

miRNA-9 在食管癌细胞株中的表达

李高峰,李桂生,杨春旭,黄健,周建红

(柳州市工人医院肿瘤科,广西柳州 545005)

摘要: **目的** 探讨 miRNA-9 在食管癌细胞株与正常食管上皮细胞的表达。**方法** 采用荧光定量 PCR 法检测食管癌细胞株及正常食管上皮细胞 miRNA-9 基因的表达水平。**结果** 5 株食管癌细胞株和正常食管上皮细胞均存在 miRNA-9 基因表达,食管癌细胞株 miRNA-9 基因的表达量均高于正常食管上皮细胞($P < 0.01$)。

结论 miRNA-9 基因在食管癌细胞株表达明显上调,说明 miRNA-9 基因与食管癌的发生有关。

关键词: miRNA-9; 食管癌细胞株; 表达

中图分类号: R737.7 **文献标识码:** A

MicroRNA-9 Expression and Clinical Significance in Esophageal Carcinoma Cells

LI Gaofeng, LI Guisheng, YANG Chunxu, et al

(Department of Oncology, Liuzhou Workers Hospital, Fourth Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Liuzhou, Guangxi 545005, China)

Abstract: **Objective** To explore the expression of miRNA-9 in human esophageal carcinoma cells and the normal esophageal epithelial cells. **Methods** The expression of miRNA-9 in human esophageal carcinoma cells and the normal esophageal epithelial cells were measured by fluorescent quantitation PCR. **Results** The expression of miRNA-9 in five esophageal cancer cells and the normal esophageal epithelial cell were all detected, the expression of miRNA-9 in five esophageal cancer cells were higher than that in normal esophageal epithelial cells. **Conclusion** The expression of miRNA-9 in esophageal carcinoma cells were markedly up-regulated, which suggested that the emerge of esophageal carcinoma was correlated with gene miRNA-9.

Key words: miRNA-9; esophageal carcinoma cell; expression

研究表明,miRNA 表达失调与肿瘤发生密切相关,临床上已成功利用 miRNA 对肿瘤进行诊断、分期与生物治疗。食管癌是人类常见恶性肿瘤之一,如何早期诊断食管癌已成为临床和基础研究领域所面临的棘手难题。本研究检测了 miRNA-9 前体分子在食管癌细胞株中的差异表达,分析 miRNA-9 基因在食管癌发生中的可能机理。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

人食管上皮细胞(HEEpiC)购自上海亿欣生物科技有限公司,食管癌细胞株 TE6、TE8、TE10、TE11 及 TE14 本室保存;RNA 试剂盒 Trizol 和 Lipofectamin™ 2000 购自美国 Invitrogen 公司;逆转录—聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒购自上海吉玛生物有限公司。PCT200 PCR 仪购自美国 MJ Research 公司;BP16 型 CO₂ 培养箱购自德国 Heraeus 公司;超低温冰箱购自三洋公司。

1.2 细胞培养

在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基下培养。RPMI1640 培养基购自 Sigma 公司,置于 37 ℃、

5% CO₂ 培养箱内培养, 每 2~3 天传代 1 次, 取对数生长期细胞用于实验。

1.3 总 RNA 的提取

用改进的异硫氰酸胍一步法^[1]从上述细胞中提取总 RNA。

1.4 逆转录—聚合酶链反应

提取的总 RNA 用 DNaseI 去除痕量基因组 DNA。按照逆转录试剂盒操作程序进行逆转录反应, RNA 的量为 1 μg, 反应条件为 70 °C 10 min、冰上 5 min、42 °C 60 min、95 °C 5 min、0 °C 5 min。荧光定量 PCR 反应体系为 25 μL, 内含终浓度为 500 ng 的 cDNA 模板、终浓度为 250 nmol/L 的上下游引物及 12.5 μL 的 2 × SYBR Green PCR Master 混合物。以 β-actin 基因为内对照 (NM_001101), 扩增产物 222 bp, 反应条件为 94 °C 40 s、56 °C 40 s、72 °C 40 s, 45 个循环, 荧光信号监测。定量的方法参照文献[2], 以 2^{-ΔΔC_t} (C_t 代表循环阈值) 表示基因的表达量, 公式如下, 实验重复 3 次。

$$\Delta\Delta C_t = (C_{t(\text{target gene})} - C_{t(\beta\text{-actin})})_{\text{肿瘤细胞}} - (C_{t(\text{target gene})} - C_{t(\beta\text{-actin})})_{\text{对照细胞}}$$

