

外源性miR-34a抑制H1299细胞生长的机制研究

段广新¹ 段卫明² 许雅香¹ 张燕娟³ 周新文^{3*}

(¹苏州大学医学部基础医学与生物科学学院, 苏州 215123; ²苏州大学附属第一医院, 苏州 215123;

³苏州大学医学部放射医学与防护学院, 苏州 215123)

摘要 将合成的miR-34a成熟序列转染 $p53^{-/-}$ 的非小细胞肺癌H1299细胞, 探究外源性的miR-34a是否影响 $p53$ 缺失细胞的生长、凋亡和衰老以及其作用机制。MTT检测细胞的生长与存活, 藻红B染色检测细胞的死亡, Annexin V/PI染色检测细胞凋亡, β -半乳糖苷酶染色试剂盒检测细胞的衰老, Western blot检测与细胞凋亡和周期相关的Bcl-2、Puma、Cdk4和E2F3蛋白的表达。结果显示, miR-34a转染组和阴性对照组相比, 存活率明显降低, 且48 h较24 h更显著, 24 h和48 h存活率分别为79.94%、64.83%; 细胞死亡和凋亡的分析结果表明, 外源性miR-34a可以促进细胞死亡和凋亡; 此外, 细胞还出现了明显的衰老, 并且检测到凋亡、衰老相关的Bcl-2、Puma、E2F3和Cdk4蛋白的表达下调。miR-34a可以下调 $p53$ 下游相应靶蛋白的表达, 通过部分补救 $p53$ 通路或 $p53$ 非依赖途径促进细胞的凋亡、衰老并抑制细胞的增殖。

关键词 miR-34a; 凋亡; 衰老; E2F3

Cell Growth Inhibition by Exogenous miR-34a in H1299 Cell

Duan Guangxin¹, Duan Weiming², Xu Yaxiang¹, Zhang Yanjuan³, Zhou Xinwen^{3*}

(¹School of Biology and Basic Medical Science, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China;

²The First Hospital Affiliated to Soochow University, Suzhou 215123, China;

³School of Radiation Medicine and Protection, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract To elucidate the function and mechanism of exogenous miR-34a involved in growth, apoptosis and senescence in the $p53^{-/-}$ H1299, miR-34a mimics was used to transfect into H1299. Viability cell rate was analyzed by MTT. Erythrosine B cells staining was used to count the rate of cell death. Apoptosis was detected by Annexin V/PI staining. Senescence was observed by senescence associated β -galactosidase kit staining. The expression of the Bcl-2, Puma, E2F3 and Cdk4 was resolved by Western blot. The group transfection with miR-34a has a lower cell viability rate than the group of negative control. The decrease of cell viability of 48 h is more notable than 24 h. The cell viability rate of 24 h and 48 h are 79.94%, 64.83%, respectively. The rate of cell death and apoptosis is higher and the senescence staining more marked when transfected with miR-34a. The expression of Bcl-2, E2F3 and Cdk4 significantly decreases and Puma increases when induction of miR-34a. So miR-34a can decrease its target proteins of $p53$ downstream and induce apoptosis and cell death, senescence, inhibit cell growth of H1299 cell by partly saving the $p53$ pathway and $p53$ independent pathway.

Key words miR-34a; apoptosis; senescence; E2F3

收稿日期: 2012-12-12 接受日期: 2013-01-15

国家自然科学基金(批准号: 81071878)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0512-65880068, E-mail: martin_zhouxw@hotmail.com

Received: December 12, 2012 Accepted: January 15, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81071878)

*Corresponding author. Tel: +86-512-65880068, E-mail: martin_zhouxw@hotmail.com

网络出版时间: 2013-04-24 11:06

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130424.1106.003.html>

microRNA(miRNA)是一种内源性、非编码的单链小RNA分子。其长度约19-25 nt, 它可以通过形成RNA依赖的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)与其靶基因的3'-端的非翻译区(3'-UTR)发生非完全的互补结合, 从而降解其靶基因的mRNA或抑制靶基因的翻译^[1]。其本身在正常的组织分化、发育、代谢与细胞数量平衡上有着非常重

