



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.04.015  
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3851.shtml

· 基础研究 ·

# microRNA-224 在结肠癌细胞中的表达及意义

于卫芳<sup>1</sup>, 樊智彬<sup>2</sup>, 张学明<sup>3</sup>, 赵增仁<sup>2</sup>, 田延锋<sup>2</sup>, 刘博<sup>2</sup>, 张丽静<sup>2</sup>, 贺新奇<sup>2</sup>

(河北医科大学第一医院 1. 内镜中心 2. 普通外科, 河北 石家庄 050031; 3. 唐山市工人医院 肛肠科, 河北 唐山 063000)

## 摘要

**目的:** 探讨 microRNA-224 (miR-224) 对结肠癌细胞中的表达及意义。

**方法:** 用 real-time PCR 检测 4 种结肠癌细胞株 (Caco-2、HCT116、HT-29、LoVo) 和正常结肠黏膜组织中 miR-224 的表达水平; 将 HCT116 细胞分别转染 miR-224 模拟物和阴性对照组序列, 以未处理的 HCT116 细胞作为空白对照, 用 real-time PCR 法检测各组细胞 miR-224 的表达水平, 用 MTT 法和平板克隆实验法检测各组细胞的增殖情况, 用流式细胞仪检测各组细胞周期情况。

**结果:** 4 种结肠癌细胞株 miR-224 的表达均明显高于正常结肠黏膜组织 (均  $P < 0.05$ ); 与空白对照组 HCT116 细胞比较, miR-224 模拟物转染组 HCT116 细胞 miR-224 的表达水平明显升高, 增殖活力明显增强, 细胞克隆数量明显增高 (均  $P < 0.05$ ); 细胞周期  $G_1$  到 S 期转换的趋势增强 ( $P = 0.074$ ); 阴性对照组序列转染组 HCT116 细胞的各项指标差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ )。

**结论:** miR-224 在结肠癌细胞中表达上调, miR-224 可能通过促进细胞增殖与细胞周期的演进, 而在结肠癌发生发展的过程中发挥促癌基因的作用。 [中国普通外科杂志, 2014, 23(4):478-482]

## 关键词

结肠肿瘤; 微 RNAs; 细胞增殖  
中图分类号: R735.3

## MicroRNA-224 expression in colon cancer cells and its significance

YU Weifang<sup>1</sup>, FAN Zhibin<sup>2</sup>, ZHANG Xueming<sup>3</sup>, ZHAO Zengren<sup>2</sup>, TIAN Yanfeng<sup>2</sup>, LIU Bo<sup>2</sup>, ZHANG Lijing<sup>2</sup>, HE Xinqi<sup>2</sup>

(1. Endoscopy Center 2. Department of General Surgery, the First Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, China;  
3. Department of Anorectal Surgery, Tangshan Gongren Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China)

**Corresponding author:** ZHAO Zengren, Email: z zr-doctor@163.com

## ABSTRACT

**Objective:** To investigate the expression and significance of microRNA-224 (miR-224) in colon cancer cells.

**Methods:** The miR-224 expression in four colon cancer cell lines (Caco-2, HCT116, HT-29 and LoVo) and normal colonic mucosal tissue were detected by real-time RT-PCR; HCT116 cells were transfected with miR-224 mimics or scrambled negative control sequence respectively, using the untreated HCT116 cells as blank control, and then the miR-224 expression was determined by real-time PCR, proliferation status was measured by MTT assay and plate colony formation assay, and cell cycle phase distribution was analyzed by flow cytometry in each group of cells.

**Results:** The miR-224 expression in each of the four colon cancer cell lines was higher than that in normal

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (81072034); 河北省自然科学基金资助项目 (C2011206103); 河北省国际合作资助项目 (12396105D)。

**收稿日期:** 2013-05-22; **修订日期:** 2013-10-14。

**作者简介:** 于卫芳, 河北医科大学第一医院副主任医师, 主要从事消化道肿瘤早期诊断与治疗方面的研究。

**通信作者:** 赵增仁, Email: z zr-doctor@163.com

colonic mucosal tissue (all  $P < 0.05$ ). Compared with the HCT116 cells in blank control group, the miR-224 expression was significantly increased, proliferative ability was significantly enhanced, the number of colonies was significantly augmented (all  $P < 0.05$ ), and G1 to S phase transition showed an accelerating trend as well ( $P = 0.074$ ) in those in miR-224 mimics transfection group; the differences in all the observed indexes showed no statistical significance in those in negative control sequence transfection group (all  $P > 0.05$ ).

