

网络出版时间:2016-5-9 15:43:10 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160509.1543.014.html

MiR-200a 对结直肠癌 SW1116 细胞侵袭和迁移的影响

李懿君 李 昊 尹 玉 孙晶璐 江 燕 詹鹤琴 杨 枫 詹 磊

摘要 目的 探讨微小 RNA(miR)-200a 的过表达对结直肠癌 SW1116 细胞迁移和侵袭能力的影响。方法 利用 Lipofectamine™ 2000 瞬时转染含 miR-200a 的质粒,实验组将载有 miR-200a 的质粒转染至结直肠癌 SW1116 细胞中,细胞对照组结直肠癌 SW1116 细胞不做任何处理;应用实时定量 PCR 法分析 miR-200a 的表达变化,划痕实验检测细胞迁移能力的改变、Transwell 小室侵袭实验检测细胞侵袭能力的改变。结果 实时定量 PCR 结果表明,与细胞对照组比较,实验组经瞬时转染后 miR-200a 的表达水平显著升高($P < 0.01$);划痕实验和 Transwell 小室侵袭实验表明外源性过表达 miR-200a 可促进结直肠癌 SW1116 细胞的迁移和侵袭能力,与细胞对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结论 miR-200a 能明显促进结直肠癌 SW1116 细胞的侵袭和迁移。

关键词 结直肠癌; miR-200a; 侵袭; 迁移

中图分类号 R 735.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)06-0791-04

结直肠癌是临床上常见的消化系统恶性肿瘤,常发生侵袭、转移^[1]。结直肠癌的早期症状通常很难被发现,患者确诊时往往已是晚期,已经发生了远处转移,甚至转移到了肝脏。发生了转移的结直肠癌患者的平均生存时间不到 2 年^[2],因此,探讨结直肠癌的发生发展的原因以及侵袭转移的分子机制,对结直肠癌的发病以及转移进行预测、诊断和预后判断等是结直肠癌研究的重要内容。Michael et al^[3] 首先报道 miRNA(miR)-143 与 miR-145 在结肠直肠癌中表达失调,随后陆续发现多种 miR 的表达失调并参与结直肠癌的发生发展,某些 miR 有一定的诊断及预后价值^[4]。该实验将载有 miR-200a 的质粒转染至结直肠癌 SW1116 细胞中,研究 miR-200a

对结直肠癌 SW1116 细胞侵袭能力和迁移能力的影响,探讨其与结直肠癌临床病理参数的关系。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 SW1116 人结直肠癌细胞系由南京医科大学病理教研室馈赠;RPMI-1640 培养液、胎牛血清和 Lipofectamine™ 2000 均购自美国 Thermo Fisher Scientific Inc 公司;二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司;miR 提取试剂盒、miR cDNA 第一链合成试剂盒、PCR 检测试剂盒均购自北京康为世纪生物科技有限公司;LightCycler™ 480 荧光定量 PCR 仪购自瑞士罗氏公司;Transwell 小室购自美国 Corning Costar 公司;Matrigel 凝胶购自美国 BD 公司。

1.2 细胞培养与转染 人结直肠癌细胞系(SW1116 细胞)常规置于含 5% 灭活胎牛血清、100 μmol/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 RPMI-1640 培养液中,于 37℃、5% CO₂ 条件下进行培养。每隔 1~2 d 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。之后换为不含抗生素的含 5% 胎牛血清的 RPMI-1640 基础培养基中传代 SW1116 细胞,调整细胞密度达 2×10^5 /ml,接种于 6 孔板中。次日进行转染实验,实验分 2 组:实验组(转染 5 μg Pgenesil-1-miRNA200a 质粒)、细胞对照组。待 SW1116 细胞的融合率约 90% 时,将载有 miR-200a 的质粒加入 250 μl 的 RPMI-1640 培养液混匀,再将 10 μl 的 Lipofectamine™ 2000 与 250 μl 的 RPMI-1640 培养液混匀,常温孵育 20 min;之后将这两种稀释液温和混匀,室温孵育 20 min,加入 6 孔板各孔,每组设置 3 个复孔。