2 结 果

2.1 细胞总 RNA 的提取

Trizol 一步法提取上述细胞中的总 RNA。通过异丙醇沉淀法浓缩 RNA, 用紫外分光光度计定量。细胞中提取总 RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 值均在 1.8~2.0 之间, 电泳检测有 3 条清晰的 rRNA 带, 分别为 28 s、18 s 和 5 s, 说明 RNA 无降解, 质量较好 (图 1)。

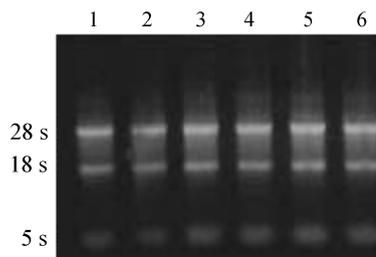


图 1 1% 琼脂糖凝胶电泳显示抽提的细胞的总 RNA。1: HEEpiC, 2: TE6, 3: TE10, 4: TE8, 5: TE11, 6: TE14

Fig. 1 1% agarose gel electrophoresis of total RNA from colorectal cancer cell

2.2 RT-PCR 结果

miRNA-9 基因 PCR 产物的熔解曲线峰值约在

83.6 °C, 熔解温度均一, 峰的形状也较锐利, 显示扩增的为特异序列 (图 2)。食管癌细胞株 TE6、TE10、TE8、TE11、TE14, miRNA-9 表达量较正常细胞明显增加, 差异有显著性 ($P < 0.01$) (图 3)。

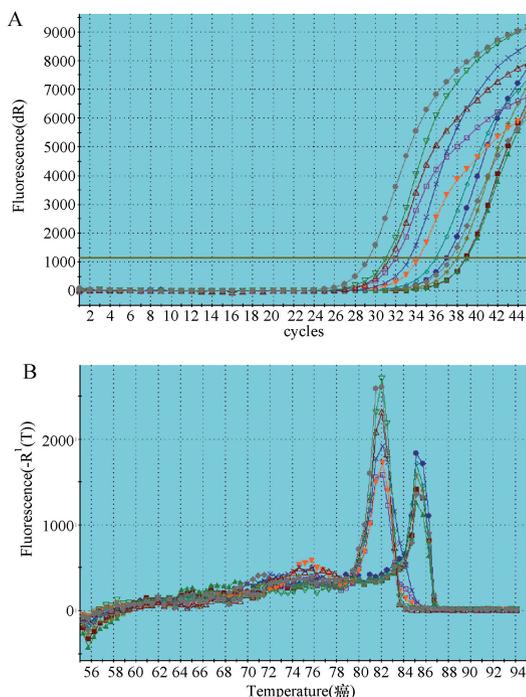


图 2 miRNA-9 的 RT-PCR 扩增曲线 (A) 和熔解曲线 (B)
Fig. 2 Curved lines of RT-PCR amplification (A) and dissolution (B) to miRNA-9

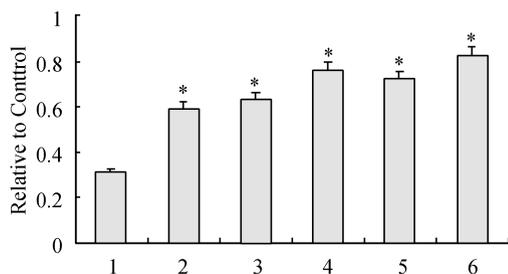


图 3 荧光定量 PCR 检测不同细胞株 miRNA-9 的表达。
1: HEEpiC; 2: TE6; 3: TE10; 4: TE8; 5: TE11; 6: TE14. * : $P < 0.01$
Fig. 3 The expression of miRNA-9 of different cells by FQ-PCR detecting

