

microRNA-24 通过下调 Cdk4 和 CyclinD3 抑制胰岛 β 细胞增殖

常晓媛¹, 朱云霞¹, 韩 晓¹, 程 光^{2*}

(¹南京医科大学江苏省人类功能基因组学重点实验室, 江苏 南京 211166; ²南京绿叶制药有限公司长效和靶向制剂国家重点实验室, 江苏 南京 210061)

[摘要] 目的:通过共同过表达 Cdk4、CyclinD3 与 microRNA-24, 观察 *miR-24* 所引起的胰岛 β 细胞增殖抑制是否得到逆转, 从而判定 Cdk4、CyclinD3 是否介导了这种抑制作用。方法:在胰岛 β 细胞系 MIN6 细胞中过表达 *miR-24*, 运用 WST-1 法检测细胞活力, 借助于流式细胞术检测细胞周期, Hoechst33342 染色和 BrdU 标记检测细胞增殖凋亡情况。Western blot 检测 Cdk4、CyclinD3 蛋白水平。构建 cyclinD3-pCMV5-myc, cdk4-pCMV5-myc 重组质粒, 与 pre-miR-24、pre-Neg miRNA precursors 共转染 MIN6 细胞, BrdU 标记检测细胞增殖。结果:过表达 *miR-24* 引起 MIN6 细胞活力降低, 细胞周期 G2 期阻滞, 细胞增殖受到抑制而并没有显著的凋亡; 过表达 *miR-24* 降低了 Cdk4、CyclinD3 蛋白水平; 而 Cdk4、CyclinD3 的过表达逆转了 *miR-24* 引起的胰岛 β 细胞增殖抑制。结论:*miR-24* 通过降低 Cdk4、CyclinD3 蛋白水平抑制胰岛 β 细胞增殖, 该作用可被 Cdk4、CyclinD3 蛋白的过表达逆转。

[关键词] microRNA; 胰岛 β 细胞; 增殖抑制

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)12-1413-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20161201

microRNA-24 inhibits islet β -cell proliferation by decreasing Cdk4 and CyclinD3 protein levels

Chang Xiaoi¹, Zhu Yunxia¹, Han Xiao¹, Cheng Guang^{2*}

(¹Jiangsu Province Key Lab of Human Functional Genomics, NJMU, Nanjing 211166; ²Nanjing Green leaf Pharmaceutical Co Ltd State Key Laboratory of Long-term and Targeted Agents, Nanjing 210061, China)

[Abstract] **Objective:** To explore whether Cdk4 and CyclinD3 are involved in the inhibition of β -cell proliferation caused by *miRNA-24*. **Methods:** *miRNA-24* (*miR-24*) was highly expressed in MIN6 cells. Cell viability was determined using WST-1 assays. Cells were collected for flow cytometry analysis to test cell cycle distribution. Protein levels of Cdk4 and CyclinD3 were analyzed by Western blot. CyclinD3-pCMV5-myc and cdk4-pCMV5-myc recombinant plasmid were constructed and transfected into MIN6 cells together with pre-miR-24 or pre-Neg miRNA precursors. Cell proliferation was measured by the BrdU labeling. **Results:** MIN6 cells proliferation was reduced because of transfected *miR-24*, mainly due to G2 phase arrest. No changes of the level of apoptotic cells were detected. Cdk4 and CyclinD3 were downregulated by overexpressed *miR-24*. Overexpressed *cdk4* and *cyclinD3* reversed the β -cell proliferation inhibition. **Conclusion:** *miR-24* inhibits β -cell proliferation by decreasing Cdk4 and CyclinD3 protein levels. The inhibition may be reversed by overexpressed *cdk4* and *cyclinD3*.

