

猪苓多糖通过 HuR 调节 Cyclin D1 表达抑制 A549 细胞增殖

沈 耿^{1,2}, 徐 谦², 曾 星^{1*}

1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广东 广州 510000

2. 广州中医药大学基础医学院, 广东 广州 510000

摘 要: 目的 研究猪苓多糖 (polyporus polysaccharide, PPS) 抑制肺癌 A549 细胞增殖的作用及其机制。方法 设对照组和 PPS 低、中、高剂量组, 用 MTT 实验、流式细胞术检测 PPS 对细胞增殖的影响, 用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测 PPS 对 A549 细胞 Cyclin D1 mRNA 表达水平及其稳定性的影响, 用 Western blotting 检测 PPS 对 A549 细胞 Cyclin D1 蛋白、人抗原 R (human antigen R, HuR) 蛋白表达及对 HuR 蛋白胞浆及胞核内分布的影响。结果 与对照组比较, 中、高剂量的 PPS 作用后, A549 细胞增殖明显受到抑制 ($P < 0.05$), Cyclin D1 mRNA 稳定性降低 ($P < 0.05$), Cyclin D1 mRNA 及蛋白表达减少 ($P < 0.05$), HuR 总蛋白没有明显变化, 但胞浆 HuR 蛋白表达下降 ($P < 0.05$), 胞核 HuR 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。结论 PPS 可抑制 A549 细胞增殖, 其作用机制可能与改变 HuR 在细胞内定位, 从而降低 Cyclin D1 mRNA 稳定性及 Cyclin D1 蛋白表达有关。

关键词: 猪苓多糖; 人抗原 R; 肺癌; 细胞周期蛋白 D1; 细胞增殖

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)06-0944-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.06.015

Inhibition of polyporus polysaccharide on proliferation of A549 cells by adjusting Cyclin D1 expression by HuR

SHEN Geng^{1,2}, XU Qian², ZENG Xing¹

1. Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China

2. College of Basic Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China

Abstract: Objective To study the effects of polyporus polysaccharide (PPS) on the proliferation of human lung cancer A549 cells and the corresponding molecular mechanism. **Methods** The A549 cells in control group were normally treated and the cells in experimental groups were incubated with different doses of PPS. The MTT method and flow cytometry were used to analyze the influence of drugs on cell proliferation. The qRT-PCR was used to detect mRNA levels of A549 cells and Cyclin D1 mRNA stability. The levels of human antigen R (HuR) protein in plasma and nuclei and cyclin D1 protein were detected by Western blotting. **Results** Compared with the control, the cell growth was obviously inhibited ($P < 0.05$), the Cyclin D1 mRNA stability and Cyclin D1 mRNA were decreased in the mid- and high-dose PPS groups ($P < 0.05$), the total protein of HuR was slightly changed, but the cytoplasm protein of HuR was down-regulated ($P < 0.05$) and the nucleus protein of HuR was up-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** PPS can suppress the proliferation of A549 cells, which is possibly affected by down-regulating the cytoplasm protein of HuR, lowering the stability of Cyclin D1 mRNA, and thus decreasing the expression of Cyclin D1 protein.

Key words: polyporus polysaccharide; human antigen R; lung cancer; Cyclin D1; cell proliferation

肺癌为临床常见肿瘤, 也是引起肿瘤患者死亡的常见原因。肺癌患者在确诊时很多已属晚期, 能手术的病例较少, 往往以放疗及化疗为主, 预后较差, 约 80%病人在诊断后 1 年内死亡^[1], 中晚期肺癌

的治疗目前主张多方法综合治疗。中西医结合及中医药治疗肺癌, 已显示其在减少毒副反应、改善症状、稳定病灶、提高生存质量、延长生存期和提高生存率等方面优势^[2]。目前, 中医对肺癌病因病机的

收稿日期: 2015-11-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573769); 广东省自然科学基金资助项目 (2014A030313415); 广东省中医药管理局立项课题资助 (20151193); 广州中医药大学基础医学院院长基金资助

作者简介: 沈 耿, 男, 在读博士, 讲师, 研究方向为中医药抗肿瘤。E-mail: shengeng2006@163.com

*通信作者 曾 星, 女, 博士生导师, 研究员, 研究方向为中医药抗肿瘤的分子机制。E-mail: zengxing-china@163.com

认识有“正气虚损学说”“邪毒侵肺论”“痰湿内聚论”3种学说。临床采用扶正培本和清热解毒,软坚化痰,活血化瘀酌情伍用治法,取得了较好的疗效^[2]。

在众多治疗肺癌的复方中,猪苓为常用药物^[3-4]。猪苓多糖(polyporus polysaccharide, PPS)为猪苓的主要成分,现代药理研究表明,PPS具有增强免疫、抗肿瘤等多种功能^[5],体内外实验均表明,PPS对肺癌细胞有抑制作用^[6],但其作用机制尚不清楚。本实验拟观察PPS对肺癌A549细胞增殖的作用,并初步探讨其相关的分子生物学机制。

