

MicroRNA-21 对胆管癌细胞侵袭与转移的影响

刘 振^{1,2}, 黄 强¹, 刘臣海¹, 林先盛¹, 谢 放^{1,2}, 朱成林^{1,2}, 任维华²

摘要 目的 探讨 microRNA-21 对胆管癌 QBC939 细胞株侵袭转移能力的作用。方法 构建合成无关序列、microRNA-21 mimics 和 microRNA-21 inhibitor 并转染至胆管癌 QBC939 细胞中。实验设自然生长组(Cell)、转染无关序列组(Cell-NC)、转染 microRNA-21 mimics 组(Cell-21M)及转染 microRNA-21 inhibitor 组(Cell-21I)。运用实时定量 RT-PCR 检测各组细胞 microRNA-21 的表达;通过黏附实验检测各组细胞聚集能力的变化;划痕实验、Transwell 迁移观察细胞迁移能力变化,Transwell 侵袭实验观察细胞侵袭能力变化。结果 与 Cell 组相比,microRNA-21 在 Cell-NC 组表达无明显差异,在 Cell-21M 组表达增加,在 Cell-21I 组表达降低。黏附实验显示:与 Cell 组相比,Cell-NC 组细胞聚集能力无明显变化,Cell-21M 组细胞聚集能力增强,Cell-21I 组细胞聚集能力减弱($P < 0.05$);划痕实验及 Transwell 迁移实验示 Cell-NC 组细胞迁移能力无明显变化,Cell-21M 组细胞迁移能力增强,Cell-21I 组细胞聚集能力减弱($P < 0.05$);Transwell 侵袭实验示 Cell-NC 组细胞侵袭能力无明显变化,Cell-21M 组细胞侵袭能力增强,Cell-21I 组细胞侵袭能力减弱($P < 0.05$)。结论 microRNA-21 可增强胆管癌 QBC939 细胞的

侵袭与转移能力 提示 microRNA-21 可能在胆管癌的侵袭转移过程中发挥重要作用。

关键词 胆管癌; microRNA-21; 侵袭; 转移

中图分类号 R 73-37

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)02-0190-04

胆管癌是起源于胆管上皮细胞的恶性肿瘤,其临床症状表现较晚,缺乏特异的肿瘤标志分子,早期诊断较为困难。目前,根治性切除虽然能使患者获得最佳疗效,但大部分肿瘤在发现时已发生侵袭转移,导致手术切除率较低,且手术复发率高,预后较差,对于放、化疗不敏感^[1]。因此,探讨胆管癌的发生、侵袭转移机制,提高胆管癌的早期诊断对临床治疗有着重要的意义。该课题组前期研究^[2]结果显示胆管癌组织中 microRNA-21 的表达明显高于癌旁组织,且与胆管癌侵袭转移密切相关。本研究通过调控 microRNA-21 在胆管癌 QBC939 细胞系中的表达,进一步探讨 microRNA-21 对胆管癌细胞株 QBC939 细胞侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 人胆管癌 QBC939 细胞株由实验室自行保存;DMEM-高糖培养基、胎牛血清、青链霉素、PBS 购自 Hyclone 公司;Opti-MEM 培养基购自 Gibco 公司。microRNA-21 mimics 由广州锐博生物科技

2013-08-27 接收

基金项目: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:刘 振,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@sohu.com

and its mechanism. **Methods** Regard lung adenocarcinoma cancer cell strains as the research object. The A549 cells were treated with different concentration of melatonin (Mel). The proliferation of A549 cells was observed by MTT assay. The change of cell morphology was observed by light microscope. The expression of MAPK related protein and OPN was analyzed by Western blot. **Results** Mel could inhibit the proliferation of A549 cells in a dose-dependent and time-dependent manner. Compared with control group, A549 cells in the group treated with Mel became lesser, more irregular, bigger intercellular gap, non-overlapping and monolayer. The Western blot analysis illustrated that 2.0mmol/L Mel could significantly decreased the expression of phosphorylation of JNK, p38 and OPN in A549 cells ($P < 0.05$), and the expression of phosphorylation of ERK was increased ($P < 0.05$), compared with control group. **Conclusion** Mel can inhibit the proliferation of A549 cells in a dose-dependent and time-dependent manner, which may be related to decrease the expression of OPN by regulating the phosphorylation level of MAPK signal pathway.

