

转录因子 MKL1 通过激活 CCNB2 转录促进肺癌转移

袁艺标¹, 吴晓燕¹, 程 献³, 周玉峰^{2*}

(¹南京医科大学基础医学国家级实验教学示范中心,²护理系,江苏 南京 211166;³江苏省原子医学研究所,江苏 无锡 214063)

[摘要] 目的:在人肺腺癌细胞中,研究转录因子 MKL1 是否参与了肺肿瘤细胞的迁移和侵袭过程,并且调控的信号通路是否涉及细胞周期蛋白 2(CCNB2)活性的改变。方法:在肺癌细胞中感染 MKL1 病毒构建稳定细胞系,分析抑制 MKL1 表达对肿瘤细胞生长及迁移能力的影响;Real-time PCR(RT-PCR)法检测内源 MKL1 缺失对 CCNB2 mRNA 水平的影响;荧光素酶报告基因法分析干扰内源 MKL1 对 CCNB2 启动子表达的作用。结果:软琼脂种植实验显示当 MKL1 表达被抑制后,形成的集落明显减少,表明 MKL1 能够促进肿瘤恶化。通过绘制生长曲线发现感染组 MKL1 表达被抑制后,细胞增殖能力下降。荧光素酶报告基因实验显示 MKL1 的小 RNA 干扰转染细胞后,CCNB2 启动子的表达显著降低,抑制率达 70%。RT-PCR 实验显示 MKL1 干扰后 CCNB2 的 mRNA 水平明显降低。以上差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论:稳定敲除 MKL1 的肺癌细胞系出现生长减慢、侵袭能力降低等特性。MKL1 干扰后 CCNB2 的转录活性和 mRNA 水平都显著降低。本研究为早期肺癌的诊断和治疗提供了依据。

[关键词] 转录因子 MKL1;细胞周期蛋白 2;肺癌细胞

[中图分类号] R392.12

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)12-1422-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20161203

MKL1 potentiates lung cancer cell oncogenesis and migration by activating CCNB2 transcription

Yuan Yibiao¹, Wu Xiaoyan¹, Cheng Xian³, Zhou Yufeng^{2*}

(¹National Model Center of Laboratory Teaching, Basic Medical Science, ²Department of Nursing, NJMU, Nanjing 211166; ³Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the migration and invasion of lung neoplasm potentiated by MKL1 and the change of CCNB2 activity involved in signal pathway. **Methods:** Lung cancer cells were infected with lentivirus carrying indicated shRNAs and effect of MKL1 inhibition on migration and invasion of lung cancer cells was measured. Small interfering RNA was transfected to suppress the expression of MKL1, RT-PCR was performed to examine CCNB2 mRNA level, and luciferase reporter assays was to assess the effect of MKL1 deletion on the promoter activities of CCNB2. **Results:** Cell colony formation was diminished by soft agar clonogenic assay and cell proliferation was reduced when MKL1 was silenced by siRNA. MKL1 depletion directly repressed CCNB2 transcription, and the inhibition was up to 70%. RT-PCR showed great depression of CCNB2 mRNA by the interference of MKL1. Difference was of significance ($P < 0.05$). **Conclusion:** Depletion of MKL1 by shRNA significantly hampered the migration and invasion of lung cancer cell. MKL1 depletion inhibited CCNB2 transcriptional activity and repressed mRNA expression. The study provided early-stage markers for lung cancer diagnosis and treatment.

[Key words] transcription factor MKL1; cell cycle protein B2(CCNB2); lung cancer cell

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(12): 1422-1425, 1509]

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,也是世界范围内致死率较高的一种癌症,平均每年约有 140 万人

[基金项目] 江苏省高校自然科学研究计划面上项目(13KJB320014);南京医科大学科技发展基金重点项目(2013NJMU027)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: njmuzhouyf@163.com

死于肺癌^[1]。由于早期缺乏敏感有效的检测手段,多数患者诊断时已出现肿瘤转移。根据病理学分期将肺癌分为两种:非小细胞肺癌(nonsmall-cell lung cancer, NSCLC)和小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC),研究公认导致肺癌的主要原因为吸烟、环境污染和氡暴露等^[2]。

