

MicroRNA-34a抑制葡萄膜黑色素瘤细胞增殖的研究

王 教* 陈林华 周仲楼 陈晓燕

(温州医学院眼视光学院, 温州 325027)

摘要 该文采用阳离子脂质体Lipofectamine介导的方法将microRNA-34a转染入体外培养的人葡萄膜黑色素瘤细胞M23和SP6.5。应用BrdU法、细胞平板克隆形成实验检测转染microRNA-34a后对细胞增殖的影响,发现M23和SP6.5细胞增殖明显被抑制($P<0.01$);并利用流式细胞技术检测转染microRNA-34a后细胞周期的变化,发现细胞停滞于G₁期;同时检测转染microRNA-34a后细胞caspase-3/7酶的活性,发现无明显改变。另外, Real-time PCR检测表明阿霉素处理后M23、SP6.5细胞中microRNA-34a的表达量上调($P<0.01$)。用阿霉素处理转染microRNA-34a的M23、SP6.5细胞,检测caspase-3/7酶活性的改变,发现caspase-3/7酶活性显著增加($P<0.01$)。本研究表明microRNA-34a通过抑制细胞周期来抑制体外培养的人葡萄膜黑色素瘤细胞的增殖,能够增加细胞对阿霉素的敏感性,但不直接诱导细胞凋亡。

关键词 MicroRNA-34a; 葡萄膜黑色素瘤; 增殖; 细胞周期; 阿霉素

葡萄膜黑色素瘤是成人最常见的眼内恶性肿瘤,易侵袭转移^[1]。MicroRNA (miRNA)是一类分布广泛的非编码蛋白质的小分子RNA,其功能是负调控基因表达^[2]。研究表明miRNA可以抑制重要的肿瘤相关基因的表达,可能在癌症的诊断和治疗中起重要作用^[3]。本实验室前期研究表明,与p53肿瘤抑制网络密切相关的microRNA-34(miR-34)家族成员microRNA-34a能抑制葡萄膜黑色素瘤细胞的生长和迁移^[4],但其抑制细胞生长的原因尚不完全明确。本研究在以往研究的基础上,通过阳离子脂质体介导的方法将miR-34a转染入人葡萄膜黑色素瘤细胞,并应用BrdU法、细胞平板克隆形成实验,探讨miR-34a对细胞增殖的影响;采用流式细胞技术分析细胞周期的改变;检测caspase-3/7酶活性分析细胞凋亡,更深入地分析miR-34a对葡萄膜黑色素瘤细胞增殖的影响。阿霉素(Adriamycin, ADR)是常见的肿瘤治疗药物,能诱导某些肿瘤中的miRNA的表达^[5,6]。本文利用Real-time PCR及caspase-3/7酶活性检测,探讨阿霉素与miR-34a之间的联系。

1 材料与方法

1.1 实验对象

人葡萄膜黑色素瘤细胞分离自白种人葡萄膜黑色素瘤患者,经体外培养所得细胞株^[4](人葡萄膜黑色素瘤细胞M23由美国纽约大学附属眼耳医院胡

诞宁教授惠赠;人葡萄膜黑色素瘤细胞株SP6.5由加拿大魁北克免疫学研究中心惠赠)。

1.2 实验材料

DMEM(Dulbecco Modified Eagle's Medium)培养基和胎牛血清FBS (Invitrogen公司),胰蛋白酶(Invitrogen公司), Lipofectamine 2000(Invitrogen公司), miRNA由Ambion公司合成^[4](阴性对照为随机序列RNA Oligo; miR-34a序列为: 5'-UGG CAG UGU CUU AGC UGG UUG UU-3'), BrdU细胞增殖分析试剂盒(Roche公司, Cat. No.11444611001), 细胞周期分析试剂盒(BD公司), caspase-3/7酶活性检测试剂盒(Promega公司, Cat. No.G7790), 阿霉素(Sigma公司), Real-time PCR所有试剂及探针(Cat. No.4427975)均购自美国ABI公司。SpectraMax M5酶标仪(Molecular Devices公司), 流式细胞仪(BD公司), 7500 型荧光实时定量PCR仪(ABI公司)。

