

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.10.003

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.10.003>

miR-122 在结肠癌细胞系 HCT116 中的表达 及其对增殖和迁移的影响

陈一思¹, 易维², 时昭红¹

(1. 武汉市第一医院消化内科, 武汉 430022; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院综合科, 武汉 430030)

[摘要] 目的: 探讨miR-122在结肠癌细胞系HCT116中的表达及对增殖和迁移的影响。方法: qRT-PCR分别检测正常结肠上皮细胞系NCM460和结肠癌细胞系HCT116, HT29, LOVO, SW620中miR-122的表达。将HCT116细胞系分成3组: miR-122过表达组(miR-122组)、阴性对照组(miR-Con组)及空白对照组(Mock组), 经Lipofectamine™ 2000分别转染miR-122 mimic, miR-Con序列及空白对照。CCK-8法及细胞划痕实验分别测定细胞增殖和迁移能力, Western 印迹测定Wnt1和cAMP反应元件结合蛋白(CREB1)表达。结果: miR-122在结肠癌细胞系HCT116, HT29, LOVO及SW620中的表达量低于NCM460。转染后72 h及96 h, miR-122组OD_{450 nm}低于miR-Con组和Mock组($P < 0.05$)。miR-122组划痕愈合率低于miR-Con组[(25.4±2.7)% vs (49.3±5.6)% , $P < 0.05$]。miR-122组CREB1蛋白表达量低于miR-Con组(0.34±0.04 vs 1.0±0.05, $P < 0.01$)。miR-122组Wnt1蛋白表达量低于miR-Con组(0.53±0.06 vs 1.0±0.07, $P < 0.05$)。结论: miR-122在结肠癌细胞系HCT116中低表达, 过表达miR-122可抑制结肠癌增殖和迁移, 其机制可能与CREB1和Wnt1蛋白下调表达有关。

[关键词] miR-122; 结肠癌; 增殖; 迁移

Expression of miR-122 in colon carcinoma cell line HCT116 and its effect on cell proliferation and migration

CHEN Yisi¹, YI Wei², SHI Zhaohong¹

(1. Department of Gastroenterology, First Hospital of Wuhan, Wuhan 430022; 2. General Department, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract **Objective:** To investigate the expression and effect of miR-122 on cell proliferation and migration in colon carcinoma cell line HCT116. **Methods:** The qRT-PCR was used to detect the expression of miR-122 in colon epithelial cell line NCM460 and four colon carcinoma cell lines, HCT116, HT29, LOVO and SW620. The HCT116 cell line was divided into three groups, miR-122 over-expression group (miR-122 group), negative control group (miR-Con group) and blank control group (Mock group), which was transfected with miR-122 mimic, miR-Con sequence and PBST by Lipofectamine™ 2000. The proliferation and migration ability was analyzed using CCK-8 and wound scratch assay. The expression of Wnt1 and CREB1 protein was analyzed by Western

收稿日期 (Date of reception): 2018-07-24

通信作者 (Corresponding author): 时昭红, Email: 292922653@qq.com

blot. **Results:** The expression of miR-122 in four colon carcinoma cell lines HCT116, HT29, LOVO, SW620, was significantly lower than that in colon epithelial cell line NCM460. The OD_{450 nm} value of miR-122 group was significantly lower than that in miR-Con group and Mock group after transfect for 72 h and 96 h, respectively ($P < 0.05$). Scar healing rate of miR-122 group was significantly lower than that in miR-Con group [(25.4±2.7)% vs (49.3±5.6)%, $P < 0.05$]. The expression level of CREB1 protein of miR-122 group was significantly lower than miR-Con group (0.34±0.04 vs 1.0±0.05, $P < 0.01$). The expression level of Wnt1 protein of miR-122 group was significantly lower than miR-Con group (0.53±0.06 vs 1.0±0.07, $P < 0.05$). **Conclusion:** miR-122 was down-regulated expressed in colon carcinoma cell lines. Over-expression of miR-122 could inhibit cell proliferation and migration, which may be associated with down-regulation of Wnt1 and CREB1 protein.

