

· 论 著 ·

miRNA-21 在胆囊癌中的表达情况及对胆囊癌细胞增殖活性的影响

闵捷 沈彬彬 周瑜 李皇保 周俊

[摘要] 目的 研究 miRNA-21 在胆囊癌细胞的表达情况和下调 miRNA-21 对胆囊癌细胞增殖活性的影响。方法 收集 50 例胆囊癌患者的肿瘤组织和癌旁正常组织,利用荧光定量 PCR (q-PCR) 检测胆囊癌组织和正常癌旁组织中 miRNA-21 的表达水平,再以人胆囊癌细胞株为研究对象,转染 miRNA-21 inhibitor 下调 miRNA-21 表达水平,标记为 miR-21 下调组、空白对照组、阴性对照组,使用 MTT 法检测转染后细胞增殖活力,流式细胞术检测细胞周期,细胞划痕检测细胞迁移能力,蛋白质印迹法 (Western blot) 法检测 10 号染色体缺失的磷酸酶基因 (PTEN)、人凋亡相关因子配体 (FasL 蛋白) 的表达情况,q-PCR 技术检测 PTEN mRNA、FasL mRNA 的表达水平。结果 胆囊癌患者肿瘤组织中 miRNA-21 表达水平高于癌旁正常组织,差异有统计学意义 ($t=16.34, P<0.05$)。miR-21 下调组 miRNA-21 表达量低于空白对照组和阴性对照组,差异均有统计学意义 (t 分别=4.86、4.59, P 均 <0.05); MTT 法检测结果显示,接种后 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h, miR-21 下调组细胞的光密度值明显低于空白对照组和阴性对照组,差异均有统计学意义 (t 分别=4.35、4.55、6.16、7.46、7.90、4.62、4.56、6.19、7.48、7.80, P 均 <0.05); miR-21 下调组停留在 G0/G1 期的细胞多于空白对照组和阴性对照组 (t 分别=12.37、13.25, P 均 <0.05), 而 S 期和 G2 期细胞少于空白对照组和阴性对照组 (t 分别=7.06、8.40、5.71、6.02, P 均 <0.05); 细胞划痕实验结果显示 miR-21 下调组的胆囊癌细胞划痕愈合率明显低于空白对照组和阴性对照组,差异均有统计学意义 (t 分别=5.77、5.98, P 均 <0.05); Western-blot 结果显示 miR-21 下调组细胞中 PTEN 蛋白和 FasL 蛋白表达量高于空白对照组和阴性对照组,差异均有统计学意义 (t 分别=19.68、19.60、27.45、26.67, P 均 <0.05)。q-PCR 结果表明 miR-21 下调组细胞中 PTEN mRNA 和 FasL mRNA 表达水平高于空白对照组和阴性对照组,差异均有统计学意义 (t 分别=16.19、16.12、16.09、17.51, P 均 <0.05)。结论 miRNA-21 在胆囊癌组织中的上调表达可能是影响胆囊癌细胞增殖和迁移活性的机制之一。

[关键词] miRNA-21; 胆囊癌; 增殖活性; 人 10 号染色体缺失的磷酸酶基因; 人凋亡相关因子配体

Expression of miRNA-21 in gallbladder carcinoma and its effect on the proliferation of gallbladder carcinoma cells

MIN Jie, SHEN Binbin, ZHOU Yu, et al. Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, The First Affiliated Hospital of Jiaxing University, Jiaxing 314000, China.

[Abstract] **Objective** To explore the expression of miRNA-21 in gallbladder cancer cells and the effect of down-regulation of miRNA-21 on the proliferation of gallbladder cancer cells. **Methods** The tumor tissues and adjacent normal tissues of 50 cases with gallbladder cancer were collected. Fluorescence quantitative PCR (q-PCR) was used to detect the expression level of miRNA-21 in gallbladder cancer tissues and normal adjacent tissues. The GBC-SD was transfected with miRNA-21 inhibitor to down-regulated the expression level of miRNA-21, and then labeled as miR-21 down-regulation group, blank control group, negative control group. MTT method was used to detect cell proliferation viability after transfection, flow cytometry detection was used to detect cell cycle, cell scratches was used to detect cell migration ability, Western-blot method was used to detect the expression of phosphatase gene (PTEN) deleted on chromosome 10

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2021.004.005

基金项目:嘉兴市科技计划项目(2019AD32196)

作者单位:314000 浙江嘉兴,嘉兴市第一医院、嘉兴学院附属第一医院肝胆胰外科

and human apoptosis-related factor ligand (FasL protein), q-PCR technology was used to detect the expression levels of PTEN and FasL mRNA.

