

抑制PRR11基因表达对H1299细胞周期的影响

张春冬^{1,2} 王义涛^{1,2} 张莹^{1,2} 李轶^{1,2} 朱慧芳^{1,2} 蔡伟^{1,2} 朱远远^{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 protein 11(*PRR11*)是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。前期研究表明, *PRR11*敲减后导致肿瘤细胞周期S期阻滞。该研究利用流式细胞检测和免疫荧光方法在人肺癌细胞系H1299中分析siRNA介导的*PRR11*表达沉默对细胞周期产生的影响, 通过添加dNTPs分析核糖核苷酸还原酶表达下降在*PRR11*敲降导致的S期阻滞中的作用。BrdU标记结果表明, *PRR11*敲减阻滞细胞周期在S期, 并且核糖核苷酸还原酶表达下降导致细胞周期阻滞。使用分裂期标记蛋白pHH3分析结果表明, *PRR11*下调表达同时也导致细胞在G₂期产生阻滞, 从而抑制细胞进入有丝分裂。研究结果表明, 在细胞周期过程中抑制*PRR11*的表达会阻滞DNA合成和有丝分裂进行, 推测*PRR11*异常表达可能导致细胞周期紊乱, 从而促进肿瘤的发生发展。

关键词 肺癌; 细胞周期; *PRR11*; 脱氧核糖核苷酸

RNAi-mediated *PRR11* Depletion Influences Cell Cycle Regulation in Lung Cancer H1299 Cells

Zhang Chundong^{1,2}, Wang Yitao^{1,2}, Zhang Ying^{1,2}, Li Yi^{1,2}, Zhu Huifang^{1,2}, Cai Wei^{1,2},
Zhu Yuanyuan^{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 protein 11(*PRR11*) is a novel tumor associated gene, implicated in both cell cycle progression and lung cancer. Studies have showed that downregulation of *PRR11* by siRNA resulted in cell cycle arrest at S phase in cancer cells. In the present study, we analyzed the molecular mechanism of downregulation of *PRR11* caused cell cycle arrest in lung cancer cell with FCM analysis and IF staining. BrdU labelling showed that downregulation of *PRR11* caused cell cycle S phase arrest, and the downregulation of ribonucleotide reductase resulted in cell cycle arrest by adding dNTPs *in vitro*. Mitotic marker pHH3 labelling showed silencing *PRR11* caused cell cycle arrest at G₂ phase leading to inhibition in mitosis. Abnormal expression of *PRR11* may result in dysregulation of cell cycle progression and promote tumorigenesis.

Key words lung cancer; cell cycle regulation; *PRR11*; deoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs)

细胞周期过程中基因组DNA正常复制是生物种系得以维持和延续的基本前提和重要保证, 细胞

内存在一整套精密的级联调控机制以保证遗传信息稳定而忠实地代代相传^[1]。基因组DNA在细胞周期

收稿日期: 2013-03-27 接受日期: 2013-05-06

国家自然科学基金(批准号: 30801356、81171879)和重庆市自然科学基金计划(批准号: cstc2013jcyjA10043)资助的课题

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

Received: March 27, 2013 Accepted: May 6, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30801356, 81171879) and Chongqing Natural Science Foundation (cstc2013jcyjA10043)

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

网络出版时间: 2013-07-31 16:20

URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130731.1620.004.html

的S期完成整个复制过程,多种蛋白在细胞周期的S期起关键作用^[2-3]。细胞周期S期相关蛋白表达失调导致DNA复制异常,从而诱发基因组不稳定,最终可能导致肿瘤等多种疾病发生^[3-4]。因此,对参与调控细胞S期进程的相关基因进行研究,不仅可以帮助我们更深入地了解细胞周期调控的分子机制,而且对于探索肿瘤等疾病的发生发展及抗肿瘤药物研发具有重要意义。

Proline-rich protein 11(*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*在mRNA和蛋白水平均高表达在肺癌等多种恶性肿瘤组织中,并且*PRR11*的表达水平与肺癌患者愈后呈负相关。*PRR11*敲减后显著阻滞细胞周期进行,并且抑制肺癌细胞的迁移、侵袭、克隆形成和在裸鼠中的成瘤能力。基因芯片分析结果表明,*PRR11*敲减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,而引起细胞周期调控紊乱^[5]。但是到目前为止,*PRR11*在细胞周期调控过程中执行功能的具体分子机制并不清楚。本研究通过流式细胞检测和免疫荧光分析检测*PRR11*敲减后对肺癌细胞H1299细胞周期的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺癌细胞系H1299为本实验室保存, RMPI 1640培养基和胎牛血清均购自GIBICO公司。针对*PRR11*的siRNA(*PRR11* siRNA)和阴性对照siRNA(NC siRNA)均由GenePharma公司(中国)合成。siRNA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和荧光定量PCR试剂SYBR[®] Premix Ex Taq[™]均购自TaKaRa公司。BrdU标记及检测试剂盒Roche BrdU Labeling and Detection Kit I购自Roche公司。磷酸化组蛋白3抗体Phosphohistone-H3 antibody、GAPDH多克隆抗体和HRP标记的羊抗兔二抗购自Cell Signaling公司。兔抗人*PRR11*多克隆抗体购自Abcam公司。Super Singal West Dura发光试剂盒购自Thermo Scientific公司。驴抗鼠荧光标记二抗Donkey Anti-Mouse Alexa Fluor[®] 488购自Invitrogen公司。细胞核染色试剂DAPI(4',6-diamidino-2-

phenylindole)购自Sigma公司。100 mmol/L的dNTPs购自Invitrogen公司。24孔板细胞爬片盖玻片购自Fisher公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 H1299细胞采用RMPI 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,使用0.25%的胰蛋白酶消化进行细胞传代。

