

IL-1 β 促进肺鳞癌细胞增殖的机制研究

王伟^{1,2}, 罗朋¹, 王保龙¹

摘要 目的 探究白细胞介素-1 β (IL-1 β) 对肺鳞癌细胞增殖的影响及其机制。方法 利用 CBA 试剂盒检测肺鳞癌患者($n=20$) 血浆和健康对照者($n=20$) 血浆中 IL-1 β 含量。运用平板克隆形成实验评价 IL-1 β 对肺鳞癌细胞增殖的影响。qRT-PCR 检测 IL-1 β 对肺鳞癌 SK-MES-1 细胞内 miR-223-3p 表达的影响。TargetScan 软件预测、双荧光素酶报告实验和 Western blot 验证 miR-223-3p 潜在的下游靶基因。CCK-8 法检测下调 p27kip1 对细胞增殖的影响。共聚焦显微镜观察肺鳞癌 SK-MES-1 细胞 p27kip1 的分布情况。Western blot 检测 IL-1 β 对肺鳞癌 SK-MES-1 细胞 p27kip1 表达的影响。结果 肺鳞癌患者血浆中 IL-1 β 含量中位数为 11.96(7.55, 29.20) ng/L, 高于健康对照组 2.52(1.64, 3.48) ng/L, 差异有统计学意义($Z=-5.06, P<0.001$); IL-1 β 可促进肺鳞癌 SK-MES-1 细胞克隆形成并使细胞内 miR-223-3p 表达降低; miR-223-3p 可直接与 CDKN1B(p27kip1) 的 3'UTR 直接结合进而抑制其表达; 下调 p27kip1 后, 肺鳞癌 SK-MES-1 细胞增殖能力降低; p27kip1 主要分布于肺鳞癌 SK-MES-1 细胞的胞质, IL-1 β 可促进 p27kip1 表达。结论 IL-1 β 通过调控肺鳞癌细胞 miR-223-3p 和 p27kip1 表达促进细胞增殖。

关键词 肺鳞癌; 白细胞介素-1 β ; miR-223-3p; p27kip1

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)02-0254-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.02.019

慢性炎症和感染是促进肿瘤发展的重要因素^[1]。流行病学资料^[2]显示,慢性阻塞性肺疾病、肺纤维化、吸烟、空气污染、肺炎和职业粉尘等与非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC) 的发生发展密切相关,提示慢性炎症在 NSCLC 的发病机制中发挥重要作用。白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 作为一个重要的炎症因子,研究^[3]表明其在 NSCLC 患者血清中高表达,且能促进肺腺癌的

增殖和迁移。肺鳞癌是 NSCLC 较常见的病理类型,为进一步探讨 IL-1 β 对肺鳞癌细胞增殖的影响和作用机制,现在采用平板克隆形成实验分析 IL-1 β 对肺鳞癌细胞增殖的影响,并运用 qRT-PCR、Western blot、双荧光素酶报告实验和 CCK-8 实验探讨 IL-1 β 参与肺鳞癌细胞增殖的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料 肺鳞癌 SK-MES-1 细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞中心;胎牛血清购自以色列 Biological Industries 公司;DMEM 高糖培养基购自加拿大 WISENT 公司;流式 CBA IL-1 β 检测试剂盒购自美国 BD 公司;重组人 IL-1 β 购自美国 R&D 公司;抗体购自 Proteintech 公司;CCK-8 细胞增殖检测试剂盒购自南京 Vazyme Biotech 公司;miR-223-3p mimics、Inhibitor、p27kip1 的 siRNA 由上海吉玛公司合成;Lipofectamine 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司;microRNA 逆转录和荧光定量试剂盒购自大连 Takara 公司;miR-223-3p 和 U48 引物由美国 Gene Copoeia 公司设计和合成;CDKN1B 3'UTR 载体和双荧光素酶报告实验检测试剂盒购自美国 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 血浆中 IL-1 β 含量测定 按照 CBA 试剂盒操作步骤进行测定:溶解标准品,进行倍比稀释,每管加入 50 μ l 捕获微球;阳性对照品、阴性对照品和样品按照同样的操作进行,室温避光孵育 3 h,各管加入 1 ml 洗液清洗,弃上清液;加入 300 μ l 洗液上机测定;结果由配套软件进行分析。

