

网络出版时间: 2018-6-8 10:04 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180607.1131.014.html>

miR-30b-5p 抑制胆固醇合成和结直肠癌细胞增殖

张亚珍¹, 何贵省¹, 吴晓明¹, 宋杰峰², 吴煌福¹

摘要 目的 探索 miR-30b-5p 在结直肠癌中的作用及机制。方法 收集结直肠癌患者的癌及癌旁组织、患者及正常人血清, 提取 RNA, 实时荧光定量 PCR 检测 miR-30b-5p 表达。将 miR-30b-5p 的 inhibitors 转入 HT-29 细胞中; 将 miR-30b-5p 的 mimics 转入 HCT-116 细胞中; CCK-8 试剂盒检测细胞活力; 胆固醇试剂盒检测细胞中胆固醇含量; 实时荧光定量 PCR 检测低密度脂蛋白受体 (LDLR) 的表达, Western blot 检测 LDLR 蛋白表达; 在转入 miR-30b-5p inhibitors 的 HT-29 细胞中应用 siRNA 敲低 LDLR, 检测 LDLR 蛋白表达、细胞胆固醇含量及细胞增殖。结果 与正常人相比, miR-30b-5p 在结直肠癌患者组织及血清中表达降低, 且其在结直肠癌细胞系 HT-29、Caco-2 及 HCT-116 中的表达量低于正常结直肠细胞系 NCM460; 在 HT-29 细胞中转入 miR-30b-5p 的 inhibitors, 细胞增殖加快, 胆固醇含量增加, LDLR 表达上调; 在 HCT-116 细胞中转入 miR-30b-5p 的 mimics, 细胞增殖减慢, 胆固醇降低, LDLR 表达被抑制; 此外, 在 miR-30b-5p 沉默的 HT-29 细胞中敲低 LDLR, 胆固醇含量减少, 细胞增殖减慢。结论 miR-30b-5p 在结直肠癌中是一种抑癌 microRNA, 它通过抑制 LDLR 和胆固醇合成抑制结直肠癌细胞增殖。

关键词 结直肠癌; miR-30b-5p; LDLR; 胆固醇; 增殖

中图分类号 R 735.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)07-1057-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.07.014

2018-04-16 接收

基金项目: 海南省卫生厅科研立项课题(编号: 琼卫 2011-73); 海南省科学技术厅重点研发计划(编号: ZDYF2017087)

作者单位: 海南医学院第二附属医院¹ 肿瘤外科、² 放射科, 海口 570311

作者简介: 张亚珍, 女, 主治医师;

吴煌福, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wu-huangfu2017@sina.com

结直肠癌是最常见和致死率最高的恶性肿瘤之一^[1-2]。研究^[3-4]显示 microRNA 在结直肠癌中扮演着抑癌或致癌作用。胆固醇代谢在近年来受到了广泛关注, 它对结直肠癌的发生发展十分关键^[5]。低密度脂蛋白受体 (low-density lipoprotein receptor, LDLR) 是调节胆固醇代谢的重要分子, 在肿瘤中的作用也被广泛报道^[6-7]。该研究首先检测结直肠癌组织及患者血清中 miR-30b-5p 的表达量, 通过过表达或敲低 miR-30b-5p 判定其在结直肠癌中的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 结直肠癌细胞系 Caco-2、HT-29 及 HCT-116 均购自 ATCC (American Type Culture Collection); 人正常结肠上皮细胞 NCM460 购自上海盖宁生物公司。12 对结直肠癌组织和癌旁组织及 11 个结直肠癌患者血液样本和正常人血液样本均来自于海南医学院第二附属医院, 并获得知情同意书。

1.1.2 试剂 Cholesteryl Ester Quantitation 试剂盒、 β -actin 抗体 (英国 Abcam 公司); LDLR 抗体 (美国 Sigma 公司); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司); DMEM 培养基及胰蛋白酶 (美国 Hyclone 公司); TRIzol、LipofectamineTM 2000 转染试剂 (美国 Invitrogen 公司); ReverTra Ace qPCR RT Kit (日本 TOYOBO 公司); TransStart SYBR Green qPCR SuperMix (中国全式金公司); RNA 酶抑制剂和 RNA 酶 free water (美国 Promega 公司)。

1.1.3 RNA 试剂 miR-30b-5p mimics 和 mimics

topathological differentiation ($P > 0.05$)。The MTT assay showed that the A value in FAM96A overexpression group was significantly lower than in control group ($P < 0.05$)。FACS analysis indicated that the cell apoptotic rate was increased in FAM96A group than that in the control group ($t = 30.015$, $P < 0.05$)。 **Conclusion** The FAM96A expression is significantly decreased in colon cancer tissues in comparison with its adjacent normal tissues. Additionally, FAM96A may be a good marker to evaluate the development, invasion and metastasis of colon cancer. Overexpression of FAM96A can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of HCT116 cells.

