

网络出版时间: 2018-1-8 11:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180104.1310.016.html>

膀胱癌中 miR-203 的表达及其对吉西他滨化疗敏感性的影响

林 壷, 沈 洲, 牛三强, 许 言, 刘 治, 宣 强

摘要 目的 探讨 microRNA-203 (miR-203) 在膀胱癌中的表达以及其对吉西他滨化疗敏感性的影响。**方法** 应用 Vita-Blue 法检测膀胱癌细胞系对吉西他滨的敏感性差异并测定半数抑制浓度 (IC_{50}) 值。应用探针法实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应 (Taqman-qRT-PCR) 检测 27 例膀胱癌组织和癌旁组织以及膀胱癌细胞系 5637、Um-Uc-3、J82、SCaBER、T24、Biu87 中 miR-203 的表达水平。同时构建带有四环素诱导表达系统的 miR-203 超表达载体 (pINDUCER21-EGFP-miR-203), 在吉西他滨化疗耐受的 Um-Uc-3 细胞中转染 pINDUCER21-EGFP-miR-203, 并用多西环素诱导表达, 未诱导表达的为阴性对照, 在化疗敏感的 T24 细胞中分别转染 miR-203 Antagomir 和 Antagomir control, 同样使用 Taqman-qRT-PCR 和 Vita-Blue 方法检测膀胱癌细胞系中 miR-203 表达水平的变化及对吉西他滨的敏感性。**结果** 在膀胱癌组织中 miR-203 的表达显著低于癌旁组织, 在膀胱癌细胞系 T24 中 miR-203 的表达水平最高, Um-Uc-3 细胞系中表达水平最低 ($P < 0.01$)。膀胱癌细胞系 T24 和 Um-Uc-3 细胞中对吉西他滨的 IC_{50} 值分别为 (0.46 ± 0.08) ng/ml 和 (5.94 ± 0.53) ng/ml ($P < 0.01$); pINDUCER21-EGFP-miR-203 (D+) 可以明显增加 Um-Uc-3 细胞的化疗敏感性, 而 miR-203 Antagomir 可以显著抑制 T24 细胞对吉西他滨的化疗敏感性。**结论** miR-203 与膀胱癌的发生发展相关, 其高表达水平将提高膀胱癌对吉西他滨的化疗敏感性。

关键词 膀胱癌; miR-203; 吉西他滨; 化疗敏感性

中图分类号 R 737.14

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)01-0071-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.01.016

由于经济的快速发展, 膀胱癌的发病率在我国呈显著上升趋势。膀胱癌常规手术后化学疗法是治疗局部疾病有效方法。虽然大约 50% 的晚期患者对初始化疗有反应^[1], 但由于复发率较高导致在大多数患者中再次发生, 这些患者对新一轮化疗药物将产生一定的药物耐受^[2]。因此, 对癌症化疗耐药的深入理解是必要的, 以改善个性化化疗。吉西他

2017-10-17 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1708085QH179)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院泌尿外科, 合肥 230001

作者简介: 林 壷, 男, 住院医师, 硕士研究生;

