

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.02.016

· 短篇论著 ·

miRNA-21 调节 PTEN 表达影响宫颈癌 HeLa 细胞的生物学行为

MiRNA-21 affect the biological behavior of cervical cancer HeLa cells by regulating the expression of PTEN

张花, 潘莹, 孙力, 何全中, 尹宝靛(新乡医学院第三附属医院妇产科, 河南新乡 453000)

[摘要] 目的:探讨抑制 miRNA-21 表达对宫颈癌 HeLa 细胞中 PTEN 的表达及细胞增殖、侵袭能力的影响。方法:以脂质体介导 anti-miRNA-21(anti-miRNA-21 转染组)、anti-miRNA-21-neg(阴性对照组)转染 HeLa 细胞,同时设空白对照组(未转染组)。应用 Real-time PCR 技术检测 3 组细胞中 miRNA-21 的表达,Western blotting 检测 3 组细胞中 PTEN 的表达,MTT 法检测 3 组细胞的增殖能力,Transwell 实验检测 3 组细胞的侵袭能力。结果:Anti-miR-21 转染组与阴性对照组相比,HeLa 细胞中 miRNA-21 的表达量明显降低[(0.187 ± 0.027) vs (0.861 ± 0.144) , $P < 0.01$]。转染 anti-miRNA-21 96 h 后,HeLa 细胞增殖抑制率明显升高[$(49.44 \pm 1.97)\%$ vs $(4.36 \pm 0.64)\%$, $P < 0.01$]。Anti-miR-21 转染组与阴性、空白对照相比,HeLa 细胞的侵袭细胞数明显减少[(29.4 ± 2.1) vs (40.4 ± 2.9) , (41.2 ± 2.6) 个,均 $P < 0.01$];PTEN 蛋白的表达则明显增加[(1766.00 ± 35.56) vs (726.00 ± 5.48) , (729.25 ± 17.73) , 均 $P < 0.01$]。结论:抑制 miRNA-21 的表达后,宫颈癌 HeLa 细胞增殖、侵袭能力明显下降,其机制可能与上调 PTEN 的表达有一定关系。

[关键词] miRNA-21;宫颈癌;HeLa 细胞;PTEN**[中图分类号]** R737.33; R730.59**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-385X(2014)02-0207-03

宫颈癌是影响女性健康的重要疾病之一,近年来其发病率逐年增加并呈现年轻化趋势^[1]。研究^[2]显示 miRNA-21 在宫颈腺癌细胞中过表达,促进细胞恶性增殖,且可以抑制抑癌基因程序性细胞死亡因子 4(programmed cell death 4, PDCD4)的表达。张力蛋白同源 10 号染色体缺失的磷酸酶(phosphatase and tension homology deleted on chromosome ten, PTEN)基因是具有磷酸酶活性的抑癌基因,该基因的突变失活与人类多数恶性肿瘤的发生、发展及转移密切相关^[3]。研究显示,PTEN 是 miRNA-21 的靶蛋白之一,在胃癌^[4]、非小细胞性肺癌^[5]、结直肠癌^[6]中均有明显表达。本课题探讨特异性抑制宫颈癌 HeLa 细胞中 miRNA-21 的表达后,瘤细胞增殖、侵袭能力和 PTEN 表达的变化,分析 HeLa 细胞中 miRNA-21 和 PTEN 的相关性。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

宫颈癌 HeLa 细胞购自北京协和医科大学细胞中心。anti-miRNA-21、anti-miRNA-21-neg 购自上海吉玛公司,脂质体 2000 购自 Invitrogen 公司,PTEN 抗体购自 Prosci 公司,Tubulin 抗体购自中杉公司。

1.2 siRNA 转染 HeLa 细胞

本实验共分三组:anti-miRNA-21 转染组、阴性对照组(anti-miRNA-21-neg 转染组)和空白对照组

(未转染组)。

HeLa 细胞培养于 10% 胎牛血清 RPMI-1640 细胞培养基中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。取对数生长期细胞,以 $(0.5 \sim 2) \times 10^5$ 个/孔接种于 24 孔板中。参照 LipofectaminTM2000 试剂说明转染 HeLa 细胞,继续培养 48 h。

