

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201602003

· 论著 ·

MiR-324-3p 经上皮 - 间质转化调控鼻咽癌 迁移侵袭的实验分析

杨年婷^{1,2}, 刘超¹, 李果¹, 刘勇¹, 粟忠武¹, 任舒灵¹, 卢善翊¹, 张水婷¹, 邓腾波¹, 田勇泉¹, 邱元正¹

(1. 中南大学湘雅医院耳鼻咽喉头颈外科耳鼻咽喉重大疾病研究湖南省重点实验室, 湖南长沙 410008; 2. 湖南省血吸虫病防治所附属湘岳医院眼耳鼻喉科, 湖南岳阳 414000)

摘要: **目的** 探讨 miR-324-3p 对鼻咽癌细胞体外迁移侵袭能力的影响。**方法** MiR-324-3p 转移上调其在鼻咽癌 5-8F 和 6-10B 细胞中的表达, 采用划痕愈合实验及 Transwell 侵袭实验检测上调后的鼻咽癌 5-8F 和 6-10B 细胞迁移及侵袭能力; western blot 检测上皮 - 间质转化 (EMT) 上皮细胞标志物 E-cadherin 和间质细胞标志物 Vimentin 的表达。**结果** MiR-324-3p 成功转移上调了其在鼻咽癌 5-8F 和 6-10B 细胞中的表达。过表达 miR-324-3p 的鼻咽癌 5-8F 和 6-10B 细胞的体外迁移及侵袭能力显著下降, 可同时伴随着 E-cadherin 的表达上调, Vimentin 的表达下降。**结论** MiR-324-3p 可能通过诱导 EMT 改变调控鼻咽癌细胞的侵袭转移能力。

关键词: 鼻咽癌; miR-324-3p; 侵袭; 转移; 上皮 - 间质转化

中图分类号: Q78; R739.63 文献标识码: A 文章编号: 1007-1520(2016)02-0095-05

MiR-324-3p regulates the migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma via epithelial-mesenchymal transition

YANG Nian-ting, LIU Chao, LI Guo, LIU Yong, SU Zhong-wu, REN Shu-ling,

LU Shan-hong, ZHANG Shui-ting, DENG Teng-bo, TIAN Yong-quan, QIU Yuan-zheng

(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of miR-324-3p on the migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma (NPC) in vitro. **Methods** MiR-324-3p mimic was used to up-regulate the expression of miR-324-3p in NPC 5-8F and 6-10B cell lines, and then alterations of migration and invasion were examined by wound healing assays and Transwell invasion assays. Molecular markers correlated with epithelial-mesenchymal transition (EMT) were finally tested. **Results** The expression of miR-324-3p was successfully up-regulated in both NPC 5-8F and 6-10B cells. Moreover, miR-324-3p overexpression led to enhanced capabilities of migration and invasion in NPC 5-8F and 6-10B cells, which was accompanied by elevated expression of E-cadherin and decreased expression of Vimentin. **Conclusion** MiR-324-3p can regulate the migration and invasion of NPC via EMT.

Key words: Nasopharyngeal neoplasma; MiR-324-3p; Invasion; Metastasis; Epithelial - mesenchymal transition

近年来, miRNAs 在肿瘤中的作用及机理研究备受研究者关注。我们前期通过梯度递增放射线照射筛选获得鼻咽癌放疗抵抗相关的 miRNAs 差异表

达谱, 发现 miR-324-3p 为其中的调控鼻咽癌放疗抵抗的差异 miRNAs 之一^[1]。前期研究已证实 miR-324-3p 作为抑癌因子, 能调控鼻咽癌的放疗抵抗性^[2], 并且在鼻咽癌组织上发现 miR-324-3p 的表达与鼻咽癌患者的 T 分级、临床分期及淋巴结转移密切相关^[3]。目前, 文献对 miR-324-3p 在肿瘤中的功能及作用机制报道较少, 其在肿瘤侵袭转移中的作用更未见报道。因此, 本研究拟探讨 miR-324-3p 对鼻咽癌侵袭转移的调控作用及作用机理。

