

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

龙银江^{1,2} 吉颖^{1,2} 翁华莉^{1,2} 张春冬^{1,2} 谢濛宇^{1,2} 蔡伟^{1,2}
王义涛^{1,2} 朱远远^{1,2} 李轶^{1,2} 张莹^{1,2*} 卜友泉^{1,2*}

(¹重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室, 重庆 400016; ²重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016)

摘要 Proline rich 11 (PRR11)是本课题组鉴定的一个新的肿瘤相关基因。为研究PRR11介导肺癌发生发展相关的分子机制,本研究分析了PRR11表达被抑制后人肺癌细胞系H1299的全基因组基因表达谱的变化。首先,采用siRNA抑制H1299细胞中PRR11的表达,提取总RNA,采用基因芯片分析全基因组基因表达谱的变化。然后,对呈现差异表达的基因进行GO和Pathway富集分析,并对部分重要的候选基因进行定量RT-PCR验证。基因芯片结果表明,采用siRNA有效抑制H1299细胞中PRR11表达后,共有550个基因的mRNA水平出现明显变化,其中139个基因表达上调,411个基因表达下调。生物信息学分析结果表明,上述差异表达的基因显著富集于细胞周期和MAPK通路。定量RT-PCR验证分析结果表明,PRR11表达抑制后确实可导致多个与细胞周期和肿瘤发生发展密切相关的基因(包括DHRS2、EPB41L3、CCNA1、MAP4K4、RRM1、NFIB)呈现显著的表达变化。这些结果提示,PRR11可能通过上述通路和/或基因的表达变化参与肺癌的发生发展过程。

关键词 PRR11; 基因芯片; 肺癌; 差异表达基因

Analysis of Gene Expression Profile Changes Responding to siRNA-mediated PRR11 Depletion in Lung Cancer H1299 Cells

Long Yinjiang^{1,2}, Ji Ying^{1,2}, Weng Huali^{1,2}, Zhang Chundong^{1,2}, Xie Mengyu^{1,2}, Cai Wei^{1,2},
Wang Yitao^{1,2}, Zhu Yuanyuan^{1,2}, Li Yi^{1,2}, Zhang Ying^{1,2*}, Bu Youquan^{1,2*}

(¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, ChongQing Medical University, Chongqing 400016, China; ²Molecular Medicine and Cancer Research Center, ChongQing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract Proline rich 11 (PRR11) is a novel cancer-associated gene identified by our group. In the present study, in order to clarifying the molecular mechanisms of PRR11 in lung cancer development, the gene expression profile changes responding to the siRNA-mediated PRR11 depletion was analyzed. siRNAs were used to inhibit the PRR11 expression, total RNAs were then prepared and subjected to microarray analysis. The differentially expressed genes were enriched for GO and pathway analysis. qRT-PCR was used to verify several important differentially expressed genes. Microarray analysis revealed that siRNA-mediated PRR11 depletion resulted into the expression changes of 550 genes including 139 upregulated and 411 downregulated. Bioinformatic analysis indicated that the 550 differentially expressed genes were mainly enriched in cell cycle and MAPK pathways. qRT-

收稿日期: 2012-10-25 接受日期: 2012-11-14

国家自然科学基金(批准号: 30801356、81171879)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485991, E-mail: zhangying078@yahoo.com.cn; buyqcn@yahoo.com.cn

Received: October 25, 2012 Accepted: November 14, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30801356, 81171879)

*Corresponding authors. Tel: +86-23-68485991, E-mail: zhangying078@yahoo.com.cn; buyqcn@yahoo.com.cn

PCR analysis verified that siRNA-mediated PRR11 depletion led to the expression changes of several cell cycle- and cancer-related genes including DHRS2, EPB41L3, CCNA1, MAP4K4, RRM1 and NFIB. Taken together, the present study suggested that PRR11 might be implicated in lung cancer development via regulating the aforementioned genes and/or pathways.

