

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201505007

· 论著 ·

miR-21 在鼻咽癌中的表达及对鼻咽癌 细胞株增殖及凋亡的影响

万仁强¹, 傅向军¹, 张学辉¹, 黄健男¹, 裴娜娜², 邹苑斌¹, 刘华盛¹

(1. 广东省第二人民医院耳鼻咽喉头颈外科, 广东 广州 510317; 2. 南方医科大学生物技术学院, 广东 广州 510515)

摘要: **目的** 研究 miR-21 在鼻咽癌组织及细胞中的表达, 并分析 miR-21 反义核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASO) 对鼻咽癌细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 用荧光定量 RT-PCR 方法检测 miR-21 在鼻咽癌组织及细胞株中的表达; 利用脂质体 LipofectamineTM2000 将 miR-21 ASO 瞬时转染至鼻咽癌细胞, 通过荧光定量 RT-PCR 检测 miR-21 的沉默效果。利用四甲基偶氮唑盐比色法 (MTT 法)、平板克隆形成实验检测 miR-21 对细胞增殖的影响; 流式细胞术检测 miR-21 对细胞周期的影响; 流式细胞仪检测细胞凋亡-AnnexinV-FITC/PI 双染色法检测 miR-21 对鼻咽癌细胞凋亡的影响; 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测 caspase-3 蛋白的表达; caspase-3 活性检测试剂盒检测沉默 miR-21 后 caspase-3 的活性变化。**结果** miR-21 在鼻咽癌组织及鼻咽癌细胞中显著高表达; MTT 法分析显示, 细胞接种 96 h 后, 5-8F/miR-21 ASO 组的生长速度较对照组显著下降 ($P < 0.05$), 细胞克隆形成率较对照组显著降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 细胞周期结果表明沉默 miR-21 表达的细胞增殖受抑, 主要通过诱导 G0/G1 期阻滞, 减少 S 期细胞的比例; 流式细胞仪检测结果显示转染 miR-21 ASO 组较对照组细胞凋亡率明显增加, 并且 caspase-3 的活性明显增强。**结论** miR-21 在鼻咽癌组织及细胞中表达上调, 靶向 miR-21 可有效抑制鼻咽癌细胞增殖、促进细胞凋亡。miR-21 的表达可能影响鼻咽癌细胞的生长。

关键词: miR-21; 细胞增殖; 细胞凋亡; 鼻咽癌

中图分类号: R739.63 文献标识码: A 文章编号: 1007-1520(2015)05-0377-06

Expression of miR-21 in nasopharyngeal carcinoma and its effect on proliferation and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells

WAN Ren-qiang, FU Xiang-jun, ZHANG Xue-hui, HUANG Jian-nan, PEI Na-na, ZOU Yuan-bin, LIU Hua-sheng
(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, the Second Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510317, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of miR-21 in nasopharyngeal carcinoma (NPC) and to explore the regulative effect of miR-21 antisense oligonucleotide (ASO) on the proliferation and apoptosis of NPC cells. **Methods** Expression of miR-21 in NPC tissues and NPC cell lines were detected by real-time RT-PCR. After transient transfection of miR-21 ASO to NPC cells with Lipofectamine TM2000, the effect of miR-21 silence on cell proliferation and cell cycle was detected by MTT assay, plate colony formation assay and flow cytometry. The cell apoptosis following miR-21 silence was detected by flow cytometry. Western blot was performed to detect the protein level of cleaved-caspase-3 and caspase-3 activity was determined by caspase-3 activity assay kit. **Results** Expression of miR-21 was significantly increased in NPC tissues and cell lines. MTT assay showed that miR-21 downregulation significantly inhibited the growth of 5-8 F/miR-21 ASO cells. Colony formation rate of 5-8 F/miR-21 ASO cells was lower than that of the control. Cell cycle analysis showed that most 5-8 F/miR-21 ASO cells were arrested in G0/G1 phase with a very low ratio of cells in S phase. Flow cytometry indicated that the apoptotic index in miR-21 ASO group was significantly higher than that in the control group. In addition, caspase-3 activity was obviously increased in 5-8 F/miR-21 ASO cells. **Conclusions** miR-21 is overexpressed in human NPC. Reducing expression of miR-21 can effectively inhibit the growth of NPC cells and promote their apoptosis. MiR-21 may become a new target for the regulation of gene expression in NPC.

