DOI:10.16016/j.1000-5404.201412210

论著

miR-451对肺癌细胞的增殖抑制及其靶基因的初步鉴定

武天慧[1*],彭 睿[2*],彭惠民[3],罗勇军[4],姚 莉[1],孙 艳[1],尹 频[1],文 利[1],张 政[1] (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院:细胞生物学及遗传学教研室[1],生物信息学教研室[2],实验教学中心[3];400038 重庆,第三军医大学高原军事医学系军事医学地理学教研室[4])

[摘要] **目的** 探讨微小RNA(microRNA, miRNA)对非小细胞肺癌细胞增殖的作用及调控机制。**方法** Lipofectamine 2000转染已构建成功的miR-451真核表达载体至非小细胞肺癌细胞A549,通过MTT检测肺癌细胞增殖状况,流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡情况,运用生物信息学技术对miR-451预测靶基因进行GO分析和KEGG信号途径分析,对炎症相关的预测靶基因PSMB8进行进一步的验证。构建含有PSMB8 3′ UTR野生型和突变型质粒,通过双荧光素酶检测A549细胞PSMB8表达水平,Western blot检测PSMB8和NOS2的表达情况。**结果** MTT结果显示过表达miR-451能显著抑制A549细胞增殖。流式细胞术检测发现miR-451组细胞阻滞在G_2期,而细胞凋亡未见明显差异。GO分析发现miR-451预测靶基因涉及PSMB8、CAB39、YWHAZ等17个基因,PSMB8主要参与细胞代谢调控,细胞周期与细胞增殖; KEGG信号途径分析结果显示靶基因主要涉及microRNA在细胞周期、PI3K-AKT、mTOR等信号通路。17个miR-451预测靶基因进行生物信息学研究发现PSMB8含有miR-451的结合位点,且在多个物种中呈高度保守。荧光素酶活性检测发现,过表达miR-451可抑制PSMB8荧光素酶活性表达。Western blot结果发现过表达miR-451的A549细胞PSMB8呈下调,而低表达miR-451的正常支气管上皮16HEB细胞PSMB8呈上调。Western blot和细胞荧光免疫化学检测发现炎症因子NOS2在肺癌中表达也降低。**结论** miR-451可能通过靶向炎症相关基因PSMB8/NOS2调控非小细胞肺癌细胞增殖,并参与肺癌的发生与发展。

[关键词] 肺癌;微小RNA;细胞增殖
[中图法分类号] R394-33;R730.23;R734.2 [文献标志码] A

Inhibitory effect of microRNA-451 on proliferation in lung cancer A549 cells and primary identification for its target genes

Wu Tianhui[1], Peng Rui[2], Peng Huimin[3], Luo Yongjun[4], Yao Li[1], Sun Yan[1], Yin Pin[1], Wen Li[1], Zhang Zheng[1] ([1]Department of Cell Biology and Genetics, [2]Department of Bioinformatics, [3]Experimental Teaching Center, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [4]Department of Military Medical Geography, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the role of microRNA-451 (miR-451) in the proliferation in non-small cell lung cancer cells and investigate the underlying regulative mechanism. **Methods** The eukaryotic expression vector of miR-451 (pGenesil-miR-451) was transfected into A549 cells using Lipofectamine 2000, and then the cell proliferation was tested by MTT assay, and cell apoptosis and cell cycle were examined by flow cytometry. Bioinformatics analysis was used for miR-451 target prediction. The target gene functional analysis was carried on by GO and KEGG pathway analysis. Among the candidate genes,

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81270912);重庆市科委资助项目(CSTC2013jcyjA10044)
*: 同等贡献者
[通信作者] 张 政,E-mail: zhangzheng92@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150324.1522.020.html(2015-03-24)

PSMB8 was chosen. The luciferase gene expression vectors containing PSMB8 3′ UTR widetype and PSMB8 3′ UTR mutant were constructed. And the luciferase activity was detected by dual-luciferase reporter assay. Moreover, the expression of PSMB8 and NOS2 was determined by Western blotting. **Results** MTT assay showed that the cell proliferation was inhibited by over-expression of miR-451 in A549 cells. Flow cytometry indicated that the cells were arrested at G_2 phase in the A549 cells after transfection of pGenesil-miR-451, however, no significant difference was seen in the apoptotic rates among the transfected cells, control cells and A549 cells ($P>0.05$). By bioinformatics analysis, there were 17 potential target genes found for miR-451. Meanwhile, PSMB8 was found to contain a phylogenetically conserved binding site with miR-451. Evidence showed that miR-451 negatively regulated the expression of PSMB8 through PSMB8 3′ UTR. Moreover, the expression of PSMB8 was declined in miR-451 over-expressed A549 cells, while the expression of PSMB8 was enhanced in miR-451 down-expressed normal 16HEB cells by Western blotting. Additionally, the expression of NOS2 was also decreased in miR-451 A549 cells. **Conclusion** MiR-451 may regulate the cell proliferation of non-small cell lung cancer cells by targeting inflammatory factors PSMB8/NOS2, and participate in the regulation of the occurrence and development of lung cancer.

