

文章编号: 1005-8982(2016)01-0030-05

论著

Micro RNA-132 对结肠癌细胞生物学功能的作用

赵继明, 彭健

(中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008)

摘要:目的 探讨 microRNA-132(miR-132)对结肠癌细胞系 LOVO 生物学功能的作用。**方法** 通过体外转染 miR-132 mimic 的方式进行获得性功能实验。以细胞计数检测(CCK-8)、平板克隆形成、流式细胞凋亡检测以及划痕实验分析 miR-132 过表达对 LOVO 细胞增殖与侵袭的影响。**结果** LOVO 细胞中,外源性过表达 miR-132 能够抑制其生长,且抑制率呈时间、浓度依赖性,50 nmol/L miR-132 mimic 处理 72 h 后,抑制率达 30%。流式细胞凋亡检测发现 miR-132 过表达诱导细胞凋亡。miR-132 过表达可以抑制 LOVO 细胞体内的外克隆形成能力。体外平板克隆形成实验显示,miR-132 过表达使 LOVO 细胞克隆形成率从 21%降至 7%。划痕修复实验结果显示,高表达 miR-132 各组细胞的迁移能力降低。**结论** miR-132 过表达能显著抑制结肠癌细胞 LOVO 发生细胞凋亡及增殖,还能削弱结肠癌细胞 LOVO 的克隆形成能力。

关键词: microRNA-132; 凋亡; 增殖; 迁移; 克隆形成

中图分类号: R735.35

文献标识码: A

Effect of miR-132 on biological characteristics of colon cancer cells

Ji-ming Zhao, Jian Peng

(Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of miR-132 on biological characteristics of colon cancer LOVO cell line. **Methods** Synthetic miR-132 mimics and miRNAs scramble were transfected into LOVO cells using Lipofectamine 2000. Transwell assay was used to assess the effect of miR-132 on LOVO cell invasion and metastasis. CCK-8 assay was used to assess the effect of miR-132 on LOVO cell proliferation. Flow cytometry was used to assess the effect of miR-132 on LOVO apoptosis. **Results** Over-expression of miR-132 induced LOVO cell apoptosis, and subsequently inhibited LOVO cell growth and colony formation. Notably, 50 nmol/L miR-132 mimic demonstrated a potent inhibitory effect at 72 h after transfection and reduced cell viability by 30%. The colony formation ability was impaired after miR-132 mimic treatment with a 14% drop of in vitro colony formation rate. Also, miR-132 inhibited the LOVO cell migration. **Conclusions** miR-132 could suppress colon cancer cell growth through induction of cell apoptosis.

Keywords: miR-132; apoptosis; proliferation; migration; colony formation

MicroRNA-132(miR-132)是高度保守 miRNA,其通过转录因子 cAMP 效应元件结合蛋白,从人类 17 号染色体上基因间隙区域转录而来^[1]。大多数研究表明,miR-132 的调节作用和生物学功能来源于神经元^[2]。miR-132 在炎症、细胞转化和肿瘤生成等病理过程中的作用也被学者们研究证实^[3]。有研究指

出,不同类型的人类癌症中 miR-132 表达上调或下调^[4]。但是,关于 miR-132 对结肠癌细胞生物学行为作用的系统研究较为少见。

由于不同结肠癌细胞内源性 miR-132 表达水平可能存在差异,为排除内源性 miR-132 对实验的干扰,本研究采用荧光实时定量逆转录酶免疫反应

收稿日期:2015-10-16

[通信作者] 彭健, E-mail: pengjian1698@aliyun.com

检测 6 株结肠癌细胞株(HCT116、HCT8、HT29、LS174T、LOVO 及 SW480)和 HCo EpiC 正常结肠细胞株中 miR-132 的表达。选取内源性 miR-132 表达水平最低的细胞株作为研究对象,将 miR-132 mimics 转染至该细胞株,建立 miR-132 过表达结肠癌细胞模型。检测 miR-132 过表达对结肠癌细胞增殖、凋亡、细胞周期及迁移能力等生物学行为的影响,以期进一步了解 miR-132 在结肠癌发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 实时定量聚合酶链反应