[Key words] microRNA; islet β -cell; proliferation inhibition

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(12): 1413-1417]

胰岛 β 细胞的总量取决于其新生、增殖、凋亡的动态平衡^[1], 其所分泌的胰岛素浓度升高与降低

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81200559); 南京医科大学科技发展基金面上项目(2015NJMU001)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: cheng@luye.cn

将血糖水平维持在一个很窄的区间, 当 β 细胞增殖受损无法维持胰岛素总量水平, 糖尿病继而发生^[2]。在成体小鼠中, 已存在的 β 细胞增殖是新 β 细胞的主要来源, 是维持 β 细胞总量的主要方式^[3]。人在婴儿时期 β 细胞的增殖对成年后的 β 细胞总量也有

着重要影响^[4]。之前的研究表明,Cyclin-Cdk4 复合体对调控 β 细胞增殖发挥着重要作用^[5-6]。microRNA(又称 miRNA)长约有 22 个碱基,是内源性的非编码 RNA,可对基因的表达进行负性调控,进而广泛参与各种生理病理过程。目前在人类已经发现 2 500 多种 miRNA,microRNA-24(miR-24)是为数不多的阐述较多、功能较为明确的 miRNA 之一,其在细胞分化、生长、增殖与凋亡等多个环节中均发挥着重要的调节作用。已有研究表明 miR-24 可以抑制胰岛 β 细胞的增殖,同时 mRNA 芯片结果显示 Cdk4 与 CyclinD3 的 mRNA 水平在 miR-24 过表达时显著下降^[7],其间的联系和分子机制仍需进一步探讨。

本研究通过在 β 细胞系中同时过表达 Cdk4 与 CyclinD3 基因的克隆载体和 miR-24,检测 β 细胞的增殖情况,探究 miR-24 对胰岛 β 细胞的增殖抑制的分子机制,为糖尿病的预防和治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠胰岛 β 细胞系 MIN6 细胞(美国 City of Hope National Medical Center 糖尿病中心),pre-miR-24、pre-Neg miRNA precursors(Ambion 公司,美国),胎牛血清、DMEM(Gibco 公司,美国),限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、PrimeSTAR[®]HS DNA 聚合酶(TaKaRa 公司,日本);凝胶回收试剂盒和清洁回收试剂盒(Axygen 公司,美国);基因组提取试剂盒和质粒提取试剂盒(Qiagen 公司,德国),Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司,美国),WST-1 检测试剂盒(中国碧云天公司);BrdU 标记试剂盒(Roche 公司,德国),Cdk4 抗体(Cell Signaling 公司,美国),CyclinD3 抗体(Cell Signaling 公司,美国),鼠抗 β -Tubulin(Sigma 公司,美国),HRP 标记的兔抗羊抗体、羊抗鼠抗体(Chemicon 公司,美国),ECL 试剂(Amersham 公司,美国)

1.2 方法

1.2.1 cyclinD3-pCMV5-myc,cdk4-pCMV5-myc 质粒构建

以小鼠 cDNA 为模板通过 PCR 扩增得到 Cdk4、CyclinD3 全长片段。并通过在 PCR 引物上添加 *Dpn* I/*Hind* III 酶切位点及保护碱基。Cdk4 正向引物:5'-GGAATTCATATGGCTGCCACTCGATATGAC-3',反向引物:5'-CGGGATCCTCACTCTGCGTCCG-C-TTT-3'。CyclinD3 正向引物:5'-GGAATTCATATGGAGCTGCTGTGTTGCGAG-3',反向引物:5'-CGG-

GATCCCTACAGGTGAATGGCTGT-3'。反应体系:5 \times PrimeSTAR[®] Buffer(Mg²⁺ Plus)10 μ L,dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L)4 μ L,上游引物(10 μ mol/L)1 μ L,下游引物(10 μ mol/L)1 μ L,模板 DNA 1 μ L,PrimeSTAR[®]HS DNA Polymerase 0.5 μ L,过滤无菌超纯水补至 50 μ L。反应条件:预变性 98 $^{\circ}$ C 5 min,变性 98 $^{\circ}$ C 10 s,退火 55 $^{\circ}$ C 15 s,延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min/kbp,30~40 个循环,延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min。上述 PCR 反应产物于 1%琼脂糖凝胶电泳,紫外光下观察扩增产物大小和亮度,并切下含目的片段的琼脂糖凝胶,收集于清洁离心管中,使用胶回收试剂盒进行回收纯化。测序确认后将回收后的 PCR 产物连入 pCMV5-myc 载体,得到重组质粒。转化至大肠杆菌 DH5 α ,挑取单克隆菌落并扩增,提取质粒进行酶切鉴定并进一步送测序。