1 材料

1.1 细胞株

肺癌A549细胞株购自中山大学生物细胞库。

1.2 药品和试剂

PPS购自南京泽朗生物科技有限公司,质量分数为95%,批号为ZL2015050651。胎牛血清、RPMI 1640培养基、0.25%胰酶-EDTA消化液均购自美国Gibco公司;实时荧光定量PCR(qRT-PCR)试剂盒、逆转录试剂盒、蛋白酶抑制剂、RIPA缓冲液均购自德国Roche公司,噻唑蓝(MTT)购自美国Sigma公司,兔抗人Cyclin D1抗体、兔抗人HuR(HuR)抗体、兔抗人 β -actin抗体、兔抗人 α -tubulin抗体、Lanin B1抗体、HRP标记抗兔抗体均购自美国CST公司;Western blotting所用试剂购自美国Bio-Rad公司。

1.3 仪器

酶标仪,美国Perkin Elmer公司;FC500流式细胞仪,美国Beckman Coulter公司;电泳及转印系统、凝胶成像系统,美国Bio-Rad公司;7500实时荧光定量基因扩增系统,美国ABI公司。

2 方法

2.1 细胞培养及分组

A549细胞常规培养在含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素的RPMI 1640培养液中,置37℃、5%CO₂培养箱中培养。实验分4组,对照组(正常培养的细胞,未做任何处理)和PPS低、中、高剂量(50、100、200 μ g/mL)组。

2.2 MTT法检测细胞增殖

取对数生长期A549细胞,用培养基制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 3×10^4 /mL,接种于96孔,每孔100 μ L,培养24 h后,各实验组加入相应量的药物和培养基至每孔液体总量为20 μ L,实验设6个复孔,继续培养24、48、72 h后,各孔分别加入MTT(5 mg/mL)20 μ L,继续培养4 h,弃培养上

清,每孔加入二甲基亚砷(DMSO)150 μ L,震荡待结晶溶解后酶标仪上检测490 nm波长下的吸光度(A)值。

2.3 流式细胞术检测细胞周期

各组细胞常规培养48 h后,收集细胞到离心管中离心,应用预冷的PBS洗涤收集的细胞3次,离心沉淀细胞,弃上清。以70%预冷的乙醇重悬细胞,吹打均匀,4℃储存过夜;离心乙醇固定过的细胞,弃上清,PBS洗涤细胞3次以去除残留的乙醇。应用细胞周期检测试剂重悬细胞,常温避光染色30 min,应用流式细胞仪测定细胞周期。计算增殖指数。

$$\text{增殖指数} = (G_2/M + S)/(G_0/G_1 + S + G_2/M)$$

2.4 Western blotting法分析Cyclin D1蛋白表达

A549细胞接种于6孔板,常规培养后于对数生长期分别加入不同质量浓度(50、100、200 μ g/mL)的PPS培养48 h;收集细胞后用RIPA提取细胞总蛋白,BCA法测定蛋白浓度,100℃变性8 min,SDS-PAGE蛋白电泳,后将蛋白转至PVDF膜,室温封闭1 h后用一抗4℃孵育过夜,TBST缓冲液洗涤3次,二抗室温孵育1 h,洗涤后以ECL化学发光法于凝胶成像系统进行检测。

2.5 qRT-PCR法检测Cyclin D1 mRNA水平

细胞分组及培养方法同“2.4”项;用Trizol抽提细胞总RNA,按Roch试剂盒操作说明逆转录cDNA。Cyclin D1上游引物:5'-GGGCAGCAGAA-GCGAGAG-3',下游引物:5'-GTTCTCTCGCAG-ACCTCCAG-3'。以 β -actin为内参,其上游引物:5'-GTGGGGTGGCTTTTAGGATGG-3',下游引物:5'-TCACAATGTGGCCGAGGACTTT-3'。qRT-PCR扩增条件为:95℃、10 min;95℃、15 s,60℃、60 s,循环40次;扩增完毕后进行熔解曲线分析。

