

· 论 著 ·

miRNA-17-5p 靶向调节 CDKN1A 对鼻咽癌细胞增殖的影响

王雯珺¹, 郭敏章¹, 列璞怡¹, 伍思培²

1. 广州医科大学第一附属医院呼吸疾病国家重点实验室 转化医学实验室, 广东 广州 510120;

2. 广东省人民医院肿瘤中心 广东省医学科学院 广东省肺癌研究所, 广东 广州 510080

摘要: 目的 研究微小核糖核酸 (microRNA-5p, miR)-17-5p 通过靶向调节细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 1A (CDKN1A) 对鼻咽癌细胞株 CNE2 增殖的影响。方法 将 miR-17-5p 模拟物 (mimics) 转染人鼻咽癌细胞系 CNE2, 使用定量逆转录-聚合酶链反应 (qRT-PCR) 和 Western blot 检测 miR-17-5p 对 CDKN1A 的影响; 生物信息学预测 miR-17-5p 是否有 CDKN1A 的结合位点; 荧光素酶实验检测 miR-17-5p 是否可靶向调节 CDKN1A; 通过 Western blot 和克隆形成实验验证 miR-17-5p 可否通过调节 CDKN1A 影响鼻咽癌细胞株 CNE2 的增殖。结果 Western blot 和 qRT-PCR 实验显示, 在蛋白水平和 mRNA 水平与对照组相比, 过表达 miR-17-5p 可降低 CDKN1A 的表达 ($P < 0.01$); Target scan 靶基因预测软件分析发现, 在 CDKN1A 的 3'UTR 有两处 miR-17-5p 的结合位点; 荧光素酶检测结果证实 miR-17-5p 可特异性的作用于这两个位点; 克隆形成实验显示, Western blot 和 qRT-PCR 实验显示, 在蛋白水平和 mRNA 水平, 过表达 miR-17-5p 可显著提高 CNE2 细胞的克隆形成率 ($P < 0.05$), 同时过表达 miR-17-5p 和 CDKN1A, 则抵消了 miR-17-5p 对细胞增殖的影响 ($P < 0.05$)。结论 CDKN1A 是 miR-17-5p 的靶基因, miR-17-5p 通过靶向性抑制 CDKN1A 的表达可促进鼻咽癌细胞的增殖。

关键词: 鼻咽癌; 细胞增殖; 微小核糖核酸-17-5p; 细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 1A; 靶基因; 结合位点; 克隆形成

中图分类号: R 739.6 R-33 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2016)02-0149-04

Effect of miRNA-17-5p on the proliferation of nasopharyngeal carcinoma cells through targeting CDKN1A

WANG Wen-jun*, GUO Min-zhang, LIE Pu-yi, WU Si-pei

* Key Laboratory of National Respiratory Diseases, First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120, China

Corresponding author: WU Si-pei, E-mail: wusipei520@aliyun.com

Abstract: Objective To investigate the impact of micro RNA (miR)-17-5p on proliferation of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE2 cells through targeting cell cyclin-depedent kinase inhibitors 1A (CDKN1A). **Methods** The CNE2 cells were cultured in vitro, and miR-17-5p mimics were transferred to CNE2 cells. The quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot method were used to detect the effect of miR-17-5p on CDKN1A expression. The bioinformatics was used to predict whether the miR-17-5p existed sites binding with CDKN1A. Luciferase experiment was used to detect whether the miR-17-5p can target CDKN1A. Western blot method and clone forming test were used to validate whether the miR-17-5p can influence the proliferation of CNE2 cells through regulating CDKN1A. **Results** Western blot method for protein level and qRT-PCR assay for mRNA showed that over-expression of MiR-17-5p can obviously low-regulate the expression of CDKN1A ($P < 0.01$). Target gene prediction software analysis found that there were two sites binding with miR-17-5p in 3'UTR region of CDKN1A, and the result of luciferase detection validated that miR-17-5p can specifically act on the two site. The result of clone forming test showed that the over-expression of miR-17-5p can significantly increase the clone forming rate of CNE2 cells ($P < 0.05$). The effect of miR-17-5p on cell proliferation was counteracted by simultaneous overexpression of miR-17-5p and CDKN1A ($P < 0.05$). **Conclusions** CDKN1A is a target

gene of miR-17-5p, and miR-17-5p can promote the proliferation of nasopharyngeal carcinoma cells by targeted-inhibiting CDKN1A expression.

