

miR-181b-5p 对卡波西肉瘤细胞系 SLK 细胞迁移、侵袭的影响

丁 媛 梁俊琴 吴秀娟 向 芳 康晓静 王红娟 普雄明

摘 要 **目的** 通过脂质转染 miR-181b-5p 模拟物及抑制物到卡波西肉瘤细胞系 SLK, 研究 miR-181b-5p 对卡波西肉瘤细胞 SLK 细胞增殖、迁移、侵袭生物学功能的影响。**方法** 应用脂质体对人卡波西肉瘤细胞株 SLK 进行转染, 转染 miR-181b-5p 模拟物及抑制物后应用 MTT 测定细胞增殖曲线, 应用流式细胞仪行检测细胞周期。利用 Transwell 小室试验后行苏木素染色观察细胞迁移、细胞侵袭生物学特性。**结果** miR-181b-5p 模拟物促进细胞增殖, 促进 S 期的转变, 加速细胞周期进程; miR-181b-5p 抑制物抑制细胞增殖, 诱导细胞发生 G₀/G₁ 期阻滞, 延缓细胞周期进程。Transwell 小室迁移实验结果显示, 与阴性对照组迁移实验下室面细胞数目 151 ± 11 个相比, miR-181b-5p 模拟物组 184 ± 9 个, 细胞数目明显数量增多, 迁移能力均明显提高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Transwell 小室侵袭实验结果显示, 与阴性对照组侵袭实验下室面细胞数目 35 ± 6 个相比, miR-181b-5p 模拟物组 48 ± 5 个, 细胞数目明显数量增多, 侵袭能力均明显提高 ($P < 0.05$)。**结论** miR-181b-5p 在 SLK 细胞中高表达, 其对 SLK 细胞的增殖、侵袭和迁移能力可能存在正向调控作用, 可能成为卡波西肉瘤的潜在治疗靶点。

关键词 miR-181b-5p 卡波氏肉瘤 细胞周期 迁移 侵袭

中图分类号 R730.266

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.11.010

Effects of microRNA-181b-5p on Migration and Invasion of Human Kaposi's Sarcoma Cell Line SLK. Ding Yuan, Liang Junqin, Wu Xiujuan, et al. Xinjiang Medical University, Xinjiang 830054, China

Abstract Objective miR-181b-5p mimics and inhibitors were transfected into Kaposi's sarcoma cell line SLK through liposomal transfection. To study the effect of miR-181b-5p on SLK cell proliferation, migration and invasion biological activities. **Methods** Human Kaposi's sarcoma cell line SLK was transfected by liposomes. After miR-181b-5p mimic or inhibitor was transfected, SLK cell proliferation was assessed by MTT assay. Cell cycle of each group was determined by flow cytometry after 48 hours after transfection. After miR-181b-5p mimic or inhibitor was transfected, cell migration and invasion was determined by transwell assay followed by hematoxylin staining after 24 hours. **Results** miR-181b-5p mimic promoted cell proliferation, promoted transformation and accelerated the process of cell cycle. miR-181b-5p inhibitor inhibited cell proliferation, induced G₀/G₁ phase retardation, delayed the process of cell cycle. Transwell migration assay results showed that number of migrated cell in the group treated with miR-181b-5p mimics was 184 ± 9, significantly higher than that of control group 151 ± 11, suggesting that miR-181b-5p mimics significantly increased cell migration ability ($P < 0.05$). Transwell invasion assay showed that cell number of miR-181b-5p mimics group 48 ± 5 significantly increased compared to negative control group 35 ± 6 suggesting increased invasiveness ($P < 0.05$). **Conclusion** miR-181b-5p may positively regulate the proliferation, invasion and migration of the SLK cell. miR-181b-5p may be a potential treatment target for Kaposi's sarcoma.

