

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.22.002

微小 RNA-30e 调控 EMT 对胃癌侵袭和迁移影响的研究*

章 萧 艾 芬[△] 张莉红 刘 迪 张佩雯

(华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院急诊科 湖北 武汉 430024)

摘要 目的:探讨微小 RNA-30e(miR-30e)对胃癌细胞迁移和侵袭能力的影响及可能的作用机制。**方法:**利用 Transwell 实验和细胞划痕实验检测胃癌细胞系 BGC823 侵袭和迁移的能力;以脂质体包裹合成 miR-30e 转染至 BGC823 细胞,并设空白载体作为对照组;Real-time PCR 分别检测实验组和对照组细胞中 miR-30e 的表达。RT-PCR 检测过表达 miR-30e 后对上皮细胞间充质转化(EMT)相关标记分子 Snail、Vimentin、N-cadherin 和 E-cadherin 表达的影响。**结果:**miR-30e 转染至胃癌细胞后,抑制 EMT 通路主要因子 Snail、Vimentin 和 N-cadherin mRNA 和蛋白质表达,而增加 E-cadherin 的 mRNA 和蛋白质表达;miR-30e 通过 TGF- β 对 BGC823 细胞的侵袭和迁移能力有明显的抑制作用。**结论:**miR-30e 可能是肿瘤细胞 EMT 过程的关键靶靶点,阻断 EMT 过程,可以抑制胃癌细胞的侵袭和迁移能力。

关键词:胃癌;上皮细胞间充质转化;微小 RNA-30e;侵袭;迁移

中图分类号:R-33;R735.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)22-4208-05

Effects of microRNA-30e Regulating Epithelial Mesenchymal Transition on Invasion and Migration in Gastric Cancer*

ZHANG Xiao, AI Fen[△], ZHANG Li-hong, LIU Di, ZHANG Pei-wen

(Department of Emergency, The Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, 430024, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of microRNA-30e (miR-30e) on the invasion and migration of gastric cancer and the potential mechanism. **Methods:** The transwell system and the assays of wound healing were used to assess the invasion and migration ability of gastric cell line BGC823. The miR-30e was transfected into BGC823 cell via lipofectamine 2000. Cells were also transfected with empty vectors to serve as controls. The expression of miR-30e was detected by real-time PCR, and western blot was used to assay the expression of Snail, Vimentin, N-cadherin, and E-cadherin which were the markers of epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Results:** After the transfection of the miR-30e, which had significantly suppressed the major factors in EMT signaling pathway, such as the expression of mRNA and proteins of Snail, N-cadherin, and vimentin, increased the mRNA and proteins expression of E-cadherin. And the mimic also had suppressed the invasion and migration of BGC823 cell line induced by TGF- β . **Conclusion:** MiR-30e may be a key target in the EMT process of cancer cells, blocking the EMT process could inhibit the invasion and migration of gastric cancer cells.

Key words: Gastric cancer; EMT; miR-30e; Invasion; Migration

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.2 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2019)22-4208-05

前言

胃癌是最常见的消化道恶性肿瘤,也是世界排名第四的恶性肿瘤^[1]。现代生物科技的快速发展,大量新研发的抗肿瘤药物及肿瘤诊疗技术在临床上的广泛应用,让广大肿瘤患者受益。尽管胃癌患者的死亡率逐年降低,但是胃癌约占人类癌症相关性死亡的 1/4,对人类的健康仍构成重大威胁^[2]。胃癌的发生发展、侵袭转移及凋亡等机制仍未阐明^[3,4],亟需深入探索其生物学机制,为肿瘤的防治提供新的策略和理论依据。上皮细胞间充质转化(EMT)是上皮细胞向具有间质特性细胞转化的过程。EMT 的特点是上皮细胞失去细胞间的紧密连接和细胞极性,

其侵袭和迁移能力明显增强,而 Snail、Slug、Twist、ZEB1、ZEB2 等转录因子介导了 EMT 过程的发生发展^[5,6],因此,EMT 是侵袭转移的重要过程,抑制 EMT 的核心调控通路可能显著改善肿瘤患者的预后。

