基础研究 文章编号:0253-3626(2009)05-0567-03

hsa-miR-518b 反义寡核苷酸对胃癌细胞生长抑制作用的研究

刘 波,吴小翎,聂 娜
(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 hsa-miR-518b 反义寡核苷酸(Antisense oligonucleotide,ASODN)对胃癌细胞生长和细胞周期的影响,以分析其在胃癌中的作用机制。方法:设计合成全硫代磷酸化修饰的 hsa-miR-518b ASODN,将其转染于胃癌细胞株 SGC7901。用 Real time RT-PCR 分析 hsa-miR-518b 在胃癌细胞转染前后的表达情况,MTT 检测胃癌细胞转染后的生长情况,流式细胞仪分析细胞周期。结果:转染 hsa-miR-518b ASODN 后,胃癌细胞 hsa-miR-518b 表达显著降低(P=0.000),生长受到抑制(P=0.000),大量胃癌细胞阻滞于 G_1 期 (P=0.000)。结论:hsa-miR-518b ASODN 能使胃癌细胞阻滞于 G_1 期,抑制胃癌细胞的生长。提示 hsa-miR-518b 可能通过促进细胞周期 G_1/S 期转换而促进胃癌细胞生长。

【关键词】hsa-miR-518b;胃癌细胞;反义寡核苷酸
【中国图书分类法分类号】R735.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-02-19

Effects of antisense oligonucleotide targeting hsa-miR-518b on the growth of gastric cancer cell

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

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of antisense oligonucleotide(ASODN) targeting hsa-miR-518b on the growth and cycle of gastric cancer cell, and the mechanism in gastric cancer. *Methods*: Specific phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides targeting hsa-miR-518b were synthesized and then transfected into the gastric cancer cell(SGC7901). We investigated the change of the hsa-miR-518b expression in SGC7901 after the transfection by using real time RT-PCR. Methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assay was used to detect the cell growth of SGC 7901 and fluorescence activated cell sorting (FACS) was used to analyze the cell cycle of SGC7901. *Results*: After transfection, the expression of hsa-miR-518b was decrased(P=0.000), the growth of SGC7901 was suppressed(P=0.000) and the cell cycle arrested in G_1(P=0.000). *Conclusion*: hsa-miR-518b(ASODN) could suppress the growth of SGC 7901 by arresting the cell cycle in G_1 phase. Hsa-miR-518b could promote the growth of gastric cancer cell by regulating G_1/S transition.

【Key words】Has-miR-518b; Gastric cancer cell; Antisense oligonucleotides

microRNAs(miRNAs)是近年来发现的一类长度为 18~25 个核苷酸的单链非编码小分子 RNA,通过与靶基因完全或不完全互补结合而负调控基因表达[1-2]。研究表明,miRNAs 在细胞中扮演非常重要的角色,其表达可以调控细胞的生长分化和凋亡、动植物的组织器官发育、脂肪的代谢等生命活动过程,还参与癌症形成[3]。现已开展肿瘤特异性 miRNAs 表达的研究,而对胃癌相关 miRNAs 的研究少见报道。我们前期工作运用基因芯片技术检测了 2 个胃癌细胞系,24 例胃癌组织和 3 例正常胃组织中 328 个 miRNAs 的表达情况,初筛了胃癌中标记性的 miRNAs,研究结果表明 hsa-miR-518b 在胃癌组织和胃癌细胞中高表达,上调约 3 倍。因此本文通过合成 hsa-miR-518b 反义寡核苷酸(Antisense oligonucleotide,ASODN) 研究其对胃癌细胞生长及细胞周期的影响, 初步探讨 has-miR-518b 在胃癌中的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

胃癌细胞株 SGC7901 由重庆医科大学病理学教研室赠送,常规培养于含 10%小牛血清及青霉素和链霉素的 RPMI1640 培养基中,置于 37℃、5%CO_2 饱和度和湿度培养箱中培养。

作者介绍:刘 波(1982-),男,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。

1.2 反义寡核苷酸的合成

合成 hsa-miR-518b ASODN 序列为:5'-ACCTCTAAAG GGGAGCGCTTTG-3',全序列均用硫代磷酸化修饰,由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.3 细胞分组

根据向培养细胞中加入的成分不同,分为:①转染组:加入 hsa-miR-518b ASODN;②脂质体组:加入等量稀释的脂质体;③空白对照组:胃癌细胞常规培养。

1.4 ASODN 作用的剂量和时间

将生长状态良好的胃癌细胞接种于 6 孔板内,培养过夜使细胞至 50%融合度。每孔转染剂量为:10 μl Lipofectamine 2000(购于 Invitrogen 公司),4.0 μg hsa-miR-518b ASODN,严格按照 Lipofectamine 2000 说明书操作方法和步骤用无血清 DMEM 稀释混匀,孵化后转染于胃癌细胞。12 h 后,将每孔细胞分 2 部分,一部分继续培养在 6 孔板中以备检测,另一部分分至 96 孔细胞培养板中,每组做 4 个复孔,每孔细胞数为 5×10^4 个。