Key words miR-181b-5p; Kaposi's sarcoma; Cell cycle; Migration; Invasion

1993 年在对秀丽新小杆线虫进行突变体的遗传分析中首次发现一种不编码蛋白质的 RNA-lin-4, 且发现它可以调控胚胎后期发育, 从而发现了 miR-

NAs 的存在, 从此展开了对其广泛的研究^[1-3]。如今 miRNAs 成为生物医学研究和肿瘤治疗研究的焦点。目前, 少见 hsa-miRNA 对卡波西肉瘤细胞的生物学功能影响的研究报道, 本研究小组前期已经以新疆维吾尔族经典型 KS 肿瘤及瘤旁组织为研究材料, 采用 miRNA 芯片技术, 筛选经典型 KS miRNAs 差异性表达谱, 并采用 Real-time PCR 技术验证差异表达的 miRNA, 并进行相应的功能研究, 结果发现 miRNA-181b-5p 在卡波西肉瘤组织中高表达, 推测 miR-

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金资助项目 (81260311); 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (2014211A059)

作者单位: 830054 乌鲁木齐, 新疆医科大学(丁媛); 830001 乌鲁木齐, 新疆维吾尔自治区人民医院皮肤科(梁俊琴、吴秀娟、向芳、康晓静、王红娟、普雄明)

通讯作者: 普雄明, 电子信箱: puxiongm@126.com

181b-5p 可能与卡波西肉瘤细胞的各种生物学功能有关,本研究通过脂质转染 miR-181b-5p 模拟物及抑制物到卡波西肉瘤细胞系 SLK 初步分析其影响卡波西肉瘤细胞的增殖、迁移、侵袭能力的可能机制。

材料与方法

1. 材料:细胞株和主要试剂:卡波西肉瘤细胞株 SLK (NIH AIDS Research and Reagent Program 提供) RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自美国 Sigma 公司;miR-181b-5p 模拟物、miR-181b-5p 抑制物由德国 Qiagen 公司合成;HiPerFect 转染试剂、阳性对照、抑制物阴性对照、阴性对照购自德国 Qiagen 公司;MTT 检测试剂盒购自上海贝博生物;细胞周期试剂盒购自上海罗氏试剂。24 孔板 Transwell 小室及 24 孔板 Transwell 包被 Matrigel 胶小室购自美国 Corning 公司。

2. 方法:(1)SLK 细胞用 RPMI-1640 培养液(含 10% 胎牛血清)中培养在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的孵箱条件下传代培养,实验用细胞均取自对数生长期。按照德国 Qiagen 的 HiPerFect 转染试剂说明书进行脂质转染,接种细胞于细胞培养板后当天进行转染。实验分 4 组:阴性对照组、miRNA-181b-5p 模拟物组、miRNA-181b-5p 抑制物组、抑制物阴性对照组。每组细胞 3 复孔,实验重复 3 次。(2)转染后 48h 按德国 Qiagen 公司 miRNeasy Mini Kit 试剂盒说明书提取总 RNA。A260/A280 比值在 1.8~2.2 的用于检测。Real-time 定量 PCR 使用的 ViiA 7 Real-time PCR System, Real-time PCR 反应体系:2×Master Mix 5μl, 10μmol/L 的 PCR 特异引物 F 0.5μl, 10μmol/L 的 PCR 特异引物 R 0.5μl, 加水至总体积为 8μl。U6 & 所有的指标均按以下程序进行:95℃, 10min; 40 个 PCR 循环(95℃, 10s; 60℃, 60s; 收集荧光)。所得 Ct 值,以 U6 为内参, Ct = 基本循环数, ΔCt = 基本循环数与内参循环数差值, ΔΔCt = 最低样本 ΔCt 值 - 其他各样本 ΔCt 值, 目的基因相对含量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。hsa-miR-181b-5p PCR 特异引物 F: 5'-GGGAACATTCATTGCTG-3', R: 5'-TGCCTGTCCTGGAGTC-3'。每组实验重复 3 次。(3)分别于转染后 6(脂质复合物 6h 开始发挥作用)、24、48、72h 后取出。每孔加入 MTT 溶液 20μl 后再放孵箱 5% CO₂、37℃ 饱和湿度的孵箱条件下孵育 4h 后取出后,逐孔吸弃上清液,加用 100μl Formazan 溶解液,置摇床上低速振荡 30min,于 A = 450nm 处测量各孔的吸光值。每组 6 个 A 值,取除去偏离最明显值后其余 5 孔的 A 值的平均数,绘制生长曲线。本实验重复 3 次。(4)转染 48h 后消化细胞,按试剂盒操作处理各组细胞后流式细胞仪检测细胞周期。(5)Transwell 小室细胞迁移实验:转染 48h 后的细胞饥饿 12h 后制备细胞悬液在无血清培养基中调整细胞密度至 1×10^5 个/毫升。吹匀后在 Transwell 小室加入 200μl 密度为 1×10^5 个/毫升细胞悬液,最后细胞数为 2×10^4 。每个下室加入 600μl 含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液。将 24 孔板置入 5% CO₂、37℃ 饱和湿度的孵箱条件下孵育 24h。24h 后吸去小室中残余液体,用较细纤维棉签擦去上

