

下调miR-21表达抑制鼻咽癌CNE2 细胞增殖和侵袭

周克兵 谷刚 曹昕

南华大学附属南华医院急诊科, 湖南 衡阳 421002

[摘要] **背景与目的:** miR-21在人类多种肿瘤中异常高表达。本研究探讨干扰miR-21表达对鼻咽癌CNE2细胞增殖、迁移和侵袭的影响。**方法:** 使用脂质体将miR-21 inhibitor转染CNE2细胞, 以无关序列(NC inhibitor)作为阴性对照。采用qRT-PCR技术验证miR-21 inhibitor转染的CNE2细胞中miR-21的表达水平; 通过MTS法、细胞划痕、Transwell侵袭实验观察下调miR-21表达对CNE2细胞增殖、迁移和侵袭的影响。**结果:** 转染miR-21 inhibitor的CNE2细胞中miR-21的表达明显下调, 并且呈浓度依赖性。表明转染miR-21 inhibitor能有效抑制CNE2细胞中miR-21的表达。转染miR-21 inhibitor的CNE2细胞与对照细胞相比, 增殖速度明显减慢, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。细胞划痕实验显示, 下调miR-21表达抑制CNE2细胞迁移($P < 0.05$)。Transwell侵袭实验结果显示, 下调miR-21表达抑制CNE2细胞侵袭($P < 0.05$)。**结论:** miR-21能促进鼻咽癌细胞增殖、迁移和侵袭, 其可能在鼻咽癌的发生、发展中发挥重要作用。

[关键词] 鼻咽癌; miR-21; 细胞增殖; 细胞侵袭

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2013.11.002

中图分类号: R739.63 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2013)11-0863-05

miR-21 downregulation attenuates cell proliferation, migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma ZHOU Ke-bing, GU Gang, CAO Xin (Emergency Department, Affiliated Nanhua Hospital, University of South China, Hengyang Hunan 421002, China)

Correspondence to: ZHOU Ke-bing E-mail: 562136355@qq.com

[Abstract] **Background and purpose:** miR-21 is overexpressed in various types of human cancers. This study was designed to investigate the effect of miR-21 knockdown on cell proliferation, migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell line CNE2. **Methods:** CNE2 was transfected with miR-21 inhibitor by Lipofectamine™2000. Meanwhile CNE2 was transfected with NC inhibitor as negative control. qRT-PCR was used to detect the miR-21 expression in these cells. The effects of miR-21 downregulation on cell proliferation, migration and invasion were evaluated by MTS, wound-healing Transwell and invasion assays. **Results:** miR-21 expression was remarkably downregulated in miR-21 inhibitor-transfected cells in concentration-dependent manner, indicating transfection with miR-21 inhibitor can effectively reduce expression level of miR-21 in CNE2 cells. Transfection of miR-21 inhibitor into CNE2 cells led to a significant decrease in cell proliferation rate compared with control cells ($P < 0.05$). miR-21 downregulation results in reduction of cell migration ($P < 0.05$). Moreover, the cell invasion by Transwell invasion assay was reduced in miR-21-downregulated cells relative to control cells. **Conclusion:** miR-21 can promote cell proliferation, migration and invasion of NPC cells. And it maybe plays an important role in tumorigenesis and development of NPC.

[Key words] Nasopharyngeal carcinoma; MiR-21; Cell proliferation; Cell invasion

miRNA是由长约19~24个核苷酸组成的非编码小分子RNA, 它通过降解靶mRNA或抑制靶mRNA的翻译来调节靶基因表达。MiRNAs参与生命过程中一系列的重要进程, 包括生长

发育、细胞增殖、分化、细胞运动、新陈代谢等^[1]。研究发现, 人类多种肿瘤中存在miRNA基因异常或表达异常^[2]。miRNA通过癌基因和抑癌基因参与细胞增殖、凋亡和分化的调控, 在肿瘤的发生、发展过程中发挥着重要的生物学功能^[3-5]。研究表明, miR-21在乳腺癌、肺癌、

胃癌、胰腺癌等组织和细胞中呈高表达^[6-9], 其可能作为癌microRNA促进肿瘤的发生发展^[10-11]。相对于对照鼻咽黏膜组织, miR-21在鼻咽癌组织中表达显著上调, 并且与鼻咽癌临床进展及转移呈正相关^[12]。本研究通过在鼻咽癌CNE2细胞中转染miR-21 inhibitor, 探讨miR-21下调对鼻咽癌细胞增殖、侵袭、迁移的影响, 从而初步揭示miR-21在鼻咽癌中的生物学功能。

