doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.10.013
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract4070.shtml

· 基础研究 ·

microRNA-139-5p 及其靶基因 Notch1 在结直肠癌中的作用

廖信芳[1]，李正荣[2]，杨清水[1]，张乡城[2]， 李柱[1]，揭志刚[2]

（1. 南方医科大学附属南海医院 普外二科，广东 佛山 528200；2. 南昌大学第一附属医院 胃肠外科，江西 南昌 330006）

摘　要

目的：探讨 microRNA-139-5p（miR-139-5p）在结直肠癌中的表达及其对结直肠癌细胞转移和侵袭的影响。

方法：用荧光定量 PCR 方法检测 miR-139-5p 在结直肠癌组织与不同结直肠癌细胞株中的表达变化；用 Boyden 小室分析和伤口愈合实验检测 miR-139-5p 转染及 miR-139-5p 抑制对结直肠癌细胞转移和侵袭能力的影响；生物信息学方法预测 miR-139-5p 的靶基因，并采用荧光素酶报告基因实验验证，Western blot 方法检测 miR-139-5p 转染对靶基因表达的影响。

结果：与各自的正常对照组比较，结直肠癌组织与结直肠癌细胞系中 miR-139-5p 表达均明显降低（$P<0.05$）。结直肠癌 DLD1 细胞和 HCT116 细胞转染 miR-139-5p 后，转移与侵袭能力均明显降低（均 $P<0.05$），而 miR-139-5p 抑制剂处理后，两种细胞的的侵袭能力均明显增强（均 $P<0.05$）。生物信息学预测显示，Notch1 是 miR-139-5p 的靶基因，且得到荧光素报告实验结果证实。Western blot 结果显示，转染 miR-139-5p 后，结直肠癌 DLD1 细胞和 HCT116 细胞中 Notch1 蛋白表达均明显下调（均 $P<0.05$）。

结论：miR-139-5p 可能通过调节 Notch1 的表达而抑制肿瘤细胞的转移和侵袭，而下调的 miR-139-5p 可能在结直肠癌的发生发展中起了重要作用。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(10):1373–1378]

关键词　结直肿瘤；微 RNAs；miR-139-5p；Notch1

中图分类号：R735.3

Role of microRNA-139-5p and its target gene Notch1 in colorectal cancer

LIAO Xinfang[1], LI Zhengrong[2], YANG Qingshui[1], ZHANG Xiangcheng[2], LI Zhu[1], JIE Zhigang[2]

(1 The Second Department of General Surgery, Affiliated Nanhai Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 528200, China;
2. Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang 330006, China)
***Corresponding author:** LIAO Xinfang, Email: xfman8888@163.com*

ABSTRACT

Objective: To investigate the effect of microRNA-139-5p (miR-139-5p) expression in colorectal cancer and its influence on migration and invasion ability of colorectal cancer cells.

Methods: The expression alteration of miR-139-5p in colorectal cancer tissue and different colorectal cancer cell lines were detected by using fluorescent quantitative PCR. The influence of miR-139-5p transfection or miR-139-5p inhibitor treatment on migration and invasion ability of colorectal cancer cells were detected by Boyden chamber assay and wound healing assay. The target gene of miR-139-5p was predicted by bioinformatics analysis

收稿日期：2014–08–14；**修订日期：**2014–09–13。

作者简介：廖信芳，南方医科大学附属南海医院副主任医师，主要从事胃肠道肿瘤疾病方面的研究。

通信作者：廖信芳， Email: xfman8888@163.com

© 版权归中国普通外科杂志所有

and was identified by luciferase reporter assay, and then the influence of miR-139-5p transfection on its target gene expression was determined by Western blot analysis.

Results: The miR-139-5p mRNA expressions in both colorectal cancer tissue and colorectal cancer cell lines were significantly decreased compared with corresponding control (all $P<0.05$). The migration and invasion ability in colorectal cancer DLD1 and HCT116 cells were significantly decreased after miR-139-5p transfection and were significantly increased after miR-139-5p inhibitor treatment (all $P<0.05$). Bioinformatics analysis showed that Notch1 was the potential target gene of miR-139-5p which was then identified by luciferase reporter assay. Western blot results showed that Notch1 protein expressions in DLD1 and HCT116 cells were significantly down-regulated after miR-139-5p transfection (both $P<0.05$).

