论著

文章编号:1000-5404(2009)22-2202-04

miR-223在CXCR4⁺ Lewis肺癌细胞中的显著低表达及其靶基因预测

辇伟奇[1],陈芳琳[1],敖绪军[2],陈正堂[1] ([1]第三军医大学新桥医院全军肿瘤研究所,重庆 400037;[2]中国人民解放军532医院普通外科,安徽 黄山 245041)

摘 要:目的 分析miR-146a、miR-206、miR-223、let-7c-1等细胞分化相关miRNAs,在小鼠Lewis肺癌细胞株(the Lewis lung cancer cell lines, LLC)CXCR4⁺与CXCR4⁻亚群间的差异表达。**方法** 免疫磁珠分选CXCR4⁺和CXCR4⁻ LLC细胞,Trizol法抽提细胞总RNA,实时荧光定量PCR(TaqMan探针)检测miRNAs表达,对表达差异最为显著的miRNAs进行潜在靶基因预测,应用免疫组化方法初步分析具有研究价值的关键分子在两个不同亚群小鼠种植瘤组织中的表达情况,并通过BLAST对其3′非翻译端(untranslated region, UTR)进行直向同源基因序列比对分析。**结果** CXCR4⁺与CXCR4⁻ LLC比较,各检测mirna表达均较低,其中以miR-223差异最为显著(Fold Change = 8.26),通过软件分析预测,miR-223与IGF1R、IGFBP5、Pik3cb、ELK-1和E2F1等基因均具有可能靶位点,免疫组化检测发现CXCR4⁺亚群种植瘤组织IGF1R表达显著高于CXCR4⁻亚群,IGF1R 3′UTR的238~244 nt和688~695 nt两个结合位点具有高度的进化保守性。**结论** miR-223在CXCR4⁺ LLC中显著低表达,可能与肺腺癌细胞IGF1R信号通路调控有关。

关键词:miR-223;CXCR4;Lewis肺癌细胞

中图法分类号:R394.3;R730.23;R734.2 **文献标识码**:A

Lowly expression of miR-223 in CXCR4 positive cells from Lewis lung carcinoma cell line and its target gene prediction

NIAN Wei-qi[1], CHEN Fang-lin[1], AO Xu-jun[2], CHEN Zheng-tang[1] ([1]Cancer Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037;[2] Department of General Surgery, No. 532 Hospital of PLA, Huangshan 245041, Anhui Province, China)

Abstract: Objective To analyze the differential expressions of miR-146a, miR-206, miR-223 and let-7c-1, such as cell differentiation-related miRNAs, in CXCR4-positive and CXCR4-negative subsets of the Lewis lung cancer cell lines (LLC). **Methods** CXCR4-positive and CXCR4-negative subsets were isolated from LLC by immunomagnetic beads sorting, and then their total cellular RNA were extracted by Trizol, expression of 4 miRNAs were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (TaqMan probe), and potential target genes of miRNA whose differential expression was the most significant were predicted. Immunohistochemistry was carried out to confirm differential expression of the key molecule of certain research value within CXCR4-positive and CXCR4-negative subsets growing tumor tissue, and a BLAST search was performed to identify homologies of its 3′UTR. **Results** Compared to CXCR4-negative subsets, the expression of 4 miRNAs were lower in CXCR4-positive subsets, and expression of miR-223 had the most significant difference (Fold change = 8.26). By softwares forecasting, miR-223 had potential target sites of IGF1R, IGFBP5, Pik3cb, ELK-1 and E2F1 mRNA, such as key molecular of IGF1R signaling pathway. The expression of IGF1R of CXCR4-positive subsets growing tumor tissue was significantly higher than that of CXCR4-negative subsets. **Conclusion** miR-223 is lowly expressed in CXCR4 positive cells from Lewis lung carcinoma cell lines. Position 238~244 nt and 688~695 nt in target sequences of 3′UTR of IGF1R mRNA was highly homologous by screening. Close correlation is found between miR-223 and IGF1R signaling pathway. The mechanisms underlying this biologically important finding need to be further explored.