**Conclusion:** The miR-224 expression is up-regulated in colon cancer cells, which may promote cell proliferation and cell cycle progression, and thereby play a cancer-promoting gene role in the pathogenesis of colon cancer.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(4):478-482]

**KEYWORDS** Colonic Neoplasms; MicroRNAs; Cell Proliferation

**CLC number:** R735.3

结直肠癌是全世界面临的一个严峻的健康问题,平均全球每年的新增病例为120余万,同时另有70余万患者死于此病。在我国,其每年的发病率/病死率明显高于世界水平。microRNA (miRNA) 是一类长19~24个碱基的非编码单链RNA分子,其通过与靶基因mRNA的3'端非编码区的完全或不完全互补结合,抑制靶mRNA翻译或降解靶mRNA而在转录后水平发生调控作用<sup>[1]</sup>。近年来,大量的科学研究发现,miRNA可通过影响肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭、细胞周期调控等生物学功能而在肿瘤的发生发展过程中发挥抑癌或促癌的作用。microRNA-224 (miR-224) 是新近发现的、在肿瘤尤为活跃的miRNA之一。Fu等<sup>[1]</sup>通过基因芯片筛查出miR-224在结直肠癌患者的组织中表达明显上调,但是并未在结肠癌细胞株中进行miR-224的生物功能性试验,本实验基于miR-224在结直肠癌患者组织中的高表达,在结肠癌细胞株中转染miR-224模拟物,通过检测上调miR-224的表达水平对增殖、凋亡、细胞周期的影响,以进一步说明miR-224在结直肠癌中表达上调的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

结肠癌细胞株Caco-2、HCT116、HT-29、LoVo均由香港中文大学消化疾病研究所于君教授馈赠。McCoy's 5A培养基、DMEM培养基、胎牛血清(FBS)、青链霉素(PEST)及L-谷氨酰胺(L-glutamine)均购自美国Gibico公司,胰蛋白-EDTA消化液购自于北京诺博莱德科技有限公司;TRIzol、Lipofectamin™ 2000购自Invitrogen公司;microRNA-224模拟物、阴性对照序列购于

广州锐博公司,cDNA第一链合成及实时定量PCR采用All-in-One™ miRNA qRT-PCR检测试剂盒、内参U6、miR-224的引物均购自广州复能基因有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及转染** HCT116、HT-29细胞使用含10% FBS、1.5 mmol/L L-谷氨酰胺、青链霉素(1×PEST)的McCoy's 5A培养液培养,Caco-2、LoVo细胞使用含10% FBS、1.5 mmol/L L-谷氨酰胺、青链霉素(1×PEST) DMEM培养基培养,在37℃、5% CO<sub>2</sub>、水饱和湿度条件下培养。选取HCT116作为实验对象,待细胞生长状态稳定,进入对数生长期,将适量(约4~5×10<sup>4</sup>)细胞接种在6孔细胞培养板上,用不含抗生素的细胞培养液培养24 h后,将细胞分为:实验组、阴性对照组、空白对照组,前两组严格按照Lipofectamin™ 2000说明书分别进行miR-224模拟物及阴性对照序列转染(均为50 nM),转染后6 h更换新鲜培养液进行后续试验;空白对照组不进行任何干预。

**1.2.2 提取细胞株中的RNA及cDNA的合成** 收取4种结肠癌细胞株及转染后24 h的HCT116细胞,用PBS洗涤2次,按照TRIzol说明书提取细胞株中的RNA,最后加EDPC水30~50 mL溶解RNA。通过紫外分光光度仪及琼脂糖凝胶电泳检测RNA的浓度和完整度,存于-80℃备用。按照All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection Kit试剂说明书进行反转录实验。反应条件:37℃ 60 min, 85℃ 5 min,将反转录得到的cDNA稀释5倍,存于-20℃冰箱备用。

**1.2.3 实时定量PCR (real-time PCR) 检测miR-224的表达** 选用20 μL反应体系:2×All-in-One qPCR Mix 10 μL, All-in-One miRNA qPCR Primer (2 μM) 2 μL, Universal Adaptor

