

# miR-133b 靶向下调 EGFR 对鼻咽癌 SUNE-1 细胞增殖、迁移及侵袭的影响\*

闫 勇, 吴曙辉\*\*, 朱静静, 姜婷婷

(上海市宝山区中西医结合医院 耳鼻喉科, 上海 201900)

**[摘 要]** **目的:** 研究 miR-133b 对鼻咽癌 SUNE-1 细胞增殖、迁移及侵袭的影响, 并探讨其作用机制。 **方法:** 采用 qPCR 检测人鼻咽癌细胞株 CNE-1、SUNE-1、C666-1 及正常人鼻咽上皮细胞株 NP69 中 miR-133b 及表皮生长因子受体(EGFR)的表达差异, 使用荧光素酶报告基因及蛋白免疫印迹实验测定 miR-133b 和 EGFR 在鼻咽癌 SUNE-1 细胞株中的调控关系; 将 miR-133b mimics 转染至 SUNE-1 细胞中构建 miR-133b 过表达模型, 同时将 EGFR siRNA 转染至 SUNE-1 细胞中构建 EGFR 低表达模型, 通过 MTT 实验检测细胞的增殖能力、Transwell 实验检测细胞的迁移及侵袭能力。 **结果:** 与 NP69 细胞株比较, miR-133b 在 CNE-1、SUNE-1、C666-1 细胞株中低表达 ( $P < 0.05$ )、且在 SUNE-1 细胞株中表达最低, 而 EGFR 在 CNE-1、SUNE-1、C666-1 中高表达 ( $P < 0.05$ )、且在 SUNE-1 细胞株中表达最高; 双荧光素酶报告基因及蛋白免疫印迹实验结果显示增强 miR-133b 的表达后, SUNE-1 细胞株中 EGFR 的表达相应下调 ( $P < 0.05$ ); 增强 miR-133b 的表达或抑制 EGFR 的表达, 鼻咽癌细胞的增殖、侵袭、迁移能力显著减弱 ( $P < 0.05$ )。 **结论:** miR-133b 可能通过负向调控 EGFR 的表达, 从而抑制鼻咽癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力。

**[关键词]** miR-133b; 鼻咽癌; 表皮生长因子受体; 增殖; 迁移; 侵袭

**[中图分类号]** R739.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)12-1420-05

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.12.011

## Inhibitory Effect of miR-133b on Down-regulation of EGFR Expression in Nasopharyngeal Carcinoma SUNE-1 Cells

YAN Yong, WU Shuhui, ZHU Jingjing, JIANG Tingting

(Department of Otolaryngology, Shanghai Baoshan Integrated Hospital of Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai 201900, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of miR-133b on the proliferation, migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma SUNE-1 cells and discuss the mechanism of its action. **Methods:** The expression of miR-133b and epidermal growth factor receptor (EGFR) in human nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-1, SUNE-1, C666-1 and normal nasopharyngeal epithelial cell line NP69 were detected by qPCR. The regulatory relationship between miR-133b and EGFR in nasopharyngeal carcinoma SUNE-1 cell line was detected by fluorescein enzyme reporter gene and Western blot assay. The miR-133b mimics was transfected into SUNE-1 cells to structure miR-133b overexpression model, and EGFR siRNA was transfected in SUNE-1 cells to structure EGFR low expression model. Cell proliferation was detected by MTT assay, and cell migration and invasion was detected by Transwell assay. **Results:** Low expression of miR-133b in CNE-1, SUNE-1 and C666-1 cell lines was compared with NP69 cell line ( $P < 0.05$ ), and the lowest expression was found in SUNE-1 cell lines. In high expres-

\*[基金项目] 上海市卫生和计划生育委员会科研课题(16PJ057)

\*\* 通信作者 E-mail: 3522438699@qq.com

网络出版时间: 2018-12-22 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20181222.1447.009.html>

sion of EGFR in CNE-1, SUNE-1, C666-1 ( $P < 0.05$ ), the highest expression was found in SUNE-1 cell lines. The results of double luciferase reporter gene and Western blotting showed that the expression of EGFR in SUNE-1 cells was down-regulated after the expression of miR-133b was enhanced ( $P < 0.05$ ). Enhancing the expression of miR-133b or inhibiting the expression of EGFR, the proliferation, invasion and migration of nasopharyngeal carcinoma cells were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** MiR-133b may inhibit the proliferation, migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells by negatively regulating the expression of EGFR.