1.3 细胞培养

人葡萄膜黑色素瘤细胞M23、SP6.5均用含10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养液,置37℃、5% CO₂培养箱中培养,细胞接近融合时用胰蛋白酶消化传代,同时接种细胞进行实验。

收稿日期: 2011-01-13 接受日期: 2011-03-07

浙江省自然科学基金(No.Y2080853)资助项目

*通讯作者。Tel: 0577-88067930, E-mail: wjiao@wzmc.edu.cn

1.4 转染

将对数生长期的M23、SP6.5细胞接种于多孔培养板, 根据Lipofectamine 2000转染说明书, 配制转染液: 无血清、无双抗的DMEM培养液中混合适量人工合成的miRNA和Lipofectamine, 室温放置15 min后, 每孔转染50 nmol/L的miR-34a, 37 °C、5% CO₂培养箱中孵育培养。以相同方法转染随机序列RNA Oligo作为阴性对照(negative control, NC)。

1.5 5-溴-2-脱氧尿苷(BrdU)掺入法检测细胞增殖

取对数生长期的细胞M23、SP6.5均匀接种于96孔板中, 每孔100 μ l, 约 3×10^3 个细胞, 每组设6个复孔。次日按上述方法转染miR-34a或NC后培养72 h, 加入BrdU(终浓度为10 μ mol/L)继续培养2 h, 固定液-20 °C固定30 min, 核酸酶37 °C孵育30 min, Anti-BrdU-POD 37 °C孵育30 min, 过氧化物酶底物室温孵育显色, 酶标仪405/490 nm检测吸光度值, 即BrdU检测值。

1.6 细胞平板克隆形成实验

接种对数生长期的M23、SP6.5细胞至24孔板, 每孔细胞数 3×10^4 个。次日按上述方法转染miR-34a或NC, 转染24 h后收集细胞, 用血球计数板进行细胞计数。接种各样本细胞至6孔板, 每孔细胞数800个, 分布均匀, 继续培养10天, 出现肉眼可见的克隆后终止培养, 用4%多聚甲醛固定15 min, 结晶紫染液染色5 min, 洗净晾干, 拍照记录。

1.7 流式细胞仪测定细胞周期

取对数生长期的细胞M23、SP6.5均匀接种于6孔板中, 每孔细胞数 3×10^5 个, 次日按上述方法转染miR-34a或NC, 48 h后收集细胞, 70%乙醇4 °C固定过夜, 碘化丙啶(PI)4 °C避光染色30 min, 400目滤布过滤, 流式细胞仪检测细胞周期分布, 每样本获取30 000个细胞, Modfit软件分析细胞周期各时期的百分率。

1.8 caspase-3/7酶活性检测

接种对数生长期的M23、SP6.5细胞于96孔板中, 每组设6个复孔, 次日按上述方法转染miR-34a或NC, 48 h后根据caspase-3/7酶活性检测试剂盒说明书, 裂解细胞, 释放caspase-3/7酶, 加入底物(Z-DEVD-R110)室温避光反应2 h, 酶标仪检测荧光强度, 激发光499 nm, 发射光521 nm。

1.9 Real-time PCR

取对数生长期的细胞M23、SP6.5均匀接种于6孔板中, 每孔细胞数 5×10^5 个, 次日加入药物ADR, 终浓度1 μ g/ml, 另设空白对照不加ADR, 继续培养24 h、48 h分

批收集细胞, 提取并纯化样本RNA。根据Superscript III First Strand Kit方法逆转录合成cDNA; Real-time PCR用FAM标记探针方法, 以U6为内参。Real-time PCR反应体系为25 μ l, 扩增条件为: 50 °C预热2 min, 95 °C预变性10 min, 95 °C变性15 s, 60 °C退火延伸60 s, 体系反应40个循环。

1.10 阿霉素处理后caspase-3/7酶活性检测

接种和转染细胞(同1.8), 转染24 h后加药物ADR, 终浓度1 μ g/ml, 继续培养, 药物作用24 h后按1.8中的方法步骤检测caspase-3/7酶活性。

