

# miR-139 在结直肠癌组织中的表达及其对癌细胞生长的影响

龙腾云<sup>1</sup> 余昌俊<sup>1</sup> 张 敏<sup>2</sup> 余康敏<sup>1</sup> 朱正杰<sup>1</sup> 欧阳欢<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨 miR-139 在结直肠癌组织中的表达以及上调 miR-139 表达对结直肠癌细胞生长的影响。方法 应用实时定量 PCR 法检测 miR-139 在 20 例大肠癌组织及癌旁组织中的表达, HT29 细胞转染 miR-139 mimics 后, 通过 MTT、Softagar 方法检测 miR-139 对大肠癌细胞增殖的影响; Transwell 实验检测 miR-139 对大肠癌细胞迁移和侵袭的影响。结果 miR-139 在结直肠癌组织中表达量明显低于癌旁组织 ( $P < 0.01$ )。转染 miR-139 mimics 的 HT29 MTT 实验中第 1 天至第 5 天的吸光度 (OD) 值与对照组相比显著减低。Softagar 实验中计数对照组每个视野 ( $41 \pm 5$ ), miR-139 每个视野 ( $72 \pm 5$ ), 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。Transwell 小室实验显示, 与阴性对照相比, 转染 miR-139 mimics 后, HT29 细胞的迁移及侵袭能力明显下降。结论 miR-139 在结直肠癌组织中低表达, miR-139 表达上调可抑制 HT29 生长、迁移及侵袭能力, miR-139 有潜在抑癌作用。

**关键词** microRNA; miR-139; 结直肠肿瘤; 肿瘤抑制

**中图分类号** R 735.34

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2015)09-1258-04

结直肠癌是最常诊断的癌症之一, 每年超过 120 万新发癌症病例, 造成超过 60 万人死亡<sup>[1]</sup>。虽然加强了对大肠癌的早期诊断和治疗, 但近 50% 患者来院就诊时已发生远处转移; 术前未发生转移者, 术后仍有超过 1/3 的患者肿瘤复发, 迫切需要发现新的方法应用于肿瘤的早期诊断和治疗。microRNA 调控肿瘤的发生和转移, miR-21<sup>[2]</sup>、miR-451<sup>[3]</sup> 和 miR-31<sup>[4]</sup> 等在结直肠癌形成中可能发挥调控作

用。该研究旨在探讨 miR-139 在结直肠癌组织中的表达及其临床意义, 并观察上调 miR-139 表达后对癌细胞株生长的影响, 初步研究 miRNA-139 对结直肠癌细胞的抑癌作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 标本** 20 例新鲜大肠癌组织及癌远端 5 cm 正常大肠黏膜组织取自安徽医科大学第一附属医院, 收集标本在 2013 年 4 月 ~ 6 月完成, 取材后迅速放入液氮冷冻, 30 min 置于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存; 20 例患者术前未接受任何化疗和放疗, 其中男 13 例, 女 7 例; 年龄 39 ~ 83 ( $61.53 \pm 12.73$ ) 岁。

**1.1.2 细胞株** 大肠癌细胞株 HT29 来源于中国科学技术大学生命科学院朱涛教授实验室。

**1.1.3 主要试剂** 台式高速冷冻离心机 (美国艾本德 Eppendorf 公司); 分光光度计 (日本岛津公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (美国安捷伦 Stratagene 公司); 所用引物及 U6 引物均购自华大科技有限公司; 转染试剂 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司; 化学合成的成熟 miRNAs (miRNA mimics) 购自上海吉玛 (Genepharma) 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** HT29 细胞株用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养, 均孵育在  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的细胞培养箱中进行常规培养。每 1 ~ 2 d 更换新鲜培养基, 当细胞融合度达到 80% ~ 90% 时进行传代。

**1.2.2 RNA 的提取与 RT-PCR** 取大肠癌组织及癌旁组织各 50 mg, 高速匀浆, 加入 600  $\mu\text{l}$  Lysis/Binding Buffer, 按照说明书提示提取 miRNA, 用紫外分光光度计测定提取的 miRNA 浓度。将 miRNA 置

2015-05-19 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31201022)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学第一附属医院普通外科, 合肥 230022

<sup>2</sup> 中国科学技术大学生命科学院, 合肥 230026

作者简介: 龙腾云, 男, 硕士研究生;

余昌俊, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yuchangjun321@163.com

and IL-1 $\beta$  increased gradually and lung tissue inflammation increased significantly. **Conclusion** RSV combined with Kp infection has synergistic effects and aggravates pulmonary inflammation. RSV combined with Kp infection can induce pulmonary defence cells release cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  by TLR4-NF- $\kappa$ B signal transduction pathway.

