

miR-181 靶向 TIMP3 调控胆囊癌细胞迁移及侵袭的实验研究

刘学停¹, 蔡军¹, 孙艳军², 孙登群², 吴文涌³

摘要 目的 研究 miR-181 靶向金属蛋白酶组织抑制因子 3 (TIMP3) 调控胆囊癌细胞迁移及侵袭的作用。方法 培养胆囊癌 GBC-SD 细胞, 转染 miR-181 mimic、阴性对照 (NC) mimic、TIMP3 siRNA、NC siRNA、表达 TIMP3 的重组质粒、空白质粒, 荧光定量 PCR 检测 miR-181 的表达量, Western blot 检测 TIMP3 的表达量, Transwell 检测细胞迁移和侵袭活力, 生物信息学分析及荧光素酶报告基因实验验证 miR-181 靶向 TIMP3; 皮下注射转染 miR-181 mimic 或 NC mimic 的 GBC-SD 细胞后建立荷瘤鼠模型, 检测移植瘤质量及 miR-181、TIMP3 表达量。结果 细胞实验显示: 转染 miR-181 mimic 促进细胞迁移及侵袭、抑制细胞中 TIMP3 的表达及双荧光素酶报告基因的荧光素酶活力; 转染 TIMP3 siRNA 促进细胞迁移及侵袭; 转染表达 TIMP3 的重组质粒后, miR-181 mimic 促进细胞迁移、侵袭的作用减弱。动物实验显示: 转染 miR-181 mimic 使移植瘤的质量减轻、移植瘤中 TIMP3 的表达增加。结论 miR-181 具有促进胆囊癌细胞迁移和侵袭的作用, 靶向抑制 TIMP3 是介导该作用的分子机制之一。**关键词** 胆囊癌; miR-181; 金属蛋白酶组织抑制因子 3; 迁移; 侵袭

中图分类号 R 735.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)04-0514-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.04.003

胆囊癌是发生于胆囊及胆囊管的恶性肿瘤, 起病隐匿且恶性程度高, 临床治疗效果不佳、预后极差。胆囊癌手术切除后容易发生转移, 对放化疗敏感性较差, 目前尚缺乏能够有效杀伤胆囊癌细胞、延长胆囊癌患者生存时间的治疗手段^[1-2]。胆囊癌的发病机制复杂, 癌细胞极强的迁移和侵袭能力是造

成肿瘤转移的重要生物学行为, 但调控胆囊癌细胞迁移、侵袭的关键分子尚未阐明, 因此也缺乏相应的靶向治疗方式。微小 RNA (microRNAs, miRs) 是一种在转录后水平调控多种基因表达的非编码小分子 RNA, 在多种恶性肿瘤的发生发展中, 存在多种 miRs 表达的上调或下调。miR-181 是一种具有促癌活性的 miR, 已经被证实在结直肠癌、食管癌、胆囊癌等多种消化系统恶性肿瘤中呈高表达趋势^[3-5]; 国内何政等^[6]细胞实验表明了 miR-181 对胆囊癌细胞迁移和侵袭的促进作用, 但具体的机制及 miR-181 在活体水平促进胆囊癌生长的作用仍未见报道。

金属蛋白酶组织抑制因子 3 (tissue inhibitor of metalloproteinases 3, TIMP3) 是迁移和侵袭的抑制分子, 通过抑制多种金属蛋白酶对细胞外基质的水解作用来使细胞的迁移和侵袭受到抑制。在胆囊癌中, TIMP3 的表达下调^[7]; 在 Targetscan 网站中进行的生物信息学分析则显示 TIMP3 基因 mRNA 的 3' UTR 中含有 miR-181 的结合位点, 从生物信息学角度推测 miR-181 能够靶向抑制 TIMP3 并起到促进癌细胞迁移、侵袭的作用。基于此, 该实验将以胆囊癌 GBC-SD 细胞为实验对象, 具体分析了 miR-181 靶向 TIMP3 调控细胞迁移及侵袭的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞 胆囊癌 GBC-SD 细胞株购自美国 ATCC 细胞公司, 液氮中冷冻保存。