1.11 统计学方法

统计学分析采用SPSS 16.0, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两两比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BrdU掺入法检测细胞增殖

与阴性对照NC相比, 转染miR-34a之后M23细胞数减少(16.96 ± 3.11)%, SP6.5细胞数减少(17.68 ± 1.12)%, $P < 0.01$ (图1)。转染miR-34a的细胞数明显减少, 提示miR-34a可以显著抑制DNA的合成, 抑制葡萄膜黑色素瘤细胞的增殖速度。

2.2 细胞平板克隆形成实验结果

转染miR-34a的M23和SP6.5细胞克隆较阴性对照NC的细胞克隆, 数目明显减少且大小明显减小(图2)。因此, miR-34a不仅仅是抑制葡萄膜黑色素瘤细胞的增殖速度, 同时也影响其克隆形成能力。

2.3 流式细胞仪检测细胞周期

由图3可知, 转染NC的M23细胞分布为G₀/G₁期47.64%, 而转染了miR-34a的M23细胞G₀/G₁期

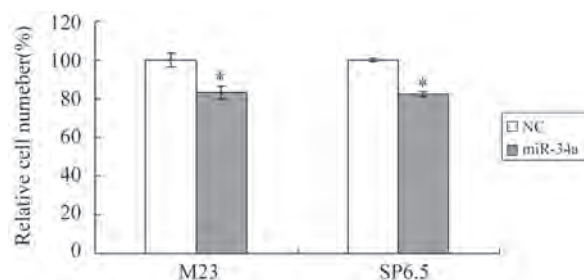


图1 BrdU法检测转染miR-34a后抑制葡萄膜黑色素瘤细胞增殖
纵坐标表示相对细胞数百分比, * $P < 0.01$ 。

Fig.1 miR-34a inhibited the proliferation of uveal melanoma cells by BrdU

Y-axis means relative cell number, * $P < 0.01$.

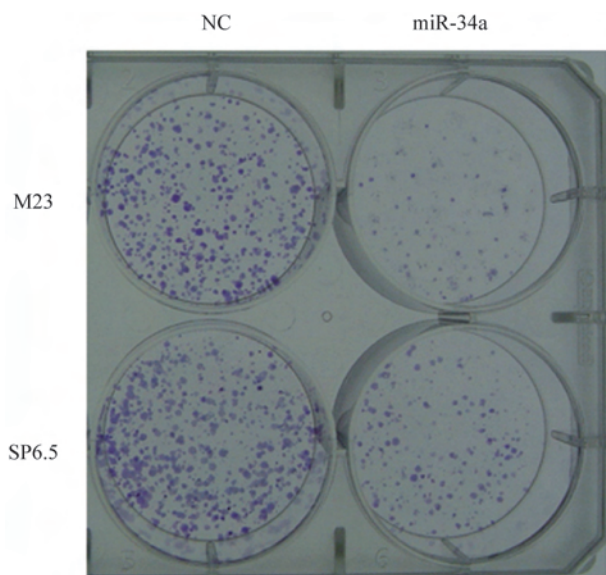


图2 M23和SP6.5细胞转染miR-34a或NC后克隆形成图
Fig.2 Colony formation of M23 and SP6.5 cells after transfection of miR-34a or NC