实时定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测结肠癌细胞株和正常结肠黏膜上皮细胞株中 miR-132 的表达。人结肠上皮细胞 HCo EpiC、人结肠癌细胞系 HCT116、HCT8、HT29、LS174T、LOVO 及 SW480 购自中国科学院上海细胞库,常规培养于含 10% 小牛血清的无血清细胞冷冻保存 (dulbecco modified eagle medium, DMEM) 高糖培养基中。依照 RNA 提取试剂盒说明书提取 HCT116、HCT8、HT29、LS174T、LOVO、SW480 及 HCoEpiC 细胞中总 RNA。紫外分光光度仪测定总 RNA 浓度与纯度, A260/A280 值为 1.8 ~ 2.0, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测质量。分别取 HCT116、HCT8、HT29、LS174T、LOVO、SW480 及 HCo EpiC 总 RNA 各 1 μ g, 逆转录酶混合液 1 μ l, 5 \times 逆转录酶缓冲液 4 μ l, 加无 RNA 酶水至反应体积为 20 μ l。37 $^{\circ}$ C 温浴 60 min, 95 $^{\circ}$ C、5 min, 终止反应。2 \times PCR 预混液 25 μ l, 10 \times 通用引物 5 μ l, 10 \times 特异引物 Assay 5 μ l (hsa-miR-132 引物序列代号为 MS00004276, U6 引物穿列代号为 MS00007497, 以 U6 为内参, 德国 Qiagen 公司提供), cDNA 模板 2 μ l, 加光 RNA 酶水定容至总反应体积 50 μ l。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 70 $^{\circ}$ C 延伸 34 s, 共 8 个循环。相同条件下实验重复 3 次。

1.2 实验分组

由于 miR-132 在结肠癌 LOVO 细胞中的表达最低, 因此本研究后续以 LOVO 细胞为研究对象来探讨 miR-132 对结肠癌细胞生物学行为的作用。miR-132 mimics 购自美国 Ambion 公司。转染时细胞分为 4 组: ①空白组, 不作任何处理, 继续常规培养; ②阴性对照组, 转染时加入无关序列 Scramble mimics+ 脂质体 2000; ③实验组, 转染时加入 miR-132

mimics+ 脂质体 2000; ④羧基荧光素 (Carboxyfluorescein, FAM) 对照组, 转染时加入 FAM-mimics control, 该组用来检测转染效率, 不再进行后续实验。

1.3 细胞克隆形成实验

将空白组、阴性对照组及实验组细胞培养至指数生长期, 细胞悬液浓度调整为 1×10^6 个/ml, 接种至双琼脂平板, 待上层琼脂凝固后, 常规培养 2 周。将细胞培养皿放置在倒置显微镜下, 观察细胞克隆数, 计算形成率。克隆形成率 = (克隆数 / 接种细胞数) \times 100%。

1.4 细胞活力检测

空白组、阴性对照组及实验组细胞培养至指数生长期, 以 1 000 个/孔的密度接种于 96 孔细胞培养板, 设 6 个平行孔, 每孔体积为 0.2 ml。分别于 1、2、3 和 4 d 各取一块 96 孔板培养板, 超净台内弃去原培养液, 加入按 9 : 1 混合的培养液与细胞计数检测 (cell counting kit-8, CCK-8) 反应液, 96 孔板继续培养箱内孵育 1 h 后取出, 轻轻震荡 10 min, 用酶标仪于 450 nm 处检测各孔吸光度值 (optical density, OD 值), 并按以下公式计算相对细胞增殖率: 相对细胞增殖率 (%) = (实验孔平均 OD 值 - 空白调零平均 OD 值) / (对照孔平均 OD 值 - 空白调零平均 OD 值) \times 100%。实验重复 3 次。

1.5 流式细胞仪检测

流式细胞仪检测转染 miR-132 mimics 对结肠癌 LOVO 细胞凋亡的影响。各组膜联蛋白 V- 异硫氰酸酯 (annexin V-fluoresceine isothiocyanate, Annexin V-FITC) 和碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 双染, 同时设置未染色空白对照管、单染 Annexin V-FITC 管及单染 PI 管。将环氧树脂 (epoxy epoxide, EP) 管置于冰上, 避光条件下室温静置 10 min, 加入 400 μ l 1 \times Binding Buffer, 轻轻混匀, 并在 30 min 内进行检测。以未染色空白细胞为基准调零机器, 以 Annexin V-FITC 单染管和 PI 单染管做为基准参照, 测定每个上样 EP 管的数据。采用 Cell Quest 3.0 软件进行参数获取和资料分析, 计算凋亡细胞百分比。

