论著

文章编号:1000-5404(2011)15-1594-04

Hsa-miR-193b 抑制人子宫内膜腺癌细胞株 HEC-1B 侵袭能力

李 荣,陈雪梅,何俊琳,丁裕斌,杨德辉,许 皓,郑安舜,刘学庆 (400016 重庆,重庆医科大学公共卫生学院生殖生物学研究室)

[摘要] **目的** 探讨 Hsa-miR-193b 对人子宫内膜腺癌细胞系 HEC-1B 侵袭的影响及其相关机制。**方法** 将 Hsa-miR-193b 模拟物(mimics)、Hsa-miR-193b 抑制剂(inhibitor)转染 HEC-1B 细胞,Real-time PCR 证实转染是否成功;Transwell 小室法检测转染 Hsa-miR-193b mimics 后 HEC-1B 细胞的侵袭能力;通过 miRGen、Targetscan、Pictar 数据库筛查 Hsa-miR-193b 指向与侵袭相关的靶基因;Real-time PCR 检测转染 Hsa-miR-193b mimics 转染组和对照组 mRNA 水平;Western blot 检测各组 GRB7 蛋白表达的水平。**结果** ①Hsa-miR-193b mimics、Hsa-miR-193b inhibitor 转染 HEC-1B 细胞成功,两转染组 Hsa-miR-193b 表达水平与未转染组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。②转染 Hsa-miR-193b mimics 组与对照组比较,肿瘤细胞的侵袭能力明显降低($P<0.05$)。③转染后,靶基因 GRB7 蛋白 Hsa-miR-193b mimics 组表达下降($P<0.05$)、Hsa-miR-193b inhibitor 组表达增加($P<0.05$),且各组 GRB7 mRNA 水平无显著变化。**结论** 在 HEC-1B 中转染 Hsa-miR-193b mimics 能下调 GRB7 蛋白表达,并抑制 HEC-1B 细胞的侵袭。

[关键词] 子宫内膜癌;Hsa-miR-193b;GRB7;侵袭
[中图法分类号] R73-362;R737.33;R394.2 [文献标志码] A

Hsa-miR-193b suppresses invasion of human endometrium adenocarcinoma HEC-1B cells

Li Rong, Chen Xuemei, He Junlin, Ding Yubin, Yang Dehui, Xu Hao, Zheng Anshun, Liu Xueqing (Department of Reproductive Biology, School of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the influence of Has-miR-193b on the invasion of human endometrium adenocarcinoma HEC-1B cells. **Methods** Validated Has-miR-193b mimics and inhibitors were transfected into endometrial carcinoma HEC-1B cells. Real-time PCR was used to confirm the efficiency of transfection. Invasiveness of transfected and non-transfected HEC-1B cells was detected by matrix metrigel invasion assay. miRGen, Targetscan, and Pictar database was used to find target genes of Has-miR-193b. Western blotting was used to measure GRB7 protein expression in the cells. **Results** Hsa-miR-193b expression in HEC-1B cells was significantly change after mimics and inhibitor transfection ($P<0.05$). Has-miR-193b mimics transfection resulted in decrease of invasiveness in HEC-1B cells ($P<0.05$), and the decrease of GRB7 protein expression ($P<0.05$). While the expression was increased after transfected with Has-miR-193b inhibitor. But no obvious change was found in the GRB7 mRNA expression in nontransfected, mimics-transfected and inhibitor-transfected HEC-1B cells. **Conclusion** Transfection with Has-miR-193b mimics effectively down-regulates GRB7 expression, and suppresses invasiveness in HEC-1B cells.

