

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.35.006

MicroRNA-199a 通过缺氧诱导因子 1 α 抑制胃癌细胞上皮间充质转化

郑 桁, 张 伟, 王 康

(四川省医学科学院/四川省人民医院胃肠外科, 成都 610072)

[摘要] **目的** 探讨微小 RNA-199a(miR-199a)调节缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)表达对缺氧状态下胃癌细胞上皮间充质转化(EMT)的影响及可能的机制。**方法** 低氧处理胃癌细胞 24 h,通过转染 si-HIF-1 α 和 miR-199a mimic,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)检测 miR-199a 的表达水平,蛋白质印迹法(Western blotting)检测 HIF-1 α 及相关 EMT 蛋白的变化,镜下观察胃癌细胞形态。**结果** 低氧处理后,能下调 miR-199a mRNA 表达,上调 HIF-1 α 和间叶细胞标志蛋白表达,下调 E-钙黏素(E-cadherin)蛋白表达。转染 miR-199a mimic 后能抑制 HIF-1 α 的蛋白表达,转染 si-HIF-1 α 和 miR-199a mimic 后能部分逆转低氧的作用,抑制 EMT 过程的发展。**结论** miR-199a 可能通过降低 HIF-1 α 的表达抑制缺氧状态下胃癌细胞的 EMT 过程的发生。

[关键词] 微小 RNA-199a;缺氧诱导因子-1 α ;缺氧;上皮间充质转化

[中图分类号] R735.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)35-4914-03

MicroRNA-199a inhibits EMT process in AGS cell by regulating HIF-1 α gene expression

Zheng Heng, Zhang Wei, Wang Kang

(Department of Gastrointestinal Surgery, Sichuan Academy of Medical Sciences/Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610072, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of microRNA-199a(miR-199a) on hypoxia epithelial-mesenchymal transition (EMT) of gastric carcinoma by regulating hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) gene expression and its probable mechanism. **Methods** After hypoxia for 24 h, si-HIF-1 α and miR-199a mimic were transfected to gastric cancer cells. The expression levels of miR-199 was detected by using quantitative real-time PCR. The levels of HIF-1 α and related protein in EMT were examined by Western blotting. Gastric cancer cell morphology were observed with an inverted microscope. **Results** After hypoxia, the expression levels of miR-199a mRNA and E-cadherin protein were decreased, and the expression levels of HIF-1 α and mesenchymal cell marker protein were increased. After transfection of miR-199a mimic, the expression of HIF-1 α was inhibited. Then, the transfection of si-HIF-1 α and miR-199a mimic could partially reverse the effect of hypoxia and inhibit the development of EMT process. **Conclusion** miR-199a could suppress the transition process and EMT process under hypoxia, it is may be achieved by down-regulating HIF-1 α gene expression.

[Key words] miR-199a; hypoxia inducible factor-1 α ; hypoxia; epithelial-mesenchymal transition

缺氧是所有实体肿瘤的共同特征,在肿瘤的起始和发展中起重要作用。缺氧时细胞内高表达的缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)可诱导肿瘤发生上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),促进肿瘤细胞异质化和肿瘤血管形成,从而参与肿瘤的浸润、转移。HIF-1 α 在胃癌组织中的表达明显高于癌旁组织,且 HIF-1 α 的表达与胃癌的分化程度、浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分期有关, HIF-1 α 可促进 EMT 的发生,从而促进胃癌的转移^[1]。EMT 是具有极性的上皮细胞转化为具有间质表型细胞的生物学过程,主要特征有细胞黏附分子表达减少、间质表型细胞标志物表达增加和转录因子表达上调。微小 RNA(microRNA, miR)作为一种非编码单链 RNA 在 EMT 的发生中也发挥了重要作用。研究发现,结肠癌中 miR-199a-5p 的下调可以活化 EMT 相关信号,促进结肠癌的转移和侵袭^[2]。本研究用 1% 氧气(O₂)处理胃癌细胞 AGS,模拟缺氧环境,观察缺氧对胃癌细胞 EMT 的影响,并以 miR-199a mimic 和 si-HIF-1 α 转染胃癌细胞,分析 EMT 标志蛋白的表达情况及细胞形态的变化,探讨 miR-199a 调控 HIF-1 α 表达参与缺氧状态下胃癌细胞 EMT 的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞及细胞培养 胃癌 AGS 细胞购自中国科学院上海生科院细胞中心(来源于 ATCC 细胞库)。细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液,加入 100 U/mL 青霉素和 100 g/mL 链霉素双抗,置于 37 °C、5% 二氧化碳(CO₂)的恒温培养箱中培养。

