对照组、SKA1 敲减组 MUM-2B 细胞 MTT 生长曲线 注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。

2.3 SKA1 对 MUM-2B 细胞凋亡的影响 流式细胞仪检测结果显示,对照组细胞凋亡率为 $5.30\% \pm 0.45\%$, SKA1 敲减组细胞凋亡率为 $12.63\% \pm 0.04\%$, SKA1 敲减组细胞凋亡率显著高于对照组 ($P < 0.01$)。采用 Caspase-3/7 法检测 Caspase-3/7 活性,结果显示,与对照组相比,SKA1 敲减组细胞 Caspase-3/7 活性显著增强 ($P < 0.001$),与流式细胞仪检测的细胞凋亡情况一致(图 3)。

2.4 SKA1 促进 UM 细胞增殖的分子机制 分别提取对照组和 SKA1 敲减组 MUM-2B 细胞的 RNA,反转录成 cDNA,进行基因表达谱芯片检测(图 4)。采用 R“limma”包筛选差异表达基因,共筛选出差异表达基因 362 个,其中高表达 176 个,低表达 186 个,高、低表达组分别选取差异最显著的前 15 个基因,以热图展示(图 4A);并对所有基因及后续富集通路中的基因以火山图展示(图 4B)。经 GO 和 KEGG 通路富集分析显示,362 个差异基因显著富集于 P53

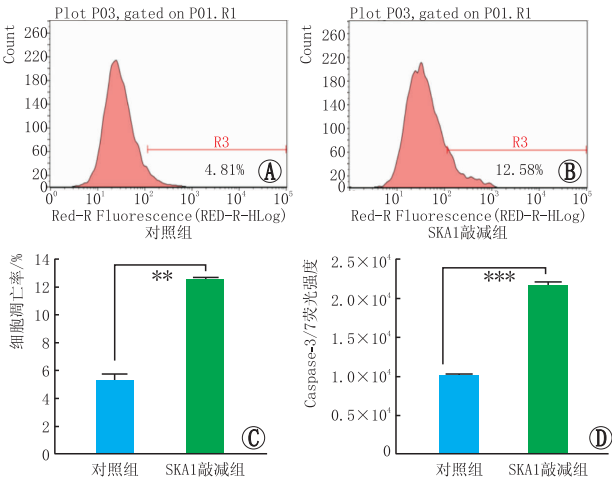


图 3 对照组、SKA1 敲减组 MUM-2B 细胞凋亡比例图 A:对照组细胞流式凋亡图;B:SKA1 敲减组细胞流式凋亡图;C:两组细胞凋亡统计图;D:两组细胞 Caspase-3/7 荧光强度统计图。注:** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