1.3 实时定量 PCR 法检测结直肠癌 SW1116 细胞中 miR-200a 基因表达变化 细胞转染成功后,收集细胞,提取总 RNA,并逆转录为 cDNA,随后通过实时荧光定量 PCR 检测实验组中 miR-200a 的表达水平,miR-200a 以磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)的表达作为内参照。miR-200a 上游引物:5'-CCTACG CACAATTAACAAGCC-3',下游引物:5'-GCCGTCTA-ACACTGTCTGGTA-3',GAPDH 上游引物:5'-TAT-GTCGTGGAGTCTACTGGT-3',下游引物:5'-GAGTT-

2016-04-14 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81201536);安徽高校省级自然科学基金(编号:KJ2011A160)

作者单位:安徽医科大学病理学教研室,合肥 230032

作者简介:李懿君,女,硕士研究生;

李 昊,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: li-hao3402@aliyun.com;

尹 玉,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: aydy-inyu@aliyun.com

GTCATATTTCTCGTGG-3'。扩增反应的条件: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环。分别记录实验组和细胞对照组的实验结果, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法进行分析计算, 以衡量 miR-200a 的表达强度, 实验重复 3 次。

1.4 划痕实验检测 miR-200a 对结直肠癌 SW1116 细胞迁移能力的影响 用 Marker 笔在 6 孔板背后均匀的划横线, 大约每隔 1 cm 划一道, 横穿过孔, 每孔至少穿过 5 条线。在 6 孔板中接种转染后 24 h 后的各组细胞, 每组设置 3 个复孔, 待细胞融合率达 90% 时, 用 200 μ l 微量移液枪头在 6 孔板内垂直于背后的横线划痕。用 PBS 洗 3 遍, 冲洗掉划痕之间的细胞, 之后加入无血清的 RPMI-1640 培养基, 放入培养箱中进行培养。随机选出 10 个点, 分别于 0 h 和 24 h 的时候在显微镜下进行拍照。通过计算划痕两边细胞迁移的距离来判断结直肠癌 SW1116 细胞的迁移能力, 实验重复 3 次。

1.5 Transwell 小室侵袭实验检测 miR-200a 对结直肠癌 SW1116 细胞侵袭能力的影响 将细胞浓度调整至 1×10^4 /ml 后接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后进行转染。50 mg/L 的 Matrigel 用不含血清的培养基 1:8 稀释, 在 Transwell 小室的通透膜上均匀涂 50 μ l 后 4 °C 晾干。将转染后 24 h 的 200 μ l 的细胞悬液加入侵袭小室的上室中, 并将含 5% 胎牛血清的 RPMI-1640 基础培养基 (600 μ l) 加入到侵袭小室的下室中。之后将小室置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。24 h 后, 将 Matrigel 凝胶和小室通透膜上方的细胞用棉签擦去, 固定侵袭到小室膜下方的细胞并用 0.1% 结晶紫染色 20 min 后, 在显微镜下随机取 5 个视野, 计数穿过通透膜的细胞个数, 以穿过膜的细胞的相对个数计量结直肠癌 SW1116 细胞的侵袭能力, 实验重复 3 次。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 19.0 以及 Excel 软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组均数之间的比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 实时定量 PCR 法检测结直肠癌 SW1116 细胞中 miR-200a 的表达 细胞对照组和实验组中 miR-200a 的表达分别为 (1.0 ± 0.0)、($1\ 269.6 \pm 441.1$), 实验组中 miR-200a 的表达水平较细胞对照组明显升高 ($t = 12.383, P = 0.006$); 实时定量 PCR 法检测表明转染后实验组 miR-200a 的表达升高。

2.2 miR-200a 对结直肠癌 SW1116 细胞迁移能力

的影响 划痕实验后分别于 0、24 h 时在倒置光学显微镜下观察划痕伤口的宽度, 细胞对照组和实验组中 24 h 时迁移距离的百分比分别为 (39.96 ± 2.64) %、(68.86 ± 4.70) % , 差异有统计学意义 ($t = 6.501, P = 0.023$)。划痕实验结果表明转染 miR-200a 后 SW1116 细胞迁移能力升高, 见图 1。