基金项目: 国家自然科学基金(81202128, 81172558, 81372426); 湖南省自然科学基金(2015JJ3137, 14JJ2018); 高等学校博士学科点专项科研基金课题(20120162120049); 中南大学自由探索计划青年教师助推基金(2012QNZT099)。
作者简介: 杨年婷, 女, 硕士, 主治医师。
通信作者: 邱元正, Email: xyqyz@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 细胞培养和细胞转染

本研究所采用的鼻咽癌 5-8F 及 6-10B 细胞均来自湘雅医学院细胞中心。在 37℃ 及 5% CO₂ 饱和湿度条件下,用含有 10% 特级胎牛血清的 RPMI 1640 培养基进行培养,常规 0.25% 胰蛋白酶消化传代。所有试验均选用处于对数生长期的细胞。细胞转染按 Lipofectamine 2 000 试剂说明书及我们前期研究的方法进行转染^[2],实验分为空白对照组(Mock)、阴性对照组(NC)及转染组(miR-324-3p mimic)。

1.2 RNA 提取及荧光定量 PCR

细胞总 RNA 按 TRIzol[®] reagent 试剂(Invitrogen, 美国)说明书提取,miR-324-3p 采用 All-in-One[™] miRNA qRT-PCR 检测试剂盒(GeneCopia Inc, 美国)进行 qRT-PCR 反应,以 U6 作为内参照;以 2^{-ΔΔCT} 值表示 miR-324-3p 的相对表达量。

1.3 总蛋白提取及 Western blot 检测

细胞总蛋白以 RIPA 裂解液进行提取,BCA 法测定蛋白浓度。取 30 μg 蛋白以 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳。蛋白电泳分离后转膜至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。5% 脱脂奶粉封闭 1 h,一抗为兔抗人 E-cadherin/Vimentin 单克隆抗体(1:800),4℃ 孵育过夜;漂洗后以辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h。洗膜后,经化学发光剂显影曝光摄片。以小鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体检测 GAPDH 含量作为内参。采用 FluorChemFC2 凝胶成像分析系统对条带进行分析。

1.4 划痕愈合实验

将细胞接种于 6 孔板,当细胞生长达到单层贴壁生长状态并接近 100% 融合度时,用 10 μl 无菌 Tip 头在 6 孔板中央划痕,用 PBS 将漂浮脱落的细胞洗净,用无血清培养基,37℃ 及 5% CO₂ 饱和湿度条件下。分别于划痕后 0、72 h 在倒置相差显微镜下拍照,观察细胞划痕愈合情况,计算划痕愈合率。每组细胞做 3 个平行孔,实验重复 3 次。

1.5 Transwell 侵袭小室实验

将铺有 Matrigel 胶的 Transwell 小室用紫外线照射 2 min,加入少量 RPMI 1 640 培养基让其充分水化。将各组细胞消化后,用无血清的培养基制成细胞悬液,按 1 × 10⁴ 细胞数加入上室(100 μl),放置

于 24 孔板上。下室加入含 10% 血清的培养基 500 μl,培养 48 h 后。取出 Transwell 小室,用棉签擦尽上室面的 Matrigel 胶和未穿过的细胞,下室面用 4% 多聚甲醛固定 20 min 后,结晶紫染色 3 ~ 5 min,置于显微镜下观察拍照观察。随机取上、下、左、右、中 5 个高倍镜视野,计数小室下室面细胞数。实验重复 3 次,取平均数作为实验结果。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用多样本均数的方差分析进行组间样本均数的比较。所有检验均为双侧检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 上调 miR-324-3p mimic 在鼻咽癌细胞中的表达

为进一步阐明其对鼻咽癌迁移和侵袭的影响,我们首先用 miR-324-3p mimic 上调其在鼻咽癌细胞中的表达。qRT-PCR 结果表明,mimic 转染 48 h 后,miR-324-3p 在鼻咽癌 5-8F 和 6-10B 细胞中 miR-324-3p 的表达分别上调了(555.2 ± 104.7)倍和(100.2 ± 8.4)倍(图 1A、1B)。