宣 强, 男, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: xqdoctor@sina.com

滨联合顺铂是临幊上膀胱癌化疗的一线用药, 但是吉西他滨化疗耐受将极大影响到治疗效果, 如在胰腺癌^[3]、肺癌^[4]和乳腺癌^[5]均出现吉西他滨耐受现象。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是天然存在的一类非编码 RNA 分子, 其介导转录后基因调节并且涉及到细胞生化过程, 例如细胞增殖, 癌症的发生、凋亡和化疗耐受。目前有一部分 miRNA 与吉西他滨化疗耐受相关, 如 miR-21^[5], miR-155^[3]。然而 miR-203 在膀胱癌中对吉西他滨化疗敏感性的研究尚不清楚, 该研究主要通过探针法实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应 (Taqman-qRT-PCR)、Vita-Blue 法探讨 miR-203 在膀胱癌中的表达及其对吉西他滨化疗敏感性。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2015 年 6 月 ~ 2017 年 3 月安徽医科大学附属省立医院泌尿外科进行手术的 27 例膀胱癌患者, 其临床及病理资料均完善, 取膀胱癌组织及对应距肿瘤边缘 >3 cm 的新鲜癌旁组织, 于液氮罐中暂时保存, 最终储存在 -80 °C 冰箱, 全部患者均为初诊, 在外科手术治疗之前均未进行任何方式的治疗, 术后病理结果均为膀胱癌, 其中男 21 例, 女 6 例, 年龄 48 ~ 82 (62.3 ± 2.1) 岁, 根据 2004 年世界卫生组织 (WHO) 病理分级标准, 高级别 10 例, 低级别 17 例; 根据国际抗癌联盟 (UICC) 2009 年第七版 TNM 分期法标准, 非肌层浸润性膀胱癌 16 例, 肌层浸润性膀胱癌 9 例。

1.2 细胞系 6 株人膀胱癌细胞株分别为 5637、Um-Uc-3、J82、SCaBER、T24、Biu87 细胞系均购自中国科学院上海细胞库。

1.3 主要试剂及仪器 RPMI-1640、MEM 培养基 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (美国 Winsent 公司); 10 × PCR buffer、dNTP、Mg²⁺、Hs-Taq 酶 (上海睿安生物科技有限公司); RT-PCR 反转录试剂 (南京诺维赞生物科技公司); TRIzol (北京天根生物有限公司); Klenow 酶、T4 连接酶、Mlu I 酶 (日本 TaKaRa 公司); Taq-man 实时荧光定量 RT-PCR 引物和探针 (上海闪晶生物科技公司); miR-203 Antagomir

(miR-203 抑制剂) 和 Antagomir control (miR-203 抑制剂对照组) (上海吉玛制药技术有限公司); pINDUCER21-EGFP 质粒 (大连医科大学汪洋教授馈赠); 多西环素 (上海安谱实验科技股份有限公司); Tanon 1600 凝胶成像仪 (上海天能公司)。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 膀胱癌细胞系 5637、T24、Biu87、J82 和 SCaBER 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养, Um-Uc-3 用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基培养, 以上细胞系均在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.4.2 pINDUCER21-EGFP-miR-203 质粒的构建 pINDUCER21-EGFP 为带有四环素诱导表达系统及绿色荧光蛋白的质粒, 在 MluI 单酶切后, 去磷, 补平黏性末端, 作为 miR-203 的载体, 从膀胱癌癌旁组织提取的基因组 DNA 作为模板, 用 miR-203 的正反向引物扩增出目的片段 (从 UCSC 数据库获取 miR-203 基因成熟序列的上下游区各 100 bp, 位于 chr14: 104583642-104583951, primer5.0 设计上下游引物, miR-203 正向引物: 5'-GGGGATCTGGGCG-CAGGGGCCGGTC-3' 反向引物: 5'-CGTGGGCTC-CCCTGGATTGGTC-3', 产物长度 286 bp, 退火温度 57 °C), 引物用 T4 多聚核苷酸激酶加磷, PCR 结束后, Klenow 酶补平末端, 后进行 T4 连接酶连接, 转化, 次日统计平板克隆数目, 挑取重组平板克隆进行菌液 PCR 验证 (引物分别位于载体上和 miR-203 成熟序列, 正向引物: 5'- GTCGAGTTACCACTC-CCTATCACT-3', 反向引物: 5'-CGGGTCTAGTGGTC-CTAACACATTTC-3', 产物长度 450 bp, 退火温度 56 °C)。

1.4.3 细胞转染 取处于对数生长期的细胞, 于转染前 1 天以 3×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板。使用双无培养基, 用不含血清的配套培养基稀释 Lipofectamine 2000, 轻轻混合, 37 °C 温育 5 min。用无血清的配套培养基稀释 miR-203 Antagomir 和 pINDUCER21-EGFP-miR-203 及对照组 Antagomir control。稀释好的上述溶液混合, 37 °C 温育 20 min。同时 6 孔板用配套培养基冲洗 1 次, 再加入相应的无血清培养基, 使用移液器缓慢加入 Lipofectamine 2000 的混合溶液。37 °C、5% CO₂ 培养箱中培育 6 h, 去除转染试剂和培养基, 加入含有血清的配套培养基, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培育 48 h 后检测。

