论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201506149

miR-200c下调KRAS基因表达抑制膀胱癌细胞体外增殖能力

李建昌[1,2],苏泽轩[1],石利平[1],陈合格[2],柳建军[2],刘 磊[2] (510630 广州,暨南大学附属第一医院泌尿外科[1];524001 广东 湛江,广东医学院附属医院泌尿外科研究室[2])

[摘要] **目的** 探讨miR-200c对膀胱癌细胞体外增殖能力的作用及机制。**方法** 慢病毒感染法建立稳定过表达和稳定低表达miR-200c膀胱癌细胞,分为对照组、稳定过表达miR-200c组(miR-200c组)、稳定低表达miR-200c组(miR-200c-inhibit组),实时定量qRT-PCR和Western blot检测不同实验组膀胱癌细胞中miR-200c、KRAS的表达量,克隆试验检测不同组膀胱癌细胞系的增殖能力。**结果** CCK-8试验显示对照组T24和UM-UC-3与miR-200c组分别为0.833 3±0.062 1、0.650 3±0.088 7和0.939 0±0.018 1、0.806 0±0.021 6,2组间差异有统计学意义(T24,$P<0.05$;UM-UC-3,$P<0.01$)。稳定过表达miR-200c后,膀胱癌细胞系内KRAS蛋白的表达降低($P<0.05$)。**结论** miR-200c在体外通过下调KRAS基因降低膀胱癌细胞的增殖能力。

[关键词] 膀胱癌;miR-200c;KRAS;增殖

[中图法分类号] R394.3; R730.23; R737.14 [文献标志码] A

miR-200c inhibits proliferation in bladder cancer cells through down-regulation of KRAS

Li Jianchang[1,2], Su Zexuan[1], Shi Liping[1], Chen Hege[2], Liu Jianjun[2], Liu Lei[2] ([1]Department of Urology, First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou, Guangdong Province, 510630; [2]Department of Urology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong Province, 524001, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the role and underlying mechanism of miR-200c in the proliferation of bladder cancer. **Methods** After lentiviruses were used to stably over-express and antagonize miR-200c in bladder cancer 5637, TCC-SUP and UM-UC-3 cells, RT-qPCR and Western blotting were intended to detect the expression changes of miR-200c and KRAS. Dual luciferase reporting system was used to verify whether miR-200c regulated the 3′UTR of KRAS as target. Colony formation assay was applied to analyze the change of colony formation abilities of bladder cancer cells in different groups. **Results** CCK-8 assay that cell viability was 0.833 3±0.062 1 and 0.650 3±0.088 7 in the controlled and miR-200c T24 cells ($P<0.05$), and 0.939 0±0.018 1 and 0.806 0±0.021 6 in the controlled and miR-200c UM-UC-3 cells ($P<0.01$). Stably over-expression of miR-200c resulted in significant decrease in protein expression of KRAS ($P<0.05$). **Conclusion** miR-200c suppresses the proliferation of bladder cancer cells by down-regulating the expression of KRAS protein, which indicates that KRAS plays a vital role in the incidence and progression of bladder cancer.

[**Key words**] bladder cancer; miR-200c; KRAS; proliferation

Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2012B031800221). Corresponding author: Su Zexuan, E-mail: suz2008@126.com

[基金项目] 广东省自然科学基金(2012B031800221)

[通信作者] 苏泽轩,E-mail: suz2008@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151015.1505.004.html(2015-10-15)