1.2 动物 BALB/c 裸小鼠, 4~6 周龄, 18~20 g, 购自菲诺克生物科技(上海)有限公司, 许可证号: SCXK(沪)2018-0005。

1.3 试剂 miR-181 mimic 及阴性对照 (NC) mimic、TIMP3 siRNA 及 NC siRNA 均购自上海吉玛公司; 表达 TIMP3 的重组质粒及空白质粒购自上海生工公司; 包含 TIMP3 基因 mRNA 野生型 3' UTR、突变型 3' UTR 的双荧光素酶报告基因质粒购自广州云舟生物公司; 转染试剂 Lipofectamine2000 购自美国 Thermo 公司; miRNA 提取试剂盒、miRNA cDNA 第一链合成试剂盒、miRNA 荧光定量 PCR 检测试剂

2020-10-14 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81572305); 安徽省自然科学基金(编号: 1808085MH238)

作者单位: 武警安徽省总队医院¹ 外一科、² 腹腔镜外科应用中心, 合肥 230041

³ 安徽医科大学第一附属医院普外科, 合肥 230022

作者简介: 刘学停, 男, 博士;

孙登群, 男, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: sundengqunsy1@126.com;

吴文涌, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: m13805694400@163.com

盒购自北京康为世纪公司;兔来源 TIMP3 单克隆一抗购自美国 Abcam 公司;结晶紫购自美国 Sigma 公司。

1.4 仪器 细胞培养箱购自中国 Thermo 公司;荧光定量 PCR 仪购自上海 Bio-rad 公司;正置显微镜购自中国 Olympus 公司;凝胶成像仪购自上海勤翔公司。

1.5 方法

1.5.1 细胞培养及干预 胆囊癌 GBC-SD 细胞在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 中贴壁培养,每 2 d 更换 1 次培养基,待细胞铺满培养瓶底面 80% ~ 90% 后用 0.25% 胰蛋白酶进行消化传代,传代后的细胞接种在培养板内并进行分组干预。对照组转染 NC mimic, miR-181 组转染 miR-181 mimic, NC-siRNA 组转染 NC siRNA, TIMP3-siRNA 组转染 TIMP3 siRNA, 对照质粒组转染空白质粒,对照质粒 + miR-181 组同时转染空白质粒和 miR-181 mimic, TIMP3 质粒 + miR-181 组同时转染表达 TIMP3 的重组质粒和 miR-181 mimic。每个干预条件做 4 个复孔。

1.5.2 荧光定量 PCR 检测 miR-181 的表达 取 12 孔板内分组干预的细胞,按照 miRNA 提取试剂盒操作、分离 miRNA,按照 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒操作、将 miRNA 反转录为 cDNA,按照 miRNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒配置反应体系,对 miR-181 及 U6 进行 PCR 反应,PCR 程序为:95 °C 预变性 3 min,95 °C,15 s 及 60 °C,34 s 重复 40 个循环,软件中生成 PCR 循环曲线及循环阈值(Ct),根据公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 miR-181 的表达量。

1.5.3 Western blot 检测 TIMP3 的表达 取 12 孔板内分组干预的细胞,用 RIPA 裂解液提取细胞中的蛋白,测定蛋白含量后取 30 μ g 蛋白进行 Western blot 检测,将蛋白加入 SDS-PAGE,电泳后电转移至 NC 膜,用 5% 脱脂牛奶在室温封闭 NC 膜 1 h,用 1:1 000 稀释的 TIMP3 抗体或 1:5 000 稀释的 β -actin 抗体在 4 °C 孵育 NC 膜过夜。第 2 天,用 1:1 000 稀释的 HRP 二抗在室温孵育 NC 膜 1 h,最后在凝胶成像仪中曝光得到蛋白条带,根据条带的灰度值、以 β -actin 为内参计算蛋白表达量。

1.5.4 Transwell 检测细胞的迁移及侵袭 检测迁移时,将 200 μ l 密度为 2×10^5 /ml 的细胞悬液加入 Transwell 上室内;检测侵袭时,在 Transwell 上室内预涂基质胶后,将 200 μ l 密度为 2×10^5 /ml 的细胞悬液加入 Transwell 上室内。在 Transwell 下室内加入 500 μ l 含有 10% 胎牛血清的 DMEM 用以趋化细

胞发生迁移或侵袭。按照 1.5.1 分组干预后 24 h,取出上室并用磷酸盐缓冲液漂洗 3 遍,将未迁移或侵袭的细胞用棉签擦去,用 4% 多聚甲醛固定过夜,第二天用结晶紫进行染色并在显微镜下观察迁移或侵袭的细胞数目。

