

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.36.004

文章编号: 1005-8982 (2018) 36-0018-05

miRNA-135b 对鼻咽癌细胞侵袭和转移的促进作用

牛善利, 满敏, 牛传贵

(山东省滕州市中心人民医院 耳鼻喉科, 山东 滕州 277500)

摘要: 目的 研究 miRNA-135b 对鼻咽癌 CNE1 细胞系侵袭和转移的影响和作用机制。**方法** 用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 miRNA-135b 在鼻咽癌 CNE1 细胞系中的表达, 分别在鼻咽癌 CNE1 细胞系中过表达和下调 miRNA-135b, 通过微孔滤膜培养小室及双室联合培养系统 (Transwell™) 检测肿瘤细胞迁移和侵袭能力, 采用 Western blotting 检测大型肿瘤抑制因子同源蛋白 2 (LATS2) 的表达。**结果** miRNA-135b 在鼻咽癌 CNE1 细胞系中高表达, 通过增强 miRNA-135b 表达, 鼻咽癌 CNE1 细胞的侵袭和转移能力有所提升; 通过靶向 miRNA-135b 干扰载体, 下调 miRNA-135b 表达, 鼻咽癌 CNE1 细胞的侵袭和转移能力有所下降。增强 miRNA-135b 表达, LATS2 活性和表达下降, 而下调 miRNA-135b 表达, LATS2 活性和表达上升。**结论** miRNA-135b 过表达会提升鼻咽癌 CNE1 细胞的侵袭和转移能力, 下调 miRNA-135b 表达可有效抑制鼻咽癌细胞增殖, 促进细胞凋亡。miRNA-135b 的表达可能通过影响 LATS2 活性影响鼻咽癌细胞的生长。

关键词: 鼻咽肿瘤; miRNA-135b; 侵袭; 转移

中图分类号: R739.6

文献标识码: A

miRNA-135b promotes invasion and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells

Shan-li Niu, Min Man, Chuan-gui Niu

(Department of Otolaryngology, Tengzhou Central People's Hospital,
Tengzhou, Shandong 277500, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of miRNA-135b in invasion and metastasis of nasopharyngeal carcinoma (NPC) and potential mechanisms. **Methods** Expression of miRNA-135b in NPC tissues and NPC cell lines were detected by RT-PCR. The invasion and metastasis were identified by Transwell™ assay. Expression of LATS2 protein and activity of LATS2 protein were determined by western blot and LATS2 activity assay kit, respectively. **Results** Expression of miRNA-135b was significantly increased in NPC cell lines. Transwell™ assay showed that over-expression of miRNA-135b induced a dramatic improvement of invasion and metastasis in CNE1 cells, which was reversed by knockdown of miRNA-135b. Expression and activity of LATS2 were decreased significantly by over-expression of miRNA-135b, which was abolished by knockdown of miRNA-135b. **Conclusions** miRNA-135b promotes the invasion and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells through mediating activity of LATS2.