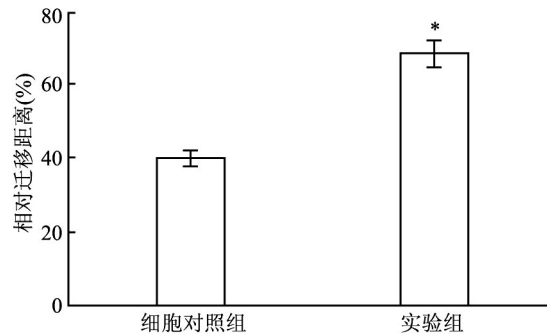
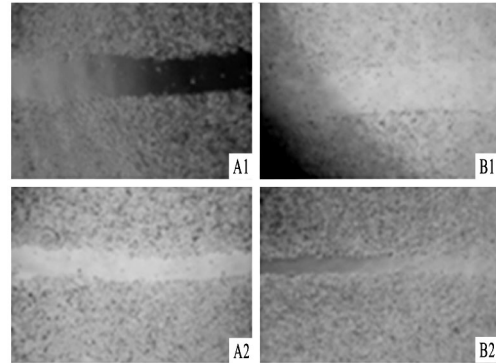


图1 miR-200a 对 SW1116 细胞迁移力的影响

A: 细胞对照组; B: 实验组; 1: 0 h; 2: 24 h; 与细胞对照组比较: * $P < 0.05$

2.3 miR-200a 对结直肠癌 SW1116 细胞侵袭能力的影响 采用 Transwell 小室侵袭实验检测 miR-200a 对 SW1116 细胞侵袭能力的影响, 细胞对照组和实验组中穿过基膜的细胞数分别为 (100.0 ± 0.0) 个和 (331.33 ± 25.03) 个, 差异有统计学意义 ($t = 13.07, P = 0.006$)。Transwell 侵袭实验结果表明转染 miR-200a 后 SW1116 细胞侵袭能力升高, 见图 2。

3 讨论

miRNAs 是一组长度约为 20 ~ 25 个核苷酸的内源性非编码小分子 RNA, 对真核生物的基因表达、细胞发育分化和个体发育等多方面起调控作用, 在肿瘤的发生发展过程中, 也起到非常重要的调控作用^[5]。近年来, miR-200 家族在调节肿瘤的进展方面受到广泛关注, miR-200 家族在上皮来源肿瘤 (如消化系统肿瘤、乳腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、前列腺