1.5.5 双荧光素酶报告基因验证 miR-181 靶向 TIMP3 将 500 μ l 密度为 2×10^5 /ml 的细胞悬液接种在 24 孔培养板中,贴壁生长且密度达到 50% 后,将双荧光素酶报告基因质粒及 miR-181 mimic 或 NC mimic 共同转染进入细胞,转染 24 h 后用 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞,用双荧光素酶报告基因检测试剂盒分别测定萤火虫荧光活力及海肾荧光活力,计算萤火虫荧光活力/海肾荧光活力的值,以该比值作为双荧光素酶报告基因的荧光素酶活力。

1.5.6 移植瘤模型建立及干预 转染 NC mimic 的胆囊癌 GBC-SD 细胞及转染 miR-181 mimic 的胆囊癌 GBC-SD 细胞、调节细胞密度至 5×10^7 /ml,取 100 μ l 接种在裸鼠背部皮下,28 d 后处死裸鼠、解剖移植瘤,测量移植瘤质量,按照荧光定量 PCR 的方法检测移植瘤中 miR-181 的表达量,按照 Western blot 的方法检测移植瘤中 TIMP3 的表达量。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件录入数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,3 组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达 miR-181 对 GBC-SD 细胞迁移及侵袭的影响 miR-181 组 GBC-SD 细胞中 miR-181 的表达量高于对照组,差异有统计学意义($t = 7.104, P < 0.05$) (图 1A),迁移细胞数目及侵袭细胞数目多于对照组,差异有统计学意义($t = 5.475, 6.949, P < 0.05$) (图 1B、C)。

2.2 过表达 miR-181 对 GBC-SD 细胞中 TIMP3 的靶向调控 过表达 miR-181 对 GBC-SD 细胞中 TIMP3 的靶向调控,miR-181 组 GBC-SD 细胞中 TIMP3 的表达量低于对照组,差异有统计学意义($t = 4.770, P < 0.05$) (图 2A);生物信息学预测,TIMP3 基因 mRNA 3' UTR 上有 miR-181 的结合位点(图 2B);miR-181 组 GBC-SD 细胞中 TIMP3 基因 mRNA 野生型 3' UTR 双荧光素酶报告基因的荧光素酶活力低于对照组,差异有统计学意义($t = 5.547, P < 0.05$),突变型 3' UTR 双荧光素酶报告基因的荧光素酶活力与对照组比较,差异无统计学

