

细胞外信号调节激酶及蛋白激酶 B 信号通路在微 RNA-21 促进胆管癌细胞侵袭转移中的作用

晋志远 黄强 刘臣海 刘振 朱成林 谢放 汪超

【摘要】 目的 观察细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2) 及蛋白激酶 B (Akt) 信号通路在微 RNA-21 (miR-21) 促进胆管癌细胞侵袭转移中的作用。**方法** 采用实验研究方法。体外培养胆管癌细胞 QBC939 细胞,通过构建合成无关序列、miR-21 mimics 和 miR-21 inhibitor 并转染到细胞中,将细胞分为 4 组:cell 组:自然生长细胞,21-NC 组:转染无关序列,21-M 组:转染 miR-21 mimics,21-I 组:转染 miR-21 inhibitor。另取 21-M 组细胞进一步分为 2 组,分别加入 20 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 和 10 $\mu\text{mol/L}$ U0126 处理 48 h,用于后续实验。检测指标:(1) RT-qPCR 检测 miR-21 在各组胆管癌细胞中的表达。(2) Western blot 检测各组胆管癌细胞第 10 号染色体缺失的张力源性磷酸酶 (PTEN)、ERK 及 Akt 蛋白的相对表达量。(3) 划痕实验检测各组胆管癌细胞迁移能力。(4) Transwell 实验检测各组胆管癌细胞迁移与侵袭能力的影响。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数比较采用 t 检验,多组均数比较采用方差分析,组间两两比较采用 Bonferroni 检验,重复测量数据采用重复测量方差分析。**结果** (1) miR-21 在 cell 组、21-NC 组、21-M 组及 21-I 组中的相对表达量分别为 1.010 ± 0.010 、 0.980 ± 0.050 、 4.900 ± 0.350 、 0.260 ± 0.010 ,4 组比较,差异有统计学意义 ($F = 78.23, P < 0.05$)。21-NC 组 miR-21 表达分别与 cell 组比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。21-M 组 miR-21 表达较 cell 组增加,21-I 组较 cell 组减少,21-M 组和 21-I 组分别与 cell 组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。(2) cell 组、21-NC 组、21-M 组、21-I 组细胞 PTEN 蛋白相对表达量分别为 0.360 ± 0.020 、 0.400 ± 0.030 、 0.140 ± 0.010 、 0.680 ± 0.110 , ERK 蛋白相对表达量分别为 0.045 ± 0.126 、 0.470 ± 0.140 、 0.460 ± 0.060 、 0.440 ± 0.110 , p-ERK 蛋白相对表达量分别为 0.310 ± 0.020 、 0.380 ± 0.040 、 0.590 ± 0.060 、 0.160 ± 0.010 , Akt 蛋白相对表达量分别为 0.400 ± 0.010 、 0.390 ± 0.080 、 0.410 ± 0.090 、 0.380 ± 0.070 , p-Akt 蛋白相对表达量分别为 0.440 ± 0.110 、 0.510 ± 0.120 、 0.980 ± 0.150 、 0.190 ± 0.010 , 4 组细胞 PTEN、p-ERK、p-Akt 蛋白相对表达量比较,差异均有统计学意义 ($F = 10.23, 12.78, 18.11, P < 0.05$),与 cell 组比较,21-NC 组 PTEN、ERK、p-ERK、Akt、p-Akt 表达,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$);而 21-M 组与 cell 组比较,PTEN 表达减少,p-ERK 和 p-Akt 表达增加,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);21-I 组与 cell 组比较,PTEN 表达增加,而 p-ERK 和 p-Akt 表达降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。(3) cell 组、21-M 组、miR-21 + LY294002 组、miR-21 + U0126 组细胞 6 ~ 48 h 迁移率变化范围为 $12.0\% \pm 3.0\% \sim 23.0\% \pm 5.0\%$ 、 $21.0\% \pm 4.0\% \sim 43.0\% \pm 7.0\%$ 、 $6.0\% \pm 1.0\% \sim 18.0\% \pm 4.0\%$ 、 $9.0\% \pm 2.0\% \sim 26.0\% \pm 6.0\%$ 。与 cell 组比较,21-M 组细胞迁移能力各时间点迁移率更高,两组迁移率变化趋势比较,差异有统计学意义 ($F = 16.23, P < 0.05$)。miR-21 + LY294002 组、miR-21 + U0126 组迁移率较 21-M 组下降,3 组迁移率趋势比较,差异有统计学意义 ($F = 25.21, P < 0.05$),3 组迁移率变化趋势与时间交互效应,具有统计学意义 ($F = 35.31, P < 0.05$)。(4) cell 组、21-M 组、miR-21 + LY294002 组、miR-21 + U0126 组迁移细胞数分别为 (198 ± 32) 个、 (248 ± 39) 个、 (187 ± 23) 个、 (174 ± 28) 个,4 组比较,差异有统计学意义 ($F = 8.48, P < 0.05$);21-M 组与 cell 组比较,差异有统计学意义 ($t = 4.13, P < 0.05$);miR-21 + LY294002 组、miR-21 + U0126 组迁移细胞数较 21-M 组下降,3 组比较,差异有统计学意义 ($F = 21.98, P < 0.05$)。cell 组、21-M 组、miR-21 + LY294002 组、miR-21 + U0126 组侵袭细胞数分别为 (102 ± 22) 个、 (211 ± 36) 个、 (55 ± 9) 个、 (67 ± 13) 个,4 组比较,差异有统计学意义 ($F = 11.32, P < 0.05$);21-M 组与 cell 组比较,差异有统计学意义 ($t = 6.67, P < 0.05$);miR-21 + LY294002 组、miR-21 + U0126 组侵袭细胞数较 21-M 组下降,3 组比较,差异有统计学意义 ($F = 36.23, P < 0.05$)。**结论** ERK 及 Akt 信号通路参与了 miR-21 促进胆管癌细胞侵袭

