

miRNA21 抑制剂对食管癌细胞凋亡的影响

李红霞¹, 李玉芝¹, 高峻峰¹, 刘思涵¹, 葛磊¹, 鲍扬漪¹, 汪正广²

摘要 目的 探讨 miRNA21 抑制剂对食管癌细胞 EC109 凋亡的影响。方法 实时荧光定量 PCR 法检测 20 例食管癌及癌旁组织中 miRNA21 的表达。转染 miRNA21 抑制剂入食管癌细胞株 EC109, Caspase 3 活性检测试剂盒分析 Caspase 3 活性变化, DNA 片段检测试剂盒分析 DNA 片段变化, Western blot 法检测 Caspase 3 及 Bcl-2 表达。结果 相对癌旁组织, 食管癌组织中 miRNA21 表达明显升高; miRNA21 抑制剂能显著增加 EC109 细胞凋亡; 同时 miRNA21 抑制剂促进食管癌细胞 EC109 Caspase 3 的表达上调, Bcl-2 的表达下调。结论 食管癌的发生可能与 miRNA21 的高表达有关, miRNA21 抑制剂可能通过下调 Bcl-2 的表达诱导食管癌细胞 EC109 的凋亡。

关键词 食管癌; 细胞凋亡; miRNA21; Bcl-2

中图分类号 R 735.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)08-1124-04

食管癌是常见的消化道肿瘤之一^[1], 在我国食管癌的发病率和死亡率位于前列^[2]。手术切除术是目前治疗食管癌的主要方法, 但手术切除对患者

有严格的要求, 如已呈恶病质、发生远端转移等的患者均不能行根治性手术治疗。因此, 寻找食管癌进展及转移等病变的特异性指标对其治疗及提高患者的生存率具有重要的理论和实际意义。microRNA (miRNA) 是一类广泛存在于真核细胞中, 长度一般为 21~23 个核苷酸的 RNA 分子^[3]。研究^[4]显示, miRNA 对真核细胞的基因表达具有调控作用。miRNA 通过与靶标基因转录的 mRNA 分子的 3'端非编码区域互补结合, 阻断蛋白质翻译的过程从而发挥对靶标的调控。miRNA 在肿瘤的发生发展过程中的作用已有相关报道^[5], 但在食管癌中研究较少。该实验在研究食管癌组织标本中 miRNA21 表达变化的基础上, 在食管癌细胞 EC109 中转染 miRNA21 抑制剂, 探讨其对食管癌细胞凋亡的影响及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 组织、细胞及主要试剂 标本来自安徽医科大学第三附属医院胸外科手术切除并经病例证实的食管癌及癌旁组织; 食管癌细胞株 EC109 (中国科学院上海细胞库); miRNA 荧光定量 PCR 试剂盒 (HG SYBR Green RNU6B, AP01501, 中国北国海基生物科技有限公司); 小鼠抗人 Bcl-2 及 Caspase 3 单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司); 小鼠抗人 GAPDH

2016-05-04 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1608085MH182)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第三附属医院肿瘤科, 合肥 230061

² 安徽医科大学第一附属医院普外科, 合肥 230022

作者简介: 李红霞, 女, 副主任医师;

鲍扬漪, 女, 主任医师, 责任作者, E-mail: 1262074653@qq.com

cells (DPSCs) into blood vessels *in vitro*. **Methods** HIF-1 α gene was mutated. The lentiviral vectors of Lenti-WT, Lenti-MT and Lenti-LacZ were constructed. The DPSCs were cultured and treated with three lentiviral vectors. Then the cells transduction efficiency and the expression of target gene at the level of mRNA and protein were detected. The influence on cell proliferation from lentiviral vectors was detected by MTT. After transduction, RNA and protein were extracted, the expression of angiogenic factor was detected by qPCR and Western blot. **Results** MTT showed that there was no effect on DPSCs proliferation from lentiviral vectors. The results of qPCR and Western blot showed that HIF-1 α gene was located in cell nucleus, expression of target gene was detected at both mRNA and protein level. After gene transduction, expression of angiogenic factor at the mRNA and protein levels was significantly increased ($P < 0.05$). The formation of blood vessel in Lenti-MT and Lenti-WT groups was better than that in Lenti-LacZ group ($P < 0.05$), and the best result was found in Lenti-MT group ($P < 0.05$). **Conclusion** HIF-1 α could promote DPSCs to form blood vessels.