意义(图2C)。

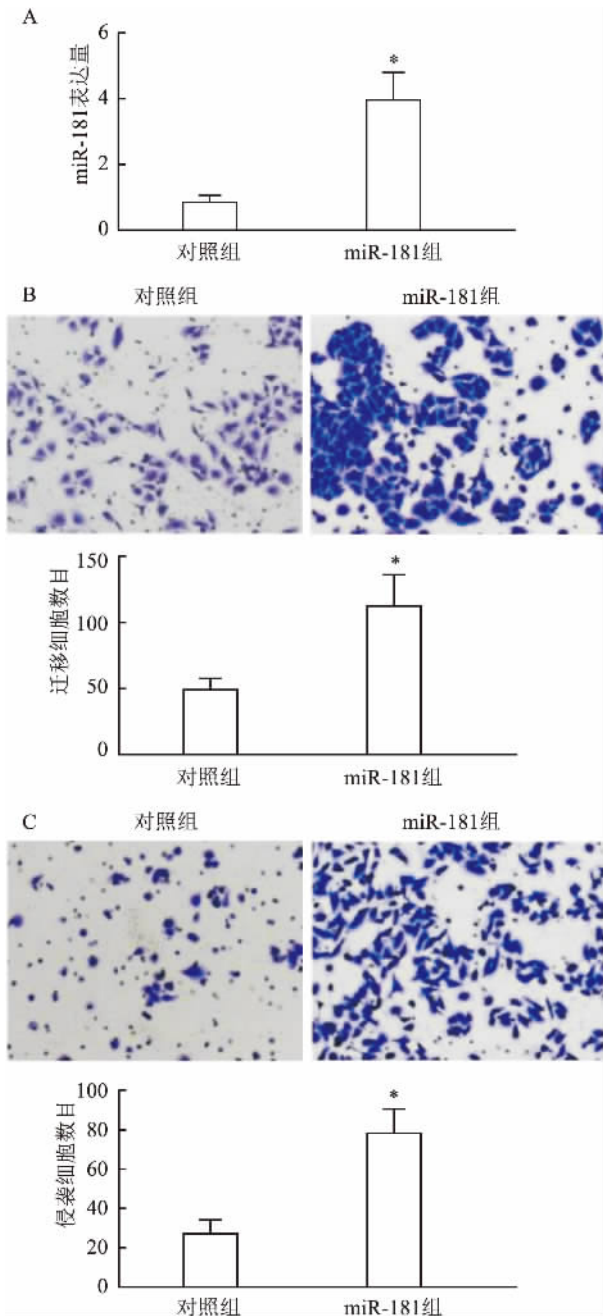


图1 过表达miR-181对GBC-SD细胞迁移及侵袭的影响

A: PCR检测miR-181的表达量; B: Transwell检测细胞迁移×200; C: Transwell检测细胞侵袭×200; 与对照组比较: * P<0.05

2.3 敲低TIMP3对GBC-SD细胞迁移及侵袭的影响 TIMP3-siRNA组GBC-SD细胞中TIMP3的表达量低于NC-siRNA组,差异有统计学意义($t = 4.717, P < 0.05$) (图3A),迁移细胞数目及侵袭细胞数目多于NC-siRNA组,差异有统计学意义($t = 4.707, 5.069, P < 0.05$) (图3B、C)。

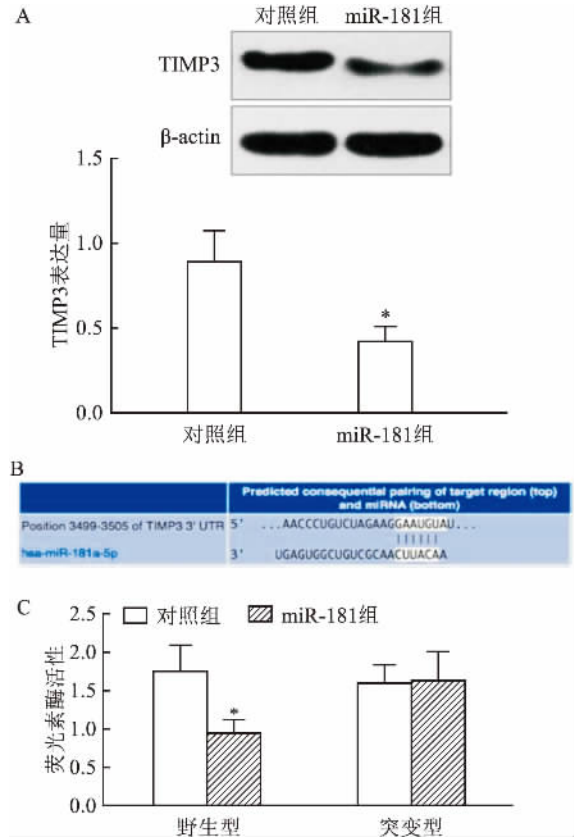


图2 过表达miR-181对GBC-SD细胞中TIMP3的表达调控

Western blot检测TIMP3的表达量; B: 生物信息学预测miR-181靶向TIMP3基因mRNA 3' UTR; C: 双荧光素酶报告基因实验验证miR-181靶向TIMP3基因mRNA 3' UTR; 与对照组比较: * P<0.05

2.4 过表达TIMP3对miR-181调控GBC-SD细胞迁移及侵袭的影响 对照质粒+miR-181组GBC-SD细胞中TIMP3的表达量低于对照质粒组, TIMP3质粒+miR-181组GBC-SD细胞中TIMP3的表达量高于对照质粒+miR-181组,差异有统计学意义($F = 7.729, P < 0.05$) (图4A); 对照质粒+miR-181组GBC-SD细胞迁移细胞数目及侵袭细胞数目多于对照质粒组, TIMP3质粒+miR-181组GBC-SD细胞的迁移细胞数目及侵袭细胞数目少于对照质粒+miR-181组,差异有统计学意义($F = 12.408, 12.361, P < 0.05$) (图4B、C)。

2.5 过表达miR-181对GBC-SD移植瘤生长及TIMP3表达的影响 miR-181组荷瘤鼠的移植瘤质量(0.91 ± 0.18) g高于对照组(0.39 ± 0.09) g,差异有统计学意义($t = 6.329, P < 0.05$) (图5A),移植瘤中miR-181的表达量(2.08 ± 0.52)高于对照组(0.72 ± 0.15),差异有统计学意义($t = 4.673, P < 0.05$) (图5B),移植瘤中TIMP3的表达量(0.67 ± 0.19)低于对照组(1.38 ± 0.32),差异有统计学意义

