

miR-107 对 HepG2 细胞增殖和细胞周期的影响

贾振亚, 曹 静, 范文洁, 徐 玥, 范璐璐, 孙国平

摘要 目的 探讨 miR-107 对 HepG2 细胞增殖和细胞周期的影响, 以及对 CDK6 蛋白表达的调控。方法 将 50 nmol/L 的 miR-107 mimics 或阴性对照序列由 Lipofectamine 2000 转染入人肝癌细胞株 HepG2 中; qRT-PCR 法检测转染后 HepG2 细胞内 miR-107 表达水平; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法检测细胞增殖能力; 流式细胞术分析转染后细胞周期的变化; Western blot 法检测 CDK6 蛋白表达水平。结果 转染后 24 h, miR-107 mimics 转染组细胞内 miR-107 表达水平较空白对照组明显升高 ($P < 0.05$); 与空白对照组相比, miR-107 mimics 转染组 HepG2 细胞增殖受抑制 ($P < 0.05$), 处于 G0/G1 期的细胞增多 ($P < 0.05$), CDK6 蛋白表达下调 ($P < 0.05$)。结论 miR-107 能够抑制 HepG2 细胞增殖并诱导 HepG2 细胞 G0/G1 期阻滞, 这可能与抑制 CDK6 蛋白的表达有关。

关键词 肝癌; miR-107; 增殖; 细胞周期; CDK6

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)10-1400-05

microRNAs (miRNAs 或者 miRs) 是一类普遍存在于生物体内, 长约 22 个核苷酸的内源性非编码小分子单链 RNA, 通过在转录后水平负性调控基因表达, 参与肿瘤等疾病的发生发展过程。研究^[1]表明, miR-107 在人类多种恶性肿瘤中异常表达, 并与肿瘤细胞的增殖、凋亡、细胞周期、侵袭转移等生物学行为有关, 但 miR-107 与肝癌的生物学行为是否有相关性尚未见报道。该研究旨在了解 miR-107 对 HepG2 细胞增殖和细胞周期的影响及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株与试剂 人肝癌细胞株 HepG2 购自中科院上海生命科学院细胞库。Hsa-miR-107 mimics 上游序列: 5'-AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUC-3', 下游序列: 3'-AUAGCCUGUACAAUGCUGCUUU-5';

阴性对照上游序列: 5'-UUCUCCGAACGUGU-CACGUTT-3', 下游序列: 3'-ACGUGACACGUUCG-GAGAATT-5', miR-107 qPCR Quantitation Kit 及 U6 snRNA qPCR Normalization Kit 均由上海吉玛公司合成。胎牛血清购自杭州四季青生物制品公司; DMEM 培养基粉末、Opti-MEM 培养基购自美国 Gibco 公司; Lipofectamine 2000、TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; 碘化丙啶 (PI) 单染试剂购自美国 BD 公司; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT)、二甲基亚砜 (DMSO) 购自美国 Sigma 公司; 鼠抗人 CDK6 单克隆抗体、抗 β -actin 多克隆抗体、山羊抗小鼠二抗均购自北京中杉金桥生物技术有限公司; ECL 发光试剂盒购自美国 Pierce 生物技术有限公司。主要仪器有: Ektex-800 型酶标仪购自美国 Bio-Tek 仪器公司; EP-ICS XL 和 XL-MCL 型流式细胞仪购自美国 Beckman Coulter 公司; 普通 PCR 仪 K960 购自杭州晶格科学仪器有限公司; PIKOREAL 96 荧光定量 PCR 仪购自美国 Thermo 公司; IX-70 荧光倒置显微镜购自日本 Olympus 光学工业株式会社; Image QuantTM LAS-4000 型发光成像系统购自日本通用电气医疗集团生命科学部。

1.2 细胞培养 人肝癌细胞株 HepG2 在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养, 隔天换液。当培养瓶中细胞融合度达 80% 时, 用胰酶消化, 反复吹打形成单细胞悬液, 分瓶培养 2~3 d 传代一次。