1.2 仪器与试剂 低氧培养箱购自美国 Thermo 公司。胎牛血清购自天津灏洋有限公司, RPMI1640 培养液购自美国 Hyclone 公司, lipofectAMINE2000 购自美国 Invitrogen 公司, miR-199a 和 U6 引物、miR-199a mimics、control mimics 和 si-HIF-1 α 由广州锐博合成, Trizol、逆转录试剂盒、SyberGreen 试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司,二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒、一抗二抗稀释液、超敏蛋白显影液、 β -actin 一抗、羊抗兔二抗购自碧云天生物技术所,兔抗人 HIF-1 α 、N-钙黏蛋白、E-钙黏蛋白、SNAIL 抗体购自美国 Abcam 公司。

1.3 方法

1.3.1 寡核苷酸和 siRNA 转染 按 LipofectAMINE2000 说明书操作,将 miR-199a mimics(50 nmol/L)、mimic 对照和 si-HIF-1 α (100 nmol/L)、si 对照分别转染至融合度为 50% 的胃

癌 AGS 细胞中,无血清培养液培养细胞 6 h 后更换为完全培养基继续培养 24 h,转染后细胞用于后续实验。

1.3.2 AGS 细胞中 miR-199a mRNA 表达的检测 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)检测 AGS 细胞中 miR-199a mRNA 的表达。收集不同分组的 AGS 细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 3 次,按 Trizol 试剂盒说明抽提细胞总 RNA,紫外分光光度计检测 RNA 水平和 260 与 280 nm 处的吸光度(A)值比值(A_{260}/A_{280}),取 100 ng 总 RNA 按逆转录试剂盒说明书合成 cDNA。以 cDNA 为模板加入 miR-199a 或 U6 上下游引物(由广州锐博合成),和 SybrGreen 进行 PCR 扩增。条件:第 1 步,95 °C 30 s;第 2 步,95 °C 5 s,60 °C 30 s,共 40 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值计算各样本中 miR-199a 的相对表达水平。实验重复 3 次。

1.3.3 HIF-1 α 及 EMT 相关标志蛋白的表达 采用蛋白质印迹法(Western blotting)检测 HIF-1 α 及 EMT 相关标志蛋白的表达。收集不同分组的 AGS 细胞,提取总蛋白,BCA 检测蛋白水平,按 40 g 计算蛋白质上样体积,8%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳后转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,5%脱脂牛奶室温封闭 1 h,一抗 4 °C 孵育过夜(HIF-1 α 稀释比例为 1 : 500,其余稀释比例为 1 : 1 000),Tris 缓冲生理盐水-吐温溶液(TBST)洗膜 3 次,二抗(抗兔 1 : 5 000, β -actin 为抗鼠二抗 1 : 5 000)室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,化学发光法显影。

1.3.4 倒置光学显微镜下观察 AGS 细胞形态 收集转染 control、1% O₂、+miR-199a mimics、+control mimics 处理后的 AGS 细胞,在倒置光学显微镜下随机选择 3 个视野($\times 200$),观察细胞的形态变化,并进行拍照。

1.4 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计软件对数据进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 低氧上调 HIF-1 α 的表达 1% O₂ 处理胃癌细胞 24 h 后,与常氧组比较,低氧可以诱导 HIF-1 α 表达,而 si-HIF-1 α 转染后能明显抑制 HIF-1 α 的表达,si 阴性对照组对 HIF-1 α 表达无明显影响,见图 1。

