

miR-203 抑制 bcl-w 表达促进膀胱癌 细胞凋亡

王晓燕

(绍兴市人民医院,浙江 绍兴 312000)

摘要: [目的] 研究 miR-203 在膀胱癌组织中的表达,探讨其表达对膀胱癌细胞 T24 凋亡的影响。 [方法] 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 23 例膀胱癌组织和癌旁正常组织中 miR-203 表达情况,免疫印迹法检测 bcl-w 蛋白的表达情况,Pearson 法分析 miR-203 表达与 bcl-w 蛋白表达相关性;转入 miR-203-mimic 建立高表达 miR-203 的 T24 细胞,流式细胞仪检测 miR-203 表达对 T24 细胞凋亡的影响。 [结果] miR-203 在膀胱癌组织中的相对表达量为 1.40 ± 0.47 , 显著低于其在癌旁正常组织中的表达量 (2.99 ± 0.59) ($P=0.0001$); miR-203 在膀胱癌组织中的表达与 bcl-w 蛋白表达呈负相关 ($r=-0.952, P<0.001$); miR-203 靶向抑制 T24 细胞中 bcl-w 蛋白的表达,转入 miR-203-mimic 24h 和 72h 后, T24 细胞凋亡率分别为 $8.33\% \pm 0.58\%$ 和 $17.07\% \pm 0.76\%$, 均显著高于对照组 T24 细胞的 $3.63\% \pm 0.32\%$ 和 $4.16\% \pm 0.28\%$ ($P=0.012, P<0.001$)。 [结论] miR-203 在膀胱癌组织中低表达,其可以通过靶向抑制 bcl-w 的表达促进膀胱癌细胞 T24 的凋亡。

关键词: miR-203; bcl-w; 膀胱肿瘤; 凋亡

中图分类号: R737.14 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2018)06-0597-04
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.06.B013

miR-203 Promote Apoptosis of Bladder Cancer Cell by Expression-suppression of Bcl-w

WANG Xiao-yan

(Shaoxing People's Hospital, Shaoxing 312000, China)

Abstract: [Objective] To study the expression of miR-203 in bladder cancer, and to explore the effect of its expression on the apoptosis of T24 cells. [Methods] The expression of miR-203 in 23 bladder cancer tissue and adjacent normal tissue was detected by RT-qPCR, and the expression of bcl-w protein was detected by immunoblotting. The correlation of miR-203 and bcl-w was analyzed by Pearson. Transfer to miR-203-mimic to construct T24 cells with high expression of miR-203, and the effect of miR-203 expression on the apoptosis of T24 cells was detected by flow cytometry. [Results] The relative expression of miR-203 in bladder cancer was 1.40 ± 0.47 , which was significantly lower than that in adjacent normal tissues (2.99 ± 0.59) ($P=0.001$). There was a negative correlation between miR-203 and bcl-w protein expression in bladder cancer tissue ($r=-0.952, P<0.001$). MiR-203 was used to inhibit the expression of bcl-w protein in T24 cells. After transfection into miR-203-mimic 24h and 72h, the apoptosis rate of T24 cells were $8.33\% \pm 0.58\%$ and $17.07\% \pm 0.76\%$, respectively, which were significantly higher than those of control group $3.63\% \pm 0.32\%$ and $4.16\% \pm 0.28\%$ ($P=0.012, P<0.001$). [Conclusion] The expression of miR-203 is significantly downregulated in bladder cancer, and the expression of miR-203 can promote the apoptosis of T24 cells by repressing bcl-w expression.

Subject words: miR-203; bcl-w; bladder cancer; apoptosis

膀胱癌(bladder cancer)是指发生在膀胱黏膜上的恶性肿瘤,是我国男性第四大常见、女性第十大常见恶性肿瘤^[1]。流行病学研究发现^[1],膀胱癌在我国

肿瘤登记地区的发病率约为 6.61/10 万,发病率随年龄增长而增加。虽然关于膀胱癌的研究已经持续了几十年,但是目前膀胱癌的发病机制还未完全明确。研究指出^[2,3],目前常见的化疗药物主要是通过诱导膀胱癌细胞凋亡而达到治疗膀胱癌的目的,但是随着治疗时间的延长,一些癌细胞可以通过过表达

通讯作者: 王晓燕,主治医师,硕士;绍兴市人民医院肿瘤内科,浙江省绍兴市中兴北路 568 号(312000);E-mail: hj306820996@126.com