[**Key words**] endometrial neoplasm; Hsa-miR-193b; GRB7; invasion

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2008BB5232). Corresponding author: Liu Xueqing, Tel:86-23-68485001, E-mail: a68733172@online.cq.cn

MicroRNAs(miRNAs)是一类高度保守的非编码单链小分子 RNA(non-coding small RNA),其长度一般为 20~25 nt(少数小于 20 nt)。它由一段具有发夹环结构、长度为 70~80 nt 的单链 RNA 前体(pre-miRNA)剪切后生成。其广泛存在于动物、植物以及病毒中[1]。miRNAs 引导 RISC 降解目的 mRNA 片段或是阻碍目的 mRNA 翻译是通过与靶基因 mRNA 分子的 3′端非编码区域(3′-untranslated region ,3′UTR)碱基完全或不完全配对[2],来实现对靶基因进行转录后表达的调控,从而对生命过程中的一系列重要进程进行调控,包

[基金项目] 重庆市科委自然科学基金(CSTC2008BB5232)
[通信作者] 刘学庆,电话:(023)68485001,E-mail:a68733172@online.cq.cn

括早期发育、组织形态的形成、细胞增殖、分化、凋亡、物质代谢等。

子宫内膜癌为女性生殖道三大恶性肿瘤之一，占女性生殖道恶性肿瘤的20% ~30%。而浸润转移是恶性肿瘤的重要特征，但其分子机制尚未完全明了。近年研究表明，肿瘤的发生与miRNAs有着密切的联系，其在肿瘤发生过程中起癌基因或抑癌基因的作用[3]。最近，Wu等[4]报道子宫内膜腺癌组织中Has-miR-193b表达与癌旁正常组织相比明显降低，提示其可能参与肿瘤的发生、发展过程。为此，本研究通过检测Hsa-miR-193b对子宫内膜癌HEC-1B细胞侵袭力的影响，并探讨其机制，为肿瘤诊断和治疗打下一定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

子宫内膜癌HEC-1B细胞株购自中国科学院上海细胞库，DMEM/F-12(GIBCO公司)，胎牛血清(杭州四季青公司)，DMSO(Sigma公司)，TRIZOL试剂、脂质体Lipofectamine 2000(Invitrogen公司)，PCR试剂(TaKaRa公司)，Has-miR-193b模拟物、抑制剂(广州锐博公司)，GRB7抗体(Santa Cruz公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞在含有10%胎牛血清培养基，温度37 ℃，5% CO_2孵箱中培养。细胞传代3代以上开始实验。

1.2.2 转染 HEC-1B内膜癌细胞以2×10^5/孔的密度转种于6孔板或35 mm培养皿中，细胞贴壁24 h(细胞30% ~40%生长融合)后按照试剂说明书步骤，用无血清培养基分别稀释Hsa-miR-193b模拟物(mimics)、抑制剂(inhibitor)、对照及脂质体，混匀制备成模拟物终浓度10 nmol/L、抑制剂终浓度50 nmol/L的转染复合物；取对数生长期细胞，无血清培养基清洗2次后加入备好的转染复合物，培养箱中孵育6 h后，加入完全培养基继续培养，72 h后收获细胞[5]。实验分为5组，分别为Hsa-miR-193b的模拟物组(MI)、抑制剂组(IH)、模拟物对照组(MC)、抑制剂对照组(IC)、空白对照组(NOR)(用无血清培养液代替转染复合物)。

1.2.3 实时荧光定量PCR 为了验证转染成功与否，通过实时荧光定量PCR检测各组Hsa-miR-193b、GRB7 mRNA的表达。miRNAs的实时荧光定量PCR方法参照Chen等[6]的方法。相应的PCR引物见表1。采用U6作为内参，进行归一化。

1.2.4 Transwell侵袭实验 Transwell小室侵袭实验检测转染前后细胞的侵袭能力，转染方法同1.2.2。实验分为3组：未转染组(NOR)、转染Hsa-miR-193b的模拟物组(MI)及转染模拟物阴性对照组(MC)。以开始加转染试剂为0 h，转染约6 h更换为完全培养基，置培养箱中继续培养，于转染48 h进行下步实验。转染后各组处理相同。将细胞制成单细胞悬液，调整细胞浓度为1×10^6/ml，将3组细胞液加入上室中，每室250 μl。下室加入500 μl含10%胎牛血清的培养液做趋化因子。孵育48 h后，弃去孔中培养液，用棉签拭去小室内侧膜细胞。4%多聚甲醛固定小室基底膜30 min，苏木精染色。400倍显微镜下计数10个视野，求其平均值。重复做3次，统计分析其结果。

