

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.07.009

文章编号: 1005-8982 (2019) 07-0043-05

## MicroRNA-29a 在结直肠癌组织中的表达及意义

蔡锐文<sup>1</sup>, 梁伟成<sup>1</sup>, 黄冀华<sup>1</sup>, 梁华艳<sup>1</sup>, 黄开劲<sup>1</sup>, 邓波<sup>2</sup>

(广东省高州市人民医院 1. 胃肠外科, 2. 检验科, 广东 高州 525200)

**摘要: 目的** 探讨 microRNA-29a (miR-29a) 在结直肠癌组织中的表达, 以及 miR-29a 反义寡核苷酸对结直肠癌细胞增殖和侵袭的影响。**方法** 选取行手术治疗的初诊结直肠癌患者 195 例, 利用实时荧光定量聚合酶链反应检测结直肠癌和癌旁组织中 miR-29a 表达, 培养人结直肠癌 LoVo 细胞, 随机分为 ASO-miR-29a 组、ASO-对照序列组和空白对照组, 检测各组细胞中 miR-29a 表达, MTT 法检测各组细胞增殖能力, Transwell 小室检测各组细胞迁移和侵袭能力。**结果** 结直肠癌组织 miR-29a 相对表达量为  $(1.93 \pm 0.19)$ , 癌旁组织为  $(1.26 \pm 0.12)$ , 两者比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 结直肠癌组织中 miR-29a 相对表达量与 TNM 分期和淋巴结转移有关 ( $P < 0.05$ ), 多元线性回归分析结果显示, TNM 分期和淋巴结转移是影响结直肠癌组织中 miR-29a 表达的因素 ( $P < 0.05$ ); ASO-miR-29a 组细胞中 miR-29a 相对表达量低于 ASO-对照序列组和空白对照组 ( $P < 0.05$ ); MTT 实验结果显示, ASO-miR-29a 组与 ASO-对照序列组和空白对照组相比吸光度值降低 ( $P < 0.05$ ); 与 ASO-对照序列组和空白对照组比较, ASO-miR-29a 组迁移细胞数和侵袭细胞数均减少 ( $P < 0.05$ )。**结论** miR-29a 在结直肠癌组织中呈高表达, 参与结直肠癌发生、进展过程, 特异性抑制结直肠癌细胞中 miR-29a 表达可减少细胞增殖, 抑制细胞迁移和侵袭能力。

**关键词:** 结直肠肿瘤; MicroRNAs; 反义寡核苷酸; 细胞增殖; 细胞侵袭

**中图分类号:** R735.3

**文献标识码:** A

## Expression and significance of miRNA-29a in colorectal cancer

Rui-wen Cai<sup>1</sup>, Wei-cheng Liang<sup>1</sup>, Ji-hua Huang<sup>1</sup>, Hua-yan Liang<sup>1</sup>, Kai-jin Huang<sup>1</sup>, Bo Deng<sup>2</sup>

(1. Department of Gastrointestinal Surgery, 2. Department of Laboratory Medicine, People's Hospital of Gaozhou, Gaozhou, Guangdong 525200, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression of miRNA-29a in colorectal cancer, and the effect of miRNA-29a on proliferation and invasion of colorectal cancer cells. **Methods** A total of 195 cases of colorectal cancer were involved in this study. The expression of miRNA-29a in colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. Human colorectal cancer LoVo cell line was cultured. All cells were randomly divided into ASO-miRNA-29a group, ASO-control sequence group and blank control group. MTT and Transwell assay were performed to detect the cell proliferation and invasion, respectively. **Results** The relative expression level of miRNA-29a in the colorectal cancer tissues was increased when compared with adjacent tissues was  $[(1.93 \pm 0.19) \text{ vs } (1.26 \pm 0.12), P < 0.05]$ . Multiple linear regression analysis suggested that increased expression level of miRNA-29a in colorectal cancer tissues was correlated to TNM stage and lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ). The relative expression level of miRNA-29a in ASO-miRNA-29a group was lower than the ASO-control group and blank control group ( $P < 0.05$ ). MTT and Transwell assay showed that silencing miRNA-29a compromised cellular proliferation and invasive capability when compared with the ASO-control sequence group and blank

control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Enhanced expression of miRNA-29a in colorectal cancer tissues may be involved in the carcinogenesis and progression of colorectal cancer.