Conclusion: MiR-139-5p may inhibit the migration and invasion of cancer cells through regulating its target gene Notch1, so the down-regulated miR-139-5p may play an important role in the occurrence and development colorectal cancer. [**Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(10):1373–1378**]

KEYWORDS Colorectal Neoplasms; MicroRNAs; miR-139-5p; Notch1

CLC number: R735.3

结直肠癌在女性常见癌症中发病率排名第2位，在男性常见癌症中发病率排名第3位[1-2]，且发病呈逐年上升的趋势[3]。结直肠癌发病机制目前尚未完全清楚。微小RNA（microRNA，miRNA）可在转录后水平对基因的表达进行负调控[4]，参与多种肿瘤的发生和发展，并在肿瘤细胞的转移和侵袭中具有重要的作用[5-8]。关于microRNA-139-5p（miR-139-5p）在结直肠癌发生发展中的具体作用及相关机制目前还不是很清楚。本研究通过观察结直肠癌细胞和组织标本中miR-139-5p表达情况，并在体外转染miR-139-5p后观察结直肠癌细胞转移和侵袭能力的变化，初步分析miR-139-5p在结直肠癌发生发展中的作用，并对miR-139-5p下游靶基因进行预测，为明确miRNA-182在结直肠癌发生发展中的作用及相关机制提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床资料 收集2011年7月—2012年8月于我院进行结直肠癌手术标本40例。肿瘤组织标本取自结直肠原发肿瘤组织，同时收集上（下）切缘正常黏膜作为对照，正常黏膜组织均于术后病理证实无癌组织侵犯。获取标本后迅速置于液氮中保存。所有患者术前均未接受化疗和放疗。

1.1.2 细胞株 正常人结肠细胞株NCM460，结直肠癌细胞株DLD1、HCT116、SW620、SW480、HT29、Caco2购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。细胞培养于含10%胎牛血清的RPMI-1640及McCoy's 5A培养基中。

1.1.3 主要试剂 RPMI-1640培养基、McCoy's 5A培养基及胎牛血清购自Gibco公司；转染试剂Lipofectamine2000及TRIzol购自美国Invitrogen公司，SYBR Green PCR试剂盒、miR-139-5p、阴性对照（NC）、anti-miRNA-NC和anti-miR-139-5p购自Ambion公司；侵袭实验用Boyden小室购自美国Millipore公司；荧光素酶检测试剂盒购自美国Promega公司；Notch1抗体购自美国Santa Cruz公司；辣根过氧化物酶（HRP）标记的二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 荧光定量PCR（qRT-PCR） TRIzol提取细胞总RNA，反转录成cDNA。PCR反应条件：95 ℃ 5 min，95 ℃ 10 s，60 ℃ 20 s，共40个循环。引物序列：miR-139-5p上游引物：5'-TCT ACA GTG CAC GTG TCT-3'，下游引物：5'-TGG AGA CGC GGC CCT GTT-3'；内参照U6上游引物：5'-GCT TCG GCA GCA CAT ATA CTA AAA T-3'，下游引物：5'-CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT-3'。得到的数据通过比较CT值法（$2^{-\Delta\Delta Ct}$）进行定量分析。

1.2.2 细胞转染 细胞长至70%融合时可用于转染。严格按照Lipofectamine2000转染说明书进行操作，转染36 h后可用于功能实验。

1.2.3 转移和侵袭能力检测 采用伤口愈合实验方法检测细胞转移能力，具体操作方法参见文献[6]

© 版权归中国普通外科杂志所有

报道。采用 Boyden 小室分析检测细胞侵袭能力，具体步骤：用于实验的细胞采用台盼蓝染色计数并重悬。将 1×10^5 个细胞置于小室上层，并补加培养基至 300 μL。下层小室中加入含 10% 胎牛血清的培养基 500 μL。孵育 12 h 后，未发生侵袭的细胞用棉拭子从上层腔室除去。下层小室中的细胞以 0.1% 结晶紫固定染色，计算出现侵袭的细胞数。

1.2.4　miR-139-5p 靶基预测因　通过靶基因预测软件（miRabda，PicTar，TargetScans）联合筛选出 Notch1 作为 miR-139-5p 的靶基因。

