

文章编号 1006-8147(2021)05-0472-05

论著

miR-133 过表达对结肠癌细胞 SW480 凋亡、增殖和裸鼠成瘤的影响

潘琼, 谷见法, 刘松格, 杨晓瑞, 易善永

(郑州市中心医院肿瘤内科, 郑州 450000)

摘要 目的:探究 miR-133 过表达对结肠癌细胞 SW480 凋亡、增殖和裸鼠成瘤的影响。方法:将 miR-133 mimic 转染至 SW480 细胞,将细胞分为 3 组:对照组、Scramble 组和 miR-133 mimic 组。RT-PCR 检测 miR-133 表达水平;流式细胞仪检测细胞凋亡;Western 印迹检测 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9、c-Myc 蛋白表达水平;CCK-8 法检测细胞增殖倍数;克隆形成实验检测细胞克隆形成率;裸鼠右侧腋窝处皮下注射 SW480 细胞悬液建立裸鼠移植瘤模型,检测肿瘤重量,RT-PCR 检测肿瘤组织 miR-133 表达水平,免疫组化检测 Caspase-3、Ki67 阳性细胞数。结果:与对照组相比,miR-133 mimic 组 miR-133 表达升高($F=136.70, P<0.05$),细胞凋亡率升高($F=59.995, P<0.05$),Bax/Bcl-2、cleaved Caspase-3/Caspase-3、cleaved Caspase-9/Caspase-9 表达升高($F=726.85, 138.76, 55.85$, 均 $P<0.05$),c-Myc 蛋白表达水平降低($F=88.98, P<0.05$),细胞活力降低($F=48.50, P<0.05$),克隆形成率降低($F=42.63, P<0.05$),肿瘤重量降低($t=1.788, P<0.05$),肿瘤组织 miR-133 表达水平升高($t=1.043, P<0.05$),Caspase-3 阳性细胞数升高($t=1.167, P<0.05$),Ki67 阳性细胞数降低($t=1.557, P<0.05$)。结论:miR-133 过表达诱导 SW480 细胞凋亡,抑制 SW480 细胞增殖和裸鼠肿瘤的形成。

关键词 结肠癌;miR-133;凋亡;增殖

中图分类号 R735.3+5

文献标志码 A

Effects of miR-133 overexpression on apoptosis, proliferation and tumor formation of colon cancer cells SW480 in nude mice

PAN Qiong, GU Jian-fa, LIU Song-Ge, YANG Xiao-rui, YI Shan-yong

(Department of Oncology, Zhengzhou Central Hospital, Zhengzhou, 450000)

Abstract **Objective:** To investigate the effects of miR-133 overexpression on the apoptosis, proliferation and tumor formation of colon cancer cells SW480 in nude mice. **Methods:** SW480 cells were transfected with miR-133 mimic. The cells were divided into three groups: control group, Scramble group and miR-133 mimic group. The expression of miR-133 was detected by RT-PCR. Flow cytometry was used to detect apoptosis. Western blotting was used to detect the expression of Bcl-2, Bax, Caspase-3, Caspase-9 and c-Myc. Cell proliferation was measured by CCK-8 method. The clone formation rate of cells was detected by clone formation experiment. The xenograft model of nude mice was established by subcutaneous injection of SW480 cell suspension in the right armpit, tumor weight was detected, the expression of miR-133 in tumor tissues was detected by RT-PCR, and the number of Caspase-3 and Ki67 positive cells were detected by immunohistochemistry. **Results:** Compared with control group, miR-133 mimic group showed increased expression of miR-133 ($F=136.70, P<0.05$), increased apoptosis rate ($F=59.995, P<0.05$), increased Bax/Bcl-2, cleaved Caspase-3/Caspase-3, and cleaved Caspase-9/Caspase-9 expression ($F=726.85, 138.76, 55.85$, all $P<0.05$), and cell apoptosis rate ($F=59.995, P<0.05$), decreased C-Myc protein expression levels ($F=88.98, P<0.05$), decreased cell viability ($F=48.50, P<0.05$), decreased clone formation rate ($F=42.63, P<0.05$), reduced tumor weight ($t=1.788, P<0.05$), increased tumor tissue expression of miR-133 levels ($t=1.043, P<0.05$), increased Caspase-3 positive cells ($t=1.167, P<0.05$), reduced number of Ki67 positive cells ($t=1.557, P<0.05$). **Conclusion:** Overexpression of miR-133 induces apoptosis of SW480 cells and inhibits SW480 cells proliferation and tumor formation in nude mice.

