

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00574

• 研究简报 •

miR-181a 调控结肠癌细胞生长的作用和机制研究

吴为明¹, 李先鹏¹, 郭世伟², 金海波¹, 卿艳平^{1*}

1. 宁波大学医学院附属医院肛肠科, 宁波 315020
2. 第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433

[关键词] miR-181a; 结肠肿瘤; 细胞增殖; PRKCD; 肿瘤基因表达调控
[中图分类号] R 735.35 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2014)05-0574-03

Role of miR-181a in regulating colon cancer cell growth and the related mechanism

WU Wei-ming¹, LI Xian-peng², GUO Shi-wei², JIN Hai-bo¹, QING Yan-ping^{1*}

1. Department of Anorectal, the Affiliated Hospital of Ningbo University School of Medicine, Ningbo 315020, Zhejiang, China
2. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Key words] miR-181a; colonic neoplasms; cell proliferation; PRKCD; neoplastic gene expression regulation
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(5): 574-576]

结肠癌是指结肠黏膜上皮在环境或遗传等多种致癌因素作用下发生的恶性病变, 是常见的恶性肿瘤之一, 占有恶性肿瘤的 10%~15%^[1]。结肠癌的发病原因与遗传、结肠腺瘤、息肉病、慢性炎症、高脂肪、少纤维饮食习惯等都有一定关系^[2], 结肠癌发病隐匿, 病程慢早期无明显的临床表现, 出现明显症状时大多已到了中晚期, 病死率仅次于肺癌和肝癌, 是危害人们健康的可怕杀手^[3]。

MicroRNA(miRNA)是一类进化上高度保守的细胞内源性非编码单链小 RNA, 与多种疾病的发病机制密切相关, 参与肿瘤的发生发展过程。MiRNA(miR)-181 家族在神经系统^[4]、造血系统^[5]、消化系统^[6]等细胞中广泛存在, 对人类生理或病理进程有调控作用。研究显示 miR-181a 在结肠癌组织中的表达水平与患者的预后情况相关, miR-181a 高表达患者预后较差^[7], 但 miR-181a 对结肠癌生长的调控作用和机制并未完全阐明。本研究通过结肠癌细胞系转染 miRNA 抑制剂/模拟物的方法, 确定 miR-181a 对结肠癌细胞生长的影响, 同时确定 miR-181a 的作用靶基因, 探索 miR-181a 对结肠癌的临床治疗的价值。

1 材料和方法

1.1 细胞系、主要试剂与仪器 人结肠癌细胞系 TCHu102 和工具细胞 293T 分别购自上海生命科学研究院细胞库。miR-181a 抑制物和模拟物购自上海吉玛公司, PRKCD 抗体和 GAPDH 抗体购自 Santa Cruz 公司, M199 和 DMEM 培养基、胎牛血清、脂质体转染试剂购自 Invitrogen 公司, 实时定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司, MTT 试剂购自 Sigma 公司, 内参质粒 Renilla、双荧光素酶活性检测试剂盒购自 Promega 公司, 荧光素酶报告基因质粒 pGL3-PRKCD-3'UTR 由英潍捷基(上海)贸易有限公司负责构建。细胞培养箱和生物安全柜购自 Thermo Fisher 公司, 显微镜购自 Olympus 公司, 实时定量 PCR 仪(RG3000A)购自 Qiagen 公司, 酶标仪购自 BioTek 公司。

1.2 细胞增殖能力检测 将结肠癌细胞按 1 000 个/孔的细胞密度铺板于 96 孔培养板中, 边缘孔用无菌 PBS 填充, 在 5% CO₂、37℃ 条件下培养 24 h, 加入转染试剂, 设 5 个复孔, 继续培养 24 h 后, 每孔加入 20 μL 0.5% MTT 溶液(5 mg/mL), 孵育 4 h 后吸去孔内培养液, 每孔加入 150 μL DMSO, 置摇床上低速振荡

[收稿日期] 2013-11-15 [接受日期] 2014-04-22
[基金项目] 中国博士后科学基金(2013M542436). Supported by China Postdoctoral Science Foundation(2013M542436).
[作者简介] 吴为民, 主治医师. E-mail: wwm2@tom.com
* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0574-87035555, E-mail: 236845564@qq.com

10 min,充分溶解结晶物,在酶标仪 490 nm 处测量各孔的光密度值。

1.3 双荧光素报告基因检测及实时定量 PCR 将 293T 细胞按 10^5 个/孔接种于 24 孔培养板,用含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养,使细胞融合率达到 70% 左右;将内参质粒 Renilla、荧光素酶报告基因质粒 pGL3-PRKCD-3'UTR 以及 miR-181a 模拟物共转染,继续培养 24 h 后,裂解细胞,利用双荧光素酶活性检测试剂盒检测荧光素酶活性的变化。根据 TRIzol 试剂的说明书提取细胞总 RNA,测定 RNA 的浓度。取 500 ng 总 RNA,利用反转录试剂盒合成 cDNA;适当稀释后进行实时定量 PCR 反应,反应条件为 95°C 10 s, 58°C 15 s, 72°C 20 s,40 个循环。

