

miR-181d 在结肠癌中 表达失调并抑制癌细胞增殖及凋亡*

吴奇¹, 申高飞², 孙丽娜², 汪鑫², 耿蕾², 杜风², 赵晓迪², 卢媛媛²

(1. 第四军医大学学员旅, 西安 710032;

2. 第四军医大学西京消化病医院 肿瘤生物学国家重点实验室, 西安 710032)

摘要:目的 检测结肠癌细胞系中 miR-181d 的表达水平, 研究 miR-181d 对结肠癌细胞增殖及凋亡的影响。方法 RT-qPCR 检测结肠癌细胞 HCT116, HT29, LoVo, SW480 及 SW620 和永生化肠黏膜上皮细胞 HIEC 中 miR-181d 的表达。在 LoVo 细胞中转染 miR-181d 模拟物及对照, SW620 细胞中转染 miR-181d 抑制物及对照, RT-qPCR 检测转染效率, MTT 法检测细胞增殖, 流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡比例。结果 miR-181d 表达水平在各结肠癌细胞系中均较正常肠黏膜上皮细胞 HIEC 显著降低 ($F=29.34, P<0.01$)。在 LoVo 细胞中过表达 miR-181d 能够显著减慢细胞体外增殖 ($F=5.403, P<0.01$), 细胞周期检测示 S 期细胞比例降低 ($t=4.71, P<0.05$), 凋亡细胞显著增多 ($t=3.47, P<0.05$)。在 SW620 细胞中抑制 miR-181d 的表达能够显著加快细胞体外增殖 ($F=20.82, P<0.01$), 细胞周期检测示细胞周期加速, S 期细胞比例增高 ($t=2.92, P<0.05$), 细胞凋亡率显著减少 ($t=4.14, P<0.05$)。结论 miR-181d 在结肠癌细胞系中表达普遍下调, 有望成为结肠癌新的诊断标志物。miR-181d 能够通过抑制结肠癌细胞增殖和促进凋亡, 发挥抑癌基因的作用。

关键词: 结肠癌; miR-181d; 增殖; 凋亡

中图分类号: R735.35; R730.43 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)02-015-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.02.004

miR-181d Inhibits Proliferation and Promotes Apoptosis in Colon Cancer Cells

WU Qi¹, SHEN Gao-fei², SUN Li-na², WANG Xin², GENG Lei², DU Feng², ZHAO Xiao-di²,

LU Yuan-yuan² (1. Student Brigade, the Fourth Military Medical University,

Xi'an 710032, China; 2. State Key Laboratory of Cancer Biology, Xijing Hospital

of Digestive Diseases, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: Objective To detect miR-181d expression levels in colon cancer cell lines, and to study the functions of miR-181d on colon cancer cell proliferation and apoptosis. **Methods** RT-qPCR was employed to study miR-181d expression levels in colon cancer cell line HCT116, HT29, LoVo, SW480 and SW620 cells, as well as in colon normal epithelial cell line HIEC. miR-181d mimic and control were transfected into LoVo cells while miR-181d inhibitor and control were transfected into SW620 cells. qRT-PCR was performed to validate the transfection efficiency. MTT assay was performed to measure cell proliferation while flow cytometry was performed to detect cell cycle and apoptosis rate. **Results** miR-181d was universally downregulated in all colon cancer cell lines compared to the colon normal epithelial cell line HIEC ($F=29.34, P<0.01$). Overexpression of miR-181d in LoVo cells significantly decreased in vitro cell proliferation rate ($F=5.403, P<0.01$). Flow cytometry indicated that cells at S phase were greatly decreased ($t=4.71, P<0.05$) and apoptotic cells were greatly increased compared to the control cells ($t=3.47, P<0.05$). On the contrary, inhibition of miR-181d in SW620 cells significantly promoted cell proliferation ($F=20.82, P<0.01$). Cell cycle was accelerated with significant increase in S phase compared to the control cells ($t=2.92, P<0.05$), whereas apoptosis ratio was significantly decreased ($t=4.14, P<0.05$). **Conclusion** miR-181d was universally downregulated in colon cancer cell lines compared to the normal epithelial cell line. miR-181d inhibits cell proliferation and induces apoptosis, thus functions as an tumor suppressive miRNA.