Key words: miR-21; Cell growth; Apoptosis; Nasopharyngeal neoplasm

miRNA 是内源性的单链非编码微分子 RNA, 普遍存在于动植物体内, 长度一般为 22 个核苷酸。越来越多的研究表明, miRNA 在肿瘤的发生发展中发挥着重要作用, 参与细胞的增殖、分化及凋亡过程^[1-2]。已有研究表明, miR-21 在多种恶性肿瘤中表达显著上调, 发挥抑制细胞凋亡的作用^[3]。目前 miR-21 与鼻咽癌相关研究的报道尚少。本研究运用荧光定量 RT-PCR 技术发现 miR-21 在鼻咽癌组织及细胞中高表达, 并发现靶向 miR-21 能够抑制鼻咽癌细胞增殖及促进癌细胞凋亡。该研究结果可以为今后鼻咽癌的诊治提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 一般资料 收集广东省第二人民医院耳鼻咽喉头颈外科 2012 年~2014 年经活组织检查获得的 26 例 NPC 标本, 同时收集鼻咽慢性炎症性组织标本 26 例, 所有患者均经病理检查证实, 且术前均未接受过放疗或靶向治疗。

1.1.2 细胞株 鼻咽癌细胞株 CNE-1, CNE-2, 5-8F, C666-1, HNE-1, HONE-1 及鼻咽部永生生化上皮细胞 NP69 于 2014 年购自 ATCC (美国模式菌种收集中心), 并冻存于我院中心实验室液氮中保存备用。

1.1.3 主要试剂 RPMI-1640 培养基、0.25% 胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清: 浙江四季青公司; Keratinocyte-SFM 培养基, Caspase 3 活性检测试剂盒, LipofectamineTM2000 转染试剂和 Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; miR-21 ASO (大连宝生物公司); Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒 (南京凯基公司); 噻唑蓝 (MTT) 购自美国 Sigma 公司; Prime-ScriptTMRT reagent Kit 逆转录试剂盒; Premix Ex TaqTM 实时定量 PCR 试剂盒购自 Takara; 兔抗人 caspase-3 及 cleaved caspase-3 购自美国 Santa Cruz 公司; Anti- β -actin 抗体和 Anti-rabbit HRP 酶标 IgG 抗体购于 Sigma-Aldrich; 细胞培养瓶、细胞培养平板购自 Corning 公司; RIPA 裂解液购于北京鼎国昌盛生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 荧光定量 RT-PCR 检测 miR-21 的表达采用 RNA 提取试剂提取癌组织、鼻咽慢性炎症性组织、鼻咽癌细胞株及正常鼻咽上皮永生生化细胞中总

RNA, 测定浓度, -80°C 保存。采用 SYBR Green 法检测 miR-21 的相对表达, 反应条件: 95°C 15 min, 95°C 30 s, 59°C 30 s, 72°C 30 s, 共 45 个循环, 最后 72°C 延伸 7 min。实验重复 3 次。

1.2.2 细胞培养 正常人鼻咽上皮永生生化上皮细胞 NP69 接种于含 10% 胎牛血清的新鲜 Defined Keratinocyte-SFM (成分确定的角质形成细胞无血清培养基) 中培养。人鼻咽癌细胞株 CNE-1, CNE-2, 5-8F, C666-1, HNE-1, HONE-1 接种于含 10% 胎牛血清的新鲜 RPMI-1640 培养基中, 培养基加青霉素与链霉素, 两抗生素最终浓度分别为 100 U/L 及 100 mg/L, 置于 37°C 、饱和湿度、5% CO_2 的培养箱中培养。

1.2.3 引物的设计及合成 获取人 miR-21 的序列 (http://www.sanger.ac.uk/soft_ware/Rfam/mirna), 设计其 ASO 序列, 运用 NCBI BLAST 检索程序以排除其他的同源序列。如下所示: 反义 miR-21 上游引物序列为: $5' \text{-UGUCCAAGUGCUACCGUUUA-3'}$, 下游引物序列: $5' \text{-UACACGGAUCCACUAGUGAC-3'}$, GAPDH 的引物序列为 F: $5' \text{-CACCCAGCACAATGAAGAT-3'}$, R: $5' \text{-CAAATAAAGCCATGCCAAT-3'}$ 。