收稿日期: 2017-09-14; **修回日期:** 2017-10-26

bcl-2 和 bcl-w 等抗凋亡蛋白而产生耐药机制。Bcl-w 蛋白是癌细胞 bcl-2 抗凋亡蛋白家族中的重要一员,其可以通过促进线粒体相关功能而维持细胞活性^[4,5]。因此,研究膀胱癌细胞内 bcl-w 蛋白表达的调控机制,对揭示膀胱癌细胞的耐药机制,开发疗效更好的抗肿瘤药物具有十分重要的意义。

miRNA 是广泛分布于哺乳动物和植物细胞体内的非编码短链 RNA,通过对其靶基因转录的调控参与到真核细胞的分化、增殖、生长和凋亡的调解。Funamizu 等^[6]研究指出,miRNA-203 可以上调结肠癌和肺癌细胞中的 Puma 表达而诱导细胞凋亡。同时,近期 Lin 等^[7]的研究也发现,miRNA-203 可以通过靶向调控 Runt 相关转录因子的表达而诱导骨肉瘤细胞的凋亡。但是,目前 miRNA-203 与膀胱癌之间的关系尚未明确,本文通过 qRT-PCR 技术检测 miR-203 在膀胱癌组织中的表达情况,探讨 miR-203 表达对于膀胱癌细胞 T24 凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 组织标本与细胞

23 例膀胱癌组织标本来自于 2016 年 10 月至 2017 年 6 月在我院进行膀胱癌根治术切除的肿瘤组织,以癌旁(距离大于 5cm)组织作为正常组织对照,所有组织标本由我院病理科冻存于-80℃。所有入选的膀胱癌肿瘤组织来源病患均对本次研究知情并自愿加入研究,本研究经医院伦理协会审核批准。

1.2 实时荧光定量 PCR

通过组织总 RNA 提取试剂盒(天根,中国)提取组织总 RNA,然后逆转录为 cDNA,使用 SYBR Premix Ex TaqTM II (TakaRa, Japan)试剂盒准备 qRT-PCR 体系,并使用 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, USA)进行扩增。PCR 参数设置:95℃ 30s, 40℃ 循环, 90℃ 5s, 65℃ 30s。miR-203 选择 U6 作为内参照,通过 $2^{-\Delta t}$ 法($\Delta t = CT_{miRNA} - CT_{U6}$)计算 miR-203 的相对表达量。

1.3 荧光素酶报告基因验证 203 靶基因

通过 miRanda 和 PicTar 等网站,并结合 NCBI 查找 Akt 基因 3'-UTR 与 miR-203 结合的部位,然后将这段 3'-UTR 的野生型(WT)和突变型(MUT)克隆到经 Sac I 和 Sal I 双酶切后的 pmirGLO 质粒

(addgene, USA)上,将构建的重组质粒与 miR-203-mimic 或者 miR-203-NC 共转到 T24 细胞内,转染 48h 后,收集细胞通过 Dual-Luciferase 系统(Promega, 中国)检测荧光素酶荧光强度。

1.4 Western blot 检测蛋白表达

通过组织或者细胞总蛋白提取试剂盒(碧云天,中国)提取组织总蛋白,测定总蛋白浓度,取 70μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 检测,然后依次进行转膜,5%脱脂奶封闭、加 bcl-w 或者 GAPDH 兔多克隆一抗(Abcam, 英国)、羊抗兔二抗(Abcam, 英国)后显色。目的蛋白表达量以目的蛋白条带亮度/GAPDH 蛋白条带亮度形式表示。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

收集经不同方式处理后的 T24 细胞,加入 70% 的乙醇 4 度处理 1h,然后依次经 PBS 清洗,PI 处理后上机(FACSCalibur, BD, USA)检测细胞凋亡情况。

1.6 统计学处理

研究数据通过 SPSS20.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数±标准差表示,组间差异通过 *t* 检验进行对比, Pearson 法分析 miR-203 相对表达量与 bcl-w 蛋白相对表达量的相关性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-203 在膀胱癌组织中的表达

提取 23 例癌旁正常和膀胱癌组织总 RNA, qRT-PCR 检测不同组织中 miR-203 相对表达量,结果显示:miR-203 在膀胱癌组织中的相对表达量为 1.40 ± 0.47 , 显著低于其在癌旁组织中的 2.99 ± 0.59 ($P = 0.0001$), 见 Figure 1。

