

MicroRNA-101 调控人胃癌细胞系增殖、迁移、侵袭的实验研究

魏夫荣 阮洪军 王惠菊 何徐军 杜静 马杰

【摘要】 目的 通过实验研究 miRNA-101 在胃癌中的表达水平,以及对胃癌细胞增殖、迁移、侵袭力和皮下移植瘤的影响,以探讨将 miRNA-101 用于胃癌生物靶向治疗的可能性。**方法** 分子克隆技术构建 miRNA-101 重组腺病毒表达载体,MTT 法检测细胞增殖能力,Millipore Transwell 小室法检测细胞迁移能力,Matrigel 法检测细胞侵袭能力,q-PCR 定量分析各基因表达水平,使用 BALB/c 免疫缺陷裸鼠建立胃癌皮下移植瘤模型。**结果** miRNA-101 在胃癌组织中的表达量为 (0.661 ± 0.396) ,低于所对应的癌旁组织 (1.128 ± 0.697) ,差异有统计学意义($t=10.091, P<0.01$)。胃正常上皮细胞 GES-1 中的 miRNA-101 表达量高于胃癌细胞系 BGC-823、SGC-7901、MKN-45 和 AGS。miRNA-101 对 MKN-45 细胞的增殖能力呈现明显的抑制作用,对胃癌细胞 BGC-823、SGC-7901、MKN-45、AGS 的迁移和侵袭均有抑制作用。选取 MKN-45 细胞系建立裸鼠皮下移植瘤模型后 5 周,Ad-miRNA-101 组肿瘤体积为 $(333.56 \pm 46.71) \text{ mm}^3$,小于 Ad-EGFP 组 $(806.41 \pm 51.83) \text{ mm}^3$,差异有统计学意义($t=21.431, P<0.01$)。**结论** 在胃组织中,miRNA-101 是一个抑制性 miRNA,miRNA-101 表达水平下调参与胃癌的发生和发展。miRNA-101 将有可能成为胃癌生物靶向治疗的新靶点。

【关键词】 microRNA 胃癌 miRNA-101

Effect of MicroRNA-101 on cell proliferation, migration and invasion of human gastric cancer cell lines WEI Furong, RUAN Hongjun, WANG Huiju, et al. Department of Gastroenterology, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of miRNA-101 on cell proliferation, migration and invasion of human gastric cancer cells in vitro and in vivo. **Methods** Recombinant adenovirus encoding miRNA-101 was constructed, MTT assay was to detect vitality and proliferation ability of cells, transmembrane motility assay was for observing cell migration and invasion, The target gene expression was analyzed using real time PCR. BALB/c nude mice were injected to develop the gastric xenograft cancer model. **Results** miRNA-101 expression was significantly lower in gastric cancer tissue (0.661 ± 0.396) than that in matched normal tissues $(1.128 \pm 0.697, P<0.05)$; and lower in BGC-823, SGC-7901, MKN-45, AGS gastric cancer cells than that in normal gastric epithelial GES-1 cells. Reestablishment of miRNA-101 was able to significantly inhibit the proliferative ability of MKN-45 cells, and induce the reduction of cellular proliferation, migration and invasion in BGC-823, SGC-7901, MKN-45 and AGS cells in vitro. The xenograft model further confirmed that miRNA-101 massively suppresses the tumor growth in vivo $(333.56 \pm 46.71 \text{ mm}^3 \text{ vs } 806.41 \pm 51.83 \text{ mm}^3)$. **Conclusion** Down-regulation of miRNA-101 may be involved in tumorigenesis of the stomach, and it might be a potential target for a novel therapeutic approach of gastric cancer.