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2016.09.014

作者单位:230001 合肥,安徽医科大学附属医院普通外科 肝胆胰外科安徽省重点实验室

通信作者:黄强,Email:hq-sohu@sohu.com

迁移, PTEN 可能介导了 miR-21 通过 ERK 及 Akt 通路促进胆管癌侵袭转移的过程。

【关键词】胆管肿瘤; 微 RNA-21; 侵袭; 迁移; 细胞外信号调节激酶; 蛋白激酶 B

基金项目: 国家自然科学基金(81272397); 安徽省教育厅自然科学基金项目(KJ2013Z143)

Effects of extracellular signal-regulated kinase/protein kinase B signal pathway in cholangiocarcinoma cells invasion and migration promoted by microRNA-21 Jin Zhiyuan, Huang Qiang, Liu Chenhai, Liu Zhen, Zhu Chenglin, Xie Fang, Wang Chao. Department of General Surgery, Anhui Provincial Hospital, Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230001, China

Corresponding author: Huang Qiang, Email: hq-sohu@sohu.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 and protein kinase B (Akt) signal pathway in cholangiocarcinoma cells invasion and migration promoted by microRNA-21(miR-21). **Methods** The experimental study was adopted. QBC939 cholangiocarcinoma cells were cultured *in vitro*, through constructing and synthesizing unrelated sequence, miR-21 mimics and miR-21 inhibitor which were transfected into cells, and these cells were allocated into 4 groups, including growing naturally cells in the cell group, cells transfected by unrelated sequence in the 21-NC group, cells transfected by miR-21 mimics in the 21-M group and cells transfected by miR-21 inhibitor in the 21-I group. Besides, cells in the 21-M group were allocated again into the 2 groups, 20 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 and 10 $\mu\text{mol/L}$ U0126 were respectively added in order to dispose 48 hours for follow-up experiments. Indications of the test: (1) real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the expression of miR-21 in each group of cholangiocarcinoma cells. (2) Western blot was performed to detect the relative expressions of PTEN, ERK and Akt proteins in each group of cholangiocarcinoma cells. (3) Scarification assay was executed to test the migration of each group of cholangiocarcinoma cells. Transwell experiment was conducted to examine the migration and invasion of each group of cholangiocarcinoma cells. The measurement data with normal distribution were presented by $\bar{x} \pm s$. The means of the 2 groups were compared by the *t* test. The means among groups were compared by the ANOVA, and pairwise comparison was analyzed by the Bonferroni test. The repeated measurement data were analyzed by the repeated measures ANOVA. **Results** (1) The relative expression of miR-21 in the cell group, 21-NC group, 21-M group and 21-I group were 1.010 ± 0.010 , 0.980 ± 0.050 , 4.900 ± 0.350 and 0.260 ± 0.010 , respectively, with a statistically significant difference among the 4 groups ($F = 78.23$, $P < 0.05$), with no statistically significant difference between the 21-NC group and cell group ($P > 0.05$). There was increased expression between the 21-M group and cell group, decreased expression between the 21-I group and cell group and significant difference between 21-M group or 21-I group and cell group ($P < 0.05$). (2) The relative expressions of PTEN, ERK, p-ERK, Akt and p-Akt proteins in the cell group, 21-NC group, 21-M group and 21-I group were 0.360 ± 0.020 , 0.400 ± 0.030 , 0.140 ± 0.010 , 0.680 ± 0.110 and 0.045 ± 0.126 , 0.470 ± 0.140 , 0.460 ± 0.060 , 0.440 ± 0.110 and 0.310 ± 0.020 , 0.380 ± 0.040 , 0.590 ± 0.060 , 0.160 ± 0.010 and 0.400 ± 0.010 , 0.390 ± 0.080 , 0.410 ± 0.090 , 0.380 ± 0.070 and 0.440 ± 0.110 , 0.510 ± 0.120 , 0.980 ± 0.150 , 0.190 ± 0.010 , respectively, showing statistically significant differences among the 4 groups ($F = 10.23, 12.78, 18.11$, $P < 0.05$). There was no significant difference in the relative expressions of PTEN, ERK, p-ERK, Akt and p-Akt proteins between the cell group and 21-NC group ($P > 0.05$). Compared with cell group, there was decreased PTEN expression and increased p-ERK and p-Akt expressions in the 21-M group, showing statistically significant differences ($P < 0.05$). Compared with cell group, there was increased PTEN expression and decreased p-ERK and p-Akt expressions in the 21-I group, showing statistically significant differences ($P < 0.05$). (3) The change of migration rate of cells from 6 hours to 48 hours were from $12.0\% \pm 3.0\%$ to $23.0\% \pm 5.0\%$ in the cell group, from $21.0\% \pm 4.0\%$ to $43.0\% \pm 7.0\%$ in the 21-M group, from $6.0\% \pm 1.0\%$ to $18.0\% \pm 4.0\%$ in the miR-21 + LY294002 group and from $9.0\% \pm 2.0\%$ to $26.0\% \pm 6.0\%$ in the miR-21 + U0126 group, respectively. The migration rate of cells in the 21-M group at each time point was higher than that in the cell group ($F = 16.23$, $P < 0.05$). The migration rate of cells in the miR-21 + LY294002 group and miR-21 + U0126 group were lower than that in the 21-M group ($F = 25.21$, $P < 0.05$), and there was the interaction effects between the change of migration rate of cells of the 3 groups and time, with a statistically significant difference ($F = 35.31$, $P < 0.05$). (4) The numbers of migration cells in the cell group, 21-M group, miR-21 + LY294002 group and miR-21 + U0126 group were 198 ± 32 , 248 ± 39 , 187 ± 23 and 174 ± 28 , respectively, with a statistically significant difference among the 4 groups ($F = 8.48$, $P < 0.05$) and between the 21-M group and cell group ($t = 4.13$, $P < 0.05$). Compared with the 21-M group, the numbers of migration cells in the miR-21 + LY294002 group and miR-21 + U0126 group were decreased ($F = 21.98$, $P < 0.05$). The numbers of invasion cells in the cell group, 21-M group, miR-21 + LY294002 group and miR-21 + U0126 group were 102 ± 22 , 211 ± 36 , 55 ± 9 and 67 ± 13 , respectively, showing a statistically significant difference among the 4 groups ($F = 11.32$, $P < 0.05$) and between the 21-M group and cell group ($t = 6.67$, $P < 0.05$). Compared with the 21-M group, the numbers of invasion cells in the miR-21 + LY294002 group and miR-21 + U0126 group were decreased ($F = 36.23$, $P < 0.05$). **Conclusion** ERK and Akt signal pathway participate in the cholangio-