1.4 蛋白质印迹分析检测 利用 RIPA 细胞裂解液提取细胞总蛋白,按常规蛋白质印迹分析方法,取 30 μg 总蛋白经凝胶电泳,转膜,5% 脱脂牛奶封闭,一抗 (PRKCD 抗体 1 : 1 000 稀释;GAPDH 抗体 1 : 5 000 稀释)于 4°C 过夜杂交,二抗 (1 : 5 000 稀释)常温杂交 2 h,洗膜后显影。灰度值经 Image-J 软件分析。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 student-t 检验,多组分析采用 one-way ANOVA 分析。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 miR-181a 抑制剂与模拟物的转染效率 定量 PCR 结果发现,miR-181a 抑制剂的转染浓度为 20、50 和 100 nmol/L 时,miR-181a 在结肠癌细胞中的水平分别是对照组的 $(59.90 \pm 3.14)\%$ 、 $(22.80 \pm 1.18)\%$ 和 $(20.40 \pm 0.65)\%$,对细胞内 miR-181a 的水平具有抑制作用 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);而 miR-181a 模拟物的转染浓度为 20、50 和 100 nmol/L 时,miR-181a 在结肠癌细胞中的水平分别是对照组的 (2.26 ± 0.19) 倍、 (2.99 ± 0.22) 倍和 (3.30 ± 0.11) 倍,对细胞内 miR-181a 的水平具有过表达作用 ($P < 0.01$) 当 miR-181a 抑制剂转染浓度为 10 nmol/L 时,miR-181a 水平无统计学意义。

2.2 miR-181a 调控结肠癌细胞的生长活力 在结肠癌细胞中转染 50 nmol/L 的 miR-181a 抑制剂后,继续培养 24 h,细胞的生长活力明显受到抑制 ($P < 0.01$),为对照组的 $(28.90 \pm 0.45)\%$;而转染 20 nmol/L 的 miR-181a 模拟物后,MTT 结果显示结肠癌细胞的生长活力无明显变化。

2.3 靶基因的生物信息学筛选 通过生物信息学预测的方法,PRKCD 基因可能是 miR-181a 的靶基因,在该基因的 3'UTR 区域存在 miR-181a 的 1 个结合位点,与 miR-181a 种子序列完全配对,并且此位点序列在人、小鼠、大鼠等物种中高度保守。

2.4 靶基因的报告基因验证 双荧光素报告基因检测结果发现转染 miR-181a 模拟物后,含有 PRKCD 基因 3'UTR 的荧光素酶活性受到明显抑制 ($P < 0.01$),为对照组的 $(30.20 \pm 5.69)\%$;同时转染 miR-181a 抑制剂后,含有 PRKCD 基因 3'UTR 的荧光素酶活性则增加 ($P < 0.01$),为对照组的 (2.76 ± 0.45) 倍。

2.5 miR-181a 调控 PRKCD 的表达 在结肠癌细胞系 TCHu102 中转染 miR-181a 抑制剂 24 h 后,分别提取细胞总 RNA 和总蛋白。抑制 miR-181a 后,定量 PCR 结果显示 PRKCD 基因的相对表达水平无明显变化,蛋白质印迹分析结果显示,PRKCD 的蛋白水平升高 ($P < 0.05$),是对照组的 (1.79 ± 0.02) 倍 (图 1)。

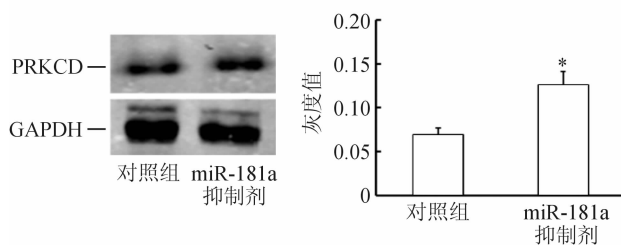


图 1 miR-181a 对 PRKCD 蛋白水平表达的影响

* $P < 0.05$ 与对照组比较. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

miR-181 家族在物种进化中较保守,最早是在小鼠淋巴细胞中发现其特异高表达,且调控早期造血系统的行程^[8]。随后的研究证实 miR-181 是一个重要的基因表达调控因子,功能涉及生物体免疫、炎症,细胞生长、凋亡及分化成熟^[9]。miR-181 在肿瘤发生发展中的调控机制目前还未完全阐明,但其在白血病等疾病发生发展过程中的调控作用均已被发现^[10]。本研究表明,miR-181a 在结肠癌细胞中调控细胞生长活力,通过生物信息学预测和报告基因验证的方法,证实了 PRKCD 是其作用的靶基因。

