基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000943

肺癌细胞 A549 中过表达 PRR11 影响 Vimentin 组装

张春冬，张　莲，卜友泉

（重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室、重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心，重庆　400016）

【摘　要】目的：探索富脯氨酸蛋白 11(Proline-rich protein 11，PRR11)过表达诱发染色体凝聚异常的分子机理。**方法**：综合利用瞬时过表达、siRNA 敲减和免疫荧光染色方法在人肺癌细胞系 A549 中过表达或沉默 PRR11 后，检测波形蛋白(Vimentin)的表达与亚细胞分布及染色质凝聚异常情况。**结果**：肺癌细胞中内源性 PRR11 在胞浆中呈现弥散型分布，而 Flag-PRR11 过表达后在细胞中的分布呈现弥散状和网络状两种不同形态。进一步检测发现内源性或外源过表达 PRR11 与Ⅲ型中间丝蛋白 Vimentin 共定位，并且导致 Vimentin 绕核分布紊乱及染色质凝聚异常。**结论**：在细胞周期过程中 PRR11 与 Vimentin 共定位并调节其组装过程。推测 PRR11 异常表达可能通过与 Vimentin 共定位导致核骨架核纤层不稳定并诱发染色质异常凝聚，从而促进肿瘤的发生发展。

【关键词】肺癌；染色质凝聚；PRR11；Vimentin

【中图分类号】R734.2　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2016-04-29

Over-expression of PRR11 regulates Vimentin assembly in lung cancer A549 cells

Zhang Chundong, Zhang Lian, Bu Youquan

(*Teaching and Research Section of Biochemistry and Molecular Biology, Molecular Medicine and Cancer Research Center, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the molecular mechanism of over-expression of Proline-rich protein 11(PRR11) gene inducing abnormal chromatin condensation. ***Methods***: The PRR11 gene was down-regulated and over-expressed using siRNA transient over-expression and immunofluorescent staining in lung cancer cell A549. The expressions of the Vimentin at mRNA and protein levels were detected by RT-PCR and Western blot after the PRR11 treatment, respectively. Subcellular distribution of Vimentin and disruption of chromatin condensation was detected by immunofluorescence. ***Results***: Endogenous PRR11 proteins were dispersively distributed in cytoplasm, and over-expressed Flag-PRR11 proteins were dispersively and reticularly arranged in cytoplasm. The results showed that both endogenous and exogenous over-expressed PRR11 proteins were co-localized with Vimentin. Disorder arrangement of Vimentin in the perinuclear area and disruption of chromatin condensation were observed after over expressing PRR11 proteins. ***Conclusion***: The PRR11 proteins are co-localized with Vimentin, and the distribution of Vimentin proteins is re-arranged after forced expression of PRR11 proteins in lung cancer cell A549. We speculate that abnormal expression of PRR11 proteins could induce the instability of Lamins and abnormal chromatin condensation through co-localization with Vimentin and thereby promotes the development of tumor.

【Key word】lung cancer; chromatin condensation; PRR11; Vimentin

在细胞周期的 G2/M 期，染色质在多种蛋白因子及激酶活性精确调控下经过折叠组装而凝聚形成染色体，最终被分配到子代细胞中[1]。参与调节染色体凝聚过程的蛋白表达及活性异常直接引起染色体凝聚出错，导致染色体不稳定[2-3]。同时研究发现胞浆骨架蛋白，如Ⅲ型中间丝蛋白波形蛋白(Vimentin)通过 LINC 复合物(linker of nucleoskeleton and cytoskeleton，LINC)与细胞核骨架紧密相连，细胞核骨架即核纤层蛋白对于维持细胞核的形态及大小以及染色质组装等过程均具有重要的作用，而

作者介绍：张春冬，Email：zcd308@163.com，
研究方向：细胞周期调控。

通信作者：卜友泉，Email：buyqcn@aliyun.com。

基金项目：国家自然科学基金资助项目(编号：81501979)；重庆市自然科学基金计划资助项目(编号：cstc2013jcyjA10043)。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150112.1722.028.html (2016-05-13)