要的生理功能^[2]。近来发现,肿瘤细胞中miRNA的表达水平与结构修饰发生了改变,并且与肿瘤的发生、发展存在密切的关系^[3-4]。miR-34a是一种重要的microRNA,它是p53直接调控的小RNA分子。目前的研究表明,外源性miR-34a可诱导细胞的凋亡、周期阻滞、细胞的衰老以及抑制肿瘤细胞的移动和侵袭。表明了miR-34a是p53抑制肿瘤信号网络中的一个非常重要的介导因子^[5-6]。

大量的研究报道,在恶性肝细胞癌、前列腺癌、黑色素瘤、神经母细胞瘤、非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中发现,由于miR-34a基因的缺失或者启动子的甲基化而使miR-34a表达下调。结果使细胞的生长、周期和凋亡过程失调,而促使了肿瘤的发生^[7]。在miR-34a调控的信号通路上,其可以直接靶向抑制SIRT1、c-myc和E2F3等转录因子来调节细胞的生长和一些重要的细胞过程^[8]。并且miR-34a通过下调SIRT1的表达,在p53之间形成正反馈机制,致使p53的脱乙酰化水平降低,增强了p53的转录活性,使凋亡蛋白如Puma以及p21的表达升高,而抗凋亡蛋白如Bcl-2的表达降低。50%以上肿瘤细胞中由于p53的突变或缺失,使得这种正反馈机制缺失,降低了外源性miR-34a诱导的部分类型肿瘤细胞的凋亡。SIRT1作为NAD依赖性的脱乙酰化酶,本身可以转录抑制促凋亡蛋白的表达。因此,外源性miR-34a诱导的细胞凋亡并不是完全p53依赖性的,它与肿瘤细胞的背景有关^[9]。本实验研究在p53^{-/-}的H1299非小细胞肺癌细胞中转染外源性miR-34a,观察其是否能够启动p53的下游凋亡信号的传导,来抑制细胞的增殖,以及对细胞衰老的影响及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 非小细胞肺癌H1299细胞系由苏州大学放射医学与防护学院杨红英教授实验室惠赠。

1.1.2 主要试剂 RPMI-1640、胎牛血清和青霉素(10 000 U/mL)/链霉素(10 000 μg/mL)双抗均购自美国Hyclone公司; miR-34a序列5'-UGG CAG UGU CUU AGC UGG UUG U-3'和阴性对照(negative control, NC)序列5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3'由上海吉玛制药技术有限公司合成;转染试剂LipofectamineTM2000购于美国Invitrogen公司; An-

nexin V/PI凋亡检测试剂盒购于南京铂优生物技术有限公司;细胞衰老β-半乳糖苷酶(SA-β-Gal)染色试剂盒购于碧云天生物技术研究; MTT购自上海生物工程技术有限公司;兔抗Cdk4(sc-260)、E2F3多克隆抗体(sc-878)和兔抗Bcl-2单克隆抗体(sc-509),以及辣根过氧化物酶标记的二抗均购于美国Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 H1299细胞用含有10%浓度的胎牛血清和1%浓度的青霉素/链霉素双抗的RPMI-1640培养基在37 °C、5% CO₂的培养箱内培养。

1.2.2 细胞转染 根据实验要求接种相应数量的细胞到35 mm的细胞培养皿[接种(1.5~2.5)×10⁵细胞]或96孔板中(24 h接种6×10³细胞,48 h接种4×10³细胞),培养24 h后根据LipofectamineTM2000产品说明书将miR-34a序列和NC序列转入H1299细胞中,4 h后更换完全培养基,继续培养。

1.2.3 MTT染色 将H1299细胞种入96孔板,24 h后按照LipofectamineTM2000产品说明书转染5, 20, 40 nmol/L的miR-34a序列和40 nmol/L的NC,4 h后换完全培养基,继续培养24, 48 h后,加入MTT,再培养4 h后,去除有MTT的培养基,加入150 μL DMSO,15 min内完全溶解皿底的晶体,酶标仪检测其490 nm波长的吸光度。

