

上调 miRNA-100 对胃癌 SGC-7901 细胞侵袭和转移的影响

李辉成¹, 刘素菊², 刘丽波¹, 徐振国¹, 贯海燕¹, 张凯¹

1. 吉林大学第四医院血液肿瘤科, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学第四医院妇产科, 吉林 长春 130021

摘要: **目的** 探讨微小核糖核酸(miRNA)-100 对人胃癌 SGC-7901 细胞侵袭、转移能力的影响。**方法** 体外培养人胃癌 SGC-7901 细胞,将细胞分为空白对照组、阴性对照组和 miRNA-100 转染组。应用脂质体法,miRNA-100 转染组、阴性对照组分别用构建的 miRNA 模拟物、阴性对照转染 SGC-7901 细胞。采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测各组细胞中 miRNA-100 的表达水平,细胞划痕实验检测细胞的迁移能力,Transwell 实验检测细胞的侵袭能力。**结果** RT-PCR 结果显示,miRNA-100 转染组 miRNA-100 的表达量明显高于空白对照组和阴性对照组(P 均 < 0.05)。细胞划痕实验显示,与空白对照组及阴性对照组比较,24 h 和 48 h 时 miRNA-100 组周边细胞迁移至中央划痕区的距离明显增大,差异有统计学意义(P 均 < 0.01)。Transwell 实验显示,与空白对照组和阴性对照组相比,转染 miRNA-100 后,穿越小室的 SGC-7901 细胞数目明显减少,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 转染 miRNA-100 可使 SGC-7901 细胞的迁移能力明显降低、细胞的侵袭能力被抑制,上调 miRNA-100 能抑制人胃癌 SGC-7901 细胞的侵袭、转移能力。

关键词: 微小核糖核酸; 微小核糖核酸-100; 胃癌; 细胞划痕实验; Transwell 实验; 逆转录-聚合酶链反应; 转移; 侵袭

中图分类号: R 73-37 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2015)11-1422-04

Influence of up-regulating miRNA-100 expression on invasion and metastasis of gastric cancer SGC-7901 cells in vitro

LI Hui-cheng*, LIU Su-ju, LIU Li-bo, XU Zhen-guo, GUAN Hai-yan, ZHANG Kai

* Department of Hematology Oncology, Fourth Hospital of Jilin University, Changchun, Jilin 130021, China

Abstract: Objective To investigate the effect of micro ribonucleic acid (microRNA, miRNA)-100 expression on invasion and metastasis of human gastric cancer SGC-7901 cells. **Methods** The SGC-7901 cells were cultured in vitro and divided into three groups: blank control group, negative control group and miRNA-100 transfection group. Using liposome method, the synthetic microRNA-100 mimic and negative control were respectively transfected into SGC-7901 cells in transfection group and negative control group. The expression levels of miRNA-100 in SGC-7901 cells in three groups were detected by reverse transcription- polymerase chain reaction(RT-PCR). The migratory of SGC-7901 cells was observed by cell wound scratch test. The invasion ability of SGC-7901 cells was measured by Transwell test. **Results** RT-PCR showed that miRNA-100 expression level in transfection group was significantly higher than that in blank control group and negative control group (all $P < 0.05$). The cell wound scratch test showed that the migration distances from peripheral cell to central scratched area at 24h and 48h after transfection enlarged significantly in transfection group compared with blank control group and negative control group (all $P < 0.01$). Transwell test showed that the number of SGC-7901 cells passed through Transwell chamber in transfection group significantly decreased compared with blank control group and negative control group (all $P < 0.05$). **Conclusions** The transfection of miRNA-100 can decline migratory ability and inhibit of invasion ability of SGC-7901 cells. Up-regulation of miRNA-100 can suppress the metastasis and invasion of SGC-7901 cells.

