



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.12.015
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.12.015
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(12):1716-1721.

· 基础研究 ·

microRNA-25 高表达与直肠癌细胞的侵袭和迁移的关系

徐晓慧, 孙欣, 刘娜, 矫健, 李秋阳, 刘京平, 林方才

(首都医科大学电力教学医院 普通外科, 北京 100073)

摘要

目的: 探讨 microRNA-25 (miR-25) 在直肠癌细胞中的表达及作用。

方法: 检测多种不同直肠癌细胞中 miR-25 的表达, 并检测直肠癌细胞转染 miR-25 前体 (pre-miR-25) 上调 miR-25 的表达或转染 miR-25 抑制剂 (anti-miR-25) 下调 miR-25 的表达后生物学行为的变化。

结果: 与正常直肠黏膜组织比较, 不同的直肠癌细胞中 miR-25 的表达均不同程度的明显升高 (均 $P < 0.05$)。在 miR-25 表达水平相对较低的直肠癌 HR-834 细胞中转染 pre-miR-25, 在 miR-25 高表达的直肠癌 SW-837 细胞中转染 anti-miR-25 后, 两种细胞的增殖、细胞周期、凋亡无明显改变 (均 $P > 0.05$), 但侵袭及迁移能力在 HR-834 细胞的明显增强, SW-837 细胞减弱 (均 $P < 0.05$)。

结论: miR-25 在直肠癌细胞中的表达升高, 且其升高程度与细胞的侵袭和迁移能力密切相关。

关键词

直肠肿瘤; 微 RNAs; 肿瘤浸润

中图分类号: R735.3

Relations of high microRNA-25 expression with migration and invasion of rectal carcinoma cells

XU Xiaohui, SUN Xin, LIU Na, JIAO Jian, LI Qiuyang, LIU Jingping, LIN Fangcai

(Department of General Surgery, Electric Power Hospital, Capital Medical University, Beijing 100073, China)

Abstract

Objective: To investigate microRNA-25 (miR-25) expression in rectal carcinoma cells and its action.

Methods: The miR-25 expressions in several different rectal cell lines were determined, and then the changes in biological behaviors in rectal cancer cells after up- or down-regulation of miR-25 expression with miR-25 precursor (pre-miR-25) or miR-25 inhibitor (anti-miR-25) transfection were examined.

Results: Compared with normal rectal mucosal tissue, the miR-25 expressions in all tested rectal cancer cells were significantly increased with varying degrees (all $P < 0.05$). In rectal cancer HR-834 cells with relatively low miR-25 expression after pre-miR-25 transfection and in rectal cancer SW-837 cells with high miR-25 expression after anti-miR-25 transfection, the proliferation, cell cycle and apoptosis showed no significant change (all $P < 0.05$), but the invasion and migration abilities in HR-834 cells were increased, and SW-837 cells were decreased significantly (all $P < 0.05$).

Conclusion: The miR-25 expression is elevated in rectal cancer cells, and its degree of increase is closely related to the invasion and migration abilities of rectal cancer cells.

Key words

Rectal Neoplasms; MicroRNAs; Neoplasm Invasiveness

CLC number: R735.3

收稿日期: 2015-09-12; 修订日期: 2015-11-19。

作者简介: 徐晓慧, 首都医科大学电力教学医院副主任医师, 主要从事肿瘤学方面的研究。

通信作者: 林方才, Email: fc-lin@126.com

直肠癌作为常见的恶性肿瘤,危害着人们的健康,术后的转移和复发是致死的主要原因,研究肿瘤发生及转移的机制,以期寻找新的可能的作用靶点,具有重要的意义。microRNA(简称miRNA)即非编码单链小分子RNA(20~25个碱基),是一类分布广泛、内源性的、高度保守的小分子。近些年研究发现,异常表达的miRNA可作为一类新的抑癌基因或癌基因,在恶性肿瘤的发生发展过程中发挥作用^[1]。miR-25属于miR-106b-25家族,已证实在胃癌、食管癌、卵巢上皮癌等多种恶性肿瘤中均有高表达,而且与患者的预后有关^[2-7]。

