MicroRNA-203 对人下咽癌细胞转移能力的影响及其机制研究

高 丽[1,2],卞 卡[2] (1. 第四军医大学学员一旅,陕西 西安 710038;2. 第四军医大学唐都医院耳鼻咽喉科,陕西 西安 710038)

[摘 要] **目的** 研究 MicroRNA-203 对人下咽癌细胞迁移能力的影响及作用机理。**方法** 利用生物信息学方法预测 MicroRNA-203 的下游调控靶分子,利用荧光素酶报告基因实验、qRT-PCR、与 Westenr blot 等方法对其中与调节细胞迁移有关的靶分子 MEKK1 进行验证,证实下咽癌细胞中 MEKK1 的表达是否受 MicroRNA-203 的影响。通过细胞迁移实验研究 MicroRNA-203 对下咽癌细胞迁移能力的影响,进一步阐明可能影响下咽癌转移能力的因素。**结果** 在过表达 MicroRNA-203 的下咽癌细胞中,Westenr blot 检测靶基因蛋白表达量分析、qRT-PCR 检测靶基因 mRNA 表达量和双荧光素酶报告基因实验结果均提示 MicroRNA-203 下调靶基因 MEKK1 的表达。细胞迁移实验证明过表达 MicroRNA-203 可显著抑制下咽癌细胞的迁移能力。**结论** MEKK1 是 MicroRNA-203 的直接下游作用靶点,MicroRNA-203 有可能通过负向调控 MEKK1 抑制下咽癌细胞的转移能力。

[关键词] MicroRNA-203;MEKK1;下咽癌;转移

[中图分类号] R739.91 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)03-0241-04

doi:10.11659/jjssx.01E015026

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81202138)

[通讯作者] 卞 卡,E-mail:kakamax85@hotmail.com

[收稿日期] 2015-02-26 [修回日期] 2015-03-25

机制是通过激活 P38 得以实现的。但有研究[7]认为 MBL 可以内在化进入细胞后促进细胞凋亡,因此 MBL 如何调控细胞凋亡的具体机制还需要进一步探讨。

综上所述,本研究发现高浓度 rhMBL 可促进 Caco-2细胞凋亡,并且其可能是通过 P38 途径参与 Caco-2细胞凋亡的调控,提示 MBL 在病理情况下升高,可能加重肠黏膜屏障损伤,为预防屏障损伤提供一个潜在的靶点。

[参考文献]

[1] Ip WK, Takahashi K, Ezekowitz RA, et al. Mannose-binding lectin and innate immunity[J]. Immunol Rev, 2009, 230(1): 9 – 21.

[2] Takahashi K. Mannose-binding lectin and the balance between immune protection and complication[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2011, 9(12): 1179 – 1190.

[3] Stuart LM, Takahashi K, Shi L, et al. Mannose-binding lectin-deficient mice display defective apoptotic cell clearance but no autoimmune phenotype [J]. J Immunol, 2005, 174(6): 3220 – 3226.

[4] Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease[J]. Mol Immunol, 2003, 40(7): 423 – 429.

[5] Wang Y, Chen AD, Lei YM, et al. Mannose-binding lectin inhibits monocyte proliferation through transforming growth factor-beta1 and p38 signaling pathways [J]. PLoS One, 2013, 8(9): e72505. doi: 10.1371/journal.pone.0072505

[6] 雷艳梅,王 燕,张丽芸,等. 甘露聚糖结合凝集素诱导人白血病细胞系 U937 细胞凋亡[J]. 热带医学杂志, 2011, 11(5): 496 – 499.

[7] van der Pol P, Schlagwein N, van Gijlswijk DJ, et al. Mannan-binding lectin mediates renal ischemia/reperfusion injury independent of complement activation [J]. Am J Transplant, 2012, 12(4): 877 – 887.

[8] Uemura K, Saka M, Nakagawa T, et al. L-MBP is expressed in epithelial cells of mouse small intestine [J]. J Immunol, 2002, 169(12): 6945 – 6950

[9] Williams JM, Duckworth CA, Watson AJ, et al. A mouse model of pathological small intestinal epithelial cell apoptosis and shedding induced by systemic administration of lipopolysaccharide [J]. Dis Model Mech, 2013, 6(6): 1388 – 1399.