2.2 miR-324-3p 调控鼻咽癌细胞体外迁移能力

成功过表达 miR-324-3p 后,划痕愈合实验表明 5-8F 和 6-10B 细胞的划痕愈合能力较空白对照组及阴性对照组细胞均显著下降(图 2A、2B)。该结果提示 miR-324-3p 上调能抑制鼻咽癌细胞的体外迁移能力。

2.3 miR-324-3p 调控鼻咽癌细胞的体外侵袭能力

同样,我们进一步通过 Transwell 侵袭实验验证了 miR-324-3p 对鼻咽癌细胞侵袭能力的影响。数据表明 miR-324-3p 过表达后,穿过聚碳酸酯膜的 5-8F 细胞和 6-10B 细胞较空白对照组和阴性对照组细胞均明显减少,3 组穿过 5-8F 细胞分别为(96.0 ± 20.2)、(101.0 ± 17.8)、(34.6 ± 8.5)个,3 组穿过 6-10B 细胞分别为(73.8 ± 9.7)、(75.7 ± 10.6)和(36.2 ± 8.3)个,miR-324-3p 过表达后,穿过聚碳酸酯膜的 5-8F 细胞与穿过聚碳酸酯膜的 6-10B 细胞比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。上述结果表明 miR-324-3p 过表达能明显抑制鼻咽癌细胞的体外迁移及侵袭能力(图 3A、3B)。

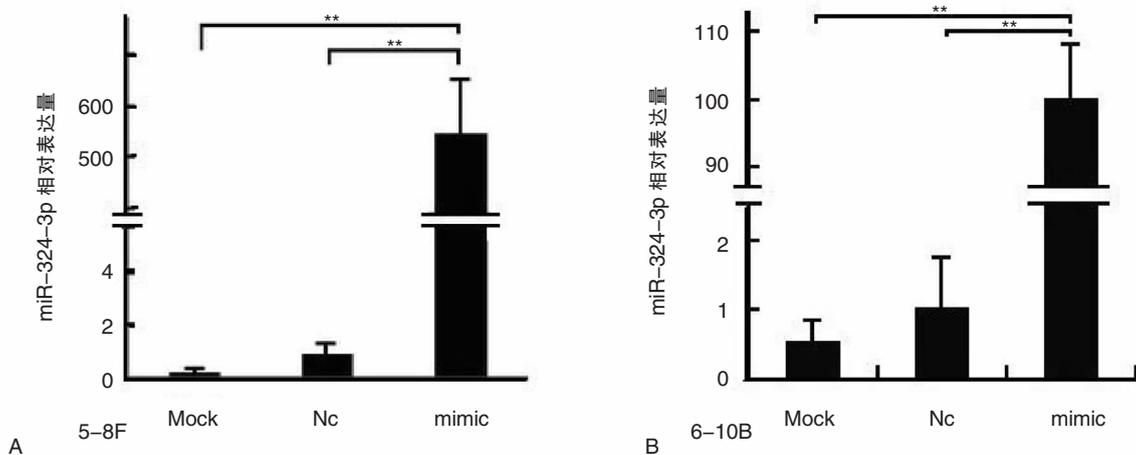


图 1 上调 miR-324-3p mimic 在鼻咽癌细胞中的表达 A:在 5-8F 细胞中与 NC 相比,miR-324-3p 表达上调了(555.2 ± 104.7)倍;B:在 6-10B 细胞中与 NC 相比,miR-324-3p 表达上调了(100.2 ± 8.4)倍

