

· 短篇论著 ·

miR-148a 抑制胃癌 MGC803 细胞的生长研究

刘福团 李阳明 孙瑞佳 刘璐 徐惠绵

【摘要】 目的 观察 miR-148a 对胃癌 MGC803 细胞生长和细胞周期的影响。方法 实时定量 PCR 检测 miR-148a 在胃癌细胞中的表达。MGC803 细胞转染 miR-148a 后, MTT 分析、生长曲线、集落生成实验观察 BGC823 细胞的生长情况, 同时进行细胞周期测定。结果 miR-148a 在胃癌 MGC803 细胞中低表达。MGC803 细胞在转染 miR-148a 后, 生长明显受到抑制, 细胞周期在 G1 期发生阻滞, 转染 miR-148 组 G1 期比率(71.52% ± 3.43%) 较对照组(47.46% ± 3.12%) 明显升高, $P < 0.01$ 。结论 miR-148a 能够影响细胞周期, 从而抑制胃癌 MGC803 细胞的生长。

【关键词】 胃肿瘤; 微 RNAs; 细胞生长过程; 细胞周期; miR-148a

microRNA(miRNA)自1993年首次被报道以来,现已发现了2000多种,存在于人类和所有模式生物中。miRNA是一类长度在22个核苷酸左右的非编码RNA基因产物,通过完全(不完全)与靶mRNA 3'末端互补结合,抑制靶mRNA的降解或翻译^[1]。现已被证实miRNA在不同的生理过程中,如生长发育、分化、增殖、凋亡等中发挥着重要的作用^[2-3]。近些年来的研究表明,部分miRNA与肿瘤的关系密切,在肿瘤的发生发展中起到了非常重要的调节作用。近期研究发现miR-148a在肿瘤中表达异常,本文探讨了miR-148a在胃癌MGC803细胞生长中的作用。

一、材料与与方法

1. 材料:人胃癌细胞株 BGC823、MGC803、SGC7901、MKN45、AGS 和人胃黏膜正常细胞 GES-1 均来自中国医科大学细胞生物实验室,用于检测 miR-148a 的表达,其中 MGC803 细胞用于 MTT 分析、生长曲线、集落生成实验、细胞周期检测。TRIzol RNA 提取试剂, Lipo2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司; qPCR 引物为上海生工合成, qPCR 试剂盒购自 Takara 公司; miR-148a mimic 及 Negative Control miRNA 由上海吉玛公司合成。

2. 细胞培养及转染: MGC803 细胞于含 10% 标准胎牛血清的 DMEM 培养基, 37 °C、5% CO₂ 孵箱内培养, 当细胞生长至对数生长期时, 消化后接种到培养板中。转染当天取终浓度为 50 nmol/L 的 miR-148a 与无血清培养基混合, 取相应 Lipofectamine™ 2000 转染剂与无血清培养基混合, 室温放置 5 min。将上述两者混匀, 室温放置 20 min。按对应时间点行 MTT 分析、生长曲线、集落生成实验、细胞周期检测。

3. 实时定量 PCR: 50 μl 反应体系, 分别加入模板 2 μl, 正向引物 1 μl, 反向引物 1 μl, SYBR® Premix Ex TaqT 12.5 μl, 加水补至 50 μl。PCR 反应条件: 95 °C 10 s; 95 °C 10 s; 60 °C 60 s 扩增 40 个循环。以 U6 作为内参基因。U6 正向引物: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'; U6 反向引物: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'; miR-148a 反转录引物: 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGACTGGATACG ACACAAAG-3'; miR-148a 正向引物: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'; miR-148a 反向引物: 5'-GCGTCAGTGCCTACAGAACTT-3'。扩增反应在实时荧光定量 PCR 仪 Rotor-Gene3000 仪器上进行扩增。待测 miRNA 的量通过 2^(-ΔΔCT) 法确定, ΔΔCT = (CT_{miRNA} - CT_{U6RNA})_{目的细胞} - (CT_{miRNA} - CT_{U6RNA})_{GES-1细胞}。实时 PCR 反应结果为 3 次独立实验的校正结果。

4. MTT 分析: 用含 10% 胎小牛血清的培养液配成单个细胞悬液, 以每孔 10 000 个细胞接种到 96 孔板, 每孔体积 200 μl。培养细胞 5 d。每孔加 MTT 溶液继续孵育 4 h, 每孔加 150 μl DMSO, 振荡 10 min, 使结晶物充分融解。选择 490 nm 波长, 测定各孔光吸收值, 记录结果, 以时间为横坐标, 吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

5. 生长曲线: 用含 10% 胎小牛血清的培养液配成单个细胞悬液, 接种 3 × 10⁵ 个细胞于培养瓶中。培养细胞 7 d。每天用细胞计数板计数细胞, 以时间为横坐标, 细胞数为纵坐标绘制细胞生长曲线。

