

miR-34a 抑制人鼻咽癌细胞生长与侵袭

黄远见¹, 肖娟¹, 张志伟², 罗志强¹

(1. 南华大学附属第二医院耳鼻咽喉科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学肿瘤研究所)

摘要: **目的** 探讨 miR-34a 在人鼻咽癌 CNE2 细胞中的生物学功能。 **方法** 采用 MTT、Transwell 侵袭实验、细胞划痕实验分别检测过表达 miR-34a 对人鼻咽癌 CNE2 细胞的生长与侵袭作用。 **结果** MTT 检测发现, 过表达 miR-34a 可抑制人鼻咽癌 CNE2 细胞的生长增殖; 细胞划痕和 Transwell 侵袭实验显示, 在鼻咽癌 CNE2 细胞中过表达 miR-34a 48 h 后划痕愈合率为 $40.3\% \pm 9.0\%$, 与对照组 ($76.3\% \pm 6.8\%$) 比较, 能明显减缓 CNE2 细胞划痕的愈合, 转染 miR-34a mimics 48 h 后穿过基底膜的细胞数为 71 ± 10 , 与对照组 (147 ± 5) 比较, 能明显减缓 CNE2 细胞侵袭能力 ($P < 0.01$)。 **结论** miR-34a 可抑制鼻咽癌 CNE2 细胞生长与侵袭。

关键词: miR-34a; 鼻咽癌; 生长与侵袭

中图分类号: R739.6 **文献标识码:** A

The Mechanism of the MiR-34a Inhibiting the Nasopharyngeal Carcinoma Cells Growth and Invasion

HUANG Yuanjian, XIAO Juan, ZHANG Zhiwei, et al

(Department of Otorhinolaryngology, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To analyse the mechanism of the role of miR-34a in the nasopharyngeal carcinoma cells. **Methods** Cell growth was evaluated by MTT. Cell invasion potential was evaluated by scratch test and transwell assay. **Results** The MTT assay demonstrated that after overexpressing miR-34a in nasopharyngeal carcinoma cells, cellular viability was significantly reduced ($P < 0.05$). The Transwell invasion chamber assay illustrated that after increasing the expression of miR-34a, the number of cells passing through the Transwell chamber was significantly reduced ($P < 0.01$). **Conclusions** miR-34a can inhibit nasopharyngeal carcinoma cell proliferation, invasion and induced apoptosis.

Key words: miR-34a; nasopharyngeal carcinom; proliferation and invasion

研究显示, miR-34a 在结直肠癌、前列腺癌、肝癌、肺癌、胶质瘤等肿瘤组织和细胞中表达下调, 且过表达 miR-34a 能抑制多种肿瘤的生长、侵袭与转移, 在肿瘤的发生发展中发挥着重要作用^[1-2]。上调 miR-34a 的表达可通过靶向抑制 Bcl-2、E2F3、CD44、SIRT1 抑制乳腺癌细胞增殖, 侵袭以及诱导乳腺癌细胞凋亡, 抑制裸鼠成瘤能力并可延长乳腺癌荷瘤小鼠的生存时间^[3-4], 这些结果均表明 miR-

34a 在一些肿瘤中是一个具有抑瘤功能的 miRNA。本课题组采用 MTT、细胞划痕、Transwell 以及流式细胞术 (PI/Annexin V) 等技术, 首次分析 miR-34a 在人鼻咽癌 CNE2 细胞中的生物学行为, 为进一步探讨鼻咽癌发生发展的分子机制提供实验依据, 为鼻咽癌的防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人鼻咽癌株 CNE2 细胞: 南华大学肿瘤研究所; Lipofectamine 2000 脂质体: 美国 Invitrogen 公司; miR-34a mimics、negative control: 广州市锐博生物科

收稿日期: 2013-09-29

作者简介: 黄远见, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 鼻咽癌的发病机制与防治研究, E-mail: 2445612695@qq.com. 通讯作者罗志强, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, E-mail: zhiqiangluo9656@126.com.

技有限公司; Annexin V-FITC/PI 试剂盒:南京凯基生物科技发展有限公司; MTT:美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人鼻咽癌细胞株 CNE2 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养在 37 ℃、5% CO₂ 的细胞培养箱内。培养细胞呈单层贴壁生长,传代时细胞汇合度达 80% ~ 90% 左右。先倾弃培养液, PBS 洗 3 遍, 0.25% 胰酶消化, 显微镜下见细胞间隙增大后, 倾去胰酶, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基吹打细胞使其成单细胞悬液, 常规传代。