carcinoma cells invasion and migration promoted by miR-21, PTEN could mediate the process of promoting cholangiocarcinoma cells invasion and migration through ERK and Akt signal pathway promoted by miR-21.

【Key words】 Bile duct neoplasms; MicroRNA-21; Invasion; Migration; Extracellular signal-regulated kinase; Protein kinase B

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81272397); Natural Science Foundation of Department of Education of Anhui Province (KJ2013Z143)

胆管癌是一种起源于胆管上皮恶性程度极高的肿瘤,其手术切除率低,术后复发率高,这通常与患者早期发生肿瘤浸润转移有关。微 RNA(miRNA)是一类短小的能在转录水平调节目标基因表达的非编码 RNA,目前 miRNA 及其下游调控基因的相关研究已是国内外研究热点。已有的研究结果证实:细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)1/2 及磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(phosphoinositide-3-kinase-protein kinase B, PI3K-Akt)信号通路在多种肿瘤的侵袭与转移过程中发挥重要作用^[1]。笔者团队前期研究结果发现:miR-21 能促进胆管癌的侵袭与转移^[2]。本研究旨在探讨 ERK 及 Akt 信号通路在 miR-21 调控胆管癌细胞侵袭与转移中的作用。

1 材料与方法

采用实验研究方法。

1.1 材料

人胆管癌 QBC939 细胞由实验室传代保存, DMEM-高糖培养基、胎牛血清、青链霉素购自美国 Hyclone 公司。无关序列、miR-21 mimics 及 miR-21 inhibitor 由中国广州锐博生物科技有限公司提供, mimics 序列为 8-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-29, inhibitor 为其反向互补序列。Opti-MEM 培养基购自美国 Gibco 公司, 逆转录试剂实验盒、聚合酶链反应(PCR)试剂盒及 LipofectamineTM RNAiMAX 购自美国 Invitrogen 公司。Transwell 小室购自美国 BD 公司。ERK、Akt 一抗购自英国 Abcam 公司, 第 10 号染色体缺失的张力源性磷酸酶(phosphatase and tensin homology deleted on ten, PTEN)、磷酸化细胞外信号调节激酶(phospho-extracellular signal-regulated kinase, p-ERK)、磷酸化蛋白激酶(phosphorylated protein kinase B, p-Akt)一抗购自美国 Cell Signaling Technology 公司, 二抗均为羊抗鼠 IgG, 购自美国 Southern Biotech 公司。Akt 通路阻断剂 LY294002 及丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)阻断剂 U0126 均购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组: QBC939 细胞接种于 DMEM 高糖培养基, 加入 10% 胎牛血清及静链霉素, 于 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养箱内常规替代培养。细胞转染采用 LipofectamineTM RNAiMAX 转染试剂, 分别转染无关序列、miR-21 mimics 和 miR-21 inhibitor, 浓度为 50 nmol/L, 转染方法参照说明书, 将细胞分为 4 组: cell 组: 自然生长细胞, 21-NC 组: 转染无关序列, 21-M 组: 转染 miR-21 mimics, 21-I 组: 转染 miR-21 inhibitor。另取 21-M 组细胞进一步分为 2 组, 分别加入 20 μmol/L LY294002(miR-21 + LY294002 组)和 10 μmol/L U0126(miR-21 + U0126 组)处理 48 h, 用于后续实验, 检测细胞的迁移和侵袭实验。