Results The expression level of miRNA-21 in

tumor tissues of patients with gallbladder cancer was higher than that in normal tissues adjacent to the cancer ($t=16.34, P<0.05$). The expression level of miRNA-21 in the miR-21 down-regulated group was lower than that of the blank control group and the negative control group ($t=4.86, 4.59, P<0.05$). The optical density value of the cells in the miR-21 down-regulating group was significantly lower than that of the blank control group and the negative control group at 24h, 48h, 72h, 96h, 120h ($t=4.35, 4.55, 6.16, 7.46, 7.90, 4.62, 4.56, 6.19, 7.48, 7.80, P<0.05$). The number of cells in the G0/G1 phase of the miR-21 down-regulating group was more than that of the blank control group and the negative control group ($t=12.37, 13.25, P<0.05$), while the number of cells in the S phase and G2 phase was less than that of the blank control group and the negative control group ($t=7.06, 8.40, 5.71, 6.02, P<0.05$). The scratch healing rate of gallbladder cancer cells in the miR-21 down-regulating group was significantly lower than that of the blank control group and the negative control group ($t=5.77, 5.98, P<0.05$). The expressions of PTEN protein and FasL protein in the cells of the miR-21 down-regulating group were higher than those of the blank control group and the negative control group ($t=19.68, 19.60, 27.45, 26.67, P<0.05$). The expressions of PTEN mRNA and FasL mRNA in the cells of the miR-21 down-regulating group were higher than those of the blank control group and the negative control group ($t=16.19, 16.12, 16.09, 17.51, P<0.05$). **Conclusion** The up-regulated expression of miRNA-21 in gallbladder cancer tissue may be one of the mechanisms affecting the proliferation and migration of gallbladder cancer cells.

[Key words] miRNA-21; gallbladder cancer; proliferative activity; PTEN; FasL

胆囊癌是一种常见的消化道恶性肿瘤,其恶性程度高,预后差,5年生存率不到5%,患者平均生存时间小于6个月^[1,2]。手术治疗是目前胆囊癌的主要治疗手段^[3]。但胆囊癌一经诊断常为中晚期,患者已丧失最佳手术机会,常导致患者预后不良^[4]。研究表明 miRNA 可作为促癌或抑癌因子参与肿瘤的发生、发展和耐药性的产生^[5,6]。miRNA-21 作为一种促癌基因在多种消化道恶性肿瘤中高表达^[7-9],但其在胆囊癌中的作用尚不明确。本次研究通过下调胆囊癌细胞 miRNA-21 表达水平,研究 miRNA-21 与胆囊癌细胞增殖活力的影响。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2017年3月至2019年3月期间嘉兴市第一医院肝胆胰外科收治的50例胆囊癌患者的肿瘤组织和癌旁正常组织。

1.2 miRNA-21 水平检测 采用 Western blot 法检测肿瘤组织和癌旁正常组织中 miRNA-21 水平。

1.3 细胞转染及 PCR 检测转染结果 利用脂质体 Lipofectamine™2000 将 miRNA-21 inhibitor 转染进入胆囊癌细胞株细胞中,标记为 miR-21 下调组;仅转染脂质体 Lipofectamine™2000 的一组设置为空白对照组;转染无意义序列 miRNA 的一组为阴性对照组。转染结束 24 h 之后利用实时荧光定量 PCR 检测各组 miRNA-21 的表达水平,选择 10 个孔进行计算。

1.4 使用 MTT 法检测不同组细胞增殖活力 将细

胞消化计数,按每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔板中,每孔加入 200 ml 培养基。于接种后的 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h 在每组细胞中加入 20 μ l MTT 溶液孵育 4 h,然后每孔加入 150 μ l 二甲基亚砷溶液混匀使沉淀溶解,用酶标仪检测 490 nm 处细胞的光密度值反映细胞增殖活力,记录结果,绘制细胞生长曲线。