MicroRNA(miRNA)是近年新发现的一类可调控基因表达的内源性非编码单链小分子RNA,其异常表达与多种肿瘤的发生、发展有密切关系[1-4]。miR-200家族被认为在多种肿瘤中发挥作用。最近研究发现miR-200c可抑制胰腺癌的浸润与转移,是胰腺癌的一个独立预后因子[2]。KRAS基因是一类癌基因,其表达产物KRAS蛋白激活下游信号因子,从而造成细胞大量增殖,发生恶变。近期研究[5]表明,miR-200c能够靶向结合KRAS癌基因,在乳腺癌中起到抑制肿瘤发展的作用。也有报道,miR-200c能够对KRAS进行调控[6],从而抑制肿瘤的发生、发展。但miR-200c是否能靶向KRAS癌基因从而调控膀胱癌细胞的生长,目前研究报道较少。我们通过生物信息工具(DIANA、Miranda、TargetScan)预测得知,KRAS是miR-200c的靶基因,应用双荧光素酶报告试验证明miR-200c与KRAS的3′非翻译区(3′-untranslated region,3′-UTR)能够特异性结合,进一步分析miR-200c对膀胱癌细胞的增殖能力的影响和作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

4个膀胱癌细胞株(5637、TCC-SUP、UM-UC-3、T24)和正常输尿管上皮细胞(SV-HUC-1)购自广州Jennio生物科技有限公司,DMEM basic(×1)培养基500 mL、BSA胎牛血清购自美国Life Technologies公司,TEMED、Bradford蛋白浓度测定试剂盒、Western及IP细胞裂解液购自碧云天生物技术研究所,PrimeScript® miRNA qPCR Starter Kit Ver.2.0试剂盒购自TaKaRa公司,miR-200c、miR-200c-inhibit和Negative control mimics委托上海吉玛基因公司合成,miR-200c序列为5′-CCCUCGUCUUACCCAGCAGUGUUUGGGUGCGGUUGGGAGUCUCUAAUACUGCCGGGUAAUGAUGGAGG-3′。见表1。

表1 qRT-PCR的目标基因引物序列

引物	引物序列:5′-3′	片段长度(bp)	温度(℃)
RNU6B	上游:CTCGCTTCGGCAGCACA	17	59.42
	下游:AACGCTTCACGAATTTGCGT	20	55.75
miR-200c	上游:TAATACTGCCGGGTAATGATGG	22	58.21
	下游:TCGTATCCAGTGCAGGGTC	19	59.72
GAPDH	上游:TGCACCACCAACTGCTTAG	19	60.07
	下游:AGTAGAGGCAGGGATGATGTTC	22	59.72

1.2 细胞培养

人膀胱上皮永生化细胞SV-HUC-1、人膀胱移行细胞癌细胞TCC-SUP、人膀胱癌细胞T24和人膀胱移行细胞癌细胞UM-UC-3均在含10%胎牛血清和1×10^4 U/mL青霉素链霉素的高糖DMEM里培养,人膀胱癌5637细胞在含10%胎牛血清和1×10^4 U/mL青霉素链霉素的高糖1640里培养。培养293T细胞用于慢病毒感染。

1.3 RNA提取及实时定量qRT-PCR

总RNA和miRNA的提取分别用总RNA试剂盒和miRNA试剂盒(广州,Omega Bio-tek公司),应用反转录试剂盒(TaKaRa公司)将各标本的总RNA反转录成cDNA。按SYBR Premix Ex *Taq* Ⅱ说明书提供的两步法在PCR仪上检测miR-200c的表达水平。以$2^{-\Delta\Delta Ct}$值表示miR-200c的相对表达水平。通过实时定量qRT-PCR检测5637、TCC-SUP、T24、UM-UC-3和SV-HUC-1的miR-200c的表达,计算miR-200c的相对表达水平。

1.4 慢病毒转染构建并筛选稳定过表达及低表达miR-200c的膀胱癌细胞株

培养293T细胞。慢病毒感染法建立稳定过表达和稳定低表达miR-200c膀胱癌细胞,分为对照组、稳定过表达miR-200c组(miR-200c组)、稳定低表达miR-200c组(miR-200c-inhibit组)。miR-200c组、miR-200c-inhibit组以及对照质粒通过慢病毒包装后收集病毒,慢病毒感染前18~24 h,T24和UM-UC-3细胞以1×10^5/孔铺到6孔板中,使细胞在慢病毒感染时的数量为2×10^5/孔。第2天,每孔用1 mL终浓度为6 μg/mL聚凝胺的新鲜培养基替换原培养基,加60 μL病毒悬液。放入细胞培养箱37 ℃孵育。转染3~4 d后开始加药筛选。每隔2~3 d换1次1 μg/mL嘌呤霉素常规培养基。药物筛选约10 d后,拍荧光照片,实时定量qRT-PCR检测miR-200c的表达情况。

