

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.01.008

miRNA-100 下调 polo 样激酶 1 表达促进肝癌 HepG2 细胞凋亡

张红鸽, 范秉琳, 嵇晓辉, 蔡新华, 朱武凌 (新乡医学院 基础医学院 病理科, 河南 新乡 453003)

[摘要] **目的:**探讨 microRNA-100(miR-100)对人肝癌 HepG2 细胞中 polo 样激酶 1(polo-like kinase 1, *Plk1*)表达和细胞凋亡的影响。**方法:**通过 oligofectamine 介导,将 miR-100 mimics 转染入 HepG2 细胞中,RT-PCR 和细胞免疫荧光法检测 *Plk1* mRNA 和蛋白的表达,并采用 Annexin V-FITC 试剂盒检测 HepG2 细胞的凋亡情况。**结果:**miR-100 mimics 成功转染 HepG2 细胞,转染效率为 $(88.75 \pm 2.22)\%$ 。转染 48 h 后,miR-100 mimics 组 HepG2 细胞 *Plk1* mRNA 的表达水平明显低于阴性对照组、空白对照组和脂质体组 (0.71 ± 0.01) vs (0.95 ± 0.01) 、 (0.92 ± 0.02) 、 (0.93 ± 0.02) ,均 $P < 0.01$];转染 72 h 后,miR-100 mimics 组 *Plk1* 蛋白几乎不表达,同时其细胞凋亡率明显高于阴性对照、空白对照组和脂质体组 $(26.95 \pm 6.72)\%$ vs $(15.03 \pm 5.12)\%$ 、 $(6.88 \pm 3.71)\%$ 、 $(9.00 \pm 3.37)\%$,均 $P < 0.05$ 。**结论:**miR-100 能够抑制 *Plk1* 基因的表达,从而促进肝癌 HepG2 细胞的凋亡。

[关键词] 肝癌;HepG2 细胞;microRNA-100;Polo 样激酶 1;凋亡

[中图分类号] R735.7; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)01-0048-04

miRNA-100 promotes hepatic carcinoma HepG2 cell apoptosis through down-regulating polo-like kinase 1 expression

Zhang Hongge, Fan Binglin, Ji Xiaohui, Cai Xinhua, Zhu Wuling (Department of Pathology, School of Basic Medical Science, Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, He'nan, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of microRNA-100(miR-100) on expression of polo-like kinase 1 (Plk1) and the apoptosis of human hepatic carcinoma HepG2 cells. **Methods:** HepG2 cells were transfected with miR-100 mimics by oligofectamine. RT-PCR and immunofluorescence were used to analyze *Plk1* mRNA and protein expressions in HepG2 cells, respectively. Moreover, the apoptosis of HepG2 cells was detected by Annexin V-FITC kit. **Results:** HepG2 cells were successfully transfected by miR-100 mimics and the transfection efficiency was $(88.75 \pm 2.22)\%$. 48 h after transfection, the expression of *Plk1* mRNA decreased significantly in the miR-100 mimics transfection group compared with the negative control, blank control, and liposome groups $([0.71 \pm 0.01] vs [0.95 \pm 0.01], [0.92 \pm 0.02], [0.93 \pm 0.02], P < 0.01)$. 72 h after transfection, *Plk1* protein expression was almost undetectable in HepG2 cells transfected with miR-100 mimics. Meanwhile, the cell apoptosis rate in the miR-100 mimics group was significantly increased in comparison with those in the negative control, blank control, and liposome groups $([26.95 \pm 6.72]\% vs [15.03 \pm 5.12]\%, [6.88 \pm 3.71]\%, [9.00 \pm 3.37]\%, P < 0.05)$. **Conclusion:** miR-100 can inhibit the expression of *Plk1* gene, therefore promoting the apoptosis of hepatic carcinoma HepG2 cells.

[Key words] hepatic carcinoma; HepG2 cell; microRNA-100; polo-like kinase 1; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(1): 48-51]

MicroRNA(miR)是一类新的基因调节分子,通过与 mRNA 完全或不完全的互补配对,促进目标 mRNA 降解或抑制其翻译来调节靶基因的表达,在细胞增殖、分化、凋亡以及肿瘤形成等多种生理和病理过程中发挥重要作用。新近研究^[1-2]发现,miR-100 在一些肿瘤中的异常表达与肿瘤发生和预后密切相关。根据 Sanger miRNA 数据库进行生物信息

