

上调 microRNA-101 沉默 EZH2 基因表达对人膀胱癌 T24 细胞系增殖和凋亡的影响

王海峰¹⁾, 杨宏²⁾, 胡礼炳²⁾, 霍倩¹⁾, 雷永虹²⁾, 秦扬²⁾, 李俊²⁾, 毕城伟²⁾

(1) 昆明医科大学第二附属医院泌尿外科, 云南昆明 650101; 2) 昆明医科大学第三附属医院泌尿外科, 云南昆明 650118)

[摘要] **目的** 探讨 microRNA-101 抑制靶基因 EZH2 对膀胱癌细胞增殖和凋亡的影响. **方法** 构建靶向 EZH2 基因的 microRNA-101 质粒并转染至人膀胱癌细胞中, 采用 RT-PCR 法检测 EZH2 mRNA 的表达情况, 利用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 检测细胞增殖抑制, 通过 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术实验观察转染后细胞的凋亡情况. **结果** microRNA-101 阳性对照组 EZH2 mRNA 较阴性对照组和空白对照组表达下降 ($P < 0.05$); 在转染 5 d 后, 其生长抑制率明显高于对照组 ($P < 0.01$); microRNA-101 组较阴性对照组及空白对照组 G0/G1 期细胞数明显增多, S 期细胞数明显减少, 凋亡率增加 ($P < 0.01$). **结论** 上调 microRNA-101 可抑制 EZH2 基因的表达, 并有效的抑制人膀胱癌细胞的增殖, 促进其凋亡, 为深入研究膀胱癌的基因治疗提供理论依据.

[关键词] 膀胱癌; EZH2 基因; microRNA-101; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R737.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 09-0023-05

Effects on Cell Proliferation and Apoptosis of Human Bladder Cancer Cells by Up-regulating the Expression of MiRNA-101 Silence Gene EZH2

WANG Hai-feng¹⁾, YANG Hong²⁾, HU Li-bing²⁾, HUO Qian¹⁾, LEI Yong-hong²⁾, QIN Yang²⁾, LI Jun²⁾, BI Cheng-wei²⁾

(1) Dept. of Urinary Surgery, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101; 2) Dept. of Urinary Surgery, The 3rd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650118, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of inhibiting enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) on cell proliferation and apoptosis by up-regulating the expression of miRNA-101 in bladder cancer cells. **Methods** The microRNA-101-expressing plasmid targeting EZH2 gene was constructed and transferred into T24 cells. RT-PCR was used to detect the expression of EZH2 mRNA. The proliferation of T24 cells was detected in vivo by MTT, and cell apoptosis was observed by Annexin V-FITC/PI flow cytometric analysis. **Results** The siRNA-expressing plasmid targeting EZH2 gene successfully inhibited the expression of EZH2 in T24 cells. Compared with control groups, the expression of mRNA in the positive group was significantly inhibited ($P < 0.05$). After plasmid transfection of 5 days, the cell proliferative activity was significantly lower in the miRNA-101 mimics group than that in the negative control group and blank control group ($P < 0.01$). In the miRNA-101 mimics group, cells increased significantly at G0/G1 phase [(80.12 ± 7.8)%, $P < 0.01$], while decreased at S phase [(11.50 ± 1.2)%, $P < 0.01$]. And the expression of EZH2 mRNA was down-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion** The

[基金项目] 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2011FB202)

[作者简介] 王海峰 (1982~), 男, 辽宁朝阳市人, 医学博士, 主治医师, 主要从事泌尿外科临床、教学及科研工作.

[通讯作者] 杨宏. E-mail: yanghong0216@126.com

microRNA-101 silencing EZH2 can significantly inhibit cell proliferation of T24 cells and promote its apoptosis. It provides a theoretical basis for further study of bladder cancer gene therapy.