1.2.4 细胞衰老分析 在6孔板内接种1.5×10⁵细胞,24 h后转染40 nmol/L合成的miR-34a和NC序列,转染后4 h更换完全培养基,培养48, 72 h后按照衰老试剂盒说明书,先固定15 min,然后加入染色液在37 °C染色过夜(无CO₂条件下),镜下观察拍照。定量分析采用任意的5个视野,观察总的细胞数以及染色的细胞数,取平均值。细胞衰老率(%)=染色的细胞数/总细胞数×100%。

1.2.5 藻红B染色观察细胞死亡 细胞转染24, 48 h后,用0.02%的藻红B(Erythrosine B)避光染细胞15 min,然后用显微镜观察细胞核的染色情况,活的细胞核不能被染色,而死亡细胞核被染成红色。计数300个细胞中被染色的细胞的百分率来计算死亡率。细胞死亡率(%)=被染色的细胞数/300×100%。具体方法参见文献^[10]。

1.2.6 细胞凋亡分析 在35 mm细胞培养皿中接种2.5×10⁵细胞,24 h后转染40 nmol/L合成的miR-34a和

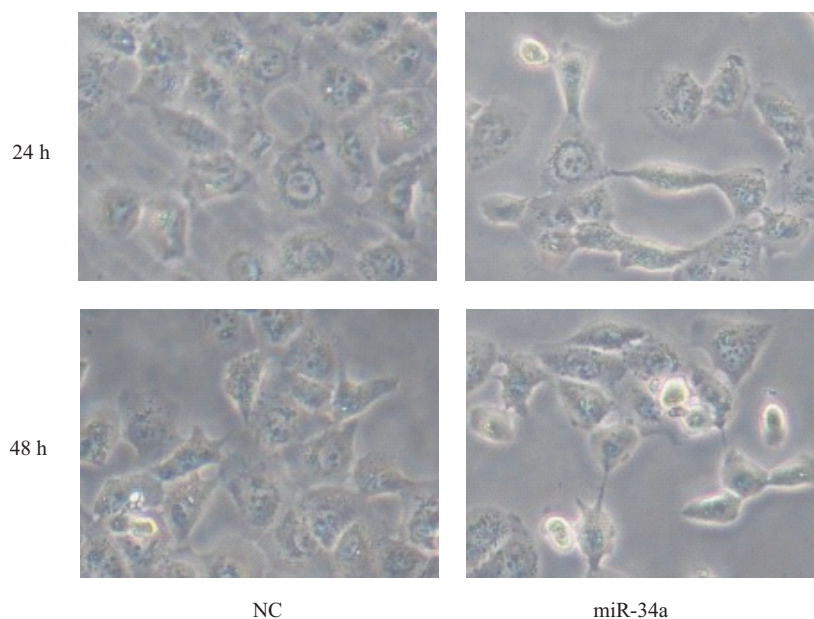


图1 H1299细胞转染后的形态变化(100×)

Fig.1 Morphology after transfection of H1299(100×)

NC序列, 4 h后更换完全培养基。继续培养24, 48 h后收集细胞, 按照Annexin V/PI凋亡检测试剂盒的说明书要求, 先后加入Annexin V和PI, 避光、室温反应10 min后, 流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.7 Western blot分析蛋白的表达 接种 2.5×10^5 细胞到35 mm的培养皿中, 24 h后转染40 nmol/L合成的miR-34a和NC序列, 4 h后更换完全培养基, 继续培养48 h后, 收集细胞, 用4 °C的PBS溶液洗3次。然后用含有苯甲基磺酰氟(PMSF)的RIPA裂解液裂解细胞, Bradford法测总的蛋白浓度, 每孔上样20 μ L, 用12%的SDS-PAGE胶进行电泳, 然后转膜到硝酸纤维素膜上, 然后用5%脱脂牛奶封闭液封闭1 h, 再加入一抗(稀释比1:1 000), 4 °C过夜, TBST洗3次, 每次5 min, 加入含有辣根过氧化物酶标记的二抗(稀释比1:2 000)孵育1 h, 然后洗膜3次, 每次5 min。再用ECL发光液A液、B液等体积混合加到硝酸纤维素膜上, 曝光检测。

