

DOI:CNKI;11-3495/R. 20110321. 1140. 019

## miR-9 前体分子抑制食管癌细胞株 TE6 中 NF- $\kappa$ B1 的研究

李高峰\*, 李桂生, 杨春旭, 黄健, 周建红, 秦梅  
(广西柳州市工人医院肿瘤科, 广西 柳州 545005)

**[摘要]** 目的:探讨 micro RNA-9(miR-9)前体分子对食管癌细胞株 TE6 中 NF- $\kappa$ B1 表达的影响。方法:RT-PCR 分析 miR-9 前体分子对食管癌细胞株 TE6 中 NF- $\kappa$ B1 mRNA 表达,Western blot 印迹法观察 miR-9 前体分子对食管癌细胞株 TE6 中 NF- $\kappa$ B1 蛋白表达。结果:食管癌细胞 TE6 的 NF- $\kappa$ B1 基因、蛋白高表达,转染阴性对照前体分子不能抑制 NF- $\kappa$ B1 基因及蛋白的表达,而转染 miR-9 前体分子可显著抑制 NF- $\kappa$ B1 的基因和蛋白表达,抑制率分别为 73.21%,87.63%。结论:miR-9 前体分子可显著抑制食管癌细胞株 TE6 中 NF- $\kappa$ B1 的表达,为食管癌的临床防治提供了新思路。

**[关键词]** 小分子 RNA-9;食管癌细胞株;核因子- $\kappa$ B1

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)10-0177-03

## Downregulation of NF- $\kappa$ B1 by Micro RNA-9 in Esophageal Carcinoma Cell TE6

LI Gao-feng\*, LI Gui-sheng, YANG Chun-xu, HUANG Jian, ZHOU Jian-hong, QIN Mei  
(Department of Oncology, Liuzhou Workers Hospital, Liuzhou 545005, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the influence of micro RNA-9(miR-9) on the down-regulation of NF- $\kappa$ B1 in esophageal carcinoma cell TE6. **Method:** The expression of mRNA of NF- $\kappa$ B1 in esophageal carcinoma cells TE6 by miR-9 was determined with RT-PCR, and the expression of protein of NF- $\kappa$ B1 in esophageal carcinoma cell TE6 by miR-9 was observed with Western blotting. **Result:** The expression of mRNA and protein of NF- $\kappa$ B1 in esophageal carcinoma cell TE6 were both up-regulated. The esophageal carcinoma cells which were transfected with negative control could not suppress the expression of mRNA and protein of NF- $\kappa$ B1, but the esophageal carcinoma cells which were transfected with miR-9 could significantly inhibit the expression of mRNA and protein of NF- $\kappa$ B1. The inhibition ratio were 73.21% and 87.63% respectively. **Conclusion:** The expression of NF- $\kappa$ B1 in esophageal cancer cell TE6 is significant down-regulated by miR-9. It provides a new way for prevention and treatment of esophageal carcinoma.

**[Key words]** Micro RNA-9; esophageal cancer cell; NF- $\kappa$ B1

食管癌是人类常见恶性肿瘤之一。本研究利用

RT-PCR 和 Western blot 法检测了 micro RNA-9(miR-9)前体分子对食管癌细胞株 TE6 中 NF- $\kappa$ B1 表达的影响。以寻求为食管癌的临床防治提供新的研究思路。

### 1 材料与方法

**1.1 细胞株** 食管癌细胞株 TE6 由本室保存;RNA 试剂盒 Trizol 和 Lipofectamine™ 2000 购自美国

**[收稿日期]** 2011-01-04

**[基金项目]** 广西壮族自治区自然科学基金项目(0991269)

**[通讯作者]** \*李高峰,博士,副主任医师,从事肿瘤放射治疗临床研究, Tel: 13558326806, 07723836539, E-mail: ligaofeng1000@sina.com.cn

**[网络出版时间]** 2011-03-21 11:40

Invitrogen 公司; OneStep RT-PCR Kit 购自美国 Qiagen 公司; 引物由上海生工有限公司合成; NF- $\kappa$ B1 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;  $\beta$ -actin 单克隆抗体购自 NeoMarkers 公司; PVDF 膜和化学发光液购自 Pierce 公司; miR-9 前体分子、miR-9 前体分子抑制物购自上海吉玛公司。

**1.2 仪器** PCT200 PCR 仪购自美国 MJ Research 公司; BP16 型 CO<sub>2</sub> 培养箱购自德国 Heraeus 公司; 超低温冰箱购自 Sanyo 公司。

**1.3 细胞培养** 在含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液下培养。RPMI 1640 培养基购自 Sigma 公司, 于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养, 每 2 ~ 3 d 传代 1 次, 取对数生长期细胞用于实验。