[10] 马远航,杨松巍,孙礼刚,等. SIRT1 在 TNF-α 介导的肠上皮屏障破坏中的作用及机制研究[J]. 重庆医学, 2014, 43(16): 1969 – 1971.

[11] Hart ML, Ceonzo KA, Shaffer LA, et al. Gastrointestinal ischemia-reperfusion injury is lectin complement pathway dependent without involving C1q[J]. J Immunol, 2005, 174(10): 6373 – 6380.

[12] Matthijsen RA, Derikx JP, Steffensen R, et al. Mannose-binding lectin null alleles are associated with preserved epithelial cell integrity following intestinal ischemia reperfusion in man[J]. Mol Immunol, 2009, 46(11): 2244 – 2248.

[13] Sun L, Wang W, Xiao W, et al. Angiotensin II induces apoptosis in intestinal epithelial cells through the AT2 receptor, GATA-6 and the Bax pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 424(4): 663 – 668.

[14] Parente R, Trifirò E, Cuozzo F, et al. Cyclooxygenase-2 is induced by p38 MAPK and promotes cell survival[J]. Oncol Rep, 2013, 29(5): 1999 – 2004.

[15] Park SJ, Kim IS. the role of p38 MAPK activation in auranofin-induced apoptosis of human promyelocytic leukaemia HL-60 cells[J]. Br J Pharmacol, 2005, 146(4): 506 – 513.

(编辑:周小林)

Research on functions and mechanisms of MicroRNA-203 on migration of human hypopharyngeal carcinoma cells

GAO Li[1,2], BIAN Ka[2] (1. Brigade 1, Fourth Military Medical University, Xi'an Shaanxi 710038, China; 2. Department of Otolaryngology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an Shaanxi 710038, China)

Abstract: Objective To determine the roles and underlying molecular mechanism of MicroRNA-203 on the migration of human hypopharyngeal carcinoma cells. **Methods** The potential MicroRNA-203 target genes were searched by bioinformatic miRNA target prediction tools and KEGG database, and a large number of candidates was identified. The MEKK1 was selected for further investigation. This gene is known to play a role in tumor metastasis. The MicroRNA-203's binding sites in MEKK1's mRNA 3'UTR were analyzed by luciferase reporter assays. Nextly, the protein expression of MEKK1 in Fadu-Lv-MicroRNA-203 cells was determined by Western blot assay. The regulation of MEKK1's mRNA expression by MicroRNA-203 was analyzed by qRT-PCR. Transwell cell migration assays were performed to confirm the impact of MicroRNA-203 on hypopharyngeal carcinoma metastasis. **Results** The expression level of endogenous MicroRNA-203 was negatively correlated with the mRNA and protein expression levels of MEKK1 in hypopharyngeal carcinoma cells. Transwell migration assay results showed that MicroRNA-203 overexpression inhibited hypopharyngeal carcinoma cell migration ability. Furtherly, MEKK1 can promote hypopharyngeal carcinoma cell migration ability. **Conclusion** MEKK1 is a direct target of MicroRNA-203. MicroRNA-203 plays a role in hypopharyngeal carcinoma cell migration ability through MEKK1.

Keywords: MicroRNA-203; MEKK1; hypopharyngeal carcinoma; migration

下咽癌又称为喉咽癌,是原发于舌根、会厌、梨状窝、杓会厌皱襞、环状软骨后区、喉咽侧壁及后壁等区域的一种病因不明的恶性肿瘤。下咽癌发病率不高,占全身恶性肿瘤的 0.5%,但 5 年生存率仅有 25% ~ 40%[1-2]。目前治疗方式以手术为主,辅以围手术期的放化疗等综合治疗。导致生存率不高的主要原因是下咽癌易出现转移,半数以上的患者早期即出现颈部淋巴结转移。因此弄清楚下咽癌转移的发生原理及影响转移的分子机制对于深入了解下咽癌,改善其治疗效果、提高患者生存率有非常重要的临床意义。MicroRNA 是一类由内源基因编码的长度为 22 个核苷酸左右的非编码单链 RNA 分子,它们在动植物中参与转录后基因表达调控。我们已经通过研究证明,MicroRNA-203 在一些肿瘤中可以发挥抑癌微小 RNA 的作用[3],但其在下咽癌中的作用尤其是对下咽癌转移机制的影响尚不清楚。本实验研究了 MicroRNA-203 通过调控靶基因 MEKK1 在下咽癌的转移中起的作用,对于进一步阐明 MicroRNA-203 对下咽癌的生物学活性的影响具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

