

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.18.006

MiR-30a-3p 对人滋养肿瘤细胞系 JEG-3 细胞侵袭功能的影响 *

孙晓雯^{1,2} 尹国武¹ 延佳佳¹ 朱晓明^{1,3Δ}

(1 第四军医大学唐都医院 陕西 西安 710038; 2 解放军第四五六医院 山东 济南 250001; 3 解放军总医院 北京 100853)

摘要 目的: MiRNAs 对于胎盘的形成和正常妊娠的维持起着至关重要的作用, 它在胎盘中的表达失衡的可能导致了妊娠相关疾病的发生, 我们前期研究发现 miR-30a-3p 在子痫前期患者胎盘上特异性高表达, 推测 miR-30a-3p 可能参与了子痫前期的发生发展过程, 本课题通过观察 miR-30a-3p 对人滋养肿瘤细胞系 JEG-3 细胞侵袭能力的影响, 深入探讨 miR-30a-3p 在子痫前期发病过程中的作用。 **方法:** 应用瞬时转染技术在人滋养肿瘤细胞系 JEG-3 细胞中分别转染 miR-30a-3p mimics、mimics NC 为 miR-30a-3p 过表达组和阴性对照组, 空白转染组为空白对照组, 利用荧光实时定量 PCR 技术检测各组细胞中 miR-30a-3p 的表达, Transwell 实验检测各组细胞侵袭能力的差别。 **结果:** 荧光实时定量 PCR 结果显示 miR-30a-3p 过表达组与阴性对照组、空白对照组相比 miR-30a-3p 的表达量明显升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); Transwell 实验结果显示 miR-30a-3p 过表达组细胞的侵袭能力与阴性对照组、空白对照组相比均有降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。阴性对照组与空白对照组的侵袭能力差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。 **结论:** miR-30a-3p 可以显著下调 JEG-3 细胞的侵袭力, miR-30a-3p 有可能通过降低滋养细胞的浸润能力, 导致滋养细胞对子宫肌层和螺旋动脉的浸润不足, 造成“胎盘浅着床”, 从而在子痫前期的发病过程中发挥了重要的作用, miR-30a-3p 有望成为诊治子痫前期疾病的靶点。

关键词: miR-30a-3p; JEG-3 细胞; 侵袭

中图分类号: R714.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)18-3422-04

Effect of MiR-30a-3p on Invasive Capacity of Choriocarcinoma Cell Line JEG-3*

SUN Xiao-luan^{1,2}, YIN Guo-wu¹, YAN Jia-jia¹, ZHU Xiao-ming^{1,3Δ}

(1 Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China; 2 People's Liberation Army 456 Hospital, Jinan, Shandong, 250001, China; 3 The people's liberation army general hospital, Beijing, 100853, China)

ABSTRACT Objective: MiRNAs plays an important role in the formation of the placenta and the maintenance of normal pregnancy, its imbalanced expression in placenta may lead to a pregnancy related to the occurrence of diseases, our previous study found that miR-30a-3p specificity high expression in the placenta of patients with preeclampsia, speculated that miR-30a-3p may participate in the development process of preeclampsia, our study observe the effect of miR-30a-3p on the invasive capacity of choriocarcinoma cell line JEG-3 to identify the function of miR-30a-3p in the process of pre-eclampsia. **Methods:** The technology of transient transfection was used to transfect with miR-30a-3p mimics and mimics NC in JEG-3 cells as miR-30a-3p overexpression group and the negative control group, blank transfection group as the blank control group. The expression of miR-30a-3p was detected by Real time PCR. The invasive capacity of JEG-3 were checked by transwell assay. **Results:** Real time PCR results showed that the expression of miR-30a-3p displayed a marked increase after transfected with miR-30a-3p mimics in JEG-3 cell ($P < 0.05$). miR-30a-3p promoted the invasive capacity of JEG-3 cells more obvious in study group than that in control groups ($P < 0.05$). **Conclusions:** miR-30a-3p can significantly reduce the invasive capacity of the JEG-3, miR-30a-3p may lead to nourish cells of myometrium and invasion of the spiral arteries by reducing the sertoli cell infiltration ability, causing "shallow placenta implantation", so it could be the diagnosis and therapeutic target in the treatment of preeclampsia.