**1.4 细胞转染** 转染前 1 d 将 TE6 细胞接种至 24 孔板中, 1 × 10<sup>5</sup> 个/孔, 使细胞达到 90% ~ 95% 汇合, 转染时用 Opti-MEM 培养基 400  $\mu$ L 换去完全培养基。分别用 50  $\mu$ L 的 Opti-MEM 稀释 0.8  $\mu$ g miR-9 前体分子和 2  $\mu$ L Lipofectamine™ 2 000, 室温孵育 5 min, 将 50  $\mu$ L 的 Lipofectamine™ 2 000 混合物加入 miR-9 前体分子中, 总体积为 100  $\mu$ L, 轻轻混匀, 室温孵育 20 min, 将 100  $\mu$ L 的 DNA-Lipofectamine™ 2 000 混合物加入 24 孔板孔中, 轻轻混匀, 培养 6 ~ 8 h 后更换完全培养基, 37 °C 培养。

**1.5 半定量 RT-PCR** 用改进的异硫氰酸胍一步法<sup>[1]</sup>从上述标本中提取总 RNA。半定量 PCR 方法如下: 提取的总 RNA 用 DNaseI 去除痕量基因组 DNA。按照逆转录试剂盒操作程序进行逆转录反应, PCR 反应条件为 94 °C 45 s, 58 °C 45 s, 72 °C 45 s, 30 个循环。扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳分离, 结果采用 1-D ADWANCED 软件进行区带的灰度分析, 分别测定 Tiam1 和 GAPDH 扩增带的密度比值, 该比值表示各肿瘤细胞株的相对表达强度, 实验重复 3 次。引物序列如下:

前导链: 5'-CCGGGATCCGCAAACTCAGCTTTAC-3',  
后随链: 5'-CGGAATTCGTGGCGACCGTGATACC-3'。

**1.6 Western blot 方法** 细胞收集后加入 RIPA 裂解液, Bradford 法测定蛋白浓度, 取 20  $\mu$ g 蛋白, 行 8% SDS-PAGE 电泳。电泳完毕后, PAGE 胶上的蛋白用 Bio-Rad 微型电转移至 PVDF 膜上。PVDF 膜加入兔抗人 miR-9 多克隆抗体, 加入 HRP 标记的抗兔二抗, 洗膜, 曝光, X-胶片经显影、定影后扫描记录。以  $\beta$ -actin 为内对照。

## 2 结果

**2.1 miR-9 前体分子对食管癌细胞 TE6 NF- $\kappa$ B1 基因表达的影响** 半定量 PCR 的结果显示, 食管癌细胞 TE6 NF- $\kappa$ B1 基因高表达, 转染阴性对照前体分子不能抑制 NF- $\kappa$ B1 基因的表达, 而转染 miR-9 前体分子可显著抑制 NF- $\kappa$ B1 的基因扩增, 抑制率 73.21%。见图 1。

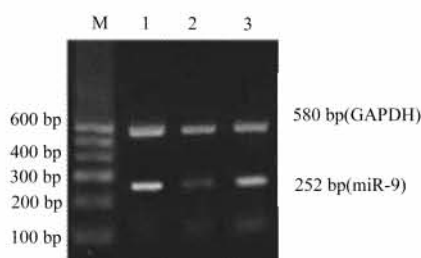


图 1 miR-9 前体分子对 TE6 细胞 NF- $\kappa$ B1 基因表达的影响  
M. marker; 1. 未转染的 TE6 细胞; 2. 已转染 miR-9 前体分子的 TE6 细胞; 3. 已转染前体分子阴性对照的 TE6 细胞

**2.2 miR-9 前体分子对食管癌细胞 TE6 NF- $\kappa$ B 蛋白表达的影响** Western blot 的结果也表明, 食管癌细胞 TE6 NF- $\kappa$ B1 蛋白高表达, 转染阴性对照前体分子不能抑制 NF- $\kappa$ B1 蛋白的表达, 而转染 miR-9 前体分子可显著抑制 NF- $\kappa$ B1 的蛋白扩增, 抑制率 87.63%。见图 2。

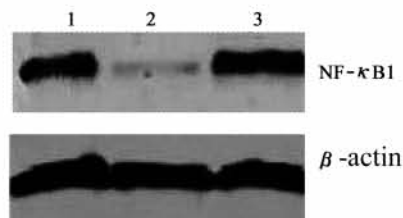


图 2 miR-9 前体分子对食管癌细胞 TE6 NF- $\kappa$ B1 蛋白的表达的影响

1. 未转染的 TE6 细胞; 2. 已转染 miR-9 前体分子的 TE6 细胞  
3. 已转染前体分子阴性对照的 TE6 细胞

## 3 讨论

miRNA 是近年来发现的一类长度为 19 ~ 25 个核苷酸的非编码小分子 RNA。miRNAs 以碱基互补的方式识别靶基因, 降解靶标基因 mRNA 或抑制其翻译, 发挥着类似于癌基因或抑癌基因的功能。引导 RNA 诱导沉默复合体 (RISC) 破坏 mRNA 或者阻碍 mRNA 转录成蛋白质<sup>[2-3]</sup>。下调参与许多重要细胞活动基因的表达。miRNA 在肿瘤的发生和发展中起着重要的作用, miRNA 具有癌基因和抑癌基因的作用。已发现若干 miRNA 直接参与消化器官 (包括

