

microRNA-21 对裸鼠人胆管癌细胞移植瘤 EMT 的影响

晋志远^{1,2}, 黄 强¹, 刘臣海¹, 刘 振^{1,2}, 林先盛¹, 谢 放¹

摘要 **目的** 观察 microRNA-21 (miR-21) 对裸鼠人胆管癌细胞移植瘤生长及上皮间质转化 (EMT) 进程的影响。**方法** 在两组裸鼠侧腹部皮下注射对数生长期的胆管癌细胞 QBC939 和稳定表达 miR-21 的 QBC939-miR-21 细胞, 建立裸鼠移植瘤模型。采用 Western blot、免疫组化及实时定量 RT-PCR 法检测 EMT 的上皮细胞标志物 E-钙粘蛋白 (E-cadherin) 和间质标志物 N-钙粘蛋白 (N-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin) 的表达。**结果** QBC939-miR-21 组移植瘤体积大于 QBC939 组 ($P < 0.05$), 且 E-cadherin 相对表达量降低, Vimentin、N-cadherin 相对表达量增加。**结论** miR-21 促进了裸鼠胆管癌细胞移植瘤生长和 EMT 进程, 为进一步研究

miR-21 在胆管癌中的功能及作用机制奠定了基础。

关键词 胆管癌; microRNA-21; 上皮间质转化; 移植瘤

中图分类号 R 73-37

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)10-1399-05

胆管癌是一种恶性度极高的起源于胆管上皮的肿瘤, 手术切除率较低, 术后复发率高, 对于放、化疗不敏感, 导致该疾病预后较差^[1]。大多数胆管癌患者在确诊时已是晚期, 术后肿瘤的复发率非常高, 这往往与患者早期即发生肿瘤浸润转移有关。miRNA-21 (miR-21) 是 miRNA 大家族中一个具有多种功能也是研究较多的 miRNA, 其被发现在大量肿瘤中表达升高^[2-3]。上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 被认为和癌症的转移及复发息息相关, 其重要特征之一是上皮细胞标志物 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 表达缺失和间质标志物波形蛋白 (Vimentin) 和 N-钙黏蛋白 (N-cadherin) 表达升高。而 miR-21 可以通过诱导 EMT 进程而促进

2015-05-22 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81272397); 安徽省自然科学基金 (编号: 1208085MH176)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院¹ 普通外科、² 肝胆胰外科安徽省重点实验室, 合肥 230001

作者简介: 晋志远, 男, 硕士研究生;

黄 强, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: hq-sohu@.com

Ectopic expression of LMO4 regulates NB4 cells proliferation and differentiation

Qin Yu¹, Chen Qiongqiong¹, Zhai Zhimin², et al

(¹Dept of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Dept of Hematology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract **Objective** To investigate potential functions of LMO4 in regulating proliferation and differentiation of acute promyelocytic leukemia cells (NB4). **Methods** The expression of LMO4 in the acute promyelocytic leukemia cell line (NB4) was detected using qRT-PCR and Western blot, respectively. Depending on lentivirus transduction, NB4 cells with overexpression of LMO4 were established. The MTT assay was performed to detect proliferation; NB4 cells were induced by all trans retinoic acid (ATRA) to differentiate into mature granulocytes, which could be detected by using NBT test or flow cytometry for analysis of CD11b⁺ cells. **Results** Western blot analysis showed that LMO4 ectopically expressed in NB4 cells, and expression level of LMO4 decreased during differentiation induced by ATRA. After transduced by lentivirus containing human LMO4 cDNA, the NB4 cell line with LMO4 overexpression was obtained according to detection of LMO4 expression using qRT-PCR and Western blot analysis. Compared to the control cells, the MTT assay showed LMO4 overexpression in NB4 cell could improve cells proliferation; meanwhile, both NBT tests and flow cytometry analysis indicated that LMO4 overexpression could also increase NB4 differentiation efficiency depending on ATRA induction. **Conclusion** Ectopic expression of LMO4 in NB4 cells promotes cell proliferation, and increases differentiation potency of NB4 cells due to being available of sensitiveness to ATRA.