细胞核骨架与染色体不稳定密切相关[3-8]。大量研究结果显示染色体不稳定是肿瘤细胞的一个显著特征，在各种恶性肿瘤的发生发展过程中具有重要作用，对于恶性肿瘤的诊断、预后和治疗均具有重要的应用价值[4-5]。但是根据国内外的相关研究进展来看，目前对于肿瘤细胞染色体不稳定发生的详细机制仍不够清楚，仍有大量的相关基因有待发现和鉴定[4-6]。

PRR11 是最近发现的一个与细胞周期调控和肿瘤发生发展均密切相关的新基因。PRR11 高表达在肺癌等多种恶性肿瘤组织中，并与愈合显著相关。PRR11 特异高表达在细胞周期的 G2/M 期，敲减后显著阻滞细胞周期进行，并导致参与细胞周期调控、肿瘤发生和代谢途径等多个重要通路中的关键基因表达失调[7]。另外，研究发现过表达 PRR11 在肺癌细胞诱发染色质凝聚异常。但 PRR11 是一个胞浆蛋白，是通过何种机制诱发异常的染色质凝聚仍未知[8]。本研究通过瞬时过表达和免疫荧光分析检测 PRR11 诱发异常染色质凝聚的分子机理。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺癌细胞系 A549 为本实验室保存。针对 PRR11 的 siRNA（PRR11 siRNA）和阴性对照 siRNA（NC siRNA）均由 GenePharma 公司（中国）合成。过表达质粒转染试剂 Lipofectamine 2000 及 siRNA 转染试剂 Lipofectamine RNAiMax 购自 Invitrogen 公司。总 RNA 提取试剂盒购自 OMEGA 公司，反转录试剂盒和荧光定量 PCR 试剂均购自 TaKaRa 公司。GAPDH 多单隆抗体（14C10）和 HRP 标记的羊抗兔二抗购自 Cell Signaling 公司。兔抗人 PRR11 多克隆抗体（HPA023923）和 Flag 鼠单克隆抗体（F7425）购自 Sigma 公司。鼠抗人 Vimentin 单克隆抗体（RV202）购自 Abcam 公司。驴抗兔荧光标记二抗 Donkey Anti-Rabbit Alexa Fluor®及驴抗鼠荧光标记二抗 Donkey Anti-Mouse Alexa Fluor®购自 Invitrogen 公司。细胞核染色试剂 DAPI（4',6-diamidino-2-phenylindole）（D8417）购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 A549 细胞采用 DMEM 培养基（含 10%胎牛血清）于 CO_2 培养箱（37 ℃、5% CO_2）静置培养。

1.2.2 siRNA 设计及过表达载体构建 PRR11 进行 RNAi 所使用的 siRNA 序列参照[7]，正义链序列为：5'-ACGCAGGCCUUAAGGAGAATT-3'，反义链序列为：5'-UUCUCCUUAAGGCCUGCGUTT-3'。阴性对照 NC siRNA 的正义链序列为：5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3'，反义链序列为：5'-TTCTCCGAACGTGTCACG T-3'。

pvn173 表达质粒由实验室保存。PRR11 基因 ORF 序列被克隆进入 pCDNA3.0Flag 表达载体，上游引物：ATGCCCAAGTTCAAACAACG，下游引物：GTTTTGTTCATCAAAGCTGCT。

1.2.3 siRNA 转染 用于荧光定量 PCR 和流式细胞检测细胞的处理：收集对数生长期的 A549 细胞，以约 1.0×10^5 个/孔的密度接种至 6 孔板，siRNA 转染参照 Lipofectamine RNAiMax 试剂转染说明书进行操作。转染 48 h 后，收集细胞提取总RNA。

用于免疫荧光检测细胞：收集对数生长期的 A549 细胞，以约 2.0×10^4 个/孔的密度接种至 24 孔板，24 孔版中放置细胞爬片盖玻片，siRNA 转染按照 Lipofectamine RNAiMax 试剂转染说明书进行操作。转染 48 h 后，进行免疫荧光检测。质粒转染按照 Lipofectamine 2000 说明书进行。

1.2.4 总 RNA 的提取和反转录 使用 Total RNA Kit I 提取细胞总 RNA，并使用 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 进行反转录。

