

前列腺癌 miRNA 表达谱及 miR-96 在氧化应激信号通路中的作用

朱宝益¹, 李小娟², 黄怀球³, 蔡焱¹, 叶春伟¹, 陶奕然¹, 高新¹, 温星桥^{1*}
(中山大学附属第三医院 1.泌尿外科; 2.保健科; 3.皮肤科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】检测 miRNA 在前列腺癌与正常前列腺组织的表达差异,并探讨表达异常的 miRNA 在前列腺癌发病中的作用。【方法】前列腺癌和正常前列腺组织样品(100 mg), Trizol 法提取 RNA,应用聚合酶链反应(PCR)芯片检测 miRNA 的表达;同时以 250 $\mu\text{mol/L}$ 的过氧化氢(H_2O_2)刺激前列腺癌 PC-3 细胞 4 h,继续正常培养 12 h。检测不同时间点细胞内活性氧(ROS)水平,以实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 miR-96 在各组细胞中的表达。【结果】与正常前列腺组织相比,前列腺癌组织中 miR-144、miR-216a 上调 5.9 倍,miR-96 上调 30.4 倍,miR-488、miR-873 下调到 4.9%,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。PC-3 细胞内 ROS 为 RWPE-1 细胞的 5.2 倍($P < 0.05$),miR-96 在 PC-3 细胞中的表达为 RWPE-1 细胞的 15.4 倍($P < 0.05$)。H₂O₂ 刺激 PC-3 细胞 1、4 h 后,胞内 ROS 为对照组的 4.3、6.4 倍(P 均 < 0.05),miR-96 表达水平为对照组的 10.2、18.9 倍(P 均 < 0.05);10、16 h 组胞内 ROS 为对照组的 2.5 倍、1.2 倍,miR-96 表达水平为对照组的 2.7、1.9 倍(P 均 > 0.05)。【结论】在前列腺癌组织中发现了若干有表达差异的 miRNA;miR-96 参与前列腺癌细胞的氧化应激信号途径,可能是防治前列腺癌的重要分子靶点。

关键词:前列腺癌;miRNA PCR 芯片;氧化应激;miR-96

中图分类号:R737.25 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2012)05-0567-04

Expression Profile of MicroRNAs in Prostate Carcinoma and Role of miR-96 in Regulation of Oxidative Stress

ZHU Bao-yi¹, LI Xiao-juan², HUANG Huai-qiu³, CAI Yi¹, YE Chun-wei¹, TAO Yi-ran¹, GAO Xin¹, WEN Xing-qiao^{1*}
(1.Department of Urology, 2.Department of Health Care, 3. Department of Dermatology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the expression profile of miRNAs in the prostate cancer and benign prostatic tissues, and to evaluate the role of differential miRNAs in the regulation of oxidative signaling of prostate cancer. 【Methods】The total RNA was extracted from prostate cancer tissues and adjacent non-tumorous tissues (100 mg each) and the expression of miRNAs were detected by miRNA PCR Array (Denmark, Exiqon). Prostate cancer cell line PC-3 was incubated with hydrogen peroxide (H_2O_2 , 250 $\mu\text{mol/L}$) for 4 hours, and then was cultured in normal condition for 12 hours. The intracellular reactive oxygen species (ROS) and the expression of miR-96 were detected at indicated time points. 【Results】Compared to the normal prostate tissues, miR-144, and miR-216a were up-regulated 5.9 times, and miR-96 was up-regulated 30.4 times in the prostate cancer tissues, while miR-488 and miR-873 were down-regulated to 4.9% ($P < 0.05$). The intracellular ROS of PC-3 cells was as 5.2 times as to that in the RWPE-1 cells ($P < 0.05$), and the expression of miR-96 in PC-3 was 15.4 times compared to that in the RWPE-1 cells ($P < 0.05$). In the 1 h and 4 h group, H₂O₂ induced 4.3 and 6.4 times of ROS compared to that in the control ($P < 0.05$), with 10.2 and 18.9 times of miR-96 expression compared to that in the control ($P < 0.05$). In the 10 h and 16 h group, the intracellular ROS remained 2.5 and 1.2 times compared to the control ($P > 0.05$), with 2.7 and 1.9 times of miR-96 expression compared to the control ($P > 0.05$). 【Conclusion】This study had identified several different expression miRNAs in prostate cancer. miR-96 plays an important role in the oxidative

