



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.10.012
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.10.012
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(10):1438-1443.

· 基础研究 ·

miRNA-186-5p 的表达与结肠癌细胞恶性表型的关系

曾庆华, 陈志康

(中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南 长沙 410008)

摘要

目的: 探究 miRNA-186-5p 在结肠癌中的表达与功能。

方法: 用 qPCR 检测 20 例配对的结肠癌与其癌旁组织标本, 以及正常肠上皮 NCM460 细胞与不同结肠癌细胞系 (HCT-116、HRT-18、HT-29) 中 miRNA-186-5p 的表达; 分别用 miRNA-186-5p 模拟物或阴性对照组序列转染 HCT-116 细胞后, 用 CCK-8 实验、平板克隆形成实验、划痕实验及 Transwell 侵袭实验检测细胞增殖、迁移和侵袭情况。

结果: miRNA-186-5p 在结肠癌组织中的表达明显低于相应癌旁组织中的表达, 在各结肠癌细胞系中均明显低于正常肠上皮 NCM460 细胞 (均 $P < 0.05$); 与转染阴性对照序列的 HCT-116 细胞比较, 转染 miRNA-186-5p 模拟物的 HCT-116 细胞, 细胞增殖能力明显降低、克隆形成数明显减少 (114.0 个 vs. 311.7 个)、划痕愈合率明显降低 (28.7% vs. 77.0%)、侵袭细胞数明显减少 (119.3 个 vs. 259.7 个), 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

结论: miRNA-186-5p 在结肠癌组织中低表达或缺失, 恢复 miRNA-186-5p 的表达水平能抑制结肠癌细胞的恶性表型, 提示 miRNA-186-5p 在结肠癌中发挥抑瘤作用。

关键词

结肠肿瘤; 微 RNAs; 细胞增殖; 肿瘤浸润
中图分类号: R735.3

Relationship between miRNA-18-5p expression and malignant phenotype of colon cancer cells

ZENG Qinghua, CHEN Zhikang

(Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract

Objective: To investigate the expression and function of miRNA-186-5p in colon cancer.

Methods: The miRNA-186-5p expressions in 20 paired specimens of colon cancer tissue and adjacent tissues as well as in normal intestinal epithelial NCM460 cells and different colon cancer cell lines (HCT-116, HRT-18 and HT-29) were determined by qPCR. Then, in HCT-116 cells after transfection with miRNA-186-5p mimics or negative control sequences, the cell proliferation, migration and invasion were measured by CCK-8 assay, plate colony-forming assay, scratch wound-healing assay and Transwell invasion assay, respectively.

Results: The miRNA-186-5p expression in colon cancer tissue was significantly lower than that in the adjacent tissue, and in each colon cancer cell line was significantly lower than that in normal intestinal

收稿日期: 2016-07-08; 修订日期: 2016-09-09。

作者简介: 曾庆华, 中南大学湘雅医院副主任技师, 主要从事普通外科相关方面的研究。

通信作者: 陈志康, Email: zhikang_chen@hotmail.com

epithelial NCM460 cells (all $P < 0.05$). In HCT-116 cells transfected with miRNA-186-5p mimics compared with HCT-116 cells transfected with negative control sequences, the proliferative ability was decreased, colony forming units were reduced (114.0 vs. 311.7), wound healing rate was lowered (28.7% vs. 77.0%), and the number of invaded cells was decreased (119.3 vs. 259.7), and all the differences had statistical significance (all $P < 0.05$).

Conclusion: The miRNA-186-5p expression is down-regulated or absent in colon cancer tissues, and restoring miRNA-186-5p expression can suppress the malignant phenotype in colon cancer cells. So it is suggested that miRNA-186-5p may play an anti-cancer role in colon cancer cells.

