

miR-195 在食管癌中的表达及其对食管癌细胞株增殖的影响

傅敏根,李 硕,郁婷婷,钱丽娟,高树娟,朱 宏,冯亚东,曹日昇,陈 亮,施瑞华*

(南京医科大学第一附属医院消化内科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨 microRNA-195 (miR-195) 在食管癌中的表达及其对食管鳞癌细胞 Eca109 增殖的影响。方法:采用 Taqman 探针实时定量 PCR 方法检测 10 对外科手术食管鳞癌标本 miR-195 的表达,用阳离子脂质体 Lipofectamine™2000 将 miR-195 类似物转入 Eca109 细胞,Cell Counting Kit-8 (CCK-8)法检测细胞增殖情况,流式细胞仪检测细胞周期,Western blot 检测蛋白表达水平。结果:与正常食管上皮相比,食管鳞癌组织 miR-195 表达明显降低($P < 0.05$)。在 48、72、96 h,miR-195 转染组细胞吸光值明显低于对照组($P < 0.05$),且 miR-195 转染组处于 G0/G1 期细胞的百分数明显高于对照组($P < 0.05$)。Western blot 结果显示 miR-195 转染组 Cdc42 蛋白水平明显低于对照组 ($P < 0.05$)。结论:miR-195 可阻滞 Eca109 细胞从 G1 期进入 S 期,抑制其增殖。

[关键词] miR-195;食管鳞癌;增殖;细胞周期

[中图分类号] R735.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)05-575-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20130503

The expression of miR-195 in esophageal cancer and its effect on proliferation of esophageal cancer cell lines

Fu Minggen, Li Shuo, Yu Tingting, Qian Lijuan, Gao Shujuan, Zhu Hong, Feng Yadong, Cao Risheng, Chen Liang, Shi Ruihua*

(Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] Objective: To observe the expression of microRNA-195 (miR-195) in ESCC tissues and the effects of miR-195 on the proliferation of Eca109 cells. **Methods:** The expression of miR-195 in ten pairs of ESCC tumor tissues and adjacent normal esophageal tissues after surgical resection was detected by Taqman Real-time PCR. The miR-195 mimics was transfected into Eca109 cell by using Lipofectamine™ 2000. The ability of cell proliferation and cell cycle were detected by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) and FACS, respectively. Protein was detected by Western Blot. **Results:** The miR-195 was down-regulated in ESCC tissues compared with normal esophageal tissues ($P < 0.05$). After transfected miR-195 mimics, cell proliferation was inhibited by CCK-8 assay and cell cycle was arrested in G0/G1 phase by FACS assay ($P < 0.01$). Western blot result indicated that Cdc42 protein was reduced after miR-195 mimics transfected ($P < 0.01$). **Conclusion:** The miR-195 could induce G1 arrest and inhibit proliferation in Eca109.

[Key words] miR-195; esophageal squamous cell carcinoma; proliferation; cell cycle

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(5): 575-578]

食管癌是世界上最常见的八大恶性肿瘤之一,其病死率居恶性肿瘤第 6 位^[1],尽管当前诊疗水平有了明显提高,但由于缺乏早期诊断方法和治疗靶向性,目前食管癌患者 5 年生存率仍不到 10%^[2],因此,在分子水平上探索食管癌增殖侵袭相关基因,寻

找敏感且特异的早期诊断及治疗标志物显得尤为重要。食管癌可分为鳞癌和腺癌,食管鳞癌好发于亚洲,特别是中国^[3],而食管腺癌则多见于西方。

microRNAs (miRNAs) 是一类长 17~25 个核苷酸非编码的高度保守的内源性小分子单链 RNA,通过与靶基因信使 RNA (mRNA) 的 3' 非编码区 (3'-UTR) 结合,降解 mRNA 和 (或) 阻断其翻译,从而调节靶基因的表达^[4],它们在疾病发展的病理生理过程中的研究仍处于进展阶段。现有研究表明,miRNA

[基金项目] 江苏省研究生创新工程 (JX22613169); 江苏省人民医院食管疾病创新团队项目 (CX11)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: ruihuashi@126.com

参与人体内多种信号过程,包括增殖、分化及凋亡,miRNA的失调可产生抑癌或促癌作用^[5-7]。Kong等^[8]发现miR-375低表达于食管鳞癌组织,并通过下调胰岛素样生长因子1受体抑制肿瘤增殖及转移。而另一研究发现miR-223高表达于食管鳞癌组织,起致癌作用^[9]。

通过前期对3对食管鳞癌组织进行基因芯片筛查,并与正常食管鳞状上皮相比,发现miR-195低表达于食管鳞癌组织,且有文献报道miR-195在结肠癌和舌鳞癌中均呈低表达,起抑癌作用^[10-11],但其在食管鳞癌中的作用尚未明了,本研究主要对miR-195在食管鳞癌中的作用进行初探。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞株培养