Key words acute promyelocytic leukemia; NB4; LMO4; ATRA

胆管癌的侵袭转移能力^[4],该研究进一步用体内实验证实 miR-21 与 EMT 在胆管癌中的关系。

1 材料与方法

1.1 材料 人胆管癌细胞 QBC939 由安徽医科大学附属省立医院肝胆胰外科安徽省重点实验室自行保存,慢病毒表达载体构建稳定表达 miR-21 的胆管癌细胞 QBC939-miR-21 及空白对照组 QBC-NC 在前期实验后冻存保存;SPF 级 BALB/C 4~5 周龄雌性裸鼠 16 只,15~20 g,购自上海实验动物中心;RNA 抽提试剂盒购自德国 Qiagen 公司;DMEM 培养基、胎牛血清及青、链霉素购自美国 Hyclone 公司;E-cadherin、N-cadherin 及 Vimentin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司;逆转录试剂盒、PCR 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 实时定量 RT-PCR 检测 miR-21 表达 收集各组细胞,常规培养、传代,取对数生长期的细胞检测 miR-21 的表达。按照 TRIzol 法抽提总 RNA,以 U6 为内参,Primer 5.0 分别设计引物,U6 上游引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',下游引物:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3';miR-21 上游引物:5'-ACACTCCAGCTGGGTAGCTTATCAGACTGATG-3',下游引物:5'-CTCAACTGGTGTCTGTGA-3',按照逆转录及 PCR 试剂盒说明设置反应体系及参数,进行 PCR 扩增。所得数据经内参基因均一处理,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方式计算目标基因表达差异以倍数表示。

1.2.2 裸鼠皮下移植瘤模型的建立 胆管癌细胞 QBC939 及 QBC939-miR-21 细胞分别于 16 只裸鼠两侧背部皮靠后下接种,约 0.1 ml/只,接种后待肉眼能观察到肿瘤时开始用微米卡尺测肿瘤体积。于第 4 周末处死全部裸鼠,剥离移植瘤称重;肿瘤体积按以下公式计算:肿瘤体积(mm^3) = $0.5 \times \text{长径}(\text{mm}) \times \text{短径}^2(\text{mm}^2)$ 。

1.2.3 免疫组化检查瘤体部分组织 获得瘤体后一部分于液氮中冻存,另一部分用 4% 多聚甲醛固定,切取合适大小材料(厚度约 0.2 cm)进行包埋,乙醇及二甲苯溶液脱水,石蜡包埋后的标本在二甲苯溶液脱蜡,逐层梯度酒精和蒸馏水水化,柠檬酸盐缓冲液(pH = 6.0)处理后行抗原修复,正常山羊血清封闭处理 15 min,用一抗 4℃ 处理过夜,相应二抗和 DAB 显色处理,苏木精复染、脱水、封片。E-cadherin 主要在肿瘤细胞的细胞膜中表达染色,≥90%

为正常表达,<90% 为缺失表达^[5]。N-cadherin、Vimentin 等主要在肿瘤细胞的细胞质中表达染色,≥20% 为阳性表达,否则相反^[6]。标本均经由两名病理医师证实。

1.2.4 实时定量 RT-PCR 法检测 EMT 相关蛋白的相对表达量 液氮罐中取出组织,运用 TRIzol 法提取总 RNA,以 GAPDH 作为内参基因,以 Primer 5.0 分别设计引物,按照逆转录及 PCR 试剂盒说明设置反应体系及参数,进行逆转录合成 cDNA 和 PCR 扩增。内参片段 GAPDH 为 299 bp,目的片段 E-cadherin 为 94 bp,N-cadherin 为 201 bp,Vimentin 为 278 bp。所得数据处理同 1.2.1。

1.2.5 Western blot 法检测 EMT 相关蛋白表达 将各组 40 mg 组织块尽量剪碎,加 RIPA 裂解液(含 PMSF 和 Cocktail)于匀浆器中,然后将裂解液于 4℃、14 000 r/min 离心 10 min,获得总蛋白后 4℃ 过夜,Lowry 法蛋白定量,紫外分光光度计测量组织蛋白浓度后将蛋白浓度调至 $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$,再经 PAGE 电泳将蛋白电转至 PVDF 膜上;5% 脱脂奶粉封闭 30 min 后,分别加入各目标蛋白一抗,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:2 000)反应、孵育,利用 X 光胶片曝光、显影、定影、拍照,用 Image J 软件进行条带灰度分析。以 GAPDH 作为对照,目的蛋白的灰度值/对照 GAPDH 灰度值的比值表示蛋白的相对表达量。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行分析,两组计量资料采用 t 检验,多组计量资料分析采用方差分析。