Key words

Colonic Neoplasms; MicroRNAs; Cell Proliferation; Neoplasm Invasiveness

CLC number: R735.3

结肠癌是常见的恶性肿瘤, 据统计, 2012年, 全球有将近70万患者死于结肠癌^[1]。近年来, 随着社会发展, 生活方式和饮食习惯等的改变, 结肠癌在中国的发病率也日益升高, 更加严重威胁人民群众的生命健康。有研究^[2]发现, 中国人已成为结肠癌的易发人群。因此, 加强结肠癌的基础和临床研究, 实现结肠癌的早期诊断和治疗, 不仅能有效控制疾病的进程, 还可极大地提高治疗效果。微小RNA (microRNA, miRNA) 是由19~24个核苷酸组成的一类短链非编码小RNA分子, 其通过碱基互补配对的原则, 介导靶基因mRNA的降解, 从而抑制靶蛋白的表达, 发挥基因表达调控的作用, 是一类重要的表观遗传调控方式^[3-5]。miRNA参与了各种生理病理过程的调控, 在结肠癌等恶性肿瘤的发生发展中, miRNA同样发挥了重要作用^[3, 5-6]。miRNA-186在肝癌, 食管癌等消化道肿瘤中, 存在表达缺失或降低, 恢复其表达水平, 能抑制肿瘤的恶性表型^[7-8]。同时, 分析基因表达综合数据库 (gene expression omnibus, GEO) 中的结肠癌的miRNA芯片数据后发现, miRNA-186-5p在结肠癌组织标本中显著低表达, 因此, 本研究通过一系列分子生物学和细胞生物学的方法, 初步探究miRNA-186-5p在结肠癌中的表达水平和基本功能。

1 材料与方法

1.1 标本和细胞

本实验中所用的组织均收集于中南大学普通外科2015年6月—2016年5月经手术切除后病理确诊为结肠癌的初诊患者。同时收集癌组织和相

应的癌旁组织, 共收集了20例配套标本。所有标本, 经切除后立即转入液氮罐中保存, 以备后续实验所用。患者均事先签订知情同意书。结肠癌细胞系HCT-116, HRT-18, HT-29均由本科室实验室保存, 培养基为RPMI1640+10%胎牛血清, 于37℃、5%CO₂细胞培养箱中进行培养。

1.2 试剂

RPMI1640、胎牛血清和0.25%胰蛋白酶购自以色列BI公司, TRIzol、Lipofectamine 2000和Transwell小室购自美国Thermo公司, miRNA检测试剂盒, miRNA-186-5p模拟物, miRNA-186-5p和U6引物均购自广州锐博生物科技有限公司 (详细序列公司出于商业目的并未提供), CCK-8购自南京诺唯瓊生物有限公司。

1.3 RNA 抽提与 qPCR 检测

利用经高温炙烤过灭活RNase的研钵, 在液氮存在下, 将组织标本磨碎, 加入1 mL TRIzol, 继续将组织磨成液状, 按照说明书继续提取RNA。细胞样本, 经洗涤后, 直接加入TRIzol, 进行RNA抽提。RNA经浓度和质量测定后, 根据说明书, 进行RNA逆转录和qPCR检测。以U6为内参, 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行相对定量分析。

1.4 miRNA 转染

转染前24 h, 以 2×10^5 个/孔密度接种HCT-116细胞于六孔板, 按Lipofectamine 2000说明书配制转染混合液, 将miRNA-186-5p模拟物和对照序列转染细胞, 终浓度50 nM。转染12 h后, 消化细胞, 进行后续实验分析。

1.5 CCK-8 实验

将分别转染miRNA-186-5p模拟物和对照序列的HCT-116细胞, 按照2 500个/孔的密度接种于

96孔板, 每组设置5个复孔, 于接种后24、48、72、96 h, 按10 μL /孔的比例, 加入CCK-8溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h后, 于450 nm下, 检测吸光值, 计算细胞生长速率。

1.6 平板克隆实验

将分别转染miRNA-186-5p模拟物和对照序列的HCT-116细胞, 按照1 000个/孔的密度接种于6孔板, 每组设置3个复孔, 连续培养8 d后, 弃培养基, 经甲醇固定, 结晶紫染色后, 计算细胞数>50的克隆数目。