[Key words] Bladder cancer; EZH2; MicroRNA-101; Proliferation; Apoptosis

MicroRNAs (miRNAs) 是一类长度为 19~25nt 的非编码单链小 RNA, 它在细胞分裂、分化、迁移、凋亡等不同的生物学过程中发挥着重要的调节作用^[1]. miRNAs 通过与靶基因 mRNA 的 3' 末端非翻译区 (3' -UTR) 完全或非完全互补结合, 导致 mRNA 降解或抑制蛋白表达, 具有癌基因或抑癌基因的功能, 从而广泛参与肿瘤的发生、发展及侵袭转移^[2]. 其中 microRNA-101 与人类肿瘤的发生发展关系密切, 在肝癌^[3]、胃癌^[4]、非小细胞肺癌^[5]等多种肿瘤中呈低表达, 在正常组织中呈高表达. microRNA-101 对癌基因 EZH2 有负调控作用, 在肿瘤中发挥着抑癌基因的作用.

本研究设计构建 microRNA-101 模拟体转染膀胱癌 T24 细胞, 观察 microRNA-101 对膀胱癌细胞增殖及凋亡的影响, 旨在为膀胱癌的基因治疗寻找新的靶点提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

膀胱癌 T24 细胞株由昆明医科大学重点实验室保存, RPMI1640 培养基、胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶 -EDTA、DPBS、Lipo 2000 转染试剂、TRIZOL、Ncode™ VILO miRNA cDNA Synthesis Kit、EXPRESS SYBR® GreenER™ miRNA qRT-PCR Kits 购自美国 Invitrogen 公司, DMSO 购自美国 Amersco 公司, EZH2 抗体购自美国 Abcam 公司, EZH2 siRNA 套装购于广州锐博生物公司, PVDF 膜购于美国 Millipore 公司.

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 膀胱癌细胞株 T24 分别在含 10% 胎牛血清的 90% RPMI 1640 培养基中, 于 37℃、5%CO₂ 饱和湿度培养箱中培养. 如果细胞未长满, 用 75% 酒精喷洒整个瓶进行消毒, 然后放到无菌台内, 严格无菌操作, 打开细胞培养瓶, 吸出培养液, 仅留下 10 mL 培养液在瓶内继续培养. 并将培养好的细胞按照每孔 $0.5 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^4$ 个细胞浓度接种在 96 孔板及每孔 $1.0 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^5$ 个细胞浓度接种在 6 孔板, 分为 miRNA-101 阳性对照组、FAM 阴性对照组和空白对照组.

1.2.2 重组质粒构建及转染 利用 miRBase 信息数据库找到人源 miRNA-101 前体 (pre-microRNA-101) 的 DNA 寡核苷酸序列: 5'-tG-CCCtGGCtCAGtAtCACAGtGtGtGAtGtGtAttC-tAAAGGtACAGtACtGtGAtAAcTGAAGGAtGGCA-3', 经酶切、溶解、加热、退火等处理后获得双链的 pre-microRNA-101 插入片段 5'-TACAGTACTGTG-ATAACTGAA-3', 阴性对照序列 FAM 序列为 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'. 将其合成功能序列插入到 PGenesil-1.1 质粒构建重组体, 并转化至大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞中. 分别挑取菌落接种至含 4 mg/mL 新霉素的 RPMI1640 培养基培养, 再使用碱裂解法抽提质粒, 并行酶切鉴定和测序分析. 转染按照 Lipofectamine™ 2000 脂质体转染试剂盒说明书的要求进行, 每孔 siRNA 为 4 μ g, Lipofectamine™ 2000 的用量为 10 μ L, 转染后置入 CO₂ 培养箱, 6 h 后换液, 继续培养 48~72 h 后收集细胞.