1.5 使用流式细胞术检测细胞周期 转染 24 h 后将细胞消化离心,收集三组细胞,每组设定 10 复孔,分别放置于 15 ml 离心管中,每管加入 1.5 ml 预冷的磷酸缓冲盐溶液和 3.5 ml 无水乙醇涡旋充分混合,4 $^{\circ}$ C 固定 3 h,1 000 r/min 离心 5 min 洗涤细胞。每管加入 10 μ l PI 染液避光孵育 30 min,磷酸缓冲盐溶液洗涤细胞,使用 beckman Cyto FLEX 流式细胞仪检测细胞周期。

1.6 细胞划痕实验检测不同组细胞迁移能力 消化并收集各组细胞,按每孔 5×10^5 个细胞接种于 6 孔板中培养过夜。次日用无菌白色枪头在孔中央轻轻笔直划痕,随后用磷酸缓冲盐溶液清洗脱落细胞,显微镜下拍照,加入无血清 DMEM 培养基继续培养,于 12 h、24 h 观察拍照,计算愈合率,评估细胞迁移能力。

1.7 Western blot 法和实时荧光定量 PCR 技术检测各组细胞中人 10 号染色体缺失的磷酸酶基因 (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10, PTEN) 和人凋亡相关因子配体 (factor related apoptosis ligand, FasL) 的表达情况 收集转

染24 h后的各组细胞,每组设定10复孔,分别经磷酸缓冲盐溶液清洗后加入RIPA细胞裂解液于4℃低温旋转摇床充分裂解30 min,高速离心后收集蛋白,用BCA试剂盒测定蛋白量。在SDS-PAGE胶中每孔加入20 μg总蛋白进行电泳,根据maker判定蛋白位置。然后进行转膜,将蛋白转入PVDF膜上,5% BSA溶液封闭1 h,将膜与PTEN、FasL和β-actin一抗(1:1000配置)在4℃下孵育过夜。将膜用TBST溶液清洗3×10 min后与山羊抗兔二抗(1:4000配置)室温下孵育2 h, TBST溶液清洗3×10 min后使用显影液进行显影,使用Graphpad 6.0对蛋白表达量进行分析。实验重复进行3次。

Trizol法提取不同组细胞总RNA,使用Nanodrop 2000检测样品吸光度(A_{260}/A_{280}),按照试剂盒说明书进行逆转录和PCR扩增。PTEN上游引物:5'-GCGTACCATGACAGCC-ATCATCAAAGAG-3',下游引物:5'-CGAAGTTTCAGACTTTGTAATTTGTGT-3'; FasL上游引物:5'-ATACAGCTGTGGC-TACCGGT-3',下游引物:5'-CTCCAGATCAAAGCAGTTCC-3'; GAPDH上游引物:5'-TGTGGGCATCAATGGATTTGG-3',下游引物:5'-ACACCATGTATTCCGGGTCAAT-3'。反应条件为92℃预变性5 min,92℃ 60 s,54℃ 30 s,72℃ 30 s,反应32个循环,4℃保存。反应结束后计算Ct值,绘制标准曲线,相对表达使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行测定。

1.8 统计学方法 采用SPSS 21.0统计学软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。计量资料比较采用F检验和t检验;计数资料比较采用 χ^2 检验。设 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胆囊癌患者肿瘤组织与癌旁正常组织中miRNA-21水平进行比较 50例胆囊癌患者肿瘤组织中miRNA-21表达水平(5.92 ± 1.33)高于癌旁正常组织(2.51 ± 0.64),差异有统计学意义($t=16.34, P<0.05$)。

2.2 转染后胆囊癌细胞miRNA-21水平变化 空白对照组miR-21表达量为(0.99 ± 0.09),阴性对照组miR-21表达量为(0.97 ± 0.08),而miR-21下调组miR-21表达量为(0.21 ± 0.07),miR-21 inhibitor转染进入胆囊癌细胞株细胞后,细胞miR-21表达量明显下降,与空白对照组和阴性对照组比较,差异均有统计学意义(t 分别=4.86、4.59, P 均 <0.05)。

