

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00607

miRNA-29c 抑制前列腺癌细胞系 LNCaP 的增殖和侵袭

邓震[△], 唐亮[△], 矫力, 许传亮, 张振声, 曾钦松, 孙颖浩*

第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433

[摘要] **目的** 观察 miRNA-29c(miR-29c)对前列腺癌细胞系 LNCaP 增殖和侵袭能力的影响,探讨其潜在的应用价值。**方法** 采用 qRT-PCR 观察雄激素依赖性(LNCaP)与雄激素非依赖性(LNCaP-AI)前列腺癌细胞中 miR-29c 的表达差异;采用 miR-29c 抑制物(anti-miR-29c)下调 LNCaP 细胞中 miR-29c 的表达量,绘制 LNCaP 细胞生长曲线,利用流式细胞仪测定细胞周期;Transwell 侵袭实验分析 miR-29c 抑制前后 LNCaP 细胞的体外侵袭能力。**结果** qRT-PCR 显示 LNCaP-AI 细胞中 miR-29c 水平明显低于 LNCaP 细胞($P<0.05$);下调 LNCaP 细胞中 miR-29c 的表达量,可明显促进 LNCaP 细胞体外增殖及侵袭能力($P<0.05$)。**结论** miR-29c 的正常表达有利于抑制 LNCaP 细胞的体外增殖和侵袭,有望成为前列腺癌生物治疗的潜在靶点。

[关键词] 前列腺肿瘤;miR-29c;细胞增殖;肿瘤浸润

[中图分类号] R 737.25

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2011)06-0607-05

Inhibitory effect of microRNA-29c on proliferation and invasion of human prostate cancer cell line LNCaP

DENG Zhen[△], TANG Liang[△], JIAO Li, XU Chuan-liang, ZHANG Zhen-sheng, ZENG Qin-song, SUN Ying-hao*

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

[Abstract] **Objective** To observe the effect of microRNA-29c on the proliferation and invasion abilities of human prostate cancer cell line LNCaP, and to discuss its potential application. **Methods** The difference in miR-29c expression between ADPC (androgen-dependent prostate cancer) and AIPC (androgen-independent prostate cancer) cell lines was observed by real time RT-PCR. MiR-29c-inhibitor(anti-miR-29c) was used to decrease miR-29c expression in LNCaP cells; then the cell proliferation was examined with CCK-8 assay, the cell cycle was analyzed using flow cytometry, and the invasive abilities of LNCaP cells were observed by transwell invasion assay before and after treatment with anti-miR-29c. **Results** The result of real-time RT-PCR showed that miR-29c expression in LNCaP-AI cells was significantly lower than that in LNCaP cells ($P<0.05$). Down-expression of miR-29c in LNCaP cells significantly promoted the proliferation and invasion abilities of LNCaP cells ($P<0.05$). **Conclusion** Normal expression of miR-29c plays an inhibitory role in the proliferation and invasion of LNCaP cells, indicating it might be a new target for biotherapy of prostate cancer.

[Key words] prostatic neoplasms;miR-29c;cell proliferation;neoplasm invasiveness

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(6):607-611]

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是许多西方国家男性最常见的恶性肿瘤之一,占男性肿瘤死因的第2位^[1];近年来我国前列腺癌发病率明显上升^[2]。一般情况下,雄激素依赖的前列腺癌在两三年内即转变为雄激素非依赖的前列腺癌,导致抗雄激素治疗失效,最终患者死亡。microRNA(miRNA)是基因转录后调控的重要方式,与机体的生长、发育及肿瘤发生等密切相关。一些关键节点的 miRNA 可能成为潜在的肿瘤调控靶点和分子标志,为肿瘤分子标志研究提供新的手段^[3]。miRNA-29c(miR-29c)

与多种肿瘤的发病相关,包括肝癌^[4]、乳腺癌^[5]、肺鳞状细胞癌^[6]等。因此,本研究观察 miR-29c 在雄激素依赖性(LNCaP)与雄激素非依赖性(LNCaP-AI)前列腺癌细胞中的表达差异,并将 miR-29c 抑制体经脂质体转染入 LNCaP 细胞,观察 miR-29c 抑制体对 LNCaP 细胞增殖和侵袭力的影响。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 激素依赖性前列腺癌细胞系 LNCaP 由德国汉堡大学 Klaus Jung 教授惠赠;

