

RNA 干扰 Chk1/2 调控二烯丙基二硫诱导的 G2/M 期阻滞作用及相关周期蛋白表达*

凌 晖 陆丽峰 文 玲 何 洁 谭 晖 夏 红 苏 琦**

(南华大学肿瘤研究所, 衡阳 421001)

摘要 在细胞周期检测点信号传导通路中, Chk1 和 Chk2 起着重要作用, 主要参与 G2/M 期细胞周期检测点信号传导. 首先采用 RNAi 技术在 BGC823 细胞中将 Chk1、Chk2 基因沉默, Chk1、Chk2 siRNA 转染 BGC823 细胞后 24 h 加入 15 mg/L 二烯丙基二硫(diallyl disulfide, DADS), 接着通过 Real-time PCR、Western blot 分析 Chk1、Chk2 基因在转染前后的表达差异, 然后运用流式细胞术和 Western blot 分析 Chk1、Chk2 基因沉默后对 DADS 诱导的细胞周期 G2/M 期阻滞作用及相关周期蛋白 CDC25C 和 cyclinB1 表达的影响. 实验结果表明, 与未转染对照组相比, 转染 Chk1、Chk2 siRNA 后 BGC823 细胞中 Chk1、Chk2 表达明显被抑制, 二者的 mRNA 表达分别下降 84.7%和 69.0%, 蛋白质水平分别下降 73.4%和 78.5%. 流式细胞术分析结果发现, Chk1 siRNA 转染的 BGC823 细胞在 15 mg/L DADS 处理 24 h 后, G2/M 期比例由单纯 DADS 处理组的 58.1%降至 10.4% ($P < 0.05$). 但 Chk2 siRNA 转染后加入 15 mg/L DADS, 与单独 15 mg/L DADS 作用相比, 细胞周期 G2/M 期比例差异不明显($P > 0.05$). Chk1 和 Chk2 下游分子的改变显示, DADS 可抑制 BGC823 细胞中 CDC25C 和 cyclinB1 表达 ($P < 0.05$), 但 Chk1 基因沉默后加入 DADS, CDC25C 和 cyclinB1 表达却不被抑制($P > 0.05$), Chk2 基因沉默后对 DADS 抑制 CDC25C 和 cyclinB1 表达的作用无影响. 由此得出结论, Chk1 基因沉默可消除 DADS 诱导 BGC823 细胞 G2/M 期阻滞作用, DADS 阻滞 G2/M 期可能是通过 Chk1/CDC25C/cyclinB1 信号通路起作用.

关键词 RNA 干扰, Chk1/2, BGC823 细胞株, 细胞周期, 二烯丙基二硫, CDC25C, cyclinB1

学科分类号 R734.2

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00469

生物体内存在复杂的细胞周期检测点信号网络途径, 它是由感受器(Rad9-Rad1-Hus1 复合体、Rad17 等)、信号转导通路、效应器(Chk1、Chk2 等)构成^[1]. 当损伤因素作用于 DNA 后, 触发此途径而引起一系列的级联效应, 如细胞周期的阻滞、错配修复系统的活化以及修复后细胞周期的恢复等^[2]. 更有研究表明, Chk1 缺失的肿瘤细胞表现出多重缺陷, 如细胞增殖缓慢、细胞周期检测点的阻滞反应消失、对 DNA 损伤剂的敏感性增加^[3-4]. 由于细胞周期与肿瘤的密切关系, Chk1/2 与肿瘤的关系及其在肿瘤发生、发展、治疗中的作用也是目前研究的热点.