收稿日期:2012-05-14

基金项目:国家自然科学基金(81072115,30901768);中山大学青年教师培育项目(10ykpy06);教育部新世纪优秀人才计划项目(2011年)

作者简介:朱宝益,在读硕士,E-mail:baoyizhu2010@yahoo.com; *通信作者:温星桥,博士,副教授,研究方向,E-mail:xingqiaowen@yahoo.com

signaling of prostate cancer. It may be developed as an important molecular target for the treatment of prostate cancer.

Key words: prostate carcinoma; miRNA PCR array; oxidative stress; miR-96

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(5):567-570]

miRNA是一类长约 21 ~ 23nt 的非编码 RNA, 参与调控细胞增殖、分化、凋亡及肿瘤的发生、发展^[1]。然而, miRNA 在前列腺癌的作用尚未明白。在肿瘤细胞中, 氧化还原代谢异常可导致细胞内的活性氧生成增加, 同时肿瘤细胞可发生氧化还原适应反应, 其抗氧化能力增强^[2]。最近研究发现, miRNA 还参与氧化应激反应, 与肿瘤药物敏感性有密切关系^[3]。本研究旨在比较前列腺癌组织与正常组织 miRNA 的表达谱, 检测差异表达的 miRNA 在氧化应激中的表达, 探索 miRNA 在前列腺癌氧化应激信号通路中的作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

前列腺癌标本 6 例, 均经临床病理诊断为前列腺癌。每例取肿瘤组织与癌旁正常前列腺组织作对照。PC-3、RWPE-1 细胞(由转染乳头状病毒 HPV18 而永生化的正常前列腺外周带的上皮细胞)从美国 ATCC 购买, Trizol (Invitrogen), miRNA PCR 芯片 (Exiqon, Denmark); 30% 过氧化氢(分析纯, 上海国药), 双氢-乙酰乙酸二氯荧光黄(2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)购自 Sigma 公司。

1.2 细胞培养及处理

RWPE-1 用含有 50 g/L 牛脑垂体萃取液、5 μg/L 表皮生长因子、1 × 抗生素/抗菌素培养液 K-SFM(Invitrogen), 于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中传代培养。PC-3 以含 100 mL/L 胎牛血清 1640 培养基(Invitrogen)培养箱中传代培养。H₂O₂ 刺激实验参考本组既往方法^[4], PC-3 细胞以每孔 1 × 10⁶ 接种于 6 孔板内, 24 h 后, 以 250 μmol/L 的 H₂O₂ 刺激 4 h, 更换正常培养基培养 12 h, 于 1、4、10、16 h 收获细胞, 检测。

1.3 RNA 提取及质检

液氮研磨法将组织磨成粉末, Trizol 法提取各例标本(100 mg)的 RNA。贴壁细胞经 PBS 洗涤后, 加入 Trizol 提取 RNA。RNA 样品用紫外分光光度计检测纯度和浓度, 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析^[5]。

1.4 miRNA PCR 芯片检测

按 miRCURY LNA™ microRNA Array V.11.0 (208202-A, Exiqon)说明书进行。总 RNA 样品调整浓度至 1.492 ~ 1.786 ng/μL, 按以下 20 μL 体系合成 cDNA: 5 × Reaction buffer (Exiqon) 4 μL, Enzyme mix (Exiqon) 2 μL, 总 RNA 14 μL; 反应条件: 42 °C (60 min), 95 °C (5 min)。cDNA 稀释 100 倍后, 按 cDNA 模板: SYBR Green Master Mix (Exiqon) = 1 : 1 的比例混合, 按每孔 10 μL 加入 384 孔 PCR 板中; 使用 ABI PRISM7900 System (Applied Biosystems)进行反应, 反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 10 s, 60 °C 1 min, (40 个循环); 溶解曲线分析。