2 结果

2.1 实时定量 RT-PCR 检测 miR-21 在各细胞组的表达 分别收集 QBC939-miR-21 组、QBC939-NC 组及 QBC939 组细胞抽提 RNA,检测 miR-21 的相对表达量。结果显示 QBC939-miR-21 组 miR-21 表达量(32.27 ± 1.05),较 QBC939-NC 组(1.00 ± 0.01)及 QBC939 组(0.75 ± 0.01)高,差异有统计学意义($F = 18.32, P < 0.01$),而 QBC939-NC 组与 QBC939 组差异无统计学意义。见图 1。

2.2 miR-21 对裸鼠皮下胆管癌移植瘤生长的影响

每天测量移植瘤体积,绘制肿瘤生长曲线(图 2)。结果显示,QBC939-miR-21 组肿瘤的增长速度明显比 QBC939 组肿瘤的增长速度快,其中 QBC939 组有 1 只小鼠始终未成瘤。于第 4 周末剥离移植瘤后

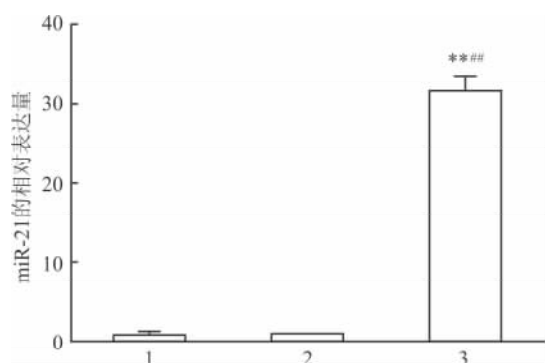


图1 miR-21在不同组中的表达水平

1: QBC939 组; 2: QBC939-NC 组; 3: QBC939-miR-21 组; 与 QBC939 组比较: ** $P < 0.01$; 与 QBC939-NC 组比较: ## $P < 0.01$

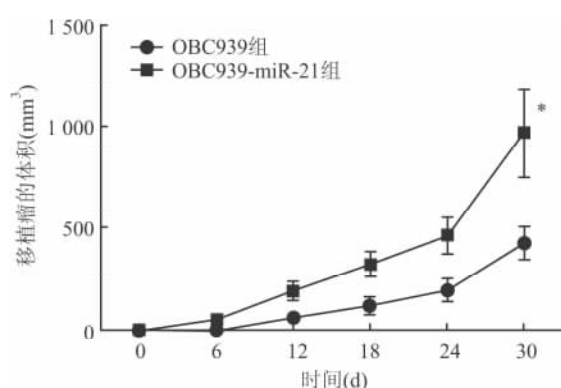


图2 QBC939 组及 QBC939-miR-21 组小鼠移植瘤的体积变化

与 QBC939 组比较: * $P < 0.05$

称重(图3),组织的一部分于 -80°C 冻存,另一部分于 4% 多聚甲醛固定。QBC939-miR-21 组移植瘤重为 (0.50 ± 0.23) g, QBC939 组重量为 (0.23 ± 0.11) g,两组移植瘤重量差异有统计学意义 ($t = 2.85, P < 0.05$),见图4,miR-21 在鼠体内可明显促进肿瘤组织的增殖与生长。

2.3 免疫组化法检测两组移植瘤 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达 免疫组化法检测两组裸鼠皮下移植瘤 E-cadherin 缺失率及 N-cadherin 和 Vimentin 阳性表达率, QBC939 组与 QBC939-miR-21 组 E-cadherin 缺失率、N-cadherin 阳性表达率及 Vimentin 阳性表达率分别为 57.1% (4/7) vs 75.0% (6/8)、71.4% (5/7) vs 87.5% (7/8)、57.1% (4/7) vs 75.0% (6/8)。结果证实 miR-21 的上调表达能够降低 E-cadherin 的表达,增加 N-cadherin 及 Vimentin 表达(图5)。