1.2.2 siRNA设计 *PRR11*进行RNAi所使用的siRNA序列参照^[5],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NC 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 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H1299细胞,以约1.0×10⁵/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。其中,siRNA用量为3×10⁻⁵ μmol/孔,设置*PRR11* siRNA组和阴性对照NC siRNA组。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H1299细胞,以约2.0×10⁴/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。其中,siRNA用量为7.5×10⁻⁶ μmol/孔,设置*PRR11* siRNA组和阴性对照NC siRNA组。转染48 h后,进行免疫荧光检测。

1.2.4 dNTPs处理 用于流式细胞检测和免疫荧光分析的细胞,转染siRNA 0 h同时在细胞培养基中分别添加4种脱氧核糖核苷酸混合物(deoxyribonucleotide triphosphates, dNTPs),设置4种不同浓度梯度,终浓度分别为0, 1, 500 μmol/mL和20 mmol/mL。

1.2.5 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。并使用PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit进行反转录。

1.2.6 定量PCR检测 采用荧光试剂SYBR[®] Premix Ex Taq[™]进行定量PCR检测,用于荧光定量PCR

引物为: *PRR11*上游 5'-GAC TTC CAA AGC TGT GCT TCC-3', *PRR11*下游 5'-CTG CAT GGG TCC ATC CTT TTT-3'; *GAPDH*上游 5'-ACC TGA CCT GCC GTC TAG AA-3', *GAPDH*下游 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'。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 $^{\circ}$ C预变性10 s; 94 $^{\circ}$ C变性5 s, 60 $^{\circ}$ C退火15 s, 72 $^{\circ}$ C延伸45 s, 共40个循环; 最后72 $^{\circ}$ C 10 min。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析定量PCR的结果。

1.2.7 蛋白提取和Western blot 收集细胞用1 $\times$ PBS清洗两次, SDS细胞裂解液在冰上裂解30 min。14 000 r/min于4 $^{\circ}$ C离心10 min, 收上清液, 采用BCA法测定蛋白浓度。采用10% SDS-PAGE分离胶电泳分离变性后的20 μ g细胞总蛋白, 使用湿转方法将蛋白转移至PVDF膜, 电转后的膜在5%脱脂奶粉中室温封闭1 h。使用抗PRR11多克隆抗体稀释液(1:1 000稀释)中4 $^{\circ}$ C孵育过夜, PBS清洗, 然后使用HRP标记的羊抗兔二抗稀释液(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, X胶片曝光。以GAPDH作为内参蛋白, 使用GAPDH兔多抗(1:2 000稀释)作为一抗。

1.2.8 流式细胞检测 流式细胞检测*PRR11*敲减后添加不同浓度dNTPs后细胞周期变化。转染后48 h细胞弃上清, PBS洗1次, 0.25%胰酶消化制成细胞悬液, 收集的细胞离心后弃上清, PBS洗涤2次, 1 000 r/min离心5 min; 再加1 mL PBS使细胞重悬, 边振荡边滴入预冷的无水乙醇2 mL, 4 $^{\circ}$ C冷藏过夜。调整细胞浓度至 1×10^5 /mL, 然后再低速离心10 min, PBS洗涤后重悬细胞, 在剩余的0.5 mL细胞悬液中加入0.5 mL PI染液(终浓度为20 μ g/mL)对DNA进行染色, 37 $^{\circ}$ C培养箱中, 避光孵育30 min, PBS洗涤2次, 流式细胞仪检测分析H1299细胞在各细胞周期(G_1 、S、 G_2 /M)所占比例, 每组检测10 000个细胞。

1.2.9 免疫荧光检测 Brdu标记及检测参照Roche说明书进行: siRNA处理细胞48 h后添加Brdu标记细胞30 min, 70%乙醇4 $^{\circ}$ C固定细胞, 使用鼠抗Brdu单克隆抗体在培养箱中37 $^{\circ}$ C孵育30 min, PBS清洗, 37 $^{\circ}$ C下使用Alexa 488标记驴抗鼠二抗(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。pHH3标记: siRNA处理细胞48 h后, PBS清洗细胞, 4% PFA室温固定10 min, PBS清洗细胞, 37 $^{\circ}$ C封闭液对

细胞进行封闭1 h(封闭液配方: PBS液中驴血清10%, BSA 5%), 抗pHH3鼠单克隆抗体1:200稀释, 在培养箱中37 $^{\circ}$ C孵育1 h, 然后使用PBS清洗细胞, 37 $^{\circ}$ C下使用Alexa 488标记驴抗鼠二抗(1:1 000稀释)避光孵育1 h, 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。

