

反义 miR-21 对荷人宫颈鳞癌裸鼠移植瘤生长和凋亡的影响

王晓玫 许静 成志强 彭全洲 胡锦涛 高利昆 张石芬

【摘要】 目的 构建荷人宫颈鳞癌裸鼠移植瘤模型,探讨干扰 miR-21 表达对移植瘤生长、凋亡的影响。方法 将人工合成的反义寡核苷酸 ASODN(AS-miR-21)转染 SiHa 细胞(抑制组),同时设阴性对照组和空白对照组,对数生长期的 SiHa 细胞分别接种于裸鼠皮下,绘制肿瘤生长曲线并计算肿瘤生长率。当肿瘤体积达 0.2 cm^3 时采用 AS-miR-21 多点瘤周注射,观察其对移植瘤的影响。应用免疫组化技术、荧光 TUNEL 检测移植瘤细胞增殖活性和凋亡情况。结果 (1)成功构建人宫颈鳞癌裸鼠皮下移植瘤模型,抑制组、阴性对照组及空白对照组成瘤率分别为 37.5%、75.0%、100.0%,瘤体平均体积为 $(732.80 \pm 56.32)\text{ mm}^3$ 、 $(1228.46 \pm 78.53)\text{ mm}^3$ 、 $(1301.26 \pm 80.63)\text{ mm}^3$,平均生长率为 18.32%、30.71% 和 32.53%,瘤重为 $(0.73 \pm 0.05)\text{ g}$ 、 $(1.26 \pm 0.12)\text{ g}$ 和 $(1.35 \pm 0.25)\text{ g}$,抑制组与阴性、空白对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$);(2)免疫组化显示抑制组裸鼠瘤体 Ki67 表达显著下降;荧光 TUNEL 凋亡检测显示抑制组裸鼠肿瘤细胞凋亡率明显增多;(3)注射治疗剂量 AS-miR-21 两周后观察肿瘤组织局部坏死严重,胞核裂解、消失,凋亡明显增加。结论 AS-miR-21 可下调裸鼠人宫颈鳞癌移植瘤中 miR-21 的表达,抑制移植瘤生长和促进其凋亡。

【关键词】 微 RNAs; 宫颈肿瘤; 寡核苷酸类,反义; SiHa 细胞; 裸鼠

Effect of miR-21 antisense oligonucleotide on growth and apoptosis of human cervical squamous carcinoma xenograft in nude mice WANG Xiao-mei, XU Jing, CHENG Zhi-qiang, PENG Quan-zhou, HU Jin-tao, GAO Li-kun, ZHANG Shi-fen. Department of Pathology, The Second Affiliated Hospital, Jinan University/Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020, China

Corresponding author: WANG Xiao-mei, Email: okmai98@yahoo.com.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate whether miR-21 antisense oligonucleotide can decrease the cervical carcinoma xenograft formation rate and inhibit growth of xenograft in nude mice. **Methods** Human cervical squamous cancer cell line SiHa cells transfected with antisense miR-21 were subcutaneously injected into the back of nude mice and grew to tumor nodules. The Negative control and blank control were established as well. The formation rate and volume of the tumors were measured and the tumor growth rates were calculated. Arounding tumor multipoint injection of antisense oligonucleotide was performed. The inhibitory effect of miR-21 antisense oligonucleotide on tumor growth was evaluated by tumor growth curves and immunohistochemistry (IHC). HE staining was used to see the changes of tumor tissues, and Fluorometric TUNEL System for the apoptosis of tissues. **Results** The nude mouse model of human cervical cancer xenograft tumor was constructed successfully. The tumor growth curves demonstrated that the growth of cells transfected with antisense miR-21 was significantly inhibited. The average tumor weight in miR-21 inhibitor group, miR-21 negative inhibitor group and SiHa cell blank control group was $(0.73 \pm 0.05)\text{ g}$, $(1.26 \pm 0.12)\text{ g}$ and $(1.35 \pm 0.25)\text{ g}$. The xenograft formation rate was 37.5%, 75% and 100%, respectively. The average tumor volume was $(732.8 \pm 56.32)\text{ mm}^3$, $(1228.46 \pm 78.53)\text{ mm}^3$ and $(1301.26 \pm 80.63)\text{ mm}^3$. The growth rate was 18.32%, 30.71% and 32.53%. miR-21 inhibitor group were positive, and the volume and the weight of tumor was statistically smaller than that of the control groups ($P < 0.05$). IHC showed that the expression of Ki67 were decreased significantly compared with other groups. Extensive dead tumor cells were seen in the miR-21 inhibitor group, and remarkable apoptosis was shown by Fluorometric TUNEL System. **Conclusions** Studies of *in vivo* experiment demonstrate that antisense miR-21 inhibites the expression of miR-21, increases the apoptosis of tumor cells and inhibites the tumor growth.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.05.022