PCR Primer (2  $\mu\text{M}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , First-strand cDNA (1:5) 2  $\mu\text{L}$ , 50 $\times$  ROX Reference Dye 0.4  $\mu\text{L}$ , 补无 RNA 酶的水至 20  $\mu\text{L}$ ; 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min, 然后按 95  $^{\circ}\text{C}$   $\times$  10 s, 60  $^{\circ}\text{C}$   $\times$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$   $\times$  10 s, 进行 40 个循环, 检测 miR-224 在结肠癌细胞株中及正常黏膜组织中的表达水平, 以及 HCT116 细胞转染 24 h 后的 miR-224 表达水平。

**1.2.4 MTT 检测各组细胞的增殖活力** 将转染后细胞分为转染 miR-224 模拟物组和转染阴性对照序列组, 另设一组未经转染处理的空白组, 收集待检测的细胞反复吹打打形成均匀的细胞悬液, 采用血细胞计数法计数细胞, 96 孔培养板中每孔接种细胞 1 000 个, 每孔加入培养液 200  $\mu\text{L}$  并设 5 个复孔。将培养板置于培养箱 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养。分别在培养 1、2、3、4、5 d 后加入 MTT 工作液, 每孔加 0.5% MTT 20  $\mu\text{L}$ , 继续培养 4 h 后, 轻轻吸出孔内液体, 然后在每孔中加入二甲基亚砜 (DMSO) 150  $\mu\text{L}$ , 将 96 孔板放置在摇床上避光震动 10 min 后应用全自动酶标仪, 检测每孔的光密度 (OD) 值, 波长设定为 450 nm。计算 5 个复孔的 OD 平均值, 以时间作为横坐标, 计算所得 OD 值为纵坐标, 绘制细胞生长曲线。

#### 1.2.5 平板克隆形成实验 (colony formation)

转染后, 在 6 孔细胞培养板中接种细胞, 每孔加培养液 2 mL, 每孔接种细胞 1 000 个, 将培养板置培养箱中, 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  条件下培养约 2 周。密切观察细胞生长情况, 当出现肉眼可见的集落形成时, 即可终止培养。移除培养液, 加入 1 mL PBS 液洗 2 次。然后加甲醇 2 mL, 固定 15 min, 移除甲醛, 加入适量结晶紫染色液染 2 h, 然后用水缓慢洗去结晶紫染色液, 置于空气中干燥。实验重复 3 次, 每次设计 3 个复孔。

**1.2.6 流式细胞术分析细胞周期** 将细胞接种 6 孔板, 转染 48 h 后收集细胞, 制成单细胞悬液, PBS 洗 2 次, 离心、弃上清, 加 PBS 重悬细胞, 加 -20  $^{\circ}\text{C}$  预冷的 75% 乙醇并振荡, 4  $^{\circ}\text{C}$  固定 1 h, 离心、弃冰乙醇, PBS 洗 1 遍, 弃上清; 加入含有 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PI (碘化吡啶) 和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  无 DNA 酶污染的 RNA 酶 PBS 染色液, 4  $^{\circ}\text{C}$  避光静置 1 h, 上机检测, 每组重复 3 次。

#### 1.3 统计学处理

应用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析, 数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间独立样本采用 Mann-Whitney 检验, 重复测量数据采用双因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-224 在结肠癌细胞株及正常黏膜组织中的表达情况

real-time PCR 检测 4 种结肠癌细胞株及正常黏膜组织中检测 miR-224 的表达, 结果发现 miR-224 在 4 种细胞株中的表达均明显高于正常黏膜组织 (均  $P < 0.05$ ) (图 1)。

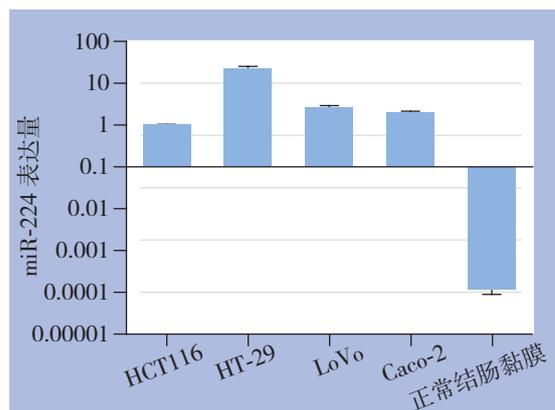


图 1 miR-224 在结直肠癌细胞株及正常黏膜的表达  
Figure 1 The miR-224 expression in colon cancer cells and normal colonic mucosal tissue