[收稿日期] 2011-03-08

[接受日期] 2011-03-21

[作者简介] 邓震,硕士生. E-mail: dengzhen1201@126.com; 唐亮,硕士,助教、住院医师. E-mail: gold9386@163.com

[△]共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81873406, E-mail: sunyh@medmail.com.cn

激素非依赖性前列腺癌细胞系 LNCaP-AI 参照文献^[7-9]建立;激素非依赖性前列腺癌细胞系 PC-3 由中国科学院上海生命科学研究院提供;RPMI 1640 培养液、无酚红 RPMI 1640 培养液、进口胎牛血清、0.05%含 EDTA 的胰蛋白酶为 Gibco 公司产品;活性炭、葡聚糖处理的胎牛血清购自 Biological Industry 公司 (Israel);脂质体 Lipofectamine 2000、RNA 抽提试剂 TRIzol 为 Invitrogen 公司产品。

1.2 细胞培养 LNCaP 用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养,LNCaP-AI 和 PC-3 用含 10%活性炭、葡聚糖处理的胎牛血清的无酚红 RPMI 1640 培养液在 37℃、5%CO₂ 条件下培养。

1.3 miR-29c 抑制体的合成与转染 miR-29c 抑制物 (anti-miR-29c) 及抑制物阴性对照寡核苷酸 (anti-miR-NC) 购自上海吉玛生物公司,序列分别为 5'-UAA CCG AUU UCA AAU GGU GCU A-3', 5'-CAG UAC UUU UGU GUA GUA CAA-3'。转染步骤按照脂质体 Lipofectamine 2000 试剂盒说明书操作^[10]。

1.4 qRT-PCR 测定 LNCaP、LNCaP-AI 细胞 miR-29c 的表达 用 TRIzol 试剂提取 LNCaP、PC-3、LNCaP-AI 细胞的总 RNA。以茎环法构建 miR-29c 反转录引物,序列为 5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACT AAC CG-3';U6 反转录引物序列为 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'。按照 First-Strand cDNA synthesis kit (# K1621, Fermentas) 步骤,反转录成 cDNA。Real time-PCR 反应体积为 20 μl,其中含 1 μl cDNA,10 μl SYBR Green Mix (2×) (SYBR Green # K0221, Fermentas),1 μl 目的引物 (5 μmol/L),序列为 5'-CGT AGC ACC ATT TGA AAT CGG-3',1 μl miRNA 通用引物 (5 μmol/L),序列为 5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3',7 μl H₂O。扩增条件:95℃ 预变性 10 min;95℃ 变性 15 s,60℃ 退火 30 s,74℃ 延伸 3 s,均扩增 40 个循环周期。定量分析采用 ABI 7500 软件,各组重复 3 次,取其平均值。结果以目标基因与 U6 基因的表达比值表示。U6 引物:上游为 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3',下游为 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3',引物均由 Invitrogen 生物技术有限公司合成。

1.5 细胞生长曲线的绘制 实验分为 3 组:实验组 (转染 anti-miR-29c),阴性对照组 (转染 anti-miR-

NC),正常细胞对照组。分别将转染后的 LNCaP 细胞,按 2×10³个细胞/孔接种于 96 孔培养板,设置 3 个复孔,加 100 μl 含 10%活性炭、葡聚糖处理的胎牛血清的无酚红 RPMI 1640 培养液,模拟去雄激素环境,后移入细胞培养箱,在 37℃、5%CO₂ 及饱和湿度环境下静置培养。分别在培养 1~5 d 呈色。每天每孔加 CCK-8 溶液 (5 mg/ml) 10 μl,移入 37℃、5%CO₂ 孵箱中继续孵育 3 h。用全自动酶标仪测定每孔的光密度 (D) 值,测定波长 450 nm。以时间为横轴,D 值为纵轴描绘细胞生长曲线。

