

• 基础医学 •

文章编号: 1002-0217(2015)02-0117-05

MiR-29b-3p 在膀胱癌化疗耐受机制中的作用

李 洋, 梁 瑜

(安徽医科大学生命科学院 生物学系, 安徽 合肥 230031)

【摘要】目的: 探讨 miR-29b-3p 在膀胱癌化疗耐受机制中的作用。方法: 通过对多药敏感的膀胱癌细胞株 5637 及多药耐受的膀胱癌细胞株 H-bc 进行 microRNA 测序分析, miR-29b-3p 作为表达差异较为明显的候选 microRNA 被挑选进行下一步研究。分别合成并转染 miR-29b-3p 的 mimic 或 antagomiR 序列以提高或抑制其细胞中的表达水平。应用 MTT 法检测膀胱癌细胞中 miR-29b-3p 及其下游基因 DNMT3A 表达水平改变后对于多种化疗药物杀伤敏感性的改变。结果: qRT-PCR 验证表明 miR-29b-3p 在 5637 中表达水平低于 H-bc (1.00: 4.41)。5637 细胞中转染 mimic 提高其表达后, 细胞对于丝裂霉素诱发的死亡比例上升了 37%, 而 H-bc 细胞中转染 antagomiR 后, 对于 IC₅₀ 剂量的丝裂霉素诱发的死亡比例下降了 19%。作为 miR-29b-3p 的下游基因, DNMT3A 的表达抑制也可以受到 miR-29b-3p 的调控。在 5637 细胞中转染其 siRNA 抑制表达后, 同样可以提高细胞对于丝裂霉素的耐受。结论: miR-29b-3p 可能通过抑制其靶基因 DNMT3A 促进了膀胱癌对于丝裂霉素的耐受。

【关键词】DNMT3A; miR-29b-3p; 化疗耐受; 膀胱癌

【中图分类号】R 737.14 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2015.02.005

MiR-29b-3p promoting the mitomycin resistance of bladder cancer via repressing DNMT3A expression

Li Yang, LIANG Yu

Department of Biology, School of Life Science, Anhui Medical University, Hefei 230031, China

【Abstract】Objective: To investigate the role of miR-29b-3p in chemoresistance of bladder cancer. **Methods:** microRNA sequencing was performed to screen the candidates that are differentially expressed between the chemosensitive (5637) and chemoresistant (H-bc) bladder cancer cell lines. miR-29b-3p was selected for further study. miR-29b-3p mimic and antagomiR were transfected into 5637 and H-bc cells, respectively for altering the miR-29b-3p expression level. MTT assay was then used to evaluate the impact of miR-29b-3p on cell resistance to multiple chemotherapeutics. **Results:** The expression level of miR-29b-3p was verified to be higher in H-bc than that in 5637 cells (1.00: 4.41). Ectopic expression of miR-29b-3p in 5637 cells raised cell survival ratio to 137% after 72 hr IC₅₀ dosed mitomycin treatment, whereas inhibition of miR-29b-3p by antagomiR transfection in H-bc cells repressed cell survival ratio to 89% of the negative control after mitomycin treatment. As a direct target of miR-29b-3p, DNMT3A was negatively correlated with miR-29b-3p expression level. Knock-down of DNMT3A expression by siRNA transfection in 5637 cells desensitized cells to mitomycin treatment. **Conclusion:** MiR-29b-3p may promote bladder cancer to chemotherapy of mitomycin through targeting DNMT3A.