微小 RNA(miRNA)是一类大约由 22 个核苷酸组成的非编码 RNA(ncRNA)分子,在转录后水平通过诱导靶点基因的 mRNA 降解或通过与其 3' 非翻译区(3' untranslated region, 3'UTR)的不完全结合调节靶基因的表达^[7]。已有研究表明在人类多种疾病中存在 miRNA 的异常表达,可参与调控细胞信号传导通路并对疾病产生影响。最近研究表明,miRNAs 可作为癌基因或抑癌基因参与调控上皮细胞间质

* 基金项目:湖北省卫生计生委科研项目(WJ2016MB007)

作者简介:章萧(1982-),女,本科,主治医师,主要研究方向:胃癌的基础与临床研究,E-mail: zhangxiaois@163.com

[△] 通讯作者:艾芬(1974-),女,硕士,主任医师,主要研究方向:胃癌的基础与临床研究,E-mail: aifenwch88@126.com

(收稿日期:2019-05-08 接受日期:2019-05-30)

转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程而影响肿瘤的侵袭转移。因此,研究 miRNA 参与调控 EMT 过程可能是预防肿瘤侵袭转移的重要策略^[6,7]。miRNAs 在胃癌中的作用已被广泛研究^[8],但是关于 miRNAs 参与调控 EMT 在胃癌中的研究却鲜有报道^[9]。

本研究旨在探讨 miR-30e 对胃癌细胞迁移和侵袭能力的影响,进一步探索 miR-30e 在影响胃癌侵袭转移中的潜在作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

胃癌细胞系 BGC823 由本室保存;DMEM 培养基和胎牛血清(FBS)为 Thermo Fisher Scientific 公司产品;miR-30e 及模拟物由上海康成生物合成;转染试剂脂质体 Lipofectamin 2000 购自 Invitrogen 公司;Transwell 购自 Gostar 公司;RNA 提取试剂盒为 iScript[®] cDNA Synthesis Kit, 购自 Bio-Rad 公司的;Matrigel 购自美国 BD 生物公司;Diff-Quik[®] 购自 Sysmes 公司。转化生长因子- β (Transforming growth factor- β , TGF- β)是重要的 EMT 诱导剂^[12],因此,拟采用 10 ng/mL TGF- β 干预胃癌 BGC823 细胞系 72 小时,建立模拟 EMT 状态的细胞模型。TGF β 购自美国 Milipore 公司(Billerica, MA, USA)。

1.2 实时荧光定量 PCR

提取转染后 72 h 细胞总 RNA,并逆转录为 cDNA,以 RNU6B 为内参,检测仪器为 Applied Biosystems[®] 7300 Real Time PCR System。采用 SYBR 法检测,PCR 扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 60 s,95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。以下为 PCR 引物:

E-cadherin: 5' -TGCACCAACCCTCATGAGTG-3' ,

5'-GTCAGTATCAGCCGCTTTCAG-3' ;

Snail: 5' -TTCTCACT GCCATGGAATTCC-3',

5'-GCAGAGGACACAGAACCAGAA A-3' ;

N-cadherin: 5' -TCGCCATCCAGACCGACCCA-3',

5' -TGAGGCGGGTGCTGAATTCCC-3' ;

Vimentin: 5' -CCTGAACCTGAGGGAACTAA-3' ,

5' -GCAGAAAGGCACTTGAAAGC-3' ;

RNU6B: 5' -CTCGCTTCGGCAG CACA-3' ,

5' -AACGCTTCACGAATTTGCGT-3' 。

Real-time 分析采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法。故 $\Delta\Delta CT$ = 样品的 [(miR-30e)CT-RNU6B]- 空白对照组[(miR-30e)CT-RNU6B]。

1.3 细胞侵袭和迁移实验

细胞侵袭实验:使用 24 孔的 Transwell 进行相关研究。实验前用预稀释的 Matrigel (5 μ g/ μ L) 进行处理。细胞以每孔 100 μ L, 5×10^4 个细胞的密度接种于孔板中。其中上层室无血清培养基,下层培养基含有 600 μ L 的 10%FBS 培养基。孵育 24 小时后,用棉签除去留在上层的细胞。对通过 Matrigel 侵入底部的细胞进行固定并使用 Diff-Quik[®] 染色。在高倍镜下观察迁移的细胞数量并进行计数。