1.2.5　荧光素酶报告基因验证靶基因　miRNA 靶点预测软件提示 Notch1 mRNA 的 3' 端的非翻译区（3'UTR）的位点 1559-1566 是 miR-139-5p 的可能结合位点（binding site，BS），体外合成含该位点的 DNA 片段及含该位点突变体的 DNA 片段，克隆至双荧光素酶启动子载体 pMIR：pMIR-Notch1-3'-UTR-wt 和 pMIR-Notch1-3'-UTR-mut。将 pMIR-Notch1-3'-UTR-wt 或 pMIR-Notch1-3'-UTR-mut 及 miR-139-5p 共同转染至肺癌细胞中，培养 48 h 后，用荧光素酶检测试剂盒检测荧光素酶活性。

1.2.6　Western blot 检测　等量提取细胞蛋白经 10% SDS-PAGE 分离胶和 5% 浓缩胶分离后，半干转印至硝酸纤维素膜上，以含 5% BSA 的 TBST 室温封闭 2 h，加入一抗 4 ℃过夜孵育。第 2 天用 0.1% TBST 洗膜 3 次，每次 5 min，加入相应的 HRP 标记的二抗，室温孵育 1 h。0.1% TBST 洗膜后，硝酸纤维素膜以 Supersignal West Femto HRP 敏感化学发光底物对条带进行显色。actin 作为内参对照。所有实验至少重复 3 次。

1.3　统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析。2 组数据间比较采用 *t* 检验，以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结　果

2.1　qRT-PCR 结果

如图 1A 所示，miR-139-5p 在结直肠癌患者组织中的表达量明显低于正常黏膜组织（$P<0.01$）；miR-139-5p 在结直肠癌细胞 DLD1、HCT116、SW620、SW480、HT29、Caco2 中的表达水平均明显低于正常结肠 NCM460 细胞（图 1B），差异均有统计学意义（均 $P<0.05$）。

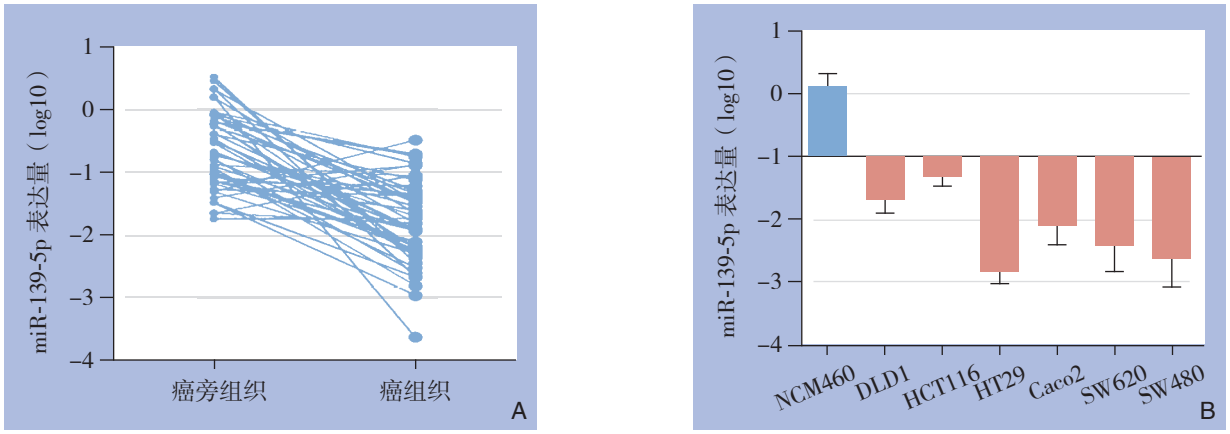

图 1　qRT-PCR 结果　A：miR-139-5p 在结直肠癌及癌旁组织中表达；B：miR-139-5p 在正常结肠细胞与结直肠癌细胞株中表达

Figure 1　Results of qRT-PCR　A: MiR-139-5p expressions in colorectal cancer tissue and tumor adjacent tissue; B: MiR-139-5p expressions in normal colonic cells and colorectal cancer cell lines