1.3 细胞转染 取对数生长期细胞 (2×10^5 个/孔) 接种于 6 孔细胞培养板中, 待细胞贴壁且融合度达到 30%~50% 时, 将 50 nmol/L 的 miR-107 mimics 及阴性对照序列由 Lipofectamine 2000 转染入 HepG2 细胞, 具体步骤按 Lipofectamine 2000 说明书进行。转染后于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下继续培养 4~6 h 后弃去孔内含转染液的培养基, 更换为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养, 按时间点进行后续检测。实验分 3 组: 空白对照组为未经转染的细胞、阴性对照组为转染了阴性对照序列的细胞、miR-107 mimics 转染组为转染了 miR-107 mimics 的细胞。miR-107 mimics 由羟基荧光素 (FAM) 基团标记, 可于荧光显微镜下看到绿色荧

2014-03-19 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81272739、81071986)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院肿瘤科, 合肥 230022

作者简介: 贾振亚, 女, 硕士研究生;

孙国平, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: sunguoping@ahmu.edu.cn

光。转染后 24 h, 于荧光显微镜下观察和拍照, 并估算转染效率。转染效率 (%) = 荧光场带绿色荧光细胞数 / 明场细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.4 qRT-PCR 检测 收集转染后 24 h 的细胞, 按 TRIzol 试剂说明书提取总 RNA。紫外线分光光度仪上测 A_{260} 及 A_{280} 值, 计算 RNA 纯度和浓度, 取 A_{260}/A_{280} 值在 1.8 ~ 2.0 应用于实验。以 U6 为内参, miR-107 及 U6 引物均由上海吉玛公司设计合成。将 RNA 逆转录成 cDNA, 逆转录反应为 20 μ l 体系, 反应条件为 25 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。扩增采用 20 μ l 体系: 反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min 预变性, 再进行 95 $^{\circ}\text{C}$ 12 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 40 s 共 40 个循环。用 qRT-PCR 仪检测, 获得 Ct 值, $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{miR-107}} - \text{Ct}_{\text{U6}}$, $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{miR-107}} - \text{Ct}_{\text{U6}})_{\text{转染组}} - (\text{Ct}_{\text{miR-107}} - \text{Ct}_{\text{U6}})_{\text{空白对照组}}$, 各组间 miR-107 的相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算。

1.5 MTT 法检测细胞增殖 取对数生长期细胞 (5×10^3 个/孔) 接种于 96 孔细胞培养板中, 24 h 后进行细胞转染。分别于转染后 24、48、72 h 进行 MTT 检测, 每孔加入 10 μ l MTT (5 mg/ml), 培养箱内继续培养 4 h, 弃去培养液, 加入 DMSO 150 μ l, 震荡 10 min, 酶标仪于 490 nm 处检测吸光度值 (absorbance, A), 每组设置 3 个复孔, 取每组平均值, 比较组间差异, 实验重复 3 次。细胞增殖抑制率 (%) = $(1 - \text{实验组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$ 。

1.6 流式细胞术检测细胞周期 收集转染后 48 h 的细胞, 制备成单细胞悬液。2 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, PBS 漂洗 2 次, 弃去漂洗液, 加入 200 μ l 预冷的 PBS 重悬细胞, 再加入 9 倍体积预冷的 70% 乙醇, 轻摇混匀, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内固定 2 h 以上, 离心后弃去冷乙醇, PBS 漂洗 1 次, 加入 PI 单染试剂 300 μ l, 400 目网纱过滤细胞悬液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光静置 20 ~ 30 min, 上机检测。应用 Modfit 软件对细胞周期进行分析。实验重复 3 次, 比较组间差异。