2.6 Cyclin D1 mRNA稳定性的检测

细胞分组及培养方法同“2.4”项;将放线菌素D以DMSO溶解后,加入培养基内,使放线菌素D的终质量浓度为5 ng/mL,给予放线菌素D处理后的0、2、4、6 h时间点分别收集细胞,提取RNA,以qRT-PCR法检测Cyclin D1的mRNA的水平,设定各组细胞0 h mRNA的量为100%,计算各组细胞2、4、6 h各时间点相对该组0 h的mRNA量的比值,绘制各组Cyclin D1 mRNA的降解拟合曲线,比较各组细胞Cyclin D1 mRNA的稳定性^[5]。

2.7 胞浆、胞核中HuR蛋白表达的检测

各实验组细胞经不同质量浓度(50、100、200

$\mu\text{g/mL}$) PPS 处理 24 h 后, 弃去培养基, 以预冷的 PBS 缓冲液清洗细胞 2 次。以细胞刮收集细胞至离心管, 离心, 弃上清, 按胞核-胞浆蛋白提取试剂盒说明分别提取胞浆蛋白和胞核蛋白。用 Western blotting 法检测总的、胞浆和胞核 HuR 蛋白的表达, 具体操作方法同“2.4”项。

2.8 统计学方法

用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析; 对于各组细胞 Cyclin D1 mRNA 稳定性比较, 采用重复测量资料的方差分析。

3 结果

3.1 PPS 对 A549 细胞增殖的抑制作用

A549 细胞在不同质量浓度 PPS 分别作用 24、48、72 h 后, 用 MTT 检测 A549 细胞的增殖, 与对照组相比, 50 $\mu\text{g/mL}$ PPS 组与对照组测得的 A 值在各个时间点上均没有显著差异 ($P > 0.05$), 100、200 $\mu\text{g/mL}$ PPS 组在 24、48、72 h 各时间点均能明显抑制 A549 细胞的增殖 ($P < 0.05$)。结果见图 1。

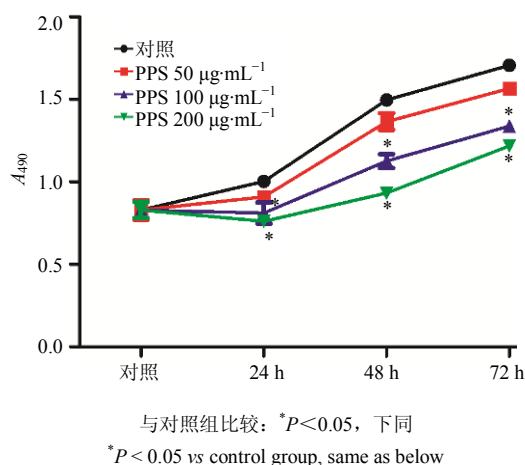


图 1 PPS 对 A549 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of PPS on proliferation of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 PPS 对 A549 细胞增殖指数的影响

细胞在不同质量浓度 PPS 分别作用 48 h 后, 流式细胞仪检测显示, 中、高剂量 PPS 组 A549 细胞的增殖指数降低 ($P < 0.05$)。结果见图 2。

3.3 PPS 对 A549 细胞 Cyclin D1 mRNA 表达的影响

qRT-PCR 检测显示, 与对照组比较, 不同质量浓度 PPS 作用于 A549 细胞 48 h 后, PPS 低剂量组与对照组 Cyclin D1 mRNA 表达无显著差异, PPS 中、高剂量组 Cyclin D1 mRNA 表达明显减少 ($P < 0.05$)。结果见图 3。

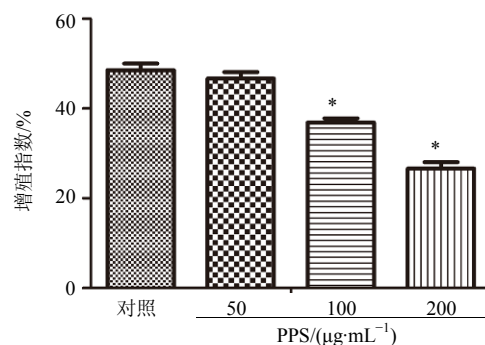


图 2 PPS 对 A549 细胞增殖指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of PPS on proliferation index of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