本科室前期在直肠癌组织标本中的研究发现,miR-25在直肠癌组织中表达增高,而且其增高水平与淋巴结转移及临床分期有关;同时发现miR-25在直肠癌前病变——直肠腺瘤中就已经存在异常高表达^[8]。本研究拟通过改变直肠癌细胞中miR-25的表达水平,进行细胞增殖、细胞周期、细胞凋亡、细胞的侵袭及迁移实验,观察miR-25表达水平的改变对细胞生物学功能的影响。明确miR-25在直肠癌细胞中发挥的生物学作用,为寻找可能作用的下游蛋白,提供一个有力的实验支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 结直肠癌细胞系HR-8348、SW-837、HCT-8、SW-620、正常直肠黏膜组织用于miR-25表达水平的检测。直肠癌细胞系HR-8348、SW-837用于细胞生物学研究。

1.1.2 主要试剂及仪器 Superscript II Reverse Transcriptase 1st strand cDNA 试剂盒(Fermentus公司)。miR-25的TaqMan MicroRNA Assay-PCR Primer引物、pre-miR-25、anti-miR-25、pre-miR-nc和anti-miR-nc(Ambion公司)。ABI7500型实时定量PCR仪进行检测。CCK-8(同仁株式会社)、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(宝赛生物公司)。Lipofectamine 2000、TRIzol(Invitrogen公司)。胎牛血清(Hyclone公司)。培养基和胰酶(Gibco公司)。Transwell小室(Corning公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与转染 将HR-8348用含

10%FBS的RPMI1640培养基,将SW-837用含10%FBS的L15培养基,于37℃、5%CO₂培养箱中培养(L15培养基不需要CO₂,SW-837要拧紧瓶盖培养)。对数生长期的细胞于转染前1d接种到六孔板中,用Lipofectmine2000进行转染。5μL Lipofectmine2000加入250μL培养基(不含血清);同时,将12μL浓度为5nM的pre-miR-25/anti-miR-25及其相应的阴性对照试剂pre-miR-nc/anti-miR-nc分别加入另外250μL培养基,混匀,室温放置5min。将两者温和混匀,室温放置20min。然后将上述混合物轻轻加到培养细胞上,转染分子的终浓度为30nmol/L。37℃培养24h后,换正常培养液终止转染。转染48h后收集细胞。

1.2.2 qRT-PCR检测miR-25在细胞中的表达水平 在无RNA酶(RNase-free)的环境下操作,全部过程严格按照TRIzol试剂盒说明书进行总RNA的提取,用miR-25的TaqMan反转引物进行反转录。震荡混匀后按如下反应条件:冰上,5min;16℃,30min;42℃,30min;85℃,5min。所得产物使用ABI7500型实时定量PCR仪,采用TaqMan探针法进行miR-25表达水平的检测。同时扩增miR-25和RNU6B,每个待测样品设3个复孔。反应条件如下:95℃,10min,(95℃,15s;60℃,30s)40个循环。

1.2.3 细胞增殖实验 取转染后24h,生长状态良好的细胞,采用一般传代方法进行消化,制成细胞悬液计数,精确地将细胞种在96孔板中,并设置空白对照,每个孔的终体积为100μL。正常培养条件下培养24h。每孔加入10μL的CCK-8溶液,正常培养条件下着色1.5h。水平晃动约10s后用酶标仪测量450nm波长的OD值,保存数据。每天依此法测定,共4d。以培养时间为横轴,OD值为纵轴,描绘在半对数坐标纸上,连接成曲线后即成该细胞的生长曲线。

1.2.4 细胞周期测定 取转染后48h,对数生长期的细胞接种于六孔板。待贴壁后,用无血清培养基培养12h以同步化细胞,然后将无血清培养基换为10%胎牛血清的培养基继续培养24h。胰酶消化后,用含血清的PBS悬浮细胞,4℃,800r/min,离心10min。收集细胞,加入0.3mL PBS,混匀后,再加0.7mL无水乙醇,4℃固定至少24h。将固定后的细胞用PBS洗2遍,加入

100 μL RNaseA (1 mg/mL), 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 30 min。加入 0.4 mL 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的碘化丙啶 (PI), 避光染色 20 min。上流式细胞仪进行分析, 每份样品获取 10^4 以上细胞, 分析细胞周期中 G_0/G_1 期、S 期以及 G_2/M 期所占的比例, 软件处理分析结果。