人下咽癌细胞系 Fadu 由美国 Baylor 医学院 Weiwen Long 副教授馈赠。pcDNA3-MEKK1 质粒、由美国 Baylor 医学院 Weiwen Long 教授馈赠。相关试剂载体:MEKK1 兔源多克隆抗体(美国 Enzo Life Sciences 公司),β-actin 鼠源单克隆抗体(美国 Sigma 公司)。反转录试剂盒(美国 Invitrogen 公司)。克隆质粒 pMD-18T(日本 Takara 公司);慢病毒系统 pLenti-6.3(美国 Invitrogen 公司)。荧光素酶实验报告基因质粒(美国 Promega 公司)。主要仪器设备:Western blot 系统(美国 Bio-Rad 公司),RT-PCR 检测仪(美国 ABI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 过表达 MicroRNA-203 的慢病毒包装 构建含有目的基因 pre-MicroRNA-203 的慢病毒载体,纯化提取质粒,将慢病毒载体与包装系统共转染病毒包装细胞 293T,培养 48 ~ 72 h 后收集含有病毒的上清培养液得到慢病毒 Lv-MicroRNA-203 与 Lv-luc,将病毒纯化和浓缩后得到的病毒上清检测滴度,-80 ℃保存备用。

1.2.2 qRT-PCR 检测慢病毒 Lv-Luc 及 Lv-MicroRNA-203 转染 Fadu 细胞后 MicroRNA-203 的表达 用慢病毒 Lv-luc 与 Lv-MicroRNA-203 分别转染下咽癌细胞 Fadu,用 Trizol 法分别提取 Fadu-Lv-Luc 和 Fadu-Lv-MicroRNA-203 两种细胞的 RNA,利用 Reverse Transcription Kit(Invitrogen 公司)进行 MicroRNA-203 的逆转录,得到的产物进行实时定量 PCR 反应。

1.2.3 细胞迁移能力检测实验 饥饿细胞 12 ~ 24 h 后制备细胞悬液,调整细胞密度至 5×10^5/mL。取细胞悬液 100 μl 加入 Transwell 小室,24 孔板下室加入 600 μl 含血清的培养基。注意下层培养基和小室间不要产生气泡。常规培养细胞 18 h,取出 Transwell 小室,弃去孔中培养液,PBS 洗 2 遍,甲醇固定 30 min,将小室适当风干。0.1% 结晶紫染色 15 min,用棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞,用 PBS 洗 3 遍。显微镜下随机 5 个视野观察细胞,记数。

1.2.4 利用生物信息学方法预测 MicroRNA-203 下游调控靶分子 在喉癌细胞中利用生物信息学分析软件 TargetScan、MiRanda 和 PicTar 分析 MicroRNA-203 可能的下游靶基因,预测 miRNA 种子区的结合;根据得出的分值高低,预测出相关下游靶基因,将靶基因的 3'UTR 与 MicroRNA-203 种子区序列进行比对。

1.2.5 荧光素酶报告基因法验证 MicroRNA-203 的靶基因 构建双荧光素酶表达载体,将希望鉴定的 MicroRNA-203 靶基因的 MEKK1 的 3'UTR 插入荧光素酶基因的 3'UTR 中,得到 pGL3-WT-MEKK1-UTR/pGL3-mut-MEKK1-UTR 及对照载体 pRL-TK。将构建好的重组载体转染 Fadu-Lv-MicroRNA-203 细

胞与阴性对照 Fadu-Lv-Luc 细胞,培养 48 h 后检测细胞荧光素酶的表达情况。检测方法参照 Dual-Glo Luciferase Assay System 说明书。计算分析数据。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 17.0 统计软件,采用独立样本 t 检验进行分析,结果以 $P<0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 qRT-PCR 检测稳定感染 Lv-Luc 及 Lv-MicroRNA-的 Fadu 细胞中 MicroRNA-203 的表达

