

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.11.001

· 基础研究 ·

PHD1 通过下调 NF- κ B 介导的 cyclinD1 的表达抑制肺癌细胞的生长和增殖 *谢 晓 梅 举[△] 肖海波 丁芳宝 钟 竑 朱家全 马 南

(上海交通大学医学院附属新华医院心胸外科 上海 200092)

摘要 目的:探讨 PHD1 在肺癌中的功能,并进一步研究其分子机制,为肺癌的治疗寻找新的靶点。**方法:**选取人肺癌细胞 A549,以脂质体为载体一方面过表达 PHD1,另一方面合成设计靶向 PHD1 的 siRNA 沉默 PHD1,利用荧光素酶检测 NF- κ B 的活性,分别用 western blot 和 real-time PCR 检测 cyclinD1 的表达水平。在 A549 细胞中过量稳定表达带 GFP 标记的 PHD1,流式细胞仪检测细胞周期变化,测量细胞的生长曲线,并将细胞注射到裸鼠皮下观察其成瘤情况。**结果:**过表达 PHD1 可明显抑制 NF- κ B 的活性和 I κ B α 的降解,降低 cyclin D1 的 mRNA 和蛋白表达水平;而干扰 PHD1 的表达可显著增加 NF- κ B 的活性,并上调 cyclin D1 的 mRNA 和蛋白表达水平,而不影响 cyclinE1。过表达 I κ B α SR 可以阻止干扰 PHD1 引起的 cyclinD1 mRNA 水平的上调。过表达 PHD1 可引起细胞周期的停滞,显著抑制细胞的增殖和移植瘤的生长。**结论:**PHD1 可能通过下调 NF- κ B 介导的 cyclinD1 的表达抑制肺癌细胞的生长和增殖。

关键词: 肺癌;细胞增殖;PHD1;Cyclin;NF- κ B

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)11-2001-05

PHD1 Inhibits NF- κ B Mediated CyclinD1 Expression and Proliferation of Lung Cancer Cells*XIE Xiao, MEI Ju[△], XIAO Hai-bo, DING Fang-bao, ZHONG Hong, ZHU Jia-quan, MA Nan

(Cardiothoracic Surgical, Xin Hua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200092, China)

ABSTRACT Objective: To find new target for lung cancer treatment through investigating the function and the mechanism of PHD1 in lung cancer cells. **Methods:** PHD1 was over expressed using the lipidosome or silenced using siRNA in A549 cells, then NF- κ B activity was detected by luciferase assay and the expression level of cyclinD1 was measured by real-time PCR and western blot. The A549 stable cell line which expresses GFP-PHD1 was established and the cell cycle and cell growth were analyzed by flow cytometry. Finally, the growth of tumor was observed after injecting cells subcutaneously to the nude mice. **Results:** Overexpression of PHD1 significantly inhibited the NF- κ B activity and degradation of I κ B α , and decreased the mRNA and protein expression of cyclinD1; Conversely, knocking down PHD1 significantly increased the NF- κ B activity and up regulated the mRNA and protein expression of cyclinD1, but it had no effect on the expression of cyclinE1. Over expression of I κ B α SR inhibited the up regulation of cyclinD1 mRNA level induced by knocking down of PHD1. Over expression of PHD1 caused cell cycle arrest and significantly inhibited the cell proliferation and tumor growth. **Conclusion:** Over expression of PHD1 might inhibit the growth and proliferation of lung cancer cells through down-regulating the cyclinD1 expression, which was mediated by NF- κ B.

Key words: Lung cancer; Cell proliferation; PHD1; Cyclin; NF- κ B

Chinese Library Classification: R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)11-2001-05

前言

NF- κ B 是一个与肿瘤发生密切相关的核转录因子,可通过调控相关基因的转录抑制肿瘤细胞的凋亡和促进其增殖,从而促进肿瘤的发生和发展^[1]。在细胞内,NF- κ B 蛋白被其抑制剂 I

κ B 家族扣留在细胞质中处于失活状态^[2]。炎症刺激等可促进 I κ B 激酶(IKK)的激活,进而磷酸化 I κ B,导致 I κ B 和 NF- κ B 解离,被解离的 NF- κ B 从细胞质进入细胞核,进一步诱导其下游基因的表达式^[3,4]。有文献报导,在 HeLa 细胞中干扰脯氨酰羟甲基化酶 1(proline hydroxylase,PHD1)的表达可以激活 NF- κ B^[5],