Keywords: colon cancer; miR-181d; proliferation; apoptosis

结直肠癌为全球范围内高发的恶性肿瘤。我国结直肠癌的发病率一直继胃癌、食管癌和肝癌之后, 位于消化系统肿瘤发病率的第四位^[1]。近年来

随着生活方式西化, 人群肥胖比率增高且缺乏锻炼, 我国结直肠癌的发病率和死亡率总体呈上升趋势^[2]。深入理解结直肠癌的发生发展机制, 寻找合

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81572929, 81602641)。

作者简介: 吴奇(1995-), 男, 在读本科生, E-mail: wcsqwq@qq.com。

通讯作者: 卢媛媛(1982-), 女, 主治医师, 讲师, 研究方向: 消化道肿瘤的分子诊断及治疗靶点研究, E-mail: luyuanreamer@aliyun.com。

赵晓迪(1987-), 主治医师, 讲师, 研究方向: 消化系统肿瘤发生发展的分子机制研究, E-mail: leedyzhao@aliyun.com。

适的诊断标志物和治疗靶标迫在眉睫。microRNA (miRNA) 是一类在真核细胞中发挥重要调控作用的内源性非编码 RNA, 其通过“一对多”的转录后调控作用, 影响肿瘤发生发展多个信号通路表达水平, 从而调控肿瘤细胞各种恶性生物学行为^[3]。

近年来, 众多研究揭示, miR-181 家族在多种肿瘤中表达失调, 其作用和机制也逐渐被揭示。在非小细胞肺癌、乳腺癌和胶质母细胞瘤中, miR-181 家族的表达均显著降低, 能够抑制肿瘤细胞增殖、侵袭和转移表型, 且其表达水平与患者预后生存时间显著相关^[4~6]。但是, miR-181 家族在结肠癌中的表达情况和作用机制尚未知。本研究研究了 miR-181d 在结肠癌细胞中的表达水平, 通过对结肠癌细胞转染 miR-181d 模拟物和抑制物, 观察 miR-181d 对结肠癌细胞增殖和凋亡的影响, 初步揭示了 miR-181d 在结肠癌中表达失调及发挥抑癌作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象 正常肠黏膜上皮永生化细胞 HIEC 和结肠癌细胞系 HCT116, HT29, LoVo, SW480 及 SW620 引自军事医学科学院, 由本所保存。细胞生长于含 10 ml/dl 的小牛血清以及 1 g/dl 青链霉素的 DMEM 培养液, 于 37℃, 5 ml/dl CO₂ 培养箱内培养传代。

1.2 试剂和仪器 DMEM 培养液、0.25 g/dl EDTA-胰蛋白酶、小牛血清、青链霉素和 Opti-MEM 培养液 (美国 Gibco 公司); Lipofectamine 2000 (美国 Invitrogen 公司); miRNeasy mini kit (美国 Qiagen 公司); miR-181d 及 U6 snRNA 逆转录及 qPCR 引物 (美国 Life Technologies 公司); miR-181d 模拟物、抑制物及对照 (锐博生物); Annexin V-FITC/PI 检测试剂盒 (美国 BD 公司); MTT, 二甲基亚砜 (美国 Sigma 公司)。CO₂ 细胞培养箱 (美国 Thermo 公司); 光学倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); 台式高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); 实时定量 PCR 仪 (美国 Bio-rad 公司); 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞转染: miRNA 模拟物和抑制物转染实验时, 取对数生长期细胞接种于 6 孔板, 用 Lipofectamine 2000 为载体, 在 Opti-MEM 培养液中进行转染。分为 miR-181d 模拟物转染组, 阴性对照组 NC, miR-181d 抑制物转染组和阴性对照组 NC, 转染浓度均为 20 nmol/L。转染 8 h 后换液, 行后续功能实验。