Key words: miR-223; CXCR4; Lewis lung cancer cell line

基金项目:国家高技术研究发展计划("863"计划)(2007AA02Z129);国家自然科学基金(30901790);重庆市自然科学基金(CSTC2008C166)
Supported by the National High Technology Research & Development Program (863 Program, 2007AA02Z129), the National Natural Science Foundation of China (30901790) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2008C166)

作者简介:辇伟奇,男,吉林省大安市人,博士研究生,主治医师,主要从事肺癌抗转移方面的研究。E-mail:nwqone@yahoo.com.cn

通信作者:陈正堂, E-mail: chenzhengtang@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2009-08-21;**修回日期**:2009-09-20

微小 RNA(microRNA,miRNA)是一类 19 ~ 25 nt 的小分子非编码单链 RNA,它能通过与靶 mRNA 的 3′非翻译区(3′-UTR)结合,抑制 mRNA 的翻译或影响 mRNA 的稳定性,在转录或转录后水平调控编码蛋白基因的表达。Garofalo 等[1]在对非小细胞肺癌(non small-cell lung cancer, NSCLC)的研究中发现关键 miRNA 表达差异可能导致癌细胞的不同表型。CXCR4 表达程度已被证实与非小细胞肺癌细胞转移能力直接相关[2,3]。本研究以小鼠 Lewis 肺癌细胞为研究对象,经磁珠分选后分析 CXCR4$^+$ 与 CXCR4$^-$ 亚群间 miR-146a、miR-206、miR-223、let-7c-1 等细胞分化相关 miRNA 差异表达,并通过对表达差异显著 miRNA 进行靶位点预测,初步探讨关键 miRNA 参与 NSCLC 转移调控的可能机制。

1　材料与方法

1.1　材料

DMEM 培养基、优等胎牛血清(美国 Hyclone 公司),小鼠 Easy Sep 磁珠分选系统(加拿大 Stem Cell 公司),PE Anti-mouse CXCR4,PE 标记的 IgG 同型对照(美国 eBioscience 公司),兔抗小鼠多抗(北京博奥森生物技术有限公司),即用型 SABC-AP 试剂盒(武汉博士德生物工程公司),TaqMan MicroRNA Assays, TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit,TaqMan Universal PCR Master Mix(美国 ABI 公司),Agilent 2100 Bioanalyzer,ABI PRISM 7000 Sequence Detection System(美国 ABI 公司),小鼠 Lewis 肺癌细胞株由四川大学细胞中心提供。

1.2　细胞培养

以 LLC 为研究对象,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37 ℃、5% CO_2 条件下培养。

1.3　磁珠分选 CXCR4$^+$ LLC

将 LLC 细胞制成单细胞悬液,调成 1 $\times 10^8$ 个/ ml,悬于 100 μl 的 DMEM 培养液中;加入 PE 标记的 CXCR4 抗体 20 μl,避光,室温孵育 15 min ;加入 EasySep PE selection cocktail 混合液 7 μl,充分混匀,避光,室温孵育 15 min ;加入磁珠纳米颗粒 5 μl,充分混匀,室温孵育 10 min ;加入含 2% FBS 和 1 mmol/L EDTA 的 PBS 至 2.5 ml,混匀细胞后将试管插入磁极中,静置 5 min;倒掉上清部分,保持磁极与试管倒置状态 2 ~ 3 s,然后使试管口恢复向上的位置;重复漂洗 4 次,用无血清的 DMEM 重悬细胞。

1.4　总 RNA 提取

分别用 Trizol 一步法提取,CXCR4$^+$ 和 CXCR4$^-$ 细胞总 RNA,异丙醇法浓缩 RNA,分光光度计测总 RNA 纯度; 通过 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行 RNA 分子完整性指数(RNA Integrity number,RIN)检测。

1.5　cDNA 的制备

使用 ABI 公司的 TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit 进行反转录,所有操作在冰上完成,5 μl 反转录反应体系包括:dNTP(100 mmol/L) 0.15 μl,MultiScribe 反转录酶(50 U/μl) 1 μl,10 × RT Buffer 1.5 μl,RNA 酶抑制剂(20 U/μl) 0.19 μl,无 RNA 酶水 4.16 μl,RT 特异引物 3 μl, RNA sample 5 μl。反转录条件:16 ℃ 30 min,42 ℃ 30 min,85 ℃ 5 min,4 ℃ 5 min。