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81071924)

作者简介:谢晓(1980-),男,硕士,主治医师,主要研究方向:胸部肿瘤的基础与临床研究,E-mail:joe99_1999@126.com

[△]通讯作者:梅举,电话:13801669185,E-mail:ju_mei63@126.com

(收稿日期:2013-10-11 接受日期:2013-11-05)

而表达 PHD1 可抑制结肠癌细胞的生长^[9]。这些结果提示 PHD1 可能在肿瘤发生发展的过程中也发挥了一定的作用,但关于 PHD1 在肺癌中发挥的作用尚不明确。因此,本研究旨在探讨 PHD1 在肺癌细胞中的功能,并进一步研究其分子机制,为肺癌的治疗寻找新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肺癌细胞 A549 和人肾 HEK293T 细胞购于中国科学院上海细胞库。

1.1.2 实验动物 裸鼠[BALB/cA-nu(nu/nu)]12 只,雌性,鼠龄 4-5 周。

1.1.3 试剂 DMEM 培养基和胎牛血清购买自 Gibco 公司;PCR 和 Real-Time PCR 反应试剂盒购自 takara 公司;Lipofectamin 2000 和 TRIzol 购自 Invitrogen 公司;siRNA 由吉玛公司合成,PCR 引物在上海生工合成; β -actin 抗体购自 sigma 公司,PHD1 抗体购自 Novus Biologicals 公司,myc 和 cyclinD1 抗体为 Santa Cruz 公司的产品;DMOG 购自 Frontier Scientific;人 TNF- α 重组蛋白通过 R&D 系统制备。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和质粒转染 人肺癌细胞 A549 和 HEK293T 细胞用含有 10% 血清的 DMEM 在 5% 的 CO₂ 条件下培养,传代时用 0.25% 的胰酶消化。做瞬时转染用 Lipofectamine-2000 和质粒按照说明书所述步骤进行。稳定转染按如下步骤进行:用 GFP/PHD1 转染细胞,然后用 800 μ g/ml 的 G418(Sigma)筛选 2 周,稳转细胞系用 western blot 鉴定。

1.2.2 Western blot 检测细胞内蛋白表达水平 收集细胞,0.3% NP40 4℃ 摇床 30 min 裂解细胞,13,000 rpm 4℃ 离心 15

min 去除细胞碎片,取上清分光光度计测定蛋白浓度,加 5 $\times$ SDS loading buffer,恒温加热器 99℃ 加热 10 min,制备蛋白样品。上样量 30 μ g,经 50 g/L 的 SDS-PAGE 浓缩胶和 100 g/L SDS/PAGE 分离胶,分别予 80V 恒压电泳 30 min,120V 恒压电泳 90 min,再用 300 mA 恒流 1h 电转移至硝酸纤维素膜上。之后用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入一抗,4℃ 摇床孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加二抗 IgG (1:3000)抗体室温摇动 1 h。ECL 发光法显影定影,胶片扫描。用凝胶图象处理系统分析目标带的分子质量和净光密度值。

1.2.3 Real time PCR 检测靶基因 PHD1 的表达水平 收集分别用 si-control 和 si-PHD1 转染的细胞,Trizol 法提取总 RNA 后采用 Real time PCR 试剂盒检测 PHD1 基因的表达。

siRNA 的序列:

siControl: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'

siPHD1: 5'-GGAUGGGAGUGGAGAGUUATT-3'

GAPDH 作为对照,引物序列如下:

GAPDH: 5'-CCATCT TCCAGGAGCGAGATC-3'(上游引物)

5'-GCCTTCTCCATGGTGGTGAA-3'(下游引物)

PHD1: 5'-AGATTGCCTGGGTGGAAG-3'(上游引物)

5'-TTGCCTGGGTAACACGCC-3'(下游引物)

1.2.4 异种移植肿瘤生长实验(动物实验) 将 4-5 周的雄性裸鼠[BALB/cA-nu(nu/nu)]分成两组,分别在两侧皮下注射稳定表达 GFP 及 PHD1 的 A549 细胞系 3×10^6 个。成瘤后每两天测量体积,实验结束后,取出皮下肿瘤测量并检测。

1.3 统计学分析

数据分析均取自三次独立实验,用 SPASS 13.0 软件进行统计分析, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

