论著

文章编号:1000-5404(2014)10-1074-04

miR-1182调控胃癌细胞人端粒酶反转录酶的分子机制及其对迁移能力的影响

张 丹*,郝宁波*,唐 波,吕沐瀚,谢 睿,胡长江,汪苏敏,杨仕明 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院消化内科)

[摘要] **目的** 研究miR-1182在胃癌细胞中调控人端粒酶反转录酶(human telomerase reverse transcriptase,hTERT)的机制及对其迁移能力的影响。**方法** 胃癌细胞MKN28中转染miR-1182类似物,qRT-PCR检测转染后细胞miR-1182的相对表达量,Western blot检测转染后细胞hTERT的表达变化;进一步通过生物信息学预测miR-1182与hTERT mRNA的结合位点,双荧光素酶实验分析miR-1182对hTERT mRNA的作用机制;Transwell实验检测转染miR-1182类似物对MKN28细胞体外迁移能力的影响。**结果** qRT-PCR表明miR-1182组的miR-1182的相对表达量(10.168±2.645)明显高于对照组(1.008±0.167)($P<0.01$)。Western blot结果显示在胃癌细胞系中过表达miR-1182后,hTERT的蛋白水平下调。双荧光素酶实验表明miR-1182可与hTERT mRNA的ORF区结合,且其主要结合部位为hTERT mRNA的ORF-1;在Transwell迁移实验中,miR-1182类似物转染细胞后,miR-1182组穿膜细胞数为(23.333±4.509)/视野,对照组穿膜细胞数为(71.000±4.582)/视野,miR-1182组细胞迁移能力明显低于对照组($P<0.01$)。**结论** miR-1182通过与胃癌细胞hTERT的ORF区结合,从而在转录后水平抑制hTERT的表达,并发现其可抑制胃癌细胞的迁移能力。

[关键词] 端粒酶反转录酶;miR-1182;胃肿瘤;肿瘤转移
[中图法分类号] R345;R730.23;R735.2 [文献标志码] A

Mechanism of miR-1182 regulating human telomerase reverse transcriptase in gastric cancer cells and its effect on cell migration capability

Zhang Dan*, Hao Ningbo*, Tang Bo, Lyu Muhan, Xie rui, Hu ChangJiang, Wang Sumin, Yang Shiming (Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the mechanism of miR-1182 regulating human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in gastric cancer cells and to study the effect of miR-1182 on the migration capability of gastric cancer cells. **Methods** MKN28 gastric cancer cells were transfected with miR-1182 mimics. Quantitative RT-PCR was used to test the level of miR-1182, and Western blot analysis to detect the expression of hTERT. Bioinformatic analysis was carried out to predict the possible binding sites of miR-1182 to hTERT mRNA. Dual-luciferase assay was adopted to analyze the mechanism of miR-1182 acting on hTERT. Transwell migration assay was used to analyze cell migration ability. **Results** The results of quantitative RT-PCR indicated that the relative expression of miR-1182 in the miR-1182 mimics treatment group was higher than that in the control group (10.168±2.645 *vs* 1.008±0.167, $P<0.01$). Western blot results suggested that over-expression of miR-1182 could inhibit the expression of hTERT. Dual-luciferase assay results suggested that miR-1182 bond to the open reading frame(ORF) of hTERT, with ORF-1 as the main target site. In Transwell migration assay, the cells passing through the membrane were 23.333±4.509 in visual field in the miR-1182 mimics treatment group and 71.000±4.582 in the control group. The migration ability of the cells in the miR-1182 mimics treatment group was significantly lower than that in the control group ($P<0.01$). **Conclusion** MiR-1182 down-regulates hTERT expression by binding to its ORF, and also inhibits the migration capability of gastric cancer cells.