1.6 划痕修复实验

划痕修复实验检测 miR-132 mimics 对结肠癌 LOVO 细胞迁移能力的影响。取对数生长期的各组 LOVO 细胞, 消化、计数, 以 5×10^5 个/ml 的密度接种于 24 孔板中, 每孔 500 μ l, 培养 4 h。待细胞贴壁后用小枪头沿着每孔偏中线两侧划痕, 划痕应较直且宽度一致, 用磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer

saline, PBS)清洗 1 遍,确保清洗掉痕线上散在的细胞。每组设 3 个平行孔,加入含 2%胎牛血清的 DMEM 培养液再放入培养箱内培养 24、48 和 72 h,分别于每个时间点观察细胞向中间的迁移情况,并在显微镜下拍照记录。注意每次拍照的位置应固定,且每次拍照前用 PBS 洗 2 遍以去除漂浮的死细胞。计算闭合率以反映细胞的迁移能力,闭合率(%)=(迁移距离 / 划痕距离) × 100%。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间样本比较用 Student's *t* 检验分析, $P < 0.05$ 为差异统计学意义。

2 结果

2.1 正常结肠细胞和结肠癌细胞中 miR-132 的表达

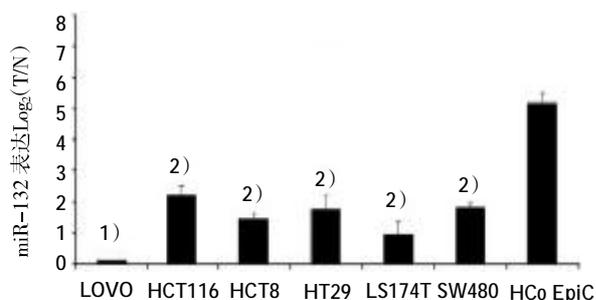
miR-132 在结肠癌细胞中的表达与其在结肠癌组织中的表达基本一致,正常结肠细胞 HCo EpiC 中 miR-132 呈高表达,而 6 种结肠癌细胞株中 miR-132 表达被不同程度地抑制(见图 1)。其中 LOVO 细胞中内源性 miR-132 表达水平最低。

2.2 miR-132 对 LOVO 细胞克隆形成的作用

用 miR-132 imimics(实验组)转染 LOVO 细胞,使其过表达 miR-132,与阴性对照组(Scramble mimics 组)和空白组比较,实验组克隆数明显下降,差异有统计学意义($P = 0.032$),而阴性对照组和空白组的克隆数比较差异无统计学意义。见图 2。

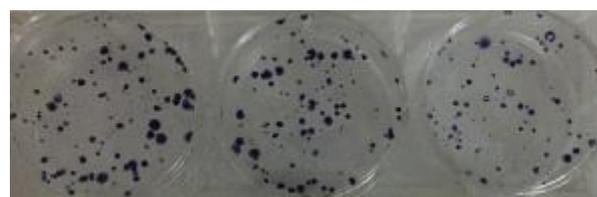
2.3 miR-132 对 LOVO 细胞增殖能力的作用

本实验采用 CCK-8 法绘制 LOVO 细胞系生长曲线,结果显示,LOVO 细胞转染 miR-132 mimics 72 h 后,细胞增殖能力逐渐下降。实验组细胞 72、96 和 120 h 增殖能力明显低于阴性对照组和空白组



Log₂(T/N): 结肠癌细胞株与癌旁正常组织相对表达量比值的 Log₂ 对数值; 1) 与正常结肠细胞比较, $P = 0.008$; 2) 与正常结肠细胞比较, $P = 0.032$

图 1 正常结肠细胞和结肠癌细胞中 miR-132 的表达



空白组 阴性对照组 实验组

图 2 3 组克隆数比较

($P = 0.014$)。见图 3。

2.4 miR-132 对 LOVO 细胞凋亡的作用

流式细胞仪检测细胞凋亡,结果显示,空白组、阴性对照组及实验组的凋亡率分别为(2.94 ± 0.81)%、(3.02 ± 1.12)%和(15.04 ± 1.52)%。空白组与阴性对照组比较,差异无统计学意义($P = 0.684$);实验组和空白组比较,差异有统计学意义($P = 0.003$)。提示 miR-132 可促进 LOVO 细胞凋亡。见图 4。

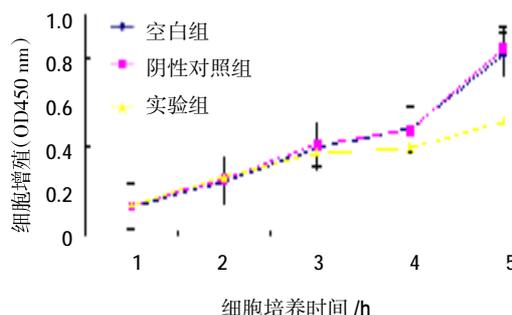
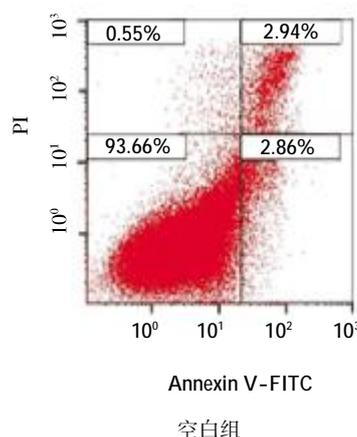


