

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00001

## 微小 RNA 分子 miR-214 对食管鳞癌细胞 Eca109 侵袭能力的影响

韩庆奇<sup>1</sup>, 姚 烽<sup>2</sup>, 徐同毅<sup>1</sup>, 徐志云<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433

2. 上海交通大学医学院附属上海市胸科医院胸外科, 上海 200030

**[摘要]** **目的** 探讨微小 RNA 分子 miR-214 对食管鳞癌细胞 Eca109 侵袭能力的影响及其可能的分子机制。**方法** 根据人源 miR-214 序列合成双链模拟物。通过脂质体转染将 miR-214 模拟物分子导入食管鳞癌 Eca109 细胞中, 转染无关 miRNA 模拟物作为对照。采用定量 PCR 法检测细胞中成熟 miR-214 分子水平, 以 Matrigel 包被的 Transwell 实验测定侵袭细胞率, 通过蛋白质印迹法检测细胞中 E-钙黏蛋白(E-cadherin)的表达, 利用流式细胞术检测 E-cadherin 阳性细胞率。**结果** Eca109 细胞转染 miR-214 模拟物 48 h 后, 其成熟 miR-214 水平较对照组明显上升( $P < 0.01$ ); 细胞侵袭能力较对照组降低( $P < 0.05$ )。同时, miR-214 转染组的 E-cadherin 表达水平及 E-cadherin 阳性细胞率较对照组下降( $P < 0.05$ )。**结论** miR-214 可能通过抑制细胞上皮间质转化(EMT)的方式抑制食管鳞癌细胞的侵袭能力。

**[关键词]** 微 RNAs; 食管肿瘤; 鳞状细胞癌; 肿瘤浸润; 上皮间质转化

**[中图分类号]** R 735.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2013)01-0001-05

### Effect of miR-214 on invasive capacity of esophageal squamous carcinoma cell line Eca109

HAN Qing-qi<sup>1</sup>, YAO Feng<sup>2</sup>, XU Tong-yi<sup>1</sup>, XU Zhi-yun<sup>1\*</sup>

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

2. Department of Thoracic Surgery, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200030, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of miR-214 on the invasive capacity of esophageal squamous carcinoma cell line Eca109, and to explore the possible molecular mechanism. **Methods** We prepared miR-214 double-stranded mimic and transfected it into Eca109 cells with Lipofectamine 2000. Eca109 cells transfected with nonsense miRNA mimics were taken as control. The expression of mature miR-214 was determined by qPCR. The capacity of cell invasion was determined by Matrigel-coated Transwell assay. E-cadherin protein expression and the percentage of E-cadherin positive cells were examined by Western blotting analysis and flow cytometry, respectively. **Results** The expression level of mature miR-214 in the miR-214 mimic transfection group was significantly higher than that in the control group 48 h after transfection ( $P < 0.01$ ). Eca109 cells transfected with miR-214 mimic showed a significantly lower cell invasive capacity compared to that of cells transfected with control miRNA mimic ( $P < 0.05$ ). Moreover, E-cadherin protein expression and the ratio of E-cadherin positive cells in miR-214 mimic transfection group were both significantly lower than those in the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Our data suggest that miR-214 may inhibit the invasive capacity of esophageal squamous carcinoma cells by repressing the epithelial-mesenchymal transition.

**[Key words]** microRNAs; esophageal neoplasms; squamous cell carcinoma; neoplasm invasiveness; epithelial-mesenchymal transition

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(1):1-5]

食管鳞癌是我国高发的恶性肿瘤之一。我国每年食管癌新发病例数超过 25 万例, 占全世界新发病例总数的一半以上, 其中超过 90% 为食管鳞癌患

者<sup>[1]</sup>。肿瘤复发、转移是导致食管鳞癌患者术后长期生存率低下的主要因素<sup>[1-2]</sup>。以往研究发现食管鳞癌细胞淋巴结转移是影响患者预后的重要指

**[收稿日期]** 2012-12-01

**[接受日期]** 2013-01-04

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30872552)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30872552)。

**[作者简介]** 韩庆奇, 博士, 讲师、主治医师。E-mail: handoctor@gmail.com

\* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-31161741, E-mail: zhiyunxu@smmu.edu.cn