基金项目: 深圳市科技计划项目(200902030)

作者单位: 518020 广东省,暨南大学第二临床医学院深圳市人民医院病理科

通讯作者: 王晓玫, Email: okmai98@yahoo.com.cn

【Key words】 MicroRNAs; Uterine cervical neoplasms; Oligonucleotides, antisense; SiHa cell;

Nude mice

近年研究表明,miRNAs异常表达与恶性肿瘤发生密切相关,为肿瘤发生机制研究提供了新思路^[1]。宫颈癌是女性常见生殖道恶性肿瘤之一,随着人类乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染率上升和社会生活水平的提高,宫颈癌发病率呈逐年增高趋势,且明显趋于年轻化。运用基因芯片技术研究发现 miR-21 在多种肿瘤组织中呈高表达,高 HPV16 感染与 miR-21 基因位点高度相关,在宫颈癌中的作用机制尚不清楚。本课题组前期研究工作已经证实,miR-21 反义寡核苷酸在体外具有抑制宫颈鳞癌 SiHa 细胞增殖活性和诱导凋亡的作用。为进一步探讨 miR-21 在生物体内的生物学效应,本研究应用反义寡核苷酸技术敲低宫颈癌 SiHa 细胞中 miR-21 表达,建立人宫颈癌荷瘤裸鼠模型观察成瘤情况,探讨移植瘤的生长、细胞凋亡状况,为 miR-21 反义寡核苷酸应用于宫颈癌基因治疗提供理论依据。

材料与方 法

一、材料

1. 细胞系:人宫颈鳞癌细胞株由本研究室提供,细胞培养用含 10% FBS RPMI-1640 于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养传代。

2. 实验动物来源和饲养条件:4~5 周龄 BLBA/c-nu/nu 雌性裸小鼠购自广东省实验动物中心,实验动物质量合格证号:SCXK(粤)2008-0002,每只体重约 17 g,共 24 只,饲养于深圳市人民医院 SPF 级动物实验室。

3. 主要试剂:新生胎牛血清(杭州四季青生物公司),RPMI-1640 培养基(Gibco),0.25% 胰蛋白酶、Lipofectamine 2000 和 OPTI-MEMI 无血清培养基(Invitrogen 公司),荧光 TUNEL 检测试剂盒(Promega);免疫组化 MaxVision™ 试剂盒、苏木精、核固红(MAIXIN BiO)。

二、方法

1. 构建荷人宫颈癌裸鼠皮下移植瘤模型:将宫颈癌 SiHa 细胞株接种于 6 孔板内,每孔细胞数约 5×10^4 个,培养过夜使细胞至 70% 融合度,每孔转染剂量为:5 μl Lipofectamine™ 2000, 100 pmol miR-21 抑制剂 ASODN,严格按照 Lipofectamine™ 2000 说明书操作方法和步骤用无血清 OPTI-MEMI 稀释混匀,孵化后转染于 SiHa 细胞 6 h 后,PBS 洗 1 遍,更换含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基继续培养 48 h。BALB/c-nu/nu 裸鼠 24 只,随机数表法分为 3 组,每组 8 只。取对数生长期的 miR-21 抑制组、miR-21 阴性对照组和未转染组

