

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00818

MiR-203 抑制食管鳞癌 Eca109 细胞的增殖及侵袭

袁 扬, 龚德军, 刘晓红, 陆方林*

第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨 microRNA 分子 miR-203 对食管鳞癌 Eca109 细胞增殖及侵袭能力的影响。**方法** 根据人源 miR-203 序列, 设计并合成其双链模拟物。通过脂质体转染将 miR-203 模拟物分子导入食管鳞癌 Eca109 细胞中, 转染无关 microRNA 模拟物作为对照。测定 2 组细胞的细胞倍增时间、细胞凋亡率以及侵袭细胞率, 观察 miR-203 对 Eca109 细胞增殖及侵袭能力的影响。**结果** Eca109 细胞转染 miR-203 后其细胞倍增时间为 (26.1 ± 0.5) h, 较对照组 (24.2 ± 0.6) h 明显延长 ($P < 0.01$); 其凋亡细胞比例较对照组增加 $[(4.5 \pm 0.4)\% \text{ vs } (3.7 \pm 0.4)\%, P < 0.05]$; Transwell 小室侵袭实验显示转染 miR-203 模拟物后, 该组的侵袭细胞率明显低于对照组 $[(39.2 \pm 5.8)\% \text{ vs } (49.5 \pm 6.8)\%, P < 0.05]$ 。**结论** miR-203 能抑制 Eca109 细胞的增殖和侵袭能力, 提示 miR-203 可能是食管鳞癌生物治疗的潜在靶点。

[关键词] 微小 RNA; miR-203; 食管鳞癌; 细胞增殖; 细胞侵袭

[中图分类号] R 735.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)08-0818-04

MiR-203 inhibits proliferation and invasion of esophageal squamous cell carcinoma

YUAN Yang, GONG De-jun, LIU Xiao-hong, LU Fang-lin*

Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the influence of miR-203 on the proliferation and invasion of human esophageal squamous cell carcinoma cell line Eca109. **Methods** Double-stranded mimics of miR-203 were designed and transfected into Eca109 cells with Lipofectamine 2000; Eca109 cells transfected with nonsense microRNA mimics were taken as control. The proliferation ability of Eca109 cells was determined by calculating the cell population doubling time and the percentage of apoptotic cells; the invasion ability of Eca109 cells was determined by Transwell assay. **Results** *In vitro* experiment showed that, compared with the control group, Eca109 cells transfected with miR-203 mimics had a significantly longer cell population doubling time $[(26.1 \pm 0.5) \text{ h vs } (24.2 \pm 0.6) \text{ h}, P < 0.01]$, a higher cell apoptotic rate $[(4.5 \pm 0.4)\% \text{ vs } (3.7 \pm 0.4)\%, P < 0.05]$, and a lower cell invasion rate $[(39.2 \pm 5.8)\% \text{ vs } (49.5 \pm 6.8)\%, P < 0.05]$. **Conclusion** Our data shows that miR-203 can inhibit the proliferative and invasive abilities of Eca109 cells, suggesting that miR-203 might be a potential gene therapeutic target of human esophageal squamous cell carcinoma.

[Key words] microRNA; miR-203; esophageal squamous cell carcinoma; proliferation; invasion

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(8):818-821]

食管癌是我国高发的恶性肿瘤之一, 近年来, 我国的食管癌发病率及死亡率均呈显著的上升趋势^[1]。与西方国家不同, 东亚地区包括我国食管癌患者中的主要类型为食管鳞癌^[2]。目前, 食管鳞癌临床治疗仍以手术结合放、化疗为主, 但患者长期生存率仍然较低。如何在基因水平对食管鳞癌进行有效的生物治疗已成为目前研究的热点之一。

微小 RNA (microRNA) 是一种 20~25 nt 的内源性小 RNA, 通过调节 mRNA 的翻译从而调控靶

基因的表达^[3-5]。目前已发现了 1 000 多个人类 miRNA 基因, 它们参与调控体内所有的信号转导途径, 其中包括许多重要肿瘤相关基因的表达, 因此 microRNA 被认为在肿瘤的发生发展过程中起到关键作用^[6]。Feber 等^[7]和 Mathé 等^[8]通过 microRNA 芯片分析发现, 食管鳞癌组织中的 miR-203 表达水平显著低于癌旁组织, 提示 miR-203 可能具有抑癌基因的功能。为了进一步探讨 miR-203 对食管鳞癌细胞的可能作用, 本研究以食管鳞癌细胞株