标<sup>[3-4]</sup>。因此,研究调控食管鳞癌转移发生的机制并进而对食管鳞癌进行有效的生物治疗,将有助于改善其目前临床治疗远期效果不佳的现状<sup>[2]</sup>。微小RNA(microRNA, miRNA)是一种内源性小分子非编码RNA,主要通过抑制mRNA的翻译从而下调靶基因的表达<sup>[5]</sup>。miRNA在细胞增殖、分化、新陈代谢及凋亡等过程发挥重要作用<sup>[5-6]</sup>,许多miRNA还参与了肿瘤的发生发展<sup>[7]</sup>。MiR-214最初被发现与细胞凋亡调控相关<sup>[8]</sup>,随后的研究发现miR-214在细胞老化及分化过程中也发挥重要作用<sup>[9-10]</sup>。临床统计分析显示miR-214表达水平与食管鳞癌淋巴结转移负相关,提示miR-214参与调控食管鳞癌细胞的侵袭转移<sup>[9]</sup>。为了进一步研究miR-214是否具有调控食管鳞癌细胞侵袭转移的作用,本研究以食管鳞癌细胞株Eca109为研究对象,设计并合成了miR-214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培养基、胎牛血清(FBS)及Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司,Transwell小室购自BD公司,Matrigel购自Sigma公司。MiRNA反转录及定量PCR试剂盒购自TaKaRa公司。人miR-214双链模拟物合成:检索miRNA在线文库(<http://www.mirbase.org>),按照人源miR-214的序列,设计正义链(5'-gugaauguuuaggaccacuag-3')和反义链(5'-ccagugguucuaacaguuaac-3');与人源microRNA无同源性的RNA双链(基于线虫miRNA,正义链5'-acagcaggcacagacaggcagu-3',反义链5'-acugccugucugugccugcugu-3')作为对照。miR-214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miRNA双链模拟物由上海吉玛制药技术有限公司合成。

1.2 细胞培养 Eca109细胞使用DMEM(含10% FBS)培养液,5% CO<sub>2</sub>、37℃条件下培养。细胞培养至对数生长期用于细胞转染实验。

1.3 细胞转染 处于对数生长期的Eca109细胞,于转染前1 d以3×10<sup>5</sup>/孔的密度接种至6孔板。转染前,240 μL无血清DMEM培养液中加入10 μL Lipofectamine 2000,混匀后37℃温育5 min,随后取miRNA模拟物双链分子0.5 μg溶于适量无血清培

养液至终体积250 μL,将上述溶液混合,室温下静置20 min;将6孔板中的细胞用无血清DMEM培养液冲洗2次后,加入2 mL无血清DMEM培养液,将混合液逐滴加入孔中,摇动培养板,轻轻混匀。5% CO<sub>2</sub>、37℃,培养6 h,随后更换为含10% FBS的DMEM培养液,5% CO<sub>2</sub>、37℃培养24 h,取2×10<sup>4</sup>细胞通过流式细胞仪检测转染效率。

1.4 MiR-214表达水平检测 Eca109细胞转染miR-214双链模拟物及对照miRNA模拟物后48 h收集细胞,以TRIzol裂解细胞并抽提总RNA。取500 ng总RNA以miRNA反转录试剂盒行反转录。SYBR法定量检测细胞内成熟miR-214的表达水平。定量PCR反应体系:SYBR Premix 10 μL,10 μmol/L正反向引物各0.4 μL,反转录产物1 μL,补充去离子水至反应体系20 μL。反应条件:95℃变性60 s;随后95℃ 5 s,60℃ 20 s,共40个循环。以U6表达水平作为内参,通过2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法比较不同细胞间miR-214相对含量。

1.5 细胞侵袭能力检测 Matrigel(5 μg/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的膜的下室面预涂纤连蛋白(fibronectin, 10 μg/mL),37℃静置2 h。PBS漂洗1次后,放入预先每孔加有600 μL培养液(含10%血清)的24孔板内,随后在Transwell的内室加入100 μL Eca109细胞悬液(培养液含0.1%血清,细胞密度为1×10<sup>4</sup>/孔),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。

