

Argonaute 亚族蛋白对人类肿瘤细胞周期的影响 *

姜琳¹⁾ 潘淑娟²⁾ 葛郁芝²⁾ 殷勤伟^{1)**}

(¹⁾中国科学院生物物理研究所计算与系统生物学研究中心, 北京 100101; ²⁾江西省人民医院, 南昌 330006)

摘要 Argonaute(Ago)家族蛋白与小的非编码 RNAs(siRNAs, miRNAs, piRNAs)生物发生和细胞功能密切相关. 它可以结合小 RNAs, 调控蛋白质的合成或影响 mRNA 的稳定性, 即 RNA 干扰(RNAi), 并且参与 Piwi 相关 RNAs(piRNAs)的生成. 人类 Argonaute 蛋白家族包括 8 个成员, 对其中的 4 个(Ago1~Ago4)mRNAs 进行了实时定量 PCR(qRT-PCR)检测, 其在许多细胞中共表达, 与细胞生长紧密相关. 针对人乳腺癌 MCF7 和子宫颈癌 HeLa 细胞系, 通过下调 Ago 亚族蛋白表达量, 研究其在细胞周期中的调控作用. MTT 实验证明, Ago 蛋白表达缺失导致细胞增殖活性显著下降($P < 0.01$), 生长受阻. 进一步研究揭示, 细胞周期在 G0/G1 期发生停滞, 其中 Ago1($P < 0.01$)和 Ago4($P < 0.05$)的作用尤为明显, 但并不引发凋亡. 虽然具体调控机制尚不清晰, 但在人类肿瘤细胞中 Argonaute 蛋白可直接或间接地参与细胞周期进程的调控.

关键词 RNA 干扰, Argonaute 蛋白, 实时定量 PCR, 细胞周期, G0/G1 期

学科分类号 Q2, Q7

在过去的十几年, 小的非编码 RNAs, 如小干扰 RNAs (siRNAs), microRNAs (miRNAs), 和 PIWI 相关 RNAs (piRNAs) 等, 被陆续发现, 并且它们的生物功能研究也日趋明了. 小 RNAs 存在于所有的高等真核细胞中, 因在细胞生长和发育过程的调节作用而备受科学家们的瞩目.

在发现这些小 RNAs 不久之后, 与其相互作用的主要的 Argonaute 蛋白家族成员也陆续被鉴定出来. Argonaute 蛋白是 RNA 诱导沉默复合体(RISC)的核心元件, 是 RNA 干扰(RNAi)所必需的, 参与靶向 mRNA 断裂、翻译抑制或染色质修饰, 从而影响基因沉默^[1].

Argonaute (Ago) 蛋白是一个高度保守的家族, 这一蛋白质家族包括许多成员, 它们都具有 PAZ 和 PIWI 两个主要结构域^[2]. PAZ 结构域是 RISC 中小 RNAs 的结合位点. 小 RNA 与 Ago 亚单位结合后组装成核糖核蛋白复合体 (RISC) 靶向同源 mRNAs 或基因位点. PIWI 结构域则与 RNaseH 具有相似的结构特征, 是 RISC 中的酶切割活性中心. Argonaute 家族蛋白在序列上呈现多样性并可分为不同的亚家族. 如线虫中的 RDE-1^[3]、ALG-1、

ALG-2^[4]、SAGO-1、SAGO-2^[5], 果蝇中的 AGO1^[6]、AGO2^[6]、AGO3、PIWI^[7,8]、Aubergine^[9], 锥虫中的 TbAGO1 和 TbPWI1^[10], 拟南芥中的 AGO1^[11,12]、AGO4^[13]、AGO6^[14]、AGO7^[15], 以及人类细胞中的 PIWI 亚族 (4 个) 和 eIF2C/Ago 亚族 (4 个)^[16]等. Piwi 亚族蛋白, 如小鼠中的 MIWI^[17]、MILI^[18], 不仅与生殖系细胞中的小 RNA (piRNAs) 和精子发生密切相关, 而且对其干细胞的发育和功能行使起重要作用^[19,20]. 人类 Ago 亚族蛋白与 RNAi 密切相关, hAgo1 参与异染色质沉默^[21,22], hAgo2 在 RNAi 中作用最明确, 具有切割活性^[23,24], 是 RNAi 中 mRNA 断裂所必需的; 在动物中大多数 miRNAs 由于其与靶基因不完全互补, 不足以产生序列特异性断裂. Ago 蛋白在与 miRNAs 结合形成复合体后, 靶向 mRNA 进入胞质处理小体 (P-bodies), 可通过三种方式抑制蛋白质合成: a. 诱导 mRNA 脱腺苷酸化和脱帽, 启动 mRNA 降

* 国家自然科学基金资助项目(30671042).

** 通讯联系人.

Tel: 010-64888572, E-mail: jqwyin@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2008-04-02, 接受日期: 2008-05-06

解^[25,26]; b. 通过 Ago 蛋白和翻译起始因子竞争与 mRNA m⁷G 帽子的结合, 阻碍功能性核糖体的装配, 造成翻译起始抑制^[27~29]; c. 通过募集与多肽链降解(翻译延伸)相关的细胞因子(肽酶、翻译后修饰酶), 使核糖体脱离肽链或新合成的肽链迅速降解, 这一过程发生在翻译起始后^[30~32].

免疫荧光定位证明, Argonaute 亚族蛋白大多定位于细胞质中, 人类 Ago1 和 Ago2 在 P 小体中富集^[33, 34], 参与上述的转录后水平的基因沉默 (PTGS)^[35, 36]. 但是仍然有一小部分 Ago 蛋白位于细胞核中, 酵母中 Ago 蛋白可通过募集甲基化转移酶到基因组的异染色质区域, 诱导转录水平的基因沉默 (TGS). 人类 Ago1 和 Ago2 也存在于细胞核中^[37], 它们可作用于 DNA 启动子区域, 使靶基因和组蛋白发生甲基化, 从而抑制基因表达^[38, 39].