1.5 Real time RT-PCR 检测转染 hsa-miR-518b ASODN 前后胃癌细胞 hsa-miR-518b 的表达

总 RNA 提取:待胃癌细胞长至 70%~80%融合,收集 6 孔板细胞,调整细胞数至 1×10^6 个/管,加入 1 ml Trizol,按操作说明进行。用不含 RNA 酶的 *DNase* Ⅰ去除 DNA 污染,琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测 RNA 的质量和纯度。用 hsa-miR-518b 特异性逆转录引物和 Ex Taq TMR-PCR ver. 2.1(TaKaRa 生物工程公司)反转录酶反转录成 cDNA。基因引物序列由 Invitrogen 公司合成。hsa-miR-518b 引物 F:5'-CAAAGCGCTCCCC-3',R:5'-GAGCAGGCTGGAGAA-3';内参照 β-actin F:5'-CTGACTGACTACCTCATGAAGATC-3',β-actin R:5'-GGAAGGAAGGCTGGAAGAGTG-3'。反应体系为:5×扩增缓冲液 5 μl,1×SYBR Green Ⅰ 1 μl,10 mmol/L dNTP 0.75 μl,10 pmol/L 引物 0.7 μl,模板 DNA 2 μl,5 U/μl Taq DNA 聚合酶 0.25 μl,250 mmol/L Mg^{2+} 0.3 μl,加双或三蒸水至 20 μl。用 PerkinEmler DNA thermal Cycler 480 (RT)仪进行扩增:94℃预变性 2 min 后进行扩增,93℃ 10 s,58℃ 30 s,40 个循环。用 ABI 7500 软件分析 Real-time PCR 的结果。

1.6 细胞增殖活性检测

采用 MTT 法测定 ASODN 对胃癌细胞增殖活性的影响。分别于转染后 24 h、48 h、72 h、96 h 取出培养板进行检测。检测时每孔加入 MTT 液 20 μl,37℃继续孵育 4 h,终止培养,弃上清液,每孔加 150 μl DMSO,震荡 10 min,充分溶解结晶物,在酶标仪上采用波长 490 nm 测定各孔吸光度值(D490)。重复 4 次试验,取均值绘制细胞生长曲线。

1.7 流式细胞仪检测细胞周期

将生长状态良好的细胞接种于 6 孔板内(每组 4 孔,重复检测 4 次取均值),培养 24 h,细胞达 50%融合度后,PBS 洗 2 次,换用无血清培养液培养 32 h,使细胞同步化。转染剂量和方法同前(本文 1.4),48 h 后收细胞,无水乙醇固定,然后 PI 染色,用流式细胞仪 FACSCalibur 检测,并用 ModFit LT V3.0 软件分析结果。

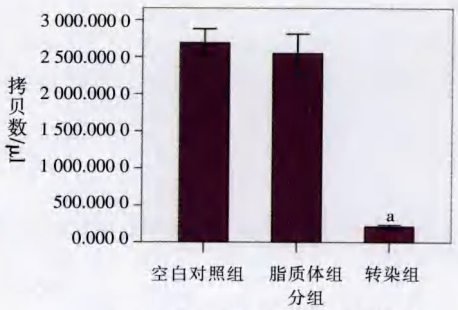
1.8 统计学处理

所有数据均使用 SPSS13.0 软件进行方差分析和 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 转染 hsa-miR-518b ASODN 前后胃癌细胞中 hsa-miR-518b 表达的差异

Real-time PCR 法检测了各组胃癌细胞中 hsa-miR-518b 在转染 hsa-miR-518b ASODN 前后的表达。结果显示:hsa-miR-518b 在转染组中低表达,在空白对照组和脂质体组中高表达,并且转染组和空白对照组之间差异较显著(P=0.000,图 1)。



a: P<0.01,与空白对照组相比

图 1 Real-time PCR 检测 hsa-miR-518b 在转染前后的表达

2.2 hsa-miR-518b ASODN 对胃癌细胞生长的影响

MTT 检测的结果显示:转染组跟空白对照组相比,胃癌细胞的生长受到明显抑制(P=0.000),而脂质体组和空白对照组比较,胃癌细胞的生长没有明显差异(P=0.108,图 2)。

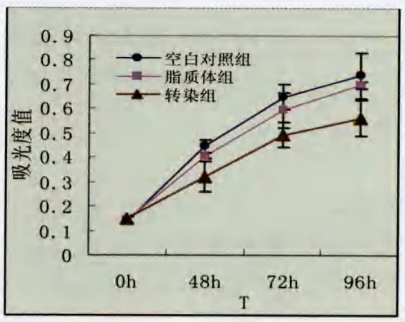


图 2 hsa-miR-518b ASODN 对胃癌细胞生长的影响

2.3 hsa-miR-518b ASODN 对胃癌细胞周期的影响

分别检测空白对照组、脂质体组和转染组胃癌细胞周期的差异。结果显示:转染组较空白对照组,G_1 期明显增加,G_2、S 期明显减少(P=0.000,表 1),大量胃癌细胞阻滞于 G_1 期。

3 讨 论

编码 miRNA 的基因由 RNA 聚合酶Ⅱ在核内

表 1 hsa-miR-518b ASODN 对胃癌细胞周期的影响(%)