1.5 引物的设计与合成

逆转录 (RT) 反应引物: hsa-miR-96: 5' - GTCGTATCCAGTGCCTGTCGTGGAGTCGGCAATT GCACTGGATACGACAGCAAAA-3', 内参 U6: 5' - CGCTTCACGAATTTGCGTGTGCAT-3'。实时定量 PCR 引物序列: hsa-miR-96 (F: 5' -GGTTTGG CACTAGCACAT-3', R: 5' -AGTGCCTGTCGTGGA GTC-3'); 内参 U6 (F: 5' -GCTTCGGCAGCACATA TACTAAAAT-3', R: 5' -CGCTTCACGAATTTGCG TGTGCAT-3')。

1.6 逆转录反应

利用特定茎-环引物和相应试剂, 将样品 RNA 逆转录成 cDNA^[6]。反应体系为 dNTP (2.5 mol/L each) 2 μL, 10X RT Buffer 2 μL, DTT (100 mmol/L) 2 μL, RT 特异引物 (1 μmol/L) 0.3 μL, RNA 1 μg, MMLV 反转录酶 (200 U/μL) 0.1 μL, RNA 酶抑制剂 (40 U/μL) 0.3 μL, 用无酶水补足总体积至 20 μL。反应条件: 16 °C 30 min, 42 °C 40 min, 85 °C 5 min。

1.7 荧光定量 PCR 检测

以 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR 检测^[6], 反应体系: dNTP (2.5 mmol/L) 2.5 μL, 10 × PCR 缓冲液 2.5 μL, Taq 聚合酶 1 units, Sybergreen 终浓度 0.25 ×, 10 μmol/L 的 PCR 特异引物 F/R 各 1 μL, cDNA 1 μL, 用无酶水补足总体积至 25 μL。反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 10 s, 60 °C 15 s, 72 °C 20 s (40 个循环); 78 °C 20 s。使用 Applied Biosystems

7500 System 扩增, 实验重复 3 次。反应结束后分析 PCR 反应曲线, 得到 Ct(threshold cycle) 值, 并按 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析。

1.8 细胞内活性氧的测定

细胞以每孔 1×10^6 接种于 6 孔板, 贴壁后以 H_2O_2 刺激细胞, $10 \mu\text{mol/L}$ 的 DCFH-DA 孵育细胞 30 min, 同时设立空白对照, 孵育后以 PBS 洗涤细胞 2 次, 用荧光倒置显微镜拍片观察^[7]。收集同样条件处理的细胞, 在流式细胞仪上检测细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平, 激发光为

氩离子激光 488 nm 谱线, 每个样品测定 10^5 个活细胞, 检测细胞内 DCF 荧光强度。

1.9 统计学处理

采用均数 \pm 标准差形式记录, 应用 SPSS13.0 统计软件行 Student-*t* 检验。

2 结 果

2.1 miRNA PCR 芯片检测结果

与正常前列腺组织比较, 前列腺癌组织中上

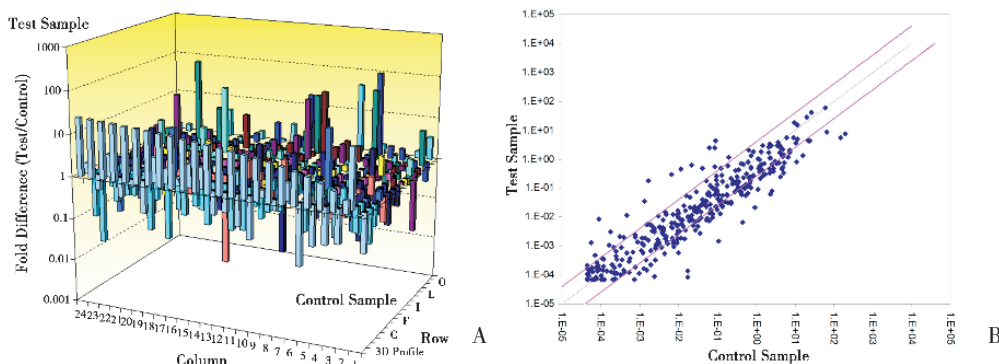


图 1 前列腺癌与正常前列腺组织 miRNA 表达

Fig.1 Histogram (A) and scatter plot (B) of differential expression of miRNAs between the prostate carcinoma and the adjacent non-tumorous tissues