1.2.2 小鼠胰岛 β 细胞 MIN6 细胞培养及转染

小鼠胰岛 β 细胞系 MIN6 细胞(1×10^6 /mL)用含 15%胎牛血清的 DMEM 培养基在 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中培养。使用脂质体 Lipofectamine 2000 进行瞬时转染,操作细节参考说明书,pre-miR-24 或 pre-Neg miRNA precursors(pre-Neg)转染浓度均为 50 nmol/L。

1.2.3 流式细胞术检测细胞周期

将细胞按照次日达 30%~50%的密度铺板,转染 pre-miR-24 或 pre-Neg,48 h 后用胰酶消化收集全部细胞以制成单细胞悬液;室温下离心 700 g 5 min;弃上清并用 250 μ L PBS 重悬细胞沉淀后,加入无水乙醇 750 μ L 立即混匀,-20 $^{\circ}$ C 固定过夜;室温下离心 700 g 5 min;弃上清并加入 1 mL PBS 重悬以洗涤细胞沉淀;室温下离心 700 g 5 min;弃上清并向各管加入 500 μ L PI 染液(含 50 μ g/mL PI 和 25 μ g/mL RNase 的 PBS 溶液)重悬细胞沉淀,室温避光孵育 30 min;然后流式细胞仪检测。

1.2.4 WST-1 实验

WST-1 实验是广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的检测方法。将细胞按照次日达 30%~50%的密度接种于 48 孔板中,在转染 pre-miR-24 或 pre-Neg 48 h 后,向各孔(200 μ L 培养液)中加入 20 μ L WST-1 溶液,37 $^{\circ}$ C 培养箱中继续培养 2~4 h。将孔板放入酶标仪中在主波长 450 nm,参考波长 630 nm 处读取吸光度值。两波长处吸光度的差值大小与细胞活力呈正比。

1.2.5 Western blot 蛋白水平检测

转染后收集细胞抽提总蛋白,测定蛋白浓度,10% SDS-PAGE 分离蛋白,湿转膜法转膜,5%脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h,一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育后洗膜,HRP

标记的二抗 37℃ 孵育 1 h,洗膜后用 ECL 试剂显影。拍照灰度分析。

1.2.6 BrdU 法检测 MIN6 细胞增殖活力

将 MIN6 细胞接种于经多聚赖氨酸包被过的盖玻片上,置于 37 °C 培养箱中过夜以待细胞贴壁。次日,分别转染 pre-miR-24 或 pre-Neg 48 h 后,采用 Roche 公司的试剂盒按说明书进行操作。然后用封片剂 VECTASHIELD 将上述盖玻片倒置于载玻片上,用指甲油固定盖玻片。使用 Zeiss 正置荧光显微镜(Imager A1)观察,并随机选取视野拍照。