6. 集落生成实验: 按 1:1 比例将 0.7% 琼脂糖和 2 × DMEM(含 2 × 抗生素和 20% 小牛血清) 在无菌试管中混合后, 加入 0.2 ml 单细胞悬液, 充分混匀、注入已铺有 1.2% 琼脂糖的培养皿中, 待上层琼脂糖凝固后, 置入培养箱中, 培养 10 ~ 14 d。观察细胞克隆形成情况。

7. 胞周期测定: MGC803 细胞接种于 6 孔培养板, 每组设 3 个复孔。siRNA 转染 BGC823 细胞 72 h 后收集细胞, 每孔加入预冷 PBS 洗涤细胞 2 次, 加入预冷 70% 乙醇固定, 4 °C 过夜。加入 100 μg/ml 的 RNase 10 μl/孔, 50 μg/ml 的碘化丙啶缓冲液

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.09.042

基金项目: 国家自然科学基金(30873043, 项目名称: PAK1 调节 miRNA-100 对胃癌侵袭和转移的影响及机制研究)

作者单位: 110001 沈阳, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

通讯作者: 徐惠绵, Email: xuhuijiancmu@126.com

300 μl/孔,4 ℃避光2 h,流式细胞仪检测细胞周期。

8. 统计分析:实验数据以均数 ± 标准差表示($\bar{x} \pm s$),应用SPSS 13.0 统计软件,多组比较进行单因素方差分析,两两比较进行t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. miR-148a 在胃癌细胞中的表达情况:实时定量 PCR 检测发现 miR-148a 在胃癌细胞中的表达低于胃正常黏膜细胞 GES-1,且在 MGC803 中的表达最低。见图 1。

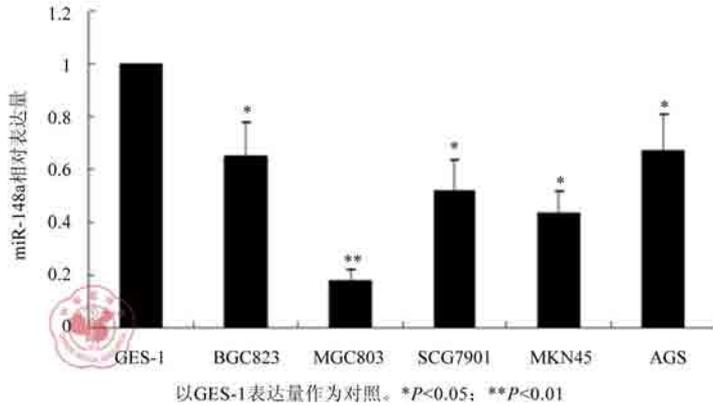


图1 miR-148a在胃癌细胞中的表达情况

2. miR-148a 对 MGC803 细胞生长的影响:将 MGC803 细胞按不同处理因素分成 3 组,单独转染脂质体组(Lipoalone),转染阴性对照 miRNA 组(Control RNA),转染 miR-148a 组(miR-148a),利用 MTT 分析、生长曲线分析、集落生成实验发现 miR-148a 抑制 MGC803 细胞的生长。见图 2~4。

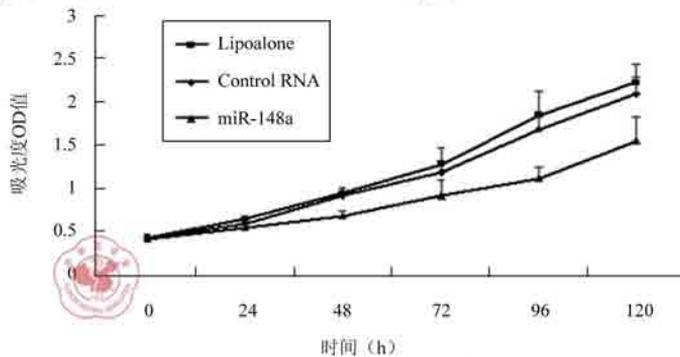


图2 MTT分析miR-148a对MGC803细胞生长的影响

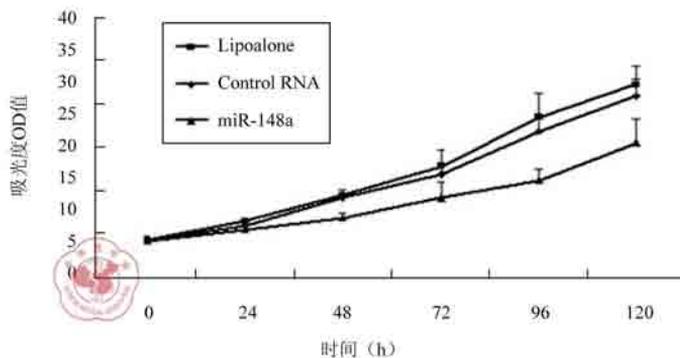


图3 生长曲线分析miR-148a对MGC803细胞生长的影响

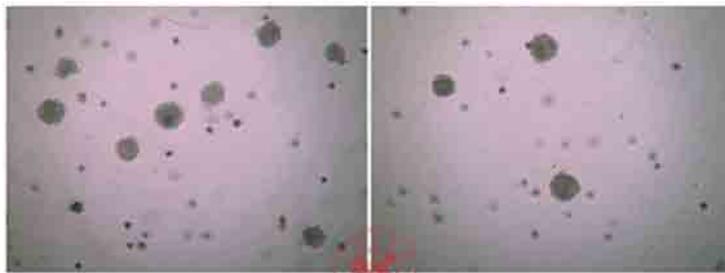


图4 集落生成实验分析miR-148a对MGC803细胞生长的影响

3. miR-148a对MGC803细胞周期的影响:细胞周期分析发现,MGC803细胞在转染miR-148a后,细胞周期在G1期发生阻滞,miR-148a组G1:71.52%±3.43%,对照组G1:47.46%±3.12%, $P=0.008$ 。见图5。

