

miR-449b 通过 E2F3-p53 途径抑制 子宫内膜腺癌细胞 HEC-1-B 的生长

陈慧君 黄亦波 林蓉蓉 郑飞云

摘要 目的 探讨 miR-449b 对子宫内膜腺癌细胞 HEC-1-B 增殖和凋亡的影响及其作用的分子途径。方法 脂质体 lipofectamine 2000 包被 miR-449b 并转染入 HEC-1-B 细胞,实时荧光定量 PCR 检测转染前后细胞内 miR-449b 的表达水平, CCK-8 试验检测转染前后细胞活性,流式细胞仪来检测转染前后细胞凋亡情况。细胞克隆形成实验观察转染前后细胞克隆形成能力。Western blot 方法检查转染前后细胞内 E2F3 蛋白和 p53 的表达情况。结果 转染后实验组 miR-449b 表达量较 NC 组增加,细胞增殖能力和克隆能力减弱,而细胞凋亡增加($P < 0.05$)。miR-449b 使 E2F3 表达下调,p53 表达上调($P < 0.05$)。结论 miR-449b 通过 E2F3-p53 途径抑制 HEC-1-B 细胞增殖并促进凋亡,可能作为治疗子宫内膜腺癌的新分子靶标。

关键词 miR-449b HEC-1-B 细胞 增殖 凋亡 E2F3 p53

中图分类号 R71;R73 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.08.013

MiR-449b Inhibits Growth of HEC-1-B Cells by Targeting E2F3 and p53 Proteins. Chen Huijun, Huang Yibo, Lin Rongrong, et al. Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To investigate the effect of miR-449b on cell proliferation and apoptosis in HEC-1-B cells and the mechanism of such effect. **Methods** We up-regulated expression of miR-449b in HEC-1-B cells by transfecting them with has-miR-449b. Transfection efficiency was determined by flow cytometry and q-PCR. We then determined the changes in cell proliferation, colony formation and cell apoptosis after transfection. In addition, western blot was applied to determine the target protein of miR-449b. **Results** Increased-expression of miR-449b significantly inhibits cell proliferation and colony formation and induces cell apoptosis in HEC-1-B cells. The expression of E2F3 protein was down-regulated and the expression of p53 protein was up-regulated. **Conclusion** MiR-449b inhibits the growth of HEC-1-B cells by targeting E2F3 and p53 proteins.

Key words miR-449b; HEC-1-B cell; Cell proliferation; Cell apoptosis; E2F3; p53

子宫内膜癌(endometrial cancer, EC)又称子宫体癌,是常见的女性生殖道恶性肿瘤之一,在全球占女性生殖道恶性肿瘤 20%~30%,发生率呈逐年上升趋势^[1]。有研究表明,微小 RNA(microRNA, miRNA)可作为癌基因或抑癌基因在肿瘤的发生、发展过程中发挥作用^[2]。本研究通过在子宫内膜腺癌 HEC-1-B 细胞中过表达 miR-449b,初步探讨其对子宫内膜腺癌 HEC-1-B 细胞的细胞增殖和凋亡的影响及其作用的分子途径。

材料与方法

1. 材料:胎牛血清、Opti-MEM、DMEM 培养液(Gibco 公司), lipofectamine 2000 转染试剂(Invitrogen 公司), hsa-

miR-449b mimics、miRNA mimics 阴性对照(上海吉玛公司), hsa-miR-449b 上游引物及 U6 上游引物(上海生工公司), SYBR GREEN(Toyobo 公司), CCK-8 试剂、凋亡试剂盒、结晶紫细胞染色液(碧云天生物技术研究), Trizol 试剂、miRNA 反转录及实时荧光定量 PCR 试剂盒(Invitrogen 公司), 兔抗 E2F3 抗体、鼠抗 p53 抗体(Abcam 公司), 鼠抗 β -actin 抗体、山羊抗兔抗体、山羊抗鼠抗体(Bioworld 公司)