1.6　实时荧光定量 PCR 检测

采用 ABI 公司 TaqMan MicroRNA 检测试剂盒,应用 PRISM 7000 型定量 PCR 仪进行 PCR 定量检测。20 μl 反应体系包括:TaqMan MicroRNA Assays (20 ×)1 μl,cDNA 1.33 μl,TaqMan 2 × Universal PCR Master Mix(No AmpErase UNGa)10 μl,Nuclease-free water 7.67 μl。PCR 条件: 95 ℃10 min;40 个 PCR 循环(95 ℃ 15 s;60 ℃60 s)。应用 ABI 7300 System SDS Software1.3.1.21 软件进行数据处理,相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。

1.7　miRNA 靶基因预测

应用预测软件 miRBase、miRanda、RNA22 和 Sfold,并结合 Ensembl 数据库,预测表达差异最为显著 miRNA 的靶基因,取至少 2 个软件预测到的基因作为其潜在靶基因。

1.8　IGF1R 在不同亚群种植瘤组织中的表达检测

将分选的 CXCR4$^+$ 细胞、CXCR4$^-$ 细胞以 5×10^5/0.2 ml 接种于 C57BL/6 小鼠右腋皮下,3 周后处死小鼠,将皮下肿瘤组织取出、固定包埋、常规切片,S-P 法检测 IGF1R 表达,结果判定以细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性。根据细胞染色强度分为 4 级:未见染色(-),轻度染色(+,浅黄色),中度染色(++,棕黄色),深度染色(+++,棕褐色)。

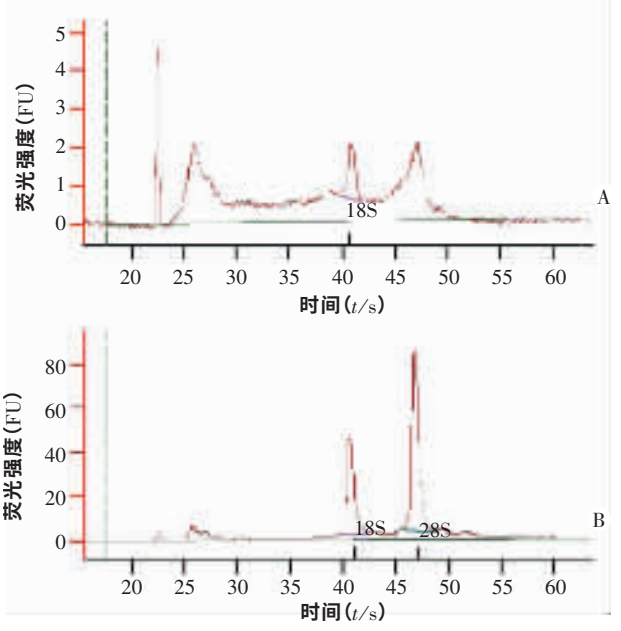
1.9　IGF1R 3′UTR 预测结合位点的进化保守性分析

利用 TARGETSCAN 资源,应用 BLAST 将小鼠 IGF1R 基因 3′UTR 与人类、黑猩猩、猕猴和大鼠进行序列比对,分析靶 mRNA 预测结合位点的进化保守性。

2　结果

2.1　总 RNA 质量检测

经 Agilent 2100 毛细管电泳,两样品 3 个主要的峰形比较明显, CXCR4$^+$ LLC 的 RIN 为 5.3, CXCR - LLC 的 RIN 为 9.7,基本满足后续实验需求,见图 1。



A: CXCR4$^+$ LLC RNA 毛细电泳图;B: CXCR4$^-$ LLC RNA 毛细电泳图

图 1　样品 RNA 质量鉴定

2.2 Real-time PCR 结果分析

经熔解曲线分析,各 miRNA 扩增产物的熔解曲线均可扩增出单峰,且 3 次重复表现一致,表明扩增的特异性和重复性良好,可用于 Real-time PCR 试验。将原始数据(Ct 值)取 3 次重复的平均值后用内参基因 snoRNA202 校正,计算 $CXCR4^+$ 与 $CXCR4^-$ LLC 各 miRNA 的差异表达倍数($2^{-\triangle\triangle Ct}$),其中 miR-223 表达差异最为显著(Fold change = 8.26)。见表 1。

