

Analysis of the Mechanism of miR-3686 Regulates PLK1

Hongyi Jin¹, Xinguang Qiu²

¹Department of Emergency, Chinese PLA General Hospital, Beijing

²The First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou Henan

Email: zzuhongyijin@126.com

Received: Jul. 30th, 2017; accepted: Aug. 21st, 2017; published: Aug. 28th, 2017

Abstract

Objective: Analysis of the mechanism of miR-3686 regulates PLK1. **Methods:** Bioinformatic analysis predicted the target of miR-3686. The wild-type and mutant 3'UTR segments of PLK1 were constructed into pmirGLO, then cotransfected into HEK293T cell along with miR-3686 mimics or scramble. Luciferase reporter assays determined whether PLK1 is regulated by miR-3686. pcDNA3.1-PLK1 was constructed and cotransfected into PANC1 cell with miR-3686 mimics or scramble. Western blot was used to determine the PLK1 protein expression level. Restore transwell assay was used to determine the invasion of every group, to analyze the interaction mechanism between miR-3686 and PLK1. **Results:** The results of bioinformatic analysis and luciferase reporter assays indicated PLK1 is regulated by miR-3686. The restore experiments showed that PLK1 without 3'UTR of wasn't regulated by miR-3686, and its function can offset the roles of miR-3686 on the biological behavior of the pancreas carcinoma cell line PANC1. **Conclusion:** miR-3686 had an inverse correlation with PLK1. In pancreas carcinoma cell line PANC1, upregulation of miR-3686 inversely regulated PLK1 expression by binding to PLK1 mRNA 3'UTR, which can suppress cell proliferation, migration and promote cell cycle block, cell apoptosis.

Keywords

Pancreas Cancer Cell, miR-3686, PLK1

miR-3686调控PLK1表达相关机制的初步分析

靳红义¹, 邱新光²

¹中国人民解放军总医院, 北京

²郑州大学第一附属医院, 河南 郑州

Email: zzuhongyijin@126.com

收稿日期: 2017年7月30日; 录用日期: 2017年8月21日; 发布日期: 2017年8月28日

摘要

目的: 探讨miR-3686调控PLK1表达相关机制。**方法:** 生物信息学软件分析预测miR-3686作用的靶基因。构建PLK1 3'UTR区的野生型和突变型载体, 分别将其与miR-3686 mimics或者miR-3686 scramble共转染入HEK293T细胞中, 运用双荧光素酶报告实验验证miR-3686的作用靶基因。构建无3'UTR区PLK1的表达载体, 单独转入或与miR-3686 mimics共转染入PANC1细胞中, Western blot实验检测各组细胞PLK1蛋白的表达水平; restore transwell实验检测转染后各组细胞的侵袭能力, 分析miR-3686靶向调控PLK1表达的作用机制。**结果:** 无3'UTR区的PLK1的表达可以不受miR-3686的调控而发挥增强PANC1细胞侵袭能力的作用。**结论:** PLK1是miR-3686的靶基因。miR-3686通过作用于靶基因PLK1基因的3'UTR区来发挥其生物学效应。

关键词

胰腺癌细胞, miR-3686, PLK1

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

胰腺癌是恶性程度极高的一种消化道肿瘤, 其极易转移且转移速度极快, 一旦发病, 预后极差。流行病学调查显示, 胰腺癌的死亡率位居美国恶性肿瘤死亡病因的第四位。根据中国肿瘤 2011 年登记年报的数据, 位于我国恶性肿瘤发病率排名的第七名。胰腺癌早期不易诊断出来, 因为其症状出现的极晚, 所以胰腺癌的总体死亡率很高。有资料显示[1] [2] [3] [4], 胰腺癌的 5 年生存率仅为 5%~10%。胰腺癌的发生是一个多因素, 多步骤的过程, 但是具体机制尚不明确。本研究以 miR-3686 为基础, 探讨 miR-3686 调控 PLK1 表达相关机制, 为探索参与胰腺癌发生发展过程的 miRNAs 的调控机制提供实验基础。

2. 实验材料

2.1. 细胞株

实验用胰腺癌细胞株 PANC1 和人胚肾细胞 HEK293T 均购自上海中科院细胞库。细胞在 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 确保各实验细胞在实验中均处于指数增长期。