Keywords: nasopharyngeal neoplasms; miRNA-135b; invasion; metastasis

收稿日期: 2018-04-01

鼻咽癌 (nasopharynx cancer, NPC) 是一种与 EB 病毒感染有关, 发生于鼻咽腔顶部和侧壁的恶性肿瘤。发病以男性居多, 男性发病率约是女性发病率的 2 倍。NPC 多在 30 岁以后开始发病, 50 ~ 59 岁发病人数最多, 60 岁后趋于平缓^[1]。目前研究表明 NPC 的 miRNA 是一种非编码 RNA, 在自然界广泛分布, 长度一般为 22 个核苷酸。miRNA 对肿瘤的发生发展中发挥着重要作用, 关于 miRNA-21、miRNA-135b 和 miRNA-141 对癌细胞的作用已有一些报道, 张彦兵等在一项肝癌研究中预测发现 miRNA-135b 的 4 个靶基因大型肿瘤抑制因子同源蛋白 2 (large tumor suppressor, homolog 2, LATS2)、转录因子 β -Trecp (β -transducin repeats containing proteins, β -TrCP)、人源下游调节因子 2 (N-mycdown-streamregulator 2, NDR2) 和亮氨酸拉链肿瘤抑制基因 (leucine zipper putative tumor suppressor 1, LZTS1), 并通过分析发现该基因均以不同的方式参与 Hippo 信号通路的活性状态, 从而调节相关蛋白的表达^[2], 但 miRNA-135b 对鼻咽癌相关研究的报道较少^[3]。MURAKAMI 等研究发现, 恶性间皮瘤细胞株的 LATS2 基因表达缺失, 由此推断 LATS2 编码的丝氨酸参与肿瘤抑制信号通路, 其失活会诱使恶性间皮瘤细胞的增殖^[4]。本研究通过检测 miRNA-135b 对鼻咽癌 CNE1 细胞迁移和侵袭能力的影响, 研究 miRNA-135b 的分子机制, 为今后鼻咽癌的诊治提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI 1640 培养基、0.25% 胰蛋白酶 (购自美国 Thermo Scientific 公司), 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (购自北京元亨圣马生物技术研究所), 鼻咽癌 CNE1 细胞及鼻咽部永生上皮细胞 NP69 系 (购自南京科佰生物细胞库), Lipofectamine™ 2000、Trizol 试剂 (购自苏州拜吉氏生物科技有限公司), microRNA 逆转录试剂盒 (购自北京索莱宝科技有限公司), RT-PCR 试剂盒 (购自上海博谷公司), Transwell 小室 (购自美国 Corning 公司), 基质胶 (购自美国 BD 公司), LATS2 m Ab (购自美国 Cell Signaling Technology 公司), ECL 发光试剂盒 (购自美国 Millipore 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

采用 RPMI 1640 培养基培养鼻咽

癌 CNE1 细胞系, 培养基加链霉素与青霉素, 浓度分别为 150 u/L 及 150 mg/L, 在 37℃、50 ml/L 二氧化碳 CO₂ 的培养箱静置培养, 每 3 ~ 4 天用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化传代。鼻咽部永生上皮细胞 NP69 系接种于含 10% 胎牛血清的新鲜成分确定的无血清培养基中培养。

1.2.2 逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测 miRNA-135b 的表达

采用 RNA 提取试剂提取鼻咽癌细胞株及正常鼻咽上皮永生细胞中总 RNA, 测定浓度, 置入 -80℃ 冰箱冷冻保存。采用 SYBR Green 法检测 miRNA-135b 的相对表达, 反应的循环参数: 95℃ 预变性 12 min, 95℃ 变性 35 s, 60℃ 退火 30 s, 70℃ 延伸 35 s, 共 40 个循环, 最后 71℃ 延伸 9 min。该步骤重复 3 次。

1.2.3 引物设计及细胞转染

在网站 (<http://www.sanger.ac.uk/software/Rfam/mirna>) 获取人 miRNA-135b 的序列, 设计其序列特异性引物, 通过 NCBI BLAST 检索程序排除其他的同源序列。扩增鼻咽癌 CNE1 细胞基因组 DNA 中的 miRNA-135b 的前体序列。PCR 扩增的正、反向引物分别为 5'-ATCGCTTGCCTGACGGACTGTGCG-3' 及 5'-TCACGTTTCTGGAAACCAGC ACCGC-3'。构建 miRNA-135b 的干扰载体并提取质粒。转染前 18 h, 对扩增的鼻咽癌 CNE1 采用胰蛋白酶消化处理, 调整细胞数为 10⁴ 个/孔。共设 3 组, 试剂对照组、空载体对照组和转染组。运用 Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒进行转染, 转染后继续培养 48 h, 提取 RNA, 测定浓度, 逆转录为 cDNA。通过 RT-PCR 检测 miRNA-135b 基因的表达, 以上的实验操作重复 3 次。

1.2.4 Western blotting 检测目标 LATS2 的表达

Western blotting 检测过表达和干扰 miRNA-135b 的鼻咽癌 CNE1 细胞及对应对照组细胞中 LATS2 的表达。过表达 miRNA-135b 的鼻咽癌 CNE1 细胞和干扰 miRNA-135b 的鼻咽癌 CNE1 细胞及各对照组细胞经, 低温裂解 40 min, 高速离心 20 min^[5], BCA 定量法测定总蛋白浓度, 采用 110 V 电压进行电泳并恒压转移蛋白至 PVDF 膜, 20℃ 封闭 80 min 加入小鼠抗人 LATS2 mAb (1 : 500), 4℃ 过夜, 室温封闭 1 h; 采用化学发光试剂曝光显影, 超高灵敏度化学发光成像系统成像。对 Western blotting 检测结果进行半定量分析, LATS2