【Key words】DNMT3A; miR-29b-3p; chemoresistance; bladder cancer

膀胱癌是常见的泌尿系统恶性肿瘤,发病率和病死率均居泌尿系统肿瘤的第二位^[1]。由于缺乏对膀胱癌化疗耐受有效的预期手段,患者往往接受了无效甚至有害的化疗,承受巨大的身心和经济负担^[2]。

目前对于肿瘤化疗耐受的机制已有了一定的认识。除了基因突变、基因拷贝数的变化、基因融合等

经典遗传机制外,不涉及到 DNA 序列改变的表观遗传调控机制的异常也参与肿瘤化疗耐受的形成^[3],其中非编码 RNA 尤其是 microRNA 对于肿瘤化疗敏感性的影响在近些年来引起了越来越多人的关注。MicroRNA 是真核生物中广泛存在的一种长约 21 到 23 个核苷酸的 RNA 分子,可以通过与特定 mRNA 的 3'-UTR 部位特异性结合,并抑制翻译或引起 mRNA

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81200975);安徽医科大学拔尖人才支持计划;安徽医科大学优秀青年教师项目

收稿日期: 2014-12-08

作者简介: 李 洋(1981-),男,讲师,博士,(电话)0551-65167282,15005511566,(电子信箱) tatabox@126.com.

NA 降解,在翻译水平调控特定编码基因的表达。通过对不同下游靶基因的调控,miRNA 广泛参与了多条关键信号传导途径如 DNA damage,Notch,NF-κB 等,并影响到肿瘤细胞的化疗耐受机制^[4]。为综合性地理解膀胱癌的多药耐受产生,我们在前期工作中通过 MTT 法测定了 5 株膀胱癌细胞系对 5 种临床常用化疗药物的化疗敏感性,确认了对于其中多药最敏感的细胞株(5637)和多药最耐受的细胞株(H-bc),并对其进行了多组学测试:包括编码及非编码基因的表达组学(RNA-seq 和 miR-seq)分析^[5]。

通过对多组学的综合生物信息学分析提示,我们发现 miR-29b-3p 的表达与化疗耐受水平呈正相关,可能参与了膀胱癌化疗调控机制。因此,我们对其与下游基因 DNMT3A 参与膀胱癌药物化疗耐受的机制进行了探索。这一工作将增进对于膀胱癌化疗多药耐受的形成的理解。

1 材料与方法

1.1 细胞信息 膀胱癌细胞株 5637(ATCC NO. HTB-9)和 H-bc(昆明医科大学肿瘤研究所 1986 年建立)均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库(上海)。培养于含有 10% 胎牛血清和 1% 谷氨酰胺的 RPMI1640 培养基(购自 Invitrogen,Carlsbad,CA,USA)。

1.2 细胞转染 所有的 mimic,antagomiR,siRNA,无意义 RNA 序列对照(scramble sequence,NC)及 riboFECT CP 转染试剂盒均购自广州瑞博。DNMT3A siRNA(HSS141868)购自英骏。转染操作均参照转染试剂盒说明书进行。

1.3 IC₅₀ 检测 对数生长期的细胞以 0.5×10^4 /孔的密度种于 96 孔板中,转染 mimic,antagomiR 或 siRNA 后 12 h,更换为含有 IC₅₀ 浓度化疗药物的培养基培养(具体细节参见我们前期的报道^[5]),72 h 后每孔加入 MTT 溶液(5 ng/mL)10 μL,4 h 后测定 490 纳米吸光值,计算相应细胞存活量^[6]。以无意义 RNA 转染的细胞作为对照(NC),设定为 1,计算其余组别的细胞相对存活比例。每组处理样品至少重复 3 孔,进行独立的三次时间,计算平均值。所有化疗药物为临床使用级别。

1.4 实时定量 PCR 使用 TRizol(购自天根)抽提细胞 RNA,microRNA 通过广州瑞博公司的 Bulge-LoopTM miRNA qRT-PCR Primer 试剂盒,以 SYBR green 法进行检测,内参为 U6 RNA,最终以 2^{-ΔΔ} 法计算相对表达量。

1.5 Western blot anti-DNMT3A (AP1034a),anti-GAPDH (AM1020a)和辣根过氧化物酶标记的 anti-rabbit IgG 二抗(LP1001b),anti-mouse IgG 二抗(LP1002a)均购自 Abgent(无锡)。目的基因条带使用 chemiluminescence reaction (Pierce)显色底物进行显色,相对条带强度以 GAPDH 条带为内参,通过 Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics)进行测定。