1.2.5 qRT-PCR 检测 采用荧光试剂 SYBR® Premix Ex TaqTM 进行定量 PCR 检测，用于荧光定量 PCR 引物为：Vimentin 上游 5'-CGAAACTTCTCAGCATCACG-3'，Vimentin 下游 5'-CTTGTAGGAGTGTCGGTTGTT-3'；GAPDH 上游 5'-ACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3'，GAPDH 下游 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。反应体系为 20 μl。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析定量 PCR 的结果。

1.2.6 蛋白提取和 Western blot 细胞用 SDS 细胞裂解液在冰上裂解 30 min。采用 BCA 法测定蛋白浓度。10%的 SDS-PAGE 分离胶电泳。使用抗 Vimentin 单隆抗体（1:1 000 稀释）稀释液中 4 ℃孵育过夜，然后使用 HRP 标记的羊抗鼠二抗稀释液（1:5 000 稀释）中室温孵育 1.5 h。最后采用 Super Singal West Dura 发光试剂盒检测。以 GAPDH 作为内参蛋白，使用 GAPDH 兔多抗（1:2 000 稀释）作为一抗。

1.2.7 免疫荧光检测 siRNA 处理细胞或是瞬时转染过表达 48 h 后 4% PFA 固定细胞，分别使用兔抗 PRR11 多抗（1:200）、兔抗 Flag 多抗（1:800）和鼠抗 Vimentin 单抗（1:200）在培养箱中 37 ℃孵育 30 min，PBS 清洗，37 ℃下使用 Alexa 488 及 594 标记驴抗鼠和抗兔二抗 1:1 000 避光孵育 30 min，并使用 DAPI 对 DNA 进行染色，室温 10 min；清洗后封片并使用荧光显微镜进行检测。

1.3 数据统计

所有数据采用 SPSS 17.0 统计分析软件进行处理，所得数值均以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。

2 结 果

2.1 PRR11 过表达呈现两种分布形态

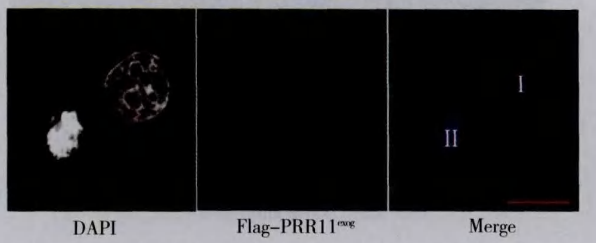
前期研究结果显示，PRR11 在细胞周期的 G2/M 期高表达[7-8]，并且过表达 PRR11 诱发染色质凝聚异常，但其过表达

诱发染色质凝聚的分子机理仍未知[8]。免疫荧光染色结果显示，细胞内源性 PRR11 在细胞质中呈现弥散型分布(图 1A)。Flag-PRR11 瞬时过表达后免疫荧光染色结果显示，(84.57 ± 8.13)%的 Flag 阳性细胞中 PRR11 的分布呈现网络状，同时伴随着染色质的异常凝聚。而仅有(15.43 ± 3.82)%的 Flag 阳性细胞中 PRR11 在细胞质中呈现弥散型分布(图 1B 和 C)。这表明 PRR11 过表达后在细胞中存在两种分布形式，并且 PRR11 的网络状分布与诱发染色质早熟凝聚显著相关。



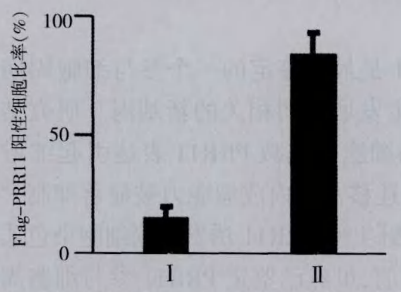
红色表示内源性 PRR11 阳性信号，蓝色为 DAPI 染色细胞核，标尺表示 20 μm