Keywords miR-122; colon carcinoma; proliferation; migration

结肠癌每年全世界有140万例发病, 病死率在所有肿瘤中排第四^[1]。结肠癌预后较差, 晚期5年生存率仅13%^[2]。对大肠癌的早期预防和筛查是降低其病死率的关键^[3]。微小RNA(miRNA)是一类非编码RNA, 长度19~22 nt, 其在基因调控和细胞分化等过程中起重要作用^[4]。miRNA与肿瘤细胞增殖和凋亡密切关系, 且参与基因损伤修复及肿瘤细胞迁移和侵袭调控^[5,6]。在乳腺癌中, miR-122低表达与肿瘤患者预后不良有关^[7]。本研究旨在探讨miR-122在结肠癌中的表达及对增殖和迁移的影响, 并阐明其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

结肠癌细胞系HCT116, HT29, LOVO及SW620及正常结肠上皮细胞系NCM460均购自美国ATCC细胞库, cAMP反应元件结合蛋白(cAMP response-element binding protein, CREB1), Wnt1及GAPDH一抗均购自美国Invitrogen公司, 二抗购自武汉博士德生物科技有限公司, RPMI 1640培养基购自上海经科化学科技有限公司, LipofectamineTM 2000转染试剂购自上海吉玛生物科技有限公司, RT-PCR仪购自美国BD公司, HBS-1096B酶标仪购自南京德铁实验设备有限公司, Western印迹电泳设备购自美国Bio-Rad公司, miR-Con和miR-122 mimic序列由上海吉玛生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、转染及分组

结肠癌细胞系HCT116, HT29, LOVO,

SW620及正常结肠上皮细胞系NCM460均种植于RPMI 1640培养基, 并培养于37 °C, 5%CO₂培养箱中, 于48 h后消化传代, 实验所用的细胞均为对数生长期细胞。

取结肠癌细胞系HCT116分成miR-122过表达组(miR-122组)、阴性对照组(miR-Con组)及空白对照组(Mock组)3组, 将HCT116细胞系以每孔 2×10^5 个接种于6孔板上, 待细胞生至融合后, miR-122组及miR-Con组经LipofectamineTM 2000分别转染miR-122 mimic, miR-Con序列, Mock组以PBST为空白对照。miR-Con序列: 正义链5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', 反义链5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'; miR-122序列: 正义链5'-UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG-3', 反义链5'-AACACCAUUGUCACACUCCAUU-3'。

1.2.2 RNA提取及qRT-PCR

采用All-in-One microRNA抽提试剂盒提取收集待测细胞系和3组细胞的miRNAs, ABI Prism 7700系统的SYBR Green Reagents (日本TaKaRa公司) qRT-PCR, 在ABI 7500 qRT-PCR仪中, 以U6小核RNA作为内参, 反应条件: 95 °C预变性30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 20 s, 共40个循环, 使用BIO-RAD qRT-PCR仪自带软件分析样本的循环阈值(Cycle threshold, CT), 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法定量, 量化miR-122相对表达量。

1.2.3 细胞增殖能力测定

采用CCK-8法测定miR-122组、miR-Con组及Mock组细胞增殖, 将miR-122组、miR-Con组及Mock组细胞消化成单细胞悬液后, 以 2×10^3 个/孔将3组细胞种植于96孔板上, 每孔按200 μL的体积上样, 经0, 24, 48, 72, 96 h培养后, 20 μL CCK-8溶液加入于每孔中去, 继续培养1 h后,

在450 nm波长下, 用酶标仪测定各孔吸光值, 以时间为横坐标, 吸光值为纵坐标绘制细胞增殖曲线。

1.2.4 细胞迁移能力测定

采用细胞划痕实验, 将miR-122组、miR-Con组及Mock组细胞培养于12孔板中, 待细胞长至融合后, 用20 μ L无菌Tips枪头画直线, 在0 h和48 h在显微镜下观察修复情况, 划痕愈合率的计算按照公式, 即划痕愈合率=(划痕后即刻的划痕面积-划痕后24 h的划痕面积)/划痕后即刻的划痕面积 \times 100%。实验在同一情况及条件下重复测量3次, 数值以均数 \pm 标准差表示, 迁移能力与划痕愈合率成正比。