1.5 Western blot法检测细胞中蛋白表达

用常规Western blot方法进行蛋白定量试验,一抗抗体为anti-KRAS抗体。转膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育。化学发光、显影、定影。

1.6 双荧光素酶报告基因检测

根据In-Fusion® HD Cloning Kit说明书中的引物设计原理,运用In-Fusion®引物设计在线工具,进行设计和构建合成含有能够与miR-200c结合的种子序列KRAS 3′ UTR的引物。将合成后的KRAS 3′ UTR片段连接于荧光素酶报告基因载体pmirGLO中。构建pmirGLO KRAS突变型质粒。培养HEK293细胞。实验分为KRAS野生型(Wt)组和KRAS突变型(Mut)组,检测荧光素酶活性值。

1.7 CCK-8增殖实验

将转染了对照质粒(对照组)、miR-200c质粒(miR-200c组)和miR-200c-inhibit质粒(miR-200c-inhibit组)的T24和UM-UC-3细胞(5×10^3/孔)分别接

种于96孔板，每组3个重复孔，培养6 d。加入CCK-8试剂，反应2 h，用96孔板酶标仪在450 nm测量每个孔，统计数据。

1.8 克隆形成实验

在直径为60 mm的培养皿里接种细胞，分别为转染了对照质粒、miR-200c质粒和miR-200c-inhibit质粒的T24和UM-UC-3细胞，正常培养。UM-UC-3细胞培养7 d，T24细胞培养12 d，然后用考马斯亮蓝染色20 min，清洗3次。

1.9 靶基因生物信息学分析

利用miRNA靶基因预测软件DIANA、Miranda、TargetScan对miR-200c的靶基因进行预测，如三个软件均预测可靶向调控KRAS基因，则进一步对其相互关系进行分析。

1.10 统计学方法

采用SPSS 17.0软件统计，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间差异的比较采用方差分析。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 膀胱癌细胞中miR-200c的表达下降

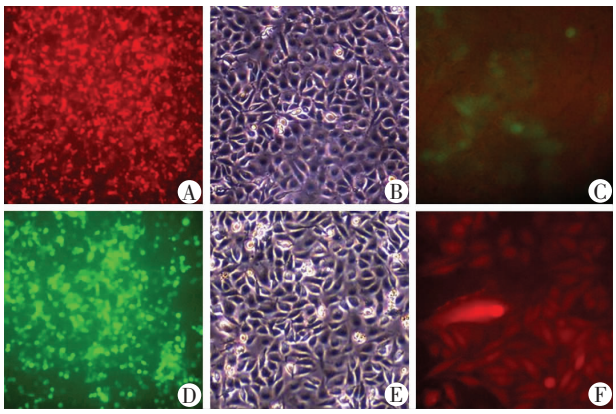
通过实时定量qRT-PCR检测，T24（0.143 ± 0.020）和UM-UC-3细胞系中miR-200c表达（0.078 ± 0.010）明显低于SV-HUC-1（1.003 ± 0.089），也低于5637（0.265 ± 0.015）、TCC-SUP（0.170 ± 0.009）。方差分析显示，与SV-HUC-1相比，T24和UM-UC-3细胞系中miR-200c表达差异有统计学意义（T24，$P<0.05$；UM-UC-3，$P<0.05$）。我们选择T24和UM-UC-3细胞作为继续研究的目标细胞，以明确miR-200c在膀胱癌中所发挥的作用。