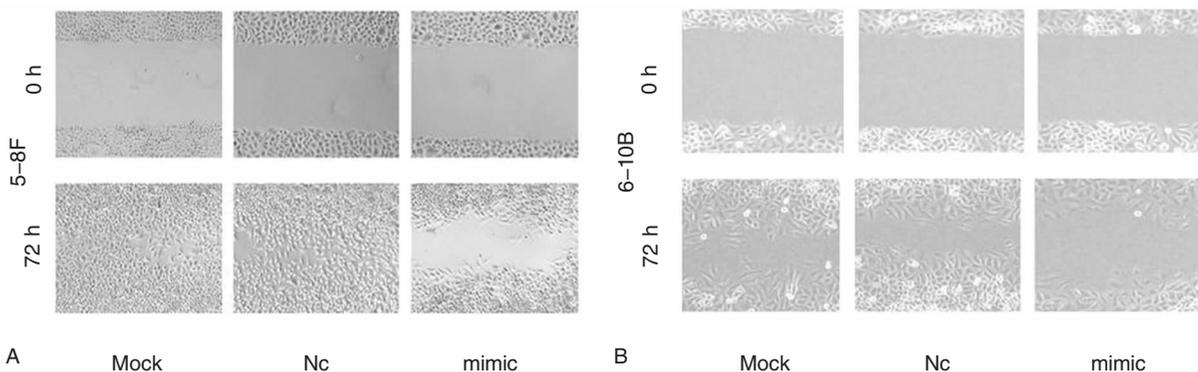


图 2 miR-324-3p 调控鼻咽癌细胞体外迁移能力:miR-324-3p 表达上调后,在 5-8F (A) 及 6-10B (B) 细胞中,与 mock 组及 NC 组相比,mimic 组划痕愈合能力显著下降

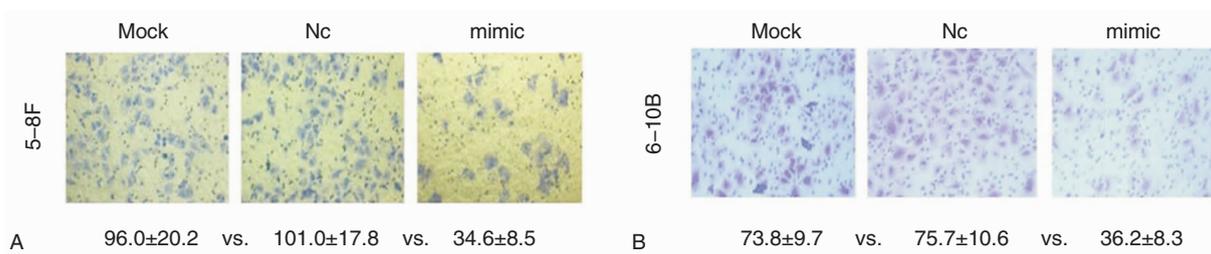


图 3 miR-324-3p 调控鼻咽癌细胞体外侵袭能力:miR-324-3p 表达上调后,在 5-8F (A) 及 6-10B (B) 细胞中,与 mock 组及 NC 组相比,mimic 组穿过聚碳酸酯膜的细胞数目明显下降(单位:个)

2.4 miR-324-3p 调控鼻咽癌细胞 EMT 过程

EMT 在肿瘤侵袭转移中发挥了重要作用。为初步阐明 miR-324-3p 调控鼻咽癌细胞侵袭转移能力的分子机理,我们检测了上皮细胞标志物 E-cadherin 和间质细胞标志物 Vimentin 的表达改变。

Western blot 结果显示 miR-324-3p 上调后,鼻咽癌 5-8F 细胞和 6-10B 细胞中 E-cadherin 的表达均升高,而 Vimentin 的表达均相应下调(图 4)。该结果表明 miR-324-3p 可通过诱导 EMT 改变促进鼻咽癌细胞的侵袭转移。

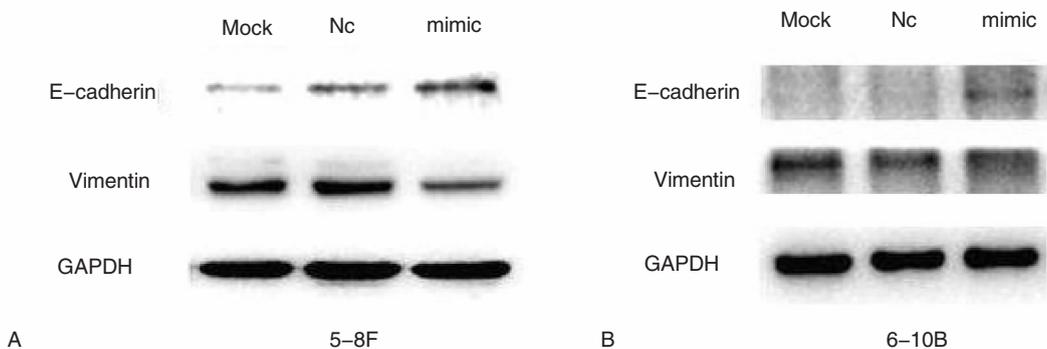


图 4 miR-324-3p 调控鼻咽癌细胞 EMT 过程:miR-324-3p 表达上调后,在 5-8F(A)及 6-10B(B)细胞中,E-cadherin 的表达升高,Vimentin 的表达降低

