

结肠癌组织中 microRNA-126 表达及临床意义*

李洪, 唐浏, 郑淋, 刘娴 (琼海市人民医院检验科, 海南琼海 571400)

摘要:目的 探讨 microRNA-126 在结肠癌组织中的表达及生物学意义。方法 收集 104 例结肠癌手术患者, 实时定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测结肠癌患者的结肠癌组织以及癌旁组织中 microRNA-126 的表达(共 104 对)。应用慢病毒表达载体构建 microRNA-126 细胞系, 并进一步通过体外实验研究 microRNA-126 对结肠癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。结果 结肠癌组织中 microRNA-126 相对表达水平(0.63 ± 0.11)明显低于癌旁组织(1.08 ± 0.15), 差异有统计学意义($t=14.561, P<0.01$)。结肠癌组织中 microRNA-126 表达阳性率(61.5%)显著低于癌旁组织(86.5%), 差异有统计学意义($\chi^2=16.908, P<0.05$)。microRNA-126 表达与结肠癌 Dukes 分期、浸润深度、有无淋巴结转移及远处转移明显相关($P<0.05$)。在有基质胶的 Transwell 实验中, 转染组细胞迁移数(11.26 ± 4.85 个)明显低于空白对照组(264.37 ± 32.15 个), 差异有统计学意义($t=23.418, P<0.01$)。无基质胶的 Transwell 实验中, 转染组细胞迁移数(83.75 ± 13.74 个)也明显低于空白对照组(339.64 ± 26.38 个), 差异有统计学意义($t=12.682, P<0.01$)。microRNA-126 可以抑制 SW480 细胞的增殖及其侵袭转移。结论 microRNA-126 可明显抑制结肠癌细胞的发生发展, 影响结肠癌细胞的生物学行为。

关键词:结肠癌; microRNA-126; 生物学功能

中图分类号: R735.35; R730.43 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)04-060-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.04.017

Expression of microRNA-126 in Colon Cancer and Its Clinical Significance

LI Hong, TANG Liu, ZHENG Lin, LIU Xian (Department of

Clinical Laboratory, Qionghai People's Hospital, Hainan Qionghai 571400, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression and biological significance of microRNA-126 in colon cancer tissue. **Methods** The expression of microRNA-126 in colon cancer tissues and adjacent tissues of colon cancer patients was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) in 104 patients with colon cancer surgery (total of 104 pairs). The lentiviral vector was used to construct microRNA-126 cell line, and the effects of microRNA-126 on proliferation, migration and invasion of colon cancer cells were further studied in vitro. **Results** The relative expression of microRNA-126 in colon cancer tissues (0.63 ± 0.11) was significantly lower than that in adjacent tissues (1.08 ± 0.15), the difference was statistically significant ($t=14.561, P<0.01$). The positive rate of microRNA-126 expression in colon cancer tissues (61.5%) was significantly lower than that in adjacent cancer tissues (86.5%) the difference was statistically significant ($\chi^2=16.908, P<0.05$). The expression of microRNA-126 was significantly correlated with Dukes stage, depth of invasion, lymph node metastasis and distant metastasis ($P<0.05$). In the Transwell experiment with matrix glue, the number of cell migration in transfection group (11.26 ± 4.85) was significantly lower than that in blank control group (264.37 ± 32.15), the difference was statistically significant ($t=23.418, P<0.01$). In the Transwell experiment without matrix glue, the number of cell migration in transfection group (83.75 ± 13.74) was significantly lower than that in blank control group (339.64 ± 26.38), the difference was statistically significant ($t=12.682, P<0.01$). MicroRNA-126 could inhibit the proliferation and invasion of SW480 cells. **Conclusion** MicroRNA-126 can significantly inhibit the development of colon cancer cells and affect the biological behavior of colon cancer cells.