Key words family with sequence similarity 96, member A (FAM96A); colon cancer; proliferation; apoptosis

control miR-30b-5p inhibitor 和 inhibitor control(广州锐博公司)。LDLR 的 siRNA 由上海 GenePharma 公司合成。miR-30b-5p mimics: UGUAAACAUCUA-CACUCAGCU; miR-30b-5p inhibitor: ACAUUUGUAG-GAUGUGAGUCGA; siLDLR: GCGACAGAUGCGAAA GAAAdTdT。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Caco-2、HT-29、HCT-116 及 NCM460 均用 DMEM 完全培养基培养, 包含 10% 胎牛血清、1% 的青链霉素混合液和 89% 的 DMEM 培养基。细胞放置于含 5% CO₂ 的 37 °C 恒温培养箱中培养。

1.2.2 细胞转染 将 miR-30b-5p inhibitors 及阴性对照 inhibitors control 和 miR-30b-5p mimics 及阴性对照 mimics control 的干粉用一定量的 RNase 水溶解。将 HT-29 和 HCT-116 细胞铺在 6 孔板中, 待细胞贴壁后 5 μl 的 Lipofectamine 2000 加入到 500 μl 无血清 DMEM 培养基中, 5 nmol/L 浓度的 miR-27a mimic 和 miR-27a inhibitor 及其阴性对照溶液加入到 500 μl 无血清 DMEM 培养基中, 轻轻吹打混匀后室温静置 5 min。将以上两种液体混匀后室温静置 20 min。将混合液加入 6 孔板的细胞中, 置于含 5% CO₂ 的 37 °C 孵箱中培养 6 h 后更换 DMEM 完全培养基。LDLR 的 siRNA 转染按照锐博生物科技有限公司的方法操作。

1.2.3 总 RNA 提取和 qRT-PCR 用 TRIzol 裂解细胞或组织, RNA 提取试剂盒(康为世纪生物科技有限公司)用于总 RNA 的提取, 血液 RNA 使用 miR-Neasy Serum/Plasma kit [德国凯杰(QIAGEN)公司] 试剂盒提取。去基因组逆转录试剂盒[日本东洋纺(TOYOBO) 生物科技有限公司]用于 RNA 逆转录, 使用北京全式金生物技术有限公司的 SYBR Green qPCR SuperMix 进行 qRT-PCR 反应, 具体操作详见说明书。逆转录及 qRT-PCR 引物见表 1。

1.2.4 蛋白提取和 Western blot 蛋白裂解液(1 g SDS、0.75 g DTT、3 ml Tris, pH 6.8、5 ml 甘油, 加水定容至 50 ml, 一定量溴酚蓝) 提取细胞蛋白, 室温裂解 5 min 后, 置于 98 °C 恒温金属浴 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 于 -20 °C 保存。取 50 ~ 80 μg 蛋白于 10% 或 12% SDS-PAGE 凝胶 80 V 0.5 h, 100 V 1.5 h 将蛋白转至 PVDF 膜上(PVDF 膜在甲醇中浸泡 10 ~ 60 s), 恒流转膜 1 h 30 min 5% 脱脂奶粉(2.5 g 50 ml TBST) 封闭 1 h 4 °C 孵育一抗过夜。第 2 天孵育相应二抗并应用化学发光仪显影。

表 1 逆转录及 Real time PCR 引物

基因名称	引物序列 (5'-3')
RT-U6	AAAATATGGAACGCTTCACGAATTTG
U6-F	CTCGCTTCGGCAGCACATATACT
U6-R	ACGCTTCACGAATTTGCGGTGTC
RT-miR-30b-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT-TCCGACTGGATACGACAGCTGA
miR-30b-5p-F	GCGCTGTAAACATCCTACAC
miR-30b-5p-R	GTGCAGGGTCCGAGGT
LDLR-F	ACGGCGTCTCTTCCTATGACA
LDLR-R	CCCTTGATATCCGCAACAGA
Actin-F	GAGCTGCGTGTGGCTCCC
Actin-R	CCAGAGCGGTACAGGGATAGCA

