

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.10.021

miR-135a 与前列腺癌细胞增殖相关因子信号转导及转录激活因子 6 的相关性研究

赵宇明,张悦,王华,田宝,郭冬梅
(河北省秦皇岛市第一医院 066000)

摘要:目的 探讨 miR-135a 与前列腺癌细胞增殖相关因子信号转导及转录激活因子(STAT6)的相关性。方法 选取前列腺癌 DU145 细胞,随机分为 miR-135a 转染组和空白转染组,miR-135a 转染组细胞转染 miR-135a 序列,空白转染组转染空白序列,采用 MTT 法检测细胞增殖情况,流式细胞仪检测细胞周期,采用 Transwell 细胞迁移侵袭实验检测细胞迁移和侵袭能力,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 p-STAT6 和 STAT6 蛋白表达,实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测 miR-135a 表达。结果 转染后 48 h,miR-135a 转染组 miR-135a 相对表达量为(0.932±0.061),明显高于空白转染组($P<0.05$);miR-135a 转染组培养 24、48 h 的 OD 值分别为(0.210±0.045)和(0.281±0.052),明显低于空白转染组($P<0.05$);miR-135a 转染组 G₀/G₁ 期细胞比例为(60.02±6.39)%,明显高于空白转染组($P<0.05$);miR-135a 转染组迁移细胞数和侵袭细胞数分别为(116.93±30.02)个和(133.02±28.51)个,明显低于空白转染组($P<0.05$);miR-135a 转染组 p-STAT6 和 STAT6 蛋白相对表达量分别为(0.947±0.114)和(0.437±0.077),明显低于空白转染组($P<0.05$)。结论 miR-135a 可抑制前列腺癌细胞增殖、迁移及侵袭能力,可能与其抑制前列腺癌细胞 STAT6 表达有关。

关键词:前列腺癌; miR-135a; 信号转导及转录激活因子 6; 转染

中图法分类号:R394

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)10-1441-04

The correlation between miR-135a and prostate cancer cell proliferation related factor STAT6

ZHAO Yuming, ZHANG Yue, WANG Hua, TIAN Bao, GUO Dongmei
(First Hospital of Qinhuangdao City, Qinhuangdao, Hebei 066000, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between miR-135a and signal transducer and activator of transcription-6 (STAT6) of prostate cancer cell proliferation related factors. **Methods** Prostate cancer DU145 cells were divided into miR-135a transfection group and blank transfection group randomly, miR-135a transfection group cells were transfected with miR-135a sequence, and blank transfection group was transfected into blank sequence, cell proliferation was detected by MTT assay, and cell cycle was detected by flow cytometry; Transwell cell migration and invasion assay was used to detect the migration and invasion ability of cells, and the expression of p-STAT6 and STAT6 protein was detected by Western blot, miR-135a expression was detected by RT-PCR. **Results** After transfection 48 h, the expression of miR-135a in miR-135a transfection group was (0.932±0.061), which was significantly higher than that in the blank transfection group ($P<0.05$); miR-135a transfection group cultured 24 h and 48 h OD values were (0.210±0.045) and (0.281±0.052), significantly lower than the blank transfection group ($P<0.05$); The percentage of G₀/G₁ cells in the miR-135a transfection group was (60.02±6.39)%, which was significantly higher than that in the blank transfection group ($P<0.05$); the number of transfected cells and the number of invasive cells in miR-135a transfection group were (116.93±30.02) and (133.02±28.51), significantly lower than those in blank transfection group ($P<0.05$); the relative expression of p-STAT6 and STAT6 protein in miR-135a transfection group were (0.947±0.114) and (0.437±0.077), which was significantly lower than that in the blank transfection group ($P<0.05$). **Conclusion** MiR-135a can inhibit the proliferation, migration and invasion of prostate cancer cells, which may be related to its inhibition of STAT6 expression in prostate cancer cells.