Key words: MiR-30a-3p; JEG-3 cell; Invasion

Chinese Library Classification: R714.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)18-3422-04

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(31000660;81170582)

作者简介: 孙晓雯(1978-), 女, 主治医师, 硕士研究生, 研究方向: 围产医学与生殖医学, E-mail: 33040792@qq.com

△通讯作者: 朱晓明(1981-), 女, 主治医师、讲师, 北京解放军总医院在读博士后, 研究方向: 妇产科学,

电话: 029-84777751, E-mail: zhuxm81@fmmu.edu.cn

(收稿日期: 2014-01-26 接受日期: 2014-02-23)

前言

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类长度在 18~25 个核苷酸的非编码单链小分子 RNA, 广泛存在于线虫、植物、哺乳动物等真核生物中, 通过与靶 mRNA 3' UTR 区的完全或不完全结合, 使 mRNA 降解或者抑制其翻译来调控靶基因的表达, 从而参与了个体生长发育、细胞分化、增殖、凋亡等诸多生物学过程^[1-3]。近年来 miRNAs 在妊娠及妊娠相关疾病的作用引起了广泛的关注^[4-6], 有研究表明, 位于 6q13 染色体上的 miR-30a 家族, 与细胞的分化、转移、侵袭显著相关^[7-9]。多数学者认为胎盘滋养细胞侵袭能力不足可以导致子痫前期、胎儿生长受限、不明原因的早期自然流产等多种病理妊娠的发生^[10-12]。我们在前期研究中发现在子痫前期患者胎盘中 miR-30a-3p 特异性高表达, 推测 miR-30a-3p 表达失衡可能与子痫前期的发病相关。本实验以人滋养肿瘤细胞系 JEG-3 细胞为体外研究模型, 应用瞬时转染技术和 Transwell 实验研究 miR-30a-3p 过表达水平对体外滋养细胞侵袭能力的影响, 为深入探讨 miR-30a-3p 在子痫前期发病机制中的作用奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

人滋养肿瘤细胞系 JEG-3 细胞 (保存于唐都医院妇产科实验室); DMEM/F12 培养基、胎牛血清 (Hyclon 公司, 美国); 人成熟型 miR-30a-3p 和无关核酸序列 (由上海吉玛生物公司设计合成); OPTI-MEM 培养液 (GIBCO 公司, 美国); 转染试剂 Lipo2000 (Invitrogen 公司, 美国), RNAiso、荧光定量 SYBR® premix Ex Taq™ (Tli RNaseH plus) 试剂盒 (TaKaRa 公司, 日本); Matrigel 胶 (BD Bioscience 公司 美国), Transwell 小室 (Costar 公司 美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 JEG-3 细胞用含 15 % 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM/F12 (1:1) 培养基、在 37 °C、5 % CO₂ 细胞培养箱 (Thermo 公司, 美国) 内恒温恒湿培养, 每 48 小时更换细胞培养液, 取状态良好, 处于对数生长期的细胞, 消化、离心、重悬并调整细胞密度为 5×10^5 /ml, 接种于 6 孔培养板, 待 24 小时后细胞长满至 70 % 左右时进行细胞转染。

1.2.2 细胞瞬时转染 按照 Lipofectamine 2000 说明书操作。设置 3 个细胞组: miR-30a-3p 过表达组 (转染 miR-30a-3p mimics)、阴性对照组 (转染 miR-30a-3p NC) 和空白对照组。转染液体的配制: A 液: 20 μ L 转染片段加入 OPTI-MEM 230 μ L; B 液: 5 μ L Lipofectamine 2000 加入 OPTI-MEM 245 μ L。B 液在室温下静置 5 min 后与 A 液混匀, 再于室温下静置 20 min, 空白对照组以 DEPC 水替代转染片段。每孔加入 OPTI-MEM 1.5 ml, 细胞置于 37 °C、5 % CO₂ 细胞培养箱中培养 6 小时后更换为含 15 % FBS 的 DMEM/F12 (1:1) 培养基, 继续培养 48 小时。