1.2.10 数据统计 实验数据以mean $\pm$ S.D.形式表示, 显著性差异分析用SPSS 11.5软件进行, $P<0.01$ 表示差异极显著。

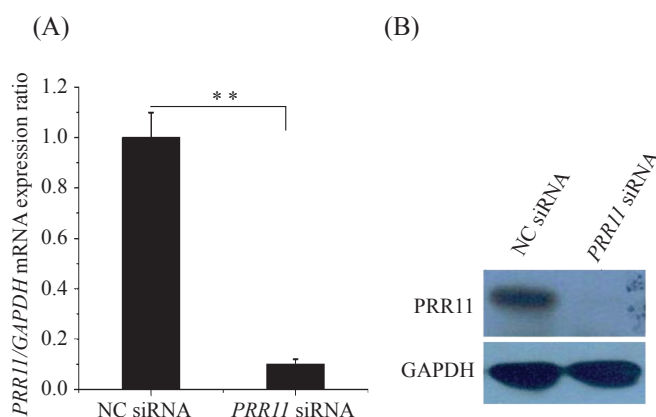
2 结果

2.1 *PRR11*基因敲减效率检测

H1299细胞瞬时转染siRNA 48 h后采用荧光定量PCR和Western blot分别检测*PRR11*的mRNA和蛋白水平的表达水平。结果显示, *PRR11* siRNA处理组中*PRR11*的mRNA和蛋白表达水平显著低于阴性对照NC siRNA组(图1)。表明本实验使用的*PRR11* siRNA能有效抑制细胞内源*PRR11*的表达。

2.2 *PRR11*基因敲减联合dNTPs处理对细胞周期进程的影响

我们的前期研究表明, 抑制*PRR11*表达可导致S期阻滞并且伴随有核糖核苷酸还原酶RRM1和RRM2表达下调^[5]。核糖核苷酸还原酶(ribonucleotide



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

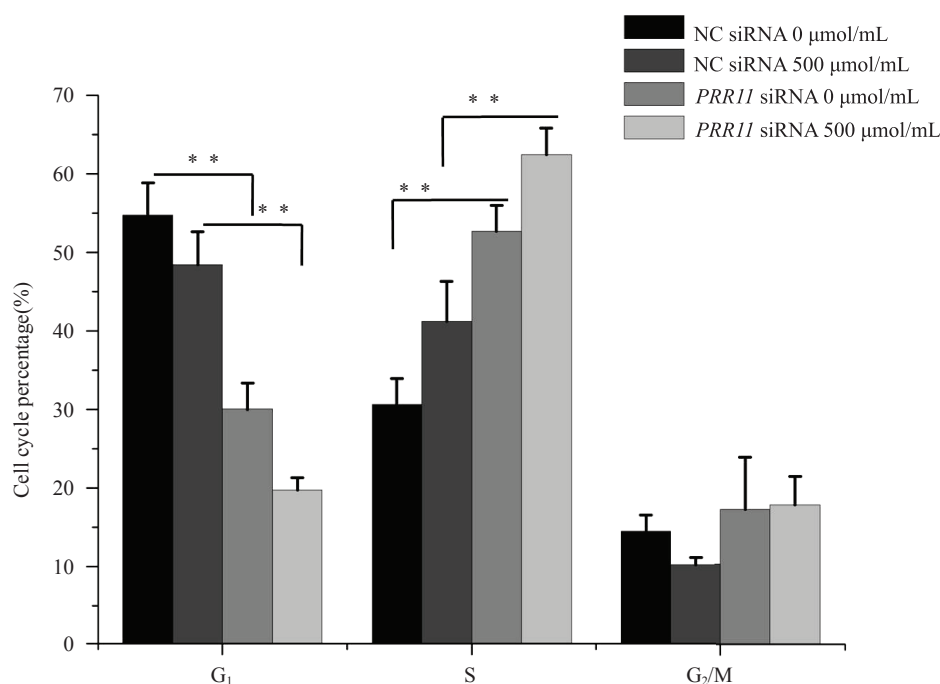
H1299 cells were transiently transfected with the negative control siRNA and *PRR11* siRNA, respectively. Total RNA and cell lysates were extracted 48 h after transfection and used to detect the expression of *PRR11* at both mRNA (A) and protein levels (B) by Real-time PCR and Western blot.

图1 H1299细胞中siRNA介导的*PRR11*敲减效率检测

Fig.1 The efficiency analysis of RNAi-mediated *PRR11* depletion in H1299

reductase, RNR)是细胞内合成脱氧核糖核苷酸的限速酶, RNR包括大小两个亚基, 大亚基(ribonucleotide reductase M1, RRM1)和小亚基(ribonucleotide reductase M2, RRM2); RNR的功能是催化dNTPs还原生成dNTPs, 后者是细胞内DNA合成的直接原料^[6-7]。因此, 我们通过在细胞培养基中添加dNTPs分析核糖核苷酸还原酶下调表达在*PRR11*敲减导致的S阻滞中的作用。H1299细胞中*PRR11*敲减后使用流式细胞进行检测, 结果显示, 当添加dNTPs浓度为0 $\mu\text{mol/mL}$ 时, *PRR11*敲减组中各时相细胞所占比例分别为: G₁期30.04% $\pm$ 3.34%、S期52.71% $\pm$ 3.26%、G₂/M期17.24% $\pm$ 6.59%, 而对照组中各时相细胞所占比例分别为: G₁期54.78% $\pm$ 4.07%、S期30.70% $\pm$ 3.26%、G₂/M期14.51% $\pm$ 2.05%。而添加1 $\mu\text{mol/mL}$ dNTPs组与添加0 $\mu\text{mol/mL}$ dNTPs组的流式细胞检测结果无显著性差异(数据未显示)。流式细胞检测结果表明, 在细胞培养基中添加低浓度dNTPs(0, 1 $\mu\text{mol/mL}$)条件下, 与对照组细胞相比, *PRR11*敲减组中G₁期细胞