【Key words】 MicroRNA Gastric cancer miRNA-101

长度大约 22nt 的内源性小 RNA,即微小 RNA (miRNA),通过调控癌基因或抑癌基因的表达,在肿瘤的发生和发展中起重要的调控作用,是目前肿瘤研究的热点^[1]。microRNA-101(miRNA-101)是 MicroRNA 家族的一员,有研究提示 miRNA-101 通过阻断细胞的自噬功能

因而能抑制肿瘤的增殖、迁移以及侵袭。miRNA-101 在前列腺癌、乳腺癌和肝癌等肿瘤研究中呈低水平表达^[2-3],但其在胃癌中的作用相关研究不多。本文通过实时定量 PCR(q-PCR)分析 miRNA-101 及其下游靶基因 EZH2、COX-2、Mcl-1、FOS 表达水平,并通过细胞增殖试验和细胞体外迁移、侵袭试验,动物实验的体内实验研究,分析 miRNA-101 在人胃癌细胞系增殖、迁移、侵袭的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和组织准备 人胃癌细胞系 BGC-823、

作者单位:310014 杭州,浙江省人民医院消化内科(魏夫荣、阮洪军、杜静,魏夫荣系海宁市第三人民医院进修医师),病理科(马杰);浙江省胃肠病学重点实验室(王惠菊、何徐军)

通信作者:阮洪军, E-mail: ruanhongjun@aliyun.com

SGC-7901、MKN-45、AGS 以及人胃黏膜上皮细胞系 GES-1 购自上海交通大学医学院消化外科研究所,生长于含 10%胎牛血清,50U/ml 青霉素 + 50μg/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基中。HEK293 细胞购自浙江大学附属邵逸夫医院,生长于含 10%胎牛血清,50U/ml 青霉素 + 50μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基中。培养条件为 37℃、5%CO₂ 以及饱和湿度。28 对胃癌及癌旁 5mm 处组织取自浙江省人民医院原发性胃腺癌手术患者。术前常规签署标本使用知情同意书,术后组织标本经快速液氮冰冻后置于-80℃超低温冰箱保存。

1.2 实时定量 PCR(q-PCR)分析 miRNA-101 及其下游靶基因 EZH2、COX-2、Mcl-1、FOS 表达水平 应用 Trizol 法提取总 RNA,取 1μg 总 RNA 为模板,应用 SuperScript[®] III cDNA 试剂盒(Invitrogen)合成 cDNA(具体步骤见说明书)。引物序列见表 1,紧接着,应用 SYBR[®] Premix Ex Taq PCR 试剂盒(Takara)进行 PCR 扩增,反应条件:95℃ 5min,95℃ 10s,60℃ 20s,72℃ 20s(共 40 个循环)。收集分别感染 Ad-miRNA-101、Ad-EGFP 的 BGC-823、SGC-7901、AGS、MKN-45 细胞总 RNA,cDNA 产物进行 EZH2、COX-2、Mcl-1、Fos 和 GAPDH 的 PCR 扩增。引物序列见表 1,反应条件:95℃ 5min,95℃ 10s,56℃ 20s,72℃ 20s(共 40 个循环)。PCR 终末,由计算机软件自动生成溶解曲线,各基因之表达量由 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算获得^[4]。

1.3 miRNA-101 腺病毒表达体系的构建 应用 Ad-Max[™] 试剂盒(Microbix Biosystems Inc)构建 miRNA-101 重组腺病毒表达载体。以人类基因组 DNA 为模板,5'-GGAATTCTGCCTCCTCAGCTCTC-3'和 5'-GGAAGATC-TATGACAGAGGTGCAGG-3'为引物,PCR 扩增 pri-miRNA-101 基因片段。之后,将 pri-miRNA-101 克隆入 pDC316 穿梭质粒,产物经酶切鉴定、测序后命名为 Ad-miRNA-101。应用脂质体 2000(Invitrogen)将 Ad-miRNA-101 和基因组质粒 pBHGloxΔE1,3Cre 共同转染 HEK293 包装细胞。10d 后收集、扩增、纯化病毒,TCID50 法测定病毒滴度。同时,应用商业化 Ad-EGFP 作为对照,根据感染复数值(MOI=25、50、100、200)建立量效曲线。将各自感染有 Ad-miRNA-101、Ad-EGFP 的胃癌细胞培养 24h,提取总 RNA,按 2.2 步骤进行 PCR 扩增以观察各基因之表达水平。