Argonaute 蛋白又名 GERp95 (Golgi ER protein 95 ku), 是与高尔基体和内质网膜相关的蛋白质^[40], 除了在备受瞩目的 RNAi 现象中担当重任外, 其参与细胞周期进程的调控, 影响细胞增殖和发育, 无论是在植物、果蝇还是酵母中都有所报道. 比如在拟南芥 *Arabidopsis* 胚胎发育中, Ago 家族蛋白 ZWILLE 对建立稳定的茎尖干细胞群非常关键^[41], 而 Ago1 蛋白则调控其叶片发育^[42]. 在果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 中, Ago 蛋白是其生殖系干细胞 (GSCs) 不对称分裂所必需的^[43], 随着 Ago 表达水平的改变会影响其生殖系干细胞的增殖速率^[44]. 在裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 中, Ago1 是着丝粒周异染色质的形成和加速染色体分离所必需的, 并且它的功能是其细胞周期检验点设定所必需的^[45].

据估计, 在人类基因组中大于 30% 的基因的表达都受与 Ago 相关的 RNAi 现象所调控^[46]. 许多由 RNAi 通路调控的基因编码转录因子相关蛋白, 从而调节信号通路和细胞周期进程. 但有趣的是, 拟南芥中 ZWILLE 突变只影响其发育, 但不影响转录后基因沉默 (PTGS). 同样的, 在线虫中 ALG-1 和 ALG-2 突变也对 RNAi 无影响^[47]. 而酵母中细胞检验点功能的维持是不需要 sRNAs 参与的, 在 Rdp1 (参与 RNAi 作用的蛋白质) 表达缺失的情况下, Ago1 和 Dcr1 仍可调控细胞周期进程^[48]. 所有这些均表明, 在拟南芥、线虫和酵母中, Ago 家族蛋白对细胞发育和基因沉默的作用是相分离、互不重叠的. 但是在高等真核生物中, 这方面的研究工作目前还处于空白.

为进一步探索 Argonaute 蛋白在人类细胞, 尤其是肿瘤细胞中对增殖活性和细胞周期的调控作用, 我们选取人乳腺癌 MCF7 和子宫颈癌 HeLa 细胞系, 专注于 Argonaute 亚族 4 个成员 (Ago1 ~ Ago4) 的研究.

1 材料与方法

1.1 细胞培养

MCF7 (人乳腺癌细胞)、HeLa (人子宫颈癌上皮细胞)、A549 (人肺腺癌细胞)、HEK293 (人胚肾细胞) 细胞系均采用 DMEM (高糖) 含 10% 胎牛血清 (FBS) 培养, 2 mmol/L 谷氨酸, 100 U/ml 青霉素, 100 mg/L 链霉素, 置于含 5% CO₂ 的 37℃ 孵箱中. 0.25% 的胰酶 (含 0.38 g/L EDTA) 用于细胞消化, 传代.

1.2 RNA 的提取和逆转录 (RT)

采用 Invitrogen 公司的 TRIzol Reagent 试剂收集细胞, 提取总 RNA. 取 1~5 μg 总 RNA, 采用 Promega 公司的 M-MLV 逆转录酶将其反转录成 cDNA.

1.3 PCR 反应

取 1 μl 逆转录产物, 采用 Promega 公司的 GoTaq DNA 聚合酶试剂盒进行 PCR 反应 (20 μl 体系). PCR 引物序列如下: Ago2, 5' GCGGGTTGGAAAAGTGGAAAC, 5' ATCTGGGACGGAAGGCATTCTG; Ago3, 5' CTACAAATCCACACGCTTCA, 5' CAGATGATACCTTGCCCTAAAT.

扩增片段长度分别为 575 bp 和 493 bp, β-actin 为内参照. 扩增条件为: 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环. PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳.

1.4 实时定量 PCR 反应

采用 BioEasy SYBR Green 荧光 PCR 试剂盒进行实时定量 PCR (qPCR) 检测. qPCR 反应条件为: 95℃ 30 s, 60℃ 1 min, 72℃ 30 s, 40 个循环. qPCR 引物序列如下: Ago1, 5' GCACTGCCCA-TTGCAACGAA, 5' CATTCGCCAGCTCACAA-TGGCT; Ago2, 5' CGCGTCCGAAGGCTGCTCTA, 5' TGGCTGTGCTTGTAACGCT; Ago3, 5' GGAATTAGACAAGCCAATCAGCA, 5' AGGGTGGT-CATATCCTTCTGGA; Ago4, 5' CTAACAGACTC-CCAGCGTGTCA, 5' GACTGGCTGGCCGTCTA-GTCA; GAPDH, 5' CGCTCTGCTCCTCTGTT, 5' CCATGGTGTCTGAGCGATGT.

对于每个细胞系的 qPCR 结果分别进行相对定量分析, 以 GAPDH 为参照基因, 即以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示 Ago1~Ago4 各基因表达量的比值.

1.5 siRNAs 转染

针对 Ago1~Ago4 靶基因设计 4 个 siRNAs, 分别用于特异性敲除其 mRNAs 的表达水平. siRNAs 由 21 nt 的全核苷酸正义链和 21 nt 5'磷酸化的反义链组成. 正反链序列如下, 由上海吉玛制药技术有限公司合成: siAgo1, GAGAAGAGG-UGCUC AAGAAUU, pUUCUUGAGCACCUCUUC-UCUU; siAgo2, GCACGGAAGUCCAUCUGAA-UU, pUUCAGAUGGACUUC CGUGCUU; siAgo3, GAAAUUAGCAGAUUGGUAUU, pUUACCAA-UCUGC UAAUUUCUU; siAgo4, GGCCAGAACU-AAUAGCAAUUU, pAUUGC UAUUAGUUCUGGC-CUU; Mock (M), AAUAGUGUAUACGGCAUG-CUU, pGCAUGCCGUAUACACUAUUUU.