1.4.4 Vita-Blue 法检测细胞活性并计算半数抑制浓度 (the half-inhibitory concentration, IC₅₀) 值 将

处于对数期的膀胱癌细胞系 5637、T24、Biu87、J82、SCaBER 和 Um-Uc-3 经胰酶消化后制成单细胞悬液, 按 10^4 个/孔接种在 96 孔板, 设置 5 个重复孔, 每种细胞分 6 组, 24 h 贴壁后弃去培养基, 用 0、2、4、6、8、10 ng/ml 的吉西他滨分别处理各细胞系, 根据化疗耐受情况, 调整各组的吉西他滨浓度, 孵育 72 h 后, 每孔加入 20 μl 的 Vita-Blue 试剂, 在培养箱内继续孵育 1~4 h (注意颜色的变化)。用荧光计数器 (激发光 570 nm) 记录荧光读数, 用没有加入细胞的孔作为空白对照, 实验重复 3 次, 细胞活力 (%) = $(A_{\text{药物}+} - A_{\text{空白对照}}) / (A_{\text{药物}-} - A_{\text{空白对照}}) \times 100\%$, 通过 Msvbvm50 软件计算 IC₅₀ 值。

1.4.5 Taqman-qRT-PCR 检测 miR-203 的表达水平

使用 TRIzol-A + Reagent 说明书提取组织和细胞中总 RNA, 以 3.5 μl 总 RNA 作为模板, 使用带有茎环结构的 RT 引物进行逆转录合成 cDNA。PCR 反应体系: cDNA 1 μl, PCR 混合体系 5.8 μl, 引物和探针 (miR-203 和 U6) 混合体系 4.8 μl, ddH₂O 8.4 μl。miRNA-203 RT-PCR 引物序列如下, miR-203 逆转录引物: 5'-GCGCGTGAGCAGGCTGGAGAAATTAAACCA CGCGCCTAGTC-3'; F: 5'-CGGGTGAAATGTTAGG-3'; R: 5'-GAGCAGGCTGGAGAA-3'; Probe 5' FAW-AACCACGCCCTAGTG-3'MGB; U6 RT-PCR 引物序列如下, U6 逆转录引物: 5'-GTCGTATCCAGTGCA GGGTCCGAGGTATTCCGCACTGATACGACAAAAATAT G-3'; F: 5'-GCTCGGCAGCACATA-3'; R: 5'-CTTCAC GAATTGCGTG-3'; Probe 5' HEX-CCTTGCGCAGGGG CCATGC-3'MGB; 反应条件: 95 °C、5 min; 50 个 PCR 循环 (95 °C、20 s, 60 °C、20 s)。实验重复 3 次, 以 U6 作为内参照, 数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 膀胱癌组织和癌旁组织 miR-203 表达水平的比较使用 Wilcoxon 符号秩和检验, 多组间差异比较采用多样本均数比较的方差分析, 其他组间均数比较采用两样本均数的 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pINDUCER21-EGFP-miR-203 质粒的构建验证结果 重组 pINDUCER21-EGFP-miR-203 质粒经 PCR 验证正确, 结果见图 1。

2.2 miR-203 在膀胱癌组织和癌旁组织的表达水平 在 27 例膀胱癌组织和癌旁组织中应用 Taqman-qRT-PCR 方法检测 miR-203 的表达水平, 结果