肝、食管、结肠、胰腺、胃、胆管)肿瘤的发生和发展<sup>[4,5]</sup>,atson 等的研究发现在食管鳞状上皮、巴东特食管(BE)和贲门柱状上皮中 39 种 micRNA 的表达明显不同。miR. 21, miR. 143, miR. 145, miR. 194, miR. 215 表达在 BE 和贲门柱状上皮中明显上调,从食管鳞状上皮-BE-腺癌中,miR. 21 表达有逐渐上升的趋势。BE 中 miR. 143, miR. 194, miR. 205 高表达,而在食管癌中表达下降。与此相反。miR. 203, miR. 205 在 BE 和贲门柱状上皮中低表达<sup>[6]</sup>。特定 microRNA 失调及其对靶基因表达的影响,miRNA 的发现为肿瘤发病机制的研究提供了新的思路,为肿瘤诊断和治疗提供了新的策略。

食管癌(carcinoma of esophagus)是食管鳞状上皮的恶性肿瘤,由食管黏膜正常上皮细胞受体内外各种因素刺激逐渐形成。食管癌是人类常见恶性肿瘤之一。全世界每年约 30 万人死于食管癌。我国是食管癌的高发国家,也是本病死亡率最高的国家。全世界每年食管癌新发病例约 31.04 万,而我国占 16.72 万。由于食管肿瘤的病期早晚与疗效有着直接关系,因此早期发现、诊断和治疗,对提高生存率和治愈率有重要意义。

有研究表明<sup>[7]</sup>,MicroRNA-9 可以通过调控 NF- $\kappa$ B1 蛋白抑制卵巢癌细胞的生长。他们的研究表明 microRNA-9 在卵巢癌细胞中是低表达的,而增加 microRNA-9 可以抑制细胞的体外生长,另外,他们发现 miR-9 直接作用于 NF- $\kappa$ B1 的 3'-UTR 区,说明 NF- $\kappa$ B1 是一个卵巢癌中 miR-9 的重要的靶点,当 miR-9 高表达时 NF- $\kappa$ B1 的 mRNA 和蛋白都被抑制。在食管癌中是否也存在这种相关,作者设想通过减弱或抑制 miR-9 的表达,观察其对食管癌细胞 NF- $\kappa$ B1 的表达,为下一步食管癌的基因治疗奠定实验基础。

目前对肿瘤细胞的研究多通过阻断因子的受体来抑制肿瘤细胞的增殖及迁徙<sup>[8,9]</sup>。本研究表明采用 miR-9 前体分子可阻断食管癌细胞株中 NF- $\kappa$ B1 的生物活性,进一步表明 miR-9 前体分子能够调控

食管癌细胞株 NF- $\kappa$ B1 的表达,为 MicroRNA 用于食管癌病人的生物治疗提供了理论依据。

#### [参考文献]

- [1] Minard M E, Kim L S, Price J E, et al. The role of the guanine nucleotide exchange factor Tiam1 in cellular migration, invasion, adhesion and tumor progression[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2004, 84:21.
- [2] Mise-Omata S, Montagne B, Deckert M, et al. Mammalian actin binding protein 1 is essential for endocytosis but not lamellipodia formation: functional analysis by RNA interference[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 301(3):704.
- [3] Berezikov E, Guryev V, Plasterk R H, et al. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes [J]. *Cell*, 2005, 120:21.
- [4] Lanza G, Ferracin M, Gafà R, et al. mRNA/micro RNA gene expression profile in microsatellite unstable colorectal cancer[J]. *Mol Cancer*, 2007, 6:54.
- [5] Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. let-7 micro RNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(5):903.
- [6] Schetter A J, Leung S Y, Sohn J J, et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma [J]. *JAMA* 2008, 299:425.
- [7] Yang H S, Jansen A P, Nair R, et al. A novel transformation suppressor, Pdc4d, inhibits AP-1 transactivation but not NF-kappaB or ODC transactivation [J]. *Oncogene*, 2001, 20:669.
- [8] Madiati F, Goettl V M, Hussian S R, et al. Anti-fibroblast growth factor-2 antibodies attenuate mechanical allodynia in a rat model of neuropathic pain [J]. *J Mol Neurosci*, 2005, 27(3):315.
- [9] Dailey L, Ambrosetti D, Mansukhani A, et al. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, 16(2):233.

[责任编辑 何伟]