1.2.8 统计学分析 实验数据均使用平均数 \pm 标准差表示, 采用SPSS16.0统计软件进行t检验, 以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

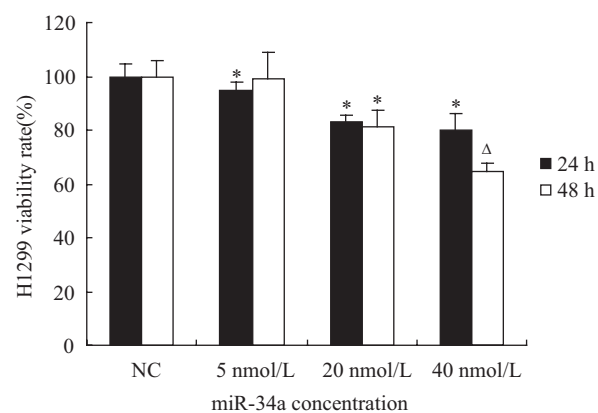
2.1 外源性miR-34a抑制H1299细胞的增殖

在H1299细胞转染miR-34a后, 24 h和48 h细胞的形态与对照组相比有些细胞伸长, 有些细胞变圆,

并发亮, 细胞的形态与对照组相比, 变得不规则(图1)。分别在24 h和48 h用MTT染色, 酶标仪检测细胞吸光度, 发现转染后24 h的细胞与阴性对照组(NC)相比, 细胞的存活率降低, 且随着转染的miR-34a浓度的增高, 存活率逐渐降低(图2, $P < 0.05$)。40 nmol/L的浓度下转染后24 h, 细胞的存活率为79.94%, 而转染后48 h, 仅为64.83%, 细胞存活率较24 h更低。

2.2 外源性miR-34a促进H1299细胞死亡

如图3所示, 转染miR-34a 24 h后, miR-34a组和阴性对照NC组的死亡率并没有明显的差异; 转染48 h后



* $P < 0.05$, 与阴性对照比较; $\Delta P < 0.05$, 与对应24 h相同浓度组比较。

* $P < 0.05$ vs negative control(NC); $\Delta P < 0.05$ vs the same concentration of 24 h group.

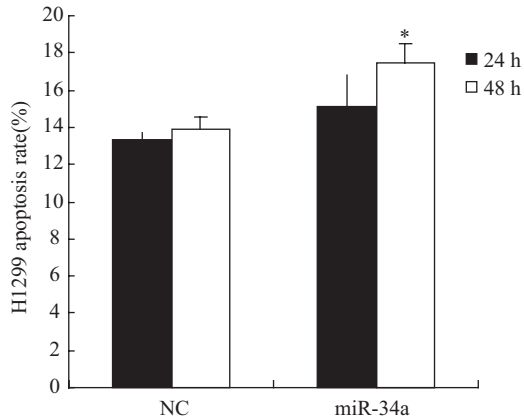
图2 转染miR-34a 24, 48 h后H1299的细胞存活率

Fig.2 H1299 viability rate after miR-34a transfection for 24, 48 h

miR-34a组的死亡率为17.44%，要高于NC组的13.89%，差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 外源性miR-34a促进H1299细胞凋亡

miR-34a转染后24 h, 与对照组相比, 早期和晚期凋亡率都提高, miR-34a转染组, 细胞的早期凋亡率和晚期凋亡率达到了4.9%和11.2%, 高于对照组的



* $P<0.05$, 与阴性对照比较。

* $P<0.05$ vs negative control(NC).