1.2.2 细胞培养 SK-MES-1 细胞系用含有 10% FBS 的 DMEM 培养基培养于培养箱中,每 1~2 d 更换培养液并消化传代,培养箱条件为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂。

1.2.3 细胞克隆形成实验 取对数生长期的 SK-MES-1 细胞,以 1 000 个/孔接种于 6 孔板中,每孔加入不同浓度的 IL-1 β ,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的温箱中培养 2 周,每 3 d 更换 1 次含有相应 IL-1 β 浓度的培养基,直至出现肉眼可见的克隆时终止培养。弃培

2019-11-14 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1708085QH220);安徽省科技攻关项目(编号:1604a0802072)

作者单位:¹安徽医科大学附属省立医院检验科,合肥 230001

²阜阳市人民医院医学检验科,阜阳 236004

作者简介:王伟,男,副主任技师;

王保龙,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wbl196555@163.com

培养基后用 PBS 清洗 2 次,每次 3 min。4% 多聚甲醛固定 30 min。0.1% 的结晶紫染色 1 h,细流水缓慢冲洗染液,干燥后低倍镜观察细胞数大于 50 的克隆数并拍照。

1.2.4 qRT-PCR 检测细胞 miR-223-3p 表达 细胞作相应处理后,利用 TRIzol 提取各组细胞 RNA,运用 Takara 逆转录和荧光定量 PCR 试剂盒检测 miR-223-3p 表达,以 U48 作为内参,以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算 miR-223-3p 相对表达量。

1.2.5 Western blot 法检测 p27kip1 蛋白的表达 细胞作相应处理后,用 PBS 洗细胞 3 次,收集细胞,加入 100 μ l 总蛋白提取液提取蛋白,5 \times 上样缓冲液与总蛋白以 5:1 混合后 95 $^{\circ}$ C 加热 5 min。取 25 μ g 蛋白质行凝胶电泳分离。10% 脱脂牛奶封闭 1.5 h 后,加入相应一抗(p27kip1, 1:1 000; GAPDH, 1:1 000; β -actin, 1:1 000) 孵育 4 $^{\circ}$ C 摇床过夜。用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,对应二抗(1:6 000) 孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,于化学发光荧光显像仪上曝光。

1.2.6 细胞转染 将对数生长期的 SK-MES-1 细胞接种到 6 孔培养板中,待细胞汇合 40% ~ 60% 时进行转染。根据 LipofectamineTM 2000 转染试剂说明书进行转染。

1.2.7 CCK-8 检测细胞增殖 收集转染 24 h 后的各组细胞,调整细胞为 5×10^4 个/ml 的单细胞悬液,接种到 96 孔板中,100 μ l/孔,每组做 5 个复孔。待细胞贴壁(37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 12 h) 作为 0 h,向每孔中加入 10 μ l CCK-8 溶液,温箱孵育 1 h 后用酶标仪在 450 nm 和 630 nm 处测量每孔的吸光度(optical density, OD) 值。细胞隔天换液,依次于培养 24、48、72 h 时终止培养,检测增殖状况。绘制生长曲线,以培养时间为横轴,以 OD 值为纵轴。

1.2.8 双荧光素酶报告基因实验 按照 Luciferase Assay Reagent 说明书进行:事先准备好用于转染的分到 96 孔板中的 293T 细胞和目的质粒,待细胞密度达到 50% ~ 70% 为宜;将 p53-3'UTR WT/MUT 目的质粒以及 5 pmol 的 miR-223-3p-mimics/mimics-NC 充分混匀后室温放置(溶液 A),之后将 10 μ l DMEM 与 0.3 μ l 的转染试剂(转染试剂为汉恒生物产品,浓度为 0.8 mg/ml) 充分混匀(溶液 B),室温放置 5 min;将溶液 A 与溶液 B 充分混匀,室温放置 20 min;转染前为细胞换取新鲜培养基,之后将转染混合物加入混匀。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养;转染 6 h 后换取新鲜培养基,转染 48 h 后收集细胞检测。

