基础研究 文章编号:0253-3626(2009)06-0668-04

Dicer 在胃癌细胞和胃癌组织的表达及意义

聂 娜,吴小翎,刘 波
(重庆医科大学附属第二医院消化内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨 Dicer 在胃癌(Gastric carcinoma)细胞和胃癌组织中的表达及意义。方法:应用 Western-Blot 和逆转录-聚合酶链反应(Reverse transcriptase polymerase chain reaction,RT-PCR)检测正常胃粘膜细胞株 GES-1、人胃癌细胞株 SGC-7901,25 例胃癌手术标本及癌旁配对组织 Dicer 的含量。结果:1.Western-Blot 和 RT-PCR 结果表明 Dicer 在人胃癌细胞株 SGC-7901 的表达水平明显低于正常胃粘膜细胞株 GES-1($P<0.05$),在胃癌手术标本组织的表达水平明显低于癌旁配对组织($P<0.05$);2.Dicer 表达水平与胃癌分化程度有关。低分化组低于中分化组($P<0.05$),中分化组低于高分化组($P<0.05$)。结论:在胃癌细胞株和胃癌组织中 Dicer 表达明显降低并且 Dicer 表达与胃癌分化程度相关。

【关键词】Dicer;胃癌;逆转录-聚合酶链反应
【中国图书分类法分类号】R5 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-02-13

The expression and significance of Dicer in gastric cell lines and gastric cancer tissue

NIE Na, et al
(*Department of Gastroenterology and Hepatology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To detect the expression and significance of Dicer in gastric cell lines and gastric cancer tissue. *Methods*: Western-Blot and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to detect the expression of Dicer in normal gastric mucosa cell line GES-1, human gastric cancer cell line SGC-7901, 25 surgical removed gastric cancer tissue and paired para-tumor tissue. *Results*: 1.The expression of Dicer in human gastric cancer cell line SGC-7901 was lower than that in normal gastric mucosa cell line GES-1 ($P<0.05$), the expression of Dicer in gastric cancer tissue was lower than that in complete sequence tissue ($P<0.05$); 2.The expression of Dicer is correlated with differentiation degrees of gastric cancer. The expression of Dicer in poorly differentiation group is lower than that in moderately differentiation group ($P<0.05$), and the expression of Dicer in moderately differentiation group is lower than that in well differentiation group ($P<0.05$). *Conclusion*: The expression of Dicer is obvious

作者介绍:聂 娜(1982-),女,硕士,研究方向:胃癌方面。
通讯作者:吴小翎,男,教授,E-mail:zzb68485383@126.com。

tients with advanced pancreatic cancer[J]. Journal of Clinical Oncology, 2006, 24 (18 s):14151.

[4] 潘国凤,张晓东,朱晓新.姜黄素抗肿瘤作用及其机制研究最新进展[J].中药药理与临床,2007,23(5):247-252.

[5] 范婷婷,赵纯全,杨 蕾.姜黄素对宫颈癌 Caski 细胞中 Pleiotrophin 蛋白表达的影响[J].重庆医科大学学报,2008,33(7):825-827.

[6] Inge L J, Rajasekaran S A, Yoshimoto K. Evidence for a potential tumor suppressor role for the Na^+-K^+-ATPase beta1-subunit[J]. Histol Histop athol, 2008, 23 (4):459-467.

[7] Singh S, Khar A. Biological effects of curcumin and its role in cancer chemoprevention and therapy[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2006, 6(3):259-270.

[8] Tamvakopoulos C, Dimas K. Metabolism and anticancer activity of the curcumin analogue, dimethoxycurcumin[J]. Clin. Cancer Res, 2007, 13: 1269-1277.

[9] Nilsson B, Mijatovic T, Mathieu A, et al. Targeting Na^+/K^+-ATPase in non-small cell lung cancer[J]. NSCLC, 2007, 25: 18144.

[10] Duran M J, Pressley, Thomas A. Regulation of Na^+/K^+-ATPase in prostate cancer: a role for PKC[J]. FASEB, 2007, 21: A1428.

[11] Balasubramanian S, Eckert R L. Curcumin suppresses AP1 transcription factor-dependent differentiation and activates apoptosis in Human epidermal keratinocytes[J]. Biol. Chem, 2007, 282: 6707-6715.

[12] Aung C, Roberts-Thomson S, Monteith G. Role of plasma membrane calcium ATPase(PMCA) in colon cancer[J]. AACR Meeting Abstracts, 2007, 2007: A35.