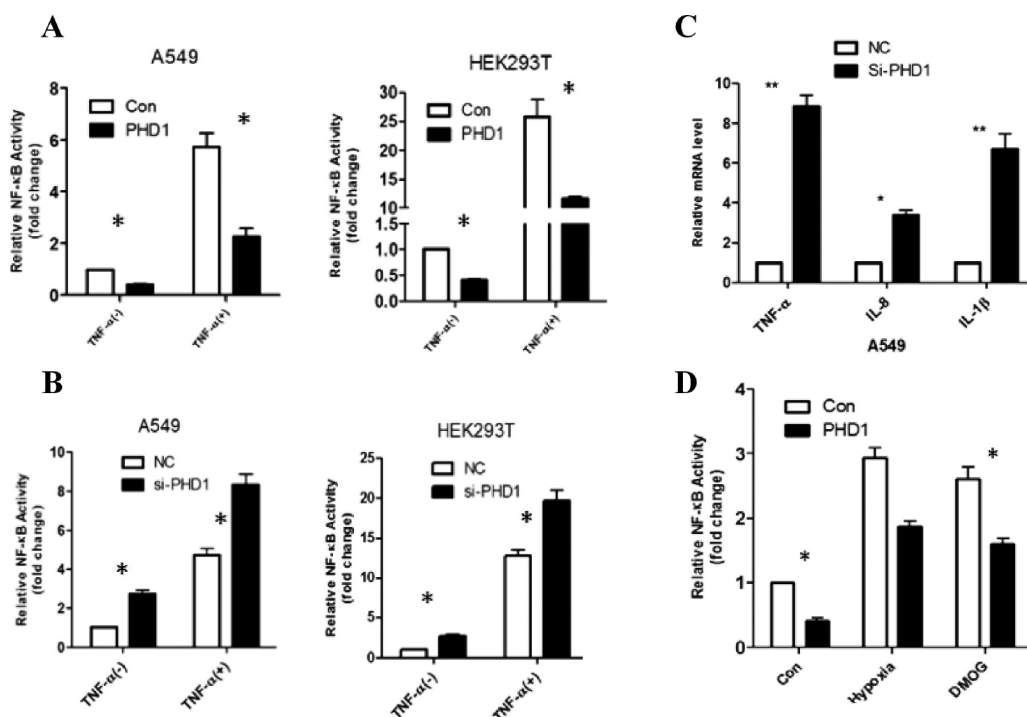


图1 PHD1 对 A549 肺癌细胞中 NF- κ B 活性的影响

Fig.1 Effect of PHD1 on the NF- κ B activity of A549 cells

2 结果

2.1 PHD1 对 A549 肺癌细胞中 NF- κ B 活性的影响

在 PHD1 过表达的 A549 稳定转染细胞株中, NF- κ B 的活性较正常对照组显著降低; 而 TNF- α 诱导可升高正常 A549 细胞中 NF- κ B 的活性, 但 PHD1 过表达可明显抑制 TNF- α 诱导的 NF- κ B 活性的增加, 在 HEK293T 细胞中也得到了相同的结果, 见图 1A。进一步发现采用 siRNA 抑制 A549 细胞中 PHD1 的表达, 可以提高其 NF- κ B 的活性以及 TNF- α 、IL-8、IL-1 β 的 mRNA 表达, 也可提高 TNF- α 诱导所致的 NF- κ B 活性的增加, 在 HEK293T 细胞中也得到了相同的结果, 见图 1B 和 1C。缺氧可诱导 PHD1 的表达^[6], 随后, 我们检测了 PHD1 对缺氧诱导的 NF- κ B 活性的影响。如图 1D 所示: 过表达 PHD1 可以抑制缺氧诱导的 NF- κ B 的激活。PHD3 也有类似的功能^[7], PHD 蛋

白的抑制剂 DMOG 也与缺氧一样能激活 NF- κ B 的活性, 而且这个效果可以被过表达 PHD1 所抑制(图 1D)。

2.2 PHD1 对 A549 肺癌细胞中 cyclin D1 表达的影响

本研究也检测了 PHD1 对 A549 肺癌细胞中 cyclin D1 表达的影响。结果显示: 在 A549 和 HEK293T 细胞中过表达 PHD1 可显著下调 cyclin D1 的蛋白水平(图 2A); 而通过 siRNA 降低 PHD1 的蛋白表达可以显著增加 cyclin D1 的蛋白表达(图 2B)。接下来, 我们想知道 PHD1 是否通过影响 cyclin D1 的 mRNA 水平来调控 cyclin D1 的蛋白表达。通过 Real-time PCR 实验, 发现通过 siRNA 降低 PHD1 的蛋白表达可显著增加 cyclin D1 的 mRNA 水平(图 2C), 而过表达 PHD1 的蛋白表达下调了 cyclin D1 的 mRNA 水平(图 2D), 但对 cyclinE1 的 mRNA 水平则没有影响(图 2E)。由此可见: PHD1 可通过影响 cyclin D1 的转录进而调控其蛋白表达。