A. 免疫荧光染色内源性 PRR11 的表达



红色表示 Flag 阳性信号，蓝色为 DAPI 染色细胞核，标尺表示 20 μm

B. Flag-PRR11 瞬时过表达后免疫荧光染色



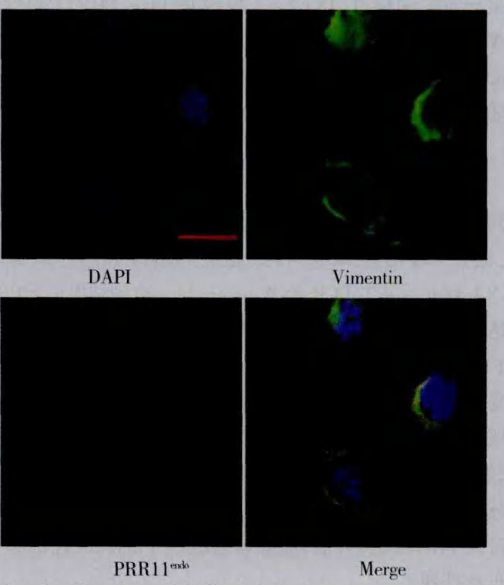
C. Flag 阳性细胞中 Flag-PRR11 阳性细胞比率分析（$n \geq 200$）

图 1　过表达 PRR11 在细胞中成网络状分布

Fig.1　Overexpression of PRR11 form a reticular arrangement

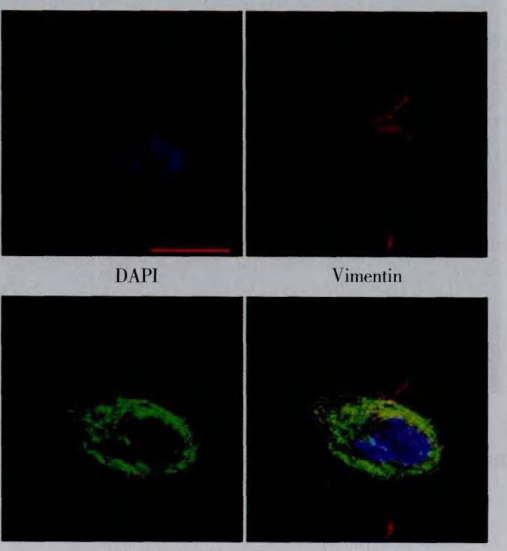
2.2　内源性及外源表达 PRR11 与 Vimentin 共定位

基于 Flag-PRR11 过表达在细胞中呈现网络状分布，推测 PRR11 定位与细胞骨架相关。因此，通过免疫荧光染色检测 PRR11 与微管、微丝及中间丝 3 种类型骨架蛋白的关系。结果显示，内源性 PRR11 在细胞中的分布与Ⅲ型中间丝 Vimentin 非常吻合(图 2A)，进一步通过过表达 Flag-PRR11 检测其与Vimentin 的定位关系，结果显示 Flag-PRR11 与 Vimentin 存在共定位，并且在细胞核周共定位信号更强(图 2B)。而 PRR11 定位与微管蛋白(Tublin)或微丝(F-actin)蛋白无显著关系(结果未显示)。这些研究结果表明，PRR11 在细胞中的定位与细胞浆骨架蛋白中间丝 Vimentin 关系密切。