图3 不同组小鼠的肿瘤照片

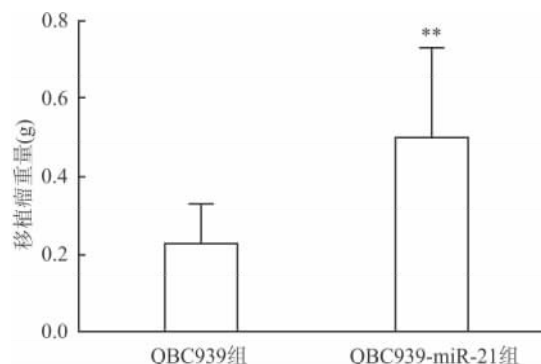
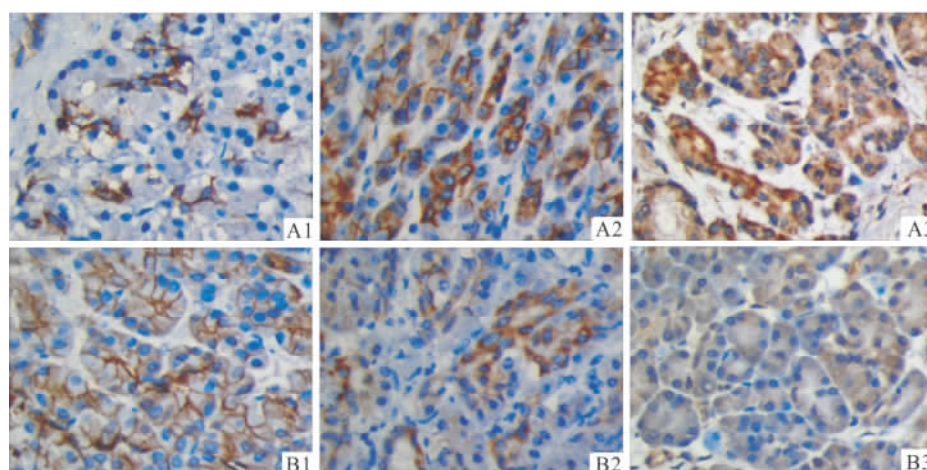


图4 两组小鼠移植瘤的重量

与 QBC939 组比较: ** $P < 0.01$

图5 免疫组化检测 E-cadherin、N-cadherin 及 Vimentin 在小鼠移植瘤中表达 $\times 40$

A: QBC939-miR-21 组; B: QBC939 组; 1: E-cadherin; 2: N-cadherin; 3: Vimentin

2.4 实时定量 RT-PCR 检测两组移植瘤 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin mRNA 表达量 实时定量 RT-PCR 检测 QBC939 组与 QBC939-miR-21 组 E-cadherin、N-cadherin 及 Vimentin mRNA 相对表达量。结果提示 QBC939-miR-21 组较 QBC939 组裸鼠皮下移植瘤 E-cadherin 表达降低, N-cadherin 及 Vimentin 表达增高。见图 6。

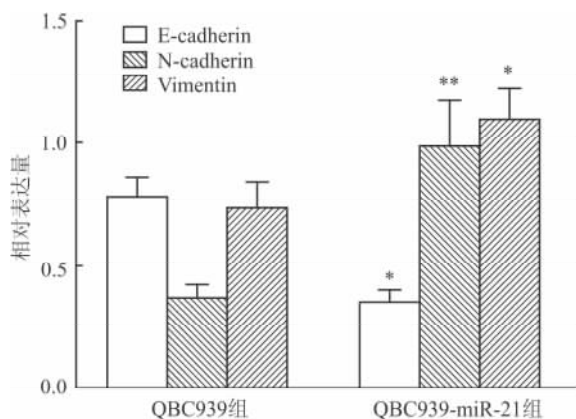


图6 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin mRNA 在不同裸鼠移植瘤中的表达

与 QBC939 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.5 Western blot 法检测 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达量 Western blot 法检测 QBC939 组与 QBC939-miR-21 组 E-cadherin 蛋白表达量 (2.02 ± 0.79 vs 0.34 ± 0.08), 差异有统计学意义 ($t = 5.2, P < 0.01$), N-cadherin 蛋白表达量 (0.20 ± 0.05 vs 0.87 ± 0.42), 差异有统计学意义 ($t = -4.012, P < 0.05$), Vimentin 蛋白表达量 (0.32 ± 0.17 vs 1.16 ± 0.58), 差异有统计学意义 ($t = -3.429, P < 0.05$)。结果表明, QBC939-miR-21 组较 QBC939 组裸鼠皮下移植瘤 E-cadherin 表达降低, N-cadherin 及 Vimentin 表达增高。见图 7。