[收稿日期] 2010-04-23 **[接受日期]** 2010-06-29

[基金项目] 国家自然科学基金(30872552), 上海市自然科学基金(10140902300)。Supported by the National Natural Science Foundation of China(30872552) and Natural Science Foundation of Shanghai(10140902300)。

[作者简介] 袁 扬, 助理研究员。E-mail: xxwkdaily@gmail.com

* 通讯作者 (Corresponding author)。Tel: 021-81873439, E-mail: lufanglin@smmu.edu.cn

Eca109 为研究对象,设计并合成了 miR-203 模拟物,通过脂质体转染将其导入 Eca109 细胞后检测其对食管鳞癌细胞增殖及侵袭的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 食管鳞癌细胞株 Eca109 购自中国科学院细胞库(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心)。DMEM、FBS 购自 Invitrogen 公司,Transwell 小室购自 BD 公司,Matrigel 购自 Sigma 公司。

1.2 人 miR-203 双链模拟物合成 检索 microRNA 在线文库(<http://www.mirbase.org>),按照人源成熟 miR-203 的序列,设计正义链:gugaauguuuaggaccacuag,反义链 ccagugguucuuacaguucaac;与人源 microRNA 无同源性的 RNA 双链(基于线虫 microRNA,正义链:gugaauguuuaggaccacuag,反义链 ccagugguucuuacaguucaac)作为对照。miR-203 模拟物及对照序列均携带 FAM 标记用以检测其转染细胞的效率。所有 microRNA 分子由上海吉玛制药技术有限公司合成。

1.3 细胞培养 Eca109 细胞使用 DMEM(含 10% 胎牛血清)培养基,5% CO₂、37℃ 条件下培养。细胞培养至对数生长期用于细胞转染实验。

1.4 细胞转染 处于对数生长期的 Eca109 细胞,于转染前 1 d 以 3×10^5 cells/well 的密度接种 6 孔板。转染前,240 μ l 无血清 DMEM 培养基中加入 10 μ l Lipofectamine 2000,混匀后 37℃ 温育 5 min,随后取 micorRNA 双链分子 0.5 μ g 溶于适量无血清培养基至终体积 250 μ l,将上述溶液混合,室温下静置 20 min;同时,将 6 孔板中的细胞用无血清 DMEM 培养基冲洗 2 次后,加入 2 ml 无血清 DMEM 培养基,将混合液逐滴加入孔中,摇动培养板,轻轻混匀。5% CO₂、37℃ 培养 6 h,随后更换 DMEM(含 10% FBS)培养基,5% CO₂、37℃ 培养 24 h,取 2×10^4 细胞通过 FACSCalibur 流式细胞仪(BD 公司)检测转染效率。

1.5 细胞增殖活性检测 Eca109 细胞转染 miR-203 及对照 microRNA 后 24 h,以 1×10^4 cells/well 的密度接种 6 孔板,5% CO₂、37℃ 培养 72 h 后计数每孔细胞数,按照公式 $T_d = (\log 2 \times t) / (\log N_t - \log N_0)$ 计算各组细胞倍增时间,其中 T_d 为细胞倍增时间, t 为细胞培养时间(即 72 h), N_t 为实验完成时细胞数, N_0 为实验开始时细胞数(即 1×10^4 cells)。

1.6 细胞凋亡检测 Eca109 细胞转染 miR-203 及对照 microRNA 后 96 h,取 5×10^5 个已转染细胞,

与 annexin V-FITC 及 PI 室温孵育 20 min,随后流式细胞仪检测,计算 annexin V⁺PI⁻ 细胞的比例作为细胞凋亡率。

1.7 细胞侵袭能力检测 Matrigel (5 μ g/ml) 稀释液包被 Transwell 小室底部膜的上室面,无菌条件下 4℃ 干燥。随后把 Transwell 倒置,在 Transwell 的膜的下室面预涂 fibronectin(10 μ g/ml),37℃ 静置 2 h。PBS 漂洗 1 次后,放入预先每孔加有 600 μ l 培养基(含 10% 血清)的 24 孔板内,随后在 Transwell 的内室加入 100 μ l Eca109 细胞悬液(含 0.1% 血清的培养基, 1×10^5 cell/well),37℃ 培养 24 h 后取出 Transwell 小室。用棉签擦去黏附于膜上室面的细胞后将膜置于 90% 乙醇常温固定 30 min,以 0.1% 结晶紫常温染色 10 min,清水漂净,显微镜下计数显色细胞数,计算侵袭细胞占总细胞的百分比。