1.6 细胞周期检测 实验分为 3 组:实验组 (转染 anti-miR-29c),阴性对照组 (转染 anti-miR-NC),正常细胞对照组。取 1×10⁶/ml 细胞,用胰酶消化后,离心收集细胞,弃上清,用预冷 PBS 洗涤细胞 2 次,加入预冷 75%乙醇,于 4℃ 固定过夜。离心收集细胞,以 1 ml 的 PBS 洗细胞 2 次,加 500 μl PBS,其中含 50 μg/ml 溴化乙啶 (PI)、100 μg/ml RNase A、0.2% Triton X-100,4℃ 避光孵育 30 min。以标准程序用流式细胞仪检测,一般计数 20 000~30 000 个细胞,结果用细胞周期拟合软件 Mod-Fit 分析。

1.7 细胞侵袭实验 实验分为 3 组:实验组 (转染 anti-miR-29c),阴性对照组 (转染 anti-miR-NC),正常细胞对照组。用 50 mg/L 基质胶 1:8 稀释液包被 Transwell 小室底部膜的上室面,4℃ 风干。消化转染后的细胞用含 BSA 的无血清培养液重悬。调整细胞密度至 1×10⁵/ml。取细胞悬液 200 μl 加入 24 孔板 Transwell 小室。24 孔板下室加入 500 μl 含 15%以活性炭、葡聚糖处理的胎牛血清的无酚红 RPMI 1640 培养液培养 32 h,模拟去雄激素环境。用棉签擦去基质胶和上室内细胞,4%多聚甲醛固定 30 min,0.25%考马斯亮蓝染色 30 min。使用正置显微镜进行观察和拍照,采用 3~5 个视野进行细胞计数,并求平均值,进行统计分析。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件处理数据,各分组所得计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本均数进行单因素方差分析,各均数间的两两比较行 *q* 检验,检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 各细胞系中 miR-29c 的相对表达量 结果 (图 1) 表明:LNCaP-AI、PC-3 细胞 miR-29c 的表达量明显低于 LNCaP 细胞 ($P < 0.05$),与预期结果基本吻合。

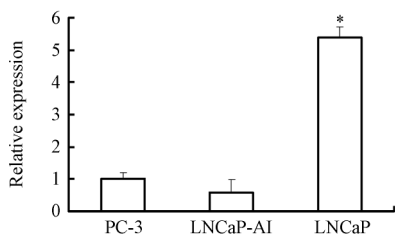


图 1 miR-29c 在 PC-3、LNCaP-AI 和 LNCaP 3 种细胞系中的相对表达量

Fig 1 Relative expression of miR-29c in PC-3, LNCaP-AI, and LNCaP cells

* $P < 0.05$ vs PC-3 and LNCaP-AI cell; $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.2 miR-29c 转染后 LNCaP 细胞 miR-29c 的相对表达量 qRT-PCR 检测结果(图 2)显示:anti-miR-29c 可明显降低 LNCaP 细胞内 miR-29c 的含量,与 miR-NC 相比可降低 70% ($P < 0.05$)。

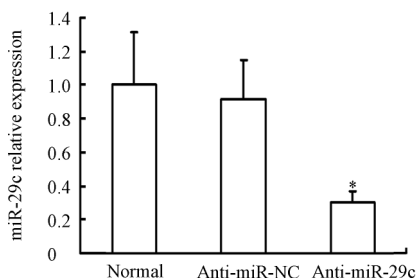


图 2 miR-29c 抑制物降低 LNCaP 细胞内 miR-29c 的表达
Fig 2 Anti-miR-29c decreased expression of miR-29c in LNCaP cells

* $P < 0.05$ vs normal and anti-miR-NC; $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.3 miR-29c 抑制物对 LNCaP 细胞增殖的影响 CCK-8 结果(图 3)显示:阴性对照组与正常细胞对照组 LNCaP 细胞增殖无差异;与阴性对照组相比,实验组 LNCaP 细胞增殖增强 ($P < 0.05$)。结果表明抑制 miR-29c 可增强 LNCaP 细胞在去雄激素环境下的增殖能力。

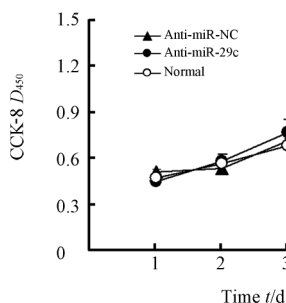


图 3 miR-29c 抑制物促进 LNCaP 细胞增殖
Fig 3 Anti-miR-29c promoted proliferation of LNCaP cells