SiHa 细胞,经 0.25% 的胰酶消化,PBS 洗细胞两次,1000 r/min 离心 5 min 并计数,重悬于 OPTI-MEMI 无血清培养基中,调整细胞浓度为 1×10^5 细胞/ml,按 0.2 ml/只分别接种于裸鼠背部皮下,构建人宫颈癌裸鼠皮下移植瘤模型。

2. miR-21 反义寡核苷酸对人宫颈癌裸鼠皮下移植瘤生长的影响:每天观察裸鼠一般状况,每 3 d 用游标卡尺测量肿瘤短径(a)及长径(b),取各组长短径平均值,按公式 $a^2b/2$ 计算肿瘤体积(V)。并将成瘤裸鼠再分为 2 个组进行后续实验。A 组:观察 miR-21 抑制剂 ASODN 对人宫颈癌裸鼠皮下移植瘤生长和凋亡的影响,60 d 后处死裸鼠,取出肿瘤称重,并取肝、肺、脾、肾等组织观察肿瘤转移情况;B 组:待瘤体长至 0.2 cm³ 时瘤周多点注射 miR-21 抑制剂 ASODN,每隔 2 日 1 次,共 3 次,14 d 后观察对肿瘤的影响,治疗结束后颈椎脱臼法处死裸鼠观察并取出移植瘤称其瘤重,绘制肿瘤生长曲线并计算肿瘤生长抑制率,肿瘤生长抑制率 = $1 - (\text{实验组平均瘤重} / \text{空白对照组平均瘤重}) \times 100\%$ 。

3. 移植瘤的组织形态学观察:各组肿瘤组织经 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋、切片,常规二甲苯脱蜡,PBS 浸洗 3 min,苏木精染色 10 min,自来水冲洗 1 min,0.5% 盐酸酒精液分化 10 s,自来水冲洗 5 min,1% 伊红液染色 10 min,自来水冲洗 15 min。常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察并拍照。

4. 移植瘤细胞的增殖活性与结果判断:按照免疫组化 MaxVision™ 试剂盒说明书操作,取正常非瘤组织作对照。各组裸鼠移植瘤组织石蜡切片常规脱蜡至水,3% 双氧水 50 μl 滴加于组织上孵育 10 min,0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)进行抗原修复,室温下孵育一抗鼠抗人 Ki67 单克隆抗体,稀释比例为 1:800,二抗为羊抗鼠 IgG。实验过程中以无关抗体代替一抗作阴性对照,以 0.01 mol/L PBS 代替一抗作空白对照,以已知阳性染色作阳性对照。免疫组化 Ki67 阳性结果判定标准:阳性细胞为肿瘤细胞核呈棕黄色颗粒的阳性反应产物,每张切片随机选 5 个高倍视野,计数 100 个肿瘤细胞,计算阳性表达细胞数占全部细胞总数的百分率,即阳性表达百分率。Ki67 阳性细胞数所占比例分为 <30% (-);30%~40% (+);41%~50% (++);>51% (+++)。

5. 移植瘤细胞的凋亡检测与判定标准:石蜡切片常规脱蜡至水,蒸馏水洗,蛋白酶 K 消化,按荧光

TUNEL 检测试剂盒说明书进行操作。用 DNase I 处理过的肿瘤组织切片作为阳性对照,用不含末端脱氧核糖苷酸转移酶(rTdT Enzyme)试剂2(脱氧核苷酸混合物)代替 TUNEL 反应混合物作为阴性对照。

结果判定是以核阳性为判定标准,荧光显微镜下观察 DAPI 使细胞核呈现蓝色,Fluorescein-12-dUTP 使肿瘤组织中发生凋亡的细胞在 560 nm 激发光下呈现绿色荧光。结合 HE 染色,排除严重坏死区域,对 HE 染色证实为坏死的细胞不计数,随机观察 10 个高倍视野,每个视野连续计数 100 个细胞的凋亡细胞数,以平均数为凋亡指数(apoptotic index, AI)。

6. 统计学分析:实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 统计软件分析数据,多组间差异采用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD 法,计数资料用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