1 材料和方法

1.1 主要材料

LipofectamineTM2000转染试剂购自美国Invitrogen公司。qRT-PCR miRNA检测试剂盒购自上海吉玛生物公司。miRNA inhibitor为Ambion公司产品。miR-21 inhibitor序列为5'-UCAACAUCAGUCUGAUAAGCUA-3', NC inhibitor序列为5'-CAGUACUUUUGUGUAGUACAA-3'。RPMI-1640培养基购自Hyclone公司、胎牛血清购自杭州四季青公司。MTS细胞增殖和毒性检测试剂盒购自美国Promega公司。铺有基质胶的Transwell侵袭小室(8.0 μm孔径)购自BD Biosciences公司。

1.2 细胞培养

鼻咽癌细胞株CNE2为典型低分化鳞癌细胞, 由本实验室保存, 培养于含10%小牛血清的RPMI-1640, 在95%湿度、CO₂体积分数为5%、37℃条件下培养。

1.3 细胞转染

转染前1d将细胞接种于6孔板中, 待贴壁细胞融合度达40%~60%时, 根据LipofectamineTM2000说明书用无血清培养基进行转染。转染后6h换新鲜完全培养基, 继续扩大培养以用于后续实验。

1.4 qRT-PCR检测

逆转录按上海吉玛生物公司转录miRNA逆转录试剂盒进行, 反应体系: 总RNA 70℃预变性10 min, 10×Buffer 2 μL, 10 mmol/L MgCl₂ 4 μL, dNTP 2 μL, Ribonuclease Inhibitor 0.5 μL, AMV逆转录酶(20 U)0.6 μL, Oligo(dT)15 Primer 1 μL, 总RNA 1 μg, 无酶水

至20 μL。反应条件: 42℃ 1 h, 95℃ 5 min, 4℃ 10 min。

PCR反应体系(SYBR Premix Ex TaqTM 20 μL体系): SYBR Premix Ex TaqTM 10 μL, 特异性引物(10 μmol/L) 0.4 μL, 连通Primer(10 μmol/L) 0.4 μL, cDNA模板2 μL, 蒸馏水加至20 μL。采用Bio-Rad IQ5实时定量PCR仪进行PCR反应, 反应条件: 95℃ 30 s; 95℃延伸5 s, 共40个循环, 60℃退火30 s。miR-21特异性引物序列为5'-TAGCTTATCAGACTGATGTT-3'。

1.5 MTS法检测细胞增殖活性

MTS是一种四唑盐化合物, 是一种常用的细胞存活和生长的检测方法^[13]。其检测原理是活细胞线粒体中琥珀酸脱氢酶能够代谢还原MTS, 生成紫色可溶于细胞培养液的甲瓩, 可通过酶标仪测定甲瓩的吸光度值来确定活细胞的相对数量。

miR-21 inhibitor转染CNE2细胞24 h后, 将细胞接种于96孔板中, 每组设6个复孔, 放置37℃、CO₂体积分数为5%的培养箱中培养。在未接种细胞的孔中加入RPMI-1640培养基中作为调零孔。接种后24、48、72和96 h各检测1次。检测时每孔加20 μL MTS检测试剂, 37℃温育2 h, 用酶标仪测定570 nm波长吸光度值(A₅₇₀), 并绘制生长曲线观察miR-21下调对鼻咽癌细胞CNE2增殖的影响。实验重复3次。

1.6 细胞划痕实验

miR-21 inhibitor转染CNE2细胞24 h后, 将细胞接种24孔板中, 待细胞融合度达到90%时, 用10 μL移液枪枪头, 以载玻片作依靠在每孔中心轴进行划痕并拍照(0 h), 37℃、CO₂体积分数为5%培养箱中继续培养24 h并拍照, 测量划痕愈合程度。实验重复3次。

1.7 Transwell侵袭实验

铺有基质胶的Transwell侵袭实验可用于观察细胞侵袭性^[14]。miR-21 inhibitor转染CNE2细胞24 h后, 消化细胞, 用无血清培养基洗涤2次, 再用无血清培养基重悬细胞, 细胞计数, 调整细胞数为1×10⁵/mL。在Transwell下室加入800 μL含15%FCS的培养基。在Transwell上室

加入250 μL 细胞悬液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养48 h。取出Transwell, 擦掉靠上室侧膜的细胞, PBS洗涤, 将Transwell用4%甲醛溶液固定10 min, 结晶紫染色, 显微镜下观察、照相, 随机选取5个高倍视野($\times 200$)进行细胞计数, 并计算平均值。实验重复3次。