1.3 Real-time PCR 检测细胞中 miRNA-21 的表达

常规消化收集转染 48 h 后的 HeLa 细胞,提取细胞总 RNA,Real-time PCR 法检测各组细胞中 miRNA-21 的表达。循环参数:预变性 95 °C 10 min,变性 95 °C 15 s,退火/延伸 60 °C 1 min,45 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示转染后细胞中 miRNA-21 表达量相对于转染前的变化倍数。

1.4 MTT 法检测转染 anti-miRNA-21 前后 HeLa 细胞增殖能力的变化

收集对数生长期细胞,按 5×10^3 个/孔的密度

[基金项目] 新乡医学院研究生科研创新支持计划资助项目(No. YJSCX201124Y)。Project supported by the Postgraduate Scientific Research Innovation Support Plan of Xinxiang Medical College (No. YJSCX201124Y)

[作者简介] 张花(1987-),女,河南省新乡市人,硕士,住院医师,主要从事宫颈癌生物治疗的基础及临床研究。E-mail: zhang.hua19871013@163.com

[通信作者] 潘莹(Pan Ying, Corresponding author), E-mail: panying@xxmu.edu.cn

接种于96孔板中,常规转染 anti-miRNA-21 及 anti-miRNA-21-neg 后,分别于转染后 24、48、72、96 h 在各孔中加入 20 μl MTT 溶液(5 mg/ml),继续培养 4 h 后,在各孔中依次加入 150 μl DMSO (二甲基亚砜),同时设置空白对照组(细胞、培养基、MTT、DMSO)和调零孔(培养基、MTT、DMSO),用酶联免疫检测仪于 490 nm 处测定各孔的光密度(D)值。细胞生长抑制率(%)=[1-(转染组 D 值/空白对照组 D 值)]×100%。

1.5 Transwell 法检测转染 anti-miRNA-21 后 HeLa 细胞的侵袭能力

取转染 48 h 后的 3 组 HeLa 细胞接种于 24 孔板中的侵袭小室中,小室中为无血清培养基,24 h 后取出侵袭小室,用棉签将未侵袭的细胞抹去,固定染色后,在倒置显微镜下(×400)观察、拍照,随机选取 5 个视野统计每组侵袭细胞数。

1.6 Western-blotting 检测三组细胞中 PTEN 蛋白的表达

收集转染 48 h 后的 HeLa 细胞,分别提取三组细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,进行 SDS-PAGE 后,进行转膜、封闭,分别孵育一抗(1:1 000 稀释 PTEN 抗体和 Tubulin 抗体)、二抗(1:5 000 稀释辣根过氧化物酶标记山羊抗兔和山羊抗鼠抗体),用 BeyoECL Plus 法在暗室中压片显色。实验重复 5 次。Quantity-One 软件分析条带灰度值。

1.7 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件分析,组间差异比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Anti-miRNA-21 转染组 HeLa 细胞中 miRNA-21 的表达量明显降低

Real-time PCR 检测结果显示,转染 anti-miRNA-21 组细胞中 miRNA-21 的表达与阴性、空白对照组相比明显下降[(0.187 ± 0.027) vs (0.861 ± 0.144)、(1.000)],均 $P < 0.01$ 。

2.2 Anti-miRNA-21 转染组 HeLa 细胞的增殖能力明显降低

MTT 法检测结果(图 1)显示,miRNA-21 转染组与阴性对照组相比,随时间增加对 HeLa 细胞的增殖抑制率明显升高,其中以转染 96 h 时增加最明显[(49.44 ± 1.97)% vs (4.36 ± 0.64)% , $P < 0.01$]。

2.3 Anti-miRNA-21 转染组 HeLa 细胞的侵袭能力明显降低

Transwell 检测结果显示,anti-miR-21 转染组与阴性、空白对照相比,HeLa 细胞的侵袭能力明显降低,其侵袭细胞数明显减少[(29.4 ± 2.1) vs (40.4 ± 2.9)、(41.2 ± 2.6)个,均 $P < 0.01$]。