Keywords: colon cancer; microRNA-126; biological function

结肠癌是临床上常见的消化道恶性肿瘤之一, 其生物学恶性程度高, 疾病进展迅速, 预后较差, 严重影响人类的生命健康。微小 RNA (microRNA) 作为一种非编码小分子 RNA, 具有广泛调节基因表达的功能, 参与细胞增殖、分化、凋亡等多种重要

细胞活动的调控^[1,2]。近来研究发现, 多种 microRNA 在结肠癌肿瘤组织、细胞系和正常组织中特异表达, 并在结肠癌的进展及转移阶段发挥着重要作用^[3,4]。Yuan 等^[5]研究表明, microRNA-126 在不同结肠癌组织中表达水平不同, 可作为监测和

* 作者简介: 李洪(1979—), 男, 本科, 主管检验师, 从事临床医学检验研究, E-mail: lihong668@126.com。

治疗结肠癌预后的新型生物标志物。本研究通过检测血浆 microRNA-126 在结肠癌组织中的表达及其对结肠癌组织生物学行为的影响,探讨血浆 microRNA-126 在结肠癌发生发展过程中发挥的作用,以期为结肠癌的诊断、治疗、预后提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取 2013 年 1 月~2016 年 10 月海南省琼海市人民医院收治的结肠癌手术患者 104 例,所有患者均经病理切片确诊,在手术前均未进行放疗或化疗治疗。其中男性 68 例,女性 36 例,年龄 34~63 岁,平均年龄 48.25 ± 2.63 岁。按照 WHO 结肠癌组织学分类及分级标准,组织学类型:高分化 21 例,中分化 39 例,低分化 44 例;Dukes 分期:A 期 11 例,B 期 34 例,C 期 37 例,D 期 22 例;有淋巴结转移 54 例,无淋巴结转移 50 例;有远处转移 28 例,无远处转移 76 例。

1.2 试剂和仪器 Gibco 公司的胎牛血清 1640 培养基;Axygen 公司的 DMEM 培养液,Lipofectamine 2000 试剂和 CCK-8 试剂盒;美国 Roche 公司的 pGIPZ 载体;Gibco 公司的 RNA 提取液,美国 ATCC 的 SW480 结肠癌细胞株。

1.3 方法

1.3.1 细胞的培养、转染:在含有 100 ml/L 进口胎牛血清的 1640 培养基和 DMEM 培养液中 37°C ,5 ml/dl CO_2 饱和湿度贴壁传代培养 SW480 结肠癌细胞株,取对数生长期用于实验,并测定 microRNA-126 在各个细胞的表达。按 Lipofectamine 2000 试剂说明书进行操作,采用阳离子脂质体法进行病毒包装,最终分为 pGIPZ-microRNA-126 转染组、空白对照组(pGIPZ)。将两组病毒上清分别感染 SW480 细胞,感染后 72 h 荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白(GFP)的发光情况,成功转染细胞后置于 37°C 5 ml/dl CO_2 的培养箱中培养。

1.3.2 实时定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测 microRNA-126 的表达水平:严格按照提取液操作说明书利用总 RNA 提取液提取结肠癌组织和癌

旁细胞中总 RNA,cDNA 的制备及实施定量的反应体系均按照 All-in-one miRNA qRT-PCR Detectionkits 说明书进行。以所测 microRNA-126 与外参 microRNA 的阈值环(threshold cycle, Ct)之差计算 ΔCt 值,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 microRNA 的相对表达水平。

1.3.3 microRNA-126 慢病毒表达载体构建:以正常黏膜组织 DNA 为模板,PCR 扩增 microRNA-126。将扩增的产物利用琼脂糖凝胶电泳,如果发现无杂带就直接对 PCR 产物纯化回收。经 ClaI,MLui 酶切 PCR 产物,连接到 pGIPZ 载体上,再经过转化、挑选单克隆、菌液 PCR 鉴定阳性菌落制备小量的质粒,通过酶切,测序后得到 pGIPZ-microRNA-126 重组质粒。