1.7 Western blot 法检测 收集转染后 48 h 的细胞, 提取蛋白样品。12.5% 的 SDS/PAGE 电泳分离蛋白, 冰浴下 200 mA 转膜 2 h, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h, PBST 洗膜 3 次, PBS 洗膜 1 次, 一抗 (CDK6 为 1 : 150 稀释, β -actin 为 1 : 1 000 稀释) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBST 洗膜 3 次后加入二抗 (均为 1 : 10 000 稀释) 室温孵育 2 h, PBST 洗膜 3 次, PBS 洗膜 1 次, 加入电化学发光试剂, 于 Image QuantTM LAS-4000 型发光成像系统托盘上检测荧光信号并成像, 应用 image J 软件分析图像灰度值。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 19.0 统计软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多个样本的均数比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 瞬时转染效率 转染 miR-107 mimics 24 h 后, 先在荧光倒置显微镜的明场下观察细胞, 后在同一视野下转为荧光场, 可观察到带绿色荧光的 HepG2 细胞大于总细胞数的 90%, 表明转染效率超过 90%。见图 1, 为了验证 HepG2 细胞在转染 miR-107 mimics 后, 细胞内的 miR-107 表达是否相应的上调, 进一步采用了 qRT-PCR 法检测转染 24 h 后 HepG2 细胞中 miR-107 的表达水平。转染 24 h 后, 与空白对照组及阴性对照组 HepG2 细胞相比, miR-107 mimics 转染组细胞内 miR-107 表达水平明显升高, 约为空白对照组的 (72.27 ± 3.57) 倍, 差异有统计学意义 ($F = 1\,036.05$, $P < 0.05$), 空白对照组及阴性对照组 miR-107 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 2。

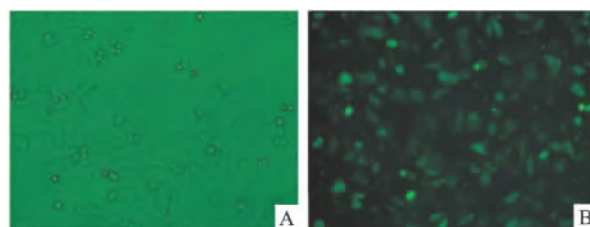


图 1 转染 miR-107 mimics 的 HepG2 细胞 $\times 100$

A: 明场; B: 荧光场

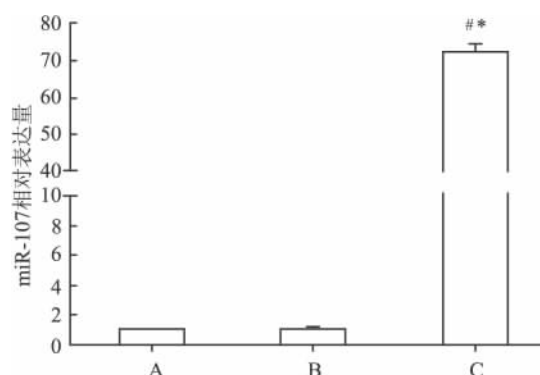


图 2 转染后各组 HepG2 细胞内 miR-107 的相对表达量

A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: miR-107 mimics 转染组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$

2.2 上调 miR-107 的表达对 HepG2 细胞增殖的影响 MTT 结果显示, 转染 24、48、72 h 后, miR-107 mimics 转染组的 A 值均明显低于空白对照组, 差异

具有统计学意义 ($F_{24h} = 4.576, P < 0.05$; $F_{48h} = 29.070, P < 0.05$; $F_{72h} = 8.120, P < 0.05$) 3 个时间点 miR-107 mimics 转染组的细胞增殖抑制率分别为 8.79%、15.05%、23.82% 随时间呈递增趋势,而阴性对照组与空白对照组相比细胞增殖差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 3。