2.2　miR-139-5p 对结直肠癌细胞转移和侵袭的影响

伤口愈合实验显示，与对照组比较，miR-139-5p 转染可明显抑制结直肠癌 DLD1 细胞和 HCT116 细胞的转移（均 $P<0.05$）（图 2A）；与对照组比较，miR-139-5p 转染可明显抑制结直肠癌 DLD1 细胞和 HCT116 细胞的侵袭能力（均 $P<0.01$），而 miR-139-5p 抑制剂处理可增加结直肠癌 DLD1 细胞和 HCT116 细胞的侵袭能力（均 $P<0.01$）（图 2B）。

© 版权归中国普通外科杂志所有

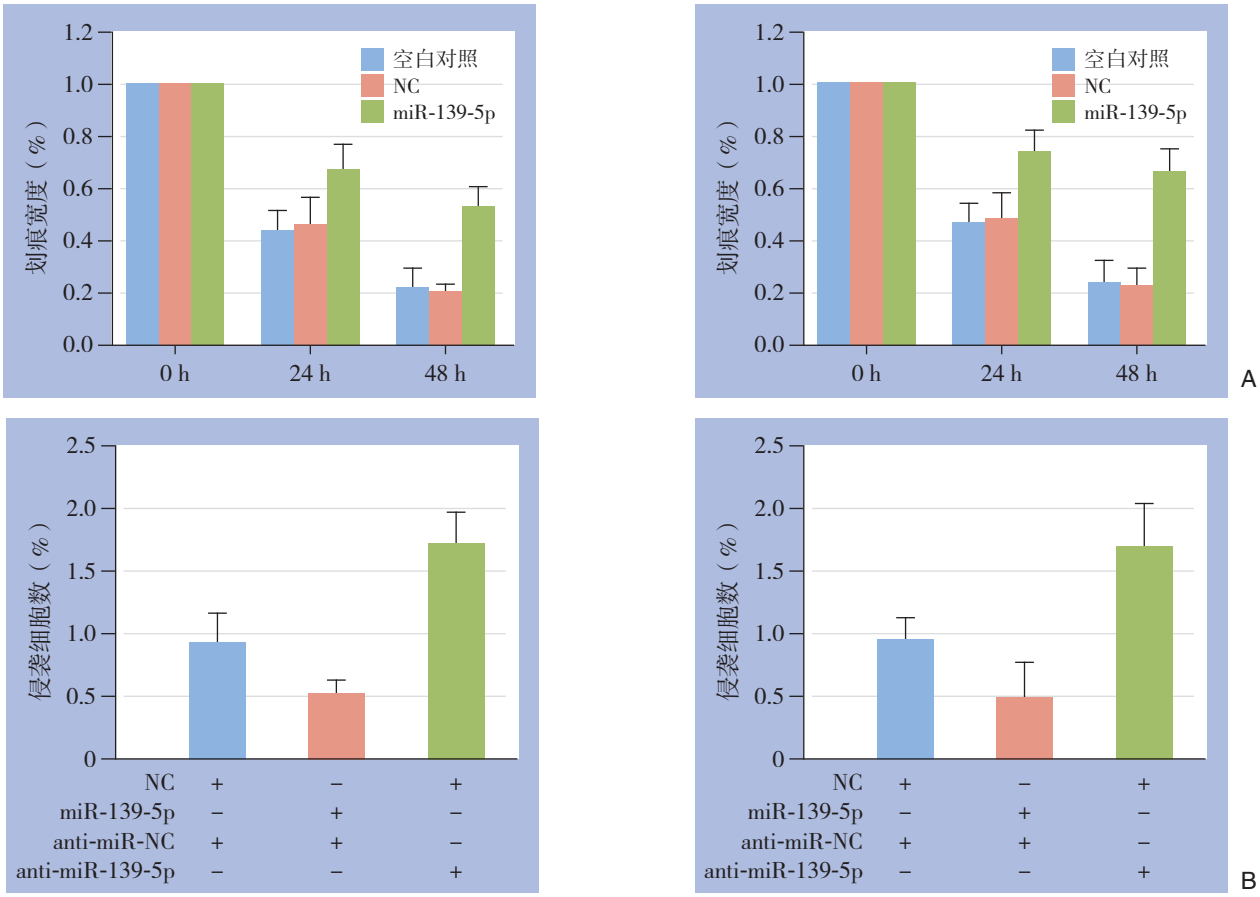

图 2 转移和侵袭实验 A：miR-139-5p 对结直肠癌细胞转移的影响；B：miR-139-5p 对结直肠癌细胞侵袭的影响

Figure 2 Migration and invasion assay A: Influence of miR-139-5p on migration of colorectal cancer cells; B: Influence of miR-139-5p on invasion of colorectal cancer cells