1.3 统计学方法

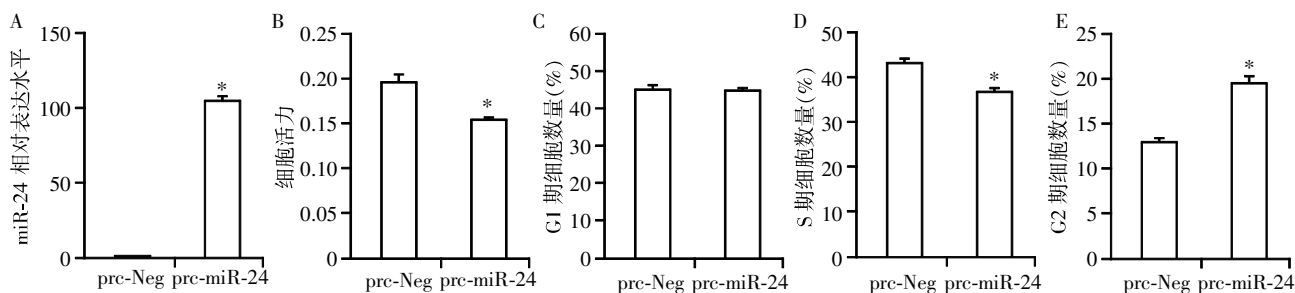
所有实验均重复 3 次或以上,计算均数和标准误($\bar{x} \pm s_x$),两组数据之间的统计学差异采用双尾 t 检验计算 P 值。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达 miR-24 抑制胰岛 β 细胞增殖

为了探索 miR-24 的高表达对胰岛 β 细胞的影

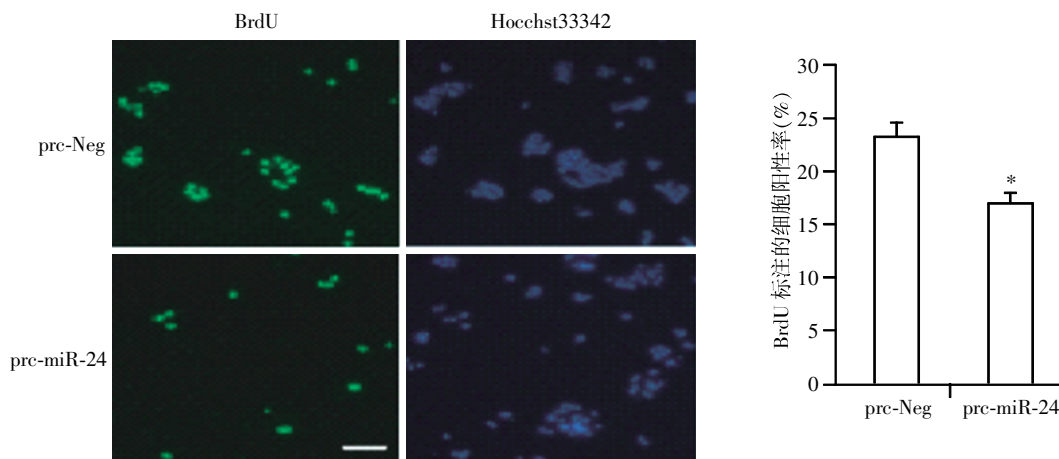
响,本研究选用人工合成的 miRNA 前体(pre-miR-24 或 pre-Neg)转染细胞。pre-miR-24 转染 MIN6 细胞 48 h,显著增加了细胞内 miR-24 的表达水平(图 1A),同时 WST-1 检测结果表明,过表达 miR-24 导致 MIN6 细胞活力降低至 75%(图 1B)。细胞活力与细胞数目呈正相关,而细胞数目与其增殖速率密切相关。因此,本研究从细胞的增殖速率和死亡情况两方面进行了后续的研究。PI 单染联合流式细胞术检测的结果显示,pre-miR-24 的转染 MIN6 细胞的 G1 期细胞数量无明显变化,而 G2 期增高、S 期减少(图 1 C,D,E)。初步提示,过表达 miR-24 对 MIN6 细胞的增殖有明显的抑制作用。进一步通过 BrdU 标记实验发现,过表达 miR-24 能够显著降低 BrdU 标记的阳性率,表明过表达 miR-24 可以抑制 MIN6 细胞的增殖(图 2A、B);而 Hoechst 33342 染色并未提示明显的核固缩(图 2A),则表明过表达 miR-24 并不会诱导 MIN6 细胞的凋亡。以上实验结果均提示,miR-24 的升高致使 MIN6 细胞活力下降主要是