1.7 划痕实验

将分别转染miRNA-186-5p模拟物和对照序列的HCT-116细胞, 按照 2.5×10^5 个/孔的密度接种于6孔板, 24 h后, 待细胞铺满整个孔的面积后, 利用200 μL 的tip, 垂直均匀用力划线, 经D-Hanks清洗后, 于倒置显微镜下观察初始划痕距离。培养36 h后, 于镜下再次观察划痕距离, 根据两次观察结果, 计算相对移动距离, 以相对移动距离与起始距离的比值, 评价细胞迁移速率。

1.8 Transwell 侵袭实验

将分别转染miRNA-186-5p模拟物和对照序列的HCT-116细胞, 按照 2.5×10^4 个/孔的密度(保证细胞悬液总体积为500 μL , FBS浓度为1%)接种于包被有基质胶的Transwell小室中, 下层为750 μL 5%FBS+RPMI1640培养基, 正常培养60 h后, 弃培养基, 经D-Hanks清洗及甲醇固定后, 进行结晶紫染色, 用棉签小心去除上层膜未穿过的细胞后, 于倒置显微镜下观察细胞穿过情况, 每组设置3个复孔, 每个孔随机选取5个视野, 计数穿过细胞数, 以平均数作为此孔的细胞穿过数, 取3个复孔的细胞穿过数进行统计学分析。

1.9 统计学处理

利用SPSS 18.0统计分析软件进行数据分析, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用两样本t检验比较实验组和对照组间的差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA-186-5p 在结肠癌组织中表达下调

利用qPCR检测了20对结肠癌和癌旁配对

组织中miRNA-186-5p的表达水平。结果显示, miRNA-186-5p在结肠癌中的表达水平明显低于其在配对癌旁组织中的表达水平, 差异有统计学意义($P < 0.01$) (图1)。

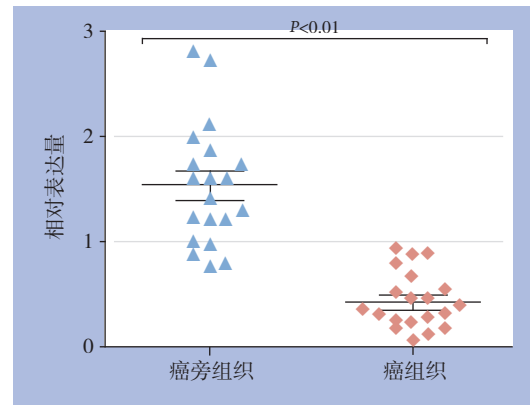


图1 qPCR检测结肠癌组织与癌旁组织miRNA-186-5p的表达

Figure 1 The miRNA-186-5p expressions in colon cancer tissues and their adjacent tissues detected by qPCR

2.2 miRNA-186-5p 在结肠癌细胞系中表达下调

在确认miRNA-186-5p在结肠癌组织中表达下降后, 进一步检测了miRNA-186-5p在结肠癌细胞系中的表达水平。qPCR结果显示, 与正常肠上皮NCM460细胞相比, miRNA-186-5p在结肠癌细胞系HCT-116、HRT-18、HT-29中的表达水平明显降低(均 $P < 0.05$) (图2)。

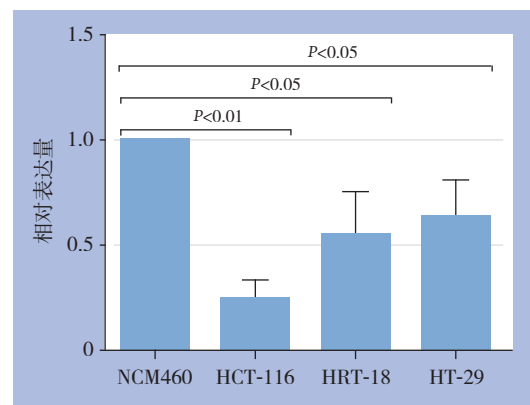


图2 qPCR检测结肠癌细胞系和正常结肠上皮细胞系中miRNA-186-5p的表达

Figure 2 The miRNA-186-5p expressions in different colon cancer cell lines and normal colon epithelial cells determined by qPCR