1.8 统计学处理 数据采用 SPSS 15.0 软件分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用独立样本 t 检验。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 转染效率 FAM 标记的 miR-203 模拟物及 miRNA 阴性对照转染食管鳞癌细胞 Eca109,培养 24 h 后在荧光显微镜下观察,可见绝大多数细胞的胞质内显示荧光(图 1A),流式细胞仪检测显示转染后荧光细胞比例分别为 $(82.6 \pm 0.9)\%$ 和 $(82.9 \pm 1.2)\%$,两组转染率差异无统计学意义(图 1B)。

2.2 miR-203 抑制 Eca109 细胞增殖 Eca109 细胞转染 microRNA 24 h 后,实验组及对照组分别取 1×10^4 细胞铺板,培养 72 h 后测定各组细胞倍增时间,结果显示 miR-203 转染组细胞倍增时间为 (26.1 ± 0.5) h,高于对照组 (24.2 ± 0.6) h ($P < 0.01$,图 2),提示 miR-203 具有抑制 Eca109 细胞增殖的能力。

2.3 miR-203 促进 Eca109 细胞凋亡 Eca109 细胞转染 microRNA 96 h 后,采用 annexin V/PI 双染法检测各组细胞的凋亡率。结果显示 miR-203 转染组 annexin V⁺PI⁻ 细胞比例为 $(4.5 \pm 0.4)\%$,高于对照组的 $(3.7 \pm 0.4)\%$ ($P < 0.05$,图 3),提示 miR-203 具有促进 Eca109 细胞凋亡的功能。

2.4 miR-203 抑制 Eca109 细胞侵袭 Eca109 细胞转染 microRNA 24 h 后,通过 Transwell 小室侵袭实验比较各组细胞侵袭能力,结果显示 miR-203 转染组的侵袭细胞率为 $(39.2 \pm 5.8)\%$,明显低于对照组 $(49.5 \pm 6.8)\%$ ($P < 0.05$,图 4),提示 miR-203 具有抑制 Eca109 细胞侵袭的作用。

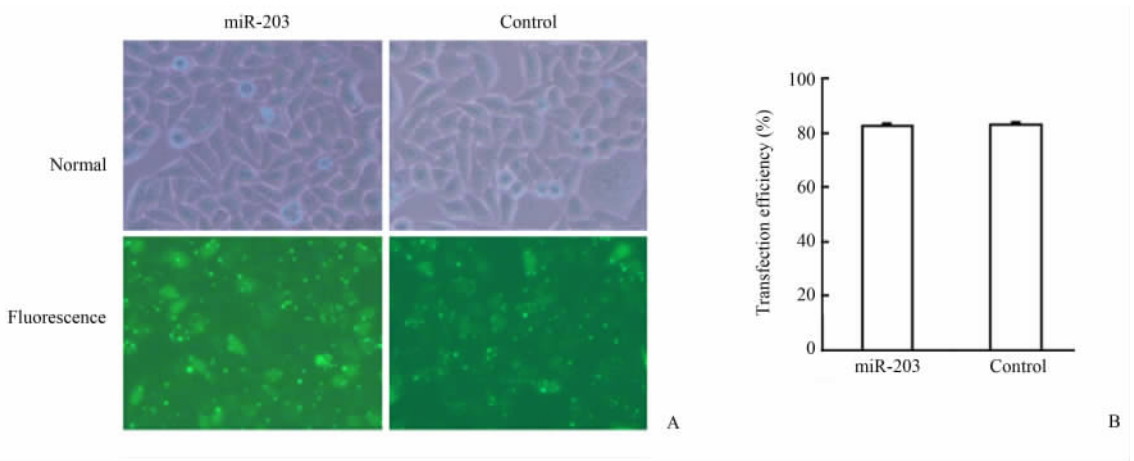


图 1 microRNA 转染 Eca109 细胞效率

Fig 1 Efficiency of microRNA in transfecting Eca109 cells

A: Eca109 cells transfected with miR-203 mimics and control microRNA mimic. Original magnification: $\times 200$. B: Histogram showing the efficiencies of miR-203 mimic and control microRNA mimic in transfecting Eca109 cells. $n=4, \bar{x} \pm s$