A: 转染 pre-miR-24 后 MIN6 细胞内 miR-24 水平显著升高; B: 过表达 miR-24 48 h MIN6 细胞活力降低; C、D、E: 过表达 miR-24 引起 MIN6 细胞 G2 期、S 期细胞数目变化。与 pre-Neg 比较, * $P \leq 0.01$ ($n=3$)。

图 1 过表达 miR-24 可导致胰岛 β 细胞的活力下降和周期阻滞

Figure 1 Elevated miR-24 reduces cell viability and induce cell cycle arrest



过表达 miR-24 能够明显降低 BrdU 标记的阳性率,Hoechst 33342 染色未见明显的核固缩。与 pre-Neg 比较, * $P \leq 0.01$ ($n=4$)。

图 2 过表达 miR-24 可导致胰岛 β 细胞的增殖抑制

Figure 2 Overexpressed miR-24 inhibited islet β -cell proliferation

通过诱导细胞周期阻滞,而非增加细胞的凋亡。

2.2 过表达 miR-24 降低 Cdk4 与 CyclinD3 蛋白水平

在 MIN6 细胞中分别转染 pre-miR-24 或 pre-Neg,48 h 后进行 Western blot 检测 (图 3),Cdk4、CyclinD3 的蛋白水平下降,提示这 2 种蛋白很可能是 miR-24 的靶分子。

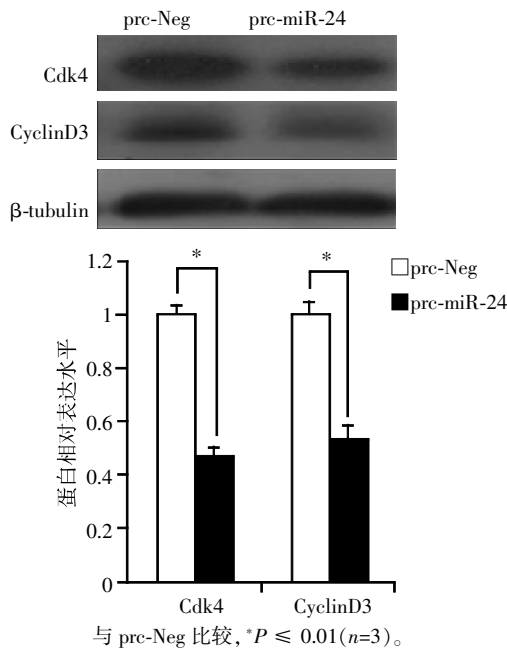


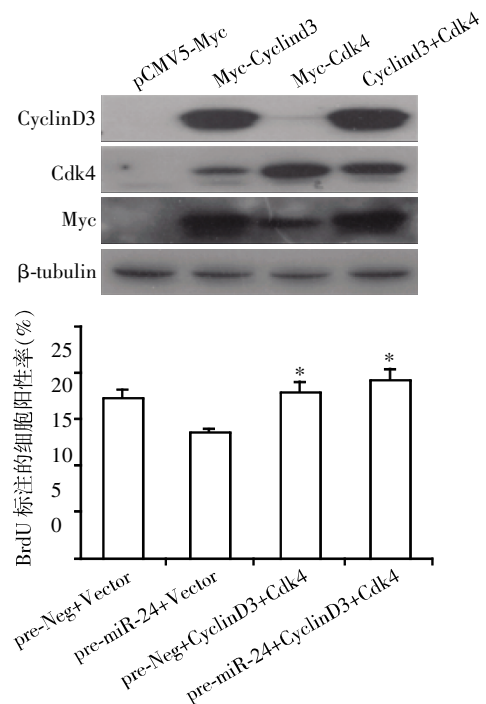
图 3 过表达 miR-24 降低 Cdk4 与 CyclinD3 蛋白水平
Figure 3 Overexpressed miR-24 decreased the protein levels of Cdk4 and CyclinD3