Key words colon cancer; miR-133; apoptosis; proliferation

结肠癌是一种常见的胃肠道肿瘤,在世界范围内的发病率和与癌症相关的死亡率中位居前列^[1]。相关研究表明,癌基因的激活和抑癌基因的失活对结肠癌的发生、发展起重要作用^[2]。尽管在诊断和治疗上有很大进步,但其发病机制尚未完全明了。因此,

需要进一步探寻结肠癌的关键分子机制,为结肠癌患者开发更有效的疗法。MicroRNAs (miRNAs)是一类长度约为 19~24 nt 的内源性非编码小 RNA,通过靶向靶基因 3'-UTR 的碱基互补配对结合,引起转录抑制或调节 mRNA 降解,从而在植物和动物中发挥重要作用^[3]。miRNA 控制并参与多种细胞过程的基因表达,包括炎症、代谢、增殖和细胞凋亡^[4]。已有研究

作者简介 潘琼(1987-),女,主治医师,硕士,研究方向:食管癌、肺癌、胃癌、结直肠癌;通信作者:易善永, E-mail: yisy2001@126.com。

表明 miR-133 在肺癌、胃癌、膀胱癌和前列腺癌中表达下调,miR-133 过表达抑制癌细胞的恶性行为,提示其可能是阻断癌症进展的靶点^[5-8]。但目前 miR-133 在结肠癌进程中的作用和潜在机制尚不完全清楚,相关研究很少,本文旨在探究 miR-133 过表达对结肠癌细胞 SW480 凋亡、增殖和裸鼠成瘤的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 RPMI1640 培养基(61870-127)、胎牛血清(26400-036)、青-链霉素(15140-122)和胰蛋白酶(25200-056)均购自美国 Gibco 公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(A0208)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(P0012S)、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(C1062S)、CCK-8 试剂盒(C0037)购自上海碧云天生物技术研究;兔抗 Bax(ab53154)、Bcl-2(ab196495)、Caspase-3(ab13847)、cleaved Caspase-3(ab2302)、Caspase-9(ab52298)、cleaved Caspase-9(ab2324)、c-Myc(ab39688)、GAPDH(ab9485)单克隆抗体均购自英国 Abcam 公司。

1.2 细胞培养 人结肠癌 SW480 细胞株来源于中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC),置于 37℃,5% CO₂ 恒温培养箱中用 RPMI 1640 培养基(含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素)培养,每 3 d 传代 1 次,收集细胞时用 0.25% 胰蛋白酶消化,实验选用对数生长期细胞。

1.3 细胞处理及分组 将 SW480 细胞接种于 6 孔板(1×10^5 个/孔),待 60% 融合度时更换为无血清培养基。采用 LipoRNAi™ 转染试剂将 Scramble 和 miR-133 mimic 转染至 SW480 细胞,细胞分组为:对照组、Scramble 组和 miR-133 mimic 组。

1.4 RT-PCR 检测 miR-133 表达 用 Trizol 法从各组 SW480 细胞中提取总 RNA,采用 PrimeScrip 反转录试剂盒进行反转录成 cDNA,通过 SYBR Premix Ex Taq 说明书配置 PCR 反应体系,miR-133 上游引物:5'-TTTGGTCCCCCTTCAACC-3',下游引物:5'-GAGCAGGGTCCGAGGT-3'。反应条件为:95℃ 5 min,95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,45 个循环,72℃ 10 min。miR-133 的相对表达使用公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 胰蛋白酶消化并收集 SW480 细胞到 10 mL 的离心管中,每样本细胞数为 3×10^6 mL,1 500 r/min 离心 5 min,弃去培养液,用孵育缓冲液洗涤 1 次,1 500 r/min 离心 5 min,重悬细胞后室温避光孵育 15 min,加入 10 μL Annexin V-FITC 后避光孵育 10 min,加入 10 μL 碘化丙啶避光孵育 30 min 后,通过流式细胞仪检测各组细胞凋