[13] Bartolommei G, Francesco, Buoninsegni T. Clotrimazole inhibits the Ca^{2+}-ATPase(SERCA) by interfering with Ca^{2+} binding and favoring the E2 conformation[J]. Biol. Chem, 2006, 281: 16384-16390.

[14] Kamath R, Jiang Z H, Sun G M, et al. c-Abl kinase regulates curcumin-induced cell death through activation of c-Jun N-Terminal kinase[J]. Mol. Pharmacol. 2007, 71: 6-72.

[15] Krstic D, Krinulovic K, Vasic V. Inhibition of Na^+/K^+-ATPase and Mg^{2+}-ATPase by metal ions and prevention and recovery of inhibited activities by chelators[J]. Enzyme Inhib Med Chem, 2005, 20(5):469-476.

(责任编辑:冉明会)

descend in gastric cancer tissue and gastric cancer cell lines and correlated with differentiation degrees of gastric cancer.
【Key words】Dicer; Gastric carcinoma; RT-PCR

胃癌(Gastric carcinoma)是指胃粘膜上皮细胞发生的癌变,是人类常见的恶性肿瘤,居全球肿瘤发病和癌症死亡率第二位。胃癌的发生是一个多因素多步骤进行性发展的过程。在正常情况下,胃粘膜上皮细胞的增殖和凋亡之间保持动态平衡。这种平衡的维持有赖于癌基因,抑癌基因及一些生长因子的共同调控。

Dicer 基因是细胞内的重要基因,与细胞存活和胚胎发育有关;同时 Dicer 蛋白属于 *RNase* Ⅲ,主要存在于细胞质,是参与 miRNA 成熟的重要酶。该酶与其酶切产物之一 miRNA 及其他蛋白质形成核酸蛋白复合物在多种生物过程中起调节作用,包括细胞增殖、分化、凋亡、死亡等。近年来,发现 miRNA 与人类癌症的发生发展密切相关。由此推测 miRNA 是一类新的癌基因或肿瘤抑制基因,但鲜有关于 Dicer 在肿瘤中表达的报道。本实验研究原发性胃癌组织及胃癌细胞中 Dicer 的表达及与与胃癌分化程度的关系,以进一步探讨胃癌发病机理。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

GES-1 于上海生物所购买,培养基为 10%胎牛血清 1640 (杭州四季青);SGC-7901 由重庆医科大学基础研究所购买,培养基为 10%小牛血清 1640(杭州四季青),所有细胞均置于 5%CO2 培养箱中 37℃培养。

1.2 胃癌标本的采集

胃癌标本均来自于重庆医科大学附属第一医院胃肠外科手术患者,男性 15 例,女性 10 例,年龄 55 ~ 65 岁。分别取癌瘤的中央部位及癌旁配对组织,采集标本后一部分立即提取蛋白和 RNA,所提蛋白和 RNA 置液氮 -80℃保存备用,其余手术标本送病理切片,并进行严格的病理诊断。按 WHO 分类方法,其中高分化腺癌 7 例 (28%),中分化腺癌 8 例 (32%)低分化腺癌 10 例(40%),癌旁配对组织经病理诊断证实均为同一正常胃组织。

1.3 Western-Blot 半定量检测 Dicer

两种细胞传 5 代后,待细胞长满,倒掉培养液,用预冷的 PBS 洗 3 次,将 PBS 弃净后把培养瓶置于冰上。按 1 ml 裂解液加 10 μl PMSF, 每瓶细胞加 400 μl 含 PMSF 的裂解液于冰上提取蛋白; 取 50 ~ 100 mg 胃癌组织及癌旁配对标本于冰冻匀浆器中进行匀浆, 同样用含 PMSF 裂解液 500 μl 提取蛋白, 蛋白提取后置于液氮 -80℃中保存备用。Western-Blot 分析各蛋白样品 Dicer 的含量。首先制作蛋白含量的标准曲线,再检测各样品的蛋白含量。分别配制 4%浓缩胶和 5%分离胶,第一孔加 marker 5 μl,其余各孔分别加细胞或组织提取的蛋白 20 μl,于120 V 电泳 2~3 h,剪下含有目的蛋白的分离胶条带,于 60 V 电压转膜 2.5 h 左右,将转印上蛋白的 pvdf 膜于室温下 10%脱脂奶粉 TBST 液脱色摇床封闭 1 h,用滤纸吸干膜上液体,于特制的器皿中放置 pvdf 膜,再于器皿中加 1:500 兔抗 Dicer 抗体 1 ml 和 β-actin 1 ml,4℃冰箱过夜, 将载有目的蛋白的 pvdf 膜用 TBST 液摇床洗 20 min,用样滤纸吸干 pvdf 膜上多余的液体,于特制的器皿中加入 1:200 辣根过氧化物酶耦联的抗兔二抗 1 ml 与之结合,于室温下孵育 1 h,用 TBST 室温下脱色摇床洗 30 min,进行 E-CL 化学发光显影。将膜进行拍照,凝胶图像处理系统分析目标带的分子量和净光密度值。GES-1、SGC-7901、每份手术标本及癌旁配对组织 Western-Blot 重复 5 次。