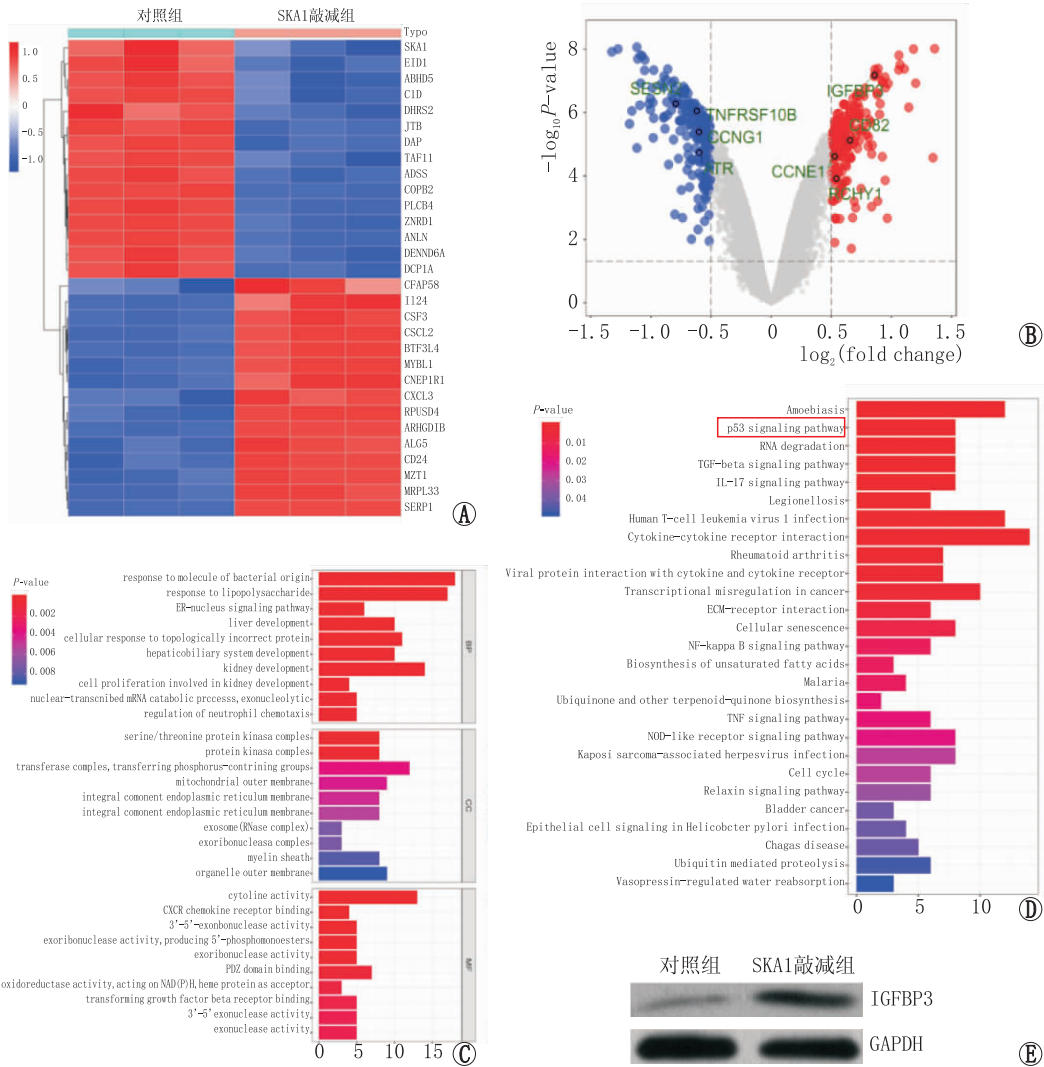


图 4 SKA1 敲减组、对照组全基因表达谱测序热图、火山图、富集分析柱状图以及相应细胞 Western blot 图 A:高、低表达组中差异最显著的前 15 个基因的热图;B:全部基因包含 P53 信号通路 8 个差异基因的火山图;C:差异基因 GO 柱状图;D:差异基因 KEGG 富集分析柱状图;E:各组 IGFBP-3 表达 Western blot 图。

信号通路(图4C、图4D),富集在此通路的基因包括胰岛素样生长因子结合蛋白-3(IGFBP3)、SESN2、TNFRSF10B、CCNG1、CD82、ATR、CCNE、RCHY1。为验证生物信息学的分析结果,分别提取SKA1敲减组及对照组细胞总蛋白,Western blot检测结果显示(图4E),SKA1敲减组IGFBP3表达下调,提示SKA1通过负调控IGFBP3抑制P53信号通路,从而促进UM细胞的增殖。

2.5 SKA1的高、低相对表达对UM患者生存期的影响 将TCGA数据库UM样本按SKA1表达(FPKM)最佳阈值(Best cutoff = 0.64)分为高、低表达患者,绘制Kaplan-Meier生存曲线,结果显示,SKA1高表达患者生存率显著下降($P < 0.05$; HR = 2.55, 95% CI: 0.92 ~ 7.05)(图5)。

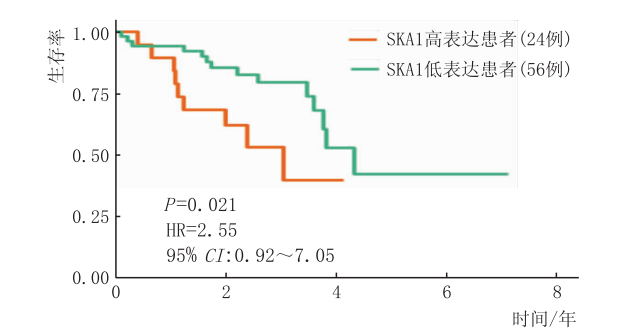


图5 SKA1的不同表达水平在UM患者中Kaplan-Meier生存曲线图

3 讨论

UM是成人最常见的眼内原发性恶性肿瘤,对于高危患者,可采用的有效治疗方案不足1%^[8],手术患者约50%以上出现血行转移,大部分累及肝脏,最终致肝衰竭而死亡。手术切除既没明显改善患者的生活质量,又没达到根治肿瘤的效果。因此,深入研究UM发生及转移的分子机制、寻找肿瘤分子标志物及治疗新靶点具有重要意义和临床应用价值。