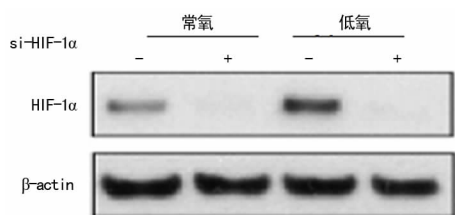


图 1 Western blotting 检测 HIF-1 α 表达

2.2 si-HIF-1 α 抑制胃癌 EMT 为了研究 HIF-1 α 对胃癌细胞 EMT 的影响,将 si-HIF-1 α 转染入 AGS 细胞内 48 h 后低氧处理 24 h,Western Blotting 检测胃癌细胞株 AGS 中上皮细胞标志物 E-钙黏素(E-cadherin)和间叶细胞标志物纤维连接蛋白(fibronectin)、波形蛋白(vimentin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)和 SNAIL 蛋白的表达。结果显示:与常氧组比较,低氧可诱导胃癌细胞间叶细胞标志物表达上调,而转染 si-HIF-1 α 后,间叶细胞标志物表达明显降低,E-cadherin 蛋白表达上调,见图 2。

2.3 低氧下调 miR-199a 的表达 1% O₂ 处理胃癌细胞 24 h 后,与常氧组比较,低氧可以下调 miR-199a mRNA 的表达,而转染 miR-199a mimic 后能明显上调 miR-199a 的表达,mimic 对照组对 miR-199a 表达无明显影响,见图 3。

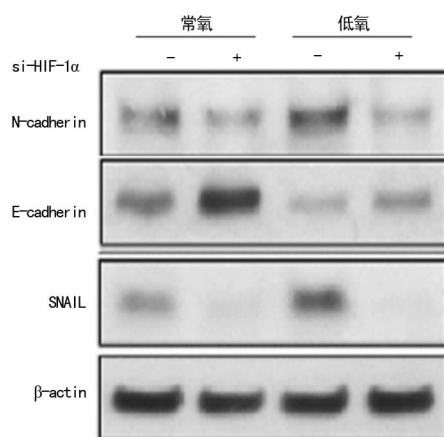
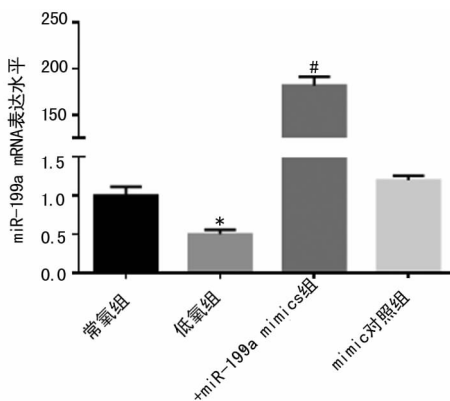