Key words HIF-1 α ; DPSCs; lentivirus transfection; angiogenesis

单克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司); RNA 抽提试剂盒(美国 Gibco-BRL 公司); Caspase 3 活性检测试剂盒(美国 BIOMOL Research Laboratories 公司); DNA 片段检测试剂盒(瑞士 Roche Applied Science 公司)。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的制备 取食管癌及癌旁组织标本于匀浆器中匀浆。加入 1 ml TRIzol 试剂后冰上放置 5 min, 加 0.2 ml 氯仿, 震荡混匀后静置 3 min, 14 000 r/min 离心 15 min。上层水相移至离心管加异丙醇, 放 10 min, 14 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 加 75% 乙醇洗涤。弃乙醇干燥 10 min, 沉淀重悬于无 RNA 酶的水中。

1.2.2 miRNA21 的检测 miRNA 检测试剂盒分析 miRNA21 的表达(参考试剂盒说明书)。

1.2.3 细胞培养及转染 食管癌 EC109 细胞于 RPMI 1640 的培养基中培养(含 20% 胎牛血清), EC109 细胞呈单层后消化细胞, 接种至 6 孔板中(细胞计数每孔约 5×10^5 个), 48 h 后用 RPMI 1640 培养液洗涤 3 次(不含血清), 分别转染 miRNA21 抑制剂和 miRNA 阴性对照, 半小时后加入脂质体 Lipofectamine2000 10 μ l/孔, 转染 6 h 后更换培养基, 进行后续实验。

1.2.4 Caspase 3 活性检测 Caspase 3 活性检测试剂盒分析其活性。方法如下: 待 EC109 细胞密度长到 80% ~ 90% 时, PBS 洗 3 遍, 加入 1 ml 胰酶, 37 $^{\circ}$ C 消化 3 min, 吹打细胞液至单细胞悬液。将 Lipofectamine2000 与 miRNA21 抑制剂及对照的混合液加入不同的培养板中孵育 48 h。离心 2 min, PBS 洗涤 2 次, 加入 100 μ l 裂解缓冲液, 冰上放置 15 min, 涡旋振荡 15 s, 离心 5 min。取 10 μ l 蛋白上清液, 加入 90 μ l 检测缓冲液中, 加入 10 μ l Ac-LEHD-pNA, 避光反应 1 ~ 2 h 后检测结果。

1.2.5 DNA 片段检测 DNA 片段检测试剂盒分析其变化(参考试剂盒说明书)。待 EC109 细胞密度长到 80% ~ 90% 时, 用 PBS 洗 3 遍, 加入 1 ml 胰酶, 37 $^{\circ}$ C 消化 3 min, 吹打细胞液至单细胞悬液。将 Lipofectamine2000 与 miRNA21 抑制剂及对照的混合液加入不同的培养板中孵育 48 h。离心 2 min, PBS 洗涤 2 次, 加 BrdU 至终浓度为 10 mmol/L。培养过夜。去培养基, PBS 洗 2 次。加入过氧化物酶结合的 BrdU 抗体, 450 nm 检测吸光度。

1.2.6 Western blot 法检测 待 EC109 细胞密度长到 80% ~ 90% 时, 用 PBS 洗 3 遍, 加入蛋白裂解液以

裂解细胞, BAC 法检测蛋白浓度。配制 SDS-PAGE 凝胶后行蛋白电泳后将凝胶中蛋白转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 3 h, 分别加入相应的抗体 Bcl-2、Caspase 3 及 GAPDH, 孵育过夜后 PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加二抗, 孵育 3 h 后 PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min, ECL 法显色。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析, 符合正态分布的定量变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组计量资料的比较采用单因素方差分析, 多组之间的两两比较采用 LSD- t 检验的方法, 两独立样本均数比较采用成组设计的 t 检验。