1.3.2 qRT-PCR 检测 miR-181d 表达水平: 收集

对数生长期细胞, 使用 miRNeasy 试剂盒抽提细胞 RNA 并测量 RNA 浓度及 A_{260nm}/A_{280nm} 比值。使用逆转录试剂盒说明书将 mRNA 反转录为 cDNA, 设置反应体系为 20 μl, 设置逆转录反应程序为: 16℃ 30 min, 42℃ 30 min, 85℃ 5 min。使用 PCR 试剂盒说明书检测 miR-181d 在各细胞系中的表达, 设置 U6 snRNA 为内参, 设置反应体系为 20 μl, 设置 PCR 反应程序为: 95℃ 20 s, 95℃ 1 s, 60℃ 20 s, 50 个反应循环。以 U6 snRNA 基因为内参, 通过 2^{-ΔΔCT} 方法分析 qPCR 数据。

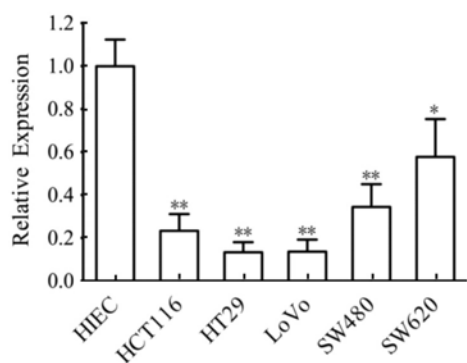
1.3.3 MTT 细胞增殖实验: 取对数生长期细胞 2 × 10⁴/孔, 种植至 48 孔板, 每个检测设置 4 个复孔, 连续检测 5 天。每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 工作液, 37℃ 持续孵育 3 h, 随后将培养上清置换成 150 μl DMSO, 溶解甲瓞产物。酶标仪读取吸光度, 检测波长为 570 nm, 以 650 nm 的背景读数扣减。同时设置仅含培养液的孔作为空白对照, 并根据数值绘制生长曲线。

1.3.4 流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡: 将细胞以 5 × 10⁵/孔接种于 6 孔板, 80% 汇合后行细胞转染。24 h 后加无血清培养液同步化 18 h, 换等量培养液培养 24 h, 胰酶消化收集细胞, PBS 洗两遍, 弃上清, 加入 1 ml 70 ml/dl 预冷乙醇, 4℃ 固定 12 h。PBS 洗涤去乙醇和重悬细胞, 加入 50 μg/ml PI 和 RNase A 至终浓度, 37℃ 温浴后, 流式细胞仪测定周期。检测凋亡时, 转染 24 h 后收集各组细胞, 制成单细胞悬液, 根据 BD 凋亡试剂盒说明书加入试剂, 流式细胞术检测细胞凋亡率。

1.4 统计学分析 所有实验均重复 3 次, 数据采用 SPSS19.0 软件分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 均数间两两比较采用 *t* 检验, MTT 细胞增殖曲线分析采用重复测量方差分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

