

文章编号 1006-8147(2016)01-0013-04

论 著

抑制 microRNA-21 表达降低 HCT-116 细胞侵袭转移能力的实验研究

王金淼,姜涛,戚峰,刘彤,王鹏志

(天津医科大学总医院普通外科,天津 300052)

摘要 目的:探讨抑制人结肠癌细胞 HCT-116 microRNA-21 表达降低结肠癌细胞侵袭转移能力作用机制。方法:应用表达反义 microRNA-21 的质粒 miRZip21 转染 HCT-116 细胞,检测 microRNA-21 的变化,TargetScan 和 PicTar 等工具筛选与侵袭转移相关的靶基因,实时定量 PCR 方法检测转染前后靶基因 mRNA 的变化,Western blot 检测靶基因蛋白表达变化,平皿划痕和 Transwell 实验观察抑制 microRNA-21 与否 HCT-116 细胞转移和侵袭能力。结果:筛选出 4 种与侵袭转移相关的 microRNA-21 靶基因:TIMP-3,RECK,BMPRII 和 PCDH17;miRZip21 质粒转染 HCT-116 后,microRNA-21 表达水平下降约 40%,靶基因 TIMP-3 和 RECK 的 mRNA 及靶蛋白表达上升明显,有统计学意义 ($P < 0.05$);平皿划痕和 Transwell 实验结果表明抑制 microRNA-21 后,HCT-116 细胞转移侵袭能力明显减弱,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论:抑制 microRNA-21 的表达能够减弱 HCT-116 细胞的侵袭和转移能力。

关键词 结肠癌;侵袭;转移;microRNA-21;质粒

中图分类号 R735.3*5

文献标志码 A

Experimental research on reducing invasion and metastasis ability of HCT-116 by inhibiting microRNA-21 expression

WANG Jin-miao, JIANG Tao, QI Feng, LIU Tong, WANG Peng-zhi

(Department of General Surgery, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

Abstract **Objective:** To explore the effect on invasion and metastasis of HCT-116 colon cancer cell by downregulating the microRNA-21 expression. **Methods:** After plasmid miRZip21, miRZipTManti-microRNA-21 expression lentivector, was used to transfect HCT-116, the expression of microRNA-21 was assessed. The microRNA-21 target genes associated with invasion and metastasis were predicted by TargetScan and PicTar. The mRNA and protein of target genes were detected by qRT-PCR and Western blot respectively. The ability of migration and invasion of HCT-116 after transfection were detected by the Scratch assay and Transwell assay. **Results:** TIMP-3, RECK, BMPRII and PCDH17 were the gene targets associated with invasion and metastasis; After the cells were transfected with plasmid miRZip21, the microRNA-21 level descended to about 60%, the mRNA and protein level of TIMP-3 and RECK increased significantly ($P < 0.05$); Significant reduction of invasion and migration were observed in anti-microRNA-21-transfected HCT-116 ($P < 0.05$).

Conclusion: Inhabiting the microRNA-21 expression can lessen the invasive and metastatic ability of HCT-116 cells.

Key words colonic cancer; invasion; metastasis; microRNA-21; plasmid

近年来随着分子生物技术的发展,人们发现结肠癌是一个多步骤、多阶段、多基因参与的遗传性疾病,这些基因参与结肠癌发生、发展、侵袭及转移。microRNA 是近年来分子生物学和肿瘤学领域的研究热点,是一类新发现的长度为 18~24 个核苷酸的内源性非编码单链小分子 RNA^[1],成熟的 microRNA 能够识别特定的目标 mRNA,对靶 mRNA 进行降解或抑制翻译来调节靶基因的表达过程^[2]。microRNA-21 在多种实体肿瘤细胞均出现异常表

达,参与调控多种抑癌基因,提示 microRNA-21 作为一个致癌 microRNA,在肿瘤的发生和发展中发挥着重要作用^[3-4]。而当前对结肠癌 microRNA-21 的研究较少,其对结肠癌转移调控机制尚不清楚,因此通过调节 microRNA-21 的水平,探讨其在结肠癌转移中的机制,有可能深入了解结肠癌的发生发展过程,为结肠癌的诊断、治疗及预后提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验对象和主要试剂

1.1.1 实验材料 miRZip21(Catalog#MZIP21-AA-1)(美国 SBI 公司);CS-CDF-CG-PRE (Leti3)(本实验室保存);感受态细胞 DH5 α (Catalog#CB101)(天根

基金项目 天津市自然科学基金资助项目(08JCYBJC08100)