Key words melatonin; human lung adenocarcinoma A549 cell; cell proliferation; signal transduction; osteopontin

有限公司提供,序列为 8-UAGCUUAUCAGACU GAUGUUGA-29, microRNA-21 inhibitor 序列为其反向互补序列。逆转录试剂盒、PCR 试剂盒及 Lipofectamine™ RNAiMAX 购自 Invitrogen 公司; Transwell 小室购自美国 BD 公司; CCK-8 试剂盒由日本 Dojindo 同仁化学研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 QBC939 细胞接种于含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM 高糖培养基,在 5% CO₂、饱和湿度、37 °C 培养箱内常规传代培养。根据转染情况将实验分为自然生长组 (Cell)、无关序列组 (Cell-NC)、microRNA-21 mimics 转染组 (Cell-21M) 和 microRNA-21 inhibitor 转染组 (Cell-21I)。转染采用 Lipofectamine™ RNAiMAX 转染试剂,转染无关序列、microRNA-21 mimics 和 inhibitor 浓度为 50 nmol/L,转染方法参照说明书。

1.2.2 实时定量 RT-PCR 检测 转染后 36 h,收集各组细胞,检测各组细胞中 microRNA-21 的表达。运用 TRIzol 法提取总 RNA,以 U6 作为内参基因,Primer 5.0 分别设计引物,microRNA-21 上游引物序列为 ACACTCCAGCTGGGTAGCTTATCAGACTGATG,下游引物序列为 CTCAACTGGTGTCTGGA,U6 上游引物序列为 CTCGCTTCGGCAGCACA,下游引物序列为 AACGCTTCACGAATTTGCGT。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 U6 94 bp,目的片段 has-microRNA-21 72 bp。所得数据经过内参基因均一处理,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方式计算,目标基因表达差异以倍数表示。

1.2.3 黏附实验 用 96 孔板每孔加入 30 mg/L 纤连蛋白 50 μ l,制成纤连蛋白包被待用。使用前用 3% 牛血清蛋白的 PBS 液化 20 μ l 置于 37 °C 2 h 封闭。每孔加入含 10% 胎牛血清 0.5×10^6 /ml 细胞 200 μ l 培养 1.0 ~ 1.5 h 后,用 PBS 洗 2 遍。加入 CCK-8 作显色反应,通过酶标仪检测溶液吸光度值,每组设 6 个复孔。

1.2.4 划痕实验 用记号笔在 6 孔板背后均匀画横线。按每孔 1×10^6 细胞接种于 6 孔板内,用丝裂霉素处理 1 h 抑制细胞分裂。用枪头垂直于 6 孔板背后横线划痕,用 PBS 洗细胞 3 次,加入无血清培养基进行常规培养。分别于 0、6、24、48 h 时间点取样,拍照。取 8 个视野尺寸进行数据统计。迁移率 = $(1 - \text{其他时间点的距离} / 0 \text{ h 的距离}) \times 100\%$ 。

1.2.5 Transwell 侵袭和迁移实验 转染 48 h 后,消化细胞,每个 Transwell 小室铺 $1 : 8$ Matrigel 80 μ l 接种 1×10^5 个细胞,加含 100 μ l 无血清 DMEM 培养基,下室加入完全培养基,孵育 24 h 后棉签擦去上室的细胞,4% 多聚甲醛固定 15 min,结晶紫染色 10 min,显微镜下取 5 个随即视野进行拍照计数。Transwell 迁移实验不需要铺胶,孵育时间为 16 h。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件分析,所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Bonferroni 检验。