义($t = 6.155, P < 0.05$) (图 5C)。

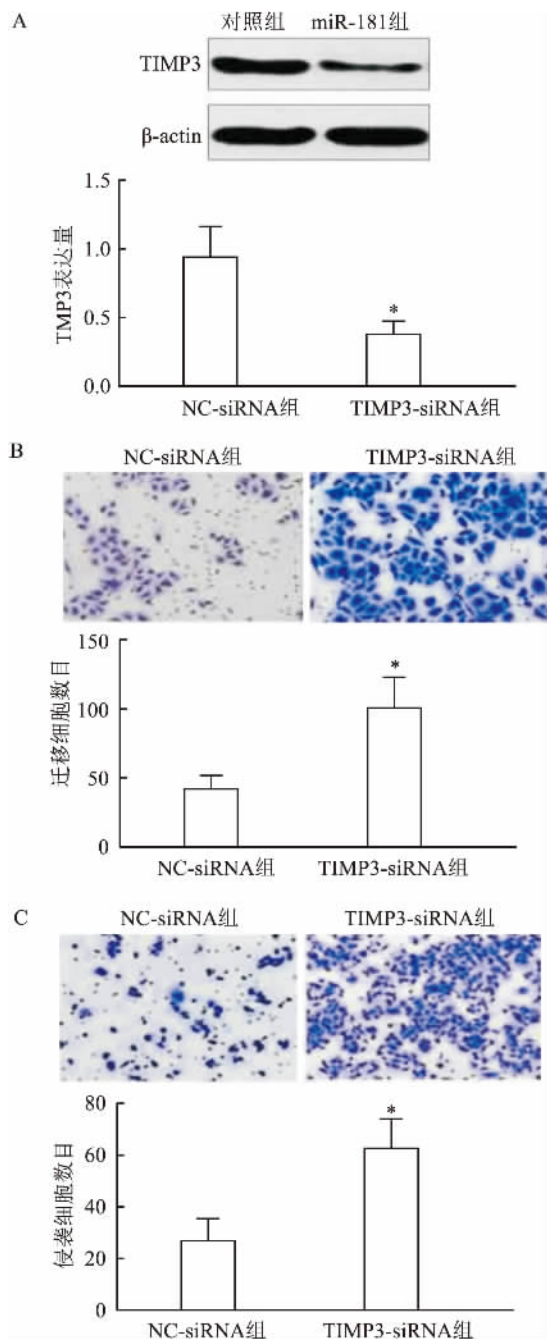


图 3 敲低 TIMP3 对 GBC-SD 细胞迁移及侵袭的影响

A: Western blot 检测 TIMP3 的表达量; B: Transwell 检测细胞迁移 $\times 200$; C: Transwell 检测细胞侵袭 $\times 200$; 与 NC-siRNA 组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