有文献报道,SKA1参与胃癌、肝细胞癌、口腔鳞癌、涎腺腺样囊性癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、前列腺癌、神经胶质瘤、甲状腺乳头状癌、骨肉瘤等恶性肿瘤的转移^[9-14]。然而,SKA1在UM发生发展过程中的作用及分子机制目前尚不清楚。本研究首次发现SKA1通过P53/IGFBP3促进UM细胞增殖,抑制其凋亡,具有潜在的临床应用价值。

SKA1介导的信号通路在不同肿瘤中影响不同表型。Li等^[15]通过体外实验发现,SKA1除了在有丝分裂中富集于纺锤体微管和动粒外层,也会在培养细胞的中心体富集。在SKA1转基因裸鼠中,敲除SKA1导致中心体复制障碍,而SKA1过表达导致前列腺上皮细胞的中心体过度扩增,出现多个中心体,导致裸鼠的肿瘤发生概率增高。Zhang等^[16]发现,SKA1敲减后,口腔鳞状细胞癌CAL-27细胞的增殖、

克隆形成能力下降,凋亡增加,细胞周期被阻滞于G2/M期。Shi等^[17]研究发现,SKA1敲减后,A172、U251神经胶质瘤细胞增殖、侵袭能力减弱等。为进一步研究SKA1在UM的发生发展中是否发挥了促进细胞增殖、抑制细胞凋亡的作用,我们利用qRT-PCR检测三种UM细胞株中SKA1表达,并筛选出最有效的敲减序列shSKA1,用于后续的MTT实验及流式细胞技术、Caspase-3/7法检测。结果发现,敲减了SKA1的MUM-2B细胞增殖活性显著低于对照组,而细胞凋亡速度显著高于对照组。间接证明了SKA1在UM的发生发展中发挥促进增殖、抑制凋亡的作用,这与其他文献^[16-17]所报道结果相一致。

IGFBP3是胰岛素样生长因子(IGFs)系统中的六种高亲和力蛋白IGFBPs中作用最主要的调节蛋白,其主要功能是结合循环中的IGFs,从而控制它们的生物利用率^[18]。研究发现,IGFBP3可以通过控制IGFs对胰岛素样生长因子受体(IGF1R)的作用,从而发挥其抑制增殖和抗凋亡的作用^[19]。Yang等^[20]在体内外实验中均证实,IGFBP3的过表达均能抑制胶质细胞瘤肿瘤细胞增殖,进而抑制肿瘤生长。有研究表明,IGFBP3是P53调控的靶基因,其表达随野生型P53的增加而增加,并与IGFBP3启动子中的DNA反应元件结合^[21]。P53诱导IGFBP3表达已被证明与细胞凋亡增加和增殖减少有关^[22]。这些都证明IGFBP3蛋白在肿瘤发生发展过程中发挥抑癌基因的作用。为探索SKA1影响UM的潜在通路,我们利用KEGG富集分析发现,SKA1可能通过P53信号通路发挥作用,Western blot检测结果显示,SKA1敲减后P53通路中关键分子IGFBP3表达随之下降,提示SKA1可能通过P53/IGFBP3来影响UM细胞的增殖及凋亡。

同时,我们还分析了TCGA数据库UM样本中SKA1表达与临床及预后的相关性。由于TCGA数据库没有UM癌旁正常组织,我们分析SKA1的表达差异,只能分析其与临床及预后的关系。结果显示,SKA1高表达的患者总生存率明显降低,这与Dong等^[23]提出的SKA1是影响甲状腺乳头状癌预后的独立危险因素一致。

综上所述,本研究发现SKA1是影响UM预后的独立危险因素,通过P53/IGFBP3信号通路促进UM细胞增殖,抑制细胞凋亡。因此,SKA1增殖可能成为UM分子治疗的潜在靶点,然而,SKA1直接作用机制,包括与SKA1结合的上、下游蛋白分子及功能域尚不明确,有待进一步研究。

参考文献

[1] HARBOUR J W, CHAO D L. A molecular revolution in uveal melanoma: implications for patient care and targeted therapy [J]. *Ophthalmology*, 2014, 121(6): 1281-1288.
[2] 曹琼洁,董蓓,李丽,陈晓燕,王教,闫东升. microRNA-127抑制葡萄膜黑色素瘤细胞增殖的表观遗传调控研究[J]. 中华眼视光学与视觉科学杂志, 2018, 20(9): 546-551, 565.

