·论 著·

miR-223 通过作用 CDK2 及 ERK 信号通路参与 Lewis 肺癌细胞周期调控

辇伟奇[1],陈芳琳[1],韩克强[2],陈正堂[1] (第三军医大学新桥医院:1. 全军肿瘤研究所;2. 肝胆外科,重庆 400037)

[摘 要] **目的** 研究 miR-223 对 Lewis 肺癌细胞(LLC)周期调控作用及其分子机制。**方法** 将 miR-223 真核表达载体转染至 LLC 细胞中,应用流式细胞仪检测其细胞周期分布变化,实时定量 PCR、western blot 检测对 CDK2 表达和 ERK 信号通路的影响。**结果** 流式细胞周期检测显示 miR-223 过表达导致 G0/G1 细胞由 53.8% 减少到 45.3%,G2 细胞由 4.29% 增加到13.2%;实时定量 PCR 及 western blot 显示,miR-223 过表达抑制 CDK2 mRNA 及蛋白表达,并下调 ERK 信号通路。**结论** miR-223 通过作用 CDK2 及 ERK 通路参与 Lewis 肺癌细胞周期调控。

[关键词] miR-223;CDK2;ERK 信号通路;细胞周期;Lewis 肺癌细胞

[中图分类号] R734.2;R329.28 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2011)03-0231-03

Involvement of miR-223 in cell cycle regulation of Lewis lung carcinoma by targeting CDK2 expression and ERK signaling

NIAN Wei-qi, CHEN Fang-lin, HAN Ke-qiang, CHEN Zheng-tang (Cancer Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the functional impact of miR-223 on cell cycle regulation of Lewis lung carcinoma (LLC) and to research into its molecular mechanism. **Methods** Eukaryotic expression vector of miR-223 was transfected in LLC cells. Flowcytometry was applied to detect the changes in the cell cycle of LLC and realtime-RT-PCR and western blot were used to investigate the effects of miR-223 on the expression of CDK2 and ERK signaling. **Results** The results of flowcytometry showed that the proportion of G0/G1 phase cell in miR-223 expressed group was reduced from 53.8% to 45.3% while the proportion of G2 phase cell in miR-223 was increased from 4.29% to 13.2%. The results from realtime-RT-PCR and western blot indicated that the expressions of CDK2 mRNA in miR-223 expressed group were reduced and ERK signaling was significantly inhibited. **Conclusion** miR-223 was extensively involved in cell cycle regulation of LLC by targeting CDK2 expression and ERK signaling.

Keywords: miR-223;CDK2;ERK signaling;cell cycle;Lewis lung cancer cell

近来研究发现,关键 miRNA 表达异常在肺癌发生中发挥着重要作用[1]。我们先前研究发现,miR-223 参与 Lewis 肺癌细胞(Lewis lung carcinoma,LLC)恶性表型调控[2],应用 MIRBase、RNA22 和 DIANA-mirPath 等生物信息学软件进一步分析,提示 miR-223 与胞外信号调节激酶(extracellular signal-rugulated kinases,ERK)信号通路调控有关,细胞周期蛋白依赖激酶 2(cyclin-dependent kinase 2,CDK2)可能是其潜在靶基因。本实验通过观察 miR-223 过表达对 LLC 细胞周期的影响,检测 CDK2 表达水平和 ERK 信号通路的变化,旨在为肺癌治疗寻找新的靶点。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂

DMEM 培养基、优等胎牛血清;Lipofectamine 2000;ECL 化学发光试剂盒、硝酸纤维膜;mmu-miR-223 前体表达质粒及对照质粒 pGenesil-1.1;兔抗小鼠 CDK2、ERK、pERK 多克隆抗体;小鼠 Lewis 肺癌细胞株。

1.2 重组质粒瞬时转染 LLC 细胞

LLC 细胞系用含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg/mL 的 DMEM 培养基培养,37 ℃,5% CO_2 条件下培养及传代。在转染前 1 d,取生长状态良好的细胞,胰酶消化,细胞计数后,均匀铺于 24 孔板中(8×10^4/孔)。次日,细胞达到 60% ~80% 融合时,按体积比 4∶1 将 miRNA 表达质粒和空载体在脂质体 Lipofectamine 2000 介导下转染细胞,分别在24、48 h 后应用荧光显微镜观察。

[基金项目] 国家高技术研究发展计划"863"项目(2007AA02Z129);国家自然科学基金项目(30901790);重庆市自然科学基金项目(2008BB5117)