2.2 成功构建过表达及低表达miR-200c的膀胱癌细胞株

图1A、B为293T细胞，用于包装病毒，可见荧光表达明显，红色荧光为低表达miR-200c质粒标志，绿色荧光为高表达miR-200c标志。图1C、D为未做处理的膀胱癌细胞系。图1E、F为病毒感染并经过筛选后的膀胱癌细胞系。实时定量qRT-PCR结果显示，miR-200c组较对照组miR-200c表达明显升高（T24，$P<0.01$；UM-UC-3，$P<0.01$），miR-200c-inhibit组较对照组miR-200c表达明显降低（T24，$P<0.05$；UM-UC-3，$P<0.01$），见图1、2。

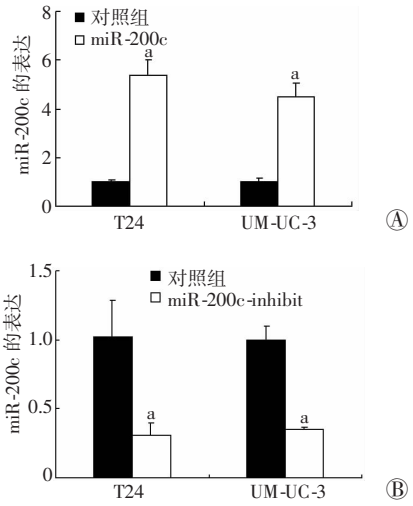
2.3 CCK-8实验证实miR-200c降低膀胱癌细胞增殖能力

CCK-8实验结果显示对照组T24和UM-UC-3较miR-200c组增殖能力明显增强（T24，$P<0.05$；UM-UC-3，$P<0.01$），较miR-200c-inhibit组增殖能力减弱（T24，$P<0.01$；UM-UC-3，$P<0.01$）。见图3。



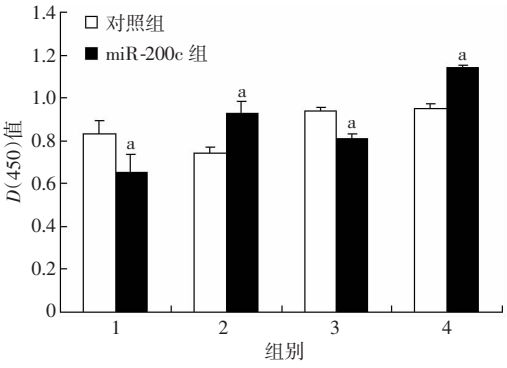
A：293T细胞（低表达miR-200c）；B：293T细胞（高表达miR-200c）；C：未处理的T24；D：未处理的UM-UC-3；E：病毒感染及筛选后的T24；F：病毒感染及筛选后的UM-UC-3

图1 不同处理的293T细胞与膀胱癌细胞系



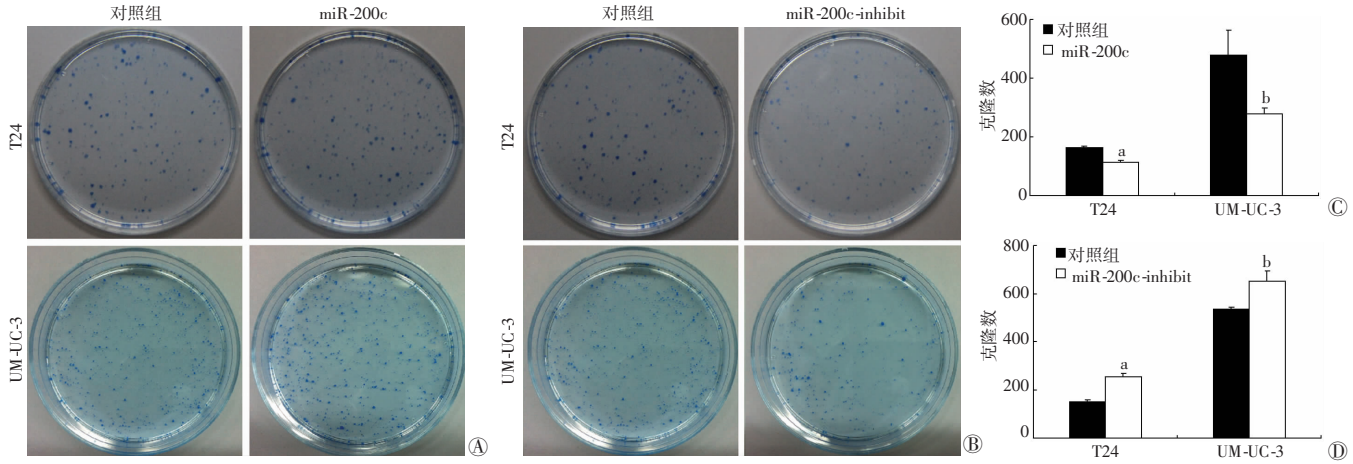
a：$P<0.01$，与对照组比较 A：稳定过表达miR-200c的T24和UM-UC-3膀胱癌细胞系；B：稳定低表达miR-200c的T24和UM-UC-3膀胱癌细胞系