2. 方法:(1)细胞培养及转染:HEC-1-B 细胞购自中科院上海细胞库,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养,隔天更换培养液。转染前 24h,以 2.5×10^5 /ml 的细胞数接种于 6 孔板(96 孔板接种细胞数为 2500/ml),置 37℃, 5% 饱和湿度 CO₂ 的培养箱过夜后,按照 lipofectamine 2000 说明书分别转染 has-miR-449b mimics 和 miRNA mimics 阴性对照。转染完成后继续培养来完成后续实验。本实验分为实验组(miR-449b mimics 转染组)和 NC 组(miRNA mimics 阴性转染组)。(2)RNA 的提取及实时荧光定量 PCR 检测 miR-449b 的水平:转染 48h 后, Trizol 手工法提取细胞总 RNA,保证 A260/A280 在 1.8~2.0 范围内。SYBR GREEN 试剂盒内提供 RT

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y2090699)

作者单位:325000 温州医科大学(陈慧君、黄亦波、林蓉蓉); 325000 温州医科大学附属第一医院(郑飞云)

通讯作者:郑飞云,电子邮箱:zfy5710@163.com

及 qPCR 通用引物,操作步骤按其说明书进行,先将 miRNA 加多聚 A 尾,反转录为 cDNA。qPCR 反应体系为 10 μ l:SYBR GREEN Mix5 μ l、cDNA 模板 1 μ l、qPCR 通用引物 1 μ l、上游引物 1 μ l、ddH₂O 2 μ l。miRNA - 449b 特异上游引物序列为 5' - AGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGC - 3',以 U6 为内参物,上游引物序列为 5' - CGCAAGGATGACACGCAAATTC - 3'。反应条件:95 $^{\circ}$ C 变性 3min 后,95 $^{\circ}$ C 5s,62 $^{\circ}$ C 40s 扩增 40 个循环。结果 CT 值以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法,来表示 miR - 449b 的表达量。(3) 细胞增殖活性检测:将 HEC - 1 - B 细胞接种于 96 孔板,2500 个细胞/孔,培养基 100 微升/孔,每组设 6 个复孔,24h 后转染。转染 24、48、72h 后,每孔更换 100 μ l 无双抗血清的 DMEM 培养基,加入 10 μ l CCK - 8 原液,避光置于培养箱孵育,每 30min 酶标仪检测 450nm 波长的吸光度,直至 NC 组吸光度值接近 1。(4) 细胞克隆形成实验:转染 72h 后,胰酶消化、离心、重悬,细胞计数后,以 500 个细胞/孔接种于 6 孔板(培养基 2 毫升/孔),轻轻摇动混匀,置于培养箱培养,每 2 天更换培养液,约 14 天后,肉眼可见 6 孔板底部成团的克隆团,停止继续培养。弃培养液,PBS 洗 3 遍,4% 多聚甲醛固定 15min 后,结晶紫避光染色 30min,PBS 洗 3 遍,空气干燥,相机拍照,计克隆数。每孔加入 500 μ l 34% 冰乙酸萃取,100 微升/孔加至 96 孔板中检测 590nm 波长的吸光度。(5) 细胞凋亡检测:6 孔板铺板,转染 72h 后,制备单细胞悬液,PBS 洗涤、离心 2 次,根据 Annexin V/PI 细胞凋亡试剂盒的说明书对细胞进行染色后,用流式细胞仪测定细胞凋亡情况。(6) 蛋白质印迹(Western blot)法检测 E2F3 和 p53 表达:采用常规 Western blot 方法,抗体浓度按其说明书稀释,经辣根过氧化物酶催化底物发光,系统照相,Image Lab 软件分析 E2F3 和 p53 表达变化(表达量以光密度数值表示)。

3. 统计学方法:采用 SPSS 19.0 统计学软件。每组实验至少重复 3 次,结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各组数据比较运用单因素方差分析,进行两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 转染后 miR - 449b 表达上调:转染 48h 后,通过实时荧光定量 PCR 检测 miR - 449b 的表达量。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR - 449b 表达量:610.84 $\pm$ 41.35。实验组 miR - 449b 表达量高于 NC 组,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 1 ~ 图 4)。