[**Key words**] miR-133b; nasopharyngeal carcinoma; epidermal growth factor receptor; proliferation; migration; invasion

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是发生于鼻咽上皮细胞的恶性肿瘤,我国每年新发病例约有 84 400 例,死亡 51 600 例<sup>[1]</sup>。鼻咽癌病因有多种,包括遗传变异,环境因素和病毒感染等<sup>[2]</sup>,但其具体发病机制尚未完全明确,虽然鼻咽癌对放疗敏感,但其局部复发及远处转移仍是治疗失败的主要原因<sup>[3]</sup>。微小 RNA(miRNA)是由长度为 20~22 个核苷酸组成的小型非编码 RNA,miRNA 通过在转录后水平与 3'-UTR 结合来调节靶基因的表达<sup>[4-5]</sup>。目前,已经发现许多 miRNA 在不同类型的癌症中表达失调,认为其在肿瘤发生和发展中起着关键诱导剂的作用<sup>[6]</sup>。miR-133b 是一种在多种癌细胞中表达的 miRNA,能显著抑制原发性肝癌细胞迁移和侵袭,并且调节 *PPP2R2D* 基因表达而对原发性肝癌放疗起到增敏作用<sup>[7]</sup>;miR-133b 参与 G1/S 细胞周期调节并抑制急性髓性白血病的终末分化<sup>[8]</sup>,然而鼻咽癌中 miR-133b 的作用及机制尚不清楚。因此,本研究观察 miR-133b 在不同鼻咽癌细胞中的表达水平及其对鼻咽癌细胞的生物学行为的影响,对其潜在的作用机制进行探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株和主要实验试剂

人鼻咽癌细胞株 CNE-1、SUNE-1、C666-1 及正常人鼻咽上皮细胞株 NP69 均购自于中国科学院上海细胞研究所,HEK293 人胚胎肾细胞系购自美国 ATCC 公司。DMEM 培养液及胰蛋白酶(Sigma 美国),胎牛血清(GIBCO 美国),全蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白浓度检测试剂盒及高灵敏 ECL 化学发光试剂盒(碧云天中国),miR-133b mimics、EGFR siRNA 由上海吉玛公司设计合成,Lipo-2000 转染试剂盒及 RNA 提取试剂(Invitrogen 美国),Takara 逆转录试剂盒(宝生物中国),Transwell 小

室(Chemicon 日本),Matrigel 基质胶(B&D 美国),兔抗人一抗 EGFR、兔抗人一抗 GAPDH 以及山羊抗兔二抗 IgG(Santa cruz 美国)。

### 1.2 细胞培养及转染

将 CNE-1、SUNE-1、C666-1、NP69 在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中培养,温度 37 ℃,5% CO<sub>2</sub>。将 SUNE-1 细胞株接种至 6 孔板,生长至密度为 50%~70% 时用于实验,根据操作手册,以 Lipo-2000 将 miR-133b mimics 转染至鼻咽癌 SUNE-1 细胞中构建 miR-133b 过表达模型(miR-133b mimics 组),并将 miR-133b NC 转染至 SUNE-1 细胞作为对照(miR-133b NC 组),同时将 EGFR siRNA 转染至鼻咽癌 SUNE-1 细胞中构建 EGFR 低表达模型(EGFR siRNA 组),并将 Control siRNA 转染至 SUNE-1 细胞作为对照(EGFR NC 组)。

### 1.3 定量聚合酶链反应(qRT-PCR)

将细胞收集后加入含有 lysis buffer 500 μL 的 EP 管中裂解,Trozel 裂解液抽提组织总 RNA,取 1 μg 总 RNA 进行 cDNA 的合成,具体操作参照使用说明,使用 U6 作为内参。反应体系 20 μL,95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,40 个循环,根据 Takara 公司实时定量 PCR 试剂盒说明书进行 PCR 反应;获得数据以  $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$  计算 mRNA 表达量,实验重复 3 次。引物序列如下:miR-133b 正义链 5'-ACAGGC-CGGGACAAGTGCAATA-3',反义链 5'-GCTGTCAA CGATACGCTACGTAACG-3';U6 内参正义链 5'-TCCGATCGTGAAGCGTTC-3',正义链 5'-GTGCAG GGTCCGAGGT-3';EGFR 正义链 5'-ATGAGTTC-CAGTGGCAGTGC,反义链 5'-TAAGTGTGGGTCCG TCCAG-3';GAPDH 正义链 5'-GGCGGCACCACCAT-GTACCCT-3',反义链 5'-AGGGGCCGGACTCGTCAT ACT-3'。