亡情况。

1.6 Western 印迹检测 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9、c-Myc 蛋白表达水平 取各组对数生长期 SW480 细胞裂解提取总蛋白,通过 BCA 试剂盒测定蛋白质含量。取等量蛋白质样品 100℃ 变性 5 min 后用 SDS-PAGE 凝胶电泳法分离并转移至聚偏氟乙烯膜,在 4℃ 条件下加入 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9 和 c-Myc 一抗(1:1 000)并孵育过夜, PBST 清洗 3 次,4℃ 下加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(1:5 000),孵育 1 h,最后加入 ECL 发光液曝光拍照。以 GAPDH 为内参,目的条带灰度值/GAPDH 灰度值表示蛋白表达水平。

1.7 CCK-8 检测细胞增殖倍数 收集各组 SW480 细胞,接种至 96 孔板,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,37℃ 下培养 4 d,于第 24、48、72、96 小时检测 450 nm 处吸光度值计算细胞增殖倍数。

1.8 克隆形成实验检测细胞克隆形成率 在培养皿中培养 SW480 细胞 4 d,接种至 6 孔板,每孔约 500 个细胞,培养 14 d,用 4% 多聚甲醛固定 30 min,0.5% 结晶紫染色,PBS 清洗后拍照观察细胞克隆形成数目,计算细胞克隆形成率。细胞克隆形成率=细胞克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.9 结肠癌裸鼠移植瘤模型 10 只 30 日龄雄性 Balb/c 裸鼠购自北京维通利华动物科技有限公司,体重(20 \pm 2)g,动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0009,在特定的无病原体条件下饲养。取方法 1.3 对照组和 miR-133 mimic 组细胞用 PBS 将细胞密度调至 1×10^7 mL,于裸鼠右侧腋窝处皮下注射 0.2 mL 细胞悬液,将裸鼠随机分为 2 组:对照组和 miR-133 mimic 组。第 28 天处死所有裸鼠,检测裸鼠肿瘤重量,RT-PCR 检测裸鼠肿瘤 miR-133 表达水平。

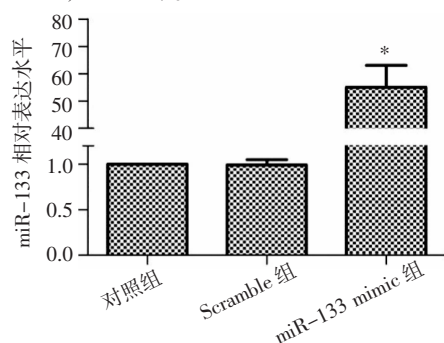
1.10 免疫组化检测 Caspase-3、Ki67 阳性细胞数 取各组裸鼠肿瘤组织,常规石蜡包埋切片,厚度约为 4 μm,按免疫组化检测试剂盒说明书对各组裸鼠肿瘤组织进行免疫组化染色,DAB 显色试剂盒显色,苏木素复染,盐酸酒精分色,光学显微镜观察 Caspase-3、Ki67 在肿瘤组织中的表达情况。

1.11 统计学处理 使用 GraphPad Prism 5 进行统计分析,正态分布的计量资料表示为 $\bar{x} \pm s$,组间比较采取 SNK-*t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SW480 细胞转染 miR-133 mimic 通过 RT-PCR 检测 miR-133 表达水平 结果如图 1 所示,与对