室内未透过膜的细胞,细胞苏木素染色,用刀片轻轻将 Transwell 小室基膜完整切除,放置在载玻片上镜下细胞计数。(6)Transwell 小室细胞侵袭实验:采用包被 Matrigel 胶的 Transwell 小室,在 Transwell 小室加入 500μl 密度为 1×10^5 个/毫升细胞悬液,最后细胞数为 5×10^4 。余步骤同“Transwell 小室细胞迁移实验”。

3. 统计学方法:所有数据采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。各组数据之间是否存在显著性差异,选用单因素方差分析,两两比较用 Dunnett t 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. 转染后各组细胞 miRNA-181b-5p 的表达:转染 48h 后,实时定量 Real-time PCR 检测阴性对照组、miR-181b-5p 模拟物组、miR-181b-5p 抑制物、抑制物阴性对照组转染组中 miR-181b-5p 的表达量平均值分别为 1.00 ± 0.07 、 3.77 ± 0.31 、 0.76 ± 0.07 和 1.10 ± 0.13 。模拟物组 miR-181b-5p 表达明显上调,抑制物 miR-181b-5p 表达量明显下调,与阴性对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$);而抑制物阴性对照组 miR-181b-5p 表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2. miR-181b-5p 对卡波西肉瘤细胞 SLK 增殖的影响:转染阴性对照组、miR-181b-5p 模拟物组、miR-181b-5p 抑制物组、miR-181b-5p 抑制物阴性对照组转染不同小时的生长曲线显示,在 48h 时模拟物组生长曲线增殖能力明显上升;miR-181b-5p 抑制物组增殖能力明显下降($P < 0.05$, 图 1)。

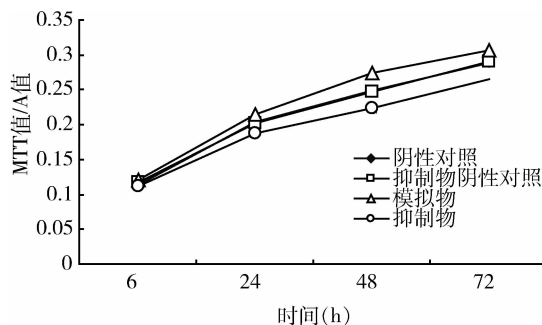


图 1 MTT 法检测各组细胞生长曲线

3. miR-181b-5p 对卡波西肉瘤细胞 SLK 细胞周期的影响:流式细胞术分析显示转染 miR-181b-5p 模拟物后其 S 期细胞比例明显增加($P < 0.05$)与阴性对照组相比;转染 miR-181b-5p 抑制物后其 G₀/G₁ 期比例明显增加,引起细胞周期 G₀~G₁ 期阻滞($P < 0.05$, 图 2)。

4. miR-181b-5p 模拟物对 SLK 细胞迁移能力

的影响:miR-181b-5p 模拟物组增加 SLK 细胞迁移数目,miR-181b-5p 抑制物组减少 SLK 细胞迁移数目,与阴性对照相比差异有统计学意义($P <$