作者简介 王金淼(1987-),男,硕士在读,研究方向:普通外科;通信作者:戚峰,E-mail:qf@medmail.com.cn。

生化科技(北京)有限公司);人结肠癌细胞系 HCT-116(中国医学科学院肿瘤细胞库)用含有 10%标准胎牛血清(FBS)的 RPMI 1640 培养液,培养于 37℃、50%CO₂ 的培养箱中。

1.1.2 主要试剂 高纯度质粒小量快速提取试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司);限制性内切酶:*Eco*R I (Catalog#R0101S),*Bam*H I (Catalog#R0136S),*Xho*I (Catalog#R0146S),*Age*I (Catalog#R0552S)(NEB, 美国);Gene Poter 3000 试剂盒(Invitrogen Corporation, 美国);2×Taq PCR MaserMix 和无内毒素质粒大提试剂盒 TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司);TIMP-3、BMPRII、PCDH17 多克隆抗体及 RECK 单克隆抗体(SantaCurz, 美国);辣根酶标记山羊抗兔 IgG 抗体、辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 抗体和辣根酶标记兔抗山羊 IgG 抗体(北京中杉金桥生物技术公司);Go TaqPCR Master Mix(Promega, 美国);免疫印迹增强化学发光法试剂盒(武汉博士德生物公司)。

1.2 研究方法

1.2.1 质粒提取及转染 将 2 μL 质粒 DNA 加入到装有 DH5α 感受态细胞的 EP 管混匀,冰浴 30 min,预加热至 42℃,90 s,冰浴 2 min,加入 600 μL LB 培养液,37℃,185 r/min 温育 90 min,转移至含抗生素 LB 板,37℃培养,取质粒菌落接种于 LB AMP+液体培养基 3 mL,37℃,185 r/min,培养 14 h,按说明书使用高纯度质粒小量快速提取试剂盒进行目的质粒提取,质粒的双酶切验证大量提取目的质粒,置于-20℃冻存。使用 GenePORTER 3000 试剂盒转染高度表达 microRNA-21 的 HCT-116 细胞。细胞分为 3 组:实验组(转染 miRZip21 组)、对照组(转染 Leti3 组)和空白对照组,各组细胞铺入 6 孔板每组转染 3 孔,质粒 miRZip21 组及 Leti3 组细胞培养 48 h 后,于倒置显微镜下观察细胞 GFP(绿色荧光免疫标记)表达程度,流式细胞仪检测转染效率。

1.2.2 HCT-116 细胞质粒转染后 microRNA-21 表达水平 取液氮下肿瘤细胞 250 mg,加 Trizol 液充分研磨,加酚仿室温静置、离心,加 75%乙醇反复洗涤沉淀,离心取上清液。紫外吸收测定法检测 RNA 浓度和纯度符合要求,后用甲醛变形琼脂凝胶电泳法检测总 RNA 完整性,采用寡聚 3'端引物 Oligo (dT)₁₅ 和 M-MLV 逆转录酶合成 cDNA 第一链, micro RNA-21 引物序列,上游:5'-CGGGATCCTGG GGTTCGATCTTAACAGGC-3',下游:5'-CGGAATTC CCACAATGCAGCTTAGTTTTCC-3',原始数据(Ct 值)采用 2^{-ΔΔCt} 法^[5]计算 microRNA-21 的相对表达量。

1.2.3 RT-PCR 及 Western blot 检测靶基因表达水平 运用 TargetScan 和 PicTar 等工具筛选出 4 种与转移侵袭相关的 microRNA-21 靶基因:基质金属蛋白酶组织抑制因子 3(TIMP-3)、伴有 kazal 域的富含半胱氨酸的逆转诱导蛋白(RECK)、骨形态发生蛋白 II 型受体(BMPRII)和原钙粘蛋白 17(PCDH17),使用商品化 Trizol 分别提取质粒 miRZip21 组和未处理组 HCT-116 细胞总 RNA,利用紫外吸收测定法检测 RNA 浓度和纯度,后用甲醛变形琼脂凝胶电泳法检测总 RNA 完整性,采用寡聚 3'端引物 Oligo (dT)₁₅ 和 M-MLV 逆转录酶合成 cDNA 第一链, microRNA-21 靶基因引物序列, TIMP-3, 上游:5'-CAGTGCTCTGCTCTGTCC-3',下游:5'-CCCCTACTTTCCATTTTG-3'(扩增片段长度 352 bp);BMPRII, 上游:5'-GAAGGTGAAGGTCCG AGTC-3',下游:5'-GAAGATGCTGATGGGATTTTC-3'(扩增片段长度 225 bp);RECK, 上游:5'-AGTGTGTGTGCTGCCTAC-3',下游:5'-TTCCAGAA CTGTTATTGGC-3'(扩增片段长度 264bp);PCDH17, 上游 5'-ATTCCTTCATTTGGTTAC-3',下游:5'-TTG CTGTTTCTACACTGG-3'(扩增片段长度 349 bp)。GAPDH(内参基因)上游:5'-GAAGGTGAAGGTCCG AGTC-3',下游 5'-GAAGATGCTGATGGGATTTTC-3', 2^{-ΔΔCt} 法计算 mRNA 的相对表达量,采用蛋白印迹法(Western blot)检测靶基因蛋白表达水平。