用慢病毒 Lv-luc 与 Lv-MicroRNA-203 分别转染下咽癌细胞 Fadu,得到 Fadu-Lv-Luc 与 Fadu-Lv-MicroRNA-203。qRT-PCR 结果显示与阴性对照 Fadu-Lv-Luc 细胞相比,Fadu-Lv-MicroRNA-203 细胞的 MicroRNA-203 的表达量提高了约 390 倍($P<0.01$)。说明利用慢病毒 Lv-MicroRNA-203 感染 Fadu 细胞得到了稳定高表达 MicroRNA-203 的下咽癌细胞株(图 1)。

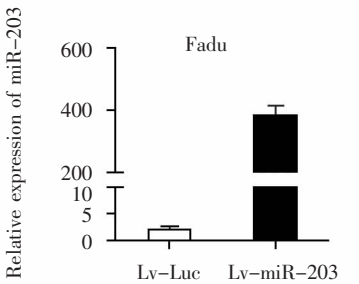
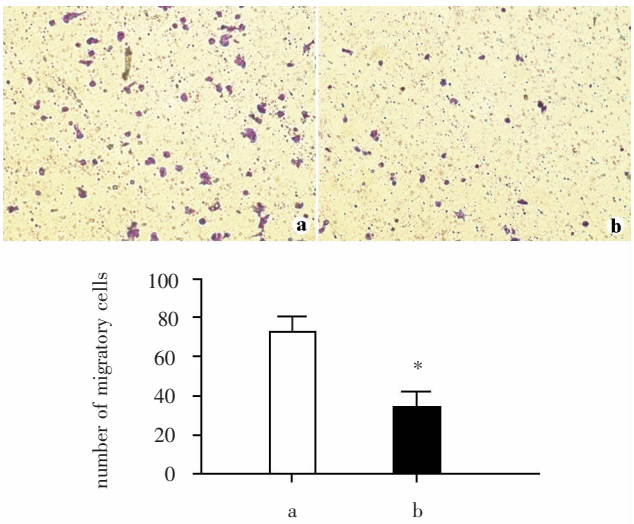


图 1 qRT-PCR 检测慢病毒感染的 Fadu 细胞 MicroRNA-203 表达量

2.2 MicroRNA-203 对下咽癌细胞迁移能力的调控

Transwell 实验显示,在过表达 MicroRNA-203 的下咽癌细胞 Fadu-Lv-MicroRNA-203 中,穿过 Transwell 膜的细胞数远远多于对照 Fadu-Lv-Luc($P<0.05$),说明在下咽癌细胞中高表达 MicroRNA-203 可以显著降低肿瘤细胞的迁移能力(图 2)。

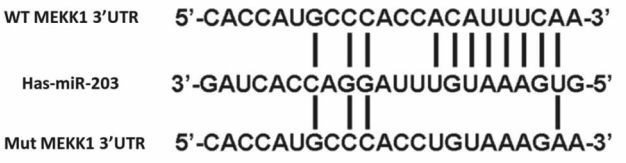


a:Fadu-Lv-MicroRNA-203 细胞数;b:Fadu-Lv-Luc(对照)细胞数;*:与 Fadu-Lv-MicroRNA-203 细胞数比较,$P<0.05$

图 2 transwell 实验检测下咽癌细胞的迁移

2.3 MEKK1 是 MicroRNA-203 的下游负向调控分子

使用 miRanda、TargetScan、PicTar 3 种微小 RNA 靶基因预测软件,通过分析得出 MicroRNA-203 的潜在可能靶基因 MEKK1。结合 KEGG 数据库,将 MicroRNA-203 与 MEKK1 的 3'UTR 区进行同源互补分析,图 3 所示两者有明显的种子区互补的假想位点,说明 MEKK1 有可能是 MicroRNA-203 的下游靶基因之一,同时在报告基因中对 MEKK1 成功进行了单点突变的载体构建。