细胞迁移研究:将细胞按照 4×10^5 个细胞 / 孔的密度接种到 6 孔平板中以生长并达到 90% 聚集程度。用无菌枪头直接划出划痕,除去漂浮细胞后继续培养。12 h 后立即拍摄划痕

处的图片并通过测量细胞的覆盖率评估细胞迁移情况。

1.4 miRNA mimic 的转染

用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养胃癌细胞,培养条件为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度,取对数生长期细胞进行后续实验。实验分为两组:参照组(转染 miR-NC)和 miR-30e mimic 组(转染 miR-30e) (12.5 nM),根据 lipofectamine 2000 说明书进行转染。72 h 后收集细胞进行下一步实验。

1.5 蛋白质免疫印迹

将培养的细胞经胰酶消化后用磷酸缓冲液吹打并收集细胞至离心管中,加入蛋白裂解液裂解后取上清进行定量。将定量后的样本变性后上样于 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳,结束后将条带转至 NC 膜上。转膜结束后将条带封闭于 5% 的 BSA(Sigma, 美国)中 1 h,然后加入一抗于 4 $^{\circ}$ C 震荡过夜:兔多克隆抗体 E-cadherin (1:1000, Cell Signaling Technology, 美国),羊多克隆抗体 Snail(1:1000, Abcam, 英国),兔多克隆抗体 N-cadherin(1:1000, Cell Signaling Technology, 美国),兔多克隆抗体 Vimentin(1:1000, Cell Signaling Technology, 美国),鼠单克隆抗体 β -actin(1:5000, Santa Cruz Biotechnology, 美国)。一抗孵育结束后用 TBST 洗膜 3 次,再用连接有辣根过氧化物酶的抗体:抗鼠(1:20000, GE Healthcare, 英国),抗兔(1:10000, Life Technologies, 美国)孵育 2 h。孵育结束后用 ChemiDoc XRS 成像系统(Bio-Rad Laboratories)显影,以同一张膜上的 β -actin 为内参计算目的蛋白的相对表达量。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 实验结果

2.1 TGF- β 对胃癌细胞中 EMT 相关分子表达的影响

用 10 ng/mL 的 TGF- β 孵育 BGC823 细胞 72 h,建立 EMT 状态的细胞模型,检测 TGF- β 诱导组和对照组(无 TGF- β 诱导的 BGC823 细胞)中 EMT 相关的分子标记物。结果显示:上皮细胞标记物 E-cadherin 表达降低,而诱导转录因子 Snail 和间质细胞标记物 Vimentin 和 N-cadherin 的表达增加(见图 1)。

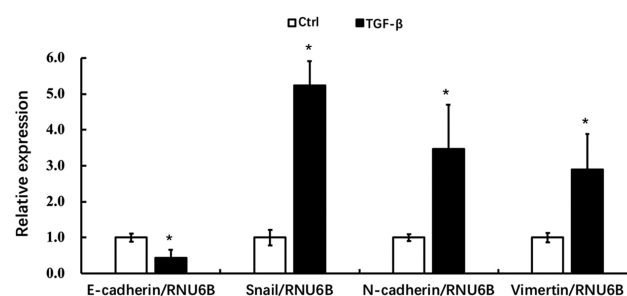


图 1 TGF- β 对胃癌细胞中 EMT 相关分子表达的影响

Fig.1 Effect of TGF- β on expression of EMT related molecules in gastric cancer cells

2.2 过表达 miR-30e 对 EMT 相关分子表达的影响

本课题组通过 TargetScan 数据库预测,经过大量筛选后发现 miR-30e 是以转录因子 Snail 信使 RNA (mRNA) 的 3'UTR 作为靶点。在经 TGF- β 孵育 72 h 的细胞系中转染 miR-30e 的

模拟物(mimic)。结果显示:在胃癌 BGC823 细胞系中过表达 miR-30 明显增加 E-cadherin 的表达,降低了 Snail、N-cadherin 和 Vimentin 的表达(图 2A);蛋白质免疫印迹结果表明 E-cadherin、Snail 蛋白、N-cadherin 和 Vimentin 的表达情况与图 2A