1.2.2 MTT 法 用 PBS 缓冲液洗涤预先培养至 80% 左右汇合度的细胞 3 次, 0.25% 胰酶消化, 取 200 μL 即 1×10^4 个细胞接种于 96 孔板中, 设复孔 5 个。37 ℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 h, 细胞达到 90% 汇合度左右。每孔加灭菌 MTT 液 (5 mg/mL) 20 μL, 继续孵育 4 h 后终止培养, 小心吸弃每孔中的上清液, 每孔中加入 150 μL DMSO, 低速振荡 10 min 至使结晶物充分融解。选择波长为 570 nm, 在酶标仪上检测各孔吸光值, 记录结果, 实验重复 3 次。

1.2.3 划痕实验 将细胞接种于 6 孔板中培养至临近饱和, 吸净上层培养液, 用 PBS 缓冲液洗涤 2 遍, 用消毒后的 10 μL Eppendorf Tip 在细胞板上划痕, 并将细胞轻洗 2 遍。加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基 2 mL 至培养板中, 倒置显微镜下观察各组细胞 0、12、24 h 的划痕距离, 并于倒置显微镜下摄像。

1.2.4 Transwell 侵袭实验 将 Matrigels 基质胶从 -20 ℃ 冰箱放置 4 ℃ 充分融解。在 8 μm 的 transwell 小室中铺加用预冷的无血清 RPMI-1640 培养基按说明稀释的基质胶, 37 ℃ 培养箱中过夜以成膜。在 transwell 小室的上室中加入无血清 RPMI-1640 培养基 100 μL 水化基质胶 20 min。用无血清 RPMI-1640 培养基稀释并制成 1×10^6 个/mL 的细胞悬液, 取 100 μL 即每孔 1×10^5 个/mL 接种至 transwell 小室的上室, 然后在 transwell 小室的下室中加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基 500 μL。37 ℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 30 h。取出 transwell 小室, 终止培养, 0.1% 结晶紫染色液, 将小室放置于 24 孔板中染色 20 min, PBS 缓冲液洗尽结晶紫, 风干后中性树胶封片。随机选取 4 个视野计算细胞总数, 取平均值, 实验重复 3 次。

1.2.5 Annexin V-FITC/PI 检测细胞凋亡 消化细胞离心收集; 用 PBS 洗涤细胞 2 次; 收集 $1 \sim 5 \times 10^5$ 细胞; 加入 100 μL 的结合缓冲液悬浮细胞; 加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后; 加入 1 μL PI, 混匀; 室温、避光、反应 15 ~ 30 min, 进行流式细胞仪检测; 激发波长 488 nm; 发射波长 530 nm; 荧光补偿调节后进行流式分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。所有数据均以均数 ± 标准差表示。两组间比较用 *t* 检验, 多组间比较用单因素方差分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT 检测 miR-34a 对人鼻咽癌 CNE2 细胞生长的影响

本研究化学合成 miR-34a mimics 及其对照 (miRNA 无关序列, scramble), 通过转染过夜后, 将 CNE2 细胞以 1×10^4 个的密度接种于 96 孔板, 每隔 24 h 在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值, 连续测定 3 天。实验重复 3 次 (图 1)。结果显示, 在转染 miR-34a mimics 24 h、48 h、72 h 后 OD 值分别为 (0.44 ± 0.03) 、 (0.49 ± 0.02) 、 (0.59 ± 0.03) ; 分别与对照组相应时间点 $[(0.49 \pm 0.04)$ 、 (0.78 ± 0.03) 、 $(1.19 \pm 0.16)]$ 比较, 在转染 48 h 及 72 h 时, 差异均有显著性 (*P* < 0.05), 即过表达 miR-34a 可抑制人鼻咽癌 CNE2 细胞的生长。

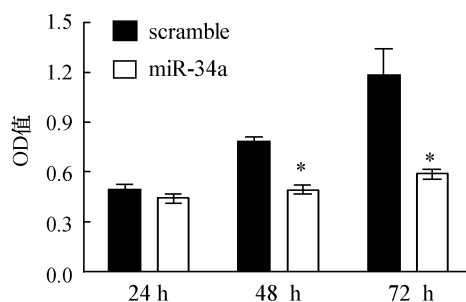


图 1 MTT 检测 miR-34a 对人鼻咽癌 CNE2 细胞生长的影响 与 scramble 比较, * : *P* < 0.05

2.2 划痕实验检测 miR-34a 对人鼻咽癌 CNE2 细胞运动能力影响

细胞划痕实验可以检查细胞的运动能力, 转染

miR-34a mimics 及其对照 scramble 于过夜细胞贴壁后进行细胞划痕实验,通过测算 0 h 与 48 h 的划痕愈合率,其愈合率 = (0 h 划痕宽度 - 48 h 划痕宽度)/(0 h 划痕宽度)。结果显示,转染 miR-34a

mimics 48 h 后划痕愈合率为 $40.3\% \pm 9.0\%$,与对照组($76.3\% \pm 6.8\%$)相比能明显减缓 CNE2 细胞划痕的愈合($P < 0.01$,图 2)。结果提示,过表达 miR-34a 对 CNE2 细胞运动能力有抑制作用。