[**Key words**] human telomerase reverse transcriptase; miR-1182; gastric cancer; tumor metastasis

Zhang Dan and Hao Ningbo are the first authors who contributed equally to the article. Corresponding author: Yang Shiming, Tel: 86-23-68765184, E-mail: shimingyang@yahoo.com

胃癌是我国最为常见的肿瘤之一,其5年生存率低且易复发率。端粒酶(telomerase)的活化在胃癌的发生、发展中有着重要作用[1]。端粒酶是一类主要由

* 同等贡献者
[通信作者] 杨仕明,电话:(023)68765184,E-mail:shimingyang@yahoo.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140328.0954.013.html(2014-3-28)

端粒酶反转录酶(TRET)、RNA亚单位(TR)和端粒酶相关蛋白1(telomerase-associated protein 1, TP1)组成的核糖核蛋白复合体,通过对端粒的动态调节进而对细胞增殖、自我更新、凋亡发挥重要作用。人端粒酶反转录酶(human telomerase reverse transcriptase,hTERT)是端粒酶活性的限速酶,其启动子被认为是调节端粒酶活性最关键的元件[2]。我们过去的研究已证实hTERT参与了肿瘤发生、侵袭转移的全过程[3-4]。如今,hTERT已成为一个重要的肿瘤治疗靶点。目前已有大量有关转录水平调节hTERT启动子的研究,如c-Myc、Sp1、Mad1、p53等。而关于hTERT的转录后水平的调控的研究较少,与hTERT相关的miRNAs仅有3篇文献报道[5-7]。本课题组前期利用miRNA芯片、qRT-PCR等技术,筛选到了3条可能在胃癌中调控hTERT的miRNAs:miR-1266、miR-1207-5p和miR-1182。Western blot及双荧光素酶实验进一步证明,miR-1266、miR-1207-5p靶向结合于hTERT 3′UTR进而抑制其表达,而miR-1182在hTERT 3′UTR没有结合活性[7]。文献[8]报道,在54条肿瘤相关基因中,miRNA的结合位点有21.8%位于5′UTR,43.0%位于ORF,35.2%位于3′ UTR。近年来亦有不少文献证实,miRNA可对靶基因ORF区进行调控。因此,本研究拟探讨miR-1182是否存在对hTERT ORF区的调控及其可能的分子机制,以及miR-1182对胃癌细胞迁移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料

胃腺癌细胞MKN28、人胚肾细胞HEK293T细胞为本实验室保存。

1.2 试剂与仪器

高糖DMEM培养液及胎牛血清(美国HyClone公司),双荧光素酶试剂盒(美国Promega公司),萤火虫荧光素酶miRNA表达报告质粒pMIR-Report(美国AB公司),海肾荧光素酶内参质粒pRL-TK(美国Promega公司),8 μm Transwell小室(Millipore公司),miR-1182类似物(广州市锐博生物科技有限公司),DU-640紫外分光光度计(美国Beckman公司),反转录试剂盒(日本TaKaRa公司)

1.3 细胞培养

人胃癌MKN28细胞、HEK293T细胞采用DMEM高塘培养基(10%胎牛血清)于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养。

1.4 qRT-PCR

使用Trizol提取总RNA,将总RNA反转录为cDNA,采用SYBR Green两步法进行PCR扩增反应:95 ℃预变性,30 s;95 ℃变性5 s,60 ℃退火34 s,扩增40个循环。U6作为内参,每个标本均设3个复孔[9-10]。

1.5 Western blot实验

SDS裂解液提取细胞总蛋白,沸水浴5 min使蛋白变性,RCDC法测定浓度,每孔蛋白上样量为30 μg进行SDS-PAGE电泳。常规湿转法转膜,5% 脱脂奶粉封闭1 h,一抗4 ℃过夜(hTERT 1∶2 000,β-actin 1∶500),二抗室温1 h(山羊抗鼠1∶5 000,山羊抗兔1∶10 000)。ECL化学发光法显影[9-10]。