### 2.2 miR-224 模拟物转染后 miR-224 的表达情况

HCT116 细胞分别转染 miR-224 模拟物、阴性对照序列 48 h 后, 收取细胞, 通过 real-time PCR 方法检测各组 miR-224 的表达, 结果显示: miR-224 模拟物转染组的 miR-224 表达明显高于空白对照组 ( $P < 0.05$ ), 阴性对照序列转染组和空白对照组之间表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图 2)。

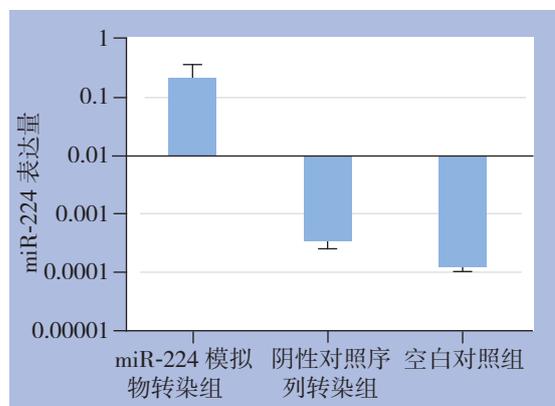


图 2 miR-224 在不同处理的 HCT116 细胞中表达水平  
Figure 2 The miR-224 expression in HCT116 cells after different treatments

### 2.3 miR-224 对 HCT116 细胞增殖的影响

用 MTT 比色分析法检测 HCT116 细胞转染转染 miR-224 模拟物、阴性对照序列后 1、2、3、4、5 d 5 个时间点的 OD 值, 结果显示: 阴性对照序列转染组与空白对照组间各时间点差异均无统计学意义 (均  $P>0.05$ ), miR-224 模拟物转染组在 5 个时间点 OD 值均高于空白对照组, 差异均有统计学意义 (均  $P<0.05$ ) (图 3)。同时, 在 HCT116 细胞的平板克隆形成实验中, 阴性对照序列转染组与空白对照组间细胞集落数无统计学差异 ( $P>0.05$ ), miR-224 模拟物转染组细胞集落数明显大于空白对照组, 差异有统计学意义 ( $P=0.0397$ ) (图 4)。

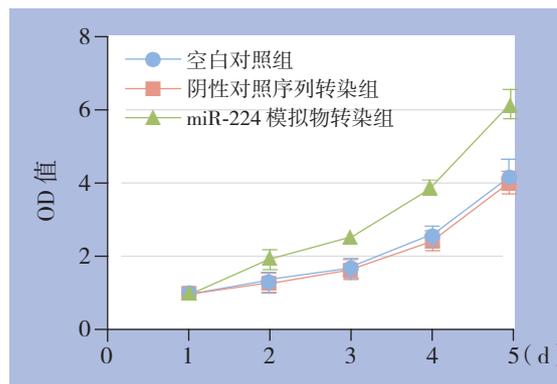


图 3 不同处理的 HCT116 细胞的增殖情况

Figure 3 The proliferation of HCT116 cells after different treatments

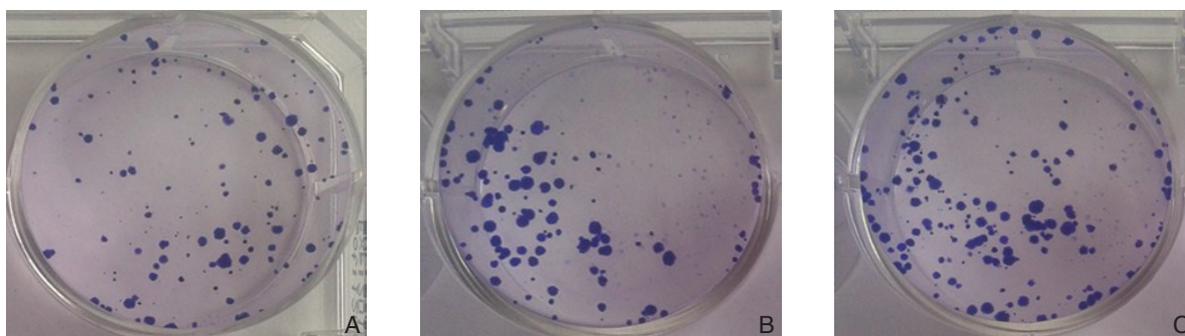


图 4 HCT116 细胞克隆形成实验 A: 空白对照组; B: 阴性对照序列转染组; C: miR-224 模拟物转染组

Figure 4 Colony formation assay in HCT116 cells A: Blank control group; B: Negative control sequence transfection group; C: MiR-224 mimics transfection group