2.3 miR-139-5p 靶基因预测

通过靶基因预测软件寻找 miR-139-5p 可能作用的靶基因，结果提示 Notch1 可能为 miR-139-5p 的功能性靶基因。miR-139-5p 预测结合的 Notch1 的 3'-UTR 的靶位点如图 3A 所示。为确定 miR-139-5p 是否和 Notch1 间存在直接的相互作用，构建了含野生型和突变型 Notch1 的 3'-UTR 序列的 pMIR 载体。结果显示，共转染野生型 pMIR-Notch1 3'-UTR 载体和 Notch1，荧光素酶活性明显降低（$P<0.01$），而共转染突变型 pMIR-Notch13'-UTR 载体和 Notch1 的荧光素酶活性未出现明显改变（$P>0.05$）（图 3B）。

2.4 miR-139-5p 对结直肠癌细胞 Notch1 表达的影响

Western blot 结果显示，miR-139-5p 转染后结直肠癌 DLD1 和 HCT116 细胞中 Notch1 的表达均较对照组明显降低（均 $P<0.05$）（图 4A–B）。

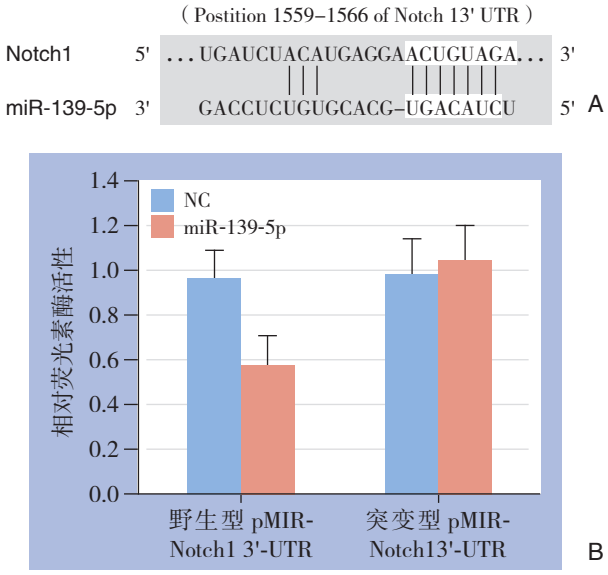

图 3 miR-139-5p 靶基因预测及验证 A：miR-139-5p 预测结合的 Notch1 3'-UTR 的靶位点结构图；B：荧光素酶活性检测 miR-139-5p 和 Notch1 关系

Figure 3 Prediction and identification of the target gene of miR-139-5p A: Predicted 3'-UTR target sequence of Notch1 formiR-139-5p; B: Luciferase activity detection for analysis of the relationship between miR-139-5p and Notch1

© 版权归中国普通外科杂志所有

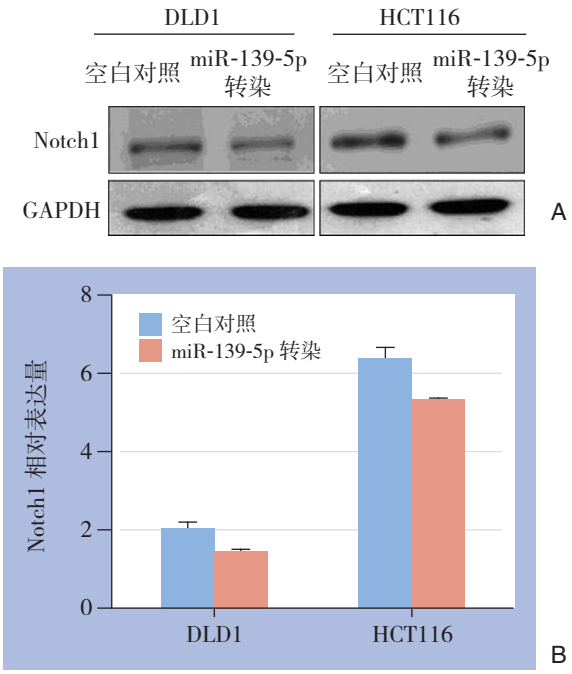

图 4　Western blot 检测 Notch1 蛋白表达　A: 电泳条带; B: Notch1 蛋白相对表达量

Figure 4　Western blot analysis for Notch1 protein expression　A: Electrophoretic bandS; B: Relative expression levels of Notch1 protein