1.2.5 细胞增殖检测 应用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力。将 3 000 个相应细胞铺至 96 孔板, 每孔 200 μl 完全培养基, 待 4 ~ 6 h 细胞贴壁设定为 0 h。在相应的 0、24、48 和 96 h 每孔加入 20 μl CCK-8 溶液, 37 °C 孵育 2 h, 利用酶标仪检测 450 nm 处的吸光值, 计算细胞相对活力。

1.3 统计学处理 mRNA、胆固醇及细胞活力由 GraphPad Prism 软件分析。两组之间的差异比较用 *t* 检验, 多组之间用 One-way ANOVA 比较。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-30b-5p 水平在结直肠癌组织、血液及细胞中降低 与患者的癌旁正常结肠组织相比, 结直肠癌组织中的 miR-30b-5p 表达水平显著降低(*P* < 0.001), 见图 1A; 结直肠癌患者血清中的 miR-30b-5p 水平明显低于正常人血清中的 miR-30b-5p 含量, 见图 1B; 结直肠癌细胞 Caco-2、HT-29 及 HCT-116 中的 miR-30b-5p 表达量显著低于正常结肠细胞系 NCM460 中的表达量(*P* < 0.05), 见图 1C。以上结果表明 miR-30b-5p 可能是结直肠癌的诊断标志物。

2.2 miR-30b-5p 抑制结直肠癌细胞的增殖 在 HT-29 细胞中转入 inhibitors control (对照组) 或 miR-30b-5p inhibitors (实验组), HT-29 细胞在 0 和 24 h 的细胞活性差异无统计学意义; 对照组和实验组细胞在 48、72 和 96 h 的细胞活力见图 2A, miR-30b-5p inhibitor 增加 HT-29 细胞 48、72 和 96 h 的增殖能力, 差异有统计学意义(*F* = 7.75, *P* < 0.05)。相反, 在 HCT-116 细胞中转入 mimics control (对照组) 或 miR-30b-5p mimics (实验组), 0 和 24 h 细胞活力差异无统计学意义; 对照组和实验组细胞在 48、72 和 96 h 的活力见图 2B, miR-30b-5p mimics 抑

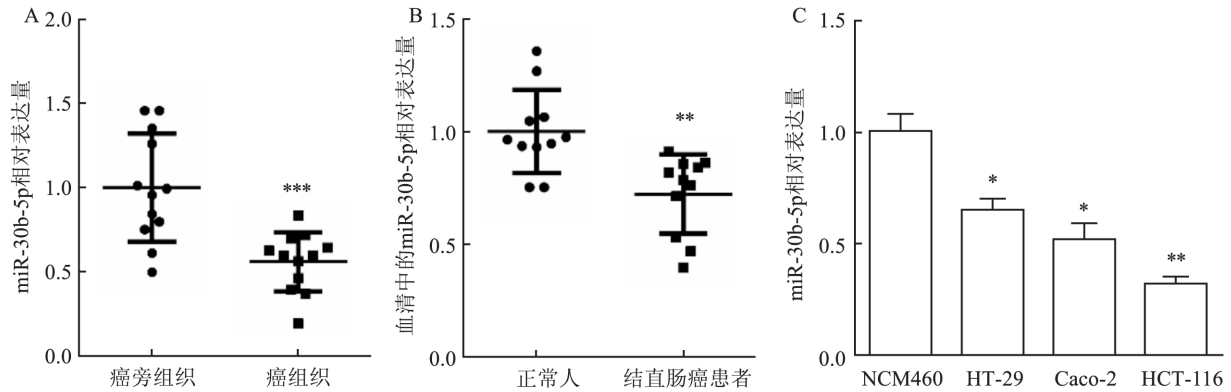


图1 miR-30b-5p在结直肠癌组织、血清及细胞中的表达情况

A: 癌及癌旁组织中 miR-30b-5p 相对表达量; 与癌旁组织比较: *** $P < 0.001$; B: 正常人及结直肠癌患者血清中的 miR-30b-5p 表达量; 与正常人比较: ** $P < 0.01$; C: 结直肠及结直肠癌细胞中的 miR-30b-5p 相对表达量; 与 NCM460 细胞比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