结 果

1. 宫颈鳞癌 SiHa 细胞裸鼠皮下移植情况:以皮下瘤结节体积达 100 mm^3 为成瘤标准,成功构建荷人宫颈鳞癌裸鼠皮下移植瘤模型,观察裸鼠一般状况良好,平均 7 d 后裸鼠背部皮下出现瘤结节,直径 0.2 ~ 0.3 cm, miR-21 抑制组(8 只)裸鼠皮下注射肿瘤细胞 4 周后,3 只裸鼠成瘤;阴性对照组(8 只)中有 6 只成瘤,空白对照组 8 只均成瘤,成瘤率分别为 37.5%、75.0%、100.0%,8 周左右肿瘤平均长至约 0.8 cm 大小,接种点无红肿破溃,且随时间增加而增大,无自发消退现象。miR-21 抑制组肿瘤生长缓慢,40 d 后肿瘤体积明显小于对照组($P < 0.05$),在每个时间检测点均明显小于空白对照组和阴性对照组,空白对照组与阴性对照组相比,裸鼠体积差异无显著性($P > 0.05$,图 1)。

2. AS-miR-21 抑制裸鼠皮下移植瘤的生长:miR-21 抑制组肿瘤平均体积、平均生长率、平均重量均明显小于 SiHa 空白对照组和阴性对照组,且差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1),而空白对照组和阴性对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。注射治疗剂量 miR-21 反义寡核苷酸两周后部分裸鼠瘤体出现溃烂坏死,裸鼠无死亡。结果说明 miR-21 反义寡核苷酸可抑制人宫颈癌裸鼠皮下移植瘤的生长。

表 1 各组瘤体的平均体积、平均生长率和平均瘤体重量比较

组别	肿瘤平均体积 ($\text{mm}^3, \bar{x} \pm s$)	肿瘤平均 生长率(%)	肿瘤平均重量 (g, $\bar{x} \pm s$)
miR-21 抑制组	732.80 ± 56.32	18.32	0.73 ± 0.05
阴性对照组	1228.46 ± 78.53	30.71	1.26 ± 0.12
空白对照组	1301.26 ± 80.63	32.53	1.35 ± 0.25

注:抑制组与两对照组相比, P 均 < 0.05

光学显微镜下观察肿瘤细胞异形性明显,细胞大小不一,形状各异,核大、质少,核浆比例失调,核仁清楚,核膜清晰,核染色较深,可见大量病理性核分裂象,呈低分化鳞癌表现。成瘤组肿瘤经 AS-miR-21 治疗两周后,镜下观察可见肿瘤组织中有大片状坏死区,细胞形态结构模糊不清,胞核裂解、消失(图 2)。

3. 移植瘤增殖活性和凋亡状态观察:免疫组化 SP 法染色后观察发现,肿瘤细胞核呈深棕黄色, Ki67 增殖指数高,各组移植瘤均呈现高的增殖活性,提示肿瘤恶性程度高。Ki67 阳性表达百分率 miR-21 抑制组(42%, + +)和 miR-21 反义寡核苷酸治疗组(33%, +)均明显低于 SiHa 空白对照组(95%, + + +)和阴性对照组(90%, + + +)($P < 0.05$,图 3)。

荧光显微镜下观察结果表明,肿瘤组织切片中肿瘤细胞核被 DAPI 染色呈蓝色荧光,凋亡细胞 TUNEL 阳性信号为黄绿色,位于胞核,呈圆形;在正常组织中,阳性细胞少见,在肿瘤组织中,阳性细胞呈散在分布或成簇分布;DNase I 处理的阳性对照片为阳性,阴性对照为阴性;进行连续切片对照 HE 染色, TUNEL 阳性细胞在形态学上表现为凋亡的细胞。

miR-21 抑制组 AI 值(18.29 ± 0.97)明显高于空白对照组 AI 值(2.56 ± 0.62),差异有统计学意义($P < 0.05$,图 4)。