图2 qRT-PCR检测慢病毒包装后T24及UM-UC-3细胞miR-200c的表达



a：$P<0.01$，与对照组比较 1：过表达miR-200c的T24；2：低表达miR-200c的T24；3：过表达miR-200c的UM-UC-3；4：低表达miR-200c的UM-UC-3

图3 CCK-8检测miR-200c对膀胱癌细胞增殖能力的影响



a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与对照组比较　A、C:过表达 miR-200c 组及半定量分析;B、D:低表达 miR-200c 组及半定量分析

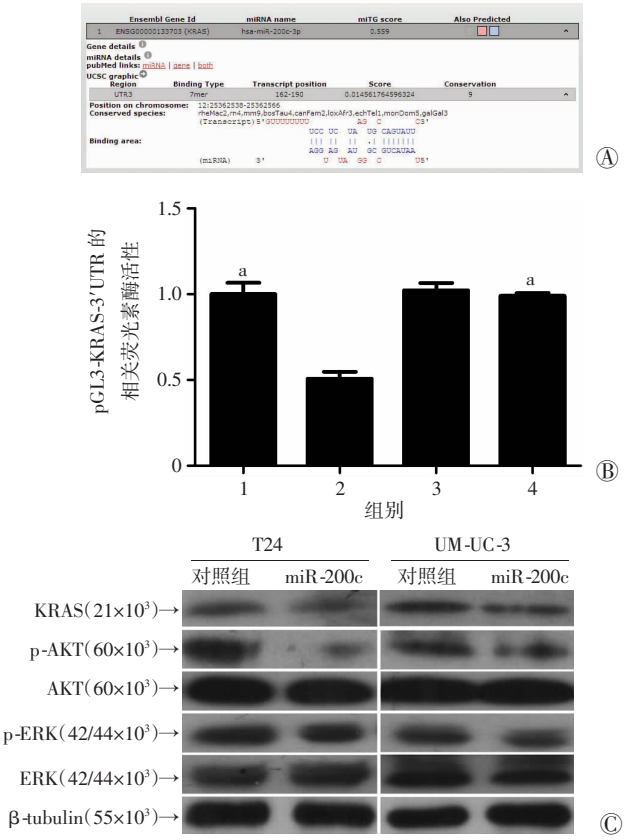
图 4　克隆形成实验检测 miR-200c 对膀胱癌细胞增殖能力的影响

2.4　克隆形成实验显示 miR-200c 降低膀胱癌细胞增殖能力

克隆形成实验显示,对照组 T24 和 UM-UC-3 较过表达 miR-200c 组克隆形成明显增多,增殖能力减弱(T24,$P<0.01$;UM-UC-3,$P<0.05$),而低表达 miR-200c 的 T24 和 UM-UC-3 较对照组克隆形成能力增强(T24,$P<0.01$;UM-UC-3,$P<0.05$),见图 4。