[作者简介] 辇伟奇(1977 -),男,吉林省大安市人,主治医师,博士,主要从事肺癌抗转移方面的研究。E-mail:nwqone@ yahoo. com. cn

[通迅作者] 陈正堂,E-mail:chenzhengtang@ mail. tmmu. com. cn

[收稿日期] 2011-01-10 [修回日期] 2011-02-15

1.3 流式细胞仪检测细胞周期

分为正常对照组(A 组)、空载体对照组(B 组)、miR-223 重组质粒转染 24 h 组(C 组)和转染 48 h 组(D 组)。用含 5% FBS 的 PBS 洗涤检测样品两次;离心后完全去除上清,用 300 μl 含 10% 胎牛血清的 PBS 重悬细胞并加入 700 μl 无水乙醇,混匀,-20 ℃固定 24 h;1 000 r/min 离心 5 min,用 1 mL PBS 洗两次,再加 0.2 mL 含 1 mg/mL RNaseA 溶液重悬细胞沉淀,37 ℃水浴 30 min;加 0.3 mL 含 50 μg/mL PI 的 PBS 染色 20 min 后上机检测。

1.4 实时定量 PCR 检测 CDK2 mRNA 的表达

按照 TakaRa SYBR premix Ex Taq 说明书进行,50 μl 体系:25 μl 2×SYBR premix Ex Taq,正义和反义引物(10 μmol/L)各 1 μl,2 μl cDNA 模板,无菌水补齐至 50 μl;反应参数如下:先 95 ℃ 15 min,再执行(95 ℃10 s,60 ℃30 s,72 ℃30 s)40 个循环,最后溶解曲线分析一个循环(95 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,95 ℃ 1 min);CDK2 引物序列正义链:5'-ttcatggatgcctctgctctc-3',反义链:5'-tccaaaagctctggctagtcc-3';同时扩增 GAPDH 为内参对照。

1.5 Western blot 检测蛋白表达水平

分别用冷 PBS 洗两次待测细胞后,每孔加入 100 μl 裂解缓冲液 20 mmol/L Tris(pH8.0),137 mmol/L 氯化钠,5 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA),15 μg/mL 亮抑蛋白酶肽(leupeptin),1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF)等。将 6 孔板放置冰上,细胞裂解物 4 ℃离心 5 min,取上清 15 μl 与等体积上样缓冲液混合并煮沸 5 min。样本经 8% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移到硝酸纤维素膜。用 TBST 液清洗膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,膜与 1∶1 000 稀释的兔抗人 CDK2、ERK、pERK 抗体在 4 ℃过夜,TBST 液再次清洗 10 min,与 1∶500 稀释的 HRP 标记山羊抗兔二抗在室温共育 1.5 h,洗膜后加 ECL 发光剂,暗室中曝光,X-ray 胶片感光,照片扫描后,应用凝胶图像分析系统进行区带分析,计算相对密度。

1.6 统计学方法

利用 SPSS 13.0 软件进行分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

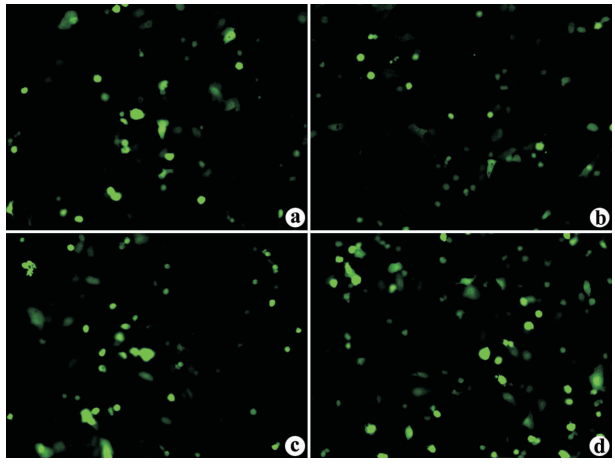
2 结果

2.1 转染 LLC 细胞

将 miR-223 重组质粒转染 LLC 细胞,转染后 24 h 即在荧光显微镜下可见绿色荧光蛋白表达,48 h 后稳定表达。转染后各组 LLC 细胞发出绿色荧光,细胞轮廓清晰,生长状况良好。大量绿色荧光蛋白的出现,说明质粒成功转染,miR-223 在 LLC 细胞得以表达(图 1)。