**Keywords:** colorectal cancer; miRNA-29a; antisense oligonucleotide; cell proliferation; cell invasion

微 RNA (MicroRNA, miR) 作为广泛存在于生物体内的短链核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA), 可通过影响靶基因转录或翻译而参与多种生理病理过程<sup>[1]</sup>, 同时, 在多种恶性肿瘤发生、进展中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。miR-29a 作为 miR-29 家族重要成员, 与乳腺癌<sup>[3]</sup>、胶质瘤等<sup>[4]</sup>恶性肿瘤发生、进展密切相关。本研究拟分析 miR-29a 在结直肠癌组织中表达, 采用反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotides, ASO) 特异性抑制结直肠癌 LoVo 细胞中 miR-29a 表达, 观察其对细胞增殖、凋亡的影响。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般研究

**1.1.1 临床资料** 选取 2013 年 3 月—2016 年 4 月在广东省高州市人民医院治疗的结直肠癌患者 195 例, 术前均未行放化疗治疗, 均经术后病理检查证实。其中, 男性 109 例, 女性 86 例; 年龄 33 ~ 82 岁, 平均 (60.1 ± 12.8) 岁; 肿瘤部位: 结肠 91 例, 直肠 104 例; TNM 分期: I 期 35 例, II 期 64 例, III 期 81 例, IV 期 15 例; 分化程度: 低分化 17 例, 中分化 166 例, 高分化 12 例。所有患者均于术中留取结直肠癌及距离肿瘤边缘 >4 cm 处的癌旁组织, 生理盐水清洗后置于液氮中, 置入 -80℃ 冰箱冷冻保存。研究经本院医学伦理委员会批准, 所有患者均行知情同意。

**1.1.2 主要试剂和设备** 人结直肠癌 LoVo 细胞株购自中科院上海生命科学研究院细胞库, Trizol 总 RNA 提取试剂盒、Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒、Matrigel 胶购自美国 Invitrogen 公司, DMEM 培养基、胎牛血清、胰酶购自美国 Gibco 公司, 逆转录和聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司, MTT 试剂盒、DMSO 购自美国 Sigma 公司, Transwell 小室购自德国 Millipore 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 利用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测结直肠癌和癌旁组织中 miR-29a 表达** 取结直肠癌和癌旁组织, 研磨后, 加入细胞裂解液, 用 Trizol 总 RNA 提取试剂盒提取细胞中总 miR, 利用紫外分光光度计检测总 miR 纯度, 以 A260/A280 在 1.80 ~ 2.10

作为合格样品。将总 miR 逆转录为模板链 cDNA, 利用 PCR 试剂盒进行 PCR, 引物序列为: 正向 5'-CG GCGGTAGCACCATCTGAAAT-3', 反向 5'-CCAGTGCA GGGTCCGAGGTA-3'; U6 引物: 正向 5'-GGAGAGTGT TTCCTCGTCCC-3', 反向 5'-ATGAAGGGGTGCGTTGATG GC-3'。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 30 s, 54℃ 退火 30 s, 73℃ 延伸 30 s, 重复循环 38 次, 每个样品设 3 个平行复孔。用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算结直肠癌和癌旁组织中 miR-29a 相对表达量<sup>[5-6]</sup>。

**1.2.2 细胞培养及分组处理** 将 LoVo 细胞株置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 于含 5% 二氧化碳 CO<sub>2</sub> 的 37℃ 恒温培养箱中常规培养。待细胞对数生长时, 胰酶消化后, 接种于 6 孔板中, 调整细胞密度为  $2 \times 10^5$  个/孔, 继续恒温培养, 待细胞融合度在 80% 左右时, 对细胞进行分组转染: ① ASO-miR-29a 组: 利用 Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒转染 miR-29a 的 ASO 序列 5'-ACTGATTTCTTTT GGTGTTTCAG-3'; ② ASO-对照序列组: 5'-TCATTGGC ATGTACCATGCAGCT-3'; ③ 空白对照组: 不作任何处理。转染后各组细胞继续恒温培养, 完成后续实验。