1.2.3 转染后 RNA 提取及实时荧光定量 PCR 收集转染 48 h 后的 T24 细胞, 按天根 DP431 试剂使用说明书提取细胞的总 RNA, 经检测浓度和完整性后, 按反转录试剂盒使用说明操作先逆转录生成 cDNA, 再以各组 cDNA 为模板对 EZH2 基因和内参 β -Action 进行实时荧光定量 PCR 反应. 每 1 个样品均做 3 个重复反应. 同时设无模板对照. 在荧光定量 PCR 仪上进行检测. 反应条件: 95℃ 15 s; 95℃ 5 s、60℃ 60 s, 30 个循环; 扩增完毕后进行熔解曲线分析: 95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s. 对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析特异性. 根据相对定量 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算各组 EZH2 mRNA 表达水平的相对比值.

1.2.4 MTT 法检测细胞增殖情况 传至 4 至 6 代的 T24 细胞生长至 90% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶 -0.53 mM EDTA 消化液消化后计数, 按 2×10^3 细胞 / 孔的浓度接种 96 孔板, 置 37℃, 5%CO₂ 培养箱中培养 18 h. 更新新鲜培养基后培养 2 h, 转染 miRNA-101 进细胞. 24 h 后开始检测设置调零孔, 对照孔, 每组设置 3 复孔. 置 37℃, 5%CO₂ 培养箱中培养 30 min. 离心弃去上清, 加入含 500 μ g/mL MTT 的 DMEM/F12 培养基. 继续培养 4 h. 离心弃上清, 用 150 μ L DMSO 溶解甲瓖, 待充分

溶解后, 用酶标仪检测各孔 490 nm 吸光度. 每组细胞测 3 个孔, 取平均值, 每隔 12 h 检测 1 次, 连续检测 72 h, 绘制细胞生长曲线.

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{实验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}}\right) \times 100$$

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡情况 用不含 EDTA 的胰酶消化收集培养及转染 24 h 后的 T24 细胞, 离心、洗涤后加入 500 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞, 接着先加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后, 加入 5 μL Propidium Iodide, 混匀, 室温、避光、反应 5 ~ 15 min 后进行流式细胞仪的检测.

1.3 统计学方法

以上实验均采用 SPSS 统计包进行统计学处理, 结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用方差分析, 组间比较采用 S-N-K 法 (q 检验). 检验水准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 miRNA-101 对 EZH2 mRNA 表达的影响

T24 细胞转染 miRNA-101 后, 经实时荧光定量 PCR 检测 EZH2 的 mRNA 表达, RT-PCR 结果显示: 空白对照组 (1.912 ± 0.015)、阴性对照组 (1.732 ± 0.025)、miRNA-101 阳性对照组 (0.857 ± 0.011); 阴性对照组和空白对照组细胞 EZH2 表达均高于 miRNA-101 阳性对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$). 阴性对照组与空白对照组相比较, 差异不统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 1.

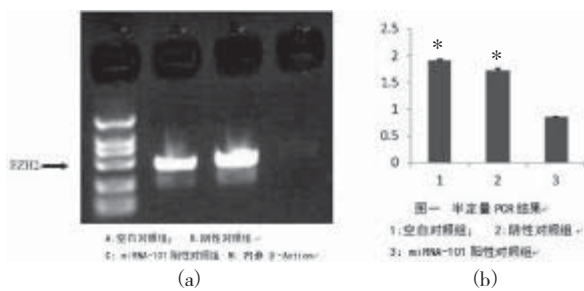


图 1 半定量 PCR 检测 miRNA-101 对 EZH2 mRNA 表达的影响

Fig. 1 Effect of miRNA-101 on the EZH2 mRNA expression detected by semi-quantitative PCR

与阳性对照组比较, $*P < 0.05$.

2.2 EZH2 表达沉默对 T24 细胞增殖活性的影响

MTT 检测法结果示: miRNA-101 阳性对照组细胞从转染后 72 h 起, 细胞的增殖的速度变得缓慢, 其明显慢于阴性对照和空白对照组. 到达第 5 天时其增殖率分别为 14.8%、28.1% 和 29.6%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 2.