### 1.4 双荧光素酶活性测定

以 EGFR 质粒为载体,分别构建能够表达荧光

素酶的包含 EGFR 3'-UTR (野生型 EGFR3'UTR, EGFR3'UTR Wt) 和 EGFR 3'-UTR 突变序列 (突变型 EGFR3'UTR, EGFR3'UTRMut) 的质粒;将已转染 miR-133b mimics 及 miR-133b NC 的 SUNE-1 细胞株按每孔  $1 \times 10^5$  接种至 24 孔板,24 h 后分别以 lipo-2000 共转染 200 ng 包含 EGFR 3'-UTRWt 或 EGFR 3'-UTRMut 的荧光素酶质粒及 80 ng 海肾荧光质粒,48 h 后用荧光检测仪检测荧光强度,海肾荧光作为内参照,每组试验重复 3 次。

### 1.5 蛋白免疫印迹实验

收集转染后的对数生长期的 SUNE-1 细胞,提取蛋白后,用 BCA 蛋白质测定试剂盒定量测定蛋白浓度。通过 SDS-PAGE 分离后,将蛋白转移至 PVDF 膜中,BSA 液封闭 30 min,EGFR 一抗 (1:1 100) 4 ℃ 孵育过夜,用含有的 TBST 溶液洗膜 3 次,每次 10 min,在室温下孵育二抗 (1:5 000),封闭 1 h。使用 ECL 显影液检测目标蛋白的表达水平,GAPDH 用于蛋白内参对照;实验重复 3 次。

### 1.6 MTT 增殖实验

将转染后处于对数生长期的 SUNE-1 细胞使用胰蛋白酶消化后,制成单细胞悬浮液并以  $1 \times 10^3$  细胞/孔的密度接种到 96 孔板中。在培养 7 d 后,加入 20  $\mu$ L MTT 测定液,每孔充分混合均匀,并在 37 ℃ 下孵育 4 ~ 6 h;将孵育后的上清液与 150  $\mu$ L 二甲基亚砷充分混合溶解,48 h 后在 490 nm 波长处测定吸光度,计算鼻咽癌细胞的增殖,实验重复 3 次。

### 1.7 Transwell 迁移、侵袭实验

迁移实验:将  $3 \times 10^4$  个细胞置于上室中 (孔径 8  $\mu$ m),下室填充无血清培养基,细胞在 Transwell 小室中培养 48 h 后用于迁移测定,迁移的细胞被 1% 的结晶紫染色,随机选择 5 个视野,在倒置显微镜下计数迁移到下侧的细胞数。侵袭实验:将基质胶在 4 ℃ 条件下过夜融化,并与 3 倍体积的无血清培养基混合均匀后加入 24 孔 Transwell 小室 (每孔 50  $\mu$ L),其余实验步骤及方法同迁移实验。实验重复 3 次。

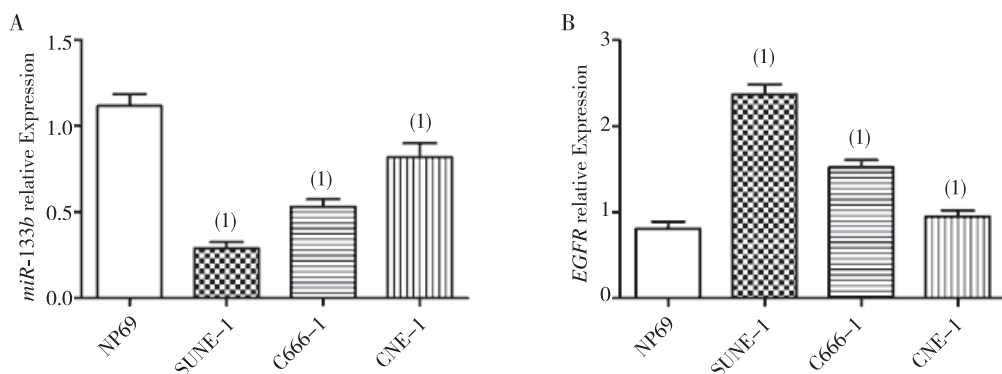
### 1.8 统计学方法

使用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,计量资料使用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 进行表示,使用 Student's *t* test 检验及 one-way ANOVA 对数据进行检验, $P < 0.05$  被认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同鼻咽癌细胞株中 miR-133b 及 EGFR mRNA 表达水平