1.3 统计学处理 本研究应用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。血浆 IL-1 β 含量结果以 $M(P_{25}、P_{75})$ 表示,两组间比较采用秩和检验。其他定量结果比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-1 β 在肺鳞癌患者血浆中高表达 利用 CBA 试剂盒检测肺鳞癌患者和健康对照者血浆中 IL-1 β 含量,结果显示肺鳞癌患者血浆中 IL-1 β 含量中位数为 11.96(7.55, 29.20) ng/L,高于健康对照组 2.52(1.64, 3.48) ng/L,差异有统计学意义($Z = -5.06, P < 0.001$),见图 1。

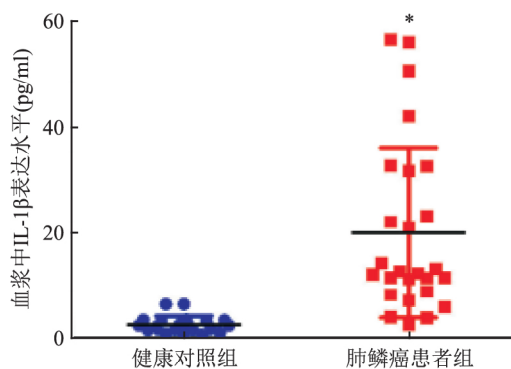


图 1 肺鳞癌患者与健康对照者血浆中 IL-1 β 含量比较($n = 20$)
与健康对照组比较: * $P < 0.05$

2.2 IL-1 β 促进肺鳞癌 SK-MES-1 细胞克隆形成 利用平板克隆形成实验评价 IL-1 β 对肺鳞癌细胞增殖能力的影响。不同浓度的 IL-1 β 作用肺鳞癌 SK-MES-1 细胞 2 周后,由图 2 可知,IL-1 β (100 ng/L) 组、IL-1 β (1 000 ng/L) 组相比于对照组(0 ng/L) 随着 IL-1 β 浓度的增加,细胞克隆数目随之增加,表明 IL-1 β 可以促进肺鳞癌 SK-MES-1 细胞克隆形成。

2.3 IL-1 β 能够降低肺鳞癌 SK-MES-1 细胞内 miR-223-3p 表达 100 ng/L IL-1 β 作用肺鳞癌 SK-MES-1 细胞 48 h 后,应用 qRT-PCR 检测 IL-1 β 对肺鳞癌细胞内 miR-223-3p 表达的影响。结果提示,与对照组相比(0 ng/L) IL-1 β 处理组肺鳞癌 SK-MES-1 细胞内 miR-223-3p 表达降低($t = 26.76, P < 0.001$)。见图 3。

2.4 CDKN1B 是 miR-223-3p 直接作用的靶点 运用 TargetScan 在线软件(<http://www.targetscan.org/>) 预测 miR-223-3p 潜在的下游靶基因,发现 CD-

KN1B 的 3'UTR 有 miR-223-3p 结合位点(图 4A)。为了验证在线数据库预测的 CDKN1B 的 3'UTR 能否与 miR-223-3p 结合,将 miR-223-3p mimics 或 mimics-NC 与 CDKN1B 3'UTR 野生型(WT)或突变型(MUT)载体共转染到 HEK-293T 细胞株中,分别检测 4 组中荧光素酶活性。如图 4B 显示:miR-223-3p mimics 与含有 CDKN1B 3'-UTR 端野生型质粒共转染后,荧光素酶活性受到抑制,提示 miR-223-3p 能够结合 CDKN1B 3'UTR 端。Western blot 实验结果表明:miR-223-3p mimics 组肺鳞癌 SK-MES-1 细胞中 CDKN1B 蛋白(p27kip1)表达量较 mimics-NC 组降低;miR-223-3p Inhibitor 组细胞中 CDKN1B 蛋白(p27kip1)表达量较 Inhibitor-NC 组增加(图 4C)。综上所述,miR-223-3p 可直接靶向作用肺鳞癌 SK-MES-1