1.6 双荧光素酶实验

委托重庆金麦公司将hTERT的ORF序列克隆至pMIR-Report的MCS位点,构建重组萤火虫荧光素酶报告质粒pMIR-Report(命名为pMIR-Glo-hTERT-ORF),经双酶切电泳及测序鉴定。将重组pMIR-Glo-hTERT-ORF质粒、海肾荧光素酶报告质粒pRL-TK及miRNA类似物(miR-1182类似物、NC类似物)共转染转HEK293T细胞,48 h后检测荧光素酶活性。再将miR-1182与hTERT的ORF区可能的结合区域克隆至pMIR-Report的MCS位点,构建重组萤火虫荧光素酶报告质粒pMIR-Report(命名为pMIR-Glo-hTERT-ORF-1、pMIR-Glo-hTERT-ORF-2),进行双荧光素酶实验。将hTERT-ORF-1片段上miR-1182结合位点突变ACCTTCCTCAGGACCCTGGTCCGAGGT突变为ACCTTCCTCAAGTCGCAGGTCCGAGGT,再次进行双荧光素酶实验[9-10]。

1.7 Transwell体外迁移实验

MKN28细胞接种至6孔板中并分别转染miR-1182类似物和NC类似物,每组设3个复孔。转染24 h后将细胞温和消化下来,计数并接种至Transwell小室上室(约细胞1×10^5/孔),上室为无血清培养基,下室为含10%胎牛血清的培养基。培养24 h后弃掉培养基并用PBS清洗,4%多聚甲醛固定20 min,再用PBS清洗3遍,0.1%结晶紫染色15 min,棉签轻轻刮掉小室上室内的细胞,显微镜下随机选取3个视野并计数。

1.8 生物信息学预测

通过miRanda软件(miRanda v3.3a版,http://www.microrna.org/microrna/getDownloads.do),将hTERT全长纳入分析,寻找miR-1 182可能的结合位点。

1.9 统计学处理

应用SPSS 13.0统计软件分析,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,两组间比较采用t检验。

2 结果

2.1 TargetScan、miRanda预测hTERT为miR-1182的靶基因

采用生物信息学预测miR-1182的靶基因,发现在hTERT的3′UTR及ORF区均存在miR-1182的结合位点(图1)。

2.2 过表达miR-1182抑制hTERT蛋白表达

在胃癌细胞系MKN28中,转染miR-1182类似物进而过表达miR-1182。qRT-PCR结果表明,miR-1182组的miR-1182的相对表达量(10.168±2.645)明显高于对照组(1.008±0.167)($P<0.01$)。Western blot表明,过表达miR-1182后,能够抑制hTERT蛋白表达(图2)。

2.3 双荧光素酶实验证明miR-1182靶向hTERT的ORF区

双荧光素酶实验表明,与转染NC类似物组(0.345±0.012)相比,HEK293细胞miR-1182类似物组荧光素酶表达(0.159±0.010)明显下降($P<0.01$)。

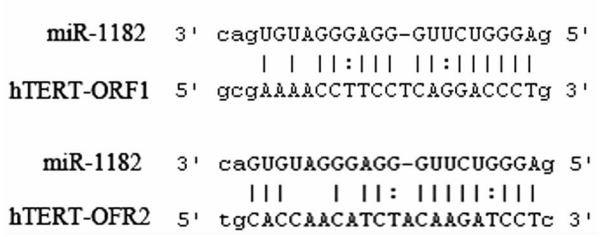
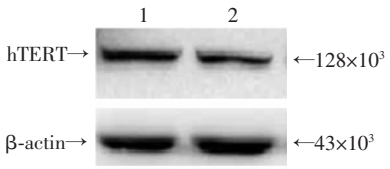