讨 论

MicroRNA(miRNA)作为真核生物体内一种小分子非编码 RNA,其成熟体在细胞核中参与 RNA 诱导的基因沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)的形成,与靶 mRNA 结合,降解靶 mRNA 或抑制翻译,从而在转录后水平调控基因表达^[2]。研究发现 miRNAs 可直接参与人类肿瘤如肺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、神经肿瘤、结直肠癌及淋巴瘤等的形成。在癌组织和正常组织之间的表达有明显差异,有证据显示 miRNA 可作为癌基因或抑癌基因发挥功能,参与肿瘤细胞增殖和凋亡过程^[3-4]。宫颈癌是女性生殖系统的高发恶性肿瘤,其发生机制仍不十分清楚,研究最多的是其与 HPV 的相关性,最近研究报道的 miRNA 与高危型 HPV16 感染的宫颈癌发生机制上存在高度相关位点。miR-21 在不同肿瘤中呈差异性表达,可作为癌基因在肿瘤发生机制上起关键作用^[5-7]。研究发现 miR-21 基因位点位于脆性位点 FBA17B 区域,此区域正好为 HPV16 在 17q23.2 处的整合位点^[8]。HPV 整合进入宿主细胞可导致多种遗传学改变,并可以引起表观遗传学改变,我们可以推测细胞内位于 HPV 整合位点或邻近 HPV 整合位点处的 miRNA 基因表达异常可能

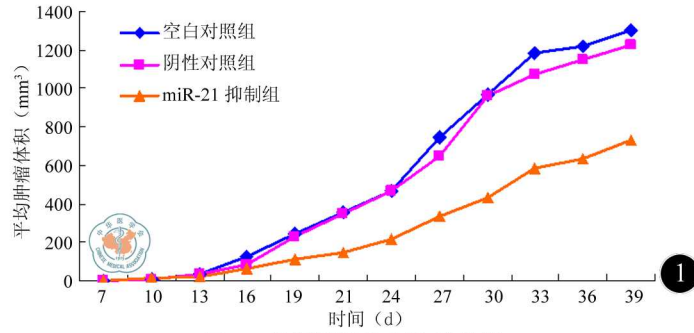


图1 各组裸鼠肿瘤生长曲线

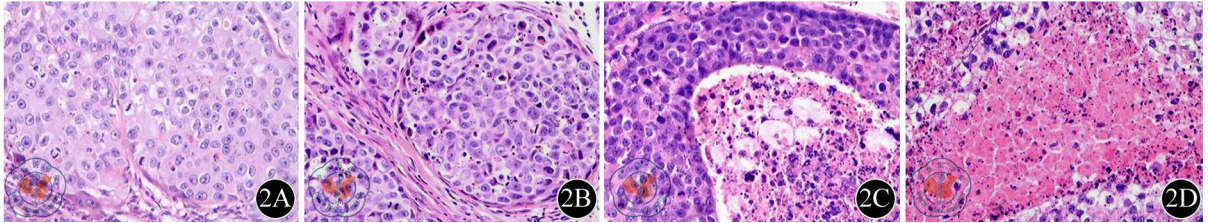


图2 各组裸鼠移植瘤组织 (HE ×400)。2A: SiHa细胞成瘤空白对照组; 2B: 阴性对照组; 2C: miR-21 抑制组; 2D: miR-21反义寡核苷酸治疗组