1.6 E-cadherin表达检测 收集转染后48 h的Eca109细胞,加入细胞裂解液[(50 mmol/L Tris(pH 8.0),5 mmol/L EDTA,150 mmol/L NaCl,0.5% NP-40,10 mmol/L PMSF,1 mmol/L DTT,1 mg/mL抑肽酶),提取细胞总蛋白,BCA法检测总蛋白浓度。取20 μg总蛋白行12% SDS聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳。采用半干法将胶中蛋白转印至PVDF膜。以5%的脱脂牛奶常温封闭2 h,加入TBST稀释的小鼠抗人E-cadherin单克隆抗体,4℃过夜。取出后以TBST洗膜3次。随后加入HRP标记的山羊抗小鼠二抗,室温孵育2 h, TBST洗膜3次,增强型化学发光显影。采用图像分析软件进行

条带光密度扫描分析 E-cadherin 相对  $\beta$ -actin 的表达丰度。

1.7 E-cadherin 阳性细胞比例检测 Eca109 细胞转染 miR-214 及对照 miRNA 后 48 h, 收集细胞重悬于 500  $\mu$ L 缓冲液 A (100 mmol/L PBS, 0.5% BSA)。细胞与 FITC 标记的小鼠抗人 E-cadherin 单克隆抗体室温孵育 1 h。随后细胞用缓冲液 A 洗涤 2 次后重悬于 500  $\mu$ L 缓冲液 A 中, 上流式细胞仪检测。

1.8 统计学处理 数据采用 SPSS 15.0 软件分析, 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两样本均数比较采用独立样本  $t$  检验, 检验水平 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 miR-214 双链模拟物转染后 Eca109 胞内成熟 miR-214 的表达丰度 FAM 标记的 miR-214 模拟物及 miRNA 阴性对照转染食管鳞癌细胞 Eca109, 培养 24 h 后流式细胞仪检测显示转染后荧光细胞比例分别为  $(81.7 \pm 3.5)\%$  和  $(79.9 \pm 2.5)\%$ , 提示两组转染率接近(图 1)。Eca109 细胞转染 48 h 后, 定量 PCR 检测显示 miR-214 双链转染组中成熟 miR-214 表达水平为对照组的 87.6 倍(图 2), 证实 miR-214 双链模拟物转染 Eca109 细胞后显著提高了胞内成熟 miR-214 的丰度。

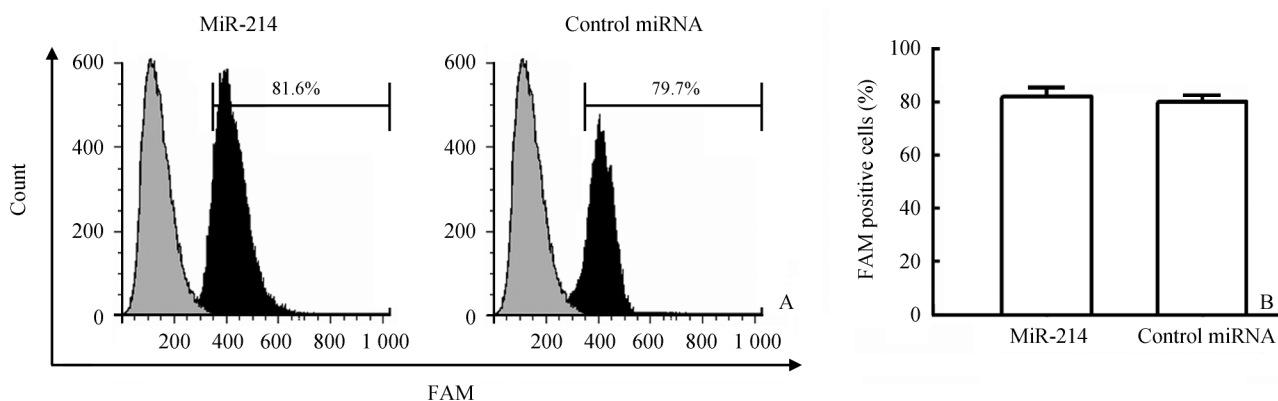


图 1 MiRNA 双链模拟物转染 Eca109 细胞效率

Fig 1 Efficiency of miRNA double-strand mimics transfecting Eca109 cells

A: Flow cytometry analysis of Eca109 cells transfected with FAM labeled miR-214 mimic and control miRNA mimic; B: Transfecting efficiency of miR-214 mimic and control miRNA mimic into Eca109 cells.  $n=4$ ,  $\bar{x} \pm s$