1.4 RT-PCR 半定量检测 Dicer

采用小量柱离心式总 RNA 抽提试剂盒 (上海华舜生物工程有限公司)按试剂说明书抽提 SGC-7901,GES-1,胃癌组织及癌旁配对组织的总 RNA, 最后用 DEPC 处理水溶解 RNA。提取的总 RNA 经紫外分光光度计测定提取物浓度,A_{260}/A_{280} 比值在 1.8 ~ 2.0。运用 PrimeScript™ RT-PCR 试剂盒 (TaKaRa)合成样本 cDNA4℃保存备用。扩增 Dicer 上游引物:5'-CTCACCACAACTTCCCACCT-3',下游引物:5'-TGTCTC-GATGCCTGTGTCTC-3',扩增产物长度 372 bp; β-actin 上游引物:5'-GCTGTCCCTGTATGCCCTCT-3',下游引物:5'-TTGAT GTCACGCACGATTT-3',扩增产物长度 222 bp。Dicer 基因及 β-actin 基因 PCR 引物由上海生物工程公司合成。反应体系:反应体积为 50 μl,cDNA5 μl, 引物浓度 0.1 mmol/L,taq 酶 2.5 μl。反应条件:94℃预变性 1 min,94℃变性 30 s,57℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,共 30 个循环,最后 72℃延伸 5 min。反应产物在 1%琼脂糖凝胶电泳, 经紫外凝胶呈像分析系统分析目的片段扩增带和 β-actin 扩增带,用两者灰度值的比值表示 Dicer mRNA 的相对含量。GES-1、SGC-7901、每份手术标本及癌旁配对组织 RT-PCR 重复 5 次。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 13.0 统计分析软件对实验数据进行 t 检验。

2 结 果

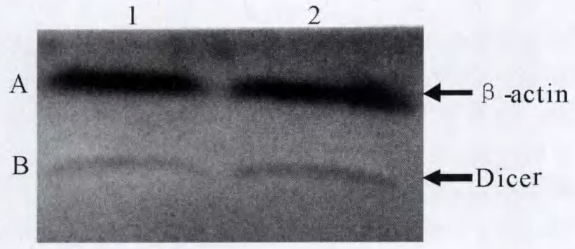
2.1 Dicer 蛋白的表达

采用 Western-Blot 对 SGC-7901、GES-1、胃癌组织及癌旁配对组织所提取蛋白样品进行检测,结果显示:Dicer 在以

上样品均有表达。

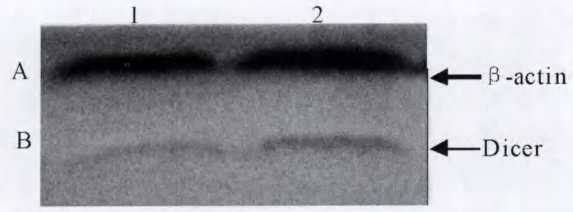
2.1.1 与 GES-1 中 Dicer（0.260 00 ± 0.017 00）相比，SGC-7901 中 Dicer 的表达量（0.080 00 ± 0.007 50）显著下降（$P<0.05$），见图 1。

2.1.2 与癌旁配对组织中 Dicer(0.400 00 ± 0.007 00)相比，胃癌标本中 Dicer 的表达量(0.010 00 ± 0.005 85)显著下降($P<0.05$)，见图 2。



1. SGC-7901；2. GES-1

图 1 Western-Blot 检测 SGC-7901 与 GES-1 中 Dicer 蛋白的表达



1. 手术标本胃癌组织；2. 癌旁配对组织

图 2 Western-Blot 检测胃癌组织与癌旁配对组织中 Dicer 蛋白的表达

2.1.3 Western-Blot 半定量分析 不同分化程度腺癌中 Dicer 含量值，低分化腺癌组织 Dicer 含量(0.006 50 ± 0.001 20)，中分化腺癌组织 Dicer 含量(0.011 00 ± 0.001 80)，高分化腺癌组织 Dicer 含量（0.014 00 ± 0.002 95）。胃癌分化程度降低，Dicer 表达下降，低分化组低于中分化组($P<0.05$)，中分化组低于高分化组($P<0.05$)，见表 1。