**Key words** respiratory syncytial virus; Klebsiella pneumonia; pneumonia; TLR4; NF- $\kappa$ B; inflammatory cytokines

于冰盒中,加入 miRNA 的量为 100 ng,  $5 \times$  RT Buffer 4  $\mu$ l, dNTP 2  $\mu$ l, U6 RT Primer 1  $\mu$ l, miRNA RT Primer 1  $\mu$ l, RTase 0.5  $\mu$ l, RNase Inhibitor 0.5  $\mu$ l, 加 DEPC 水至 20  $\mu$ l。在反应条件为 42  $^{\circ}$ C 1 h, 70  $^{\circ}$ C 10 min 下,将混合物置于 PCR 自动系列化分析仪。逆转录生成 cDNA 稀释 50 倍取 9.4  $\mu$ l,加 miRNA205 Real Time Primer Mix 0.6  $\mu$ l, Reaction Buffer 10  $\mu$ l。反应条件设为 95  $^{\circ}$ C 10 min 热启动, 95  $^{\circ}$ C 10 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环后 95  $^{\circ}$ C 1 min, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 95  $^{\circ}$ C 30 s, 用实时荧光定量 PCR 仪对反应管进行荧光信号检测。

**1.2.3 细胞转染** 6 孔板中的细胞融合度达到约 60%, 开始进行实验组(miR-139 mimics) 和对照组的转染。RNA 采用 Lipofectamine 2000 转染, 转染 24 h 后进行功能试验操作。

**1.2.4 MTT 实验** 以 2 000 个细胞/孔接种于 5 块 96 孔培养板, 每孔培养液总量 200  $\mu$ l, 放置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中进行常规培养, 1 d 检测 1 块板, 每孔加入 2  $\mu$ g/ml 的 MTT 液 50  $\mu$ l, 培养箱中继续培养 2 h; 将孔内的培养液倒出, 每孔加入 150  $\mu$ l DMSO 液, 在微孔板振荡器上振荡 10 min, 使结晶物溶解; 第 2 天将剩余板每板加入 100  $\mu$ l 培养液。酶标仪检测各孔吸光度(optical density, OD) 值(波长 570 nm)。

**1.2.5 软琼脂克隆形成实验** 将 HT29 细胞培养至约 60% 融合度时, 细胞中转入 miR-139 mimics 或对照组 mimics, 培养箱中培养 24 h, 胰酶消化打散成单细胞, 3 000 r/min 离心 3 min, 计数并调整细胞密度到  $5 \times 10^5$  /ml, 在 1.5 ml 的 0.75% 软琼脂中加入 100  $\mu$ l, 加入一个 6 孔板中, 在恒温培养箱中孵育约 10 d, 观察软琼脂中的细胞克隆形成的能力并拍照计数。

**1.2.6 Transwell 迁移和侵袭实验** Transwell 迁移实验: 在 6 孔板中, 将 HT29 细胞培养至 60% 的融合度, 更换新鲜含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液; 加入 miR-139 mimics 或对照 mimics, 放入培养箱培养 2 d, 用胰酶消化细胞、计数, 3 000 r/min 离心 3 min; 用无血清培养液洗涤细胞 1 次, 将无血清培养液弃去; 用含 0.2% 牛血清白蛋白的无血清 DMEM 培养液重悬细胞, 调整细胞密度为  $10^6$  /ml。在 24 孔板中, 每孔加入完全 DMEM 培养基 600  $\mu$ l, 小心将 Transwell 小室放在培养基上, 加入转染不同 RNA 的细胞各 100  $\mu$ l。将 24 孔板放入培养箱中培养 2 d。弃去 Transwell 小室中的培养基, 用 PBS 润洗 2 遍,

浓度为 90% 的乙醇固定 Transwell 小室微孔膜 30 min, 室温晾干 Transwell 小室, 用 0.1% 结晶紫染色 10 min, 后用 PBS 清洗 3 遍, 用棉签擦去 Transwell 小室底部微孔膜上层残存的细胞, PBS 清洗小室, 每孔选取 5 个视野于显微镜下拍照。