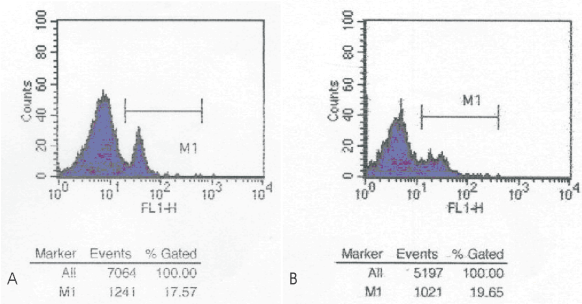
1.2.4 划痕实验 用 marker 笔在 6 孔板背后均匀划横线,间距大约 2~3 cm,横穿过板孔,每孔至少穿过 2 条,在相应板孔内细胞转染 48 h,用 100 μL 枪头垂直于背后的横线划痕,划痕宽度约 3 mm,37℃ PBS 清洗细胞 3 次,更换无血清 RPMI1640 培养基,37℃ CO₂ 培养箱内培养,分别于 0、24、48、72、96 h 镜下测量划痕宽度,比较各组间划痕愈合的差异。

1.2.5 Transwell 实验检测细胞侵袭能力 用 50 mg/L Matrigel 1:8 稀释液包被 Transwell 小室底部膜的上室面,4℃风干,于每 Transwell 小室中加入 50 μL 含 10 g/L 的 BSA 无血清培养液,37℃,30 min,0.25%胰酶消化收集细胞,PBS 缓冲液洗涤 2 遍,用 10%胎牛血清细胞培养基重悬细胞至 5×10⁵/mL,在 Transwell 下室内加入 10%胎牛血清细胞培养基 600 μL,上室内加入含肿瘤细胞的无胎牛血清培养基悬液 200 μL,上室内细胞数为 1×10⁵,置于 5%CO₂ 培养箱,37℃培养 48 h,将 Transwell 置于苏木素染色液中 3 min,清水浸洗 3 遍,湿棉签擦去微孔膜上层的基质胶,倒置显微镜 200 倍视野下计数移至微孔膜下层每视野的细胞数,随机计数 4 个高倍视野。

1.3 统计学方法 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 *LSD* 法,所有统计结果以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义标准。

2 结果

2.1 质粒转染结果 miRZip21 和 Leti3 质粒转染 HCT-116 细胞 48 h 后,倒置荧光显微镜下观察 GFP 表达,结果均发出绿色荧光,表明转染成功。流式细胞仪检测 miRZip21 质粒转染效率为 17.57%, 本实验室保存空白质粒 Leti3 为 19.65%(图 1), 两者之间无明显差异,说明质粒本身具有良好转染性。



A: miRZip21; B: Leti3

图 1 质粒转染效率

Fig 1 Transfection efficacy of plasmid

2.2 质粒转染后 HCT-116 细胞 microRNA-21 表达水平 转染 48 h 后,miRZip21 组与 Leti3 组、空白组比较,micoRNA-21 表达降低约 40%,有统计学差异($P < 0.01$),Leti3 组与空白组无明显差异($P > 0.05$),结果显示体外转染质粒 miRZip21 可以一定程度抑制 microRNA-21 表达(表 1)。

表 1 microRNA-21 在各组细胞间的表达水平($\bar{x} \pm s$)

| Tab 1 The expression level of microRNA-21 in each group($\bar{x} \pm s$) | | | | | | |
|--|---------------|------------------|--------------------|-------------------------|----------|----------|
| 分组 | ΔCt 值 | $2^{-\Delta Ct}$ | $\Delta \Delta Ct$ | $2^{-\Delta \Delta Ct}$ | <i>F</i> | <i>P</i> |
| miRZip21 组 | -6.783±0.047 | 110.253±3.411 | 0.669 | 0.629 | | |
| Leti3 组 | -7.360±0.066 | 164.390±7.429 | 0.060 | 0.959 | 16.934 | 0.003 |
| 未处理组 | -7.420±0.191 | 172.273±23.216 | 0 | 1 | | |