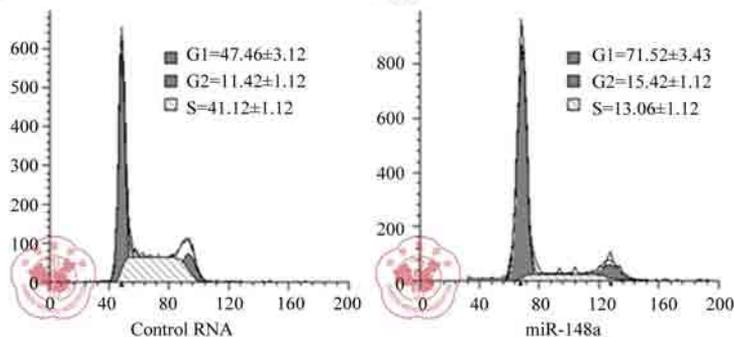


图5 miR-148a对MGC803细胞细胞周期的影响

三、讨论

胃癌是我国发病率和死亡率较高的恶性肿瘤之一,严重危害人类生命健康。为了降低胃癌的致死率,人们不断研究胃癌新的诊治措施及其发生发展的分子机制,但仍无法显著提高胃癌患者术后的生存率。miRNA作为一种非编码RNA基因产物,调节人类近1/3的基因表达,且部分miRNA的表达失调与肿瘤的发生发展密切相关,发挥着癌基因或抑癌基因的功能,是近年来肿瘤学领域研究的热点之一。miR-148a作为miRNA中的一员,已被发现在乳腺癌^[4]、胰腺癌^[5]中表达降低。Chen等^[6]则通过检测101例患者胃癌组织中miR-148a的表达情况,发现miR-148a与对应的正常组织相比,在胃癌组织中表达降低,且与胃癌的肿瘤大小相关。我们进一步研究了miR-148a在胃癌细胞中的作用,发现miR-148a能够影响胃癌MGC803细胞的细胞周期,将其阻滞于G1期,从而抑制胃癌MGC803细胞的生长。与miR-148a同一家族的miR-148b亦被发现在胃癌组织中低表达,充当抑癌基因的角色,抑制胃癌细胞的生长^[7]。但是对miR-148a作用的研究,亦出现相反的情况。在雄激素刺激下,miR-148a通过抑制CAND1的表达,促进前列腺癌LNCaP细胞的生长^[8]。分析出现相反结果的原因可能有两个。第一,miR-148a及其所作用的靶基因在各个组织中的正常表达存在差异。第二,miR-148a在不同环境,不同条件刺激下所发挥的作用亦不一样。

目前的实验结果显示miR-148a在胃癌细胞的生长过程中发挥重要作用,部分解释了胃癌发生发展的分子机制。miR-148a是否与胃癌的侵袭转移相关,是否在特定条件下发挥负性调节作用,有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Shi Y, Jin Y. MicroRNA in cell differentiation and development. *Sci China C Life Sci*, 2009, 52:205-211.
- [2] Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 2004, 431:350-355.
- [3] Miska EA. How microRNAs control cell division, differentiation and death. *Curr Opin Genet*, 2005, 15:563-568.
- [4] Lehmann U, Hasemeier B, Christgen M, et al. Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. *J Pathol*, 2008, 214:17-24.
- [5] Hanoun N, Delpu Y, Suriawinata AA, et al. The Silencing of MicroRNA 148a Production by DNA Hypermethylation Is an Early Event in Pancreatic Carcinogenesis. *Clin Chem*, 2010, 56:1107-1118.
- [6] Chen Y, Song Y, Wang Z, et al. Altered expression of MiR-148a and MiR-152 in gastrointestinal cancers and its clinical significance. *J Gastrointest Surg*, 2010, 14:1170-1179.
- [7] Song YX, Yue ZY, Wang ZN, et al. MicroRNA-148b is frequently down-regulated in gastric cancer and acts as a tumor suppressor by inhibiting cell proliferation. *Mol Cancer*, 2011, 10:1.

- [8] Murata T, Takayama K, Katayama S, et al. miR-148a is an androgen-responsive microRNA that promotes LNCaP prostate cell growth by repressing its target CAND1 expression. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2010, 13:356-361.

(收稿日期:2011-03-31)

(本文编辑:戚红丹)

刘福国,李阳明,孙瑞佳,等. miR-148a 抑制胃癌 MGC803 细胞的生长研究[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2011,5(9):2697-2700.