

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.24.006

文章编号: 1005-8982(2017)24-0029-05

临床研究·论著

## miR-148a 对食管癌细胞迁移及侵袭的影响 及潜在分子机制研究

李张维, 李涛

(西南医科大学 临床医学院, 四川 泸州 646000)

**摘要:目的** 探究微小核糖核酸 148a(miR-148a)在食管鳞状细胞癌(ESCC)中的表达及对食管癌 TE-1 细胞迁移和侵袭能力的影响。**方法** 收集 48 例食管癌患者肿瘤及癌旁组织的 RNA 标本,逆转录 PCR 合成互补脱氧核糖核酸(cDNA),实时荧光定量聚合酶链反应 PCR 检测 miR-148a 在肿瘤及癌旁组织中的表达情况,分析肿瘤组织中 miR-148a 表达差异的临床意义。将人工合成的 miR-148a 模拟物(miR-148a mimics)转染入食管癌细胞 TE-1 中,划痕愈合实验检测过表达 miR-148a 对 TE-1 细胞迁移的影响,Transwell 小室模型检测 miR-148a 对 TE-1 侵袭的影响。Western blot 检测 miR-148a 过表达对 TE-1 细胞中原癌基因(c-myc)及基质金属蛋白酶 9(MMP-9)蛋白表达的影响。**结果** MiR-148a 在食管癌组织中表达水平下调( $P=0.031$ );过表达 miR-148a 能够抑制 TE-1 细胞迁移( $P=0.021$ )及侵袭( $P=0.018$ )并下调细胞内 c-myc( $P=0.037$ )及 MMP-9( $P=0.026$ )的表达水平。**结论** miR-148a 在食管癌中低表达,miR-148a 可能通过抑制 c-myc/MMP-9 通路的表达来发挥抑制食管癌细胞迁移及侵袭。

**关键词:** MiR-148a;食管癌;迁移;侵袭;原癌基因(c-myc);基质金属蛋白酶 9

**中图分类号:** R735.1

**文献标识码:** A

## Role and potential mechanism of miR-148a in migration and invasion of esophageal carcinoma

Zhang-wei Li, Tao Li

(School of Clinical Medicine, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression of miR-148a in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and its role in cell migration and invasion. **Methods** A total of 48 cases of ESCC and tumor adjacent tissue ribonucleic acid (RNA) samples were collected in our hospital. Complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) was synthesized by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression level of miR-148a was detected by real-time PCR. MiR-148a mimics were synthesized and transfected into TE-1 cells. Migration and invasion rates were determined by wound-healing assay and Transwell assay, respectively. The expression levels of c-myc and matrix metalloprotein 9 (MMP-9) were measured by Western blot. **Results** miR-148a was down-regulated in ESCC tissue ( $P=0.031$ ). Over-expression of miR-148a inhibited migration and invasion rates of TE-1 cells ( $P=0.021$  and  $0.018$ , respectively). Moreover, protein levels of c-myc and MMP-9 were decreased with miR-148a over expression ( $P=0.037$  and  $0.026$ , respectively). **Conclusions** miR-148a inhibits cell migration and invasion of ESCC through inhibition of c-myc/MMP-9 signal pathway.

**Keywords:** miR-148a; esophageal cancer; migration; invasion; c-myc; matrix metalloproteinases 9

食管癌是我国常见的上消化道恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>, 对于食管癌发生、发展机制的研究对于提高食管癌患

收稿日期:2017-02-28

[通信作者] 李涛, Tel:13709000298

者的诊断及预后评价效果具有重要意义。MicroRNAs 是一类长度在 25 个核苷酸以内的单链、短序列 RNA。MicroRNAs 不具有编码蛋白质的功能,而是通过结合与靶基因 mRNA 的 3'-端非编码区(three prime untranslated region, 3'-UTR)来抑制靶基因表达<sup>[2]</sup>。研究发现, MicroRNA 148a(miR-148a)的异常表达与卵巢癌<sup>[3]</sup>、肺癌<sup>[4]</sup>等多种肿瘤的发生、发展密切相关,因而,miR-148a 被认为是一种具有潜在应用价值的肿瘤评估指标。但是 miR-148a 在食管癌中的表达及生物作用尚不完全清楚。本研究通过检测 miR-148a 在食管癌及对应癌旁组织中的表达情况及其对细胞迁移侵袭的效应,为食管癌的诊治提供新的分子靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