胆囊癌细胞极强的迁移和侵袭能力是胆囊癌发生转移的生物学基础,探寻胆囊癌细胞迁移和侵袭的关键调控分子及相应分子机制有助于发现新的胆

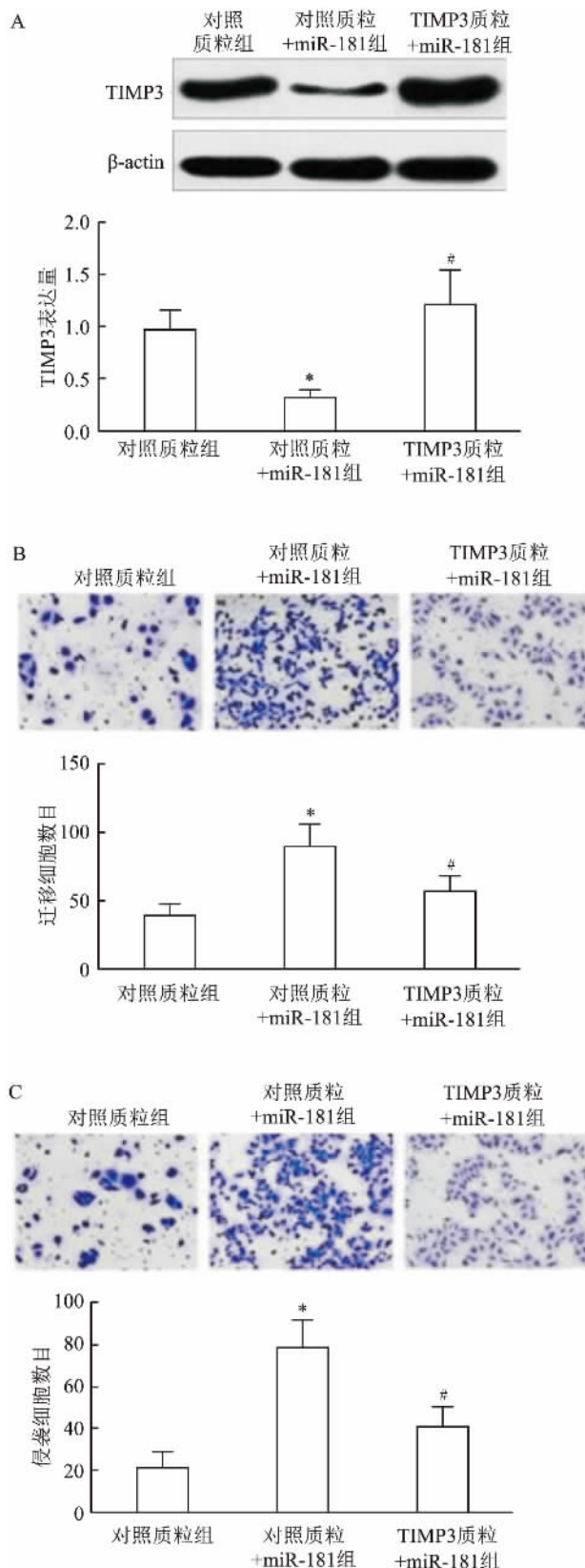


图 4 过表达 TIMP3 对 miR-181 调控 GBC-SD 细胞迁移及侵袭的影响

A: Western blot 检测 TIMP3 的表达量; B: Transwell 检测细胞迁移 $\times 200$; C: Transwell 检测细胞侵袭 $\times 200$; 与对照质粒组比较: * $P < 0.05$; 与对照质粒 + miR-181 组比较: # $P < 0.05$

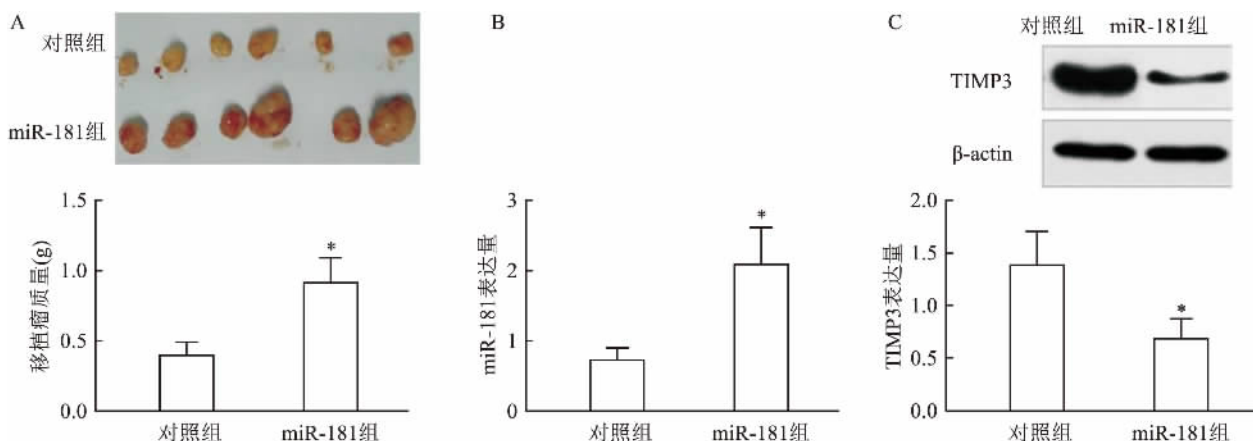


图5 过表达 miR-181 对 GBC-SD 移植瘤生长及 TIMP3 表达的影响

A: 移植瘤的质量; B: PCR 检测 miR-181 的表达量; C: Western blot 检测 TIMP3 的表达量; 与对照组比较: * $P < 0.05$