显示在膀胱癌组织中 miR-203 表达水平显著低于癌旁组织, 差异有统计学意义 ($Z = -4.541, P < 0.01$), 见图 2。

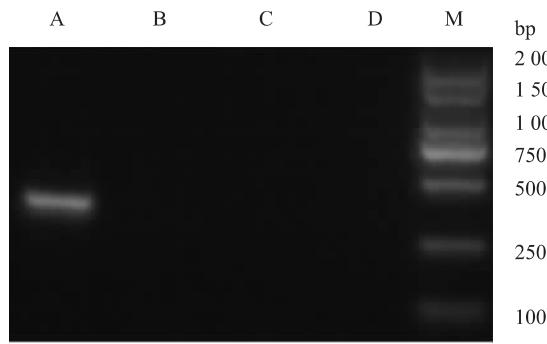


图 1 重组 pINDUCER21-EGFP-miR-203 质粒验证电泳图

A: pINDUCER21-miR-203 重组质粒验证阳性; B、C: pINDUCER21-miR-203 重组质粒验证阴性; D: 水对照; M: DL2000 Marker

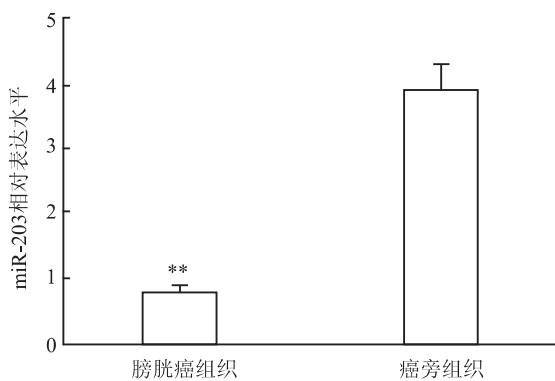


图 2 miR-203 在膀胱癌组织和癌旁组织中的表达水平
与癌旁组织比较: ** $P < 0.01$

2.3 Vita-Blue 法检测膀胱癌细胞系对化疗药物吉西他滨的 IC_{50} 值 在膀胱癌细胞系中 Um-Uc-3 细胞对吉西他滨的 IC_{50} 值最高, 其次是 Biu87、SCaBER、J82、5637、T24。与 Um-Uc-3 细胞 IC_{50} 值比较, 差异均有统计学意义 ($F = 158.92, P < 0.01$), 见图 3。

2.4 miR-203 在膀胱癌细胞系 Um-Uc-3 和 T24 中的表达水平 在膀胱癌细胞系 T24 细胞中 miR-203 (5.941 ± 0.529) 与 Um-Uc-3 细胞中 miR-203 (0.456 ± 0.078) 表达水平比较, 差异有统计学意义 ($t = 30.80, P < 0.05$)。

2.5 pINDUCER21-EGFP-miR-203 和 miR-203 Antagomir 在 Um-Uc-3 和 T24 细胞系中对吉西他滨的化疗敏感性影响 根据在 Um-Uc-3 和 T24 细胞中转染结果, 转染 pINDUCER21-EGFP-miR-203 (D+, 加入多西环素) 的 Um-Uc-3 细胞 ($0.489 \pm$