1.2.4 细胞转染 运用 LipofectamineTM2000 转染试剂盒进行转染, miR-21 ASO 终浓度分别为: 20、50、100、150、200 nmol/L、250 nmol/L。本实验组筛选出最佳终干扰浓度为 100 nmol/L。转染后继续培养 24、48、72 h, 初步筛出最佳作用时间为 48 h。转染 miR-21 ASO 48 h 后, 提取总 RNA, 测定浓度, 逆转录为 cDNA。运用 RT-PCR 检测 miR-21 的表达。上述操作重复 3 次。

1.2.5 MTT 比色实验 将对数期生长的 5-8F 细胞按 1×10^3 个/孔分别接种至 96 孔板内, 重复 7 孔, 并设置空白对照孔。分别常规培养 24、48、72、96 h 后, 弃培养基, 每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 20 μl , 继续培养 4 h 后, 加入 150 μl 二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶解, 酶标仪 570 nm 处检测各孔 OD 值, 取 7 孔平均值绘制细胞增殖曲线。

1.2.6 平板克隆形成实验 将细胞按 10^2 个/孔分别接种至 6 孔板内, 每组设 3 个复孔, 晃动均匀, 常规培养 14 d, 肉眼可见细胞克隆后终止培养。4% 多聚甲醛固定 20 min, 加姬姆萨染色液染色 30 min, 之后用 ddH_2O 清洗, 干燥后在普通光学显微镜下计算大于 50 个细胞的克隆数, 克隆形成率 = 克隆数/接

种细胞数 $\times 100\%$ 。上述操作重复 3 次。

1.2.7 流式细胞仪分析细胞早期凋亡 将鼻咽癌细胞接种于 6 孔板中,转染 miR-21 ASO。48 h 后收集细胞,调整待检测细胞浓度为 10^6 个/ml,取 $200 \mu\text{l}$, $1\ 000 \text{ rpm}$ 离心 5 min (4°C),预冷的 PBS 漂洗 2 次, $1\ 000 \text{ rpm}$ 离心 5 min (4°C),弃上清。最后运用 Annexin V-FITC 早期凋亡试剂盒和流式细胞仪检测 5-8F/control 及 5-8F/miR-21ASO 的早期凋亡情况。上述操作重复 3 次。

1.2.8 caspase-3 蛋白表达 转染后 48 h 收集细胞,加 RIPA 裂解液裂解细胞,采用 Bradford 法对于蛋白质进行定量。10% SDS-PAGE 胶电泳分离蛋白质,转膜,用 5% BSA 封闭 1 h,一抗 (caspase-3、cleaved caspase-3、 β -actin 抗体 1:2 000) 4°C 温育过夜, TBST 漂洗,二抗 (抗鼠和抗兔 1:3 000) 室温温育 1 h, TBST 洗膜,膜稍干后加入化学发光液,超高灵敏度化学发光成像系统 (Bio-Rad ChemiDoc XRS + Imaging System) 成像。

1.2.9 caspase-3 活性的检测 胰酶消化转染后 48 h 细胞,并收集细胞。用 PBS 洗涤一次,吸尽上清后,按照每 200 万细胞加入 $50 \mu\text{l}$ 裂解液的比例加

入裂解液,重悬沉淀,冰浴裂解 30 min,其间涡旋振荡 4 次,每次 10 s, 4°C 离心 ($12\ 000 \text{ rpm}$, 15 min)。小心吸取上清 (含裂解的蛋白质) 转移至新的管中,依据 caspase-3 活性检测试剂盒的操作步骤检测靶向 miR-21 后 caspase-3 的活性变化。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 20.0 统计软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 One-Way ANOVO 及两样本 t 检验统计学方法, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-21 在人鼻咽癌组织及细胞中的表达

用荧光定量 RT-PCR 的方法检测 miR-21 在 26 例鼻咽癌组织及鼻咽癌细胞 CNE-1、CNE-2、5-8F、C666-1、HNE-1、HONE-1 中的表达。结果显示,miR-21 在各鼻咽癌细胞株中表达上调 (图 1A),尤其在 5-8F 中表达最高;与 NP69 细胞相比,所有癌细胞株 miR-21 表达上调的差异具有显著性 ($P < 0.05$), (图 1B)。