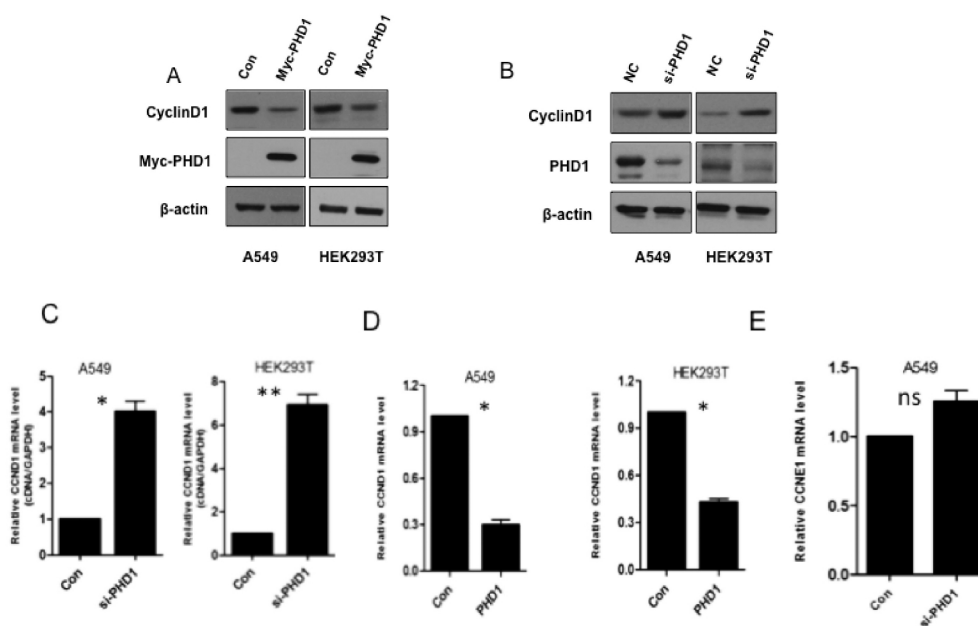


图2 PHD1 对 A549 肺癌细胞中 Cyclin D1 表达的影响

Fig.2 Effect of PHD1 on the cyclinD1 expression in A549 cells

2.3 PHD1 至少部分抑制 NF- κ B 的活性减少 cyclin D1 的表达

既往的研究^[8]和本实验的结果(图2)表明 PHD1 可能通过影响 NF- κ B 的活性调控 cyclin D1 的表达。因此, 随后我们检测了 NF- κ B 的抑制蛋白 I κ B α 的表达情况。与 NF- κ B 的荧光素酶实验结果一致, 我们发现在 A549 和 HEK293T 细胞中, 通过 siRNA 降低 PHD1 的蛋白表达可以促进 I κ B α 的降解(图 3A),

从而减少 I κ B α 对 NF- κ B 的抑制作用, 激活 NF- κ B, 同时上调了 cyclin D1 的 mRNA 水平(图 3B)。而过表达 I κ B α -SR(I κ B α 的显性失活突变体)可以抑制 siRNA 降低 PHD1 的蛋白表达所致的 cyclin D1 的 mRNA 水平上调(图 3B)。这些结果表明 PHD1 至少部分通过抑制 NF- κ B 的活性进而减少 cyclin D1 的表达。