* $P < 0.05$ vs normal and anti-miR-NC; $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.4 miR-29c 抑制物对 LNCaP 细胞周期的影响 结果(图 4)发现:实验组 S+G₂/M 期细胞占 (42.17 ± 0.426)%, 高于阴性对照组 LNCaP 细胞 [(23.64 ± 1.000)%], 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果提示抑制 LNCaP 细胞 miR-29c 表达明显促进了 LNCaP 细胞生长。

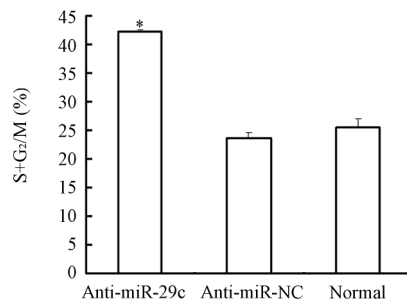


图 4 miR-29c 抑制物对 LNCaP 细胞周期的影响
Fig 4 Flow cytometry assay of cell cycle of anti-miR-29c-treated LNCaP cells

* $P < 0.05$ vs normal and anti-miR-NC; $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.5 miR-29c 抑制物对 LNCaP 细胞侵袭能力的影响 Transwell 实验结果(图 5)表明:转染了 anti-miR-29c 的 LNCaP 细胞穿过滤膜的数量多于转染 anti-miR-NC 的细胞 (63.0 ± 4.6 vs 32.3 ± 2.5, $P < 0.05$)。结果说明抑制 miR-29c 表达可上调 LNCaP 细胞的侵袭能力。

2.6 miR-29c 靶基因的生物信息学预测及主要功能分析 运用生物信息学方法,在 microRNA 权威网站 www.mirbase.org 搜索 miR-29c 调控的靶基因,发现理论上与其结合的靶基因有 684 个,结合 GenBank 数据库得到相关靶基因的信息。预测结果(表 1)显示:miR-29c 调节的靶基因范围非常广泛,包括与细胞增殖和细胞周期相关基因、原癌基因 (RAB30、Bcl-2 等)、抑癌基因 (DBC1 等)、细胞信号和转导蛋白基因、肿瘤坏死因子等各个方面。

3 讨论

肿瘤的发生和发展是由于基因突变不断积累,导致抑癌基因的失活和致癌基因的活化,改变了正常细胞的生物学行为而恶变。miRNA 在转录后水平通过结合在 mRNA 3'-UTR 区域调控人体内近 30% 的基因表达^[3]。这其中就包含着众多的癌基因和抑癌基因。Cimmino 等^[11]发现 miR-15 和 miR-16 通过转录后抑制抗凋亡基因 Bcl-2 诱导凋亡,二者的缺失可导致慢性淋巴细胞性白血病的发生。因此,miR-15 和 miR-16 被认为是一种抑癌基因。后

来研究发现 miR-15 和 miR-16 基因位于染色体 13q14 区域,而 13 号染色体短臂一些等位基因的缺失与前列腺癌的发生发展密切相关^[12-13]。Bonci 等^[14]通过敲除前列腺癌细胞 miR-15 和 miR-16 的

表达,证明 miR-15 和 miR-16 的缺失可以增强前列腺癌细胞增殖及侵袭等恶性生物学行为的能力,并认为二者是前列腺癌的抑癌基因,为临床寻找诊断治疗前列腺癌的生物靶标提供了重要依据。