0.01,图 3、表 1),笔者通过在体外培养实验的结果推测 miR-181b-5p 可能具有促进卡波西肉瘤细胞迁移的能力。

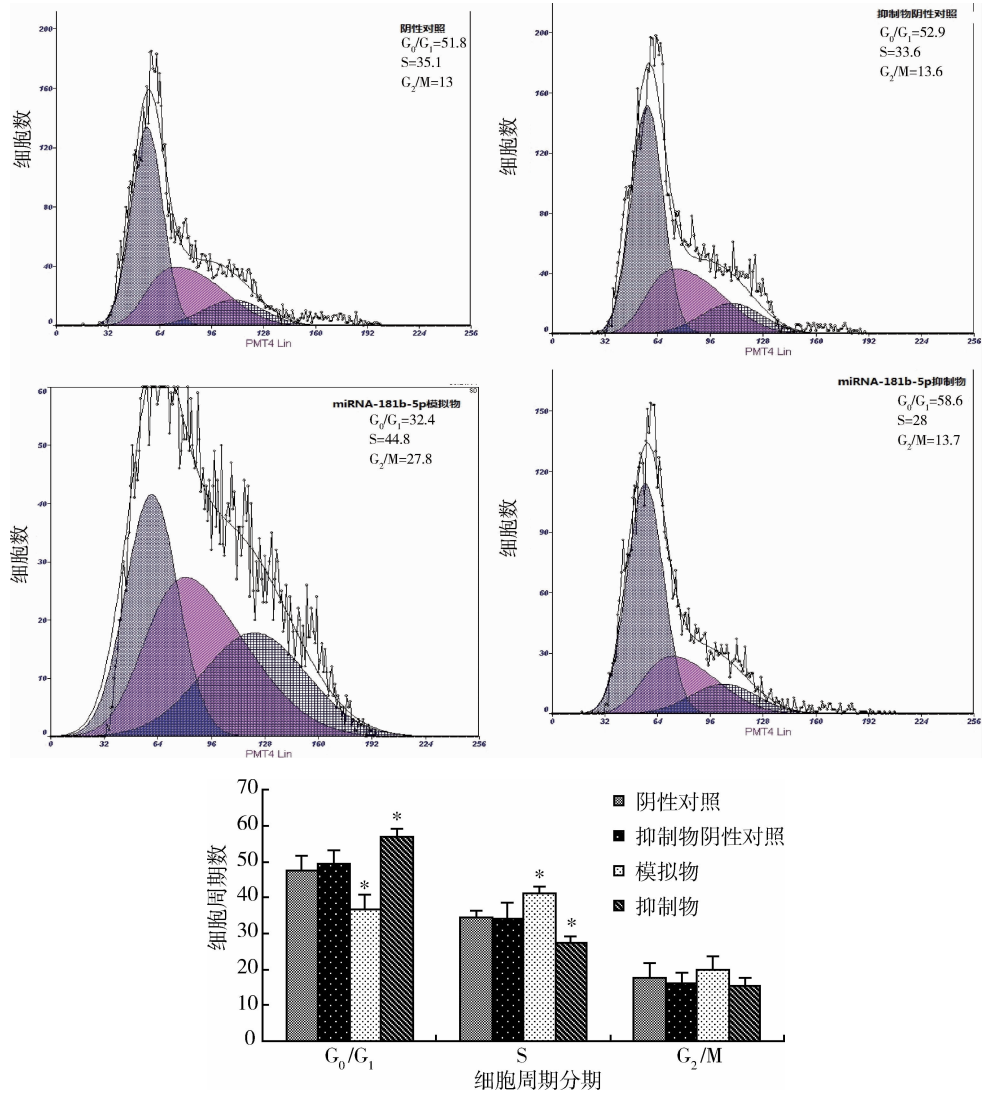


图 2 流式细胞仪分析细胞周期
与阴性对照相比,* $P < 0.05$

5. miR-181b-5p 模拟物对 SLK 细胞侵袭能力的影响:miR-181b-5p 模拟物组增加 SLK 细胞侵袭数目;miR-181b-5p 抑制物组减少 SLK 细胞侵

袭数目,与阴性对照相比,差异有统计学意义($P <$ 0.01,图 4、表 2)。笔者通过在体外培养实验的结果推测miR-181b-5p可能具有促进卡波西肉瘤细胞