组别	G_1(%)	G_2(%)	S(%)
空白对照组	30.27 ± 1.32	5.01 ± 0.57	64.71 ± 0.94
脂质体组	32.38 ± 1.17	6.24 ± 0.72	61.38 ± 1.76
转染组	66.13 ± 1.83[a]	0.69 ± 0.09[a]	33.18 ± 1.76[a]

a:$P<0.01$,与空白对照组相比

转录,经过加工形成 pri-miRNA,继而在核酸酶 Drosha 及其辅助因子 Pasha 的作用下被加工成 65~75 bp 并具有茎环结构的 pre-miRNA。然后被转运出细胞核,再经细胞质中的核酸酶 Dicer 剪切成约 22 bp 的双链 miRNAs,其中的一条链为发挥作用的 miRNAs,即成熟 miRNAs,另一条链被降解。成熟 miRNAs 结合到 RNA 诱导的基因沉默复合物(RNA-induced silencing complex,RISC)中,形成非对称 RISC,该复合物与目标靶 mRNA 结合,降解靶 mRNA 或者抑制翻译,从而达到调控基因表达的效果[4-5]。

近年来,有相关文献报道 miRNAs 在癌组织和正常组织之间的表达有明显差异[6-8],且部分 miRNAs 表现为一类新型的基因调节剂,既可以充当肿瘤的致癌基因,又可作为抑制基因[9],在癌症中高表达的分子通常具有促肿瘤发生的作用。本研究在前期工作的基础上,选择在胃癌组织和胃癌细胞中均高表达,且上调最多的 hsa-miR-518b,通过合成其反义寡核苷酸, 转染后使 hsa-miR-518b 表达显著降低,MTT 检测发现胃癌细胞生长受到抑制,提示胃癌细胞中高表达的 hsa-miR-518b 能促进细胞的生长,可能与胃癌的发生和发展有密切关系[10],起着致癌基因的作用。同时通过流式细胞术检测发现,hsa-miR-518b 反义寡核苷酸能使大量胃癌细胞阻滞于 G_1 期,表明 hsa-miR-518b 可能通过促进胃癌细胞 G_1/S 期转换从而达到促进胃癌细胞生长的作用。也有研究认为其机制可能是 hsa-miR-518b 基因位于胃癌相关区域或基因组中的脆性位点[11],但其具体机制有待于更深入的研究。

本研究发现转染 hsa-miR-518b 反义寡核苷酸后可导致胃癌细胞生长抑制,同时 Petrocca 等[12]人发现上调的 miR-106b microRNAs 簇通过调控胃癌细胞周期而影响胃癌细胞生长,更有研究发现 let-7 miRNA 与小细胞肺癌患者的预后和术后生存期成正比[13],提示有可能通过调控 miRNAs 的表达对肿瘤进行治疗。值得一提的是,已有研究将与胆固醇结合的合成反义寡核苷酸注入小鼠体内可以有效抑制多种器官内的 miRNAs 活性[14],为调控 miRNAs 应用于临床治疗提供了技术参考,使利用高效的现代分子生物学技术调控 miRNAs 用于肿瘤的治疗成为可能。

参 考 文 献

[1] Brennecke J,Hipfner DR,Stark A,et al.Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila [J]. Cell,2003,113(1):25-36.

[2] Zheng WD,Zhang LJ,Shi MN,et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hepatic stellate cells during rat hepatic fibrosis and its intervention by IL-10[J]. World J Gastroenterol,2005,11(12):1753-1758.

[3] Zhao Y,Samal E,Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis [J]. Nature,2005,436(7048):214-220.

[4] Bohnsack MT,Czaplinski K,Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs[J]. RNA,2004,10(2):185-191.

[5] Yekta S,Shih IH,Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA[J]. Science,2004,304(5670):594-596.

[6] 廖荣霞,孙建国,张 亮,等. 乳腺癌 miRNAs 表达谱检测及初步分析[J]. 第三军医大学学报,2006,28(22):2209-2212.

[7] Volinia S,Calin GA,Liu CG,et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets[J]. ProcNad Acad Sei USA,2006,103(7):2257-2261.

[8] Murakami Y,Yasuda T,Saigo K,et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues[J]. Oncogene,2006,25(17):2537-2545.

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

[10] Volinia S,Calin GA,Liu CG,et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets [J]. Proc Natl Acacl Sci USA,2006,103(7):2257-2261.

[11] Calin GA,Sevignani C,Dumitru CD,et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2001,101(9):2999-3004.

[12] Petrocca F,Visone R,Onelli MR,et al. E2Fl-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer[J]. Cancer Ceil,2008,13(3):272-286.

[13] Takamizawa J,Konishi H,Yanagisawa K,et al. Reduced Expression of the Let-7 MicroRNAs in Human Lung Cancers in Association with Shortened Postoperative Survival[J]. Cancer Res,2004,64(11):3753-3759

[14] Kruetzfeldt,Rajewsky N,Braich R,et al. Silencing of microRNAs in vivo with antagomirs[J]. Nature,2005,438(7068):685-689.

(责任编辑:关蕴良)