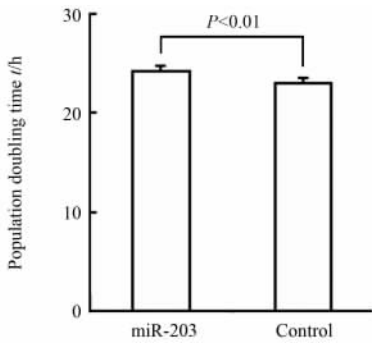


图 2 microRNA 转染 Eca109 后细胞倍增时间

Fig 2 Population doubling time of Eca109 cells transfected with miR-203 mimics and control microRNA mimics

$n=4, \bar{x} \pm s$

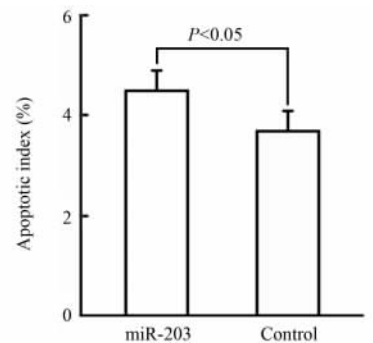


图 3 microRNA 转染 Eca109 后细胞凋亡率

Fig 3 Apoptotic index of Eca109 cells transfected with miR-203 mimics and control microRNA mimics

$n=4, \bar{x} \pm s$

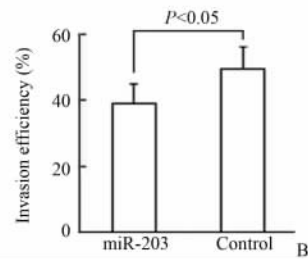
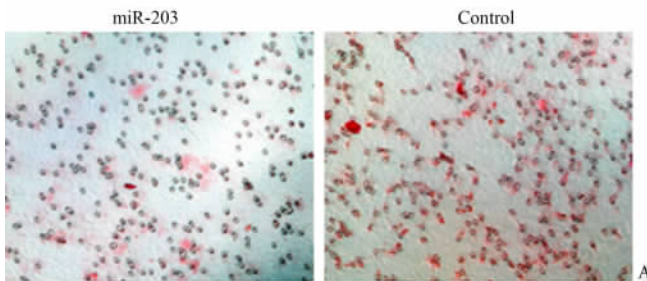


图 4 microRNA 转染 Eca109 后细胞侵袭效率检测

Fig 4 Invasion efficiency of Eca109 cells transfected with microRNA

A: Crystal violet staining of the invasive Eca109 cells transfected with miR-203 mimics and control microRNA mimics. Original magnification: $\times 40$; B: Histogram showing the invasion efficiencies of Eca109 cells transfected miR-203 mimics and control microRNA mimics. $n=4, \bar{x} \pm s$

3 讨论

现有研究表明, microRNA 是一种普遍存在于真核生物中的小分子。在人以及其他模式动物中已

发现的上千条 microRNA 基因中,绝大多数在不同组织以及不同发育阶段中表达水平有差异,即 microRNA 的表达模式具有时间及空间的特异性,提示 microRNAs 在真核基因表达调控中发挥重要作用

用^[3-5]。

在真核生物的 RNA 聚合酶 II 作用下,细胞核内编码 microRNA 的基因转录形成长度为数百碱基的初级产物 pri-micro RNA,初级转录物在 Drasha 酶的作用下进一步被加工成为长度约为 70 bp 单个 pre-microRNA 分子并形成茎环结构^[9],pre-microRNA 由转运蛋白 Exportin-5 转运至胞质后,在 Dicer 酶的作用下被加工形成互补双链 RNA,随后双链解链最终形成成熟 microRNA。成熟的 microRNA 通过与靶基因 mRNA 的互补配对,抑制 mRNA 翻译为蛋白质或在少数情况下直接降解 mRNA,从而在翻译水平上对靶基因的表达进行负调控^[6]。