目前认为人细胞周期蛋白 2(CCNB2)参与肿瘤的进展过程,文献报道^[3]在人肺腺癌组织标本中,CCNB2 高于肺正常组织的表达。CCNB2 是细胞周期蛋白家族的一个成员,细胞周期蛋白 B 族包括 B1 和 B2,在细胞周期调控中起重要作用,主要与 Cdc2 结合促进细胞由 G2 期进入 M 期,对 CCNB2 的研究有可能揭示肿瘤发病的一些分子机制^[4]。

近年来心肌相关转录因子 A(MRTFA 或 MKL1)在肿瘤转移中的作用越来越受到关注。在外部刺激下,MKL1 能够激活 Rho 信号通路实现入核,从而调节靶基因的转录^[5]。在人乳腺癌细胞和小鼠黑色素瘤细胞的小鼠移植瘤实验中,通过干扰 RNA 下调 MKL1 可以降低肿瘤细胞的转移水平^[6]。MKL1 敲除的乳腺癌细胞在肺上形成小结节的能力显著降低,同时过表达组成性激活 MKL1 能够促进肿瘤细胞肺上克隆的形成^[7]。研究发现 MKL1 改变基质金属蛋白酶 9(MMP9)启动子上 H3K4 的甲基化水平,介导转化生长因子 β (TGF- β)刺激下 MMP9 的上调并影响肺癌转移^[8]。

本研究拟在人肺腺癌细胞中,研究 MKL1 是否参与了肺肿瘤细胞的迁移和侵袭过程,并且调控的信号通路是否涉及 CCNB2 活性的改变。探讨 MKL1 在肺癌发生中的作用,将有助于发现早期诊断肺癌的分子标志,为其治疗提供靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

人肺腺癌 H1299 和 A549 细胞(ATCC 公司,美国);1640 培养液(Gibco 公司,美国);胎牛血清(杭州四季青公司);报告基因分析试剂盒、RNA 抽提试剂盒(Promega 公司,美国);Lipofectamine™2000(Invitrogen 公司,美国);CO₂ 培养箱(Thermo 公司,美国);荧光检测仪(Biosystem 公司,美国);GeneQuant 核酸定量仪(Pharmacia 公司,美国);实时定量 PCR 仪 7500(ABI 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 人肺腺癌 H1299 和 A549 细胞的培养

用含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基,在 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下常规培养,待细胞至对数生长期用于实验。

1.2.2 稳定细胞系的构建

编码干扰 MKL1 基因表达的小发卡 RNA (shRNA)的载体,及该载体包装产生的慢病毒均由

上海吉玛公司设计和生产。进行感染前 1 d,将肺腺癌细胞以 40%密度种板,次日进行慢病毒感染(MOI=10),加入 5 μ g/mL polybrene 增强感染效率。24 h 后换液,再培养 24 h 使慢病毒的基因组充分整合入肺腺癌基因组中。培养基中添加 5 μ g/mL 嘌呤霉素以筛选被稳定感染的细胞,细胞密度不超过 50%,筛选至少 1 周。

1.2.3 Real-time PCR 检测内源 MKL1 对 CCNB2 mRNA 水平的作用

搜索 GenBank 数据库人 CCNB2 基因 mRNA 序列,Premier 3.0 软件辅助设计引物,所有引物均由美国 Invitrogen 公司合成。提取总 RNA,取 1 μ g 逆转录。用 TaKaRa 逆转录试剂盒,反应体系如下:5 \times 缓冲液 4 μ L,逆转录酶 1 μ L,随机引物 1 μ L,补水至 20 μ L。反应条件:37℃ 30 min、85℃ 5 s、4℃保存,取出 PCR 管离心后,每管加 80 μ L 无核酸酶水,充分混匀、离心。探针法:将试剂加入 96 孔 PCR 反应板中,于荧光定量 PCR 仪中扩增。反应体系:2 \times PCR probe Master Mix 10 μ L,Forward primer 0.1 μ L,Reverse primer 0.1 μ L,18s-RNA-vic 0.3 μ L,Taqman Probe 0.04 μ L,Nuclease-Free water 4.46 μ L,cDNA 5 μ L。反应条件如下:50℃ 2 min;95℃ 10 min,95℃ 15 s,60℃ 1 min,40 个循环。结果分析采用参照基因的 $\Delta\Delta C_T$ 法计算目的基因的相对表达量。