**1.2.3 qRT-PCR 检测各组细胞中 miR-29a 表达** 取各转染组转染后培养 48 h 细胞, 加入细胞裂解液, 其余步骤同 1.2.1。

**1.2.4 MTT 法检测各组细胞增殖能力** 取各组细胞, 胰酶消化后, 离心取细胞沉淀, 重悬后调整细胞密度为  $2 \times 10^4$  个/ml, 各取 100 μl 加入 96 孔板, 各组均设 6 个平行反应复孔, 于含 5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养, 分别于转染后 12、24、48、72 和 96 h 时, 将 20 μl 的 MTT 液加入各孔, 孵育 4 h, 将孔内培养液去除, 各加入 150 μl 的 DMSO 液, 振荡 15 ~ 20 min 待沉淀完全溶解后, 利用酶标仪取 570 nm 处对各孔吸光度 (A) 值进行检测<sup>[7]</sup>。

**1.2.5 Transwell 小室检测各组细胞迁移能力** 取各组转染后培养 48 h 细胞, 胰酶消化后收集细胞, 利用无血清培养液制备单细胞悬液, 调整细胞密度为  $2 \times 10^5$  个/ml。取 200 μl 单细胞悬液置于 Transwell 小室上室, 将 800 μl 的含 20% 胎牛血清的培养液加入小室下室, 于含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中 37℃ 恒温培养 24 h。将小室

取出后,用 PBS 冲洗 3 次,用棉签轻轻将小室上散落细胞擦除,多聚甲醛室温下固定 15 min,1% 结晶紫染色 15 min, PBS 冲洗 3 次,用倒置显微镜观察,拍照,计数穿膜细胞数<sup>[7]</sup>。

**1.2.6 Transwell 小室检测各组细胞侵袭能力** 取 Matrigel 胶预先平铺于 Transwell 小室上室,风干后以备用。其余步骤同 1.2.5。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件,计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,比较采用  $t$  检验、方差分析或重复测量设计的方差分析,两两比较采用 LSD- $t$  检验,影响因素分析采用多元线性回归分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 结直肠癌和癌旁组织中 miR-29a 表达比较

结直肠癌组织中 miR-29a 相对表达量为 ( $1.93 \pm 0.19$ ),癌旁组织中 miR-29a 相对表达量为 ( $1.26 \pm 0.12$ ),经  $t$  检验,差异有统计学意义 ( $t = 41.596, P = 0.000$ )。

### 2.2 结直肠癌组织中 miR-29a 表达与临床病理特征之间的关系

不同年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤大小和分化程度结直肠癌组织中 miR-29a 相对表达量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),而 TNM 分期 III、IV 期和发生淋巴结转移结直肠癌组织中 miR-29a 相对表达量增加,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),TNM 分期和淋巴结转移是影响结直肠癌组织中 miR-29a 表达的因素。见表 1。

### 2.3 结直肠癌组织中 miR-29a 表达影响因素分析

多元线性回归分析结果显示,TNM 分期和淋巴结转移是影响结直肠癌组织中 miR-29a 表达的因素 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

### 2.4 各组细胞中 miR-29a 表达比较

3 组细胞中 miR-29a 相对表达量分别为 ( $1.14 \pm 0.07$ )、( $1.84 \pm 0.12$ ) 和 ( $1.82 \pm 0.21$ ),经方差分析,差异有统计学意义 ( $F = 45.940, P = 0.000$ ),两两比较,ASO-miR-29a 组细胞中 miR-29a 相对表达量低于 ASO- 对照序列组和空白对照组 ( $P < 0.05$ )。