减少, S期细胞数目增加, 而G₂/M期细胞数量无显著变化, 表明*PRR11*敲减后导致细胞被阻滞在S期。但是添加高浓度dNTPs(500 $\mu\text{mol/mL}$)时流式细胞检测结果显示, 对照NC siRNA组中各时相细胞所占比例为: G₁期48.47% $\pm$ 4.17%, S期41.27% $\pm$ 5.02%, G₂/M期10.25% $\pm$ 0.88%, 与添加0 $\mu\text{mol/mL}$ 浓度dNTPs组无显著性差异; 但是*PRR11*敲减组细胞中, G₁期细胞比率为19.78% $\pm$ 1.55%, 显著少于添加500 $\mu\text{mol/mL}$ dNTPs处理的对照组中G₁期细胞, 而S期细胞比率为62.46% $\pm$ 3.34%, 显著高于对照组S期细胞, G₂/M期细胞为17.76% $\pm$ 3.67%, 与对照组相比仍然无显著性差异(图2)。细胞中添加20 mmol/mL dNTPs流式细胞检测数据与500 $\mu\text{mol/mL}$ 组数据无显著性差异, 因此数据未展示。这些结果表明, 在对照NC siRNA处理组细胞中添加500 $\mu\text{mol/mL}$ 或20 mmol/mL浓度的dNTPs对肺癌细胞的细胞周期无显著影响。而在*PRR11*敲减组细胞中添加500 $\mu\text{mol/mL}$ 或20 mmol/mL浓度的dNTPs后, 细胞仍然呈现S期积累; 因此, 利用



H1299细胞瞬时转染阴性对照NC siRNA和*PRR11* siRNA, 并在细胞培养基中添加0 $\mu\text{mol/mL}$ 和500 $\mu\text{mol/mL}$ 浓度的dNTPs, 转染后48 h收集细胞并进行流式细胞检测, ** $P < 0.01$ 。

H1299 cells were transiently transfected with the negative control NC siRNA and *PRR11* siRNA. And at the same time, 0 $\mu\text{mol/mL}$ and 500 $\mu\text{mol/mL}$ dNTPs was added in the cell culture medium, respectively. The cells were treated 48 h after transfection and used to detect cell cycle by FCM, ** $P < 0.01$.

图2 流式细胞检测*PRR11*敲减后细胞周期变化

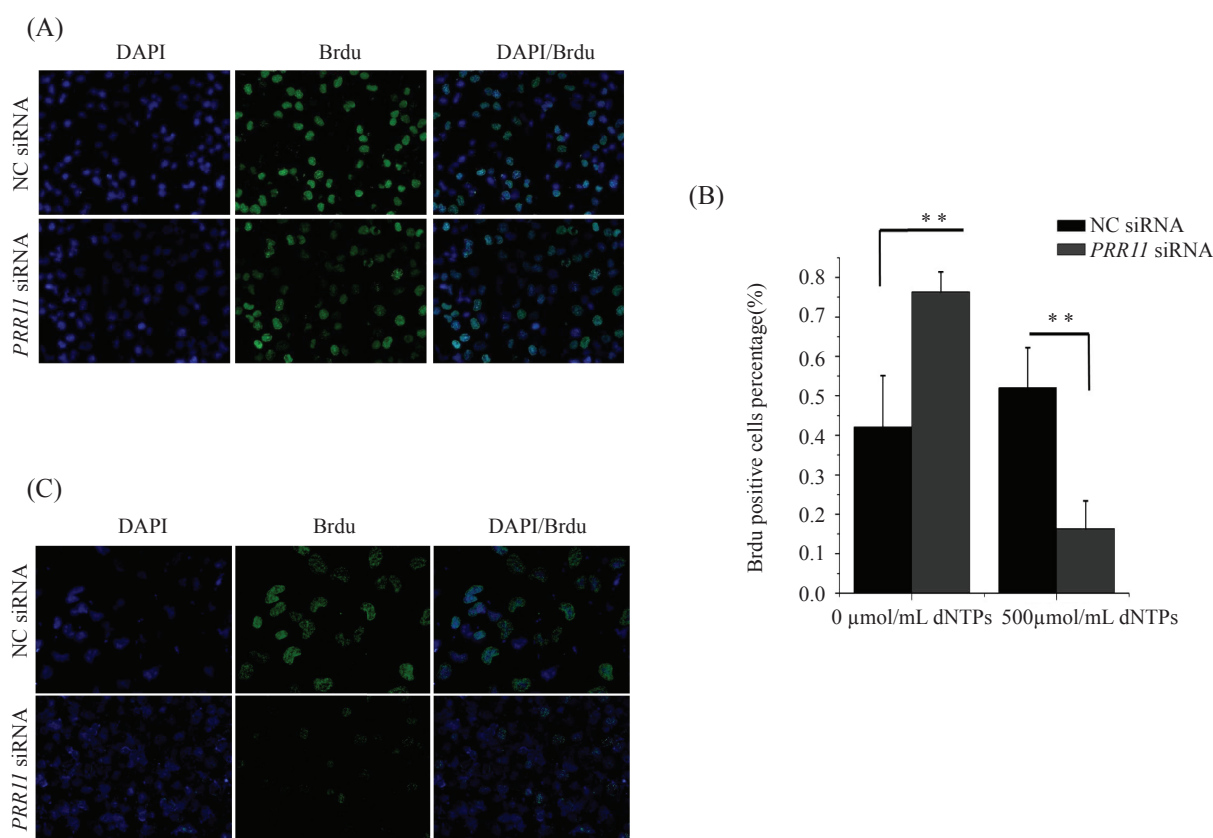
Fig.2 Cell cycle analysis of *PRR11* knock down in H1299 by FCM