图 2 Western blotting 检测 EMT 相关蛋白表达



* : $P < 0.01$,与常氧组比较;# : $P < 0.01$,与低氧组比较; $n = 3$ 。

图 3 miR-199a mRNA 表达

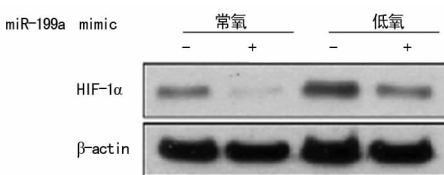


图 4 Western blotting 检测 HIF-1 α 表达

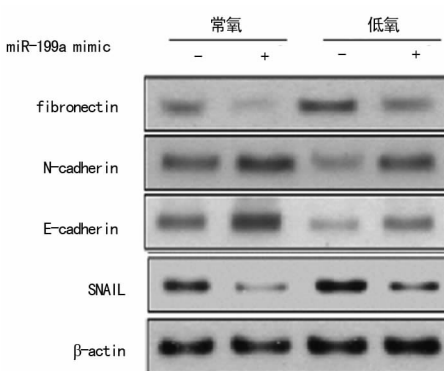
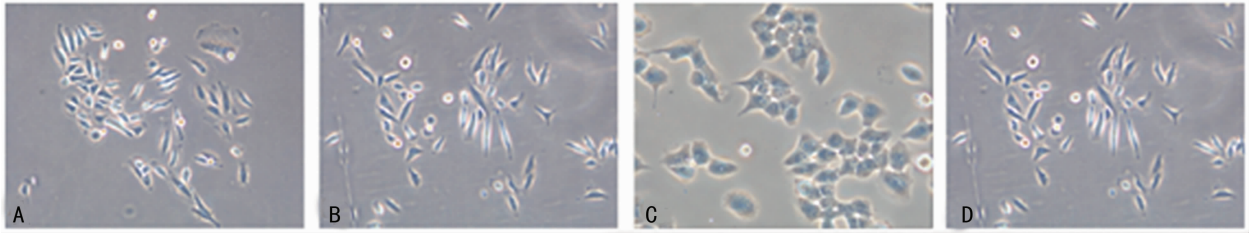


图 5 Western blotting 检测 EMT 相关蛋白表达

2.4 过表达 miR-199a 通过 HIF-1 α 抑制胃癌 EMT 实验证明,转染 miR-199a mimic 后能明显抑制 HIF-1 α 的表达,见图

4,并上调上皮细胞标志物 E-cadherin 蛋白水平,抑制间叶细胞标志物的表达。mimic control 组对上述蛋白表达无明显影响,见图 5。

2.5 过表达 miR-199a 对胃癌细胞形态变化的影响 在倒置



A:常氧组;B:低氧组;C:+miR-199a mimics 组;D:mimic 对照组。

图 6 倒置显微镜下观察 miR-199a mimics 转染对低氧处理后胃癌细胞的形态影响($\times 200$)

3 讨论

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一,严重威胁人们的健康安全。胃癌转移是影响胃癌患者疗效和获得长期生存的关键问题。近年来多项研究证实,多种 miRNA 在胃癌中的表达异常,导致癌基因的激活和抑癌基因缺失,从而调控癌细胞的增殖和生长。

本研究探讨了低氧对胃癌细胞 EMT 的影响,1% O_2 处理后,上皮相关指标 E-cadherin 表达水平明显下调,而 vimentin、N-cadherin 和 SNAIL 蛋白表达水平明显升高,提示 EMT 的发生,同时细胞内 HIF-1 α 蛋白表达上调,这一结果说明缺氧环境下 HIF-1 α 蛋白表达上调可导致 EMT 的发生。miRNA 能与癌基因或抑癌基因的 3'-非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)特异性结合,通过对靶基因 mRNA 的降解或转录后调控抑制基因的表达,从而在肿瘤的发生、发展中起重要作用。生物信息学预测分析 HIF-1 α 可能为 miR-199a 的靶基因,目前已有研究通过 Western blotting 和双荧光素酶报告基因实验证实 HIF-1 α 为 miR-199a 的靶基因^[3-4],本实验也证明了 miR-199a mimic 可以下调 HIF-1 α 的蛋白表达。在难治性癫痫患者的癫痫组织^[5]、酒精性肝病肝窦内皮细胞^[6]和多发性骨髓瘤细胞^[7]中,miR-199a 表达下调,HIF-1 α 表达上调,过表达 miR-199a 后可下调 HIF-1 α 。接下来作者检测了在缺氧条件下胃癌细胞中 miR-199a 的表达水平,结果发现 miR-199a 在缺氧状态下表达下调,而转染 miR-199a mimics 可部分逆转缺氧导致的 EMT 相关蛋白的变化,倒置光学显微镜下观察也可见细胞由缺氧状态时的长梭形转变为多角形或卵圆形,说明胃癌细胞 EMT 减少。这一结果进一步证实,miR-199a 能抑制胃癌细胞的 EMT 过程。