囊癌治疗靶点。miR-181 是一种具有促癌活性的 miR, 多项细胞实验^[8-10]表明 miR-181 对乳腺癌、前列腺癌、视网膜母细胞瘤等恶性肿瘤细胞的增殖、迁移等恶性生物学行为具有促进作用。国内何政等^[6]关于胆囊癌的研究表明, miR-181 在胆囊癌组织中的表达增加, 提示 miR-181 可能参与胆囊癌的发生且高表达的 miR-181 可能起到促癌作用。基于此, 该实验将以胶质瘤 GBC-SD 细胞为实验对象, 具体分析 miR-181 在胆囊癌细胞迁移、侵袭中的调控作用及分子机制, 以期为阐明胆囊癌的发生机制、探寻胆囊癌的治疗靶点提供依据。

该实验通过转染 miR-181 mimic 的方式来增加 GBC-SD 细胞中 miR-181 的表达, 过表达 miR-181 后在 Transwell 中检测了细胞的迁移和侵袭, 结果显示: GBC-SD 细胞的迁移数目和侵袭数目均增多, 说明 miR-181 能够促进胆囊癌细胞的迁移和侵袭。结合靶基因 mRNA 3'UTR 并促进 mRNA 降解、阻碍 mRNA 反应是 miR 发挥基因表达转录后调控的方式, 该实验在 Targetscan 网站中的生物信息学分析显示: 迁移和侵袭抑制基因 TIMP3 的 3'UTR 上含有 miR-181 的结合位点; 在转染 miR-181 mimic 后, GBC-SD 细胞中 TIMP3 的表达减少, 含有 TIMP3 基因 mRNA 野生型 3'UTR 双荧光素酶报告基因的荧光素酶活力降低, 而在将 Targetscan 预测的 miR-181 结合位点进行突变后、转染 miR-181 mimic 未能使荧光素酶活力降低, 说明 miR-181 能够靶向 TIMP3 基因 mRNA 的 3'UTR 且靶向结合的位点与 Targetscan 网站的预测一致。

TIMP3 是 TIMP 家族中的特殊成员, 属于非可溶性蛋白, 能够直接抑制多种金属蛋白酶的水解活

性, 使细胞水解细胞外机制的能力减弱, 进而抑制细胞的迁移和侵袭。在肺癌、结直肠癌等恶性肿瘤中, TIMP3 的表达减少^[11-12]; 相关细胞实验^[13-15]表明, 多种 miR 能够靶向 TIMP3 并发挥促癌作用。该实验在 GBC-SD 细胞中验证了 TIMP3 的生物学作用。在转染 TIMP3-siRNA 时 TIMP3 的表达减少后, GBC-SD 细胞的迁移和侵袭受到抑制, 说明 TIMP3 参与胆囊癌细胞迁移和侵袭的调控。在此基础上, 该实验还通过转染 TIMP3 基因重组质粒的方式来验证靶向抑制 TIMP3 在 miR-181 调节胆囊癌迁移和侵袭中的作用, 增加 TIMP3 基因的表达后, miR-181 促进细胞迁移和侵袭的作用均减弱, 进一步表明了 miR-181 促进胆囊癌细胞迁移、侵袭的作用与靶向抑制 TIMP3 基因的表达有关。

在上述细胞学实验观察到 miR-181 促进胆囊癌细胞迁移、侵袭后, 该实验还进一步通过荷瘤鼠来验证 miR-181 促进胆囊癌生长的作用。将转染了 miR-181 mimic 或 NC mimic 的胆囊癌细胞接种在裸鼠皮下后形成移植瘤, 通过比较移植瘤的生长及 TIMP3 的表达可知: 转染 miR-181 mimic 细胞形成的移植瘤质量减轻、TIMP3 的表达增加, 这一结果与 miR-181 在离体 GBC-SD 细胞中促进迁移及侵袭、抑制 TIMP3 基因表达的作用吻合, 说明 miR-181 能够促进胆囊癌的生长且这一促进作用与靶向抑制 TIMP3 有关。

参考文献

- [1] Azizi A A, Lamarca A, Valle J W. Systemic therapy of gallbladder cancer: review of first line, maintenance, neoadjuvant and second line therapy specific to gallbladder cancer [J]. Chin Clin Oncol, 2019, 8(4): 43.