1.2.4 荧光素酶报告基因法分析内源 MKL1 对 CCNB2 启动子表达的作用

每孔细胞数 1×10^5 个种板。接种 24 h 后转染重组荧光素酶报告基因质粒和 MKL1 的小干扰 RNA,24 h 后检测荧光素酶活性,每组重复 3 孔。BCA 试剂盒测定每组蛋白浓度。转染 GFP 检测转染效率,荧光素酶活性分析用蛋白浓度和 GFP 荧光校正,所得数据是校正随机荧光素酶单位(NRLU)。NRLU=荧光素酶活性/蛋白浓度/GFP 荧光值。

1.3 统计学方法

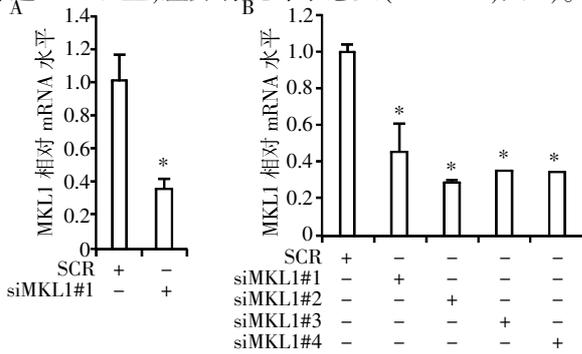
采用 SPSS13.0 统计学软件对图象分析的数据进行统计学分析,各试验组和对照组间的比较采用多组单因素方差分析(ANOVA),post-hoc analysis(LSD、SNK、Duncan), $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小 RNA 干扰后 MKL1 基因的敲降效率

A549 和 H1299 细胞分别转染 MKL1 的小 RNA 干扰,通过 RT-PCR 检测干扰后 MKL1 基因的敲降效率。两组结果都显示,干扰 MKL1 后其 mRNA 水平下

降达 60% 以上, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1)。

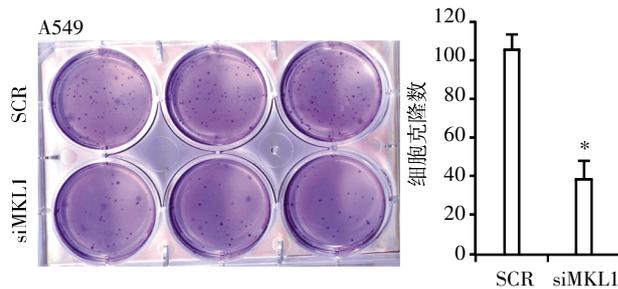


A: A549 细胞; B: H1299 细胞。与干扰前比较, $*P < 0.05$ 。

图 1 两种细胞中小 RNA 干扰后 MKL1 基因的敲降效率
Figure 1 Knock down efficiency of MKL1 after small RNA interference

2.2 抑制 MKL1 表达对肿瘤细胞克隆形成数目的影响

肿瘤细胞与正常细胞区别的重要特征就是丧失了与其他细胞之间的黏连, 能够不受接触抑制而无限增殖形成细胞集落, 且能在各种环境中非锚定性生长^[9]。本研究用克隆形成能力的强弱来判断肿瘤恶化的程度。A549 稳定干扰 MKL1 的细胞系, 在软琼脂中种植同等数目的对照和实验组稳定细胞系, 2 周后观察细胞的克隆形成数。结果表明当 MKL1 表达被抑制后, 在软琼脂中形成的集落明显减少(图 2), 表明 MKL1 能够促进肿瘤的恶化。



与干扰前比较, $*P < 0.05$ 。

图 2 抑制 MKL1 表达降低肿瘤细胞的克隆形成数目
Figure 2 MKL1 depletion diminished cell colony formation

2.3 抑制 MKL1 表达对稳定细胞增殖数目的影响

在 A549 细胞中感染两种不同序列的 MKL1 慢病毒, 嘌呤霉素筛选后形成稳定细胞系。同等数目的初始细胞基础上, 观察 MKL1 感染组与对照组的生长情况, 绘制稳定细胞系的生长曲线。结果显示 MKL1 表达被抑制以后, 细胞的增殖能力也受到抑制(图 3), 表明 MKL1 能够影响肺癌的肿瘤生成和迁移能力。