2.3 恢复 miRNA-186-5p 表达抑制结肠癌细胞 HCT-116 的生长和增殖

为了探究 miRNA-186-5p 表达对结肠癌细胞生长和增殖的影响, 将 miRNA-186-5p 模拟物瞬时转染 HCT-116 细胞 (miRNA-186-5p 本底表达水平最低, 图 2), 成功恢复了 HCT-116 细胞中 miRNA-186-5p 的表达水平 (图 3)。随后, 利用 CCK-8 和平板克隆形成实验, 分析了 miRNA-186-5p 对 HCT-116 细胞生长和增殖能力的影响。CCK-8 和克隆形成实验结果显示, 转染 miRNA-186-5p 模拟物后, HCT-116 细胞的生长速度较阴性对照组明显减慢 (图 4A), 克隆形成数较阴性对照组明显减少 [(114.0 ± 13.3) 个 vs. (311.7 ± 9.2) 个, $P < 0.01$] (图 4B)。

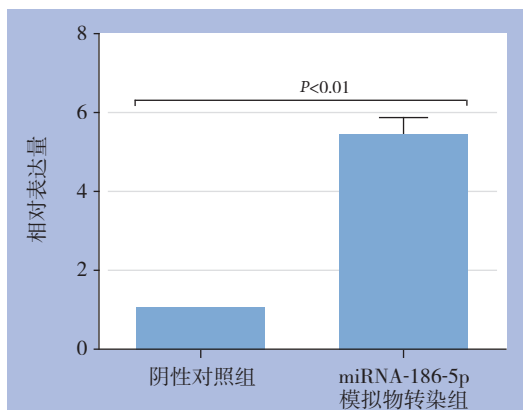


图 3 qPCR 检测转染 miRNA-186-5p 模拟物 HCT-116 细胞中 miRNA-186-5p 的表达

Figure 3 Detecting the expression of miRNA-186-5p in miRNA-186-5p mimic transfected HCT-116 cells by qPCR

2.4 恢复 miRNA-186-5p 表达抑制结肠癌细胞 HCT-116 迁移和侵袭

将 miRNA-186-5p 模拟物瞬时转染 HCT-116 细胞后, 利用划痕实验和 Transwell 小室侵袭实验, 研究 miRNA-186-5p 对 HCT-116 细胞迁移和侵袭能力的影响。实验结果显示, 转染 miRNA-186-5p 模拟物后, HCT-116 细胞的迁移距离较阴性对照组

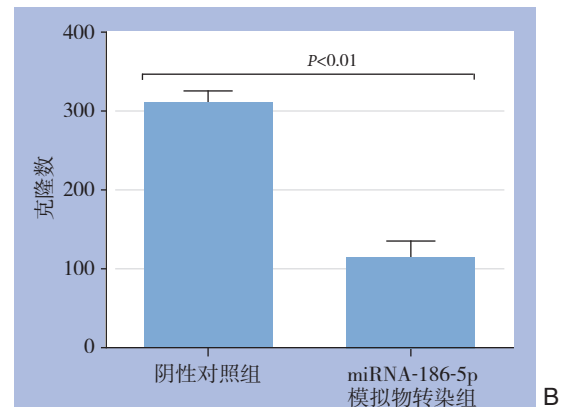
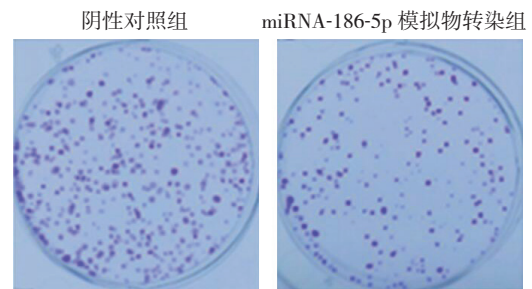
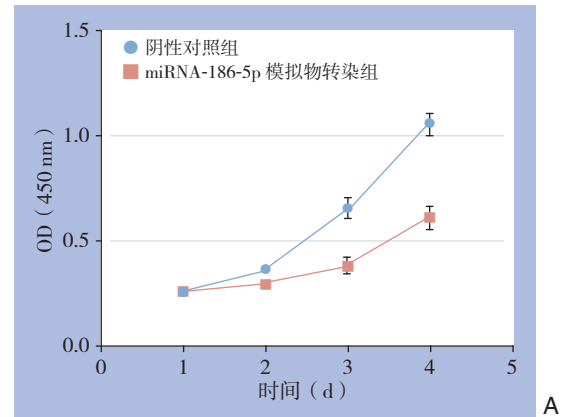