3 讨论

microRNA 是一类通过与靶 mRNA 的 3' 非翻译区互补结合, 引起靶基因的抑制翻译或降解的内源性非编码小分子 RNA。miR-21 作为 microRNA 家族中被较早发现的成员之一, 其编码基因位于 17q23.1 染色体上, 与跨膜蛋白 49 (TMEM49) 基因重叠^[7]。研究^[8-9]证实 miR-21 在多种恶性肿瘤中处于高表达水平, 如肝癌、结直肠癌、胃癌、乳癌等, 并能显著提高肿瘤的生长及侵袭转移能力, 在肿瘤的进展及评估预后中发挥重要作用。本试验中通过慢病毒表达载体的构建成功的上调了 QBC939 细胞

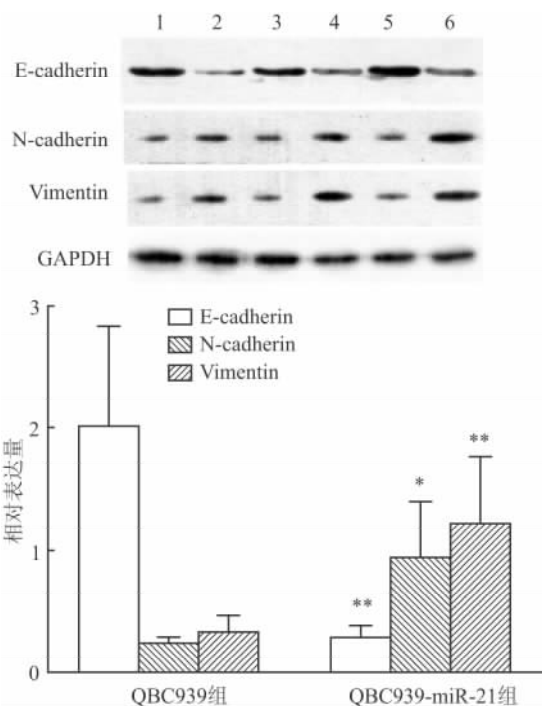


图7 Western blot 法检测不同裸鼠移植瘤 E-cadherin、N-cadherin 及 Vimentin 蛋白的表达

1、3、5: QBC939 组; 2、4、6: QBC939-miR-21 组; 与 QBC939 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

中 miR-21 的表达, 通过小鼠的皮下移植瘤模型构建, 显示转染后的 QBC939 细胞形成的皮下移植瘤较对照组, 生长速度及重量都明显加强, 提示 miR-21 在胆管癌中也发挥着促癌基因的作用, 能促进肿瘤细胞的生长。

胆管癌的侵袭与转移通常是影响术后患者生存率的主要因素之一, 而近年来越来越多的证据^[10]表明, EMT 现象是肿瘤细胞发生侵袭与转移的机制之一。EMT 是指上皮细胞向间质细胞转化的过程, 是胚胎发育过程中的一种生理现象, 也是肿瘤细胞具有迁移性和侵袭性的一个主要原因。其细胞表型发生改变, 以 E-cadherin 表达缺失和 N-cadherin、Vimentin 阳性表达为 EMT 现象的标志^[11]。大量的 miRNA 被发现能直接或间接的参与 EMT 进程的调控, 其中以 miR-200 以及 miR-34 家族研究^[12]较多。本团队前期研究^[13]显示 miR-21 在胆管癌组织中表达较癌旁组织及正常组织都高, 体外实验^[4]也证实了 miR-21 在胆管癌细胞中可以通过诱导 EMT 进程促进胆管癌细胞的侵袭与转移。本研究利用免疫组化、Western blot、qRT-PCR 法对皮下移植瘤组织的检测显示, 上调表达 miR-21 的 QBC939 细胞其构建移植瘤组织较空白对照组小鼠移植瘤组织中 E-cadherin 表达减低, N-cadherin 及 Vimentin 表达增强。

以上均表明 miR-21 能够通过调节 EMT 相关分子的表达从而诱导 EMT 进程,也进一步证实了 miR-21 能够通过促进 EMT 进程从而影响胆管癌的侵袭与转移。