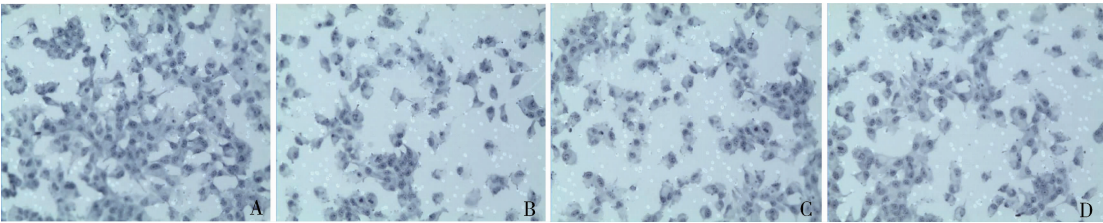


图 3 Transwell 小室 SLK 细胞迁移实验结果(HE, $\times 200$)

A. miR-181b-5p 模拟物组;B. miR-181b-5p 抑制物组;C. 阴性对照组;D. miR-181b-5p 抑制物阴性对照

表 1 不同物质转染后 SLK 细胞的体外迁移能力

组别	均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$, 个)	<i>F</i>	<i>P</i>	组间 <i>P</i> 值
miR - 181b - 5p 模拟物组	184 ± 9	565.23	<0.01	<0.01
miR - 181b - 5p 抑制物组	105 ± 10			<0.01
miR - 181b - 5p 抑制物阴性对照	151 ± 9			>0.05
阴性对照组	152 ± 11			

不同物质组转染 SLK 细胞后 Transwell 小室迁移细胞数目差异有统计学意义, $F = 565.23$, $P < 0.01$, 与阴性对照相比, 模拟物组及抑制物组差异均有统计学意义, 组间 $P < 0.01$

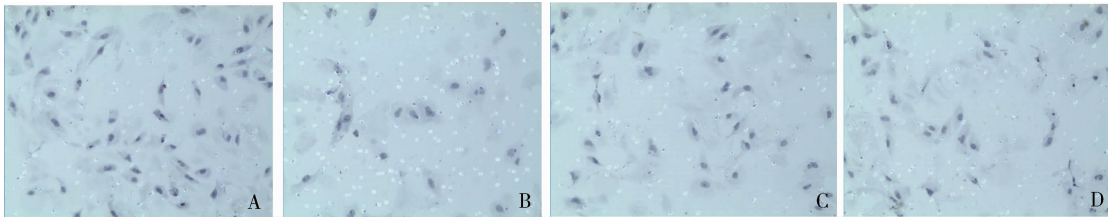


图 4 Transwell 小室 SLK 细胞侵袭实验结果 (HE, ×100)

A. miR - 181b - 5p 模拟物组; B. miR - 181b - 5p 抑制物组; C. 阴性对照组; D. miR - 181b 抑制物阴性对照

表 2 不同物质转染后 SLK 细胞的体外侵袭能力 ($\bar{x} \pm s$)

组别	均数 ± 标准差 (个)	<i>F</i>	<i>P</i>	组间 <i>P</i> 值
miR - 181b - 5p 模拟物组	48 ± 5	161.152	<0.01	<0.01
miR - 181b - 5p 抑制物组	23 ± 4			<0.01
miR - 181b - 5p 抑制物阴性对照	33 ± 7			>0.05
阴性对照组	35 ± 6			

不同物质组转染 SLK 细胞后 Transwell 小室侵袭细胞数目差异有统计学意义, $F = 161.152$, $P < 0.01$, 与阴性对照相比, 模拟物组及抑制物组差异均有统计学意义, 组间 $P < 0.01$