对照组相比,miR-133 mimic 组 miR-133 表达显著升高($F=136.70, P<0.05$)。



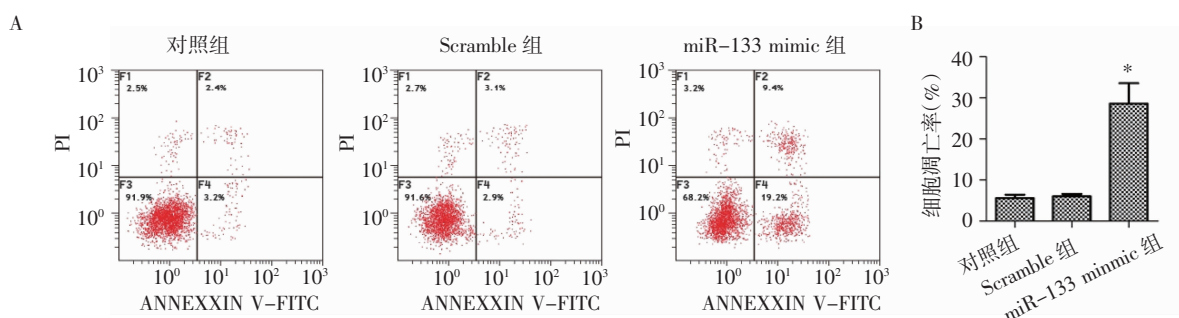
注:与对照组比较, $*P<0.05$

图1 SW480 细胞转染 miR-133 mimic

Fig 1 SW480 cells transfected with miR-133 mimic

2.2 miR-133 过表达对 SW480 细胞凋亡的影响 通过流式细胞仪检测各组 SW480 细胞凋亡率,结果如图 2 所示,与对照组相比,miR-133 mimic 组细胞凋亡率显著升高($F=59.995, P<0.05$)。

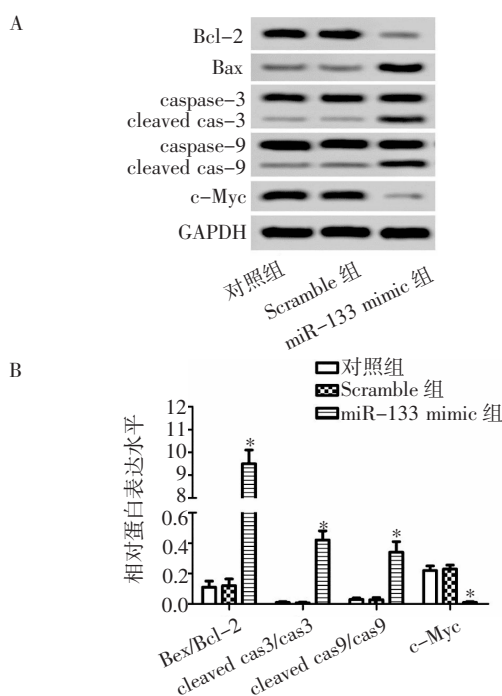
2.3 miR-133 过表达对 SW480 细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9、c-Myc 蛋白表达水平的影响 通过 Western 印迹检测各组细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9、c-Myc 蛋白表达水平,结果如图 3 所示,与对照组相比,miR-133 mimic 组 Bax/Bcl-2、cleaved Caspase-3/Caspase-3、cleaved Caspase-9/Caspase-9 表达显著升高($F=726.85, 138.76, 55.85$, 均 $P<0.05$), c-Myc 蛋白表达水平显著降低($F=88.98, P<0.05$)。



注:与对照组比较, $*P<0.05$

图2 miR-133 过表达对 SW480 细胞凋亡的影响

Fig 2 Effect of miR-133 overexpression on apoptosis of SW480 cells

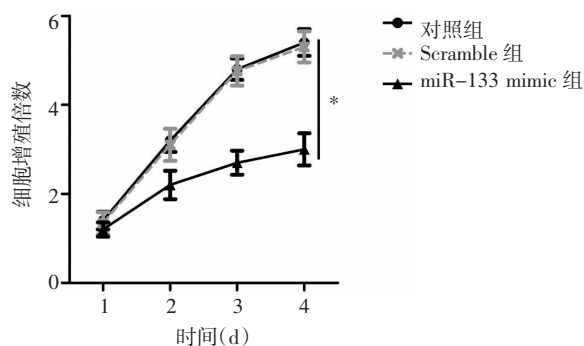


注:与对照组比较, $*P<0.05$

图3 miR-133 过表达对 SW480 细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9、c-Myc 蛋白表达水平的影响

Fig 3 Effects of miR-133 overexpression on the expression of Bcl-2, Bax, Caspase-3, Caspase-9 and c-Myc in SW480 cells

2.4 miR-133 过表达对 SW480 细胞活力的影响 通过 CCK-8 法检测各组细胞活力,结果如图 4 所示,与对照组相比,miR-133 mimic 组细胞活力显著降低($F=48.50, P<0.05$)。



注:与对照组比较, $*P<0.05$

图4 miR-133 过表达对 SW480 细胞活力的影响

Fig 4 Influence of miR-133 overexpression on the viability of SW480 cells

2.5 miR-133 过表达对 SW480 细胞增殖的影响 通过克隆形成实验检测各组细胞克隆形成率如图 5 所示,与对照组相比,miR-133 mimic 组细胞克隆形成率显著降低($F=42.63, P<0.05$)。