Key words: Micro ribonucleic acid; Micro ribonucleic acid-100; Gastric cancer; Cell wound scratch test; Transwell test; Reverse transcription-polymerase chain reaction; Metastasis; Invasion

微小核糖核酸(microRNA, miRNA)是长约 20 ~ 22 bp 的非编码单链 RNA。它通过碱基互补配对识别特定目标的信使 RNA(mRNA),通过沉默复合体降解靶 mRNA 或者抑制靶 mRNA 翻译^[1]。miRNA-100 定位于人类 11q24.1,长 22 个核苷酸(nucleotides, nt),在多种肿瘤中表达异常,与肿瘤的发生、发展密切相关^[2-3]。miRNA-100 作为 miRNA 家族的重要一员,有研究表明它在食管鳞状细胞癌中低表达,并且其表达决定着食管鳞状细胞癌的发展和预后^[4]。同样的结论 Chen 等^[5]在结肠癌中也得到证明。侵袭、转移是肿瘤不良预后的重要生物学特征, Peng 等^[6]的研究表明,miRNA-100 在结肠癌的侵袭和转移中有重要作用。本研究以人工化学合成的 miRNA-100 模拟物转染胃癌 SGC-7901 细胞,探讨 miRNA-100 对胃癌 SGC-7901 细胞侵袭和转移的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂 人胃癌 SGC-7901 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心, RPMI 1640 培养基购自 Hyclone 公司, Lipofectamine 2000 转染试剂为 Invitrogen 公司产品, Transwell 小室购自美国 Corning 公司, 总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、SYBR 实时定量试剂盒购自 TAKARA 公司。miRNA-100 模拟物及阴性对照由上海吉玛公司合成。

1.2 SGC-7901 细胞的培养与转染 使用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基在 37℃、5% CO₂ 条件下培养胃癌 SGC-7901 细胞。将细胞分为空白对照组(Control)组、阴性对照组(Null)组和 miRNA-100 转染组。应用 miRNA-100 模拟物和阴性对照分别转染 miRNA-100 转染组及 Null 组 SGC-7901 细胞,转染 6 h 后更换培养基继续培养。

1.3 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 miRNA-100 的表达 根据 RNAi os PLUS 说明书逐步加入氯仿、异丙醇、乙醇等提取各组细胞总 RNA。根据反转录试剂盒说明,在 37℃ 15 min; 85℃ 5 s 条件下将 RNA 反转录合成 complementary DNA(cDNA)。SYBR Premix EaqtMII(2 ×) 12.5 μl、PCR Forward Primer(10 μM) 1 μl、PCR Reverse Primer(10 μM) 1 μl、模板 cDNA 2 μl,加 dH₂O(灭菌蒸馏水)至总体积 25 μl。在 95℃ 30 s 1 个循环; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 40 个循环; 95℃ 15 s, 60℃ 30 s 的条件下,进行实时定量 PCR 扩增反应。结果用相对表达量表示。miRNA-100 的上游引物: 5'-AAGGAGAACCCG-TAGATCCG-3', 下游引物: 5'-GTGCAGGGTCCGAGG-

TATTC-3'。

1.4 细胞划痕检测细胞的迁移能力 调整细胞密度将其接种至 6 孔板,待完全贴壁后用 20 μl 无菌枪头在细胞表面划一横线, PBS 洗涤细胞,加入新鲜培养基,继续培养 24、48 h 后于倒置显微镜下观察拍照。

1.5 Transwell 实验检测细胞的侵袭能力 将 Transwell 小室放入 24 孔板中,下室加入含 20% FBS 的培养液 500 μl,上室加入 200 μl 浓度为 1 × 10⁵/ml 的细胞悬液,每组设置 2 个复孔。培养 24 h 后取出 Transwell 小室, PBS 冲洗后用棉签轻轻擦去微孔膜上层细胞;多聚甲醛室温下固定 20 min,结晶紫染液染色 5 min,蒸馏水冲洗。倒置显微镜下对迁移至微孔膜下层的细胞计数。每个样本选取 5 个视野计数细胞个数,取平均值。

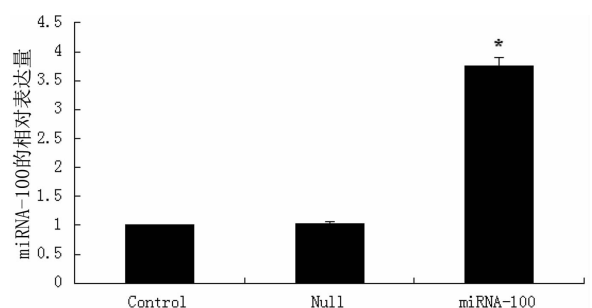
1.6 统计学处理 所有数据用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,所得结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 ANOVA 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA-100 成功转染 SGC-7901 细胞 转染 48 h 后,收集细胞,提取总 RNA 并进行反转录后,用 RT-PCR 检测 miRNA-100 的相对表达量。结果显示 miRNA-100 组的相对表达量明显高于 Control 组和 Null 组(P 均 < 0.05),而 Null 组和 Control 组相比无明显变化(P > 0.05)。见图 1。