1.3.4 结肠癌细胞的增殖、迁移能力试验:CCK-8 检测结肠癌细胞的增殖能力按照 CCK-8 试剂盒说明书进行,分别选取 12,24 h,3 天、5 天时间点在酶标仪 550 nm 波长处检测光密度值。划痕试验观察细胞迁移能力:将两组细胞铺入 8 孔板,放入 37°C ,5 ml/dl CO_2 培养箱中孵育,等到细胞临近饱和时,用 15 μl 微量移液头在细胞板上垂直划痕,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次,每隔 24 h 在倒置显微镜下观察各组细胞的迁移情况并拍照。

1.4 统计学分析 采用 SPSS17.0 统计软件分析,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验。计数资料以百分率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结肠癌及癌旁组织中 microRNA-126 相对表达水平比较 癌旁组织中 microRNA-126 相对表达水平为 1.08 ± 0.15 ,结肠癌组织中 microRNA-126 相对表达水平为 0.63 ± 0.11 ,两者比较差异有统计学意义($t = 14.561$, $P < 0.01$)。

2.2 结肠癌及癌旁组织中 microRNA-126 表达阳性率比较 见表 1。结肠癌组织中 microRNA-126 表达阳性率显著低于癌旁组织,差异有统计学意义($\chi^2 = 16.908$, $P < 0.05$)。

表 1 结肠癌及癌旁组织中 microRNA-126 表达阳性率比较[$n = 104$, $n(\%)$]

组别	-	+	++	+++	阳性率
结肠癌组织	40(38.5)	26(25.0)	22(21.2)	16(15.4)	64(61.5)
癌旁组织	14(13.5)	15(14.4)	39(37.5)	36(34.6)	90(86.5)

2.3 microRNA-126 表达与结肠癌临床特征的相关性分析 见表 2。microRNA-126 表达与结肠癌 Dukes 分期、浸润深度、有无淋巴结转移及远处转

移明显相关,差异有统计学意义($P < 0.05$),而与性别、年龄、分化程度及肿块直径无明显相关($P > 0.05$)。

表2 microRNA-126 表达与结肠癌临床特征的相关性分析

项目	n	microRNA-126			χ^2 值	P 值
		阴性(例)	阳性(例)	阳性率(%)		
性别	男	68	24	44	64.7	0.131
	女	36	14	22	61.1	
年龄(岁)	≥ 55	48	16	32	66.7	0.990
	< 55	56	24	32	57.1	
浸润深度	侵及浆膜	47	23	24	51.1	5.684
	未及浆膜	57	15	42	73.7	
分化程度	高中分化	60	21	39	65.0	0.378
	低分化	44	18	26	59.1	
淋巴结转移	有	54	26	28	51.9	4.453
	无	50	14	36	72.0	
远处转移	有	28	15	13	46.4	9.352
	无	76	17	59	77.6	
Dukes 分期	A~B 期	45	12	33	73.3	5.405
	C~D 期	59	29	30	50.8	
肿块直径	$\geq 5\text{cm}$	43	18	25	58.1	0.595
	$< 5\text{cm}$	61	21	40	65.6	

2.4 microRNA-126 表达对 SW480 细胞增殖的影响 见表3。利用 MTT 比色法检测转染组和空白对照组 SW480 细胞的增殖能力,结果显示随培养时间的延长,转染组细胞增殖能力明显低于空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表3 microRNA-126 表达对 SW480 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

各时间点	对照组	转染组	t 值	P 值
12 h	0.42 \pm 0.08	0.39 \pm 0.06	3.016	0.062
24 h	0.62 \pm 0.12	0.44 \pm 0.08	9.287	< 0.001
3 d	0.96 \pm 0.14	0.57 \pm 0.10	13.473	< 0.001
5 d	1.15 \pm 0.16	0.64 \pm 0.12	16.518	< 0.001