Transwell 侵袭实验: 在 6 孔板中, 将 HT29 细胞培养至 60% 的融合度, 更换新鲜含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液; 加入 miR-139 mimics 或对照 mimics, 放入培养箱培养 2 d, 用胰酶消化细胞、计数, 3 000 r/min 离心 3 min, 用无血清培养液洗涤细胞 1 次, 将无血清培养液弃去; 用含 0.2% 牛血清白蛋白的无血清 DMEM 培养液重悬细胞, 调整细胞密度为  $10^6$  /ml, 前 1 d 准备 24 孔板, 并将 60  $\mu$ l 含有 10% Matrigel 的 DMEM 无血清培养液均匀的铺在每个 Transwell 小室里, 24 孔板放置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱过夜; 实验前置于 37  $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 5 h, 在每个小室中加入转染不同 RNA 的细胞各 100  $\mu$ l。将 24 孔板放入培养箱中培养 2 d。弃去 Transwell 小室中的培养基, 用 PBS 润洗 2 遍, 浓度为 90% 的乙醇固定 Transwell 小室微孔膜 30 min, 室温晾干 Transwell 小室; 用 0.1% 结晶紫染色 10 min, 后用 PBS 清洗 3 遍; 用棉签擦去 Transwell 小室底部微孔膜上层残存的细胞, PBS 清洗小室; 每孔选取 5 个视野于显微镜下拍照。

**1.3 统计学处理** 运用 GraphPad Prism 软件进行统计分析, 实验结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示; 利用  $t$  检验分析各组数据的统计学差异。

## 2 结果

**2.1 miR-139 在结直肠癌中表达下调** 通过 miR-139 和内参 U6RNA 的扩增曲线, 计算每组大肠癌和癌旁组织的 Ct 值。大肠癌组织中 miR-139 表达水平低于对应的癌旁组织, 差异有统计学意义( $t = 4.41$ ,  $P < 0.01$ ), 见图 1。

### 2.2 miR-139 抑制 HT29 细胞的增殖和恶性程度

MTT 实验结果, 第 1 天至第 5 天, OD 值显著变化, 并且随着时间的推移, 有扩大趋势, 表明转染 miR-139 mimics 的 HT29 细胞增殖明显受限。见图 2。Softagar 实验中, HT29 对照细胞能在软琼脂中形成数量多且体积较大的克隆, 而转入 miR-139 后, HT29 形成克隆的能力被削弱, 仅形成数量较少且体积也很小的克隆; 计数差异有统计学意义( $t = 8.79$ ,  $P < 0.01$ ); 表明 miR-139 抑制大肠癌细胞非锚定生长的能力。见图 3。