图1 生物信息学预测 hTERT 的 ORF 区中 miR-1182 的结合位点



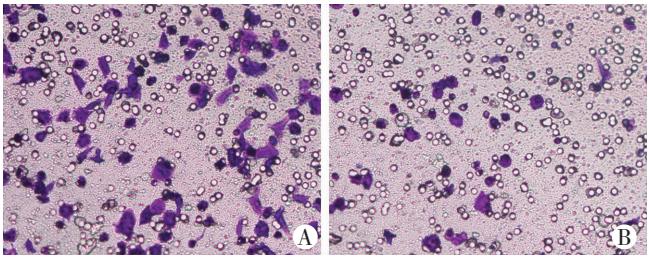
1:转染 NC 组;2:转染 miR-1182 组

图2 Western blot 检测 miR-1182 抑制 hTERT 蛋白表达

转染 pMIR-Glo-hTERT-ORF-1 后,miR-1182 类似物组相对荧光素酶表达(0.656 ± 0.015)低于转染 NC 类似物组(1.000 ± 0.074)($P < 0.01$);而转染 pMIR-Glo-hTERT-ORF-2 后,miR-1182 类似物组与 NC 类似物组荧光素酶表达相比无下降,证明 miR-1182 与 hTERT 的结合部位为 ORF-1 而非 ORF-2。为进一步证实 miR-1182 与 hTERT 的 ORF-1 结合,我们进行了双荧光素酶突变实验,发现将 ORF-1 与 miR-1182 的结合位点突变后,miR-1182 类似物组相对荧光素酶表达(1.032 ± 0.024)与 NC 类似物组(1.000 ± 0.002)相比无统计学差异($P > 0.05$)。

2.4 miR-1182 对胃癌细胞迁移能力的抑制作用

MKN28 细胞转染 miR-1182 类似物 24 h 后,miR-1182 组穿膜细胞数为(23.333 ± 4.509)/视野,对照组穿膜细胞数为(71.000 ± 4.582)/视野,miR-1182 组细胞转移能力明显低于对照组($P < 0.01$)。说明过表达 miR-1182 类似物后可明显抑制胃癌细胞迁移能力(图3)。



A:转染 NC 组;B:转染 miR-1182 组

图3 Transwell 实验检测 miR-1182 对 MKN28 细胞迁移能力的影响 (结晶紫 ×200)

3 讨论

hTERT 的活化在肿瘤的发生及发展中具有相当重要的作用,但有关 hTERT 的调控机制仍尚未完全明确。文献[5]报道,在甲状腺癌中,miR-138 可直接结合到 hTERT 3′UTR 从而抑制其表达。miR-21 通过 stat-3 间接调节神经胶质瘤中 hTERT 的表达[6]。本课题组前期工作筛选了 3 条可能调控 hTERT 的 miRNAs(miR-1207、miR-1266、miR-1182),在胃癌细胞系 SGC-7901 细胞中转染慢病毒过表达 miRNAs 后,Western blot 检测 hTERT 蛋白水平均下降,证实了这 3 条 miRNAs 对 hTERT 具有靶向调控能力。双荧光素酶实验验证了其中两条 miRNAs(miR-1207、miR-1266)在 hTERT 3′UTR 具有结合能力,但 miR-1182 不能通过 3′UTRs 影响 hTERT 的表达[7]。那么 miR-1182 对 hTERT 是否存在其他调控机制呢? 在动物中,miRNAs 主要与靶基因 mRNA 的 3′非翻译区(3′UTRs)结合而抑制 mRNA 翻译。然而近几年来,不少文献报道,动物 ORF 区同样存在 MREs,并已证实 miRNAs 也能通过 ORF 区调控其靶基因。文献[11]在哺乳动物中首先报道,miR-148 家族通过 Dnmt3b 的 CDS 区调控其表达。Forman 等[12]发现,let-7 microRNA 通过识别 Dicer CDS 区的 MREs 进而下调 Dicer 的表达,由此提出:在寻找 MREs 时,应同时考虑靶基因的 CDS 区和 3′UTR。文献[13]报道了 miR-34a 通过 MDM4 的 ORF 区调控。hTERT mRNA 的 ORF 区全长 3399bp,而目前尚没有报道证明有 miRNA 能对此进行调控,因此,本研究就 miR-1182 对 hTERT 的调控机制进行探讨。