1.2.3 荧光实时定量 PCR 检测各组细胞 miR-30a-3p 的差异表达 细胞总 RNA 的提取遵照 TaKaRa RNAiso 试剂盒说明书操作, 提取的 RNA 样品使用分光光度计进行定量, 2 % 琼脂糖凝胶电泳检测其质量。按照 TaKaRa 公司的 SYBR® premix Ex Taq™ (Tli RNaseH plus) 试剂盒说明书, 进行反转录 (反应条件:

37 °C 60 min, 85 °C 5 s), 产物在 ABI 7500 PCR 仪上进行 PCR 扩增, 以 U6 为内参, U6 引物序列为 TaKaRa 公司提供保密序列, miR-30a-3p 的上游引物序列: 5'-ctttcagtcggagtttcagc-3', 下游引物为 TaKaRa 公司提供的通用引物 Uni-miR qPCR 引物, 反应体系 25 μ L, PCR 反应条件: 95 °C 30 s; 35 个 PCR 循环 (95 °C 5 s, 57 °C 30 s)。获得 CT 值后, 采用比较分析 CT 值法进行相对定量, miR-30a-3p 的相对定量利用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。

1.2.4 Transwell 实验检测各组 JEG-3 细胞的侵袭能力 50 mg/L Matrigel 胶提前置于 4 °C 冰箱过夜, 融化成液态, 与 OPTI-MEM 培养液按照 1:8 比例稀释, 冰上操作, 混匀后迅速加入预先放入 24 孔板的 transwell 小室中, 每孔加入 50 μ L, 室温风干后水化基底膜 (每孔加入 100 μ L OPTI-MEM 培养液, 37 °C 孵育 30 min)。常规消化各转染组 JEG-3 细胞, 中止消化后离心、弃上清, 用 OPTI-MEM 培养液重悬后细胞计数并调整密度至 1×10^5 /mL, 取 200 μ L 加入上室内, 下室内加入 500 μ L 含 20 % FBS 的 DMEM/F12 (1:1) 完全培养基, 每组各设 3 个复孔, 37 °C、5 % CO₂ 培养箱中培养 24 小时后取出小室, PBS 淋洗, 棉签擦掉小室底部膜内表面未穿过膜的细胞, 浸入 95 % 乙醇固定 5 min, 4 g/L 结晶紫染色 10 min。100 倍显微镜下计数迁移到微孔膜下层的细胞数, 每个样本随机计数 10 个不重复视野, 计算平均值。

1.3 统计学分析处理

数据采用 SPSS16.0 软件分析, 多组均数间的比较采用方差分析 F 检验, 组间两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 JEG-3 细胞转染效率检测

转染 48 小时后, 荧光实时定量 PCR 技术检测各组 JEG-3 细胞中 miR-30a-3p 的表达量, 结果显示与阴性对照组和空白对照组相比, miR-30a-3p 过表达组 JEG-3 细胞转染 miR-30a-3p mimic 后 miR-30a-3p 的表达量显著升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 阴性对照组、空白对照组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 结果见图 1。

2.2 JEG-3 细胞侵袭能力检测

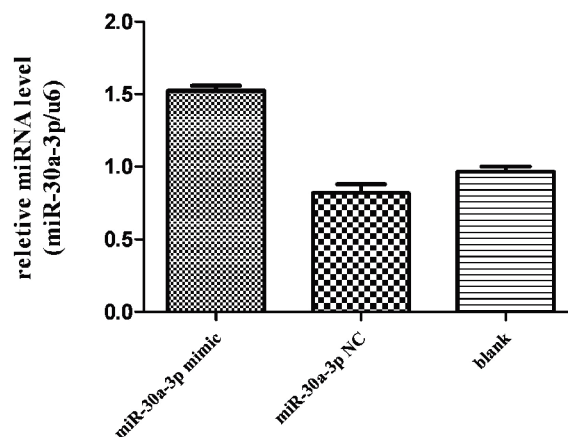


图 1 转染后各组荧光实时定量 PCR miR-30a-3p 扩增结果

Fig. 1 Expression of miR-30a-3p by real-time PCR after transfection

转染 48h 小时后,Transwell 实验检测各组 JEG-3 细胞浸润能力变化,每组样本各做 3 个重复,100 倍显微镜下随机选取 10 个视野,计数微膜孔下层细胞数,随后做统计学分析,结果