结果一致,即转染模拟物后 Snail 蛋白、N-cadherin 和 Vimentin 的表达水平降低,而 E-cadherin 表达水平增加(图 2B)。

为了探讨 miR-30e 在 TGF- β 所诱导 EMT 过程中的作用,采用 TGF- β 孵育 BGC823 细胞 72 h,建立 EMT 状态下的细胞

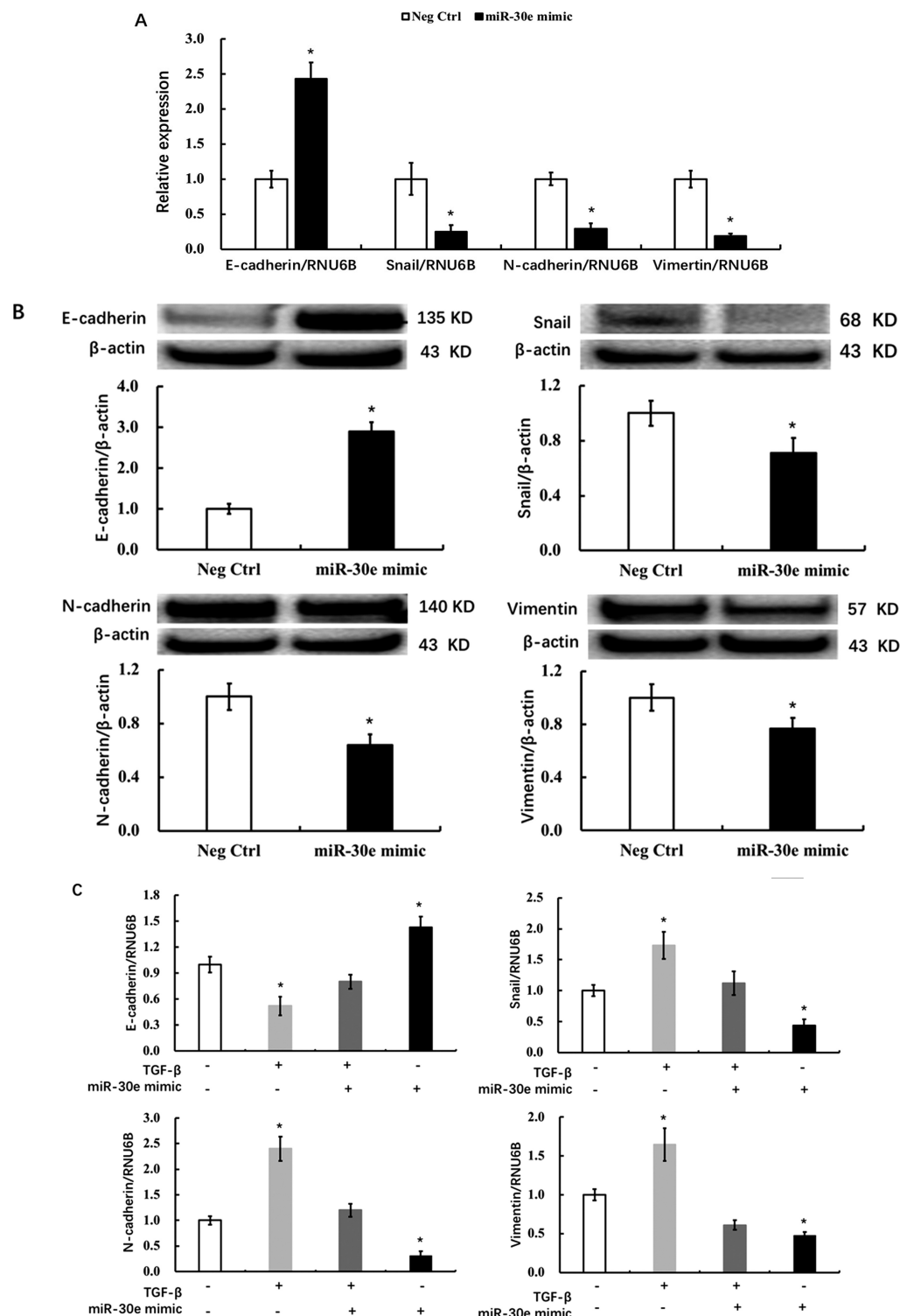


图 2 过表达 miR-30e 对 EMT 相关分子表达的影响

Fig. 2 Effect of miR-30e over expression on expression of EMT related molecules

注:(A) 转染 miR-30e 模拟物后 E-cadherin, Snail, N-cadherin 和 Vimentin 的 mRNA 表达情况;(B) 转染 miR-30e 模拟物后 E-cadherin, Snail, N-cadherin 和 Vimentin 的蛋白表达情况;(C) TGF- β 诱导和转染 miR-30e 模拟物后对 E-cadherin, Snail, N-cadherin 和 Vimentin 表达的影响。

Note: (A). mRNA relative expression of E-cadherin, Snail, N-cadherin, and Vimentin after transfection mimics; (B). Protein expression levels of E-cadherin, snail, N-cadherin, and