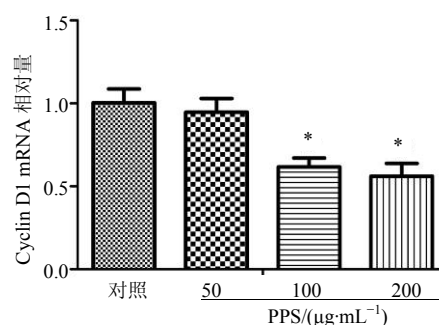


图 3 PPS 对 A549 细胞 Cyclin D1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of PPS on expression of Cyclin D1 mRNA in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 PPS 对 A549 细胞 Cyclin D1 蛋白表达的影响

Western blotting 检测显示, 与对照组比较, 不同质量浓度 PPS 作用于 A549 细胞 48 h 后, PPS 低剂量组与对照组 Cyclin D1 蛋白表达没有显著差异, PPS 中、高剂量组 Cyclin D1 蛋白表达明显减少 ($P < 0.05$)。结果见图 4。

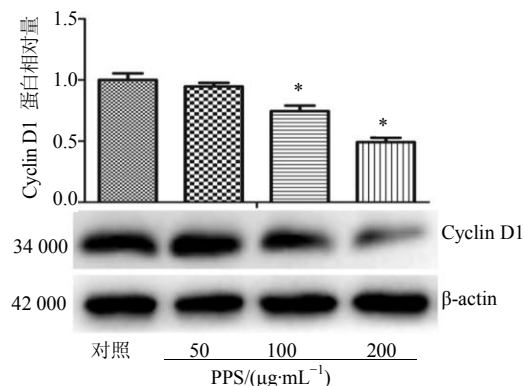


图 4 PPS 对 A549 细胞 Cyclin D1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of PPS on expression of Cyclin D1 protein in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 PPS 对 A549 细胞 Cyclin D1 mRNA 稳定性的影响

分别于放线菌素 D 处理 0、2、4、6 h 检测 Cyclin D1 mRNA 的量, 绘制衰减曲线 (图 5), 与对照组比较, PPS 低剂量组与对照组 Cyclin D1 mRNA 稳定性没有明显差别, PPS 中、高剂量组 Cyclin D1 mRNA 稳定性明显下降 ($P < 0.05$)。

3.6 PPS 促进 HuR 由胞核向胞浆转移

不同质量浓度 PPS 作用于 A549 细胞 48 h 后, 各组细胞总 HuR 蛋白比较, 差异不显著 ($P > 0.05$); 与对照组比较, 50 $\mu\text{g/mL}$ PPS 组胞浆 HuR 蛋白无明显变化, 100、200 $\mu\text{g/mL}$ PPS 组胞浆 HuR 蛋白表达明显减少 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 50 $\mu\text{g/mL}$ PPS 组胞核 HuR 蛋白无明显变化, 100、200 $\mu\text{g/mL}$ PPS 组胞核 HuR 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$), 见图 6。

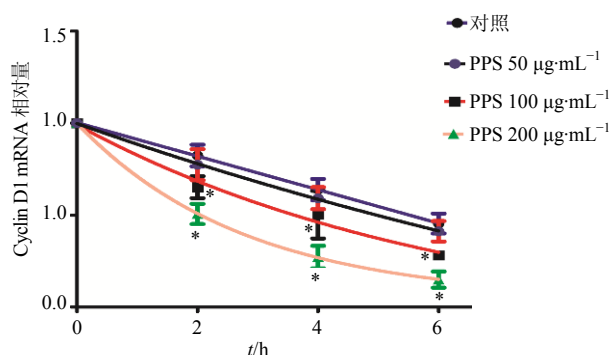


图 5 PPS 对 A549 细胞 Cyclin D1 mRNA 稳定性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effect of PPS on stability of Cyclin D1 mRNA in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