表1 基因引物序列

基因		引物序列(5′→3′)
miR-193 b	逆转录引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT
		TCGCACTGGATACGACGGGCGA
	PCR引物	正义链 TTGACCGGGAGTTTCAGG
		反义链 GTGCAGGGTCCGAGGT
U6	PCR引物	正义链 GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT
		反义链 CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT
GRB7	PCR引物	正义链 CAGCCATTCATCGCACCC
		反义链 TCTCCCGGACCAGGAACAC
β-actin	PCR引物	正义链 CCTGAGGCTCTTTTCCAGCC
		反义链 TAGAGGTCTTTACGGATGTCAACGT

1.2.5 生物信息学分析 采用目前常用miRNAs靶基因预测数据库miRGen[7]、Targetscan[8]、Pictar[9]来检索Hsa-miR-193b与侵袭相关的靶基因。

1.2.6 Western blot检测 提取总蛋白，用考马斯亮蓝标准曲线法测出蛋白的浓度。上样量均为每孔50 μg。分别用6% SDS-PAGE分离蛋白，然后转移到PVDF膜上，用5%脱脂牛奶封闭，抗GRBT抗体(1∶50)作为一抗，HRP标记的兔抗作为二抗。用ECL系统染色。

1.3 统计学方法

数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 13.0统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 定量PCR检测转染后各组Hsa-miR-193b的变化

定量PCR检测转染了Hsa-miR-193b模拟物、抑制剂、模拟物对照及抑制剂对照后各组Hsa-miR-193b的表达量，模拟物组Hsa-miR-193b表达显著升高，抑制剂组显著降低($P<0.05$)，而2个对照组无明显变化，说明转染成功，见图1。

2.2 Transwell侵袭实验

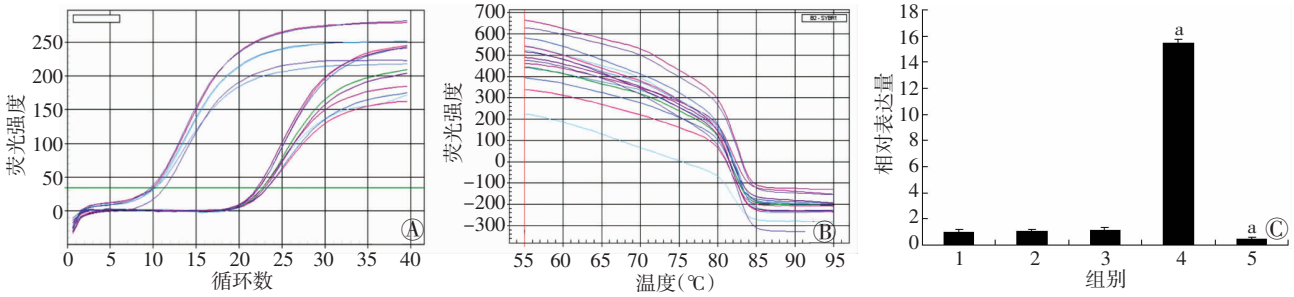
未转染组穿过Transwell小室细胞数为(31.021 ±0.030)个/视野，模拟物对照组为(30.325 ±0.063)个/视野，模拟物组为(11.631 ±0.009)个/视野；模拟物组细胞侵袭能力与未转染组及转染模拟物阴性对照组比较明显下降($P<0.05$)。见图2。

2.3 Hsa-miR-193b靶基因预测

通过互联网上miRNA靶基因预测软件(miRGen、Targetscan、Pictar)，输入Hsa-miR-193b，得到其靶基因可能为：生长因子受体结合蛋白7(GRB7)、泛素特异肽酶8(Usp8)、心肌营养素1(Ctf1)、鞘氨醇激酶2(Sphk2)、弹力蛋白(Eln)及丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶11(Map3k11)。结合本研究，我们推测其侵袭相关的靶基因为GRB7。