3　讨　论

miRNA 是近年来发现的一种在进化上保守的非编码小 RNA 分子，广泛存在于动物、植物及病毒等多细胞真核生物中。miRNA 可对基因表达进行转录后调控，在个体发育、肿瘤发生中发挥重要作用。人们通过对哺乳动物基因内源性 miRNA 基因序列的研究，发现至少存在 1 000 个或更多不同类型的 RNA 调控着机体内大约 1/3 的基因，参与了真核细胞的生长、发育、新陈代谢、疾病及死亡等生理病理过程。许多研究证实，在人类多种肿瘤中 miRNA 异常表达 [9-12]，这可以为恶性肿瘤的诊断提供有用信息。

研究 [13-17] 表明，在炎症性肠病相关的肿瘤组织、结直肠癌原发灶和转移灶中 miR-139-5p 的表达水平均出现显著下调。除此之外，miR-139-5p 的表达在胃癌、子宫内膜浆液性腺癌和肝癌中也出现显著下调 [18-20]。本研究结果表明，miR-139-5p 在结直肠癌细胞和结直肠癌组织表达显著下调，这一研究结果同文献报道相一致。miR-139-5p 在结直肠癌细胞和结直肠组织中表达下调提示 miR-139-5p 失调可能是结直肠癌发生的预警事件。

进一步的功能实验提示，miR-139-5p 可显著抑制结直肠癌细胞系 DLD1 和 HCT116 的转移和侵袭能力。其他文献 [21] 报道，miR-139-5p 对肺癌细胞的增殖和侵袭能力并无显著性影响。这可能是由于 miR-139-5p 在不同的肿瘤组织中其调控的靶基因不尽相同，而其下游靶基因的生物学效应决定了 miR-139-5p 的作用 [22]。

由于 miRNA 下游靶基因的生物学效应决定了 miRNA 的作用，故本研究通过靶基因预测软件联合筛选出 miR-139-5p 的靶基因，结果提示 Notch1 可能为 miR-139-5p 的靶基因。将 miR-139-5p 转入结直肠癌细胞系 DLD1 和 HCT116 后，结果显示结直肠癌细胞系 DLD1 和 HCT116 中 Notch1 蛋白表达水平显著降低，提示 miR-139-5p 可能是通过调节 Notch1 的表达而抑制结直肠癌细胞的转移和侵袭能力。

综上所述，本研究对 miR-139-5p 在结直肠癌发生发展中的作用进行了观察。结果提示，miR-139-5p 可能是一类新的肿瘤抑制 miRNA。结直肠癌细胞中 miR-139-5p 表达下调，抑制靶基因 Notch1 的表达，从而促进结直肠癌的转移和侵袭。本研究结果为结直肠癌的发生发展提供了一种新的见解。且在结直肠癌治疗中，miR-139-5p 可作为一种潜在的治疗靶点。

参考文献

[1] 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.

[2] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69–90.

[3] 姚建峰，孙学军，闫立昆，等. c-Met 在有、无肝转移结直肠癌组织中的表达差异 [J]. 中国普通外科杂志，2014, 23(4):468–472.

[4] 鲁艳明，银铎，王宁，等. miRNA-200c 对卵巢癌细胞侵袭能力影响观察 [J]. 中华肿瘤防治杂志，2014, 21(10):732–735.

[5] 王球玉，唐珺，周欣想，等. miR-129 在乳腺癌中表达下调及其对乳腺癌细胞迁移运动的影响 [J]. 生理学报，2012, 64(4):403–411.

[6] Lin Y, Wu J, Chen H, et al. Cyclin-dependent kinase 4 is a novel target in micoRNA-195-mediated cell cycle arrest in bladder cancer cells[J]. FEBS Lett, 2012, 586(4):442–447.

[7] Wang J, Gu Z, Ni P, et al. NF-kappaB P50/P65 hetero-dimer mediates differential regulation of CD166/ALCAM expression via interaction with micoRNA-9 after serum deprivation, providing evidence for

© 版权归中国普通外科杂志所有

a novel negative auto-regulatory loop[J]. Necleic Acids Res, 2011, 39(15):6440–6455.