Key words: prostate cancer; miR-135a; signal transducer and activator of transcription 6; transfection

前列腺癌是一种常见的泌尿系统恶性肿瘤,多发于老年患者,且病死率较高,是目前导致男性癌症病死的主要原因之一^[1-2]。随着我国老龄化的不断加重,前列腺癌患者的发病率也持续增高,给家庭和社会带来了沉重的负担,如何控制癌细胞的转移和扩散并提高肿瘤治疗的效果,对改善患者的预后具有重要的临床意义^[3-4]。多项研究表明,微小RNA(miRNA)可能在基因表达调控领域起重要作用,而多种 miRNA 均参与肿瘤的发生、发展和转移过程^[5-6]。为了进一步探讨 miR-135a 与前列腺癌细胞增殖相关因子信号转导及转录激活因子(STAT6)的相关性,现对前列腺癌 DU145 细胞分别转染 miR-135a 序列和空白序列后的细胞增殖情况、细胞周期、迁移和侵袭能力,以及 p-STAT6 和 STAT6 蛋白表达、miR-135a 表达水平进行检测分析,为临床提供一定的治疗理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 人激素非依赖前列腺癌细胞株 DU145 购自中国科学院上海生命科学研究细胞资源中心。

1.2 仪器与试剂 (1)HR22 型高速冷冻离心机(日本日立),FS-7900 型 PCR 仪(美国应用生物系统公司),Gel Doc 1000UV 型分子定量成像系统(美国 BIO-RAD 公司),Napco-541 型二氧化碳培养箱(美国),IX70 型倒置相差显微镜(日本奥林巴斯),880 型酶标仪(德国拜发)。(2)胎牛血清、DMEM 培养基、F12K-DMEM 培养基、胰蛋白酶、青霉素、链霉素均购自美国 Gibco 公司;Mature miRNA-135a 和 miRNA Negative Control(NC)均购自上海吉玛公司;Trizol 提取试剂盒、逆转录试剂盒、RT-PCR 试剂盒均购自美国 Epitomics 公司;脂质体(Lipofectamine)2000 购自 Invitrogen 公司。CCK-8 试剂盒购自碧云天试剂公司;侵袭(Transwell)小室购自美国 Corning 公司;鼠抗人 STAT6、p-STAT6 1 抗和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔、抗鼠 2 抗均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)购自美国 Bio Sharp 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 DU145 细胞株采用含 10% 胎牛血清、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素双抗的 F12K-DMEM 培养基,在 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中进行培养,待细胞密度约 80% 时进行传代培养,取指数生长期细胞进行实验。

1.3.2 细胞转染 采用脂质体瞬时转染法进行转染:取对数期生长的细胞株接种于 6 孔培养板中,加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基进行培养,待贴壁细胞生长至 60%~70% 融合后利用 Lipo-

fectamine 2000 转染试剂分别转染 has-miR135a 序列(miR-135a 转染组)及 NC 序列(空白转染组),转染终浓度为 50 mmol/L,严格按照说明书进行操作,转染结束后加培养基增殖培养 48 h。

1.3.3 MTT 检测细胞增殖 分别于转染 48 h 后取各组细胞悬液利用胰蛋白酶进行消化,加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基进行培养,并于培养 0、24、48 h 时取各组细胞悬液加入 MTT (5 mg/mL) 孵育 4 h,随后加入 DMSO 进行溶解并沉淀,使用酶标仪在 490 nm 波长测定各孔的吸光值(A),观察各组细胞增殖情况,每组实验重复 3 次。

1.3.4 流式细胞仪检测细胞周期 分别于转染 48 h 后取各组细胞悬液,应用胰蛋白酶进行消化,1 000 r/min 离心 15 min 后收集细胞沉淀,以 PBS 洗涤 2 次加入预冷 75% 乙醇在 -20 $^\circ\text{C}$ 条件下固定 24 h,1 000 r/min 离心 15 min 弃上清液,最后加入 500 μL 细胞周期固定液重悬细胞,4 $^\circ\text{C}$ 避光孵育 30 min,使用流式细胞仪测定细胞周期。

1.3.5 Transwell 细胞迁移侵袭实验 先以无血清培养基 37 $^\circ\text{C}$ 润湿 Transwell 小室 2 h,将转染 48 h 的各组细胞采用胰酶消化后计数,选取 1×10^6 个细胞以无血清的 RPMI 1640 培养液进行重悬并接种于上室,下室中仅加入 10% 的完全培养基,37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养 48 h。取出滤膜后以 10% 多聚甲醛固定,苏木红染色在光镜下观察,计数穿膜细胞数,取其均值代表迁移力量值。