红色表示内源性 PRR11 阳性信号，绿色表示 Vimentin 信号，蓝色为 DAPI 染色细胞核，标尺表示 20 μm

A. 免疫荧光染色内源性 PRR11 与 Vimentin 亚细胞定位



红色表示 Vimentin 阳性信号，绿色表示 Flag 阳性信号，蓝色为 DAPI 染色细胞核，标尺表示 20 μm

B. 免疫荧光染色 Flag-PRR11 与 Vimentin 亚细胞定位

图 2　PRR11 与 Vimentin 共定位

Fig.2　PRR11 co-localizes with Vimentin

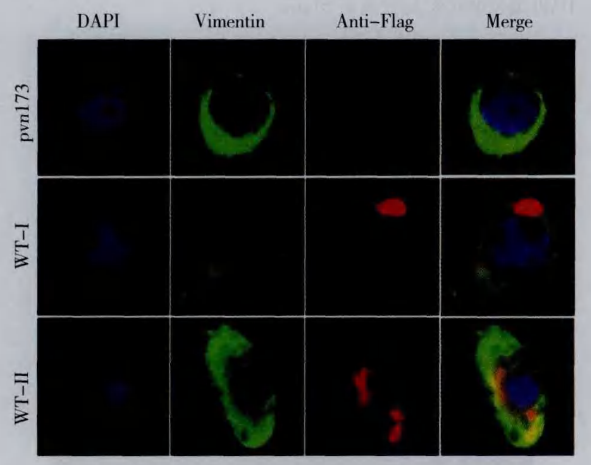
2.3　PRR11 过表达诱发 Vimentin 组装紊乱

为了检测 PRR11 表达对 Vimentin 的影响，过表达 Flag-PRR11 48 h 后进行免疫荧光染色，结果显示转染 pvn173 质粒对照组细胞中 Vimentin 分布正常。而转染 Flag-PRR11 后，(81.38 ± 9.13)%的 Flag-PRR11 阳性细胞中 Vimentin 组装紊乱(Ⅱ型)，尤其是在绕核区域呈现不规则状(图 3A 和

B）。同时 DAPI 染色结果显示 Vimentin 排列紊乱细胞的核呈现高度浓缩状，表明这些细胞过表达 PRR11 后诱发染色质凝聚异常[8]；而仅有（18.62 ± 4.79）%的 Flag-PRR11 阳性细胞中 Vimentin 分布正常（Ⅰ型），且这部分细胞和形态也呈现正常形态。这表明 PRR11 过表达导致 Vimentin 排列紊乱同时伴随染色质凝聚异常。

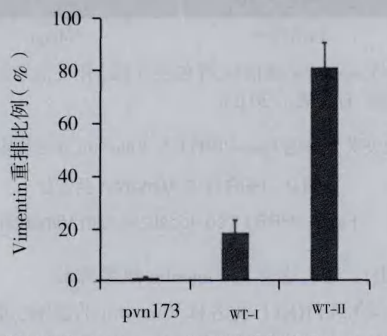
2.4　沉默 PRR11 表达导致 Vimentin 亚细胞分布改变

上述研究表明肺癌细胞中 PRR11 过表达诱发 Vimentin 排列紊乱。为了检测 PRR11 表达下调是否影响 Vimentin 分布，通过 siRNA 敲减 A549 细胞中 PRR11 表达。瞬时转染 siRNA 48 h 后，RT-PCR 及 Werstern blot 检测结果显示PRR11 表达被有效抑制（数据未显示）[7-8]。同时，RT-PCR 及 Werstern blot 检测结果显示 Vimentin 在 mRNA 和蛋白水平表达无显著变化（图 4A）。但免疫荧光染色结果显示，对照组中 Vimentin 绕核分布显著，而 PRR11 敲减后 Vimentin 分布与对照组相比较为松散，且 PRR11 敲减细胞中 Vimentin 在整个细胞中分布较为均一（图 4B）。这些研究结果表明，在 A549 细胞中敲减 PRR11 表达同样能够显著改变 Vimentin 在细胞中的分布及排列。



红色表示 Flag 阳性信号，绿色表示 Vimentin 信号，蓝色为 DAPI 染色细胞核，标尺表示 10 μm

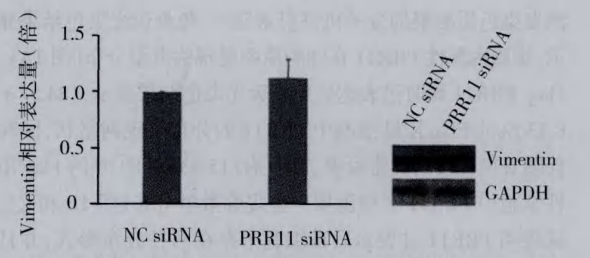
A. Flag 阳性细胞中 Vimentin 的亚细胞分布



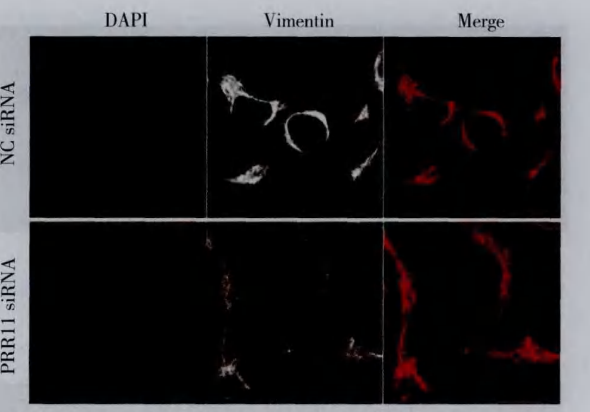
B. Flag 阳性细胞中 Vimentin 的重排分布统计（$n \geq 100$）