1.6 统计分析 数据均使用平均值 ± 标准差进行表示。统计学计算均使用 Excel (Microsoft,Redmond,WA)或 Prism (GraphPad Software Inc.,La Jolla,CA)进行。根据不同数据特性,分别使用 Two-tailed Student's *t* 检验计算显著性差异。*P*-value < 0.05 被认为是具有显著性差异。

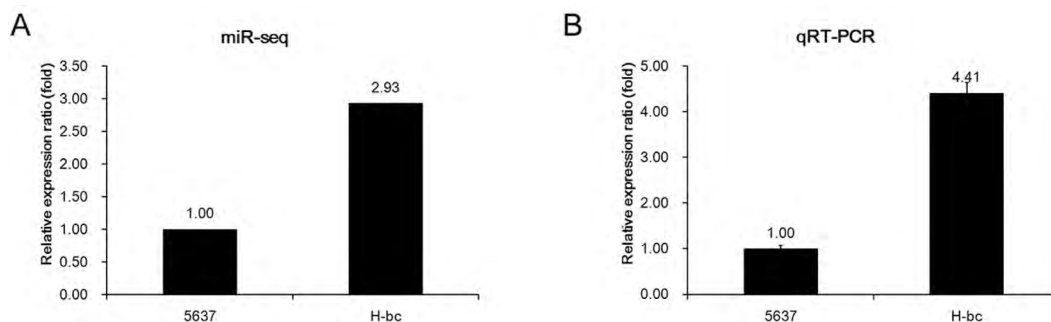
2 结果

2.1 miR-29b-3p 的表达与膀胱癌化疗耐受呈正相关 在我们的前期研究中,通过对多种膀胱癌细胞株进行了多种化疗药物的 IC₅₀ 测定,确认了这些细胞株的敏感性谱系,并鉴定 5637 为多药物敏感细胞株,H-bc 为多药物耐受细胞株^[5]。MicroRNA 测序结果提示,miR-22b-3p 的表达在 5637 细胞中明显低于 H-bc 相对表达比例达到 1.00:2.93(图 1A)。我们通过茎环引物扩增实时定量 PCR 法检测了 miR-29b-3p 的内源性表达(以 U6 RNA 为内参),发现其在 5637 与 H-bc 细胞中的相对表达比值为 1.00:4.41,与 microRNA 测序结果的趋势吻合(图 1B)。这一结果确认了 miR-26b-3p 的表达在膀胱癌细胞株 5637(化疗敏感)中低于 H-bc(化疗耐受),提示其表达水平可能与化疗耐受性呈正相关。

2.2 miR-29b-3p 可以增强膀胱癌细胞对于丝裂霉素的耐受水平 为了进一步确认 miR-29b-3p 与膀胱癌化疗耐受的关系,我们在 5637 中转染了 miR-29b-3p 的 mimic 序列,模拟其表达水平上升(qPCR 验证其表达水平被 mimic 转染上调约 42 倍,图 2B)。通过使用 IC₅₀ 剂量的化疗药物处理细胞 72 h 后,MTT 法检测细胞存活数量的相对变化。通过与无意义 RNA 序列转染的细胞(对照组,NC)比较,发现 miR-29b-3p 可以明显提高细胞在阿霉素(Ad *t* = 4.98, *P* < 0.05),吉西他滨(Ge *t* = 4.40, *P* < 0.05)和丝裂霉素(Mi *t* = 4.69, *P* < 0.05)药物处理下的细胞相对存活数量,而对于所检测的其他五种化疗药物:顺铂(Ci),吡柔比星(Pi),紫杉醇(Pa),盐酸表柔比星(EH),羟基喜树碱(Hy)则无明显的影响(图 2A)。在 H-bc 细胞中转染 miR-29b-3p 的 antagomiR 后,模拟其下调表达(qPCR 验证其表达水