2.3 过表达 cdk4 与 cyclinD3 逆转 miR-24 引起的增殖抑制

为了进一步研究 Cdk4 与 CyclinD3 在 miR-24 引起的细胞增殖抑制中的作用,构建了 Cdk4 与 CyclinD3 两种过表达质粒,与 pre-miR-24 共同转染 MIN6 细胞。BrdU 标记实验显示,同时过表达 Cdk4 和 CyclinD3 能够完全逆转由 miR-24 引起的细胞增殖抑制,而对相应的对照组细胞的增殖率无明显影响(图 4)。本研究结果初步证明,miR-24 介导的细胞增殖抑制是由 Cdk4 与 CyclinD3 蛋白水平降低引起的。

3 讨论

成熟的胰岛 β 细胞具有自我复制和更新能力,正常情况下可以通过低速率的增殖以补充衰老凋亡的细胞^[8],且在肥胖引起轻度的胰岛素抵抗时,β 细胞仍可以代偿性增生,以分泌更多的胰岛素从而满足机体的需要^[8-9]。越来越多的研究表明,microRNA 在调控胰岛 β 细胞增殖的关键信号通路中发挥着重要



与 pre-miR-24+Vector 比较, *P ≤ 0.01(n=3)。
图 4 过表达 Cdk4 与 CyclinD3 逆转 miR-24 引起的 β-cell 增殖抑制

Figure 4 Overexpressed Cdk4 and CyclinD3 rescued the β-cell proliferation inhibition caused by miR-24

作用^[10];miR-184 在胰岛素抵抗情况下受到抑制,其靶分子 Ago2 表达升高,可以显著提高胰岛 β 细胞的代偿性增殖,而且 Ago2 作用的发挥,是通过调控 miR-375 来影响其下游靶基因来实现的^[11]。miR-7a 的靶基因包括 mTOR 信号通路的 5 个组成因子,抑制 miR-7a 可以激活 mTOR 信号通路并促进小鼠原代胰岛中 β 细胞的增殖,而且 mTOR 信号通路的抑制剂可以逆转这一效应^[12]。在对 miR-29a 的研究中也发现,过表达 miR-29a 可以显著促进胰岛 β 细胞的增殖^[13]。

miR-24 在各物种间高度保守,并在肺、心、胰腺和肾脏中高表达,而在肝脏和肌肉中表达较低^[14]。在 2 型糖尿病发生发展过程中 miR-24 的表达水平发生了明显的改变,例如在 db/db 糖尿病小鼠的肺和血浆中 miR-24 都有明显降低^[15],而在胰岛细胞中显著升高^[7]。miR-24 在胰岛 β 细胞中发挥作用的机制已有了初步的研究,发现 miR-24 可以抑制胰岛 β 细胞增殖^[7]。细胞增殖是细胞经过细胞周期实现细胞数目的增长,细胞周期主要受细胞周期素、细胞周期素依赖性蛋白激酶及其抑制蛋白的调控^[15]。因此在验证过表达 miR-24 抑制胰岛 β 细胞增殖后,本研究进一步检测与调控细胞周期有关的蛋白 Cdk4 与 Cy-

clinD3的表达变化,研究结果显示Cdk4与CyclinD3蛋白水平受miR-24调控,发生显著下降。

作为细胞周期素依赖性蛋白激酶家族中的一员,Cdk4在细胞从G1期向S期过渡的过程中发挥着重要作用^[16]。以往的研究表明,Cdk4的缺失直接会导致小鼠的胰岛β细胞数量减少及糖尿病的发生^[5],而重新表达Cdk4能够恢复Cdk4敲除小鼠胰岛β细胞的增殖。CyclinD3属于高度保守的细胞周期素家族,其主要的功能是正向调控周期素依赖性蛋白激酶(如Cdk4或Cdk6)^[17]。因此推测恢复Cdk4和CyclinD3的表达或许能够逆转miR-24对MIN6细胞的增殖抑制作用,研究结果证实了推测,miR-24对胰岛β细胞的增殖抑制是可逆的。