1.8 统计学处理

采用统计软件SPSS 13.0进行统计学分析。结果数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间比较采用t检验; 3组或3组以上比较采用One-way ANOVA检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染miR-21 inhibitor有效抑制CNE2细胞中miR-21表达

首先, 运用qRT-PCR方法分析鼻咽癌CNE2细胞与正常鼻咽上皮细胞NP69细胞中miR-21表达情况, 结果发现CNE2细胞中miR-21表达明显高于NP69细胞, 约为NP69的5.3倍(图1)。然后分别用NC inhibitor及miR-21 inhibitor(终浓度为10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)转染CNE2细胞, 48 h后抽提细胞总RNA, 运用qRT-PCR验证miR-21 inhibitor转染的细胞中miR-21的表达。结果表明, 转染不同浓度miR-21 inhibitor的CNE2细胞中, miR-21的表达明显下调, 并且呈浓度依赖性(图2)。表明miR-21 inhibitor能有效抑制CNE2细胞中miR-21的表达。

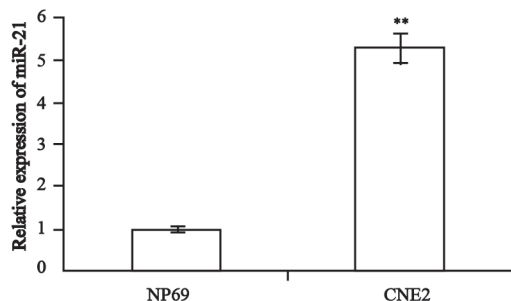


图1 qRT-PCR检测CNE2和NP69细胞中miR-21表达水平

Fig. 1 Analysis of miR-21 expression in CNE2 and NP69 cells by qRT-PCR

** $P<0.01$, compared with NP69.

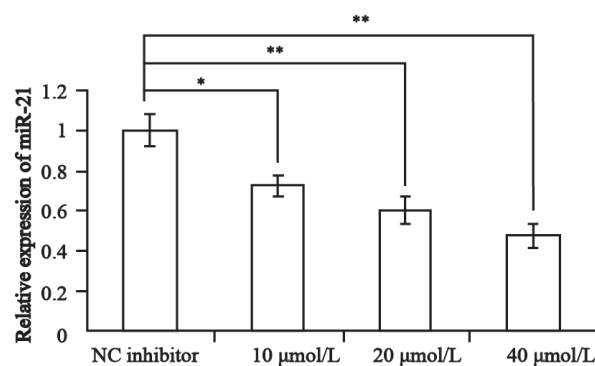


图2 qRT-PCR验证miR-21 inhibitor转染细胞后miR-21表达水平

Fig. 2 Analysis of miR-21 expression in CNE2 cells transfected with miR-21 inhibitor by qRT-PCR

*: $P<0.01$, **: $P<0.01$.

2.2 miR-21下调后CNE2细胞增殖速度减慢

MTS法检测结果发现, 转染不同浓度miR-21 inhibitor的CNE2细胞从第48小时起增殖速度明显减慢。统计分析各组在96 h时的细胞增殖情况发现, 转染10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的miR-21 inhibitor组 A_{570} 分别为 1.18 ± 0.09 、 0.98 ± 0.09 、 0.71 ± 0.06 , 与对照细胞组(1.51 ± 0.12)相比, 差异均有统计学意义($P<0.05$), 并且呈现明显的浓度依赖性(图3)。这表明下调miR-21表达抑制鼻咽癌细胞CNE2增殖。

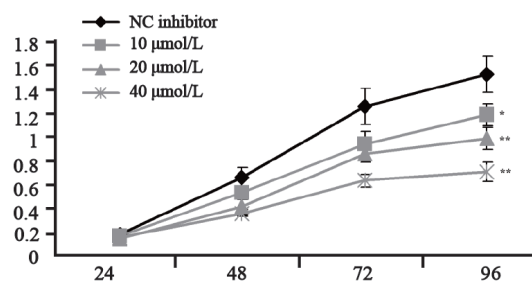


图3 下调miR-21对CNE2细胞增殖的影响

Fig. 3 Effect of miR-21 downregulation in CNE2 cells on cell proliferation

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, compared with NC inhibitor.