1.2.2 RT-qPCR 检测: 转染后 36 h, 收集 cell 组、21-NC 组、21-M 组、21-I 组细胞, 运用 Trizol 法提取总 RNA 并检测其纯度和完整性, 按照逆转录及 PCR 试剂盒说明设置反应体系及参数, 进行逆转录合成 cDNA 及 PCR 扩增, U6 作为检测 miR-21 的内参基因(表 1)。Primer 5.0 被用来设计引物, 反应体系为 50 ℃ 启动 2 min, 95 ℃ 预变性 2 min, 95 ℃ 变性 15 s, 60 ℃ 退火延伸 32 s, 设置 40 个循环。采用美国 ABI 7500 型荧光实时定量 PCR 仪进行检测, 并采用 7500 Sequence Detection System 分析软件, 所得数据经过内参基因均一处理, 通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方式计算, 目标基因表达差异以相对表达量表示。

表 1 RT-qPCR 的目的基因及内参基因上下游引物

基因名称	引物序列
hsa-miR-21-F	5'-ACACTCCAGCTGGGTAGCTTATCAGACTGATG-3'
hsa-miR-21-R	5'-CTCAACTGGTGTCTGCTGGA-3'
U6-F	5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'
U6-R	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'

1.2.3 Western blot 检测: 提取 cell 组、21-NC 组、21-M 组、21-I 组细胞蛋白, 二喹啉甲酸测定蛋白浓度, 蛋白变性后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 并转移至硝酸纤维素膜上。5% 脱脂奶粉

溶液室温封闭 2 h, 加入一抗 (PTEN、ERK、p-ERK、Akt、p-Akt), 4 ℃ 反应过夜后用 TBST 洗膜, 加入二抗室温反应 2 h, ECL 显色, X 线片放射自显影, 图像分析仪测定条带灰度值, 测得的灰度值高低反映蛋白的表达。

1.2.4 划痕实验: 用记号笔在 6 孔板背后均匀画线。cell 组细胞、21-M 组细胞及 miR-21 + LY294002 组和 miR-21 + U0126 组细胞分别接种于 6 孔板内 (每孔 1×10^6), 丝裂霉素处理后用枪头于 6 孔板横线划痕, PBS 洗 3 次, 无血清培养基常规培养。分别于 0、6、24、48 h 时间点取样拍照。取 8 个视野尺寸进行分析, 计算迁移率。迁移率 = $(1 - \text{其他时间点的距离} / 0 \text{ h 的距离}) \times 100\%$ 。

1.2.5 Transwell 实验: 取 cell 组、21-M 组细胞及 miR-21 + LY294002 组和 miR-21 + U0126 组细胞培养, 48 h 后胰酶消化, 于 Transwell 小室铺 1:8 Matrigel 胶 80 μL , 将 1×10^5 个细胞接种, 加含 100 μL 无血清培养基, 下室加入完全培养基, 孵育 24 h 后棉签擦去上室的细胞, 4% 多聚甲醛固定 15 min, 结晶紫染色 10 min, 200 倍显微镜下计数, 每张膜中间部分和周围部分各取 5 个随机视野进行拍照计数视野内穿过 8 μm 微孔的细胞数, 取其均值, 以侵袭细胞的数目来表示肿瘤的侵袭能力。Transwell 迁移实验除不用 Matrigel 胶在 Transwell 上室制备人工基底膜外, 孵育时间为 16 h, 余步骤同侵袭实验。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组均数比较采用 t 检验, 多组均数比较采用方差分析, 组间两两比较采用 Bonferroni 检验, 重复测量数据采用重复测量方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-qPCR 检测 miR-21 在各组胆管癌细胞中的表达

miR-21 在 cell 组、21-NC 组、21-M 组及 21-I 组中的相对表达量分别为 1.010 ± 0.010 、 0.980 ± 0.050 、 4.900 ± 0.350 、 0.260 ± 0.010 , 4 组比较, 差异有统计学意义 ($F = 78.23, P < 0.05$)。21-NC 组 miR-21 表达分别与 cell 组比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。21-M 组 miR-21 表达较 cell 组增加, 21-I 组 miR-21 表达较 cell 组减少, 21-M 组和 21-I 组分别与 cell 组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 Western blot 检测各组胆管癌细胞相关蛋白的相对表达量

cell 组、21-NC 组、21-M 组、21-I 组细胞 PTEN、p-ERK、p-Akt 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 ERK、AKT 蛋白的相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 cell 组比较, 21-NC 组 PTEN、p-Akt、p-ERK 表达, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 而 21-M 组与 cell 组比较, PTEN 表达减少, p-ERK 和 p-Akt 表达增加, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 21-I 组与 cell 组比较, PTEN 表达增加, 而 p-ERK 和 p-Akt 表达降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2, 图 1。