- CAO Q J, DONG J, LI L, CHEN X Y, WANG J, YAN D S. Epigenetic regulation of microRNA-127 in the inhibition of uveal melanoma cell proliferation [J]. *Chin J Optim Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 20(9): 546-551, 565.
- [3] CARVAJAL R D, SCHWARTZ G K, TEZEL T, MARR B, FRANCIS J H, NATHAN P D. Metastatic disease from uveal melanoma: treatment options and future prospects [J]. *Br J Ophthalmol*, 2017, 101(1): 38-44.
- [4] HANISCH A, SILLJÉ H H, NIGG E A. Timely anaphase onset requires a novel spindle and kinetochore complex comprising SKA1 and SKA2 [J]. *EMBO J*, 2006, 25(23): 5504-5515.
- [5] ZHANG Q, SIVAKUMAR S, CHEN Y, GAO H, YANG L, YUAN Z, et al. SKA3 phosphorylated by CDK1 binds NDC80 and recruits SKA to kinetochores to promote mitotic progression [J]. *Curr Biol*, 2017, 27(10): 1477-1484.
- [6] SUN W, YAO L, JIANG B, LIN G, QIANG W. Spindle and kinetochore-associated protein 1 is overexpressed in gastric cancer and modulates cell growth [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 391(1/2): 167-174.
- [7] SCHMIDT J C, ARTHANARI H, BOESZOERMENYI A A, WILSON-KUBALEK E M, MONNIER N, MARKUS M, et al. The kinetochore-bound SKA1 complex tracks depolymerizing microtubules and binds to curved protofilaments [J]. *Dev Cell*, 2012, 23(5): 968-980.
- [8] RODRIGUES M, KONING L, COUPLAND S E, JOCHEMSEN A G, MARAIS R, STERN M H, et al. So close, yet so far: discrepancies between uveal and other melanomas. A position paper from UM cure 2020 [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(7): 1032.
- [9] QIN X H, YUAN B, XU X T, HUANG H, LIU Y. Effects of short interfering RNA-mediated gene silencing of SKA1 on proliferation of hepatocellular carcinoma cells [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2013, 48(11): 1324-1332.
- [10] GE J C, WANG Y X, CHEN Z B, CHEN D F. Integrin alpha 7 correlates with poor clinical outcomes, and it regulates cell proliferation, apoptosis and stemness via PTK2-P13K-Akt signaling pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Signal*, 2020, 66: 109465.
- [11] CHEN Y, ZHAO J, JIAO Z, WANG W, WANG D, YU X, et al. SKA1 overexpression is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 1240.
- [12] ZHAO L J, YANG H L, LI K Y, GAO Y H, DONG K, LIU Z H, et al. Knockdown of SKA1 gene inhibits cell proliferation and metastasis in human adenoid cystic carcinoma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90: 8-14.
- [13] YIP P Y. Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin (PI3K-Akt-mTOR) signaling pathway in non-small cell lung cancer [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2015, 4(2): 165-176.
- [14] AMARO A, GANGEMI R, PIAGGIO F, ANGELINI G, BARISSONE G, FERRINI S, et al. The biology of uveal melanoma [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2017, 36(1): 109-140.
- [15] LI J, XUAN J W, KHATAMIANFAR V, VALIYEVA F, MOUSSA M, SADEK A, et al. SKA1 over-expression promotes centriole over-duplication, centrosome amplification and prostate tumorigenesis [J]. *J Pathol*, 2014, 234(2): 178-189.
- [16] ZHANG B, LI K Y, CHEN H Y, PAN S D, JIANG L C, WU Y P, et al. Spindle and kinetochore associated complex subunit 1 regulates the proliferation of oral adenosquamous carcinoma CAL-27 cells in vitro [J]. *Cancer Cell Int*, 2013, 13(1): 83.
- [17] SHI X J, CHEN X Z, PENG H, SONG E, ZHANG T, ZHANG J X, et al. Lentivirus-mediated silencing of spindle and kinetochore-associated protein 1 inhibits the proliferation and invasion of neuronal glioblastoma cells [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(5): 3533-3538.
- [18] JOHNSON M A, FIRTH S M. IGFBP-3: a cell fate pivot in cancer and disease [J]. *Growth Horm IGF Res*, 2014, 24(5): 164-173.
- [19] JOGIE-BRAHIM S, FELDMAN D, OH Y. Unraveling insulin-like growth factor binding protein-3 actions in human disease [J]. *Endocr Rev*, 2009, 30(5): 417-437.
- [20] YANG C H, YUE J, PFEFFER S R, FAN M, PAULUS E, HOSNI-AHMED A, et al. MicroRNA-21 promotes glioblastoma tumorigenesis by down-regulating insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP3) [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(36): 25079-25087.
- [21] BURTNES B. Projections: novel therapies for HPV-Negative cancers of the head and neck [M]. New York: Springer, 2014.
- [22] 张玉洁, 孙怡琳, 朱苹, 郑雁飞, 张倩, 马晓丽. 非小细胞肺癌中IGFBP-3, P53, Ki-67的表达及临床意义 [J]. *贵州医药*, 2020, 44(1): 6-9, 16.
- [23] ZHANG Y J, SUN Y L, ZHU P, JIA Y F, ZHANG Q, MA X L. Expression and clinical significance of IGFBP-3, P53, Ki-67 in non-small cell lung cancer [J]. *Guizhou Med J*, 2020, 44(1): 6-9, 16.
- [23] DONG C, WANG X L, MA B L. Expression of spindle and kinetochore-associated protein 1 is associated with poor prognosis in papillary thyroid carcinoma [J]. *Dis Markers*, 2015, 2015: 616541.