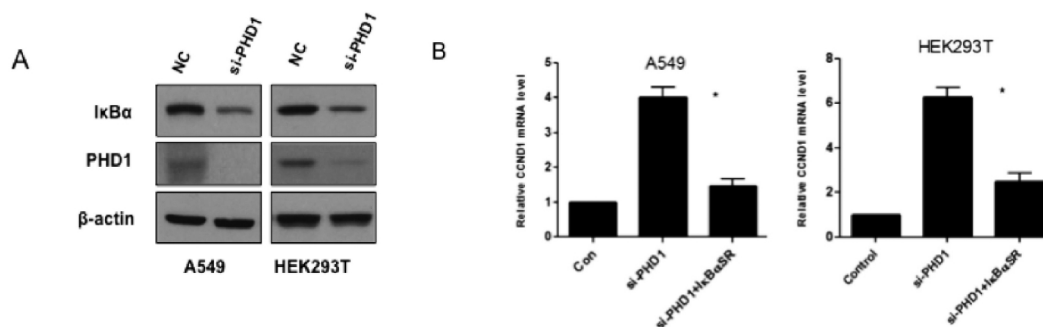


图3 PHD1 至少部分抑制 A549 细胞中 NF- κ B 的活性减少 cyclin D1 的表达

Fig.3 PHD1 decreased cyclinD1 expression at least partly through inhibiting the activity of NF- κ B in A549 cells

2.4 PHD1 抑制 A549 肺癌细胞的增殖和肿瘤生长

众所周知, cyclin D1 是 G1/S 期转换的关键因子。因此, 本研究检测了 PHD1 对 A549 细胞周期和增殖的影响, 结果表明过表达 PHD1 显著抑制了 G1/S 期的转换, 而对 G2/M 期则几

乎无影响(图 4A), 并可显著抑制 A549 细胞的增殖(图 4B)。进一步检测 PHD1 对 A549 细胞异种移植肿瘤生长的影响, 结果显示 PHD1 的稳定表达显著抑制了肺癌细胞异种移植肿瘤的生长(图 4C)。

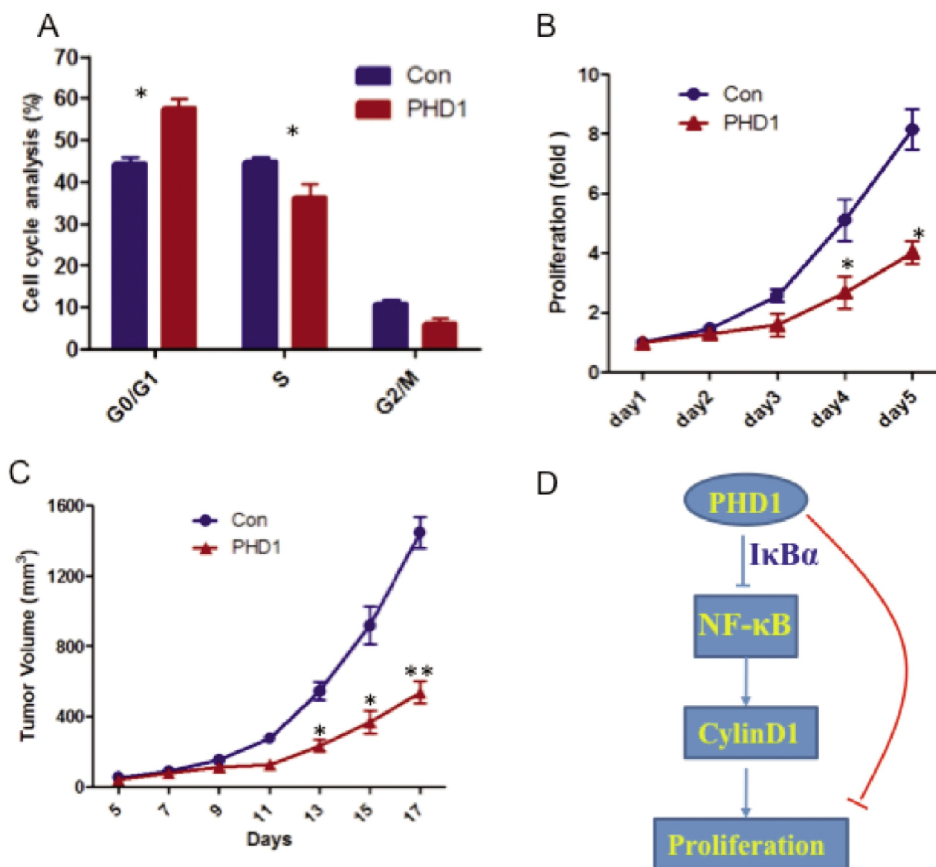


图 4 PHD1 可抑制 A549 肺癌细胞增殖和肿瘤生长

Fig.4 PHD1 inhibited the proliferation of A549 cells and xenografted tumor growth