Key words PRR11; gene chip; lung cancer; differentially expressed gene

肺癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率均占恶性肿瘤之首^[1]。中国国家卫生部公布的资料显示,肺癌死亡率在过去30年间上升了465%,已替代肝癌成为我国首位恶性肿瘤死亡原因,占全部恶性肿瘤死亡的22.7%^[2]。筛选和鉴定肺癌相关基因有助于解析肺癌的发生发展机制,并能辅助性地指导肺癌的早期诊断、靶向治疗及预后判断。目前,已确认的肺癌相关基因包括TP53、KRAS、AKT1、ALK、BRAF、ERBB2、MYCL1、RB1等。鉴于肿瘤是多基因参与的网络型疾病^[3],因此鉴定更多的肺癌相关基因并挖掘其分子机制将为破译肺癌这类高度复杂性疾病提供更多线索。

前期本课题组筛选并鉴定了一个新的肿瘤相关基因Proline rich 11(PRR11),定位于染色体17q23,包含10个外显子和9个内含子,翻译起始密码子位于第2个外显子,终止密码子位于最后1个外显子^[4],共编码360个氨基酸^[5]。研究结果显示,肺癌组织PRR11的mRNA水平和蛋白水平均显著高于正常肺组织,抑制其表达可显著降低肺癌细胞体外的增殖和侵袭转移能力及体内成瘤能力(数据待发表)。该结果提示PRR11是候选的肺癌相关癌基因,但并不清楚其作用的分子机制。本研究利用基因芯片技术筛选PRR11表达沉默后的人肺癌细胞系H1299中的差异表达基因,为探索PRR11参与肺癌发生发展的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺癌细胞系H1299为实验室保存, RPMI 1640培养基和胎牛血清均购自GIBICO公司。针对PRR11的siRNA(PRR11siRNA)和阴性对照siRNA均由GenePharma公司(中国)合成,转染试剂Lipofectamine RNAiMax购自Invitrogen公司。总RNA提取试剂盒Total RNA Kit I购自OMEGA公司,反转录试剂盒PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit和定量PCR

试剂SYBR[®] Premix Ex Taq[™]均购自TaKaRa公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 H1299细胞采用RPMI 1640培养基(含10%胎牛血清)于CO₂培养箱(37 °C、5% CO₂)静置培养。当细胞生长状态良好并且融合度达到80%左右时,用0.25%的胰蛋白酶消化进行细胞传代。

1.2.2 siRNA设计 从GenBank数据库检索PRR11的序列,以此为模板,采用Primer5.0软件设计PRR11-siRNA。然后根据siRNA设计原则和BLAST比对结果,获取理论最佳的PRR11siRNA。PRR11siRNA正义链序列为: 5'-ACG CAG GCC UUA AGG AGA ATT-3', 反义链序列为: 5'-UUC UCC UUA AGG CCU GCG UTT-3'。阴性对照siRNA的正义链序列为: 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG U-3', 反义链序列为: 5'-TTC TCC GAA CGT GTC ACG T-3'。

1.2.3 siRNA转染 收集对数生长期的H1299细胞,以约1.0×10⁵/孔的密度接种至6孔板, siRNA转染按照Lipofectamine RNAiMax试剂反式转染法说明书进行操作。其中, siRNA用量为30 pmol/孔, 设置PRR11-siRNA组和阴性对照siRNA组。转染48 h后, 收集细胞总RNA。转染72 h后, 收集细胞总蛋白。

1.2.4 总RNA的提取和反转录 使用Total RNA Kit I提取细胞总RNA, 经NanoDrop Spectrophotometer测定其浓度和D₂₆₀/D₂₈₀比值, 并采用普通琼脂糖凝胶电泳对RNA质量进行快速分析。初步确认RNA质量良好后送北京博奥生物有限公司进行进一步质控确认并使用PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit进行反转录。

1.2.5 基因芯片检测 采用基因芯片技术分别检测PRR11siRNA组mRNA表达谱和阴性对照组mRNA表达谱。基因芯片检测由北京博奥生物有限公司完成, 采用Affymetrix公司(美国)的Human Genome U133 Plus 2.0表达谱芯片(含有54675个探针)。

1.2.6 差异表达基因的筛选 从基因芯片高密度杂交点阵图中提取杂交点荧光信号强度, 采用

SAM(significance analysis of microarrays)软件筛选差异表达基因。差异显著标准设定为:与阴性对照siRNA组相比,PRR11siRNA组中mRNA水平改变倍数 ≥ 2 和 ≤ 0.5 分别为高表达基因和低表达基因。

