

网络出版时间: 2017-7-29 12:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170729.1200.003.html>

# miRNA-331 对大肠癌细胞 HCT116 生物学功能的影响

胡明高<sup>1,2</sup>, 余昌俊<sup>1</sup>, 陈昌裕<sup>3</sup>, 郑强<sup>1</sup>, 康伟彪<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨 miRNA-331 对大肠癌细胞 HCT116 增殖、迁移和侵袭等生物学功能的影响。方法 将 HCT116 细胞转染 miRNA-331 mimics 后, 通过 MTT 实验、克隆形成实验检测 miRNA-331 对大肠癌细胞增殖的影响; Transwell 实验检测 miRNA-331 对 HCT116 细胞迁移和侵袭的影响。结果 转染 miRNA-331 mimics 的 HCT116 细胞在 MTT 实验中第 1 天~第 5 天的吸光度值与对照组相比显著减低; 克隆形成实验中 转染 miRNA-331 mimics 后, HCT116 细胞形成克隆的能力被削弱; Transwell 实验显示, 与阴性对照相比, 转染 miRNA-331 mimics 后, HCT116 细胞的迁移能力明显下降。结论 miRNA-331 表达上调可抑制 HCT116 细胞的增殖、迁移能力, 表明 miRNA-331 有潜在的抑癌作用。

**关键词** miRNA-331; 结肠肿瘤; 肿瘤抑制

**中图分类号** R 735.34

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2017)10-1429-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.10.003

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类长度约 22nt 的内源性非编码小分子 RNA, 其通过与靶

mRNA 的 3' 非翻译区完全或不完全配对来降解 mRNA 或阻断其翻译, 在细胞的分化、增殖、凋亡、浸润、迁移等方面起着重要作用。近年研究<sup>[1]</sup>显示, miRNA 在大肠癌中存在异常表达, 在大肠癌发生、发展过程中起着正性或负性调节作用。已有研究<sup>[2-5]</sup>表明 miRNA-331 在胃癌、原发性肝癌、前列腺癌、宫颈癌等恶性肿瘤的发生和发展中起着调控作用, 但 miRNA-331 对大肠癌基因的调控作用少有报道。该研究拟通过分析 miRNA-331 对肠癌细胞 HCT116 的增殖、迁移及侵袭等生物学功能的影响, 为进一步探讨 miRNA-331 在大肠癌诊断及治疗中意义提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 主要材料和试剂** 大肠癌细胞株 HCT116 购自中国科学技术大学生命科学院朱涛教授实验室; DMEM 培养液、胎牛血清、青、链霉素、L-谷氨酰胺、胰蛋白酶购自美国 GIBCO 公司; 苏木精染色液购自福州迈新 Maxim 生物技术有限公司; 三氯甲烷、无水乙醇、异丙醇、EDTA、DMSO 购自国药集团化学试剂有限公司。

**1.2 细胞培养** HCT116 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液进行培养, 孵育在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中常规培养。每 1~2 d 更换培养液, 当细胞的融合度达 80%~90% 时进行细胞传代。

2017-05-25 接收

基金项目: 安徽省科技计划项目(编号: 3101005002598)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学第一附属医院胃肠外科, 合肥 230022

<sup>2</sup> 中国人民解放军海军安庆医院普外科, 安庆 246003

<sup>3</sup> 安徽省中医院普外科, 合肥 230022

作者简介: 胡明高, 男, 硕士研究生;

余昌俊, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yuchangjun321@163.com

20 mg/L). The model of the myocardial ischemia/reperfusion injury were established using the Langendorff method. The hemodynamics indexes, cardiac enzymes AST and LDH, inflammatory cytokines (NF- $\kappa$ B, ICAM-1, TNF- $\alpha$  and IL-6) were measured. The effect and mechanism of Gossypol on early-stage MI/R of the oxidative stress response and the JNK/p38 MAPK signal pathway were investigated. **Results** Experimental results showed that Gossypol could significantly improve the functional capacity of the heart, reduce the contents of AST, LDH and inflammatory cytokines in reperfused heart tissue, and increase superoxide dismutase levels to protect the heart. The mechanism of this substance may involve anti-lipid peroxidation and inhibition of p38 kinase phosphorylation and JNK, and reduction of oxidative stress injury and apoptosis damage induced by MI/R. **Conclusion** This study confirm that Gossypol exerts extensive anti-MI/R effects. Its mechanism may be related to the interfering with the oxidative stress response and suppressing the JNK/p38 MAPK signal pathway.