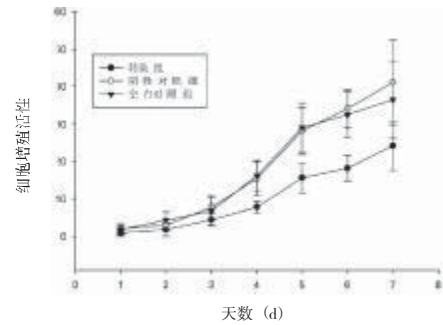


图 2 MTT 检测 miRNA-101 对 T24 细胞增殖能力的影响

Fig. 2 Effect of miRNA-101 on the proliferative capability of T24 cells by MTT

2.3 EZH2 表达沉默对 T24 细胞凋亡的影响

Annexin-v/Pi 双染, 流式细胞仪分析细胞周期结果, 发现转染 48 h 后 miRNA-101 阳性对照组 G0/G1 期细胞数为 (80.12 ± 7.8)%, 较阴性对照组 (65.35 ± 3.5)% 及空白对照组 (64.89 ± 3.4)% 显著增高 ($P < 0.01$); miRNA-101 阳性对照组 S 期细胞数 (11.50 ± 1.2)% 较阴性对照组 (22.64 ± 3.2)% 及空白对照组 (24.98 ± 2.9)% 明显减少 ($P < 0.01$). 而阴性对照组和空白对照组比较无明显差异 ($P > 0.01$), 见图 3、4.

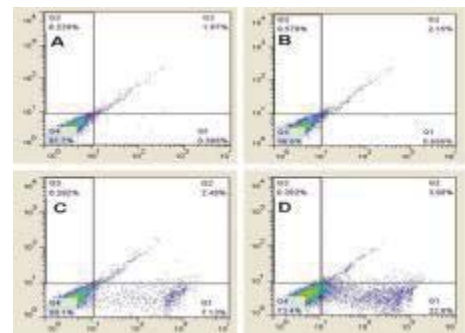


图 3 Annexin-v/Pi 双染法检测 miRNA-101 沉默对 T24 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of miRNA-101 silence on T24 cells apoptosis detected by Annexin V-FITC/PI flow cytometric analysis

A: 对照组 0 h; B: 试验组 0 h; C: 对照组 48 h; D: 试验组 48 h.

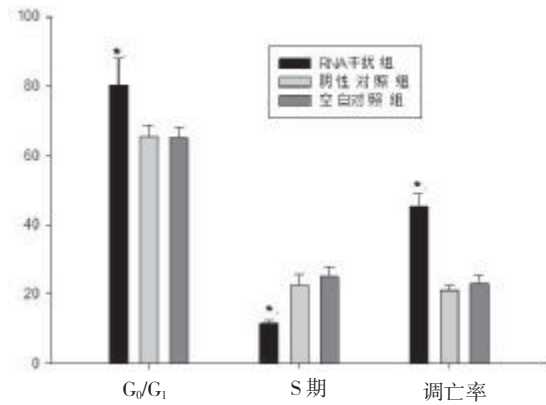


图 4 膀胱癌 T24 细胞周期变化

Fig. 4 Cell cycle changes of T24, The changes of T24 cells cycle in bladder cancer

注: RNA 干扰组较阴性对照组及空白对照组 G₀/G₁ 期细胞数明显增多, S 期细胞数明显减少, 凋亡率增加, ** $P < 0.01$. 阴性对照和空白对照组细胞周期及凋亡率比较无明显差异.