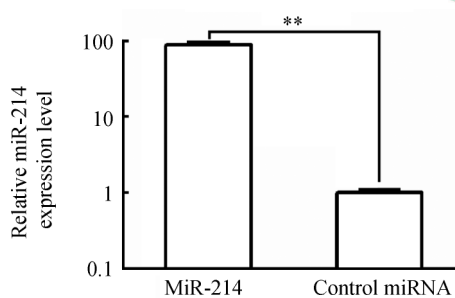


图 2 MiRNA 双链模拟物转染 Eca109 细胞后 miR-214 相对表达水平检测

Fig 2 MiR-214 expression level in Eca109 cells transfected with miR-214 mimic and control miRNA mimic

\*\*  $P < 0.01$ .  $n=4$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.2 miR-214 双链模拟物转染后 Eca109 细胞侵袭能力的变化 Eca109 细胞转染 miRNA 48 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-214 转染组的侵袭细胞率为  $(7.8 \pm 1.0)\%$ , 低于对照组的  $(11.1 \pm 1.6)\%$  ( $P < 0.05$ , 图 3), 提示 miR-214 具有抑制 Eca109 细胞侵袭的作用。

2.3 miR-214 双链模拟物转染后 Eca109 细胞 E-cadherin 的表达 为了探讨 miR-214 是否调控食管鳞癌细胞上皮间质转化(EMT)的发生, Eca109 细胞转染 miRNA 48 h 后, 我们通过蛋白质印迹法检测各组细胞 E-cadherin 的表达。结果显示 miR-214 转染组细胞 E-cadherin 相对  $\beta$ -actin 的表达水平为  $0.13 \pm 0.03$ , 高于对照组的  $0.07 \pm 0.02$  ( $P < 0.05$ , 图 4)。同时, 我们通过流式细胞术检测各组细胞中 E-cadherin 阳性细胞率, 结果显示 miR-214 转染组 E-cadherin 阳性细胞率为  $(9.4 \pm 1.6)\%$ , 高于对照组的  $(6.0 \pm 1.1)\%$  ( $P < 0.05$ , 图 5)。上述结果提示 miR-214 具有抑制食管鳞癌细胞 EMT 发生的功能。

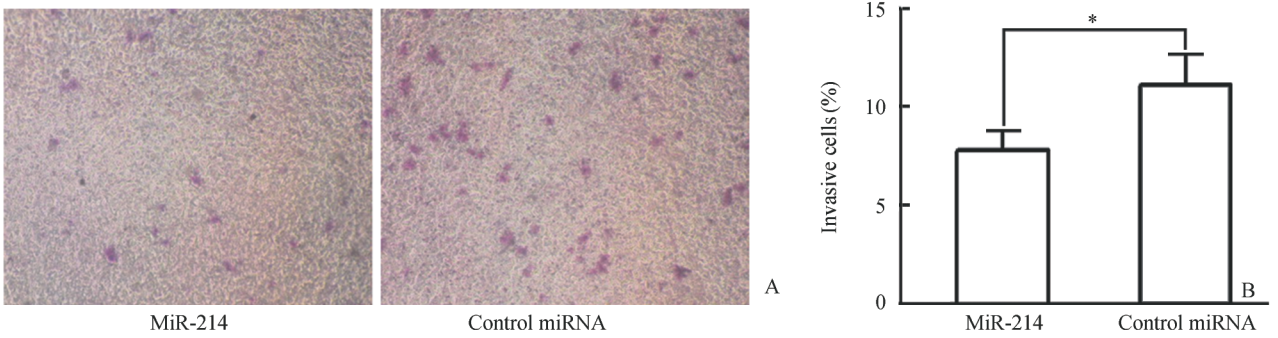


图3 MiRNA双链模拟物转染Eca109后细胞侵袭效率检测

Fig 3 Invasion efficiency of Eca109 cells transfected with miRNA mimics

A: Crystal violet staining invasion of Eca109 cells transfected with miR-214 mimic and control miRNA mimic; B: Invasion efficiency of Eca109 cells transfected with miR-214 mimic and control miRNA mimic. \*  $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$