的表达水平标准化后, 计算转染组细胞中该蛋白的表达^[5]。

1.2.5 Transwell 实验检测鼻咽癌 CNE1 细胞侵袭能力 Transwell 基质胶上胶准备完成后, 在 4℃ 下放置 12 h^[6]。采用无血清培养基 37℃ 恒温水化 45 min; 比较过表达 miRNA-135b 的鼻咽癌 CNE1 细胞 (过表达组) 与空载体细胞 (空载体组), 及干扰 miRNA-135b 的鼻咽癌 CNE1 细胞 (干扰组) 与空载体细胞 (对照组) 的侵袭能力。对 4 组细胞进行消化处理, 调整细胞悬液浓度为 2×10^5 个/ml; 下室加入细胞悬液 800 μ l。37℃、5% CO₂ 培养箱恒温培养 12 h; 清理干净后进行染色, 并在 200 倍显微镜下随机取 15 个视野计数。

1.2.6 LATS2 活性检测 胰酶消化转染 48 h 后, 按照 20 μ l 每 100 万细胞的比例加入裂解液, 采用水浴法裂解细胞, 4℃ 离心机, 15 000 r/min 离心 12 min, 取上清液。按照 LATS2 活性检测试剂盒的操作说明书检测实验组和对照组的 LATS2 活性变化^[7]。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用两独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA-135b 在鼻咽癌 CNE1 细胞系的表达

CNE1 细胞系 miRNA-135b 相对表达量为 ($4.85 \pm$

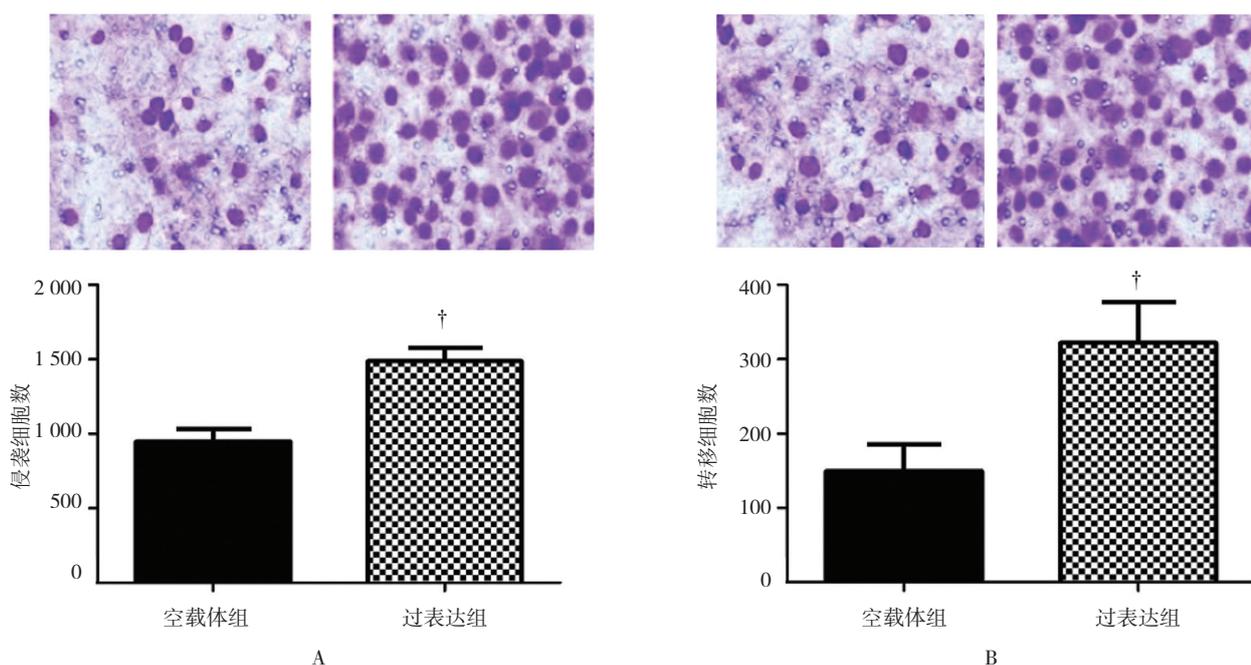
0.41), 而 NP69 细胞系相对表达量为 (1.87 ± 0.15), 两者比较差异有统计学意义 ($t = 5.813, P = 0.014$), miRNA-135b 在鼻咽癌 CNE1 细胞系中的表达较 NP69 细胞高。