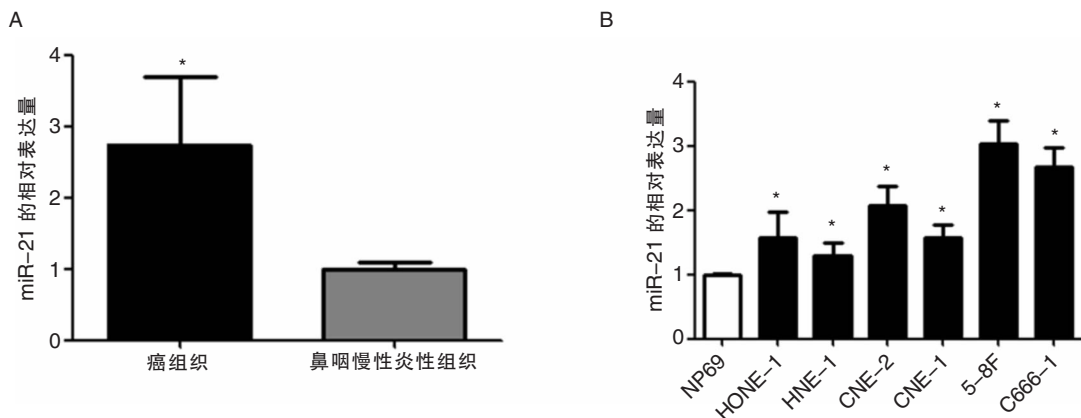


图 1 miR-21 在人鼻咽癌中的表达 A:miR-21 在鼻咽癌与鼻咽慢性炎症组织中的表达;B:miR-21 在鼻咽癌细胞中的表达

2.2 转染 miR-21ASO 后对 miR-21 表达的影响

荧光定量 RT-PCR 检测结果发现,5-8F 细胞转染 miR-21ASO 后 miR-21 的相对量较转染随机 ASO 组及空白对照组下降约 60%,见图 2。

2.3 沉默 miR-21 对鼻咽癌细胞增殖能力的影响

2.3.1 细胞增殖率的检测: MTT 结果显示,转染 miR-21ASO 24 h 后 5-8F 细胞的 OD 值为 0.21 ± 0.01 ,转染随机 ASO 5-8F 细胞的 OD 值为 0.23 ± 0.01 ,经两独立样本 t 检验,差异无统计学意义

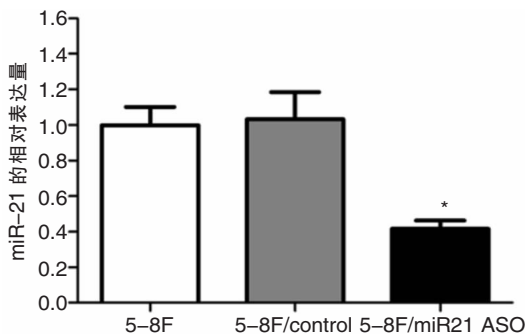


图 2 转染 miR-21 ASO 后 miR-21 在 5-8F 中的表达

($P > 0.05$)。转染 miR-21 ASO 96 h 后, 5-8F 细胞的 A 值由 1.34 ± 0.05 下降至 0.76 ± 0.03 , 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3A。

2.3.2 平板克隆形成实验 转染 miR-21 ASO 组形成的细胞克隆数目显著少于对照组, 经两独立样本 t 检验统计分析, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3B。

2.3.3 沉默 miR-21 对细胞周期的影响 细胞周期结果显示, 5-8F/miR-21 ASO 组细胞生长阻滞于 G0/G1 期, 其比例由 58.25 ± 1.46 升高至 69.63 ± 3.07 , S 期由 34.10 ± 1.78 下降至 20.29 ± 2.14 , 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明干扰 miR-21 可显著影响鼻咽癌细胞周期的分布, 见图 4。

2.4 沉默 miR-21 对细胞凋亡的影响

5-8F 细胞转染 miR-21 ASO 后, 流式细胞仪检测细胞凋亡, 结果显示: miR-21 ASO 的凋亡率 (12.60)