1.2.5 细胞凋亡实验 取转染后 48 h, 对数生长期的细胞经胰酶消化, 用含血清的 PBS 悬浮细胞。采用宝赛生物公司的 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒。先加 10 μL 结合缓冲液, 再加 5 μL AnnexinV-FITC 轻轻混匀, 室温避光孵育 15 min。加 5 μL PI 轻轻混匀, 放置冰上, 避光。上流式细胞仪分析。在双变量流式细胞仪的散点图上, 左下象限显示活细胞, 为 (FITC $^-$ /PI $^-$); 右上象限是非活细胞, 即坏死细胞, 为 (FITC $^+$ /PI $^+$); 而右下象限为凋亡细胞, 显现 (FITC $^+$ /PI $^-$)。

1.2.6 细胞的迁移和侵袭 细胞迁移实验: 实验前将 Transwell 小室用无血清培养基平衡至少 1 h。将 Transwell 放入 24 孔板, 在下室中加入 600 μL 含 10% 血清的培养基作为趋化因子。取转染后 24 h, 继之在无血清培养基中饥饿培养 1 d 的细胞, 消化后进行活细胞计数, 调整细胞浓度为 $1\sim 4 \times 10^6/\text{mL}$, 每个 Transwell 小室中加入 100 μL 细胞悬液 (无血清培养基), 每组设 3 个平行样本, 置于孵箱中培养。20 h 后吸去上室液体, 用 PBS 湿润的棉签擦去膜上面未穿过聚碳酸酯膜小孔的细胞, 生理盐水漂洗。0.5% 甲醇结晶紫溶液染色 30 min, 流水冲洗 3~5 次。用小刀片将聚碳酸酯膜小心切下, 置于载玻片上, 膜底面朝上, 滴树脂后用盖玻片封片, 100 倍显微镜下随机计数 5 个视野的细胞数, 求均数, 进行统计学检验。细胞的侵袭实验: 与细胞迁移实验相似, 不同的是 Transwell 小室内加入 Matrigel 胶。注意在铺胶之前将使用到的材料 (枪头、EP 管、Matrigel 胶、Transwell 小室和 24 孔板) 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。

1.3 统计学处理

数据应用 SPSS 13.0 软件分析系统, 采用 *t* 检验分别分析实验组和对照组之间的差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各细胞系 miR-25 的相对表达水平

用 Taqman 探针法检测了 4 株结直肠癌细胞系

(HR-8348、SW-837、HCT-8、SW-620) 及一个正常直肠黏膜组织中的 miR-25 表达水平。用 RNU6B 作为内参, 根据公式计算 miR-25 的相对表达水平, $R' = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, $\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{miR-25}} - \text{Ct}_{\text{U6B}})$, $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{细胞系}} - \Delta\text{Ct}_{\text{正常黏膜}}$ 。设定 miR-25 在正常直肠黏膜中的表达水平为 1。4 株结直肠癌细胞系对正常直肠黏膜的 miR-25 的相对表达量分别为: HR-8348 (1.60 ± 0.24) 倍、SW-837 (3.21 ± 0.45) 倍、HCT-8 (2.14 ± 0.38) 倍、SW-620 (1.85 ± 0.36) 倍, 与正常直肠黏膜组织比较, 4 株结直肠癌细胞系 miR-25 的相对表达量均明显增高 (均 $P < 0.05$) (图 1)。

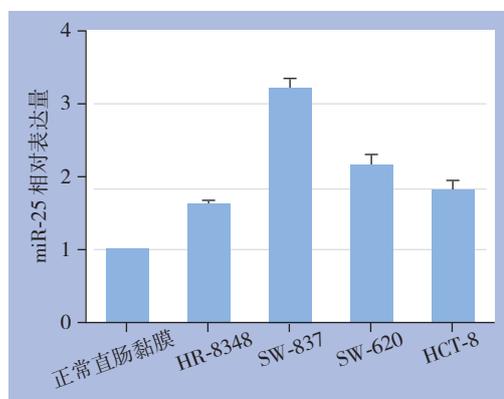


图 1 各细胞系 miR-25 的相对表达水平

Figure 1 Relative miR-25 expression levels in different cell lines

2.2 miR-25 表达水平与细胞增殖、细胞周期及凋亡的关系

在 miR-25 相对表达水平较低的直肠癌细胞系 HR-8348 中, 转染 pre-miR-25, 调高细胞中 miR-25 的表达水平, 转染 pre-miR-nc 作为阴性对照; 在 miR-25 相对表达水平较高的直肠癌细胞系 SW-837 中, 转染 anti-miR-25 调低细胞中 miR-25 的表达水平, 转染 anti-miR-nc 作为对照。结果显示, 两种细胞的增殖、细胞周期及凋亡无明显变化 (均 $P > 0.05$) (图 2)。