### 2.5 各组细胞增殖能力比较

3 组细胞 24、48、72 和 96 h 时 A 值比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点的 A 值

表 1 不同因素对结直肠癌组织中 miR-29a 表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

影响因素	n	miR-29a 表达量	t 值	P 值
年龄				
≥ 60 岁	100	1.95 ± 0.21	0.150	0.440
<60 岁	95	1.92 ± 0.16		
性别				
男	109	1.91 ± 0.15	1.272	0.102
女	86	1.97 ± 0.22		
肿瘤部位				
结肠	91	1.90 ± 0.14	1.288	0.100
直肠	104	1.96 ± 0.20		
肿瘤大小				
≥ 5 cm	94	1.94 ± 0.22	1.002	0.159
<5 cm	101	1.91 ± 0.17		
TNM 分期				
I、II 期	99	1.72 ± 0.15	14.776	0.000
III、IV 期	96	2.16 ± 0.24		
分化程度				
低分化	17	1.98 ± 0.25	1.353	0.089
中、高分化	178	1.92 ± 0.18		
淋巴结转移				
是	93	2.20 ± 0.23	12.738	0.000
否	102	1.81 ± 0.13		

有差异 ( $F = 46.351, P = 0.000$ )。② 3 组时间 A 值有差异 ( $F = 102.861, P = 0.000$ ),ASO-miR-29a 组与 ASO- 对照序列组和空白对照组相比 A 值比较低,细胞增殖被抑制。③ 3 组的 A 值变化趋势有差异 ( $F = 21.573, P = 0.000$ )。见表 3。

### 2.6 各组细胞迁移和侵袭能力比较

3 组迁移细胞数和侵袭细胞数差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),与 ASO- 对照序列组和空白对照组比较,ASO-miR-29a 组迁移细胞数和侵袭细胞数均减少,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 1、2 和表 4。

表 2 结直肠癌组织中 miR-29a 表达影响因素的多元线性回归分析

指标	<i>b</i>	<i>S<sub>e</sub></i>	Wald $\chi^2$	<i>P</i> 值	$\hat{OR}$	95% CI	
						下限	上限
年龄	0.053	0.021	1.413	0.159	0.029	-0.012	0.070
性别	0.021	0.021	0.560	0.576	0.012	-0.030	0.054
肿瘤部位	0.050	0.022	1.296	0.196	0.028	-0.014	0.070
肿瘤大小	-0.010	0.021	-0.257	0.797	-0.005	-0.047	0.036
TNM 分期	0.475	0.026	9.987	0.000	0.262	0.210	0.313
分化程度	-0.055	0.035	-1.445	0.150	-0.051	-0.119	0.018
淋巴结转移	-0.388	0.026	-8.148	0.000	-0.214	-0.266	-0.162

表 3 各组细胞增殖能力比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
ASO-miRNA-29a 组	0.15 ± 0.04	0.26 ± 0.05	0.31 ± 0.05	0.41 ± 0.14	0.57 ± 0.10
ASO- 对照序列组	0.17 ± 0.06	0.40 ± 0.07	0.48 ± 0.05	0.64 ± 0.12	0.80 ± 0.12
空白对照组	0.18 ± 0.02	0.41 ± 0.12	0.49 ± 0.06	0.60 ± 0.10	0.87 ± 0.14

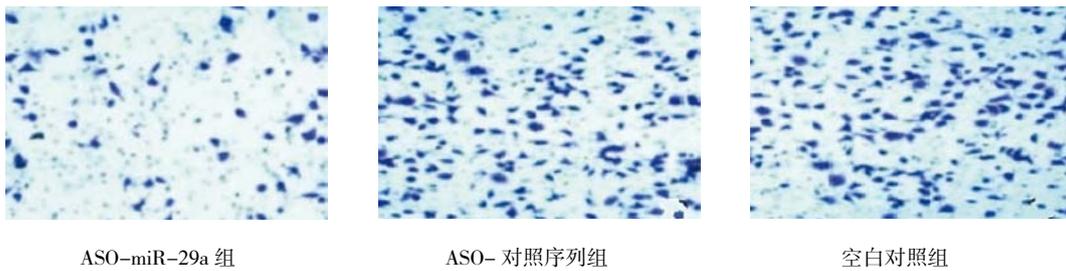


图 1 各组细胞迁移能力比较 (结晶紫 × 400)