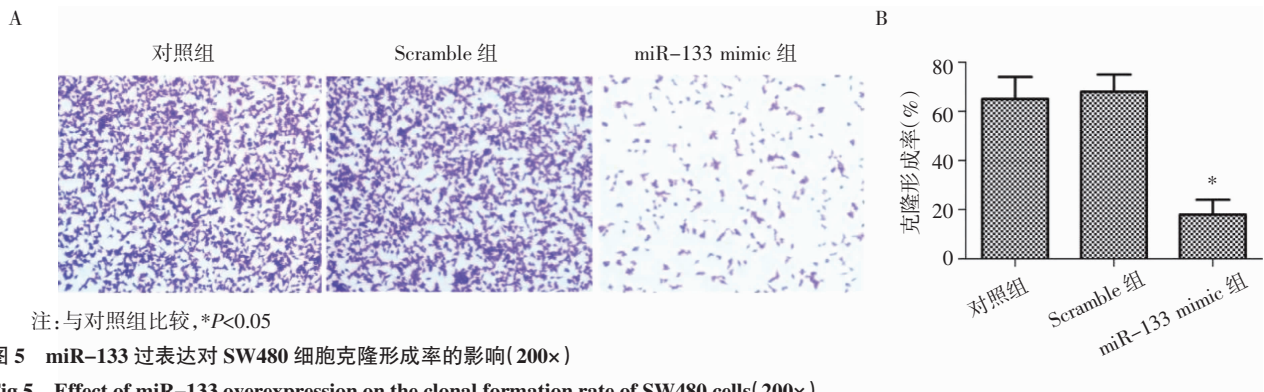


图5 miR-133 过表达对 SW480 细胞克隆形成率的影响(200×)

Fig 5 Effect of miR-133 overexpression on the clonal formation rate of SW480 cells(200×)

2.6 miR-133 过表达对结肠癌裸鼠移植瘤成瘤的影响 检测各组裸鼠肿瘤重量如图 6A、B 所示,与对照组相比,miR-133 mimic 组肿瘤重量显著降低($t=1.788, P<0.05$);RT-PCR 检测各组裸鼠肿瘤 miR-133 表达水平结果如图 6C 所示,与对照组相比,

miR-133 mimic 组 miR-133 表达水平显著升高($t=1.043, P<0.05$);免疫组化检测各组裸鼠 Caspase-3、Ki67 阳性细胞数结果如图 6D 所示,与对照组相比,miR-133 mimic 组 Caspase-3 阳性细胞数显著升高($t=1.167, P<0.05$), Ki67 阳性细胞数显著降低($t=1.557, P<0.05$)。