[基金项目] 河南省杰出青年科学基金资助项目(No. 0512000800)。Project supported by the Science Foundation for Distinguished Young Scholars of He'nan Province (No. 0512000800)

[作者简介] 张红鸽(1982-)女,河南省平顶山市人,硕士生,主要从事肿瘤的分子靶向治疗研究。E-mail: zhanghongge9@163.com

[通信作者] 朱武凌(Zhu Wuling, corresponding author), E-mail: wulingzhu2009@126.com

预测,miR-100 可能是 polo 样激酶 1 (polo-like kinase 1, *Plk1*) 基因表达的调控者之一。*Plk1* 是广泛存在于真核细胞中的一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶家族成员^[3],它在细胞增殖过程中起着非常重要的作用,并在多种肿瘤中高表达^[4,5]。目前国内研究^[6]已证实,*Plk1* 基因在人肝癌 HepG2 细胞中呈高表达,且与癌细胞的有丝分裂密切相关。本研究采用阳离子脂质体 oligofectamine 介导,将人工合成的 miR-100 mimics 转染进入肝癌 HepG2 细胞内,探讨 miR-100 对 *Plk1* 基因表达的调控作用及其对肝癌 HepG2 细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

肝癌 HepG2 细胞购自中科院上海细胞生物所,用含 10% FBS 的 DMEM 培养基在 37℃、5% CO₂ 条件下培养,取对数生长期细胞进行实验。脂质体 Oligofectamine™ 及 TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司,*Plk1* 兔多克隆抗体及山羊抗兔 FITC 荧光二抗购自北京希凯公司,Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒购自碧云天生物试剂公司,DMEM 培养基、胰蛋白酶和 Opti-MEM 培养基购自 Gibco 公司,AMV Single Step RT-PCR 试剂盒购自 BBI 公司,DAPI 购自美国 Roche 公司。

1.2 miR-100 mimics 的合成与细胞转染

由 TaKaRa 公司合成 miR-100 mimics 和阴性对照序列,全硫代修饰,5'端带有 Cy3 荧光标记,可用于检测转染效率。miR-100 mimics 序列:5'-AAC-CCGUAGAUCGGAACUUGUG-3';阴性对照序列:5'-CGAGUAGACUCCAACUGUGAUC-3'。HepG2 细胞在转染前于 24 孔板内(5 × 10⁴/孔)培养 24 h。细胞转染过程按 Oligofectamine™ 操作说明,miR-100 mimics 转染终浓度为 200 nmol/L。转染后 4 h 于每孔内加入培养基,培养 48、72 h。实验同步设阴性对照、空白对照和脂质体组,每组设 3 个复孔。

1.3 RT-PCR 检测 *Plk1* mRNA 的表达

TRIzol 法提取转染后 48、72 h HepG2 细胞总 RNA,利用紫外分光光度计检测其浓度和纯度,1% 甲醛变性的琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性。*Plk1* 引物由上海生工生物公司合成:上游引物为 5'-CCCCTCACAGTCTCAATAA-3',下游引物为 5'-TGTCCGAATAGTCCACCC-3'; β -actin 作内参对照,上游引物为 5'-CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC-3',下游引物为 5'-AGGCTACATGGTGGTGC-CGCCAGAC-3'。RT-PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶

电泳,半定量分析采用 Band leader 3.0 凝胶图像处理软件,将 *Plk1* 电泳条带的平均灰度值以 β -actin 校正,得出 *Plk1* mRNA 相对表达水平。

1.4 免疫细胞荧光化学法检测 *Plk1* 蛋白的表达

取转染后 48、72 h 各组 HepG2 细胞,4% 多聚甲醛固定,0.25% Triton X-100 室温下通透 15 min,3% 的 H₂O₂ 室温下避光孵育 15 min,然后滴加 *Plk1* 兔多克隆抗(稀释比例为 1:100),4℃ 过夜,室温下复温 30 min,滴加山羊抗兔 FITC 荧光二抗(稀释比例 1:100),37℃ 避光孵育 1 h,滴加 1 μ l/ml DAPI 工作液,室温下避光孵育 3 min;以上每步操作后均用 PBS 冲洗 3 次。最后在激光共聚焦荧光显微镜下观察实验结果并采集图像。实验同步以 PBS 代替一抗作为空白对照。