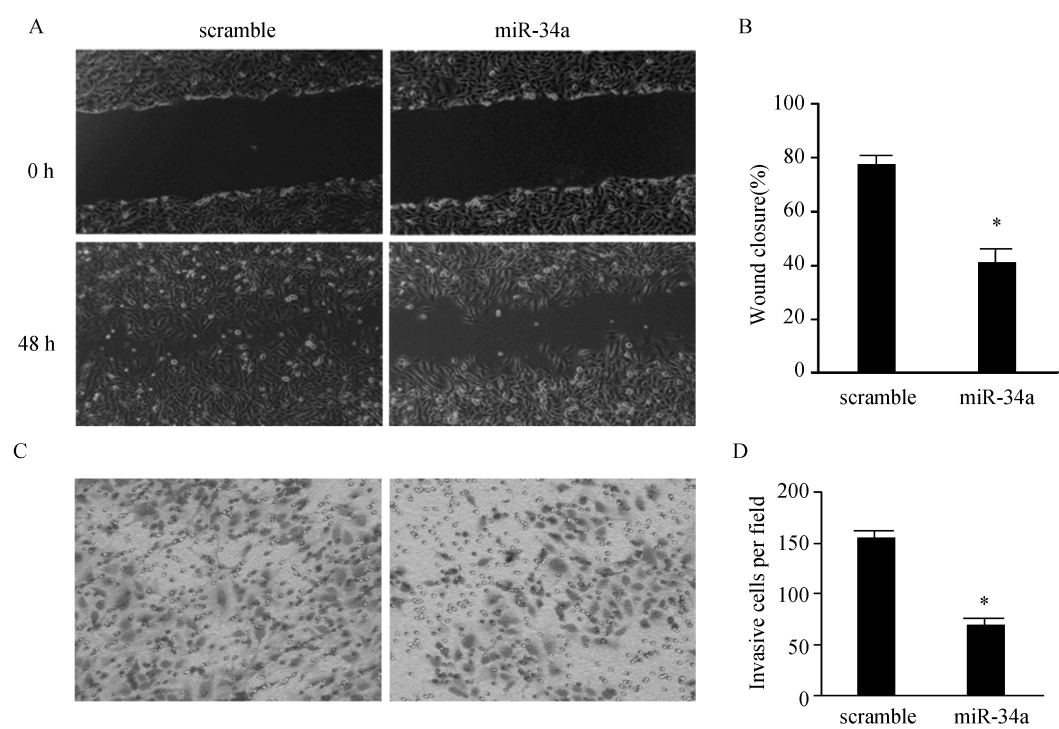


图 2 过表达 miR-34a 对鼻咽癌 CNE2 的迁徙侵袭能力影响 A:细胞划痕实验检测转染 miR-34a 的 mimics 后 0h、48 h 细胞之间的划痕宽度;B:细胞划痕实验检测过表达 miR-34a 后划痕愈合统计分析;C:Transwell 侵袭实验检测过表达 miR-34a 48 h 后穿过基底膜的 CNE2 细胞显微照片(×200);D:过表达 miR-34a 48 h 后 CNE2 细胞穿出数量统计分析

2.3 Transwell 侵袭实验检测过表达 miR-34a 对 CNE2 细胞侵袭能力的影响

进一步检测过表达 miR-34a 对 CNE2 细胞侵袭能力的影响,Transwell 上室接种 CNE2 细胞,转染 miR-34a mimics,接种于 24 孔板上 Transwells 小室,48 h 后取出 Transwells 小室固定,结晶紫染色,用中性树胶封片,显微摄影,任意选取 4 个不同视野的穿出的细胞进行统计,结果显示,转染 miR-34a mimics 48 h 后穿过基底膜的细胞数为 71 ± 10 ,与对照组(147 ± 5)比较,能明显减缓 CNE2 细胞侵袭能力($P < 0.05$,图 2C ~ D)。过表达 miR-34a 对 CNE2 细胞侵袭能力有抑制作用。