[**Key words**] lung cancer; microRNA; cell proliferation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81270912) and the Project of Chongqing Commission of Science and Technology (CSTC2013jcyjA10044). Wu Tianhui and Peng Rui are co-first authors who contributed equally to the article. Corresponding author: Zhang Zheng, E-mail: zhangzheng92@163.com

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是全球病死率最高的恶性肿瘤之一[1]。近年研究发现,慢性炎症和感染是肿瘤发生的一个重要诱因,慢性阻塞性肺病、肺部感染、吸烟、空气污染及职业粉尘等炎症刺激为肺癌发生的高危因子,促进肺癌的发生、发展[2],但其确切机制不清。

微小核糖核酸(microRNA,miRNA)是一类真核生物高度保守的长度在19~22个核苷酸之间的内源性非编码小分子RNA[3]。每个miRNA可以调控多个靶基因,而特定靶mRNA也可以同时被多个miRNA调节,形成复杂的调控网络[4]。研究表明,miRNA在肿瘤细胞增殖的炎症机制中起着重要作用[5-6]。miR-451在进化上十分保守,在疾病的发生、发展中表现活跃,参与结肠癌、鼻咽癌及肝癌的细胞增殖、凋亡等生物学事件[7-9]。不仅如此,miR-451还参与肺癌发生。Qian等[1]研究发现miR-451在维持肺细支气管干细胞保持自我更新能力中发挥重要作用,并参与其转化为肺癌干细胞。在非小细胞肺癌患者组织[10]及肺癌细胞[11]中miR-451呈低表达。Wang等[12]研究发现miR-451通过靶向抑制RAB14调控NSCLC细胞增殖。但是miR-451是否通过介导非小细胞肺癌细胞的炎症机制调控细胞增殖,目前尚不清楚。

本研究应用前期已成功构建的miR-451真核表达载体,转染至人非小细胞肺癌细胞株A549中,观察细胞增殖情况;运用生物信息学技术对miR-451预测靶基因进行GO分析和KEGG信号途径分析,对炎症相关的预测靶基因PSMB8进一步的验证。同时检测PSMB8及NOS2的蛋白表达,研究miR-451通过炎症相关靶基因调控肺癌细胞增殖的机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

pGenesil-1.1-control购自武汉晶赛生物工程技术有限公司,人肺癌细胞系A549、正常支气管上皮细胞16HBE及293T细胞由实验室保存,pGenesil-1-miRNA-451真核表达载体有本实验室前期构建。miR-451 inhibitor、miR-451 mimics及其control购自上海吉玛制药技术有限公司,Lipofectamine™2000脂质体购自Invitrogen公司,荧光素酶报告载体pmiR-RB-REPORT™ vector购自广州锐博生物科技有限公司,DMEM高糖培养基和胎牛血清购自美国HyClone公司,PSMB8抗体和NOS2抗体购自Santa Cruz公司。

1.2 miR-451靶基因生物信息学分析

运用microRNA靶基因预测软件TargetScan(http://www.targetscan.org/)、miRanda(http://www.microrna.org/microrna/getTargets)、RepTar(http://bioinformatics.ekmd.huji.ac.il/reptar)预测miR-451的靶基因,选择至少2个软件共同的靶基因作为后续基因功能富集分析。

使用DAVID软件(http://david.abcc.ncifcrf.gov/)对miR-451的靶基因进行GO分类富集分析和生物通路富集分析。按照软件使用指导选择

"Functional annotation tool"目录,以此导入 miR-451 的靶基因,选择相对应的基因识别码并以人类全基因组作为背景基因。点击运行得到 miR-451 靶基因 GO 富集分析及生物通路富集分析的结果

1.3 PSMB8 野生型与突变型质粒构建

根据人的 PSMB8 基因 3′UTR 序列(GenBank, NM_004159)设计上下游引物:PSMB8-wt-F: 5′-CCGCTCGAGTCTCCTCTGGGAGGTCTT-3′; PSMB8-wt-R: 5′-GAATGCGGCCGCATAACCGTTTTTCTTTATTCTACTT-3′。以正常人 293T 细胞株基因组 DNA 为模板,按照 TaKaRa 生物有限公司提供的 PCR 试剂盒扩增 PSMB8 基因 3′UTR 序列。将 PCR 产物和荧光素酶报告载体 pmiR-RB-REPORT™vector 分别用 *Xho* Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切,回收目的基因和载体片段,以 T_4连接酶 16 ℃连接过夜并将产物转化感受态 DH5α 细胞,提取质粒验证获得野生型重组质粒 pmiR-RB-PSMB8-3′UTR-wt。