3 讨论

miRNA 是机体的一种位于基因组非编码区的内源性小分子 RNA, 本身不具有开放阅读框, 它广泛存在于各种真核细胞中, miRNA 基因先转录产生具有发卡结构的 miRNA 前体 (precursor miRNA, pre-miRNA), 核糖体核酸酶将初级产物切割成 70 个核苷酸序列, 再被核糖核酸酶 III 家族中特异识别双链 RNA 的一员 Dicer 酶以 ATP 依赖方式逐步切割成约 22nt 的双链 RNA 片段. 这些小的 miRNA 通过与靶 mRNA 特异的碱基配对引起靶 mRNA 的降解或翻译抑制, 在转录后水平调控基因表达, 影响蛋白质的合成, 从而调节细胞增殖、分化与凋亡, 参与个体发育、机体代谢以及肿瘤的发生、发展等过程.

miRNAs 与肿瘤密切相关, 致癌 miRNAs 的负调控和染色体的缺失、增加及易位有关^[6]. miRNAs 在肿瘤中异常表达且具有组织特异性, 不同肿瘤组织 miRNAs 表达谱不同^[7]. Chen^[8]等发现在胶质母细胞瘤中 microRNA-203 的表达高于正常脑组织. 他们采用荧光定量 PCR 的方法在不同分期的胶质母细胞瘤中检测 microRNA-203 的表达, 结果显示分化程度越高. miRNA-101 是一类抑制肿瘤侵袭转移的 miRNA, 存在两个前提, 分别位于人 1 号和 9 号染色体中, 但成熟序列在各个物种中高度保守, 目前已有报告证实 MCL-1 (抗凋亡 BCL-2 家族成员之一) 和癌基因 FOS、EZH2 是其靶基因^[9].

果蝇的 Enhancer of Zeste 基因增强子人类同源物 2 (ebgabc of zest homolog, EZH2) 是多梳基因

家族 (polycomb group, PcG) 的主要成员, 是组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸特异性的甲基化转移酶, 通过沉默与细胞分化、抑制增殖相关的基因, 而导致肿瘤的发生^[9]. 大量研究报道 EZH2 在多种恶性肿瘤组织和细胞中高表达, 如非小细胞肺癌^[5]、结肠癌^[10]、前列腺癌^[11]等.

当 miRNA-101 与靶基因 EZH2 结合, 降解 EZH2 mRNA, 抑制 EZH2 表达, 可致肿瘤细胞停滞于 DNA 合成前期, DNA 合成减少, 最终影响肿瘤细胞的增殖. 目前在前列腺癌、肝细胞癌等多种肿瘤中发现 miRNA-101 表达下调, 对 EZH2 基因具有负调控作用, 说明 miRNA-101 与体外肿瘤细胞迁移、浸润、克隆形成和发生肿瘤密切相关^[12,13].

Smits^[14]等发现在恶性胶质母细胞瘤 (GBM) 中, miR-101 的下调可导致靶基因 EZH2 过表达并诱导细胞增殖、迁移和血管生成, 因此 miR-101 可负调控靶基因 EZH2 从而抑制肿瘤侵袭转移. Hui-Ju Wang^[4]等进行了体内体外实验来研究 miR-101 在胃癌中的作用机制, 他们发现胃癌细胞与正常胃组织相比, miR-101 的表达降低, 将 miR-101 注射到 MKN-45 癌细胞株的裸鼠模型中, 证实了在胃癌中 miR-101 具有抑制肿瘤的角色.

本研究通过上调 microRNA-101 沉默 EZH2 基因探讨其对膀胱癌 T24 细胞增殖和凋亡的影响. 为了明确 miR-101 表达在 T24 细胞生物活性过程中的作用, 本研究利用基因工程的手段在体外构建 miR-101 基因的表达载体, 并将其转染入 T24 细胞, 实现 miR-101 在膀胱癌细胞学水平上的研究, 并采用实时荧光定量 PCR 检测 EZH2 mRNA 表达、MTT 法测定细胞增殖活性、流式细胞技术检测细胞周期. 实时荧光定量 PCR 检测经上调 microRNA-101 表达后, EZH2 mRNA 表达与阴性对照组和空白对照组相比显著降低, 证实癌基因 EZH2 为 microRNA-101 的靶基因, 可以抑制 EZH2 基因表达.