2. miR - 449b 抑制细胞增殖:分别转染 24、48 和 72h 后用 CCK - 8 试剂盒检测实验组和 NC 组的 HEC - 1 - B 细胞增殖活性,结果显示,转染 24h:实验组为 0.95 $\pm$ 0.04,NC 组为 1.00 $\pm$ 0.06;转染 48h:实验组为 0.84 $\pm$ 0.05,NC 组为 0.98 $\pm$ 0.04;转染 72h:实验组为 0.58 $\pm$ 0.07,NC 组为 1.02 $\pm$ 0.05。各时间点实验组细胞增殖活性均较 NC 组弱,组间比较,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 5)。

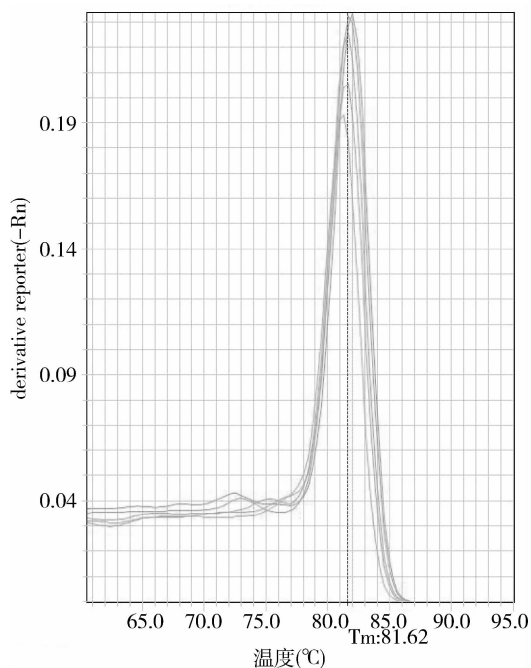


图 1 U6 溶解曲线

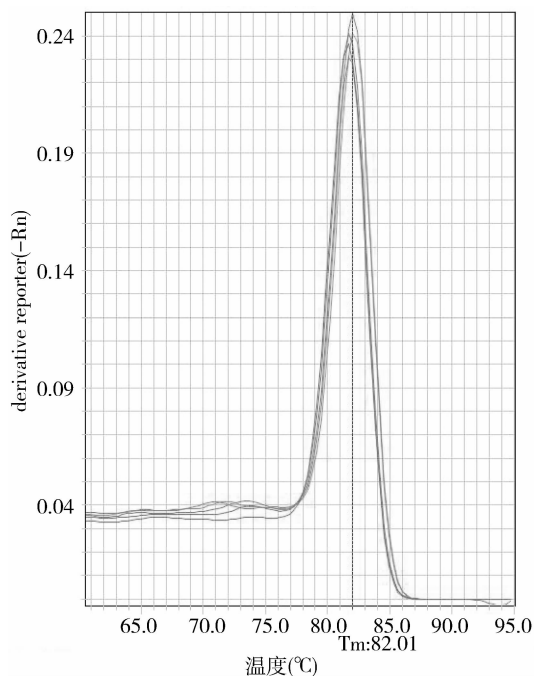


图 2 miR - 449b 溶解曲线

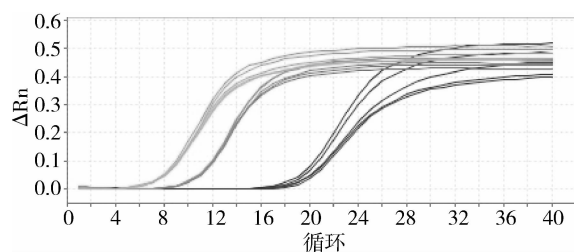
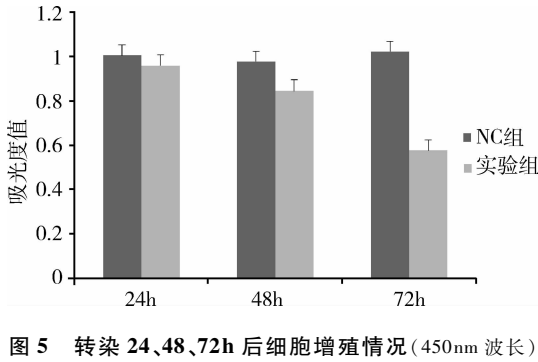
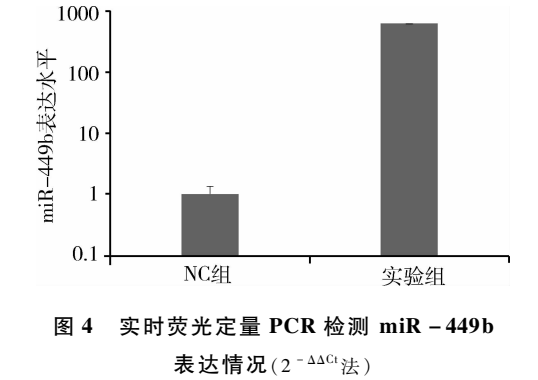
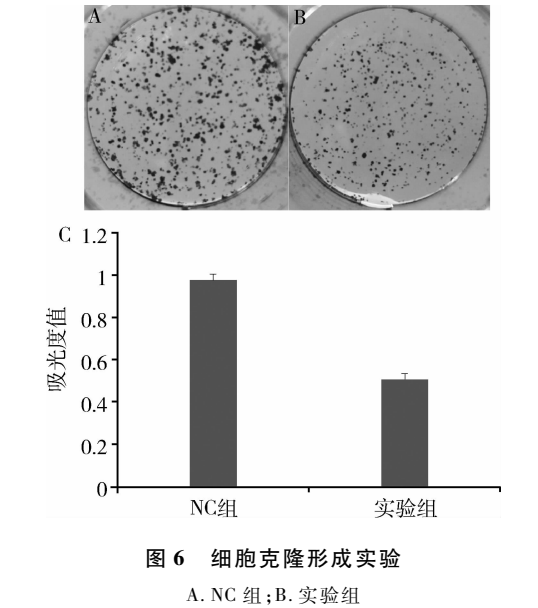


图 3 扩增曲线

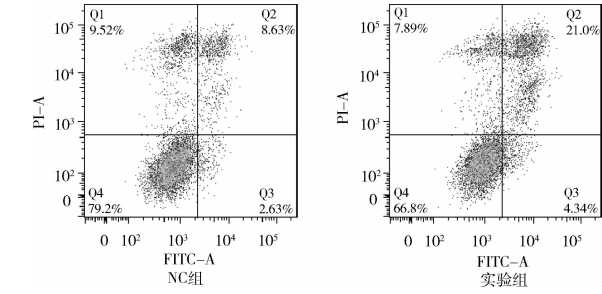