Molecular mechanism of spindle and kinetochore associated complex-1 in promoting the proliferation of uveal melanoma cells

LING Feng¹, ZHANG Yong², XIN Xiangyang¹

1. Department of Ophthalmology, the Third Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University (Inner Mongolia Baogang Hospital), Baotou 014010, Inner Mongolia Autonomous Region, China
2. Department of Oncology, Inner Mongolia Autonomous Region People's Hospital, Huhehaote 010000, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Corresponding author: XIN Xiangyang, E-mail: xinxiangyang_2006@163.com

[Abstract] Objective To investigate the molecular mechanism of spindle and kinetochore associated complex-1 (SKA1) in promoting uveal melanoma (UM) cell proliferation. **Methods** MUM-2B cells were infected by lentivirus through SKA1 knockdown (SKA1 group) and empty vector (control group). Cell proliferation and apoptotic phenotype were detected by MTT assay, flow cytometry and Caspase-3/7 assay. Gene expression microarray was used to screen differential genes, KEGG enrichment analysis was performed to explore the potential signaling pathways through which SKA1 promotes the development of UM, and Western blot was used to detect the changes of key proteins in the signaling pathways. The relationship between SKA1 expression and prognosis was analyzed using UM RNA-Seq and follow-up data from TCGA database. **Results** Compared with the control group, the optical density of the SKA1 group was significantly reduced at day 3, 4 and 5 after the cell culture (all $P < 0.01$), while the cell apoptosis rate and Caspase-3/7 activity were significantly increased (all $P < 0.01$). KEGG enrichment analysis results showed that the differential genes were enriched in the P53 signaling pathway. Western blot confirmed that the expression of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) in the P53 pathway was significantly decreased after SKA1 knockdown ($P < 0.05$). The overall survival of patients with high SKA1 expression decreased ($P = 0.021$, HR = 2.55, 95% CI: 0.92 - 7.05). **Conclusion** SKA1 promotes the proliferation of UM cells through the P53/IGFBP-3 signaling pathway, and the high SKA1 expression is a risk factor for the prognosis of UM patients.

[Key words] spindle and kinetochore associated complex-1; uveal melanoma; insulin-like growth factor-binding protein-3; cell proliferation; cell apoptosis