1.2.7 生物信息学分析 采用ArrayTrack软件中的GOFFA模块(<http://edkb.fda.gov/webstart/arraytrack/>)对差异表达基因进行Gene Ontology(GO)富集分析,应用北京博奥生物有限公司提供的生物分子功能注释系统Mas3.0(<http://bioinfo.capitalbio.com/mas3/>)对差异表达基因进行Pathway富集分析。

1.2.8 定量PCR检测 采用荧光试剂SYBR® Premix Ex Taq™进行定量PCR检测,反应体系为20 μ L。反转录的cDNA产物稀释20倍作为模板,每组样品设置3个重复。扩增程序为95 °C预变性10 s; 94 °C变性5 s, 60 °C退火15s, 72 °C延伸45 s, 共40个循环;最后72 °C 10 min。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析定量PCR的结果。

1.2.9 蛋白提取和Western blot 细胞收集于1.5 mL离心管,用1×PBS清洗两次,加适量细胞裂解液(碧云天)在冰上裂解30 min。之后以14 000 r/min于4 °C离心10 min,收上清液,采用BCA Protein Assay Kit(Pierce)进行蛋白定量。Western blot检测细胞样品中PRR11蛋白水平时,采用10% SDS-PAGE分离胶电泳分离变性后的20 μ g细胞总蛋白,随后使用湿转方法将分离后的蛋白转移至PVDF膜,电转后的膜在5%脱

脂奶粉中室温封闭1 h。将转有蛋白的膜在鼠抗人PRR11多克隆抗体(1:1 000稀释, Abcam公司)稀释液中4 °C孵育过夜,然后在带辣根过氧化物酶标签的马抗鼠二抗稀释液(1:5 000稀释, Cell Signaling公司)中室温孵育1.5 h。最后采用SuperSingal West Dura发光试剂盒(Thermo Scientific, 美国)检测, X线胶片曝光、显影、定影。以GAPDH作为内参蛋白,使用GAPDH兔多抗(1:2 000, 杭州贤至生物有限公司)作为一抗,使用羊抗兔抗体作为二抗。

2 结果

2.1 siRNA介导的PRR11表达抑制

采用定量RT-PCR和Western blot分别检测瞬时转染siRNA后细胞中PRR11的mRNA和蛋白水平。结果显示, PRR11siRNA组中PRR11的mRNA和蛋白表达水平均明显低于阴性对照siRNA组(图1)。说明本实验使用的PRR11SiRNA能显著抑制细胞内源PRR11的表达。

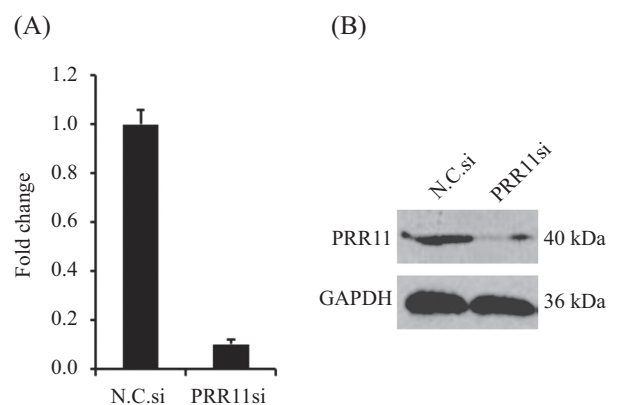
2.2 总RNA质量分析

确认PRR11siRNA的抑制效果后,进行平行实验,分别提取PRR11siRNA组和阴性对照siRNA组的总RNA,对RNA质量和浓度进行检测,结果显示: D_{260}/D_{280} 比值均在1.8~2.0之间。普通琼脂糖凝胶电泳检测到清晰的28S和18S条带(图2),并且28S/18S