2.5 microRNA-126 表达对 SW480 细胞细胞侵袭能力的影响 利用有基质胶及无基质胶 Transwell 实验检测 microRNA-126 对细胞迁移、侵袭能力的作用,经过一段时间的观察,结果显示,有基质胶的细胞培养 36 h 后,转染组细胞迁移数(11.26 \pm 4.85 个)明显低于空白对照组(264.37 \pm 32.15 个),差异有统计学意义($t = 23.418$, $P < 0.01$);无基质胶的细胞培养 36 h 后,转染组细胞迁移数(83.75 \pm 13.74 个)也明显低于空白对照组(339.64 \pm 26.38 个),差异有统计学意义($t = 12.682$, $P < 0.01$)。

2.6 microRNA-126 表达对 SW480 细胞迁移能力的影响 对 SW480 两组细胞进行划痕处理后,间隔 24 h 连续观察细胞的迁移情况,结果显示空白对照组划痕 72 h 后,细胞已基本完全覆盖划痕区域,而转染组则未完全覆盖。说明 microRNA-

126 具有抑制结肠癌细胞迁移的能力。

3 讨论 结肠癌组织中存在大量 microRNA 异常表达,并在肿瘤的发生、发展中发挥着重要的作用^[6]。Zhang 等^[7]研究表明,在结肠癌组织及细胞系中 microRNA-218 表达水平明显降低,体外高表达 microRNA-218 可通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的激活而显著抑制结肠癌细胞的迁移及侵袭能力。近年来的研究发现,结肠癌上皮细胞中的 microRNA-126 表达水平明显下调,将 microRNA-126 基因应用慢病毒转染的方法转染进结肠癌细胞后肿瘤细胞生长速度明显减慢,其可能是结肠癌发生的抑制因子^[8,9]。正常的结肠上皮组织中,microRNA-126 通过下调 p85 β 的水平而在 PI3K-AKT 传导通路的最初阶段进行抑制,结肠癌发生过程中 microRNA-126 的下调导致正常的反馈信息的抑制,进而导致了 PI3K-AKT 信号传导通路的放大^[10]。

本研究结果显示,结肠癌组织中 microRNA-126 相对表达水平明显低于癌旁组织,结肠癌组织中 microRNA-126 表达阳性率也显著低于癌旁组织。提示 microRNA-126 在结肠癌组织中表达下调,与 Nie 等^[11]研究结果基本一致。Li 等^[12]研究也发现,microRNA-126 在结肠癌组织中的表达明显减少,尤其是在高转移细胞株。microRNA-126 表达水平的变化与结肠癌 Dukes 分期、浸润深度、有无淋巴结转移及远处转移明显相关,与既往文献报道相近^[13]。我们利用 MTT 比色法检测转染组和空白对照组 SW480 细胞的增殖能力,结果显示

随培养时间的延长,转染组细胞增殖能力明显低于空白对照组,提示 microRNA-126 具有抑制结肠癌细胞增殖的能力。对 SW480 两组细胞进行划痕处理后,间隔 24 h 连续观察细胞的迁移情况,结果显示空白对照组划痕 72 h 后,细胞已基本完全覆盖划痕区域,而转染组则未完全覆盖,说明 microRNA-126 具有抑制结肠癌细胞迁移的能力。Li 等^[14]研究也表明,microRNA-126 可通过抑制结肠癌细胞周期进程、促进结肠癌细胞凋亡而发挥抑瘤作用,并可显著抑制结肠癌细胞迁移及侵袭能力。在有基质胶的 Transwell 试验中,转染组细胞迁移数明显低于空白对照组,无基质胶的 Transwell 试验中,转染组细胞迁移数也明显低于空白对照组,进一步说明 microRNA-126 在结肠癌发生侵袭转移的过程中发挥着重要的作用。Li 等^[15]研究发现,microRNA-126 通过导致 CXCR4 转录活性和表达下调,使迁移的细胞数量减少,抑制结肠癌细胞的活力、迁移和侵袭能力。另有研究表明,microRNA-126 抑制的 Rho 相关蛋白激酶(ROCK)信号抑制结肠癌细胞生长和转移的途径^[16],在高转移的结肠癌细胞中 microRNA-126 表达降低,恢复 microRNA-126 的表达可抑制细胞周期的进展、生长和侵袭^[17,18]。