二烯丙基二硫(diallyl disulfide, DADS)是大蒜中的有效抗癌成分, 其对乳腺癌、肝癌、肺癌、胃癌、结肠癌、前列腺癌、神经母细胞瘤、白血病细胞增殖有明显的抑制作用^[5-12], 且 Arunkumar 等^[13]的研究发现, DADS 是通过诱导 G2/M 期阻滞

起到抑制前列腺癌 PC-3 细胞增殖的作用. 我们前期工作表明, DADS 可抑制人胃癌 BGC823 细胞增殖与诱导细胞周期 G2/M 期阻滞, 其机制可能与抑制细胞周期检测点激酶 Chk 下游分子 CDC25C、cyclinB1 表达有关^[14]. 鉴于 Chk1/2 在细胞周期及肿瘤发生发展、治疗中的重要作用, 本课题通过 RNAi 将 Chk1 和 Chk2 基因沉默, 阻断细胞周期检测点信号传导通路, 观察其对 DADS 诱导的人胃癌 BGC823 细胞 G2/M 期阻滞作用及相关周期蛋白 CDC25C、cyclinB1 表达的影响.

* 国家自然科学基金(30600285), 南华大学博士科研启动基金(2007XQD26)和湖南省重点学科建设资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0734-8281547, E-mail: suq1@hotmail.com

收稿日期: 2009-08-04, 接受日期: 2009-12-01

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DADS 购自 Fluka 公司; RPMI-1640 培养基购自 GIBCO 公司; 胎牛血清购自 Hyclone 公司; siRNA 转染试剂、siRNA 转染培养基及 Chk1、Chk2 siRNA、Lipofectamine2000 为 Santa Cruz 公司产品; Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司; Real-time PCR 所需 TaqBead™ 热启动聚合酶、RNA 酶抑制剂、MMLV 反转录酶等均由 Promega 公司提供; Bradford 试剂购于上海生物工程公司; Chk1、Chk2、CDC25C 和 cyclinB1 一抗(均为兔多克隆抗体)及相应二抗均为 Santa Cruz 公司产品; β -Actin 一抗购自博士德公司, 为兔多克隆抗体; ECL 发光剂 LumiGLO Reagent 是 CST 公司产品; 通用 PCR 试剂由上海生工生物工程有限公司提供; 碘化丙锭(PI)购自 Sigma 公司。

1.2 BGC823 细胞的培养

人胃癌细胞株 BGC823 购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所。常规培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 置于 37°C、5% CO₂, 恒湿恒温培养箱中培养。

1.3 siRNA 的配制及脂质体复合体合成

5 nmol 的 Chk1、Chk2 siRNA 均用无核酸酶水稀释, 终浓度为 20 μ mol/L。将干扰用的适量 siRNA 稀释于 siRNA 转染培养基中, 轻轻混匀。适量的 Lipofectamine2000 与稀释的 siRNAs 混合, 轻轻混匀, 并于室温下孵育 20 min 左右, 以使 siRNA-Lipofectamine2000 复合体形成。

1.4 siRNA 转染细胞

转染前一天将对数生长期的细胞以 3×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 细胞铺板在 2 ml 含血清、不含抗生素的正常培养基中, 于 24 h 内细胞融合达 40%~60% 左右进行转染, 在加入复合物前换用 1 ml 无血清、无抗生素的培养基, 然后将脂质体复合体加到培养板中, 转染体系为 500 μ l, siRNA 终浓度为 100 nmol/L。置 37°C CO₂ 培养箱中培养 6 h, 吸弃培养基, 加入新鲜的含血清、不含抗生素的正常培养基 2.5 ml, 以空载体和非特异性 siRNA 转染作为对照。