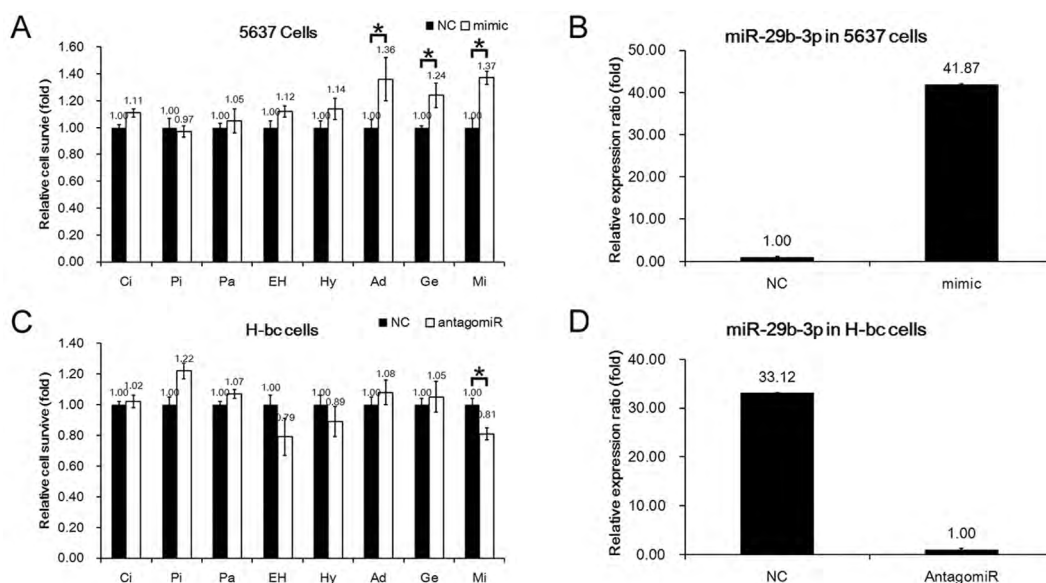
平被 antagomiR 下调为约 1/33 (图 2D) ,则可以明显降低细胞对于丝裂霉素处理后的细胞存活数量 ,提高其杀伤效应(图 2C $t = 5.11$, $P < 0.05$) ,与 5637

细胞中的结果相对应。综合上述结果 ,我们的数据表明 miR-29b-3p 在膀胱癌细胞中的表达水平可以正调控细胞对于丝裂霉素的耐受性。



A microRNA 测序法检测 miR-29b-3p 在 5637 和 H-bc 细胞中的表达水平。B 实时定量 PCR 法检测 miR-29b-3p 在 5637 和 H-bc 细胞中的表达水平