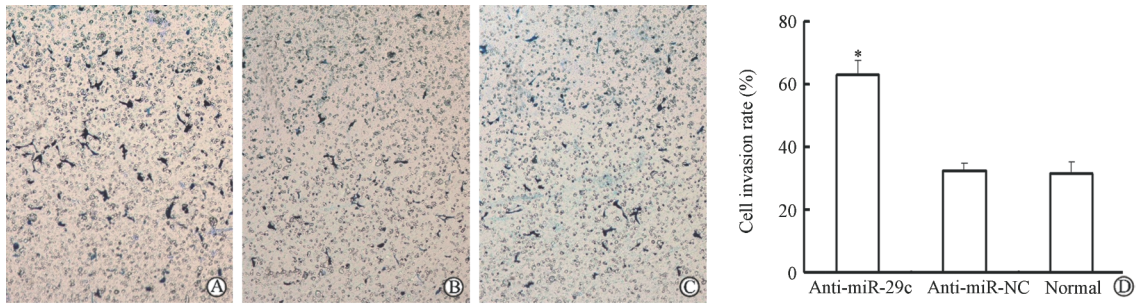


图 5 miR-29c 抑制物增强 LNCaP 细胞的侵袭能力

Fig 5 Anti-miR-29c enhanced invasive ability of LNCaP cells

A: Anti-miR-29c-treated LNCaP cells; B: Anti-miR-NC-treated LNCaP cells; C: Untreated LNCaP cells (normal). Original magnification: × 200. D: The statistical graph of cells invaded. * P<0.05 vs normal and anti-miR-NC; n=3, $\bar{x} \pm s$

表 1 miR-29c 调控的部分靶基因
Tab 1 Some target genes of miR-29c

| Gene number | Gene name | Function |
|-------------|-----------|-------------------------------|
| 004295 | TRAF4 | Activate NF-κB |
| 001418 | DBC1 | Anti-oncogene |
| 001003943 | BMF | Bcl-2 modifying factor |
| 001259 | CDK6 | Regulate cell cycle |
| 005259 | GDF8 | Regulate cell differentiation |
| 001448 | RAB30 | Proto-oncogene |

miR-29c 最早是在血液系统疾病中被 Yu 等^[15]发现与疾病相关,之后大量的文献报道了 miR-29c 参与多种疾病或病理状态的发生发展过程,如糖尿病^[16]、鼻咽癌^[17]、膀胱癌^[18]、子宫内膜癌^[19]、黑色素瘤^[20]等。Stamatopoulos 等^[21]针对 110 例患者长达平均 72 个月的随访发现:miR-29c 可作为慢性淋巴细胞白血病的预后指标,但未做功能性研究。Pass 等^[22]也证明 miR-29c 可作为恶性胸膜间皮瘤独立的预后评估因子,并在细胞水平上证实了过表达可降低肿瘤细胞的增殖、侵袭、迁移和克隆生长,与本研究结果相符。

国内目前对 miR-29c 的研究较少,特别是 miR-29c 在前列腺癌方面的研究鲜见报道。本实验在雄激素依赖性和雄激素非依赖性细胞系中验证了 miR-29c 的差异表达,预测 miR-29c 可能在前列腺癌的疾病进展中发挥重要作用。细胞生长曲线(CCK-8 试验)证明:下调 miR-29c 在前列腺癌细胞中的表达,可促进其增殖,经拟合曲线计算,实验组

的增长速率为对照组的近 1.7 倍。流式细胞检测结果显示实验组比对照组的 S+G₂/M 期细胞明显增多,进一步证明了 anti-miR-29c 具有促进增殖的作用。转染后 24 h,即在不影响细胞活性的时间点进行 Transwell 侵袭实验检测细胞的侵袭能力。结果发现,抑制 miR-29c 后,穿过滤膜的细胞数是对照组的 2 倍 (P<0.05)。结果提示 miR-29c 具有抑制 LNCaP 细胞侵袭的能力。此外,本研究还通过生物信息学检索,对 miR-29c 的下游靶基因功能进行了预测,找到了一些与肿瘤发生发展相关的重要基因,为将来的机制研究提供了有力依据。

综上所述,miR-29c 的正常表达有利于抑制 LNCaP 细胞的增殖和侵袭,可作为前列腺癌生物治疗的潜在靶点。

[参考文献]

- [1] Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006[J]. Ann Oncol, 2007, 18: 581-592.
- [2] 叶定伟. 前列腺癌的流行病学和中国的发病趋势[J]. 中华外科杂志, 2006, 44: 362-364.
- [3] Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev K G, Tuschl T, Manoharan M, et al. Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs'[J]. Nature, 2005, 438: 685-689.
- [4] Chiang C W, Huang Y, Leong K W, Chen L C, Chen H C, Chen S J, et al. PKCalpha mediated induction of miR-101 in human hepatoma HepG2 cells[J]. J Biomed Sci, 2010, 17: 35.
- [5] Yan L X, Huang X F, Shao Q, Huang M Y, Deng L, Wu Q L, et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is

- associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis[J]. *RNA*, 2008, 14:2348-2360.
- [6] Gao W, Shen H, Liu L, Xu J, Xu J, Shu Y. MiR-21 overexpression in human primary squamous cell lung carcinoma is associated with poor patient prognosis[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137:557-566.
- [7] Xu B, Sun Y, Tang G, Xu C, Wang L, Zhang Y, et al. Id-1 expression in androgen-dependent prostate cancer is negatively regulated by androgen through androgen receptor[J]. *Cancer Lett*, 2009, 278:220-229.
- [8] 纪家涛, 许传亮, 叶华茂, 周铁, 汤元杰, 孙颖浩. 激素递减法成功建立雄激素非依赖性 LNCaP 细胞亚系[J]. *第二军医大学学报*, 2008, 29:1311-1315.
Ji J T, Xu C L, Ye H M, Zhou T, Tang Y J, Sun Y H. Establishment of androgen-independent human prostate cancer line LNCaP by gradual deprivation of hormone[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2008, 29:1311-1315.
- [9] 叶华茂, 孙颖浩, 许传亮, 王林辉, 侯建国, 高旭, 等. 雄激素非依赖性前列腺癌细胞亚系模型 LNCaP-AI 的建立[J]. *第二军医大学学报*, 2008, 29:59-62.
Ye H M, Sun Y H, Xu C L, Wang L H, Hou J G, Gao X, et al. Establishment of androgen-independent human prostate cancer cell line model LNCaP-AI[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2008, 29:59-62.
- [10] Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki E C, Tilkins M L, Price P J, et al. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent; primary neurons, siRNA, and high-throughput applications[J]. *Methods*, 2004, 33:95-103.
- [11] Cimmino A, Calin G A, Fabbri M, Iorio M V, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102:13944-13949.
- [12] Hyytinen E R, Frierson H F Jr, Boyd J C, Chung L W, Dong J T. Three distinct regions of allelic loss at 13q14, 13q21-22, and 13q33 in prostate cancer[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 1999, 25:108-114.
- [13] Dong J T, Boyd J C, Frierson H F Jr. Loss of heterozygosity at 13q14 and 13q21 in high grade, high stage prostate cancer[J]. *Prostate*, 2001, 49:166-171.
- [14] Bonci D, Coppola V, Musumeci M, Addario A, Giuffrida R, Memeo L, et al. The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities[J]. *Nat Med*, 2008, 14:1271-1277.
- [15] Yu J, Wang F, Yang G H, Wang F L, Ma Y N, Du Z W, et al. Human microRNA clusters: genomic organization and expression profile in leukemia cell lines[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 349:59-68.
- [16] He A, Zhu L, Gupta N, Chang Y, Fang F. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes[J]. *Mol Endocrinol*, 2007, 21:2785-2794.
- [17] Sengupta S, den Boon J A, Chen I H, Newton M A, Stanhope S A, Cheng Y J, et al. MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105:5874-5878.
- [18] Wang G, Zhang H, He H, Tong W, Wang B, Liao G, et al. Up-regulation of microRNA in bladder tumor tissue is not common[J]. *Int Urol Nephrol*, 2010, 42:95-102.
- [19] Castilla M A, Moreno-Bueno G, Romero-Pérez L, De Vijver K V, Biscuola M, López-García M A, et al. Micro-RNA signature of the epithelial-mesenchymal transition in endometrial carcinoma[J]. *J Pathol*, 2011, 223:72-80.
- [20] Nguyen T, Kuo C, Nicholl M B, Sim M S, Turner R R, Morton D L, et al. Downregulation of microRNA-29c is associated with hypermethylation of tumor-related genes and disease outcome in cutaneous melanoma[J]. *Epigenetics*, 2011, 6:388-394.
- [21] Stamatopoulos B, Meuleman N, Haibe-Kains B, Saussoy P, Van Den Neste E, Michaux L, et al. microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has *in vivo* significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification[J]. *Blood*, 2009, 113:5237-5245.
- [22] Pass H I, Goparaju C, Ivanov S, Donington J, Carbone M, Hoshen M, et al. hsa-miR-29c* is linked to the prognosis of malignant pleural mesothelioma[J]. *Cancer Res*, 2010, 70:1916-1924.

[本文编辑] 贾泽军