2.3 microRNA-21 靶基因 mRNA 和蛋白表达水平 质粒 miRZip21 转染后 TIMP-3 的 mRNA 和蛋白表达分别是转染前的 2.3 倍和 3.5 倍,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); RECK 的 mRNA 和蛋白表达分别上调 2.6 倍和 1.9 倍,差异有统计学意义($P < 0.05$); BMPRII 的 mRNA 和蛋白表达差异不显著($P > 0.05$); PCDH17 的 mRNA 和蛋白表达差异不显著($P > 0.05$),表明 microRNA-21 对靶基因存在 mRNA 和蛋白两个层面影响(图 2)。

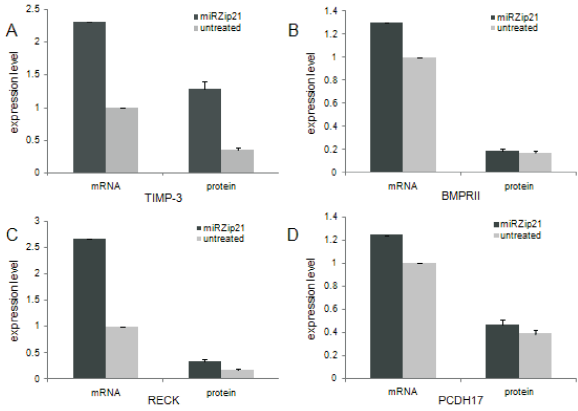


图 2 靶基因 mRNA 和蛋白的表达水平

Fig 2 The expression levels of mRNA and protein of target genes

2.4 划痕实验结果 如图 3 所示:24 h 后可见细胞向划痕中间迁移,96 h 后可见未处理细胞将划痕铺满,而转染 miRZip21 质粒的细胞划痕部位仍有一定间隙。因此转染 miRZip21 质粒的细胞虽仍有迁移性,但与未转染细胞相比迁移能力减弱。

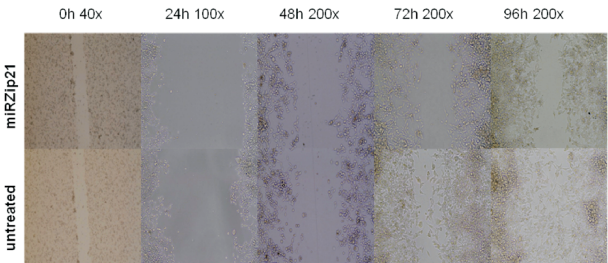


图 3 各组 HCT-116 细胞的转移能力

Fig 3 The metastasis ability of HCT-116 in each group

2.5 Transwell 检测细胞侵袭能力实验结果 转染质粒 miRZip21 组与未转染组相比,侵袭细胞数目明显减少,差异有统计学意义($P < 0.01$),表明抑制 microRNA-21 后,HCT-116 细胞侵袭能力明显减弱(表 2)。

表 2 各组 HCT-116 细胞侵袭结果

| 组别 | 侵袭细胞计数 | |
|------------|---------------|---------------|
| | 24 h | 48 h |
| miRZip21 组 | 73.00±13.491 | 226.25±31.218 |
| 空白组 | 158.50±24.480 | 450.50±50.455 |
| <i>t</i> | -8.640 | -6.884 |
| <i>P</i> | 0.000 | 0.000 |

3 讨论

目前认为 microRNA 的前体和成熟体在很多物种之间具有高度保守性,表明 microRNA-21 在基因表达调控上发挥着重要作用^[3]. microRNA 在生物体