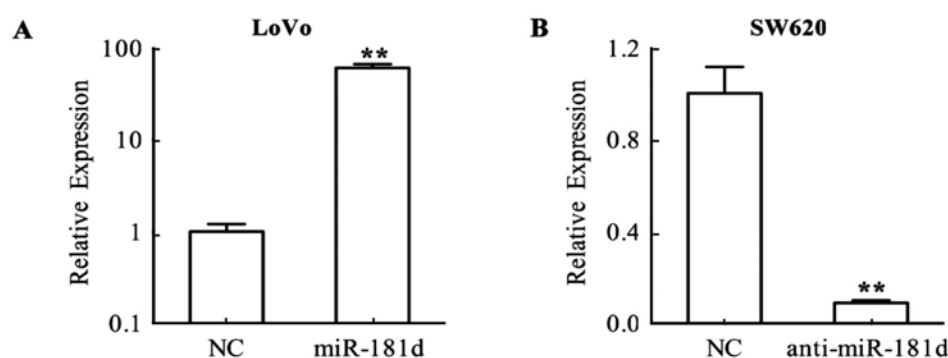
2 结果

2.1 结肠癌细胞系中 miR-181d 的表达水平 收集永生化肠黏膜上皮细胞 HIEC 和结肠癌细胞 HCT116, HT29, LoVo, SW480 和 SW620 细胞, 提取总 RNA, qRT-PCR 检测结肠癌细胞系中 miR-181d 的表达水平 (图 1)。以 HIEC 中 miR-181d 的表达水平为对照, HCT116, HT29, LoVo, SW480 和 SW620 中 miR-181d 的表达水平分别为 0.234 ± 0.08, 0.134 ± 0.046, 0.136 ± 0.057, 0.345 ± 0.106, 0.578 ± 0.176。miR-181d 在结肠癌细胞系中的表达水平均较正常细胞系表达显著减低, 差异有统计学意义, 提示 miR-181d 可能发挥抑癌作用。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图1 结肠癌细胞系及正常肠黏膜上皮细胞中 miR-181d 表达水平



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图2 上调和下调 miR-181d 后的表达水平验证

2.3 miR-181d 对结肠癌细胞增殖的影响 MTT 细胞增殖实验连续 5 天观察过表达及下调 miR-181d 对结肠癌细胞 LoVo 及 SW620 的生长影响, 根据酶标仪检测数值绘制生长曲线(图 3)。结果显示, 与 LoVo-NC 细胞相比, LoVo-miR-181d 细

胞体外增殖能力明显减慢 ($F = 5.403$, $P < 0.01$); 与 SW620-NC 细胞相比, SW620-anti-miR-181d 细胞体外增殖能力明显增强 ($F = 20.82$, $P < 0.01$)。以上结果提示, miR-181d 能够抑制结肠癌细胞的体外增殖, 发挥抑癌作用。

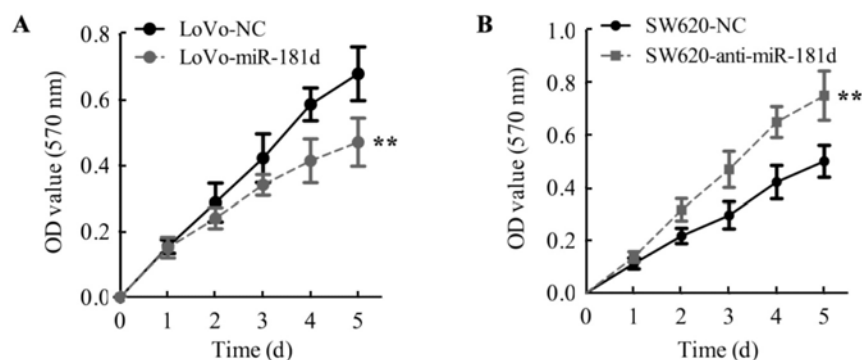


图3 MTT 细胞增殖实验

2.4 miR-181d 对结肠癌细胞周期的影响 转染细胞经同步化后, 流式细胞术检测细胞周期在 24 h 的变化。结果显示(图 4), 在 LoVo 细胞中上调 miR-181d 的表达可以显著降低 S 期细胞的比例

($36.52\% \pm 0.87\%$ vs $53.18\% \pm 3.43\%$, $t = 4.71$, $P < 0.05$), G1 期细胞比率显著增加 ($48.48\% \pm 1.91\%$ vs $34.38\% \pm 3.43\%$, $t = 3.59$, $P < 0.05$), 细胞滞留于 G0/G1 期。在 SW620 细胞中下调

miR-181d 的表达可以增加 S 期细胞的比例 (48.06%±4.48% vs 32.38%±2.95%, $t=2.92$, $P<0.05$), G1 期细胞比率显著减少 (37.84%±