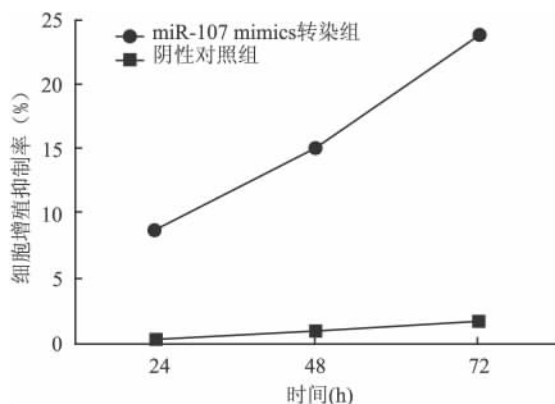


图3 miR-107 对 HepG2 细胞增殖的影响

2.3 上调 miR-107 的表达对 HepG2 细胞周期的影响 流式细胞术分析显示,转染 48 h 后,空白对照组、阴性对照组、miR-107 mimics 转染组中 G0/G1 期细胞所占比例分别为 $(52.87 \pm 1.29)\%$ 、 $(54.58 \pm 2.14)\%$ 、 $(64.40 \pm 1.04)\%$,可见 miR-107 mimics 转染组中处于 G0/G1 期的细胞比例明显大于空白对照组及阴性对照组,差异有统计学意义 ($F = 47.628, P < 0.05$),而空白对照组及阴性对照组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 4。

2.4 上调 miR-107 的表达对 HepG2 细胞内 CDK6 蛋白表达水平的影响 结果显示 miR-107 mimics 转染组 CDK6 蛋白表达水平明显低于空白对照组及阴性对照组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),空白对照组与阴性对照组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 5。

3 讨论

原发性肝细胞癌是常见的消化系统恶性肿瘤之一。大量研究^[2-3]显示,许多 miRNAs 在肝癌中表达异常,与肝癌的发生发展过程密切相关。对这些肿瘤的生长起抑制作用和促进作用皆有报道^[4-5]。研究^[6]显示 miR-107 通过抑制 let-7 家族促进肿瘤的生长,起“癌基因”的作用。