1.2.5 Western 印迹法

采用Western印迹法, 将miR-122组、miR-Con组细胞裂解、变性后, 上样量为每孔30 μ g蛋白, 浓缩胶条件为50 min 80 V, 分离胶条件为100 min 100 V, 常规湿法转膜, 加入CREB1, Wnt1及GAPDH一抗, 一抗浓度为1:200, 4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 二抗(1:1 000)经37 $^{\circ}$ C孵育4 h后, PBST漂洗3次, 在ECL发光液下显影, Quantity One 1-D分析目标蛋白灰度值, 目标蛋白相对表达量=目标蛋白灰度值/GAPDH灰度值, 实验重复3次, 取平均值。

1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0统计软件进行分析, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组间的比较采用 t 检验, 三组比较先用方差分析, 有意义时, 两两比较再用LSD- t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-122 在正常结肠上皮及结肠癌细胞系中的表达

qRT-PCR示: 在正常结肠上皮细胞系NCM460中, miR-122相对表达量为 1.0 ± 0.05 , miR-122在结肠癌细胞系HCT116, HT29, LOVO及SW620相对表达量分别为 0.17 ± 0.02 , 0.35 ± 0.04 , 0.31 ± 0.04 及 0.28 ± 0.03 , miR-122在结肠癌细胞系中的表达量低于正常结肠上皮细胞系($P<0.05$, 图1)。

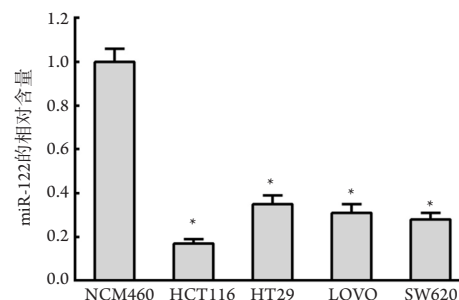


图1 miR-122在结肠癌细胞系及正常结肠上皮细胞系中的表达

Figure 1 Expression of miR-122 in colon epithelial and colon carcinoma cell lines

与NCM460组相比, $*P<0.05$ 。

Compared with the NCM460 group, $*P<0.05$.

2.2 miR-122 过表达抑制结肠癌细胞系 HCT116 增殖

转染24 h后, qRT-PCR示: miR-122组miR-122的相对表达量为 5.26 ± 0.27 , 分别高于Mock组的 1.03 ± 0.05 和miR-Con组的 1.01 ± 0.06 , 差异均有统计学意义($P<0.001$, 图2A)。

CCK-8结果示: 转染后0, 24, 48 h后, miR-122组与miR-Con组的OD_{450 nm}分别为 0.27 ± 0.03 和 0.28 ± 0.03 , 0.38 ± 0.04 和 0.45 ± 0.05 , 0.54 ± 0.05 和 0.74 ± 0.07 , 差异均无统计学意义($P>0.05$); 转染72及96 h后, miR-122组与miR-Con组的OD_{450 nm}分别为 0.71 ± 0.07 和 1.11 ± 0.09 , 0.93 ± 0.07 和 1.59 ± 0.11 , 差异均有统计学意义($P<0.01$)。Mock组分别为 0.26 ± 0.03 , 0.43 ± 0.04 , 0.78 ± 0.07 , 1.14 ± 0.09 及 1.63 ± 0.11 , 与miR-Con组差异无统计学意义($P>0.05$, 图2B)。

2.3 miR-122 过表达抑制结肠癌细胞系 HCT116 迁移

miR-122组划痕愈合率为 $(25.4\pm 2.7)\%$, 显著低于miR-Con组的 $(49.3\pm 5.6)\%$ ($P<0.05$, 图3)。