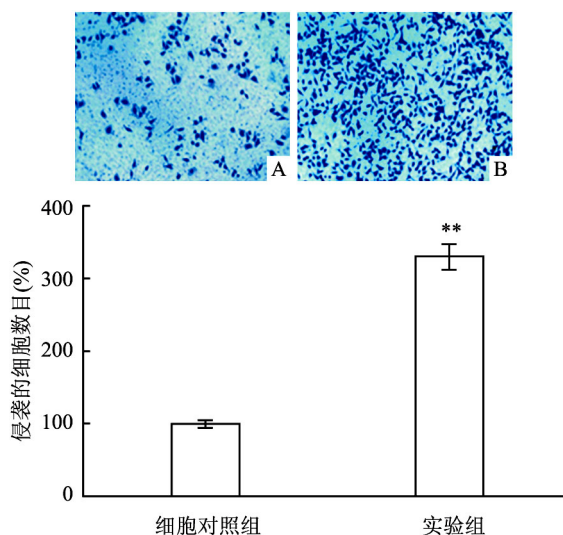


图2 miR-200a对SW1116细胞侵袭力的影响

A: 细胞对照组; B: 实验组; 与细胞对照组比较: ** $P < 0.01$

癌等)中扮演的角色也越来越为人们所知。

miR-200家族包括miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-141和miR-429五个成员,miR-200家族已经被证实在多种肿瘤中通过调控上皮-间质转化影响肿瘤的进展。miR-200家族在不同的肿瘤的发生发展以及转移中起着重要的作用,目前已有研究^[6]证明miR-200家族在胃癌中表达下调,在正常组织和癌组织中的表达差异有统计学意义,亦有研究^[7]表明,在奥沙利铂抵抗的结直肠癌患者中,miR-200c和miR-141的表达是下调的,miR-200c和miR-141则被报道^[8]其表达的下调可促进ZEB1/2的表达进而推动及胃癌的进展,miR-200家族在乳腺癌中的低表达与乳腺癌的淋巴结转移息息相关。Humphries et al^[9]证明miR-200b通过靶向作用于蛋白激酶C α 抑制三阴性乳腺癌的转移。这些研究结果都表明,miR-200家族在上皮来源的肿瘤中发挥着重要作用,扮演着癌基因或者抑癌基因的角色。

然而miR-200a在结直肠癌中的作用目前仍有争议,对其浸润侵袭以及远处转移的研究尚少见,为此我们进行了这一体外实验,通过在体外提高miR-200a的表达水平,探讨其对结直肠癌SW1116细胞的迁移能力和侵袭能力的影响。本实验采用稳定性好、操作简便的瞬时转染法将载有miR-200a的质粒导入SW1116细胞中,在结直肠癌SW1116细胞中高表达miR-200a作为实验组,同时建立细胞对照组与之相比较,用实时定量PCR法结果证实SW1116细胞中miR-200a的表达。通过划痕实验检测细胞的迁移能力、Transwell小室法检验细胞的侵袭能力,

证明miR-200a的高表达促进了SW1116细胞的迁移和侵袭。说明miR-200a在结直肠癌的侵袭和转移中起着重要作用,由此推测miR-200a在结直肠癌的侵袭以及迁移过程中可能发挥着癌基因的作用。

结直肠癌是当今世界上第三大常见癌症,肿瘤细胞的转移导致晚期结直肠癌患者的预后较差,然而其具体的调控机制并不十分清楚。因此,深入探索结直肠癌转移的分子机制可以为转移性结直肠癌的诊断和治疗以及提高患者的生存率提供新思路。miRNAs可以通过其种子序列与靶基因的mRNA 3'非翻译区(3'-UTR)结合而抑制靶基因的转录和翻译。研究^[10]表明,miR-200a可以通过靶向作用于EGFR以及c-Met进而抑制非小细胞肺癌的迁徙和侵袭,亦有研究^[11]报道miR-200a可直接靶向作用于TGFB2,抑制肾细胞癌的发生发展,Yang et al^[12]发现miR-200a通过降低ZEB2的表达,抑制肝细胞癌的转移,说明进一步研究miRNAs及预测其靶基因对于研究其在结直肠癌的发生发展中所起的作用有重要意义,而miR-200a在抑制结直肠癌迁徙和侵袭作用的靶基因及分子机制还不明确,因此寻找miR-200a在结直肠癌中的作用靶点是进一步研究的重要内容。

miR-200a在结直肠癌组织中呈高表达模式,miR-200a在结直肠癌SW1116细胞中表达失常^[13]。本实验进一步表明miR-200a能促进结直肠癌SW1116细胞的侵袭和迁移能力,提示miR-200a是一种重要潜在的原癌基因,在促进肿瘤增殖生长中起了不可或缺的作用,因此目前临床上常将其作为在基因水平上治疗肿瘤发生发展的重要靶点,是治疗肿瘤的关键基因之一。研究^[14]表明miR-200a和miR-200b能够影响姜黄素在肝细胞癌中的疗效,miR-200家族在肝细胞癌中已经成为通用的诊断标志,根据miR-200a在结直肠癌转移过程中所扮演的角色可以为未来开展结直肠癌治疗提供新思路,即通过下调miR-200a的表达从而抑制结直肠癌的转移。

结合以往的研究、文献报道及本实验结果综合考虑,miR-200a与结直肠癌的发生和发展息息相关。本研究结果进一步证实miR-200a在人结直肠癌的侵袭和转移起促进作用,可能是调控结直肠癌细胞侵袭和转移的关键miR之一。这为结直肠癌临床基因治疗提供了新的思路 and 理论依据。然而对于miR-200a还有许多问题需要进一步研究,如miR-200a对结直肠癌SW1116细胞影响的确切作用