2 结果

2.1 实时定量 RT-PCR 检测 microRNA-21 在各细胞组的表达 microRNA-21 在 Cell、Cell-NC、Cell-21M、Cell-21I 组的表达分别为 1.00 ± 0.02 , 0.99 ± 0.1 , 17.57 ± 0.18 , 0.87 ± 0.06 。与 Cell 组比较,microRNA-21 在 Cell-NC 组表达无明显差异,在 Cell-21M 组表达明显增加,在 Cell-21I 组 microRNA-21 表达降低。

2.2 黏附实验 观各组细胞聚集能力 通过酶标仪显示各细胞组溶液吸光度值,Cell、Cell-NC、Cell-21M、Cell-21I 组分别为 0.76 ± 0.04 、 0.76 ± 0.03 、 0.81 ± 0.02 、 0.69 ± 0.02 。与 Cell 组比较,Cell-21M 及 Cell-21I 组差异具有统计学意义 ($F = 8.848$, $P < 0.05$),Cell-21M 组细胞聚集能力增加,而 Cell-21I 组细胞聚集能力减弱。

2.3 划痕实验 检测各组细胞迁移能力 定量分析各组细胞迁移率,Cell、Cell-NC、Cell-21M、Cell-21I 组在 0、6、24、48 h 细胞的迁移率变化见图 1。与 Cell 组相比,Cell-NC 组细胞迁移能力无明显差异,Cell-21M 组细胞迁移能力增加 ($P < 0.05$),而 Cell-21I 迁移能力下降 ($P < 0.05$)。

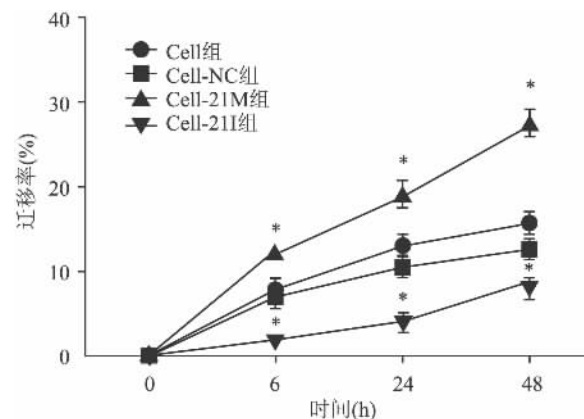


图1 划痕实验检测各组细胞迁移能力
与 Cell 组比较: * $P < 0.05$

2.4 Transwell 迁移检测各组细胞迁移能力 在显微镜下观察, Cell、Cell-NC、Cell-21M、Cell-21I 组迁移细胞计数分别为 61.88 ± 10.09 、 61.63 ± 7.71 、 76.25 ± 9.30 、 41.00 ± 9.61 , 与 Cell 组比较, Cell-21M 及 Cell-21I 组差异具有统计学意义 ($F = 19.796$, $P < 0.05$), Cell-21M 组细胞迁移能力增加, 而 Cell-21I 迁移能力下降。见图 2。

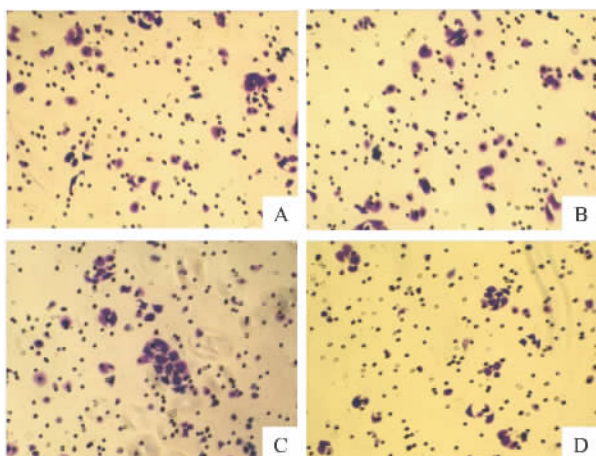


图2 Transwell 迁移实验检测各组细胞迁移能力 $\times 200$
A: Cell 组; B: Cell-NC 组; C: Cell-21M 组; D: Cell-21I 组