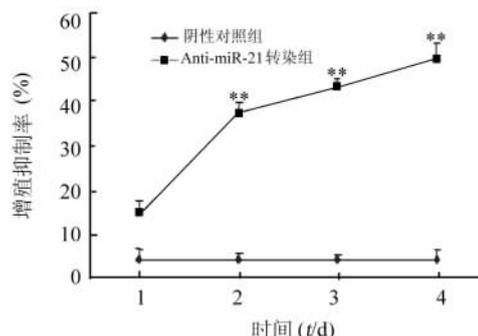


图 1 MTT 法检测转染对细胞增殖影响

** $P < 0.01$ vs anti-miR-21-neg

2.4 Anti-miRNA-21 转染组 HeLa 细胞中 PTEN 蛋白的表达明显增高

Western-blotting 结果(图 2)显示,各组细胞内参照 Tubulin 的表达强度基本一致,转染 anti-miRNA-21 后 PTEN 的表达上调。

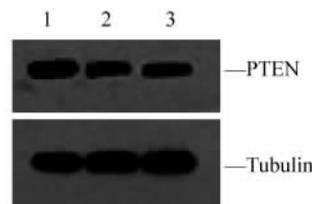


图 2 Western-blotting 法测定各组蛋白表达

1: Anti-miR-21 转染组; 2: 阴性对照组; 3: 空白对照组

3 讨论

宫颈癌是目前全球范围内最常见的妇科恶性肿瘤之一,占女性恶性肿瘤的第二位。目前的研究证明,高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染与宫颈癌的发生密切相关,但是并不是所有感染了高危型 HPV 的患者都最终进展为宫颈癌,这说明还有其他因素参与宫颈癌的发生发展^[7]。

miRNA 是体内一种由大约 18 ~ 23 个碱基组成的独立的转录单位,其 2 ~ 8 位点的核苷酸(称之为“点火区”)可与靶基因 mRNA 的 3'-UTR 区域完全或部分配对结合,成倍地复制,从而放大 miRNA 基因调控的活性^[8]。人类大约有超过 60% 的编码蛋

白质的基因有与 mRNA 结合受其调控的风险^[9]。不同的肿瘤有不同的 miRNA 的表达谱^[10-12]。miRNA 有促进和抑制肿瘤生长的双重作用。对于某一特定的 miRNA, 通常有多个靶基因, 这使得 miRNA 对靶基因的调控机制变得十分复杂^[13]。miRNA-21 可促进多种肿瘤的生长, 包括乳腺癌、胰腺癌、结直肠癌、头颈部癌、食管癌、恶性胶质瘤、成纤维细胞瘤、胆管癌、肺癌及胃癌等^[14-16]。在宫颈癌方面, 研究^[2]显示 miRNA-21 在宫颈癌 HeLa 细胞中过量表达, 可促进细胞增殖, 下调 PDCD4 的表达。在宫颈鳞癌方面, 也有研究^[17]显示 miRNA-21 可通过调节趋化因子 CCL20 的表达, 促进细胞增殖。

PTEN 是体内的一种抑癌基因, 在血液系统肿瘤、消化道肿瘤、妇科及泌尿系等肿瘤中表达下降。有研究^[18]显示, PTEN 异常引起 P13K/Akt 通路的激活还与许多靶向药物无效有关。