3.32% vs 54.17%±3.115%, $t=3.59$, $P<0.05$), 细胞周期加速。

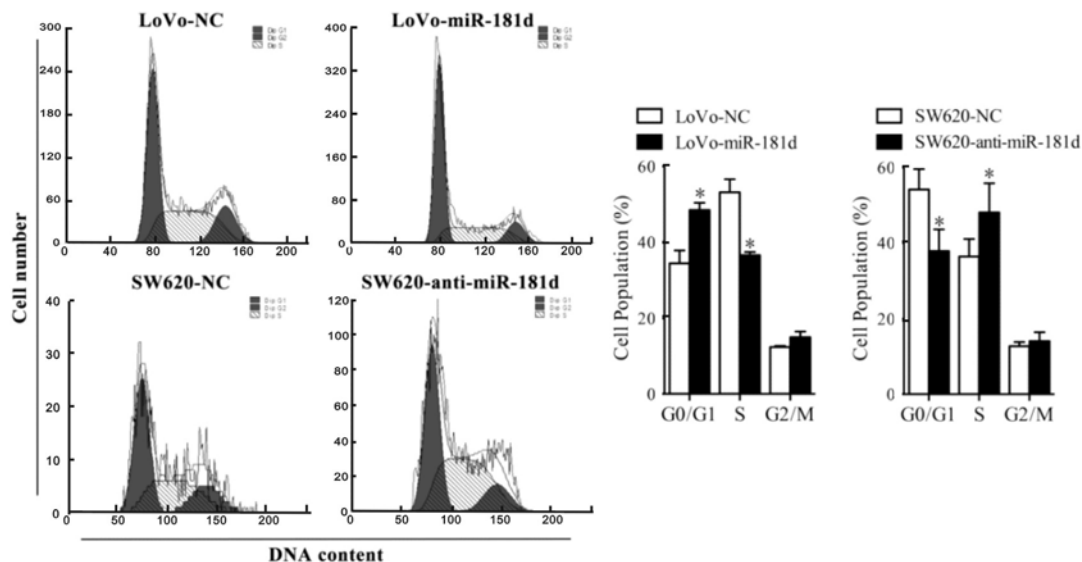


图4 流式细胞术检测 miR-181d 上下调后细胞周期变化

2.5 miR-181d 对结肠癌细胞凋亡的影响 应用 Annexin V 和 PI 双染细胞, 流式细胞术检测细胞凋亡。LoVo-miR-181d 在无血清处理 18 h 后, 发生凋亡的细胞比例为 10.93%±2.13%, 较对照转染细胞 LoVo-NC 中的细胞凋亡比例 (3.27%±0.59%) 明显增高 3.34 倍 ($t=3.47$, $P<0.05$), 表明 miR-181d 能够促进结肠癌细胞发生凋亡; 而在

SW620 细胞中下调 miR-181d 表达, SW620-anti-miR-181d 细胞较对照组细胞 SW620-NC 发生凋亡的细胞比例明显减少, 分别是 4.03%±0.81% 和 10.63%±1.37%, 减少到对照的 37.9%, 差异有统计学显著意义 ($t=4.14$, $P<0.05$), 表明下调 miR-181d 能够诱导结肠癌细胞发生凋亡抵抗。