表 1 不同分化程度腺癌中 Dicer 含量

分化程度	例数	Dicer 含量
低分化腺癌	10	0.006 50 ± 0.001 20
中分化腺癌	8	0.011 00 ± 0.001 80
高分化腺癌	7	0.014 00 ± 0.002 95

注：$P<0.05$

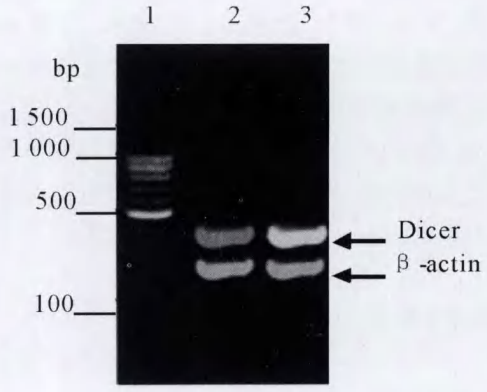
2.2 Dicer mRNA 的表达水平

RT-PCR 实验结果：分别抽提胃癌细胞 SGC-7901，正常胃粘膜细胞 GES-1，胃癌组织及癌旁配对组织的总 RNA，电泳可见 RNA28S、18S 和 5S 三条带。纯度测定 OD_{260}/O_{D280} 比值为 1.9～2.0，证明 RNA 抽提完整、无降解、无蛋白质污染。分别以上述总 RNA 为模板，以 Dicer 和 β-actin 的引物进行 RT-PCR。结果显示：SGC-7901，GES-1，胃癌组织及癌旁配对组织的 RT-PCR 产物在 372 bp 左右出现特异条带，与 Dicer 片断大小相符，即 Dicer 在以上样品均有表达。

2.2.1 与 GES-1Dicer mRNA（0.130 00 ± 0.008 50）相比，SGC-7901Dicer mRNA 的表达(0.041 00 ± 0.003 75)显著下降($P<0.05$)，见图 3。

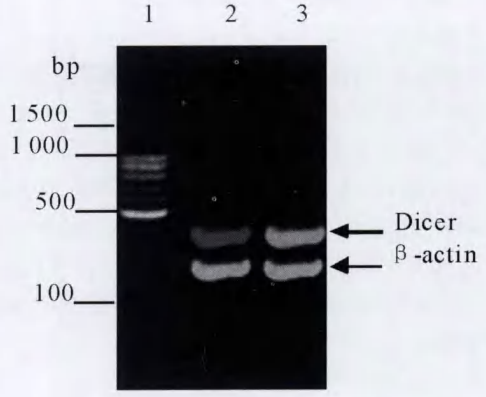
2.2.2 与癌旁配对组织中 Dicer mRNA(0.200 00 ± 0.003 50)相比，胃癌标本中 Dicer mRNA 的表达(0.005 10 ± 0.002 93)显著下降($P<0.05$)，见图 4。

2.2.3 RT-PCR 检测不同分化程度腺癌中 Dicer mRNA 的表达，低分化腺癌组织 Dicer mRNA 含量(0.003 20 ± 0.000 60)，中分化腺癌组织 Dicer mRNA 含量(0.005 60 ± 0.000 90)，高分化腺癌组织 Dicer mRNA 含量(0.007 10 ± 0.001 47)。胃癌分化程度降低，Dicer 表达下降，低分化组低于中分化组（$P<0.05$），中分化组低于高分化组($P<0.05$)，见表 2。



1. Marker；2. SGC-7901；3. GES-1

图 3 RT-PCR 检测 SGC-7901 与 GES-1 中 Dicer mRNA 的表达



1. Marker；2. 手术标本胃癌组织；3. 癌旁配对组织

图 4 RT-PCR 检测胃癌组织与癌旁配对组织 Dicer mRNA 的表达

表 2 不同分化程度腺癌中 Dicer mRNA 含量

分化程度	例数	Dicer 含量
低分化腺癌	10	0.003 20 ± 0.000 60
中分化腺癌	8	0.005 60 ± 0.000 90
高分化腺癌	7	0.007 10 ± 0.001 47