3. miR - 449b 抑制细胞克隆形成: HEC - 1 - B 细胞培养 14 天后, 结晶紫染色结果如图, 实验组细胞克隆形成能力下降。用冰醋酸萃取后, 测 590nm 吸光度结果显示, 实验组为 0.51 ± 0.01, NC 组为 0.98 ± 0.27, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 6)。

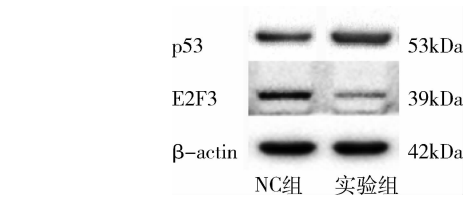


4. miR - 449b 促进细胞凋亡; 转染 72h 后流式细胞仪测细胞凋亡情况。结果显示, 实验组为 24.70% ± 0.56%, NC 组为 10.90% ± 0.64%。实验

组细胞凋亡增多, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 7)。



5. E2F3 和 p53 的表达情况: 实验组较 NC 组 E2F3 表达水平下调, p53 表达水平上调 (图 8)。



讨 论

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类长度为 22 ~ 25 个核苷酸的内源性小分子非编码 RNA, 广泛存在于真核生物中, 功能是通过与靶基因 3'UTR 上的结合位点互补结合, 在转录后调控基因的表达, 在细胞生长、分化及凋亡等多种生物过程中发挥作用^[3, 4]。随着 miRNA 研究的深入, 近年 miRNA 与肿瘤的相关性越来越受到人们的重视, 有研究报道癌组织和癌细胞中 miRNA 表达差异明显, 可作为癌基因或抑癌基因参与肿瘤的发生、发展^[2, 5]。子宫内膜癌是发生于子宫内膜的上皮性恶性肿瘤, 分为雌激素依赖型 (I 型) 和非雌激素依赖型 (II 型), 目前关于 miRNA 在子宫内膜癌中的生物学影响及作用机制研究甚少。