2.3 miR-25 表达水平与细胞迁移和侵袭的关系

在直肠癌细胞系 HR-8348 中, 转染 pre-miR-25, 调高细胞中 miR-25 的表达水平后, 细胞的迁移和侵袭能力增强 ($P < 0.05$); 在直肠癌细胞系 SW-837 中, 转染 anti-miR-25 调低细胞中 miR-25 的表达水平, 细胞的迁移和侵袭的能力降低 ($P < 0.05$) (图 3)。

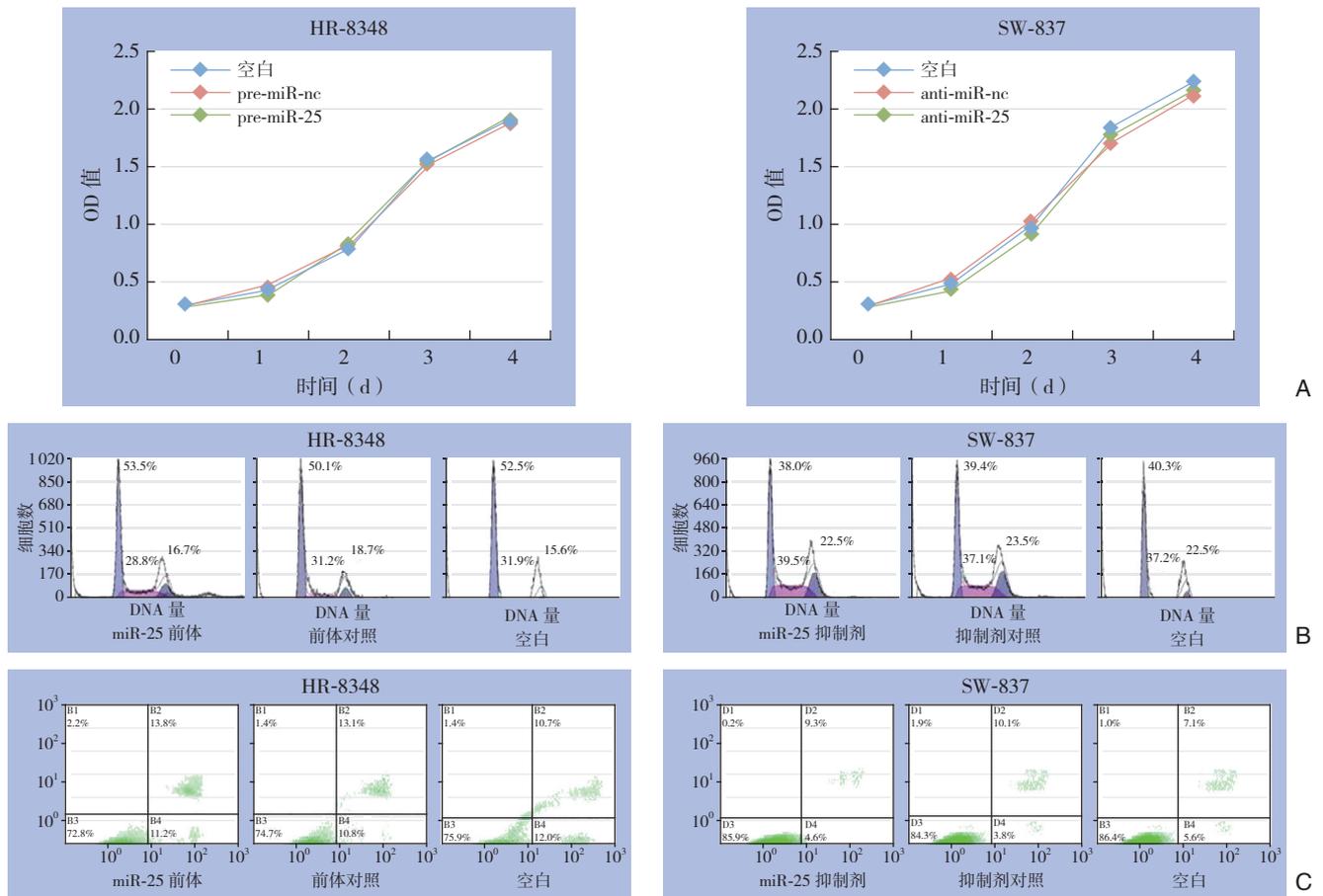


图 2 两种细胞分别转染后的增殖、细胞周期及凋亡情况 A: CCK-8 法检测细胞增殖; B: 流式细胞术检测细胞周期; C: 流式细胞术检测细胞凋亡

Figure 2 Proliferation, cell cycle and apoptosis of the two types of rectal cancer cells after transfection A: Proliferation detection by CCK-8 assay; B: Cell cycle determination by flow cytometry; C: Apoptosis analysis by flow cytometry