3 讨 论

食管癌是发生在食管上皮组织的恶性肿瘤, 占所有恶性肿瘤的 2%, 全世界每年约有 20 万人死于

食管癌,中国是食管癌高发区,因食管癌死亡者仅次于胃癌,居第二位。发病年龄多在40岁以上,男性多于女性,但近年来40岁以下发病者有增长趋势。食管癌的发生与亚硝酸胺、慢性刺激、炎症和创伤、遗传因素以及饮水粮食和蔬菜中的微量元素含量有关,但确切原因不甚明了。

microRNAs(miRNAs)是一个长度为21~25个核苷酸非编码的小RNA大家族,人类基因组编码了超过1000个miRNA^[3],通过干扰mRNA的翻译而下调靶基因的表达。肿瘤被认为是一种复杂的基因病,肿瘤的发生或发展过程中几乎都有癌基因的过表达和/或抑癌基因的表达缺失。研究发现,几乎一半的miRNA基因定位于这些基因的脆性位点或相关遗传区域,并对这些基因行转录后调控,而起到类似于癌基因或抑癌基因的作用^[4]。MiRNA let-7家族是典型的有抑癌基因作用的分子。在肺癌、结肠癌等肿瘤研究中发现,let-7负调控原癌基因Ras/let-60的表达^[5-6]。并在非小细胞性肺癌中发现,let-7表达水平越低,其预后越差,术后生存期越短。Watson等^[7]发现,在结肠癌组织中,miR-143和miR-145的表达明显下调。在乳腺癌、前列腺癌等中的研究也发现同样的情况。Bloomston等^[8]用芯片分析了6种实体瘤(肺癌、乳腺癌、结肠癌、胃癌、前列腺癌、胰管癌)的miRNA表达谱发现,miR-21均显著过表达,提示其在肿瘤形成过程中起广泛的致癌作用。新近研究显示,miR-21通过直接下调抑癌基因tropomyosin 1(TPM1)而发挥作用。Schetter等^[9]在睾丸干细胞肿瘤的研究中发现,miR-372和miR-373有癌基因的作用。

食管癌变是多种因素综合作用,由多基因变化先后积累或叠加形成的。研究证实,其发生与Rb、P53等抑癌基因失活以及环境等多因素使原癌基因H-ras、c-myc和hsl-1等激活有关^[10],而miRNA作为继蛋白质之后又一高效的基因表达调控因子,并已证实在多种肿瘤的发生发展中有重要作用。miRNA极大可能在食管癌中有更大的作用空间,因此,本课题前期研究利用基因芯片技术,通过食管癌组织及癌旁正常组织的横向比较找出癌组织中特异表达的miRNA,其中有23个miRNAs在食管癌组织中有显著差异,包括18个上调和5个下调,因此推测,某些关键miRNAs表达水平的失衡可能是食管癌发生和发展的重要因素。

本研究采用实时定量荧光PCR方法,检测食管癌细胞株和正常食管上皮细胞株miRNA-9的表达,发现miRNA-9表达量在食管癌细胞株TE6、TE10、TE8、TE11、TE14比正常细胞明显增加,且差异显著($P < 0.01$)。提示miRNA-9与食管癌的发生可能呈正相关。那么设想可以通过减弱或抑制miRNA-9的表达改善食管癌的发生与发展,为下一步食管癌的基因治疗奠定实验基础。

参考文献:

- [1] Minard ME, Kim LS, Price JE, et al. The role of the guanine nucleotide exchange factor Tiam1 in cellular migration, invasion, adhesion and tumor progression[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2004, 8(4): 21-32.
- [2] Mise-Omata S, Montagne B, Deckert M, et al. Mammalian actin binding protein 1 is essential for endocytosis but not lamellipodia formation; functional analysis by RNA interference[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 301(3): 704-710.
- [3] Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, et al. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes[J]. *Cell*, 2005, 120(12): 21-24.
- [4] Lanza G, Ferracin M, Gafù R, et al. mRNA/microRNA gene expression profile in microsatellite unstable colorectal cancer[J]. *Mol Cancer*, 2007, 6: 54-64.
- [5] Kumar MS, Erkeland SJ, Pester RE, et al. Small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(10): 3903-3908.
- [6] Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells[J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(5): 903-906.
- [7] Watson DI, Wijnhoven BP, Michael MZ, et al. MicroRNA expression profiles in Barrett's oesophagus[J]. *ANZ J Surg*, 2007, 77(6): 1-4.
- [8] Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis[J]. *JAMA*, 2007, 297(17): 1901-1908.
- [9] Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma[J]. *JAMA*, 2008, 299(3): 425-436.
- [10] Hiyoshi Y, Kamohara H, Karashima R, et al. MicroRNA-21 regulates the proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(6): 1915-1922.