qRT-PCR 测定结果显示,与 NP69 细胞株比较,miR-133b 在不同的鼻咽癌细胞 (CNE-1、SUNE-1、C666-1) 中均呈现低表达 ( $P < 0.05$ ),并且 SUNE-1 细胞株中 miR-133b 的表达水平相对最低,见图 1A;同时 EGFR 在不同的鼻咽癌细胞株中均呈现高表达 ( $P < 0.05$ ),且 SUNE-1 细胞株中 EGFR 的表达水平相对最高,见图 1B;因此后续实验选取鼻咽癌细胞株 SUNE-1 作为研究对象。



(<sup>1</sup>) 与 NP69 细胞株比较,  $P < 0.05$

图 1 NP69 细胞株及不同鼻咽癌细胞株中 miR-133b 及 EGFR mRNA 表达

Fig. 1 Expression of miR-133b and EGFR mRNA in different Nasopharyngeal carcinoma cell lines

### 2.2 miR-133b 和 EGFR 在鼻咽癌 SUNE-1 细胞株中的调控关系

通过蛋白免疫印迹实验发现,过表达 miR-133b 后,SUNE-1 细胞株中 EGFR 蛋白表达含量降

低 ( $P < 0.05$ ),见图 2A。通过 TargetScan 生物信息学数据库查询发现,miR-133b 与 EGFR 存在部分配对的碱基序列 (图 2B),因此将 miR-133b mimics、EGFR 3'-UTR 共转染到 SUNE-1 细胞中,双荧

光素酶报告基因结果显示,与 miR-133b NC 组相比,miR-133b mimics 与野生型载体 EGFR 3'-UTR-Wt 共转染的 SUNE-1 细胞中 EGFR 的荧光素酶活性显著降低,而 miR-133b mimics 与突变型载体

EGFR 3'-UTRMut 共转染的 SUNE-1 细胞中 EGFR 的荧光素酶活性无明显变化,说明过表达 miR-133b 能下调 EGFR 的表达,见图 2C。

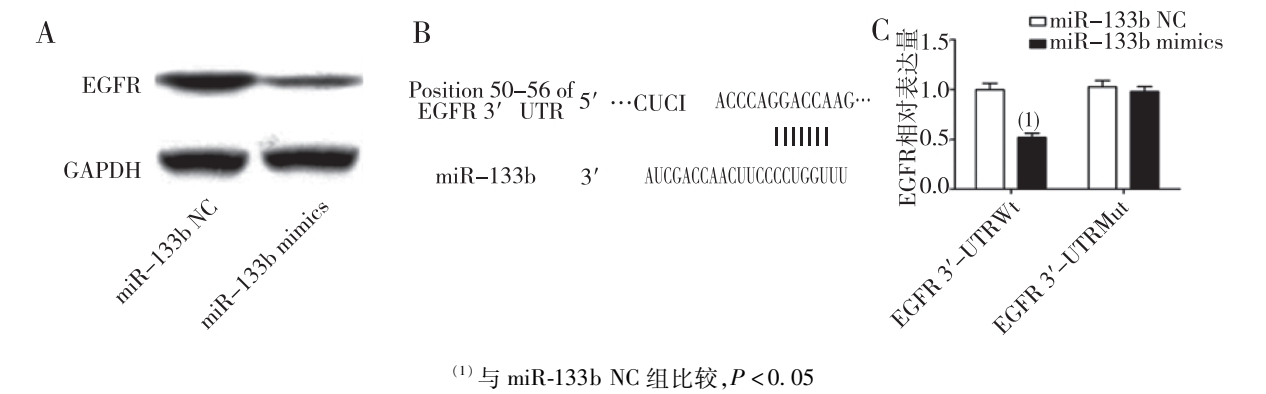


图2 miR-133b 和 EGFR 在鼻咽癌 SUNE-1 细胞株中的调控关系

Fig. 2 Regulatory relationships between miR-133b and EGFR in Nasopharyngeal carcinoma SUNE-1 cell line

2.3 过表达 miR-133b 对鼻咽癌 SUNE-1 细胞株增殖、迁移及侵袭的影响

过表达 miR133b 后,鼻咽癌 SUNE-1 细胞株增殖细胞数、迁移细胞数目及侵袭细胞明显减少( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 过表达 miR-133b 对鼻咽癌 SUNE-1 细胞株增殖、迁移、侵袭的影响( $n, \bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Effects of overexpression of miR-133b on proliferation, migration, and invasion of Nasopharyngeal carcinoma SUNE-1 cell lines