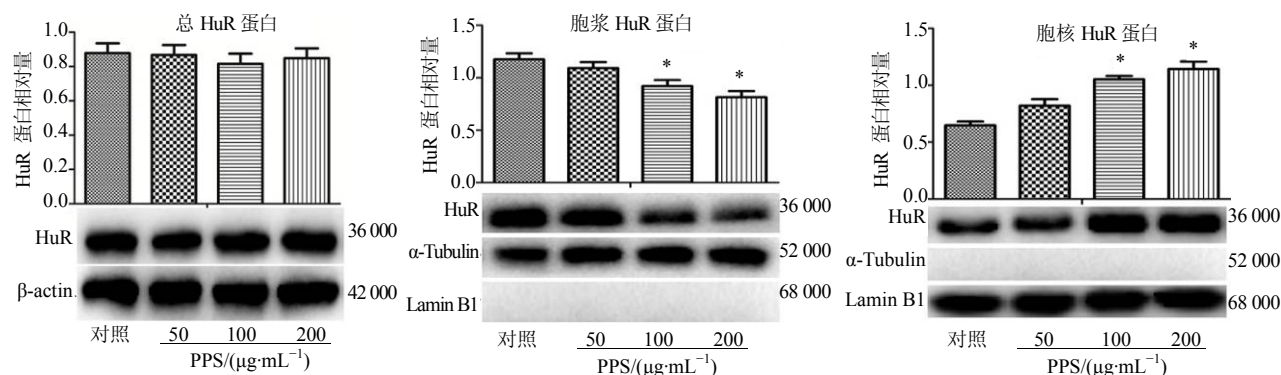


图 6 PPS 对 A549 细胞 HuR 蛋白亚细胞定位的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effect of PPS on subcellular distribution of HuR protein in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

细胞增殖是由于细胞生长和细胞分裂而导致细胞数目的增加, 真核细胞的细胞周期分为间期和分裂期, 间期又分为 G_1 期、S 期、 G_2 期。本实验通过 MTT 研究显示, PPS 可抑制 A549 细胞的增殖; 流式细胞周期分析也显示 PPS 可抑制 A549 细胞的增殖指数, 中、高剂量 PPS 组细胞 G_1 期比例明显升高 ($P < 0.05$), 而 G_2 期和 S 期细胞比例明显降低 ($P < 0.05$), 增殖指数明显下降 ($P < 0.05$), 提示 PPS 可抑制 A549 细胞 G_1 期向 S 期转换。

在真核细胞细胞周期的调控中, Cyclin D1 是调控 G_1 期向 S 期转化的重要蛋白, 能和细胞周期依赖激酶形成蛋白复合体, 最终使细胞通过 G_1/S 控制点, 进入 DNA 合成的 S 期。研究表明, Cyclin D1 基因是一种原癌基因, 在多种肿瘤中发现了 Cyclin D1 基因表达升高, 包括肺癌、乳腺癌、膀胱癌、甲状腺癌等。本研究显示, 中、高剂量的 PPS 可降低 A549

细胞 Cyclin D1 mRNA 的量, 也可降低 Cyclin D1 蛋白的表达。因此推测 PPS 抑制 A549 细胞增殖的作用可能与其降低 Cyclin D1 蛋白的表达有关。

mRNA 是蛋白质生物合成的模板, 在真核生物基因表达的转录后水平调控中, mRNA 稳定性起重要作用, 其机制主要通过影响 mRNA 的降解速率影响蛋白质的翻译效率。放线菌素 D 是一种最常用的基因转录抑制剂^[6], 能嵌合于 DNA 双链内与鸟嘌呤基团结合, 抑制 DNA 依赖的 RNA 聚合酶活力, 干扰细胞的转录, 从而抑制 mRNA 合成。放线菌素 D 抑制了 DNA 的转录为 mRNA 的过程, 则 mRNA 的水平只与 mRNA 的降解速度有关, 此时 mRNA 降解的速度可反映其稳定性。本实验研究表明, 中、高剂量 PPS 组细胞的 Cyclin D1 mRNA 的稳定性较对照组细胞明显降低, 与之相应的 Cyclin D1 mRNA 的水平及 Cyclin D1 蛋白表达量下降, 推测 PPS 导致的 Cyclin D1 mRNA 的稳定性下降减少了用于翻译的 mRNA 的

模板量,最终使 Cyclin D1 蛋白表达水平降低。

真核生物的 RNA 转录在细胞核内完成,而翻译成蛋白质在胞质中完成,故合成的 mRNA 需要转运至胞质合成蛋白质,在此过程中,mRNA 常受到核酸酶的破坏而降解。在此过程中,ARE(AU-rich element)结构很重要。ARE 是位于 mRNA 3'端非翻译区(3'-untranslated regions, 3'-UTR)的一类十分重要的顺式调控元件,常见的有 UUAUUUAUU 和 AUUUA 重复序列 2 种形式^[7]。HuR 是一个重要的 RNA 结合蛋白,与 mRNA 有高度亲和性,直接或间接结合 ARE 结构而调控 mRNA 的降解^[8-10]。HuR 可在细胞核和细胞浆之间穿梭,静息状态下 HuR 多定位于核内,在细胞外信号作用下,胞浆中 HuR 蛋白量增高,并通过 RNA 识别基序(RRM)与多种 mRNA 3'-UTR 的 ARE 结合,使 mRNA 在由胞核转运至胞浆的过程中免受核酸酶降解,从而增加 mRNA 稳定性^[11-13]。Cyclin D1 mRNA 的 3'-UTR 含有较多的 ARE 结构,目前已发现胞浆 HuR 可参与 Cyclin D1 mRNA 稳定性的调控^[13-15]。