### 2.4 miR-224 模拟物转染后对结肠癌细胞周期的影响

流式细胞周期分析发现, 转染 miR-224 模拟物后 HCT-116 细胞的细胞周期有  $G_0/G_1$  期向 S 期发展的趋势, 但与空白对照组差异未达统计学意义 ( $P=0.074$ ), 阴性对照组和空白组差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ) (图 5)。

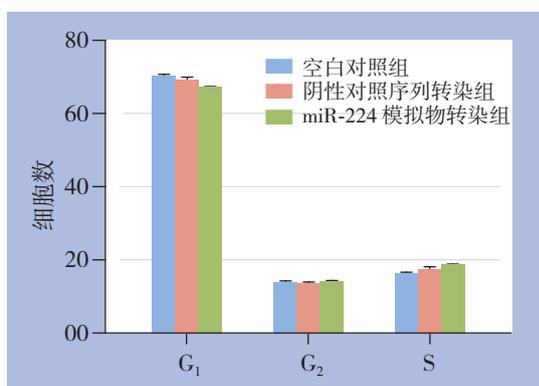


图 5 各组 HCT116 细胞周期情况

Figure 5 The cell cycle phase distributions in each groups of HCT116 cells

## 3 讨论

miRNA 的作用机制较为独特, 是在转录后水平进行调控。研究发现, miRNA 可以通过影响细胞的增殖、细胞周期、凋亡、侵袭等生物学功能参与到癌症的发生发展。有报道 miR-451 在结直肠癌患者组织中低表达, 并且与结直肠癌分化程度及组织学类型相关<sup>[2]</sup>; miR-133b 抑制人结直肠癌细胞迁移和侵袭在影响结肠癌细胞的发生发展<sup>[3]</sup>。可见 miRNA 已经成为了结直肠癌的又一研究重点。有研究<sup>[4]</sup>发现, miR-224 在肝癌组织中表达明显高于癌旁正常组织, 并且可以通过促进肝癌细胞的增殖、转移和侵袭, 同时抑制其凋亡过程, 在肝癌发生发现过程中发挥类似促癌基因的作用<sup>[5]</sup>; 而 Huang 等<sup>[6]</sup>在对乳腺癌的研究中发现, miR-224 在乳腺癌细胞中的表达水平显著高于乳腺正常上皮细胞, 而且高侵袭性细胞 MDA-MB-231 的表达水平尤为增高, 通过多种生物功能实验发现 miR-224 可促进乳腺癌细胞的转移, 认为 miR-224

在乳腺癌转移过程中发挥重要作用。Olaru 等<sup>[7]</sup>研究 miRNA 在正常→炎性肠病→结肠癌过程中的作用,发现 miR-224 在炎性肠病发展的各个阶段都表达上调,而且结肠癌中 miR-224 的表达水平明显高于正常粘膜和炎性肠病。进一步研究 miR-224 对结肠癌细胞生物学行为的影响,结果显示 miR-224 在细胞周期的调控中发挥了重要作用,其加快了 G<sub>1</sub> 期→S 期的进程,并且发现这种调控作用是通过影响细胞周期调控因子 p21 实现的,同时 Fu 等<sup>[1]</sup>、屈昌民等<sup>[8]</sup>亦发现 miR-224 在结直肠癌组织中高表达。但是到目前为止,关于 miR-224 对结肠癌细胞株增殖的影响尚无相关报道。