食管鳞癌细胞株Eca109购自上海细胞研究所,用含10%小牛血清及1%双抗的RPMI1640于37℃、5%CO₂培养箱中培养。

1.1.2 临床病例标本收集

在南京医科大学第一附属医院胸外科收集了10对食管鳞癌组织及其邻近食管正常组织(距病变部位5cm以上)标本,离体后立即于液氮中骤冷,然后移至-80℃长期保存。本实验获得南京医科大学伦理委员会批准。

1.2 方 法

1.2.1 实时定量PCR

TRIzol法提取细胞及组织总RNA,用Taqman miRNA逆转录试剂盒将10ngRNA逆转录成cDNA,Taqman探针法实时定量PCR,检测组织及细胞miR-195及U6的含量。逆转录反应体系为15μl:100mmol/LdNTPs0.15μl,MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50U/μl)1.0μl,10× Reverse Transcription Buffer 1.50μl,RNase抑制剂(20U/μl)0.19μl,Nuclease-free water 4.16μl,RT引物3μl,RNA(2ng/μl)5μl,反应条件:16℃30min;42℃30min;85℃5min。实时定量PCR反应体系为10μl:TaqMan 2× Universal PCR Master Mix 5μl,Nuclease-free water 3.835μl,TaqMan MiRNA Assay (20×)0.5μl,RT reaction product 0.665μl、反应条件:95℃10min;95℃15s,60℃60min,共40个循环。miR-195的相对表达量以2^{-ΔΔCT}法计算。

1.2.2 细胞转染

miR-195类似物及阴性对照(NC)由上海吉玛

公司设计合成,转染试剂为Lipofectamine™ 2000(美国Invitrogen公司),转染前将食管鳞癌Eca109细胞按2×10⁵个/孔种植于6孔板中,待细胞达到70%融合时按说明书进行转染。

1.2.3 CCK-8细胞增殖实验

转染后48h将细胞接种到96孔板中,每孔3000个细胞,每组设4个复孔,分别于接种后24、48、72、96h加入CCK-8,37℃孵育2h后,用酶标仪检测450nm波长下的吸光度值。

1.2.4 细胞周期检测

转染后72h收集细胞,PBS洗2遍,70%预冷乙醇固定细胞,于4℃过夜后加入PI/RNase,用流式细胞仪分析。

1.2.5 Western blot检测

转染后72h后提取细胞蛋白,BCA法测蛋白浓度后,50μg蛋白加入10%SDS-PAGE中电泳,结束后转印至PVDF膜上,用5%脱脂奶粉室温封闭1h,一抗4℃摇床过夜,二抗室温孵育1h,X线片曝光显影。

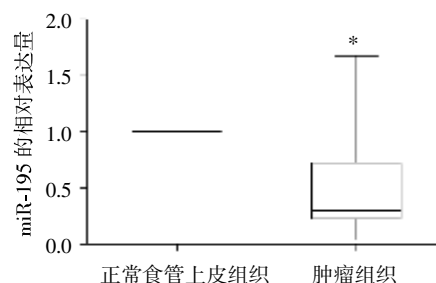
1.3 统计学方法

采用SPSS17.0统计软件进行分析,所有结果均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用独立样本t检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 miR-195低表达于食管鳞癌组织

Taqman探针实时定量PCR法对10对外科食管鳞癌手术标本进行了miR-195含量的检测,以表达量相差2倍为截点,发现在10对标本中,有8对(80%)食管鳞癌组织miR-195含量低于其邻近正常食管鳞状上皮组织的2倍及以上($t = 2.641, P < 0.05$,图1)。



与正常食管上皮组织相比,* $P < 0.05$ 。

图1 Real-Time PCR检测miR-195在食管癌与邻近正常食管上皮组织中的表达

Figure 1 The miR-195 expression in ESCC tissues and adjacent normal esophageal tissues by Real-time PCR

2.2 转染细胞miR-195的表达

Eca109 细胞转染 100 nmol/L miR-195 类似物后 48 h 提取细胞总 RNA,用 Taqman 探针实时定量 PCR 法检测 miR-195 的表达,发现转染后 miR-195 表达量明显增加($t = 15.405, P < 0.01$,图 2)。表明通过此种方法可以增加 miR-195 表达。后续实验中采取此方法来增加 Eca109 细胞中 miR-195 的表达。