1.4 细胞增殖试验 应用 MTT 法检测 miRNA-101 对胃癌细胞增殖能力的影响。将 BGC-823、SGC-7901、MKN-45、AGS 制成单细胞悬液,种植于(1×10³/孔,4 个平行孔)96 孔板内培养过夜。第 2 天分别加入 Ad-miR-

表 1 引物序列

基因	引物	序列
miRNA-101	RT 引物	5' -GTCGTATCCAGTGCCTGTCTGAGTC- GCAATTGCACTGGATACGACCTTCAGT-3'
	前向引物	5' -TGGGCTACACTACTGTGATA-3'
	反向引物	5' -TGCGTGTCTGGAGTC-3'
RNU6B	RT 引物	5' -CGCTTCACGAATTTGCGTGTCTCAT-3
	前向引物	5' -GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'
	反向引物	5' -CGCTTCACGAATTTGCGTGTCTCAT-3'
EZH2	前向引物	5' -GACCCCTGACCTCTGTCTTACTT-3'
	反向引物	5' -GATGGTGGCAGCAATAGATG-3'
COX-2	前向引物	5' -CTGAATGTGCCATAAGACTG-3'
	反向引物	5' -CCACAGTGTCTGACACAGAAT-3'
Mcl-1	前向引物	5' -TCAGCGACGGCGTAACAAACT-3'
	反向引物	5' -ACAAACCCATCCCAGCCTCTT-3'
Fos	前向引物	5' -GACCTTATCTGTGCGTGAAAC-3'
	反向引物	5' -TTCCAATAATGAACCAATAGAT-3'
GAPDH	前向引物	5' -TGAAGCTCGGACTCAACGG-3'
	反向引物	5' -CTGGAAGATGCTGATGGGATT-3'

NA-101、Ad-EGFP(1×10⁶pfu/ml),孵育 72h 后加入 10μl MTT 液(5mg/ml)(Sigma),孵育 4h 后弃培养基并加入 150μl DMSO。采用分光光度计测定 570nm 以及 630nm 处吸光度值,根据以下公式计算细胞增殖率:实验组(A570~A630nm)/对照组(A570~A630nm)×100%。

1.5 细胞体外迁移、侵袭试验 应用 Millipore Transwell 小室法检测胃癌细胞迁移能力。将分别感染 Ad-miRNA-101、Ad-EGFP 的 BGC-823、SGC-7901、MKN-45、AGS 细胞制成单细胞悬液,种植于(1×10⁵/孔,4 个平行孔)带膜(0=8μm)的 Transwell 小室内,再将小室置于含 30%胎牛血清 RPMI1640 培养基的 24 孔板内,孵育 24h 后取膜下层细胞,经固定、染色后随机选取 5 个高倍镜视野,计算平均细胞数。应用 Matrigel 法检测胃癌细胞侵袭能力。将细胞制成单细胞悬液,种植于(4×10⁵/孔,4 个平行孔)覆盖 Matrigel 的滤膜上(0=8μm),再将小室置于含 30%胎牛血清 DMEM 培养基的 24 孔板内,孵育 48h 后取膜下层细胞,经固定、染色后随机选取 5 个高倍镜视野,计算平均细胞数。

1.6 动物实验 4~5 周龄的雌性 BALB/c 裸鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司。所有动物实验均依照实验动物处理和保护委员会条例进行。将 1×10⁷ 个 MKN45 细胞注射入裸鼠右后腿建立裸鼠胃癌移植瘤模型。待瘤体直径约 5mm 时,将动物按数字表法随机分为两组,每组 5 只,分别在第 1、4、7、10、13 天将 1×10¹⁰PFU/ml 的 Ad-miRNA-101 和 Ad-EGFP 注射入相应组瘤体内(设为 Ad-miRNA-101 组和 Ad-EGFP 组)。