Vimentin after transfection mimics; (C). Effects of TGF- β -induced and transfected mimics of miR-30e on the expression of E-cadherin, snail, N-cadherin, and Vimentin.

模型(分组为 TGF- β (+)和 TGF- β (-))。之后,在 EMT 细胞模型中转染 miR-30e 的模拟物 (mimic)(分组为:在 TGF- β (+)和 TGF- β (-)组中分别加入 miR-30e 的模拟物及对照)。结果显示 miR-30e 模拟物 (-)和 TGF- β (+)组 Snail、N-cadherin 和 Vimentin 的表达水平降低,而 E-cadherin 表达水平增加,而 miR-30e 模拟物 (+)和 TGF- β (-)组 Snail、N-cadherin 和 Vimentin 的表达水平增加,而 E-cadherin 表达水平降低,可见

miR-30e 诱导 TGF- β 后对 EMT 产生抑制效应(图 2 C)。

2.3 过表达 miR-30e 对胃癌细胞侵袭和迁移的影响

为了检测 miR-30e 对细胞迁移和侵袭能力的影响,采用脂质体转染的方法在胃癌细胞系 BGC823 细胞中过表达 miR-30e。然后用 Transwell 实验和细胞划痕实验检测 BGC823 细胞侵袭和迁移情况。结果发现过表达 miR-30e 降低了胃癌细胞的侵袭和迁移能力(见图 3)。