2.5 Transwell 侵袭实验检测各组细胞侵袭能力 在显微镜下观察, Cell、Cell-NC、Cell-21M、Cell-21I 组侵袭细胞计数分别为 169.17 ± 36.03 、 161.83 ± 23.92 、 223.67 ± 17.57 、 117.17 ± 16.55 。与 Cell 组比较, Cell-21M 及 Cell-21I 组差异具有统计学意义 ($F = 18.661$, $P < 0.05$), Cell-21M 组细胞侵袭能力增加, 而 Cell-21I 侵袭能力下降。见图 3。

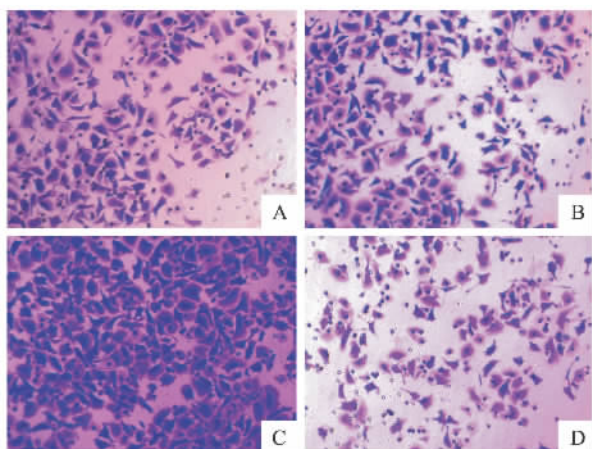


图3 Transwell 侵袭实验检测各组细胞侵袭能力 $\times 200$
A: Cell 组; B: Cell-NC 组; C: Cell-21M 组; D: Cell-21I 组

3 讨论

MicroRNAs 是一类非编码、高度保守的短小单链 RNA, 能够在转录后水平同靶基因 mRNA 3' 非编码端 (3'-UTR) 结合, 阻止靶基因 mRNA 的翻译或者诱导其降解, 以此调控靶基因的表达进而影响生物学进程^[3]。研究^[4-5]表明: microRNAs 作为原癌基因或者抑癌基因在肿瘤的发生发展中起到重要的作用, 且部分 microRNAs 已被人们作为肿瘤靶向治疗的靶点进行更深层的研究。其中, microRNA-21 在胃癌、结肠癌、肝癌、前列腺癌等多种实体肿瘤中均处于高表达, 并且能够促进多种肿瘤的侵袭与转移^[6-10]。但 microRNA-21 在胆管癌中研究较少, 结合课题组前期在胆管癌组织中的研究结果, 本研究中在细胞学中进一步探讨了 microRNA-21 对胆管癌的侵袭转移的影响。实验中, 通过向胆管癌 QBC939 细胞转染 microRNA-21 mimics 和 inhibitor, 成功上调和下调了 microRNA-21 的表达。然后运用黏附试验、划痕实验和 Transwell 侵袭及迁移实验来探讨 microRNA-21 对胆管癌侵袭转移的影响。结果表明: 上调 microRNA-21 的表达后, QBC939 细胞的聚集能力、侵袭与迁移能力均升高; 下调 microRNA-21 的表达后, QBC939 细胞的聚集能力、侵袭与迁移能力均降低。说明 microRNA-21 能够促进胆管癌的侵袭转移, 同在其他实体肿瘤中研究^[6-10]结果一致。