2.4 miR-122 对结肠癌细胞增殖和迁移影响的机制

miR-122组CREB1蛋白相对表达量 (0.34 ± 0.04) 显著低于miR-Con组 (1.0 ± 0.05) , $P<0.01$, 图4A); miR-122组Wnt1蛋白相对表达量 (0.53 ± 0.06) 显著低于miR-Con组 (1.0 ± 0.07) , $P<0.05$, 图4B)。

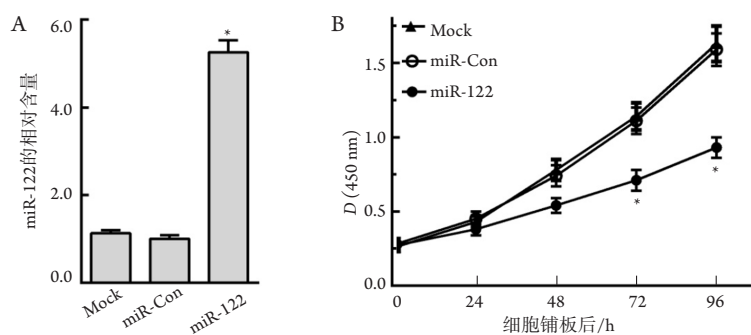


图2 miR-122过表达抑制结肠癌细胞增殖

Figure 2 Over-expression of miR-122 inhibit the proliferation of colon carcinoma cell

(A) 3组miR-122表达量的比较; (B) 3组细胞增殖曲线的比较。与miR-Con组相比, * $P < 0.05$ 。

(A) Comparison of miR-122 expression in the 3 groups; (B) Comparison of proliferation curve among the 3 groups. Compared with the miR-Con group, * $P < 0.05$.

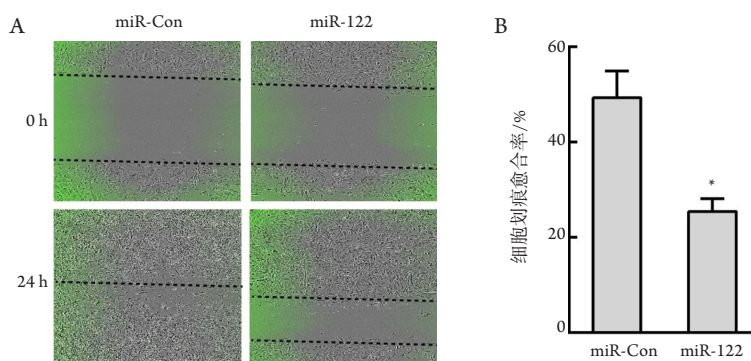


图3 miR-122过表达抑制结肠癌细胞迁移

Figure 3 Over-expression of miR-122 inhibit the migration of colon carcinoma cell

(A) miR-122组与miR-Con组细胞划痕实验; (B) miR-122组与miR-Con组细胞划痕愈合率比较。与miR-Con组相比, * $P < 0.05$ 。

(A) Comparison of wound scratch assay between the miR-122 group and the miR-Con group; (B) Comparison of scar healing rate between the miR-122 group and the miR-Con group. Compared with the miR-Con group, * $P < 0.05$.

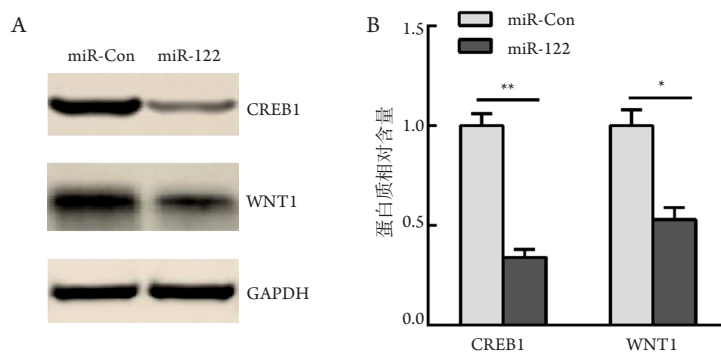


图4 miR-122组及miR-Con组CREB1及Wnt1蛋白的比较

Figure 4 Comparison of CREB1 and Wnt1 protein expression in miR-122 group and miR-Con group