根据 miR-451 与 PSMB8 基因 3′UTR 序列结合突变位点设计突变引物,PSMB8-mut 上游:5′-GGAAGTTTCTGGGTGCCCCACTAAGTAGAATAAAGAAAAGATTCCGTGCGGCCGTGGCCGCAATAA-3′; 下游:5′-TTATTGCGGCCACGGCCGCACGGAATCTTTTCTTTATTCTACTTAGTGGGGCACCCAGAAACTTCC-3′。用 Stratagene 公司提供的定点诱变试剂盒,扩增突变产物,克隆到 pmiR-RB-REPORTTM 质粒。

1.4 细胞培养及转染

细胞接种于 100 mL 细胞培养瓶,用含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 DMEM 培养基在 37 ℃、5% CO_2条件下培养。每 2 ~ 3 天换液,待细胞生长到 80% 左右,按照脂质体 Lipofectamine™ 2000 试剂盒说明书将 pGenesil-1.1-control 质粒和 pGenesil-1-miRNA-451 质粒转染至 A549 细胞,将 miR-451 inhibitor 和 inhibitor control 转染 16HEB 细胞,将 miR-451 mimics 和 mimics control 分别与 pmiR-RB- PSMB8-3′UTR-mut 或 pmiR-RB- PSMB8-3′UTR-wt 及报告载体 pmiR-RB-REPORTTM vector 共转染 293T 细胞。4 ~ 6 h 后更换新鲜的 DMEM 培养基,24 ~ 48 h 收集各组细胞。

1.5 Real-time PCR

采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA。采用 *Taq*Man® MicroRNA Reverse Transcription kit 进行逆转录反应.逆转录反应总体系 15 μL,其中 100 mmol/L dNTPs 0.15 μL,MultiScribe™ Reverse Transcriptase(50 U/μL) 1 μL,10 × Reverse Transcription Buffer 1.5 μL,RNase Inhibitor(20 U/μL) 0.19 μL,Nuclease-free 水 4.16 μL,RNA(2 ng)5 μL,RT 引物 3 μL。逆转录反应条件:16 ℃ 30 min;42 ℃ 30 min;85 ℃ 5 min;4 ℃放置。应用 *Taq*Man® MicroRNA Assays Real-time PCR 试剂盒,以 U6 作为内标。引物均由 Applied Biosystems 公司合成,反应参照试剂盒说明书进行。hsa-miR-451 (miRbase 登录号:MIMAT0001631),序列: AAACCGUUACCAUUACUGAGUU。PCR 反应体系为 10 μL,其中 *Taq*Man 2 × Universal PCR Master Mix(含引物)5 μL,20 × *Taq*Man MicroRNA Assay Mix 0.5 μL,Nuclease-free 水 3.8 μL,RT 反应液 0.7 μL。反应条件为:95 ℃ 2 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s,共 40 个循环。每个检验指标做 3 个复孔,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$法相对定量 miR-451 的表达水平[13]。

1.6 MTT 检测 A549 细胞增殖

实验分为 3 组,未转染质粒的即 A549 组,转染 pGenesil-1.1-control 质粒即 control 组,转染 pGenesil-1-miRNA-451 质粒即 miR-451 组。将每组细胞以 4×10^3 个/孔接种于 96 孔板,同一时间做 5 个平行孔。每隔 24 h 向孔内加入 MTT,4 h 后吸弃培养液加入 DMSO,5 min 后在波长 490 nm 处检测光密度值[D(490)]。连续观察 6 d。

A549 细胞抑制率 = [A549 组 D(490)-miR-451 组 D(490)]/A549 组 D(490) ×100%

1.7 流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡

按照凋亡试剂盒收集 A549 组、control 组、miR-451 组细胞,PBS 洗涤 2 次,用 500 μL PBS 重悬细胞转入 EP 管,加入 61 μL FITC-annexinV 和 20 μL PI,室温避光孵育 30 min,离心弃上清,200 μL PBS 重悬细胞混匀,流式细胞仪检测细胞凋亡。收集上述 3 组细胞 PBS 洗 2 遍,加入 1 mL 70% 预冷乙醇中,吹打均匀,4 ℃ 固定 12 h 后加入 300 μL PBS 重悬细胞,加入 PI 至终浓度 50 μg/mL,37 ℃ 温浴 30 min,用流式细胞仪测定周期。

1.8 荧光素酶检测

转染 24 h 后,按照荧光素酶检测试剂盒说明操作,pmiR-RB-REPORTTM 质粒包含了海肾荧光素酶(hRluc)编码基因和萤火虫荧光素酶(hLuc)编码基因,作为报告基因体系。裂解各组细胞,按 Dual-Luciferase Reporter Assay System 说明书操作,以萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值表示各组细胞的荧光强度。