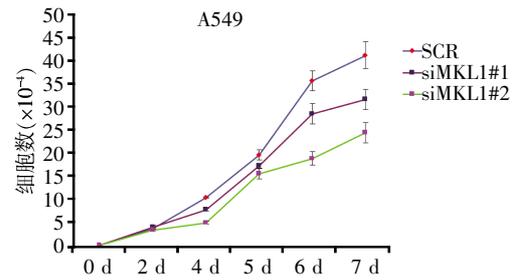
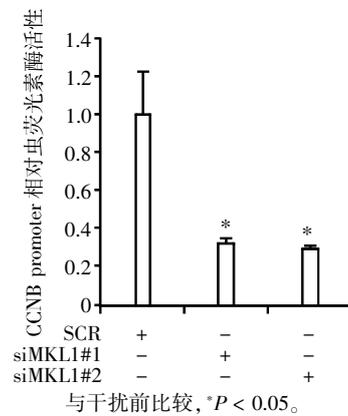


图 3 MKL1 的缺失抑制肿瘤细胞的增殖能力

Figure 3 MKL1 depletion inhibited cell proliferation

2.4 干扰内源 MKL1 对 CCNB2 启动子表达的影响

H1299 细胞转染 MKL1 的小 RNA 干扰 #1 和 #2, 转染以下质粒: ① 0.1 μg CCNB promoter 质粒 + 0.1 μg control (SCR); ② 0.1 μg CCNB promoter + 0.1 μg siMKL1#1; ③ 0.1 μg CCNB promoter + 0.1 μg siMKL1#2。每组转染 0.03 μg 内参 GFP, 重复 3 孔。结果显示, MKL1 的小干扰 RNA#1 和 #2 转染细胞后, CCNB2 启动子的表达显著降低, 抑制率达 70%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4)。说明 MKL1 对 CCNB2 启动子的转录激活是必须的, MKL1 干扰后, 激活作用消失。



与干扰前比较, $*P < 0.05$ 。

图 4 内源 MKL1 干扰后抑制 CCNB2 的转录活性

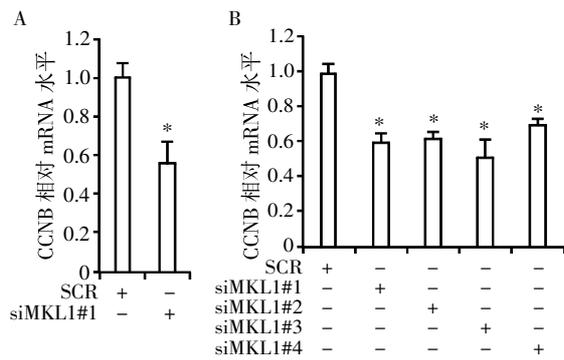
Figure 4 MKL1 depletion inhibits CCNB2 transcriptional activity

2.5 干扰内源 MKL1 对 CCNB2 mRNA 水平的影响

H1299 和 A549 细胞通过脂质体转染 MKL1 的小干扰 RNA#1、#2、#3、#4, 分别检测 CCNB2 的 RNA 水平。发现 MKL1 的缺失抑制 CCNB2 的 mRNA 水平(图 5)。

3 讨论

肺癌的形成涉及多个基因多条信号通路的改变, 与细胞生长、增殖信号的调控异常密切相关^[10]。原癌基因的激活、抑癌基因的失活以及相互之间作用的失衡是肺癌发生发展的分子基础, 调节细胞周



A: A549 细胞; B: H1299 细胞。与干扰前比较, * $P < 0.05$ 。

图 5 内源 MKL1 干扰后 Ccnb2 的 mRNA 水平降低

Figure 5 MKL1 depletion represses expression of Ccnb2 mRNA

期的相关基因表达异常在肺癌细胞增殖过程中影响较大。研究表明 P21 和 P53 通过下游分子调节细胞周期蛋白的表达和活性,进而调控细胞增殖^[11]。CCNB2 作为周期蛋白,在人肺腺癌组织中表达高于肺正常组织^[3]。Albulescu 等^[12]发现血清中 Ccnb2 水平可作为癌症诊断的一项依据,如肺癌、消化道肿瘤等,且其含量高低与肿瘤发病进程及转移相关。TGF β -RII 通过 Ccnb2 与 Cdc2 间接结合,从而来调节细胞周期。NF-Y 与 Ccnb2 启动子上的 CCAAT box 结合,DNA 结合因子 CBP/P300 为 NF-Y 接近启动子提供桥梁,在控制细胞生长分化上作用重大^[13]。HMG2 沉默后下调 Ccnb2 的表达,诱使细胞 G2/M 期阻滞,抑制白血病细胞增殖^[14]。