MCF7 和 HeLa 细胞种板 24 h 后, 采用脂质体 Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司) 进行转染, siRNA 浓度为 1.2 $\mu\text{mol/L}$. 以 24 孔板为例, 即每孔加 1.5 μl Lipofectamine, 60 pmol siRNAs, 以 Opti-MEM (GIBCO) 培养基转染 4~6 h 后, 更换新鲜培养液.

1.6 MTT 法

细胞接种于 96 孔板, 24 h 贴壁后转染 siRNAs, 分别于转染后 24 h、48 h、72 h 检测细胞增殖活性. 加入 MTT (5 g/L) 20 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 4 h 后弃上清, 每孔加入 DMSO 150 μl , 酶标仪 570 nm 下读出吸光度 (A), 绘制生长曲线.

1.7 流式细胞仪 (FCM) 测细胞周期

以约 20×10^5 /孔的细胞密度种植细胞于六孔板中, 收集经 siRNAs 转染 48 h 后的细胞, 70%乙醇 -20 $^{\circ}\text{C}$ 固定 2 h 或过夜, 碘化丙锭 PI (50 mg/L) + RNase A (100 mg/L) 室温避光染色 15 min. PBS 清洗后以 10^6 个/ml 的密度上机检验. 并计算增殖指数, $PI = (S+G2/M) / (G0/G1+S+G2/M)$.

1.8 Annexin V/PI 双染法测凋亡

采用 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒, 对经 siRNAs 作用 48 h 的细胞消化、PBS 清洗, 先后用 Annexin-V-FITC 结合液和 PI 染色后, 进行流式细胞仪分析.

1.9 统计学处理

应用 SPSS 13.0 统计软件处理数据, 采用配对数据 t 检验 (Paired-Samples t test) 分析差异显著性.

2 结 果

2.1 Ago 亚族蛋白在许多细胞系中普遍存在

为了获得人类不同细胞系中 4 个 Ago 蛋白的全面转录水平图谱, 我们采用实时定量 PCR 方法来检测其 mRNAs 表达水平 (图 1). 在人乳腺癌 MCF7、子宫颈癌 HeLa、肺腺癌 A549 和胚肾 HEK293 这 4 个细胞系中, 均可检测到 Ago1~Ago4 mRNAs 的表达, 说明 Ago 亚族蛋白在人类许多细胞系中普遍存在, 但与用作标准化的 GAPDH 相比, 其 mRNAs 转录水平低仅为 GAPDH 的 0.1%~1%. 其中 Ago2 和 Ago3 mRNAs 转录水平较高且相似, 而 Ago1 与 Ago4 mRNAs 水平则相对变化较大, 它们在肺腺癌 A549 细胞, 特别是胚肾细胞 HEK293 中表达量较高, 可能对肺、肾的发育和分化更为重要. 此外, 比较胚肾细胞 HEK293 与其他三种肿瘤细胞后可以发现 Ago1~Ago4 四种 mRNAs 在胚肾细胞 HEK293 的表达水平高于在肿瘤细胞中的水平.

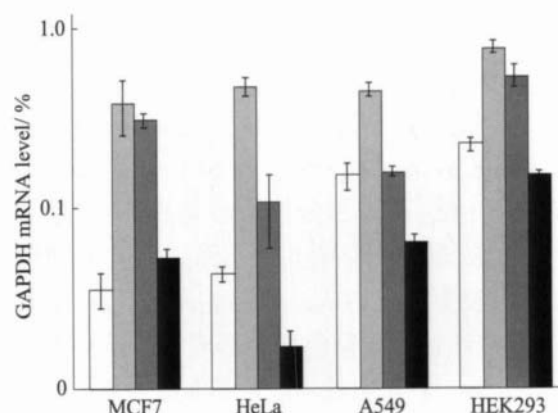


Fig. 1 Expression profiles of Argonaute subfamily genes in different cell lines

The mRNA levels of the Ago subfamily members were determined by qRT-PCR and depicted in a percentage scale after normalized to GAPDH mRNA level of the respective cell line. □: Ago1; ▨: Ago2; ▩: Ago3; ■: Ago4.

2.2 siRNAs 对 Ago 蛋白的基因沉默效果明显

Ago 蛋白在人类细胞系中普遍表达, 那么这个相对保守的蛋白质家族究竟在细胞生长发育的过程中承担怎样的职责? 若 Ago 蛋白表达缺失, 将会对细胞生长产生怎样的影响呢? 为此, 我们选取 MCF7 (人乳腺癌) 和 HeLa (人宫颈癌) 2 个人类肿瘤细胞系, 分别设计 siRNAs 以下调 Ago1~Ago4 基因表达.

MCF7 和 HeLa 细胞经 siAgo1~siAgo4 转染后, 分别于 24 h、48 h、72 h 收集细胞, 检测其基因沉默效率. 对于转录水平较高的 Ago2 和 Ago3, 采取 RT-PCR 方法检测, 结果如图 2a. 而对于转录水平相对较低的 Ago1 和 Ago4, 则采取实时定量 PCR 来评估其基因下调效率, 图 2b 显示了 siAgo1 和 siAgo4 转染后 48 h 的细胞 qRT-PCR 结果.