1.9 Western blot 检测

按试剂盒说明操作提取细胞总蛋白,BCA 试剂盒说明检测蛋总含量。根据目的蛋白分子量用 SDS-

PAGE 凝胶电泳分离,转膜,封闭,按照一抗说明书稀释抗体,4 ℃过夜孵育;TBST 漂洗 3 次,二抗孵育 90 min,TBST 洗涤 3 次,进行化学放光,图像采集。

1.10 细胞荧光免疫化学

细胞爬片,48 h 后 4% 多聚甲醛固定 15 min,PBS 漂洗 3 次/5 min;5% 的山羊血清封闭 30 min,孵育一抗,4 ℃过夜,PBS 漂洗 3 次/5 min;孵育二抗,37 ℃条件下 1 h,PBS 漂洗 3 次/5 min;甘油封片,显微镜观察。

1.11 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件分析,数值资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用单因素方差分析,组内两两比较用 Dunnett-t 检验,两独立样本均数比较 t 检验。

2 结果

2.1 MTT 检测细胞增殖

MTT 结果显示,miR-451 组 A549 细胞抑制率在 0、24、48、72、96、120、144 h 分别为 0、14.63%、38.24%、45.92%、52.53%、41.28%,细胞增殖明显抑制,说明过表达 miR-451 对 A549 细胞增殖有抑制作用。

2.2 流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期结果

细胞凋亡检测发现 A549 组、control 组和 miR-451 组细胞凋亡率分别为(3.06 ±0.85)% (2.52 ±0.56) % 和(5.22 ±1.68) %,统计学分析显示,各组细胞凋亡率之间无明显差异($P>0.05$),提示 miR-451 对 A549 细胞的凋亡没有明显的抑制作用。

同时,细胞周期检测发现,miR-451 组的 G_2 期较 A549 组增加了 9.98%,较 control 组增加了 10.04%($P<0.05$,图 1),提示 miR-451 对 A549 细胞周期有影响,可能通过 G_2 期阻滞,抑制 A549 肺癌细胞增殖。

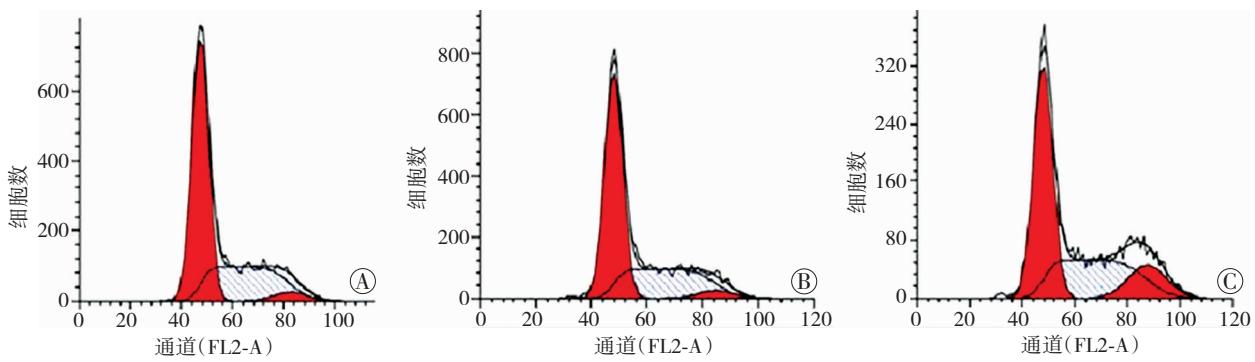
2.3 miR-451 靶基因生物信息学分析结果

运用 microRNA 靶基因在线预测软件,得到在 3 个软件中至少 2 个软件有交集的 miR-451 的 17 个预测靶基因 YWHAZ、PMM2、PSMB8、C11orf30、AEBP2、TTN、S1PR2、TSC1、PRR12、CAB39、TRIM66、CDKN2D、SAMD4B、TBX1、MEX3C、FBXO33、OSR1。GO 分析结果显示这些靶基因在分子功能、细胞组成、生物过程中参与了诸多生理过程。GO 注释有不同的分类,在 38 条 GO 注释中生物过程占主要地位,包括了正负调节细胞代谢过程,调节磷酸化,调节细胞周期过程等。这提示 miR-451 在调节上述生物过程中可能发挥着重要的作用。KEGG 分析结果显示靶基因参与了多条信号通路,主要涉及 microRNA 在细胞周期、PI3K-AKT、mTOR 等信号通路。