**Key words** Gossypol; myocardial ischemia/reperfusion injury; oxidative stress response; JNK/p38 MAPK signal pathway

**1.3 细胞转染** 选择已传代 2 次以上的处于稳定生长、对数期的细胞进行铺板,将适量的细胞( $4 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ )接种于 24 孔板上,第 2 天当细胞密度达到 30% ~ 50% 时,进行 miRNA-331mimics(设为实验组)和阴性对照(设为对照组)转染;使用 50  $\mu$ l 不含血清培养液 Opti-MEM 兑 1.25  $\mu$ l 浓度为 20  $\mu$ mol/L 的 miRNA-331mimics 和阴性对照进行稀释,轻轻震荡摇匀后在室温下孵育 5 min;同样用 50  $\mu$ l 不含血清培养液 Opti-MEM 兑 1  $\mu$ l Lipo2000 进行稀释,轻轻震荡摇匀后在室温下孵育 5 min;将稀释好的 miRNA-331mimics 和阴性对照分别与 Lipo2000 混匀后在室温下孵育 20 s,使之形成 mimics-Lipo2000 混合物;将 100  $\mu$ l mimics-Lipo2000 混合物加入到 24 孔板中,再将 24 孔培养板置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 4 ~ 6 h,移除每孔中的混合培养液,并更换新鲜的培养液,继续培养 24 h,以供后续实验使用。

**1.4 MTT 法检测 miRNA-331 转染对 HCT116 细胞增殖的影响** 取 5 块 96 孔培养板,设 6 个平行孔,每孔加入上述转染并计数的 HCT116 细胞 1 000 个,每孔内加入培养液至 200  $\mu$ l,置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中进行培养,分别在培养后第 1、2、3、4、5 天用酶标仪检测各孔吸光度(optical density, OD)值(波长 570 nm)。

**1.5 克隆形成实验** 取 6 孔板,将上述已转染并计数的 HCT116 细胞分别接种于 6 孔中,每孔接种细胞 1 000 个,培养液为 2 ml。继续培养 10 d 后用结晶紫染色,计数细胞克隆并拍照,重复实验 3 次,每次实验设 3 个重复孔。

**1.6 Transwell 小室检测细胞迁移和侵袭能力**

**1.6.1 迁移实验** 准备一个 24 孔板,每孔中加入含 600  $\mu$ l 完全 DMEM 的培养液,在培养液上放入 Transwell 小室,将上述已转染并计数的 HCT116 细胞分别取 100  $\mu$ l ( $10 \times 10^4$  个细胞)分别加入各个 Transwell 小室中。将 24 孔板放入 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 18 h 后观察到有少量细胞穿过小室到达下方的培养液,弃去 Transwell 小室中的培养液,清洗、固定、染色后将 Transwell 小室置于显微镜下拍照,每个孔至少选取 5 个不同的视野拍照记录。

**1.6.2 侵袭实验** 实验前 1 天准备好 Transwell 小室和 24 孔板,在每个 Transwell 小室里铺上 60  $\mu$ l 铺含有 10% Matrigel 的 DMEM 无血清培养液,将 24 孔板置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱中过夜,然后置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育至少 5 h。将上述已转染并计数的

HCT116 细胞分别取 100  $\mu$ l ( $10 \times 10^4$  个细胞)加入各个 Transwell 小室中。培养 24 h 后观察有无细胞穿过小室到达下方培养液,然后每 6 h 观察一次,在培养 72 h 后仍未显示各小室中有少量细胞穿透至下层培养液中。按迁移实验方法,将 Transwell 微孔膜固定、染色,于显微镜下拍照记录,每孔至少选取 5 个不同视野拍照记录。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS 20.0 软件进行分析,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两样本均数比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 MTT 实验结果** HCT116 细胞转染 miRNA-331mimics 后第 1 天 ~ 第 5 天随着时间推移 OD 值有明显变化,并有扩大趋势,表明转染了 miRNA-331 mimics 的 HCT116 细胞增殖受限 (*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 实验组和对照组 MTT 实验结果