低氧可通过转化生长因子- β (TGF- β)信号通路、Notch 信号通路、Wnt 信号通路、刺猬信号通路、肝细胞生长因子/肝细胞生长因子受体信号通路及多种转录因子等途径参与肿瘤 EMT 调控^[8]。在缺氧状态下,肿瘤细胞中 TGF- β 表达增加,低氧可通过直接提高 SMAD3 mRNA 水平影响 TGF- β 信号通路^[9];反之,TGF- β 通过 SMAD 信号通路特异性减少脯氨酰羟化酶的表达,从而间接增强 HIF-1 α 蛋白的稳定性^[10]。在肿瘤缺氧微环境中,HIF-1 α 与 Notch 信号通路细胞内结构域功能性结合,增强转录活性,提高转录因子 SNAIL 表达水平,从而导致 EMT^[11-12],而 HIF-1 α 与 Notch 信号通路可能是通过 HES1 依赖的 SRC/转录激活子 3(STAT3)通路发挥作用^[13]。

光学显微镜下观察发现,低氧 24 h 胃癌细胞中长梭形细胞明显增加,而转染 miR-199a mimics 后细胞由长梭形变为多角形或卵圆形,见图 6。

肿瘤低氧环境中,HIF-1 α 通过 N 端区域将 β -catenin 从 T 细胞因子-4(TCF-4)移除,结合 N-乙酰基转移酶基因 hARD1 使 β -catenin 失活,虽然 HIF-1 α 可抑制 β -catenin 的转录活性,但低氧环境对 β -catenin 诱发的 EMT 是必要的^[14]。Wnt/ β -catenin 信号能通过增加 EMT 相关的 HIF-1 α 蛋白活性和抑制肿瘤死亡,加速缺氧诱导的 EMT 进展^[15]。

综上所述,本研究表明在缺氧状态下,胃癌细胞内上调的 HIF-1 α 可诱导 EMT 的发生,过表达 miR-199a 可通过抑制 HIF-1 α 从而抑制 EMT 过程,为胃癌细胞的靶向治疗提供新的线索。

参考文献

- [1] 倪小晴,张佐阳,吴继锋. HIF-1 α 蛋白在胃癌中的表达及其与 Wnt 信号通路、上皮-间质转化的关系[J]. 临床与实验病理学杂志,2014,30(2):140-144.
- [2] Hu Y, Liu J, Jiang B, et al. MiR-199a-5p loss up-regulated DDR1 aggravated colorectal cancer by activating epithelial-to-mesenchymal transition related signaling[J]. Dig Dis Sci, 2014, 59(9): 2163-2172.
- [3] 贾筱琴. miR-199a 对肝癌的抑制作用及分子机制研究[D]. 南京:南京医科大学,2010.
- [4] Jiang Y, Zhu Y, Wang X, et al. Temporal regulation of HIF-1 and NF- κ B in hypoxic hepatocarcinoma cells[J]. Oncotarget, 2015, 6(11): 9409-9419.
- [5] Jiang G, Zhou R, He X, et al. Expression levels of microRNA-199 and hypoxia-inducible factor-1 alpha in brain tissue of patients with intractable epilepsy[J]. Int J Neurosci, 2016, 126(4): 326-334.
- [6] Yeligar S, Tsukamoto H, Kalra VK. Ethanol-induced expression of ET-1 and ET-BR in liver sinusoidal endothelial cells and human endothelial cells involves hypoxia-inducible factor-1alpha and microrna-199[J]. J Immunol, 2009, 183(8): 5232-5243.
- [7] Raimondi L, Amodio N, Di Martino MT, et al. Targeting of multiple myeloma-related angiogenesis by miR-199a-5p mimics; in vitro and in vivo anti-tumor activity[J]. Oncotarget, 2014, 5(10): 3039-3054.
- [8] 郭晓川,石燕,陈丽,等. 缺氧诱导因子(下转第 4921 页)