(A) Western印迹法示miR-122组及miR-Con组CREB1及Wnt1蛋白的表达; (B) miR-122组及miR-Con组CREB1及Wnt1蛋白表达量的比较。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

(A) Expression of CREB1 and Wnt1 protein in miR-122 group and miR-Con group by Western blot; (B) Comparison of CREB1 and Wnt1 protein expression in the miR-122 group and the miR-Con group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论

近二十年来, 中国的城市和农村中结肠癌发病率分别上升了32%和8.5%^[8]。已有癌胚抗原等肿瘤标志物用于结肠癌的早期诊断, 但其敏感性和特异性尚不尽如人意^[9]。

miR-122位于染色体18q21.3非编码区, 长度为22 nt^[10]。在乳腺癌^[7]中, miR-122的表达显著低于癌旁组织, miR-122低表达的肿瘤患者预后不良, 显示miR-122在这些肿瘤中发挥抑癌基因的作用。本研究中相对于正常结肠上皮细胞系, 结肠癌细胞系中miR-122低表达, 这与乳腺癌^[7]中的结果一致, 提示在结肠癌中, miR-122也发挥类似抑癌基因的作用。miR-122过表达可抑制Wnt/ β -catenin等相关信号通路, 进而抑制癌细胞增殖, 阻滞细胞周期进程^[11]。本研究构建了miR-122过表达载体, 并转染结肠癌细胞系HCT116, 发现细胞增殖和迁移能力显著被抑制, 这证明了miR-122的抑癌能力。这与Mairerthaler等^[12]报道结果类似。

在肝癌^[10-13]中, miR-122可抑制cyclin G1的表达进而阻滞细胞周期, 随后发现miR-122可通过抑制B细胞淋巴因子-w转录诱导细胞凋亡, 及通过解聚素-金属蛋白酶17依赖的机制抑制肝癌转移和侵袭。通过荧光素酶实验及生物信息学分析, CREB1^[13]及Wnt1^[11]基因为miR-122作用的靶基因。Rao等^[13]发现miR-122可通过直接靶向结合CREB1而抑制胃癌细胞增殖和侵袭。Xu等^[11]报道miR-122靶向结合Wnt/ β -连环素信号通路而抑制肝癌增殖, 并诱导凋亡。

本研究发现: 在过表达miR-122的结肠癌细胞系中, Wnt1表达显著下调, 这提示在结肠癌中, miR-122可通过抑制Wnt1表达来发挥作用。Wnt信号通路包括多种糖蛋白, 该信号通路被激活后会影 β -连环素泛素化水平, 进而入核影响c-Myc和细胞周期蛋白D1的表达, 对调节细胞增殖、分化和迁移有重要作用, 该信号通路的异常常伴随肿瘤产生^[14]。除了Wnt1外, 笔者还发现过表达miR-122后, 结肠癌细胞系中的CREB1表达也有明显降低。对miR-122在肿瘤内相互作用的网络分析中发现, CREB1在该网络中占据关键地位^[15]。CREB1是一个转录因子, 其属于碱性亮氨酸拉链家族, 其包含几个能与miR-122结合的位点, 可通过miR122直接或间接调控多种基因, 进而影响多种细胞学行为, 与肿瘤形成密切相关^[15]。作为转录激活因子, CREB1可结合启动子区, 促进多种基因转录, 增加骨髓细胞存活和异常增殖能力, 并与急

性骨髓性白血病患者不良预后有关^[16], 且可通过促进miR-23a表达促进神经胶质瘤形成^[17]。在胃癌中可促进胃癌细胞增殖和迁移能力^[18]。本研究结果显示: miR-122可能通过作用于CREB1来调控下游基因转录, 进而影响结肠癌细胞的增殖和迁移能力。

当然, 由于本研究是在体外细胞系中的研究, 尚存在一定的不足之处, 如miR-122敲除后对实验动物的影响, miR-122在结肠癌患者组织中的表达如何, 都值得进一步研究。