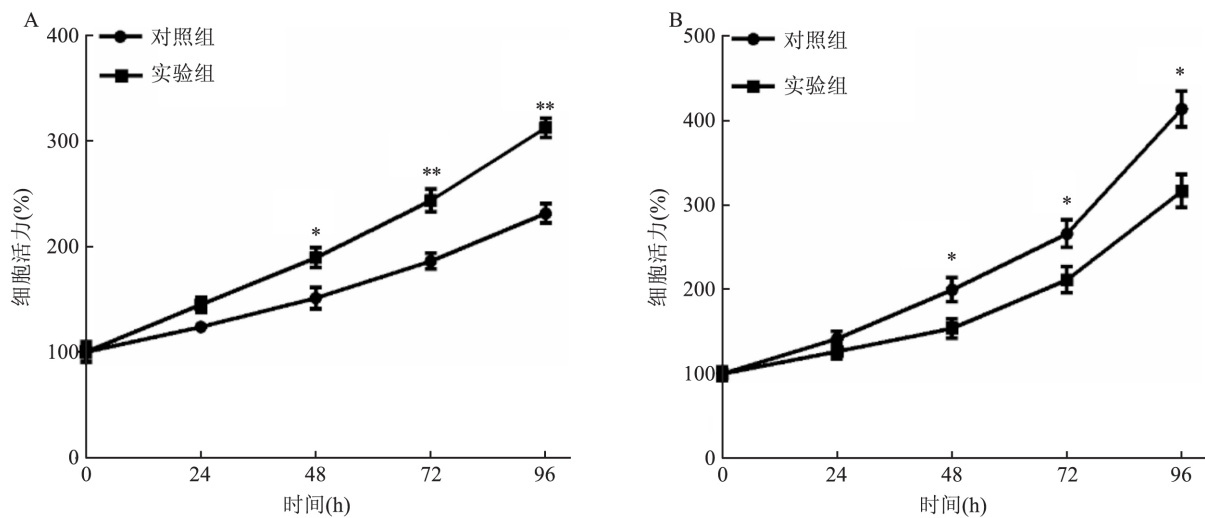


图2 miR-30b-5p对结直肠癌细胞增殖的影响

A: HT-29 细胞转染 inhibitors control (对照组) 或 miR-30b-5p inhibitors (实验组) 的细胞活力曲线图; B: HCT-116 细胞转染 mimics control (对照组) 或 miR-30b-5p mimics (实验组) 的细胞活力曲线图; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

制 HCT-116 细胞 48、72 和 96 h 的增殖能力, 差异有统计学意义 ($F = 14.81$, $P < 0.05$)。这些结果说明 miR-30b-5p 在结直肠癌中起着抑癌作用。

2.3 miR-30b-5p 抑制结直肠癌细胞胆固醇含量

在 HT-29 细胞中转入 inhibitors control (对照组) 或 miR-30b-5p inhibitors (实验组), 实验组的胆固醇水平显著高于对照组 ($P < 0.01$), 见图 3A; 相反, 在 HCT-116 细胞中转入 mimics control (对照组) 或 miR-30b-5p mimics (实验组), 实验组的胆固醇含量显著低于对照组 ($P < 0.01$), 见图 3B。

2.4 miR-30b-5p 抑制结直肠癌细胞 LDLR 的表达

图 4A 显示 LDLR 的 UTR 区域能与 miR-30b-5p 结合; 在 HT-29 细胞中转入 inhibitors control (对照组) 或 miR-30b-5p inhibitors (实验组), 对照组和实验组的 LDLR 的 mRNA 相对表达值分别是 ($1.00 \pm$

0.052)、(2.88 ± 0.19), 实验组的 LDLR 的 mRNA 和蛋白表达升高 (图 4B); 相反, 在 HCT-116 细胞中转入 mimics control (对照组) 或 miR-30b-5p mimics (实验组), 对照组和实验组的 LDLR 的 mRNA 分别是 (1.00 ± 0.032)、(0.45 ± 0.043), 实验组的 mRNA 和蛋白表达被抑制 (图 4C), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.5 敲低 LDLR 抑制 miR-30b-5p 沉默的 HT-29