1.5 Real-time PCR 检测 Chk1、Chk2 mRNA 的水平

设计并合成 Real-time PCR 引物。chk1: 正向引物, 5' CGGTATAATAATCGTGAGCG 3', 反向

引物, 5' TTCCAAGGGTTGAGGTATGT 3'; chk2: 正向引物, 5' CTCGGGAGTCGGATGTTGAG 3', 反向引物, 5' GAGTTTGGCATCGTGCTGGT 3'; GAPDH: 正向引物, 5' AAGAAGGTGGTGAAGC-AGGC 3', 反向引物, 5' TCCACCACCCTGTTG-CTGTA 3'。产物长度分别为 230、142、203 bp。用 Trizol 试剂抽提转染后 24 h 细胞中总 RNA, 将 1 μ l dNTP、1 μ l MMLV、4 μ l 5 \times MMLV 反转录反应缓冲液, 1 μ l Oligo(dT), 1 μ l RNasin 混合后, 加入 3 μ g RNA, 随后用双蒸水补足至 20 μ l, 混匀, 置 37°C 水浴 2 h, 95°C 变性 5 min。得 RT 终溶液即为 cDNA 溶液, 置冰浴待用。进行相对定量, 需要先将样品的目的基因以及管家基因进行 PCR 扩增, 其产物进行梯度稀释用于做标准曲线。标准曲线样品和待测样品分别加入到含 SG 的 Real-time PCR 反应液中, 进行 Real-time PCR 扩增和检测。Real-time PCR 反应体系配置如下: dNTP(2.5 mmol/L) 2.5 μ l, 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ l, 25 mmol/L MgCl₂ 溶液 1.5 μ l, Taq 聚合酶 1 U, Sybergreen I (分子探针) 终浓度为 0.25 \times , 10 μ mol/L 的 PCR 特异正向引物 1 μ l, 10 μ mol/L 的 PCR 特异反向引物 1 μ l, cDNA 或 DNA 1 μ l, 加水至总体积为 25 μ l。置于 Real-time PCR 仪上进行 PCR 反应, 各基因扩增条件如下。GAPDH: 95°C, 5min; 35 个 PCR 循环(95°C, 10 s; 58°C, 15 s; 72°C, 20 s; 86°C(收集荧光), 5 s)。chk1: 95°C, 5 min; 35 个 PCR 循环(95°C, 10 s; 58°C, 15 s; 72°C, 20 s; 80°C(收集荧光), 5 s)。chk2: 95°C, 5 min; 35 个 PCR 循环(95°C, 10 s; 58°C, 15 s; 72°C, 20 s; 86.5°C(收集荧光), 5 s)。为了建立 PCR 产物的熔解曲线, 扩增反应结束后继续从 72°C 缓慢加热到 99°C(每 5 s 升高 1°C)。检测结果进行标准曲线分析, 以对待测样品的目的基因进行定量。相对定量实验需要进一步用样品的目的基因测得值除以管家基因测得值以校正误差, 所得结果代表某样品的目的基因相对含量。

1.6 Western blot 检测 Chk1、Chk2、CDC25C 和 cyclinB1 蛋白的水平

细胞裂解, 收集蛋白质, Bradford 法测定细胞蛋白质含量。蛋白质变性后每孔上样 30 μ g, 经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至 PVDF 膜上, 用含 5% 牛血清白蛋白的 TBST(Tris-HCl 20 mmol/L, NaCl 137 mmol/L 含 0.1% Tween-20)封闭 1 h, 用 Chk1、Chk2、CDC25C、cyclinB1、 β -actin 一抗

4°C 孵育过夜, TBST 洗 3 次, 每次 5 min, 相应的二抗孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 每次 5 min, 化学发光剂检测蛋白质印迹, 薄层色谱扫描仪(日本公司生产, 型号 CS-930)测定印迹区带的灰度值。

1.7 流式细胞仪检测细胞周期

收集培养细胞, 用预冷 PBS 洗涤 2 次, 再用 4°C 预冷的 75%乙醇固定 48 h, 1 000 *g* 离心 10 min, 弃上清, 1 000 μ l PBS 重悬, 加 0.5 g/L RNase 50 μ l, 混匀, 37°C 水浴 30 min, PBS 洗去 RNase, 100 μ l PBS 重悬, 加 1 g/L 碘化丙啶(PI)50 μ l, 振荡混匀, 4°C 避光染色 30 min. 流式细胞仪测定荧光强度, Cell Quest 分析软件进行细胞周期 DNA 含量分析, 确定细胞周期分布。

1.8 统计学方法

采用 SPSS11.5.2.1 统计分析软件, 进行 Student's *t*-test 法分析, 数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 确定 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结 果