时间	实验组 OD 值	对照组 OD 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
第 1 天	0.081 $\pm$ 0.072	0.096 $\pm$ 0.081	-3.423	0.007
第 2 天	0.101 $\pm$ 0.014	0.165 $\pm$ 0.041	-3.334	0.015
第 3 天	0.388 $\pm$ 0.090	0.621 $\pm$ 0.211	-2.485	0.043
第 4 天	0.749 $\pm$ 0.102	1.120 $\pm$ 1.937	-5.050	0.000
第 5 天	1.127 $\pm$ 0.229	2.225 $\pm$ 0.296	-7.192	0.000

**2.2 克隆形成实验结果** 在细胞克隆形成实验中,实验组、对照组细胞集落形成数分别为 (178  $\pm$  8)、(249  $\pm$  4) 个,差异有统计学意义 (*t* = -23.492、-23.492, *P* < 0.05),实验组细胞集落形成数量少于对照组,且集落体积明显小于对照组 (*P* < 0.05),表明 miRNA-331 抑制大肠癌细胞的非锚定生长能力。见图 1、2。

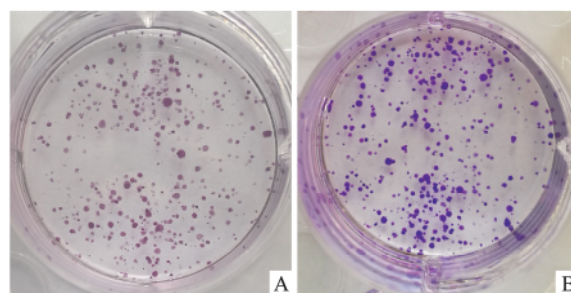


图 1 高表达 miRNA-331 的 HCT116 细胞克隆形成结果 结晶紫染色  $\times 4$   
A: 实验组; B: 对照组

**2.3 Transwell 迁移和侵袭实验结果** 实验组、对

对照组 18 h 迁移细胞数分别为  $(48 \pm 3)$ 、 $(106 \pm 4)$  个, 细胞迁移能力差异有统计学意义 ( $t = -35.571$ 、 $-35.571$ ,  $P < 0.05$ ), 见图 3、4; 侵袭实验中, 超过 72 h 两组中细胞均未穿透培养液, 结果为阴性, 见图 5。