侵袭的能力。

讨 论

卡波西肉瘤 (Kaposi's sarcoma, KS) 又称多发性特发性出血性肉瘤, 好发于皮肤, 可侵袭淋巴结和内脏。KS 发生具有明显的地域和种族特点, 多见于地中海沿岸、犹太人后裔等, 亚洲少见^[5]。在中国, 新疆 KS 发生率较高, 主要见于维吾尔族人群, 罕见于汉族人群, 卡波西肉瘤的具体病因及发病机制至今尚未明确。Catrina Ene 等^[6]通过对 17 例卡波西肉瘤标本和 3 例正常皮肤做为对照, 通过微阵列分析发现了 76 个上调 miRNAs 和 109 个下调 miRNAs, 并通过 Real-time PCR 验证了下调最为显著的为 miR - 99a, miR - 200 家族, miR - 199b - 5p, miR - 100 和 miR - 335。上调最为显著的是 kshv - miR - K12 - 4 - 3p、kshv - miR - K12 - 1、kshv - miR - K12 - 2、kshv - miR - K12 - 4 - 5p、kshv - miR - K12 - 8。进一步研究证实 miR - 99a 的致癌靶基因为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (一种丝/苏氨酸蛋白激酶), 其不仅在肿瘤细胞生长、增殖过程中起重要作用, 而且其信号

通路活动异常与肿瘤的发生有密切关系。miR - 200 家族的靶基因为 ZEB1、ZEB2 和 E - cadherin。

miR - 181s 家族为人类细胞中广泛存在的一种 miRNA, 其家族成员高度同源, 包括 miR - 181a、miR - 181b、miR - 181c 和 miR - 181d。多项研究证实 miR - 181s 家族在多种肿瘤组织中异常表达, 表明其在疾病的发生、发展过程中有重要的作用^[7,8]。本研究前期通过实时荧光定量 RT - PCR 检测 KS 组织中 miR - 181b - 5p 的表达水平, 结果显示, miR - 181b - 5p 在 KS 组织中的表达水平高于瘤旁组织, 表明其与 KS 的发生、发展可能存在着密切关系, 提示 miR - 181b - 5p 对于 KS 来说可能是一种致癌基因。故为进一步研究 KS 的发病机制, 开展其对 KS 细胞系 SLK 细胞生物学功能的影响的研究有重要的作用, 更是为下一步靶基因功能验证的奠定了丰富的理论基础。

本研究发现转染 miRNA - 181b - 5p 模拟物后, SLK 细胞中 miRNA - 181b - 5p 明显高于阴性对照组, 且促进了细胞的增殖, 进一步发现 miRNA -

181b-5p 在细胞内表达升高可能通过促进 S 期的转变,加速细胞周期进程;抑制 miRNA-181b-5p 表达,则可能诱导细胞发生 G₀/G₁ 期阻滞,延缓细胞周期进程,表明 SLK 通过加快 G₁/S 的转化而促进细胞增殖,转染 miRNA-181b-5p 模拟物后 SLK 细胞的迁移、侵袭能力明显增强,模拟物组和阴性对照组差异有显著性,且转染 miRNA-181b-5p 抑制物后 SLK 细胞的迁移及侵袭能力明显下降,说明 miRNA-181b-5p 可能参与了 SLK 转移、侵袭的过程,和国内外的报道相同,He 等^[9]研究证明 miR-181b 在前列腺癌组织中高表达,并可以促进细胞的迁移和侵袭能力;Yang 等^[10]研究证明 miRNA-181b 可以促进卵巢癌细胞的侵袭能力。

本研究在侵袭实验中发现采用迁移实验终浓度的 2×10^4 个细胞时,没有细胞留在膜上,染色后未发现膜上有穿膜细胞,且下室培养基中也没有细胞。后调整细胞数量为 5×10^4 个后,发现有穿膜细胞,但数量也较少,故采用 100 倍目镜下计数;Yang 等^[10]在进行卵巢癌细胞系 SKOV3 和 ES-2 的 Transwell 侵袭研究中使用的实验条件同本研究,但在上室 2×10^4 个细胞时已经有细胞穿膜,且在 200 目镜下计数,表明 miRNA-181b-5p 可能参与了 SLK 侵袭的过程,但 SLK 细胞株侵袭能力较弱相对于其他恶性肿瘤细胞株,这可能和 SLK 来源有关。SLK 细胞来源于在 1990 年以色列 1 例男性患者,其为免疫抑制型 KS 的口腔肿瘤组织,HIV 阴性。2002 年,Ganem 发现 SLK 细胞系在试管内易于感染 KSHV,紧接着 SLK 被导入表达强力霉素依赖性 RTA 基因,RTA 基因为复制和转录激活因子,是病毒转录的一个关键因子,它的表达控制 KSHV 在潜伏期和裂解期的转化。因为此细胞系为内皮来源,故已经被广泛应用于 KS 肿瘤生物学研究^[11-13]。SLK 来源免疫抑制型 KS,HIV 阴性,相对于其他恶性肿瘤细胞 SLK 细胞株本身侵袭性可能较弱。