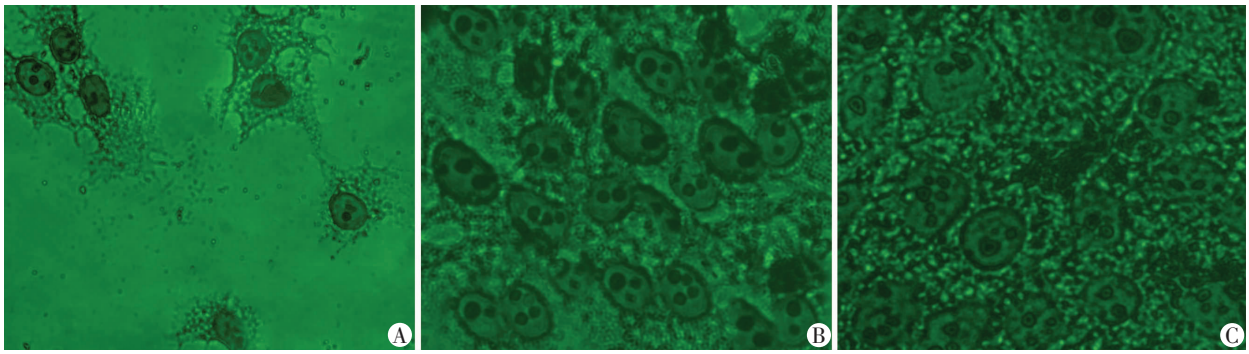
2.4 各组GRB7 mRNA及其蛋白表达水平

各组GRB7 mRNA水平无明显变化(图3)，转染Hsa-miR-193b模拟物组GRB7蛋白表达下调35%，转染Hsa-miR-193b抑制剂组GRB7蛋白表达增高40%($P<0.05$)，而各对照组无明显变化，见图4。



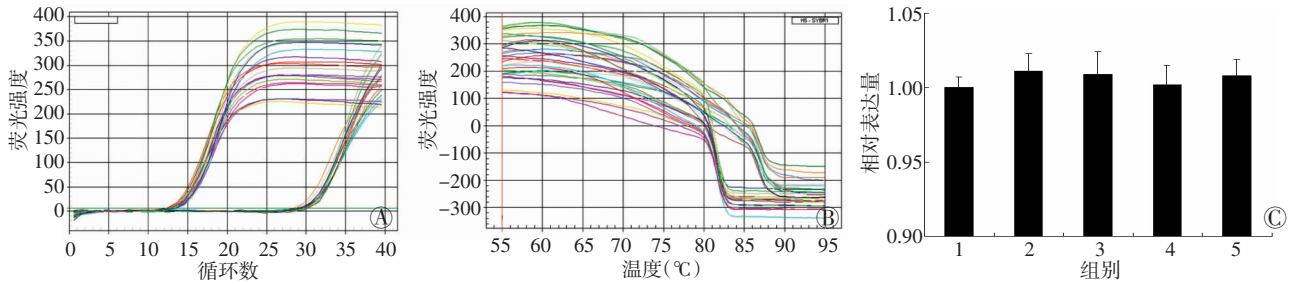
A:Hsa-miR-193b 定量 PCR 起峰曲线图;B:Hsa-miR-193b Real-time PCR 溶解曲线图;C:各组转染后 Hsa-miR-193b 相对表达量
1:未转染组;2:模拟物对照组;3:抑制剂对照组;4:模拟物组;5:抑制剂组;a:$P<0.05$,与未转染组比较

图 1 定量 PCR 检测转染后各组 Hsa-miR-193b 表达



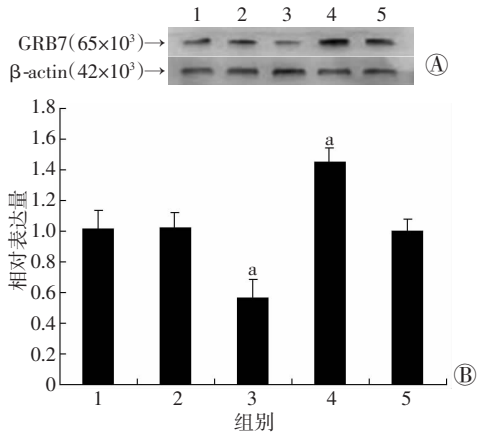
A:模拟物组;B:模拟物对照组;C:未转染组

图 2 Transwell 侵袭实验检测各组细胞形态变化 (×400)