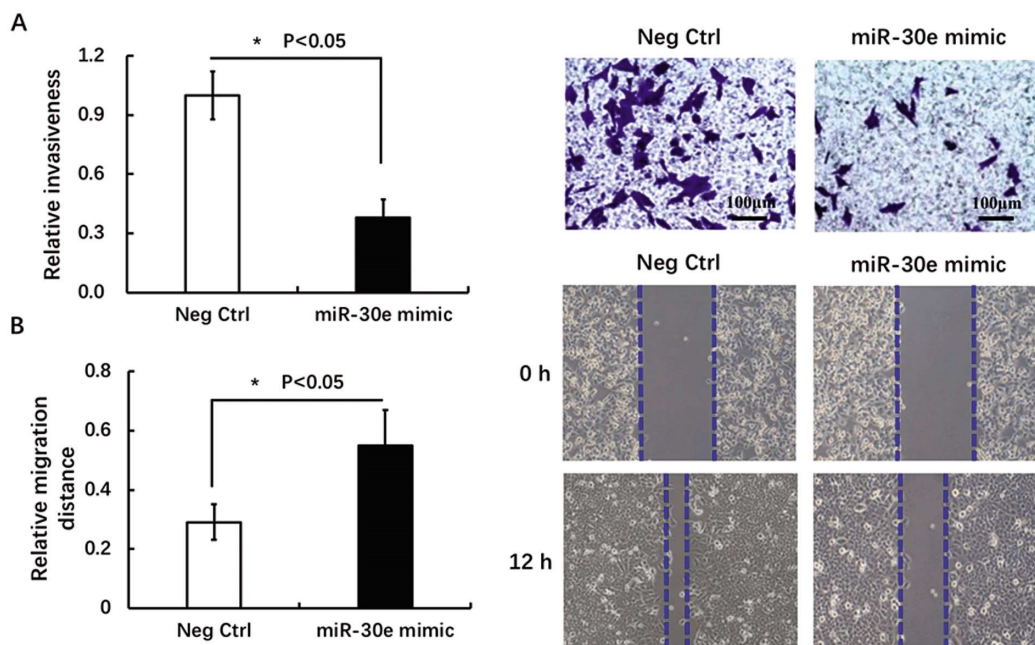


图 3 过表达 miR-30e 对胃癌细胞侵袭(A)和迁移(B)的影响

Fig.3 Effect of miR-30e overexpression on invasion (A) and migration (B) of gastric cancer cells

3 讨论

EMT 是指具有极性的上皮细胞转化成为具有活动能力的间质细胞并获得侵袭和迁移能力的生物学过程,存在于人体许多生理和病理过程中。EMT 是肿瘤细胞侵袭和转移的关键过程,肿瘤细胞包括胃癌细胞,发生 EMT 后侵袭和迁移能力显著增强^[9],其特征为上皮标记物如 E-cadherin 的减少和间充质标记物如 N-cadherin 和 Vimentin 表达增加^[11]。转录因子如 Snail, Slug, Twist, ZEB1 和 ZEB2 等均参与调控肿瘤细胞的 EMT 过程^[12-15]。在多个肿瘤中转录因子 Snail 的表达与 E-cadherin 的表达呈负相关,因此 Snail 可通过增加 E-cadherin 的表达而抑制 EMT 过程^[16]。

据报道,miR-30 家族在胰腺上皮细胞和肝细胞中通过 Snail 抑制 EMT^[17,18]。最近的研究提示 miR-30 家族在肿瘤中出现表达下调,这与 EMT 的密切相关并参与了几种类型癌症的发展和演变机制。在非小细胞癌中,miR-30a 抑制侵袭和转移是通过调控 EMT 实现的,而其重要的靶点就是 Snail^[19]。细胞外囊泡包裹的 miR-30e 通过抑制上皮间充质转换抑制胆管癌细胞的侵袭和迁移^[20]。miR-30e-5p 通过靶向泛素特异性肽酶 22(USP22)抑制鼻咽癌细胞的增殖和转移,表明 miR-30e-5p 可作为鼻咽癌潜在的治疗目标^[21]。此外,在治疗肾细胞癌和非小细胞肺癌的过程中,miR-30c 靶向作用于 Slug 或 Snail 而抑制

EMT^[22,23]。MiR-30a、miR-30c 和 miR-30d 诱导转化生长因子- β (Transforming growth factor- β , TGF- β) 而抑制卵巢癌的 EMT 过程^[24,25]。

大量的研究表明,TGF- β 也参与调控 EMT 过程^[15],整合子复合物 8 通过上调 TGF- β 信号通路,加速肝细胞癌的 EMT^[26]。本研究中,我们发现 TGF- β 可使胃癌细胞上皮细胞标记物 E-cadherin 表达降低,而诱导转录因子 Snail 和间质细胞标记物 Vimentin 和 N-cadherin 的表达增加。我们通过生物信息学预测(TargetScan)发现 miR-30e 以 Snail mRNA 的 3'UTR 作为靶点。进一步的研究结果显示 miR-30e 模拟物(-)和 TGF- β (+)组 Snail、N-cadherin 和 Vimentin 表达水平降低,而 E-cadherin 表达水平增加,而 miR-30e 模拟物(+)和 TGF- β (-)组 Snail、N-cadherin 和 Vimentin 表达水平增加,而 E-cadherin 表达水平降低,可见 miR-30e 诱导 TGF- β 后对 EMT 产生抑制效应。最后我们还发现过表达的 miR-30e 降低了胃癌细胞的侵袭和迁移能力。这些数据表明 miR-30e 对胃癌细胞的分子信号和肿瘤发展具有一定的作用。我们的研究结果与 Ye 和 Han 等的结论相似^[24,25]。

总之,我们的研究发现 EMT 通路可能是 miR-30e 的下游靶点,miR-30e 通过 TGF- β 诱导 Snail 高表达而抑制 EMT 过程,进而抑制胃癌细胞的侵袭和迁移能力。因此,我们的研究可能为肿瘤的防治提供新的策略和理论依据。