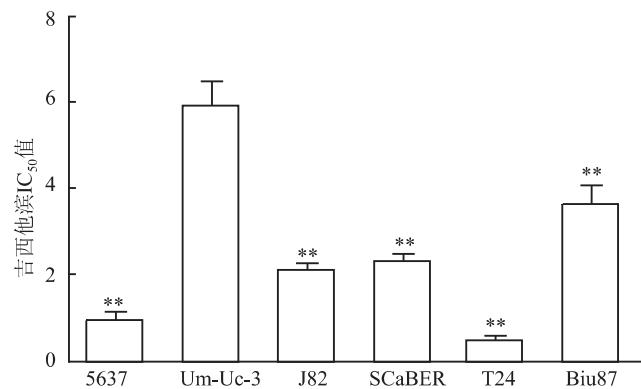


图 3 吉西他滨在不同膀胱癌细胞系中的 IC_{50} 值

与 Um-Uc-3 的 IC_{50} 值比较: ** $P < 0.01$

0.061) 与转染 pINDUCER21-EGFP-miR-203 (D-, 未加多西环素) 对照组 (0.312 ± 0.049) 相比, 其表达水平显著升高 ($t = 6.80, P < 0.01$), 转染 pINDUCER21-EGFP-miR-203 的细胞在荧光显微镜下观察见图 4; 转染 miR-203 Antagomir 的 T24 细胞 (1.148 ± 0.119) 与对照组 (1.417 ± 0.155) 相比, 其表达水平降低 ($t = 4.13, P < 0.01$); 另外, Um-Uc-3 和 T24 细胞在不同药物浓度的作用下转染结果用 Vita-Blue 法分析, 转染 pINDUCER21-EGFP-miR-203 (D+) 的 Um-Uc-3 细胞在较高药物浓度下相对细胞生存率降低 ($t_2 = 0.20, P = 0.84, t_4 = 1.10, P = 0.30, t_6 = 5.26, P < 0.01, t_8 = 5.07, P < 0.01, t_{10} = 5.58, P < 0.01$), 转染 miR-203 Antagomir 的 T24 细胞在较高药物浓度下相对的细胞生存率升高 ($t_{0.2} = 0.34, P = 0.74, t_{0.4} = 5.15, P < 0.01, t_{0.6} = 9.03, P < 0.01, t_{0.8} = 2.36, P = 0.04, t_{1.0} = 5.72, P < 0.01$), 见图 5。

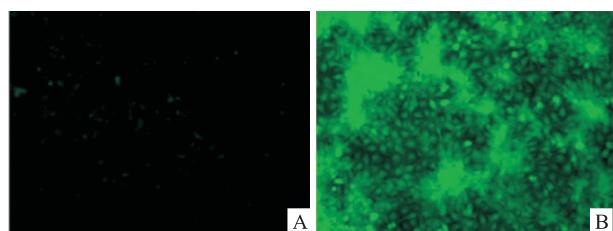


图 4 荧光显微镜下观察 Um-Uc-3 细胞中转染结果 $\times 100$

A: Um-Uc-3 细胞中转染 pINDUCER21-EGFP-miR-203 (D-); B: Um-Uc-3 细胞中转染 pINDUCER21-EGFP-miR-203 (D+)

3 讨论

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤, 其中多数患者初发为非肌层浸润性膀胱癌。在临幊上经尿

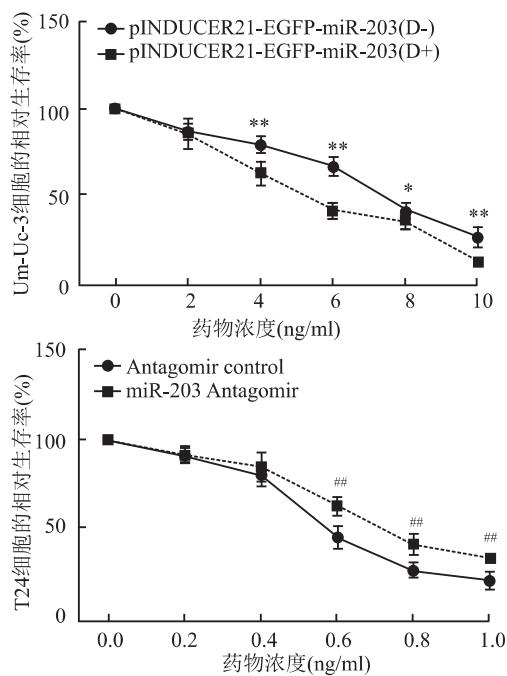


图 5 不同药物浓度作用下转染后的细胞生存率

D - : 未加入多西环素; D + : 加入多西环素; 与 pINDUCER21-EGFP-miR-203(D +) 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 Antagomir control 比较: ## $P < 0.01$