流式细胞检测结果表明, 联合dNTPs处理不能解除PRR11敲减导致的细胞S期阻滞。

2.3 PRR11基因敲减联合dNTPs处理对DNA合成的影响

流式细胞仪分析细胞周期是通过测定细胞相对DNA含量而获得。因此, 通过流式细胞检测能够获得细胞在细胞周期过程中所处时相, 对于正常培养细胞流式检测处于S期的细胞则认为正在进行DNA合成; 而siRNA或其他药物处理可能抑制DNA合成, 在某一时间点使用流式细胞对细胞相对DNA含量进行分析, 能够获得S细胞的比率, 但是不能确定这些S期细胞是否进行DNA合成。肺癌细胞H1299中PRR11

敲减后流式细胞检测结果显示, 细胞周期被阻滞在S期, 即相对DNA含量介于2倍体~4倍体间的细胞数量增加; 为了检测PRR11敲减后导致RRM1和RRM2下调表达对细胞DNA合成的影响, 我们使用BrdU标记方法分析具有DNA合成活性的细胞。免疫荧光检测结果表明, 添加0 $\mu\text{mol/mL}$ dNTPs的PRR11敲减组细胞中BrdU标记阳性细胞为76.33% $\pm$ 5.07%, 显著高于对照组中BrdU阳性细胞42.05% $\pm$ 13.13%, 但是PRR11敲减组中BrdU阳性细胞荧光强度与对照组相比明显减弱(图3)。这表明, PRR11敲减后阻滞细胞周期正常进行, 导致细胞在积累S期; 并且BrdU孵育时间相同情况下, PRR11敲减组细胞与对照组相比检测到BrdU荧光信



H1299细胞瞬时转染NC siRNA和PRR11 siRNA, 同时在培养基中添加0 $\mu\text{mol/mL}$ dNTPs和500 $\mu\text{mol/mL}$ dNTPs, 转染后48 h孵育BrdU并进行免疫荧光检测。A: 添加0 $\mu\text{mol/mL}$ dNTPs组细胞BrdU标记后免疫荧光检测结果(200 $\times$), 绿色表示BrdU阳性细胞, 蓝色为DAPI染色; B: BrdU阳性细胞数量统计分析结果, $**P<0.01$; C: 添加500 $\mu\text{mol/mL}$ dNTP组细胞BrdU标记后免疫荧光检测结果, 绿色表示BrdU阳性细胞, 蓝色为DAPI染色(400 $\times$)。

H1299 cells were transiently transfected with NC siRNA and PRR11 siRNA. At the same time, 0 $\mu\text{mol/mL}$ dNTPs and 500 $\mu\text{mol/mL}$ dNTPs was added in the cell culture medium, respectively. The DNA sythesis were detected by BrdU labelling after transfection 48 h. A: the IF straining results of 0 $\mu\text{mol/mL}$ dNTPs treatment group(200 $\times$), green indicated BrdU positive cells, blue indicated DAPI staining; B: statistical analysis of BrdU positive cells, $**P<0.01$; C: the IF straining results of 0 $\mu\text{mol/mL}$ dNTPs treatment group(400 $\times$), the green indicated BrdU positive cells, blue indicated DAPI staining.

图3 dNTPs处理后BrdU标记细胞DNA合成情况
Fig.3 BrdU labelling cells DNA sythesis by adding dNTPs