2.2 膀胱癌组织中 miR-203 表达与 bcl-w 表达相关性

提取 23 例癌旁正常和膀胱癌组织总蛋白,免疫印迹法检测不同组织中 bcl-w 的相对表达量,通过 Pearson 法分析 bcl-w 蛋白相对表达量与 miR-203 之间的相关性,结果显示:膀胱癌组织中 miR-203 表达与 bcl-w 蛋白呈负相关($r = -0.952, P < 0.001$), 见 Figure 2。

2.3 miR-203 靶向抑制 bcl-w 表达促进 T24 细胞凋亡

通过生物信息学手段对 miR-203 的靶基因进行预测,发现: bcl-w mRNA 的 3'-UTR 端存在与 miR-203 互补的序列,如 Figure 3A 所示。荧光素酶基因

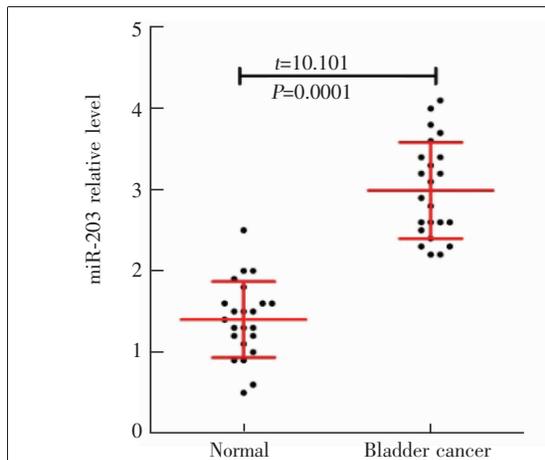


Figure 1 miR-203 was low expression in bladder cancer tissues

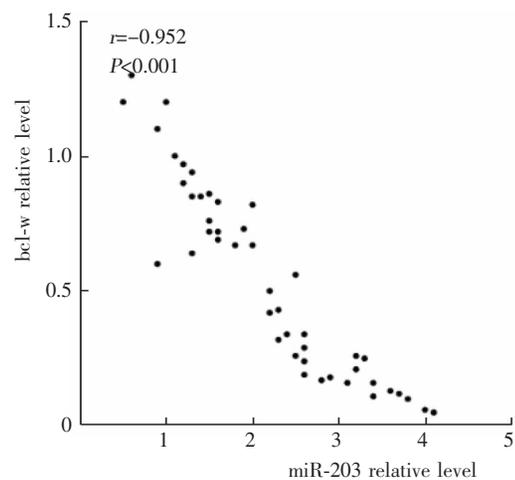


Figure 2 Negatively correlated between miR-203 and bcl-w

报告系统验证发现：转入 miR-203-mimic 可以显著降低野生型 bcl-w mRNA 3'-UTR 荧光素酶活性 ($P < 0.05$) (Figure 3B)。免疫印迹法检测转入 miR-203-mimic 不同时间后 T24 细胞中 bcl-w 蛋白表达情况发现, bcl-w 蛋白随转入 miR-203-mimic 时间的延长而表达逐渐降低; 流式细胞仪检测 T24 凋亡情况发现, 转入 miR-203-mimic 24h 后的 T24 细胞凋亡率为 $8.33\% \pm 0.58\%$, 显著高于对照组的 $3.63\% \pm 0.32\%$

($P = 0.012$), 72h 后转入 miR-203-mimic 的 T24 细胞凋亡率为 $17.07\% \pm 0.76\%$, 显著高于对照组的 $4.16\% \pm 0.28\%$ ($P < 0.001$) (Figure 3C、3D)。

3 讨论

近年来多项研究已经证实, miRNA 在肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭以及迁移等生物学行为中发挥着