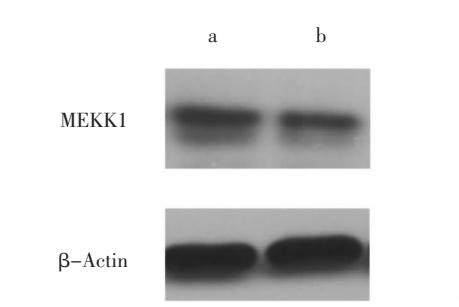


WT MEKK1:野生型 MEKK1 序列;Mut MEKK1:MEKK1 点突变序列

图 3 MicroRNA-203 序列与 MEKK1 3'UTR 序列相关性分析

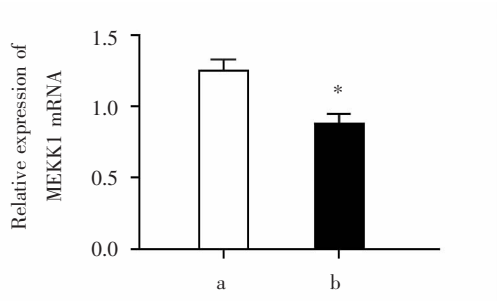
2.4 下咽癌细胞高表达 MicroRNA-203 后 MEKK1 蛋白表达的变化

Western blot 与 qRT-PCR 结果显示,在下咽癌细胞中高表达 MicroRNA-203 后 MEKK1 的蛋白表达水平(图 4)及 mRNA 表达水平(图 5)均有显著下降($P<0.05$),提示 MicroRNA-203 可通过结合 MEKK1 3'UTR 发挥转录后基因沉默作用,通过加速降解 MEKK1 mRNA 来降低 MEKK1 蛋白的表达。



a:阴性对照 Fadu-Lv-Luc 细胞;b:高表达 MicroRNA-203 的 Fadu-Lv-MicroRNA-203 细胞

图 4 Western blot 检测过表达 MicroRNA-203 的下咽癌细胞中 MEKK1 的蛋白表达

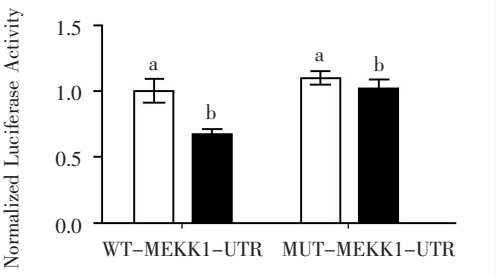


a:阴性对照 Fadu-Lv-Luc 细胞;b:高表达 MicroRNA-203 的 Fadu-Lv-MicroRNA-203 细胞;*:与阴性对照 Fadu-Lv-Luc 细胞比较,$P<0.05$

图 5 qRT-PCR 检测过表达 MicroRNA-203 的下咽癌细胞中 MEKK1 的 mRNA 表达量

2.5 双荧光素酶检测 MicroRNA-203 对 MEKK1 有抑制作用

本实验结果显示,在下咽癌细胞 Fadu 中转染 MEKK1 萤光素酶表达载体后,在高表达 MicroRNA-203 的 Fadu 细胞(图 6)中,MEKK1 的荧光素酶活性大大降低,是正常下咽癌细胞(图 6)的 65%。但我们将 MEKK1 进行突变后,MicroRNA-203 的表达对 MEKK1 的荧光素酶活性则无影响。提示 MEKK1 可能是 MicroRNA-203 的一个下游调控靶分子,MicroRNA-203 与 MEKK1 的 3'UTR 结合后对它进行负性调控。