图 4 细胞生长和增殖能力检测 A: CCK-8 检测细胞生长速度; B: 克隆形成实验检测细胞增殖

Figure 4 Measurement of cell growth and proliferation A: CCK-8 assay for cell growth; B: Colony-forming assay cell proliferation

明显变短 [(28.7 ± 2.2) % vs. (77.0 ± 4.2) %, $P < 0.01$] (图 5A), 消化基质胶的能力下降, 穿过微孔膜的细胞数目较阴性对照组明显减少 [(119.3 ± 16.0) 个 vs. (259.7 ± 31.7) 个, $P < 0.05$] (图 5B)。

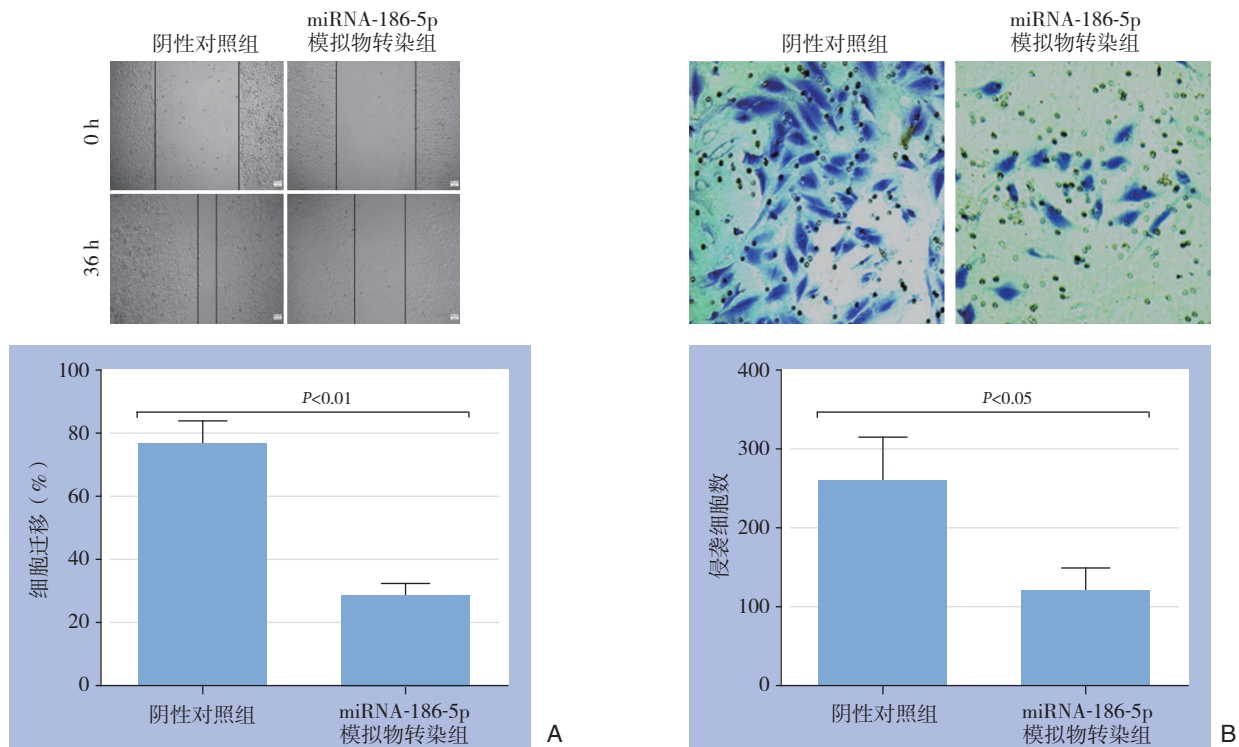


图 5 细胞迁移和侵袭能力检测 A: 划痕实验检测细胞迁移; B: Transwell 实验检测细胞侵袭

Figure 5 Examination of cell migration and invasion A: Scratch wound-healing assay for cell migration; B: Transwell assay for cell invasion