A:GRB7 Real-time PCR 起峰曲线图;B:GRB7 Real-time PCR 溶解曲线图;C:各组 GRB7 mRNA 相对表达量 1:未转染组;2:模拟物对照组;3:抑制剂对照组;4:模拟物组;5:抑制剂组

图 3 Real-time PCR 检测转染后各组 GRB7 mRNA 表达



A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果;1:抑制剂对照组;2:模拟物对照组;3:模拟物组;4:抑制剂组;5:未转染组;a:$P<0.05$,与未转染组比较

图 4 Western blot 检测转染后各组 GRB7 蛋白表达

3 讨论

大多数哺乳动物的 miRNAs 具有调控其他基因表达的功能,而且这种调控具有时空特异性。其参与生命过程中一系列的重要进程,影响多种生物学进程,包括发育,组织形态发生,组织特性维持,细胞生长、分化、凋亡、代谢等[10-11]。通过实验和计算机预测分析,人类基因组编码的 miRNAs 多达 1 000 种,调节着大约 30% 的蛋白质编码基因[12-14]。这个预测提示有可能 miRNAs 调控着所有的细胞通路。Sassen 等[15]研究表明在恶性肿瘤细胞中 miRNAs 表达失调。

在子宫内膜癌研究中,Boren 等[16]研究发现,多个 miRNAs 存在异常表达。在 20 例子宫内膜癌,9 例正常内膜中,用不同基因芯片检测,发现 13 个 miRNAs,

90个mRNAs表达异常。经生物信息学分析,发现其中26个mRNAs是该13个miRNAs的靶mRNA。而且26个mRNAs与细胞凋亡、生长、增生和癌变有关。最近,Wu等[4]分析了10例内膜腺癌组织和癌周对照的非肿瘤组织miRNAs芯片。17个miRNAs在肿瘤组织中表达上调,6个miRNAs表达下调。其中miR-449、miR-205和miR-429上调最显著;miR-193b、miR-99b和miR-204下调最显著。Chung等[17]进一步研究发现部分miRNAs表达还与内膜样腺癌的临床病理特征有关,包括分期、肌层浸润、淋巴结转移和复发。表明子宫内膜癌的发生与miRNAs的异常表达有关。

本研究表明在子宫内膜癌中异常表达的Hsa-miR-193b的模拟物能使HCE-1B细胞的侵袭力明显降低,说明Hsa-miR-193b对肿瘤细胞的侵袭力具有抑制作用。其在子宫内膜癌中的异常下调,提示在子宫内膜的癌变发生或发展过程中具有作用。而且这种调控作用是通过对GRB7翻译水平的调控得以实现,这与miRNAs在哺乳类动物中的作用机制[18]:即抑制其靶基因mRNA的翻译而不影响mRNA水平的表达相符。GRB7是生长因子受体结合蛋白家族成员之一。它及其信号通路在肿瘤细胞移行、增殖、分化及凋亡的过程中起着重要的作用[19]。相关研究表明GRB7的异常表达与肿瘤转移密切相关。如有研究证明GRB7通过FAK信号通路参与肿瘤细胞的移行过程,并在此过程中起重要作用[20];Han等[21-22]报道通过过表达GRB7可以使细胞移行能力增强;Tanaka等[23]研究证实GRB7可以增强细胞的侵袭力,与我们的研究结果一致。

综上所述,Hsa-miR-193b通过调控其靶基因GRB7表达从而参与调控HEC-1B细胞的侵袭能力。对肿瘤中差异表达的miRNAs深入研究,将有助于进一步探明肿瘤的发生机制,为临床诊断和治疗癌症发挥作用。

参考文献:

[1] Cai X, Schafer A, Lu S, *et al*. Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed [J]. PLoS Pathog, 2006, 2(3): e23.