图 3　过表达 PRR11 诱发 Vimentin 重排

Fig.3　Forced expression of PRR11 induces Vimentin rearrangement



A. PRR11 敲减 48 h 后 RT-PCR 和 Western blot 检测 Vimentin 表达



红色表示 Vimentin 信号，蓝色为 DAPI 染色细胞核，标尺表示 20 μm

B. PRR11 敲减 48 h 后免疫荧光检测 Vimentin 分布

图 4　敲减 PRR11 表达改变 Vimentin 亚细胞分布

Fig.4　Silencing of PRR11 changes subcellular distribution of Vimentin

3　讨　论

PRR11 是最近鉴定的一个参与细胞周期调控及肿瘤发生发展密切相关的新基因。研究结果表明，在肺癌细胞中敲减 PRR11 表达引起细增殖减缓、细胞的迁移及体内成瘤能力被显著抑制[7,9]。另外，过表达野生型 PRR11 诱发肺癌细胞染色质凝聚异常[8]。目前，虽然已鉴定 PRR11 参与细胞周期调控及肺癌的发生，但其涉及的分子机制仍然未知。

Vimentin 属于Ⅲ型中间丝蛋白。Vimentin 在细胞粘附和细胞——细胞间的相互作用、细胞迁移及胞内信号转导过程中均起着重要作用。另外，Vimentin 通过 LINC 复合物与细胞核骨架（Lamins）紧密相连，对于维持细胞核形态及功能起关键作用[10-14]。核纤层蛋白（lamins）属于 V 型中间丝蛋白，是细胞核骨架的关键组成成分，主要分为 Lamin A 和 Lamin B两类。lamins 通过 Plectin-Nesprin3-SUN 与细胞质骨架紧密联系[10,15-17]。研究表明，胞浆中间丝组成蛋白、核纤层蛋白 lamins 及核纤层组装辅助蛋白 Ne-

sprin3 和 SUN 等多种相关蛋白表达和功能异常通常导致核纤层不稳定，从而诱发致染色质不稳定及基因表达异常[18-21]。

已有研究表明 PRR11 定位于细胞质中，而过表达 PRR11 诱发染色质凝聚异常[8]。本研究发现PRR11 在细胞中与Ⅲ型中间丝蛋白 Vimentin 密切相关。内源性或外源表达 PRR11 在细胞中环绕细胞核区域富集并与 Vimentin 共定位。Flag-PRR11 过表达导致 Vimentin 在细胞中的分布紊乱，尤其是绕核分布呈现不规则状，这与正常细胞中的 Vimentin 绕核均一分布有明显区别。并且野生型 PRR11 过表达后诱发 Vimentin 排列紊乱同时伴着染色质凝聚异常，提示 PRR11 可能通过 Vimentin 诱发细胞核不稳定。PRR11 是一个新的肿瘤相关蛋白，除 2 个脯氨酸富集区域外，无其它已知功能的保守结构域[7]。已有研究表明，脯氨酸富集区主要涉及蛋白与蛋白相互作用“22”。推测 2 个脯氨酸富集区可能介导PRR11 与 Vimentin 共定位并通过 LINC 复合物诱发核纤层去组装和染色质异常凝聚，即 PRR11 与胞浆骨架 Vimentin 共定位而影响核骨架稳定，而进一步诱发染色质凝聚异常。

综上所述，本研究综合利用瞬时过表达和免疫荧光方法探讨 PRR11 高表达诱发染色质凝聚异常的分子机理。发现 PRR11 在胞浆中与Ⅲ型中间丝蛋白 Vimentin 共定位，过表达野生型 PRR11 导致胞浆骨架 Vimentin 紊乱及染色凝聚异常。这表明 PRR11 与胞浆骨架蛋白共定位并影响其组装与排列，并可能进一步通过 LINC 复合物影响核纤层蛋白稳定，最终导致染色质凝聚异常。因此，在后续工作中我们将集中于 PRR11 与 Vimentin 直接或是间接相互作用的鉴定，深入探索 PRR11 在肺癌发生发展的分子机制。

参 考 文 献

[1] Thadani R, Uhlmann F, Heeger S. Condensin, chromatin crossbarring and chromosome condensation[J]. Curr Biol, 2012, 22(23): 1012-1021.