Key words: Nasopharyngeal carcinoma; Cell proliferation; Micro ribonucleic acid-17-5p; Cell cyclin-depedent kinase inhibitors 1A; Target gene; Binding site; Clone formation

微小核糖核酸 (microRNA, miRNA) 是一种长度约 20~24 对碱基的非编码单链 RNA, 通常是通过结合 mRNA 的 3'-UTR 区形成互补序列, 调控基因转录后的表达^[1]。miRNA 能够调控的靶基因很多, 这些靶基因包括转录因子、信号通路蛋白、代谢相关的酶等, 它们在生命体的演化过程中具有重要作用, miRNA 通过与靶基因组成复杂的调控网络, 调节细胞的一些基本功能, 引起各种不同的疾病, 所以 miRNA 也可作为癌基因或抑癌基因, 成为肿瘤生物标记物, 作为潜在的治疗靶点^[2]。miR-17-92 家族编码 miR-17-5p、miR-17-3p、miR-18a、miR-19a、miR-20a、miR-19b-1、miR-92-1 等 7 个 miRNA, 已有报道 miR-17-5p 在多种肿瘤中过表达, 通过影响细胞周期诱导肿瘤的发生^[3]。细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 1A (cyclin-depedent kinase inhibitors 1A, CDKN1A) 是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 (CDKI) 家族成员之一, 是细胞周期负性调控因子, 可以作为细胞 G1 期的检验点^[4]。本研究重点探讨 miR-17-5p 靶向调节 CDKN1A 对鼻咽癌细胞增殖的影响, 并为研究 miR-17-5p 在鼻咽癌分化中的作用机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 人鼻咽癌细胞系 CNE2 来自南方医科大学肿瘤研究所; RPMI-1640 培养基 (Gibco, USA)、胎牛血清 (HyClone, Australia); miR-17-5p 模拟物 (miR10000070-1-2)、miRNA 模拟物 Negative Control (miR01201-1-5) 购自广州锐博公司; LipofectaminTM RNAiMAX (Invitrogen, USA), SYBR PrimeScript miRNA RT-PCR 检测试剂盒和 RNAiso Plus 提取试剂及 miR-17-5p 引物、U6 内参 (TaKaRa, 大连); anti-CDKN1A (Cell signaling technology, USA); 山羊抗鼠 IgG/辣根酶标记二抗 (Cell signaling technology, USA)。

1.2 细胞培养和转染 将 CNE2 细胞置于 37℃ 水中复苏, 在 RPMI-1640 中常规培养 [含 10% 胎牛血清 (FBS)], 培养条件为 37℃、5% CO₂。培养皿中细胞

的覆盖率达到 80%, 使用胰酶消化, 约每 3 天传代 1 次, 使用对数生长期的细胞进行试验。将 miR-17-5p 模拟物 (mimics) 转染人鼻咽癌细胞系 CNE2, 接种 1.0×10^5 细胞至含有 500 μ l 完全培养基的 24 孔板中, 使转染时密度达到 30%, 按照锐博说明书稀释 mimic, 制备混合液加入细胞培养基中, 在适当的条件下培养 48 h。

1.3 Western blotting 检测 采用 RIPA 裂解液提取待测样品的总蛋白, 根据蛋白含量绘制标准曲线, 配置 4% 浓缩胶和 10% 分离胶, 将电泳槽中加入足量电泳液上样, 电泳时间 1 h, 电压为 100 V。电泳至溴酚蓝刚跑出终止电泳, 进行转膜。100 mA 电转膜 2 h, 然后使用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。抗体稀释比例为: anti-CDKN1A 1:1 000, 山羊抗鼠二抗 1:5 000。使用增强化学发光显影。

1.4 克隆形成实验 采用克隆形成能力检测细胞增殖, 设立 miR-17-5p 组、CDKN1A 组、miR-17-5p 和 CDKN1A 共转染组等, 将不同组的细胞消化成单个细胞, 接种到 6 孔板中, 14 d 左右形成肉眼可见克隆, 弃去上清液, 用 PBS 浸洗 2 次。加 4% 多聚甲醛固定细胞约 15 min。加适量吉姆萨染液 10~30 min, 最后根据公式计算克隆形成率。克隆形成率 = (克隆数/接种细胞数) $\times$ 100%。