本实验研究表明,PPS 作用于 A549 细胞时,胞核内的 HuR 水平升高、胞浆内 HuR 水平降低,细胞内总的 HuR 蛋白没有明显变化,故 PPS 可以改变 HuR 在细胞内的定位。而胞浆 HuR 水平对 Cyclin D1 mRNA 稳定性起重要作用,本实验中,PPS 作用后 A549 细胞胞浆 HuR 水平下降,Cyclin D1 mRNA 的稳定性也下降,提示二者之间的相关性,即在 PPS 作用后,Cyclin D1 mRNA 的稳定性下降可能是由于胞浆 HuR 水平的下降引起。而 Cyclin D1 mRNA 的稳定性下降最终导致 Cyclin D1 蛋白的表达量下降及细胞增殖的抑制。

综上所述,本研究结果证实 PPS 可以抑制 A549 细胞的增殖,此作用可能是因为 PPS 减少 HuR 在 A549 细胞胞浆内表达,降低 Cyclin D1 mRNA 的稳定性和 Cyclin D1 蛋白表达而引起。然而,mRNA 的稳定性受到多种因素的调节,要想肯定 PPS 通过改变 HuR 在细胞内定位而降低 Cyclin D1 mRNA 的稳定性之间的相关性,还需要通过免疫共沉淀等方法确定其二者之间的关系,本课题组将继续深入研究。

参考文献

[1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(1): 5-29.

- [2] 刘嘉湘. 肺癌的中医治疗进展 [J]. *中国肿瘤*, 2002, 11(6): 326-329.
- [3] 李向晖. 中西医结合治疗晚期非小细胞肺癌临床观察 [J]. *新中医*, 2015, 47(7): 129-131.
- [4] 嵇冰, 周维顺, 张峰. 周维顺教授治疗肺癌经验拾萃 [J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(3): 639-641.
- [5] 李心群, 许文. 猪苓多糖通过 Toll 样受体 4 对小鼠骨髓来源树突状细胞作用研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(1): 118-123.
- [6] Wu H, Zhu H, Li X, *et al*. Induction of apoptosis and cell cycle arrest in A549 human lung adenocarcinoma cells by surface-capping selenium nanoparticles: an effect enhanced by polysaccharide-protein complexes from *Polyporus rhinocerus* [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(41): 9859-9866.
- [7] He Y, Zhang X, Zeng X, *et al*. HuR-mediated posttranscriptional regulation of p21 is involved in the effect of *Glycyrrhiza uralensis* licorice aqueous extract on polyamine-depleted intestinal crypt cells proliferation [J]. *J Nutr Biochem*, 2012, 23(10): 1285-1293.
- [8] Mochizuki U, Murphy C J, Brandt J D, *et al*. Altered stability of mRNAs associated with glaucoma progression in human trabecular meshwork cells following oxidative stress [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(4): 1734-1741.
- [9] Sun W, Song L, Ai T, Zhang Y, *et al*. Prognostic value of MET, cyclin D1 and MET gene copy number in non-small cell lung cancer [J]. *J Biomed Res*, 2013, 27(3): 220-230.
- [10] Takeuchi O. HuR keeps interferon- β mRNA stable [J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(5): 1296-1299.
- [11] Khabar K S. Post-transcriptional control during chronic inflammation and cancer: a focus on AU-rich elements [J]. *Cell Mol Life Sci: CMLS*, 2010, 67(17): 2937-2955.
- [12] Barreau C, Paillard L, Osborne H B. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? [J]. *Nucl Acids Res*, 2005, 33(22): 7138-7150.
- [13] Kakuguchi W, Kitamura T, Kuroshima T, *et al*. HuR knockdown changes the oncogenic potential of oral cancer cells [J]. *Mol Cancer Res: MCR*, 2010, 8(4): 520-528.
- [14] Nguyen-Chi M, Morello D. Aberrant regulation of mRNA 3' untranslated region in cancers and inflammation [J]. *Med Sci*, 2008, 24(3): 290-296.
- [15] Briata P, Ilengo C, Corte G, *et al*. The Wnt/beta-catenin-Pitx2 pathway controls the turnover of Pitx2 and other unstable mRNAs [J]. *Mol Cell*, 2003, 12(5): 1201-1211.