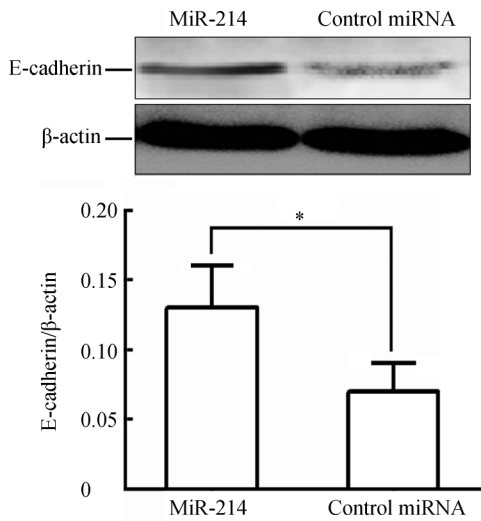


图4 MiRNA转染Eca109后E-cadherin蛋白表达检测

Fig 4 E-cadherin protein expression level in Eca109 cells transfected with miRNA mimics

\*  $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$

### 3 讨论

MiR-214在多种肿瘤组织中表达异常,并通过影响不同靶基因的翻译参与调控肿瘤细胞的增殖、凋亡及耐药等性质<sup>[11-14]</sup>。但miR-214在不同类型肿瘤组织中的变化趋势截然不同,如Zhang等<sup>[12]</sup>发现miR-214在胰腺癌中的表达较对应癌旁组织显著升高,Yang等<sup>[13]</sup>报道miR-214在人卵巢癌组织也呈高表达,并发现miR-214可能通过靶向抑制抑癌基因PTEN表达进而抑制癌细胞凋亡,同时增强癌细胞对化疗药物的耐受能力;而与之相反,Derfoul等<sup>[14]</sup>发现miR-214在乳腺癌组织中表达较对应癌旁组织显著下降,细胞学实验也证实miR-214具有抑制乳腺癌细胞增殖、侵袭的功能。在食管鳞癌中,Huang等<sup>[11]</sup>报道miR-214在癌组织中的表达水平显著低于癌旁组织,同时发现miR-214表达与食管鳞癌淋巴结转移负相关,提示miR-214参与调控食管

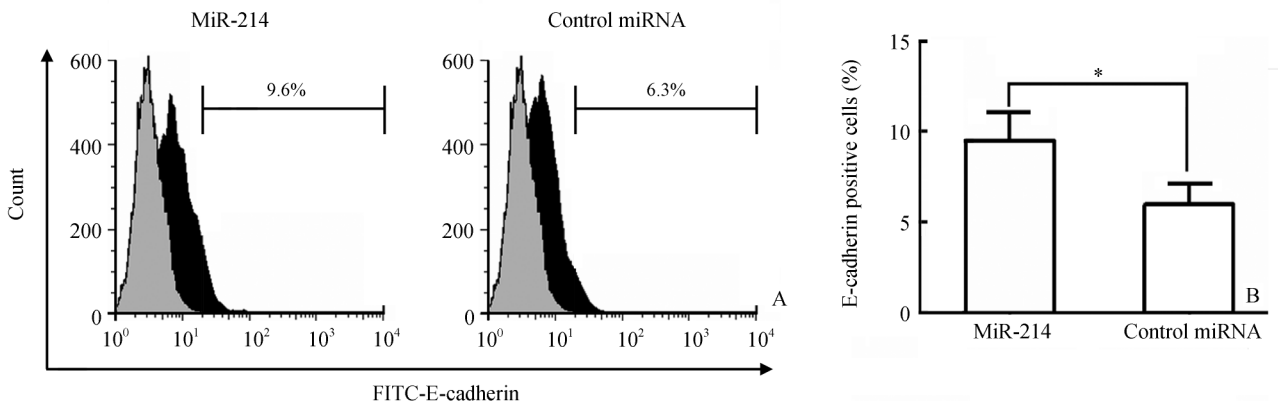


图5 MiRNA转染Eca109后E-cadherin阳性细胞率检测

Fig 5 The percentage of E-cadherin positive cells in Eca109 cells transfected with miRNA mimics

A: Flow cytometry analysis of the percentage of E-cadherin positive cells in Eca109 cells transfected with FAM labeled miR-214 mimic and control miRNA mimic; B: The percentage of E-cadherin positive cells in Eca109 cells transfected with miR-214 mimic and control miRNA mimic. \*  $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$

鳞癌细胞的侵袭转移。本研究通过 Matrigel 包被的 Transwell 小室实验检测转染 miR-214 双链模拟物后食管鳞癌细胞的侵袭细胞率, 结果显示 miR-214 能显著抑制食管鳞癌细胞的侵袭能力, 进一步提示在食管鳞癌中 miR-214 发挥了抑癌基因的功能。