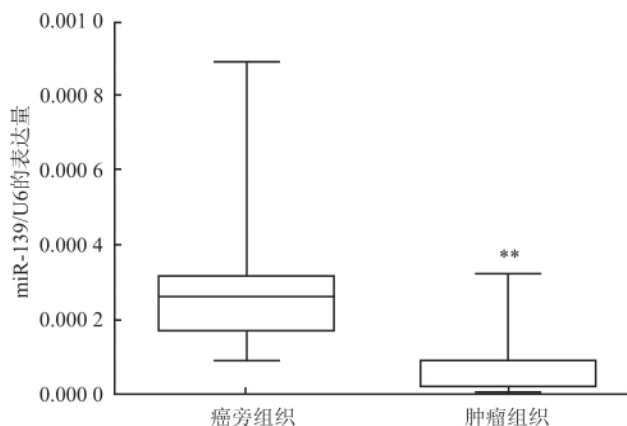


图1 比较 miR-139 在大肠癌组织中和对应癌旁组织中的表达  
与癌旁组织比较: \*\*  $P < 0.01$

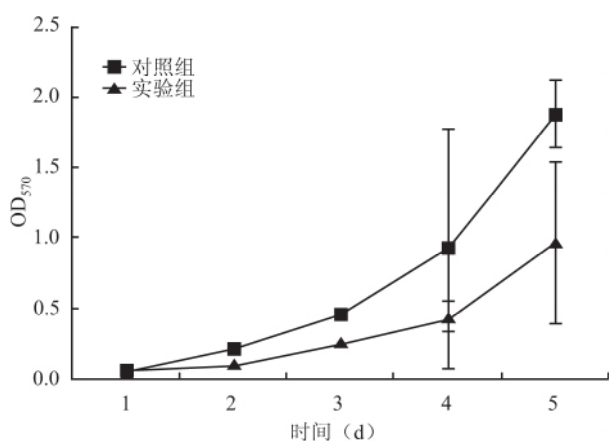


图2 miR-139 的表达量上调后对 HT29 细胞体外生长的影响

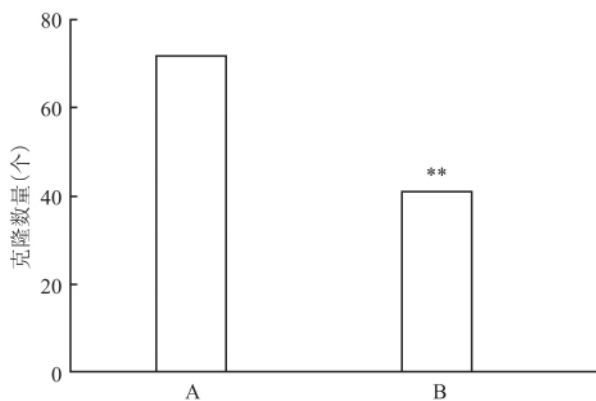
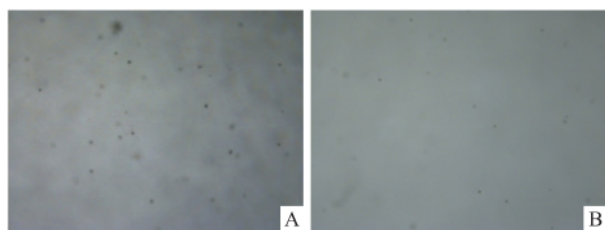


图3 miR-139 使 HT29 细胞锚定非依赖生长能力下降  
A: 对照组; B: miR-139 组; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

**2.3 miR-139 抑制大肠癌细胞迁移和浸润** Transwell 实验表明, 转染 miR-139 的 HT29 细胞的迁移能力和侵袭能力均有显著的下调。见图 4。

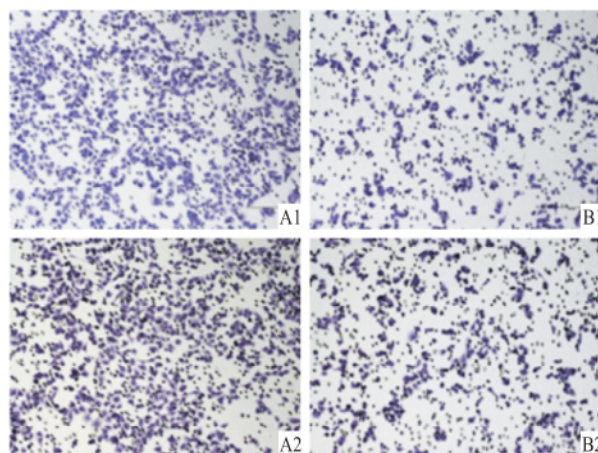


图4 miR-139 表达量上调使大肠癌细胞 HT29 迁移和浸润能力下降  $\times 10$   
A: 对照组; B: miR-139 组; 1: 迁移实验; 2: 侵袭实验

### 3 讨论

miRNA 是一种单链不编码蛋白质的内源性 RNA, 平均长度约为 22 个核苷酸, 广泛存在于真核生物细胞中<sup>[5]</sup>。成熟的 miRNAs 在转录水平后通过特异性地与靶基因 3' UTR 区结合来发挥调节作用, 可以使靶基因在 mRNA 水平的降解或抑制蛋白质翻译<sup>[6-7]</sup>。miRNAs 与多种疾病的调节有关, 人类的癌症就是其中之一<sup>[8]</sup>。miRNA 对肿瘤的诊断、治疗和预后的评估等有重要的价值。结直肠癌的发生是多种因素造成的, 基因发生异常表达是其中的一种, 同时分子生物学标志表达被认为与大肠癌的发生有关<sup>[9]</sup>。国内外一些学者<sup>[10]</sup>发现 miR-139 在不同的癌症中表达量差异以及意义都不同, 发现 miR-139 在胶质母细胞瘤、结肠癌、喉癌、头颈癌中表达量下降, 同样是表现出抑癌的作用; 然而在另外<sup>[11-12]</sup>的如肝癌、胃癌中 miR-139 表达上调, 在这些癌症中, miR-139 可能是促癌基因。在不同的肿瘤中 miRNA-139 通过不同的作用途径来发挥生物学作用, 另外通过 miRanda、TargetScanS 和 PicTar 生物信息学网站分析预测 miRNA-139 在大肠癌中可能有多条作用通路, C-Fos 可能是其中一条可能的通路。C-Fos 是一类核分裂信号效应蛋白, 对细胞的生长和侵袭有明显的调控作用, 同时还可以调节多种基因的转录。C-Fos 的表达和调控与大肠癌的发生、发