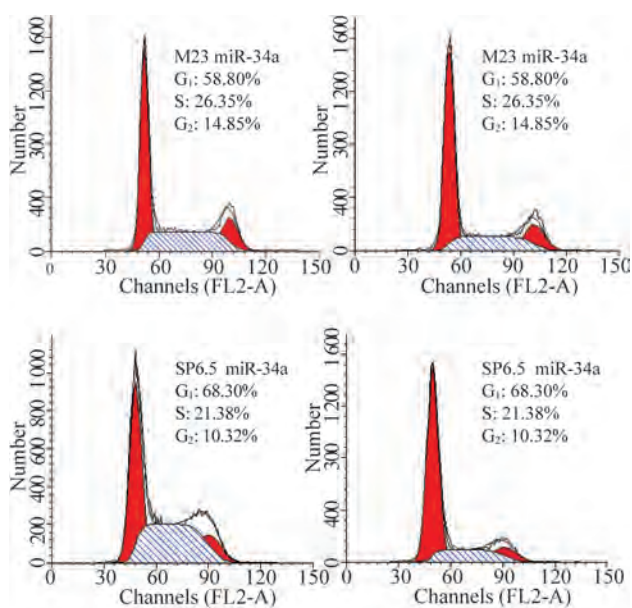


图3 M23和SP6.5细胞转染miR-34a或NC后细胞周期分布
Fig.3 Cell cycle analysis of M23 and SP6.5 cells after transfection of miR-34a or NC

为58.80%。转染NC的SP6.5细胞分布为G₀/G₁期42.94%，而转染了miR-34a的SP6.5细胞G₀/G₁期为68.30%。结果提示：转染了miR-34a的M23和SP6.5细胞滞留在G₀/G₁期的细胞数明显增多，S期和G₂/M期细胞减少。这表明miR-34a能有效阻滞葡萄膜黑色素瘤细胞周期进程于G₀/G₁期。

2.4 caspase-3/7酶活性检测

如图4所示，M23、SP6.5细胞转染miR-34a后，caspase-3/7酶活性与阴性对照NC相比无明显改变，数据无统计学差异，提示miR-34a并不直接诱导肿瘤细胞凋亡。

2.5 Real-time PCR检测阿霉素处理后细胞中miR-34a的表达

经Real-time PCR检测，得出miR-34a的相对表达量(图5)：M23细胞经ADR处理24 h，miR-34a的表达量上调(3.61±0.016)倍，48 h则差异更为显著，上调(5.61±0.035)倍，具有统计学意义($P<0.01$)；SP6.5细胞经ADR处理48 h后，miR-34a的表达量亦上调(2.156±0.043)倍，有显著性差异($P<0.01$)。

2.6 阿霉素处理后caspase-3/7酶活性检测

转染miR-34a的M23、SP6.5细胞，经ADR处理后，

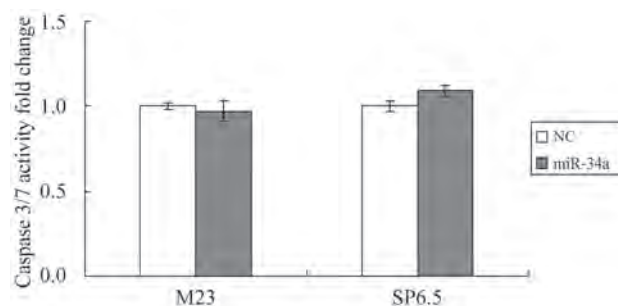


图4 M23和SP6.5细胞转染miR-34a或NC后caspase-3/7酶活性检测

Fig.4 The activity of caspase-3/7 of M23 and SP6.5 cells after transfection of miR-34a or NC

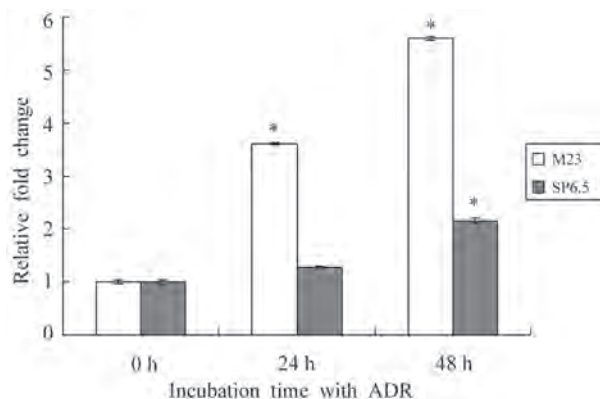


图5 ADR处理M23、SP6.5细胞诱导miR-34a的表达
纵坐标为miR-34a的相对表达量，横坐标为ADR处理的时间，* $P<0.01$ 。

Fig.5 The expression of miR-34a in M23 and SP6.5 cells after treatment with ADR

Y-axis means relative fold change, X-axis means the incubation time with ADR, * $P<0.01$.