2 结果

2.1 miRNA21 在食管癌中的表达 实时荧光定量 PCR 结果显示: 相对于癌旁组织, 食管癌组织中 miRNA21 表达明显升高($t = 2.645$, $P < 0.05$), 达到 230% (图 1)。

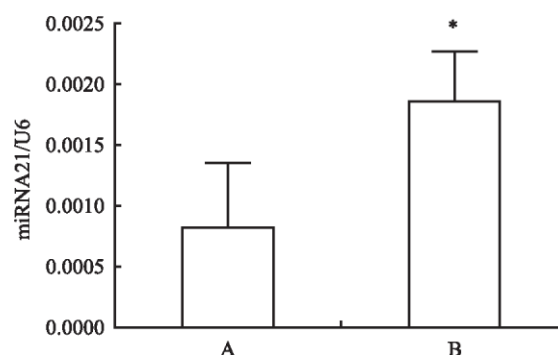


图 1 食管癌中 miRNA21 含量的变化

A: 癌旁组织; B: 食管癌组织; 与癌旁组织比较: * $P < 0.05$

2.2 miRNA21 抑制剂对食管癌 EC109 细胞 Caspase 3 活性的影响 将 miRNA 阴性对照、miRNA21 抑制剂用 Lipofectamine2000 转染 EC109 细胞, 接种于 6 孔板中。Caspase 3 检测结果显示: 相对于正常对照组及 miRNA 阴性对照组, miRNA21 抑制剂组 Caspase 3 活性明显升高($F = 64.78$, $P < 0.05$)。提示 miRNA21 能显著诱导 EC109 细胞凋亡。见图 2。

2.3 miRNA21 抑制剂对食管癌 EC109 细胞 DNA 片段的影响 将 miRNA 阴性对照、miRNA21 抑制剂用 Lipofectamine2000 转染 EC109 细胞, 接种于 6 孔板中。DNA 片段检测试剂盒结果显示: 相对于正常对照组及 miRNA 阴性对照组, miRNA21 抑制剂组 DNA 片段出现明显增加($F = 12.80$, $P < 0.05$)。提示 miRNA21 抑制剂能显著诱导 EC109 细胞凋

亡。见图3。

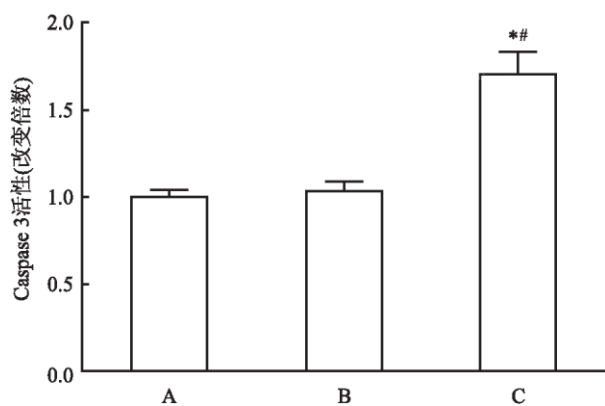


图2 miRNA21抑制剂对食管癌EC109细胞Caspase 3活性的影响

A: 正常对照组; B: miRNA 阴性对照组; C: miRNA21 抑制剂组; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与 miRNA 阴性对照组比较: # $P < 0.05$

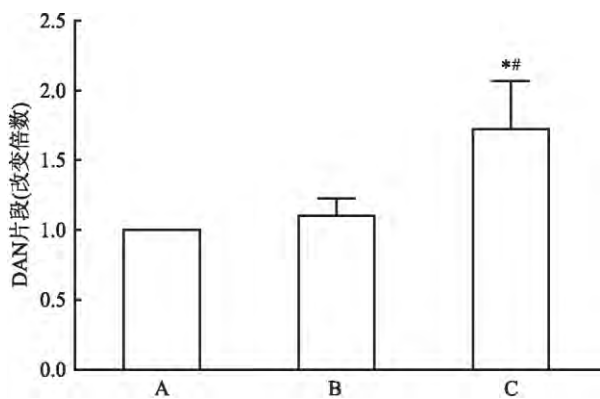


图3 miRNA21抑制剂对食管癌EC109细胞DNA片段的影响

A: 正常对照组; B: miRNA 阴性对照组; C: miRNA21 抑制剂组; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与 miRNA 阴性对照组比较: # $P < 0.05$