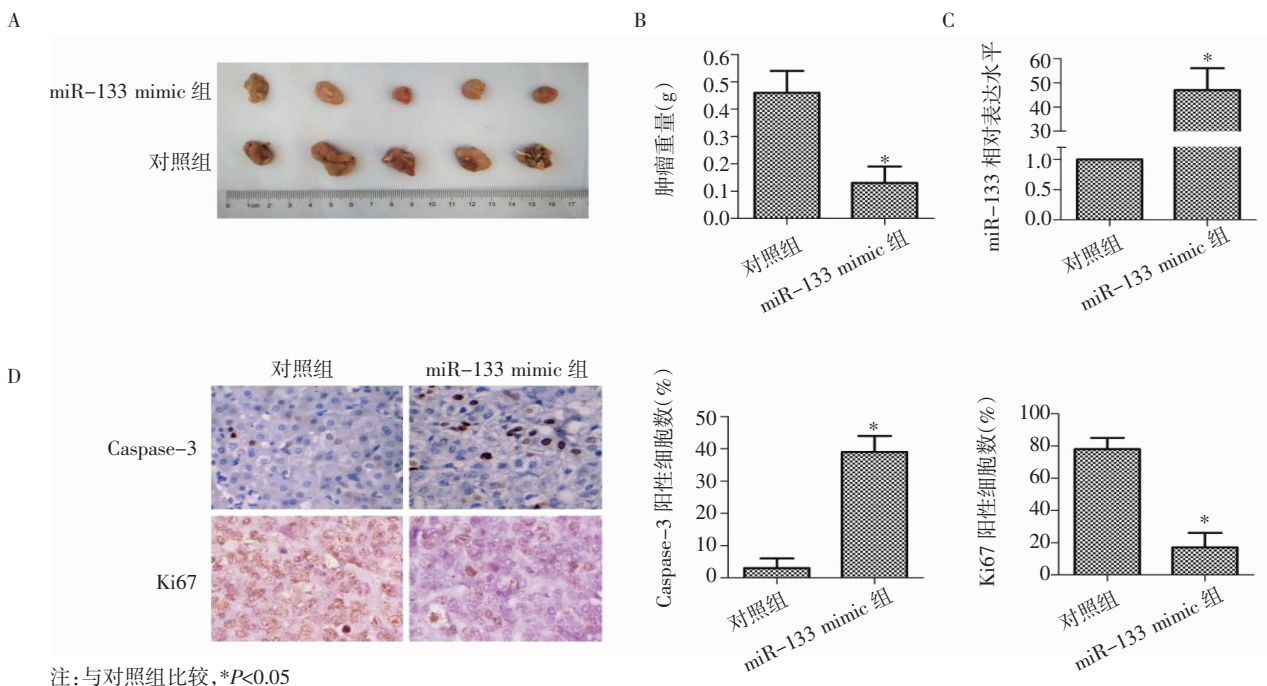


图6 miR-133 过表达对结肠癌裸鼠移植瘤成瘤的影响(200×)

Fig 6 Effect of miR-133 overexpression on tumorigenesis in nude mice with colon cancer (200×)

3 讨论

结肠癌是一种常发于中老年群体的恶性消化道肿瘤,主要发病部位为直肠与乙状结肠交界处。结肠癌早期症状不典型,诊断困难,且多数患者发现时已处于癌症中晚期,导致预后较差。因而,迫切需要探寻早期诊断结肠癌的生物标志物。

细胞凋亡途径的活化是治疗肿瘤最主要的方法之一。细胞凋亡分为外源性、内源性及内质网应激凋亡途径^[9]。Bcl-2 家族的抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 是细胞凋亡的关键调控因子,升高 Bax/Bcl-2 比值可诱导细胞凋亡,降低 Bax/Bcl-2 比

值则抑制细胞凋亡^[10]。细胞质中的 Caspase-3 一般无活性,并以 ProCaspase-3 形式存在,当细胞受到凋亡刺激时,被激活进而诱导细胞发生凋亡,当 Caspase-3 活化时意味着凋亡进入不可逆阶段^[11]。Caspase-9 是一种常见凋亡启动因子,可通过激活下游凋亡执行因子启动凋亡^[12]。C-myc 是一种常见的原癌基因,可促进细胞增殖或诱导细胞凋亡,在结肠癌组织中异常高表达^[13]。ZHANG 等^[14]研究发现,miR-133 靶向 YES 原癌基因 1,诱导三阴性乳腺癌细胞凋亡。许荣华等^[15]研究发现,上调 miR-133 水平可抑制胃癌细胞的侵袭并诱导凋亡。本研究发现,

miR-133 过表达具有升高 SW480 细胞 Bax/Bcl-2、cleaved Caspase-3/Caspase-3、cleaved Caspase-9/Caspase-9 表达,降低 c-Myc 蛋白表达水平和升高结肠癌裸鼠移植瘤 Caspase-3 阳性表达率的作用。提示 miR-133 过表达通过调节线粒体凋亡通路凋亡因子,诱导 SW480 细胞凋亡,促进结肠癌裸鼠移植瘤肿瘤细胞凋亡。

结肠癌的发生、发展是多步骤、多基因变化的过程,从分子角度出发,抑制癌细胞增殖是治疗结肠癌的基本策略^[16]。Ki67 在肿瘤组织中的表达强度与肿瘤细胞的增殖密切相关。已有研究表明,Ki67 在结肠癌肿瘤组织中高表达^[17]。彭玉平等^[18]研究发现,miR-13 通过靶向 JAK2 抑制胃癌细胞增殖。胡东辉等^[19]研究发现,miR-133 通过影响 EGFR 表达而抑制肝癌细胞的增殖。本研究发现,miR-133 过表达可降低 SW480 细胞克隆形成率和结肠癌裸鼠移植瘤 Ki67 的阳性表达率。提示 miR-133 过表达抑制 SW480 细胞和结肠癌裸鼠移植瘤肿瘤细胞增殖。