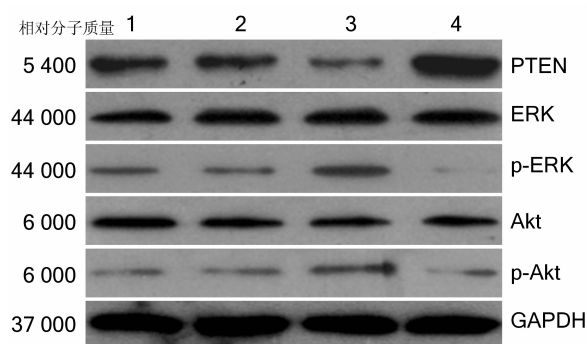
2.3 划痕实验检测各组胆管癌细胞迁移能力

与 cell 组比较, 21-M 组细胞迁移能力各时间点迁移率更高, 两组迁移率变化趋势比较, 差异有统计学意义 ($F = 16.23, P < 0.05$)。miR-21 + LY294002 组、miR-21 + U0126 组迁移率较 21-M 组下降, 3 组迁移率趋势比较, 差异有统计学意义 ($F = 25.21, P < 0.05$), 3 组迁移率变化趋势与时间交互效应, 具有统计学意义 ($F = 35.31, P < 0.05$)。见表 3, 图 2。

表 2 Western blot 检测各组细胞 PTEN、ERK、p-ERK、Akt、p-Akt 蛋白的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	蛋白的相对表达量				
	PTEN	ERK	p-ERK	Akt	p-Akt
Cell 组	0.360 ± 0.020	0.045 ± 0.126	0.310 ± 0.020	0.400 ± 0.010	0.440 ± 0.110
21-NC 组	0.400 ± 0.030	0.470 ± 0.140	0.380 ± 0.040	0.390 ± 0.080	0.510 ± 0.120
21-M 组	0.140 ± 0.010	0.460 ± 0.060	0.590 ± 0.060	0.410 ± 0.090	0.980 ± 0.150
21-I 组	0.680 ± 0.110	0.440 ± 0.110	0.160 ± 0.010	0.380 ± 0.070	0.190 ± 0.010
F 值	10.23	3.22	12.78	2.11	18.11
P 值	<0.05	>0.05	<0.05	>0.05	<0.05

注: cell 组: 自然生长细胞; 21-NC 组: 转染无关序列; 21-M 组: 转染 miR-21 mimics; 21-I 组: 转染 miR-21 inhibitor; PTEN: 第 10 号染色体缺失的张力源性磷酸酶; ERK: 细胞外信号调节激酶; p-ERK: 磷酸化细胞外信号调节激酶; Akt: 蛋白激酶 B; p-Akt: 磷酸化蛋白激酶 B



1: cell 组; 2: 21-NC 组; 3: 21-M 组; 4: 21-I 组 cell 组: 自然生长细胞; 21-NC 组: 转染无关序列; 21-M 组: 转染 miR-21 mimics; 21-I 组: 转染 miR-21 inhibitor; PTEN: 第 10 号染色体缺失的张力源性磷酸酶; ERK: 细胞外信号调节激酶; p-ERK: 磷酸化细胞外信号调节激酶; Akt: 蛋白激酶 B; p-Akt: 磷酸化蛋白激酶 B

图 1 Western blot 检测各组胆管癌细胞 PTEN、ERK、p-ERK、Akt 及 p-Akt 蛋白的相对表达量

2.4 Transwell 实验检测各组胆管癌细胞迁移与侵袭能力的影响

cell 组、21-M 组、miR-21 + LY294002 组、miR-21 + U0126 组迁移细胞数分别为 (198 ± 32) 个、 (248 ± 39) 个、 (187 ± 23) 个、 (174 ± 28) 个, 4 组比较, 差异有统计学意义 ($F = 8.48, P < 0.05$)。21-M 组与 cell 组比较, 差异有统计学意义 ($t = 4.13, P < 0.05$); miR-21 + LY294002 组、miR-21 + U0126 组迁移细胞数较 21-M 组下降, 3 组比较, 差异有统计学意义 ($F = 21.98, P < 0.05$)。cell 组、21-M 组、miR-21 + LY294002 组、miR-21 + U0126 组侵袭细胞数分别为 (102 ± 22) 个、 (211 ± 36) 个、 (55 ± 9) 个、 (67 ± 13) 个, 4 组比较, 差异有统计学意义 ($F = 11.32, P < 0.05$); 21-M 组与 cell 组比较, 差异有统计学意义 ($t = 6.67, P < 0.05$); miR-21 + LY294002 组、miR-21 + U0126 组侵袭细胞数较 21-M 组下降, 3 组比较, 差异有统计学意义 ($F = 36.23, P < 0.05$)。见图 3, 4。

表 3 划痕实验检测各组细胞的迁移率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	6 h	24 h	48 h
cell 组	12.0 ± 3.0	18.0 ± 5.0	23.0 ± 5.0
21-M 组	21.0 ± 4.0	32.0 ± 6.0	43.0 ± 7.0
miR-21 + LY294002 组	6.0 ± 1.0	12.0 ± 2.0	18.0 ± 4.0
miR-21 + U0126 组	9.0 ± 2.0	15.0 ± 4.0	26.0 ± 6.0

注: cell 组: 自然生长细胞; 21-M 组: 转染 miR-21 mimics; miR-21 + LY294002 组: 21-M 组细胞加入 $20 \mu\text{mol/L}$ LY294002 处理 48 h; miR-21 + U0126 组: 21-M 组细胞加入 $10 \mu\text{mol/L}$ U0126 处理 48 h