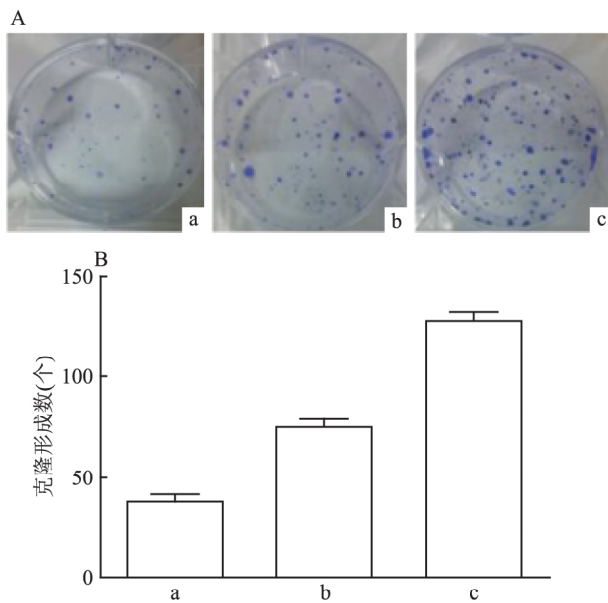


图 2 不同浓度 IL-1β 对肺鳞癌 SK-MES-1 细胞克隆形成的影响
A: 平板克隆形成图; B: 克隆形成数柱状图; a: IL-1β 0 ng/L; b: IL-1β 100 ng/L; c: IL-1β 1 000 ng/L

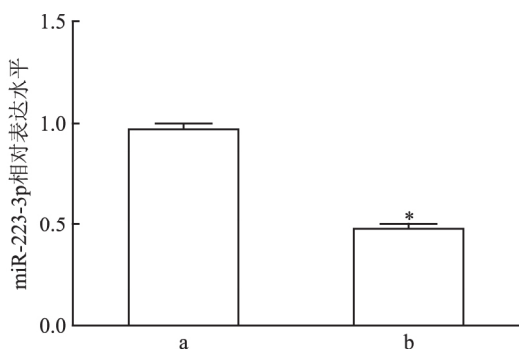


图 3 IL-1β 对肺鳞癌 SK-MES-1 细胞内 miR-223-3p 表达的影响与对照组(IL-1β 0 ng/L)比较: * P < 0.05; a: 0 ng/L; b: 100 ng/L

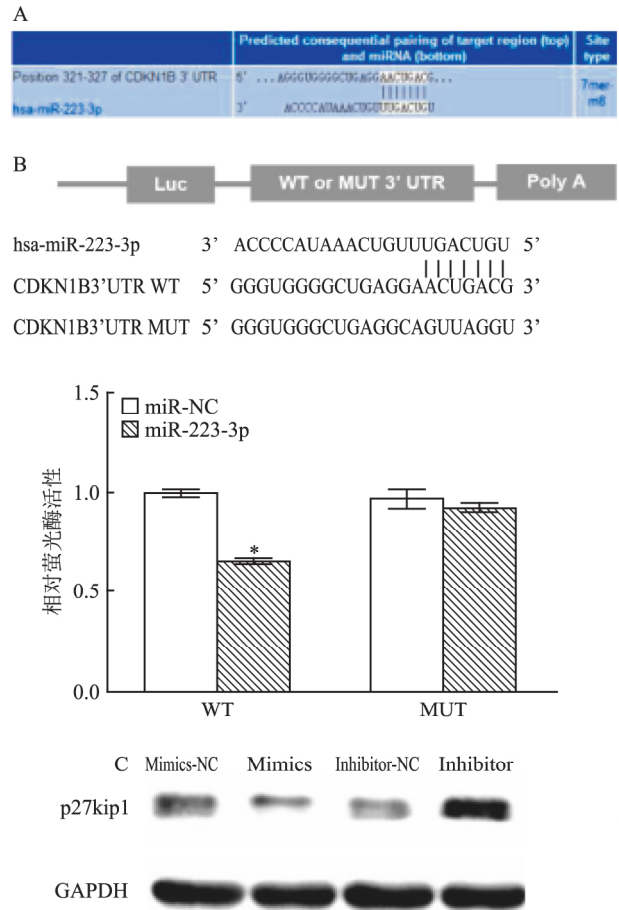


图 4 miR-223-3p 直接作用 CDKN1B 3'UTR 抑制其表达

A: TargetScan 软件预测 CDKN1B 3'UTR 有 miR-223-3p 结合位点; B: 双荧光素酶报告实验验证 miR-223-3p 与 CDKN1B 3'UTR 直接结合;与 miR-NC 比较: * P < 0.05; C: Western blot 检测过表达和敲低 miR-223-3p 后对 p27kip1 表达的影响