1.5 Annexin V-FITC 试剂盒检测 HepG2 细胞凋亡

取转染后 72 h HepG2 细胞,PBS 冲洗后,按照 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明进行操作,每孔加入 195 μ l 的 Annexin V-FITC 结合液,再加入 5 μ l 的 Annexin V-FITC 混匀,室温下避光孵育 10 min,弃上述混合液,每孔加入 190 μ l 的 Annexin V-FITC 结合液,再加入 10 μ l 的碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色液混匀,冰浴避光孵育 2 min,随后在激光共聚焦荧光显微镜下观察实验结果,并采集图像。

1.6 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件包(SPSS Inc, Chicago, USA),数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,组间率的比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-100 mimics 成功转染肝癌 HepG2 细胞

本实验采用了 5'末端标记有 Cy3 荧光的 miR-100 mimics 和阴性对照,以脂质体介导转染肝癌 HepG2 细胞,在激光共聚焦荧光显微镜下观察转染结果,可见大多数细胞内出现红色荧光,分布在细胞质中,转染效率大于(88.75 ± 2.22)%,说明脂质体成功介导 miR-100 mimics 转染肝癌细胞(图 1)。

2.2 转染 miR-100 mimics 下调 HepG2 细胞中 *Plk1* mRNA 和蛋白的表达

在 HepG2 细胞转染后 48 h 和 72 h 时提取实验组和对照组的 HepG2 细胞总 RNA,采用 RT-PCR 法分析 *Plk1* mRNA 的表达水平(图 2)。转染后 48 h 后,miR-100 实验组 *Plk1* mRNA 的表达水平明显低于阴性对照、空白对照组和脂质体组[(0.71 ±

0.01) vs (0.95 ± 0.01)、(0.92 ± 0.02)、(0.93 ± 0.02), 均 $P < 0.05$]; 转染后 72 h 后, miR-100 实验组 *Plk1* mRNA 的表达水平也低于阴性对照、空白对照组和脂质体组 (0.59 ± 0.02) vs (0.84 ± 0.03)、(0.83 ± 0.03)、(0.83 ± 0.02), 均 $P < 0.05$]; 可见肝癌 HepG2 细胞经成功转染 miR-100 mimics 后, *Plk1* mRNA 表达量下降。另外, 免疫细胞荧光化学检测发现, miR-100 实验组 *Plk1* 蛋白在转染后 48 h 较对照组无明显减少, 然而在转染后 72 h 较对照组显著减少, 几乎不见表达 (图 3)。以上结果说明 miR-100 能够抑制 *Plk1* 基因的表达。

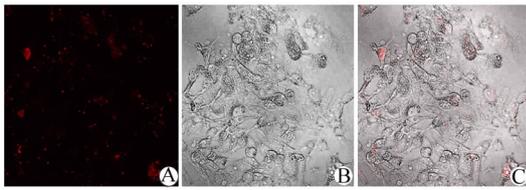


图 1 miR-100 mimics 转染 HepG2 细胞 (×400)

Fig. 1 miR-100 mimics transfected into HepG2 cells (×400)

A: Fluorescence microscope; B: Light microscope; C: Merge

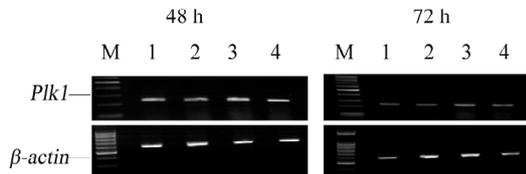


图 2 HepG2 细胞转染 miR-100 mimics 后 *Plk1* mRNA 的表达

Fig. 2 *Plk1* mRNA expression in HepG2 cells after miR-100 mimics transfection

M: Marker; 1: miR-100 mimics; 2: Negative control; 3: Blank control; 4: Liposome control

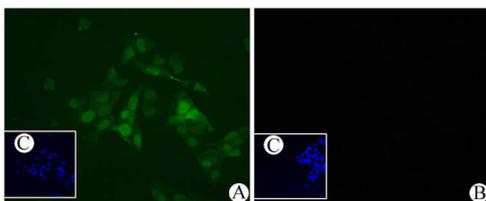


图 3 miR-100 mimics 转染 72 h 后 HepG2 细胞中 *Plk1* 蛋白的表达 (×400)

Fig. 3 *Plk1* protein expression in HepG2 cells 72 h after miR-100 mimics transfection (×400)