2.3 miR-21表达下调抑制CNE2细胞迁移

细胞划痕实验显示划痕后24 h, 转染miR-21 inhibitor(20 $\mu\text{mol/L}$)的CNE2细胞划痕愈合率明显低于对照组细胞($P<0.05$, 图4), 表明下调miR-21表达明显抑制CNE2细胞的迁移。

2.4 下调miR-21表达抑制CNE2细胞侵袭

本研究利用铺有基质胶的Transwell小室观察miR-21下调对细胞侵袭的影响。结果显示,

转染miR-21 inhibitor(20 $\mu\text{mol/L}$)的CNE2细胞较对照细胞侵袭力明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图5)。

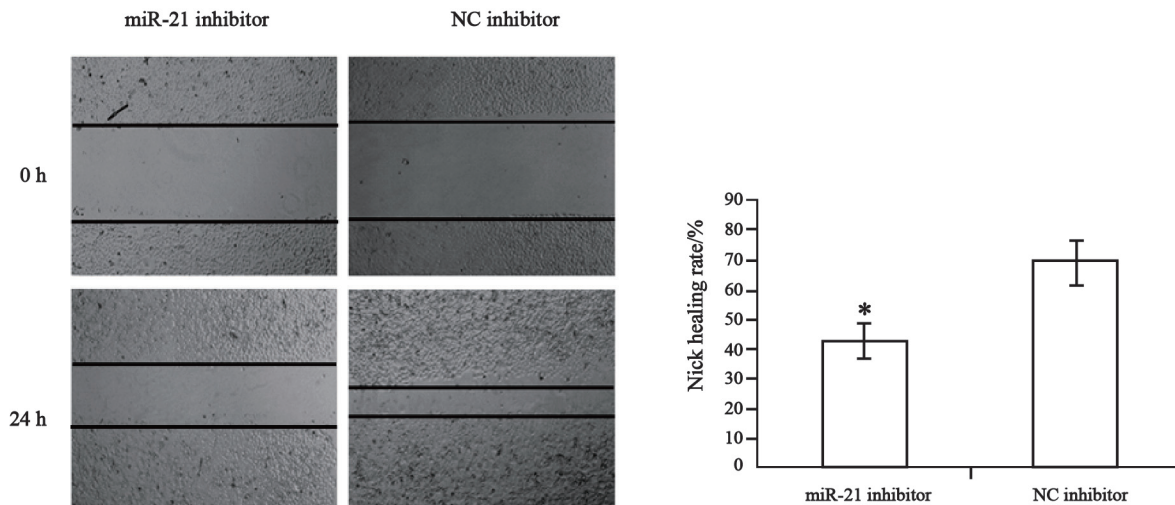


图4 miR-21表达下调对CNE2细胞迁移的影响

Fig. 4 Effect of miR-21 downregulation in CNE2 cells on cell migration

*: $P<0.05$.

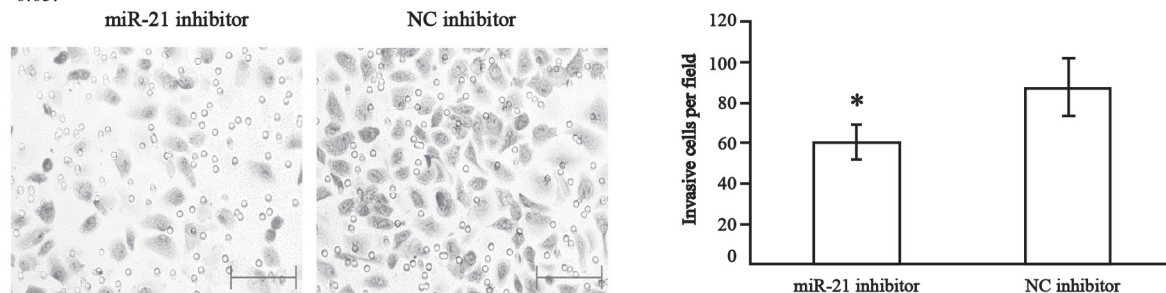


图5 miR-21表达下调对CNE2细胞侵袭的影响

Fig. 5 Effect of miR-21 downregulation in CNE2 cells on cell invasion

*: $P<0.05$.