3 讨 论

鼻咽癌是中国最常见的恶性肿瘤,发病具有明显的地区聚集性,广东省等华南地区尤为高发。世

界卫生组织材料显示,40% 的鼻咽癌发生在中国,严重威胁中国人民生命健康。随着磁共振等现代影像学技术、放射治疗等精确放射治疗技术的联合应用,鼻咽癌的局部控制率已经提高到 93%,但中晚期鼻咽癌的远处转移率仍高达 30%,成为鼻咽癌治疗失败的主要模式^[5]。

miRNAs 包含 20 ~ 24 个核苷酸,它是一类非编码的小分子单链 RNAs,具有高度保守性、时间和组织特异性^[6]。通过与靶基因 mRNA 完全或不完全地碱基配对,RNA 诱导的沉默复合物可降解靶 mRNA 或抑制翻译,并且在转录后水平调节靶基因的表达^[7]。miRNAs 广泛存在于真核生物中,调节细胞增殖、分化和凋亡。特定的 miRNAs 在不同的肿瘤和不同的阶段高表达或低表达,这意味着与肿瘤的发生发展以及预后具有一定相关性^[8]。进一步研究 miRNA 和鼻咽癌的关系可能为早期肿瘤的检测、监测、预后、基因治疗以及解决化疗抵抗提供新

的应用价值。迄今为止,对 miRNA 34a 在鼻咽癌发生发展中的研究尚无人涉足^[9]。

关于 miR-34a 已有很多研究,miR-34a 可通过抑制 CD44 表达而抑制前列腺癌和前列腺癌干细胞的再生和转移,从而起到治疗前列腺癌的作用^[10]。miR-34a 可通过抑制 c-Myc 的表达从而抑制肾细胞癌的增殖^[11]。Wu 等^[2]报道 miR-34a 可通过抑制 Fra-1 的表达而抑制结肠癌的迁移和侵袭。本研究通过 MTT、细胞划痕、Transwell、PI/Annexin V 结合 FCM 发现,过表达 miR-34a 可抑制人鼻咽癌 CNE2 细胞的生长增殖以及运动和侵袭能力,且可诱导 CNE2 细胞凋亡,结果表明 miR-34a 可在鼻咽癌的发生发展中发挥抑瘤基因的作用。提示 miR-34a 可能在鼻咽癌发生发展过程中发挥重要作用。

miRNA 作为瘤基因或抑瘤基因功能的发现为肿瘤病因及发病机制的研究提供了新思路,也为肿瘤的防治、肿瘤的诊断、肿瘤的分子分型、肿瘤的预后分子以及疗效监测甚至辅助治疗方面如何指导用药提供了新策略。本课题继续深入 miR-34a 在鼻咽癌中的功能和分子研究,系统阐明 miR-34a 参与鼻咽癌发生发展的可能分子机制,为鼻咽癌的防治提供理论依据和实验基础。

参考文献:

- [1] Tang H, Deng M, Tang Y, et al. miR-200b and miR-200c as prognostic factors and mediators of gastric cancer cell progression [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19 (20): 5602-5612.
- [2] Wu J, Wu G, Lv L, et al. MicroRNA-34a inhibits migration and invasion of gastric cancer cells via targeting to Fra-1 [J]. Carcinogenesis, 2012, 33 (3): 519-528.
- [3] Li L, Xie X, Luo J, et al. Targeted expression of miR-34a

using the T-VISA system suppresses breast cancer cell growth and invasion [J]. Mol Ther, 2012, 20 (12): 2326-2334.

- [4] Li L, Yuan L, Luo J, et al. MiR-34a inhibits proliferation and migration of breast cancer through down-regulation of Bcl-2 and SIRT1 [J]. Clin Exp Med, 2013, 13 (2): 109-117.
- [5] Lo EJ, Bell D, Woo J, et al. Human papillomavirus & WHO type I nasopharyngeal carcinoma [J]. Laryngoscope, 2010, 120 (4): S185.
- [6] Finnegan EF, Pasquinelli AE. MicroRNA biogenesis: regulating the regulators [J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2013, 48 (4): 51-68.
- [7] Tang H, Kong Y, Guo J, et al. Diallyl disulfide suppresses proliferation and induces apoptosis in human gastric cancer through Wnt-1 signaling pathway by up-regulation of miR-200b and miR-22 [J]. Cancer Lett, 2013, 340 (1): 72-81.
- [8] Chen B, Li H, Zeng X, et al. Roles of microRNA on cancer cell metabolism [J]. J Transl Med, 2012, 10 (4): 228.
- [9] Sengupta S, den Boon JA, Chen IH, et al. MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105 (15): 5874-5878.
- [10] Liu C, Kelnar K, Liu B, et al. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44 [J]. Nat Med, 2011, 17 (2): 211-215.
- [11] Yang P, Li QJ, Feng Y, et al. TGF- β -miR-34a-CCL22 signaling-induced Treg cell recruitment promotes venous metastases of HBV-positive hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Cell, 2012, 22 (3): 291-303.

(此文编辑:蒋湘莲)