目前 miR-107 在肝癌中的研究较少,既往研究^[7]表明 HepG2 细胞中的 miR-107 表达量低于人

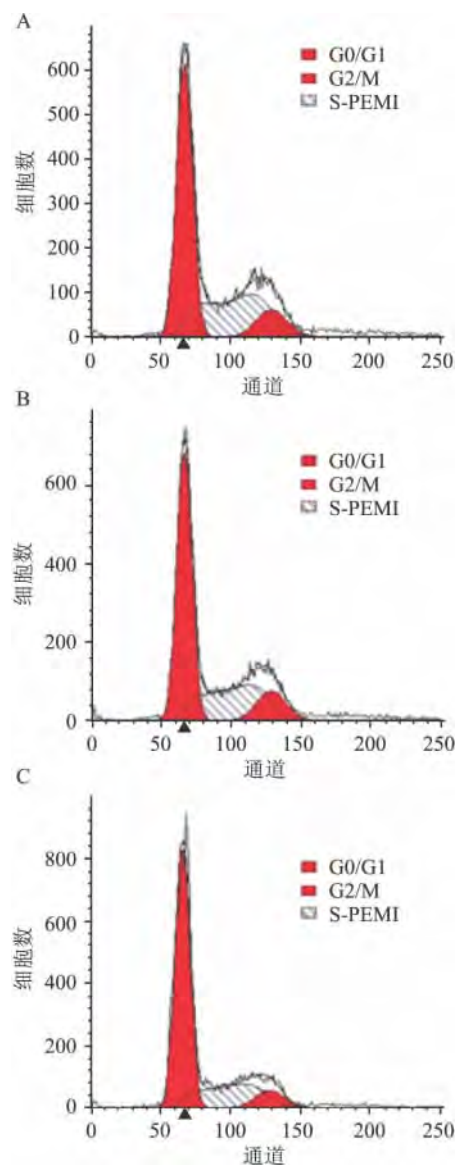


图4 miR-107 对 HepG2 细胞周期的影响

A:空白对照组;B:阴性对照组;C:miR-107 mimics 转染组

正常肝细胞株 L02,但 miR-107 与肝癌的生物学行为是否有相关性尚未见报道。为了解 miR-107 在体外对 HepG2 细胞增殖的作用,本研究将人工合成的 miR-107 mimics 转染入 HepG2 细胞,qRT-PCR 法显示其能够明显上调细胞内 miR-107 的表达水平。MTT 法显示与空白对照组和阴性对照组相比,miR-107 mimics 转染组的细胞增殖明显受限,提示上调 miR-107 的表达能够抑制 HepG2 细胞增殖。由于细胞增殖受到细胞周期的调控,本研究应用流式细胞术对各组细胞的细胞周期进行分析,显示转染 miR-107 mimics 后有更多的细胞停留在 G0/G1 期,提示上调 miR-107 的表达能够诱导 HepG2 细胞 G0/G1 期阻滞。查找 miRanda、PicTar、TargetScan 等 miR-

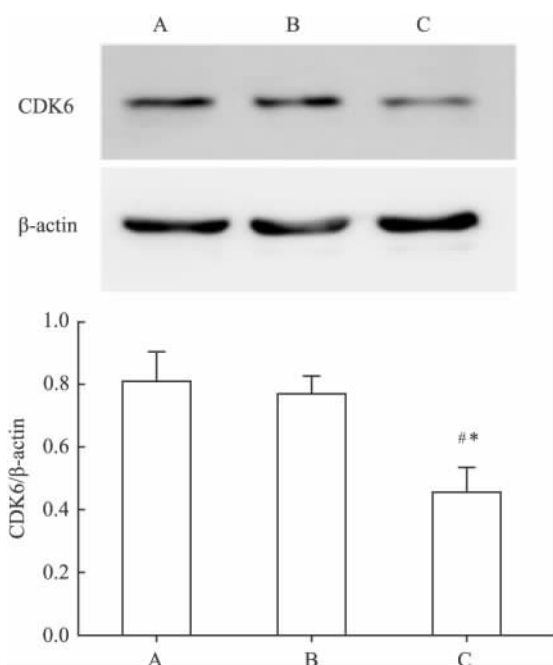


图5 miR-107对HepG2细胞内CDK6蛋白表达的影响

A:空白对照组;B:阴性对照组;C:miR-107 mimics转染组;与空白对照组比较: * $P < 0.05$;与阴性对照组比较: # $P < 0.05$

NA靶基因预测软件,分析CDK6可能是miR-107诱导HepG2细胞发生G0/G1期阻滞的靶基因。CDK6属于丝氨酸/苏氨酸激酶家族,与细胞周期蛋白D1结合并激活后,可促使pRB蛋白磷酸化,磷酸化的pRB会释放出与之结合的转录因子E2F,进而诱导S期相关基因的转录,加速G1期细胞向S期细胞转变,促进细胞增殖,目前普遍认为CDK6是一种癌基因^[8]。本研究通过对HepG2细胞CDK6蛋白水平的检测,显示上调miR-107能够抑制CDK6蛋白的表达。由此推断,miR-107可能通过抑制HepG2细胞中CDK6蛋白的表达,使得G1/S转换受阻,诱导G0/G1期阻滞,从而抑制HepG2细胞增殖,而这一结果也提示miR-107在肝癌中可能起到了“抑癌基因”的作用。目前已有研究^[4,9-11]显示,miR-107通过调控细胞周期相关的靶基因,诱导胃癌、头颈部鳞癌、脑胶质瘤及乳腺癌等多种肿瘤细胞周期阻滞进而抑制细胞增殖,与本研究结果一致。