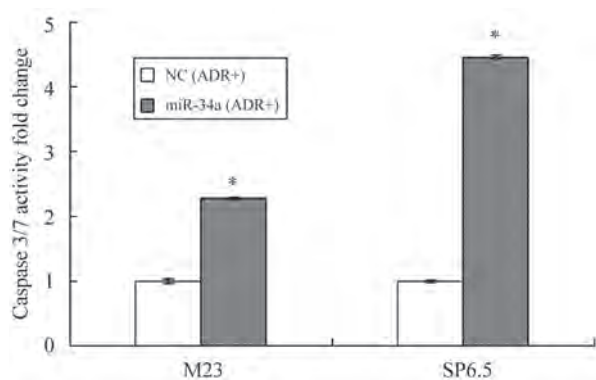


图6 转染miR-34a或NC的M23和SP6.5细胞经ADR处理后caspase-3/7酶活性检测

纵坐标为caspase-3/7酶活性的相对荧光表达量, * $P < 0.01$ 。

Fig.6 The activity of caspase-3/7 of M23 and SP6.5 cells after miR-34a transfection and treatment with ADR

Y-axis means caspase-3/7 activity fold change, * $P < 0.01$ 。

caspase-3/7酶活性较转染NC的细胞明显增加: M23增加(2.28 ± 0.02)倍, SP6.5增加(4.46 ± 0.027)倍, $P < 0.01$ (图6)。此结果提示miR-34a能够增加肿瘤细胞对ADR的敏感性, 而加剧细胞凋亡。

3 讨论

葡萄膜黑色素瘤是成人眼内最常见的原发性恶性肿瘤, 恶性程度高, 其治疗方式主要基于局部控制治疗, 而无针对性的个性化治疗, 预后差^[1]。miRNA是一类生物内源性的非编码蛋白质的小分子RNA, 是一类基因调控因子, 广泛存在于真核生物细胞内, 参与众多生物的生长、代谢等生命过程, 其异常表达与多种肿瘤的发生发展相关^[2,3]。miR-34家族是抑癌基因p53的直接转录靶标, 调控细胞周期、DNA修复和细胞凋亡^[5]。miR-34a是miR-34家族的重要成员之一。研究表明, miR-34a能够抑制某些肿瘤增殖, 促进肿瘤细胞凋亡^[7]。

细胞增殖是通过细胞分裂来实现的, 细胞分裂周期包括DNA合成前期(G₁期)、DNA合成期(S期)、DNA合成后期(G₂期)和分裂期(M期)这整个细胞分裂过程^[8]。其中G₁期的长短在很大程度上决定了细胞周期的长短, 即细胞增殖的速度。本研究通过基因转染技术, 将miR-34a导入葡萄膜黑色素瘤细胞中, 继而采用流式细胞技术检测细胞周期, 结果显示转染miR-34a后葡萄膜黑色素瘤细胞在G₁期出现明显的滞留。此结果亦与BrdU检测结果相符, 表明miR-34a能够通过抑制

细胞周期而抑制葡萄膜黑色素瘤细胞的增殖。

细胞凋亡是机体细胞的一种程序性死亡, 其信号传导通路中caspase家族起着核心作用。Caspase-3/7是caspase家族中的重要成员, 激活后通过凋亡的级联反应引起细胞凋亡^[9]。多数的抗肿瘤治疗都是通过激活凋亡通路引发细胞凋亡而达到治疗效果的。而凋亡抵抗是肿瘤细胞的标志之一, 肿瘤细胞通过异常表达抗凋亡蛋白等机制产生凋亡抵抗^[10], 这与抗肿瘤治疗效果直接相关, 是引起临床上治疗失败的重要原因。因此, 逆转肿瘤细胞的凋亡抵抗, 增强肿瘤细胞对凋亡诱导剂的敏感性尤为重要。