2.3 MTT法检测不同组细胞增殖活力见图1

由图1可见,在接种后24 h、48 h、72 h、96 h、120 h,miR-21下调组细胞的光密度值明显低于空白对照组和阴性对照组,差异均有统计学意义(t 分别=4.35、4.55、6.16、7.46、7.90、4.62、4.56、6.19、7.48、7.80, P 均 <0.05)。

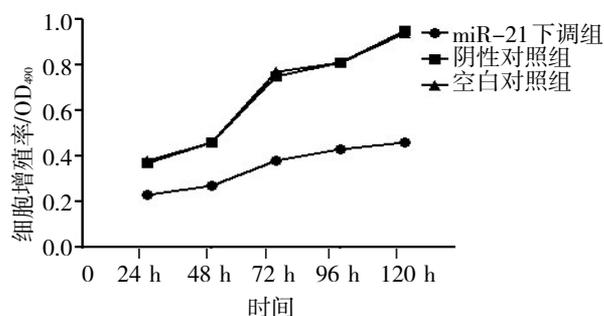


图1 MTT法检测不同组细胞增殖活力

2.4 流式细胞术检测不同组细胞周期见表1

表1 流式细胞术检测不同组细胞周期

组别	G0/G1期	S期	G2期
miR-21 下调组	76.21 ± 4.62*#	14.53 ± 3.52*#	13.37 ± 3.87*#
阴性对照组	54.33 ± 3.15	26.63 ± 4.12	22.78 ± 3.49
空白对照组	53.17 ± 2.98	27.42 ± 3.34	23.44 ± 3.61

注:*:与空白对照组比较, $P<0.05$;#:与阴性对照组比较, $P<0.05$ 。

由表1可见,三组不同细胞周期的细胞比较,差异均有统计学意义(F 分别=125.90、38.645、23.69, P 均 <0.05),miR-21下调组停留在G0/G1期的细胞明显多于空白对照组和阴性对照组,差异均有统计学意义(t 分别=12.37、13.25, P 均 <0.05),而S期和G2期细胞少于空白对照组和阴性对照组,差异均有统计学意义(t 分别=7.06、8.40、5.71、6.02, P 均 <0.05)。

2.5 miRNA-21表达水平对胆囊癌细胞迁移能力的影响见图2

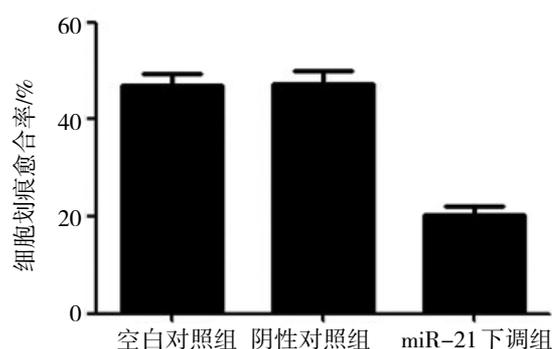


图2 细胞划痕实验检测不同组细胞迁移能力

由图2可见,细胞划痕实验结果显示,miR-21下调组的胆囊癌细胞划痕愈合率明显低于空白对照组和阴性对照组,差异均有统计学意义(t 分别=5.77、5.98, P 均 <0.05)。

2.6 不同组细胞中PTEN、FasL蛋白表达情况见表2

表2 不同组细胞中PTEN蛋白和FasL蛋白表达情况

组别	PTEN蛋白	FasL蛋白
miR-21 下调组	1068.44 ± 67.56*#	979.18 ± 50.18*#
阴性对照组	582.31 ± 39.25	431.31 ± 38.27
空白对照组	569.25 ± 43.54	452.60 ± 37.15

注:*,与空白对照组比较, $P<0.05$;#:与阴性对照组比较, $P<0.05$ 。

由表2可见,三组的细胞中PTEN蛋白和FasL蛋白表达量比较,差异均有统计学意义(F 分别=303.53、538.81, P 均 <0.05)。miR-21下调组细胞中PTEN蛋白和FasL蛋白表达量均高于空白对照组和阴性对照组,差异均有统计学意义(t 分别=19.68、19.60、27.45、26.67, P 均 <0.05)。