3 讨论

胆管癌是仅次于肝癌的第二原发肝胆恶性肿瘤, 由于其解剖位置、生长特点及确切诊断标准的缺少而导致早期诊断困难, 大部分患者在被发现时已发生侵袭及转移^[3]。miRNA 是一类具有调控功能的内源性高度保守的非编码 RNA, 长 19 ~ 25 nt, 可通过与目标 mRNA 分子的 3' 端非编码区的结合而在转录后水平调节基因表达。miRNA-21 自被发现以来被证实可作为致癌基因在多种肿瘤中高表达并参与细胞的侵袭、转移等过程, 其在包括胆管癌在内的肿瘤的发生发展中具有重要作用^[4]。笔者团队前期研究中发现: miR-21 在胆管癌组织中表达较癌旁组织及正常组织高^[2]。体外实验也证实了抑制 miR-21 可明显降低胆管癌细胞中侵袭与转移能力^[5-6]。本实验通过上调 miR-21 的表达能明显增加胆管癌细胞的侵袭与迁移能力, 与现有的文章结果一致^[7]。

3.1 miR-21 对于 PTEN、AKT 和 ERK 表达的影响

miRNA 可作用于下游靶基因, 导致一系列相关基因的表达改变, 并且可同时存在多条通路纵横交织成网。ERK1/2 及 PI3K-Akt 通路作为较为经典的信号通路被证实在细胞的增殖、分化、凋亡发挥重要作用^[7]。PI3K/Akt 通路及 ERK 通路的持续活化与肿瘤的发生发展密切相关^[8]。PI3K 在肿瘤细胞中被活化后可激活细胞膜上 PIP3 的生成, 并于磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1 结合而激活 Akt, 进而调控下游如 Caspase-9 等靶基因的表达, 导致肿瘤细胞的增殖及侵袭能力的增加。Yothaisong 等^[9]发现胆管癌中 PI3K/Akt 信号通路活化与肿瘤的转移能力呈正相关, 抑制 Akt 的活性可明显抑制胆管癌的侵袭能力。MAPK 属丝氨酸/苏氨酸蛋白酶家族, 现已明确的 MAPK 家族成员分别为 ERK、JNK (c-Jun 氨基端激酶) 和 p38MAPK 家族, 它们广泛参与调控基因的表达和疾病的发生发展。本研究通过检测 miR-21 不同表达组的胆管癌细胞 ERK 以及 Akt 的表达发现, 上调 miR-21 能显著提高 p-ERK 和 p-Akt 的表达, 两者的表达与自然生长组差异有统计学意义; 而下调 miR-21 后出现与之相反的现象。PTEN 是一种肿瘤抑制因子, 作为 miR-21 的下游靶基因被研究发现介导了 ERK/Akt 通路的活性, PTEN 功能下调通常会引起 Akt 及 ERK 通路的激活从而促进肿瘤的浸润转移。本研究结果表明: 与 cell 组比较, 上调 miR-21 能抑制 PTEN 的表达而下调 miR-21 能提高 PTEN 的表达, 提示 PTEN 可能介导了 miR-21 调控的 ERK 及 Akt 通路的作用, 但 PTEN 在 miR-21 促