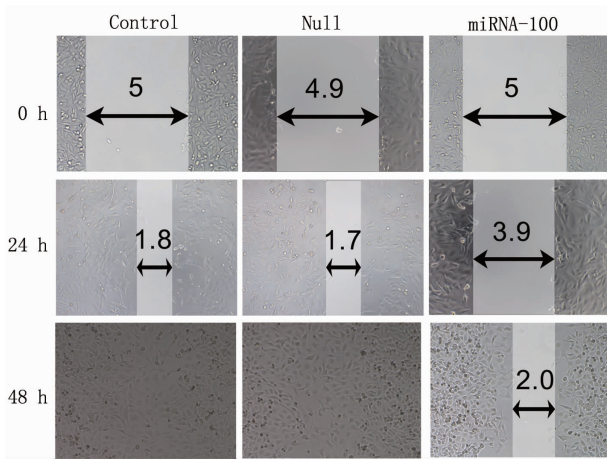
2.2 上调 miRNA-100 抑制 SGC-7901 细胞的迁移能力 细胞划痕实验检测 SGC-7901 细胞迁移的变化, 24 h 和 48 h 时 miRNA-100 组分别与 Control 组、Null 组相比,周边细胞迁移至中央划痕区的距离明显增大,差异有统计学意义(P 均 < 0.01),显示细胞的迁移能力明显降低。见图 2、3。

2.3 上调 miRNA-100 抑制 SGC-7901 细胞的侵袭能力 Transwell 实验检测 SGC-7901 细胞侵袭能力的变化,与 Control 组、Null 组相比,转染 miRNA-100 后,穿过小室的细胞数目明显减少,差异具有统计学意义



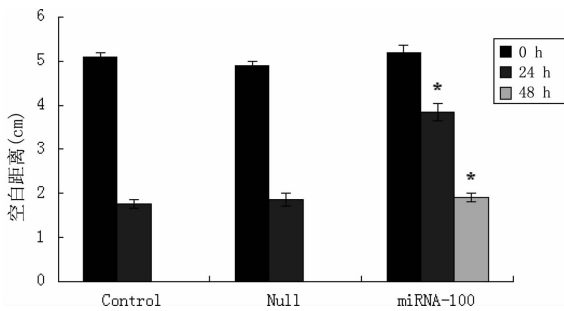
注:与 Control 组、Null 组比较, * P < 0.05。

图 1 miRNA-100 转染 SGC-7901 后 miRNA-100 的相对表达量比较



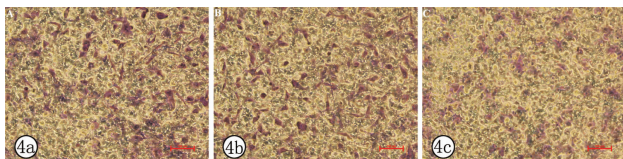
注:图中所示距离为 cm。

图 2 三组 SGC-7901 细胞于细胞划痕实验 0、24、48 h 倒置显微镜下所见



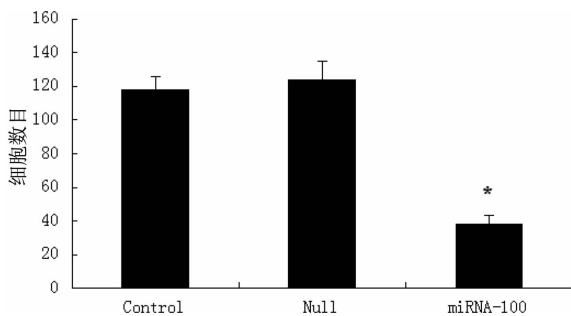
注:与 Control 组、Null 组比较, * $P < 0.01$ 。

图 3 细胞划痕实验三组 SGC-7901 细胞不同时点的迁移距离比较



4a: control 组; 4b: null 组; 4c: miRNA-100 组。

图 4 三组 SGC-7901 细胞 Transwell 实验倒置显微镜下所见



注:与 Control 组、Null 组比较, * $P < 0.05$ 。

图 5 三组 SGC-7901 细胞 Transwell 检测细胞的侵袭数目比较 (P 均 < 0.05), 显示 miRNA-100 对 SGC-100 细胞的侵袭具有抑制作用。见图 4、5。

3 讨论

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一,在全球范围内是发病率第四高的恶性肿瘤,而病死率位居第二^[7]。由于胃癌早期症状不明显,发现时大多发生转移,因