图 3 miR-132 mimics 对 LOVO 细胞生长能力的抑制作用

2.5 miR-132 对结肠癌 LOVO 细胞迁移能力的作用

分别于 24、48 和 72 h 观察各组细胞的划痕修复。实验组 LOVO 细胞迁移能力被抑制,48 h 后各组迁移能力明显受到抑制,差异有统计学意义($P = 0.037$)。见附表。



Annexin V-FITC

空白组

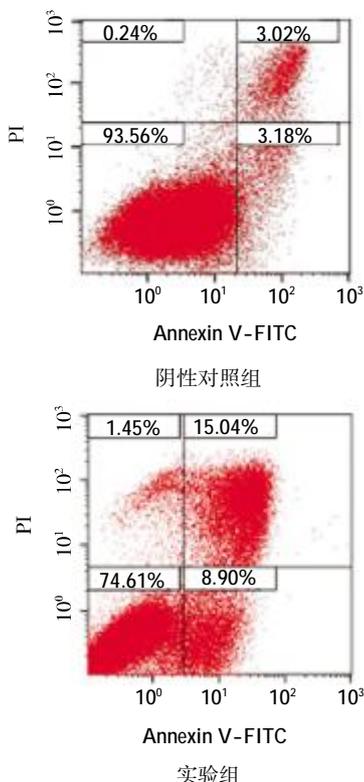


图 4 流式细胞术检测 3 组细胞的凋亡率

附表 3 组细胞在不同时间的闭合率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h
空白组	15.21 ± 3.56	27.11 ± 2.52	67.79 ± 3.97
阴性对照组	15.41 ± 2.72	25.42 ± 3.18	68.34 ± 5.62
实验组	11.37 ± 1.44	19.52 ± 3.26	31.34 ± 4.62

3 讨论

miRNA 是包含 19 ~ 25 个碱基的小分子非编码 RNAs, 能够通过和靶基因 mRNAs 的 3' - 非翻译区 (3' - untranslated regions, 3' - UTRs) 反应, 反向调控靶基因表达。研究证实, miR-132 具有调控多巴胺神经元分化, 激活内皮细胞, 发挥病理血管生成的作用⁶。还有研究表明, miR-132 参与胰腺癌的发展过程⁶。

近年来, 关于 miR-132 对肿瘤细胞生物学行为的作用的研究成果层出不穷, 但是这些结果多有矛盾之处。You 等⁷研究表明, miR-132 在非小细胞肺癌和非小细胞肺癌组织标本中显著下降, 且恢复非小细胞肺癌细胞株中的表达, 能够抑制 miR-132 迁移和侵袭。Zhang⁸等研究发现, miR-132 能够抑制乳腺癌细胞的增殖、分化和转移等。Luo 等⁹研究发现, miR-132/212 簇能显著抑制肺癌细胞株 H1299 在裸

鼠皮下的成瘤能力。而 Park 等¹⁰在胰腺癌中的研究发现, miR-132 在胰腺癌组织中表达增加, 抑制胰腺癌细胞株中 miR-132 表达导致胰腺癌细胞凋亡加快, 侵袭和迁移能力显著下降。本研究结果表明, 恢复结肠癌细胞中 MiR-132 的表达, 能显著抑制结肠癌细胞恶性表型。MiR-132 在不同肿瘤中发挥相反作用的原因目前仍不清楚, 结合以往研究结果, 本实验推测其主要原因为: ①肿瘤的异质性。不同肿瘤组织间的异质性, 以及同类肿瘤组织中的异质性都可能导致 miR-132 作用的差异; ②肿瘤来源不同, 导致 miR-132 的作用也不尽相同。有的肿瘤源自内皮细胞, 有的源自上皮细胞, 而结肠癌细胞主要源自结肠星状细胞; ③不同肿瘤组织中靶基因表达丰度不同也导致 miR-132 作用差异。众所周知, miRNA 主要通过靶基因发挥作用, 而且一种 miRNA 可能存在多种靶基因, 而不同肿瘤组织中靶基因表达丰度不同, 导致 miR-132 作用的靶基因也不一致, 从而引起 miR-132 表达作用不同。