(见图 2、图 3)显示:miR-30a-3p 过表达组细胞穿膜数显著低于阴性对照组和空白组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

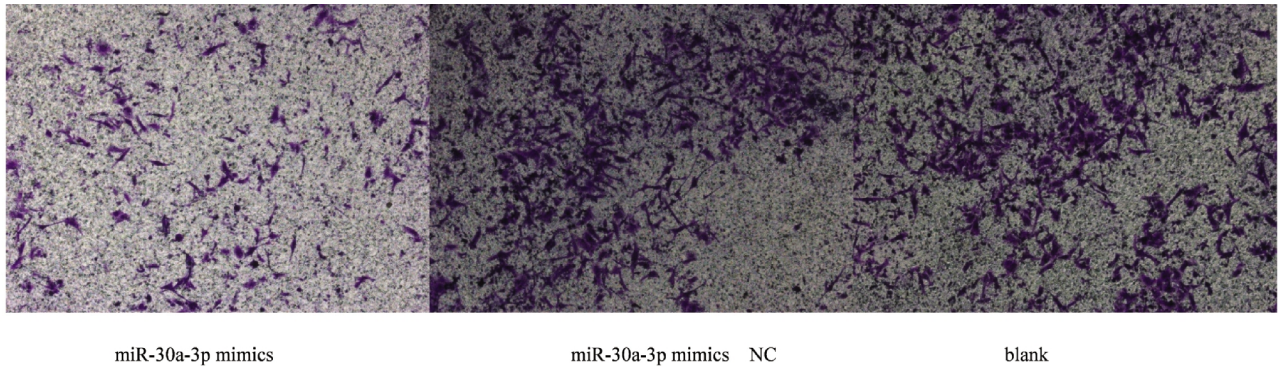


图 2 转染后 transwell 实验结果($\times 100$ 倍)

Fig. 2 Results of transwell experiment after transfection

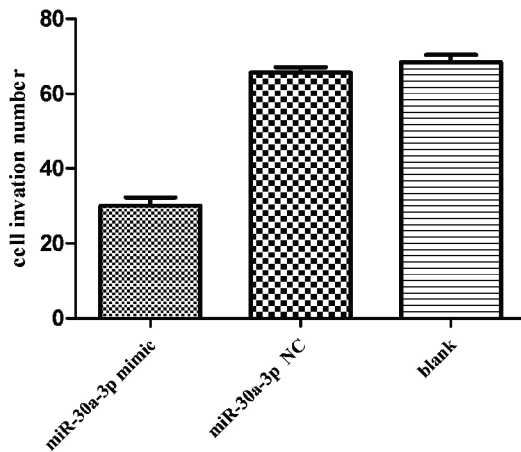


图 3 转染后 Transwell 实验结果统计分析图

Fig. 3 The histogram of transwell experiment results after transfection

3 讨论

子痫前期(pre-eclampsia, PE)是全球范围内孕产妇及围产儿病死率升高的主要原因,其病因和发病机制是产科领域中长期研究的热点,该疾病的发生与滋养细胞侵袭功能障碍密切相关。已有研究^[13-16]证实 miRNAs 在子痫前期胎盘中表达失衡,通过调控相应靶基因的表达水平异常,造成滋养细胞异常分化、增殖、凋亡和浸润障碍,从而导致了子痫前期发病。我们课题组^[17]前期利用基因芯片技术和荧光实时定量 RCR 技术证实子痫前期胎盘组织中 miR-30a-3p 呈特异性高表达,因此推测 miR-30a-3p 高表达可能参与了子痫前期的病理生理过程。