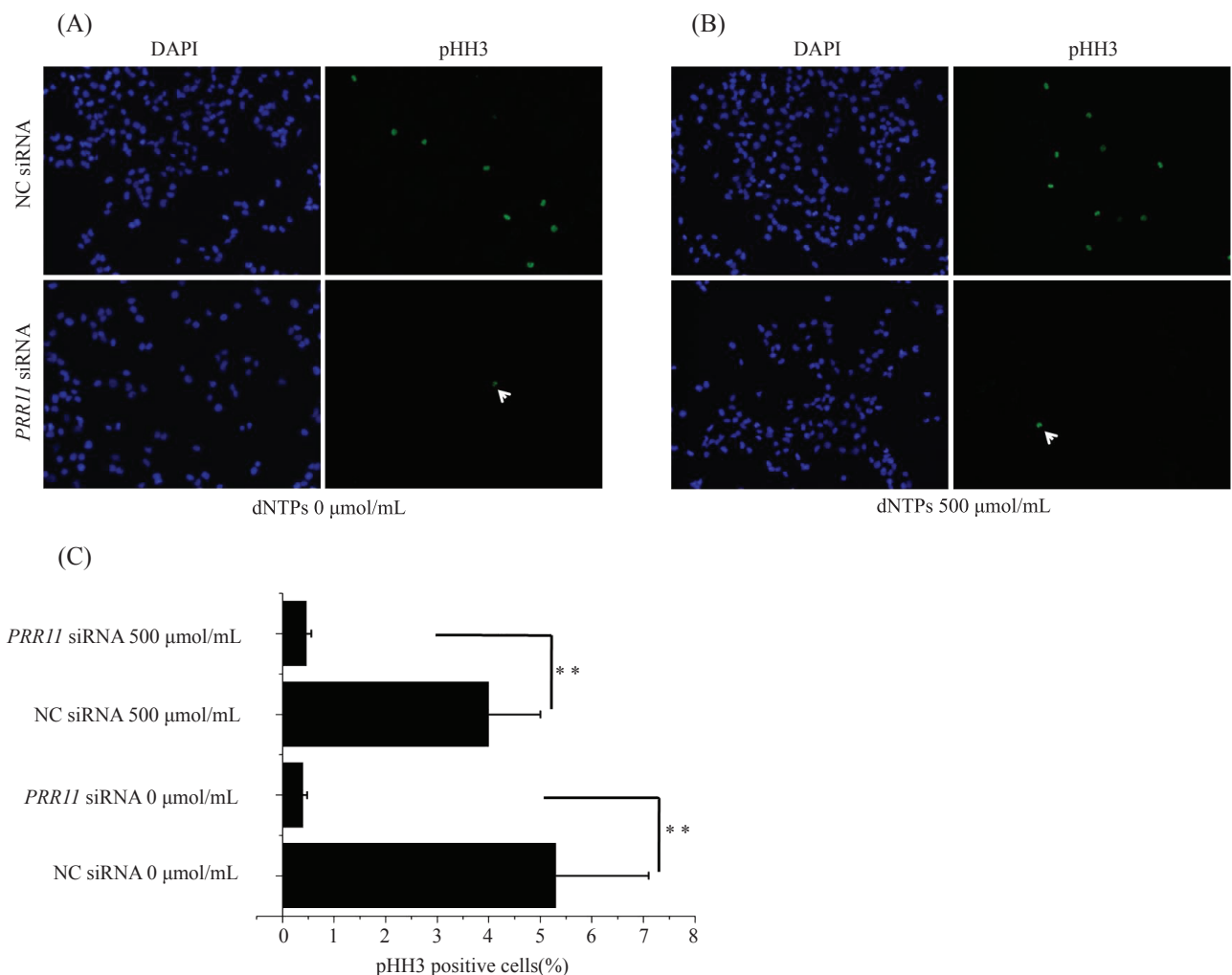
号强度减弱,即单位时间嵌合进入DNA中的BrdU量减少,因此,*PRR11*敲减后会影DNA合成速率。

H1299细胞*PRR11*敲减后联合500 $\mu\text{mol/mL}$ dNTPs处理后流式细胞检测结果显示,细胞仍然呈现S期阻滞。为了分析*PRR11*敲减后500 $\mu\text{mol/mL}$ dNTPs处理48 h后细胞DNA合成情况,我们通过BrdU标记检测细胞DNA合成。免疫荧光检测结果表明,添加500 $\mu\text{mol/mL}$ dNTPs的*PRR11*敲减组细胞中BrdU标记阳性率为 $16.33\% \pm 7.07\%$,显著低于对照NC siRNA处理组细胞BrdU标记阳性率 $52.05\% \pm 10.12\%$

和添加0 $\mu\text{mol/mL}$ dNTPs的*PRR11*敲减组的BrdU阳性细胞,并且添加500 $\mu\text{mol/mL}$ dNTPs的*PRR11*敲减组细胞中BrdU阳性细胞信号强度非常弱(图3)。这些研究结果表明,500 $\mu\text{mol/mL}$ dNTPs处理后*PRR11*敲减组细胞与对照组相比,虽然流式细胞检测结果表明处于S期的细胞数量增加,但是BrdU标记结果说明具有DNA合成活性的细胞数目显著减少,即DNA合成受到抑制。

2.4 *PRR11*基因敲减对细胞有丝分裂的影响

流式细胞检测结果显示,肺癌细胞H1299中



H1299细胞瞬时转染阴性对照NC siRNA和*PRR11* siRNA,同时在培养基中添加0 $\mu\text{mol/mL}$ 和500 $\mu\text{mol/mL}$ dNTPs,转染后48 h免疫荧光检测pHH3的表达。A、B: 分别添加dNTPs 0 $\mu\text{mol/mL}$ 和500 $\mu\text{mol/mL}$ 细胞免疫荧光检测结果,绿色为pHH3阳性细胞,蓝色为DAPI染色,白色箭头所示为pHH3阳性细胞; C: 统计分析pHH3阳性细胞数量。

H1299 cells were transiently transfected with NC siRNA and *PRR11* siRNA. At the same time, cells were treated with 0 $\mu\text{mol/mL}$ and 500 $\mu\text{mol/mL}$ dNTPs, respectively. DNA sythensis was labelled by BrdU after transfection 48 h. A,B: the IF straining results of 0 $\mu\text{mol/mL}$ and 500 $\mu\text{mol/mL}$ dNTPs treated groups, respectively. The green indicated pHH3 positive cells, blue indicated DAPI staining, and white arrow indicated the pHH3 positive cell; C: statistical analysis of BrdU positive cells.