表 1 $CXCR4^+$ 与 $CXCR4^-$ LLC 的 Real-time PCR 结果

miRNA	*P* 值	$CXCR4^+$ 亚群平均 Ct 值	$CXCR4^-$ 亚群平均 Ct 值	△△Ct	倍数	上下调(↑/↓)
mmu-miR-146a	7.97E-02	29.81	28.97	0.84	1.79	↓
mmu-miR-206	1.77E-01	28.60	28.23	0.36	1.29	↓
mmu-miR-223	2.50E-02	36.19	33.14	3.05	8.26	↓
mmu-let-7c-1	5.83E-02	36.13	34.71	1.42	2.68	↓

2.3 mmu-miR-223 靶基因预测

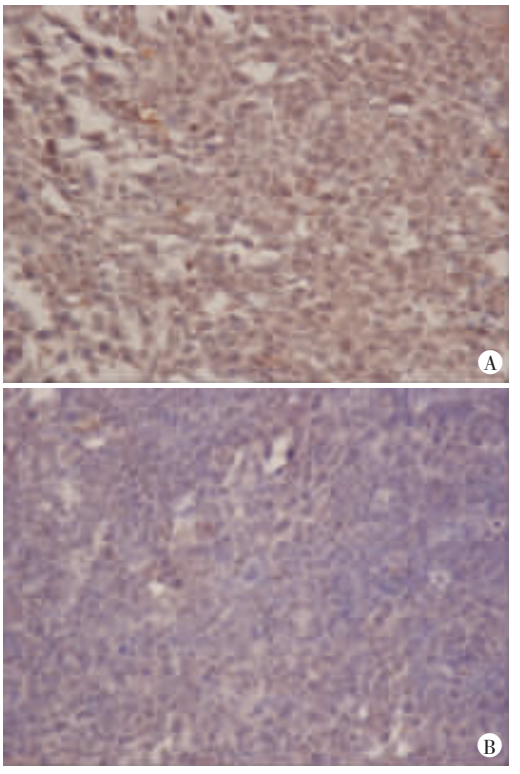
如表 2 所示,mmu-miR-223 与 IGF1R、IGFBP5、Pik3cb、ELK-1、E2F1 等基因都具有可能的靶位点,这表明 miR-223 可能与 IGF1R 信号通路调控有关。

表 2 miR-223 与预测 IGF1R 信号通路相关靶基因列表

计算机算法	靶标	基因全称	3′UTR 长度
miRBase\miRanda\Sfold	IGF1R	insulin-like growth factor I receptor	7 187 bp
miRanda\RNA22\Sfold	IGFBP5		4 438 bp
miRanda\Sfold	IGF2BP2	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2	2 478 bp
miRBase\miRanda\RNA22\Sfold	Pik3cb	phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide (p110β)	1 311 bp
miRBase\miRanda\Sfold	ELK-1	member of ETS oncogene family	1 264 bp
miRBase\Sfold	myc	myelocytomatosis oncogene	427 bp
miRBase\miRanda\RNA22\Sfold	E2F1	E2F transcription factor 1	1 188 bp
miRBase\miRanda\RNA22\Sfold	Bcl-2	B cell lymphoma/lewkmia-2	5 077 bp
miRBase\Sfold	CXCR4	chemokine (CXC motif) receptor 4	641 bp

2.4 IGF1R 在 $CXCR4^+$ 和 $CXCR4^-$ LLC 种植瘤组织的差异表达

如图 2 所示,$CXCR4^+$ LLC 种植瘤组织中 IGF1R 呈强阳性表达(细胞质呈棕褐色染色),而 $CXCR4^-$ LLC 种植瘤组织中 IGF1R 仅呈轻-中度表达(细胞质呈浅黄至棕黄色染色),这表明 miR-223 可能对 IGF1R 表达具有负调控作用。