a:阴性对照 Fadu-Lv-Luc 细胞;b:高表达 MicroRNA-203 的 Fadu-Lv-MicroRNA-203 细胞

图 6 双荧光素酶报告基因实验检测 MicroRNA-203 对 MEKK1 的作用

3 讨论

近年来,伴随对人类基因组结构与功能的进一步深入探析,科学家们发现在基因组的转录产物中存在一类长度约为 19 ~ 25 nt 的小核酸类物质微小 RNA(microRNA,miRNA),它可以通过结合与自身序列部分碱基互补匹配的 mRNA 分子,通过抑制其翻译或降解 mRNA 自身达到转录后基因沉默的调节功能,已知的 MicroRNA 已经超过千种[4]。众多研究[5-14]表明 MicroRNA 与肿瘤发生发展密切相关。以 MicroRNA-203 为例,研究发现 MicroRNA-203 在宫颈癌等许多恶性肿瘤中高表达,表现出癌基因的作用[5-6],然而在肝癌等另一部分肿瘤中,MicroRNA-203 又被发现起到抑癌基因的作用[7-14]。因此,MicroRNA-203 在不同类型的肿瘤中起到怎样的作用,需要更加深入地研究。我们的前期实验结果显示,慢病毒介导过表达 MicroRNA-203 明显抑制了头颈肿瘤细胞的增殖能力及细胞周期进展速率[3],其通过结合 survivin 3'UTR 发挥转录后基因沉默的作用,抑制 survivin 在头颈肿瘤细胞中的表达,进而影响对细胞存活及增殖的生物学效应。由此我们相信,MicroRNA-203 在头颈肿瘤的发生发展及转归中很可能是一个重要的功能分子和预后评价指标。本实验进一步研究了 MicroRNA-203 对下咽癌细胞转移能力的影响,证明 MEKK1 为 MicroRNA-203 的有效下游靶基因,有可能通过 MicroRNA-203 对其的抑制发挥着调控下咽癌转移能力的作用。MEKK1 是 MAPK 信号转导通路中的结点位置,其生物学作用与肿瘤的增殖、迁移、运动、侵袭等密切相关[15]。虽然 MEKK1 在肿瘤的生物学活动中起到十分重要的作用,但目前还没有有效的 MEKK1 抑制剂上市,因此深入研究 MEKK1 在信号转导通路中的的作用机制,寻找 MicroRNA-203 等直接作用于 MEKK1 的可靠抑制剂,对于肿瘤的特异性治疗具有重要意义。

[参考文献]

[1] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010[J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277 - 300.

[2] Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(1): 9 - 22.

[3] Bian K, Fan J, Zhang X, et al. MicroRNA-203 leads to G1 phase cell cycle arrest in laryngeal carcinoma cells by directly targeting survivin[J]. FEBS Lett, 2012, 586(6): 804 - 809.

[4] Wery M, Kwapisz M, Morillon A. MicroRNA-203 leads to G1 phase cell cycle arrest in laryngeal carcinoma cells by directly targeting survivin[J]. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2011, 3(6): 728 - 738.

[5] Iorio MV, Visone R, Di Leva G, et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer[J]. Cancer Res, 2007, 67(18): 8699 - 8707.

[6] Ikenaga N, Ohuchida K, Mizumoto K, et al. MicroRNA-203 expression as a new prognostic marker of pancreatic adenocarcinoma[J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17(12): 3120 - 3128.

[7] Furuta M, Kozaki KI, Tanaka S, et al. miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(5): 766 - 776.

[8] Yuan Y, Zeng ZY, Liu XH, et al. MicroRNA-203 inhibits cell proliferation by repressing ΔNp63 expression in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. BMC Cancer, 2011, 11: 57. doi: 10.1186/1471 - 2407 - 11 - 57.

[9] Bueno MJ, Pérez de Castro I, Gómez de Cedrón M, et al. Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression[J]. Cancer Cell, 2008, 13(6): 496 - 506.

[10] Li J, Chen Y, Zhao J, et al. miR-203 reverses chemoresistance in p53-mutated colon cancer cells through downregulation of Akt2 expression[J]. Cancer Lett, 2011, 304(1): 52 - 59.

[11] Bo J, Yang G, Huo K, et al. microRNA-203 suppresses bladder cancer development by repressing bcl-w expression[J]. FEBS J, 2011, 278(5): 786 - 792.

[12] Chiang Y, Song Y, Wang Z, et al. Aberrant expression of miR-203 and its clinical significance in gastric and colorectal cancers[J]. J Gastrointest Surg, 2011, 15(1): 63 - 70.

[13] Saini S, Arora S, Majid S, et al. Curcumin modulates microRNA-203-mediated regulation of the Src-Akt axis in bladder cancer[J]. Cancer Prev Res (Phila), 2011, 4(10): 1698 - 1709.

[14] Saini S, Majid S, Yamamura S, et al. Regulatory role of miR-203 in prostate cancer progression and metastasis[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(16): 5287 - 5298.

[15] Wu LC, Shao YX. Map3k1 regulation of mouse eyelid closure[J]. Chinese Journal of Zoology, 2011, 46(3): 144 - 151.

(编辑:杨 颖)