图3 转染miR-34a 24, 48 h后细胞的死亡率
Fig.3 Rate of cell death after miR-34a transfection for 24, 48 h

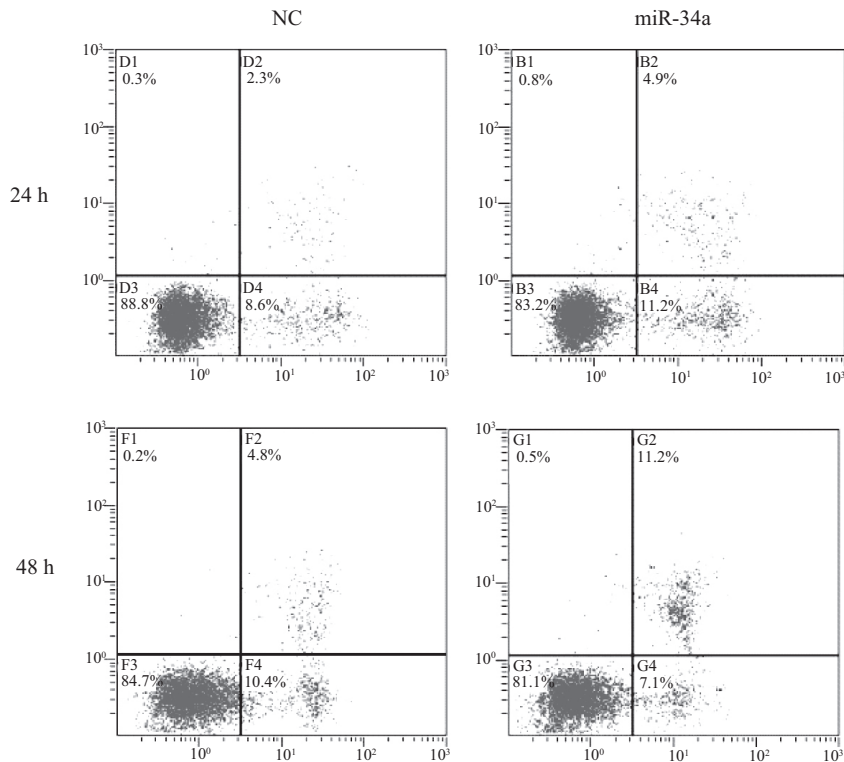


图4 Annexin V/PI染色流式细胞仪检测细胞凋亡

Fig.4 Apoptosis analyzed by flow cytometry after staining with Annexin V/PI

2.3%和8.6%。而转染后48 h, 转染组早期凋亡低于对照组, 但是晚期凋亡率与对照组相比具有更显著的提高, miR-34a转染组细胞早期凋亡率为7.1%, 低于对照组, 而晚期凋亡率达到了11.2%, 显著高于对照组的4.6%(图4)。

2.4 外源性miR-34a诱导细胞衰老

转染miR-34a 48, 72 h后的细胞用衰老试剂盒染色发现, 转染后48 h与阴性对照组相比, miR-34a转染组的细胞出现了较明显的衰老现象(图5), 衰老率为20.78%, 显著高于阴性对照组($P<0.05$); 转染72 h后, miR-34a转染组的衰老率达到了25.22%, 高于48 h的20.78%, 但统计学分析, 差异不明显($P>0.05$, 图6)。

2.5 H1299细胞转染miR-34a 48 h后Bcl-2、E2F3、Cdk4和Puma的表达情况

转染H1299细胞48 h后, 与阴性对照NC组相比, miR-34a组抗细胞凋亡的蛋白Bcl-2表达下调, 而Bcl-2家族的另一个成员即促细胞凋亡的Puma蛋白表达上调。与细胞衰老、周期和增殖相关的E2F3和Cdk4蛋白表达也出现了下调(图7)。