细胞 CDKN1B 3'-UTR 抑制其表达。

2.5 IL-1β 促进肺鳞癌 SK-MES-1 细胞 p27kip1 表达 Western blot 检测 IL-1β(100 ng/L) 作用肺鳞癌 SK-MES-1 细胞 48 h 后 p27kip1 表达情况,由图 5A 可知 相比于对照组,IL-1β 处理后细胞 p27kip1 表达随之增加。表明 IL-1β 可以促进细胞 p27kip1 表达。进一步利用共聚焦显微镜观察 p27kip1 分布情况,发现肺鳞癌 SK-MES-1 细胞 p27kip1 主要分布于细胞质。综上所述,IL-1β 促进肺鳞癌 SK-MES-1 细胞增殖可通过降低细胞内 miR-223-3p 表达进而促进 p27kip1 表达。

2.6 下调 p27kip1 表达抑制肺鳞癌 SK-MES-1 细胞增殖 利用 siRNA 下调 p27kip1 表达,CCK-8 检测肺鳞癌 SK-MES-1 细胞增殖,结果提示下调 p27kip1 表达,细胞增殖能力降低(t = 9.50, P = 0.001)。见图 6。

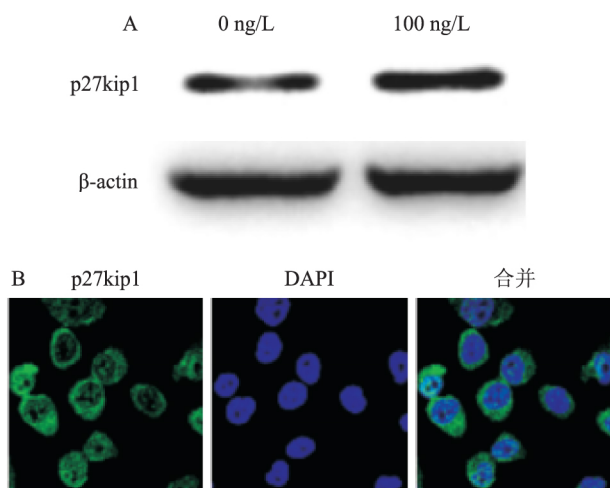


图5 IL-1 β 对肺鳞癌 SK-MES-1 细胞 p27kip1 表达的影响

A: Western blot 检测 IL-1 β 对肺鳞癌 SK-MES-1 细胞 p27kip1 蛋白表达的影响; B: 共聚焦显微镜观察肺鳞癌 SK-MES-1 细胞 p27kip1 分布情况 $\times 400$

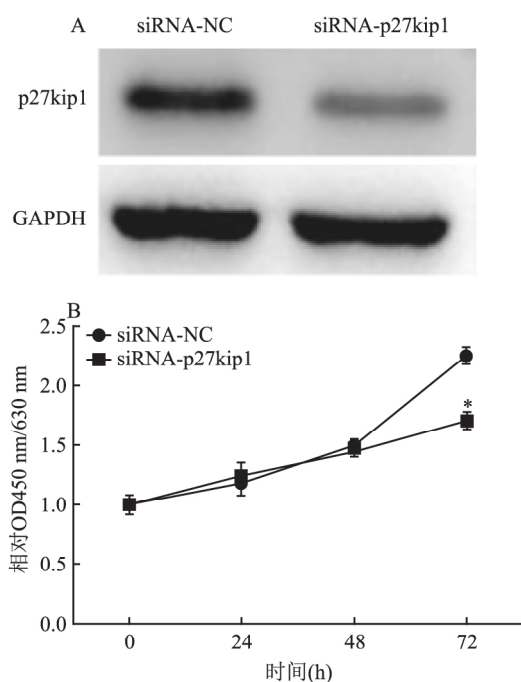


图6 p27kip1对肺鳞癌 SK-MES-1 细胞增殖的影响

A: Western blot 检测 siRNA 干扰 p27kip1 后其蛋白表达情况; B: CCK-8 检测敲低 p27kip1 后细胞增殖情况; 与 siRNA-NC 比较: * $P < 0.05$