2.4 PSMB8 基因是 miR-451 的靶基因

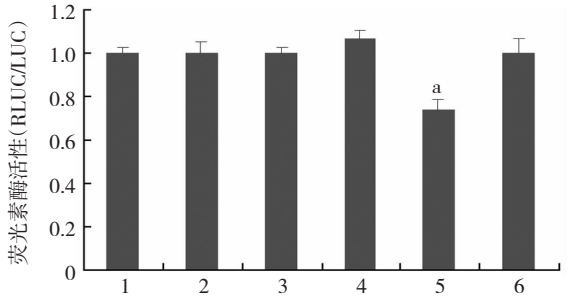
在这 17 个 miR-451 预测靶基因中,进一步运用生物信息学技术发现,PSMB8 基因的 3′ UTR 含有一个 miR-451 的结合位点,其与 miR-451 的 5′端第 2 ~ 8 为碱基序列,即“种子序列”完全互补,其二聚体结结构自由能为-18.25 kcal/mol,而且该 PSMB8 基因 3′UTR 结合位点在多个物种(包括人类、小鼠、豚鼠、黑猩猩、恒河猴、马、牛)的基因组中高度保守。这提示 PSMB8 基因 3′UTR 与 miR-451 结合位点结合性强,保守度高,可能是 miR-451 一个较好的靶基因,因此选择 PSMB8 基因进一步研究。

选用包含海肾荧光素酶和萤火虫素酶作为报告基因体系,分别构建了 pmiR-RB- PSMB8-3′UTR-wt 和 pmiR-RB- PSMB8-3′UTR-mut 的荧光素酶报告载体质粒,测序证实构建成功。荧光素酶活性检测结果显示,过表达 miR-451 可显著抑制 PSMB8 荧光酶活性($P<0.05$,图 2),提示 miR-451 可通过与 PSMB 3′UTR 的结合,负性调控 PSMB 的表达,PSMB8 是 miR-451 的靶基因。



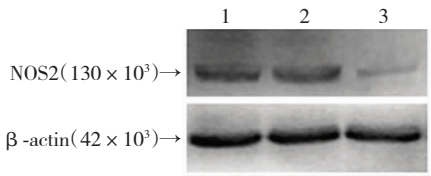
A:A549 组;B:control 组;C:miR-451 组

图 1 流式细胞术检测 miR-451 对 A549 细胞周期的影响



1:mimic NC + pmiR-RB-REPORT vector; 2:mimic NC + pmiR-RB-PSMB8-3′ UTR-wt; 3:mimic NC + pmiR-RB- PSMB8-3′ UTR-mut; 4:miR-451 mimic + pmiR-RB-REPORT vector; 5:miR-451 mimic + pmiR-RB- PSMB8-3′ UTR-wt; 6: miR-451 mimic + pmiR-RB-PSMB8-3- UTR-mut a:$P<0.05$,与相对应的对照组比较

图 2 荧光素酶检测验证 miR-451 与靶基因的相互作用



1:A549 组;2:control 组;3:miR-451 组

图 4 Western blot 检测各组细胞 NOS2 蛋白表达

2.5 PSMB8 蛋白的表达水平

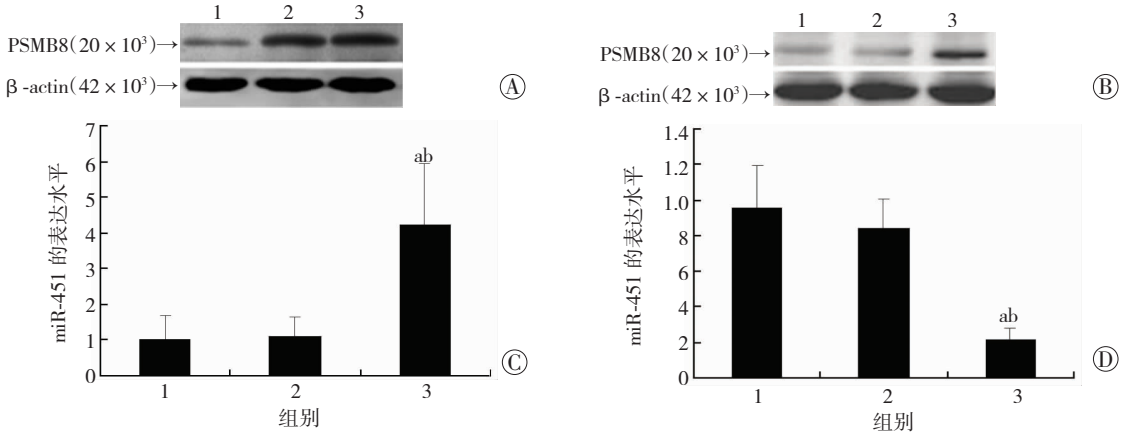
在 A549 中高表达 miR-451,在 16HEB 中低表达 miR-451,Western blot 检测高、低表达 miR-451 的细胞中靶基因 PSMB8 的蛋白表达。结果显示,在 A549 细胞株中,miR-451 组 PSMB8 蛋白表达水平较 control 组及未转染组低,而在 16HEB 细胞中 miR-451 inhibitor 组较 inhibitor control 组及未转染组高(图 3A、B)。说明 miR-451 可以负性调节 PSMB8 蛋白的表达。同时,Real-time PCR 检测发现 miR-451 组 miR-451 表达增高($P<0.01$,图 3C),miR-451 inhibitor 组 miR-451 表达降低($P<0.01$,图 3D),提示 miR-451 高、低表达细胞模型是成功的。