3 讨论

miRNA参与调控肿瘤发生发展的各个过程,如细胞周期进程、细胞凋亡、细胞干性、放化疗敏感性等。同时,miRNA还是理想的生物标志物,可应用于肿瘤进程和临床治疗预后的判断。miRNA在大肠恶性转化中同样发挥了重要作用^[3, 9]。数十个miRNA被证实与结肠癌的恶性特征密切相关,包括miRNA-23a、miRNA-135b等促进结肠癌发展的促癌miRNA及let-7a、miRNA-138等抑制结肠癌发展的抑癌miRNA^[3, 6, 10-12]。新近研究^[13-14]表明,miRNA-186与炎症反应,衰老,尤其是肿瘤发生等生理病理进程密切相关,已证实其在肝癌、食管鳞状细胞癌等消化系统肿瘤,以及肺癌、卵巢癌等肿瘤中表达缺失或降低^[7-8, 15-18]。尽管已有文献^[19]证实miRNA-186在结直肠神经内分泌肿瘤中表达水平降低,但其在更大范围病理类型的结肠癌中的表达水平和功能仍有待进一步研究。基于GEO miRNA表达谱芯片数据的提示,本研究利用qPCR验证了miRNA-186-5p在结肠癌组织中的表达情况,结果显示miRNA-186-5p在结肠癌组织中低表达,与芯片结果一致,同时也验证了Wang

等^[19]证实的miRNA-186在结直肠神经内分泌肿瘤中低表达这一结论^[15],提示miRNA-186-5p在结肠癌中起负调控作用。

miRNA主要通过靶向不同靶基因,调控肿瘤细胞的生长和增殖,侵袭转移,放化疗敏感性等单个或多个生物学效应而发挥促进或抑制作用^[20-21]。已知,miRNA-186可以通过靶向不同靶基因,抑制肿瘤细胞生长和侵袭,诱导其凋亡,增强其化疗敏感性。比如,恢复肝癌细胞系HepG2、Hep3B及SNU398中miRNA-186的表达,能通过靶向YAP1蛋白,抑制Hippo信号通路,抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭等恶性表型^[7];在食管鳞状细胞癌中,miRNA-186过表达能抑制SKP2的表达,诱导食管鳞状细胞系凋亡,而抑制其生长^[8]。在非小细胞肺癌细胞系中,转染miRNA-186模拟物后,能靶向抑制ROCK1,MAP3K2的表达,进而抑制细胞的生长和迁移^[15-16];在多发骨髓瘤细胞系U266和RPMI-8226中,外源表达miRNA-186,能通过靶向抑制Jagged1,引起细胞周期G₁/S阻滞,从而抑制细胞的增殖^[17];在卵巢癌中,转染miRNA-186模拟物,能显著增强肿瘤对化疗药物紫杉醇和顺铂的敏感性^[18]。本研究通过转染

miRNA-186模拟物,恢复结肠癌细胞HCT-116中miRNA-186-5p的表达水平后,HCT-116细胞的生长和增殖速率明显减慢,细胞的迁移和侵袭能力也显著下降。因此,本研究从细胞水平证实,同肝癌等其它肿瘤类似,miRNA-186在结肠癌中发挥抑瘤作用。

综上所述,本研究首次从临床样本和细胞水平证实了miRNA-186-5p在结肠癌中表达降低,并进一步证实其在结肠癌中发挥抑瘤功能,但是miRNA-186-5p调控的靶基因及调控的靶细胞通路等具体的分子机制还有待进一步查实。