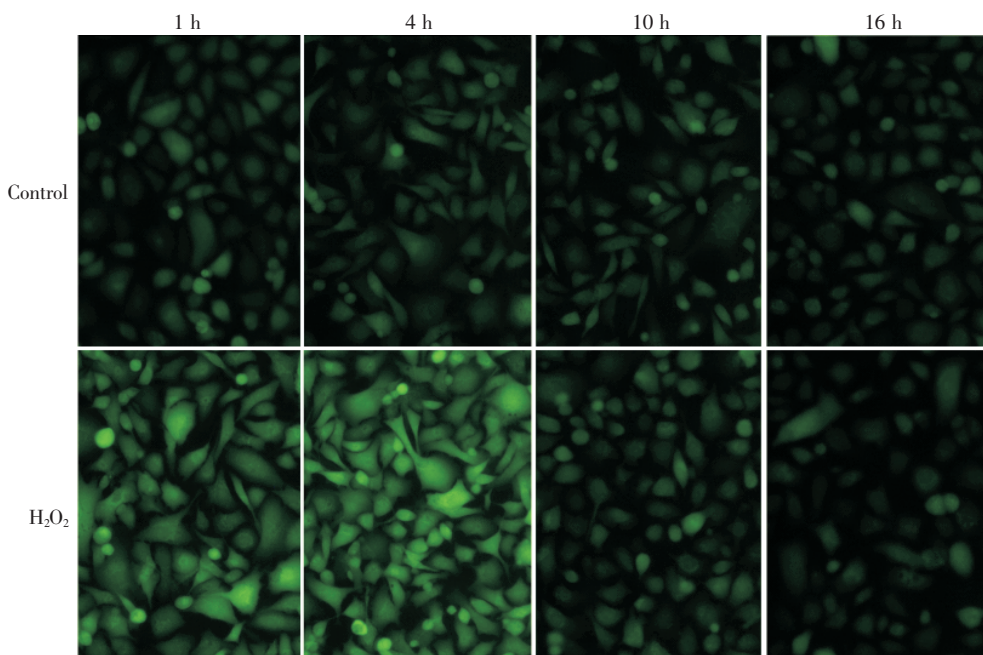


图 2 H_2O_2 处理对 PC-3 细胞内 DCF 荧光强度的影响

Fig.2 Fluorescence intensity of DCF in PC-3 cells exposed to H_2O_2

The intracellular ROS changes in PC-3 cells induced by H_2O_2 exposure were detected by fluorescence intensity of DCF. Control; PC-3 cells incubated in normal condition; H_2O_2 ; PC-3 cells incubated with H_2O_2 ($250 \mu\text{mol/L}$) for 4 hours followed in normal condition for 12 hours. Fluorescence microscope; $\times 400$.

调的 miRNA 共 143 个,下调的 miRNA 共 241 个(图 1);其中 miR-144、miR-216a 上调 5.9 倍,miR-96 上调 30.4 倍,miR-488、miR-873 下调到 4.9%,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。

2.2 细胞内活性氧水平及 miR-96 表达水平

经 DCFH-DA 孵育后,荧光显微镜观察及流式细胞仪检测发现,PC-3 细胞内 DCF 平均荧光强度为 RWPE-1 细胞的 5.2 倍 ($P < 0.05$),miR-96 在 PC-3 细胞中的表达为 RWPE-1 细胞的 15.4 倍 ($P < 0.05$),提示肿瘤细胞内的 ROS 水平及 miR-96 水平均高于正常前列腺上皮细胞。