注:$P<0.05$

3 讨 论

核酸内切酶 Dicer,属 *RNase* Ⅲ,与细胞存活和胚胎发育有关。Dicer 也是参与 miRNA 生物合成及成熟的重要酶。这类 miRNA 数量很多且高度保守,构成一个 RNA 调节体系[1]。能够通过与靶 mRNA 特异性的碱基配对引起靶 mRNA 的降解或者抑制其翻译,从而对基因进行转录后表达调控[2]。当 miRNA 与某一基因同源时,若与该基因 mRNA 的 3',端非翻译区不完全互补结合,此时核酸蛋白复合物会阻止该基因 mRNA 翻译成相应的蛋白质,称之此为翻译抑制[3];若与该基因 mRNA 完全互补结合,则在核酸蛋白复合物核酸内切酶 Dicer 的作用之下,该基因 mRNA 就会被切割降解,达到基因沉默效应,发挥类似 siRNA 的作用[4,5]。越来越多的实验证明这些 miRAN 导致 RNA 量的改变与与人类肿瘤的发生有关[6,7]。在慢性淋巴细胞白血病患者中发现 miR-15 和 miR-16 这两个基因的表达有缺失或下调[8,9];在结、直肠肿瘤中,miR-13 和 miR-145 表达减少;在原发性肝癌中,miR-16 表达下降;在肺癌细胞系中,miR-26a 和 miR-99a 表达减少;在肺癌组织中,let-7miRNA 表达下降,并且产生 let-7miRNA 的 RNase Ⅲ Dicer 的表达也是下降的,这种患者预后差,生存率低[10]。因此,可以推测 miRNA 的上游酶 Dicer 在肿瘤的发生发展中也起着非常重要的作用。

本研究小组前期报道胃癌细胞及胃癌组织中 miR-433,miR-9 等表达下降[11]。本文应用 Western-Blot 及 RT-PCR 研究了胃癌细胞及胃癌组织中 Dicer 的表达,结果发现 Dicer 蛋白和 Dicer mRNA 在 SGC-7901 中的表达低于 GES-1($P<0.05$),在胃癌组织中表达亦低于癌旁配对组织($P<0.05$),表明 Dicer 在胃癌细胞及组织中表达均下降,可能通过其相应 miRNA 的作用形成的非对称 RNA 沉默复合物(RNA-induced silencing complex,RISC)与目标靶 mRNA 特异性的碱基配对引起靶 mRNA 的降解或者抑制其翻译,影响癌基因或抑癌基因的表达从而使癌基因表达上调或使抑癌基因表达下降,因而与胃癌的发生发展相关;实验结果发现胃癌中 Dicer 蛋白和 Dicer mRNA 的表达低分化组低于中分化组($P<0.05$),中分化组低于高分化组($P<0.05$),表明 Dicer 与胃癌分化程度相关,提示 Dicer 表达越低,对 RISC 调节基因表达引起癌基因表达上调或使抑癌基因表达下降的影响越显著,因而促进胃癌发展与演化。

综上,本研究分别从基因和蛋白水平证明了胃癌组织和胃癌细胞中 Dicer 的表达降低,并且 Dicer 的表达与胃癌的分化程度相关,有助于进一步深化胃癌相关 miRNA 研究,这为研究胃癌发病机制及 Dicer 下游产物 miRNA 的功能奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Basyuk E,Suavet F,Doglio A, et al.Human let-7 stemloop precursors harbor features of RNase Ⅲ cleavage products[J]. Nucleic Acids Res, 2003,31(22):6593-6597.

[2] 0'Donnell KA,Wentzel EA,Zeller KI ,et al. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 express ion[J]. Nature,2005,435(7043):839-843.

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

[4] Doench JG,Petersen CP,Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs [J]. Genes Dev,2003,17(4):438-442.

[5] Meister G,Tuschl T.Mechanisms of gene silencing by double stranded RNA[J]. Nature,2004,431(7006):343-349.

[6] Takamizawa J,Konishi H,Yanagisawa K,et al. Reduced expression of the let-7 microRNA in humanlung cancers in association with shortened postoperative survival[J]. Cancer Res,2004,64(11): 3753-3756.

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

[8] Caldas C,Brenton J D,Sizing up miRNA as cancer genes [J]. Nat Med, 2005,11(7):712-714.

[9] Calin GA,Garzon R,Cimmino A,et al. MicrnRNAs and leukemias: How strong is the connection[J]. Leuk Res,2006,30(6):653-655.

[10] Karube Y,Tanaka H,Osada H,et al. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients[J]. Cancer Sci,2005,96 (2):111-115.

[11] Hong-chun Luo,Zhen-zhen Zhang,Xia Zhang,et al. MicroRNA Expression Signature In Gastric cancer [J]. Cancer Res,2009,21(1):74-80.

(责任编辑:关蕴良)