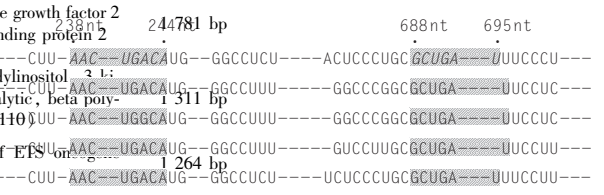


A:$CXCR4^+$ LLC;B:$CXCR4^-$ LLC

图 2 IGF1R 在 $CXCR4^+$ 和 $CXCR4^-$ LLC 种植瘤组织的表达情况(S-P ×400)

2.5 miR-223 作用于 IGF1R mRNA 3′UTR 的候选靶筛选

通过对预测 IGF1R 基因 mRNA 3′UTR 序列对比分析,我们发现在 7 个预测结合位点中,238 ~ 244 nt 和 688 ~ 695 nt 两个结合位点具有高度的进化保守性(图 3),可作为继续研究的候选靶。



Mmu:小鼠; Hsa:人类; Ptr:黑猩猩; Mml:猕猴; Rno:大鼠

斜体字母为 miR-223 与 IGF1R mRNA 3′UTR 预测结合位点;阴影区域为高度保守的结合位点

图 3 mmu-miR-223 作用于 IGF1R mRNA 3′UTR 的候选靶分析

3 讨论

miRNAs 在肿瘤转移中发挥着十分重要的作用。乳腺癌起始细胞(或干细胞样细胞)转染 let-7 慢病毒载体后体外增殖能力、未分化细胞数目以及 NOD/SCID 小鼠成瘤转移能力均减少,而用反义寡核苷酸阻断乳腺癌非起始细胞 let-7 可增强其体外自我更新能力[4]。microRNA-10b 被发现在转移性乳腺癌中呈高表达,非转移性乳腺癌细胞株过表达 microRNA-10b 后可始发肿瘤的侵袭与转移[5]。Blenkiron 等[6]以 miRNA 谱作为 93 例乳腺癌临床分子分型依据,发现不同亚型间 miRNA 表达不同,并与临床病理预后因子相关。

趋化性细胞因子受体 CXCR4 是趋化性细胞因子

基质衍生因子 SDF-1 的专属受体。现已证实了 SDF-1/CXCR4 轴对 NSCLC 转移调控发挥着重要作用,NSCLC 多个细胞株均表达 CXCR4,且 SDF-1/CXCR4 轴与 NSCLC 胸膜腔转移有关,胸腔积液中存在 CXCR4 阳性细胞[7];CXCR4 表达对肺腺癌预后价值的判断与其亚细胞定位有关,其中膜表达被认为是独立危险因素,与远处转移发生、降低无病生存率呈正相关[8]。新近一项研究在 NSCLC 患者外周血中检测到 pan-cytokeratin +/CXCR4$^+$ 细胞,且≤2 500 个/ml 组比 >2 500 个/ml 组中位生存率明显增长($P=0.03$)[9]。因此,我们选择以 CXCR4 作为衡量 Lewis 肺癌细胞转移能力的标志物,分选后检测阳性亚群和阴性亚群相关 miRNA 的表达差异。

本实验发现 miR-223 在 CXCR4$^+$ LLC 呈显著低表达,这一结果可能有着重要意义,现已有证据表明其参与了肿瘤发生演进过程的调控。miR-223 在进化上是高度保守的,最初发现其参与骨髓细胞分化调控,表型幼稚(M0 ~ M2)髓性白血病细胞中其表达显著降低,用维甲酸诱导急性早幼粒白血病细胞分化时,miR-223 显著上调[10,11];另外,小鼠 miR-223 突变时,粒系祖细胞数目增加,但其功能发生异常[12]。miR-223 在肝癌组织呈低表达,且较癌周正常组织差异十分显著,肝癌细胞株转染 miR-223 后增殖明显受抑[13]。