选取 2014 年 3 月 -2015 年 4 月于四川省肿瘤医院收治的 48 例食管鳞状细胞癌及对应癌旁组织患者。其中,年龄 45~68 岁;男性 34 例,女性 14 例。所有入组患者均签署研究知情同意书。人食管癌细胞系 TE-1(购自中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所),细胞液体培养基 DMEM(11965-084)、胎牛血清(16000044)(购自美国 Gibco 公司),Trizol 试剂(15596026)及 Lipofectamine™ 3000 转染试剂(L3000015)、一步法转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒(10928042)(购自美国 Invitrogen 公司),miR-148a mimics、阴性对照 mimics、miR-148a 实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)引物试剂盒及 RNU6B qRT-PCR 引物试剂盒(购自广州复能基因有限公司),兔抗人原癌基因(c-myc)(#5605)及基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinases 9, MMP-9)(#13667)多克隆抗体和小鼠抗人  $\beta$ -actin(#3700)单克隆抗体(购自美国 Cell Signaling Technology 公司),ECL 化学发光试剂盒(WBKLS0050)(购自美国密理博公司),8.0  $\mu$ m 孔径 Transwell 小室(#3458)(购自美国 Corning 公司),基质胶(货号:354230)(购自美国 BD 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 qRT-PCR** 按 Trizol 试剂说明书提取组织或细胞总 RNA,按试剂盒说明书配制逆转录及 PCR 扩增体系。设置逆转录条件:50℃ 30 min,94℃ 2 min,

循环 1 次;94℃ 15 s,60℃ 30 s,68℃ 3 min,循环次数 40;72℃ 10 min。以 RNU6B 作为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 miR-148a 的相对表达量。每个样本独立重复实验 3 次。

**1.2.2 细胞培养及 mimics 转染** TE-1 细胞在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中培养至稳定传代 2、3 代。按过夜增殖至愈合度达 70%之密度接种 6 孔细胞培养板。达到预定培养密度后移除培养基,1  $\times$  PBS 溶液充分洗涤细胞。转染分组:miR-148a 组每孔加入 100 pmol miR-148a mimics 及 5  $\mu$ l 转染试剂;对照组每孔加入 100 pmol 的阴性对照 mimics 及 5  $\mu$ l 转染试剂。添加无血清 DMEM 培养液至终体积 1 ml/孔。4 h 后更换完全培养基继续培养。

**1.2.3 细胞划痕愈合实验** 转染 24 h 后的 TE-1 细胞接种于 6 孔板中,接种密度以过夜铺满为准。无血清 DMEM 培养基饥饿细胞 4 h 已减弱细胞间连接。100  $\mu$ l 的枪头由每孔中线划过,PBS 清洗 6 孔板内残余悬浮细胞,每孔加入 2 ml 无血清 DMEM 培养基。培养 48 h 后在显微镜下观察细胞迁移情况并拍照。

**1.2.4 Transwell 侵袭小室检测** 按 1:8 比例采用 DMEM 培养液稀释基质胶后,每孔 100  $\mu$ l 包被 Transwell 小室膜的上室面,取转染 72 h 后的 TE-1 细胞,使用无血清培养基重悬细胞至  $5 \times 10^5$  个/ml,上层小室每室加入 250  $\mu$ l 细胞悬液,下层小室中加入含 10% FBS 的培养基,置于 37℃、5%二氧化碳 CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 12 h。用棉签擦净上室面细胞,4%多聚甲醛固定下室面细胞,Giemsa 染液染色。 $\times 100$  光镜下随机选择 10 个视野计数下室面的细胞个数。以每个小室的平均细胞数为最终计数。

**1.2.5 蛋白免疫印迹检测** 提取转染 72 h 后的 TE-1 细胞总蛋白。SDS-PAGE 胶垂直电泳分离蛋白,采用 BIO-RAD 湿转系统,70 V 恒压转膜 150 min,5% BSA 室温封闭 1 h;用 3%浓度的脱脂奶粉溶液按 1:1 000 比例稀释的 c-myc、MMP-9 及  $\beta$ -actin 抗体。在 4℃下孵育相应条带过夜。洗去残余一抗后采用 1:5 000 稀释的 HRP 标记山羊抗兔或抗鼠二抗室温孵育条带 1 h。于暗室内,ECL 法发光观察蛋白表达。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,计数资料以率(%)表示,用  $\chi^2$  检验,用  $t$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-148a 在食管癌组织中的表达