3 讨论

肺鳞癌是 NSCLC 常见的病理类型^[4-5]。与肺腺癌相比,其发病机制的研究和治疗进展滞后^[6-7]。因此,对肺鳞癌进行深入研究具有重要意义。慢性炎症可导致癌变,炎症在 NSCLC 发生和发展中的作用被人们所认识^[8],但其潜在的分子机制尚不清

楚。

越来越多的研究^[9]表明 miRNAs 可作为联系炎症与肿瘤重要枢纽,参与肿瘤的发生发展。IL-1 β 作为一个重要的炎症因子,研究^[3]表明其能通过环氧化酶-2/缺氧诱导因子-1 α (COX-2/HIF-1 α) 途径抑制 miR-101 表达进而促进肺腺癌的增殖和迁移,但 IL-1 β 在肺鳞癌中的作用及其机制的研究报道较少。课题组前期研究^[10]发现 miR-223-3p 在肺鳞癌组织中表达降低,其可与突变型 p53 蛋白形成反馈环路促进肺鳞癌的增殖和迁移。另外,研究^[11]显示:单核细胞经 IL-1 β 和肿瘤坏死因子- α 刺激后,胞内 miR-223 表达下调;但肺内皮细胞经 IL-1 β 和肿瘤坏死因子- α 刺激后,胞内 miR-223 表达上升,结果提示在不同类型的细胞中,炎症因子对细胞内 miR-223 的表达存在差异。本研究证实在肺鳞癌患者血浆中 IL-1 β 高表达,外源性加入 IL-1 β 能够促进肺鳞癌 SK-MES-1 细胞的增殖,且使细胞内 miR-223-3p 表达降低,结果提示高表达的 IL-1 β 通过降低细胞内 miR-223-3p 表达促进细胞增殖。

通过软件预测、双荧光素酶报告实验和 Western blot 证实 miR-223-3p 可以直接靶向 CDKN1B (p27kip1) 的 3' UTR 抑制其表达。p27kip1 是一种细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK) 抑制因子,通过与细胞周期蛋白/细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin/cdk) 复合物结合调节细胞的增殖、迁移和凋亡^[12]。研究^[13]显示,分布于细胞核和细胞质中 p27kip1 具有不同的功能:细胞核中 p27kip1 主要作为 CDK 抑制剂调节细胞周期,而细胞质中 p27kip1 具有抗凋亡、促进细胞迁移作用。近期研究^[14]表明,p27kip1 的异常表达和亚细胞分布与恶性肿瘤的发生发展密切相关。本研究通过共聚焦显微镜观察发现,p27kip1 在肺鳞癌 SK-MES-1 细胞中主要分布于细胞质,外源性 IL-1 β 能够促进细胞 p27kip1 表达。敲低 p27kip1 表达后,细胞的增殖降低。

综上所述,IL-1 β 通过降低肺鳞癌 SK-MES-1 细胞内 miR-223-3p 表达进而使 p27kip1 表达增加,抑制细胞凋亡,促进细胞增殖。

参考文献

- [1] Grivennikov S I, Greten F R, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer[J]. Cell, 2010, 140(6): 883 - 99.
- [2] O'Callaghan D S, O'Donnell D, O'Connell F, et al. The role of inflammation in the pathogenesis of non-small cell lung cancer [J]. J Thorac Oncol, 2010, 5(12): 2024 - 36.