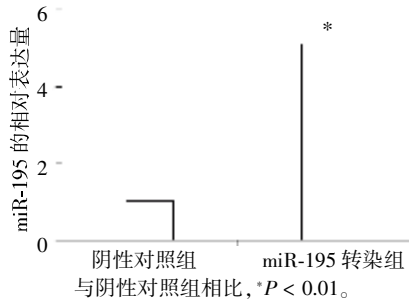


图 2 Real-time PCR 检测转染后 Eca109 中 miR-195 的表达
Figure 2 The miR-195 expression in Eca109 cells after transfection detected by Real-time PCR

2.3 miR-195 可抑制食管鳞癌细胞的增殖

将 miR-195 类似物转入 Eca109 细胞株 48 h 后,与阴性对照组相比,在接种到 96 孔板 24 h 后 miR-195 转染组细胞的增殖未受明显影响 ($t = 1.554, P > 0.05$),而在 48、72、96 h 后则细胞增殖明显抑制(t 值分别为 11.155、9.443、3.174, P 值分别 < 0.01 、 < 0.01 、 < 0.05 ,图 3)。这表明,增加 miR-195 表达可明显抑制食管鳞癌细胞增殖。

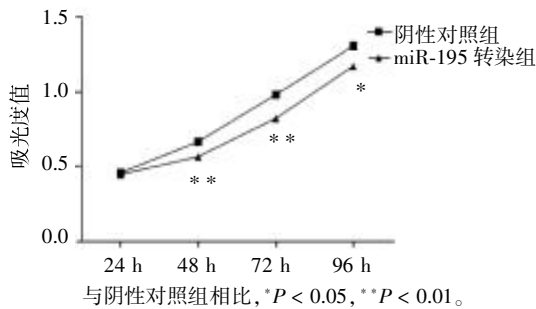


图 3 miR-195 对细胞增殖的影响
Figure 3 The effect of miR-195 on the cell proliferation

2.4 miR-195 使食管鳞癌 Eca109 细胞阻滞于 G1 期

将 Eca109 细胞转染 miR-195 类似物 72 h 后,对细胞所处周期进行检测,与阴性对照组相比,miR-195 转染组 G0/G1 期细胞数百分比明显增多 ($t = 5.765, P < 0.01$,图 4),而 S 期及 G2 期细胞数百分比明显减少。这表明,miR-195 抑制细胞增殖是通过阻断细胞周期来实现的。

2.5 miR-195 抑制食管鳞癌细胞 Cdc42 蛋白表达

Eca109 细胞转染 miR-195 类似物 72 h 后,提

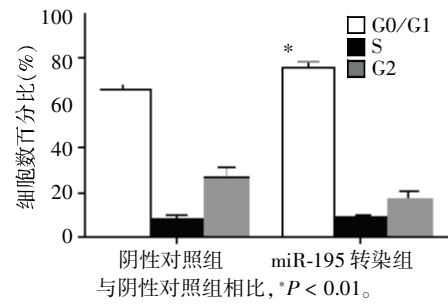


图 4 流式细胞仪检测转染细胞所处细胞周期
Figure 4 The cell cycle detected by flow cytometry

取蛋白进行 Western blot,发现 miR-195 转染组 Cdc42 的蛋白水平明显比阴性对照组低($t = 5.414, P < 0.01$,图 5)。表明 miR-195 可能是通过抑制 Cdc42 的表达来实现阻滞细胞周期的进展,抑制细胞增殖。

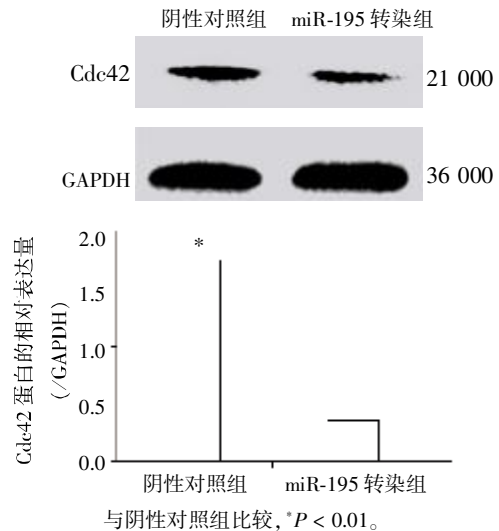


图 5 转染后 Western blot 检测 Cdc42 蛋白表达水平
Figure 5 The expression of Cdc42 protein after transfection detected by Western blot

3 讨论

miR-195 与 miR-15、miR-16、miR-424、miR-497 同属于 miR-16 家族,它们拥有共同的 5' 核心序列:CGACGA。miR-195 最早被报道高表达于心脏肥厚的转基因小鼠中,并且使病理性心脏向心力衰竭发展^[12]。其后有研究显示 miR-195 低表达于结肠癌,能抑制结肠癌细胞增殖及促进细胞凋亡,属抑癌基因^[10],但其对食管癌的作用尚未有文献报道。本研究发现 miR-195 低表达于食管鳞癌组织,并观察其对食管鳞癌细胞株 Eca109 的影响。