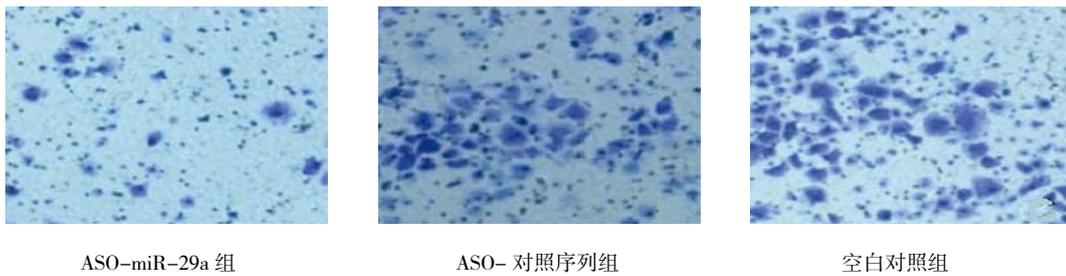


图 2 各组细胞侵袭能力比较 (结晶紫 × 400)

表 4 各组细胞迁移和侵袭能力比较 (个,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	迁移细胞数	侵袭细胞数
ASO-miR-29a 组	75.7 ± 8.0 <sup>(1)(2)</sup>	84.8 ± 4.0 <sup>(1)(2)</sup>
ASO- 对照序列组	100.4 ± 6.1	117.2 ± 8.7
空白对照组	105.5 ± 6.9	122.1 ± 7.8
<i>F</i> 值	30.815	48.618
<i>P</i> 值	0.000	0.000

注: 1) 与空白对照组比较, *P* < 0.05; 2) 与 ASO- 对照序列组比较, *P* < 0.05

### 3 讨论

结直肠癌作为消化道发病率仅次于胃癌的恶性肿瘤, 是我国三大癌症之一, 目前尚无特效的治疗手段, 多数患者预后较差, 给我国人群及社会带来沉重的疾病负担<sup>[8]</sup>。近年来研究发现<sup>[9]</sup>, miR 可通过发挥类似癌基因或抑癌基因的作用而参与肿瘤发生、进展过程。亦有研究指出<sup>[10]</sup>, miR 参与调控肿瘤细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭等过程。有研究指出<sup>[11]</sup>, 结直

肠癌患者外周血中多种 miR 出现表达异常,其靶基因可能在结直肠癌生长、转移等过程中发挥关键性作用。miR-29a 位于人染色体 7q32 上,可通过发挥促癌或抑癌基因功能而参与多种肿瘤发生<sup>[12-13]</sup>。本研究结果显示,结直肠癌组织中 miR-29a 相对表达量高于癌旁组织,说明 miR-29a 在结直肠癌组织中呈高表达,可能参与了结直肠癌发生过程。

本研究结果显示,TNM 分期和淋巴结转移是结直肠癌组织中 miR-29a 相对表达量的影响因素,TNM 分期Ⅲ、Ⅳ期、发生淋巴结转移的结直肠癌组织中表达量增加,进一步说明 miR-29a 可能参与结直肠癌病程进展过程。为进一步探讨 miR-29a 在结直肠癌发生、进展中的作用,本研究利用 ASO 技术特异性抑制结直肠癌 LoVo 细胞中 miR-29a 表达,结果显示,ASO-miR-29a 组细胞中 miR-29a 相对表达量低于 ASO- 对照序列组和空白对照组,说明 LoVo 细胞中 miR-29a 基因表达被抑制。MTT 实验结果显示,ASO-miR-29a 组与 ASO- 对照序列组和空白对照组相比 A 值降低,说明特异性抑制 miR-29a 基因表达可减少 LoVo 细胞增殖,提示 miR-29a 可能与结直肠癌细胞增殖有关。本研究结果显示,与 ASO- 对照序列组和空白对照组比较,ASO-miR-29a 组迁移细胞数和侵袭细胞数均减少,说明特异性抑制 miR-29a 基因表达可有效减少 LoVo 细胞迁移和侵袭能力,提示 miR-29a 可能参与结直肠癌细胞迁移和侵袭过程。