2.2. 细菌

TOP10 和 DH5α 大肠杆菌购自于 Invitrogen 公司。

2.3. 质粒

pmirGLO-Enhancer 载体和 pEGM-T 载体均购于美国 Promega 公司, pcDNA3.1(+)载体购于 Invitrogen 公司。

3. 实验方法

运用 TargetScan 和 miRanda 软件分析预测 miR-3686 的靶基因。通过对二者结果的交集进行分析,

预测 PLK1 是 miR-3686 的靶基因。然后进行双荧光素酶报告实验、Restore 实验。

统计学分析

用 SPSS 21.0 统计软件对实验数据进行统计学分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 计数, 设定 $\alpha = 0.01$ 为检验水准。

4. 实验结果

4.1. miR-3686 的靶基因生物信息学预测

通过 TargetScan 和 miRanda 软件是分析和预测, 结果见图 1。PLK1 的 3'UTR 区包含 miR-3686 的互补区域。提示 PLK1 可能是 miR-3686 的靶基因。

4.2. 双荧光素酶报告实验验证 miR-3686 的靶基因

4.2.1. 重组报告基因载体的构建

1) 目的片段扩增结果: 取 5 μ L PCR 扩增出的 PLK1 野生型 3'UTR 片段全长(325 bp), 突变型上片段(255 bp)和下片段(103 bp)及采用 overlap PCR 扩增出的 PLK1 突变型 3'UTR 片段全长(325 bp), 进行琼脂糖凝胶电泳, 结果见图 2。片段大小均与预期长度一致。

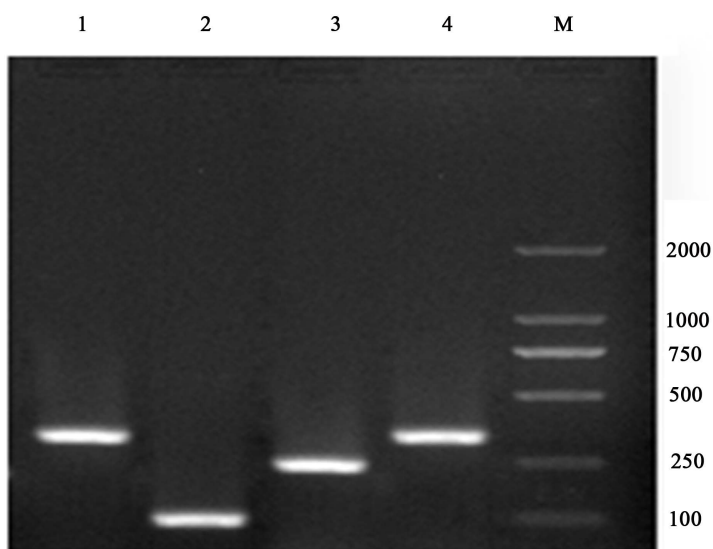
2) 重组报告基因载体鉴定:

酶切鉴定结果: 提取 PmirGLO-PLK1 质粒, 用 Sac I 和 Xho I 进行双酶切鉴定, 结果见图 3。

Position 232-238 of PLK1 3' UTR	5'	...CCACCAUAUGAAUUGUACAGAAU...
hsa-miR-3686	3'	AGUAAAUGAAAGAGAAUGUCUA

Figure 1. The predict target gene of miR-3686

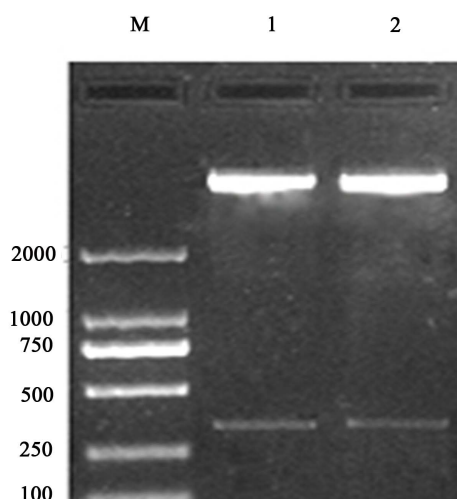
图 1. miR-3686 靶基因预测



1: PLK1 野生型全长, 2: PLK1 突变型下片段, 3: PLK1 突变型上片段, 4: PLK1 突变型全长, M: Marker

Figure 2. PCR amplification products of wild and mutant type PLK1

图 2. PLK1 野生型和突变型全长的 PCR 扩增产物



1: PLK1 野生型全长, 2: PLK1 突变型全长, M: Marker

Figure 3. Products of recombinant vector

图 3. 重组载体双酶切后鉴定产物

4.2.2. 双荧光素酶报告检测结果

采用双荧光素酶报告系统检测荧光素酶活性变化,结果见表 1。共转染 miR-3686 mimics 和含有 PLK1 野生型 3'UTR 区组的细胞的荧光素酶活性相较于其他三组细胞呈明显下调状态($P < 0.01$)。共转染 miR-3686 mimics 和含有 PLK1 突变型 3'UTR 区的重组载体组,以及共转染有 miR-3686 scramble 和两种载体组的萤光素酶活性之间没有出现明显的差异($P > 0.01$)。提示 miR-3685 与 PLK1 3'UTR 区相互作用,使得 miR-3686 可负向调控 PLK1 的表达。