2.4 miRNA21抑制剂对食管癌EC109细胞Caspase 3表达的影响 Western blot 结果显示: 相对于正常对照组及 miRNA 阴性对照组, miRNA21 抑制剂能显著促进 Caspase 3 表达 ($F = 34.56$, $P < 0.05$)。见图4。

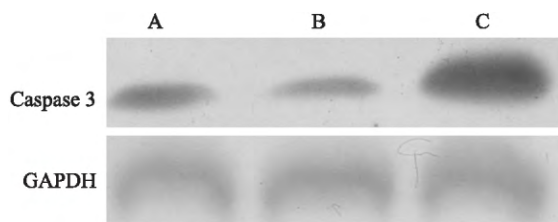


图4 miRNA21抑制剂对食管癌EC109细胞Caspase 3表达的影响

A: 正常对照组; B: miRNA 阴性对照组; C: miRNA21 抑制剂组

2.5 miRNA21抑制剂对食管癌EC109细胞Bcl-2

表达的影响 Western blot 结果显示: 相对于正常对照组及 miRNA 阴性对照组, miRNA21 抑制剂能显著抑制 Bcl-2 表达 ($F = 25.31$, $P < 0.05$)。见图5。

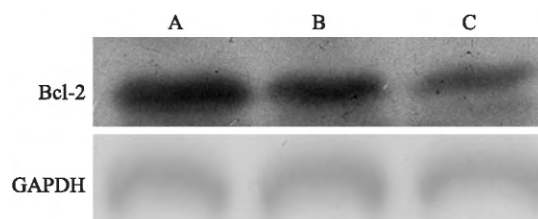


图5 miRNA21抑制剂对食管癌EC109细胞Bcl-2表达的影响

A: 正常对照组; B: miRNA 阴性对照组; C: miRNA21 抑制剂组

3 讨论

食管癌是我国乃至世界范围内的恶性肿瘤, 尽管手术切除术及放化疗法在临床上广泛应用, 得到了很大的发展, 但是患者的预后并不理想。因调节秀丽线虫发育作用, 使得 Lin-4 成为首个发现的 miRNA^[6]。而在对慢性淋巴细胞白血病的研 究^[7]显示 miRNA 与肿瘤发生发展及诊断治疗之间具有重要的相关性, 在此之后人们开始关注并进行了大量广泛的研究。研究^[8-9]表明, 肿瘤的发生和发展与 miRNA 的异常表达(包括上调和下调)密切相关, miRNA 作为调控基因表达的一类小分子 RNA, 主要通过下游靶基因 mRNA 的相互作用, 调控着肿瘤的发生发展, 扮演着非常重要的角色。研究^[10-11]表明, miRNA 与肿瘤的发生发展、诊断治疗有重要的相关性, 而在食管癌与 miRNA 方面研究的相对较少。

miRNA21 被广泛用于结直肠癌研究。研究^[12]显示其可以下调肿瘤抑制基因和诱导细胞增殖。研究^[13]表明 miRNA21 可以作为结直肠癌的一个生物标记物。在食管癌中是否具有一定的生物学作用, 目前仍不清楚。本实验结果显示相对癌旁组织, 在食管癌标本中 miRNA21 表达明显升高, 提示 miRNA21 起了癌基因的作用, 在食管癌的发生发展中发挥一定的作用。为证实 miRNA21 的功能, 本研究进一步用 miRNA21 抑制剂处理食管癌 EC109 细胞, 观察 miRNA21 抑制剂是否对细胞的凋亡产生影响。结果显示 miRNA21 抑制剂处理后的 EC109 细胞, 其 Caspase 3 活性、DNA 片段等反映细胞凋亡指标发生显著的变化。进一步研究显示抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达出现了明显的降低。以上结果提示

miRNA21 抑制剂可能通过抑制 Bcl-2 的表达促进 EC109 细胞的凋亡。

本实验结果表明 miRNA21 抑制剂能明显诱导食管癌 EC109 细胞的凋亡,为食管癌的诊断、治疗及预防提供了一定的实验基础,但 miRNA21 抑制剂是否直接通过靶向 Bcl-2 进而调节食管癌 EC109 细胞的凋亡,目前并不清楚。下一步将利用生物信息学的方法对 miRNA21 的靶标进行预测,并利用相关实验法对 miRNA21 潜在靶标进行验证,为治疗食管癌提供新的靶点。