RT-PCR 试验表明, Ago2 和 Ago3 mRNAs 转录水平在 24 h 时有所下降, 在 48 h 达到最低值, 并均可维持低表达水平 72 h 以上. 实时定量 RT-PCR 检测显示, MCF7 细胞中 Ago1 和 Ago4 mRNAs 转录水平在 48 h 时为对照的 29% 和 9%, 而 HeLa 细胞中则分别为对照的 8% 和 1%. 可见, HeLa 细胞系比 MCF7 细胞系下调效果更好, 而 siAgo4 比 siAgo1 下调效率更高. 相反, Mock siRNA 对这些 Ago mRNAs 却没有抑制作用, 说明这些 siAgos 具有很好的序列特异的靶抑制效应.

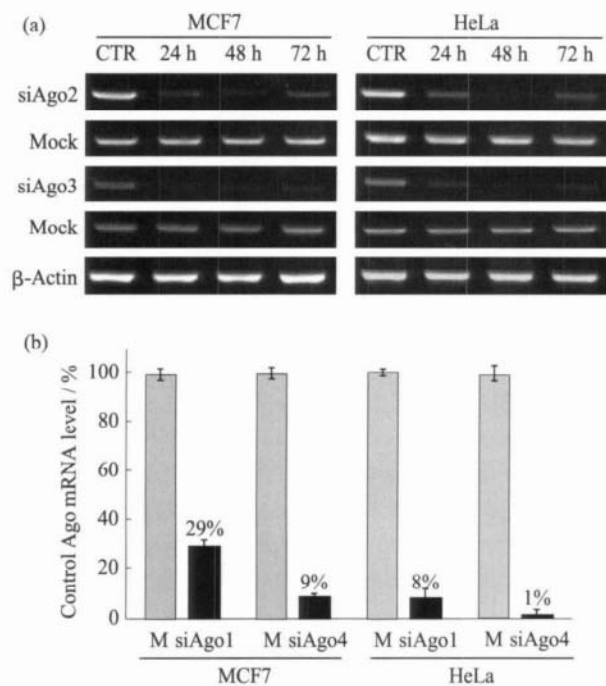


Fig. 2 siRNAs could effectively silence the expression of Argonaute subfamily genes

(a) RT-PCR analysis of Ago2 & Ago3 mRNAs expression in MCF-7 and HeLa cells after treatment of siAgo2 (1.2 nmol/L) or siAgo3 (1.2 nmol/L) respectively for different time points such as 0, 24, 48, and 72 h. β-Actin was used as a loading control. Mock (M) stands for mock siRNA as a negative control. (b) Quantitative RT-PCR analysis of Ago1 & Ago4 mRNAs expression in MCF-7 and HeLa cells after treatment of siAgo1 (1.2 nmol/L) or siAgo4 (1.2 nmol/L) for 0, 24, 48, and 72 h, respectively. GAPDH was used as a control. Mock (M) stands for mock siRNA as a negative control.

2.3 Ago 蛋白沉默导致细胞增殖活性下降

在确保 Ago1~Ago4 基因被有效沉默后, 我们分别针对不同 Ago 蛋白表达缺失情况下的细胞, 采取 MTT 法检测其增殖活性的变化. 对 siAgos 转染 24 h、48 h、72 h、96 h 的 MCF7 和 HeLa 细胞进行 MTT 检测. 结果显示, 相比 Control 和 Mock 组, Ago1~Ago4 基因沉默后的 MCF7 和 HeLa 细胞增殖活性均明显下降, 生长受到抑制. 细胞增殖活性随 Ago 下调时间的延长而持续下降, 在转染后 96 h 其吸光度(A) 仅分别为对照组的 60%~70% (MCF7 细胞, 图 3a, $P < 0.01$) 和 33%~50% (HeLa 细胞, 图 3b, $P < 0.01$), 具有显著性差异. 其中 Ago1 沉默所致的细胞生长抑制程度最大, 增殖活性在 MCF7 和 HeLa 细胞中分别下降约 40% 和 70%, 而 Ago3、Ago4、Ago2 沉默所致的增殖活性下降程度略小, 约为 35%, 37% 和 60%. 比较

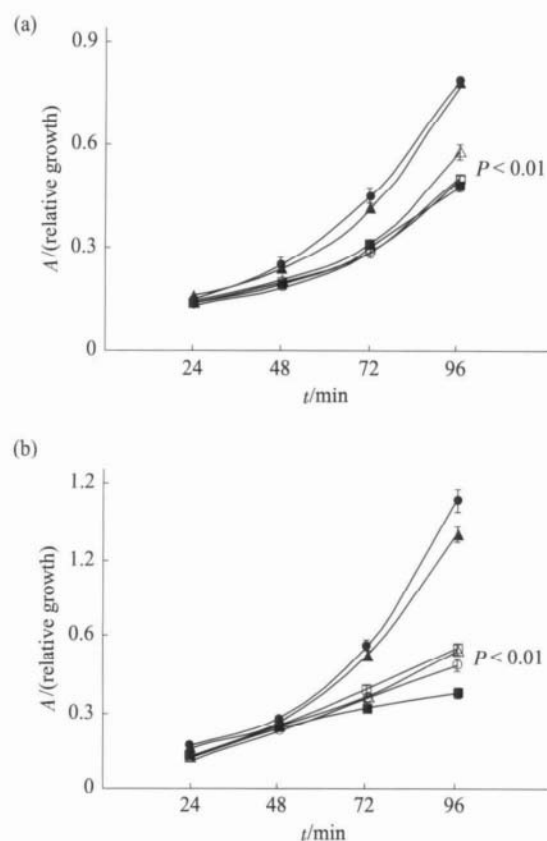


Fig. 3 The inhibitory effect of siAgos on cell growth of MCF7 (a) and HeLa (b) cells

These cells were treated with siAgo1~siAgo4 for 0, 24, 48, 72, 96 h. The cells untreated served as a control, and cells treated with mock siRNA (Mock) as a negative control. Cell growth curve was plotted against time. Each assay was performed in triplicate and data are displayed as $\bar{x} \pm s$. Error bars indicate standard deviations. $P < 0.01$, siAgo1~4 compared with the control group. ●—●: Control; ▲—▲: Mock; ■—■: siAgo1; ○—○: siAgo2; △—△: siAgo3; □—□: siAgo4.