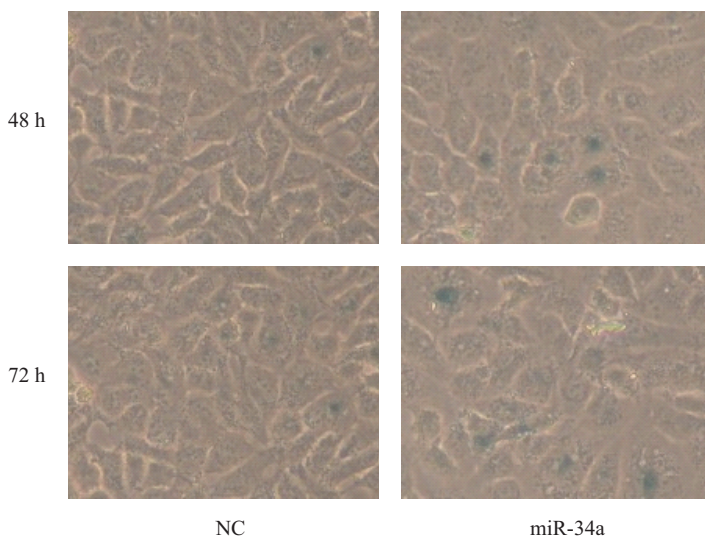
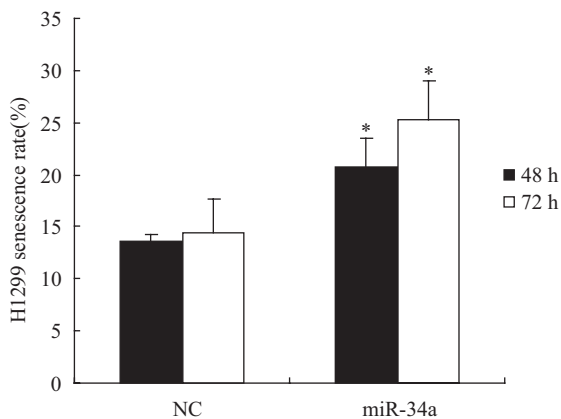


图5 转染miR-34a后衰老染色(100×)

Fig.5 SA-β-Gal staining after miR-34a transfection(100×)



* $P < 0.05$, 与阴性对照比较。

* $P < 0.05$ vs negative control(NC).

图6 转染miR-34a后48, 72 h细胞的衰老率

Fig.6 Rate of senescence after miR-34a transfection for 48, 72 h

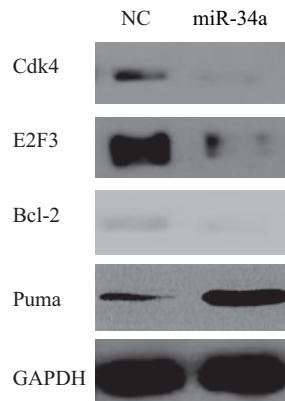


图7 转染miR-34a 48 h后Bcl-2、Puma、E2F3和Cdk4蛋白的表达情况

Fig.7 Expression of Bcl-2, Puma, E2F3 and Cdk4 after miR-34a transfection for 48 h

3 讨论

H1299是一种p53缺失($p53^{-/-}$)的非小细胞肺癌细胞株。因为其p53的缺失,所以H1299细胞较 $p53^{+/+}$ 的非小细胞肺癌细胞对放射线和一些抗肿瘤药物有更强的抗性。本实验用化学合成的miR-34a序列直接转染到H1299细胞中, 24 h后, 20 nmol/L转染组细胞存活率明显降低; 而转染后48 h, 细胞存活率降低更显著, 40 nmol/L转染组的细胞存活率与NC组相比仅为64.83%。将miR-34a转入H1299细胞48 h后, 细胞的死亡率上升, 且具有统计学意义($P < 0.05$)。miR-34a转染组细胞, 转染后24 h细胞的早期凋亡率与晚期凋亡率与对照组相比都有所提高, 而48 h后细胞晚期凋亡率提高更显著。与此相吻合的是, 转

染48 h后, 抑制细胞凋亡的Bcl-2蛋白的表达量较NC组出现了下调, 而Bcl-2家族的另一成员, 促凋亡的Puma蛋白的表达上调。Puma是p53的靶基因, 具有强大的促凋亡作用, Puma属于Bcl-2家族的BH3亚家族成员, 其蛋白定位于线粒体, 通过BH3结构域与Bcl-2相互作用, 诱导细胞色素C释放, 激活细胞凋亡程序, 其可以参与p53依赖和非依赖途径的促凋亡过程。miR-34a可能通过下调抗凋亡Bcl-2的表达, 上调促凋亡的Puma, 来促使细胞凋亡。细胞的衰老是细胞生长停滞的一种体现形式。我们用miR-34a转染H1299细胞48 h后, β -半乳糖苷酶染色试剂盒染色发现 β -半乳糖苷酶染色阳性的细胞增多, 细胞发生了衰老现象, 72 h后衰老率达25.22%, 明显高于阴性