另外细胞株侵袭力较弱,也符合卡波西肉瘤的临床特点,不同临床类型的 KS 其临床表现及生物学行为为差异很大。世界卫生组织关于血管肿瘤命名的最新提议将 KS 定义为中间恶性(低度恶性)血管肿瘤。但这需要在进一步分离细胞培养及检测 MMPs 的表达等研究中得以验证。这些也更进一步证实了此细胞系的来源确切。

本研究初步阐明了 miR-181b-5p 参与了卡波

西肉瘤细胞的生物学功能的过程,表明其可能为促瘤基因,参与了 SLK 细胞的增殖、迁移、侵袭的过程。下一步将结合生物分析软件预测其靶基因,进而验证,明确 miR-181b-5p 如何作用于靶基因共同参与肿瘤发生、发展的过程,为最终 miR-181b-5p 是否可以做为 KS 诊断、治疗、疗效预测及预后判断的重要分子标志物提供理论依据和技术支持。

参考文献

- Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: biogenesis, function and role in cancer [J]. *Curr Genomics*, 2010, 11(7):537-561
- Carrington JC, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development [J]. *Science*, 2003, 301:336-338
- Kolesnikov NN, Titov SE, Veriaskina IuA, *et al.* MicroRNA, evolution and cancer [J]. *Tsitologiya*, 2013, 55(3):159-164
- Wang J, Zhang KY, Liu SM, *et al.* Tumor-associated circulating microRNAs as biomarkers of cancer [J]. *Molecules*, 2014, 19(2):1912-1938
- Antman K, Chang Y. Kaposi's sarcoma [J]. *N Engl J Med*, 2000, 342:1027-1038
- Catrina Ene AM, Borze I, Guled M, *et al.* MicroRNA expression profiles in Kaposi's sarcoma [J]. *Pathol Oncol Res*, 2014, 20(1):153-159
- Liu J, Shi W, Wu C, *et al.* miR-181b as a key regulator of the oncogenic process and its clinical implications in cancer [J]. *Biomed Rep*, 2014, 2(1):7-11
- Zhu W, Shan X, Wang T, *et al.* miR-181b modulates multidrug resistance by targeting BCL2 in human cancer cell lines [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(11):2520-2529
- He L, Yao H, Fan LH, *et al.* MicroRNA-181b expression in prostate cancer tissues and its influence on the biological behavior of the prostate cancer cell line PC-3 [J]. *Genet Mol Res*, 2013, 12(2):1012-1021
- Yang L, Wang YL, Liu S, *et al.* miR-181b promotes cell proliferation and reduces apoptosis by repressing the expression of adenyl cyclase 9 (AC9) in cervical cancer cells [J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(1):124-130
- Lucial MB, Anul R, Handley M, *et al.* Exposure to HIV-protease inhibitors selects for increased expression of P-glycoprotein (ABCB1) in Kaposi's sarcoma cells [J]. *British Journal of Cancer*, 2011, 105:513-522
- Curry CL, Reed LL, Broude E, *et al.* Notch inhibition in Kaposi's sarcoma tumor cells leads to mitotic catastrophe through nuclear factor-KB signaling [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(7):1983-1992
- Livengooda AJ, Wua C, Carsona DA. Opposing roles of RNA receptors TLR3 and RIG-I in the inflammatory response to double-stranded RNA in a Kaposi's sarcoma cell line [J]. *Cell Immunol*, 2007, 249(2):55-62

(收稿日期:2015-04-26)

(修回日期:2015-06-18)