本研究中,我们利用瞬时转染技术在 JEG-3 细胞中过表达 miR-30a-3p,Transwell 实验检测过表达 miR-30a-3p 后 JEG-3 细胞侵袭能力的改变,旨在进一步探讨 miR-30a-3p 对滋养细胞侵袭功能的影响。JEG-3 细胞系是国际上常用的人滋养层细胞模型,有高度侵袭性,具有类似于合体滋养层细胞的多种生物学特性,是研究滋养细胞功能的理想模型。实验结果显示:在 JEG-3 细胞中转入 miR-30a-3p mimics 后,JEG-3 细胞中的表达量与对照组相比明显升高,而 JEG-3 细胞的侵袭能力与对照组

相比显著下降,结果表明 miR-30a-3p 的高表达可以明显降低 JEG-3 细胞的侵袭力。因此我们推测,miR-30a-3p 可能通过降低滋养细胞的侵袭功能参与了子痫前期的发病过程。

MiR-30a-3p 是 miR-30a 家族成员之一,定位于 6q13 染色体上,来源于 miR-30a 前体颈环的 3' 臂。研究发现^[18-20] miR-30a-3p 在皮肤癌、肝癌、乳腺癌等多种癌组织及其转移灶中低表达,Wang^[19]在体外研究中发现肝癌细胞中过表达 miR-30a-3p 能够通过负向调控 MMP-3、E-钙粘连蛋白及波形蛋白的表达抑制肝癌细胞的浸润和转移,以上均表明 miR-30a-3p 与肿瘤细胞的侵袭能力密切相关,能够负向调节肿瘤细胞浸润、转移。

孕早期滋养细胞浸润母体的生物学行为类似于肿瘤细胞的侵袭转移过程,主要包括黏附、基底膜或细胞外基质的降解、迁移三方面,而基底膜或细胞外基质的降解是其中的关键环节,与肿瘤细胞不同的是,滋养细胞的侵袭过程受到精密的调控,仅在孕早期具有侵袭能力,浸润部位只限于子宫肌层的上 1/3。在滋养细胞侵袭过程中,滋养细胞分泌的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)和 MMPs 组织特异性抑制物(tissues specific of matrix metalloproteinases, TIMPs)相互作用,保持动态平衡,使滋养细胞适度浸润,保证胎盘正常的形成和良好的发育,从而维持妊娠顺利进行。研究表明^[21,22]在子痫前期胎盘中 MMP-2、MMP-3、MMP-7 以及 MMP-9 表达水平均有下降,并且其下降程度与病情严重程度呈正相关,乔宠等^[23]发现子痫前期胎盘中 MMPs 抑制物 TIMP-1 表达水平也与 PE 病情密切相关,王永红等^[24]则发现在 PE 胎盘中 TIMP-3 的表达水平升高,以上研究均表明 MMPs 表达及活性的下降能够降低滋养细胞侵袭能力,阻碍细胞外基质的降解,致使滋养细胞对子宫肌层浸润过浅,子宫螺旋动脉重铸不足,从而导致了 PE 的发病。

综上,滋养细胞侵袭能力下降是子痫前期发病的重要原因。我们的实验结果表明过表达 miR-30a-3p 能够显著降低 JEG-3 细胞的侵袭力,推测 miR-30a-3p 有可能通过调控 MMPs/TIMPs 通路降低了滋养细胞的侵袭力,导致了“胎盘浅着床”,从而参与了子痫前期的发生发展过程,但具体机制需要

进一步研究,深入研究子痫前期中 miR-30a-3p 对滋养细胞侵袭功能的调控机制,对明确子痫前期的发病机理具有重要意义,miR-30a-3p 有望成为子痫前期疾病诊断和治疗的靶点。

参考文献(References)