首先,我们在另一个细胞系 MKN28 中过表达 miR-1182,Western blot 检测 hTERT 蛋白水平发现 miR-1182 可显著降低 hTERT 的表达。这就再次证明了 miR-1182 对 hTERT 的确存在负性调控作用。接下来,我们将 ORF 全长构建双荧光素酶表达载体,并进行双荧光素酶实验,结果表明 miR-1182 可明显下调 pMIR-ORF 的荧光素酶活性,由此证明 miR-1182 在 ORF 区具有结合能力。接下来,我们将 hTERT ORF 区纳入生物信息学分析,发现 ORF 区存在两个可能的 miR-1182 的结合位点。通过双荧光素酶实验验证,miR-1182 能够与其中的一个位点(ORF-1)结合,并且将结合位点突变以后,双荧光素酶实验证实 miR-1182 对失去结合能力,由此证明 miR-1182 对 hTERT ORF 的靶向调节。本课题组前期研究发现,在 58 例临床标本中,miR-1182 在癌与癌旁的表达差异明显[12]。本研究通过 Transwell 实验,探讨了 miR-1182 对胃癌细胞迁移能力的影响,并发现在胃癌细胞 MKN28 中 miR-1182 过表达后,细胞体外迁移能力减弱。由此我们认为,miR-1182 可作为一个抑癌基因,有望成为胃癌的预后指标。在后续工作中,我们将进行体内试验,进一步研究 miR-1182 对肿瘤迁移能力的影响。并且,考虑到 hTERT 对细胞增殖能力有重要作用,接下来我们也将研究 miR-1182 是否会通过调控 hTERT 影响胃癌细胞的增殖能力。

综上,本研究发现 hTERT mRNA 的 ORF 区同样存在 miRNA 调控位点,miR-1182 在 hTERT mRNA 的 ORF-1 部位具有有效靶向能力,因此完善了 miRNA 对

hTERT 的调控机制。本研究也探讨了 miR-1182 的高表达会抑制胃癌细胞体外迁移能力,有望对胃癌的预后提供理论依据。

参考文献:

[1] Duarte M C, Babeto E, Leite K R, *et al*. Expression of TERT in precancerous gastric lesions compared to gastric cancer[J]. Braz J Med Biol Res, 2011, 44(2): 100-104.
[2] Daniel M, Peek G W, Tollefsbol T O. Regulation of the human catalytic subunit of telomerase (hTERT)[J]. Gene, 2012, 498(2): 135-146.
[3] Yang S M, Fang D C, Luo Y H, *et al*. Alterations of telomerase activity and terminal restriction fragment in gastric cancer and its premalignant lesions[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2001, 16(8): 876-882.
[4] Yu S T, Chen L, Wang H J, *et al*. hTERT promotes the invasion of telomerase-negative tumor cells *in vitro*[J]. Int J Oncol, 2009, 35(2): 329-336.
[5] Mitomo S, Maesawa C, Ogasawara S, *et al*. Downregulation of miR-138 is associated with overexpression of human telomerase reverse transcriptase protein in human anaplastic thyroid carcinoma cell lines[J]. Cancer Sci, 2008, 99(2): 280-286.
[6] Wang Y Y, Sun G, Luo H, *et al*. MiR-21 modulates hTERT through a STAT3-dependent manner on glioblastoma cell growth[J]. CNS Neurosci Ther, 2012, 18(9): 722-728.
[7] Chen L, Lu M H, Zhang D, *et al*. miR-1207-5p and miR-1266 suppress gastric cancer growth and invasion by targeting telomerase reverse transcriptase[J]. Cell Death Dis, 2014, 5: e1034.
[8] Issabekova A, Berillo O, Regnier M, *et al*. Interactions of intergenic microRNAs with mRNAs of genes involved in carcinogenesis[J]. Bioinformation, 2012, 8(11): 513-518.
[9] 何兵, 余松涛, 吕沐瀚, 等. miR-29 通过 ITGB1 抑制胃癌侵袭、转移的分子机制[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(11): 1037-1042.
[10] 曹亚玲, 陈陵, 吕沐瀚, 等. miR-149-5p 在肝细胞癌中的表达及其临床意义[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(7): 627-631.
[11] Duursma A M, Kedde M, Schrier M, *et al*. miR-148 targets human DNMT3b protein coding region[J]. RNA, 2008, 14(5): 872-877.
[12] Forman J J, Legesse-Miller A, Coller H A. A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(39): 14879-14884.
[13] Mandke P, Wyatt N, Fraser J, *et al*. MicroRNA-34a modulates MDM4 expression *via* a target site in the open reading frame[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42034.