3 讨论

鼻咽癌患者就诊时多伴有颈部淋巴结转移 (metastasis),而转移很大程度上影响了鼻咽癌患者的治疗、生存质量及预后。因此,阐明鼻咽癌转移发生的分子机理进而采取靶向干预措施控制转移,有望进一步改善鼻咽癌患者预后。我们前期通过高通量深度测序技术筛选获得了鼻咽癌放疗抵抗相关的 miRNAs 差异表达谱。其中,miR-324-3p 为改变明显的放疗抵抗相关 miRNAs 之一^[1]。在前期研究工作中,我们发现抑制或过表达 miR-324-3p,均能够直接靶向 WNT2B 基因,引起鼻咽癌细胞的放疗敏感性相应地改变^[2]。并且在组织标本中通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测发现 miR-324-3p mRNA 和蛋白的表达与鼻咽癌患者的 T 分级、临床分期和淋巴结转移密切相关^[3]。因此,本研究在此基础上,进一步阐明了 miR-324-3p 能通过诱导鼻咽癌细胞发生 EMT 改变,从而促进鼻咽癌的侵袭转移。

目前对 miR-324-3p 的功能及作用机制研究报道较少。在非肿瘤性疾病的研究中,Cui 等^[4]报道 miR-324-3p 联合另外 5 种 miRNAs (miR-148a, miR-143, miR-628-3p, miR-140-5p, and miR-362-3p) 在血清中的表达,可以协助区分肠病毒 71 和柯萨奇病毒 16 所致的手足口感染。肾纤维化^[5]的研究表明,miR-324-3p 能够靶向减少 Prep 促进进展期肾病的肾组织纤维化的发生。在肿瘤研究中,Hu 等^[6]发现 miR-324-3p 与另外 3 种 miRNAs (miR-16, miR-25, miR-222) 在乳腺癌患者的血清中存在显著的差异性表达。Greenberg 等^[7]发现 miR-324-3p 在恶性黑色素瘤患者血清中缺失,可以作为疾病进展的检测指标之一。在肝细胞癌中^[8],miR-324-3p 同样可

以作为肝癌早期诊断的血清标志物之一。

现有研究多集中于 miR-324-3p 的血清学表达与疾病病理参数的相关性研究之间。而对其功能学研究报道较少。最新有同样的研究表明 miR-324-3p 能对鼻咽癌的放疗抵抗性发挥调控作用,且其发挥调控的靶基因为 SMAD7^[9],而我们前期证实的 miR-324-3p 的靶基因为 WNT2B 基因^[2]。本研究在之前研究基础上,首先检测了 miR-324-3p 在鼻咽癌组织中的表达,发现其与鼻咽癌患者的 T 分级、临床分期和淋巴结转移密切相关。该结果提示除调控放疗抵抗外,miR-324-3p 对鼻咽癌的侵袭转移亦可能发挥调控作用。我们研究发现 miR-324-3p 能对鼻咽癌细胞的体外迁移和侵袭产生调控作用。而目前国内外尚未见 miR-324-3p 在肿瘤侵袭转移中的研究报道。

上皮-间质转化 (EMT) 为上皮细胞发生向间质细胞的形态及基因表达改变,其常伴有上皮细胞标志物 E-cadherin 等表达下调,而间质细胞标志物 Vimentin 等表达升高。目前,肿瘤细胞 EMT 改变与其侵袭转移、干性维持、耐药及放疗抵抗关系密切^[10]。一直以来,EMT 被认为是导致肿瘤侵袭转移的重要原因之一。在本研究中,我们发现 miR-324-3p 上调后,鼻咽癌细胞的体外迁移及侵袭能力提高的同时,鼻咽癌细胞发生 EMT 改变。从而初步表明 miR-324-3p 经 EMT 调控鼻咽癌的侵袭转移。

miRNAs 是一类由内源基因编码长度为 17 ~ 25 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,均通过与靶基因 mRNA 的 3'-UTR 区域结合,抑制靶基因的翻译过程,从而达到调控靶基因参与到肿瘤的各项生物学行为^[11]。miRNAs 调控的靶基因并非简单的一对一关系,一个 miRNA 可对多个靶基因进行调控,而一个靶基因又可同时受到多个 miRNAs 的调控。