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297
- [2] Alvarez-Garcia I, Miska E A. MicroRNA functions in animal development and human disease [J]. Development, 2005, 132 (21): 4653-4662
- [3] Bartel D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. Cell, 2009, 136(2): 215-233
- [4] Chiu R W, Lo Y M. Pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma: a channel for fetal-maternal communication [J]. Clin Chem, 2010, 56(11): 1656-1657
- [5] Miura K, Miura S, Yamasaki K, et al. Identification of pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma[J]. Clin Chem, 2010, 56(11): 1767-1771
- [6] Lozoya T, Dominguez F, Romero-Ruiz A, et al. The lin28/let-7 system in early human embryonic tissue and ectopic pregnancy [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e87698
- [7] Sun G X, Cao X S, Li Q, et al. Significance of miR-155, miR-34a and miR-30a expression in diffuse large B-cell lymphoma [J]. Journal of Medical Genetics, 2013, 30(1): 79-83
- [8] Liu Y, Song Y, Ma W, et al. Decreased microRNA-30a levels are associated with enhanced ABL1 and BCR-ABL1 expression in chronic myeloid leukemia[J]. Leuk Res, 2013, 37(3): 349-356
- [9] Liu Z, Chen L, Zhang X, et al. RUNX3 regulates vimentin expression via miR-30a during epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cells[J]. J Cell Mol Med, 2014, 18(4):610-623
- [10] Hannon T, Innes B A, Lash G E, et al. Effects of local decidua on trophoblast invasion and spiral artery remodeling in focal placenta creta - an immunohistochemical study [J]. Placenta, 2012, 33 (12): 998-1004
- [11] Guibourdenche J, Leguy M C, Tsatsaris V. Biology and markers of preeclampsia[J]. Ann Biol Clin (Paris), 2013, 71: 79-87
- [12] Starzyk K A, Pijnenborg R, Salafia C M. Decidual and vascular pathophysiology in pregnancy compromise[J]. Semin Reprod Endocrinol, 1999, 17(1): 63-72
- [13] Pineles B L, Romero R, Montenegro D, et al. Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia [J]. Am J Obstet Gynecol, 2007, 196 (3) : 261
- [14] Zhu X M, Han T, Sargent I L, et al. Differential expression profile of microRNAs in human placentas from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies[J]. Am J Obstet Gynecol, 2009, 200(6): 661
- [15] Seitz H, Royo H, Bortolin M L, et al. A large imprinted microRNA gene cluster at the mouse Dlk1-Gtl2 domain [J]. Genome Res, 2004, 14(9): 1741-1748
- [16] Barad O, Meiri E, Avniel A, et al. MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues[J]. Genome Res, 2004, 14(12): 2486-2494
- [17] 栾丽霞. 子痫前期相关 miR-30a-3p 的功能研究 [D]. 第四军医大学, 2012: 36-40
- Luan Li-xia .The research of the function of PE-related miR-30a-3p [D]. Fourth Military Medical University, 2012: 36-40
- [18] Xie H, Lee L, Caramuta S, et al. MicroRNA expression patterns related to merkel cell polyomavirus infection in human merkel cell carcinoma[J]. J Invest Dermatol, 2014, 134(2): 507-517
- [19] Wang W, Lin H, Zhou L, et al. MicroRNA-30a-3p inhibits tumor proliferation, invasiveness and metastasis and is downregulated in hepatocellular carcinoma[J]. Eur J Surg Oncol, 2013: 19[Epub ahead of Print]
- [20] Yan L X, Huang X F, Shao Q, et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis[J]. RNA, 2008, 14(11): 2348-2360
- [21] Xu P, Alfaiy N, Challis J R. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(3): 1353-1361
- [22] Reister F, Kingdom J C, Ruck P, et al. Altered protease expression by periarterial trophoblast cells in severe early-onset preeclampsia with IUGR[J]. J Perinat Med, 2006, 34(4) :272-279
- [23] 乔宠,王春晖,栾南南.基质金属蛋白酶及其组织抑制物在子痫前期患者胎盘中的基因表达 (英文)[J]. 中国现代医学杂志, 2005, (22): 3361-3365
- Qiao Chong, Wang Chun-hui, Luan Nan-nan. mRNA expression of MMPs and TIMPs in placenta of preeclampsia [J]. China Journal of Modern Medicine, 2005,(22): 3361-3365
- [24] 程欣,王永红.基质金属蛋白酶 3 及其抑制剂 3 在子痫前期患者胎盘中的表达[J]. 国际妇产科学杂志,2012, (02): 196-198
- Cheng Xin, Wang Yong-hong. The expression of Matrix Metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in placenta of pregnant women with preeclampsia [J]. J Int Obstet Gynecol,2012, (02): 196-198