4.3. Restore 实验

无 3'UTR 区 pcDNA3.1-PLK1 表达载体构建

PCR 扩增无 3'UTR 区的 PLK1, 扩增产物凝胶电泳,结果见图 4。用 BamHI 和 EcoRI 双酶切鉴定 pcDNA3.1 双粘载体与无 3'UTR 区 PLK1 片段重组的表达载体,电泳结果见图 5。鉴定结果均与预期一致,提示无 3'UTR 区 pcDNA3.1-PLK1 重组表达载体构建成功。

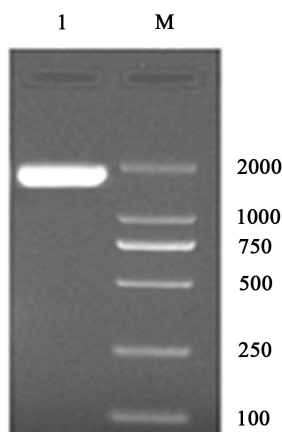
5. 讨论

5.1. PLK 家族成员的特点

PLK 家族成员的特点在于它们具有经典的丝氨酸苏氨酸结合域,这一区域半数位于该分子的 N 末端和 PBD 的 C 末端,是 PLK 家族特有的属性。PLK1-3 的 PBDs 都由 PB1 和 PB2 组成,具有相同的结构。人类 PLK1 的 PBD 调节 PLK1 的催化活性、定位和底物结合能力。这一区域组成一个结合袋以适应其他蛋白质丝氨酸或者苏氨酸残基磷酸化[1] [5] [6]。PLK 家族成员的 PBDs 磷酸化结合的最佳时机由定向肽筛查决定[2] [6]。

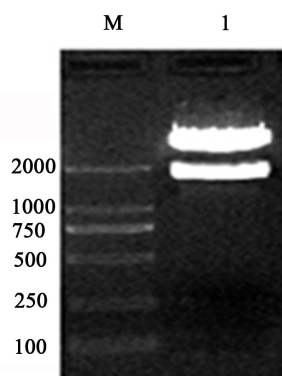
5.2. PLK1 发挥作用的机制

PLK1 通过 PBD 的定向活动进行空间调节。现有的比较有说服力的模型是 PBD 与一种磷酸化肽类物质结合模型,这种肽类物质由 CDK1 或者其他具有亲和力的蛋白激酶催化产生。此外,PLK1 通过产生自身的 PBD 连接位点自我推进自身的定位[2] [3] [6]。



M: Marker, 1: PLK1

Figure 4. PCR amplification products of PLK1 without 3'UTR region
图 4. 无 3'UTR 区 PLK1 的 PCR 产物



M: Marker, 1: PLK1

Figure 5. Double enzyme products of pcDNA3.1-PLK1
图 5. pcDNA3.1-PLK1 重组载体双酶切鉴定产物

Table 1. Results of dual luciferase report
表 1. 各组细胞的荧光素酶活性

组别	n	荧光素酶活性相对值
miR-3686和PLK1-WT共转染组	3	0.6188 ± 0.0552*
scramble和PLK1-WT共转染组	3	1.0014 ± 0.4357
miR-3686和PLK1-MUT共转染组	3	1.2630 ± 0.4119
scramble和PLK1-MUT共转染组	3	1.1913 ± 0.3852

PBD 与激酶结合域的结合抑制了 PLK1 的酶活性同时减弱了 PBD 和磷酸化肽类物质的联系[7] [8] [9]。生物信息学软件分析预测了 PLK1 的 3'UTR 区包含 miR-3686 的结合位点, 提示 PLK1 可能是 miR-3686 的作用靶基因。PLK1 能够在肿瘤治疗中代表一种优秀的预示性标志物多是由于它参与整个细胞周期的多个步骤以及其对肿瘤细胞的特异性; PLK1 的多种功能被引入生物学、医学、药学的研究中[10]。