1.5 定量逆转录-聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测转染前后 miR-17-5p 的表达 收集转染后 48 h 各组细胞, Trizol 法提取细胞总 RNA, 用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 获得的 RNA 作为模板用于 RT-PCR 检测。然后按照 miRNA RT-PCR 检测试剂盒说明进行反转录和 RT-PCR 过程。各基因引物见表 1。

1.6 荧光素酶活性实验 双荧光素酶报告基因系统构建。通过 pGL4.13 荧光素酶质粒构建 pGL4.13-CDKN1A'UTR 报告基因载体, 并通过重叠延伸 PCR 删除 miR-17-5p 与 CDKN1A'UTR 直接结合位点, 构建 pGL4.13-CDKN1A'UTR-mut。扩增所用引物见表 1。

表 1 各基因引物序列

基因名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
GAPDH	AAC GGA TTT GGT CGT ATT G	GGA AGA TGG TGA TGG GAT T
U6	CTC GCT TCG GCA GCA CA	AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT
miR-17-5p	CCA GGA TCC TTT ATA GTT GTT AGA GTT TG	CGG AAT TCT AAT CTA CTT CAC TAT CTG CAC
CDKN1A	TGA TTA GCA GCG GAA CAA G	AAA CAG TCC AGG CCA GTA TG
CDKN1A-UTR	GCG GAT CCC TAA TCC GCC CAC AGG AAG	GCT CTA GAC AAG TAA AGT CAC TAA GAA TC
CDKN1A mutation 1	GAA GTA AAC AGA TGG CTT CTG	CAG AAG CCA TCT GTT TAC TTC
CDKN1A mutation 1	CTG GGG AGT TCA TTG CTT ATT G	CAA TAA GCA ATG AAC TCC CCA G

1.7 统计学处理 采用 Graphpad 5.0 软件进行统计分析。所有实验结果重复 3 次,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 q 检验,并绘制直条图。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

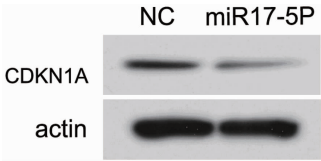
2 结果

2.1 miR-17-5p 负调控 CDKN1A 的表达 首先在 CNE2 细胞中从蛋白和 mRNA 水平检测过表达 miR-17-5p 对 CDKN1A 表达的影响,验证 CDKN1A 在鼻咽癌细胞内受 miR-17-5p 表达调控的情况。Western blot 和 qRT-PCR 实验显示,在蛋白水平和 mRNA 水平,过表达 miR-17-5p 可明显下调 CDKN1A 的表达(见图 1A、图 1B,图中 NC 表示未转染 miR-17-5p mimics),差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 miR-17-5p 特异靶向 CDKN1A 的 3'UTR 根据 Target scan 靶基因预测软件的分析,发现在 CDKN1A 的 3'UTR 有两处 miR-17-5p 的结合位点(图 2A),进一步构建了这两个位点的突变体,再与 miR-17-5p 慢病毒表达载体共转染 293T 细胞,荧光素酶检测结果证实 miR-17-5p 可特异性的作用于这两个位点(图 2B)。

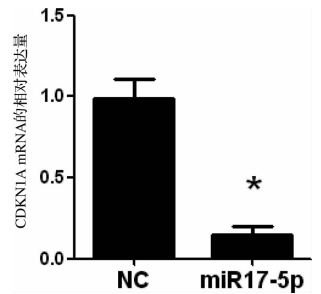
2.3 CDKN1A 的表达情况 为了进一步验证 miR-17-5p 通过调控 CDKN1A 的表达来影响鼻咽癌细胞的增殖能力,将携带 CDKN1A 的慢病毒感染鼻咽癌 CNE2 细胞,再使用 miR-17-5p minics 同时转染 CNE2 细胞;从而使 miR-17-5p 和 CDKN1A 同时在 CNE2 细胞上表达;Western Blot 实验检测结果见图 3。转染 miR-17-5p 后可见 CDKN1A 表达显著下降($P < 0.05$),过表达 CDKN1A 则显著提升了 CDKN1A 的表达水平($P < 0.05$);在 CNE2 细胞中同时过表达 miR-17-5p 和 CDKN1A,对 CDKN1A 的表达影响并不显著。