表1 定量PCR引物序列

Table 1 List of primer sequences used for RT-PCR analysis

| 基因名称 | 引物序列 |
|-----------|---|
| Gene name | Primer sequences |
| PRR11 | F581: 5'-GAC TTC CAA AGC TGT GCT TCC-3' |
| | R757: 5'-CTG CAT GGG TCC ATC CTT TTT-3' |
| GAPDH | F833: 5'-ACC TGA CCT GCC GTC TAG AA-3' |
| | R1060: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3' |
| NFIB | F138: 5'-GAA GCG AAT GTC AAA GGA-3' |
| | R333: 5'-CTG GTC GGG ATT GGA TAA-3' |
| RRM1 | F758: 5'-GTT GTA TTC GGG CTA CTG G-3' |
| | R973: 5'-CAC GCT GCT CTT CCT TTC-3' |
| MAP4K4 | F3354: 5'-ATC AAA CCC CAT GCA ATC AT-3' |
| | R3587: 5'-CAC ACC ATC CAA GTG ACC AG-3' |
| CCNA1 | F493: 5'-ACC CCA AGA GTG GAG TTG TG-3' |
| | R690: 5'-GGA AGG CAT TTT CTG ATC CA-3' |
| DHRS2 | F918: 5'-GCC CTA CAT GGA GAA CAG GA-3' |
| | R1146: 5'-CAT TCC CAT GAA ACC AAT CC-3' |
| EPB41L3 | F2813: 5'-CGC TAA AGC TGT CCT GGA AC-3' |
| | R2984: 5'-TAC TCC TCC CGG TGA AAC AC-3' |



H1299细胞分别瞬时转染阴性对照siRNA和PRR11siRNA,转染后48~72 h,分别提取总RNA和制备细胞裂解液,采用定量PCR和Western印迹检测PRR11的mRNA(A)和蛋白质表达水平变化(B)。

H1299 cells were transiently transfected with the negative control siRNA and PRR11 siRNA, respectively. Total RNA and cell lysates were extracted 48~72 h after transfection and used to detect the expression of PRR11 at both mRNA (A) and protein levels (B) via Real-time PCR and Western blot.

图1 siRNA介导的PRR11表达抑制

Fig.1 siRNA-mediated PRR11 depletion

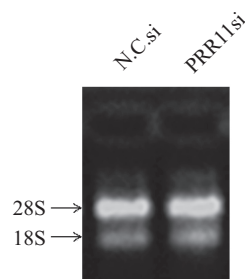
的亮度比值接近2, 说明RNA质量良好, 可以进行下一步的基因芯片分析。

2.3 PRR11表达抑制后基因谱变化分析

采用表达谱芯片分别检测PRR11表达沉默的细胞和阴性对照细胞的mRNA表达谱, 依据设定的差异显著标准筛选差异表达基因。结果表明, PRR11表达被抑制后, 有550个基因表达呈现明显改变, 其中139个基因表达上调, 411个基因表达下调(包括PRR11基因)。

2.4 GO富集分析

采用GO富集分析550个差异表达基因的生物学特点, 发现它们显著富集于细胞周期(cell cycle)、细胞死亡(cell death)、细胞定位(cellular localization)、刺激应答(response to stress)、信号调控(regulation of

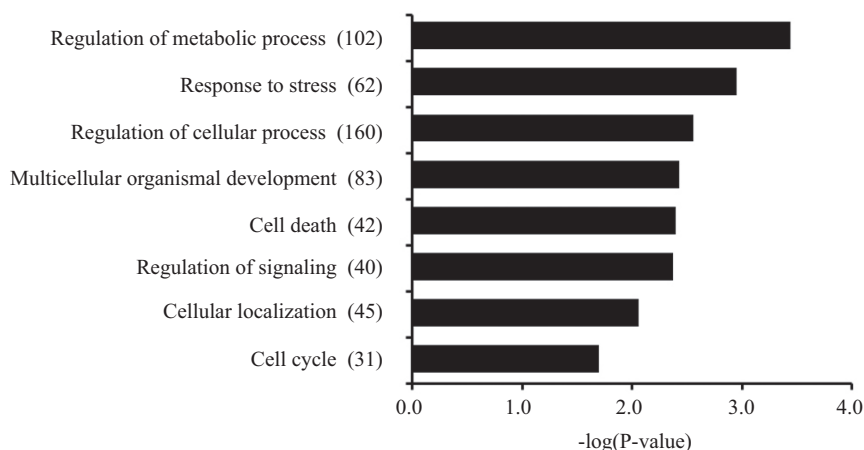


用H1299细胞做瞬时转染, 分别设置阴性对照siRNA组和PRR11siRNA组。48 h后收细胞, 分别提取总RNA, 采用琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性。

H1299 cells were transiently transfected with the control siRNA and PRR11 siRNA, respectively. Forty-eight hours after transfection, total RNAs were extracted and subjected to agarose gel electrophoresis.