参 考 文 献(References)

- [1] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. *Ca Cancer J Clin*, 2014, 64(1): 9-29
- [2] Markar SR, Wiggins T, Ni M, et al. Assessment of the quality of surgery within randomized controlled trials for the treatment of gastro-oesophageal cancer: a systematic review [J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(1): e23-e31
- [3] Cheng J, Fan XM. Role of cyclooxygenase-2 in gastric cancer development and progression[J]. *World J Gastroentero*, 2013, 19(42): 7361-7368
- [4] Wadhwa R, Song S, Lee JS, et al. Gastric cancer: molecular and clinical dimensions[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10(11): 643-655
- [5] Friedman RC, Farh KK, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs [J]. *Genome Res*, 2008, 19(1): 92-105
- [6] Baranwal S, Alahari SK. miRNA control of tumor cell invasion and metastasis[J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(6): 1283-1290
- [7] Visone R, Croce CM. MiRNAs and cancer[J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(4): 1131-1138
- [8] Takahashi K, Yan I, Wen HJ, et al. MicroRNAs in liver disease: from diagnostics to therapeutics [J]. *Clin Biochem*, 2013, 46(10-11): 946-952
- [9] Haga H, Yan I, Takahashi K, et al. Emerging insights into the role of microRNAs in the pathogenesis of cholangiocarcinoma [J]. *Gene Expression*, 2014, 16(2): 93-99
- [10] Thiery J P, Sleeman J P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(2): 131-142
- [11] Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition[J]. *Cell Re*, 2009, 19(2): 156
- [12] Battle E, Sancho E, Francé C, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(2): 84-89
- [13] Cano A, Pérezmoreno MA, Rodrigo I, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression[J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(2): 76-83
- [14] Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis [J]. *Cell*, 2004, 117(7): 927-939
- [15] Comijn J, Berx G, Vermassen P, et al. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion[J]. *Mol Cell*, 2001, 7(6): 1267-1278
- [16] Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(6): 415-428
- [17] Zhang J, Zhang H, Liu J, et al. miR-30 inhibits TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocyte by targeting Snail [J]. *Biochem Bioph Res Commun*, 2012, 417(3): 1100-1105
- [18] Joglekar MV, Patil D, Joglekar VM, et al. The miR-30 family microRNAs confer epithelial phenotype to human pancreatic cells[J]. *Islets*, 2009, 1(2): 137-147
- [19] Kumarswamy R, Mudduluru G, Ceppi P, et al. MicroRNA 30a inhibits epithelial to mesenchymal transition by targeting Snail and is downregulated in non small cell lung cancer [J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(9): 2044-2053
- [20] Ota Y, Takahashi K, Otake S, et al. Extracellular vesicle-encapsulated miR-30e suppresses cholangiocarcinoma cell invasion and migration via inhibiting epithelial-mesenchymal transition[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(23): 16400-16417
- [21] Ma YX, Zhang H, Li XH, et al. MiR-30e-5p inhibits proliferation and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells by target-ing USP22[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(19): 6342-6349
- [22] Huang J, Yao X, Zhang J, et al. Hypoxia induced downregulation of miR 30c promotes epithelial mesenchymal transition in human renal cell carcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2013, 104(12): 1609-1617
- [23] Zhong Z, Xia Y, Wang P, et al. Low expression of microRNA-30c promotes invasion by inducing epithelial mesenchymal transition in non-small cell lung cancer[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(5): 2575-2579
- [24] Ye Z, Zhao L, Li J, et al. MiR-30d blocked transforming growth factor β 1-induced epithelial-mesenchymal transition by targeting snail in ovarian cancer cells [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2015, 25(9): 1574
- [25] Han X, Zhen S, Ye Z, et al. A feedback loop between miR-30a/c-5p and DNMT1 mediates cisplatin resistance in ovarian cancer cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(3): 973-986
- [26] Tong H, Liu X, Li T, et al. INTS8 accelerates the epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma by upregulating the TGF- β signaling pathway [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 1869-1879