此传统的手术、放疗和化疗效果并不理想,预后差。随着分子研究手段的进展,肿瘤的基因治疗逐渐成为临床应用中具有前景的靶向治疗,寻找新的治疗手段一直是国内外研究的热点。

近年来多项研究表明,miRNA 在肿瘤中表达异常,导致癌基因的激活和抑癌基因的缺失,从而调控癌细胞的增殖和肿瘤生长^[8-11],在肿瘤转移浸润方面 miRNA 也受到越来越多的关注。有研究表明,在胃癌中 miRNA-100 低表达,并与胃癌的总生存率有关^[12]。miRNA-100 在结肠癌的侵袭和转移方面有重要作用^[6]。曾钦松^[13]就 miRNA-100 对膀胱尿路上皮癌的抑制作用展开了研究,miRNA-100 通过抑制 3'-非翻译区 (3'-UTR) RAB1B 的表达抑制肿瘤的侵袭和转移。Xu 等^[14]的研究显示,miRNA-100 直接作用于哺乳动物雷帕霉素靶蛋白抑制膀胱尿路上皮癌。同样的结果,在前列腺癌中也得到证实^[15]。本研究通过 miRNA-100 模拟物上调人胃癌 SGC-7901 细胞系 miRNA-100 的表达,划痕实验表明 miRNA-100 能明显抑制 SGC-7901 细胞的迁移能力;Transwell 实验结果显示,miRNA-100 明显减少 SGC-7901 细胞穿过小室的数目,说明 miRNA-100 对 SGC-7901 细胞的侵袭具有抑制作用。本研究为寻找胃癌治疗的新手段和新靶点提供了一定的理论依据。

参考文献

- [1] Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin [J]. Nat Biotechnol, 2008, 26 (4): 462-469.
- [2] Peng DX, Luo M, Qiu LW, et al. Prognostic implications of microRNA-100 and its functional roles in human epithelial ovarian cancer [J]. Oncol Rep, 2012, 27 (4): 1238-1244.
- [3] Chen P, Zhao X, Ma L. Downregulation of microRNA-100 correlates with tumor progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. Mol Cell Biochem, 2013, 383 (1/2): 49-58.
- [4] Zhou S, Yang B, Zhao Y, et al. Prognostic value of microRNA-100 in esophageal squamous cell carcinoma [J]. J Surg Res, 2014, 192 (2): 515-520.
- [5] Chen P, Xi Q, Wang Q, et al. Downregulation of microRNA-100 correlates with tumor progression and poor prognosis in colorectal cancer [J]. Med Oncol, 2014, 31 (10): 235.
- [6] Peng H, Luo J, Hao H, et al. MicroRNA-100 regulates SW620 colorectal cancer cell proliferation and invasion by targeting RAB1B [J]. Oncol Rep, 2014, 31 (5): 2055-2062.
- [7] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. Lancet, 2012, 380 (9859): 2095-2128.