为了进一步验证软件分析预测结果, 本研究进行了双荧光素酶报告实验和 qRT-PCR。qRT-PCR 结果显示 PLK1 在胰腺癌组织中的表达水平明显高于其对应的癌旁组织, 并且 PLK1 的表达水平与胰腺癌患

者的分化程度、TNM 分期以及淋巴结的转移情况有密切关系。PANC1 细胞的双荧光素酶报告实验的结果显示共转染 miR-3686 mimics 和野生型 PLK1 的 3'UTR 区重组载体时, 其荧光素酶活性显著降低。而共转染 miR-3686 mimics 和突变型 PLK1 的 3'UTR 区的重组载体的细胞, 以及转染 miR-3686 scramble 和重组报告载体的细胞的荧光素酶活性之间没有出现明显的差异。以上结果表明: miR-3686 可以通过作用于 PLK1 的 3'UTR 区, 从而负向调控其表达水平。

为了进一步研究 miR-3686 对 PLK1 的调控作用的机制, 本研究进行了 restore 实验。在本实验中, 我们构建了无 3'UTR 区的 pcDNA3.1-PLK1 表达载体。PLK1 蛋白的 Western blot 实验结果显示表明, 相对于 Mock 组, miR-3686 组 PLK1 蛋白的表达水平显著降低, pcDNA3.1-PLK1 组 PLK1 蛋白的表达水平显著升高。miR-3686 mimics 和 pcDNA3.1-PLK1 共转染组 PLK1 蛋白的表达水平与 pcDNA3.1-PLK1 组 PLK1 蛋白的表达水平没有明显变化。细胞侵袭实验结果表明: 相对于 Mock 组, miR-3686 mimics 和 pcDNA3.1-PLK1 共转染组和 pcDNA3.1-PLK1 组细胞迁移通过基质胶的 PANC1 细胞数均显著升高。

综上所述表明, miR-3686 通过作用于 PLK1 的 3'UTR 区负向调控 PLK1 的表达, 从而抑制胰腺癌细胞的侵袭和转移能力。

参考文献 (References)

- [1] Xu, J., Shen, C., Wang, T., *et al.* (2013) Structural Basis for the Inhibition of Polo-Like Kinase 1. *Nature Structural & Molecular Biology*, **20**, 1047-1053. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2623>
- [2] Kettenbach, A.N., Schweppe, D.K., Faherty, B.K., *et al.* (2011) Quantitative Phosphoproteomics Identifies Substrates and Functional Modules of Aurora and Polo-Like Kinase Activities in Mitotic Cells. *Science Signaling*, **4**, rs5. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001497>
- [3] Bai, Y., Li, J., Fang, B., *et al.* (2012) Phosphoproteomics Identifies Driver Tyrosine Kinases in Sarcoma Cell Lines and Tumors. *Cancer Research*, **72**, 2501-2511. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3015>
- [4] Bieging, K.T., Mello, S.S. and Attardi, L.D. (2014) Unravelling Mechanisms of p53-Mediated Tumour Suppression. *Nature Reviews Cancer*, **14**, 359-370. <https://doi.org/10.1038/nrc3711>
- [5] Salvi, M., Trashi, E., Cozza, G., *et al.* (2012) Investigation on PLK2 and PLK3 Substrate Recognition. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1824**, 1366-1373.
- [6] Bruinsma, W., Macurek, L., Freire, R., *et al.* (2014) Bora and Aurora-A Continue to Activate Plk1 in Mitosis. *Journal of Cell Science*, **127**, 801-811. <https://doi.org/10.1242/jcs.137216>
- [7] Craig, S.N., Wyatt, M.D. and McInnes, C. (2014) Current Assessment of Polo-Like Kinases as Anti-Tumor Drug Targets. *Expert Opinion on Drug Discovery*, **9**, 773-789. <https://doi.org/10.1517/17460441.2014.918100>
- [8] Gjertsen, B.T. and Schoffski, P. (2015) Discovery and Development of the Polo-Like Kinase Inhibitor Volasertib in Cancer Therapy. *Leukemia*, **29**, 11-19. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.222>
- [9] Cholewa, B.D., Liu, X. and Ahmad, N. (2013) The Role of Polo-Like Kinase 1 in Carcinogenesis: Cause or Consequence? *Cancer Research*, **73**, 6848-6855. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2197>
- [10] McInnes, C. and Wyatt, M.D. (2011) PLK1 as an Oncology Target: Current Status and Future Potential. *Drug Discovery Today*, **16**, 619-625.

期刊投稿者将享受如下服务：

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：acm@hanspub.org