图2 琼脂糖凝胶电泳检测RNA质量

Fig.2 Agarose gel electrophoresis detect the quality of RNA



括号内为该GO term包含的基因数目。

Gene counts in each GO term were shown in the bracket.

图3 PRR11相关差异表达基因显著富集的生物学过程

Fig.3 The biological processes of PRR11 related differentially expressed genes were significantly enriched

表2 PRR11相关差异表达基因显著富集的信号通路

Table 2 The enriched pathways of differentially expressed genes after PRR11 depletion

| 通路名称 | 数据库 | 基因数量 | P值 | Q值 |
|-----------------------------------|----------|-------------|-------------|-------------|
| Pathway name | Database | Gene number | P value | Q value |
| MAPK signaling pathway | KEGG | 12 | 1.11E-07 | 3.1E-07 |
| | BioCarta | 4 | 0.001 155 5 | 0.000 626 |
| | GenMAPP | 8 | 5.82E-06 | 9.95E-06 |
| T cell receptor signaling pathway | KEGG | 2 | 0.136 382 2 | 0.017 689 |
| | BioCarta | 3 | 0.001 165 2 | 0.000 626 |
| | GenMAPP | 4 | 0.008 660 2 | 0.002 560 2 |
| Insulin signaling pathway | KEGG | 3 | 0.049 034 9 | 0.009 165 4 |
| | BioCarta | 3 | 0.000 217 | 0.000 185 |
| | GenMAPP | 4 | 0.015 043 9 | 0.003 863 9 |
| TGF-beta signaling pathway | KEGG | 3 | 0.015 069 2 | 0.003 863 9 |
| | BioCarta | 1 | 0.095 97 | 0.014 472 6 |
| | GenMAPP | 3 | 0.003 654 1 | 0.001 427 4 |

表3 基因芯片结果中部分差异表达基因

Table 3 The differentially expressed genes in gene chip

| 基因名称 | UniGene号 | 基因全称 | 差异倍数 |
|----------------|------------|--|-------------|
| Gene name | UniGene ID | Gene title | Fold change |
| <i>DHRS2</i> | Hs.272499 | dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2 | 14.730 6 |
| <i>EPB41L3</i> | Hs.213394 | Erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3 | 6.621 2 |
| <i>CCNA1</i> | Hs.417050 | cyclin A1 | 0.448 7 |
| <i>MAP4K4</i> | Hs.719073 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 | 0.388 3 |
| <i>NFIB</i> | Hs.644095 | nuclear factor I/B | 0.383 3 |
| <i>RRM1</i> | Hs.445705 | ribonucleotide reductase M1 | 0.382 8 |

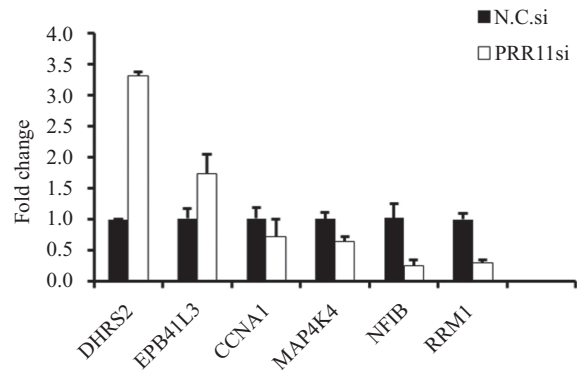
signaling)、代谢调节(regulation of metabolic process)等生物学过程(图3)。譬如,富集于细胞周期的差异表达基因包含CDK6、CCNA1等31个基因。