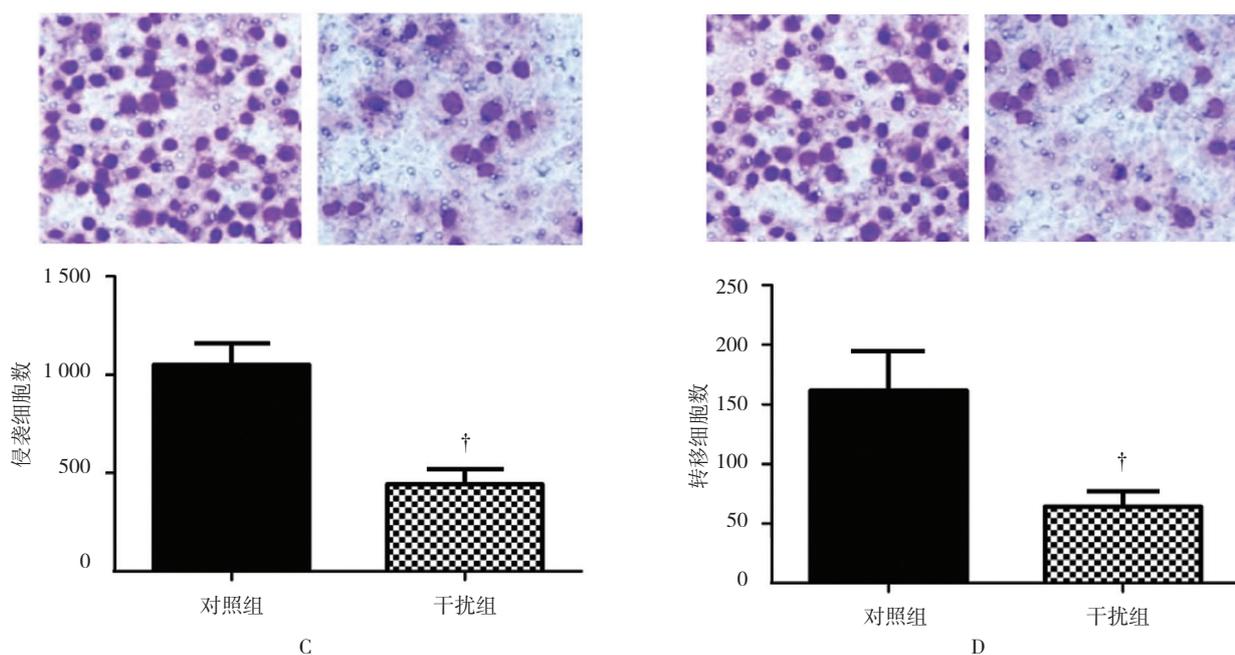
2.2 miRNA-135b 不同表达程度对鼻咽癌 CNE1 细胞侵袭和转移的影响

过表达组与空载体组比较, 差异有统计学意义 ($t = 6.212, P = 0.012$), 过表达 miRNA-135b 的鼻咽癌 CNE1 细胞的侵袭和转移能力有所增加 (见图 1A~B)。Transwell 实验结果显示, 干扰组与对照组细胞比较, 差异有统计学意义 ($t = 9.330, P = 0.001$), 干扰组鼻咽癌 CNE1 细胞的侵袭和转移能力减弱 (见图 1C~D)。