图 1 miR-29b-3p 在 5637 与 H-bc 细胞中的相对表达



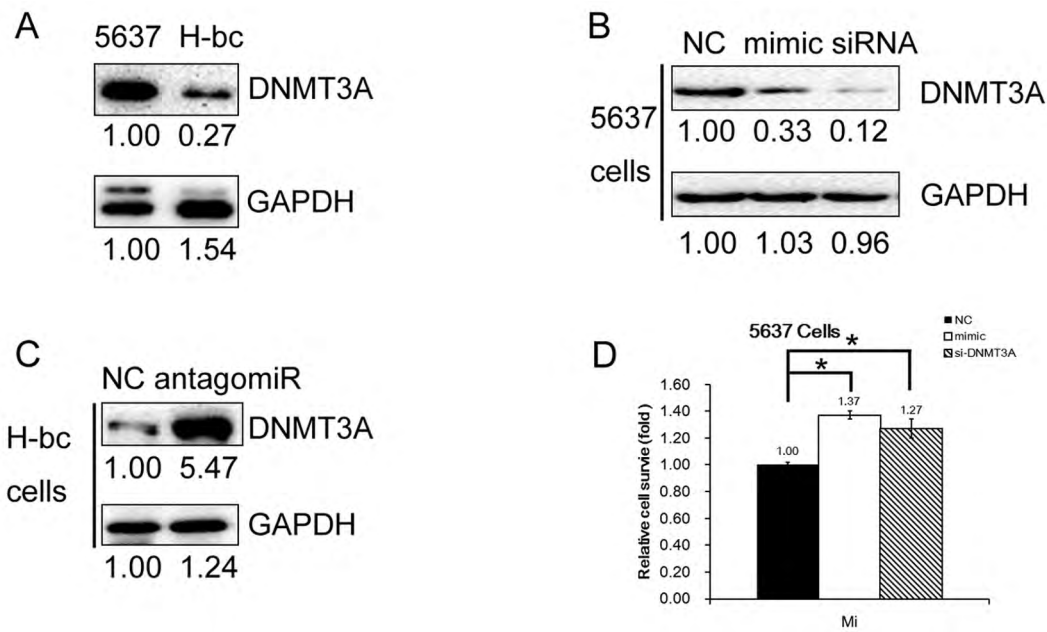
A 5637 细胞中转染 miR-29b-3p 模拟序列(mimic)后 ,对于 8 种化疗药物处理后的相对细胞存活率 ,无意义序列转染细胞(NC)作为对照 ,设定为 1。B 实时定量 PCR 法检测模拟序列转染后的细胞中 miR-29b-3p 的相对表达。C H-bc 细胞中转染 miR-29b-3p 拮抗序列(antagomiR)后 ,对于 8 种化疗药物处理后的相对细胞存活率 ,无意义序列转染细胞(NC)作为对照 ,设定为 1。D 实时定量 PCR 法检测拮抗序列转染后的细胞中 miR-29b-3p 的相对表达。所有数据为 3 次实验平均值 ,* 表示 $P < 0.05$

图 2 miR-29b-3p 在膀胱癌细胞中的表达水平可以影响丝裂霉素的耐受性

2.3 DNMT3A 作为 miR-29b-3p 的下游基因参与了丝裂霉素耐受性调控机制 前期已有报道证明 DNMT3A 在白血病细胞中为 miR-29b-3p 的下游调控靶基因^[7-8]。为了验证 miR-29b-3p 是否可在膀胱癌细胞中抑制 DNMT3A 的表达 ,我们检测了 5637 与 H-bc 细胞中 DNMT3A 蛋白的内源性表达水平 ,结果证明其在 5637 中表达明显高于 H-bc(1.00: 0.18 ,图 3A) ,与我们 RNA-seq 结果趋势一致(5637 : H-bc = 1.00: 0.18) 。我们还对 miR-29b-3p mimic 转染的 5637 细胞及 miR-29b-3p antagomiR 转染的 H-bc 细胞蛋白样品做了 Western 验证 ,结果表明

在 5637 中转染 miR-29b-3p mimic 可以明显抑制 DNMT3A 的蛋白表达水平(图 3 B) ,而在 H-bc 细胞中转染 miR-29b-3p antagomiR 则可以明显上调 DNMT3A 的蛋白水平(图 3 C) ,这一结果表明 DNMT3A 在膀胱癌中的表达同样受 miR-29b-3p 的调控。为了确认 miR-29b-3p 是否通过 DNMT3A 调控膀胱癌细胞的对于丝裂霉素的耐药性 ,我们设计合成 DNMT3A 的 siRNA 序列 转染 5637 细胞。与 miR-29b-3p mimic 转染后的结果类似 ,DNMT3A 的 siRNA 可以抑制其蛋白表达水平(图 3 B) ,且同样可以上调细胞在丝裂霉素处理后的存活数量(图 3 D , $t =$

4.32, $P < 0.05$)。



A, Western blot 检测 DNMT3A 在 5637 及 H-bc 细胞中的内源性蛋白表达水平 ,GAPDH 作为内参。B 5637 细胞中转染 miR-29b-3p 模拟序列或 siRNA 序列后 ,Western blot 检测 DNMT3A 的蛋白表达水平变化。C H-bc 细胞中转染 miR-29b-3p 拮抗序列后 ,Western blot 检测 DNMT3A 的蛋白表达水平变化。D 5637 细胞中转染 miR-29b-3p 模拟序列或 siRNA 序列后 ,细胞对于丝裂霉素处理后的相对细胞存活率 ,无意义序列转染细胞(NC)作为对照 ,设定为 1。数据为 3 次实验平均值 ,* 表示 $P < 0.05$