- Cell Oncol (Dordr), 2014, 37(1):9-15.
- [11] Sastre J, Maestro ML, Gómez-España A, et al. Circulating tumor cell count is a prognostic factor in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line chemotherapy plus bevacizumab; a Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumors study [J]. *Oncologist*, 2012, 17(7):947-955.
- [12] Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(8):781-791.
- [13] Cao S, Li Y, Li J, et al. Quantitative determination of HER2 expression by confocal microscopy assay in CTCs of breast cancer [J]. *Oncol Rep*, 2010, 23(2):423-428.
- [14] Smerage JB, Barlow WE, Hortobagyi GN, et al. Circulating tumor cells and response to chemotherapy in metastatic breast cancer: SWOG S0500 [J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(31):3483-3489.
- [15] Alonso-Alconada L, Muínelo-Romay L, Madisoo K, et al. Molecular profiling of circulating tumor cells links plasticity to the metastatic process in endometrial cancer [J]. *Mol Cancer*, 2014, 13(1):223.
- [16] Roberts TC, Hart JR, Kaikkonen MU, et al. Quantification of nascent transcription by bromouridine immunocapture nuclear run-on RT-qPCR [J]. *Nat Protoc*, 2015, 10(8):1198-1211.
- [17] Wang HY, Ahn S, Kim S, et al. Detection of circulating tumor cell-specific markers in breast cancer patients using the quantitative RT-PCR assay [J]. *Int J Clin Oncol*, 2015, 20(5):878-890.
- [18] Markou A, Strati A, Malamos N, et al. Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer by a liquid bead array hybridization assay [J]. *Clin Chem*, 2011, 57(3):421-430.
- [19] Mi DC. Circulating CD133: a promising biomarker, but what are we measuring? [J]. *Ann Surg Oncol*, 2012, 19(2):351-352.
- [20] Lankiewicz S, Rother E, Zimmermann S, et al. Tumour-associated transcripts and EGFR deletion variants in colorectal cancer in primary tumour, metastases and circulating tumour cells [J]. *Cell Oncol*, 2008, 30(6):463-471.
- [21] Uen YH, Lin SR, Wu CH, et al. Clinical significance of MUC1 and c-Met RT-PCR detection of circulating tumor cells in patients with gastric carcinoma [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2006, 367(1/2):55-61.
- [22] Taylor M, Rössler J, Geoerger B, et al. High levels of circulating VEGFR2 + Bone marrow-derived progenitor cells correlate with metastatic disease in patients with pediatric solid malignancies [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(14):4561-4571.
- (收稿日期:2016-05-21 修回日期:2016-08-09)
- (上接第 4916 页)
- 对肿瘤细胞上皮-间质转化的诱导机制 [J]. 2015, 36(1):90-93.
- [9] Ali A, Zhang P, Liangfang Y, et al. KLF17 empowers TGF- β /Smad signaling by targeting Smad3-dependent pathway to suppress tumorgrowth and metastasis during cancer progression [J]. *Cell Death Dis*, 2015(6):e1681.
- [10] van Zijl F, Mair M, Csiszar A, et al. Hepatic tumor-stroma crosstalk guides epithelial to mesenchymal transition at the tumor edge [J]. *Oncogene*, 2009, 28(45):4022-4033.
- [11] Ishida T, Hijioka H, Kume K, et al. Notch signaling induces EMT in OSCC cell lines in a hypoxic environment [J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(5):1201-1206.
- [12] Sahlgren C, Gustafsson MV, Jin S, et al. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(17):6392-6397.
- [13] Lee JH, Suk J, Park J, et al. Notch signal activates hypoxia pathway through HES1-dependent SRC/signal transducers and activators of transcription 3 pathway [J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(10):1663-1671.
- [14] Lim JH, Chun YS, Park JW. Hypoxia-inducible factor-1 α obstructs a Wnt signaling pathway by inhibiting the hARD1-mediated activation of beta-catenin [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(13):5177-5184.
- [15] Zhang Q, Bai X, Chen W, et al. Wnt/ β -catenin signaling enhances hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via crosstalk with hif-1 α signaling [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(5):962-973.
- (收稿日期:2016-05-18 修回日期:2016-08-06)

《重庆医学》对临床研究论文医学伦理学要求

凡投本刊的临床研究论文(主体是以人为研究对象),作者应说明其遵循的程序是否符合负责人体试验的委员会(单位性的、地区性的或国家性的)所制订的伦理学标准,并提供(上传)该委员会的批准文件复印件及受试对象或其亲属的知情同意书复印件。