(**收稿**:2014-01-28;**修回**:2014-02-28)
(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2014)10-1077-01

经验交流

24 例颅内微小动脉瘤的显微外科手术临床效果分析

冉启山,余云湖,李 航,杨开华,文远超,王 飞 (563000 贵州 遵义,遵义市第一人民医院神经外科)

[**关键词**] 颅内动脉瘤;显微外科手术;微小动脉瘤
[**中图法分类号**] R651.12 [**文献标志码**] B

颅内微小动脉瘤是指动脉瘤瘤体直径≤3 mm 的动脉瘤,因其体积小,大多为宽颈动脉瘤,介入治疗时动脉瘤体积较小,易导致微导管难以到位,多需要辅助技术,给手术增加很大难度。我们用显微手术夹闭的方法治疗直径≤3 mm 的动脉瘤取得了较好的效果,现将 2008 年 12 月至 2013 年 6 月本院行显微手术夹闭的 24 例颅内微小动脉瘤回顾分析如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本组 24 例患者,男性 17 例,女性 7 例,年龄 32~67(51.23±13.15)岁。临床特点:主要临床表现有突发剧烈头痛呕吐,意识模糊,浅昏迷;查体:呈颈项强直;头部 CT 检查均提示蛛网膜下腔出血 2 例见额叶或颞叶少量血肿, Hunt-Hess 分级 2 级 5 例,3 级 17 例,4 级 2 例。4 级患者均合并脑积水。DSA 检查 24 例,CTA 检查 7 例。其中大脑中动脉动脉瘤 5 例,大脑前动脉动脉瘤 2 例,前交通动脉瘤 7 例,脉络膜前动脉动脉瘤 3 例,后交通动脉瘤 2 例,颈内动脉床突段 2 例,小脑后下动脉动脉瘤 3 例。其中 1 例前交通动脉瘤及 1 例后交通动脉瘤介入栓塞不成功改为动脉瘤夹闭。

1.2 手术方法

前循环动脉瘤采用翼点入路:剪开硬膜后,分离侧裂,沿颈内动脉大脑中动脉顺行分离暴露, 2 例 Hunt-Hess 4 级患者(脉络膜前动脉瘤及前交通动脉瘤各 1 例)伴有脑积水,分离外侧裂池前行侧脑室外引流术。3 例 Hunt-Hess 3 级患者术中及术后脑压高行去骨瓣减压术。夹闭动脉瘤选择合适微动脉瘤夹夹闭(德国贝朗医疗国际贸易有限公司蛇牌 AESCULAP 钛合金迷你脑动脉瘤夹)。夹闭后仔细观察瘤颈夹闭是否完全,同时观察载瘤动脉是否通畅,否则调整瘤夹。对 11 例瘤颈菲薄者,在瘤颈处缠绕少许棉丝后夹闭,均顺利夹闭动脉瘤,未出现动脉瘤破裂和夹闭后动脉瘤夹脱落。对动脉瘤夹移动度较大者可用生物蛋白胶固定,防止脑搏动及脑组织复位时动脉瘤夹脱落。对于介入栓塞不成功的 2 例患者,其中 1 例为前交通动脉瘤(图 1),另 1 例为后交通动脉瘤,均因为路径血管迂曲动脉瘤生长方向特殊,微导管不能到位进入动脉瘤内栓塞不成功,直接由导管室转入手术室,进行开颅夹闭。术后所有患者均多次腰穿释放血性脑脊液至化验检查正常。手术后常规给予尼莫地平抗脑血管痉挛治疗。

(下转 1097 页)

[**通信作者**] 冉启山,电话:(0852)8926893,E-mail:ranqishan@126.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140522.0915.001.html(2014-5-22)