2.3 LATS2 活性及表达

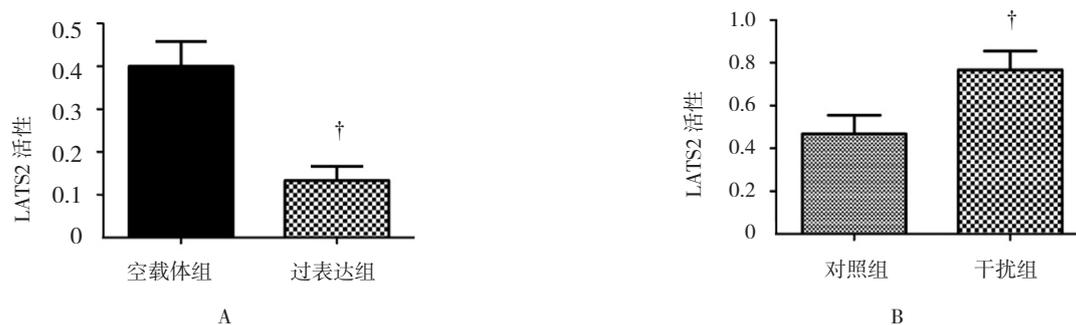
转染 24 h 后 LATS2 蛋白的活性检测结果显示, 空载体组与过表达及干扰组比较, 差异有统计学意义 ($t = 8.351, P = 0.002$); 对照组与干扰组比较, 差异有统计学意义 ($t = 5.420, P = 0.011$), LATS2 的活性在过表达 miRNA-135b 的鼻咽癌 CNE1 细胞降低, 而在干扰 miRNA-135b 的鼻咽癌 CNE1 细胞中增强, 见图 2。Western blotting 结果显示, 过表达 miRNA-135b 的鼻咽癌 CNE1 细胞中 LATS2 的表达水平有所下降, 而干扰该 miRNA 后的鼻咽癌 CNE1 细胞中 LATS2 的表达水平有所增强, 见图 3。





† 与空载体组或对照组比较, $P < 0.05$

图 1 miRNA-135b 不同表达程度对鼻咽癌 CNE1 细胞侵袭和转移的影响 (×40)



† 与空载体组或对照组比较, $P < 0.05$

图 2 LATS2 的活性

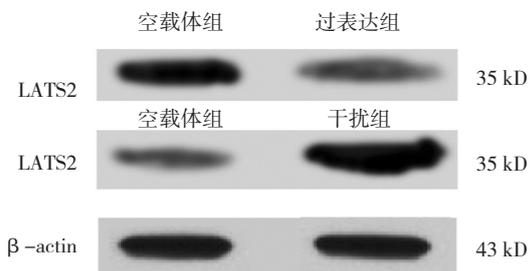


图 3 各组鼻咽癌 CNE1 细胞中 LATS2 蛋白的表达水平

3 讨论

miRNA 是一种可促进癌症发生或者抑制癌症发生的基因调节因子, 在控制细胞生长、分化及凋亡等生物学过程中发挥着重要的作用^[8], 目前已有多种 miRNA 被发现与癌症有关, 其中 miRNA-135b 被证明

在多种肿瘤细胞中的表达均出现异常。miRNA-135b 在结肠癌、肝癌、骨肉瘤等癌症中均被发现呈高表达状态^[9]。多项研究表明, *LATS2* 为抑癌基因, 在肿瘤的发生和调节人类细胞周期中起到关键作用。作为 LATS 家族的新成员, *LATS2* 在多种肿瘤组织中都为表达抑制或基因突变, 然而在鼻咽癌组织中却为过度表达, 从而抑制鼻咽癌细胞的生长, 诱导其凋亡。ZHANG 等^[10] 在鼻咽癌鼻咽上皮用生化细胞株 N96 中检测出 *LATS2* 的过度表达, 提示 *LATS2* 可能在鼻咽癌组织中发挥促进癌细胞生长的作用。

本研究结果显示, miRNA-135b 在鼻咽癌 CNE1 细胞系中高表达, 可能导致鼻咽癌 CNE1 细胞侵袭和转移能力增强。Transwell 实验表明, miRNA-135b 的过

表达提高鼻咽癌 CNE1 细胞的侵袭和转移能力, 而对 miRNA-135b 进行干扰后, 鼻咽癌 CNE1 细胞的侵袭和迁移能力下降。与 miRNA-135b 在其他癌症的细胞实验中的结果一致^[5]。