2.7 不同组细胞中PTEN、FasL mRNA表达水平见表3

表3 不同组细胞中PTEN mRNA和FasL mRNA表达水平

组别	PTEN mRNA	FasL mRNA
miR-21 下调组	2.58 ± 0.31*	2.44 ± 0.26*
阴性对照组	0.98 ± 0.04	1.04 ± 0.09
空白对照组	1	1

注:*,与空白对照组比较, $P<0.05$;#:与阴性对照组比较, $P<0.05$ 。

由表3可见,不同组细胞中PTEN mRNA和FasL mRNA表达水平,差异均有统计学意义(F 分别=258.79、266.53, P 均 <0.05)。miR-21下调组细胞中PTEN mRNA和FasL mRNA表达水平均高于空白对照组和阴性对照组,差异均有统计学意义(t 分别=16.19、16.12、16.09、17.51, P 均 <0.05)。

3 讨论

胆石症、胆囊息肉是胆囊癌的危险因素,直径 >3 cm的胆结石和直径 >1 cm的胆囊息肉被认为更容易诱发胆囊癌。手术治疗是目前胆囊癌的主要治疗手段,但晚期胆囊癌治疗效果不佳,且易复发和转移。

miRNA是一种长度在17~25个核苷酸的非编码小RNA,研究表明miRNA在细胞中参与生命活动

的调控,在胚胎时期miRNA-21参与体内多种脏器的发育过程,肺脏、肾脏和多种外分泌腺体的发育依赖miRNA-21的参与^[10]。在肿瘤的发生发展过程中miRNA也起重要作用,一些miRNA的表达水平与疾病的发生及预后密切相关。miRNA-21已被证实是一种致癌基因,在多种肿瘤中过表达,且多与疾病的预后不良相关,一些动物实验中下调小鼠体内的miRNA-21水平能够使肿瘤细胞快速凋亡,肿瘤迅速消失^[11]。在肾透明细胞癌、肺腺癌、前列腺癌和多种消化道恶性肿瘤中miRNA-21高表达患者预后常较差,而miRNA-21低表达患者预后较好^[12]。

PTEN基因于1997年被发现,后被证实是一种抑癌基因,PTEN能够诱导细胞凋亡,防止细胞过度增殖,在多种恶性肿瘤的检测中均发现PTEN基因缺失。近年来有研究表明肿瘤细胞中miRNA-21的表达能够抑制PTEN的表达,促进肿瘤的增殖和转移^[13]。PTEN的下游效应蛋白为蛋白激酶B,在调节细胞生长、发育、控制器官大小等多种细胞活动中发挥作用,蛋白激酶B能够使促凋亡因子caspase-3和caspase-9失活,抑制细胞凋亡^[14]。FasL是TNF超家族成员之一,通过自身受体Fas诱导细胞凋亡而维持免疫稳态,FasL/Fas介导的细胞凋亡在细胞死亡、终止免疫应答、T细胞和NK细胞的细胞毒作用等方面发挥重要作用^[15]。在多种恶性肿瘤中FasL表达缺陷,使其下游蛋白失活,有助于肿瘤的增殖和扩散^[16],但对细胞中FasL的表达水平与miRNA-21水平的关系研究较少。

本次研究发现胆囊癌肿瘤组织中miRNA-21表达水平高于癌旁正常组织($P<0.05$),说明胆囊癌肿瘤细胞中miRNA-21呈高表达状态。转染miRNA-21 inhibitor后miR-21下调组细胞中miRNA-21水平明显低于空白对照组和阴性对照组(P 均 <0.05)。MTT法检测细胞活力结果为miR-21下调组细胞增殖活力明显低于空白对照组和阴性对照组(P 均 <0.05),说明下调miRNA-21水平能够抑制细胞增殖活力。流式细胞术结果显示下调miRNA-21水平能够抑制细胞周期,使G0/G1期细胞增多($P<0.05$),S期和G2期细胞减少($P<0.05$)。细胞划痕实验结果显示下调miRNA-21水平可以明显抑制肿瘤细胞迁移能力($P<0.05$)。Western blot结果显示下调miRNA-21表达水平能够使PTEN、FasL蛋白表达增多,而实时荧光定量PCR结果结果显示下调

(下转第308页)

- ol,2019,4(5):766-773.
- 12 Vaahntuvuo J, Munukka E, Korkeamäki M, et al. Fecal microbiota in early rheumatoid arthritis[J]. *J Rheumatol*, 2008,35(8):1500-1505.
- 13 Liu X, Zou Q, Zeng B, et al. Analysis of fecal *Lactobacillus* community structure in patients with early rheumatoid arthritis[J]. *Curr Microbiol*, 2013,67(2):170-176.
- 14 Zhang X, Zhang D, Jia H, et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment[J]. *Nat Med*, 2015,21(8):895-905.