2.5　miR-200c 靶向结合 KRAS 基因并抑制其表达

靶基因预测结果显示,miR-200c 与 KRAS 的 3′ UTR 有一个结合位点(图 5A)。针对 KRAS 设计并构建荧光素酶报告基因载体,利用海肾荧光素报告基因共转染进行内对照,减少内在的变化因素对实验准确性的影响,结果见图 5B。KRAS 野生型组 miR-200c 转染后荧光素酶活性较 Mut 转染组降低,活性受到了明显抑制,两组差异有统计学意义($P<0.05$)。进一步对 miR-200c 抑制膀胱癌细胞增殖的作用机制进行研究,发现过表达 miR-200c 影响 KRAS 蛋白的表达。Western blot 法对细胞内的 KRAS 蛋白进行定量分析(图 5C),过表达 miR-200c 后 KRAS 蛋白表达较对照组显著降低,其下游通路蛋白也发生变化,包括磷酸化的 AKT 和磷酸化的 ERK。



A:miR-200c 对 KRAS 的靶向调控预测;B:双荧光素酶报告基因实验　1:WT-对照组;2:WT-miR-200c;3:Mut-对照组;Mut-miR-200c;a:$P<0.01$,与 WT-miR-200c 比较;C:Western blot 检测 KRAS 的表达

图 5　miR-200c 靶向调控 KRAS 的观察

3　讨论

目前研究[7-10]表明,miR-200c 在膀胱癌中是肿瘤抑制基因,而癌基因 KRAS 是 miR-200c 的目标基因。在膀胱癌细胞系中,miR-200c 的表达较在泌尿系尿路上皮细胞明显降低,提示 miR-200c 在膀胱癌中呈现低表达,推测其在膀胱癌的发生、发展中起着重要作用,而 miR-200c 降低后失去了其抗癌作用,最终导致膀胱癌的发生。本研究发现,将膀胱癌细胞内的 miR-200c 表达提升后,KRAS 的表达水平下降,同时膀胱癌细胞系的增殖能力降低;沉默掉膀胱癌细胞系里的内源性

miR-200c,KRAS 的表达升高,膀胱癌细胞系的增殖能力升高。然而有趣的是,miR-200c 在胰腺癌表达增高后,其增殖能力增强[2]。Liu 等[11]研究发现,在非小细胞肺癌组织中 miR-200c 的表达水平均高于正常组织,而且肿瘤组织中 miR-200c 表达越高,预后越差。提示 miR-200c 在不同肿瘤中可能扮演抑制肿瘤基因或癌基因角色,需进一步研究。

miR-200c 是如何发挥肿瘤抑制作用的呢? 本研究通过 miRNA 基因靶点预测软件预测和双荧光素酶报告基因检测,证实癌基因 KRAS 是 miR-200c 的直接靶点,能够被靶向结合,上调 miR-200c 降低了 KRAS 基因的表达。其下游通路也发生变化,包括磷酸化的 AKT 和磷酸化的 ERK,在过表达 miR-200c 后也发生下降,从而影响膀胱癌细胞的增殖能力。文献[12]报道,KRAS 基因作为一种促进肿瘤进展的分子,能促进膀胱癌细胞的增殖。本研究结果表明,过表达 miR-200c 抑制 T24 和 UM-UC-3 膀胱癌细胞的增殖能力。

本研究发现,miR-200c 能抑制体外培养的膀胱癌细胞的增殖,提示 miR-200c 在膀胱癌中起到肿瘤抑制作用,表明双重角色的 miR-200c 是一种促进或抑制肿瘤发生、发展的 miRNA,需要定义在一个特定类型肿瘤中讨论 miRNA 的具体作用。我们推测,遗传和微环境因素可能是重要影响因素,它们决定 miRNA 分子的功能,或促进或抑制癌基因的活动。因此,需要去彻底了解它的分子机制以及不同的生物学效应,以及 miR-200c 在膀胱癌和其他肿瘤中参与的细胞通路,也包括通路中各个分子之间的相互作用。