综上, 在结肠癌中, miR-122下调表达, miR-122过表达可通过影响下游wnt及CREB1的表达促进结肠癌细胞增殖和迁移能力, 这可能为结肠癌的诊断和治疗提供新思路。

参考文献

1. Xu P, Zhu Y, Sun B, et al. Colorectal cancer characterization and therapeutic target prediction based on microRNA expression profile[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20616.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(1): 7-30.
3. Bibbins-Domingo K, Grossman DC, Curry SJ, et al. Screening for colorectal cancer: US preventive services task force recommendation statement[J]. *JAMA*, 2016, 315(23): 2564-2575.
4. Giordano M, Boldrini L, Servadio A, et al. Differential microRNA expression profiles between young and old lung adenocarcinoma patients[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(3): 892-900.
5. Rapado-González Ó, Majem B, Muínelo-Romay L, et al. Human salivary microRNAs in Cancer[J]. *J Cancer*, 2018, 9(4): 638-649.
6. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs[J]. *Nature*, 2005, 433(7027): 769-773.
7. Wang B, Wang H, Yang Z. MiR-122 inhibits cell proliferation and tumorigenesis of breast cancer by targeting IGF1R[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e47053.
8. Deng M, Lan Y, Luo S. Quality of life estimate in stomach, colon, and rectal cancer patients in a hospital in China[J]. *Tumor Biol*, 2013, 34(5): 2809-2815.
9. Nicolini A, Ferrari P, Duffy MJ, et al. Intensive risk-adjusted follow-up with the CEA, TPA, CA19. 9, and CA72. 4 tumor marker panel and abdominal ultrasonography to diagnose operable colorectal cancer recurrences: effect on survival[J]. *Arch Surg*, 2010, 145(12): 1177-1183.
10. Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, et al. Cyclin G1 is a target of miR-

- 122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(13): 6092-6099.
11. Xu J, Zhu X, Wu L, et al. MicroRNA-122 suppresses cell proliferation and induces cell apoptosis in hepatocellular carcinoma by directly targeting Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Liver Int*, 2012, 32(5): 752-760.
 12. Maierthaler M, Benner A, Hoffmeister M, et al. Plasma miR-122 and miR-200 family are prognostic markers in colorectal cancer[J]. *Int J Cancer*, 2017, 140(1): 176-187.
 13. Rao M, Zhu Y, Zhou Y, et al. MicroRNA-122 inhibits proliferation and invasion in gastric cancer by targeting CREB1[J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(2): 323-333.
 14. Alghamdi S, Khan I, Beeravolu N, et al. BET protein inhibitor JQ1 inhibits growth and modulates WNT signaling in mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1): 22.
 15. Boutz DR, Collins PJ, Suresh U, et al. Two-tiered approach identifies a network of cancer and liver disease-related genes regulated by miR-122[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(20): 18066-18078.
 16. Shankar DB, Cheng JC, Kinjo K, et al. The role of CREB as a proto-oncogene in hematopoiesis and in acute myeloid leukemia[J]. *Cancer Cell*, 2005, 7(4): 351-362.
 17. Tan X, Wang S, Zhu L, et al. cAMP response element-binding protein promotes gliomagenesis by modulating the expression of oncogenic microRNA-23a[J]. *PNAS*, 2012, 109(39): 15805-15810.
 18. Xu X, Gao F, Wang J, et al. MiR-122-5p inhibits cell migration and invasion in gastric cancer by down-regulating DUSP4[J]. *Cancer Biol Ther*, 2018, 19(5): 427-435.

本文引用：陈一思, 易维, 时昭红. miR-122在结肠癌细胞系HCT116中的表达及对增殖和迁移的影响[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(10): 2069-2074. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.10.003

Cite this article as: CHEN Yisi, YI Wei, SHI Zhaohong. Expression of miR-122 in colon carcinoma cell line HCT116 and its effect on cell proliferation and migration[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(10): 2069-2074. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.10.003