道膀胱肿瘤电切术是治疗非肌层浸润性膀胱癌的快捷有效手段,但术后复发率较高,可达 50% ~ 70%,大多数患者于术后 2 年内复发,但是术后辅以化疗药物的膀胱灌注可在一定程度上延缓复发^[6]。基于吉西他滨的化疗已广泛用于肌层浸润性或转移性膀胱癌,从而使高达 70% 的患者有反应。不幸的是,由于癌细胞的化学耐药性,在超过 50% 的情况下,化疗药物反应不能维持,导致 5 年存活率低于 15%^[7]。目前对于膀胱癌有效治疗的主要障碍是对化疗药物的耐受性^[8],但是在许多类型的癌症中机制不清楚。

miRNA 是长度为 19 ~ 25 个核苷酸的内源性非编码 RNA 分子。大多数 miRNA 通过阻断 mRNA 抑制 mRNA 翻译,仅一些 mRNA 降解或去腺苷化,然而还有小部分的 miRNA 介导 mRNA 靶向上调。由于 miRNA 的种子序列的 6 ~ 8 个碱基与 mRNA 的所需结合的低严格性,从而每个 miRNA 可能潜在地与数百个 mRNA 靶标相互作用。异常表达的 miRNA 已经显示在许多类型的癌症中起到抑癌或促癌的作用。而且 miRNA 的表达谱可以提供关于化疗敏感性的信息,其 miRNA 表达的变化可能是化疗反应的一种标志物。近年来,miRNA 在吉西他滨化疗耐受方面的研究越来越多,如 miR-21 通过 EMT 过程调

节参与了乳腺癌中吉西他滨耐药^[5],miR-455 在胰腺导管癌中高表达从而促进对吉西他滨的化疗耐受^[3]。

本研究通过 Taqman-qRT-PCR 检测 miR-203 在膀胱癌组织和癌旁组织中的表达水平,结果显示其在膀胱癌组织中是低表达,癌旁组织高表达,与 Bo et al^[9] 研究一致,进一步说明 miR-203 在膀胱癌的发生发展中可能起到抑癌基因的作用。Vita-Blue 法检测 6 株膀胱癌细胞系 5637、Um-Uc-3、J82、SCaBER、T24、Biu87 对吉西他滨药物的 IC_{50} 值,其对吉西他滨化疗敏感性的顺序依次为 T24、Biu87、SCaBER、J82、5637、Um-Uc-3,最为耐受的 Um-Uc-3 细胞系是最为敏感细胞系 T24 的 13.04 倍。随后继续通过 Taqman-qRT-PCR 检测 miR-203 在膀胱癌细胞系 T24 和 Um-Uc-3 中的表达,结果显示对吉西他滨化疗最为敏感的 T24 细胞表达水平显著高于最为耐受的 Um-Uc-3 细胞。从而推测吉西他滨的化疗敏感性与 miR-203 的表达相关。

该研究通过构建带有四环素诱导表达系统的 miR-203 的超表达载体 pINDUCER21-EGFP-miR-203,在相对耐受的 Um-Uc-3 的细胞中上调 miR-203 的表达,而 miR-203 Antagomir 在 T24 细胞中抑制 miR-203 的表达,从而观察对吉西他滨化疗耐受的影响,Taqman-qRT-PCR 和 Vita-Blue 实验检测结果显示在 Um-Uc-3 细胞中转染 pINDUCER21-EGFP-miR-203(D +) 组与对照组相比,表达水平升高,其细胞生存率降低,差异有统计学意义。在 T24 细胞系中转染 miR-203 Antagomir 组与对照组相比,表达水平降低,细胞生存率显著升高,差异有统计学意义。上述结果表明在膀胱癌细胞系中 miR-203 的表达水平对吉西他滨化疗敏感和耐受的细胞生存率密切相关。本研究尚需要进一步在分子层面进行靶向基因和信号通路的研究,更深入的了解具体的化疗耐受机制。

综上所述,本研究表明 miR-203 在膀胱癌的发生发展中起到一定的作用,其高表达水平将提高膀胱癌细胞系对吉西他滨的化疗敏感性。此外,miR-203 具有作为吉西他滨治疗方案中的预测性生物标志物的潜力。

参考文献

- [1] Cimino G D, Pan C X, Henderson P T. Personalized medicine for targeted and platinum-based chemotherapy of lung and bladder cancer [J]. *Bioanalysis*, 2013, 5(3): 369 ~ 91.