肿瘤细胞的持续分裂与无限增殖能力是肿瘤恶性程度的重要标志. 本研究通过细胞增殖实验分析上调 microRNA-101 沉默 EZH2 表达 T24 细胞增殖能力的变化, MTT 检测结果显示随着时间的推移, 呈明显抑制膀胱癌细胞增殖趋势; 流式细胞技术检测结果显示多数细胞停滞在 G₀/G₁ 期, S 期 DNA 合成期细胞减少, 使细胞增殖活性下降, 生长周期减缓. 本实验说明上调 microRNA-101 可抑制 EZH2 基因的表达, 并有效的抑制人膀胱癌细胞的增殖, 促进其凋亡.

综上所述, microRNA-101 与降低肿瘤发生、发展的能力密切相关, 并且可抑制 EZH2 基因的表达, 因此采用 microRNA-101 抑制靶向癌基因表达, 阻止肿瘤细胞增殖、侵袭能力, 并促进其凋亡, 对肿瘤基因治疗及预后判断具有重要意义; 如何高效地将 miRNA 转染到肿瘤细胞以及提高 miRNA 的器官靶向特异性是我们进一步需要解决的问题。

[参考文献]

- [1] HWANG H W, MENDELL J T. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis[J]. *British Journal of Cancer*, 2007, 96(Suppl):R40 - 44.
- [2] DENLI A M, TOPS B B, PLASTERK R H, et al. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex [J]. *Nature*, 2004, 432(7 014):231 - 235.
- [3] SU H, YANG J R, XU T, et al. MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity[J]. *Cancer Research*, 2009, 69(3):1 135 - 1 142.
- [4] WANG H J, RUAN H J, HE X J, et al. MicroRNA-101 is down-regulated in gastric cancer and involved in cell migration and invasion [J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(12): 2 295 - 2 303.
- [5] ZHANG H, ZHAO M, LV Z, et al. MiR-138 inhibits tumor growth through repression of EZH2 in non-small cell lung cancer[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 31(1):56 - 65.
- [6] HAMMOND S M. MicroRNAs as oncogenes[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2006, 16(1):4 - 9.
- [7] LU J, GETZ G, MISKA E A, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers [J]. *Nature*, 2005, 435(7 043):834 - 838.
- [8] CHEN Z, LI D, CHENG Q, et al. MicroRNA-203 inhibits the proliferation and invasion of U251 glioblastoma cells by directly targeting PLD2 [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 9(2): 503 - 508.
- [9] CHANG C J, HUNG M C. The role of EZH2 in tumour progression[J]. *British journal of cancer*, 2012, 106(2):243 - 247.
- [10] FERRARO A, MOURTZOUKOU D, KOSMIDOU V, et al. EZH2 is regulated by ERK/AKT and targets integrin alpha2 gene to control Epithelial-Mesenchymal Transition and anoikis in colon cancer cells[J]. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2013, 45(2):243 - 254.
- [11] SHIN Y J, KIM J H. The role of EZH2 in the regulation of the activity of matrix metalloproteinases in prostate cancer cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(1):e30 393.
- [12] CAO P, DENG Z, WAN M, et al. MicroRNA-101 negatively regulates Ezh2 and its expression is modulated by androgen receptor and HIF-1 α /HIF-1 β [J]. *Molecular Cancer*, 2010, 9(1):108.
- [13] CHIANG C W, HUANG Y, LEONG K W, et al. PKC α mediated induction of miR-101 in human hepatoma HepG2 cells[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2010, 17(1):35.
- [14] SMITS M, NILSSON J, MIR S E, et al. miR - 101 is down-regulated in glioblastoma resulting in EZH2-induced proliferation, migration, and angiogenesis [J]. *Oncotarget*, 2010, 1(8):710 - 720.

(2014 - 06 - 21 收稿)