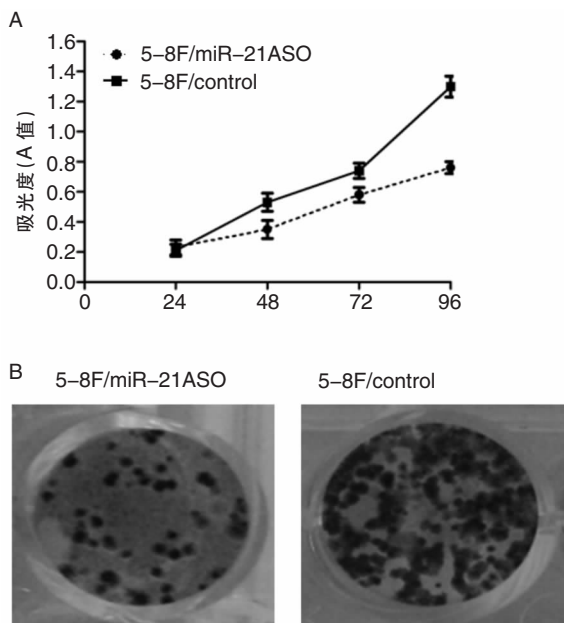


图3 沉默 miR-21 能抑制鼻咽癌细胞的增殖 A: MTT 结果; B: 平板克隆形成实验结果

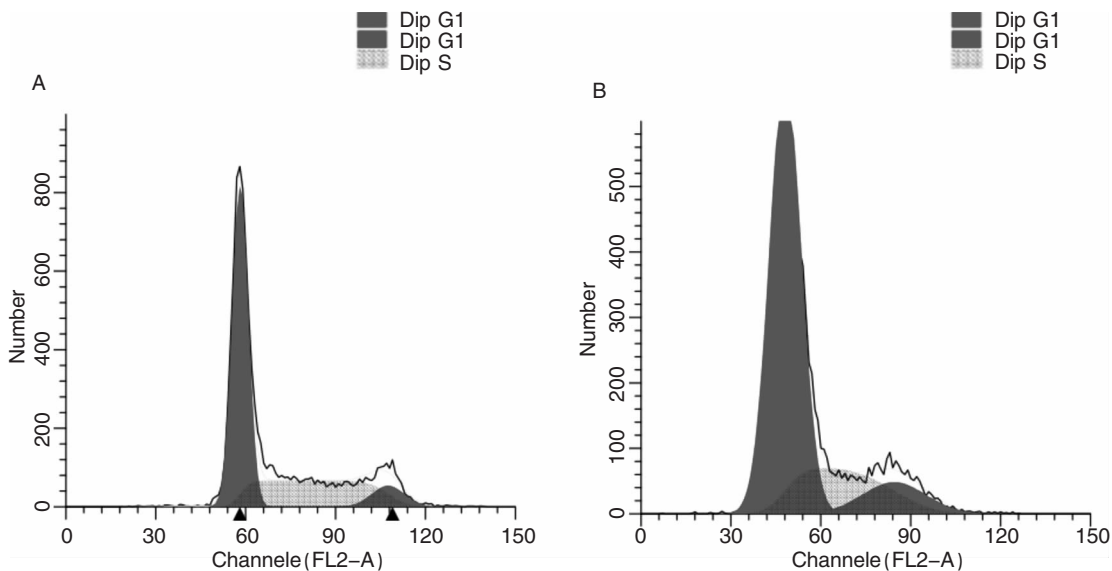


图4 沉默 miR-21 对鼻咽癌细胞周期的影响 A: 5-8F/miR-21 ASO; B: 5-8F/control

比对照组 (2.44) 明显增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明靶向 miR-21 可显著促进鼻咽癌细胞的凋亡, 见图 5。

2.5 caspase-3 的活性及蛋白的表达

蛋白免疫印迹结果显示, 靶向 miR-21 48 h 后 5-8F/miR-21 ASO 组 caspase-3 蛋白的表达较对照组

无明显差异, 但是 cleaved caspase-3 蛋白表达水平明显升高, 见图 6A。caspase-3 活性检测结果显示, 沉默 miR-21 48 h 后 caspase-3 活性与对照组相比明显升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 6B。