2.6 MiR-451 抑制 NOS2 蛋白表达

Western blot(图 4)和免疫荧光化学结果均显示(图 5),miR-451 组 NOS2 蛋白表达与 A549 及 control 组相比明显下调,表明 miR-451 对 NOS2 蛋白表达水平具有抑制作用。

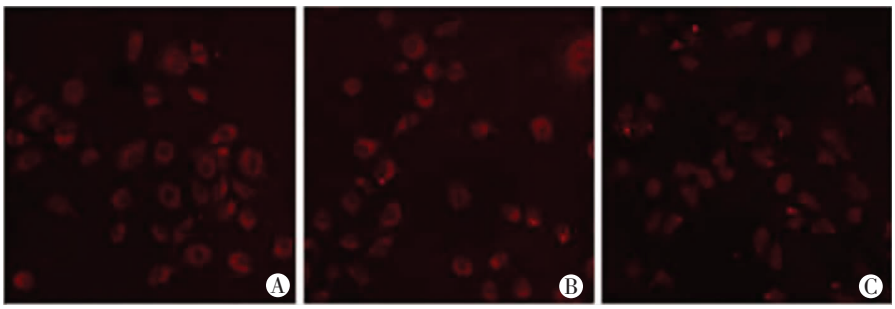
3 讨论

miRNA 的发现为我们提供了一种全新的角度来认识基因和基因表达调控的本质。文献[14]报道 miRNA 在多种癌症中表达异常,在癌细胞的转移、浸润、凋亡及



1: miR-451 组;2: contro 组;3:A549 组 A: Western blot 检测 A549 细胞中 PSMB8 蛋白表达 1: 16HEB 组;2:control 组;3: miR-451组 inhibitor 组;B:Western blot 检测 16HEB 细胞中 PSMB8 蛋白表达; C、D:Real-time PCR 检测各组细胞 miR-451 表达 a:$P<0.01$,与 A549 组和 16HEB 组比较;b:$P<0.01$,与 control 组比较

图 3 高低表达 miR-451 对 PSMB8 蛋白表达的影响



A: A549 组;B:contro 组;C:miR-451 组 免疫荧光 NOS2 TRITC 染色显红色

图 5 荧光显微镜观察各组细胞 NOS2 蛋白表达 (×200)

增殖过程中发挥了重要作用。我们的前期研究发现let-7a参与肺癌的发生[15]。此外,Chen等[16]研究发现,miR-378参与了非小细胞肺癌的脑转移,促进细胞的迁移、侵袭,从而促进了肿瘤血管生成。Zhao等[17]发现miR-21能抑制肺癌细胞SPC-A1细胞的凋亡。以上提示,在肺癌的发生、发展中,miRNA扮演了重要角色。同时,研究显示miR-451在非小细胞肺癌(NSCLC)和非癌性肺组织样本中表达量明显降低[11-12]。在与正常的人支气管上皮细胞相比,miR-451在非小细胞肺癌细胞中表达量降低[12],提示miR-451在肺癌细胞及肺癌组织的低表达,可能与肺癌的发生和发展密切相关。因此,为进一步研究miR-451在肺癌中的生物学功能,本实验应用前期成功构建的pGenesil-1.1-miRNA-451真核表达质粒[18],将其转染到人肺癌细胞A549中,使miR-451在A549细胞中高表达,研究其对细胞增殖的作用及机制。

MTT结果显示转染miR-451组的A549细胞在0、24、48、72、96、120、144 h细胞生长抑制率分别是0、14.63%、38.24%、45.92%、52.53%、41.28%,提示过表达miR-451可抑制A549细胞的增殖。此结果与Bian等[11]的研究结果一致。我们的结果还显示,miR-451组的G_2期较其他组增高,提示G_2期阻滞可能是miR-451抑制A549细胞增殖的原因之一,同时生物信息学表示miR-451与周期蛋白依赖性激酶抑制剂2有相互作用。综上所述,miR-451可能在肺癌细胞增殖中发挥重要作用。但其机制到底如何呢?