综上所述,本研究通过过表达 SW480 中 miR-133,观察其对 SW480 细胞生物学的影响。结果证实,miR-133 过表达诱导 SW480 细胞凋亡,抑制 SW480 细胞增殖和裸鼠肿瘤的形成。miR-133 可能为结肠癌的诊疗提供新的依据和分子靶点。

参考文献:

- [1] GOMES S E, SIMÕES A E S, PEREIRA D M, et al. Mir-143 or mir-145 overexpression increases cetuximab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in human colon cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(8):9368
- [2] QI L, DING Y. Screening of differentiation-specific molecular biomarkers for colon cancer[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(6): 2543
- [3] ZENG M, ZHU L, LI L, et al. Mir-378 suppresses the proliferation, migration and invasion of colon cancer cells by inhibiting sdad1[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2017, 22:12
- [4] VELAZQUEZ K T, Enos R T, McClellan J L, et al. Microna-155 deletion promotes tumorigenesis in the azoxymethane-dextran sulfate sodium model of colon cancer[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2016, 310(6):G347
- [5] ZHOU Y, WU D, TAO J, et al. Microna-133 inhibits cell proliferation, migration and invasion by targeting epidermal growth factor receptor and its downstream effector proteins in bladder cancer[J]. *Scand J Urol*, 2013, 47(5):423
- [6] LIU S, CHEN J, ZHANG T, et al. Microna-133 inhibits the growth and metastasis of the human lung cancer cells by targeting epidermal growth factor receptor[J]. *J BUON*, 2019, 24(3):929
- [7] CHEN X B, LI W, CHU A X. Micro RNA-133a inhibits gastric cancer cells growth, migration, and epithelial-mesenchymal transition process by targeting presenilin 1[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(1):470
- [8] CHENG Z, LIU F, WANG G, et al. Mir-133 is a key negative regulator of cdc42-pak pathway in gastric cancer[J]. *Cell Signal*, 2014, 26(12):2667
- [9] MODI S, KIR D, BANERJEE S, et al. Control of apoptosis in treatment and biology of pancreatic cancer[J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117(2):279
- [10] SIQUEIRA EC, SOUZA FT, Diniz MG, et al. Hsp27 (hspb1) differential expression in normal salivary glands and pleomorphic adenomas and association with an increased bcl2/bax ratio[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(1):213
- [11] YANG S, LI X, DOU H, et al. Sesamin induces A549 cell mitophagy and mitochondrial apoptosis via a reactive oxygen species-mediated reduction in mitochondrial membrane potential[J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2020, 24(3):223
- [12] MORISHIMA N, NAKANISHI K, TAKENOUCHI H, et al. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(37):34287
- [13] 孙光源, 武亮, 张月, 等. 结肠癌组织中 wwp1、c-myc 的表达及临床意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2019, 29(10):21
- [14] ZHANG G, WANG J, ZHENG R, et al. Mir-133 targets yes1 and inhibits the growth of triple-negative breast cancer cells[J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2020, 19:1533033820927011
- [15] 许荣华, 何冬雷, 孟津. Mir-133 在胃癌组织中的表达及对胃癌细胞恶性行为的影响[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2015, 7:588
- [16] NAGAPPAN A, LEE W S, YUN J W, et al. Tetraarsenic hexoxide induces g2/m arrest, apoptosis, and autophagy via PI3k/Akt suppression and p38 mapk activation in sw620 human colon cancer cells[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3):e0174591
- [17] 王东华, 贾喜花, 郑淑君, 等. 结肠癌组织中 capn4 和 ki-67 的表达及临床意义[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2017, 22(3):223
- [18] 彭玉平, 蒋红钢, 陈治横, 等. Mir-133 靶向 jak2 抑制胃癌细胞增殖、迁移和侵袭[J]. *世界华人消化杂志*, 2018, 26(35):2036
- [19] 胡东辉, 黄橘村, 张建军. Mir-133 靶向表皮生长因子受体抑制肝癌细胞的侵袭和迁移[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2019, 38(6):1044

(2020-11-06 收稿)