2.1 Chk1、Chk2 siRNA 转染对 Chk1 和 Chk2 mRNA 水平的影响

siChk1、siChk2 转染 24 h 后提取总 RNA, 用 Real-time PCR 检测 Chk1、Chk2 基因的表达抑制情况, 设立 3 个平行试验组(RNAi 组、脂质体转染组、未转染对照组), 结果表明, 转染 siChk1、siChk2 的 BGC823 细胞分别出现 Chk1、Chk2 mRNA 水平下调, 与未转染对照组、脂质体转染组比较有差异 ($P < 0.05$, 表 1)。BGC823 细胞 siChk1、siChk2 转染后 Chk1、Chk2 表达抑制率分别为 84.7%和 69.0%。我们使用管家基因 GAPDH (不同样品间表达量基本恒定)作为内参, 以样品待测基因所得值除以该样品内参所得值, 最终得到的比值为样品的待测基因相对含量。

Table 1 The expression of Chk1 and Chk2 in Chk1 and Chk2 siRNA transfected cells by Real-time PCR

Group	Chk1/GAPDH	Chk2/GAPDH
Empty control cells	6.27×10^{-2}	1.21×10^{-3}
Lipofectamine-transfected cells	5.99×10^{-2}	1.19×10^{-3}
siRNA-transfected cells	$9.57 \times 10^{-3*}$	$3.75 \times 10^{-4*}$

The data were averages of three independent determinations. * $P < 0.05$ vs empty control cells and lipofectamine-transfected cells.

2.2 Chk1、Chk2 siRNA 转染对 Chk1 和 Chk2 蛋白水平的影响

蛋白质印迹检测结果显示(图 1), 转染靶向

Chk1、Chk2 siRNA 24 h 的 Chk1、Chk2 蛋白杂交带, 明显弱于未转染对照组、脂质体转染组 ($P < 0.05$), 而未转染对照组、脂质体转染组之间比较无显著性差异($P > 0.05$), 进一步证实了转染靶向 Chk1、Chk2 siRNA 抑制 Chk1、Chk2 蛋白的表达, 以及抑制作用的特异性。薄层色谱扫描仪分析结果显示, Chk1、Chk2 的蛋白表达分别下调 73.4%和 78.5%。

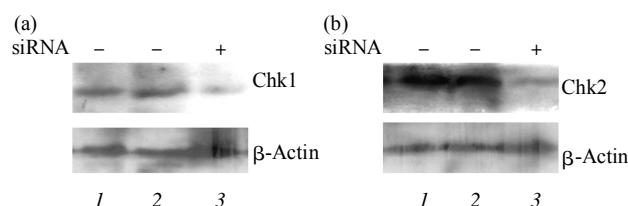


Fig. 1 Protein expression of Chk1(a) and Chk2(b) in BGC823 cells at 24 h after Chk1 or Chk2 siRNA-transfection detected by Western blot

1: Empty control cells; 2: Lipofectamine-transfected cells; 3: Chk1(a) or Chk2(b) siRNA-transfected cells. $P < 0.05$ vs empty control cells and lipofectamine-transfected cells.

2.3 Chk1、Chk2 siRNA 转染对 DADS 诱导 BGC823 细胞周期的影响

为了探讨 Chk1、Chk2 siRNA 转染与细胞周期的关系, 我们采用了流式细胞仪(FCM)的方法。以 siChk1、siChk2 转染 BGC823 细胞, 15 mg/L DADS 处理后 24 h 和 48 h, 细胞周期变化表现为: BGC823 细胞经 DADS 作用 24 h 时, G2/M 期细胞增加到 58.1%; 48 h 时为 36.2%, 均明显高于未处理对照组 ($P < 0.05$)。siChk1 转染明显降低 DADS 处理后 G2/M 期比例, 在 siChk1 转染后加入 15 mg/L DADS, 与单独 15 mg/L DADS 作用相比其 G2/M 期比例明显降低, 24 h 时最明显, 由 58.1%下降至 10.4%相差 5 倍多, 48 h 时 G2/M 期比例为 17.1%。 ($P < 0.05$, 图 2)。表明 DADS 对 BGC823 细胞的 G2/M 期阻滞作用被 siChk1 明显抑制。但 siChk2 转染后加入 15 mg/L DADS, 与单独 15 mg/L DADS 作用相比细胞周期 G2/M 期比例差异不明显 ($P > 0.05$, 图 2)。