[2] Gardner L, Malik R, Shimizu Y, et al. Geminin overexpression prevents the completion of topoisomerase Ⅱ alpha chromosome decatenation, leading to aneuploidy in human mammary epithelial cells[J]. Breast Cancer Res, 2011, 13(3): R53.

[3] Coschi CH, Martens AL, Ritchie K, et al. Mitotic chromosome condensation mediated by the retinoblastoma protein is tumor-suppressive [J]. Genes Dev, 2010, 24(13): 1351-1363.

[4] Bakhoum SF, Compton DA. Chromosomal instability and cancer: a complex relationship with therapeutic potential[J]. J Clin Invest, 2012, 122(4): 1138-1143.

[5] Weaver BA, Cleveland DW. Does aneuploidy cause cancer?[J]. Curr Opin Cell Biol, 2006, 18(6): 6586-67.

[6] Vitre BD, Cleveland DW. Centrosomes, chromosome instability (CIN) and aneuploidy[J]. Curr Opin Cell Biol, 2012, 24(6): 809-815.

[7] Ji Y, Xie M, Lan H, et al. PRR11 is a novel gene implicated in cell cycle progression and lung cancer[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45 (3): 645-656.

[8] Zhang C, Zhang Y, Li Y, et al. PRR11 regulates late-S to G2/M phase progression and induces premature chromatin condensation (PCC)[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 458(3): 501-508.

[9] 龙银江，吉 颖，翁华莉，等. siRNA 介导的 PRR11 表达抑制导致肺癌细胞系基因表达谱变化的分析[J]. 中国细胞生物学学报，2013, 35(2): 196-202.

[10] Wiche G. Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics[J]. J Cell Sci, 1998, 111(Pt 17): 2477-2486.

[11] Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, et al. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling[J]. Exp Cell Res, 2007, 313(10): 2050-2062.

[12] Gonzales M, Weksler B, Tsuruta D, et al. Structure and function of a vimentin-associated matrix adhesion in endothelial cells[J]. Mol Biol Cell, 2001, 12(1): 85-100.

[13] Hookway C, Ding L, Davidson MW, et al. Microtubule-dependent transport and dynamics of vimentin intermediate filaments[J]. Mol Biol Cell, 2015, 26(9): 1675-1686.

[14] Leduc C, Etienne-Manneville S. Intermediate filaments in cell migration and invasion: the unusual suspects[J]. Curr Opin Cell Biol, 2015(32): 102-112.

[15] Mellad JA, Warren DT, Shanahan CM. Nesprins LINC the nucleus and cytoskeleton[J]. Curr Opin Cell Biol, 2011, 23(1): 47-54.

[16] Dechat T, Adam SA, Taimen P, et al. Nuclear lamins[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010, 2(11): a000547.

[17] Crisp M, Liu Q, Roux K, et al. Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex[J]. J Cell Biol, 2006, 172 (1): 41-53.

[18] Georgatos SD, Blobel G. Lamin B constitutes an intermediate filament attachment site at the nuclear envelope[J]. J Cell Biol, 1987, 105 (1): 117-125.

[19] Traub P, Scherbarth A, Willingale-Theune J, et al. Differential sensitivity of vimentin and nuclear lamins from Ehrlich ascites tumor cells toward Ca^{2+}-activated neutral thiol proteinase[J]. Eur J Cell Biol, 1988, 46(3): 478-490.

[20] Ostlund C, Folker ES, Choi JC, et al. Dynamics and molecular interactions of linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex proteins[J]. J Cell Sci, 2009, 122(Pt 22): 4099-5108.

[21] Kuga T, Nie H, Kazami T, et al. Lamin B2 prevents chromosome instability by ensuring proper mitotic chromosome segregation[J]. Oncogenesis, 2014(3): e94.

[22] Zarrinpar A, Bhattacharyya RP, Lim WA. The structure and function of proline recognition domains[J]. Sci STKE, 2003, 2003(179): RE8.

（责任编辑：张辉洁）