miR-24通过直接或间接地抑制多个周期蛋白的表达从而阻碍细胞周期进程,并且此周期阻滞效应存在于肿瘤细胞、成纤维细胞等多种细胞系中^[18]。在本研究中miR-24通过下调Cdk4与CyclinD3蛋白水平,阻滞细胞周期,抑制胰岛β细胞的增殖,这种抑制可以通过过表达Cdk4与CyclinD3得到逆转。本研究丰富了miRNA调控胰岛β细胞增殖的成果,并为糖尿病的预防和治疗提供了新思路。

[参考文献]

[1] Bonner-Weir S. Life and death of the pancreatic beta cells [J]. *TEM*, 2000, 11(9): 375-378

[2] Bonner-Weir S. Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth [J]. *Endocrinology*, 2000, 141(6): 1926-1929

[3] Dor Y, Brown J, Martinez OI, et al. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation [J]. *Nature*, 2004, 429(6987): 41-46

[4] Meier JJ, Butler AE, Saisho Y, et al. Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans [J]. *Diabetes*, 2008, 57(6): 1584-1594

[5] Rane SG, Dubus P, Mettus RV, et al. Loss of cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia [J]. *Nature Genetics*, 1999, 22(1): 44-52

[6] Heit JJ, Karnik SK, Kim SK. Intrinsic regulators of pancreatic beta-cell proliferation [J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2006, 22: 311-338

[7] Zhu Y, You W, Wang H, et al. MicroRNA-24/mody gene regulatory pathway mediates pancreatic beta-cell dysfunction [J]. *Diabetes*, 2013, 62(9): 3194-3206

[8] Cerf ME. Beta cell dynamics; Beta cell replenishment, beta cell compensation and diabetes [J]. *Endocrine*, 2013, 44(2): 303-311

[9] Weir GC, Bonner-Weir S. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes [J]. *Diabetes*, 2004, 53(Suppl 3): S16-21

[10] Eliasson L, Esguerra JL. Role of non-coding RNAs in pancreatic beta-cell development and physiology [J]. *Acta Physiologica*, 2014, 211(2): 273-284

[11] Tattikota SG, Rathjen T, McNulty SJ, et al. Argonaute2 mediates compensatory expansion of the pancreatic beta cell [J]. *Cell Metabolism*, 2014, 19(1): 122-134

[12] Wang Y, Liu J, Liu C, et al. MicroRNA-7 regulates the mTOR pathway and proliferation in adult pancreatic beta-cells [J]. *Diabetes*, 2013, 62(3): 887-895

[13] Bagge A, Clausen TR, Larsen S, et al. MicroRNA-29a is up-regulated in beta-cells by glucose and decreases glucose-stimulated insulin secretion [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 426(2): 266-272

[14] Xiang Y, Cheng J, Wang D, et al. Hyperglycemia repression of mir-24 coordinately upregulates endothelial cell expression and secretion of von willebrand factor [J]. *Blood*, 2015, 125(22): 3377-3387

[15] Lim S, Kaldis P. Cdks, cyclins and ckis: Roles beyond cell cycle regulation [J]. *Development*, 2013, 140(15): 3079-3093

[16] Wang H, Iakova P, Wilde M, et al. C/ebpalpha arrests cell proliferation through direct inhibition of cdk2 and cdk4 [J]. *Molecular Cell*, 2001, 8(4): 817-828

[17] Lin J, Jinno S, Okayama H. Cdk6-cyclin d3 complex evades inhibition by inhibitor proteins and uniquely controls cell's proliferation competence [J]. *Oncogene*, 2001, 20(16): 2000-2009

[18] Giglio S, Cirombella R, Amodeo R, et al. MicroRNA mir-24 promotes cell proliferation by targeting the cdks inhibitors p27kip1 and p16ink4a [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2013, 228(10): 2015-2023

[收稿日期] 2016-07-19