Ago1 和 Ago2 在转染相应 siRNA 的 MCF7 和 HeLa 细胞中的表达水平后，可以发现含有较高水平的 Ago1 和 Ago2 的 MCF7 细胞比有较低水平的 Ago1 和 Ago2 的 HeLa 细胞有相对高的增殖活性。这些发现揭示一定水平的 Ago 蛋白的表达是肿瘤细胞进行增殖活动所必需的。

2.4 Ago 蛋白沉默使细胞周期在 G0/G1 期阻滞

为了进一步探讨这种细胞生长变缓是否与细胞周期的改变有关，我们采用了流式细胞仪 (FCM) 的方法。现已知道细胞周期进程通常可分为 G0/G1 期、S 期、G2 期和 M 期^[49]。那么为了探求 Ago 表

达缺失所致增殖受抑的发生时期，以便进一步研究其调控机制，检测了 Ago 沉默前后细胞处于不同时期的比例变化。

对 siAgo1~siAgo4 转染 48 h 后的细胞进行流式细胞周期分析，结果如表 1 所示，与对照组和 Mock 组相比，无论 MCF7 或是 HeLa 细胞，经过 siRNAs 作用后细胞比例在 G0/G1 期增多，S 期减少，而 G2/M 期则变化不大 (图 4a 和 b)。证明，Ago 基因表达沉默致使细胞周期进程出现 G0/G1 期阻滞，进入 S 期细胞减少，从而增殖指数 (PI) 下降，增殖受抑。

Table 1 The effect of siAgos on the cell cycles of MCF-7 & HeLa cells 48 h after treatment

MCF7	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	PI (%)
Control	66.01 ± 2.15	25.02 ± 1.39	8.26 ± 0.53	33.52
Mock	66.32 ± 2.07	24.87 ± 1.45	8.31 ± 0.63	33.35
siAgo1	75.34 ± 2.46**	15.43 ± 0.67	8.92 ± 0.50	24.43
siAgo2	68.69 ± 2.37	22.79 ± 1.02	8.50 ± 0.86	31.30
siAgo3	71.40 ± 1.92	20.46 ± 1.15	7.51 ± 1.00	28.15
siAgo4	73.69 ± 2.48**	18.50 ± 0.98	7.50 ± 0.62	26.08
HeLa	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	PI (%)
Control	65.98 ± 2.01	19.69 ± 1.94	14.31 ± 1.08	34.01
Mock	65.83 ± 2.09	19.54 ± 1.20	14.29 ± 1.01	33.95
siAgo1	78.15 ± 2.54**	10.90 ± 0.75	10.64 ± 0.91	21.61
siAgo2	66.22 ± 2.20	17.85 ± 1.29	15.42 ± 0.97	33.44
siAgo3	67.27 ± 2.75	17.19 ± 1.11	15.54 ± 1.24	32.73
siAgo4	69.44 ± 2.13	14.83 ± 1.17	15.73 ± 1.19	30.56

The data were averages of at least three independent determinations ($\bar{x} \pm s$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control group.

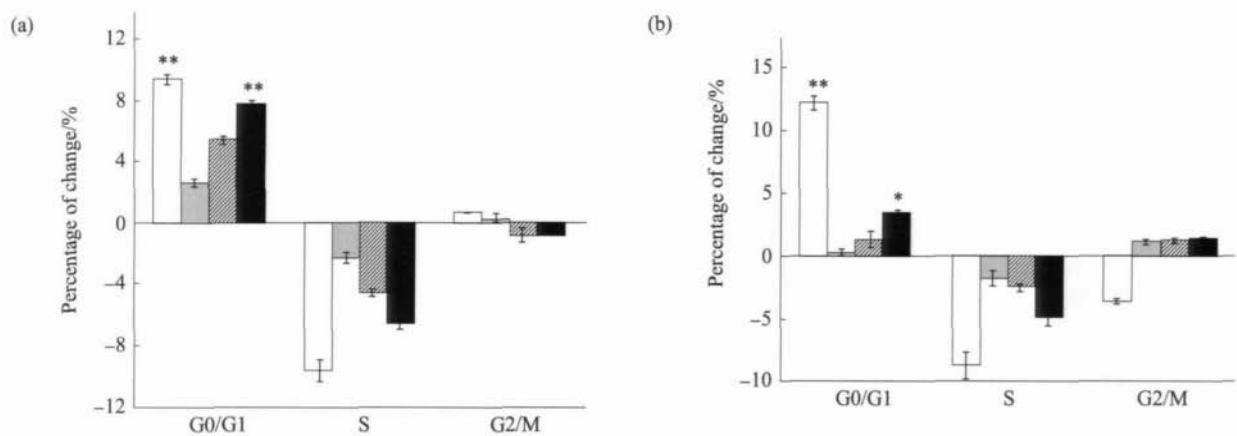


Fig. 4 The changes in the percentage of MCF7(a) and HeLa(b) cells in G0/G1, S and G2 phases after treatment of siAgos for 48 h

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control group. □: siAgo1; ▨: siAgo2; ▩: siAgo3; ■: siAgo4.