3 讨论

miRNA是一类广泛存在于动植物体内的非编码小RNA, 主要参与基因转录后水平调控, 通过与其目标mRNA分子的3'端非编码区域(3'-untranslated region, 3'UTR)互补匹配降解靶mRNA或抑制其翻译。miRNA作为一类新型基因调控剂, 与肿瘤的发生、发展密切相关。越来越多的研究显示, 在人类肿瘤中存在miRNA表达的失调, miRNA通过癌基因和抑癌基因参与细胞增殖、凋亡和分化的调控, 在肿瘤的发生、发展过程中发挥着重要的生物学功能。

miR-21是最早发现的哺乳动物microRNAs之一, 成熟miR-21在不同物种之间高度保守。

研究表明, miR-21在肺癌、前列腺癌、结肠癌、胃癌、肝癌等多种恶性肿瘤中过表达。Toiyama^[15]等报道, 外周血miR-21可能是结直肠癌的诊断和预后标志物。邓敏等^[12]报道, miR-21在鼻咽癌组织中异常高表达, 其表达与鼻咽癌临床进展及转移呈正相关, Kaplan-Meier生存曲线分析发现, 鼻咽癌患者miR-21表达越高, 预后越差。这些结果提示, miR-21在鼻咽癌的发生、发展中起着重要作用。本研究将miR-21 inhibitor转染至鼻咽癌CNE2细胞中, 观察miR-21下调对细胞增殖、迁移侵袭的影响。结果发现, 转染不同浓度miR-21 inhibitor的CNE2细胞从第48小时起增殖速度明显减慢。细胞划痕及Transwell侵袭实验结果显示,

miR-21表达下调抑制CNE2细胞迁移、侵袭性。这些结果表明, miR-21能促进鼻咽癌细胞增殖和侵袭,很可能作为癌基因参与鼻咽癌的发生、发展。文献报道miR-21作为癌miRNA能够通过调控靶基因如PTEN、CCL20、FAS,促进肺癌、胃癌、结肠、肾癌等肿瘤细胞增殖、生长、侵袭^[7, 9-11]。本研究结果与文献报道的一致, miR-21将有可能成为治疗鼻咽癌的潜在靶点。

[参 考 文 献]

- [1] HE L, HANNON G J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation [J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(7): 522-531.
- [2] CHEN P S, SU J L, HUNG M C. Dysregulation of MicroRNAs in cancer [J]. *J Biomed Sci*, 2012, 19(1): 90.
- [3] MANIKANDAN J, AARTHI J J, KUMAR S D, et al. Oncomirs: the potential role of non-coding microRNAs in understanding cancer [J]. *Bioinformatics*, 2008, 2(8): 330-334.
- [4] CHIN L J, RATNER E, LENG S, et al. A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(20): 8535-8540.
- [5] SENGUPTA S, DEN BOON J A, CHEN I H, et al. MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(15): 5874-5878.
- [6] ZHU Q, WANG Z, HU Y, et al. miR-21 promotes migration and invasion by the miR-21-PDCD4-AP-1 feedback loop in human hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(5): 1660-1668.
- [7] ZHANG B G, LI J F, YU B Q, et al. microRNA-21 promotes tumor proliferation and invasion in gastric cancer by targeting PTEN [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(4): 1019-1026.
- [8] DARIDO C, GEORGY S R, WILANOWSKI T, et al. Targeting of the tumor suppressor GRHL3 by a miR-21-dependent proto-oncogenic network results in PTEN loss and tumorigenesis [J]. *Cancer Cell*, 2011, 20(5): 635-648.
- [9] VICINUS B, RUBIE C, FAUST S K, et al. miR-21 functionally interacts with the 3' UTR of chemokine CCL20 and down-regulates CCL20 expression in miR-21 transfected colorectal cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2012, 316(1): 105-112.
- [10] MEDINA P P, NOLDE M, SLACK F J. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma [J]. *Nature*, 2010, 467(7311): 86-90.
- [11] HATLEY M E, PATRICK D M, GARCIA M R, et al. Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21 [J]. *Cancer Cell*, 2010, 18(3): 282-293.
- [12] 邓敏, 谷依学, 郑国沛, 等. 鼻咽癌组织中miR-21的表达变化及意义 [J]. *山东医药*, 2012, 52(47): 10-12.
- [13] GAROFALO M, ROMANO G, DI LEVA G, et al. EGFR and MET receptor tyrosine kinase-altered microRNA expression induces tumorigenesis and gefitinib resistance in lung cancers [J]. *Nat Med*, 2011, 18(1): 74-82.
- [14] DENG M, TANG H L, LU X H, et al. miR-26a suppresses tumor growth and metastasis by targeting FGF9 in gastric cancer [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72662.
- [15] TOIYAMA Y, TAKAHASHI M, HUR K, et al. Serum miR-21 as a diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2013, 105(12): 849-859.

(收稿日期: 2013-06-11 修回日期: 2013-10-20)