细胞中胆固醇含量和细胞增殖 在转入 miR-30b-5p inhibitor 的 HT-29 细胞中进一步转染 siRNA 阴性对照 (对照组) 和 siLDLR (实验组) 后, 实验组胆固醇含量较对照组明显减少 ($P < 0.01$), 见图 5A; 对照组和实验组细胞增殖在 24 h 差异无统计学意义, 在 48、72、96 h 的细胞数量分别是 (183.8 ± 7.2)、(156.1 ± 6.2)、(230.2 ± 8.9)、(184.2 ± 7.1),

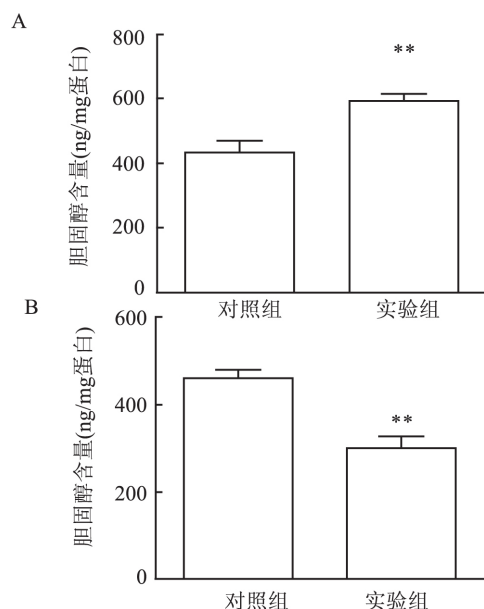


图3 miR-30b-5p 调节结直肠癌细胞胆固醇水平

A: HT-29 细胞转染 inhibitors control(对照组) 或 miR-30b-5p inhibitors(实验组) 的胆固醇含量柱状图; B: HCT-116 细胞转染 mimics control(对照组) 或 miR-30b-5p mimics(实验组) 的胆固醇含量柱状图; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

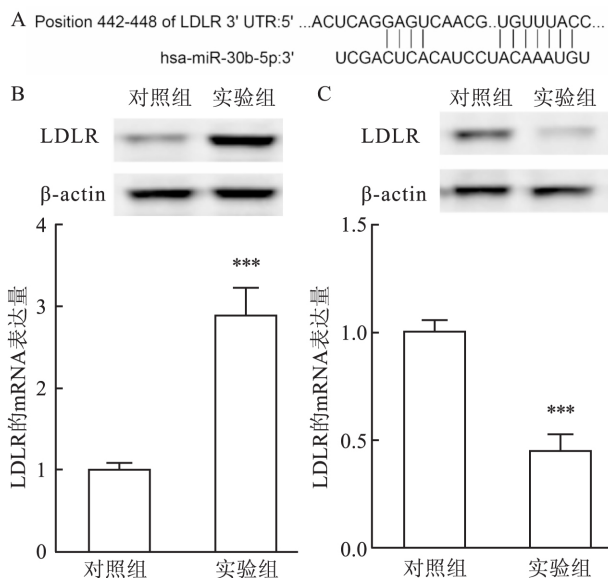


图4 miR-30b-5p 负调控 LDLR 的表达

A: miR-30b-5p 结合 LDLR 的 3' UTR 区的示意图; B: HT-29 细胞转染 inhibitors control(对照组) 或 miR-30b-5p inhibitors(实验组) 的 LDLR 的 mRNA 和蛋白表达; 与对照组比较: *** $P < 0.001$; C: HCT-116 细胞转染 mimics control(对照组) 或 miR-30b-5p mimics(实验组) 的 LDLR 的 mRNA 和蛋白表达; 与对照组比较: *** $P < 0.001$

(296.4 ± 10.4)、(221.3 ± 6.2), LDLR 敲低的细胞增殖能力被抑制, 见图 5B。结果显示 miR-30b-5p 通过负调控 LDLR 表达抑制胆固醇合成和结直肠癌细胞增殖, 差异有统计学意义 ($F = 8.95$ $P < 0.05$)。