2.4 Chk1、Chk2 siRNA 转染对 DADS 诱导 CDC25C 和 cyclinB1 表达的影响

BGC823 细胞经 siChk1、siChk2 转染后, 加或不加 DADS 后于 24 h 收集细胞, Western blot 结果显示, 15 mg/L DADS 处理 24 h 可明显抑制 BGC823 细胞内 CDC25C 和 cyclinB1 表达 ($P < 0.05$, 图 3)。转染靶向 Chk1 siRNA 抑制 Chk1 蛋白的表

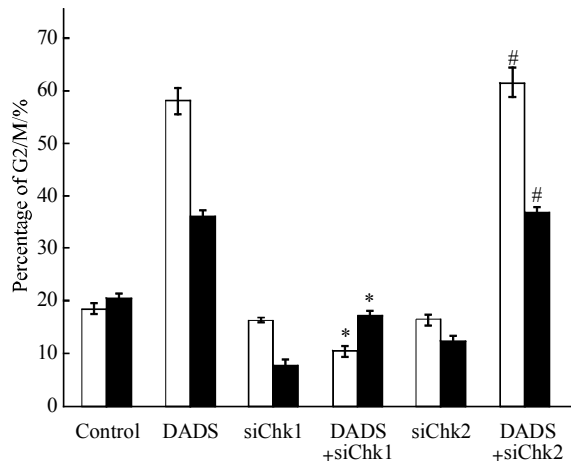


Fig. 2 The changes in the percentage of BGC823 cells in G2/M phases

* $P < 0.05$ vs DADS group. # $P > 0.05$ vs DADS group. □: 24 h; ■: 48 h.

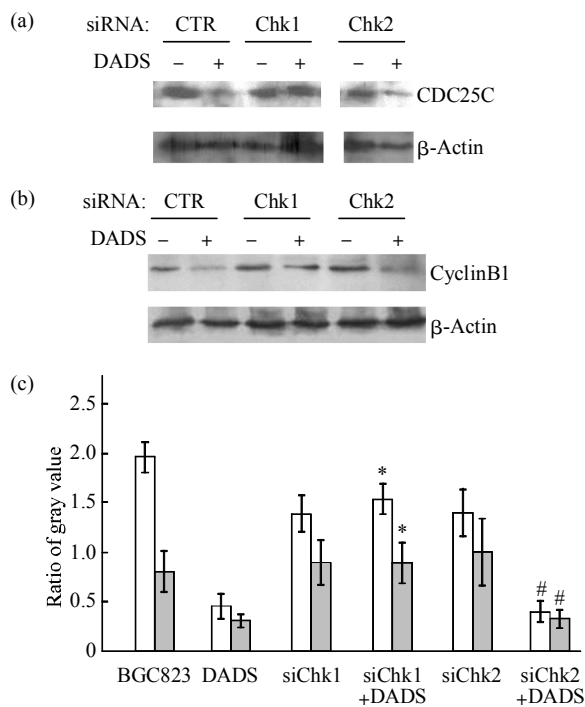


Fig. 3 expression of CDC25C and cyclinB1 by Chk1 and Chk2 RNAi in BGC823 cells

(a) Western blot analysis of CDC25C expression in BGC823 cells after treatment of siChk1 or siChk2. β-Actin was used as a loading control. (b) Western blot analysis of cyclinB1 expression in BGC823 cells after treatment of siChk1 or siChk2. β-Actin was used as a loading control. (c) The gray values for CDC25C and cyclinB1 were determined by thin layer chromatography. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. Average of duplicates constitutes one determination. * $P < 0.05$ vs DADS group, # $P > 0.05$ vs DADS group. □: CDC25C; ■: CyclinB1.