2.5 Pathway富集分析

基于KEGG、Biocarta、GenMAPP这三个数据库,将550个差异表达基因进行Pathway富集分析,发现它们显著富集于一系列信号通路。我们尤其关注在三个数据库中均显著富集的通路(表2),包括MAPK信号通路(MAPK signaling pathway)、T细胞受体介导的信号通路(T cell receptor signaling pathway)、胰岛素信号通路(insulin signaling pathway)、TGF- β 信号通路(TGF-beta signaling pathway)。例如,在KEGG数据库中富集的MAPK信号通路含有12个差异表达基因,其中的高表达基因有PTPRR和MKNK2,低表达基因有TAOK3、TAOK1、TGFBR1、PPM1A、MAP4K4、FGF5、SOS1、FOS、IL1R1和RASA1。在KEGG数据库中富集的T细胞受体介导的信号通路含有2个差异表达基因,即SOS1和FOS,两者均为低表达基因。在KEGG数据库中富集的胰岛素信号通路含有3个差异表达基因,其中高表达基因有RPS6和MKNK2,低表达基因为SOS1。在KEGG数据库中富集的TGF- β 信号通路含有3个差异表达基因,PPP2R1B、BMPRI1A和TGFBR1均为低表达基因。

2.6 定量PCR验证基因芯片结果

我们前期的实验结果也表明,PRR11参与细胞周期和肿瘤的发生发展。因此,结合文献检索分析,我们从上述筛选到得550个差异表达基因中重点选取了多个与细胞周期、肿瘤发生发展过程相关的基因进行定量PCR验证(表3)。多个重要基因的表达变化的到了证实,其中,与阴性对照组细胞相比,



H1299细胞分别瞬时转染阴性对照siRNA和PRR11siRNA,转染后48 h,提取总RNA,采用实时定量PCR检测相应基因的表达水平变化。

H1299 cells were transiently transfected with the negative control siRNA and PRR11siRNA, respectively. Forty-eight hours after transfection, total RNA were prepared and subjected to qRT-PCR analysis.

图4 定量PCR验证部分差异表达基因的变化

Fig.4 Verification of several differentially expressed genes by qRT-PCR

PRR11表达沉默的细胞中DHRS2和EPB41L3表达升高,而CCNA1、MAP4K4、RRM1和NFIB表达下降(图4)。

3 讨论

本课题组前期发现了PRR11这一新的肿瘤相关基因,尚未见其功能研究报道。前期研究结果表明,敲降肺癌细胞中PRR11的表达,出现细胞S期阻滞进而引起细胞增殖减缓,细胞的迁移能力减弱,体内成瘤能力减弱。PRR11作为候选的肺癌相关癌基因,其涉及的分子机制值得深入探索。

本研究采用高通量基因芯片技术检测PRR11表达敲降后的人肺癌细胞系H1299细胞的mRNA表达

谱,再基于比较基因组学策略筛选PRR11相关差异表达基因。随后,表达谱芯片分析筛选到550个基因的表达在PRR11表达沉默的H1299细胞中发生改变,低表达基因(411个)远远多于高表达基因(139个)。

PRR11相关差异表达基因显著富集于众多的生物学过程,其中31个差异表达基因富集于细胞周期,说明PRR11的功能与细胞周期密切相关,这与前期结果中敲降PRR11表达引起细胞周期阻滞的结果相符。CCNA1(cyclin A1)是其中的低表达基因,它是周期调节蛋白(cyclin)家族成员之一,作为重要的细胞周期调控因子,它在各种肿瘤中高表达,但是在正常组织中表达量很低,只在减数分裂的生殖细胞中表达。据报道,肺癌细胞系H157和H596中敲降CCNA1的表达后,将明显下调cyclin B1、Cdc2和CDK2表达,细胞出现S期阻滞,进而诱导细胞凋亡^[6]。在本研究中,敲降PRR11表达后,CCNA1的表达亦下降,提示PRR11极可能通过CCNA1来调节细胞周期影响细胞增殖。

为进一步寻找PRR11相关的信号通路,我们对这些差异表达基因进行通路富集分析,发现它们富集于MAPK信号通路、T细胞受体介导的信号通路、胰岛素信号通路、TGF- β 信号通路等。丝裂原活化蛋白激酶信号通路(mitogen-activated protein kinase cascade, MAPK)参与细胞增殖、细胞分化、细胞运动和细胞死亡等过程,在哺乳动物中,MAPK通路主要包括ERK1/2、JNK、p38等几条亚通路^[7]。敲降PRR11表达后,MAPK通路相关基因PTPRR和MKNK2表达升高,而TAOK3、TAOK1、TGFBR1、PPM1A、MAP4K4、FGF5、SOS1、FOS、IL1R1和RASA1表达下降。据报道,PTPRR可抑制p44/42 MAPK信号通路^[8],而MAP4K4则可以激活JNK信号通路^[9],TAO激酶(包括TAOK3、TAOK1)可以激活p38 MAPK信号通路^[10],RASA1通过降低Ras-GTP的水解作用来增强Ras/MAPK信号通路^[11]。敲降PRR11表达后,伴随PTPRR表达升高和MAP4K4、TAOK3、TAOK1及RASA1表达降低,提示MAPK通路极可能处于不活跃的状态。据此推测,PRR11可能经由MAPK通路来调节细胞增殖和细胞运动。T细胞受体介导的信号通路主要参与免疫应答的调节^[12]。胰岛素信号通路是一个高度保守的通路,主要调节细胞的生长和葡萄糖的摄取和利用^[13]。TGF- β 信号通路参与了细胞增殖、分化、凋亡等生物过程^[14],如今入越来越多的研究显示TGF- β 信号通路与肿瘤