3 讨论

在缺氧的情况下, PHD1 通过 NF-κB 途径参与炎症反应^[9-11]。Hela 细胞内 PHD1 的蛋白表达降低可以激活 NF-κB, 推测 PHD1 可能通过羟基化 IKKβ 调控 NF-κB^[12], 进而影响 TNF-α 和 IL-1β 等炎症因子的表达^[13-15]。本研究结果表明: 在 A549 肺癌细胞中, 通过 siRNA 降低 PHD1 的蛋白表达可激活 NF-κB 以及上调 TNF-α、IL-8、IL-1β 的 mRNA 表达(图 1)。这与 Scholz 等^[16]观点一致, 即药物羟化酶抑制剂降低免疫反应, PHD1 调节 IL-1β 诱导的 NF-κB 途径, 进而调节炎症基因的表达。Adluri 等^[17]研究中, PHD1 的沉默通过 NF-κB 途径减弱了缺血再灌注心肌中的损伤; Van Welden 等^[18]研究也表明 PHD1 在炎症性肠病中高表达, 与炎症因子 IL-8 和 TNF-α 的表达相关。这些研究结果都表明 PHD1 通过 NF-κB 途径调控炎症反应。

由于 PHD1 在缺氧情况下可被诱导表达^[19], 且组织缺氧^[10]和 PHD1^[9]通过 NF-κB 途径分别参与天然免疫和炎症反应已经被证明, 因此本研究检测了缺氧和 PHD 蛋白抑制剂 DMOG 对 NF-κB 的影响, 结果表明 DMOG 和缺氧一样能激活 NF-κB 的活性, 而且此作用可被过表达 PHD1 所抑制。

NF-κB 是天然免疫反应的重要转录因子, 其活性被多个反

馈循环控制, 其中两个最重要的负反馈调控循环分别是 IκBα 直接与 NF-κB 绑定的信号通路, 以及 A20 介导的 IKK 活性减弱进而导致 IκBα 合成下降的信号通路^[15]。在 A20 缺失的细胞内, NF-κB 的正反馈循环使得 TNF-α 的短波刺激都造成了 NF-κB 的持久活性^[15], 这与本研究 TNF-α 诱导可升高 A549 细胞中 NF-κB 的活性一致。然而, PHD1 过表达明显抑制了 TNF-α 诱导的 NF-κB 活性的增加, 推测 PHD1 可能通过 IKKβ/IκBα 负反馈信号通路调控 NF-κB^[9], 过表达 PHD1 可抑制肺癌细胞中 IκBα 的降解, 从而抑制 NF-κB 的活性^[15, 20]。

研究显示 PHD1 可能是一个肿瘤抑制因子, 其过表达可抑制结肠癌细胞的生长^[9]。因此, 我们检测了 cyclin 的表达和细胞周期, 结果显示 PHD1 过表达可抑制 cyclin 蛋白的表达和细胞周期。而 Hinz 等^[8]研究证明 NF-κB 途径可调控 cyclinD1 表达; Liu 等^[20]认为 NF-κB 通过调节 cyclinD1 参与了胆脂瘤上皮细胞的增生。因此, 本研究检测了 IκBα 的活性, 结果显示在 A549 和 HEK293T 细胞中, 通过 siRNA 降低 PHD1 的蛋白表达可以促进 IκBα 的降解, 从而减少 IκBα 对 NF-κB 的抑制作用^[21], 激活 NF-κB, 上调 cyclin D1 的 mRNA 水平。这些结果证实了 PHD1—IκBα—NF-κB—cyclinD1 这一通路, 表明 PHD1 至少部分通过抑制 NF-κB 的活性进而减少 cyclin D1 的表达。

本研究结果也证明 PHD1 可以显著抑制 A549 细胞的增殖及肿瘤生长。众所周知, NF- κ B 的激活可以阻止细胞凋亡, 导致治疗的效果很差^[12, 23, 24]。NF- κ B 是一个常规的潜在治疗靶点, PHD1 可以通过不同的方面抑制 NF- κ B, 提示其可以作为一个肺癌治疗的新靶点。

参考文献(References)