1.3.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)实验 取转染后培养 48 h 的各组细胞,洗去培养基后提取总蛋白,并取约 75 μg 以 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),分离后转移至孔径为 0.45 μm 的聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,置于 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h;加入 STAT6 和 p-STAT6 1 抗后 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜,0.5% TBS-T 溶液洗膜 3 次后再加入 LRH 标记的 2 抗进行反应,0.5% TBS-T 溶液洗膜 3 次,使用化学发光法进行显色,并采用软件进行灰度值分析,计算各目标蛋白与 β -actin 的灰度比值。

1.3.7 RT-PCR 实验 取各组转染后培养 48 h 的细胞,采用 Trizol 提取试剂盒提取总 RNA,使用逆转录试剂盒逆转录为 DNA,在聚合酶作用下进行扩增,扩增引物为上游:5'-CCG ACG CGT TCT TTT CTG TTG CCC CAT C-3';下游:5'-CCC AAG CTT GGA CCG CAG CAC CTA TCT-3'。扩增条件:95 $^\circ\text{C}$ 5 min 后以 95 $^\circ\text{C}$ 15 s 变性、60 $^\circ\text{C}$ 、60 s 退火、72 $^\circ\text{C}$ 5 min 30 s 延伸,此为 1 个循环,共 40 个循环,电泳后进行 RT-CPR 测定,获得 miR-135a 的表达水平。严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较使用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组转染 DU145 细胞的 miR-135a 表达结果比较 转染后 48 h, miR-135a 转染组 miR-135a 相对表达量为 (0.932 ± 0.061) , 明显高于空白转染组 (0.023 ± 0.002) ($t = 36.482, P < 0.05$)。

2.2 2 组 miR-135a 对 DU145 细胞的增殖能力结果比较 miR-135a 转染组培养 24、48 h 的 OD 值分别为 (0.210 ± 0.045) 、 (0.281 ± 0.052) , 明显低于空白转染组 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 2 组 DU145 细胞不同时间点 OD 值结果比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	0 h	24 h	48 h
miR-135a 转染组	0.022 ± 0.006	0.210 ± 0.045	0.281 ± 0.052
空白转染组	0.021 ± 0.008	0.313 ± 0.033	0.562 ± 0.078
<i>t</i>	0.245	-4.521	-13.951
<i>P</i>	>0.05	<0.05	<0.05

2.3 2 组 miR-135a 对 DU145 细胞周期影响的结果比较 miR-135a 转染组 G₀/G₁ 期细胞比例为 $(60.02 \pm 6.39)\%$, 明显高于空白转染组 $(45.34 \pm 7.22)\%$ ($t = 3.730, P < 0.05$)。

表 2 2 组 DU145 细胞迁移和侵袭的结果比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	迁移细胞数(个)	侵袭细胞数(个)
miR-135a 转染组	116.93 ± 30.02	133.02 ± 28.51
空白转染组	189.31 ± 42.11	170.04 ± 24.02
<i>t</i>	-3.428	-2.432
<i>P</i>	<0.05	<0.05

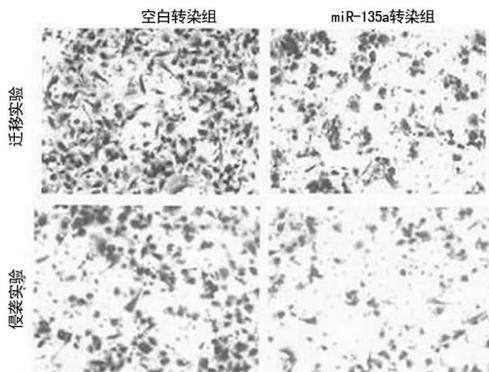
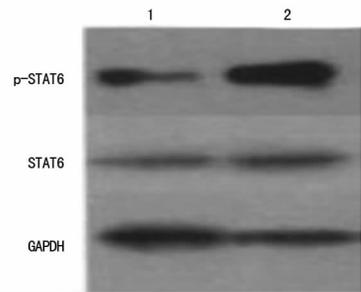


图 1 Transwell 细胞迁移和侵袭图

2.4 2 组 miR-135a 对 DU145 细胞迁移和侵袭的结果比较 miR-135a 转染组迁移细胞数和侵袭细胞数分别为 (116.93 ± 30.02) 个和 (133.02 ± 28.51) 个, 明显低于空白转染组 ($P < 0.05$)。见表 2 和图 1。