图4 免疫荧光pHH3标记结果(100 $\times$)

Fig.4 The results of pHH3 labelling by IF(100 $\times$)

*PRR11*敲减后无论是否添加dNTPs, G₂/M期细胞比率与对照组相比均无显著差异, 但是流式细胞检测无法对G₂期与M期细胞进行区分。因此, 为了检测*PRR11*敲减后是否对细胞有丝分裂产生影响, 我们使用分裂期标志蛋白pHH3对添加0 μmol/mL和500 μmol/mL dNTPs处理的H1299细胞分别进行免疫荧光检测, 结果显示*PRR11*敲减后添加0 μmol/mL和500 μmol/mL dNTPs处理组的pHH3阳性细胞比率分别为0.4%±0.08%和0.46%±0.1%, 而对照NC siRNA细胞添加0 μmol/mL和500 μmol/mL dNTPs处理组pHH3阳性细胞比率分别为5.3%±1.8%和4.08%±1.03%; *PRR11*敲减后无论是否添加dNTPs pHH3阳性细胞与对照组相比均显著减少(图4)。该结果表明, 抑制*PRR11*表达可导致细胞不能进入有丝分裂, 从而被阻滞于G₂期。

3 讨论

*PRR11*基因是本课题组前期研究中发现的一个新的肿瘤相关基因。研究结果表明, 在肺癌细胞中敲减*PRR11*后引起细胞S期阻滞导致细胞增殖减缓, 并且抑制细胞的迁移及体内成瘤; 基因芯片分析结果显示, 肺癌细胞中*PRR11*敲减引起参与细胞周期调控、肿瘤发生和代谢途径等多个关键通路基因表达失调^[5,8]。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。

*PRR11*敲减后对细胞周期最显著的影响为阻滞细胞在S期, 而基因组DNA复制是细胞周期过程中S期最主要的事件。研究表明, 多种蛋白的异常表达导致DNA复制紊乱, 如CyclinE和CyclinA等S期调控蛋白^[9], 或是MCM2-7和PCNA等直接参与DNA复制的蛋白表达下调均会抑制DNA合成, 导致细胞周期呈现S期阻滞^[10-12]; 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路是广泛存在于各种细胞中的一条信号转导途径, 由一组级联活化的丝/苏氨酸蛋白激酶组成, 对于细胞周期的运行和基因表达具有重要调控作用^[13]。*PRR11*敲减后的基因芯片数据表明, 除MAPK信号通路中的多个基因均下调表达外, 细胞中负责合成dNTPs的RNR两个亚基RRM1和RRM2的mRNA表达也分别下调^[5]。研究表明, 细胞中四种脱氧核

糖核苷酸浓度为(2~80)×10⁻⁶ μmol /10⁶细胞, 在细胞周期的G₁期浓度较低, 而在S期浓度最高^[14-15]。RNR在细胞中表达下调导致细胞中dNTPs库浓度下调或是4种dNTPs的平衡被破坏, 而抑制DNA复制及损失修复, 从而引发S期阻滞及基因突变^[16-18]。

通过在细胞培养基中添加不同浓度的dNTPs处理并进行流式细胞和免疫荧光检测, 分析*PRR11*敲减后H1299细胞中RRM1和RRM2表达下调与细胞S期阻滞的关系。流式细胞检测结果显示, 添加dNTPs不能解除*PRR11*敲减引起的细胞S期阻滞。利用BrdU标记研究结果表明, 在不添加dNTPs(0 μmol/mL)处理细胞中, *PRR11*敲减后DNA复制细胞数量增加, 与*PRR11*敲减后流式细胞检测结果S期阻滞一致; 但是在高浓度dNTPs(500 μmol/mL)的条件下, *PRR11*敲减后DNA合成受到抑制。添加高浓度dNTPs条件下*PRR11*敲减后BrdU标记结果与流式细胞检测存在差异, 说明在高浓度dNTPs存在条件下*PRR11*敲减后48 h细胞的DNA合成被抑制, 因此细胞不能够完成S期进程, 直接导致细胞周期在S期被阻止。我们推测导致种现象出现的原因是在不添加dNTPs的条件下, H1299细胞*PRR11*敲减后下调脱氧核糖核酸合成的关键酶RNR表达是导致细胞S期阻滞的因素之一, 细胞内dNTPs的不足引起细胞DNA合成受阻而积累在S期, 因此流式细胞检测和BrdU标记都能检测到细胞被阻滞在S期。培养基中存在高浓度dNTPs条件能够挽救*PRR11*敲减导致RNR下调引起的内源性dNTPs合成不足, 然而*PRR11*敲减同时也通过其他途径阻止细胞S正常进行, 所有流式细胞检测S期细胞增加, 但是BrdU标记显示进行DNA合成的细胞数量减少。综合这些数据我们推测, 肺癌细胞中*PRR11*敲减引起RNR表达下调导致dNTPs库浓度下调, 是导致细胞S期阻滞的原因之一, 但是*PRR11*同时还通过其他途径调控S期的进行。而芯片数据表明, *PRR11*敲减后MAPK信号通路中多个基因表达下调, 已有研究结果表明MAPK通路对于调控S期的正常进行起着关键作用^[13,19-20]。推测*PRR11*敲减导致的细胞周期阻滞涉及多方面的原因, MAPK的异常可能是导致S期阻滞的关键因素, 但是解析具体分子机制还有待于更深入的研究。