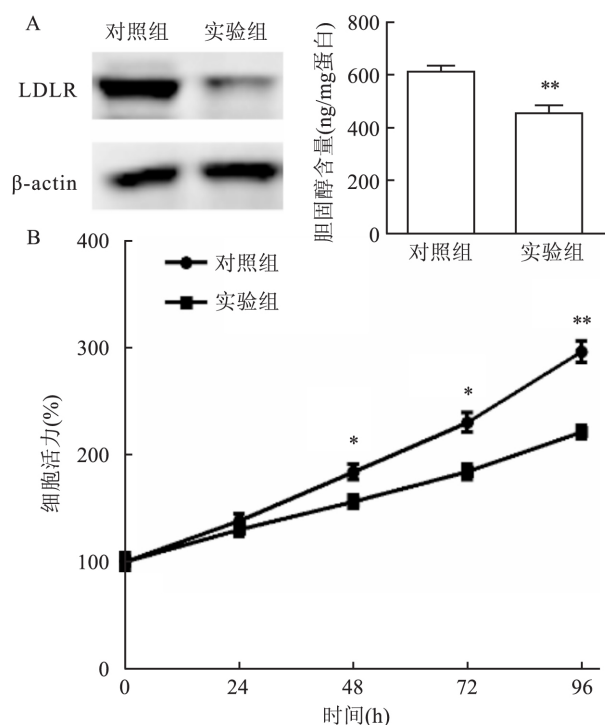


图5 敲低 LDLR 对 HT-29 细胞的胆固醇和细胞增殖的影响

A: LDLR 蛋白表达及胆固醇含量柱状图; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; B: 对照组和实验组的细胞活力曲线图; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

microRNA 是一种长度约 22 个核苷酸的不编码蛋白的短 RNA, 通过转录后水平靶向抑制基因的表达。在很长一段时间里, microRNA 被认为是细胞中的垃圾 RNA, 但是近年来它的功能及作用受到越来越多的关注, 研究^[8-9]显示 microRNA 在各种疾病中起到很重要的作用, 其中最被人熟知的就是癌症, 包括结直肠癌。例如, microRNA-184 可通过下调 C-MYC 和 BCL-2 抑制结直肠癌细胞增殖和促进细胞凋亡^[10]。也有研究^[11]显示 microRNA-27a 通过靶向抑制 SFRP1 促进结直肠癌的增殖和侵袭。本研究显示, miR-30b-5p 在结直肠癌组织中表达显著降低, 同时在结肠癌患者血清中的含量也减少, 与正常结肠上皮细胞相比, miR-30b-5p 在结直肠癌细胞中表达下调, 提示 miR-30b-5p 可能在结直肠癌中扮演着抑癌的作用。通过进一步在结直肠癌细胞 HT-29 中转入 miR-30b-5p 的 inhibitor, 发现细胞增殖能力显著增强, 在 HCT-116 细胞中转入 miR-30b-5p 的 mimic, 细胞增殖能力降低。这些结果表明 miR-30b-5p 在结直肠癌中起着抑癌作用, 同时也提示它可作为结直肠癌的一个潜在诊断指标。

胆固醇是细胞膜的重要组成部分, 对维持膜的

完整性和流动性很重要。作为一种脂质分子,胆固醇是合成类固醇激素和胆酸的前体。近年来,胆固醇在肿瘤中的作用被广泛报道。研究^[12]显示,胆固醇代谢异常可引起肝癌发生;此外,胆固醇在结直肠癌发生发展过程中也起着重要作用。在小鼠饮食中添加胆固醇,可促进 AOM 诱发的结直肠癌进程,其机制是通过激活 NLRP3 炎症体^[13]。在本研究中,转入 miR-30b-5p 的 inhibitor 后结直肠癌细胞胆固醇含量升高,相反,在 HCT-116 细胞中转入 miR-30b-5p 的 mimic 后胆固醇水平降低,提示 miR-30b-5p 抑制结直肠癌细胞胆固醇的水平。此外,miR-30b-5p 沉默后 LDLR 表达上调,而转入 miR-30b-5p 的 mimic 可抑制 LDLR 表达,由于 LDLR 是胆固醇合成通路中的重要酶,miR-30b-5p 抑制胆固醇水平可能通过下调 LDLR。由于胆固醇合成增多可促进细胞增殖,而 miR-30b-5p 敲低是否是通过增加胆固醇合成促进细胞增殖。为研究此问题,在转入 miR-30b-5p inhibitor 的结直肠癌细胞中进一步敲低胆固醇合成的关键酶 LDLR,发现不仅胆固醇含量显著减少,细胞增殖速率也明显降低,这些结果表明 miR-30b-5p 沉默可通过上调 LDLR 的表达增加细胞胆固醇合成,从而促进结直肠癌细胞增殖。

本研究阐明了 miR-30b-5p 在结直肠癌中的作用。miR-30b-5p 的表达在结直肠癌组织、外周血及结直肠癌细胞中降低,通过沉默和过表达方法发现 miR-30b-5p 在结直肠癌细胞中起着抑癌作用。miR-30b-5p 敲低后,LDLR 表达和胆固醇含量都增加,而转入 miR-30b-5p 的 mimic 后,两者都下降;重要的是,在 miR-30b-5p 敲低的结直肠癌细胞中进一步沉默 LDLR 可显著抑制细胞中胆固醇含量和增殖能力。这些结果提示 miR-30b-5p 是结直肠癌的重要抑癌 microRNA,可作为结直肠癌潜在的诊断标志物。

参考文献

[1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J].