参考文献

- [1] Leung DY, Chow KM, Lo SW, et al. Contributing Factors to Colorectal Cancer Screening among Chinese People: A Review of Quantitative Studies[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2016, 13(5):pii: E506. doi: 10.3390/ijerph13050506.
- [2] Sung JJ, Lau JY, Goh KL, et al. Increasing incidence of colorectal cancer in Asia: implications for screening[J]. *Lancet Oncol*, 2005, 6(11):871-876.
- [3] Li X, Nie J, Mei Q, et al. MicroRNAs: Novel immunotherapeutic targets in colorectal carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(23):5317-5331.
- [4] Celluzzi A, Masotti A. How Our Other Genome Controls Our Epi-Genome[J]. *Trends Microbiol*, 2016, 24(10):777-787.
- [5] Enokida H, Yoshino H, Matsushita R, et al. The role of microRNAs in bladder cancer[J]. *Investig Clin Urol*, 2016, 57(Suppl 1):S60-76.
- [6] 李军, 许荣华, 周晓华, 等. 上调miRNA-34a表达对人结肠癌细胞体外生长的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(4):524-528.
Li J, Xu RH, Zhou XH, et al. Effect of miRNA-34a up-regulation on growth of human colon cancer cells in vitro[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2016, 25(4):524-528.
- [7] Ruan T, He X, Yu J, et al. MicroRNA-186 targets Yes-associated protein 1 to inhibit Hippo signaling and tumorigenesis in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(4):2941-2945.
- [8] He W, Feng J, Zhang Y, et al. microRNA-186 inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human esophageal squamous cell carcinoma by targeting SKP2[J]. *Lab Invest*, 2016, 96(3):317-324.
- [9] Okugawa Y, Grady WM, Goel A. Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers[J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(5):1204-1225.
- [10] Yi R, Li Y, Wang FL, et al. MicroRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers in colorectal cancer[J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2016, 8(4):330-340.
- [11] 姜训圳, 赵科, 何向辉. miRNA-21、miRNA-135b、miRNA-141在结肠癌中的表达及其意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(10):1367-1372.
Jiang XZ, Zhao K, He XH. Expressions of miRNA-21, miRNA-135b and miR-141 in colon cancer and the significance[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2014, 23(10):1367-1372.
- [12] 雷伟琦, 胡谦, 王思远, 等. miR-101在结直肠癌中的研究进展 [J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(4):592-597.
Lei WQ, Hu Q, Wang SY, et al. Role of miR-101 in colorectal cancer: recent advances[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2016, 25(4):592-597.
- [13] Yao Y, Zhang X, Chen H P, et al. MicroRNA-186 promotes macrophage lipid accumulation and secretion of pro-inflammatory cytokines by targeting cystathionine γ -lyase in THP-1 macrophages[J]. *Atherosclerosis*, 2016, 250:122-132.
- [14] Kim J, Yoon H, Chung DE, et al. miR-186 is decreased in aged brain and suppresses BACE1 expression[J]. *J Neurochem*, 2015, 137(3):436-445.
- [15] Zhang J, Du Y, Wu C, et al. Curcumin promotes apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through miR-186* signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2010, 24(5):1217-1223.
- [16] Huang T, She K, Peng G, et al. MicroRNA-186 suppresses cell proliferation and metastasis through targeting MAP3K2 in non-small cell lung cancer[J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(4):1437-1444.
- [17] Liu Z, Zhang G, Yu W, et al. miR-186 inhibits cell proliferation in multiple myeloma by repressing Jagged1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 469(3):692-697.
- [18] Sun KX, Jiao JW, Chen S, et al. MicroRNA-186 induces sensitivity of ovarian cancer cells to paclitaxel and cisplatin by targeting ABCB1[J]. *J Ovarian Res*, 2015, 8:80. doi: 10.1186/s13048-015-0207-6.
- [19] Wang M, Xia X, Chu W, et al. Roles of miR-186 and PTTG1 in colorectal neuroendocrine tumors[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(12):22149-22157.
- [20] Acunzo M, Romano G, Wernicke D, et al. MicroRNA and cancer—a brief overview[J]. *Adv Biol Regul*, 2015, 57:1-9. doi: 10.1016/j.jbior.2014.09.013.
- [21] Hayes J, Peruzzi P P, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy[J]. *Trends Mol Med*, 2014, 20(8):460-469.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 曾庆华, 陈志康. miRNA-186-5p的表达与结肠癌细胞恶性表型的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(10):1438-1443. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.10.012
Cite this article as: Zeng QH, Chen ZK. Relationship between miRNA-18-5p expression and malignant phenotype of colon cancer cells[J]. *Chin J Gen Surg*, 2016, 25(10):1438-1443. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.10.012