其中，经 siAgo1 和 siAgo4 作用后的细胞变化趋势尤为明显。MCF7 细胞中，Ago1 和 Ago4 下调后，处于 G0/G1 期细胞比例由对照组的 66% 分别上升至 75% ($P < 0.01$) 和 74% ($P < 0.01$)，S 期比例则由 25% 下降为 15% 和 19%，增殖指数 (PI) 由

34% 降至 24% 和 26%，存在显著性差异。同样的，HeLa 细胞中，G0/G1 期细胞比例由对照组的 66% 分别上升至 78% ($P < 0.01$) 和 69% ($P < 0.05$)，S 期比例则由 20% 下降为 11% 和 15%，增殖指数 (PI) 由 34% 降至 22% 和 31% (表 1)。

3 讨 论

Argonaute 家族蛋白与多种肿瘤密切相关。人 Ago3、Ago1 和 Ago4 基因, 前后排列在 1 号染色体(1p34~35)^[50], 在 Wilms 肾癌中经常缺失^[51], 还与神经外胚层瘤有关。Ago1 在肺和肾的发育过程中高表达, 在缺少 Wilms 肿瘤抑制基因 WT1 的肾癌中表达显著上升^[51], 即 Ago1 在这些组织的胚胎发生过程中起重要作用。对人类乳腺癌 MCF7、子宫颈癌 HeLa、肺腺癌 A549 和胚肾细胞 HEK293 这 4 种细胞系中 Ago1~Ago4 的转录图谱显示, 其在细胞系中普遍存在并稳定表达, 说明 Ago 亚族蛋白在调节基因表达或维持细胞生长分化过程中起着至关重要的作用。Ago2 和 Ago3 转录水平较高且相对稳定, 证明其是基本功能所必需的, 而 Ago1 与 Ago4 mRNAs 水平则相对变化较大, 它们在肺腺癌 A549 细胞, 特别是胚肾细胞 HEK293 中表达量较高, 证实了 Ago1 在胚肾细胞中的高表达, 其在肾胚胎发生的分化过程中起重要作用。

早期在拟南芥^[41, 42]、果蝇^[43, 44]和酵母^[45, 48]中均有报道表明, Ago 亚族蛋白参与细胞周期进程的调控, 进而影响细胞增殖和发育。但是在高等真核生物人类中, 此类研究还未见报道。我们的实验证明 Ago 蛋白表达沉默会导致细胞增殖活性显著下降, 生长受抑。Ago1~Ago4 基因沉默所致的细胞增殖活性随 Ago 下调时间的延长而持续下降。其中 Ago1 沉默所致的细胞生长抑制程度最大, 可能与细胞周期进程的调控关系更为紧密。进一步研究揭示, Ago 蛋白的表达缺失导致其细胞周期在 G0/G1 期发生停滞, 细胞不能正常进入 S 期完成 DNA 复制, 从而抑制增殖。

细胞周期通常可分为 G0/G1 期、S 期、G2 期和 M 期, 其有序进行是由细胞周期蛋白(cyclin)和周期蛋白依赖性激酶(CDK)相互作用而完成的^[50]。细胞要通过 G1/S 检验点, 需要 CDK2、CDK4 和 CDK6 对 cyclin D 和 cyclin E 激活, 形成 cyclin/CDK 复合物。视网膜母细胞瘤蛋白(Rb)被该复合物磷酸化, 从而丧失其 G1 期阻滞作用, 推动细胞周期顺利进行。同时, 细胞周期从 G1 期向 S 期过渡还会受到 CDK 抑制蛋白(CDKI)的调节作用。CDKI 可分为两类, 一类为 INK4 家族, 包括 p16、p15、p18、p19, 能特异性抑制 cyclin D-CDK4/CDK6 复合物, 另一类为 CIP/KIP 家族, 包括 p12、

p21、p27、p57, 可与多种 cyclin 及 CDK 相结合, 广谱抑制 G1 期 cyclin-CDK 的激酶活性。此外, PTEN 能特异性地使 3, 4, 5-三磷酸磷脂酰肌醇(PIP₃)去磷酸化, 拮抗三磷酸肌醇激酶(PI3K/AKT)信号转导系统, 使细胞周期阻滞于 G1 期^[52], 是第一个被发现的具有磷酸酶活性的抑癌基因^[53]。细胞周期的调控是由多个通路彼此相互作用而构成的一个调节网络。

在以上的调控网络中, 我们选取 PTEN、Rb、p21/waf-1 和 p16/ink-4a 4 个抑癌基因, 采用 RT-PCR 方法, 检测其经 Ago 蛋白沉默导致细胞进程受阻后的转录水平变化, 以探求 G0/G1 期阻滞与抑癌基因间的相互关系, 或揭示细胞周期停滞的分子机制。但试验结果显示, 此 4 个基因转录水平在周期变化前后并无明显差别(未发表资料), 表明 Ago 蛋白不是通过此 4 个基因在转录水平的调节来控制周期进程的。但是不排除转录后水平基因调控的影响, 可以进一步采取 Western blot 方法检测其蛋白质水平是否变化, 或对 Rb 蛋白进行磷酸化检测。所有这些有待进一步的试验验证。

除上述直接与细胞周期调控因子作用影响周期进程外, Ago 蛋白也可能是通过 miRNA 途径间接地影响细胞正常生长增殖的。最新发现, miRNAs 不仅可以靶向 mRNA 3' UTR 对蛋白质表达进行负调控^[25~32], 还可以激活 mRNA 翻译^[54], 而两种调控机制的转换则依赖于细胞周期的状态。如 miR369-3 在 G1 期阻滞时激活转录, 当细胞正常生长时则抑制转录^[55]。而无论正负调控都需要 Ago 蛋白的参与, 那么 Ago 蛋白的缺失就可能对 miRNAs 调控通路造成影响, 进而影响细胞增殖。