CA Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5–29.

- [2] DA Silva F C, Wernhoff P, Dominguez-Barrera C, et al. Update on hereditary colorectal cancer [J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(9): 4399–405.
- [3] Liu W Y, Yang Z, Sun Q, et al. miR-377-3p drives malignancy characteristics via upregulating GSK-3 β expression and activating NF- κ B pathway in hCRC cells [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(2): 2124–34.
- [4] Flum M, Kleemann M, Schneider H, et al. miR-217-5p induces apoptosis by directly targeting PRKCI, BAG3, ITGAV and MAPK1 in colorectal cancer cells [J]. *J Cell Commun Signal*, 2018, 12(2): 451–66.
- [5] Jacobs R J, Voorneveld P W, Kodach L L, et al. Cholesterol metabolism and colorectal cancers [J]. *Curr Opin Pharmacol* 2012, 12(6): 690–5.
- [6] Gallagher E J, Zelenko Z, Neel B A, et al. Elevated tumor LDLR expression accelerates LDL cholesterol-mediated breast cancer growth in mouse models of hyperlipidemia [J]. *Oncogene*, 2017, 36(46): 6462–71.
- [7] Tanaka T, Oyama T, Sugie S, et al. Different susceptibilities between apoe- and ldlr-deficient mice to inflammation-associated colorectal carcinogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(11): 1806.
- [8] Hur K. MicroRNAs: promising biomarkers for diagnosis and therapeutic targets in human colorectal cancer metastasis [J]. *BMB reports* 2015, 48(4): 217–22.
- [9] 陈昌裕, 余昌俊, 张敏, 等. 大肠癌组织 miRNA205 表达及临床意义分析 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(7): 1016–8.
- [10] Wang Y B, Zhao X H, Li G, et al. MicroRNA-184 inhibits proliferation and promotes apoptosis of human colon cancer SW480 and HCT116 cells by downregulating C-MYC and BCL-2 [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(2): 1702–15.
- [11] Ba S, Xuan Y, Long Z W, et al. MicroRNA-27a promotes the proliferation and invasiveness of colon cancer cells by targeting SFRP1 through the wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem* 2017, 42(5): 1920–33.
- [12] Bakiri L, Hamacher R, Grana O, et al. Liver carcinogenesis by FOS-dependent inflammation and cholesterol dysregulation [J]. *J Exp Med* 2017, 214(5): 1387–409.
- [13] Du Q, Wang Q, Fan H, et al. Dietary cholesterol promotes AOM-induced colorectal cancer through activating the NLRP3 inflammatory [J]. *Biochem Pharmacol* 2016, 105: 42–54.

miR-30b-5p suppresses cholesterol synthesis and colorectal cancer cell proliferation

Zhang Yazhen, He Guisheng, Wu Xiaoming et al

(Dept of Oncological Surgery, The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570311)

Abstract Objective To investigate the role and involved mechanisms of miR-30b-5p in colorectal cancer. **Methods** RNA was isolated from the colorectal cancer and adjacent tissues, the serum of patients and healthy people.

网络出版时间: 2018-6-8 10:04 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180607.1131.015.html>