2.4 miR-17-5p 对 CNE2 细胞增殖的影响 与空白对照组相比,过表达 miR-17-5p 可显著提高 CNE2 细胞的克隆形成率($P < 0.05$),如果同时过表达 miR-17-5p 和 CDKN1A 则抵消了 miR-17-5p 对细胞增殖的影响($P < 0.05$)。见图 4。



注:actin 为内参对照。

图 1A Western blot 检测过表达 miR-17-5p 对 CDKN1A 的影响



注:与 NC 比较, * $P < 0.05$ 。

图 1B miR-17-5p 过表达后使用 qRT-PCR 检测 CDKN1A 的变化

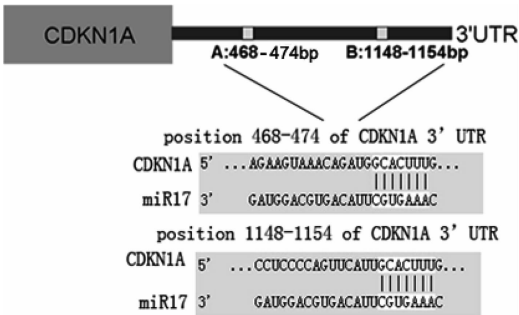
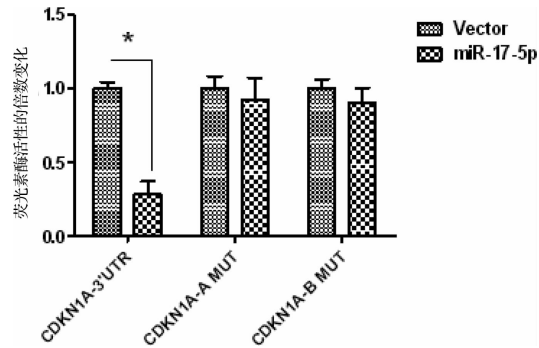


图 2A Target scan 软件预测 CDKN1A 为 miR-17-5p 靶基因



注:Vector 表示载体;与 Vector 比较, * $P < 0.05$ 。

图 2B miR-17-5p 直接靶定并且调控靶基因 CDKN1A 的表达

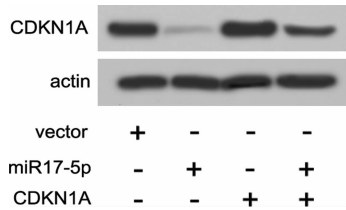
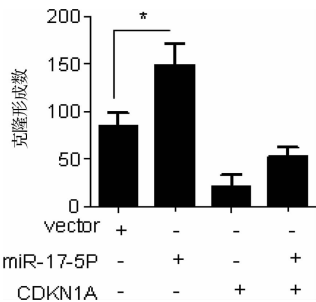


图 3 Western blot 检测 CDKN1A 的表达



注:与 Vector 比较, * $P < 0.05$ 。

图 4 克隆形成实验检测 miR-17-5p 对 CNE2 细胞增殖的影响

3 讨论

miRNA 是一类内源性 RNA 小分子,能在转录后水平调控基因的表达。研究发现,miRNA 功能主要是作为转录的抑制因子,通过抑制靶基因的蛋白表达发挥其生物学功能^[5]。miR-17-5p 是 miR-17-92 家族的主要成员之一,在肿瘤发生发展中有重要作用^[3],其在很多上皮细胞癌(如前列腺癌、肝癌、淋巴瘤)中表达增高^[6-8]。miR-17-5p 可通过促进细胞周期 G1 期向 S 期转化,抑制凋亡,促进卵巢癌细胞株的增殖;原癌基因酪氨酸蛋白激酶 YES1 基因是 miR-17-5p 的靶基因,敲除 YES1 可抑制 miR-17-5p 引起的细胞增殖^[9]。蛋白质组学和免疫印迹分析显示,miR-17-5p 可显著激活 p38,通过丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径引起热休克蛋白 27(HSP27)的磷酸化。转录因子 E2F1 下调 Wip1 可调节 miR-17-5p/p38/HSP27 信号通路的表达,影响肝细胞癌细胞的增殖和转移^[10]。CDKN1A 分子量约 18 000,是一个已明确功能的抑癌基因,在液体中,CDKN1A 是一种非结构蛋白,可根据目标蛋白的不同诱导多种构象,是细胞周期重要调控因子。CDKN1A 蛋白在细胞的许多代谢途径中起着重要的作用,如调节翻译后修饰(磷酸化和泛素化)、基因的转录、DNA 复制和修复等重要过程等。由 G1 期向 S 期的进展主要是受 G1 期的细胞周期蛋白调控,p21 通过与它们的 N-末端结构域结合,干扰 CDK1/2 的磷酸化,CDKN1A 表达减弱或消失与 CDK 的活性被抑制有关。CDKN1A 是 p53 下游的一个基因,当受到物理或化学刺激时,细胞可通过激活 p53 依赖和非依赖途径进行 DNA 的损伤修复,如果该基因受到抑制,在细胞没有进行完全修复的时候就进入