每两周测一次肿瘤大小,5 周后处死动物,收集标本,根据公式计算肿瘤体积:(长×宽²)/2。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件,测得计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,配对 t 检验用于分析肿瘤组和非肿瘤组 miRNA-101 表达水平的差异,独立样本 t 检验用于实验组和对照组之间的表达差异。

2 结果

2.1 miRNA-101 在胃癌组织和细胞中表达水平的变化 胃癌组织中 miRNA-101 的表达量为(0.661±0.396),低于所对应的癌旁组织(1.128±0.697),比较差异有统计学意义($t=10.091, P<0.01$)。胃正常上皮细胞 GES-1 中的 miRNA-101 表达量为(2.423±0.303),高于胃癌细胞系 BGC-823(0.788±0.427)、SGC-7901(1.854±0.358)、MKN-45(0.723±0.212)和 AGS(1.896±0.418),差异均有统计学意义($t=4.644, 5.350, 6.482, 4.990$, 均 $P<0.01$)。

2.2 miRNA-101 对胃癌细胞增殖能力的影响 见图 1。

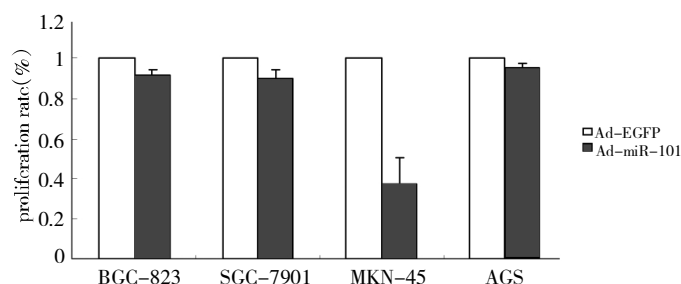


图 1 重建 miRNA-101 表达对胃癌细胞增殖的影响

由图 1 可见,在 4 种胃癌细胞系中,与各自对照组相比,miRNA-101 对 MKN-45 细胞增殖的抑制作用最强,差异有统计学意义(37.4%vs94.1%, $P<0.01$),对 BGC-823、SGC-7901 细胞的增殖亦有较强的抑制作用,差异有统计学意义(91.3% vs 98.7%,89.7% vs 96.5%; 均 $P<0.05$),对 AGS 细胞的增殖活性无明显影响,差异无统计学意义(95.3% vs96.2%, $P>0.05$)。

2.3 miRNA-101 对胃癌细胞迁移和侵袭能力的影响 见表 2~3。

表 2 miRNA-101 对胃癌细胞迁移的影响

胃癌细胞系	平均细胞数(个)		t 值	P 值
	Ad-miRNA-101 组	Ad-EGFP 组		
BGC-823	239.000 ± 8.369	270.000 ± 6.972	3.180	<0.05
SGC-7901	162.000 ± 4.193	270.000 ± 6.972	50.060	<0.05
MKN-45	77.000 ± 3.186	294.000 ± 2.769	89.041	<0.05
AGS	145.000 ± 9.125	308.000 ± 4.038	28.293	<0.05

由表 2 可见,与 Ad-EGFP 组比较,Ad-miRNA-

表 3 miRNA-101 对胃癌细胞侵袭能力的影响

胃癌细胞系	平均细胞数(个)		t 值	P 值
	Ad-miRNA-101 组	Ad-EGFP 组		
BGC-823	65.000 ± 7.994	84.000 ± 8.163	4.929	<0.01
SGC-7901	32.000 ± 6.681	76.000 ± 8.207	7.201	<0.01
MKN-45	22.000 ± 5.007	93.000 ± 11.204	10.021	<0.01
AGS	40.000 ± 6.452	79.000 ± 8.336	6.408	<0.01

101 组能显著抑制 BGC-823、SGC-7901、MKN-45、AGS 胃癌细胞的平均细胞迁移数,此抑制作用在 MKN-45 细胞中最明显,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。

由表 3 可见,与 Ad-EGFP 组比较,Ad-miRNA-101 组能够明显抑制以上 4 种细胞系的侵袭能力,此抑制作用也在 MKN-45 细胞中最强,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。