的进展密切相关。

鉴于基因芯片结果存在一定的假阳性,我们从中挑选部分与细胞周期、肿瘤发生发展过程相关的基因(包括DHRS2、EPB41L3、CCNA1、MAP4K4、NFIB和RRM1)进行定量PCR检测。定量PCR的验证结果与芯片结果保持一致。另外,PRR11在芯片结果中是低表达基因,与定量PCR和Western blot结果相符。以上结果说明,从芯片数据中筛选的差异表达基因具有较高的可信度。DHRS2(dehydrogenase/reductase SDR family member 2)位于人类染色体14q11上^[15],最初确定于人肝胚细胞瘤细胞株HepG2的细胞核内^[16]。它在受抑制的细胞和G₀期细胞中表达水平增高^[17]。在雌激素受体阳性的乳腺癌细胞中,DHRS2可能在c-Myb-Hep27-Mdm2-p53这条线粒体至细胞核的信号通路中发挥重要作用^[18]。敲降PRR11后,H1299细胞DHRS2的表达升高,提示DHRS2是PRR11作用的下游信号分子。丝裂原激活蛋白激酶激酶激酶激酶4(MAP4K4)在多种肿瘤中均高表达。敲降MAP4K4的表达导致细胞增殖减少,细胞周期呈现S期阻滞,细胞凋亡增加,体外成瘤能力减弱^[19]。另外,MAP4K4还与肿瘤的侵袭转移相关^[20]。PRR11表达沉默后,H1299细胞MAP4K4表达下降,推测PRR11极可能通过上调MAP4K4来增强MAPK通路,进而促进细胞增殖等过程。RRM1(ribonucleotide reductase M1)是核糖核苷酸还原酶(RR)的其中一个亚型,催化核糖核苷酸还原生成脱氧核糖核苷酸。文献报道,RRM1通过调节细胞增殖和迁移来参与肿瘤形成及其转移过程^[21]。敲降PRR11的表达导致RRM1表达下降,提示RRM1可能是PRR11增强细胞增殖的另一个作用分子。另外,NFIB(nuclear factor 1 B-type)和EPB41L3(erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3)也与肿瘤发生发展过程相关^[22],PRR11表达沉默引起NFIB表达下降和EPB41L3表达升高。面对上述众多的差异表达基因,我们需要更多的功能学实验来确认与PRR11功能相关重要分子及信号通路。

综上所述,本研究通过基因芯片筛选技术获得了PRR11相关差异表达基因,其中包括细胞周期相关基因和MAPK信号通路相关基因。因此,我们将在后续工作中集中于这两类基因,深入探索PRR11参与肺癌发生发展的分子机制。

参考文献 (References)