流式细胞检测及BrdU标记结果表明, *PRR11*敲减后导致细胞被阻止在S期, 但是G₂/M期细胞含量

无显著变化, 暗示 $PRR11$ 敲减后对 G_2/M 期也会产生阻滞作用, 才会导致流式细胞检测 G_2/M 期细胞数量无明显变化。为了探明 $PRR11$ 敲减后是否对细胞的 G_2/M 期产生影响, 我们利用细胞有丝分裂的M期特异标记物pHH3对分裂期细胞进行标记。虽然H1299细胞 $PRR11$ 敲减后流式细胞仪检测 G_2/M 期无明显变化, 但是免疫荧光检测结果显示 $PRR11$ 敲减后无论是否添加dNTPs处理pHH3阳性细胞与对照组细胞比显著减少, 表明 $PRR11$ 敲减后处于分裂期的细胞减少。根据这些结果我们推测, $PRR11$ 敲减后导致细胞被阻滞在 G_2 期, 而不能进入M期, 即细胞不能正常进入有丝分裂过程。

综上所述, 本研究综合利用流式细胞仪和免疫荧光方法探讨 $PRR11$ 在细胞周期调控中的作用, 阐明 $PRR11$ 在整个细胞周期进程都执行相关功能, $PRR11$ 敲减后抑制细胞DNA合成和有丝分裂; 而 $PRR11$ 调控S期进程可能牵涉多个通路, 并且MAPK信号通路可能起着关键作用。因此, 我们将在后续工作中集中于 $PRR11$ 与MAPK信号通路对S期调控的分子机制研究, 深入探索 $PRR11$ 参与细胞周期调控及在肺癌发生发展的分子机制。

参考文献 (References)

- Bell SP, Dutta A. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 2002; 71: 333-74.
- Woo RA, Poon RY. Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells. *Cell Cycle* 2003; 2(4): 316-24.
- Bartek J, Lukas C, Lukas J. Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5(10): 792-804.
- Nojima H. G1 and S-phase checkpoints, chromosome instability, and cancer. *Methods Mol Biol* 2004; 280: 3-49.
- Ji Y, Xie M, Lan H, Zhang Y, Long Y, Weng H, *et al.* $PRR11$ is a novel gene implicated in cell cycle progression and lung cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45(3): 645-56.
- Bjorklund S, Hjortsberg K, Johansson E, Thelander L. Structure and promoter characterization of the gene encoding the large subunit (R1 protein) of mouse ribonucleotide reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(23): 11322-6.
- Johansson E, Hjortsberg K, Thelander L. Two YY-1-binding proximal elements regulate the promoter strength of the TATA-less mouse ribonucleotide reductase R1 gene. *J Biol Chem* 1998; 273(45): 29816-21.
- 龙银江, 吉颖, 翁华莉, 张春冬, 谢濛宇, 蔡伟, 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. *中国细胞生物学报*(Long Yinjiang, Ji Ying, Weng Huali, Zhang Chundong, Xie Mengyu, Cai Wei, *et al.* Analysis of gene expression profile changes responding to siRNA-mediated $PRR11$ depletion in lung cancer H1299 cells. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2013; 35(2): 196-202.
- Coverley D, Laman H, Laskey RA. Distinct roles for cyclins E and A during DNA replication complex assembly and activation. *Nat Cell Biol* 2002; 4(7): 523-8.
- Beattie TR, Bell SD. Molecular machines in archaeal DNA replication. *Curr Opin Chem Biol* 2011; 15(5): 614-9.
- Li J, Deng M, Wei Q, Liu T, Tong X, Ye X. Phosphorylation of MCM3 protein by cyclin E/cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) regulates its function in cell cycle. *J Biol Chem* 2011; 286(46): 39776-85.
- Strzalka W, Ziemienowicz A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): A key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Ann Bot* 2011; 107(7): 1127-40.
- Guegan JP, Fremin C, Baffet G. The MAPK MEK1/2-ERK1/2 pathway and its implication in hepatocyte cell cycle control. *Int J Hepatol* 2012; 2012: 328372.
- Wilson PM, Labonte MJ, Russell J, Louie S, Ghobrial AA, Ladner RD. A novel fluorescence-based assay for the rapid detection and quantification of cellular deoxyribonucleoside triphosphates. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(17): e112.
- Horowitz RW, Zhang H, Schwartz EL, Ladner RD, Wadler S. Measurement of deoxyuridine triphosphate and thymidine triphosphate in the extracts of thymidylate synthase-inhibited cells using a modified DNA polymerase assay. *Biochem Pharmacol* 1997; 54(5): 635-8.
- Cayrol C, Lacroix C, Mathe C, Ecochard V, Ceribelli M, Loreau E, *et al.* The THAP-zinc finger protein THAP1 regulates endothelial cell proliferation through modulation of pRB/E2F cell-cycle target genes. *Blood* 2007; 109(2): 584-94.
- Zheng Z, Chen T, Li X, Haura E, Sharma A, Bepler G. DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer. *N Engl J Med* 2007; 356(8): 800-8.
- D'Angiolella V, Donato V, Forrester FM, Jeong YT, Pellacani C, Kudo Y, *et al.* Cyclin F-mediated degradation of ribonucleotide reductase M2 controls genome integrity and DNA repair. *Cell* 2012; 149(5): 1023-34.
- Sun Y, Tang S, Jin X, Zhang C, Zhao W, Xiao X. Involvement of the p38 MAPK signaling pathway in S-phase cell-cycle arrest induced by Furazolidone in human hepatoma G_2 cells. *J Appl Toxicol* 2012; doi: 10.1002/jat.2829.
- Zhang Z, He H, Chen F, Huang C, Shi X. MAPKs mediate S phase arrest induced by vanadate through a p53-dependent pathway in mouse epidermal C141 cells. *Chem Res Toxicol* 2002; 15(7): 950-6.