本研究发现, 结肠癌 LOVO 细胞稳定过表达 miR-132 mimics 后, 细胞增殖能力、体外细胞克隆形成率、抗凋亡能力、体内致瘤能力明显下降, 结果提示, 结肠癌细胞的恶性表型与 miR-132 表达缺失有关。miR-132 是结肠癌治疗的潜在有效靶点。国内学者李书军等¹¹也做过类似的研究工作, 探讨 miR-132 对食管癌 KYSE150 细胞肿瘤调节因子 FOXA1 及 mRNA 表达的调节作用对食管癌 KYSE150 细胞增殖的影响, 结果表明, 过表达的 miR-132 能抑制 KYSE150 食管癌细胞增殖, 该抑制作用至少部分与 FOXA1 基因的低表达有关。管娣等¹²试图识别和发现肿瘤转移相关 miRNA, 以期能够作为治疗靶点高效抑制肿瘤转移, 其为验证 miR-132 与肿瘤迁移的相关性, 将 miR-132 转染入高迁移乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 细胞中, 检测细胞迁移率的变化, 结果发现 miR-132 能够抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移。管娣等¹²为进一步揭示 miR-132 抑制细胞迁移的可能机制, 通过生物信息学手段寻找并鉴定 3 种可能与肿瘤转移相关的 miR-132 的靶基因, 其分别是 STIP1 同源性和含 U 框蛋白 1 (STIP1 homologous and U box containing protein1, STUB 1)、GTP 酶激活蛋白 -Src 同源结构域 3- 结合蛋白 1 [GTPase activating protein- (Src homology domain 3)-binding protein 1, G3BP1]、GTP 酶激活蛋白 -Src 同源结构域 3- 结合蛋白 2 [GTPase activating protein- (Src-

homology domain 3)-binding protein 2, G3BP2]。管娣等^[12]分别比较 MCF7 与 MDA-MB-231 细胞,以及转染 miR-132 和阴性对照组 MDA-MB-231 细胞 3 种基因的表达差异,结果发现,G3BP1、G3BP2 可能参与 miR-132 对肿瘤转移的调控,与本研究结果类似。

总之,结合以往和本研究结果,miR-132 有望成为结肠癌肿瘤基因治疗的潜在高效靶点。

参 考 文 献:

- [1] Kano M, Seki N, Kikkawa N, et al. MiR-145, miR-133a and miR-132b: tumor suppressive miRNAs target FSCN1 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2804-2814.
- [2] Luikart BW, Bensen AL, Washburn EK, et al. MiR-132 mediates the integration of newborn neurons into the adult dentate gyrus[J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): DOI: 10.1371/journal.pone.0019077.
- [3] Yang D, Li T, Wang Y, et al. MiR-132 regulates the differentiation of dopamine neurons by directly targeting Nurr1 expression[J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(7): 1673-1682.
- [4] Hwang JY, Kaneko N, Noh KM, et al. The gene silencing transcription factor REST represses miR-132 expression in hippocampal neurons destined to die[J]. *J Mol Biol*, 2014, 426(9): 3454-3466.
- [5] Togninil P, Pizzorusso T. MicroRNA212/132 family: molecular transducer of neuronal function and plasticity[J]. *The J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(1): 6-10.
- [6] Formosa A, Lena AM, Markert EK, et al. DNA methylation silences miR-132 in prostate cancer[J]. *Oncogene*, 2013, 32(1): 127-134.
- [7] You J, Li Y, Fang N, et al. MiR-132 Suppresses the migration and invasion of lung cancer cells via targeting the EMT regulator ZEB2[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): DOI: 10.1371/journal.pone.0091827.
- [8] Zhang ZG, Chen WX, Wu YH, et al. MiR-132 prohibits proliferation, invasion, migration, and metastasis in breast cancer by targeting HN1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 454(4): 109-114.
- [9] Luo JD, Meng CC, Tang YT, et al. MiR-132/212 cluster inhibits the growth of lung cancer xenografts in nude mice[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2014, 7(11): 4115-4122.
- [10] Park JK, Henry JC, Jiang JM, et al. MiR-132 and miR-212 are increased in pancreatic cancer and target the retinoblastoma tumor suppressor[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 406(4): 518-523.
- [11] 李书军, 张秀金, 侯俊峰, 等. Hsa-miR-132 通过靶向 FOXA1 基因影响食管癌细胞的增殖和侵袭[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2011, 18: 485-489.
- [12] 管娣, 刘春颖, 陈晨等. MiR-132 抑制肿瘤转移[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2013, 12(2): 159-164.

(童颖丹 编辑)