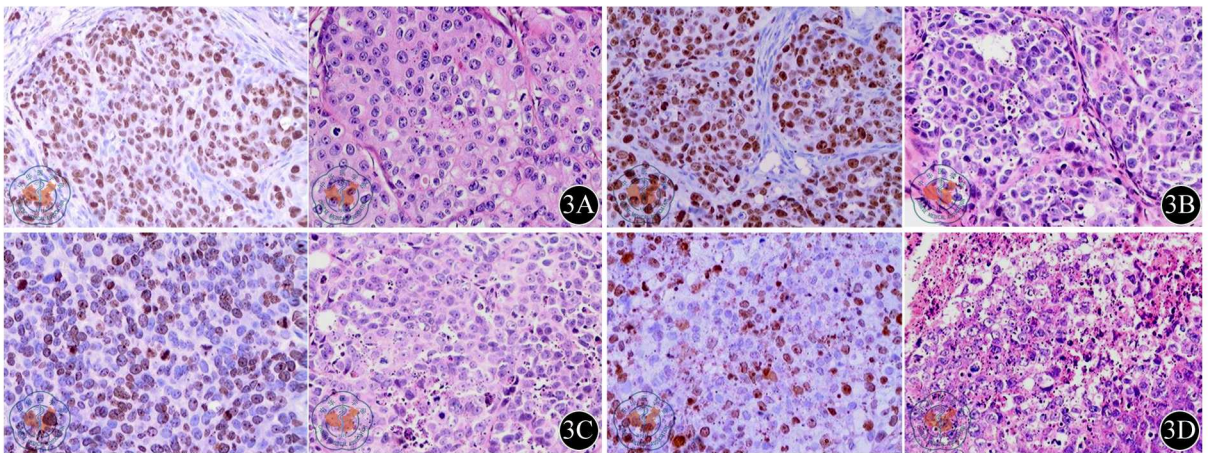


图3 各组裸鼠移植瘤组织中Ki67的表达 (SP ×400)。3A: SiHa空白对照组; 3B: 阴性对照组; 3C: miR-21 抑制组; 3D: miR-21反义寡核苷酸治疗组

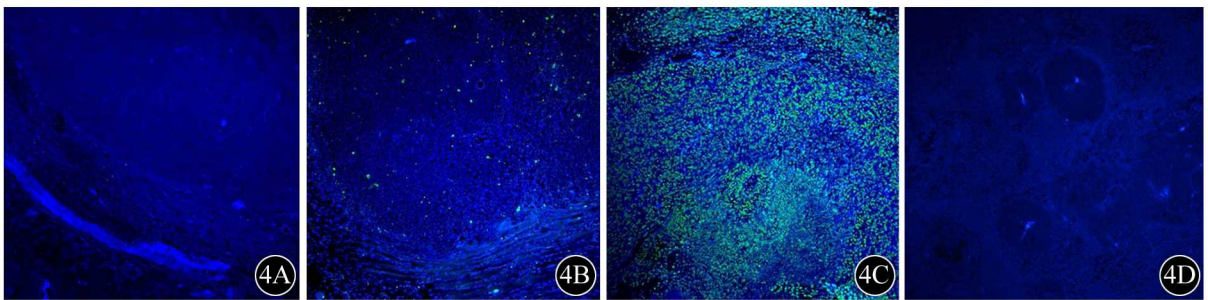


图4 各组裸鼠移植瘤组织TUNEL检测结果 (×200)。4A: SiHa空白对照组; 4B: miR-21抑制组; 4C: 阳性对照组; 4D: 阴性对照组

会导致细胞的表型发生改变,从而参与肿瘤的生成。

本实验采用 BALB/c 裸鼠能使移植瘤在动物体内较短时间内成瘤,保持与人肿瘤高度相似的形态和功能。有研究将与胆固醇结合的合成反义寡核苷酸注入小鼠体内可以有效抑制多种器官内的 miRNAs 活性。针对 mRNA 特定区段的反义寡核苷酸 (antisense oli-

godeoxynucleotides, ASODN) 在生物体内发挥有效的抑制作用实现其在肿瘤分子生物学技术方面的应用^[9-12]。

本课题组前期研究工作中应用 miRNA 检测技术筛查了 12 例 HPV 阳性宫颈鳞癌组织与癌旁正常组织的 miR-21 表达情况,提示在 HPV 阳性宫颈鳞癌组织中 miR-21 呈现高表达状态;本研究选择在宫颈癌组织和