2.5 2 组 miR-135a 对 DU145 细胞 STAT6 表达影响的结果比较 miR-135a 转染组 p-STAT6 和 STAT6 蛋白相对表达量分别为 (0.947 ± 0.114) 和 (0.437 ± 0.077) , 明显低于空白转染组 [(1.320 ± 0.104) 和 (0.783 ± 0.095)] ($t = -5.757, -6.931, P < 0.05$)。见图 2。



注: 1 表示 miR-135a 转染组; 2 表示空白转染组

图 2 Western blot 检测图

3 讨论

前列腺癌是指发生在前列腺的上皮性恶性肿瘤, 包括腺癌、导管腺癌、尿路上皮癌、鳞状细胞癌、腺鳞癌等, 其中前列腺癌占 95% 以上^[7-8]。随我国老龄化人口的加重, 前列腺癌的发病率也逐渐上升, 其病死率较高, 现已成为危害男性健康的首位肿瘤^[9]。前列腺癌的具体发病原因和机制尚不完全清楚, 一般认为与遗传因素有关; 且前列腺癌多侵袭膀胱、精囊、血管神经束等, 并可通过盆腔淋巴结转移引起双下肢水肿, 部分患者还会发生骨转移, 给临床治疗造成难度^[10-11]。miRNA 是一类重要的内源性单链非编码小 RNA 分子, 可调控细胞生物的发育、增殖、分化、代谢、凋亡、应激等过程, 通过与靶 mRNA 的互补配对而在转录后水平上对基因表达进行负调控, 导致 mRNA 的降解和翻译抑制^[12]。越来越多的研究表明, miRNA 与肿瘤的发生、发展等过程密切相关, 但目前对于 miRNA 在前列腺癌中的发病机制研究较少^[13]。miR-135a 是 miR-135 家族的重要成员之一, 具有促进细胞凋亡和抑制细胞增殖的作用, 其在多种肿瘤的发生、发展中发挥了重要的调控作用。有研究报道, miR-135a 促进细胞凋亡和抑制细胞增殖的作用是通过 JAK2 (Janus kinase 2) 及相关通路 (JA-STAT) 的调控而实现, 但具体机制仍需作进一步的研究^[14]。

本研究结果表明, 转染 48 h 后 miR-135a 转染组 miR-135a 相对表达量明显高于空白转染组 ($P < 0.05$), 提示 miR-135a 转染组细胞 miR-135a 明显高表达。通过 MTT 检测细胞增长率发现, miR-135a 转染组培养 24、48 h 的 OD 值明显低于空白转染组 ($P < 0.05$), 提示 miR-10a 高表达可抑制肿瘤的增长。通过流式细胞仪测定细胞周期显示, miR-135a 转染组

G₀/G₁ 期细胞比例为明显高于空白转染组 ($P < 0.05$), 说明 miR-135a 可显著地阻滞 DU145 细胞周期, 进一步抑制肿瘤细胞的生长。侵袭实验发现, miR-135a 转染组迁移细胞数和侵袭细胞数分别明显低于空白转染组 ($P < 0.05$), 提示 miR-135a 与前列腺癌细胞的侵袭和迁移高度相关, 其高表达可抑制细胞的侵袭和迁移, 但其具体机制仍需作进一步的深入研究。

STAT6 是一种相对分子质量约为 94×10^3 的蛋白质, 属于 STAT 家族, 可通过 JAK-STAT 信号转导途径介导多种细胞因子的活化, 进而参与多种疾病的发生和发展。有研究报道, STAT6 是 miR-135a 的潜在靶基因, 可能与 miR-135a 抑制癌细胞增殖、迁移、侵袭等机制有关, 与本研究的研究结果基本一致^[15]。本研究结果表明, miR-135a 转染组 p-STAT6 和 STAT6 蛋白相对表达量均明显低于空白转染组 ($P < 0.05$), 说明 miR-135a 高表达可抑制前列腺癌细胞 STAT6 蛋白的表达, 而这可能是 miR-135a 抑制前列腺癌细胞增殖、迁移、侵袭的机制之一, 但具体机制仍需作进一步的实验。

综上所述, miR-135a 可抑制前列腺癌细胞增殖、迁移、侵袭的能力, 可能与其抑制前列腺癌细胞 STAT6 表达有关。

参考文献

[1] GUZEL E, KARATAS O F, SENERCIOZ A, et al. Identification of microRNAs differentially expressed in prostatic secretions of patients with prostate cancer[J]. Internat J Cancer, 2015, 136(4): 875-879.