- [2] Gordon R R, Nelson P S. Cellular senescence and cancer chemotherapy resistance [J]. *Drug Resist Updat*, 2012, 15(1-2): 123-31.
- [3] Mikamori M, Yamada D, Eguchi H, et al. MicroRNA-455 controls exosome synthesis and promotes gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42339.
- [4] Koh V, Kwan H Y, Tan W L, et al. Knockdown of POLA2 increases gemcitabine resistance in lung cancer cells [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(13): 1029.
- [5] Wu Z H, Tao Z H, Zhang J, et al. MiRNA-21 induces epithelial to mesenchymal transition and gemcitabine resistance via the PTEN/AKT pathway in breast cancer [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(6): 7245-54.
- [6] Kawamura N, Matsushita M, Okada T, et al. Relative efficacy of neoadjuvant gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, adriamycin, and cisplatin in the management for muscle-invasive bladder cancer [J]. *Hinyokika Kiyo*, 2013, 59(5): 277-81.
- [7] Nordinoff I, Birkenkamp-Demtroder K, Agerbaek M, et al. miRNAs associated with chemo-sensitivity in cell lines and in advanced bladder cancer [J]. *BMC Med Genomics*, 2012, 5(1): 40.
- [8] Djeu J Y, Wei S. Clusterin and chemoresistance [J]. *Adv Cancer Res*, 2009, 105: 77-92.
- [9] Bo J, Yang G, Huo K, et al. microRNA-203 suppresses bladder cancer development by repressing bcl-w expression [J]. *FEBS J*, 2011, 278(5): 786-92.

Expression of miR-203 in bladder carcinoma and its sensitivity to gemcitabine chemotherapy

Lin Yao, Shen Zhou, Niu Sanqiang, et al

(Dept of Urology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract **Objective** To investigate the expression of microRNA-203 (miR-203) in bladder cancer and its effect on chemosensitivity of gemcitabine. **Methods** The sensitivity of the bladder cancer cell line to gemcitabine was analyzed by Vita-Blue assay and the half-inhibitory concentration (IC_{50}) was measured. The expression level of miR-203 was detected in 27 cases of bladder cancer tissues and adjacent tissues by Taqman-qRT-PCR. All the time, the expression levels of miR-203 were also detected in bladder cancer cell lines 5637, Um-Uc-3, J82, SCaBER, T24, Biu87. Construction of miR-203 overexpression vector (pINDUCER21-EGFP-miR-203) with a tetracycline-induced expression system, which was transfected into gemcitabine-resistant Um-Uc-3 cells and was induced with doxycycline (No doxycycline was negative control). Simultaneously, miR-203 Antagomir and Antagomir control were transfected into T24 cells respectively. The sensitivity to gemcitabine and expression levels of miR-203 were also detected using Vita-Blue and Taqman-qRT-PCR in T24 and Um-Uc-3. **Results** The expression of miR-203 was significantly lower in bladder cancer tissues than in adjacent tissues. The expression level of miR-203 was the highest in bladder cancer cell line T24 and the lowest in Um-Uc-3 cell line ($P < 0.01$). Bladder cancer cell line T24 and Um-Uc-3 to IC_{50} values of gemcitabine chemotherapy were (0.46 ± 0.08) ng/ml and (5.94 ± 0.53) ng/ml, respectively ($P < 0.01$); pINDUCER21-EGFP-miR-203 (D+) can remarkably enhance its chemosensitivity in Um-Uc-3, whereas miR-203 Antagomir can also significantly suppress the chemosensitivity of T24 cells to gemcitabine. **Conclusion** miR-203 is associated with the development and progression of bladder cancer, and its high expression level may improve the chemosensitivity of bladder cancer to gemcitabine.

Key words bladder cancer; miR-203; gemcitabine; chemosensitivity