通过对 miR-195 与 Eca109 细胞的研究,发现有以下结果或可作为 miR-195 在食管鳞癌中起抑癌作

用的依据:①与邻近正常食管上皮相比,miR-195 低表达于食管鳞癌组织中;②在 Eca109 细胞中增加 miR-195 的表达,可明显抑制 Eca109 细胞增殖。这说明在原发性食管肿瘤的发生过程中,miR-195 表达下调可能是一个重要的始动因素。miR-195 位于染色体 17p13.1 上,是一个在肿瘤发展过程中易产生缺失的部位。因此,对于 miR-195 在食管鳞癌中的低表达,等位基因缺失可能是重要原因之一,其他具体机制有待进一步深入研究。

细胞周期失调在肿瘤发生过程中有重要意义,因此与细胞周期相关的 miRNA 失调是肿瘤发生的一个重要原因。本研究通过增加 Eca109 细胞中 miR-195 的表达,流式细胞仪检测细胞所处周期,发现 miR-195 可以阻滞细胞从 G1 期进入 S 期,从而抑制细胞增殖,这与文献报道相吻合^[13]。通过生物信息学分析发现,Cdc42 可能是 miR-195 的 1 个直接靶基因,Cdc42 属 Rho 家族,已发现其高表达于食管癌^[14]、结直肠癌^[15],并在细胞增殖及细胞周期中有重要作用^[16],属癌基因。有研究显示,miR-137 通过靶向抑制 Cdc42 表达,阻滞结肠癌细胞从 G1 期到 S 期^[6]。本研究中发现,增加 Eca109 细胞 miR-195 的表达可使 Cdc42 蛋白表达明显减少,这表明 miR-195 可通过抑制 Cdc42 表达以阻滞 Eca109 细胞从 G1 期进入 S 期,从而抑制肿瘤细胞的增殖。当然,Cdc42 是通过何种信号通路来调节细胞增殖,是否会引起细胞凋亡都有待进一步研究。

本研究发现,miR-195 低表达于食管鳞癌组织,在 Eca109 细胞中增加 miR-195 表达可靶向调节 Cdc42 表达,并使其作为抑癌基因抑制 Eca109 细胞增殖,其具体机制有待进一步探讨,miR-195 或可成为食管鳞癌诊断和治疗的一个新靶点。

[参考文献]

- [1] Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer[J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(23):2241-2252
- [2] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010[J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60(5):277-300
- [3] Li JY. Epidemiology of esophageal cancer in China[J]. *Natl Cancer Inst Monogr*, 1982, 62: 113-120
- [4] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2):281-297
- [5] Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease[J]. *Development*, 2005, 132(21):4653-4662
- [6] Liu M, Lang N, Qiu M, et al. miR-137 targets Cdc42 expression, induces cell cycle G1 arrest and inhibits invasion in colorectal cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(6):1269-1279
- [7] Zhang X, Nie Y, Du Y, et al. MicroRNA-181a promotes gastric cancer by negatively regulating tumor suppressor KLF6[J]. *Tumour Biol*, 2012, 33(5):1589-1597
- [8] Kong KL, Kwong DL, Chan TH, et al. MicroRNA-375 inhibits tumour growth and metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma through repressing insulin-like growth factor 1 receptor[J]. *Gut*, 2012, 61(1):33-42
- [9] Kurashige J, Watanabe M, Iwatsuki M, et al. Overexpression of microRNA-223 regulates the ubiquitin ligase FBXW7 in oesophageal squamous cell carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2012, 106(1):182-188
- [10] Liu L, Chen L, Xu Y, et al. microRNA-195 promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity of human colorectal cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 400(2):236-240
- [11] Wong TS, Liu XB, Wong BY, et al. Mature miR-184 as potential oncogenic microRNA of squamous cell carcinoma of tongue[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(9):2588-2592
- [12] van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(48):18255-18260
- [13] Xu T, Zhu Y, Xiong Y, et al. MicroRNA-195 suppresses tumorigenicity and regulates G1/S transition of human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Hepatology*, 2009, 50(1):113-121
- [14] Feng JG, Liu Q, Qin X, et al. Clinicopathological pattern and Annexin A2 and Cdc42 status in patients presenting with differentiation and lymphnode metastasis of esophageal squamous cell carcinomas [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(2):1267-1274
- [15] Gómez Del Pulgar T, Valdés-Mora F, Bandrés E, et al. Cdc42 is highly expressed in colorectal adenocarcinoma and downregulates ID4 through an epigenetic mechanism [J]. *Int J Oncol*, 2008, 33(1):185-193
- [16] Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology[J]. *Nature*, 2002, 420(6916):629-635

[收稿日期] 2012-12-17