本实验中, 转染 anti-miRNA-21 后 HeLa 细胞中 miRNA-21 的表达明显下降, HeLa 细胞中 PTEN 蛋白的表达较转染前增高, 细胞的增殖率下降, 转移能力也明显下降。因此推断, 转染后 miRNA-21 的表达下降, 可能对 PTEN 的抑制作用减弱, PTEN 的表达增高, 然后通过一定的信号通路抑制细胞增殖和转移。该结果与胃癌^[4]、非小细胞性肺癌^[5]、结直肠癌^[6]等细胞中 miRNA-21 与 PTEN 的关系研究结果一致, 为进一步明确 miRNA-21 参与宫颈癌发生发展的机制提供实验依据, 同时为 PTEN 基因参与宫颈癌发生发展机制的研究作了补充, 也为进一步解决 PTEN 异常与宫颈癌靶向治疗过程中的耐药问题提供一定的实验依据。

miRNA-21 作为一种致瘤因子, 可作为未来宫颈癌治疗的靶点。PTEN 基因通过一定的信号转导调节肿瘤细胞的增殖、转移及耐药, 是近年来的研究热点, 其在宫颈癌中的具体调控的信号通路需进一步明确。miRNA-21 和 PTEN 作为调控靶点有效应用于临床仍需进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Pennisi E. Breakthrough of the year: Areas to watch [J]. Science, 2008, 322(5909): 1773.
- [2] Yao Q1, Xu H, Zhang QQ, et al. MicroRNA-21 promotes cell proliferation and down-regulates the expression of programmed cell death 4 (PDCD4) in HeLa cervical carcinoma cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 388(3): 539-542.
- [3] Yaginuma Y, Yamashita T, Ishiya T, et al. Abnormal structure

and expression of PTEN/ MMAC1 gene in human uterine cancers [J]. Mol Carcinog, 2000, 27(2): 110-116.

- [4] Zhang BG, Li JF, Yu BQ, et al. MicroRNA-21 promotes tumor proliferation and invasion in gastric cancer by targeting PTEN [J]. Oncol Rep, 2012, 27(4): 1019-1026.
- [5] Liu ZL, Wang H, Liu J, et al. MicroRNA-21(miR-21) expression promotes growth, metastasis, and chemo- or radio-resistance in non-small cell lung cancer cells bu targeting PTEN [J]. Mol Cell Biochem, 2013, 372(1/2): 35-45.
- [6] Xiong B, Cheng Y, Ma L, et al. MiR-21 regulates biological behavior through the PTEN/PI3K/Akt signaling pathway in human colorectal cancer cells [J]. Int J Oncol, 2013, 42(1): 219-228.
- [7] Kisseljov F, Sakharova O, Kondratjeva T. Cellular and molecular biological aspects of cervical intraepithelial neoplasia [J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2008, 271: 35-95.
- [8] Bartek DP. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions [J]. Cell, 2009, 136(2): 215-233.
- [9] 孙茗, 王立东. MicroRNA 与食管癌 [J]. 肿瘤基础与临床, 2009, 22(3): 272-274.
- [10] Philippidou D, Schmitt M, Moser D, et al. Signatures of microRNAs and selected microRNA target genes in human melanoma [J]. Cancer Res, 2010, 70(10): 4163-4173.
- [11] Conti A, Aguenouz M, La Torre D, et al. MiR-21 and 221 up-regulation and miR-181b downregulation in human grade II-IV astrocytic tumors [J]. J Neurooncol, 2009, 93(3): 325-332.
- [12] Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, et al. The role of site accessibility in microRNA target recognition [J]. Nature Genetics, 2007, 39(10): 1278-1284.
- [13] Sempere LF, Christensen M, Silahatoglu A, et al. Altered microRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer [J]. Cancer Res, 2007, 67(24): 11612-11620.
- [14] Dillhoff M, Liu J, Frankel W, et al. MicroRNA-21 is overexpressed in pancreatic cancer and a potential predictor of survival [J]. Gastrointest Surg, 2008, 12(12): 2171-2176.
- [15] Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma [J]. JAMA, 2008, 299(4): 425-436.
- [16] Yao T, Lin Z. MiR-21 is involved in cervical squamous cell tumorigenesis and regulates CCL20 [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1822(2): 248-260.
- [17] Jhawer M, Goel S, Wilson AJ, et al. PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab [J]. Cancer Res, 2008, 68(6), 1953-1961.

[收稿日期] 2013 - 12 - 30

[修回日期] 2014 - 02 - 05

[本文编辑] 阮芳铭, 黄静怡