然而由于miRNAs与其靶mRNA之间形成了一个复杂的调控网络,miR-107可以同时调控多条靶mRNA,CDK6亦可以是多条miRNAs的靶基因,故miR-107在HepG2细胞中更多的功能和机制仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Finnerty J R, Wang W X, Hébert S S, et al. The miR-15/107 group of microRNA genes: evolutionary biology, cellular functions, and roles in human diseases [J]. *J Mol Biol*, 2010, 402 (3): 491–509.
- [2] Braconi C, Henry J C, Kogure T, et al. The role of microRNAs in human liver cancers [J]. *Semin Oncol*, 2011, 38 (6): 752–63.
- [3] Li G, Cai G, Li D, et al. MicroRNAs and liver disease: viral hepatitis, liver fibrosis and hepatocellular carcinoma [J]. *Postgrad Med J*, 2014, 90 (1060): 106–12.
- [4] Feng L, Xie Y, Zhang H, et al. MiR-107 targets cyclin-dependent kinase 6 expression, induces cell cycle G1 arrest and inhibits invasion in gastric cancer cells [J]. *Med Oncol*, 2012, 29 (2): 856–63.
- [5] Li X, Zhang Y, Shi Y, et al. MicroRNA-107, an oncogene microRNA that regulates tumour invasion and metastasis by targeting DICER1 in gastric cancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15 (9): 1887–95.
- [6] Chen P S, Su J L, Cha S T, et al. miR-107 promotes tumor progression by targeting the let-7 microRNA in mice and humans [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121 (9): 3442–55.
- [7] 沈雁兵, 马德宾, 邹丽云, 等. 肝细胞性肝癌相关miRNA的筛选和鉴定 [J]. *免疫学杂志* 2012, 29 (4): 310–3.
- [8] Kohrt D, Crary J, Zimmer M, et al. CDK6 binds and promotes the degradation of the EYA2 protein [J]. *Cell Cycle*, 2014, 13 (1): 62–71.
- [9] Piao L, Zhang M, Datta J, et al. Lipid-based nanoparticle delivery of Pre-miR-107 inhibits the tumorigenicity of head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Mol Ther*, 2012, 20 (6): 1261–9.
- [10] Chen L, Zhang R, Li P, et al. P53-induced microRNA-107 inhibits proliferation of glioma cells and down-regulates the expression of CDK6 and Notch-2 [J]. *Neurosci Lett*, 2013, 534: 327–32.
- [11] Li X Y, Luo Q F, Wei C K, et al. MiRNA-107 inhibits proliferation and migration by targeting CDK8 in breast cancer [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7 (1): 32–40.

The effects of miR-107 on proliferation and cell cycle of HepG2 cells

Jia Zhenya, Cao Jing, Fan Wenjie, et al

(Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effects of miR-107 on cell proliferation and cell cycle of HepG2 cells, as well as the expression of CDK6 protein. **Methods** Human hepatoma HepG2 cells were transfected with 50 nmol/L

依西美坦与低剂量甲氨蝶呤对依西美坦耐药人乳腺癌细胞的协同效应及逆转耐药机制

居伶俐¹, 袁媛², 潘跃银¹

摘要 目的 研究依西美坦 (EXE) 与低剂量甲氨蝶呤 (MTX) 对依西美坦耐药人乳腺癌 MCF-7 细胞 (MCF-7/EXE) 的增殖抑制作用及意义。方法 使用 MTT 法检测 EXE 与低剂量 MTX 单药和联合给药对 MCF-7/EXE 细胞的增殖抑制作用, 计算依西美坦与低剂量甲氨蝶呤联合给药时的联合指数 (CI), 评价两药间的相互作用。流式细胞术检测 IC₅₀ 浓度药物 EXE 组 (120 μmol/L)、低剂量 MTX 组 (60 nmol/L)、EXE + MTX 组处理后的 MCF-7/EXE 细胞周期变化。荧光染色观察单药及联合作用对细胞凋亡的影响。Western blot 法检测各组细胞 Bcl-2、AKT、P-AKT、COX-2 蛋白的表达情况。结果 MTT 法表明, 与单药作用相比, 联合治疗明显降低 MCF-7/EXE 细胞的活性 (CI < 0.9)。此外, EXE 和低剂量 MTX 的联合使用表现对细胞增殖的协同抑制作用, 细胞周期显著阻滞于 S 期, Western blot 法显示联合组与对照组或单个药物组相比对 P-AKT、Bcl-2、COX-2 蛋白的表达有更强的抑制作用。结论 EXE 与低剂量 MTX 联合使用时对 MCF-7/EXE 细胞产生协同抑制作用, 可逆转耐药。