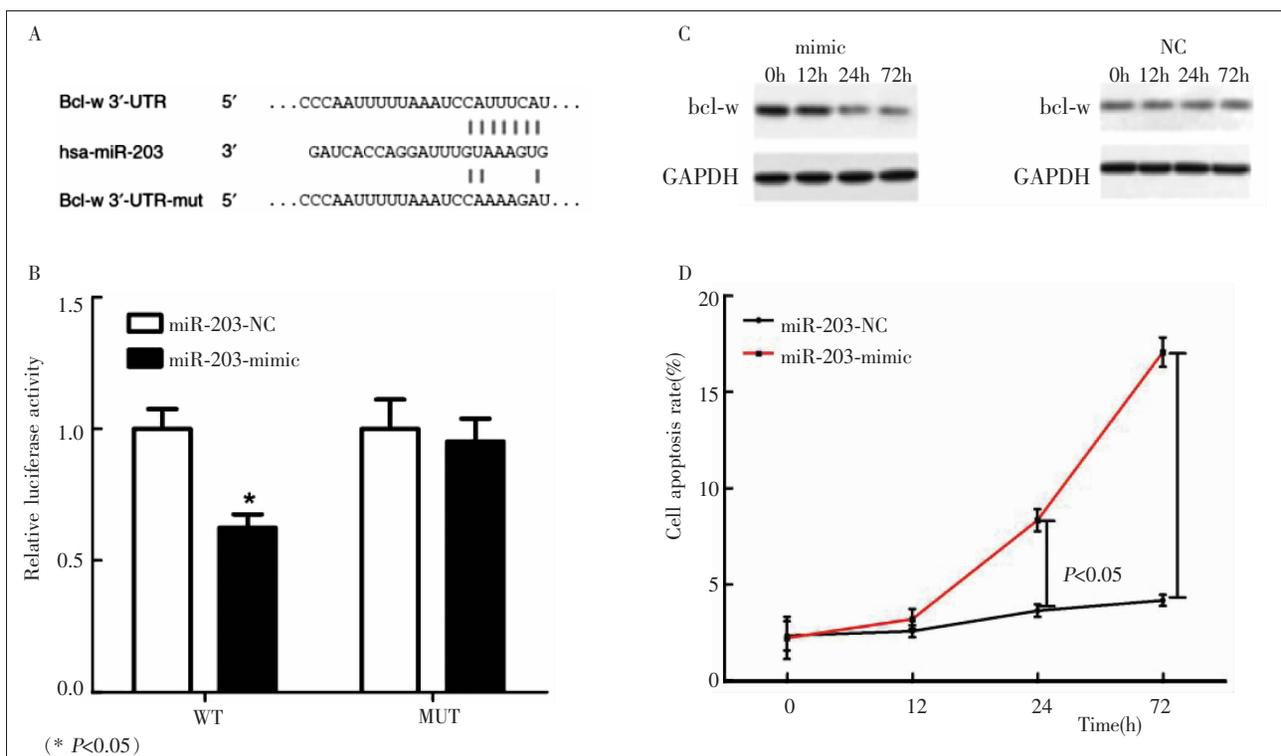


Figure 3 miR-203 targeting inhibition of bcl-w expression promotes apoptosis in T24 cells

重要作用。通过对 miRNA 表达的调控机制的研究, 可以为肿瘤的诊断、治疗、预后预测提供新的有效的靶点。而一些关于 miRNA 在膀胱癌发生发展与治疗中的作用的研究也指出^[8,9], miRNA 同样可以通过对靶基因转录的调控而对膀胱癌细胞的增殖与凋亡等生物学行为进行调控, 如: Miyamoto 等^[8]研究指出, miRNA-26a-5p 和 miRNA-26b-5p 可以通过靶向调控 PLOD2 蛋白在膀胱癌细胞中的表达而抑制膀胱癌细胞的侵袭性; 而 miRNA-556-3p 则可以通过抑制 DAB2IP 蛋白的表达而促进人膀胱癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

本研究发现, 人膀胱癌组织中 miR-203 相对表达量显著低于癌旁正常组织 ($P < 0.05$)。miRNA-203 位于人染色体 14q32.33 上, 以往关于其的研究指出, 在人神经胶质瘤表达下调的 miRNA-203 是造成患者预后不良的危险因素之一^[10], 并且其可以通过上调 Puma 蛋白的表达诱导结肠癌和肺癌细胞的凋亡^[6], 通过靶向调控 Runx2 蛋白的表达而抑制乳腺癌的骨转移^[11]。因此我们猜测在膀胱癌组织中低表达的 miRNA-203 可能参与到膀胱癌的疾病进展中。