2.4 miRNA-101 对胃癌细胞内靶基因 EZH2、COX-2、Mcl-1、FOS 转录水平的影响 见表 4。

由表 4 可见,与对照 Ad-EGFP 组相比,Ad-miRNA-101 组能显著抑制 BGC-823、MKN-45、AGS 胃癌细胞系中 EZH2、COX-2、Mcl-1、FOS 靶基因 mRNA 的表达水平,差异有统计学意义($t=10.579, 5.703, 7.675, 2.915$, 均 $P<0.05$; $t=5.797, 11.944, 2.882, 2.979$, 均 $P<0.05$; $t=9.860, 10.209, 8.682, 7.275$, 均 $P<0.01$);在 SGC-7901 细胞系中,与对照 Ad-EGFP 组相比,Ad-miRNA-101 组能显著抑制 EZH2、Mcl-1、FOS 靶基因 mRNA 的表达水平差异有统计学意义($t=3.380, 2.958, 2.943$, 均 $P<0.05$),而对 COX-2 mRNA 的表达水平无影响,差异无统计学意义($t=0.121, P>0.05$)。

2.4 miRNA-101 对胃癌皮下移植瘤生长能力的影响 见图 2。

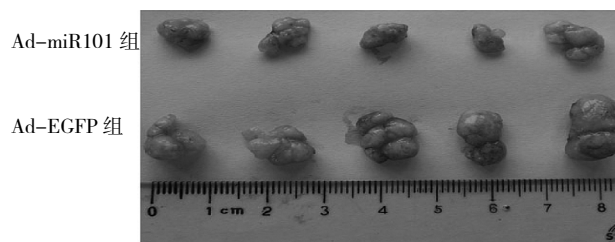


图 2 重建 miRNA 对裸鼠胃癌移植瘤的影响

由图 2 可见,5 周后处死动物,比较皮下瘤体体积大小,显示 Ad-miRNA-101 组肿瘤体积为(333.56±46.71)mm³,明显小于 Ad-EGFP 组的(806.41±51.83)mm³,差异有统计学意义($t=21.431, P<0.01$)。

3 讨论

研究已证实 miRNA 存在于正常人体组织内,参与

表 4 miRNA-101 对胃癌细胞内靶基因 EZH2、COX-2、Mcl-1、FOS 转录水平的影响

分组	EZH2	COX-2	Mcl-1	FOS
Ad-EGFP 组				
BGC-823	1.728 ± 0.053	1.662 ± 0.129	1.967 ± 0.092	2.163 ± 0.532
SGC-7901	1.136 ± 0.061	1.410 ± 0.174	2.310 ± 0.124	1.860 ± 0.443
MKN-45	0.615 ± 0.065	2.991 ± 0.093	0.754 ± 0.058	3.575 ± 0.783
AGS	2.055 ± 0.062	3.370 ± 0.124	2.116 ± 0.148	8.164 ± 0.737
Ad-miRNA-101 组				
BGC-823	1.152 ± 0.078*	0.997 ± 0.283*	1.405 ± 0.087*	1.344 ± 0.492*
SGC-7901	0.909 ± 0.049*	1.424 ± 0.099 [△]	2.073 ± 0.038*	1.327 ± 0.402*
MKN-45	0.330 ± 0.055*	2.034 ± 0.103*	0.645 ± 0.059*	2.936 ± 0.815*
AGS	1.644 ± 0.037**	2.393 ± 0.110**	1.049 ± 0.153**	3.549 ± 0.734**