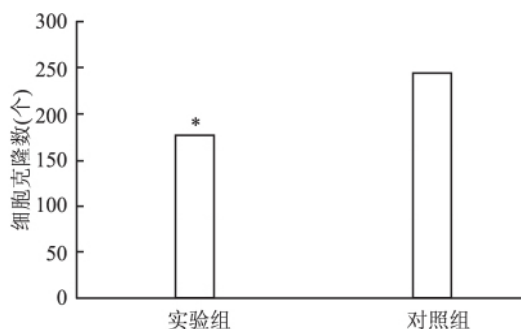


图2 大肠 HCT116 细胞锚定非依赖生长能力  
与对照组比较: \*  $P < 0.05$

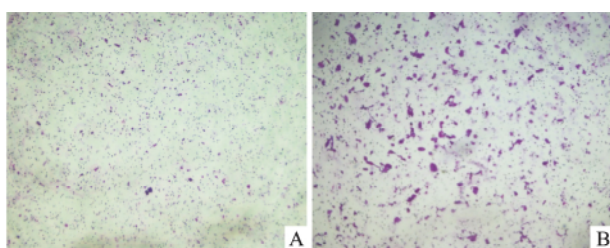


图3 大肠癌细胞 HCT116 迁移能力 结晶紫染色  $\times 4$   
A: 实验组; B: 对照组

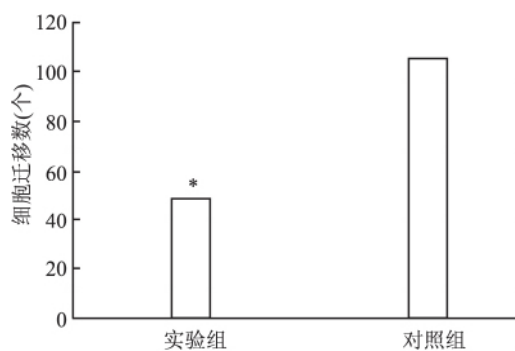


图4 大肠 HCT116 迁移能力  
与对照组比较: \*  $P < 0.05$

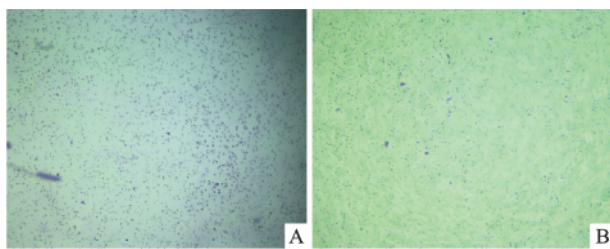


图5 miRNA-331 表达上调对大肠癌细胞 HCT116  
侵袭能力的影响 结晶紫染色  $\times 4$   
A: 实验组; B: 对照组

### 3 讨论

大肠癌是人类常见的恶性肿瘤,其发病率和死亡率在我国癌症中占前 5 位<sup>[6]</sup>。miRNA 作为内源性分子,在大肠癌的早期诊断、预后评估和靶向治疗中的作用仍是研究的重点。本实验旨在探讨 miRNA-331 在大肠癌细胞中的生物学功能。

本研究结果显示,转染了 miRNA-331 mimics 的大肠癌细胞克隆形成集落及体积明显减少; MTT 实验显示第 1 天~第 5 天两组细胞增殖明显改变,且有扩大趋势,两组差异有统计学意义,表明转染了 miRNA-331 mimics 的大肠癌细胞增殖能力下降,即高表达 miRNA-331 抑制了大肠癌细胞的克隆与增殖。在 Transwell 迁移中,实验组 HCT116 细胞迁移能力明显降低,这表明高表达 miRNA-331 可以抑制大肠癌细胞迁移能力。但在侵袭实验中,72 h 后两组 HCT116 细胞均未能穿至膜上,结果呈阴性。本研究显示过表达 miRNA-331 可抑制大肠癌细胞克隆、增殖及侵袭能力,表明 miRNA-331 可能是大肠癌的抑癌基因,在大肠癌的发生、发展过程中起到负性调节作用。

对 miRNA 相关的机制研究(信号通路和靶向基因)是其作为分子标志物及治疗靶点应用于临床的前提。目前对于 miRNA-331 在大肠癌中的功能研究鲜有报道,但在胃癌、原发性肝癌、前列腺癌、宫颈癌等恶性肿瘤中已有报道<sup>[2-5]</sup>。Zhao et al<sup>[7]</sup> 研究发现 miRNA-331-3p 通过激活 PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路作用于 HER2,进而抑制大肠癌细胞增殖。Butrym et al<sup>[8]</sup> 首次发现 miRNA-331 在急性髓系白血病患者中明显上调,miRNA-331 过表达与急性髓系白血病治疗疗效差及生存期短有关。这些研究结果有助于更好地了解白血病发病机制,为新的抗白血病药物的研发提供理论依据。Epis et al<sup>[9]</sup> 研究发现 DOHH 表达与前列腺癌细胞 miRNA-331-3p 表达呈负相关性,转染 miRNA-331-3p 可抑制 DOHH 表达、细胞增殖和细胞毒性作用。Guo et al<sup>[10]</sup> 将 miRNA-331-3p 的前体或抑制剂转染到胃癌细胞中,经过 RT-PCR 检测显示在所有的胃癌细胞株中 miRNA-331-3p 表达下调,miRNA-331-3p 过表达可阻止 SGC-7901 和 AGS 细胞系的 G1/S 细胞周期转化,miRNA-331-3p 通过干扰其直接靶基因 E2F1 活动从而显著抑制集落形成和细胞生长的能力。Chang et al<sup>[11]</sup> 研究原发性肝癌 miRNA 的表达谱发现,miRNA-331-3p 在肝癌细胞组织中的表达明显上调,特

别是在结节性原发性肝癌中的表达水平增加超过正常肝细胞组织的3倍,而且发现 miRNA-331-3p 在肝癌组织中高表达与患者预后不良有显著相关性。Fujii et al<sup>[12]</sup> 研究发现,miRNA-331-3p 在宫颈癌细胞增殖的调节中起重要作用,而且 miRNA-331-3p 可能通过 NRP2 有助于抑制角质形成细胞分化。miRNA-331-3p 和 NRP2 可能有助于抗癌作用,miRNA-331-3p 通过调节 HPV 的活动与宫颈癌进展有关。