miR - 449 是近年新发现的一种 miRNA, 通过转录后调控基因表达, 参与多种疾病的发生、发展^[6]。miR - 449 既能通过自动调节反馈机制调控细胞周期负反馈调控通路, 又能直接靶向识别及调控靶基因的表达, 对细胞周期相关基因 CDK 家族进行调控。在细胞增殖方面, Marcet 等^[7] 研究显示 miR - 449 能影响 Notch 信号通路, 抑制细胞增殖。而在肝癌细胞系中, Zhang 等^[8] 发现 miR - 449 通过阻碍脂代谢相关的 SIRT1 通路抑制细胞增殖。在胃癌中, Bou Kheir

等^[9]研究显示 miR - 449 的直接靶基因有 GMNN、MET、CCNE2、SIRT1, 通过与靶基因的 3UTR 结合沉默靶基因的表达, 间接上调细胞 p53 和 p21 的表达, 进而抑制细胞的增殖能力。在细胞凋亡方面, Lize 等^[10]研究发现 miR - 449 和 miR - 34 调节 E2F - p53 负反馈循环系统的平衡来诱导细胞凋亡。Feng 等^[11]研究显示 miR - 449 调节反馈机制调控细胞周期负反馈调控通路 CDK - Rb - E2F1, miR - 449 下调 pRb - E2F1 的表达, 靶向沉默 CDK6 和 CDK25A, 导致 pRb 脱磷酸化。而在妇科肿瘤方面, Jang 等^[12]研究发现 miR - 449 在卵巢和子宫透明细胞癌中低表达。

笔者之前的研究^[13]通过基因芯片的筛查发现 miR - 449a 及 miR - 449b 在子宫内膜癌组织和正常子宫内膜组织中的表达存在差异, 这与其在胃癌、肝癌、肺癌、结肠癌等多种肿瘤中表达一致^[8, 9, 14]。并且在后续研究^[15]中, 我们发现 miR - 449a 能抑制 HEC - 1 - B 细胞的生长。而本研究同样以子宫内膜腺癌 HEC - 1 - B 细胞为对象, 通过转染 has - miR - 449b mimics 使 miR - 449b 表达上调, 通过实时荧光定量 PCR 验证 HEC - 1 - B 细胞转染后 miR - 449b 表达量明显高于 NC 组, 证实细胞转染成功。CCK - 8 和细胞克隆形成实验显示细胞增殖明显受抑制, 说明 miR - 449b 能抑制 HEC - 1 - B 细胞增殖。流式细胞仪测细胞凋亡显示细胞凋亡增加明显, 说明 miR - 449b 能促进 HEC - 1 - B 细胞凋亡。

E2F3 属于转录因子 E2F 家族, 参与调控细胞周期由 G 期进入 S 期, 促进细胞增殖及恶性转化, 是细胞周期重要的转录因子^[16]。E2F3 可以和 DP 蛋白结合形成二聚体, 进而与靶基因的启动子结合来调控转录。E2F3 活性受到肿瘤抑制因子 Rb 磷酸化的直接调控。E2F3 与去磷酸化的 Rb 结合而失活, 使细胞周期于 G₁/S 期停滞, 细胞增殖停止; E2F3 被释放而活化时, 细胞周期顺利度过 G₁/S 期, 促进细胞增殖^[17]。E2F3 这种作用也同样促进肿瘤细胞异常增殖, 在肿瘤发展过程中起重要作用^[18]。而 p53 属于 p53 基因家族, 是一种抑癌基因, 具有阻滞细胞周期、修复受损 DNA、促进细胞凋亡、抑制细胞过度增殖等功能。有研究表明过表达 miR - 34 家族能调节 E2F - p53 的平衡来诱导细胞周期停滞和促进细胞凋亡^[10]。本研究用 Western blot 方法证实转染 miR - 449b 后 E2F3 蛋白的表达下调及 p53 蛋白的表达上调, 表明 miR - 449b 可调节 E2F3 - p53 负反馈循环

系统, 可能参与其信号通路的转导, 影响细胞周期过程, 抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡。