目前 miR-223 调控作用的分子机制尚不完全清楚。我们通过 miRanda、miRBase、RNA22 和 Sfold 等生物信息学工具初步预测 miR-223 的靶 mRNA,发现其可能与 IGF1R 信号通路调控密切相关,该通路关键分子如 IGF1R、IGFBP5、Pik3cb 、ELK-1、E2F1 等,均具有与 miR-223 作用的可能靶位点。IGF1R 信号通路现已被证实与肿瘤发生演进密切相关,且与 NSCLC 预后相关[14-16]。我们通过免疫组化检测发现 CXCR4$^+$ 亚群种植瘤组织 IGF1R 表达显著高于 CXCR4$^-$ 亚群,并应用 BLAST 序列比对分析筛选得到 IGF1R 两个具有高度保守性的候选靶。本实验证实了关键 miRNA 表达差异可能决定肿瘤细胞的生物学特性,为进一步研究 NSCLC 异质性与其转移的内在联系提供了新的方法与思路,并对下一步揭示 miRNA 参与肺腺癌转移调控机制奠定了基础。

参考文献:

[1] Garofalo M, Quintavalle C, Di-Leva G, *et al*. MicroRNA signatures of TRAIL resistance in human non-small cell lung cancer[J]. Oncogene, 2008, 27(27): 3845 - 3855.

[2] Su L, Zhang J, Xu H, *et al*. Differential expression of CXCR4 is associated with the metastatic potential of human non-small cell lung cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(23): 8273 - 8280.

[3] 厉红元,任国胜,谭金详. siRNA 沉默人乳腺癌细胞株 CXCR4 基因的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(8): 728 - 730.

[4] Yu F, Yao H, Zhu P, *et al*. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells[J]. Cell, 2007, 131(6): 1109 - 1123.

[5] Ma L, Teruya-Feidstein J, Weinberg R A. Tumor invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer[J]. Nature, 2007, 449(7163): 682 - 688.

[6] Blenkiron C, Goldstein L D, Thorne N P, *et al*. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype[J]. Genome Biol, 2007, 8(10): R214.

[7] Oonakahara K, Matsuyama W, Higashimoto I, *et al*. Stromal-derived factor-1alpha/CXCL12-CXCR 4 axis is involved in the dissemination of NSCLC cells into pleural space[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004, 30(5): 671 - 677.

[8] Wagner P L, Hyjek E, Vazquez M F, *et al*. CXCL12 and CXCR4 in adenocarcinoma of the lung: association with metastasis and survival [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2009, 137(3): 615 - 621.

[9] Reckamp K L, Figlin R A, Burdick M D, *et al*. CXCR4 expression on circulating pan-cytokeratin positive cells is associated with survival in patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. BMC Cancer, 2009, 9: 213.

[10] Fazi F, Racanicchi S, Zardo G, *et al*. Epigenetic silencing of the myelopoiesis regulator microRNA-223 by the AML1/ETO oncoprotein [J]. Cancer Cell, 2007, 12(5): 457 - 466.

[11] Fazi F, Rosa A, Fatica A, *et al*. A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis[J]. Cell, 2005, 123(5): 819 - 831.

[12] Johnnidis J B, Harris M H, Wheeler R T, *et al*. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223 [J]. Nature, 2008, 451(7182): 1125 - 1129.

[13] Wong Q W, Lung R W, Law P T, *et al*. MicroRNA-223 is commonly repressed in hepatocellular carcinoma and potentiates expression of stathmin1[J]. Gastroenterology, 2008, 135(1): 257 - 269.

[14] Chitnis M M, Yuen J S, Protheroe A S, *et al*. The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14 (20): 6364 - 6370.

[15] Pollak M. Targeting insulin and insulin-like growth factor signalling in oncology[J]. Curr Opin Pharmacol, 2008, 8(4): 384 - 392.

[16] Ludovini V, Bellezza G, Pistola L, *et al*. High coexpression of both insulin-like growth factor receptor-1 (IGFR-1) and epidermal growth factor receptor (EGFR) is associated with shorter disease-free survival in resected non-small-cell lung cancer patients[J]. Ann Oncol, 2009, 20(5): 842 - 849.

(编辑　龙　亮)