参与诱导或调控 EMT 进程的因素十分复杂,其被大量的细胞的信号所调节并最终激活转录因子,如 Twist, Snail 及 Zeb 等。Bao et al^[14] 在肝癌中发现 miR-21 能通过调节 PTEN 和 hSulf-1 介导的 AKT 和 ERK 信号通路诱导 EMT 的发生,而 Bin et al^[15] 发现在胰腺癌中 Notch-1 信号通路或许介导了 miR-21 诱导 EMT 进程的发生,而在胆管癌中 miR-21 通过何种信号通路诱导 EMT 的发生还需进一步研究,本团队下一步将就这一现象利用基因芯片的技术进行更深入的探讨,进而为胆管癌的诊断以及靶向治疗提供更为切实可靠的理论依据。

参考文献

- [1] Friman S. Cholangiocarcinoma-current treatment options [J]. *Scand J Surg*, 2011, 100(1): 30-4.
- [2] Xu J, Wu C, Che X, et al. Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis [J]. *Mol Carcinog*, 2011, 50(2): 136-42.
- [3] Asaga S, Kuo C, Nguyen T, et al. Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer [J]. *Clin Chem*, 2011, 57(1): 84-91.
- [4] 刘 振, 黄 强, 刘臣海, 等. MicroRNA-21 对胆管癌细胞侵袭与转移的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(2): 190-3.
- [5] Richmond P J, Karayiannakis A J, Nagafuchi A, et al. Aberrant E-cadherin and alpha-catenin expression in prostate cancer: correlation with patient survival [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(15): 3189-93.
- [6] Nakajima S, Doi R, Toyoda E, et al. N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(12 Pt 1): 4125-33.
- [7] Dong Y, Yu J, Ng S S. MicroRNA dysregulation as a prognostic biomarker in colorectal cancer. [J]. *Cancer Manag Res*, 2014, 6: 405-22.
- [8] Zhang B G, Li J F, Yu B Q. microRNA-21 promotes tumor proliferation and invasion in gastric cancer by targeting PTEN [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(4): 1019-26.
- [9] Zheng J, Xue H, Wang T, et al. miR-21 downregulates the tumor suppressor P12 CDK2AP1 and stimulates cell proliferation and invasion [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(3): 872-80.
- [10] Krantz S B, Shields M A, Dangi-Garimella S, et al. Contribution of epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells to pancreatic cancer progression [J]. *J Surg Res*, 2012, 173(1): 105-12.
- [11] Kraljevic Pavelic S, Sedic M, Bosnjak H, et al. Metastasis: new perspectives on an old problem [J]. *Mol Cancer*, 2011, 10: 22.
- [12] Siemens H, Jackstadt R, Hunten S, et al. miR-34 and SNAIL form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions [J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(24): 4256-71.
- [13] 刘 磊, 刘臣海, 黄 强, 等. 胆管癌组织中 microRNA-21 的表达与上皮间质转化的关系及对预后评估的价值 [J]. *中华消化外科杂志*, 2013, 12(3): 228-32.
- [14] Bao L, Yan Y, Xu C, et al. MicroRNA-21 suppresses PTEN and hSulf-1 expression and promotes hepatocellular carcinoma progression through AKT/ERK pathways [J]. *Cancer Lett*, 2013, 337(2): 226-36.
- [15] Bao B, Wang Z, Ali S, et al. Notch-1 induces epithelial-mesenchymal transition consistent with cancer stem cell phenotype in pancreatic cancer cells [J]. *Cancer Letters*, 2011, 307(1): 26-36.

Effect of microRNA-21 on EMT of human cholangiocarcinoma xenografts in nude mice

Jin Zhiyuan^{1,2}, Huang Qiang¹, Liu Chenhai¹, et al

(¹Dept of General Surgery, ²Key Laboratory of Hepatopancreatobiliary Surgery of Anhui Province, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To observe the effects of microRNA-21 (miR-21) on the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human cholangiocarcinoma xenografts in nude mice. **Methods** QBC-939 and QBC939-miR-21 cholangiocarcinoma cells were subcutaneously injected into two groups of nude mice respectively as xenografts, expressions of E-cadherin, N-cadherin and Vimentin were detected by Western blot, RT-PCR and immunohistochemical analysis. **Results** Compared with group QBC939, group QBC939-miR-21 xenografts showed the greater tumor weight and rapider growth, expression of E-cadherin decreased, whereas the protein expressions of Vimentin and N-cadherin increased. **Conclusion** miR-21 overexpression enhances tumor growth, which promotes EMT phenotype and the foundation for further study of miR-21 function in cholangiocarcinoma and mechanism is established.

Key words cholangiocarcinoma; microRNA-21; EMT; xenograft