组别	增殖细胞数	迁移细胞数	侵袭细胞数
miR-133b mimics	331.75 ± 67.02	156.31 ± 29.18	142.23 ± 35.69
miR-133b NC	547.03 ± 78.25	189.23 ± 36.55	266.31 ± 52.36
<i>P</i>	0.001	0.013	0.004

2.4 抑制 EGFR 表达对鼻咽癌 SUNE-1 细胞株增殖、迁移及侵袭的影响

抑制 EGFR 表达后,鼻咽癌 SUNE-1 细胞株增殖细胞数、迁移细胞数目及侵袭细胞明显减少( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 抑制 EGFR 表达对鼻咽癌 SUNE-1 细胞株增殖、迁移及侵袭的影响( $n, \bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Effect of inhibiting EGFR expression on proliferation, migration, and invasion of Nasopharyngeal carcinoma SUNE-1 cell line

组别	增殖细胞数	迁移细胞数	侵袭细胞数
EGFR siRNA	399.11 ± 68.37	157.58 ± 20.46	168.23 ± 32.67
EGFR NC	543.06 ± 72.850	199.40 ± 28.44	282.81 ± 43.65
<i>P</i>	0.001	0.022	0.019

3 讨论

目前中晚期鼻咽癌以近距离放射治疗加常规外照射同时辅以化疗为主要的治疗手段<sup>[9]</sup>,但鼻咽癌发病隐匿,临床症状不典型,超过 75% 的鼻咽癌患者确诊时已为中晚期,导致治疗效果不佳,5 年生存率尚不足 50%,因此如何能早期诊断并优化目前鼻咽癌治疗方案已成为亟待解决的问题。自 1993 年 LEE<sup>[10-11]</sup> 在秀丽线虫的研究中发现 miRNA 以来,目前在动植物及病毒中已发现超过 20 000 个的 miRNA 分子。目前,越来越多的研究表明,miRNA 在肿瘤的发生发展过程中扮演者重要角色,通过与靶基因的 3'-UTR 结合,形成 RNA 诱导或沉默复合体,在转录或翻译水平对靶基因表达进行上调或下调,从而对肿瘤细胞生物学行为产生影响<sup>[12]</sup>。例如:miR-206 通过调控 FMNL2 和 c-MET 的表达,将结肠癌细胞阻滞在 G1/G0 期,抑制结肠癌细胞的增殖、侵袭、转移<sup>[13-15]</sup>, II a 期临床研究评估了 Miravirsen 用于慢性 HCV1 型感染患者的安全性和有效性,试验表明 Miravirsen 在慢性 HCV1 型感染患者中表现出长期剂量依赖性地减少 HCV RNA 表达水平的效应,且未出现病毒抵抗性<sup>[16-17]</sup>。Qiu<sup>[18]</sup> 的研究发现 26 例胃癌组织与非胃癌组织相比,miR-133b 的表达明显下调,过表达 miR-133b 后胃癌细胞的增殖及侵袭能力降低,表明 miR-133b 在胃癌的发生发展中扮演者抑癌基因的角色。米永华等<sup>[19]</sup> 的研究表明 miR-133b 通过

靶向下调 PKM2 基因的表达,增强非小细胞肺癌对化疗及电离辐射的敏感性。但目前尚没有研究对 miR-133b 在鼻咽癌的发生发展中的作用进行报道。本研究发现 miR-133b 在不同的鼻咽癌细胞中均呈现低表达状态,进一步使 miR-133b 过表达后,鼻咽癌 SUNE-1 细胞株的增殖、侵袭、转移受到明显抑制,可见 miR-133b 在鼻咽癌的发生发展中扮演者抑癌基因的角色。