[2] Stark A, Brennecke J, Bushati N, *et al*. Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3′UTR evolution [J]. Cell, 2005, 123(6): 1133-1146.

[3] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.

[4] Wu W, Lin Z, Zhuang Z, *et al*. Expression profile of mammalian microRNAs in endometrioid adenocarcinoma [J]. Eur J Cancer Prev, 2009, 18 (1): 50-55.

[5] Fontana L, Fiori M E, Albini S, *et al*. Antagomir-17-5p abolishes the growth of therapy-resistant neuroblastoma through p21 and BIM[J]. PLoS One, 2008, 3(5): e2236.

[6] Chen C, Ridzon D A, Broomer A J, *et al*. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR[J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33 (20): e179.

[7] Megraw M, Sethupathy P, Corda B, *et al*. miRGen: a database for the study of animal microRNA genomic organization and function[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 35(Database issue): D149-D155.

[8] Lewis B P, Burge C B, Bartel D P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. Cell, 2005, 120(1): 15-20.

[9] Krek A, Grun D, Poy M N, *et al*. Combinatorial microRNA target predictions[J]. Nat Genet, 2005, 37(5): 495-500.

[10] Ouellet D L, Perron M P, Gobeil L A, *et al*. MicroRNAs in Gene Regulation: When the Smallest Governs It All[J]. J Biomed Biotechnol, 2006, 2006(4): 69616.

[11] Song L, Tuan R S. MicroRNAs and cell differentiation in mammalian development[J]. Birth Defects Res C Embryo Today, 2006, 78(2): 140-149.

[12] Berezikov E, Guryev V, van-de-Belt J, *et al*. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes[J]. Cell, 2005, 120(1): 21-24.

[13] Bentwich I, Avniel A, Karov Y, *et al*. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs [J]. Nat Genet, 2005, 37(7): 766-770.

[14] Xie X, Lu J, Kulbokas E J, *et al*. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3′ UTRs by comparison of several mammals[J]. Nature, 2005, 434(7031): 338-345.

[15] Sassen S, Miska E A, Caldas C. MicroRNA: implications for cancer [J]. Virchows Arch, 2008, 452(1): 1-10.

[16] Boren T, Xiong Y, Hakam A, *et al*. MicroRNAs and their target messenger RNAs associated with endometrial carcinogenesis[J]. Gynecol Oncol, 2008, 110(2): 206-215.

[17] Chung T K, Cheung T H, Huen N Y, *et al*. Dysregulated microRNAs and their predicted targets associated with endometrioid endometrial adenocarcinoma in Hong Kong women[J]. Int J Cancer, 2009, 124 (6): 1358-1365.

[18] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, *et al*. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs [J]. Science, 2001, 294(5543): 853-858.

[19] Han D C, Shen T L, Guan J L. The Grb7 family proteins: structure, interactions with other signaling molecules and potential cellular functions[J]. Oncogene , 2001, 20(44): 6315-6321.

[20] Tsai N P, Ho P C, Wei L N. Regulation of stress granule dynamics by Grb7 and FAK signalling pathway[J]. EMBO J, 2008 , 27(5): 715-726.

[21] Shen T L, Han D C, Guan J L. Association of Grb7 with phosphoinositides and its role in the regulation of cell migration [J]. J Biol Chem, 2002, 277(32): 29069-29077.

[22] Han D C, Shen T L, Guan J L. Role of Grb7 targeting to focal contacts and its phosphorylation by focal adhesion kinase in regulation of cell migration[J]. J Biol Chem, 2000, 275(37): 28911-28917.

[23] Tanaka S, Sugimachi K, Kawaguchi H, *et al*. Grb7 signal transduction protein mediates metastatic progression of esophageal carcinoma [J]. J Cell Physiol, 2000, 183(3): 411-415.

(**收稿**:2011-03-09;**修回**:2011-04-01)

(编辑 汪勤俭)