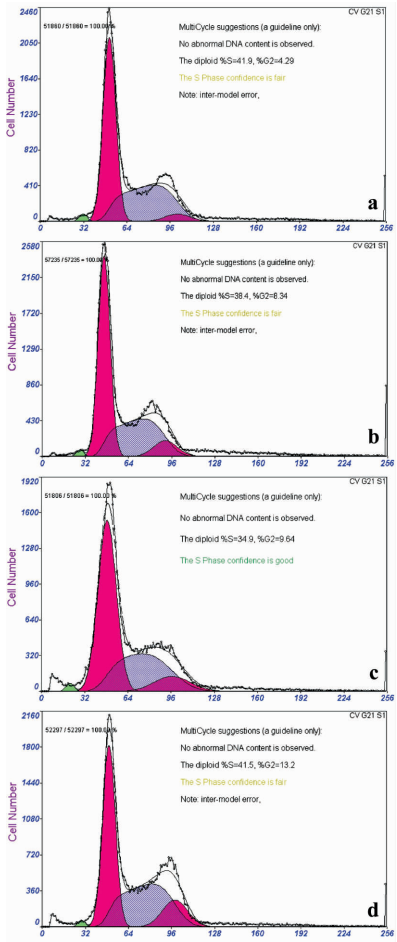
2.2 miR-223 过表达对 LLC 细胞周期的影响

流式细胞仪分析发现,与对照组比较,LLC 转染 miR-223 重组质粒 48 h 后,G0/G1 细胞由 53.8% 减少到 45.3%,G2 细胞由 4.29% 增加到 13.2%,S 期细胞无显著变化,见图 2。这表明 miR-223 过表达可能促进 LLC 细胞分化成熟。



a:空载体转染 24 h;b:miR-223 重组质粒转染 24 h;c:空载体转染 48 h;d:miR-223 重组质粒转染 48 h

图 1 miR-223 重组质粒转染 LLC 细胞的荧光表达情况



a:正常对照;b:空载体对照;c:miR-223 重组质粒转染 24 h;d:miR-223 重组质粒转染 48 h

图 2 miR-223 过表达对 LLC 细胞周期的调控

2.3 miR-223 过表达对 CDK2 mRNA 及蛋白表达影响

正常对照组(A 组)与空载体对照组(B 组)间 CDK2 mRNA 及蛋白表达无显著变化;而与对照组比较,miR-223 重组质粒转

染 48 h（D 组）后 CDK2 mRNA 及蛋白表达显著下调（$P<0.05$），见图 3。

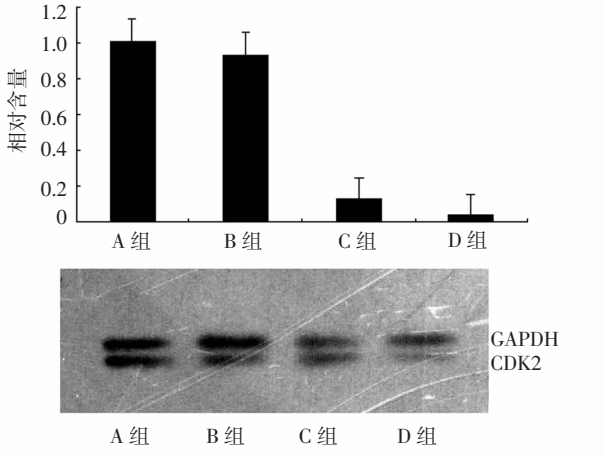


图 3 miR-223 过表达抑制 CDK2 mRNA 及蛋白的表达

2.4 miR-223 过表达对 ERK 通路的影响

经 Quantity One 分析发现，miR-223 重组质粒转染后 ERK1/2 蛋白水平与对照组比较无明显变化，磷酸化 ERK1/2 蛋白表达减少，并以 48 h 更为明显（$P<0.05$），见图 4。提示 miR-223 转染后 ERK 通路下调。