综上所述, 本研究证明 miR - 449b 能抑制子宫内膜腺癌 HEC - 1 - B 细胞的增殖, 促进 HEC - 1 - B 细胞的凋亡。转染 miR - 449b 后 E2F3 的表达下调和 p53 的表达上调, 说明 miR - 449b 可作用于 E2F3 - p53 负反馈循环系统来调控影响细胞周期, 在子宫内膜腺癌的发生、发展中起作用, 且有可能成为子宫内膜腺癌靶向治疗的靶点。本研究初步提示了 miR - 449b 在子宫内膜腺癌 HEC - 1 - B 细胞中的生物学功能和分子调控机制。而 miR - 449b 还通过哪些其他分子机制作用于子宫内膜腺癌中还有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Jemal A, Bray F, Center MM, *et al.* Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69 - 90
- 2 Bouyssou JM, Manier S, Huynh D, *et al.* Regulation of microRNAs in cancer metastasis[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1845(2): 255 - 265
- 3 Lee Rosalind C, Feinbaum Rhonda L, Ambros Victor. The C. elegans heterochronic gene lin - 4 encodes small RNAs with antisense complementarity to Lin - 14[J]. Cell, 1993, 75: 843 - 854
- 4 Ambros V, Lee Rosalind C. Identification of microRNAs and other tiny noncoding RNAs by Cdna cloning[J]. Methods Mol Biol, 2004, 265: 131 - 158
- 5 Kisselov FL. MicroRNAs and cancer[J]. Molecular Biology, 2014, 48(2): 197 - 206
- 6 Muriel L, Alexander K, Matthias D. MicroRNA - 449 in cell fate determination[J]. Cell Cycle, 2014, 10(17): 2874 - 2882
- 7 Marcet B, Chevalier B, Luxardi G, *et al.* Control of vertebrate multiciliogenesis by Mir - 449 through direct repression of the delta/notch pathway[J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(6): 693 - 699
- 8 Zhang H, Feng Z, Huang R, *et al.* MicroRNA - 449 suppresses proliferation of hepatoma Cell lines through blockade lipid metabolic pathway related to Sirt1[J]. Int J Oncol, 2014, 45(5): 2143 - 2152
- 9 Bou Kheir T, Futoma - Kazmierczak E, Jacobsen A, *et al.* Mir - 449 inhibits cell proliferation and is down - regulated in gastric cancer[J]. Mol Cancer, 2011, 10(29): 40
- 10 Lize M, Pilarski S, Dobbstein M. E2f1 - inducible microRNA 449a/B suppresses cell proliferation and promotes apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2010, 17(3): 452 - 458
- 11 Feng M, Yu Q. Mir - 449 regulates Cdk - Rb - E2f1 through an auto - regulatory feedback circuit[J]. Cell Cycle, 2014, 9(2): 213 - 214
- 12 Jang SG, Yoo CW, Park SY, *et al.* Low expression of Mir - 449 in gynecologic clear cell carcinoma[J]. Int J Gynecol Cancer, 2014, 24(9): 1558 - 1563
- 13 薛纪森, 张乾, 李晓琳, 等. Mir - 449a/B 在 ii 型子宫内膜癌中表达下调[J]. 医学研究杂志, 2012, 41(11): 103 - 107

- 14 Fang Y, Gu X, Li Z, *et al.* Mir - 449b Inhibits the proliferation of sw1116 colon cancer stem cells through downregulation of Cend1 and E2f3 expression[J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(1): 399 - 406
- 15 Ye W, Xue J, Zhang Q, *et al.* Mir - 449a functions as a tumor suppressor in endometrial cancer by targeting Cdc25a[J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(3): 1193 - 1199
- 16 King J, Moskowitz PG, Burgon PG, *et al.* E2f3 plays an essential role in cardiac development and function[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(23): 3775 - 3780
- 17 Giangrande PH, Zhu WC, Nevins JR. E2fs link the control of G1/S and G2/M transcription[J]. *EMBO J*, 2004, 23:4615 - 4626
- 18 Miles WO, Tschop K, Herr A, *et al.* Pumilio facilitates mirna regulation of the E2f3 oncogene[J]. *Genes Dev*, 2012, 26(4): 356 - 368
- (收稿日期:2014 - 12 - 03)
- (修回日期:2015 - 01 - 02)