有研究表明, miRNA-135b 参与肿瘤发生、发展的机制可能与 Hippo 信号通路, 而 LATS2 基因是 Hippo 信号通路的相关基因^[11-13], LATS2 具有抑癌作用, 本研究通过对鼻咽癌 CNE1 细胞 miRNA-135b 的过表达和干扰发现, LATS2 的活性和表达水平在过表达 miRNA-135b 的鼻咽癌 CNE1 细胞降低而在干扰 miRNA-135b 的鼻咽癌 CNE1 细胞中增强。说明 miRNA-135b 的表达可能通过影响 LATS2 活性影响鼻咽癌细胞的生长。

综上所述, miRNA-135b 的过表达可以引起鼻咽癌 CNE1 细胞的侵袭和转移能力增强, 影响鼻咽癌细胞浸润扩散, 并可通过调节 LATS2 的活性和表达水平来调控癌变和恶性程度。干扰 miRNA-135b 可抑制鼻咽癌细胞增殖、侵袭和转移。miRNA-135b 在鼻咽癌的侵袭和转移中可能起着重要的调节作用, 通过调节 LATS2 或许能够入核调控鼻咽癌的发生和恶性程度, 但详细的机制有待更进一步的研究。

参 考 文 献:

- [1] 魏矿荣, 梁智恒, 欧志雄. 广东省中山市 1970-2010 年鼻咽癌死亡概况 [J]. 中国癌症杂志, 2014, 24(4): 241-245.
- [2] 张彦兵, 王妍华, 郭亚焕, 等. miR-135b 促进肝癌细胞侵袭和转移 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(10): 1316-1321.
- [3] 万仁强, 傅向军, 张学辉, 等. miR-21 在鼻咽癌中的表达及对鼻咽癌细胞株增殖及凋亡的影响 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2015, 21(5): 378-381.
- [4] MURAKAMI H, MIZUNO T, TANIGUCHI T, et al. LATS2 is a tumor suppressor gene of malignant mesothelioma[J]. Cancer Res, 2011, 71(3): 873-883.
- [5] YANG G L, ZHANG L H, BO J J, et al. Increased expression of HMGB1 is associated with poor prognosis in human bladder cancer[J]. J Surg Oncol, 2012, 106(1): 57-61.
- [6] 张彦兵, 王妍华, 郭亚焕, 等. miR-135b 促进肝癌细胞侵袭和转移 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(10): 1316-1321.
- [7] TANG J F, YU Z H, LIU T, et al. Five miRNAs as novel diagnostic biomarker candidates for primary nasopharyngeal carcinoma[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(18): 7575-7581.
- [8] BANDRES E, CUBEDO E, AGIRRE X, et al. Identification by RealtimePCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues[J]. Mol Cancer, 2006, 2(5): 29-32.
- [9] MELKAMU T, ZHANG X, TAN J, et al. Alteration of microRNA expression in vinyl carbamate-induced mouse lung tumors and modulation by the chemopreventive agent indole-3-carbinol[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(2): 252-258.
- [10] ZHANG Y, HU C F, CHEN J, et al. LATS2 is de-methylated and overexpressed in nasopharyngeal carcinoma and predicts poor prognosis[J]. BMC Cancer, 2010(10): 538.
- [11] SAYED D, RANE S, LYPOWY J, et al. MicroRNA-21 targets Sprouty 2 and promotes cellular outgrowths[J]. Mol Biol Cell, 2008, 19(8): 3272-3278.
- [12] HE Y, WANG J, YUNG V Y, et al. microRNA-135b regulates apoptosis and chemoresistance in colorectal cancer by targeting large tumor suppressor kinase 2[J]. Am J Cancer Res, 2015, 5(4): 1382-1395.
- [13] JUNG H S, SEO Y R, YANG Y M, et al. Galpha 12 gep oncogene inhibits FOXO1 in hepatocellular carcinoma as a consequence of miR-135b and miR-194 dysregulation[J]. Cell Signal, 2014, 26(7): 1456-1465.

(王荣兵 编辑)