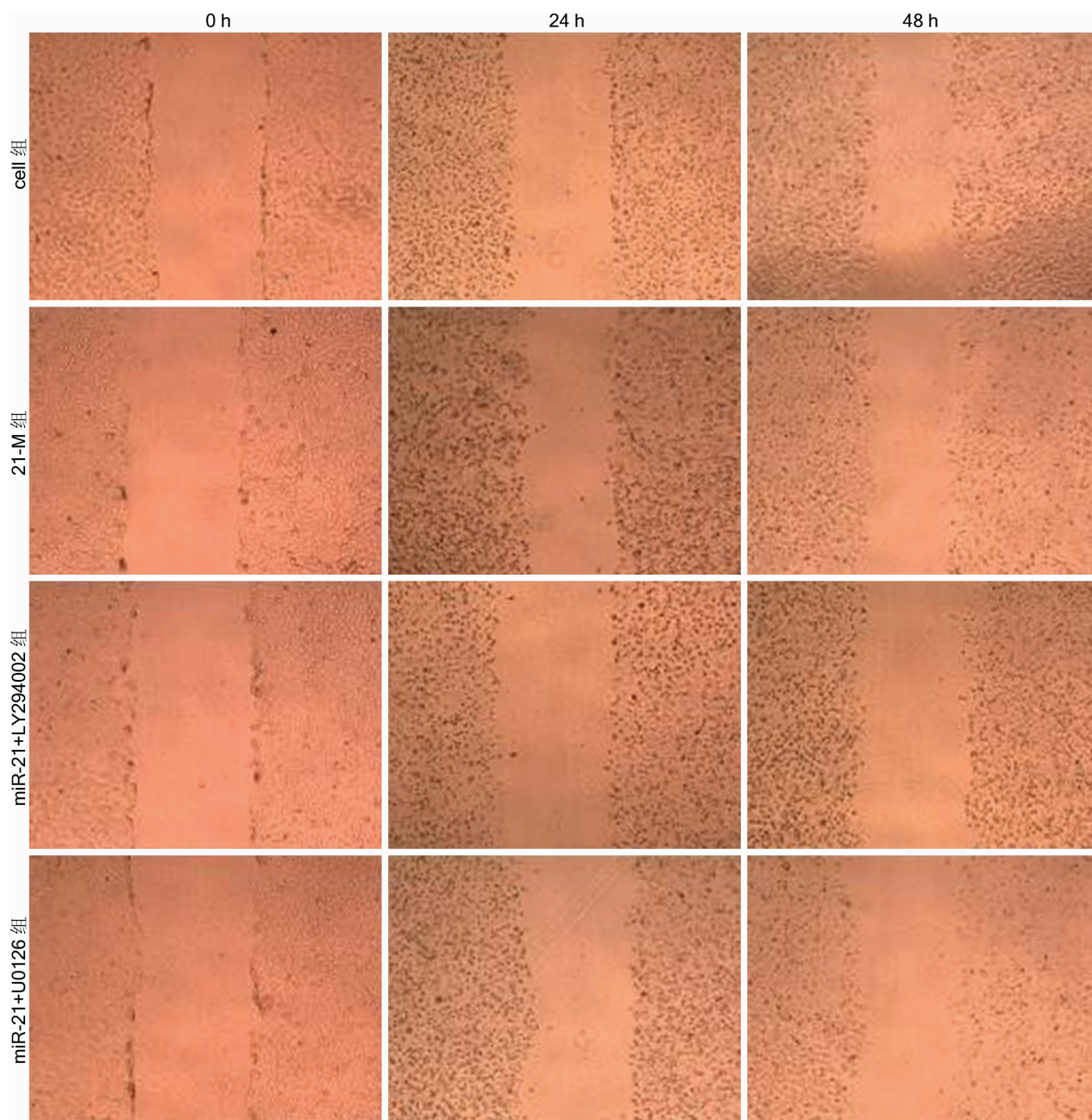


图2 划痕实验检测各组 ERK/Akt 通路阻断对于胆管癌细胞迁移能力的影响 结晶紫染色 中倍放大 cell 组:自然生长细胞;21-M 组:转染 miR-21 mimics;miR-21 + LY294002 组:转染 miR-21 mimics + 20 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 处理 48 h;miR-21 + U0126 组:转染 miR-21 mimics + 10 $\mu\text{mol/L}$ U0126 处理 48 h

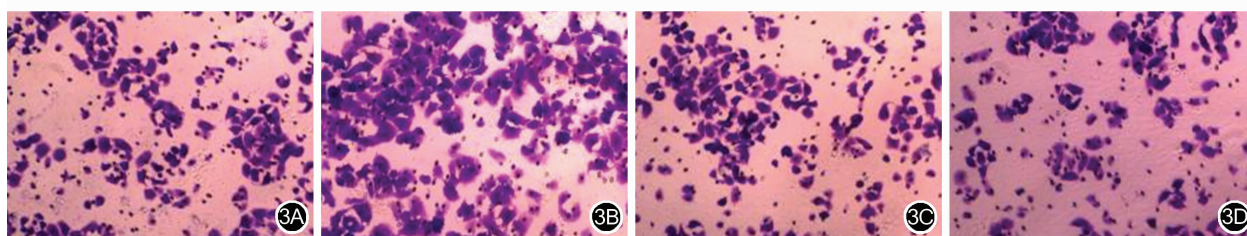


图3 Transwell 实验检测各组 ERK/Akt 通路阻断对于胆管癌细胞迁移能力的影响 结晶紫染色 中倍放大 3A:cell 组:自然生长细胞;3B:21-M 组:转染 miR-21 mimics;3C:miR-21 + LY294002 组:转染 miR-21 mimics + 20 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 处理 48 h;3D:miR-21 + U0126 组:转染 miR-21 mimics + 10 $\mu\text{mol/L}$ U0126 处理 48 h

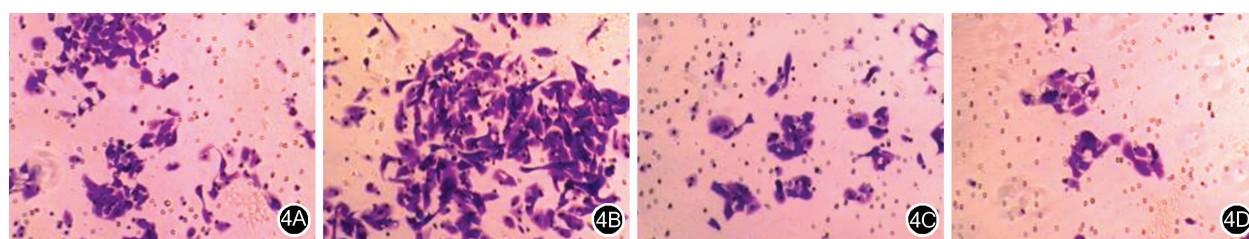


图4 Transwell 实验检测各组 ERK/Akt 通路阻断对于胆管癌细胞侵袭能力的影响 结晶紫染色 中倍放大 4A: cell 组: 自然生长细胞; 4B: 21-M 组: 转染 miR-21 mimics; 4C: miR-21 + LY294002 组: 转染 miR-21 mimics + 20 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 处理 48 h; 4D: miR-21 + U0126 组: 转染 miR-21 mimics + 10 $\mu\text{mol/L}$ U0126 处理 48 h