Green color: FITC; Blue color: DAPI
A: Control; B: miR-100 mimics; C: Nucleus

2.3 miR-100 mimics 转染促进 HepG2 细胞的凋亡
镜下 (图 4) 可见, 转染 miR-100 mimics 后 72 h,

肝癌 HepG2 细胞呈现较多的凋亡。取 5 个视野, 计算出每个视野中凋亡细胞数和未凋亡细胞数, 得出细胞凋亡率。miR-100 实验组 HepG2 细胞凋亡率明显高于阴性对照 [(26.95 ± 6.72)% vs (15.03 ± 5.12)% , $P < 0.05$]、空白对照组 [(26.95 ± 6.72)% vs (6.88 ± 3.71)% , $P < 0.01$]和脂质体组 [(26.95 ± 6.72)% vs (9.00 ± 3.37)% , $P < 0.01$], 说明 miR-100 转染可促进肝癌细胞的凋亡。

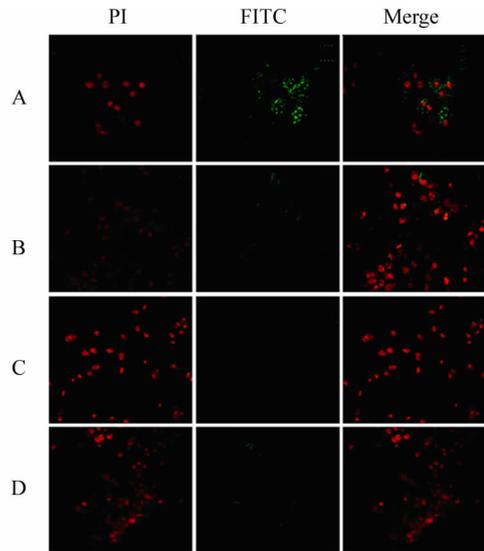


图 4 miR-100 mimics 转染 72 h 后 HepG2 细胞的凋亡 (×400)

Fig. 4 Apoptosis of HepG2 cells 72 h after miR-100 mimics transfection (×400)

A: miR-100 mimics; B: Negative control; C: Blank control; D: Liposome control

3 讨论

Plk1 在大多数人类肿瘤组织中高表达, 如肺癌^[7]、乳腺癌^[8]、卵巢癌^[9]、前列腺癌^[10]、胃癌^[11]、头颈部鳞癌^[12] 和黑素瘤^[13], 且在肿瘤发生、发展中起重要作用, 与肿瘤患者不良预后密切相关。通过 *Plk1* 抗体^[14]、siRNA^[15]、小分子激酶抑制剂^[16] 等方法阻断 *Plk1* 的表达或降低其激酶活性, 能够有效抑制肿瘤细胞的增殖, 并诱导肿瘤细胞的凋亡, 提示 *Plk1* 是一个颇具吸引力的基因治疗靶点。

本课题利用 Sanger miRNA 数据库预测了针对 *Plk1* 基因的特异性 miRNA, 最终选定 miR-100 作为候选 miRNA。目前国内外关于 miR-100 的研究还较少。有报道^[17] 显示, miR-100 在口腔鳞状细胞癌组织及其细胞系内表达均下调, 当在细胞内转染入外源的 miR-100 后可显著抑制癌细胞的增殖和改变

其靶基因的表达;另有研究^[18]发现,miR-100 在胃癌组织中表达明显上调,但其生物学作用还不十分清楚。

目前 miRNA 用于肿瘤治疗尚处于探索阶段。Weiler 等^[19]采用反义技术下调 miRNA 表达,显示针对 miRNA 的反义寡核苷酸是抑制 miRNA 表达的有效工具,有望在肿瘤的治疗中发挥重要作用。Meister 等^[20]在体外将靶向 miR-21 的反义 2-氧甲基修饰的 miRNA 导入人宫颈癌细胞,发现细胞内 miR-21 的表达明显受抑制。另外,利用病毒载体或阳离子脂质体瞬时引入大量具有抑制作用的 miRNA,也可以诱导肿瘤细胞的凋亡。

本研究采用阳离子脂质体 oligofectamine 介导,成功地将 miRNA-100 mimics 转染入肝癌 HepG2 细胞内,经半定量 RT-PCR 分析发现,转染 miRNA-100 mimics 后,HepG2 细胞中 *Plk1* mRNA 表达水平在 48 h 后显著低于对照组;免疫荧光检测发现,转染 miR-100 mimics 后 72 h,HepG2 细胞中 *Plk1* 蛋白的表达较对照组锐减。细胞凋亡检测结果显示,HepG2 细胞经转染 miR-100 mimics 后 72 h,细胞凋亡率明显增高。以上实验结果表明,miR-100 对 *Plk1* mRNA 和蛋白的表达具有抑制作用,可以促进 HepG2 细胞的凋亡。亦有研究^[21]报道,利用小分子 RNA 干扰技术,miR-100 可成功抑制人鼻咽癌细胞中 *Plk1* mRNA 和蛋白的表达,这与本研究的结果是一致的。总之,通过 miR-100 调控靶基因 *Plk1* 的表达进而促进肝癌细胞凋亡,有可能成为临床上肝癌基因治疗的一种新途径。