在对 48 组食管癌及癌旁组织中进行 PCR 定量检测发现,miR-148a 在食管癌组织中的相对表达量为(0.475 ± 0.013)。结果表明,其表达水平较癌旁组织(1.136 ± 0.011)降低( $t=2.307, P=0.031$ )。以 48

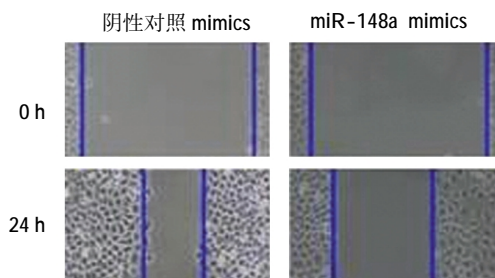
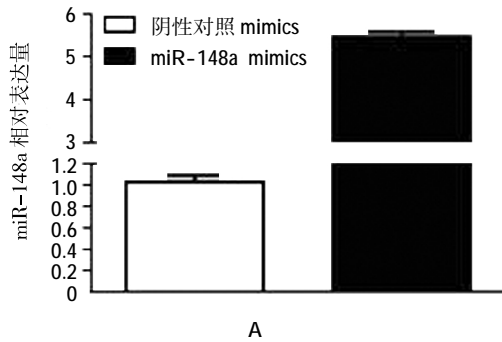
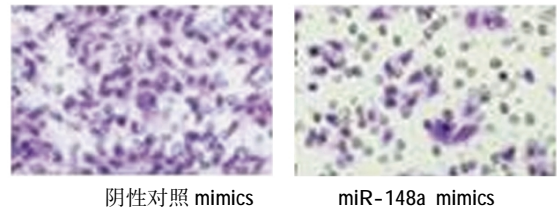
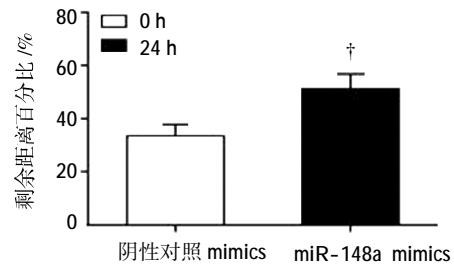
例食管癌组织中 miR-148a 的平均表达量为界值,将患者分为 miR-148a 高表达组 ( $\geq 0.475, n=35$ )及 miR-148a 低表达组 ( $< 0.475, n=13$ )。对两组患者的临床病理特征进行分析表明,食管癌组织中 miR-148a 阳性表达与肿瘤淋巴结转移 ( $\chi^2=6.553, P=0.019$ ) 关系密切。见附表。

附表 食管癌患者 miR-148a 与临床特征表达的关系

miR-148a 表达	男/女/例	年龄		Barrett 食管		肿瘤直径		淋巴结转移		TNM 分期	
		≤60 岁	>60 岁	是	否	≤3 cm	>3 cm	是	否	I、II	III、IV
高表达(n=35)	27/8	23	12	19	16	22	13	25	10	22	13
低表达(n=13)	7/6	6	7	8	5	6	7	4	9	4	9
$\chi^2$ 值	1.490	1.517		0.203		1.088		6.553		3.931	
P 值	0.157	0.321		0.750		0.339		0.019*		0.059	

### 2.2 过表达 miR-148a 表达对 TE-1 迁移及侵袭的影响

为探究 miR-148a 的生物学功能,笔者首先通过 mimics 转染在 TE-1 细胞内成功过表达 miR-148a ( $t=17.291, P=0.003$ ) (见图 1A)。细胞划痕愈合实验结果显示,与转染阴性对照 mimics 组 ( $33.430 \pm 4.356$ ) 比较,过表达 miR-148a 能抑制 TE-1 细胞迁移 ( $51.283 \pm 7.201$ ) ( $t=6.833, P=0.021$ ) (见图 1B)。Transwell 侵袭小室检测结果表明,与阴性对照 mimics 比较 ( $89.685 \pm 9.375$ ),miR-148a 对 TE-1 细胞的侵袭能力 ( $27.094 \pm 6.281$ ) 同样具有抑制效果 ( $t=7.124, P=0.018$ ),见图 1C。