细胞周期,复制错误的遗传信号,导致肿瘤的发生^[11]。

本研究中,我们通过生物信息学的方法,在 Target scan 中预测 miR-17-5p 的靶基因,发现 CDKN1A 与其具有 2 个直接的结合位点。我们在蛋白和 mRNA 水平检测发现,在鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞中,miR-17-5p 可靶向调控 CDKN1A 的表达,从而影响细胞周期的进程。本研究结果为后续探讨 miR-17-5p 在鼻咽癌分化的作用机制提供了更多的基础。

参考文献

[1] Loffreda A, Rigamonti A, Barabino SM, et al. RNA-Binding Proteins in the Regulation of miRNA Activity: A Focus on Neuronal Functions [J]. Biomolecules, 2015, 5(4): 2363-2387.

[2] Mouillet JF, Ouyang Y, Coyne CB, et al. MicroRNAs in placental health and disease [J]. Am J Obstet Gynecol, 2015, 213(4 Suppl): S163-S172.

[3] Diosdado B, van de Wiel MA, Terhaar Sive Droste JS, et al. MiR-17-92 cluster is associated with 13q gain and c-myc expression during colorectal adenoma to adenocarcinoma progression [J]. Br J Cancer, 2009, 101(4): 707-714.

[4] Chhabria SV, Akbarsha MA, Li AP, et al. In situ alliinase generation using targeted alliinase delivery for inhibition of MIA PaCa-2 cells via epigenetic changes, oxidative stress and cyclin-dependent kinase-inhibitor (CDKI) expression [J]. Apoptosis, 2015, 20(10): 1388.

[5] Kim HS, Shen Q, Nam SW. Histone Deacetylases and Their Regulatory MicroRNAs in Hepatocarcinogenesis [J]. J Korean Med Sci, 2015, 30(10): 1375-1380.

[6] Dhar S, Kumar A, Rimando AM, et al. Resveratrol and pterostilbene epigenetically restore PTEN expression by targeting oncomiRs of the miR-17 family in prostate cancer [J]. Oncotarget, 2015, 6(29): 27214-27226.

[7] Sarhan RA, Aboelenen HRA, Sourour SKN, et al. Targeting E2F1 and c-Myc expression by microRNA-17-5p represses interferon-stimulated gene MxA in peripheral blood mononuclear cells of pediatric systemic lupus erythematosus patients [J]. Discov Med, 2015, 19(107): 419-425.

[8] Peng H, Ishida M, Li L, et al. Pseudogene INTS6P1 regulates its cognate gene INTS6 through competitive binding of miR-17-5p in hepatocellular carcinoma [J]. Oncotarget, 2015, 6(8): 5666-5677.

[9] Li L, He L, Zhao JL, et al. MiR-17-5p up-regulates YES1 to modulate the cell cycle progression and apoptosis in ovarian cancer cell lines [J]. J Cell Biochem, 2015, 116(6): 1050-1059.

[10] Yang F, Yin Y, Wang F, et al. miR-17-5p Promotes migration of human hepatocellular carcinoma cells through the p38 mitogen-activated protein kinase-heat shock protein 27 pathway [J]. Hepatology, 2010, 51(5): 1614-1623.

[11] Dutto I, Tillhon M, Cazzalini O, et al. Biology of the cell cycle inhibitor p21 (CDKN1A): molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology [J]. Arch Toxicol, 2015, 89(2): 155-178.