机制及作用途径, miR-200a 与其他和结直肠癌相关的基因相互作用的关系, 以及和 miR-200a 相关的体内实验是不是能得到相同的结论等, 因此对于 miR-200a 的研究仍有广阔的前景和巨大的空间, 需要不断地努力探索和开拓。

参考文献

- [1] Van Cutsem E, Cervantes A, Nordlinger B, et al. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [J]. *Ann Oncol*, 2014, 25 Suppl 3: iii1-9.
- [2] Varnholt H, Drebbler U, Schulze F, et al. MicroRNA gene expression profiles of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2008, 47(4): 1223-32.
- [3] Michael M Z, O'Connor S M, van Holst Pellekaan N G, et al. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia [J]. *Mol Cancer Res*, 2003, 1(12): 882-91.
- [4] Melo S A, Esteller M. Dysregulation of microRNAs in cancer: playing with fire [J]. *FEBS Lett* 2011, 585(13): 2087-99.
- [5] Wang Y, Lee C G. MicroRNA and cancer-focus on apoptosis [J]. *J Cell Mol Med* 2009, 13(1): 12-23.
- [6] Xu F, He H, Huang W, et al. Decreased expression of MicroRNA-200 family in human breast cancer is associated with lymph node metastasis [J]. *Clin Transl Oncol*, 2015, 15(2): 32-9.
- [7] Tanaka S, Hosokawa M, Yonezawa T, et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition and down-regulation of miR-200c and miR-141 in oxaliplatin-resistant colorectal cancer cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2015, 38(3): 435-40.
- [8] Zhou X, Wang Y, Shan B, et al. The downregulation of miR-200c/141 promotes ZEB1/2 expression and gastric cancer progression [J]. *Med Oncol*, 2015, 32(1): 428.
- [9] Humphries B, Wang Z, Oom A L, et al. MicroRNA-200b targets protein kinase Ca and suppresses triple-negative breast cancer metastasis [J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(10): 2254-63.
- [10] Zhen Q, Liu J, Gao L, et al. MicroRNA-200a targets EGFR and c-Met to inhibit migration, invasion, and gefitinib resistance in non-small cell lung cancer [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2015, 146(1): 1-8.
- [11] Lu R, Ji Z, Li X, et al. Tumor suppressive microRNA-200a inhibits renal cell carcinoma development by directly targeting TGF- β 2 [J]. *Tumour Biol* 2015, 36(9): 6691-700.
- [12] Yang X, Wang J, Qu S, et al. MicroRNA-200a suppresses metastatic potential of side population cells in human hepatocellular carcinoma by decreasing ZEB2 [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(10): 7918-29.
- [13] 孙晶璐, 李昊, 尹玉等. miR-200a 在结直肠癌组织中的表达及其临床意义 [J]. *安徽医科大学学报* 2015, 50(6): 797-800.
- [14] Dhayat S A, Husing A, Senninger N, et al. Circulating microRNA-200 family as diagnostic marker in hepatocellular carcinoma [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e010066.

Effect of miR-200a on the migration and invasion of colorectal cancer SW1116 cells

Li Yijun, Li Hao, Yin Yu, et al

(Dept of Pathology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of microRNA (miR)-200a on migration and invasion abilities of colorectal cancer SW1116 cells. **Methods** miR-200a plasmid was transfected into SW1116 cells in colorectal cancer SW1116 cells by Lipofectamine™ 2000 as the experimental group, colorectal cancer SW1116 cells in the control group do not do any processing. The expression of miR-200a in the experimental group was confirmed by real-time PCR. The migration abilities of cells were detected by Transwell invasion assay, and the invasion abilities of cells were detected by wound-healing assay. **Results** Real-time quantitative PCR results showed that compared with the control group, experimental group after transient transfection of miR-200a was significantly increased ($P < 0.01$). Exogenous overexpression of miR-200a could promote migration and invasion abilities of SW1116 cells, compared with the control group the difference was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** miR-200a can promote the migration and invasion abilities of colorectal cancer SW1116 cells.

Key words colorectal cancer; miR-200a; migration; invasion