[8] Suzuki H, Tokino T, Shinomura Y, et al. DNA methylation and cancer pathways in gastrointestinal tumors[J]. Pharmacogenomics , 2008, 9(12):1917–1928.

[9] Rossi S, Sevignani C, Nnadi SC, et al. Cancer-associated genomic regions (CAGRs) and noncoding RNAs: bioinformatics and therapeutic implications[J]. Mamm Genome, 2008, 19(7/8):526–540.

[10] Gaur A, Jewell DA, Liang Y, et al. Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines[J]. Cancer Res, 2007, 67(6):2456–2468.

[11] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. Nature, 2005, 435(7043):834–838.

[12] 谢海涛 . 结肠癌组织中 miR-451 表达的检测与分析 [J]. 中南医学科学杂志 , 2012, 40(3):257–259.

[13] Olaru AV, Selaru FM, Mori Y, et al. Dynamic changes in the expression of MicroRNA-31 during inflammatory bowel disease-associated neoplastic transformation[J]. Inflamm Bowel Dis, 2011, 17(1):221–231.

[14] Cekaite L, Rantala JK, Bruun J, et al. MiR-9, -31, and -182 deregulation promote proliferation and tumor cell survival in colon cancer[J]. Neoplasia, 2012, 14(9):868–879.

[15] Chang KH, Miller N, Kheirelseid EA, et al. MicroRNA signature analysis in colorectal cancer:identification of expression profiles in stage II tumors associated with aggressive disease[J]. Int J Colorectal Dis, 2011, 26(11):1415–1422.

[16] Shen K, Liang Q, Xu K, et al. MiR-139 inhibits invasion and metastasis of colorectal cancer by targeting the type I insulin-like growth factor receptor[J]. Biochem Pharmacol, 2012, 84(3):320–330.

[17] Schepeler T, Holm A, Halvey P, et al. Attenuation of the beta-catenin/TCF4 complex in colorectal cancer cells induces several growth-suppressive microRNAs that target cancer promoting genes[J]. Oncogene, 2012, 31(22):2750–2760.

[18] Guo J, Miao Y, Xiao B, et al. Differential expression of microRNA species in human gastric cancer versus non-tumorous tissues[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2009, 24(4):652–657.

[19] Hiroki E, Akahira J, Suzuki F, et al. Changes in microRNA expression levels correlate with clinicopathological features and prognoses in endometrial serous adenocarcinomas[J]. Cancer Sci, 2010, 101(1):241–249.

[20] Wong CC, Wong CM, Tung EK, et al. The microRNA miR-139 suppresses metastasis and progression of hepatocellular carcinoma by down-regulating Rho-kinase 2[J]. Gastroenterology, 2011, 140(1):322–331.

[21] Krishnan K, Steptoe AL, Martin HC, et al. miR-139-5p is a regulator of metastatic pathways in breast cancer[J]. RNA, 2013, 19(12):1767–1780.

[22] 李谦平 . miR-16-1 抑制 A549 细胞株生物学行为及非小细胞肺癌 ARID1A 基因表达的研究 [D]. 武汉 : 华中科技大学 , 2012:27–29.

（本文编辑　姜晖）

本文引用格式： 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. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.10.013

Cite this article as: LIAO XF, LI ZR, YANG QS, et al. Role of microRNA-139-5p and its target gene Notch1 in colorectal cancer[J]. Chin J Gen Surg, 2014, 23(10):1373–1378. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.10.013

《中国普通外科杂志》2013 年主要学术指标居本学科期刊前茅

据《2014 年版中国科技期刊引证报告（核心版）》报告，《中国普通外科杂志》主要学术水平衡量指标均居本学科期刊前茅。

报告显示，在与普通外科学相关的外科学类 17 种期刊中，《中国普通外科杂志》2013 年核心总被引用频次第 1，综合评价总分第 5，核心影响因子第 8，这三大指标为对科技期刊学术质量评估的主要指标。此外，杂志的即年指标、引用刊数、扩散因子、权威因子、被引半衰期等指标也达本学科前列。

中国普通外科杂志编辑部

© 版权归中国普通外科杂志所有