综上所述,miRNA-331 在大肠癌的发生和发展中可能起着抑癌基因的作用,但其在大肠癌中的具体作用机制还不清楚,还需要进一步研究,以期在大肠癌早期诊断以及分子靶向治疗方面提供依据。

### 参考文献

[1] 唐林,黄维康,杨帆等. miRNA 在大肠癌中的作用[J]. 癌症进展, 2016, 14(2): 138-41.  
 [2] 孙彦珍,李珍,袁征. MicroRNA-195 在胃癌患者血清及组织中的表达水平及意义[J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(5): 59-62.  
 [3] 张纓,贾绍昌,项方等. miR-21 在肝癌细胞中的表达及其与抑癌基因 PTEN 的关系[J]. 临床肿瘤学杂志, 2014, 19(6): 490-3.  
 [4] 姚春红,袁新初,刘冲等. miRNA-15a 在前列腺癌中的表达及诊断意义[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(8): 1219-24.

[5] 车艳红,卢爱妮,廖予妹. miR-143 在宫颈癌组织中表达及临床意义的初步研究[J]. 医学研究生学报, 2014, 27(5): 510-2.  
 [6] 陈万青,郑荣寿,张思维等. 2012 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2016, 25(1): 1-8.  
 [7] Zhao D, Sui Y, Zheng X, et al. MiR-331-3p inhibits proliferation and promotes apoptosis by targeting HER2 through the PI3K/Akt and ERK1/2 pathways in colorectal cancer[J]. *Oncol Rep* 2016, 35(2): 1075-82.  
 [8] Butrym A, Rybka J, Baczyńska D, et al. Expression of microRNA-331 can be used as a predictor for response to therapy and survival in acute myeloid leukemia patients[J]. *Biomark Med*, 2015, 9(5): 453-60.  
 [9] Epis M R, Giles K M, Kalinowski F C, et al. Regulation of expression of deoxyhypusine hydroxylase (DOHH), the enzyme that catalyzes the activation of eIF5A, by miR-331-3p and miR-642-5p in prostate cancer cells[J]. *J Biol Chem* 2012, 287(42): 35251-9.  
 [10] Guo X, Guo L, Ji J, et al. miRNA-331-3p directly targets E2F1 and induces growth arrest in human gastric cancer[J]. *Biochem Biophys Res Comm* 2010, 398(1): 1-6.  
 [11] Chang R M, Yang H, Fang F, et al. MicroRNA-331-3p promotes proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting PH domain and leucine-rich repeat protein phosphatase[J]. *Hepatology* 2014, 60(4): 1251-63.  
 [12] Fujii T, Shimada K, Asano A, et al. MicroRNA-331-3p suppresses cervical cancer cell proliferation and E6/E7 expression by targeting NRP2[J]. *Int J Mol Sci* 2016, 17(8): E1351.

## The biological function of miRNA-331 in colorectal cancer HCT116 cells

Hu Minggao<sup>1,2</sup>, Yu Changjun<sup>1</sup>, Chen Changyu<sup>3</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

<sup>2</sup>Dept of General Surgery, The PLA Navy Anqing Hospital, Anqing 246003;

<sup>3</sup>Dept of General Surgery, Anhui Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To explore effects of miRNA-331 on proliferation, migration and invasion of human colorectal cancer cell line HCT116. **Methods** After transfection of HCT116 cells with miRNA-331 mimics, the effect of miRNA-331 on the proliferation of colorectal cancer cells was detected by MTT assay and clone formation assay. Transwell was used to detect the effects of miRNA-331 on migration and invasion of HCT116 cells. **Results** The absorbance values were significantly lower compared to the control group after HCT116 cells transfected with miRNA-331 mimics from day 1 to day 5. After the transfection of miRNA-331 mimics, the ability of HCT116 cells to form clones was reduced. Transwell assay revealed that compared with the negative control after transfection of miRNA-331 mimics, the migration ability of HCT116 cells decreased significantly. **Conclusion** The up-regulation of miRNA-331 expression can inhibit the proliferation and migration of HCT116 cells, suggesting that miRNA-331 is a potent tumor suppressor.

**Key words** miRNA-331; colorectal carcinoma; tumor suppressor