人参皂苷 Re 对防龋疫苗 rPac 免疫效应的影响

金洁 孙成 李午丽

摘要 目的 研究人参皂苷 Re 作为防龋亚单位疫苗 rPac 佐剂的免疫保护效应。方法 40 只 BALB/c 小鼠随机分为 4 组: 防龋疫苗(rPac)组、人参皂苷 Re(Re)组、Re+rPac 组和生理盐水(NS)组,分别用 rPac、Re、Re+rPac、生理盐水经鼻黏膜免疫。2 周后加强免疫 1 次。用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清和唾液中特异性抗体的水平。脾细胞刺激实验检测细胞因子分泌水平。将 24 只定植了变形链球菌的 Wistar 大鼠随机分为 4 组: rPac 组、Re 组、Re+rPac 组和 NS 组,分别用 rPac、Re、Re+rPac、生理盐水经鼻黏膜免疫。2 周后加强免疫 1 次。龋齿记分评价防龋保护效能。结果 Re+rPac 组血清特异性抗 PAc IgG、IgG1、IgG2a 水平及唾液中特异性抗 PAc IgA 抗体水平均明显高于其他组($P < 0.01$)。Re+rPac 组较其他组脾淋巴细胞白细胞介素 4 和 γ 干扰素表达增强($P < 0.05$)。大鼠龋齿保护实验显示 Re+rPac 组定菌鼠釉质龋(E)、牙本质浅龋(Ds)和牙本质中龋(Dm)均显著低于其他组($P < 0.05$)。结论 Re 作为防龋亚单位疫苗 rPac 的佐剂可提高防龋疫苗的血清和唾液中特异性抗体的水平及防龋保护效能,具有作为防龋疫苗 rPac 免疫佐剂的可行性。

关键词 人参皂苷 Re; 龋病; 亚单位疫苗 rPac; Th1/Th2

中图分类号 R 781.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)07-1062-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.07.015

龋病是人类最常见的细菌感染性疾病之一。变异链球菌(*S. mutans*)是龋病的主要致病菌,其表面蛋白抗原 PAc 是主要的毒力因子,参与介导细菌对牙面的粘附,抗 PAc 特异性抗体能有效抑制 *S. mutans* 的致龋能力。研究^[1]显示,用 PAc 分子中特定核酸序列制备的防龋亚单位疫苗 rPac 经黏膜途径免疫机体可以诱导机体产生特异性抗 PAc 抗体,从而达到防龋效果,但是 rPac 的免疫效能还有待于提高,需要与佐剂联合应用以增强免疫效果。目前常用的佐剂如霍乱毒素 B 亚单位^[2]、脂质体或 Adda-Vax^[3-4]。由于这些佐剂存在具有一定的毒副作用、制备过程繁琐或黏膜佐剂活性低等缺点,阻碍 rPac 安全方便的应用。人参皂苷 Re 是人参中含量较多的活性成分之一。近年来研究^[5]显示 Re 具有免疫调节功能,能够有效地提高抗原的免疫原性,从而增强机体的细胞和体液免疫应答,具有佐剂功能,已被用于多种疫苗研究。目前,尚未见 Re 应用于防龋疫苗研究的报道。该实验研究拟在鼻腔滴注免疫途

2018-03-24 接收

基金项目: 安徽医科大学博士科研资助基金(编号: XJ201306),安徽省自然科学基金(编号: 1508085SQH222)

作者单位: 安徽医科大学附属口腔医院牙体牙髓科,合肥 230032

作者简介: 金洁,女,副主任医师,责任作者, E-mail: jinjah@163.com

miR-30b-5p expression was determined by qRT-PCR assay. miR-30b-5p inhibitors were transfected into HT-29 cells. miR-30b-5p mimics were transfected into HCT-116 cells. Cell viability was measured by CCK-8 assay. Cholesteryl Ester Quantitation Kit was used to detect the cholesterol level in indicated cells. qRT-PCR was performed to determine LDLR expression. Western blot was used to detect the protein abundance of LDLR. LDLR was further knocked down using siRNA assay in HT-29 cells transfected with miR-30b-5p inhibitors. LDLR expression, cholesterol level and cell proliferation were detected. **Results** miR-30b-5p level was decreased in the tumor tissues and serum of colorectal cancer patients. It was also down-regulated in Caco-2, HT-29 and HCT-116 colorectal cancer cells compared with NCM460 cells. miR-30b-5p inhibitors led to enhanced the proliferation, cholesterol abundance and LDLR expression of HT-29 cells. miR-30b-5p mimics suppressed the viability, cholesterol level and LDLR expression of HCT-116 cells. In addition, knockdown of LDLR decreased the cholesterol abundance and suppressed the viability of HT-29 cells transfected with miR-30b-5p inhibitors. **Conclusion** miR-30b-5p exerts as a tumor suppressive microRNA in colorectal cancers. It inhibits the proliferation of colorectal cancer cells through inhibiting LDLR expression and cholesterol synthesis.

Key words colorectal cancer; miR-30b-5p; LDLR; cholesterol; proliferation