

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¹,余昌俊¹,张敏²,余康敏¹,朱正杰¹,欧阳欢¹

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降低。Softagar 实验中计数对照组每个视野 (41 ± 5), miR-139 每个视野 (72 ± 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^[1]。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^[2]、miR-451^[3] 和 miR-31^[4] 等在结直肠癌形成中可能发挥调控作

2015-05-19 收稿

基金项目:国家自然科学基金(编号:31201022)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院普通外科,合肥 230022

²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 β 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- α and IL-1 β by TLR4-NF- κ B signal transduction pathway.

Key words respiratory syncytial virus; Klebsiella pneumonia; pneumonia; TLR4; NF- κ B; inflammatory cytokines

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 °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 ± 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 °C、5% CO₂ 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 μ 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

于冰盒中 加入 miRNA 的量为 100 ng ,5 × RT Buffer 4 μl ,dNTP 2 μl ,U6 RT Primer 1 μl ,miRNA RT Primer 1 μl ,RTase 0.5 μl ,RNase Inhibitor 0.5 μl ,加 DEPC 水至 20 μl 。在反应条件为 42 ℃ 1 h ,70 ℃ 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 μl ,加 miRNA205 Real Time Primer Mix 0.6 μl ,Reaction Buffer 10 μl 。反应条件设为 95 ℃ 10 min 热启动 95 ℃ 10 s ,60 ℃ 30 s ,40 个循环后 95 ℃ 1 min ,60 ℃ 30 s ,95 ℃ 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 μl ,放置于 37 ℃、5% CO₂ 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 μg/ml 的 MTT 液 50 μl ,培养箱中继续培养 2 h ;将孔内的培养液倒出 ,每孔加入 150 μl 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 μl 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 5×10^5 /ml ,在 1.5 ml 的 0.75% 软琼脂中加入 100 μl ,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 μl ,小心将 Transwell 小室放在培养基上 ,加入转染不同 RNA 的细胞各 100 μl 。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 μl 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 ℃ 冰箱过夜; 实验前置于 37 ℃ 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 μl 。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 。

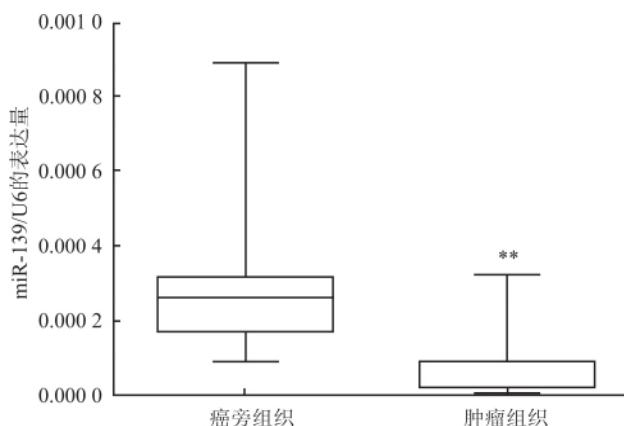


图1 比较 miR-139 在大肠癌组织中和对应癌旁组织中的表达
与癌旁组织比较: ** $P < 0.01$

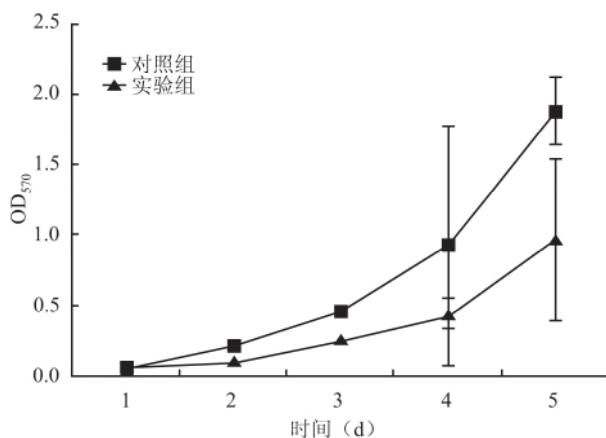


图2 miR-139 的表达量上调后对 HT29 细胞体外生长的影响

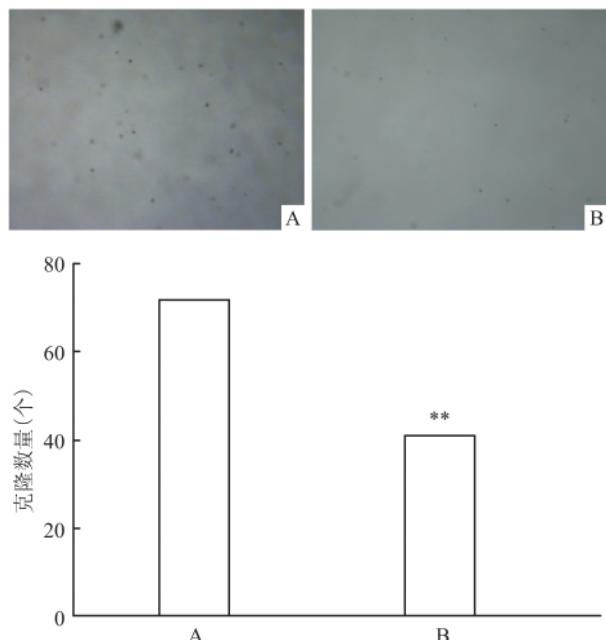


图3 miR-139 使 HT29 细胞锚定非依赖生长能力下降
A: 对照组; B: miR-139 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

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。

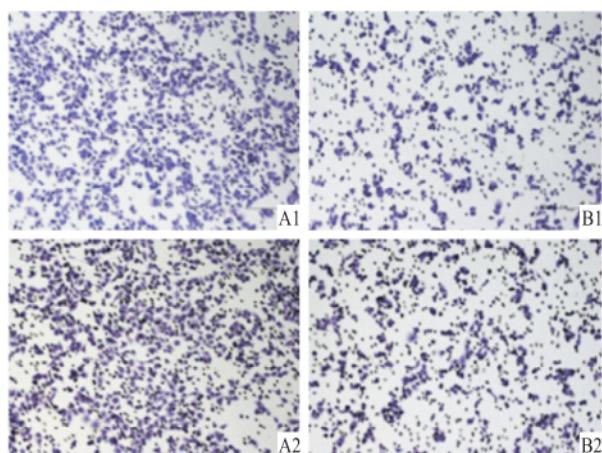


图4 miR-139 表达量上调使大肠癌细胞 HT29 迁移
和浸润能力下降 $\times 10$
A: 对照组; B: miR-139 组; 1: 迁移实验; 2: 侵袭实验

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^[5]。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^[6-7]。miRNAs 与多种疾病的调节有关, 人类的癌症就是其中之一^[8]。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^[9]。国内外一些学者^[10]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^[11-12]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 Tengyun¹, Yu Changjun¹, Zhang Min², et al

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

²Dept 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 ± 5) each field compared with miR-139 (72 ± 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