我们之前研究已经发现 WNT2B 为 miR-324-3p 的直接靶基因,二者一起在鼻咽癌放疗抵抗中发挥作用。本研究并未对其调控侵袭转移的靶基因进行报道。目前课题组正对之前证实的靶基因 WNT2B 在鼻咽癌侵袭转移、耐药及放疗抵抗中的作用进行系统研究,并同时探讨 miR-324-3p 可能存在的其他可能靶基因。

总之,本研究通过体外实验证实 miR-324-3p 能对鼻咽癌细胞的迁移和侵袭能力发挥调控作用。同时初步表明该调控作用的产生与其诱导的鼻咽癌细胞 EMT 过程密切相关^[12]。目前 miR-324-3p 调控肿瘤侵袭转移的分子机理仍有待进一步研究。因此,进一步明确其在鼻咽癌侵袭转移中的作用靶点及具体机理,将有助于实现将其作为今后鼻咽癌治疗的潜在干预靶点。

参考文献:

- [1] Li G, Qiu Y, Su Z, et al. Genome-wide analyses of radioresistance-associated miRNA expression profile in nasopharyngeal carcinoma using next generation deep sequencing[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e84486.
- [2] Li G, Liu Y, Su Z, et al. MicroRNA-324-3p regulates nasopharyngeal carcinoma radioresistance by directly targeting WNT2B[J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(11): 2596-2607.
- [3] 刘超,李果,刘勇,等. miRNA-324-3p 及其靶基因 WNT2B 在鼻咽癌组织中的表达及临床意义[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2014, 377(24): 1676-1678,1684.
- [4] Cui L, Qi Y, Li H, et al. Serum microRNA expression profile distinguishes enterovirus 71 and coxsackievirus 16 infections in patients with hand-foot-and-mouth disease[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27071.
- [5] Macconi D, Tomasoni S, Romagnani P, et al. MicroRNA-324-3p promotes renal fibrosis and is a target of ACE inhibition[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(9): 1496-1505.
- [6] Hu Z, Dong J, Wang LE, et al. Serum microRNA profiling and breast cancer risk; the use of miR-484/191 as endogenous controls[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(4): 828-834.
- [7] Greenberg E, Besser MJ, Ben-Ami E, et al. A comparative analysis of total serum miRNA profiles identifies novel signature that is highly indicative of metastatic melanoma: a pilot study[J]. *Biomarkers*, 2013, 18(6): 502-508.
- [8] Wen Y, Han J, Chen J, et al. Plasma miRNAs as early biomarkers for detecting hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2015, 137(7): 1679-1690.
- [9] Xu J, Ai Q, Cao H, et al. MiR-185-3p and miR-324-3p Predict Radiosensitivity of Nasopharyngeal Carcinoma and Modulate Cancer Cell Growth and Apoptosis by Targeting SMAD7[J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 2828-2836.
- [10] Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition[J]. *Sci Signal*, 2014, 7(344): re8.
- [11] 周世平,张哲,黄光武. miRNA 与鼻咽癌侵袭转移关系的研究进展[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2013, 19(6): 568-572.
- [12] 任舒灵,刘勇,李果,等. EphA2 蛋白调控鼻咽癌紫杉醇敏感性的实验研究[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2013, 19(1): 28-31.

(收稿日期:2015-12-01)

· 消息 ·

版权说明

为适应我国信息化建设,扩大本刊及作者知识信息交流渠道,本刊已被《中国学术期刊网络出版总库》及 CNKI 系列数据库收录,作者著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。如作者不同意文章被收录,请在来稿时向本刊声明,本刊将作适当处理。