(收稿日期 2020-11-09)

(本文编辑 蔡华波)

(上接第304页)

miRNA-21 表达水平能够使 PTEN mRNA、FasL mRNA 表达水平升高,与文献报道一致^[17]。

综上所述,胆囊癌组织中 miRNA-21 明显高于正常癌旁组织,下调胆囊癌细胞中 miRNA-21 表达水平能够抑制细胞增殖活力、周期和迁移能力,使细胞内 PTEN 和 FasL 表达增高,具有作为胆囊癌治疗新靶点的潜力。

参考文献

- 1 焦辉,鲁艳,张志刚,等.胆囊结石合并胆囊癌 134 例临床分析[J]. *中国基层医药*, 2020,27(13):1555-1558.
- 2 Rappard DF, Bugiani M, Boelens JJ, et al. Gallbladder and the risk of polyps and carcinoma in metachromatic leukodystrophy[J]. *Neurology*, 2016,87(1):103-111.
- 3 Goetze TO. Gallbladder carcinoma: Prognostic factors and therapeutic options[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(43):12211-12217.
- 4 Matsumoto Y, Fujimoto K, Mitsuoka E, et al. Cholecystoduodenal fistula caused by aggressive mucinous gallbladder carcinoma with a porcelain gallbladder[J]. *Clin J Gastroenterol*, 2019,12(5):460-465.
- 5 Vishnoi A, Rani S. MiRNA Biogenesis and regulation of diseases: An overview[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1509(7):1-10.
- 6 Van RK, Calin GA. Cancer hallmarks and microRNAs: The therapeutic connection[J]. *Adv Cancer Res*, 2017, 135(1):119-149.
- 7 Ma S, Zhang A, Li X, et al. MiR-21-5p regulates extracellular matrix degradation and angiogenesis in TMJOA by targeting Spry1[J]. *Arthritis Res Ther*, 2020,22(1):99.
- 8 Wu Y, Song Y, Xiong Y, et al. MicroRNA-21 (Mir-21) promotes cell growth and invasion by repressing tumor suppressor PTEN in colorectal cancer[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017,43(3):945-958.
- 9 Orosz E, Kiss I, Gyöngyi Z, et al. Expression of Circulating miR-155, miR-21, miR-221, miR-30a, miR-34a and miR-29a: Comparison of colonic and rectal cancer[J]. *In Vivo*, 2018,32(6):1333-1337.
- 10 Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease[J]. *RNA Biol*, 2011,8(5):706-713.
- 11 Lu J, Tan T, Zhu L, et al. Hypomethylation causes MIR21 overexpression in tumors[J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2020,18(5):47-57.
- 12 黄体政,孙鹤,肖军. miR-21 在结肠癌细胞失巢凋亡调节中的作用及机制研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2020,45(5):645-649.
- 13 Chen CY, Chen J, He L, et al. PTEN: Tumor suppressor and metabolic regulator[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018,9(5):338.
- 14 Yan Y, Huang H. Interplay among PI3K/AKT, PTEN/FOXO and AR signaling in prostate cancer[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019,1210(3):319-331.
- 15 Lettau M, Paulsen M, Schmidt H, et al. Insights into the molecular regulation of FasL (CD178) biology[J]. *Eur J Cell Biol*, 2011,90(6):456-466.
- 16 Badillo AI, Badillo SC, Villalobos R, et al. Defective expression of FasL and Bax in human lung cancer[J]. *Clin Exp Med*, 2003,3(2):106-112.
- 17 张琳梅,陈诚,张耀超,等. PTENp1 作为 miR-21 吸附“海绵”在口腔鳞癌中调控 PTEN 的表达[J]. *西安交通大学学报:医学版*, 2020,41(5):713-717.

(收稿日期 2021-02-24)

(本文编辑 蔡华波)