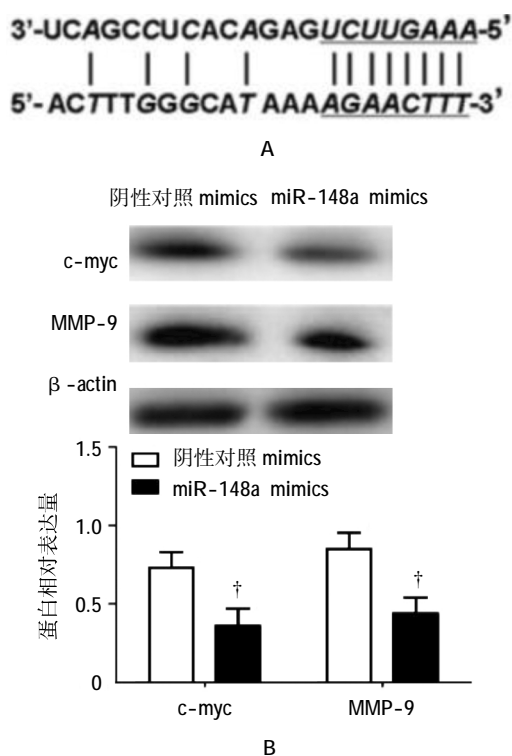
A: 转染 miR-148a mimics 提高 TE-1 细胞内 miR-148a 表达水平;B: 过表达 miR-148a 抑制 TE-1 细胞迁移;C: 过表达 miR-148a 抑制 TE-1 细胞侵袭。† 与转染阴性对照 mimics 组比较,  $P < 0.05$

图 1 过表达 miR-148a 抑制 TE-1 细胞迁移及侵袭

### 2.3 过表达 miR-148a 抑制 TE-1 细胞内 c-myc 及 MMP-9 的表达

生物信息学检索表明,癌性转录因子 c-myc 是 miR-148a 的下游潜在作用靶点(见图 2A)。笔者在

TE 细胞内过表达 miR-148a 后,通过蛋白免疫印迹检测发现细胞内 c-myc 蛋白的表达下调 ( $0.623 \pm 0.074$  vs  $0.466 \pm 0.101$ ,  $t=5.307$ ,  $P=0.037$ )(见图 2B)。同时,对细胞迁移和侵袭具有重要促进作用的基质金属蛋白酶 MMP-9 的表达量也降低( $0.760 \pm 0.111$  vs  $0.512 \pm 0.109$ ,  $t=6.113$ ,  $P=0.026$ )。



A: miR-148a 与 c-myc 3'-端非编码区存在结合位点; B: 过表达 miR-148a 降低 TE-1 细胞内 c-myc 及 MMP-9 蛋白表达水平。† 与转染阴性对照 mimics 组比较,  $P < 0.05$

图 2 过表达 miR-148a 抑制 TE-1 细胞内 c-myc 及 MMP-9 表达

### 3 讨论

目前,在临床上有实际应用价值的食管癌的生物学诊断标志物及治疗靶点极少<sup>[6]</sup>。因而,研究新的食管癌生物治疗靶点靶标具有重要的临床应用价值。miR-148a 由位于染色体 7p15.2 上的基因编码<sup>[6]</sup>。研究确认,miR-148a 在生理和病理生理过程中发挥重要作用。例如,前 B 淋巴细胞激活后能诱导 miR-148 的表达,miR-148a 进而诱导活化的 B 淋巴细胞进一步分化成浆细胞,即效应 B 淋巴细胞<sup>[7]</sup>。除此之外,miR-148a 在骨骼肌细胞分化的过程中同样具有诱导作用<sup>[8]</sup>。近年来对 miR-148a 功能的研究多集中于肿瘤学领域。在胃癌组织及多种胃癌细胞系中均检测到 miR-148a 的表达下调<sup>[9]</sup>。低表达的 miR-148a

与患者肿瘤体积增大、肿瘤淋巴结转移、高 TNM 临床分期<sup>[10]</sup>及不良预后均密切相关<sup>[11]</sup>。提示 miR-148a 在癌组织中的低表达,并具有相当的临床意义。在本研究中,笔者通过对食管癌及癌旁组织检测发现,miR-148a 在食管癌组织中的表达明显降低,并且与肿瘤淋巴结转移等与肿瘤侵袭、转移相关的恶性表型关系密切,提示 miR-148a 可能通过抑制食管癌细胞侵袭而抑制肿瘤发展。