达后, DADS 加入时却不能抑制 CDC25C 和 cyclinB1 表达, 其表达与单纯 DADS 处理组相比有统计学差异($P < 0.05$, 图 3); 但是转染靶向 Chk2 siRNA 抑制 Chk2 蛋白的表达后, DADS 加入时仍可抑制 CDC25C 和 cyclinB1 表达, 其表达与单纯 DADS 处理组相比无差异($P > 0.05$, 图 3).

3 讨 论

Chk1/2 是一种进化上高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白质激酶. 当 DNA 复制受阻或损伤后, 活化的 Chk1/2 可通过磷酸化 CDC25C, 阻止 CDC25C 对 CDC2 的去磷酸化作用, 从而抑制 CDC2-cyclinB 的活性, 使细胞阻滞在 G2/M 期, 供受损的 DNA 修复^[15]. Chk1/2 信号途径因其对细胞的保护作用近年成为治疗肿瘤的新靶点. 前期工作表明, DADS 可诱导人胃癌 BGC823 细胞阻滞于 G2/M 期^[4]. 本研究应用 RNA 干扰技术使胃癌细胞株 BGC823 的 Chk1、Chk2 基因沉默, 旨在探讨 Chk1/2 在 DADS 诱导人胃癌 BGC823 细胞周期阻滞中的作用.

首先采用 RNA 技术将 Chk1 和 Chk2 基因沉默, 阻断细胞周期检测点信号传导通路. 结果显示, 转染 Chk1、Chk2 siRNA 的 BGC823 细胞株其 Chk1、Chk2 mRNA 和蛋白质表达量明显较未转染组为低. Chk1、Chk2 蛋白主要功能是参与 G2/M 期细胞周期检测点信号传导, 当其表达降低而出现功能障碍时, 细胞将无法启动细胞周期检测点对受损的 DNA 进行修复, 从而表现为对抗肿瘤药物的敏感性增加. 有研究显示, Chk1、Chk2 反义寡核苷酸转染 HL-60 细胞株可增加其放疗敏感性^[16].

我们的实验结果显示, 在 siChk1 转染后加入 15 mg/L DADS, 与单独 15 mg/L DADS 作用相比其 G2/M 期比例明显降低, 24 h 时最明显, 由 58.1% 下降至 10.4% 相差 5 倍多, 48 h 时 G2/M 期比例为 17.1%, 稍高于 24 h, 这可能是由于 Chk1 基因沉默效率在 24 h 最高, 至 48 h 时有所下降, 从而导致其对 DADS 诱导的 G2/M 期阻滞的消除作用减弱. 以上结果表明, Chk1 RNAi 沉默目的基因对 DADS 诱导的 G2/M 期阻滞作用产生了显著的影响, 在 Chk1 基因沉默后使 DADS 诱导的 G2/M 期阻滞作用明显消除, 表明 Chk1 是 BGC823 细胞的 G2/M 期主要检查点激酶, 其功能缺陷将导致检查点消除, 也就引起 G2/M 期阻滞作用消除, 细胞在 G2/M 期百分比减少. 但是 Chk2 基因沉默后对

DADS 诱导的 G2/M 期阻滞作用无明显影响, 说明 Chk2 不是 BGC823 细胞周期 G2/M 的主要检查点激酶。

前期工作发现, DADS 对 BGC823 细胞的 G2/M 期阻滞作用与下调 CDC25C 磷酸酶、cyclinB1 的表达有关^[5]。CDC25C 是 Chk1 和 Cds1(即 Chk2)作用的下游分子。Chk1 可通过一些机制下调 CDC25C 磷酸酶活性^[17]。研究显示, 活化的 Chk2 也可作用于 CDC25C 参与细胞周期调节^[18], 为了阐明 DADS 诱导 BGC823 细胞 G2/M 期阻滞的作用机制, 本实验在前期工作的基础上, 探讨 Chk1 和 Chk2 的改变对其下游分子 CDC25C、cyclinB1 表达的影响。结果显示, Chk1 基因沉默后加入 DADS, CDC25C 和 cyclinB1 表达不被抑制, 但 Chk2 基因沉默后对 DADS 抑制 Cdc25C 和 cyclinB1 表达的作用无影响, 提示 DADS 是通过靶向 Chk1 对 Cdc25C 和 cyclinB1 表达产生影响, 而不是通过 Chk2, 这说明 DADS 阻滞 G2/M 期是通过 Chk1/Cdc25C/cyclinB1 信号通路起作用。