本实验通过查阅文献,发现了 miR-224 在结直肠癌患者的表达中明显上调,初步在 4 种结肠癌细胞株及 3 例正常黏膜组织中对 miR-224 的表达量进行了验证,发现 miR-224 在结肠癌细胞株中明显高于正常组织,因此,为了弄清楚 miR-224 影响结直肠癌的机制,本研究通过转染手段提高了结肠癌细胞 HCT-116 中 miR-224 的表达水平,进而通过 MTT 及克隆形成检测了 miR-224 对细胞增殖的影响,另外运用流式细胞术检测了其影响细胞周期的影响。结果发现,上调 miR-224 的表达促进了细胞株的增殖 ( $P < 0.05$ ),并且有促进了细胞周期 G<sub>1</sub> 期向 S 期进展的趋势,与 Olaru 等<sup>[7]</sup>所得的 miR-224 对细胞周期影响类似。近期, Fu 等<sup>[1]</sup>在研究结直肠癌 microRNA-mRNA 调控通路时,发现 miR-224 在结肠癌中表达上调,并且可能通过作用于 WNT 通路中的 SFRP2 的发挥作用。Wnt 信号通路对机体的细胞增殖分化、肿瘤发生发展均发挥重要作用<sup>[9]</sup>。Wnt 包括 3 种作用途径,已被证实的有参加到肿瘤发生发展过程中的是经典 Wnt/ $\beta$ -catenin 途径。研究发现 Wnt 途径的激活是约 90% 结直肠癌发生的早期事件<sup>[10]</sup>。而 SFRP2 可通过与 Wnt 蛋白竞争结合 Frizzled 受体而抑制 WNT 的活性<sup>[11]</sup>。因此,笔者推测 miR-224 可能通过抑制靶点 SFRP2,进而激活 Wnt 途径,从而影响结肠癌细胞的增殖分化等过程,但是尚需实验进一步验证。

总之, miR-224 在结直肠癌的发生中发挥重要作用,很可能成为又一个新的结直肠癌的标记物,但 miR-224 在结直肠癌的表达是否具有临床

意义,另外其是通过何种通路调节结直肠癌细胞生长的尚需进一步研究和验证。

#### 参考文献

- [1] Fu J, Tang W, Du P, et al. Identifying microRNA-mRNA regulatory network in colorectal cancer by a combination of expression profile and bioinformatics analysis[J]. BMC Syst Biol, 2012, 6:68. doi: 10.1186/1752-0509-6-68.
- [2] 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.
- [3] 胡桂,陈道瑾,李小荣,等. microRNA-133b 抑制人结直肠癌细胞迁移和侵袭的研究[J]. 中国普通外科杂志, 2010, 19(4):359-363.
- [4] Zhang Y, Takahashi S, Tasaka A, et al. Involvement of microRNA-224 in cell proliferation, migration, invasion, and anti-apoptosis in hepatocellular carcinoma[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2013, 28(3):565-575.
- [5] Wang Y, Toh HC, Chow P, et al. MicroRNA-224 is up-regulated in hepatocellular carcinoma through epigenetic mechanisms[J]. FASEB J, 2012, 26(7):3032-3041.
- [6] Huang L, Dai T, Lin X, et al. MicroRNA-224 targets RKIP to control cell invasion and expression of metastasis genes in human breast cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 425(2):127-133.
- [7] Olaru AV, Yamanaka S, Vazquez C et al. MicroRNA-224 negatively regulates p21 expression during late neoplastic progression in inflammatory bowel disease[J]. Inflamm Bowel Dis, 2013, 19(3):471-480.
- [8] 屈昌民,梁书文,李连勇,等. MicroRNA 在直肠癌中的表达谱[J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(16):1407-1414.
- [9] Sugimura R, Li L. Noncanonical Wnt signaling in vertebrate development, stem cells, and diseases[J]. Birth Defects Res C Embryo Today, 2010, 90(4):243-256.
- [10] Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer[J]. Nat Rev Cancer, 8(5):387-398.
- [11] Jost E, Gezer D, Wilop S, et al. Epigenetic dysregulation of secreted Frizzled-related proteins in multiple myeloma[J]. Cancer Lett, 2009, 281(1):24-31.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式:于卫芳,樊智彬,张学明,等. microRNA-224 在结肠癌细胞中的表达及意义[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(4):478-482. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.04.015

Cite this article as: YU WF, FAN ZB, ZHANG XM, et al. MicroRNA-224 expression in colon cancer cells and its significance[J]. Chin J Gen Surg, 2014, 23(4):478-482. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.04.015