- [2] Suzuki E, Bridgewater J. Adjuvant therapy for resected gallbladder cancer [J]. *Chin Clin Oncol*, 2019, 8(4): 39.
- [3] Pop-Bica C, Pintea S, Cojoceanu-Petric R, et al. miR-181 family-specific behavior in different cancers: a meta-analysis view [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2018, 37(1): 17–32.
- [4] Peng Q, Yao W, Yu C, et al. Identification of microRNA-181 as a promising biomarker for predicting the poor survival in colorectal cancer [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(13): 5995–6009.
- [5] 陈述, 艾尼瓦尔·巴巴依, 卿松, 等. miR-181c-3p 和 miR-5692b 在食管癌患者中的表达水平及其临床意义 [J]. *中华病理学杂志*, 2015, 44(12): 905–9.
- [6] 何政, 吴慧, 郑军, 等. microRNA-181b-3p 对人胆囊癌细胞侵袭能力的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2018, 34(23): 3874–8.
- [7] Eckfeld C, Häußler D, Schoeps B, et al. Functional disparities within the TIMP family in cancer: hints from molecular divergence [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2019, 38(3): 469–81.
- [8] Strotbek M, Schmid S, Sánchez-González I, et al. miR-181 elevates Akt signaling by co-targeting PHLPP2 and INPP4B phosphatases in luminal breast cancer [J]. *Int J Cancer*, 2017, 140(10): 2310–20.
- [9] 苗玉娟, 王淑坤, 孙丹, 等. miR-181 通过 Prox1 促进人乳腺癌细胞系 MCF-7 的增殖并抑制凋亡 [J]. *基础医学与临床*, 2019, 39(9): 1265–9.
- [10] 杨夏, 吴涛. miR-130b 在人视网膜母细胞瘤中的表达及促癌机制研究 [J]. *国际眼科杂志*, 2019, 19(2): 214–20.
- [11] Huang H L, Liu Y M, Sung T Y, et al. TIMP3 expression associates with prognosis in colorectal cancer and its novel arylsulfonamide inducer, MPTOB390, inhibits tumor growth, metastasis and angiogenesis [J]. *Theranostics*, 2019, 9(22): 6676–89.
- [12] 冯宇娇, 王宏坤, 郑绘霞, 等. ADAM17 与 E-cadherin、TIMP3 蛋白在胃癌中的表达及临床意义 [J]. *山西医科大学学报*, 2017, 48(9): 945–8.
- [13] Wang X, Shi Z, Liu X, et al. Upregulation of miR-191 promotes cell growth and invasion via targeting TIMP3 in prostate cancer [J]. *J BUON*, 2018, 23(2): 444–52.
- [14] Li W, Yi J, Zheng X, et al. miR-29c plays a suppressive role in breast cancer by targeting the TIMP3/STAT1/FOXO1 pathway [J]. *Clin Epigenetics*, 2018, 16(10): 64.
- [15] Chen J, Zhou C, Li J, et al. miR215p confers doxorubicin resistance in gastric cancer cells by targeting PTEN and TIMP3 [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(4): 1855–66.

Experimental study on miR-181 regulates the migration and invasion of gallbladder cancer cells by targeting TIMP3

Liu Xueting¹, Cai Jun¹, Sun Yanjun², et al

(¹The First Dept of General Surgery, ²Dept of Laparoscopic Surgery, Anhui Corps Hospital of Chinese People's Armed Police Force, Hefei 230041)

Abstract Objective To study the effect of miR-181 on the migration and invasion of gallbladder cancer cells by targeting tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP3). **Methods** Gallbladder cancer GBC-SD cells were cultured and transfected with miR-181 mimic, NC mimic, TIMP3 siRNA, NC siRNA, recombinant plasmid expressing TIMP3, blank plasmid. The expression of miR-181 was detected by fluorescence quantitative PCR, the expression of TIMP3 was detected by Western blot, the cell migration and invasion activity were detected by Transwell, and miR-181 target TIMP3 was verified by bioinformatics analysis and luciferase reporter gene experiment. Tumor-bearing mouse model was established by subcutaneous injection of GBC-SD cells transfected with miR-181 mimic or NC mimic, then the quality of the transplanted tumor and the expression of miR-181, TIMP3 were detected. **Results** Cell experiments showed that miR-181 mimic could promote cell migration and invasion, inhibit the expression of TIMP3 and luciferase activity of double luciferase reporter gene; TIMP3 siRNA could promote cell migration and invasion; after transfection of recombinant plasmid expressing TIMP3, the effect of miR-181 mimic on cell migration and invasion was weakened. Animal experiments showed that miR-181 mimic could reduce the weight of transplanted tumor and increase the expression of TIMP3. **Conclusion** miR-181 promotes the migration and invasion of gallbladder cancer cells, and targeting inhibition of TIMP3 is one of the molecular mechanisms.

Key words gallbladder cancer; miR-181; tissue inhibitor of metalloproteinase 3; migration; invasion