目前, 肿瘤的治疗仍以放化疗、手术治疗为主, 但放化疗毒副作用较大且易复发, 手术治疗也并非适合所有患者, 因此寻找高效、高选择性的肿瘤治疗靶点是当前基因治疗领域的重大任务。Chk1 基因沉默在 DADS 诱导的 BGC823 细胞周期阻滞中显示出的突出效果, 提示干预 Chk1 的表达, 可从细胞周期检测点调控肿瘤的发生及发展。而 RNA 干扰为高效、高特异性地抑制该靶点的功能提供技术保证。但 Chk1 通过 Cdc25C/cyclinB1 信号通路诱导细胞周期阻滞在体内的作用仍需进一步地研究。

参 考 文 献

- [1] Choi J H, Lindsey-Boltz L A, Sancar A. Reconstitution of a human ATR-mediated checkpoint response to damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104** (33): 13301-13306
- [2] Sorensen C S, Hansen L T, Dziegielewska J, *et al.* The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat Cell Biol*, 2005, **7**(2): 195-201
- [3] Herman-Antosiewicz A, Stan S D, Hahn E R, *et al.* Activation of a novel ataxia-telangiectasia mutated and Rad3 related/checkpoint kinase 1-dependent prometaphase checkpoint in cancer cells by diallyl trisulfide, a promising cancer chemopreventive constituent of processed garlic. *Mol Cancer Ther*, 2007, **6**(4): 1249-1261
- [4] Zachos G, Black E J, Walker M, *et al.* Chk1 is required for spindle checkpoint function. *Dev Cell*, 2007, **12**(2): 247-260
- [5] Nakagawa H, Tsuta K, Kiuchi K, *et al.* Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human breast cancer cell lines. *Carcinogenesis*, 2001, **22**(6): 891-897
- [6] De Martino A, Filomeni G, Aquilano K, *et al.* Effects of water garlic extracts on cell cycle and viability of HepG2 hepatoma cells. *J Nutr Biochem*, 2006, **17**(11): 742-749
- [7] Wu X J, Kassie F, Mersch-Sundermann V. The role of reactive oxygen species (ROS) production on diallyl disulfide (DADS) induced apoptosis and cell cycle arrest in human A549 lung carcinoma cells. *Mutat Res*, 2005, **579**(1-2): 115-124
- [8] Ling H, Zhang L Y, Su Q, *et al.* ERK is involved in the differentiation induced by diallyl disulfide in the human gastric cancer cell line MGC803. *Cell Mol Biol Lett*, 2006, **11**(3): 408-423
- [9] Jakubikova J, Sedlak J. Garlic-derived organosulfides induce cytotoxicity, apoptosis, cell cycle arrest and oxidative stress in human colon carcinoma cell lines. *Neoplasma*, 2006, **53**(3): 191-199
- [10] Gayathri R, Gunadharini D N, Arunkumar A, *et al.* Effects of diallyl disulfide (DADS) on expression of apoptosis associated proteins in androgen independent human prostate cancer cells (PC-3). *Mol Cell Biochem*, 2009, **320**(1-2): 197-203
- [11] Aquilano K, Filomeni G, Baldelli S, *et al.* Neuronal nitric oxide synthase protects neuroblastoma cells from oxidative stress mediated by garlic derivatives. *J Neurochem*, 2007, **101** (5): 1327-1337
- [12] Yang J S, Kok L F, Lin Y H, *et al.* Diallyl disulfide inhibits WEHI-3 leukemia cells *in vivo*. *Anticancer Res*, 2006, **26** (1A): 219-225
- [13] Arunkumar A, Vijayababu M R, Srinivasan N, *et al.* Garlic compound, diallyl disulfide, induces cell cycle arrest in prostate cancer cell line PC-3. *Mol Cell Biochem*, 2006, **288**(1-2): 107-113
- [14] 凌 晖, 苏 琦, 廖前进, 等. Cdc25C、cyclin B1 在二烯丙基二硫化物诱导人胃癌 BGC823 细胞 G2/M 期阻滞中的作用. *中国肿瘤临床*, 2008, **35**(22): 1299-1302
- [15] Niida H, Nakanishi M. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis*, 2006, **21**(1): 3-9
- [16] 汤 屹, 刘文励, 周剑锋, 等. chk1、chk2 反义寡核苷酸转染 HL-60 细胞株增加其放疗后凋亡敏感性. *中华血液学杂志*, 2003, **24**(5): 253-255
- [17] Tang Y, Liu W L, Zhou J F, *et al.* *Chin J Hematol*, 2003, **24**(5): 253-255
- [18] Chen M S, Ryan C E, Piwnicka W H. Chk1 kinase negatively regulates mitotic function of Cdc25A phosphatase through 14-3-3 binding. *Mol Cell Biol*, 2003, **23**(21): 7488-7497
- [19] Bartek J, Lukas J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*, 2003, **3**(5): 421-429