内发挥作用根据其作用模式不同可分为3种形式,一种为 microRNA 与靶基因 mRNA 不完全互补结合,进而抑制 mRNA 的翻译而不影响 mRNA 的稳定性,以线虫 lin-4 为代表^[6]。在抑制 microRNA 翻译中,microRNA 主要作用位点为靶 mRNA 的 3'UTR 区(非编码区),通过改变靶 mRNA 上核糖体密度或特异性降解新合成的多肽来达到抑制 mRNA 翻译的目的。第2种以拟南芥 microRNA-171 为代表^[7],作用时与靶标基因完全互补结合,作用方式和功能与 siRNA 相似,最后切割靶 mRNA,从而使 mRNA 的表达水平降低。第3种以 let-7 为代表^[8],它具有以上两种作用模式,如果与靶基因完全互补结合,直接切割 mRNA;当与靶基因不完全结合时,其调节基因表达的作用。microRNA-21 对靶基因即属于第3种形式,对 mRNA 和蛋白层面发挥着双重调控作用。本实验在对 HCT-116 细胞进行转染抑制 microRNA-21 后,发现 TIMP-3 和 RECK 基因的 mRNA 和蛋白都有不同程度的表达上调,证实 microRNA-21 确实存在两个层面的调节,可能同时存在对靶基因转录的干扰和降解作用。而 Fujita 等^[9]预测 NFIB 为 microRNA-21 的靶基因,对 microRNA-21 进行抑制,发现 NFIB 蛋白显著提高,而 NFIB 的 mRNA 表达不变,提示 microRNA-21 对其作用发生在 mRNA 的翻译阶段,而不是发生在转录阶段。Asangani^[10]对 10 种结肠癌细胞 microRNA-21 与 PCDD4 的 mRNA 及蛋白的表达情况进行研究时,发现 microRNA-21 与 PDCD4 蛋白水平存在显著的负相关,而与 PDCD4 的 mRNA 无显著关系,表明对靶基因的调控作用于蛋白水平。因此,microRNA-21 对靶基因的调控模式存在差异,但其对靶基因调控差异的机制尚不清楚,有待于进一步研究。

结直肠癌中 microRNA-21 的表达上调,多与临床病理分期差、浸润转移及预后不良有关^[11],我们前期实验证实 microRNA-21 在结肠癌患者中与临床病理分期差有关,本实验从预测的靶基因中选择与抑制肿瘤迁移和侵袭有关的基因:TIMP-3、RECK、BMPRII 和 PCDH17 进行研究。研究显示消化道肿瘤患者组织中这4种转移抑制蛋白出现表达异常^[12-14],实验结果显示抑制结肠癌细胞 microRNA-21 的表达后,TIMP-3 和 RECK 升高明显,具有统计学意义,而 BMPRII 和 PCDH17 升高的幅度并不显著。

划痕实验和 Transwell 显示抑制 microRNA-21

表达后肿瘤细胞的迁移性和侵袭性明显抑制,这意味着肿瘤细胞降解基质的能力下降,基质金属蛋白酶抑制因子的功能得到增强,证实 microRNA-21 在结肠肿瘤的侵袭转移过程中发挥着重要作用,也表明针对 microRNA-21 的基因治疗存在可行性。

综上所述,本实验成果取得为进一步行体内试验对肿瘤的体内特征如肿瘤的生长、浸润、转移、血管形成等诸方面进行研究奠定基础。

参考文献:

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004,116(2):281
- [2] Zhang B H, Pan X P, Cobb G P, et al. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors[J]. N Engl J Med, 2007, 302 (1):1
- [3] Schramedei K, Mörbt N, Pfeifer G, et al. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes ANP32A and SMARCA4[J]. Oncogene, 2011, 30(26):2975
- [4] Selcuklu S D, Donoghue M T, Spillane C. miR-21 as a key regulator of oncogenic processes[J]. Biochem Soc Trans, 2009, 37(Pt 4):918
- [5] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method[J]. Methods, 2001, 25(4):402
- [6] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. Cell, 1993, 75(5):843
- [7] Llave C, Xie Z, Kasschau K D, et al. Cleavage of scarecrow-like mRNA targets directed by a class of arabidopsis miRNA[J]. Science, 2002,297(5589):2053
- [8] Reinhart B J, Slack F J, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans[J]. Nature, 2000,403(6772):901
- [9] Fujita S, Ito T, Mizutani T, et al. miR-21 gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism[J]. J Mol Biol, 2008, 378(3):492
- [10] Asangani I A, Rasheed S A, Nikolova D A, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdc4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal Cancer[J]. Oncogene, 2008, 27(15):2128
- [11] 董令仪,张辉,叶颖江,等. MicroRNA 在结直肠癌中的研究进展[J]. 中华外科杂志, 2010, 48(17):1345
- [12] Qin S, Zhu Y, Ai F, et al. MicroRNA-191 correlates with poor prognosis of colorectal carcinoma and plays multiple roles by targeting tissue inhibitor of metalloprotease 3[J]. Neoplasia, 2013, 61(01):27
- [13] Qin J, Luo M. MicroRNA-221 promotes colorectal Cancer cell invasion and metastasis by targeting RECK[J]. FEBS Lett, 2014, 588(1):99
- [14] Qu Y P, Dang S W, Hou P. Gene methylation in gastric cancer[J]. Clinica Chimica Acta, 2013, 424: 53

(2015-06-07 收稿)