我们运用生物信息学技术对miR-451的预测靶基因功能的进行了富集性分析。GO分析发现,这些靶基因在分子功能、细胞组成、生物过程中参与了诸多生理过程,尤其在细胞代谢正向和负向调节、细胞周期调节等方面表现突出。同时,KEGG信号途径分析发现靶基因参与了多条信号通路,主要涉及microRNA在细胞周期、PI3K-AKT、mTOR、AMPK等信号通路。结果提示,miR-451的预测靶基因广泛参与了肺癌细胞增殖相关的生物过程和信号途径。在这些预测靶基因中,PSMB8引起了我们的注意。β型蛋白酶体8(proteasome subunit beta type 8,PSMB8,也称LMP7)基因,编码20S蛋白酶复合体的本构亚基β5和免疫亚基LMP7,参与卵巢癌、结肠癌、食管癌等多种癌症的发生和发展[19-21]。GO注释显示PSMB8调节刺激反应、细胞周期、蛋白活性、负调节细胞代谢过程等,并有研究发现,与遗传背景相同的野生型小鼠相比,PSMB8$^{-/-}$鼠的蛋白酶体活性降低,可阻断NF-κB信号活化,导致促感染细胞因子,趋化因子分泌减少,减轻炎症损害[22]。因此PSMP8在肿瘤炎症反应中可能发挥至关重要的作用。炎症相关途径可能是miR-451抑制肺癌细胞增殖的机制之一。

本实验通过生物信息学技术发现PSMB8基因的3′UTR含有一个miR-451的结合位点,其与miR-451的5′端第2~8位碱基序列,即"种子序列"完全互补,其二聚体结结构自由能为-18.25kcal/mol,而且该PSMB8基因3′UTR结合位点在多个物种(包括人类、小鼠、豚鼠、黑猩猩、恒河猴、马、牛)的基因组中高度保守。因此,PSMB8基因是较好的miR-451的炎症相关预测靶基因。

为证实miR-451与PSMB8的直接靶向作用,我们构建了pmiR-RB-PSMB8-3′UTR-wt和pmiR-RB-PSMB8-3′UTR-mut的荧光素报告载体质粒进行荧光素酶活性检测。结果显示,过表达miR-451可抑制PSMB8荧光素酶活性,提示miR-451可与PSMB8 3′UTR上的互补位点结合,从而调控报告基因的表达。由于已知miR-451在A549细胞中呈下调,在16HBE细胞中呈上调,因此我们在A549细胞中转染miR-451真核载体使之高表达miR-451,在16HBE细胞中转染miR-451 inhibitor使之低表达miR-451。通过Western blot检测结果显示,在A549细胞中miR-451组PSMB8蛋白表达量明显降低,而16HBE细胞中miR-451 inhibitor组,PSMB8表达量显著升高,表明miR-451可负性调控psmb8蛋白的表达,是miR-451的一个炎症相关的靶基因。

本实验通过Western blot和免疫荧光细胞化学发现,在A549细胞株中过表达miR-451后NOS2蛋白表达也降低。研究报道,炎症相关因子一氧化氮合酶(nitric oxide synthase,NOS)在肺癌、卵巢癌、乳腺癌等多种肿瘤中发挥重要作用[23-25]。同时,在PSMB8基因敲除小鼠中,NOS基因的表达及NO的释放都受到抑制[26]。提示高表达miR-451的肺癌细胞PSMB8/NOS2炎症相关基因表达受到抑制,可能参与肺癌的发生。此外,NOS是肺癌中促进和保持细胞恶性转化的重要因素[27]。也有研究证明NO主要在VEGF调节血管生成中发挥作用,抑制肿瘤血管的增殖[28]。这提示miR-451可能通过降低PSMB8/NOS2炎症因子表达,抑制人非小细胞肺癌细胞A459的细胞增殖,从而参与调控肺癌的发生、发展。

因此,在肺癌细胞中过表达miR-451可抑制细胞增殖,其机制可能是通过介导炎症相关靶基因PSMB8及炎症基因NOS2。若针对miR-451特异性分子进行靶药物治疗,抑制PSMB8/NOS2炎症通路可能是肺癌防治的新策略。然而,miRNA对疾病相关基因的调控是复杂的,还需要进一步研究。

参考文献:

[1] Qian S, Ding J Y, Xie R, *et al*. MicroRNA expression profile

of bronchioalveolar stem cells from mouse lung[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 377(2): 668 - 673.
[2] Ettinger D S, Akerley W, Bepler G, *et al*. Non-small cell lung cancer [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2010, 8(7): 740 - 801.
[3] Aghanoori M R, Mirzaei B, Tavallaei M. MiRNA molecular profiles in human medical conditions: connecting lung cancer and lung development phenomena[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014,15(22): 9557 - 9565.
[4] Munker R, Calin G A. MicroRNA profiling in cancer[J]. Clin Sci (Lond), 2011, 121(4): 141 - 158.
[5] Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, *et al*. The MicroRNA let-7a modulates interleukin-6-dependent STAT-3 survival signaling in malignant human cholangiocytes[J]. J Biol Chem, 2007, 282(11): 8256 - 8264.
[6] Mets E, Van-Peer G, Van-der-Meulen J, *et al*. MicroRNA-128-3p is a novel oncomir targeting PHF6 in T-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. Haematologica, 2014, 99(8): 1326 - 1333.
[7] Liu X, Zhang X, Xiang J, *et al*. miR-451: potential role as tumor suppressor of human hepatoma cell growth and invasion [J]. Int J Oncol, 2014, 45(2): 739 - 745.
[8] Liu N, Jiang N, Guo R, *et al*. MiR-451 inhibits cell growth and invasion by targeting MIF and is associated with survival in nasopharyngeal carcinoma [J]. Mol Cancer, 2013, 12(1): 123.
[9] Li H Y, Zhang Y, Cai J H, *et al*. MicroRNA-451 inhibits growth of human colorectal carcinoma cells via downregulation of PI3k/Akt pathway[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(6): 3631 - 3634.
[10] Markou A, Sourvinou I, Vorkas P, *et al*. Clinical evaluation of microRNA expression profiling in non small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2013, 81(3): 388 - 396.
[11] Bian, H B, Pan X, Yang J S, *et al*. Upregulation of microRNA-451 increases cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer cell line (A549)[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011, 30: 20.
[12] Wang R, Wang Z X, Yang J S, *et al*. MicroRNA-451 functions as a tumor suppressor in human non-small cell lung cancer by targeting ras-related protein 14 (RAB14) [J]. Oncogene, 2011, 30(23): 2644 - 2658.
[13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402 - 408.
[14] Wang Y, Lee C G. MicroRNA and cancer-focus on apoptosis [J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(1): 12 - 23.
[15] He X, Duan C, Chen J, *et al*. Let-7a elevates p21(WAF1) levels by targeting of NIRF and suppresses the growth of A549 lung cancer cells [J]. FEBS Lett, 2009, 583(21): 3501 - 3507.
[16] Chen L T, Xu S D, Xu H, *et al*. MicroRNA-378 is associated with non-small cell lung cancer brain metastasis by promoting cell migration, invasion and tumor angiogenesis [J]. Med Oncol, 2012, 29(3): 1673 - 1680.
[17] 赵光锋, 郭葳, 赵晓寅, 等. 灵芝孢子油通过下调 miR-21 促进人肺腺癌 SPC-A1 细胞凋亡[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(9): 1231 - 1234.
[18] 姚莉, 孙艳, 查何, 等. MiRNA-451 表达质粒的构建及对人 A549 肺癌细胞侵袭转移及凋亡的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2012 ,37(10): 841 - 845.
[19] Fellerhoff B, Gu S, Laumbacher B, *et al*. The LMP7-K allele of the immunoproteasome exhibits reduced transcript stability and predicts high risk of colon cancer [J]. Cancer Res, 2011, 71(23): 7145 - 7154.
[20] Zheng F, Hasim A, Anwer J, *et al*. LMP gene promoter hypermethylation is a mechanism for its down regulation in Kazak's esophageal squamous cell carcinomas[J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(3): 2069 - 2075.
[21] Song L, Ma N, Han L, *et al*. Association between LMP2/LMP7 genetic variability and the metastasis risk of ovarian cancer in Chinese women in Beijing [J]. Hum Immunol, 2014, 75(3): 239 - 244.
[22] Schmidt N, Gonzalez E, Visekruna A, *et al*. Targeting the proteasome: partial inhibition of the proteasome by brotezomib or deletion of the immunosubunit LMP7 attenuates experimental colitis [J]. Gut, 2011, 59(7): 896 - 906.
[23] Zhang J, Li B, Ding X, *et al*. Genetic variants in inducible nitric oxide synthase gene are associated with the risk of radiation-induced lung injury in lung cancer patients receiving definitive thoracic radiation[J]. Radiother Oncol, 2014, 111(2): 194 - 198.
[24] Iakubets O I, Fafula R V, Vorobets D Z, *et al*. Arginase and NO-synthase pathways of L-arginine metabolism in peripheral blood lymphocytes of patients with ovarian cancer [J]. Ukr Biokhim Zh (1999), 2013, 85(5): 105 - 113.
[25] Dave B, Granados-Principal S, Zhu R, *et al*. Targeting RPL39 and MLF2 reduces tumor initiation and metastasis in breast cancer by inhibiting nitric oxide synthase signaling [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(24): 8838 - 8843.
[26] Qureshi A, Tan X, Reis J C, *et al*. Suppression of nitric oxide induction and pro-inflammatory cytokines by novel proteasome inhibitors in various experimental models [J]. Lipids Health Dis, 2011, 10: 177.
[27] Zhang L, Liu J, Wang X, *et al*. Upregulation of cytoskeleton protein and extracellular matrix protein induced by stromal-derived nitric oxide promotes lung cancer invasion and metastasis[J]. Curr Mol Med, 2014, 14(6): 762 - 771.
[28] Sakthivel K M, Guruvayoorappan C. Acacia ferruginea inhibits tumor progression by regulating inflammatory mediators-(TNF-a, iNOS, COX-2, IL-1β, IL-6, IFN-γ, IL-2, GM-CSF) and pro-angiogenic growth factor- VEGF [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(6): 3909 - 3919.

(**收稿**:2014-12-21;**修回**:2015-01-05)
(编辑 汪勤俭)