目前,miR-29a 已证实与多种恶性肿瘤发生、进展有关,且参与了肿瘤多药耐药<sup>[14]</sup>,为肿瘤期诊断、分期及预后判定提供了可靠生物学标志物,有望为包括结直肠癌在内的多种恶性肿瘤的靶向治疗提供新的靶点,但鉴于肿瘤发生涉及多基因、多步骤,miR-29a 在肿瘤发生、进展中的具体作用机制尚待进一步开展后续研究以明确。

综上所述,miR-29a 在结直肠癌组织中呈高表达,参与结直肠癌发生、进展过程,特异性抑制结直肠癌细胞中 miR-29a 表达可减少细胞增殖,抑制细胞迁移和侵袭能力。

#### 参 考 文 献:

- [1] LI N, LONG B, HAN W, et al. microRNAs: important regulators of stem cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 110-117.
- [2] TAKAHASHI R U, PRIETO-VILA M, HIRONAKA A, et al. The role of extracellular vesicle microRNAs in cancer biology[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2017, 55(5): 648-656.
- [3] MAHATI S, XIAO L, YANG Y, et al. miRNA-29a suppresses growth and migration of hepatocellular carcinoma by regulating CLDN1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 486(3): 732-737.
- [4] 奚卓,薛一雪,马璐,等. miRNA-29s 家族对人脑胶质瘤干细胞生物学行为的影响[J]. *中国医科大学学报*, 2017, 46(3): 201-209.
- [5] 宋佳伦,杨琦. 转录因子扭曲基因表达异常在早期宫颈癌发病中的意义及对预后的影响[J]. *中国妇幼保健研究*, 2016, 27(9): 1066-1068.
- [6] 王建国,史春云,王建飞,等. miRNA-7 对胃癌细胞 SGC7901 增殖、迁移及侵袭能力的影响及其与黏着斑激酶相关性研究[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2016, 45(5): 519-522.
- [7] 李增军,王海鹏,宋宝,等. RNA 干扰沉默高迁移率族蛋白 B1 的表达对结直肠癌 LoVo 细胞增殖和侵袭的抑制作用[J]. *中华肿瘤杂志*, 2015, 37(9): 664-670.
- [8] 冯雅婧,王宁,方利文,等. 1990 年与 2013 年中国人群结直肠癌疾病负担分析[J]. *中华流行病学杂志*, 2016, 37(6): 768-772.
- [9] 傅信泓. 结直肠癌中差异表达 miRNA 的筛选与功能研究[D]. 上海:上海交通大学,2013.
- [10] KEDMI M, SAS-CHEN A, YAREN Y. MicroRNAs and growth factors: an alliance propelling tumor progression[J]. *J Clin Med*, 2015, 4(8): 1578-1599.
- [11] YAMADA A, HORIMATSU T, OKUGAWA Y, et al. Serum miRNA-21, miRNA-29a, and miRNA-125b are promising biomarkers for the early detection of colorectal neoplasia[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(18): 4234-4242.
- [12] PEI Y F, LEI Y, LIU X Q. miR-29a promotes cell proliferation and EMT in breast cancer by targeting ten eleven translocation 1[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1862(11): 2177-2185.
- [13] KWON J J, WILLY J A, QUIRIN K A, et al. Novel role of miRNA-29a in pancreatic cancer autophagy and its therapeutic potential[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(44): 71635-71650.
- [14] 李志华. miRNA-29 家族调控乳腺癌形成、发展和转移分子机制的研究进展[J]. *肿瘤研究与临床*, 2016, 28(7): 490-493.

(王荣兵 编辑)