进一步研究发现, miRNA-203 在膀胱癌组织中的表达与 bcl-w 蛋白表达呈负相关 ($r = -0.952, P < 0.001$)。Bcl-w 蛋白是 bcl-2 抗细胞凋亡蛋白家族中重要一员, 在结肠癌、宫颈癌以及乳腺癌组织中均被证实呈现高表达; 在胃癌中 bcl-w 可以通过阻断 SAPK/JNK 信号通路的传导而抑制癌细胞的凋亡, 进而促进疾病发生发展^[12]; 并且相关研究也指出, bcl-w 蛋白的表达也同样受到 miRNA 的调控, miR-133b 就可以通过下调 bcl-w 蛋白的表达而抑制甲状腺乳头状癌 K1 细胞的增殖和侵袭^[13]。同时, 生物学信息方法和荧光酶基因报告系统均表明, bcl-w 是 miR-203 的靶基因, 向膀胱癌 T24 细胞内转入 miR-203-mimic 上调 miR-203 的表达可以显著抑制 bcl-w 蛋白的表达, 并且转入 miR-203-mimic 24h 和 72h 后, T24 细胞凋亡率分别为 $8.33\% \pm 0.58\%$ 和 $17.07\% \pm 0.76\%$, 均显著高于对照组 T24 细胞的 $3.63\% \pm 0.32\%$ 和 $4.16\% \pm 0.28\%$ ($P < 0.05$)。相关研究已明确 bcl-w 蛋白在癌细胞内起着抗凋亡的作用^[4,5,12,13], 因此我们推断 miRNA-203 通过抑制 bcl-w 蛋白的表达而诱导膀胱癌细胞 T24 的凋亡。

综上所述, miR-203 在膀胱癌组织中低表达, 其

可以通过靶向抑制 bcl-w 的表达促进膀胱癌细胞 T24 的凋亡。

参考文献:

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *Ca A Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] Martínezbalibrea E, Martínezcardús A, Ginés A, et al. Tumor-related molecular mechanisms of oxaliplatin resistance[J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14(8): 1767-1776.
- [3] García-Aranda M, Téllez T, Muñoz M, et al. Clusterin inhibition mediates sensitivity to chemotherapy and radiotherapy in human cancer[J]. *Anticancer Drugs*, 2017, 28(7): 702-716.
- [4] Pan Q, Zhang LH, Yang GL et al. The role of Bcl-w in carcinogenesis[J]. *Journal of Chinese Oncology*, 2014, 20(10): 838-841. [潘麒, 张连华, 杨国良, 等. Bcl-w 在肿瘤发生发展中的作用[J]. *肿瘤学杂志*, 2014, 20(10): 838-841.]
- [5] Crawford AC, Riggins RB, Shajahan AN, et al. Co-Inhibition of BCL-W and BCL2 restores antiestrogen sensitivity through BECN1 and promotes an autophagy-associated necrosis[J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8604.
- [6] Funamizu N, Lacy CR, Kamada M, et al. MicroRNA-203 induces apoptosis by upregulating Puma expression in colon and lung cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(5): 1981-1988.
- [7] Lin W, Zhu X, Yang S, et al. MicroRNA-203 inhibits proliferation and invasion, and promotes apoptosis of osteosarcoma cells by targeting Runt-related transcription factor 2 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 91: 1075-1084.
- [8] Miyamoto K, Seki N, Matsushita R, et al. Tumour-suppressive miRNA-26a-5p and miR-26b-5p inhibit cell aggressiveness by regulating PLOD2 in bladder cancer[J]. *Br J Cancer*, 2016, 115(3): 354-363.
- [9] Feng C, Sun P, Hu J, et al. miRNA-556-3p promotes human bladder cancer proliferation, migration and invasion by negatively regulating DAB2IP expression [J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(6): 2101-2112.
- [10] He J, Deng Y, Yang G, et al. MicroRNA-203 down-regulation is associated with unfavorable prognosis in human glioma[J]. *J Surg Oncol*, 2013, 108(2): 121-125.
- [11] Taipaleenmaki H, Browne G, Akech J, et al. Targeting of Runx2 by miRNA-135 and miRNA-203 impairs progression of breast cancer and metastatic bone disease[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(7): 1433-1444.
- [12] Lee HW, Lee SS, Lee SJ, et al. Bcl-w is expressed in a majority of infiltrative gastric adenocarcinomas and suppresses the cancer cell death by blocking stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase activation [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(5): 1093-1100.
- [13] Wang J, Li ZD. Effect of miR-133b targeting Bcl-w gene on proliferation and invasion of papillary thyroid carcinoma cells[J]. *Progress of Anatomical Sciences*, 2016, 15(6): 625-628. [王静, 李振东. miR-133b 靶向调节 Bcl-w 基因对甲状腺乳头状癌细胞增殖和侵袭的影响[J]. *解剖科学进展*, 2016, 15(6): 625-628.]