宫颈癌细胞中高表达且上调最多的 miR-21, 通过合成其反义寡核苷酸转染敲低细胞中 miR-21 的表达, 在体外细胞实验中发现人工合成的 miR-21 反义寡核苷酸具有体外抑制宫颈鳞癌 SiHa 细胞的增殖并诱导凋亡的作用, 提示 miR-21 可能在宫颈癌发生中发挥癌基因作用, 为将来通过调控 miRNAs 的表达治疗肿瘤提供新思路。研究首先用培养的细胞分别建立了荷人宫颈癌裸鼠皮下移植瘤模型观察各组裸鼠成瘤情况, 检测和比较各组移植瘤增殖活性及肿瘤细胞凋亡状况, 观察 AS-miR-21 对人宫颈癌裸鼠皮下移植瘤的影响, 了解 miR-21 在体内的生物学效应。

由实验显示接种 AS-miR-21 于裸鼠, 能够使裸鼠皮下的人宫颈鳞癌瘤体明显小于阴性对照组和 SiHa 空白组, 三组成瘤率分别为 37.5%、75.0% 和 100.0%, 说明 AS-miR-21 对肿瘤生长有明显抑制作用。测量三组裸鼠瘤重, miR-21 抑制组明显小于阴性对照组和 SiHa 空白组的瘤重, 分别为 $(0.73 \pm 0.05) \text{ g}$, $(1.26 \pm 0.12) \text{ g}$ 和 $(1.35 \pm 0.25) \text{ g}$, 差异有显著意义 ($P < 0.05$), 空白对照组和阴性对照组间无明显差异 ($P > 0.05$), 病理组织学显示: 肿瘤细胞呈低分化鳞癌形态, 部分区域有坏死。免疫组化 Ki67(+) 主要用于判断细胞的增殖活性, 其增殖指数高低与肿瘤分化程度、浸润转移以及预后有关, miR-21 抑制组和反义寡核苷酸裸鼠瘤体 Ki67 较其他两组相比显著下降, 说明增殖活性降低。瘤周注射反义寡核苷酸的裸鼠在观察期均未见消瘦、出血、食欲缺乏等副作用, 对药物耐受良好。荧光标记 TUNEL 检测系统结合形态学方法, 对石蜡包埋组织切片进行原位染色, 在荧光显微镜下准确反映肿瘤细胞凋亡特征, 显示: miR-21 抑制组移植瘤发生凋亡数量明显增多。观察注射治疗剂量 AS-miR-21 两周后肿瘤局部坏死严重, 胞核裂解、消失, 凋亡明显增加。

综上所述, 本研究揭示 miR-21 反义寡核苷酸对荷人宫颈癌裸鼠移植瘤的生长具有抑制作用, 能在一定

程度上诱导肿瘤细胞凋亡。

参 考 文 献

- [1] Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 2257-2261.
- [2] Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*, 2004, 304: 594-596.
- [3] Cho WC. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer*, 2007, 25: 60.
- [4] Wang Y, Lee CG. MicroRNA and cancer-focus on apoptosis. *Cell Mol Med*, 2009, 13: 12-23.
- [5] Selcuklu SD, Donoghue MT, Spillane C. miR-21 as a key regulator of oncogenic processes. *Biochem Soc Trans*, 2009, 37: 918-925.
- [6] Yue J, Sheng Y, Ren A, et al. A miR-21 hairpin structure-based gene knockdown vector. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 394: 667-672.
- [7] Wang X, Tang S, Le SY. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PLoS ONE*, 2008, 3: e2557.
- [8] Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, et al. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene*, 2003, 22: 1225.
- [9] Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, et al. Silencing of microRNAs in vivo with antagomirs. *Nature*, 2005, 438: 685-689.
- [10] Davis S, Lollo B, Freier S. Improved targeting of miRNA with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: 2294-2304.
- [11] Lu Y, Xiao J, Lin H. A single anti-microRNA antisense oligodeoxyribonucleotide (AMO) targeting multiple microRNAs offers an improved approach for microRNA interference. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: e24.
- [12] Mei M, Ren Y, Zhou X, et al. Downregulation of miR-21 enhances chemotherapeutic effect of taxol in breast carcinoma cells. *Technol Cancer Res Treat*, 2010, 9: 77-86.

(收稿日期: 2011-10-09)

(本文编辑: 戚红丹)