图 3 miR-29b-3p 的下游靶基因 DNMT3A 在膀胱癌中参与其对于丝裂霉素敏感性的调控

3 讨论

miR-29b 已被鉴定为一个肿瘤抑制性 microRNA ,可以通过调控多个下游基因的表达和信号通路的活性发挥其抑癌作用^[9]。在肿瘤化疗耐受调控机制中 ,目前报道并不完全一致 ,比如有报道表明 miR-29b 可以抑制卵巢癌对于紫杉醇的耐受^[10] ,但也有研究证明其可以提高胆管癌对于吉西他滨的化疗耐受性^[11]。我们的研究则第一次证明 miR-29b-3p 在膀胱癌化疗敏感细胞株 5637 中表达低于耐受细胞株 H-bc ,且在细胞中的表达水平的改变与膀胱癌对于丝裂霉素的化疗耐受呈正相关关系 ,但对于其他几种所检测的化疗药物则无明显影响(图 2A 和 C) ,包括前文报道的紫杉醇(Pa ,图 2A 和 C) 。然而 miR-29b-3p 可以在 5637 细胞中提高对于吉西他滨(Ge) 的耐受(图 2A) ,在 H-bc 细胞中则无明显影响(图 2C) ,这一结果提示由于肿瘤的异质性 ,在不同类型的细胞以及不同类型的肿瘤间 ,miR-29b-3p 对于不同药物的耐药性影响可能并不一致。

作为已被证实的 miR-29b-3p 下游基因^[7-8] , DNMT3A 编码 DNA 甲基转移酶 ,负责基因组 DNA 序列中的 CG 位点胞嘧啶甲基化修饰 ,从而引起相应区域的基因表达沉默。已有多个研究表明

miR-29b-3p 可以通过抑制 DNMT3A 的表达 ,进而抑制一系列下游基因的甲基化修饰水平并上调表达 ,包括 Mcl-1^[12] ,DNMT1^[8] ,WIF-1^[13] ,PTEN^[14] 等 ,参与了肿瘤的发生发展过程。我们前期的研究表明 ,在膀胱癌中 miR-193a-3p 的表达调控受到 DNA 甲基化调控 ,并在多药物化疗耐受机制中起关键调控作用^[5]。miR-193a 基因的甲基化水平是否受到 DNMT3A 影响 ,并间接受 miR-29b-3p 的调控 ,将是非常值得研究的后续课题。

目前除了 DNMT3A 以外 ,已报道的 miR-29b 下游编码基因还包括 AKT2^[15]、TET1^[16]、VEGF^[17] 和 Tiam1^[18] 等。这些编码基因均通过不同的信号调控网络参与到了肿瘤发生及发展的各个阶段 ,从而广泛地影响了多种肿瘤的发生、发展过程。因此 ,miR-29b 对于不同类型肿瘤 ,不同药物的敏感性调控差异 ,对于其最终进入临床作为诊断及治疗靶点应用的前景研究至关重要。

在我们的研究中 ,DNMT3A 作为 miR-29b-3p 的下游基因 ,参与了其对于膀胱癌丝裂霉素的耐受性。这一结果不仅有助于理解膀胱癌化疗耐受的机制 ,而且对于膀胱癌临床个体化化疗及诊断具有重要意义。然而 ,化疗耐受是一个由多个基因参与的复杂

机制, miR-29b-3p 是否还会通过其他下游基因参与膀胱癌化疗耐受调控, 以及是否与其他 microRNA 及编码基因之间存在协同效应及反馈调节, 仍值得进一步探索。