展和预后关系密切 将在下一步研究中通过 Western blot 法证实 miR-139 通过 C-Fos 通路在大肠癌中起到抑癌作用。

本研究初步证明了 miR-139 在大肠癌组织中低表达,有类似抑癌基因的作用,降低了大肠癌细胞系 HT29 的增殖、迁移和侵袭能力,为 miRNA 作为靶向肿瘤的基因治疗提供了重要的实验依据,有成为大肠癌基因治疗新靶点的潜力。

### 参考文献

- [1] Jemal A , Bray F , Center M M , et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin* 2011 61( 2) : 69 – 90.
- [2] Wu C W , Ng S S , Dong Y J , et al. Detection of miR-92a and miR-21 in stool samples as potential screening biomarkers for colorectal cancer and polyps[J]. *Gut* 2012 61( 5) : 739 – 45.
- [3] Bitarte N , Bandres E , Boni V , et al. MicroRNA-451 is involved in the self-renewal , tumorigenicity , and chemoresistance of colorectal cancer stem cells[J]. *Stem Cells* 2011 29( 11) : 1661 – 71.
- [4] Cottonham C L , Kaneko S , Xu L. miR-21 and miR-31 converge on TIAM1 to regulate migration and invasion of colon carcinoma cells[J]. *J Biol Chem* , 2010 285( 46) : 35293 – 302.
- [5] Bartel D P. MicroRNAs: genomics , biogenesis , mechanism , and function[Z]. *Cell* 2004 116( 2) : 281 – 97.
- [6] Ambros V. The functions of animal microRNAs [J]. *Nature* , 2004 , 431( 7006) : 350 – 5.
- [7] Bartel D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. *Cell* 2009 , 136( 2) : 215 – 33.
- [8] Paranjape T , Slack F J , Weidhaas J B. MicroRNAs: tools for cancer diagnostics [J]. *Gut* 2009 58( 11) : 1546 – 54.
- [9] Peeters M , Price T. Biologic therapies in the metastatic colorectal cancer treatment continuum-applying current evidence to clinical practice[J]. *Cancer Treat Rev* 2012 38( 5) : 397 – 406.
- [10] Li R Y , Chen L C , Zhang H Y , et al. MiR-139 inhibits Mcl-1 expression and potentiates TMZ-induced apoptosis in glioma [J]. *CNS Neurosci Ther* 2013 19( 7) : 477 – 83.
- [11] Bao W , Fu H J , Xie Q S , et al. HER2 interacts with CD44 to up-regulate CXCR4 via epigenetic silencing of microRNA-139 in gastric cancer cells[J]. *Gastroenterology* , 2011 141( 6) : 2076 – 87.
- [12] Wong C C , Wong C M , Tung E K , et al. The microRNA miR-139 suppresses metastasis and progression of hepatocellular carcinoma by down-regulating Rho-kinase 2 [J]. *Gastroenterology* 2011 140( 1) : 322 – 31.

## Expression of miR-139 and its role in colorectal cancer cells

Long Tengyun<sup>1</sup> , Yu Changjun<sup>1</sup> , Zhang Min<sup>2</sup> , et al

(<sup>1</sup>Dept of Gastrointestinal Surgery ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022;

<sup>2</sup>Dept of Life Sciences ,University of Science and Technology of China Hefei 230026)

**Abstract Objective** To explore the expression of miR-139 in colorectal cancer and study its role in colorectal cancer HT29 cells *in vitro*. **Methods** Real-Time PCR was used to analyze the expression of miR-139 in 20 colorectal cancer tissues and their matched adjacent tissues. HT29 cells were transfected with a miR-139 mimics , then MTT and Softagar methods were used to detect the proliferation of the cells. The migration and invasion of HT29 cells were investigated using Transwell assay. **Results** The expression of miR-139 was down-regulated in colorectal cancer tissues compared with those in adjacent tissues (  $P < 0.01$  ) . According to MTT method , from the first day to fifth day , the OD of HT29 cells transfected with miR-139 mimics significantly reduced compared with the control group. According to Softagar method , the control group counts (  $41 \pm 5$  ) each field compared with miR-139 (  $72 \pm 5$  ) each field (  $P < 0.01$  ) . According to Transwell assay , compared with the control group , transfection of miR-139 mimics inhibited the migration and invasion of HT29 cells. **Conclusion** The expression level of miR-139 is lower in colorectal cancer. Transfection of HT29 cells with a miR-139 mimics can inhibit the cell proliferation , migration and invasion *in vitro* , suggesting that miR-139 is a potent tumor suppressor.

**Key words** microRNA; miR-139; colorectal carcinoma; tumour suppressor