参考文献

- [1] Andrici J, Hu S X, Eslick G D. Facial flushing response to alcohol and the risk of esophageal squamous cell carcinoma: A comprehensive systematic review and meta-analysis [J]. *Cancer Epidemiol*, 2015, 40: 31–8.
- [2] Gao Q Y, Fang J Y. Early esophageal cancer screening in China [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2015, 29(6): 885–93.
- [3] Crea F, Clermont P L, Parolia A, et al. The non-coding transcriptome as a dynamic regulator of cancer metastasis [J]. *Cancer Metastasis Rev* 2014, 33(1): 1–16.
- [4] Cheng Q, Yi B, Wang A, et al. Exploring and exploiting the fundamental role of microRNAs in tumor pathogenesis [J]. *Onco Targets Ther* 2013, 6: 1675–84.
- [5] Sethi S, Ali S, Kong D, et al. Clinical implication of microRNAs in molecular pathology [J]. *Clin Lab Med* 2013, 33(4): 773–86.
- [6] Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-4* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans* [J]. *Cell*, 1993, 75(5): 855–62.
- [7] Calin G A, Dumitru C D, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(24): 15524–9.
- [8] Rana T M. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(1): 23–36.
- [9] Dalmay T, Edwards D R. MicroRNAs and the hallmarks of cancer [J]. *Oncogene*, 2006, 25(46): 6170–5.
- [10] Winter J, Jung S, Keller S, et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(3): 228–34.
- [11] 晋志远, 黄强, 刘臣海, 等. microRNA-21 对裸鼠人胆管癌细胞移植瘤 EMT 的影响 [J]. *安徽医科大学学报* 2015, 50(10): 1399–402.
- [12] Asangani I A, Rasheed S A, Nikolova D A, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor *Pdcd4* and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer [J]. *Oncogene*, 2008, 27(15): 2128–36.
- [13] Kanaan Z, Rai S N, Eichenberger M R, et al. Plasma miR-21: A potential diagnostic marker of colorectal cancer [J]. *Ann Surg*, 2012, 256(3): 544–51.

Effect of miRNA21 inhibitor on the apoptosis of esophageal cancer cell line

Li Hongxia, Li Yuzhi, Gao Junfeng, et al

(Dept of Oncology, The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230061)

Abstract Objective To investigate the effect of miRNA21 inhibitor on the apoptosis of esophageal cancer cell line EC109. **Methods** The expression of miRNA21 in 20 cases of esophageal cancer and adjacent tissues was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. miRNA21 inhibitor was transfected into human esophageal cancer cell line EC109. Caspase 3 activity was analyzed by Caspase 3 activity test kit, DNA fragment changes were measured by DNA fragment detection kit. Western blot was used to detect Caspase 3 and Bcl-2 expression. **Results**

Real-time fluorescence quantitative PCR results showed that compared with adjacent tissue to carcinoma, miRNA21 expression in esophageal cancer tissues increased significantly. Caspase 3 activity and DNA fragment analysis indicated that miRNA21 inhibitor could significantly increase the EC109 cells apoptosis. Western blot showed that Caspase 3 expression was significantly up-regulated and Bcl-2 expression was significantly down-regulated in esophageal cancer EC109 cells transfected with miRNA21 inhibitor. **Conclusion** The occurrence of esophageal carcinoma may be related to the high expression of miRNA21. miRNA21 inhibitor may induce apoptosis of human esophageal cancer cell EC109 by down regulating the expression of Bcl-2.

Key words esophageal carcinoma; apoptosis; miRNA21; Bcl-2