此外, 人类 Ago1 和 Ago2 在 P 小体中富集, 参与转录后水平基因沉默。P 小体被认为是 mRNA 的储存中心和降解位点。有趣的是, P 小体也是细胞周期依赖性的, 它们的大小和数量随着细胞周期的不同而变化, 在 S 和 G2 期体积最大, 数量最多^[56~58]。因此 Ago 蛋白、P 小体、miRNAs 和细胞周期之间可能存在着复杂的联系网络。

综上所述, 我们的研究工作第一次证明, 在人类肿瘤细胞中 Argonaute 亚族蛋白对其细胞生长和增殖起着至关重要的调控作用。Ago 蛋白表达沉默导致细胞增殖活性显著下降, 细胞周期在 G0/G1 期发生阻滞, 生长受抑。揭示 Ago 蛋白可能直接或间接地参与细胞周期进程的调控。

参 考 文 献

- 1 Chen F, Yin Q. Gene expression regulator--miRNAs. *Chin Science Bulletin*, 2005, **50**(13): 1281~1292
- 2 Hutvagner G, Simard M J. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, **9**(1): 22~32
- 3 Tabara H, Sarkissian M, Kelly W G, *et al.* The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell*, 1999, **99**(2): 123~132
- 4 Grishok A, Pasquinelli A E, Conte D, *et al.* Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, 2001, **106**(1): 23~34
- 5 Yigit E, Batista P J, Bei Y, *et al.* Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. *Cell*, 2006, **127**(4): 747~757
- 6 Okamura K, Ishizuka A, Siomi H, *et al.* Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes Dev*, 2004, **18**(14): 1655~1666
- 7 Gunawardane L S, Saito K, Nishida K M, *et al.* A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science*, 2007, **315**(5818): 1587~1590
- 8 Brennecke J, Aravin A A, Stark A, *et al.* Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*, 2007, **128**(6): 1089~1103
- 9 Vagin V V, Sigova A, Li C, *et al.* A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science*, 2006, **313**(5785): 320~324
- 10 Durand-Dubief M, Bastin P. TbAGO1, an argonaute protein required for RNA interference, is involved in mitosis and chromosome segregation in *Trypanosoma brucei*. *BMC Biol*, 2003, **12**: 1~2
- 11 Vazquez F, Vaucheret H, Rajagopalan R, *et al.* Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs. *Mol Cell*, 2004, **16**(1): 69~79
- 12 Vaucheret H, Vazquez F, Cr  t   P, *et al.* The action of Argonaute1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev*, 2004, **18**(10): 1187~1197
- 13 Zilberman D, Cao X, Jacobsen S E. Argonaute4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*, 2003, **299**(5607): 716~719
- 14 Zheng X, Zhu J, Kapoor A, *et al.* Role of *Arabidopsis* AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *EMBO J*, 2007, **26**(6): 1691~1701
- 15 Hunter C, Sun H, Poethig R S. The *Arabidopsis* heterochronic gene ZIPPY is an Argonaute family member. *Curr Biol*, 2003, **13**(19): 1734~1739
- 16 Sasaki T, Shiohama A, Minoshima S, *et al.* Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome. *Genomics*, 2003, **82**(3): 323~330
- 17 Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Ijiri T W, *et al.* Mili, a mammalian member of Piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development*, 2004, **131**(4): 839~849
- 18 Deng W, Lin H. Miwi, a murine homolog of Piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev Cell*, 2002, **2**(6): 819~830
- 19 Girard A, Sachidanandam R, Hannon G J, *et al.* A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*, 2006, **442**(7099): 199~202
- 20 Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, *et al.* A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*, 2006, **442**(7099): 203~207
- 21 Janowski B A, Huffman K E, Schwartz J C, *et al.* Involvement of AGO1 and AGO2 in mammalian transcriptional silencing. *Nature Struct Mol Biol*, 2006, **13**(9): 787~792
- 22 Kim D H, Villeneuve L M, Morris K V, *et al.* Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nature Struct Mol Biol*, 2006, **13**(9): 793~797
- 23 Liao J Y, Yin J Q, Chen F, *et al.* A study on the fundamental factors determining the efficacy of siRNAs with high C/G contents. *Cell Mol Biol Lett*. 2008, **13**(2): 283~302.
- 24 Liu J, Carmell M A, Rivas F V, *et al.* Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 2004, **305**(5689): 1437~1441
- 25 Giraldez A J, Mishima Y, Rihel J, *et al.* Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science*, 2006, **312**(5770): 75~79
- 26 Wu L, Fan J, Belasco J G. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(11): 4034~4039
- 27 Humphreys D T, Westman B J, Martin D I, *et al.* MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(47): 16961~16966
- 28 Pillai R S, Bhattacharyya S N, Artus C G, *et al.* Inhibition of translational initiation by Let-7 microRNA in human cells. *Science*, 2005, **309**(5740): 1573~1576
- 29 Kiriakidou M, Tan G S, Lamprinaki S, *et al.* An mRNA m(7) G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell*, 2007, **129**(6): 1141~1151
- 30 Nottrott S, Simard M J, Richter J D. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nature Struct Mol Biol*, 2006, **13**(12): 1108~1114
- 31 Maroney P A, Yu Y, Fisher J, *et al.* Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nature Struct Mol Biol*, 2006, **13**(12): 1102~1107
- 32 Petersen C P, Bordeleau M E, Pelletier J, *et al.* Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell*, 2006, **21**(4): 533~542
- 33 Liu J, Rivas F V, Wohlschlegel J, *et al.* A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol*, 2005, **7**(12): 1261~1266
- 34 H  ck J, Weinmann L, Ender C, *et al.* Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells. *EMBO Rep*, 2007, **8**(11): 1052~1060
- 35 Liu J, Valencia-Sanchez M A, Hannon G J, *et al.* MicroRNA-

- dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*, 2005, **7**(7): 719~723
- 36 Sen G L, Blau H M. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol*, 2005, **7**(6): 633~636
- 37 Robb G B, Brown K M, Khurana J, *et al.* Specific and potent RNAi in the nucleus of human cells. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, **12**(2): 133~137
- 38 Kim D H, Villeneuve L M, Morris K V, *et al.* Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, **13**(9): 793~797
- 39 Morris K V, Chan S W, Jacobsen S E, *et al.* Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science*, 2004, **305**(5688): 1289~1292
- 40 Cikaluk D E, Tahbaz N, Hendricks L C, *et al.* GERP95, a membrane-associated protein that belongs to a family of proteins involved in stem cell differentiation. *Mol Biol Cell*, 1999, **10**(10): 3357~3372
- 41 Moussian B, Schoof H, Haecker A, *et al.* Role of the ZWILLE gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during *Arabidopsis* embryogenesis. *EMBO J*, 1998, **17**(6): 1799~1809
- 42 Bohmert K, Camus I, Bellini C, *et al.* AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *EMBO J*, 1998, **17**(1): 170~180
- 43 Yang L, Chen D, Duan R, *et al.* Argonaute 1 regulates the fate of germline stem cells in *Drosophila*. *Development*, 2007, **134**(23): 4265~4272
- 44 Cox D N, Chao A, Lin H. Piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells. *Development*, 2000, **127**(3): 503~514
- 45 Carmichael J B, Provost P, Ekwall K, *et al.* Ago1 and dcr1, two core components of the RNA interference pathway, functionally diverge from rdp1 in regulating cell cycle events in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*, 2004, **15**(3): 1425~1435
- 46 Lewis B P, Burge C B, Bartel D P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 2005, **120**(1): 15~20
- 47 Morel J B, Godon C, Mourrain P, *et al.* Fertile hypomorphic argonaute (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell*, 2002, **14**(3): 629~639
- 48 Stoica C, Carmichael J B, Parker H, *et al.* Interactions between the RNA interference effector protein Ago1 and 14-3-3 proteins: consequences for cell cycle progression. *J Biol Chem*, 2006, **281**(49): 37646~37651
- 49 Nurse P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell*, 2000, **100**(1): 71~78
- 50 Koesters R, Adams V, Betts D. Human eukaryotic initiation factor EIF2C1 gene: cDNA sequence, genomic organization, localization to chromosomal bands 1p34-p35, and expression. *Genomics*, 1999, **61**(2): 210~218
- 51 Dome J S, Coppes M J. Recent advances in Wilms tumor genetics. *Curr Opin Pediatr*, 2002, **14**(1): 5~11
- 52 Wu X, Senechal K, Neshat M S, *et al.* The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(26): 15587~15591
- 53 Maehama T, Dixon J E. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem*, 1998, **273**(22): 13375~13378
- 54 Vasudevan S, Steitz J A. AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell*, 2007, **128**(6): 1105~1118
- 55 Vasudevan S, Tong Y, Steitz J A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 2007, **318**(5858): 1931~1934
- 56 Eystathiou T, Jakymiw A, Wood M R, *et al.* A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol Biol Cell*, 2002, **13**(4): 1338~1351
- 57 Yang Z, Jakymiw A, Wood M R, *et al.* GW182 is critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation. *J Cell Sci*, 2004, **117**(Pt 23): 5567~5578
- 58 Lian S, Jakymiw A, Eystathiou T, *et al.* GW bodies, microRNAs and the cell cycle. *Cell Cycle*, 2006, **5**(3): 242~245

Effects of Argonaute Subfamily Proteins on Cell Cycle of Human Cancer Cells*

JIANG Lin¹⁾, PAN Shu-Juan²⁾, GE Yu-Zhi²⁾, YIN James Q(YIN Qin-Wei)^{1)**}

¹⁾Computational and Systems Biology Research Center, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²⁾Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang 330006, China)

Abstract Argonaute family proteins are closely linked to small non-coding RNAs (siRNAs, microRNAs, piRNAs). With their functional domains, Argonaute proteins can bind small non-coding RNAs and control protein synthesis, finally affecting mRNA stability, namely RNA interference (RNAi). Moreover, they also participate in the production of Piwi-interacting RNAs (piRNAs). There are 8 members in the human Argonaute family. Using quantitative RT-PCR (qRT-PCR), the expression levels of 4 Ago genes (Ago1 ~ Ago4) were assayed. Experimental results indicated that these genes were ubiquitously expressed in many cell lines. Then it was investigated whether Argonaute subfamily proteins could influence cell cycle regulation by knocking down their expressions in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells and cervical carcinoma HeLa cells. The lack of Ago expression resulted in decreased cellular proliferation activity. Further investigation revealed that the cell cycle was delayed at the G0/G1 phases with the especially remarkable arrest occurring in the cases of Ago1 ($P < 0.01$) and Ago4 ($P < 0.05$), but without apoptosis. It suggests that Argonaute proteins may function in the cell cycle progression through a possible pathway that does not require small RNAs. The mechanisms underlying this phenomenon are still a puzzle for us.

Key words RNAi, Argonaute, qRT-PCR, cell cycle, G0/G1 checkpoint

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30671042).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64888572, E-mail: jqwyin@sun5.ibp.ac.cn

Received: April 2, 2008 Accepted: May 6, 2008