综上所述,microRNA-126 表达水平在结肠癌组织中明显下降,其水平变化与结肠癌是否发生侵袭转移密切相关,microRNA-126 高表达可能是结肠癌发生发展的抑制因子。因此,microRNA-126 的表达异常有望成为结肠癌早期诊断、早期治疗和预后的标志物及潜在生物治疗靶分子。

参考文献:

- [1] Peng F, Xiong L, Tang H, et al. Regulation of epithelial-mesenchymal transition through microRNAs; clinical and biological significance of microRNAs in breast cancer[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(11): 14463-14477.
- [2] Pereira TC, Lopes-Cendes I. Emerging RNA-based drugs: siRNAs, microRNAs and derivatives[J]. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 2012, 12(3): 217-232.
- [3] Wu K, Zhao Z, Xiao Y, et al. Roles of mitochondrial transcription factor A and microRNA-590-3p in the development of colon cancer[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(6): 5475-5480.
- [4] Arora H, Qureshi R, Rizvi MA, et al. Study of apoptosis-related interactions in colorectal cancer [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(11): 14415-14425.
- [5] Yuan W, Guo YQ, Li XY, et al. MicroRNA-126 inhibits colon cancer cell proliferation and invasion by targeting the chemokine (C-X-C motif) receptor 4 and Ras homolog gene family, member A, signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(37): 60230-60244.
- [6] Mohammadi A, Mansoori B, Baradaran B. The role of microRNAs in colorectal cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84(5): 705-713.
- [7] Zhang X, Shi H, Tang H, et al. miR-218 inhibits the invasion and migration of colon cancer cells by targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(5): 1301-1308.
- [8] Zhang XF, Li KK, Gao L, et al. miR-191 promotes tumorigenesis of human colorectal cancer through targeting C/EBP β [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(6): 4144-4158.
- [9] Guo C, Sah JF, Beard L, et al. The noncoding RNA, miR-126, suppresses the growth of neoplastic cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase signaling and is frequently lost in colon cancers[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2008, 47(11): 939-946.
- [10] Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer[J]. *Apoptosis*, 2004, 9(6): 667-676.
- [11] Nie ZC, Weng WH, Shang YS, et al. MicroRNA-126 is down-regulated in human esophageal squamous cell carcinoma and inhibits the proliferation and migration in EC109 cell via PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(5): 4745-4754.
- [12] Li N, Li X, Huang S, et al. miR-126 inhibits colon cancer proliferation and invasion through targeting IRS1, SLC7A5 and TOM1 gene[J]. *Journal of Central South University (Medical Science)*, 2013, 38(8): 809-817.
- [13] Ebrahimi F, Gopalan V, Wahab R, et al. Deregulation of miR-126 expression in colorectal cancer pathogenesis and its clinical significance[J]. *Exp Cell Res*, 2015, 339(2): 333-341.
- [14] Li XM, Wang AM, Zhang J, et al. Down-regulation of miR-126 expression in colorectal cancer and its clinical significance[J]. *Med Oncol*, 2011, 28(4): 1054-1057.
- [15] Li Z, Li N, Wu M, et al. Expression of miR-126 suppresses migration and invasion of colon cancer cells by targeting CXCR4[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 381(1/2): 233-242.
- [16] Li N, Tang A, Huang S, et al. MiR-126 suppresses colon cancer cell proliferation and invasion via inhibiting RhoA/ROCK signaling pathway[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 380(1/2): 107-119.
- [17] Wang XY, Wu MH, Liu F, et al. Differential miRNA expression and their target genes between NGX6-positive and negative colon cancer cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 345(1/2): 283-290.
- [18] Hansen TF, Sørensen FB, Lindebjerg J, et al. The predictive value of microRNA-126 in relation to first line treatment with capecitabine and oxaliplatin in patients with metastatic colorectal cancer[J]. *BMC Cancer*, 2012, 8(3): 1471-1477.

收稿日期:2017-02-09

修回日期:2017-04-02