表皮细胞生长因子受体 (EGFR) 是人表皮生长因子受体 (HER) 家族成员,属于受体酪氨酸激酶 (TKI) 家族,为原癌基因 c-erbB1 表达产物<sup>[20]</sup>。EGFR 主要位于细胞膜,被 EGF 等配体激活后发生二聚化并引发胞内段产生酪氨酸激酶活性,进一步激活下游信号转导通路,参与细胞生长、增殖等多种生理过程<sup>[21-23]</sup>。EGFR 信号通路重要靶标的检测及靶向治疗一直是国际肿瘤医疗领域关注的焦点。miR-133b 能否通过调控 EGFR 影响鼻咽癌细胞的生物学行为尚不清楚。本研究发现,EGFR 在不同的鼻咽癌细胞中均呈现高表达状态,进一步抑制 EGFR 的表达,鼻咽癌 SUNE-1 细胞的增殖、侵袭、转移能力减弱,并且通过 TargetScan 数据库对 miR-133b 进行检索,预测其靶基因,发现 miR-133b 和 EGFR 间有部分互补的结合序列,推测 EGFR 可能是 miR-133b 的靶基因,荧光素酶基因报告显示 miR-133b mimics 与野生型载体 EGFR 3'-UTR Wt 共转染后,EGFR 的荧光素酶活性显著降低,蛋白免疫印迹实验表明过表达 miR-133b 后,EGFR 蛋白表达含量降低,说明 EGFR 是 miR-133b 的靶基因,miR-133b 可靶向负向调控 EGFR 表达水平,抑制鼻咽癌细胞的增殖、侵袭及转移。但其上游及下游是否存在特异性的调控通路,本研究将会进一步探讨。

综上所述,本研究证明 miR-133b 可靶向下调 EGFR 基因的表达,抑制鼻咽癌细胞的增殖、侵袭及转移,可为鼻咽癌的治疗及临床药物的研制提供新的思路。

## 4 参考文献

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *Ca Cancer J Clin*, 2016, 66 (2):115-132.
- [2] 邓卓霞, 司勇锋, 陶仲强. 鼻咽癌病因研究及早期诊断与治疗 [J]. *国际耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2016, 40 (3):173-177.
- [3] 黄祥, 曲超, 姜新, 等. 鼻咽癌的治疗进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35 (11):3159-3161.
- [4] LI Y, KOWDLEY K V. MicroRNAs in common human diseases [J]. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 2012, 10 (5):246-253.
- [5] 何顺伟, 魏晓星. 新型诊断标志物循环 miRNA 的研究进展与应用 [J]. *中国高原医学与生物学杂志*, 2016, 37 (1):68-72.
- [6] RUPAIMOOLE R, CALIN G A, LOPEZBERESTEIN G, et al. miRNA deregulation in cancer cells and the tumor microenvironment [J]. *Cancer Discovery*, 2016, 6 (3):415-421.
- [7] ZHUANG Q Y, ZHOU T J, HE C Y, et al. Protein phosphatase 2A-B558 enhances chemotherapy sensitivity of human hepatocellular carcinoma under the regulation of microRNA-133b [J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2016, 35 (1):67.
- [8] YAN L V, XUE X, LIN M, et al. Expression and significance of miR-133a in acute myeloid leukemia [J]. *Journal of Wenzhou Medical College*, 2012, 35 (1):50-54.
- [9] 张磊, 徐巍. 鼻咽癌的治疗进展 [J]. *国际肿瘤学杂志*, 2017, 44 (9):693-695.
- [10] VISHNOI A, RANI S. MiRNA biogenesis and regulation of diseases: An overview [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2017, 1509:1-10.
- [11] PRADHAN A K, EMDAD L, DAS S K, et al. The enigma of mirna regulation in cancer [J]. *Advances in Cancer Research*, 2017, 135:25-52.
- [12] DIDIANO D, HOBERT O. Molecular architecture of a miRNA-regulated 3' UTR [J]. *Rna-A Publication of the Rna Society*, 2008, 14 (7):1297.
- [13] REN X L, HE G Y, LI X M, et al. MicroRNA-206 functions as a tumor suppressor in colorectal cancer by targeting FMNL2 [J]. *Journal of Cancer Research & Clinical Oncology*, 2016, 142 (3):581-592.
- [14] INOUCHI S, SEKI N, CHIYOMARU T, et al. Tumour-suppressive microRNA-24-1 inhibits cancer cell proliferation through targeting FOXM1 in bladder cancer [J]. *Febs Letters*, 2016, 588 (17):3170-3179.
- [15] PATICK A K, CHEN A, DOORN L J V, et al. 1202 sequence analysis of hcv variants from a phase iia trial of miravirsin (mir), an oligonucleotide targeting mir-122, in treatment naive patients with chronic HCV infection [J]. *Journal of Hepatology*, 2012, 56 (4):476-476.
- [16] GEBERT L F R, REBHAN M A E, CRIVELLI S E M, et al. Miravirsin (SPC3649) can inhibit the biogenesis of miR-122 [J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42 (1):609-621.