MKL1 在哺乳动物中广泛表达,在机体的各种生理和病理过程中发挥重要作用。已有文献报道干扰乳腺癌细胞中 MKL1 的表达能够减弱肿瘤细胞的迁移水平^[15],提示 MKL1 在肿瘤的发生中也作用重大。肿瘤细胞敲除 MKL1 后在小鼠中的荷瘤能力显著降低,随血循环向肺迁移的能力也减弱^[8]。MKL1 参与肿瘤的调控是通过多方面来实现的。依赖于 Rho 信号通路激活的 MKL1 在 MDCK 细胞中能够被 TGF- β 激活诱导 EMT 的发生^[16]。MKL1 通过与 Smad3 相互作用直接结合于 Slug 启动子的核心区域来调控 Slug 启动子的活性,这种作用是通过类 GCCG 基序的顺式作用元件来实现的^[17]。SCAI 与 MKL1 之间存在相互作用,SCAI 与 MKL1 的 RPEL 以及 B-box 结合来抑制其转录活性,但是却不影响 MKL1/SRF 之间的结合^[18]。这些证据都表明,MKL1 可以作为肿瘤治疗的一个新靶点,了解 MKL1 是如何各种信号通路之间的作用显得更为重要,改变肿瘤细胞移动性所涉及的转录机制也越来越引起人

们的注意。然而,在人肺腺癌细胞中,研究 MKL1 参与与肺癌细胞的迁移和侵袭过程,并且调控的信号通路是否涉及 Ccnb2 活性的改变未见报道。

本研究在细胞水平上研究了抑制 MKL1 表达对肺癌细胞生长及迁移能力的影响。在软琼脂中种植对照和实验组稳定细胞系,当 MKL1 表达被抑制后,形成的集落明显减少,表明 MKL1 能够促进肿瘤的恶化。通过观察 MKL1 感染组与对照组的生长情况,绘制稳定细胞系的生长曲线。发现 MKL1 表达被抑制后,细胞增殖能力下降。荧光素酶报告基因实验显示 MKL1 的小干扰 RNA 转染细胞后,CCNB2 启动子的表达显著降低,抑制达 70%,说明 MKL1 对 Ccnb2 启动子的转录激活是必须的。RT-PCR 实验显示转染 MKL1 的小干扰 RNA,内源 MKL1 缺失后 Ccnb2 的 mRNA 水平明显降低。以上差异有统计学意义($P < 0.05$)。综上,本研究发现 Ccnb2 的表达和转录活性是依赖于 MKL1 的,提示 Ccnb2 是 MKL1 作用的一个靶点,阐明了肺癌发生的分子机制。但是有关 MKL1 调控 Ccnb2 转录的表观遗传机制仍有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Siegel R, Ward E, Brawley O, et al. Cancer statistics: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths [J]. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2011, 61(4): 212-236
- [2] Khuder SA. Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis [J]. *Lung Cancer*, 2001, 31(2): 139-148
- [3] Stav D, Bar I, Sandbank J, et al. Usefulness of CDK5RAP3, Ccnb2, and RAGE genes for the diagnosis of lung adenocarcinoma [J]. *Int J Biol Markers*, 2007, 22(2): 108-113
- [4] Varjosalo M, Keskitalo S, Van DA, et al. The protein interaction landscape of the human CMGC kinase group [J]. *Cell Rep*, 2013, 3(4): 1306-1320
- [5] He H, Wang D, Yao H, et al. Transcriptional factors p300 and MRTF-A synergistically enhance the expression of migration-related genes in MCF-7 breast cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 467(4): 813-820
- [6] Xie L. MKL1-2 and ELK4 co-regulate distinct serum response factor (SRF) transcription programs in macrophages [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 301
- [7] Sun L, Li H, Chen J, et al. A SUMOylation-dependent pathway regulates SIRT1 transcription and lung cancer metastasis [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2013, 105(12): 887-898
- [8] Cheng X, Yang Y, Fan Z, et al. MKL1 potentiates lung