促进胆管癌细胞侵袭迁移能力及对于 ERK/Akt 通路的具体作用, 仍需进一步研究。

3.2 ERK 和 Akt 通路在 miR-21 促进胆管癌细胞迁移能力的影响

肿瘤的侵袭与转移是导致术后患者复发的重要因素之一, 它涉及原癌基因的激活、抑癌基因失活及多种信号转导通路的相互作用^[10-11]。近来发现 MAPK 及 PI3K-Akt 信号通路与多种 microRNA 分子相互作用^[8-9]。已有的研究结果发现: 膀胱癌中 miR-143 和 miR-145 的下调可明显抑制 MAPK 及 PI3K-Akt 信号通路的活^[12]。Bao 等^[13]发现: miR-21 在肝癌中能通过调节 ERK 及 Akt 通路从而影响肿瘤的侵袭与转移能力。然而 microRNA 及 ERK/Akt 通路在胆管癌中的相关研究尚少, 本研究通过划痕修复实验发现: 21-M 组 6 h、24 h、48 h 的迁移率分别为较 cell 组细胞增加, 而 miR-21 + LY294002 组和 miR-21 + U0126 组迁移率分别较 21-M 组下降, 差异均有统计学意义。本研究 Transwell 实验结果显示: 21-M 组其迁移及侵袭细胞数较 cell 组增加, 而 miR-21 + LY294002 组和 miR-21 + U0126 组其迁移及侵袭细胞数则较 21-M 组减低。以上结果证实 Akt 通路阻断剂 (LY294002) 及 MAPK 阻断剂 (U0126) 阻断 ERK 及 Akt 通路后能抑制 miR-21 对于胆管癌细胞迁移及侵袭能力的影响, 降低 miR-21 转染组胆管癌细胞的侵袭及迁移能力, 提示 ERK/Akt 通路可能在 miR-21 促进胆管癌细胞侵袭与转移过程中发挥作用。

综上, 本研究再次证实了 miR-21 对于胆管癌细胞的侵袭与迁移具有重要调控作用, 而 ERK 及 Akt 通路可能在 miR-21 促进胆管癌细胞侵袭转移中发挥作用, 从而为干预胆管癌的早期侵袭转移提供了新的思路及策略。

参考文献

[1] Li SQ, Wang ZH, Mi XG, et al. MiR-199a/b-3p suppresses migration and invasion of breast cancer cells by downregulating

PAK4/MEK/ERK signaling pathway [J]. IUBMB Life, 2015, 67 (10): 768-777. DOI: 10.1002/iub.1433.

- [2] 刘磊, 刘臣海, 黄强, 等. 胆管癌组织中 microRNA-21 的表达与上皮间质转化的关系及对预后评估的价值 [J]. 中华消化外科杂志, 2013, 12 (3): 228-232. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2013.03.016.
- [3] Gores GJ. Cholangiocarcinoma: current concepts and insights [J]. Hepatology, 2003, 37 (5): 961-969. DOI: 10.1053/jhep.2003.50200.
- [4] Wen KC, Sung PL, Yen MS, et al. MicroRNAs regulate several functions of normal tissues and malignancies [J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2013, 52 (4): 465-469. DOI: 10.1016/j.tjog.2013.10.002.
- [5] Huang Q, Liu L, Liu CH, et al. Micro-RNA-21 regulates the invasion and metastasis in cholangiocarcinoma and may be a potential biomarker for cancer prognosis [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 14 (2): 829-834.
- [6] 韩超, 王健东. ERK-非编码微小 RNA 在胆管癌中的表达及功能 [J]. 中华消化外科杂志, 2015, 14 (10): 877-880. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2015.10.021.
- [7] 刘振, 黄强, 刘臣海, 等. MicroRNA-21 对胆管癌细胞侵袭与转移的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49 (2): 190-193.
- [8] Xiong B, Cheng Y, Ma L, et al. MiR-21 regulates biological behavior through the PTEN/PI-3K/Akt signaling pathway in human colorectal cancer cells [J]. Int J Oncol, 2013, 42 (1): 219-228. DOI: 10.3892/ijo.2012.1707.
- [9] Yothaisong S, Dokduang H, Techasen A, et al. Increased activation of PI3K/AKT signaling pathway is associated with cholangiocarcinoma metastasis and PI3K/mTOR inhibition presents a possible therapeutic strategy [J]. Tumour Biol, 2013, 34 (6): 3637-3648. DOI: 10.1007/s13277-013-0945-2.
- [10] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6 (4): 259-269. DOI: 10.1038/nrc1840.
- [11] 俞媛, 陈晓蓉. PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路在肝细胞癌发生发展中的作用 [J]. 临床肝胆病杂志, 2014, 30 (9): 954-957. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2014.09.029.
- [12] Noguchi S, Yasui Y, Iwasaki J, et al. Replacement treatment with microRNA-143 and -145 induces synergistic inhibition of the growth of human bladder cancer cells by regulating PI3K/Akt and MAPK signaling pathways [J]. Cancer Lett, 2013, 328 (2): 353-361. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.10.017.
- [13] Bao L, Yan Y, Xu C, et al. MicroRNA-21 suppresses PTEN and hSulf-1 expression and promotes hepatocellular carcinoma progression through AKT/ERK pathways [J]. Cancer Lett, 2013, 337 (2): 226-236. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.05.007.

(收稿日期: 2016-06-13)

(本文编辑: 张玉琳)