[2] YAM L T, WINKLER C F, JANCKILA A J, et al. Prostatic cancer presenting as metastatic adenocarcinoma of undetermined origin. Immunodiagnosis by prostatic acid phosphatase[J]. Cancer, 2008, 51(2): 283-287.

[3] 褚英, 沈碧玉. 前列腺癌睾丸切除患者围术期的常见护理问题与对策[J]. 实用临床医药杂志, 2015, 19(18): 164-

165.

[4] 曾蜀雄, 林建水, 许传亮, 等. 晚期前列腺癌治疗及其基因分型研究进展[J]. 中华泌尿外科杂志, 2015, 26(6): 478-480.

[5] 闫岩, 张春妮. 微小核糖核酸与肾细胞癌关系的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(1): 145-148.

[6] 兰敏. miR-370 在肿瘤中的作用及其机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2016, 23(2): 291-296.

[7] QUINN D I, SHORE N D, EGAWA S, et al. Immunotherapy for castration-resistant prostate cancer: progress and new paradigms[J]. Urol Oncol, 2015, 33(5): 245-260.

[8] 姜辰一, 俞俊杰, 阮渊, 等. LMO₂ 蛋白在前列腺基质细胞中介导的 IL-11、FGF-9 旁分泌促进前列腺癌细胞增殖与侵袭[J]. 中国癌症杂志, 2016, 26(11): 894-901.

[9] 吴敏, 赵红光, 李英华, 等. PET-CT 在前列腺癌诊断中的应用现状和展望[J]. 中国实验诊断学, 2015, 19(3): 513-516.

[10] 聂晓枫, 王增利. 腹腔镜下腹膜外保留血管神经束前列腺癌根治术对患者排尿及性功能的影响[J]. 中国性科学, 2016, 25(12): 14-17.

[11] 朱寅杰, 王艳青, 潘家骅, 等. 前列腺癌根治标本提示神经周围侵犯对预测前列腺癌进展和预后的价值[J]. 中华外科杂志, 2016, 54(3): 217-221.

[12] 张婷. miRNA-101 在肿瘤中的研究进展[J]. 肿瘤预防与治疗, 2016, 29(6): 339-342.

[13] 云林, 唐焕文. MicroRNA-124 对肿瘤发生发展影响研究进展[J]. 中国职业医学, 2016, 43(2): 227-229.

[14] 赵宇明. miR-135a 通过抑制 STAT6 表达及其磷酸化调控激素非依赖前列腺癌细胞增殖的研究[D]. 南京: 东南大学, 2013.

[15] 张彦兵, 王妍华, 郭亚焕, 等. miR-135b 促进肝癌细胞侵袭和转移[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(10): 1316-1321.

(收稿日期: 2017-11-06 修回日期: 2018-01-07)

(上接第 1440 页)

et al. p-mTOR expression is associated with better prognosis in luminal breast carcinoma[J]. J Clin Pathol, 2014, 67(11): 961-967.

[11] WEIGELT B, EBERLE C, COWELL C F, et al. Metaplastic breast carcinoma: more than a special type[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(3): 147-148.

[12] 周红, 陈东, 王伟, 等. 乳腺癌功能磁共振成像发展现状[J]. 中国临床医学影像杂志, 2015, 26(1): 47-49.

[13] 张涛涛, 杨晓棠. 乳腺肿瘤血管生成与 DCE-MRI 参数的

相关性研究[J]. 国际医学放射学杂志, 2016, 39(2): 142-145.

[14] 周礼金, 李晓杰, 纪婷. 磁共振动态增强 VIEWS 及弥散加权成像 DWI 在乳腺癌保乳术前评估的价值[J]. 中国 CT 和 MRI 杂志, 2015, 13(5): 74-76.

[15] 李富, 曾健, 李春燕, 等. 磁共振成像表观扩散系数对乳腺癌新辅助化疗的疗效评估[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(17): 66-69.

(收稿日期: 2017-11-24 修回日期: 2018-01-16)