[参 考 文 献]

- [1] Leite KR, Tomiyama A, Reis ST, et al. MicroRNA-100 expression is independently related to biochemical recurrence of prostate cancer [J]. *J Urol*, 2011, 185(3): 1118-1122.
- [2] Peng DX, Luo M, Qiu L W, et al. Prognostic implications of microRNA-100 and its functional roles in human epithelial ovarian cancer [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(4): 1238-1244.
- [3] Glover DM, Hagan IM, Tavares AA. Polo-like kinases: A team that plays throughout mitosis [J]. *Genes Dev*, 1998, 12(24): 3777-3787.
- [4] Han DP, Zhu QL, Cui JT, et al. Polo-like kinase 1 is overexpressed in colorectal cancer and participates in the migration and invasion of colorectal cancer cells [J]. *Med Sci Monit*, 2012, 18(6): R237-R246.
- [5] Pellegrino R, Calvisi DF, Ladu S, et al. Oncogenic and tumor suppressive roles of polo-like kinases in human hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2010, 51(3): 857-868.
- [6] 何自力,钟德珩,郑核,等.原发性肝癌 Plk-1 基因表达及其与预后的相关性 [J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(2): 146-150.
- [7] Wolf G, Elez R, Doermer A, et al. Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in non-small cell lung cancer [J]. *Oncogene*, 1997, 14(5): 543-549.
- [8] Wolf G, Hildenbrand R, Schwar C, et al. Polo-like kinase: A novel marker of proliferation: Correlation with estrogen-receptor expression in human breast cancer [J]. *Pathol Res Pract*, 2000, 196(11): 753-759.
- [9] Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K, et al. Expression of polo-like kinase in ovarian cancer is associated with histological grade and clinical stage [J]. *Cancer Lett*, 2001, 164(1): 41-49.
- [10] Ahmad N. Polo-like kinase (Plk) 1: A novel target for the treatment of prostate cancer [J]. *FASEB J*, 2004, 18(1): 5-7.
- [11] Weichert W, Ullrich A, Schmidt M, et al. Expression patterns of polo-like kinase 1 in human gastric cancer [J]. *Cancer Sci*, 2006, 97(4): 271-276.
- [12] Knecht R, Elez R, Oechler M, et al. Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(12): 2794-2797.
- [13] Kneisel L, Strebhardt K, Bernd A, et al. Expression of polo-like kinase (PLK1) in thin melanomas: A novel marker of metastatic disease [J]. *J Cutan Pathol*, 2002, 29(6): 354-358.
- [14] Lane H A, Nigg E A. Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes [J]. *J Cell Biol*, 1996, 135(6 Pt 2): 1701-1713.
- [15] Reagan-Shaw S, Ahmad N. Silencing of polo-like kinase (Plk) 1 via siRNA causes induction of apoptosis and impairment of mitosis machinery in human prostate cancer cells: Implications for the treatment of prostate cancer [J]. *FASEB J*, 2005, 19(6): 611-613.
- [16] Grinshtein N, Datti A, Fujitani M, et al. Small molecule kinase inhibitor screen identifies polo-like kinase 1 as a target for neuroblastoma tumor-initiating cells [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(4): 1385-1395.
- [17] Henson B J, Bhattacharjee S, O' Dee D M, et al. Decreased expression of miR-125b and miR-100 in oral cancer cells contributes to malignancy [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2009, 48(7): 569-582.
- [18] Ueda T, Volinia S, Okumura H, et al. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: A microRNA expression analysis [J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(2): 136-146.
- [19] Weiler J, Hunziker J, Hall J. Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): Ammunition to target miRNAs implicated in human disease? [J]. *Gene Ther*, 2006, 13(6): 496-502.
- [20] Meister G, Landthaler M, Dorsett Y, et al. Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing [J]. *RNA*, 2004, 10(3): 544-550.
- [21] Shi W, Alajez NM, Bastianutto C, et al. Significance of Plk1 regulation by miR-100 in human nasopharyngeal cancer [J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(9): 2036-2048.

[收稿日期] 2012 - 09 - 05

[修回日期] 2012 - 12 - 24

[本文编辑] 周玲琳