关键词 依西美坦; 甲氨蝶呤; 耐药细胞; 乳腺癌

中图分类号 R 737.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)10-1404-05

2014-06-13 接收

基金项目: 安徽高校省级自然科学基金重点项目 (编号: KJ2012A157); 安徽省科技攻关项目 (编号: 13010422140); 安徽省年度重点科技计划项目 (编号: 12070403072)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院肿瘤科, 合肥 233022

²合肥市滨湖医院中心实验室, 合肥 230601

作者简介: 居伶俐, 女, 硕士研究生;

潘跃银, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yueyinpan@gmail.com

在激素受体阳性 (ER+) 乳腺癌患者中, 芳香化酶抑制剂 (AIs) 表现出很好的疗效^[1], 有研究^[2]显示 AIs 在绝经后激素反应性乳腺癌妇女的辅助内分泌治疗和解救治疗效果优于他莫昔芬。当前治疗绝经后雌激素依赖性乳腺癌患者以 AIs 作为一线治疗, 但是仍然有一半的 ER+ 乳腺癌患者治疗失败^[3]。同时, 随着药物治疗的深入, AIs 的耐药也逐渐显现。有研究^[4]表明在很多种耐药癌细胞中, COX-2 过表达是诱导多药耐药基因表达的因素, 继而产生耐药。目前 COX-2 抑制剂作为抗炎、抗风湿治疗药物, 也用于抗肿瘤治疗, 虽然先前研究^[5]显示选择性 COX-2 抑制剂取得了良好的临床疗效, 但是由于存在心血管毒性限制了其长期服用。甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX) 作为一种抗肿瘤代谢药也可用于抗炎治疗类风湿 (rheumatoid, RA), 其机制尚不明确, 有研究^[6]显示低剂量的 MTX 能够抑制体内 COX-2 的水平治疗 RA, 且长期使用是安全的, 肿瘤的内分泌治疗一般也是需要长期服药, 所以肿瘤的内分泌治疗与低剂量的 MTX 联合使用对防止内分泌治疗耐药可能有效, 该研究将探讨 AIs 耐药机制及低剂量的 MTX 如何逆转耐药。

1 材料与方法

1.1 实验材料 DMEM 培养液、胎牛血清购于美国 Hyclone 公司; 二甲基亚砜 (DMSO)、MTT、碘化丙啶 (PI)、RNase A、P-AKT 和 AKT 购于美国 Sigma 公司; Bcl-2、β-actin 抗体购于北京中杉金桥生物技术

miR-107 mimics or negative control using Lipofectamine 2000. After transfection, the expression level of miR-107 was tested by qRT-PCR. Cell proliferation was tested by methylthiazol tetrazolium (MTT) assay. Cell cycle was detected by flow cytometry. The expression level of CDK6 protein was measured by Western blot. **Results** Compared with the blank control group, the expression level of miR-107 in miR-107 mimics group was significantly increased ($P < 0.05$). In addition, the proliferation of HepG2 cells was inhibited ($P < 0.05$), G0/G1 phase cells were increased ($P < 0.05$), and the expression level of CDK6 protein was decreased ($P < 0.05$) in miR-107 mimics group. **Conclusion** These results demonstrate that miR-107 inhibits the proliferation and induces G0/G1 phase arrest in HepG2 cells, which may be related to the inhibition of CDK6 expression.

Key words hepatocellular carcinoma; miR-107; proliferation; cell cycle; CDK6