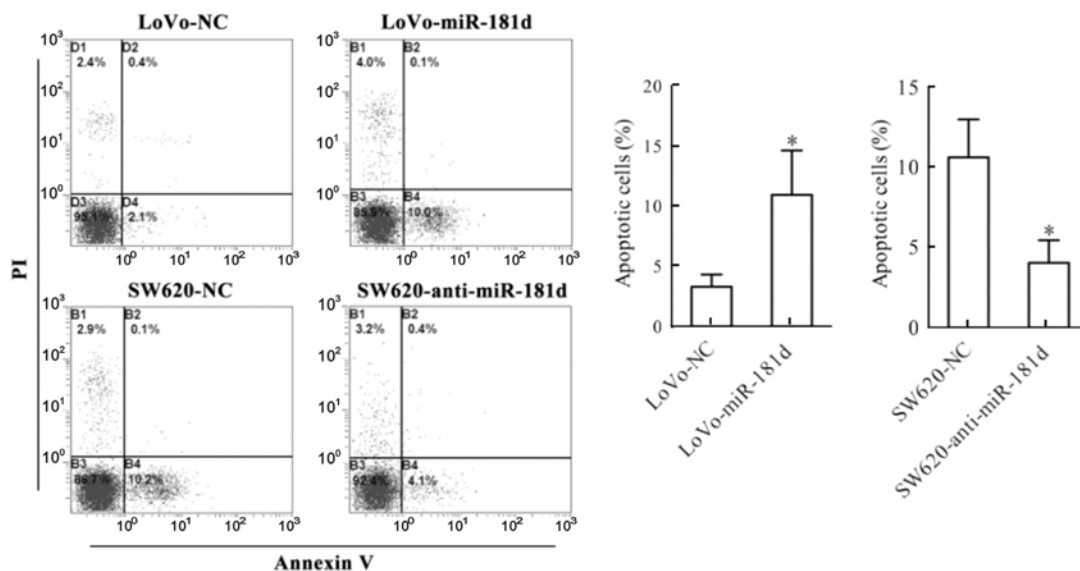


图5 流式细胞术检测 miR-181d 上下调后细胞凋亡比例变化

3 讨论 miRNA 是一类平均长度为 22 个核苷酸的內源性小分子 RNA, 其通过靶向蛋白表达基因

的 mRNA, 促进降解或抑制翻译, 在转录后水平调控基因表达^[7]。肿瘤中存在一系 (下转 22 页)

- [6] Li D, Jia H, Zhang H, et al. TLR4 signaling induces the release of microparticles by tumor cells that regulate inflammatory cytokine IL-6 of macrophages via microRNA let-7b[J]. *Oncoimmunology*, 2012, 1(5): 687-693.
- [7] Guo LJ, Yang YH, Liu J, et al. Differentially expressed plasma microRNAs and the potential regulatory function of Let-7b in chronic thromboembolic pulmonary hypertension [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e101055.
- [8] Zhang AY, Guo YF, Zhang SG, et al. Cytokine effects and cellular signaling pathways of grass carp HSP70 in head kidney leukocytes[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(2): 550-556.
- [9] 钱 铮, 陈孙孝, 任传路, 等. 原发性胆汁性肝硬化患者 miR-let-7b 的异常表达及其意义[J]. *中华肝脏病杂志*, 2013, 21(7): 533-536.
- Qian C, Chen SX, Ren CL, et al. Abnormal expression of miR-let-7b in primary biliary cirrhosis and its clinical significance[J]. *Chin J Hepatol*, 2013, 21(7): 533-536.
- [10] McLean MH, El-Omar EM. Genetics of gastric cancer[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2014, 11(11): 664-674.

收稿日期: 2016-08-14

修回日期: 2016-12-28

(上接 18 页)列表达异常、且发挥促癌或抑癌功能的 miRNA, 能够参与肿瘤发生和发展过程, 在染色体异常、基因突变、基因多态性和表观遗传学改变等过程中发挥重要作用, 有望用于临床监测肿瘤的发生发展, 为治疗提供新的靶标。

miR-181 家族包括 miR-181a, miR-181b, miR-181c 和 miR-181d 四个分子, 它们在细胞免疫调节、发育、分化和肿瘤发生发展中发挥重要的调控作用。在免疫调节方面, miR-181 家族在 NKT 细胞早期发育和 TCR 信号阈值调定中发挥重要作用^[8]; 丙肝病毒能够诱导 miR-181a 表达下调, 从而抑制 CD4 阳性 T 细胞的细胞免疫反应^[9]。在多种肿瘤中, miR-181 家族表达降低, 且与不良预后密切相关。如在胶质母细胞瘤中, 过表达 miR-181b 能够逆转上皮间质转化, 抑制肿瘤生长^[5]; 在乳腺癌中, miR-181a 能够通过靶向乳腺癌耐药蛋白 (BCRP) 分子, 从而部分逆转米托蒽醌介导的细胞耐药; miR-181a 还能够通过抑制 MMP14, 抑制肿瘤细胞迁移和血管生成^[10]。