肿瘤是一种复杂的多基因疾病,在所有肿瘤的发生或发展过程中都可检测到特异基因的过表达或表达缺失。研究表明,已发现的 microRNA 基因中,超过半数定位于原癌基因或抑癌基因的相关遗传区域,从而表现出类似原癌基因或抑癌基因的作用^[10-11]。miR-203 位于人 14 号染色体^[12],在同一区域同时拥有约 12% 已发现的 microRNA 基因^[13]。该区域也是染色体上的不稳定区域,有报道显示该区域的杂合性丢失可能是导致 T 细胞淋巴瘤发生的关键^[14]。进一步研究发现,miR-203 是该区域的 microRNA 基因中唯一在 T 细胞淋巴瘤中表达下调的基因。对食管鳞癌的 microRNA 表达谱分析也发现 miR-203 在癌组织中低表达^[7-8],提示 miR-203 对食管鳞癌的发生发展具有抑制作用。在本研究中,我们通过将 miR-203 模拟物转染至 Eca109 细胞内,结果发现转染后细胞的倍增时间明显延长,凋亡细胞比例明显升高,而侵袭细胞率明显下降,表明 miR-203 可抑制 Eca109 细胞增殖和侵袭能力,提示 miR-203 具有抑癌的功能。

综上所述,miR-203 的低表达可能是食管鳞癌发生中的重要事件,在食管鳞癌发生发展过程中可能具有重要作用,miR203 有望成为食管鳞癌的诊断和进展的分子标志物,也可能是食管鳞癌基因治疗的一个有效靶点。miR-203 通过何种途径参与食管鳞癌的发生发展有待进一步深入的研究。

[参 考 文 献]

- [1] Boyle P, Levin B. World Cancer Report 2008[R]. Lyon: IARC Press, 2008.
- [2] Enzinger P C, Mayer R J. Esophageal cancer[J]. N Engl J Med, 2003, 349: 2241-2252.
- [3] Bartel D P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116: 281-287.
- [4] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004, 431: 350-355.
- [5] He L, Hannon G J. MicroRNAs: small RNAs with a big role gene regulation[J]. Nat Rev Genet, 2004, 5: 52.
- [6] Schickel R, Boyerinas B, Park S M, Peter M E. MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death[J]. Oncogene, 2008, 27: 5959-5974.
- [7] Feber A, Xi L, Luketich J D, Pennathur A, Landreneau R J, Wu M, et al. MicroRNA expression profiles of esophageal cancer [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2008, 135: 255-260.
- [8] Mathé E A, Nguyen G H, Bowman E D, Zhao Y, Budhu A, Schetter A J, et al. MicroRNA expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus: associations with survival[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15: 6192-6200.
- [9] Ruby J G, Jan C H, Bartel D P. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing[J]. Nature, 2007, 448: 83-86.
- [10] Calin G A, Sevignani C, Dumitru C D, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101: 2999-3004.
- [11] Sevignani C, Calin G A, Nnadi S C, Shimizu M, Davuluri R V, Hyslop T, et al. MicroRNA genes are frequently located near mouse cancer susceptibility loci[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104: 8017-8022.
- [12] Bueno M J, Pérez de Castro I, Gómez de Cedrón M, Santos J, Calin G A, Cigudosa J C, et al. Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression[J]. Cancer Cell, 2008, 13: 496-506.
- [13] Davis E, Caiment F, Tordoir X, Cavaille J, Ferguson-Smith A, Cockett N, et al. RNAi-mediated allelic trans-interaction at the imprinted Rtl1/Peg11 locus[J]. Curr Biol, 2005, 15: 743-749.
- [14] Melendez B, Cuadros M, Robledo M, Rivas C, Fernandez-Piqueras J, Martinez-Delgado B, et al. Coincidental LOH regions in mouse and humans: Evidence for novel tumor suppressor loci at 9q22-q34 in non-Hodgkin's lymphomas[J]. Leuk Res, 2003, 27: 627-633.

[本文编辑] 孙 岩