调强放疗模式下青年鼻咽癌患者的预后分析

陈荔莎 张恩环 吴君心 许雨虹 陈传本

摘要 目的 探讨调强放疗(intensity - modulated radiotherapy, IMRT)模式下青年鼻咽癌患者的生存分析与预后因素。**方法** 回顾性分析 2004 年 1 月 ~ 2007 年 12 月在笔者医院接受 IMRT 的青年鼻咽癌患者(年龄 ≤ 35 岁)的临床资料,进行相关预后分析。**结果** 101 例患者 5 年无局部区域复发生存率、总生存率(OS)、无远处转移生存率(DFFS)及无瘤生存率(DFS)分别为 93.8%、85.0%、79.9% 和 76.6%。多因素分析表明 N 分期是 OS($P = 0.018$)、DFFS($P = 0.001$)及 DFS($P = 0.003$)的独立预后因素。性别在本研究中是 DFFS($P = 0.050$)的独立预后因素。**结论** IMRT 治疗青年鼻咽癌可获得较好的局部区域控制率及总生存率, N 分期是影响青年鼻咽癌调强放疗远期疗效的相关预后因素, 远处转移是治疗失败的主要原因。

关键词 青年鼻咽肿瘤 放射疗法 调强适行 预后

中图分类号 R4 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.08.014

Prognostic Analysis of Intensity - modulated Radiotherapy (IMRT) for Nasopharyngeal Carcinoma in Young Adult Patients. Chen Lisha, Zhang Enhuan, Wu Junxin, *et al.* Department of Radiation Oncology, Cancer Hospital of Fujian Medical University, Fujian 350014, China

Abstract Objective To evaluate the treatment outcome and prognostic factors of young adults with nasopharyngeal carcinoma under intensity - modulated radiotherapy(IMRT). **Methods** One hundred and one nasopharyngeal carcinoma patients of young adults (35 years old or below) who were treated by IMRT at our institution from January 2004 to December 2007 were reviewed and analyzed. **Results** The median follow - up for all 101 patients was 70.3 months (range, 7.5 - 110.5 months). The 5 - year local - regional recurrence - free survival (LRRFS), overall survival (OS), distant metastasis free survival (DMFS), and disease - free survival (DFS) were 93.8%, 85.0%, 79.9% and 76.6%, respectively. Multivariate factors analyses revealed that N classification was the significant prognosticator for OS ($P = 0.018$), DMFS ($P = 0.001$), DFS ($P = 0.003$) and gender was an independent prognostic factor for DMFS ($P = 0.050$). Chemotherapy failed to benefit treatment outcome ($P > 0.05$). **Conclusion** Intensity - modulated radiotherapy seems to lengthen 5 - year OS and to achieve a reasonable local - regional control in young adults nasopharyngeal carcinoma patients. N classification was the related prognostic factor influencing the long - term curative effect of IMRT of the youth with nasopharyngeal carcinoma, and distant metastasis remained the dominant failure pattern of our series.

Key words Youth with nasopharyngeal neoplasm; Radiotherapy; Intensity - modulation plan; Prognosis

鼻咽癌是我国常见的头颈部恶性肿瘤之一,放射治疗是其主要的治疗手段^[1]。调强放疗(intensity - modulated radiotherapy, IMRT)技术的应用,明显提高鼻咽癌患者的局控率,并降低放疗的不良反应^[2,3]。

Xiao 等^[4]、肖光莉等^[5]研究提示年龄 < 45 岁的男性鼻咽癌患者疾病无进展生存率、无远处转移生存率低于 > 45 岁的患者。青年鼻咽癌发生率不高,目前相关报道极少。本研究回顾性分析笔者医院近年来收治的年龄 18 ~ 35 岁的 101 例鼻咽癌经调强放疗后的生存情况及分析相关预后因素。

材料与方法

1. 一般临床资料:2004 年 1 月 ~ 2007 年 12 月笔者医院

基金项目:福建省自然科学基金资助项目(2010J01137)

作者单位:350014 福州,福建医科大学教学医院、福建省肿瘤医院头颈放疗科

通讯作者:陈传本,电子信箱:chchben@sina.cn