- [3] Wang L, Zhang L F, Wu J, et al. IL-1 β -mediated repression of microRNA-401 is crucial for inflammation-promoted lung tumorigenesis [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(17): 4720 - 30.
- [4] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(1): 7 - 30.
- [5] Zappa C, Mousa S A. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2016, 5(3): 288 - 300.
- [6] Herbst R S, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer [J]. *Nature*, 2018, 553(7689): 446 - 54.
- [7] Gandara D R, Hammerman P S, Sos M L, et al. Squamous cell lung cancer: from tumor genomics to cancer therapeutics [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(10): 2236 - 43.
- [8] Elinav E, Nowarski R, Thaiss C A, et al. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(11): 759 - 71.
- [9] Tili E, Michaille J J, Croce C M. MicroRNAs play a central role in molecular dysfunctions linking inflammation with cancer [J]. *Immunol Rev*, 2013, 253(1): 167 - 84.
- [10] Luo P, Wang Q, Ye Y, et al. MiR-223-3p functions as a tumor suppressor in lung squamous cell carcinoma by miR-223-3p-mutant p53 regulatory feedback loop [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 74.
- [11] Leuenberger C, Schuoler C, Bye H, et al. MicroRNA-223 controls the expression of histone deacetylase 2: a novel axis in COPD [J]. *J Mol Med(Berl)*, 2016, 94(6): 725 - 34.
- [12] Bencivenga D, Caldarelli I, Stampone E, et al. p27Kip1 and human cancers: A reappraisal of a still enigmatic protein [J]. *Cancer Lett*, 2017, 403: 354 - 65.
- [13] Noske A, Weichert W, Niesporek S, et al. Expression of the nuclear export protein chromosomal region maintenance/exportin 1/Xpo1 is a prognostic factor in human ovarian cancer [J]. *Cancer*, 2008, 112(8): 1733 - 43.
- [14] Calvayrac O, Nowosad A, Cabantous S, et al. Cytoplasmic p27Kip1 promotes tumorigenesis via suppression of RhoB activity [J]. *J Pathol*, 2019, 247(1): 60 - 71.

The mechanism of IL-1 β promoting the proliferation of lung squamous cell carcinoma cells

Wang Wei^{1,2}, Luo Peng¹, Wang Baolong¹

(¹Dept of Clinical Laboratory, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

²Medical Laboratory, Fuyang People's Hospital, Fuyang 236004)

Abstract Objective To investigate the effect of interleukin-1 β (IL-1 β) on lung squamous cell proliferation and its mechanism. **Methods** CBA kit was used to detect the content of IL-1 β in plasma of patients with lung squamous cell carcinoma ($n = 20$) and healthy controls ($n = 20$). The effect of IL-1 β on lung squamous cell proliferation was evaluated by plate cloning formation experiment. The effect of IL-1 β on the expression of miR-223-3p in SK-MES-1 cells was detected by qRT-PCR. The potential downstream target genes of miR-223-3p were verified by TargetScan software, double luciferase reporting experiment and Western blot. CCK-8 assay was used to detect the effect of down-regulated p27kip1 on cell proliferation. Confocal microscope was used to observe the distribution of p27kip1 in SK-MES-1. Western blot was used to analyze the effect of IL-1 β on the expression of p27kip1 in SK-MES-1 cells. **Results** The median IL-1 β content in plasma of patients with lung squamous cell carcinoma was 11.96 (7.55, 29.20) ng/L, which was higher than the healthy control group by 2.52 (1.64, 3.48) ng/L, and the difference was statistically significant ($Z = -5.06, P < 0.001$). IL-1 β can promote the cloning formation of SK-MES-1 cells in lung squamous cell carcinoma and significantly reduce the expression of miR-223-3p in cells. miR-223-3p directly binded to the 3'UTR of CDKN1B (p27kip1) and inhibited its expression. After p27kip1 was down-regulated, SK-MES-1 cell proliferation ability was significantly reduced. p27kip1 was mainly distributed in the cytoplasm of SK-MES-1 cells, and IL-1 β can promote the expression of p27kip1. **Conclusion** IL-1 β promotes cell proliferation by regulating the expression of miR-223-3p and p27kip1 in lung squamous cell carcinoma cells.

Key words lung squamous cancer; IL-1 β ; miR-223-3p; p27kip1