本研究确定了增殖的调节因子 KRAS 是 miR-200c 的直接靶向结合目标,该基因控制着增殖的状态和强度,说明原癌基因 KRAS 将成为十分有价值的抗癌治疗靶点。但是我们未知的还有很多,如 miR-200c 在膀胱癌中是通过何种机制发生表达变化的。总之,膀胱癌中 miR-200c 的表达下调机制,是由于基因缺失或启动子甲基化所导致的? 尚需进一步的探讨。本研究结果提示,miR-200c 有望成为诊断和提示预后的生物标志物。目前对 miR-200 家族的研究尚处于起步阶段,不够全面,尤其是在肿瘤的发生、发展过程中,miR-200c 的表达升高与降低的机制尚未得到证实,是肿瘤发生的原因还是存在其他的调控过程而导致 miR-200c 的表达或高或低,我们将进一步研究。

参考文献:

[1] 邱钧, 金俊余, 孙建国, 等. 实时定量 PCR 检测 miR-373 *、miR-200c 在乳腺癌干细胞中的表达及其靶基因预测[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(10): 984 - 987.

[2] Yu J, Ohuchida K, Mizumoto K, *et al*. MicroRNA, hsa-miR-200c, is an independent prognostic factor in pancreatic cancer and its upregulation inhibits pancreatic cancer invasion but increases cell proliferation[J]. Mol Cancer, 2010, 9: 169.

[3] Vrba L, Jensen T J, Garbe J C, *et al*. Role for DNA methylation in the regulation of miR-200c and miR-141 expression in normal and cancer cells[J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8697.

[4] Ceppi P, Mudduluru G, Kumarswamy R, *et al*. Loss of miR-200c expression induces an aggressive, invasive, and chemoresistant phenotype in non-small cell lung cancer[J]. Mol Cancer Res, 2010, 8(9): 1207 - 1216.

[5] Tanic M, Yanowsky K, Rodriguez-Antona C, *et al*. Deregulated miRNAs in hereditary breast cancer revealed a role for miR-30c in regulating KRAS oncogene[J]. PloS One, 2012, 7(6): e38847.

[6] Kopp F, Wagner E, Roidl A. The proto-oncogene KRAS is targeted by miR-200c[J]. Oncotarget, 2014, 5(1): 185 - 195.

[7] Liu Y, Zhang M, Qian J, *et al*. miR-134 functions as a tumor suppressor in cell proliferation and epithelial-to-mesenchymal Transition by targeting KRAS in renal cell carcinoma cells[J]. DNA Cell Biol, 2015, 34(6): 429 - 436.

[8] Hara T, Jones M F, Subramanian M, *et al*. Selective targeting of KRAS-mutant cells by miR-126 through repression of multiple genes essential for the survival of KRAS-mutant cells[J]. Oncotarget, 2014, 5(17): 7635 - 7650.

[9] Okudela K, Suzuki T, Umeda S, *et al*. A comprehensive search for microRNAs with expression profiles modulated by oncogenic KRAS: potential involvement of miR-31 in lung carcinogenesis[J]. Oncol Rep, 2014, 32(4): 1374 - 1384.

[10] Mahdavinezhad A, Mousavi-Bahar S H, Poorolajal J, *et al*. Evaluation of miR-141, miR-200c, miR-30b Expression and Clinicopathological Features of Bladder Cancer[J]. Int J Mol Cell Med, 2015, 4(1): 32 - 39.

[11] Liu X G, Zhu W Y, Huang Y Y, *et al*. High expression of serum miR-21 and tumor miR-200c associated with poor prognosis in patients with lung cancer[J]. Med Oncol, 2012, 29(2): 618 - 626.

[12] Ouerhani S, Bougatef K, Soltani I, *et al*. The prevalence and prognostic significance of KRAS mutation in bladder cancer, chronic myeloid leukemia and colorectal cancer[J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(6): 4109 - 4114.

(**收稿**:2015-06-30;**修回**:2015-07-17)

(编辑 龙 亮)