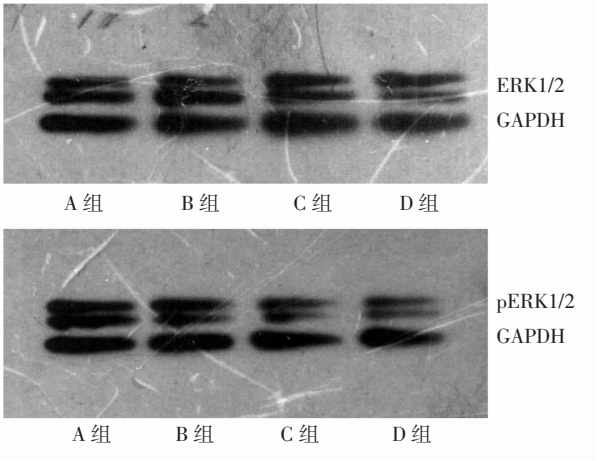


图 4 miR-223 过表达下调 ERK 信号通路

3 讨论

近来研究证实，一些与干细胞分化相关 miRNA 能有效调控肺癌细胞周期分布，抑制癌细胞增殖。Kumar 等[3]用 let-7g 慢病毒转染 K-Ras G12D 小鼠肺腺癌细胞，引起 G0/G1 及 G2/M 期细胞显著增加，S 期细胞显著减少，细胞凋亡增加。miR-107 和 miR-185 可能通过抑制细胞周期蛋白依赖性激酶 6（cyclin-dependent kinase-6，CDK6）在肺腺癌细胞中的表达，使癌细胞发生 G1 期停滞，从而降低癌细胞增殖能力[4]。

miR-223 是造血干细胞分化相关 miRNA，现有证据表明其可能在肺癌发生中发挥调控。Williams 等[5]发现 miR-223 在人肺发育中表达上调；Izzotti 等[6]发现香烟烟雾暴露下 28 d 的大鼠肺组织，与正常大鼠肺组织相比，有 26% 检测 miRNA（126/400）下调 2 倍，6% 检测 miRNA（24/400）下调 3 倍以上，其中 let-7、miR-223、miR-146 等均在其中，这表明 miR-223 可能参与肺癌发生的过程调控。本研究发现 LLC 细胞转染 miR-223 后 48 h，G0/G1 期细胞减少，G2 期细胞增加，而 S 期细胞无明显变化。与 let-7 过表达等导致细胞 G1 期阻滞抑制增殖相比，miR-223 似乎更倾向于导致细胞 G2 期阻滞，以此来促进细胞分化成熟。实验发现 S 期细胞无明显下降，可能由于所用质粒为瞬时表达，且观察时间较短有关，之前也有类似报道[7]。

细胞周期的进程受到细胞周期蛋白（cyclin）和细胞周期蛋白依赖性激酶（cyclin-dependent kinase，CDK）的调控，当 cyclin 与 CDK 的蛋白质产物形成有活性的蛋白激酶复合体时，可使多种蛋白底物磷酸化，驱动细胞在细胞周期各时相间转换。CDK2 是 CDK 家族中的重要成员，活化的 cyclin E-CDK2 复合物促进细胞周期通过 G1/S 限制点进入 S 期；进入 S 期后，CDK2 通过与 cyclin A 形成复合物，参与 DNA 复制与中心体复制的调节；在 G2/M 转换过程中促进有丝分裂发生[8-10]。本研究发现转染 miR-223 后 48 h，CDK2 mRNA 及蛋白表达显著下降，表明 miR-223 可能通过抑制 CDK2 来调控细胞周期。

ERK 是第一个被克隆并鉴别出的 MAPK 家族的成员，ERK 级联反应主要作用于细胞的增殖分化，在肺腺癌形成早期阶段 ERK 通路已被激活[11]，ERK 的激活还参与由糖蛋白聚集素（clusterin，CLU）调节的上皮-间质转化（mesenchymal-to-epithelial transition，MET）和肺腺癌的恶性行为[12]。本研究中发现转染 miR-223 后 48 h，LLC 细胞 pERK 水平显著下降，这表明 miR-223 可能通过调控 ERK 信号通路来影响肺癌的发生发展。

[参考文献]

[1] Inamura K, Togashi Y, Nomura K, et al. let-7 microRNA expression is reduced in bronchioloalveolar carcinoma, a non-invasive carcinoma, and is not correlated with prognosis[J]. Lung Cancer, 2007, 58(3): 392 – 396.

[2] 辇伟奇，陈芳琳，敖绪军，等. miR-223 在 CXCR4$^+$ Lewis 肺癌细胞中的显著低表达及其靶基因预测[J]. 第三军医大学学报，2009，31(22)：2202 – 2205.

[3] Kumar MS, Erkeland SJ, Pester RE, et al. Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(10): 3903 – 3908.

（下转第 236 页）