致谢: 感谢安徽省肿瘤医院朱景德教授对于本文研究的指导和建议

【参考文献】

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013 [J]. CA: a cancer journal for clinicians 2013 63: 11 - 30.
- [2] Von der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, et al. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer[J]. Journal of Clinical Oncology, 2005(23) : 4602 - 4608.
- [3] Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer[J]. Cell, 2007 (128) : 683 - 692.
- [4] Allen KE, Weiss GJ. Resistance may not be futile: microRNA biomarkers for chemoresistance and potential therapeutics [J]. Molecular cancer therapeutics, 2010(9) : 3126 - 3136.
- [5] LÜ Lei, DENG Hui, LI Yang, et al. The DNA methylation-regulated miR-193a-3p dictates the multi-chemoresistance of bladder cancer via repression of SRSF2/PLAU/HIC2 expression [J]. Cell Death & Disease 2014(5) : e1402.
- [6] Andrisano V, Bartolini M, Gotti R, et al. Determination of inhibitors' potency (IC50) by a direct high-performance liquid chromatographic method on an immobilised acetylcholinesterase column [J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2001(753) : 375 - 383.
- [7] Amodio N, Leotta M, Bellizzi D, et al. DNA-demethylating and anti-tumor activity of synthetic miR-29b mimics in multiple myeloma [J]. Oncotarget 2012 (3) : 1246 - 1258.
- [8] Garzon R, Liu S, Fabbri M, et al. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1 [J]. Blood, 2009 (113) : 6411 - 6418.
- [9] WANG Yang, ZHANG Xinmei, LI Hui, et al. The role of miRNA-29 family in cancer [J]. Eur J Cell Biol 2013 (92) : 123 - 128.
- [10] Sugio A, Iwasaki M, Habata S, et al. BAG3 upregulates Mcl-1 through downregulation of miR-29b to induce anticancer drug resistance in ovarian cancer [J]. Gynecol Oncol, 2014 (134) : 615 - 623.
- [11] Okamoto K, Miyoshi K, Murawaki Y. miR-29b, miR-205 and miR-221 Enhance Chemosensitivity to Gemcitabine in HuH28 Human Cholangiocarcinoma Cells [J]. PloS one 2013 (8) : e77623.
- [12] Meunier L, Siddeek B, Vega A, et al. Perinatal programming of adult rat germ cell death after exposure to xenoestrogens: role of microRNA miR-29 family in the down-regulation of DNA methyltransferases and Mcl-1 [J]. Endocrinology 2012 (153) : 1936 - 1947.
- [13] TAN Ming, WU Junjie, CAI Yong. Suppression of Wnt signaling by the miR-29 family is mediated by demethylation of WIF-1 in non-small-cell lung cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013 (438) : 673 - 679.
- [14] DAI Fulong, ZHANG Yi, ZHU Xin, et al. Anticancer role of MUC1 aptamer-miR-29b chimera in epithelial ovarian carcinoma cells through regulation of PTEN methylation [J]. Target Oncol, 2012 (7) : 217 - 225.
- [15] LI Ming, LI Hui, LIU Xiaoqiang, et al. MicroRNA-29b regulates TGF-beta1-mediated epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells by targeting AKT2 [J]. Exp Cell Res, 2014 (14) : 431 - 435.
- [16] LIN lili, WANG Wei, HU Zhaoyang, et al. Negative feedback of miR-29 family TET1 involves in hepatocellular cancer [J]. Med Oncol 2014 (31) : 291.
- [17] ZHANG Kexiang, ZHANG Chaoyue, LIU Li, et al. A key role of microRNA-29b in suppression of osteosarcoma cell proliferation and migration via modulation of VEGF [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014 (7) : 5701 - 5708.
- [18] WANG B, LI W, LIU H, et al. miR-29b suppresses tumor growth and metastasis in colorectal cancer via downregulating Tiam1 expression and inhibiting epithelial-mesenchymal transition [J]. Cell Death Dis 2014 (5) : e1335.