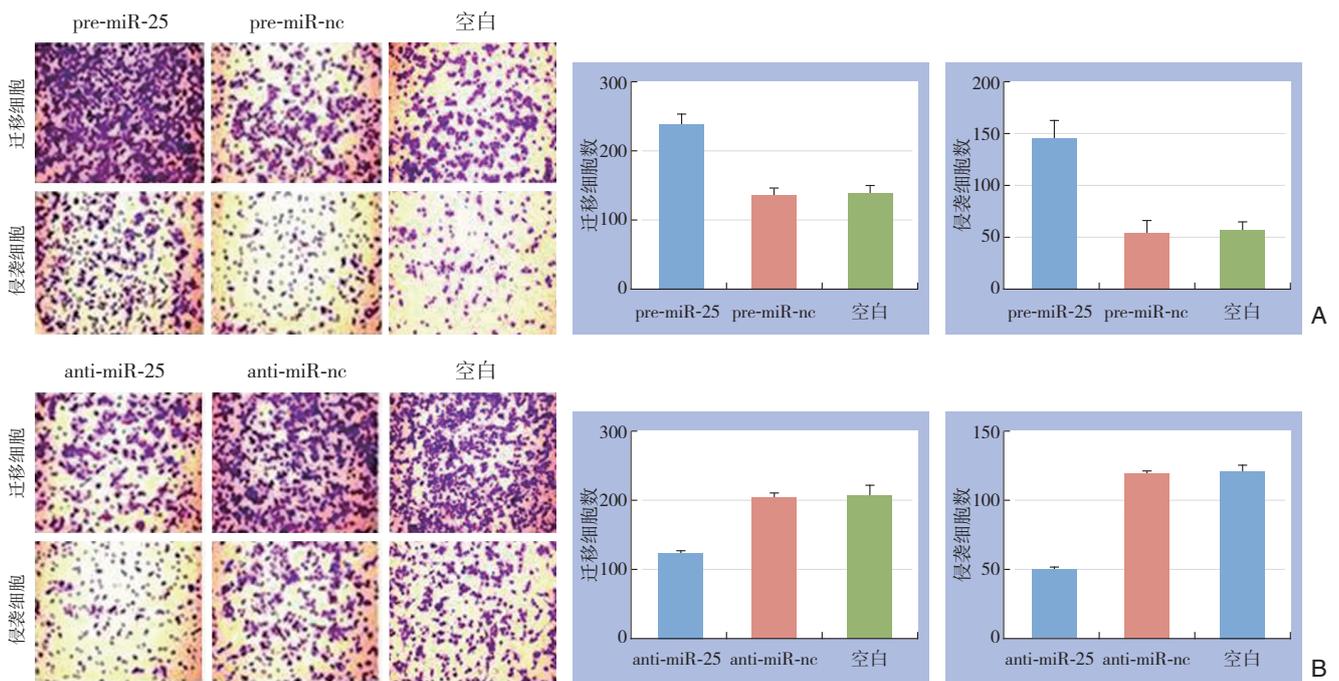


图 3 两种细胞转染后侵袭和迁移检测结果 A: HR-8348; B: SW-837

Figure 3 Results of invasion and migration of the two types of rectal cancer cells after transfection A: HR-8348; B: SW-837

3 讨论

结直肠癌是人类最常见的恶性肿瘤之一。据统计其发病率和病死率在美国均位居第3位^[9]；在我国均居第5位^[10]。恶性肿瘤本身就是一种异质性疾病，它们发病复杂，肿瘤发生的位置不同，可能会导致其分子及蛋白表型有所不同^[11]。因此严格意义上讲，结肠癌和直肠癌不能笼统地作为一种疾病来进行研究。本研究针对直肠癌进行，在进行细胞生物学研究中仅选取了直肠癌来源的细胞系。由于人们体检很少将肠镜检查作为常规查体项目，而且直肠癌早期表现缺乏特异性，等发现症状来医院诊治的直肠癌患者大都处于中晚期，这直接导致了患者生存率的降低。影响患者生存率的主要原因是肿瘤的复发和转移，因此进一步研究直肠癌细胞可能的侵袭和转移的机制，显得尤为重要。