然而, miR-181 家族在结肠癌中的表达和其功能鲜有报道。仅有一篇文献报道, miR-181a 表达水平能够预测病人抗表皮生长因子受体 (EGFR) 治疗的疗效^[11]。本研究发现, miR-181d 在结肠癌细胞系中较正常肠粘膜上皮细胞 HIEC 表达显著降低。体外上下调和功能实验证实, miR-181d 能够显著抑制结肠癌细胞的增殖, 使细胞周期 G0/G1 阻滞, 并促进其凋亡。miR-181d 在结肠癌中普遍下调并发挥抑癌作用, 提示其有望作为诊断和治疗结肠癌的新的候选分子标志物和分子靶标。进一步深入研究 miR-181d 的作用靶分子及相关分子信号通路, 有望阐明 miR-181d 在结肠癌中发挥抑癌作用的分子机制, 为其进一步在临床实践中作为分子标志物应用和进行靶向治疗奠定理论和实践基础。

参考文献:

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in

China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.

- [2] 李道娟, 李 倩, 贺宇彤. 结直肠癌流行病学趋势[J]. *肿瘤防治研究*, 2015, 42(3): 305-310.
- Li DJ, Li Q, He YT. Epidemiological trends of colorectal cancer[J]. *Cancer Research on Prevention and Treatment*, 2015, 42(3): 305-310.
- [3] 王钦君, 张红春, 申娟娟, 等. microRNAs 作为结直肠癌潜在标记物的研究进展[J]. *现代检验医学杂志*, 2015, 30(4): 107-110, 114.
- Wang QJ, Zhang HC, Shen XJ, et al. microRNA as a potential marker in the progress of colorectal cancer [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2015, 30(4): 107-110, 114.
- [4] Kastrati I, Canestrari E, Frasor J. PHLDA1 expression is controlled by an estrogen receptor-NFkappaB-miR-181 regulatory loop and is essential for formation of ER+ mammospheres[J]. *Oncogene*, 2015, 34(18): 2309-2316.
- [5] Wang H, Tao T, Yan W, et al. Upregulation of miR-181s reverses mesenchymal transition by targeting KPNA4 in glioblastoma[J]. *Sci Rep*, 2015(5): 13072.
- [6] Huang P, Ye B, Yang Y, et al. MicroRNA-181 functions as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer (NSCLC) by targeting Bcl-2[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(5): 3381-3387.
- [7] Dalmay T, Edwards DR. MicroRNAs and the hallmarks of cancer[J]. *Oncogene*, 2006, 25(46): 6170-6175.
- [8] Henao-Mejia J, Williams A, Goff LA, et al. The microRNA miR-181 is a critical cellular metabolic rheostat essential for NKT cell ontogenesis and lymphocyte development and homeostasis [J]. *Immunity*, 2013, 38(5): 984-997.
- [9] Li GY, Zhou Y, Ying RS, et al. Hepatitis C virus-induced reduction in miR-181a impairs CD4(+) T-cell responses through overexpression of DUSP6 [J]. *Hepatology*, 2015, 61(4): 1163-1173.
- [10] Li Y, Kuscu C, Banach A, et al. miR-181a-5p inhibits cancer cell migration and angiogenesis via downregulation of matrix metalloproteinase-14 [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(13): 2674-2685.
- [11] Pichler M, Winter E, Ress AL, et al. miR-181a is associated with poor clinical outcome in patients with colorectal cancer treated with EGFR inhibitor[J]. *J Clin Pathol*, 2014, 67(3): 198-203.

收稿日期: 2017-01-10

修回日期: 2017-02-12