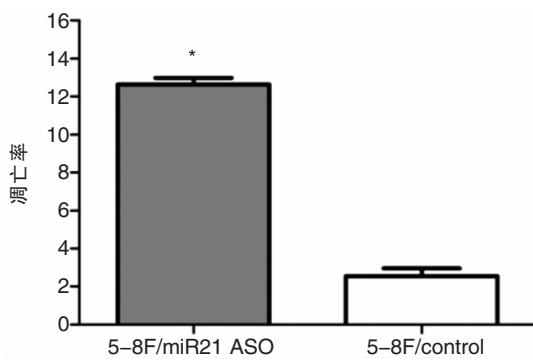


图5 靶向 miR-21 能促进鼻咽癌细胞的凋亡

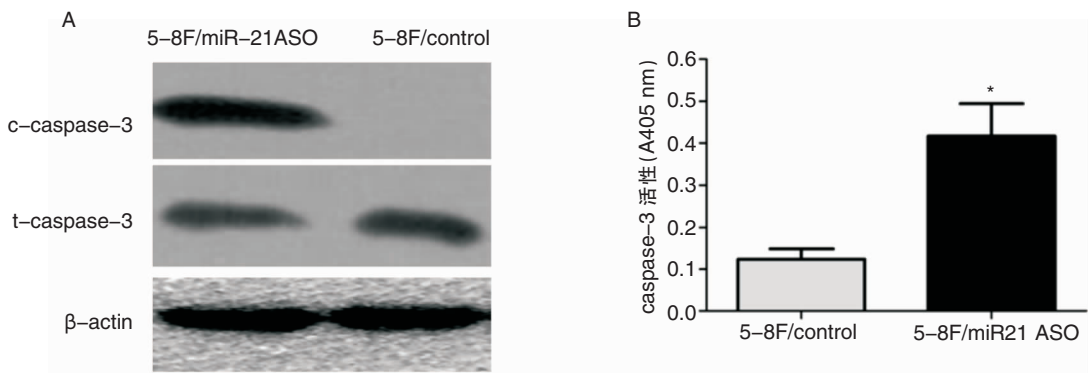


图6 沉默 miR-21 对 caspase-3 表达的影响 A:蛋白免疫印迹显示 caspase-3 的表达;B:caspase-3 活性检测

疗靶标。miR-21 在胰腺癌、肺癌、胃癌、前列腺癌等多种肿瘤中表达升高,并且与肿瘤的增殖、侵袭、转移等密切相关^[9-16]。

本研究首先利用荧光定量 RT-PCR 检测鼻咽癌标本及鼻咽癌细胞中 miR-21 的表达。结果发现,miR-21 在肿瘤组织及肿瘤细胞中高表达,为了进一步分析 miR-21 对鼻咽癌细胞生物学行为的影响,我们通过转染反义的 miR-21 来拮抗鼻咽癌细胞中 miR-21 的表达,通过 MTT 法检测 miR-21 对鼻咽癌细胞增殖的影响。结果发现,下调 miR-21 能显著抑制鼻咽癌细胞的增殖。同时平板克隆形成实验证实靶向 miR-21 能显著抑制鼻咽癌细胞的克隆形成。细胞周期结果表明,干扰 miR-21 后可显著影响细胞周期的分布,主要表现为诱导 G0/G1 期阻滞,减少 S 期细胞的比例。本研究对 miR-21 影响细胞周期的具体机制未行深入探讨,其是否与 G1/S 关键点上的调控因子有关尚需进一步探索。

有研究报道,miR-21 可以通过调节 FasL 影响乳腺癌细胞的凋亡^[17]。本研究进一步研究发现,拮抗 miR-21 可以促进鼻咽癌细胞凋亡,并且 miR-21 可以调节凋亡蛋白酶 caspase-3 的活性,靶向 miR-21

3 讨论

鼻咽癌又称“广东癌”,在中国广东、广西等地区发病率很高且具有较高的转移性,其 5 年生存率不高于 70%^[4-5]。miRNA 是一类新的基因调节因子,在控制细胞生长、分化及凋亡等生物学过程中发挥着重要的作用^[4,6-7]。随 miRNA 研究的深入,研究发现 miRNA 与癌症的发生及侵袭转移密切相关^[8]。因此 miRNA 有可能成为肿瘤诊断的分子标志和治

可显著激活 caspase-3 蛋白的表达。由此可以推测,miR-21 通过调节 caspase-3 的活性来调控细胞凋亡。

综上所述,拮抗 miR-21 的表达可通过影响细胞周期 G1/S 关键点,引起 G1 期阻滞从而抑制鼻咽癌细胞增殖,并可通过调节 caspase-3 的活性来调控细胞凋亡。靶向 miR-21 可抑制鼻咽癌细胞增殖和促进鼻咽癌细胞凋亡。因此,miR-21 在鼻咽癌的发生发展中可能起着重要作用,有进一步研究的价值。

参考文献:

- [1] Croce CM, Calin GA. miRNAs cancer, and stem cell division [J]. Cell, 2005, 122(1):6-7.
- [2] Chen CZ, Li L, Lodish HF, et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation[J]. Science, 2004, 303(5654):83-86.
- [3] Sayed D, He M, Hong C, et al. MicroRNA-21 is a downstream effector of AKT that mediates its antiapoptotic effects via suppression of Fas ligand[J]. J Biol Chem, 2011, 285(26):20281-20290.
- [4] Lee AW, Yau TK, Wong DH, et al. Treatment of stage IV(A-B) nasopharyngeal carcinoma by induction-concurrent chemoradiotherapy and accelerated fractionation[J]. Int J Radiat Oncol Biol

- Phys, 2005, 63(5):1331-1338.
- [5] Dittmer DP, Hilscher CJ, Gulley ML, et al. Multiple pathways for Epstein-Barr virus episome loss from nasopharyngeal carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(12):2105-2112.
- [6] Sarver AL, French AJ, Borralho PM, et al. Human colon cancer profiles show differential micro RNA expression depending on mismatch repair statuses and are characteristic of undifferentiated proliferative states[J]. *BMC Cancer*, 2009, 9(2): 401-415.
- [7] Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, et al. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*[J]. *Cell*, 2003, 113(1): 25-36.
- [8] Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework [J]. *Cell*, 2006,127(4):679-695.
- [9] Sayed D, Rane S, Lypowy J, et al. MicroRNA-21 targets Sprouty 2 and promotes cellular outgrowths[J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(8):3272-3278.
- [10] Chap TF, Xiong HH, Liu W, et al. MiR-21 mediates the radiation resistance of glioblastoma cells by regulating PDCD4 and hM-SH2[J]. *Huazhong Univ Sci Techno[Med Sci]*, 2013, 33(4): 525-552.
- [11] Wang X, Liu Y, Chen X, et al. Impact of MiR-21 on the expression of FasL in the presence of TGF- β 1 [J]. *Aesthet Surg J*, 2013, 33(8):1186-1198.
- [12] Wang N, Zhang CQ, He JH, et al. MiR-21 downregulation suppresses cell growth, invasion and induces cell apoptosis by targeting FAS L, TIMP3 and RECK genes in esophageal carcinoma [J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58(7): 1863-1870.
- [13] Wang P, Zhuang L, Zhang J, et al. The serum miR-21 level serves as a predictor for the chemosensitivity of advanced pancreatic cancer and miR-21 expression confers chemoresistance by targeting FasL[J]. *Mol Oncol*, 2013, 7(3):334-345.
- [14] Zhang L, Dong LY, Li YJ, et al. miR-21 represses FasL in microglia and protects against microglia-mediated neuronal cell death following hypoxia/ischemia [J]. *Glia*, 2012, 60(12):1888-1895.
- [15] Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(16):7065-7070.
- [16] Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer [J]. *Gastroenterology*, 2007, 133(2):647-658.
- [17] Wu MF, Yang J, Xiang T, et al. MiR-21 targets Fas Ligand-mediated apoptosis in breast cancer cell line MCF-7 [J]. *Huazhong Univ Sci Techno[Med Sci]*, 2014,34(2):190-194.

(修回日期:2015-04-28)

(上接第376页)

- 及鼻咽部容积的测定[J]. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 2000, 14(11):494-495.
- [4] 樊韵平,左可军,许庚,等.慢性鼻窦炎炎症状态的内镜评价和临床相关因素分析[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2006, 41(9):677-682.
- [5] 邱建华,陈福权,乔莉,等.腺样体肥大3种不同手术方式的比较[J]. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 2005, 19(8):355-357.
- [6] Kapusuz Z, Ozkiris M, Okur A, et al. The prevalence of adenoid hypertrophy in adults in a rural area of Turkey [J]. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg*, 2012, 22(4):225-227.
- [7] Finkelstein Y, Malik Z, Kopolovic J, et al. Characterization of smoking-induced nasopharyngeal lymphoid hyperplasia [J]. *Laryngoscope*, 1997, 107(1):1635-1642.
- [8] Barcin C, Tapan S, Kursakloglu H, et al. Turkiye! de saglikli genciler? kinlerde koroner risk fakt rlerinin incelenmesi: Kesitsel bir analiz [J]. *Turk Kardiyoloji Dern Ars*, 2005, 33(2):96-103.
- [9] Manas Ranjan. Adenoid Hypertrophy in Adults: A case Series [J]. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*, 2013, 65(3):269-274.

(修回日期:2015-02-01)