随着科学的发展，既往曾经被忽视的一类小分子的非编码RNA——miRNA越来越受到人们关注，甚至成为生命研究的热点。miRNA约占整个基因组1%，但是它们却能调控约30%的基因的表达^[12]。已有研究证明miR-25在多种恶性肿瘤中表达增高，甚至有学者^[13-15]提出血清中的miR-25可以作为一种新的肿瘤标志物用于乳腺癌、肝细胞癌、非小细胞肺癌等肿瘤的诊断。有多个研究^[16-18]表明miRNA-21等多个miRNA在结直肠癌中表达异常，而且与患者的预后有关。近期国内的一篇关于直肠癌miRNA芯片的研究结果提示中国人直肠癌中miR-25表达增高^[19]。本科室前期收集64名直肠癌患者的癌组织及配对的癌旁正常组织标本进行miR-25表达水平的研究，发现miR-25在直肠癌组织中过度表达，miR-25的表达水平与患者的临床分期和淋巴结转移有关^[8]。这与同期发表的一项关于结直肠癌的186例样本的研究结果一致^[20]。同时收集了24对直肠腺瘤及配对癌旁正常组织的标本，经研究发现miR-25在直肠腺瘤中的表达就有增高，提示miR-25可能是直肠癌发生的一个早期事件^[8]。因此进一步研究miR-25在直肠癌细胞中所发挥的生物学作用，显得尤为必要。本研究选取了两株直肠癌来源的细胞系（HR-8348，SW-837）分别转染pre-miR-25，调高细胞中miR-25的表达水平；转染anti-miR-25，降低细胞中miR-

25的表达水平，进行细胞增殖、细胞周期、细胞凋亡、细胞的侵袭及迁移实验。结果显示，改变miR-25的表达水平对细胞增殖、细胞周期、细胞凋亡无明显影响。其表达水平的变化影响到细胞的侵袭及迁移能力：miR-25的表达水平调高，细胞的迁移和侵袭的能力增强；miR-25的表达水平降低，细胞的迁移和侵袭的能力降低。由此提示在直肠癌中高表达的miR-25是通过促进肿瘤细胞的侵袭和迁移能力而促进肿瘤的发生和转移的。

本研究通过在直肠癌细胞中进行细胞功能实验，发现在直肠癌细胞中，高表达的miR-25能够通过促进细胞的侵袭和迁移能力而发挥作用。为下游靶蛋白的确定奠定了基础，进一步进行靶基因及信号通路的研究，有可能为直肠癌的治疗寻找一个新的靶点，为直肠癌患者的生存质量的提高做出贡献。

参考文献

- [1] Lan H, Lu H, Wang X, et al. MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: opportunities and challenges[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 125094. doi:10.1155/2015/125094
- [2] Li BS, Zuo QF, Zhao YL, et al. MicroRNA-25 promotes gastric cancer migration, invasion and proliferation by directly targeting transducer of ERBB2, 1 and correlates with poor survival[J]. *Oncogene*, 2015, 34(20):2556-2565.
- [3] Zhang M, Wang X, Li W, et al. miR-107 and miR-25 simultaneously target LATS2 and regulate proliferation and invasion of gastric adenocarcinoma (GAC) cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 460(3):806-812.
- [4] Zhang R, Wang W, Li F, et al. MicroRNA-106b~25 expressions in tumor tissues and plasma of patients with gastric cancers[J]. *Med Oncol*, 2014, 31(10):243.
- [5] Xu X, Chen Z, Zhao X, et al. MicroRNA-25 promotes cell migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 421(4):640-645.
- [6] Feng S, Pan W, Jin Y, et al. MiR-25 promotes ovarian cancer proliferation and motility by targeting LATS2[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(12):12339-12344.
- [7] Wang X, Meng X, Li H, et al. MicroRNA-25 expression level is an independent prognostic factor in epithelial ovarian cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2014, 16(11): 954-958.
- [8] 徐晓慧, 马静, 林方才, 等. MicroRNA-25 在直肠癌中的表达及临床意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2014, 24(27): 38-41.
- [9] Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014[J].