本研究中,笔者通过基因转染技术提高食管癌 TE-1 细胞中 miR-148a 的表达,通过细胞划痕愈合试验和 Transwell 侵袭小室模型发现,过表达 miR-148a 能够明显抑制 TE-1 细胞的迁移和侵袭能力。该研究结果与国内外学者在肾癌<sup>[12]</sup>、乳腺癌<sup>[13]</sup>及卵巢癌<sup>[14]</sup>中的研究结论相一致。为探讨 miR-148a 的作用机制,通过生物信息学检索发现,癌性转录因子 c-myc 可能是 miR-148a 的作用靶点之一。通过蛋白免疫印迹检测,证实 miR-148a 对 c-myc 表达的负调控作用。并且 c-myc 转录靶标 MMP-9 的表达水平也受到明显的抑制。MMP-9 是参与分解细胞外基质而促进细胞迁移侵袭的蛋白酶之一<sup>[15]</sup>,其表达改变从分子水平解释了过表达 miR-148a 后细胞迁移及侵袭能力变化的原因。

综上所述,miR-148a 在食管癌中表达下调并与食管癌侵袭转移相关表型关系密切。在体外,miR-148a 能够通过抑制 c-myc/MMP-9 的表达来抑制食管癌细胞的迁移侵袭能力,最终抑制食管癌进展。

### 参 考 文 献:

- [1] 王志敏,杜云翔,山顺林,等. 2009-2011 年淮安市食管癌流行病学与治疗现状分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(5): 334-337.
- [2] TU K, ZHENG X, DOU C, et al. MicroRNA-130b promotes cell aggressiveness by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human hepatocellular carcinoma[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(11): 20486-20499.
- [3] ZHAO M, SU Z, ZHANG S, et al. Suppressive role of microRNA-148a in cell proliferation and invasion in ovarian cancer through targeting transforming growth factor- $\beta$ -induced 2[J]. Oncol Res, 2016, 24(5): 353-360.
- [4] XU X, ZHANG Y, JASPER J, et al. miR-148a functions to suppress metastasis and serves as a prognostic indicator in triple-negative breast cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(15): 20381-20394.
- [5] SHAIB W L, NAMMOUR J P, GILL H, et al. The future prospects of immune therapy in gastric and esophageal adenocarcinoma[J]. J Clin Med, 2016, 5(11): E100.



- [6] CALIN G A, SEVIGNANI C, DUMITRU C D, et al. Human mi-croRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(9): 2999-3004.
- [7] PORSTNER M, WINKELMANN R, DAUM P, et al. miR-148a promotes plasma cell differentiation and targets the germinal center transcription factors *mitf* and *bach2*[J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(4): 1206-1215.
- [8] ZHANG J, YING Z Z, TANG Z L, et al. microRNA-148a promotes myogenic differentiation by targeting the *ROCK1* gene[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(25): 21093-21101.
- [9] YU B, LV X, SU L, et al. miR-148a functions as a tumor suppressor by targeting *CCK-BR* via inactivating *STAT3* and *Akt* in human gastric cancer[J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0158961.
- [10] ZHANG W, LI Y. miR-148a downregulates the expression of transforming growth factor- $\beta$  2 and *SMAD2* in gastric cancer[J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(5): 1877-1885.
- [11] LIU L, YE J X, QIN Y Z, et al. Evaluation of miR-29c, miR-124, miR-135a and miR-148a in predicting lymph node metastasis and tumor stage of gastric cancer[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(12): 22227-22236.
- [12] CAO H, LIU Z, WANG R, et al. miR-148a suppresses human renal cell carcinoma malignancy by targeting *AKT2* [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(1): 147-154.
- [13] XU X, ZHANG Y, JASPER J, et al. miR-148a functions to suppress metastasis and serves as a prognostic indicator in triple-negative breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(15): 20381-20394.
- [14] WEN Z, ZHAO S, LIU S, et al. microRNA-148a inhibits migration and invasion of ovarian cancer cells via targeting sphingosine-1-phosphate receptor 1[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(3): 3775-3780.
- [15] LI W, LING W, TENG X, et al. Effect of advanced glycation end products, extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinases on type-I collagen metabolism [J]. *Biomed Rep*, 2016, 4(6): 691-693.

(王荣兵 编辑)