参考文献

- [1] Bertani H, Frazzoni M, Mangiafico S, et al. Cholangiocarcinoma and malignant bile duct obstruction: A review of last decades advances in therapeutic endoscopy [J]. *World J Gastrointest Endosc*, 2015, 7 (6): 582 - 592.
- [2] Nakanuma Y, Kakuda Y. Pathologic classification of cholangiocarcinoma: New concepts [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2015, 29 (2): 277 - 293.
- [3] Shaib YH, El-Serag HB, Davila JA, et al. Risk factors of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States; a case-control study [J]. *Gastroenterology*, 2005, 128 (3): 620 - 626.
- [4] 张秋学, 杨冬山, 张执全, 等. 不同术式治疗 104 例肝门胆管癌疗效及生存分析 [J]. *中国综合临床*, 2011, 27 (3): 295 - 297.
- [5] Saxena A, Chua TC, Chu FC, et al. Improved outcomes after aggressive surgical resection of hilar cholangiocarcinoma: a critical analysis of recurrence and survival [J]. *Am J Surg*, 2011, 202 (3): 310 - 320.
- [6] 秦兴雷, 薛焕洲, 王作仁, 等. 肝外胆管癌淋巴结微转移的检测及其对预后的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2010, 90 (10): 678 - 682.
- [7] 陈志国, 雷霆, 魏海梁, 等. 肝门部胆管癌根治术肝动脉重建 7 例体会 [J]. *肝胆胰外科杂志*, 2010, 22 (4): 316 - 318.
- [8] 菅志远, 沈先锋, 周猛, 等. 肝门部胆管癌患者的手术治疗 [J]. *中国普通外科杂志*, 2011, 20 (2): 114 - 118.
- [9] 吴洁, 王翔. ERCP 或 PTCD 胆管支架置入治疗恶性梗阻性黄疸 32 例体会 [J]. *中国临床研究*, 2013, 26 (11): 1164 - 1165.
- [10] 吴林霖, 罗剑钧, 颜志平, 等. 门脉支架及 TACE 联合或未联合血管内植入 ^{125}I 粒子条治疗肝癌合并门脉主干癌栓 (MPVTT) 的随机对照研究 [J]. *复旦学报 (医学版)*, 2013, 40 (3): 354 - 359.
- [11] 邹建伟, 倪才方, 刘一之, 等. 不同类型高位恶性胆道梗阻的介入治疗 [J]. *临床放射学杂志*, 2011, 30 (10): 1523 - 1526.
- [12] Wang S, Shi G, Meng X. Clinical curative effect of percutaneous vertebroplasty combined with ^{125}I -seed implantation in treating spinal metastatic tumor [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2015, 28 (3 Suppl): 1039 - 1042.
- [13] Qin QH, Huang BS, Tan QX, et al. Radiobiological effect induced by different activities of ^{125}I seed brachytherapy in a hepatocellular carcinoma model [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7 (12): 5260 - 5267.
- [14] 张伟浩, 郭志, 荆文阁, 等. CT 导向下 ^{125}I 粒子植入挽救治疗肾上腺转移瘤 11 例近期疗效评价 [J]. *介入放射学杂志*, 2013, 22 (10): 815 - 818.
- [15] 韩成龙, 马亦龙, 欧盛秋, 等. ^{125}I 粒子条联合胆道支架植入治疗恶性阻塞性黄疸 22 例疗效分析 [J]. *介入放射学杂志*, 2015, 24 (2): 141 - 145.
- [16] 李说, 颜志平, 张雯, 等. 兔门静脉主干内植入连续排列 ^{125}I 粒子条的实验研究 [J]. *介入放射学杂志*, 2009, 18 (8): 607 - 611.
- [17] Nakagawa K, Yamashita H, Shiraiishi K, et al. Radiation therapy for portal venous invasion by hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11 (46): 7237 - 7241.
- [18] Khaksar SJ, Laing RW, Henderson A, et al. Biochemical (prostate-specific antigen) relapse-free survival and toxicity after ^{125}I low-dose-rate prostate brachytherapy [J]. *BJU Int*, 2006, 98 (6): 1210 - 1215.
- [19] 刘清欣, 颜志平, 李说, 等. ^{125}I 粒子条联合门静脉支架及化疗栓塞治疗原发性肝癌合并门静脉癌栓 [J]. *介入放射学杂志*, 2009, 18 (8): 593 - 595.

收稿日期: 2015-04-29 修回日期: 2015-06-05 编辑: 王海琴

(上接第 1424 页)

- [8] Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, et al. MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations [J]. *Hepatology*, 2008, 47 (6): 1955 - 1963.
- [9] Yang W, Lee DY, Ben-David Y. The roles of microRNAs in tumorigenesis and angiogenesis [J]. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 2011, 3 (2): 140 - 155.
- [10] Osman A. MicroRNAs in health and disease—basic science and clinical applications [J]. *Clin Lab*, 2012, 58 (5/6): 393 - 402.
- [11] Roberts AP, Lewis AP, Jopling CL. The role of microRNAs in viral infection [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2011, 102: 101 - 139.
- [12] Chen J, Zheng B, Wang C, et al. Prognostic role of microRNA-100 in various carcinomas: evidence from six studies [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35 (4): 3067 - 3071.
- [13] 曾钦松. miRNA-100 在膀胱尿路上皮癌发生发展中的抑制作用及机制研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2012.
- [14] Xu C, Zeng Q, Xu W, et al. miRNA-100 inhibits human bladder urothelial carcinogenesis by directly targeting mTOR [J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12 (2): 207 - 219.
- [15] Leite KR, Morais DR, Reis ST, et al. MicroRNA 100: a context dependent miRNA in prostate cancer [J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2013, 68 (6): 797 - 802.

收稿日期: 2015-05-10 修回日期: 2015-06-20 编辑: 王国品