本研究发现M23、SP6.5细胞转染miR-34a后, caspase-3/7酶活性与阴性对照NC相比无明显改变, 表明miR-34a不直接诱导葡萄膜黑色素瘤细胞发生凋亡。另外, 阿霉素属蒽环类抗生素, 是一种常见的肿瘤治疗药物, 而部分肿瘤对阿霉素能产生凋亡抵抗^[6]。有研究发现阿霉素可以激活抑癌基因p53的表达, 而miR-34a是p53的直接转录靶标之一^[5,6]。本研究通过Real-time PCR检测, 发现阿霉素可以诱导葡萄膜黑色素瘤细胞中miR-34a的表达。同时, 我们发现转染后, 实验组和对照组均经阿霉素处理, caspase-3/7酶活性显著增加。表明miR-34a虽不直接诱导细胞凋亡, 但能够增强肿瘤细胞对阿霉素的敏感性, 加剧肿瘤细胞的凋亡。而miR-34a与阿霉素共同作用时的机制, 还需作进一步深入研究。

综上所述, miR-34a通过抑制细胞周期来抑制体外培养的人葡萄膜黑色素瘤细胞的增殖, 并且能够增加细胞对药物阿霉素的敏感性。其结构简单, 合成方便, 预期在肿瘤诊断和治疗中将发挥更大的作用。其功能和分子机制的研究, 将为肿瘤的基因治疗提供新的思路。

参考文献(References)

- Hurst EA, Harbour JW, Cornelius LA. Ocular melanoma: A review and the relationship to cutaneous melanoma. Arch Dermatol 2003; 139(8): 1067-73.
- He L, Hannon GJ. MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. Nat Rev Genet 2004; 5(7): 522-31.
- Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. Nat Genet 2007; 39(5): 673-7.
- Yan DS, Zhou XT, Chen XY, Hu DN, Dong XD, Wang J, et al. MicroRNA-34a inhibits uveal melanoma cell proliferation and

- migration through downregulation of c-Met. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(4): 1559-65.
- 5 He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, *et al.* A microRNA component of the *p53* tumour suppressor network. *Nature* 2007; 447(7148): 1130-4.
- 6 Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa MC. New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(6): 1425-38.
- 7 Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, *et al.* Transactivation of miR-34a by *p53* broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell* 2007; 26(5): 745-52.
- 8 Viallard JF, Lacombe F, Belloc F, Pellegrin JL, Reiffers J. Molecular mechanisms controlling the cell cycle: Fundamental aspects and implications for oncology. *Cancer Radiother* 2001; 5(2): 109-29.
- 9 Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin* 2005; 37(11): 719-27.
- 10 Lee S, Schmitt CA. Chemotherapy response and resistance. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13(1): 90-6.

The Mechanism of MicroRNA-34a-mediated Inhibition of Human Uveal Melanoma Cell Proliferation

Jiao Wang*, Lin-Hua Chen, Zhong-Lou Zhou, Xiao-Yan Chen

(School of Ophthalmology and Optometry, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China)

Abstract MicroRNA-34a was transfected into uveal melanoma cells M23 and SP6.5 by lipofectamine. The proliferation of uveal melanoma cells was examined by BrdU and colony-forming assay, respectively, and transfection of microRNA-34a into uveal melanoma cells led to a significant decrease in cell growth ($P < 0.01$). Flow cytometry was applied to analyze cell cycle and these cells were found to have a higher proportion of cell cycle arrest at the G_1 phase. The activity of caspase-3/7 had no significant changes. In addition, the expression of microRNA-34a in uveal melanoma cells after treatment with adriamycin was upregulated based on real-time PCR ($P < 0.01$). The activity of caspase-3/7 increased significantly after microRNA-34a transfection and treatment with adriamycin ($P < 0.01$). These results indicate that microRNA-34a inhibits proliferation of uveal melanoma cells by cell cycle arrest. Furthermore, microRNA-34a increases cell sensitivity to adriamycin, but doesn't induce apoptosis directly.

Key words MicroRNA-34a; uveal melanoma; proliferation; cell cycle; adriamycin

Received: January 13, 2011 Accepted: March 7, 2011

This work was supported by Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (No.Y2080853)

*Corresponding author. Tel: 86-577-88067930, E-mail: wjiao@wzmc.edu.cn