Interference of Chk1/2 by RNA Regulates G2/M Arrest and Expressions of Cell Cycle Related Proteins Induced by Diallyl Disulfide*

LING Hui, LU Li-Feng, WEN Ling, HE Jie, TAN Hui, XIA Hong, SU Qi**

(Cancer Research Institute, University of South China, Hengyang 421001, China)

Abstract Chk1 and Chk2 play major role in cell cycle checkpoint signaling pathway, which are mainly involved in G2/M cell cycle checkpoint signal transduction. Firstly, the siRNA targeting at Chk1 or Chk2 gene was transfected into human gastric cancer BGC823 cells for 24 h before 15 mg/L DADS was added. Then, the mRNA and protein expression of Chk1 or Chk2 was detected by Real-time PCR and Western-blot respectively. Cell cycle rates and expressions of CDC25C and cyclinB1 were determined by FCM and Western blot respectively. The results showed that the Chk1 or Chk2 expression was inhibited in Chk1 or Chk2 siRNA-transfected group, in which the Chk1 or Chk2 expression at mRNA level was reduced 84.7% and 69.0% respectively and the protein expression of Chk1 or Chk2 was reduced 73.4% and 78.5% respectively as compared with that in empty control group ($P < 0.05$). Then it was investigated whether Chk1 and Chk2 proteins could influence cell cycle regulation by knocking down their expressions in BGC823 cells. Further investigation revealed that inhibition of the Chk1 expression in Chk1 siRNA transfected group cut down the proportion of the cells in G2/M phase from 58.1% to 10.4% in BGC823 cells after 24 h induced by DADS ($P < 0.05$). While inhibition of the Chk2 expression in Chk2 siRNA transfected group had little effect on G2/M arrest after treatment with DADS ($P > 0.05$). Western blot showed that although DADS decreased expression of CDC25C and cyclinB1 in untransfected cells, inhibition of expression of CDC25C and cyclinB1 treated by DADS was blocked by Chk1 gene silence ($P < 0.05$). On the contrary, Chk2 gene silence can not do so. These results suggest Chk1 gene silence could abrogate G2/M arrest induced by DADS in BGC823 cell line, and Chk1/CDC25C/cyclinB1 pathway was involved at the G2/M arrest induced by DADS.

Key words RNA interfering, Chk1/2, BGC823 cell line, cell cycle, diallyl disulfide, CDC25C, cyclinB1

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00469

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30600285), Doctor Start-up Fund Research of University of South China (2007XQD26) and The Construct Program of The Key Discipline in Hunan Province in China.

**Corresponding author.

Tel: 86-734-8281547, E-mail: suqi1@hotmail.com

Received: August 4, 2009 Accepted: December 1, 2009