- CA Cancer J Clin, 2014, 64(2):104-117.
- [10] 陈万青, 郑荣寿, 曾红梅, 等. 2011年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2015, 24(1):1-10.
- [11] Minoo P, Zlobec I, Peterson M, et al. Characterization of rectal, proximal and distal colon cancers based on clinicopathological, molecular and protein profiles[J]. Int J Oncol, 2010, 37(3): 707-718.
- [12] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. Cell, 2005, 120(1):15-20.
- [13] Wu Q, Wang C, Lu Z, et al. Analysis of serum genome-wide microRNAs for breast cancer detection[J]. Clin Chim Acta, 2012, 413(13/14):1058-1065.
- [14] Qi J, Wang J, Katayama H, et al. Circulating microRNAs (cmRNAs) as novel potential biomarkers for hepatocellular carcinoma[J]. Neoplasma, 2013, 60(2):135-142.
- [15] Chen X, Hu Z, Wang W, et al. Identification of ten serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as novel noninvasive biomarkers for nonsmall cell lung cancer diagnosis[J]. Int J Cancer, 2012, 130(7): 1620-1628.
- [16] 胡小苗, 李明忠. 大肠癌组织中miRNA-21表达水平及其与预后的研究[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(12):1717-1720.
- [17] 廖信芳, 李正荣, 杨清水等. microRNA-139-5p及其靶基因Notch1在结直肠癌中的作用[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(10):1373-1378.
- [18] 刘博, 田延锋, 赵增仁等. microRNA-451在结直肠癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2013, 22(4):447-451.
- [19] Li X, Zhang G, Luo F, et al. Identification of aberrantly expressed miRNAs in rectal cancer[J]. Oncol Rep, 2012, 28(1):77-84.
- [20] Li X, Yang C, Wang X, et al. The expression of miR-25 is increased in colorectal cancer and is associated with patient prognosis[J]. Med Oncol, 2014, 31(1):781.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 徐晓慧, 孙欣, 刘娜, 等. microRNA-25高表达与直肠癌细胞的侵袭和迁移的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(12):1716-1721. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.12.015

Cite this article as: XU XH, SUN X, LIU N, et al. Relations of high microRNA-25 expression with migration and invasion of rectal carcinoma cells[J]. Chin J Gen Surg, 2015, 24(12):1716-1721. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.12.015

本刊对来稿中统计学处理的有关要求

1. 统计研究设计: 应交代统计研究设计的名称和主要做法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或横断面调查研究); 实验设计(应交代具体的设计类型, 如自身配对设计、成组设计、交叉设计、正交设计等); 临床试验设计(应交代属于第几期临床试验, 采用了何种盲法措施等)。主要做法应围绕4个基本原则(随机、对照、重复、均衡)概要说明, 尤其要交代如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

2. 资料的表达与描述: 用 $\bar{x} \pm s$ 表达近似服从正态分布的定量资料, 用 $M(QR)$ 表达呈偏态分布的定量资料; 用统计表时, 要合理安排纵横标目, 并将数据的含义表达清楚; 用统计图时, 所用统计图的类型应与资料性质相匹配, 并使数轴上刻度值的标法符合数学原则; 用相对数时, 分母不宜小于20, 要注意区分百分率与百分比。

3. 统计分析方法的选择: 对于定量资料, 应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的, 选用合适的统计分析方法, 不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析; 对于定性资料, 应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备条件以分析目的, 选用合适的统计分析方法, 不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析, 应结合专业知识和散布图, 选用合适的回归类型, 不应盲目套用简单直线回归分析, 对具有重复实验数据的回归分析资料, 不应简单化处理; 对于多因素、多指标资料, 要在一元分析的基础上, 尽可能运用多元统计分析方法, 以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系进行全面、合理的解释和评价。

4. 统计结果的解释和表达: 当 $P < 0.05$ (或 $P < 0.01$) 时, 应说明对比组之间的差异有统计学意义, 而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)的差别; 应写明所用统计分析方法的具体名称(如: 成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等), 统计量的具体值(如 $t=3.45$, $\chi^2=4.68$, $F=6.79$ 等)应可能给出具体的 P 值(如 $P=0.0238$); 当涉及到总体参数(如总体均数、总体率等)时, 在给出显著性检验结果的同时, 再给出95%置信区间。

中国普通外科杂志编辑部