蛋白激酶 C 属于多功能丝氨酸和苏氨酸激酶,是 G 蛋白偶联受体系统中的效应物,在非活性状态下是水溶性的,游离存在于胞质溶胶中,激活后成为膜结合的酶^[11]。PRKCD 是蛋白激酶 C 家族的亚类,目前研究证明 PRKCD 的激活与细胞周期激活密切相关^[12],与

磷脂酰肌醇蛋白依赖性激酶-1、西多莫司靶蛋白、胰岛素受体等相互作用^[13]。肿瘤的发生发展也与 PRKCD 的表达相关,De Servi 等^[14]的研究表明 PRKCD 的激活能充分诱导肿瘤细胞凋亡,并且是凋亡过程的主要参与者。本研究发现 PRKCD 的表达受到 miR-181a 的调控,在结肠癌细胞中敲低 miR-181a 可显著抑制 PRKCD 的蛋白表达水平,但其基因表达水平并无明显变化,提示 miR-181a 对 PRKCD 的调控是在转录后水平,通过与 PRKCD 基因 3'UTR 的不完全互补结合,抑制其翻译,不影响其转录活性。但在宫颈癌细胞化疗敏感性的研究显示 miR-181a 对 PRKCD 的调控作用不仅体现在蛋白水平的下调,其 mRNA 水平也受到明显的抑制^[15],这可能与 miR-181a 在不同类型细胞中内源性水平以及 miR-181a 的过表达或抑制效率有关,同时增加转染时间可能也会影响 miRNA 靶基因的 mRNA 水平。

miR-181a 参与细胞分化、凋亡、迁移、免疫等过程,在多种肿瘤中发现 miR-181a 的表达异常。深入研究 miR-181a 的调控机制及影响因素,将有利于探明 miR-181a 与肿瘤发生发展之间的因果关系,为肿瘤发生机制的研究提供新的遗传路线,开发新的癌症诊断和治疗方法,为 miRNA 将来可能的临床应用提供理论依据。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Watson A J, Collins P D. Colon cancer: a civilization disorder[J]. *Dig Dis*,2011,29:222-228.

[2] Pino M S, Chung D C. The chromosomal instability pathway in colon cancer[J]. *Gastroenterology*,2010,138:2059-2072.

[3] Klampfer L. Cytokines, inflammation and colon cancer [J]. *Curr Cancer Drug Targets*,2011,11:451-464.

[4] Hutchison E R, Kawamoto E M, Taub D D, Lal A, Abdelmohsen K, Zhang Y, et al. Evidence for miR-181 involvement in neuroinflammatory responses of astrocytes[J]. *Glia*,2013,61:1018-1028.

[5] Vasilatou D, Papageorgiou S, Pappa V, Papageorgiou E, Dervenoulas J. The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis [J]. *Eur J Haematol*,2010,84:1-16.

[6] Kim C H, Kim H K, Rettig R L, Kim J, Lee E T, Aprelikova O, et al. miRNA signature associated with outcome of gastric cancer patients following chemotherapy[J]. *BMC Med Genomics*,2011,4:79.

[7] Nishimura J, Handa R, Yamamoto H, Tanaka F, Shibata K, Mimori K, et al. MicroRNA-181a is associated with poor prognosis of colorectal cancer [J]. *Oncol Rep*,2012,28:2221-2226.

[8] Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, et al. Tc1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181[J]. *Cancer Res*,2006,66:11590-11593.

[9] Naguibneva I, Ameyar-Zazoua M, Poleskaya A, Ait-Si-Ali S, Groisman R, Souidi M, et al. The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation[J]. *Nat Cell Biol*,2006,8:278-284.

[10] Dahlhaus M, Schult C, Lange S, Freund M, Junghanss C. MicroRNA 181a influences the expression of HMGB1 and CD4 in acute leukemias[J]. *Anticancer Res*,2013,33:445-452.

[11] Hernández-Maqueda J G, Luna-Ulloa L B, Santoyo-Ramos P, Castañeda-Patlán M C, Robles-Flores M. Protein kinase C delta negatively modulates canonical Wnt pathway and cell proliferation in colon tumor cell lines[J]. *PLoS One*,2013,8:e58540.

[12] Perletti G, Marras E, Osti D, Felici L, Zaro S, de Eguileor M. PKCdelta requires p53 for suppression of the transformed phenotype in human colon cancer cells [J]. *J Cell Mol Med*,2004,8:563-569.

[13] Jackson D, Zheng Y, Lyo D, Shen Y, Nakayama K, Nakayama K I, et al. Suppression of cell migration by protein kinase Cdelta [J]. *Oncogene*,2005,24:3067-3072.

[14] De Servi B, Hermani A, Medunjanin S, Mayer D. Impact of PKCdelta on estrogen receptor localization and activity in breast cancer cells[J]. *Oncogene*,2005,24:4946-4955.

[15] Chen Y, Ke G, Han D, Liang S, Yang G, Wu X. MicroRNA-181a enhances the chemoresistance of human cervical squamous cell carcinoma to cisplatin by targeting PRKCD[J]. *Exp Cell Res*,2014,320:12-20.

[本文编辑] 商素芳