- 1 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
- 2 卫生部新闻办公室. 第三次全国死因调查主要情况. *中国肿瘤 (Information office, Ministry of Health, P.R.C. The third national sampling survey of cause of death. China Cancer)* 2008; 17(5): 344-5.
- 3 Goh KI, Cusick ME, Valle D, Childs B, Vidal M, Barabási AL. The human disease network. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007; 104(21): 8685-90.
- 4 艾青, 卜友泉, 刘竹, 兰欢, 吉颖, 杜刚. 人PRR11启动子的结构与功能初步分析. *中国生物化学与分子生物学报 (Ai Qing, Bu Youquan, Liu Zu, Lan Huan, Ji Ying, Du Gang. Structural and functional analysis of human PRR11 promoter. Chin J Biochem Mol Biol)* 2011; 27(4): 356-63.
- 5 崔涛, 兰欢, 杜刚, 刘革力, 易发平, 卜友泉. 新基因PRR11的克隆、原核表达及鉴定. *生物技术通报 (Cui Tao, Lan Huan, Du Gang, Liu Geli, Yi Faping, Bu Youquan. Cloning, prokaryotic expression and identification of novel human gene PRR11. Biotechnology Bulletin)* 2009; 3(98): 105.
- 6 Cho NH, Choi YP, Moon DS, Kim H, Kang S, Ding O, *et al.* Induction of cell apoptosis in non-small cell lung cancer cells by cyclin A1 small interfering RNA. *Cancer Sci* 2006; 97(10): 1082-92.
- 7 Huang P, Han J, Hui L. MAPK signaling in inflammation-associated cancer development. *Protein Cell* 2010; 1(3): 218-26.
- 8 Su PH, Lin YW, Huang RL, Liao YP, Lee HY, Wang HC, *et al.* Epigenetic silencing of PTPRR activates MAPK signaling, promotes metastasis and serves as a biomarker of invasive cervical cancer. *Oncogene* 2012; doi: 10.1038/onc.2012.29.
- 9 Yao Z, Zhou G, Wang XS, Brown A, Diener K, Gan H, *et al.* A novel human STE20-related protein kinase, HGK, that specifically activates the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway. *J Biol Chem* 1999; 274(4): 2118-25.
- 10 Raman M, Earnest S, Zhang K, Zhao Y, Cobb MH. TAO kinases mediate activation of p38 in response to DNA damage. *EMBO J* 2007; 26(8): 2005-14.
- 11 Tidyman WE, Rauen KA. The RASopathies: Developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. *Curr Opin Genet Dev* 2009; 19(3): 230-6.
- 12 Moreau HD, Lemaître F, Terriac E, Azar G, Piel M, Lennon-Dumenil AM. Dynamic in situ cytometry uncovers T cell receptor signaling during immunological synapses and kinapses in vivo. *Immunity* 2012; 37(2): 351-63.
- 13 DeBosch BJ, Muslin AJ. Insulin signaling pathways and cardiac growth. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 44(5): 855-64.
- 14 Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113(6): 685-700.
- 15 Deisenroth C, Thorne AR, Enomoto T, Perou CM, Zhang Y. Mitochondrial Hep27 is a c-Myb target gene that inhibits Mdm2 and stabilizes p53. *Mol Cell Biol* 2010; 30(16): 3981-93.
- 16 Donadel G, Garzelli C, Frank R, Gabrielli F. Identification of a novel nuclear protein synthesized in growth-arrested human hepatoblastoma HepG2 cells. *Eur J Biochem* 1991; 195(3): 723-9.
- 17 Neuspiel M, Schauss AC, Braschi E, Zunino R, Rippstein P, Rachubinski RA, *et al.* Cargo-selected transport from the mitochondria to peroxisomes is mediated by vesicular carriers. *Curr Biol* 2008; 18(2): 102-8.
- 18 Gabrielli F, Donadel G, Bensi G, Heguy A, Melli M. A nuclear protein, synthesized in growth-arrested human hepatoblastoma cells, is a novel member of the short-chain alcohol dehydrogenase family. *Eur J Biochem* 1995; 232(2): 473-7.
- 19 Liu AW, Cai J, Zhao XL, Jiang TH, He TF, Fu HQ, *et al.* ShRNA-targeted MAP4K4 inhibits hepatocellular carcinoma growth. *Clin Cancer Res* 2011; 17(4): 710-20.
- 20 Collins CS, Hong J, Sapinoso L, Zhou Y, Liu Z, Micklash K, *et al.* A small interfering RNA screen for modulators of tumor cell motility identifies MAP4K4 as a promigratory kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(10): 3775-80.
- 21 Jordheim LP, Seve P, Tredan O, Dumontet C. The ribonucleotide reductase large subunit (RRM1) as a predictive factor in patients with cancer. *Lancet Oncol* 2011; 12(7): 693-702.
- 22 Bernkopf DB, Williams ED. Potential role of EPB41L3 (protein 4.1B/Dal-1) as a target for treatment of advanced prostate cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2008; 12(7): 845-53.