目前研究^[11]认为: 肿瘤侵袭与转移是一个多步骤的过程, 首先肿瘤细胞之间黏附降低, 依赖与周围基质的黏附能力、细胞骨架的伸缩能力和对细胞外基质的重构进行移动, 然后突破基底膜, 进入循环系统, 经免疫逃避, 发生远处转移。通过实验笔者得出, microRNA-21 在胆管癌侵袭转移的多个环节中都发挥作用, 能够增强 QBC939 细胞对周围组织的黏附能力、侵袭能力和向远处的迁移能力, 故此 microRNA-21 表达增高后, 能够促进胆管癌 QBC939 细胞的侵袭转移, 而 microRNA-21 表达降低后, 抑制 QBC939 细胞的侵袭转移。该实验虽然证实了 microRNA-21 能够增强胆管癌细胞的聚集、侵袭与迁移能力, 但细胞之间的黏附能力降低也是肿瘤侵袭转移的重要环节, 故此 microRNA-21 对胆管癌细胞之间的黏附有无影响需要进一步探讨。目前认为, 上皮间质转化 (epithelial to mesenchymal transition, EMT) 能够降低细胞之间的黏附^[12]而增加细胞的移动能力, 因此探讨 microRNA-21 能否影响胆管癌细

胞 EMT 的发生需要进一步的实验论证。

参考文献

- [1] Friman S. Cholangiocarcinoma-current treatment options [J]. *Scand J Surg*, 2011, 100(1): 30-4.
- [2] 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.
- [3] Schanen B C, Li X. Transcriptional regulation of mammalian miRNA genes[J]. *Genomics*, 2011, 97(1): 1-6.
- [4] Jansson M D, Lund A H. MicroRNA and cancer[J]. *Mol Oncol*, 2012, 6(6): 590-610.
- [5] 项茹, 吴正升, 张晴, 等. miR-133a 在乳腺癌组织中的表达及其临床意义[J]. *安徽医科大学学报* 2011, 46(2): 109-12.
- [6] Hiyoshi Y, Kamohara H. MicroRNA-21 regulates the proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(6): 1915-22.
- [7] Li T, Li D, Sha J, Sun P, et al. MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 383(3): 280-5.
- [8] Zhang J G, Wang J J, Zhao F. MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *Clin Chim Acta*, 2010, 411(11-12): 846-52.
- [9] 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.
- [10] Negrini M, Gramantieri L, Sabbioni S, et al. microRNA involvement in hepatocellular carcinoma [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2011, 11(6): 500-21.
- [11] Friedl P, Locker J, Sahai E, et al. Classifying collective cancer cell invasion [J]. *Nat Cell Biol* 2012, 14(8): 777-8.
- [12] Abdulla T, Luna-Zurita L, de la Pompa J L, et al. Epithelial to mesenchymal transition-the roles of cell morphology, labile adhesion and junctional coupling [J]. *Comput Methods Programs Biomed* 2013, 111(2): 435-46.

Effect of microRNA-21 on invasion and metastasis of cholangiocarcinoma

Liu Zhen^{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 detect the effects of microRNA-21 on invasion and metastasis of cholangiocarcinoma QBC939 cells. **Methods** MicroRNA-21 scramble, mimics and inhibitor were constructed and transfected into QBC939 cells. The blank control group (Cell), negative control group (Cell-NC), microRNA-21 mimics group (Cell-21M) and microRNA-21 inhibitor group (Cell-21I) were designed in this study. The expression of microRNA-21 was examined by real-time RT-PCR. Then adhesion experiment was used to examine aggregation capability. Wound healing experiment and transwell migration experiment were used to investigate the migration capability. Transwell invasion experiment was used to investigate the invasion capability of cells in each group. **Results** Comparing with Cell, the expression of microRNA-21 in Cell-21M was added and in Cell-21I was reduced. Adhesion experiment showed that aggregation capability of cells in Cell-21M was increased and in Cell-21I decreased ($P < 0.05$). Wound healing experiment and transwell migration experiment showed that migration capability of cells in Cell-21M was increased and in Cell-21I decreased ($P < 0.05$). Transwell invasion experiment showed that invasion capability of cells in Cell-21M was increased and in Cell-21I decreased ($P < 0.05$). All the results had no different significance in Cell-NC. **Conclusion** MicroRNA-21 can promote the invasion and metastasis of cholangiocarcinoma QBC939 cells, which suggest that microRNA-21 may play a vital role in the process of invasion and metastasis of cholangiocarcinoma.

Key words cholangiocarcinoma; microRNA-21; metastasis; invasion