注:与 Ad-EGFP 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,[△] $P > 0.05$

调控细胞的多种生物学功能。miRNA 的失调可能导致肿瘤的形成。本实验通过研究 miRNA-101 在胃癌组织和细胞系中的表达情况,以及对胃癌细胞增殖、迁移、侵袭能力的影响,揭示了 miRNA-101 在胃癌中的作用及其可能的调控机制。目前对于 miRNA-101 在肿瘤中的表达水平尚存在争议。大多数研究者认为 miRNA-101 在肿瘤中表达水平下调,而有两项研究发现 miRNA-101 在肝癌细胞系 HepG2 和前列腺癌中呈现为高表达^[5-6]。我们的实验结果与大多数研究结果相仿,即:miRNA-101 在胃癌组织与细胞系中的表达水平明显降低。此结果预示着在胃组织中,miRNA-101 可能是一个抑癌基因,其表达缺失或下降可能促进胃癌的发生和发展。

多个研究发现在肝癌、乳腺癌以及前列腺癌中,miRNA-101 能够抑制癌细胞的增殖和克隆形成,另有一些体外实验表明在前列腺癌和肝癌中,miRNA-101 能抑制癌细胞的生长^[7-9]。我们通过外源性导入 miRNA-101 重组腺病毒,并借助 MTT 试验、肿瘤细胞迁移和侵袭实验,证明了 miRNA-101 表达增高能显著抑制 BGC-823、SGC-7901、MKN-45、AGS 4 种胃癌细胞系的增殖、迁移以及侵袭能力,并且此抑制作用在自身表达 miRNA-101 最低的 MKN-45 细胞系中尤为明显。另外,我们亦通过裸鼠移植瘤模型发现 miRNA-101 的高表达能明显抑制胃癌瘤体的生长。此两项研究结果进一步验证了我们认为胃组织中 miRNA-101 可能是一个抑癌基因的假设。

EZH2、COX-2、Mcl-1、FOS 分别是受 miRNA-101 调控的靶基因^[10-11]。EZH2 是一种组蛋白-赖氨酸 N-甲基转移酶,通过促使组蛋白 H3 亮氨酸 27 甲基化而引起基因沉默。EZH2 在许多实体瘤中表达明显升高,促进肿瘤细胞增殖、克隆形成、迁移和侵袭。COX-2 是前

列腺素合成过程的限速酶,其过表达可促进肿瘤细胞增殖、转移和血管生成,抑制凋亡。Mcl-1 属于 Bcl-2 家族,是一种抗凋亡因子,敲除 Mcl-1 能够促使肿瘤细胞凋亡。FOS 是转录调节子 AP-1 的一个重要组分,其高表达与肿瘤发生、进展相关。既往研究表明,EZH2、COX-2、Mcl-1 和 FOS 在胃癌组织中高表达^[12]。我们通过外源性导入 miRNA-101 重组腺病毒载体而重建其在 BGC-823、SGC-7901、MKN-45 和 AGS 胃癌细胞系中的表达,发现 miRNA-101 表达增高能显著抑制此 4 种靶基因的 mRNA 水平。此结果解释了 miRNA-101 抑制胃癌细胞增殖、迁移、侵袭作用的潜在机制。事实上,利用 miRNA 靶标预测软件 TargetScan、PicTar、miRNAanda 等尚发现了其他一些靶基因如 MYCN、STC1 和 DNMT3A 亦受 miRNA-101 调控,因此,miRNA-101 抑制胃癌的作用机制仍值得进一步探讨。

本实验通过体内和体外研究发现:(1)miRNA-101 在胃癌组织和细胞系中表达水平下调,并且能显著抑制胃癌细胞的增殖、迁移、侵袭能力;(2)miRNA-101 对胃癌的抑制作用可能是通过抑制靶基因 EZH2、COX-2、Mcl-1、FOS 的转录来实现的。

综上所述,在胃组织中,miRNA-101 是一个抑制性 miRNA,其表达下调参与胃癌的发生和发展。此点为将来进一步开发以 miRNA-101 为靶点的胃癌生物靶向治疗提供了有力的实验基础。

4 参考文献

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004,116(2):281-297.
- [2] Frankel L B, Wen J, Lees M, et al. microRNA-101 is a potent inhibitor of autophagy[J]. EMBO J, 2011,30(22):4628-4641.
- [3] Gui T, Shen K. miRNA-101: a potential target for tumor therapy[J].

(下转第 1278 页)