EMT 是指上皮细胞在形态学上转变为间充质细胞表型的过程<sup>[15]</sup>。EMT 与肿瘤的发生发展密切相关, 在包括食管鳞癌在内的众多上皮性肿瘤中, 体内外实验均证实经历 EMT 的肿瘤细胞侵袭、转移能力显著增强, 病理研究也发现实体瘤中央的肿瘤细胞往往呈现上皮表型, 而周围及侵袭前沿处的细胞多呈现间质细胞表型, 提示 EMT 是肿瘤侵袭和转移发生的早期事件<sup>[16-17]</sup>。E-cadherin 作为维持上皮细胞极性及其细胞间黏附连接的主要分子, 被认为是判断细胞是否发生 EMT 的重要分子标记<sup>[18]</sup>。在本研究中, 我们发现转染 miR-214 双链模拟物具有显著上调食管鳞癌细胞 E-cadherin 表达水平及 E-cadherin 阳性细胞率的作用, 提示 miR-214 能够抑制食管鳞癌细胞 EMT 的发生。

综上所述, 我们证明了 miR-214 具有抑制食管鳞癌细胞侵袭的作用, 同时观察到 miR-214 显著增强食管鳞癌细胞中 E-cadherin 的表达, 提示 miR-214 可能通过抑制食管鳞癌细胞 EMT 的方式进而抑制其侵袭转移。但 miR-214 调控食管鳞癌 EMT 发生的分子机制仍有待进一步研究。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61: 69-90.
- [2] Kim T, Grobmyer S R, Smith R, Ben-David K, Ang D, Vogel S B, et al. Esophageal cancer: the five year survivors[J]. *J Surg Oncol*, 2011, 103: 179-183.
- [3] Xie F, Li K, Ouyang X. Twist, an independent prognostic marker for predicting distant metastasis and survival rates of esophageal squamous cell carcinoma patients [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2009, 26: 1025-1032.
- [4] Hsu W H, Hsu P K, Hsieh C C, Huang C S, Wu Y C. The metastatic lymph node number and ratio are independent prognostic factors in esophageal cancer [J]. *J Gastrointest Surg*, 2009, 13: 1913-1920.
- [5] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116: 281-287.
- [6] He L, Hannon G J. MicroRNAs: small RNAs with a big role gene regulation [J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5: 522-531.
- [7] Shenouda S K, Alahari S K. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2009, 28: 369-378.
- [8] Cheng A M, Byrom M W, Shelton J, Ford L P. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 1290-1297.
- [9] Maes O C, An J, Sarojini H, Wang E. Murine microRNAs implicated in liver functions and aging process [J]. *Mech Ageing Dev*, 2008, 129: 534-541.
- [10] Flynt A S, Li N, Thatcher E J, Solnica-Krezel L, Patton J G. Zebrafish miR-214 modulates Hedgehog signaling to specify muscle cell fate [J]. *Nat Genet*, 2007, 39: 259-263.
- [11] Huang S D, Yuan Y, Zhuang C W, Li B L, Gong D J, Wang S G, et al. MicroRNA-98 and microRNA-214 post-transcriptionally regulate enhancer of zeste homolog 2 and inhibit migration and invasion in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Mol Cancer*, 2012, 11: 51.
- [12] Zhang X J, Ye H, Zeng C W, He B, Zhang H, Chen Y Q. Dysregulation of miR-15a and miR-214 in human pancreatic cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2010, 3: 46.
- [13] Yang H, Kong W, He L, Zhao J J, O'Donnell J D, Wang J, et al. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN [J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 425-433.
- [14] Derfoul A, Juan A H, Difilippantonio M J, Palanisamy N, Ried T, Sartorelli V. Decreased microRNA-214 levels in breast cancer cells coincides with increased cell proliferation, invasion and accumulation of the Polycomb Ezh2 methyltransferase [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32: 1607-1614.
- [15] Thiery J P, Acloque H, Huang R Y, Nieto M A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease [J]. *Cell*, 2009, 139: 871-890.
- [16] Sethi S, Macoska J, Chen W, Sarkar F H. Molecular signature of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human prostate cancer bone metastasis [J]. *Am J Transl Res*, 2010, 3: 90-99.
- [17] Labelle M, Begum S, Hynes R O. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis [J]. *Cancer Cell*, 2011, 20: 576-590.
- [18] Zeisberg M, Neilson E G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119: 1429-1437.