- [1] Maniatis T. A ubiquitin ligase complex essential for the NF-kappaB, Wnt/Wingless, and Hedgehog signaling pathways [J]. *Genes & development*, 1999, 13(5):505-510
- [2] Baeuerle P A, Baltimore D. NF-kB: Ten years after [J]. *Cell*, 1996, 87 (1): 13-20
- [3] Zhou B R, Zhang J A, Zhang Q, et al. Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokines interleukin-6, interleukin-1 β , and tumor necrosis factor- α via a NF- κ B-dependent mechanism in HaCaT keratinocytes[J]. *Mediators of Inflammation*, 2013, 2013:1-13
- [4] Karin M, Greten F R. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5(10): 749-759
- [5] Cummins E P, Berra E, Comerford K M, et al. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates IkappaB kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NFkappaB activity [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(48): 18154-18159
- [6] Erez N, Milyavsky M, Eilam R, et al. Expression of prolyl-hydroxylase-1 (PHD1/EGLN2) suppresses hypoxia inducible factor-1alpha activation and inhibits tumor growth [J]. *Cancer Research*, 2003, 63(24):8777-8783
- [7] Xue J, Li X, Jiao S, et al. Prolyl hydroxylase-3 is down-regulated in colorectal cancer cells and inhibits IKKbeta independent of hydroxylase activity[J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(2):606-615
- [8] Hinz M, Krappmann D, Eichten A, et al. NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1999, 19(4):2690-2698
- [9] Taylor CT, Cummins EP. The role of NF-kappaB in hypoxia-induced gene expression[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1177:178-184
- [10] Schaible B, Schaffer K, Taylor CT. Hypoxia, innate immunity and infection in the lung [J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2010, 174: 235-243
- [11] Schaible B, McClean S, Selfridge A, Broquet A, Asehnoun K, Taylor CT, Schaffer K. Hypoxia modulates infection of epithelial cells by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2):e56491
- [12] Popivanova B K, Kitamura K, Wu Y, et al. Blocking TNF- α in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2008, 118(2): 560-570
- [13] Kim B H, Roh E, Lee H Y, et al. Benzoxathiole derivative blocks lipopolysaccharide-induced nuclear factor-kappaB activation and nuclear factor-kappaB-regulated gene transcription through inactivating inhibitory kappaB kinase beta [J]. *Molecular Pharmacology*, 2008, 73(4):1309-1318
- [14] Lujambio A, Akkari L, Simon J, et al. Non-cell-autonomous tumor suppression by p53[J]. *Cell*, 2013, 153(2): 449-460
- [15] Pekalski J, Zuk P J, Kochański M, et al. Spontaneous NF- κ B Activation by Autocrine TNF α Signaling: A Computational Analysis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):e78887
- [16] Scholz CC, Cavadas MA, Tambuwala MM, Hams E, Rodríguez J, Kriegshiem AV, Cotter P, Bruning U, Fallon PG, Cheong A, Cummins EP, Taylor CT. Regulation of IL-1 β -induced NF- κ B by hydroxylases links key hypoxic and inflammatory signaling pathways[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(46):18490-18495
- [17] Adluri RS, Thirunavukkarasu M, Dunna NR, et al. Disruption of hypoxia-inducible transcription factor-prolyl hydroxylase domain-1 (PHD-1/-) attenuates ex vivo myocardial ischemia/reperfusion injury through hypoxia-inducible factor-1 α transcription factor and its target genes in mice[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(7):1789-1797
- [18] Van Welden S, Laukens D, Ferdinande L, et al. Differential expression of prolyl hydroxylase 1 in patients with ulcerative colitis versus patients with Crohn's disease/infectious colitis and healthy controls[J]. *J Inflamm (Lond)*, 2013, 10(1): 36
- [19] Fong G H, Takeda K. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2008, 15 (4): 635-641
- [20] Kearns J D, Basak S, Werner S L, et al. IkBE provides negative feedback to control NF-kB oscillations, signaling dynamics, and inflammatory gene expression [J]. *Journal of Cell Biology*, 2006, 173 (5):659-664
- [21] Liu W, Yin T, Ren J, et al. Activation of the EGFR/Akt/NF- κ B/cyclinD1 survival signaling pathway in human cholesteatoma epithelium[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2013 Mar 5 [Epub ahead of print]
- [22] Hayden M S, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB [J]. *Genes & development*, 2004, 18: 2195-2224
- [23] Hardwick J C, van den Brink G R, Offerhaus G J, et al. NF-kappaB, p38 MAPK and JNK are highly expressed and active in the stroma of human colonic adenomatous polyps [J]. *Oncogene*, 2001, 20 (7): 819-827
- [24] Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow?[J]. *Lancet*, 2001, 357(9225): 539-545