2.3 H_2O_2 刺激上调 PC-3 细胞内的活性氧及 miR-96 表达水平

H_2O_2 刺激 PC-3 细胞 4 h,正常培养 12 h,经上述方法检测发现,1、4 h 组内 DCF 平均荧光强度分别为对照组的 4.3、6.4 倍,差异有统计学意义 (P 均 < 0.05);1、4 h 组 miR-96 表达水平分别为对照组的 10.2、18.9 倍,差异有统计学意义 (P 均 < 0.05);10、16 h 组细胞内 DCF 平均荧光强度分别对照组的 2.5、1.2 倍,miR-96 表达水平为对照组的 2.7、1.9 倍,差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)。荧光显微镜观察结果如图 2。

3 讨论

本研究检测了前列腺癌组织与正常前列腺组织 miRNA 表达谱的差异,发现了 miR-96 等 5 个 miRNA 的表达发生了显著变化,这些 miRNA 可能在前列腺癌的发生发展中起重要作用。miRNA 在前列腺癌的作用尚未完全明白,本研究在 Porkka 等^[8-10]的报道基础上,新发现了一些差异性 miRNA,可为防治前列腺癌提供新的分子靶点。我们发现前列腺癌细胞 PC-3 中,ROS 和 miR-96 表达水平均明显高于正常前列腺上皮细胞 RWPE-1,表明 miR-96 可能与前列腺癌细胞能适应高氧化应激生存有关。进一步研究发现, H_2O_2 刺激可使 PC-3 细胞内 ROS 水平和 miR-96 表达水平同步升高,提示 miR-96 与前列腺癌的氧化应激信号通路密切相关,但 miR-96 具体如何调控下游信号通路参与调节氧化应激反应,值得进一步探索。氧化应激对于提高肿瘤治疗的有效性和特异性有着重要意义。近年研究发现,与正常细胞相比,肿瘤细胞内通常含有较高的 ROS 水平,在持

续内源性高 ROS 水平下,很多肿瘤细胞产生了一套强化的内源性抗氧化系统,对细胞内过高的 ROS 水平变得高度适应,使得单独应用 ROS 生成药物并不能很好的杀灭肿瘤细胞^[2]。本课题组既往研究也发现,250 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理前列腺癌细胞 PC-3,刺激 4 h,仅能诱导 7.56% 的轻微凋亡^[4],提示 PC-3 有着较强的抗氧化应激能力。寻找肿瘤细胞抵抗氧化应激相关的分子靶点,并探索其下游调控信号通路,对于增强氧化应激治疗前列腺癌的敏感性有重要的意义。总之,本研究发现了前列腺癌组织中 miRNA 的表达差异,并发现了 miR-96 可能是前列腺癌氧化应激通路的新分子靶点,可为防治前列腺癌提供新的思路与实验数据。

参考文献:

- [1] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay [J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(9): 597-610.
- [2] Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8(7): 579-591.
- [3] Mateescu B, Batista L, Cardon M, et al. miR-141 and miR-200a act on ovarian tumorigenesis by controlling oxidative stress response[J]. *Nat Med*, 2011, 17(12): 1627-1635.
- [4] 王喻,李小娟,叶春伟,等.生育酚结合蛋白对氧化应激所致前列腺癌细胞凋亡的调控作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2010, 27(12): 1785-1787.
- [5] 肖伟伟,毛志钢,周静,等.无功能垂体腺瘤与正常垂体中 microRNAs 的差异表达[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2011, 32(1): 26-30.
- [6] 温星桥,李小娟,罗云,等.生育酚结合蛋白通过磷酸肌醇 3 激酶途径抑制前列腺癌的生长[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2007, 28(4): 367-372.
- [7] 孟金兰,兰爱平,郭瑞鲜,等.硫化氢对化学性缺氧诱导 PC12 细胞凋亡的影响[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2010, 31(1): 79-84.
- [8] Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, et al. MicroRNA expression profiling in prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(13): 6130-6135.
- [9] Wach S, Nolte E, Szczyrba J, et al. MicroRNA profiles of prostate carcinoma detected by multiplatform microRNA screening[J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(3): 611-621.
- [10] Coppola V, De Maria R, Bonci D. MicroRNAs and prostate cancer [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2010, 17(1): 1-17.

(编辑 徐杰)