对照NC组。E2F3是E2F家族的一员,是一种重要的转录调控因子,可以和DP蛋白结合形成二聚体,这种二聚体可以和靶基因的启动子结合来调控转录。研究表明,E2F3还与细胞衰老密切相关,Tazawa等^[11]和Noguchi等^[12]先后验证了E2F3的下调可以诱导细胞的衰老。现在,研究比较多的衰老通路主要有两条:一是RAS和p38 MAPK通路诱导的衰老通路;另一条是E2F/DP活性降低而引起的衰老通路^[13-14]。前一条通路是需要p53和p16等蛋白的调节作用下来完成的,而H1299细胞中,p53是缺失的,且在转染miR-34a后,E2F3表达下调,接着就会抑制E2F/DP复合体的活性,那么miR-34a诱导的衰老可能是通过补救p53通路,调节其下游的相关蛋白,或者通过E2F/DP通路来完成的。E2F/DP主要是与细胞的增殖及周期相关的一种复合体,这种复合体的活性降低使细胞的增殖和周期可能会受到抑制,而Western blot检测到和细胞增殖周期相关的蛋白Cdk4表达下调。此外,Noguchi等^[12]发现E2F3的沉默可以下调SIRT1、c-Myc和E2F1的表达,同时出现 β -半乳糖苷酶的活性上调;E2F3的过表达,使细胞的 β -半乳糖苷酶的活性明显下调。

我们在p53^{-/-}的H1299非小细胞肺癌细胞中转染了外源性miR-34a后,下调了p53下游的一些调节蛋白,补救了部分的p53下游的信号通路。从而使细胞的生长受到了显著的抑制,细胞的死亡率和凋亡率也增高。我们还发现,外源性miR-34a可以下调与细胞增殖和细胞衰老相关的转录因子E2F3的表达,从而促使细胞发生衰老,抑制细胞的生长增殖。

参考文献 (References)

- 1 Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2): 281-97.
- 2 Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431(7006): 350-5.
- 3 Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435(7043): 834-8.
- 4 Trang P, Weidhaas JB, Slack FJ. MicroRNAs as potential cancer therapeutics. *Oncogene* 2008; 27: S52-7.
- 5 He X, He L, Hannon GJ. The guardian's little helper: MicroRNAs in the p53 tumor suppressor network. *Cancer Res* 2007; 67(23): 11099-101.
- 6 Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ* 2010; 17(2): 193-9.
- 7 Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(9): 2999-3004.
- 8 Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(36): 13421-6.
- 9 Fujita Y, Kojima K, Hamada N, Ohhashi R, Akao Y, Nozawa Y, *et al.* Effects of miR-34a on cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 377(1): 114-9.
- 10 Zhou X, Suto S, Ota T, Tatsuka M. Nuclear translocation of cleaved LyGDI dissociated from Rho and Rac during Trp53-dependent ionizing radiation-induced apoptosis of thymus cells *in vitro*. *Radiat Res* 2004; 162(3): 287-95.
- 11 Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(39): 15472-7.
- 12 Noguchi S, Mori T, Otsuka Y, Yamada N, Yasui Y, Iwasaki J, *et al.* Anti-oncogenic microRNA-203 induces senescence by targeting E2F3 protein in human melanoma cells. *J Biol Chem* 2012; 287(15): 11769-77.
- 13 Zhang X, Kim J, Ruthazer R, McDevitt MA, Wazer DE, Paulson KE, *et al.* The HBP1 transcriptional repressor participates in RAS-induced premature senescence. *Mol Cell Biol* 2006; 26(22): 8252-66.
- 14 Maehara K, Yamakoshi K, Ohtani N, Kubo Y, Takahashi A, Arase S, *et al.* Reduction of total E2F/DP activity induces senescence-like cell cycle arrest in cancer cells lacking functional pRB and p53. *J Cell Biol* 2005; 168(4): 553-60.