

· 论 著 ·

微小 RNA-451 对结肠癌细胞侵袭能力的影响

吴春蓉¹, 李生陆¹, 罗治彬^{2△}

(1. 重庆医科大学第二附属医院肿瘤科 400010; 2. 重庆市合川区人民医院肿瘤科 401520)

摘要:目的 研究微小 RNA-451(miR-451)对结肠癌细胞系 SW480 侵袭能力的影响。方法 用荧光染料标记的 siRNA 片段转染,优化转染条件,观察转染效率;通过化学方法合成 miR-451 mimics,以脂质体包裹转染 SW480 细胞,并设单独脂质体转染组、无关序列转染组、未处理组(对照组),采用细胞计数试剂盒-8 检测 miR-451 对细胞增殖的影响,流式分析检测 miR-451 对细胞凋亡的影响,Transwell 小室检测 miR-451 对细胞侵袭能力的影响。结果 化学合成的 miR-451 mimics(100 nM)转染对结肠癌细胞系 SW480 的增殖和凋亡无明显影响,但对 SW480 的侵袭能力有抑制作用。结论 转染 miR-451 mimics 能抑制结肠癌细胞系 SW480 的侵袭能力。

关键词:结肠癌细胞;微小 RNA-451;凋亡;侵袭

中图分类号:R735.75

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)14-1813-03

Effect of micro RNA-451 on invasion to colon cancer cell line SW480

WU Chun-rong¹, LI Sheng-lu¹, LUO Zhi-bin^{2△}

(1. Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical Science University, Chongqing 400010, China; 2. Department of Oncology, Hechuan Public Hospital, Chongqing 401520, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of human microRNA-451 (miR-451) on the invasion of colon cancer cell line SW480. **Methods** The human miR-451 was synthesized chemically. Transfection Control (Cy3) (50, 80, 100, and 120 nM) was transfected into SW480 cells via lipofectamin 2000, which served as optimizing transfection efficiency. The synthesized miR-451 (100 nM) was transfected into SW480 cells via lipofectamin 2000. Cells were also transfected with empty vectors and unrelated fragment to serve as negative controls. Cell counting kit-8 was used to study the effect of miR-451 on the proliferation of SW480 cells. Flow cytometry was performed to detect the effect of miR-451 on the apoptosis of SW480 cells. The invasion of SW480 cells was investigated by Transwell assay. **Results** The optimal concentration of miR-451 was 100 nM; miR-451 (100 nM) had no obvious influence on the proliferation and apoptosis of SW480 cells; however, it inhibited the invasion of SW480 cells. **Conclusion** Synthesized human miR-451 can effectively suppress the invasion of the SW480 cells.

Key words: colon cancer cell; microRNA-451; apoptosis; invasion

肿瘤是目前对人类生命和健康危害最严重的疾病之一。肿瘤发生、发展的确切机制仍未完全阐明,一类新的非蛋白质编码微小 RNA (microRNA, miR) 的出现为肿瘤研究提供了新的思路。miR 是一类长约 20~25 个核苷酸的非编码的单链 RNA 分子。它通过与靶 mRNA 完全或不完全地互补配对,促进目标 mRNA 降解或抑制蛋白翻译,在细胞增殖、分化、凋亡、基因调控及肿瘤的发生中扮演重要的角色。研究特定 miR 在肿瘤发生、发展中的作用正成为肿瘤研究的一个新的热点。

2005 年 Altuvia 等^[1]首次发现 miR-451。2009 年 Bandres 等^[2]研究发现 miR-451 与预后不良相关。与无瘤组织相比,原位杂交显示胃癌和结肠癌上皮细胞 miR-451 表达降低。胃癌细胞 AGS 和结肠癌上皮细胞 DLD1 miR-451 过表达则降低细胞扩增及增加放射敏感性。微阵列及生物信息学分析鉴别出新的致癌基因巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)是 miR-451 的潜在靶点。而 MIF 是参与肿瘤侵袭、转移的重要因子^[3-4]。2010 年 Godlewski 等^[5]研究 miR-451 表达对脑胶质瘤迁移的影响。球体实验、划痕实验及小室侵袭实验均发现 miR-451 降低球体迁移,深入研究发现 miR-451 通过影响细胞骨架而调控迁移。但 miR-451 是否影响胃癌癌细胞侵袭能力还未被研究。本课题将化学合成的 miR-451 mimics 转染结肠癌细胞系 SW480 细胞,观察其对结肠癌细胞增殖、凋亡、侵袭的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 人源性结肠癌细胞株 SW480 (CCL-228, ATCC) 为重庆医科大学张贵海博士馈赠。特级胎牛血清购自北京元亨圣马生物科技公司,新生牛血清购自杭州四季青公司, Leibovitz's L-15 培养基购自北京迈晨基因公司,转染试剂脂质体 lipofectamine 2000 (简称 lipo2000) 购自美国 Invitrogen 公司, Opti-MEM I 低血清培养基购自 GIBCO 公司,细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 购自碧云天生物技术研究所,人 miR-451 mimics、阴性控制及 Cy3 标记的转染效率控制购自广州锐博公司 (RiBoBio), Matrigel 购自 BD Bioscience 公司, Transwell 侵袭小室 (8 μm 孔径) 购自 Millipore 公司,细胞培养板购自美国 Costar 公司。

1.2 细胞培养 用含 10% 胎牛血清的 L-15 培养基培养。所有细胞均在 37 °C、无 CO₂、饱和湿度条件下传代培养,选用对数生长期细胞进行实验。

1.3 细胞转染 实验分组:(1) miR-451 转染组,加入合成的成熟型 miR-451 100 nmol/L (终浓度为 100 nM) 和相应剂量的脂质体;(2) Negative 组,加入无关序列和脂质体;(3) 脂质体组,仅加入脂质体;(4) 对照组,无任何转染。

1.3.1 转染效率检测 转染前 24 h 接种 SW480 于 24 孔板,待生长至 30%~50% 汇合时, Opti-MEM I 释转染试剂 li-

△ 通讯作者, E-mail: luozhibincq@126.com。

po2000, 另用 Opti-MEM I 分别稀释不同剂量的 siR-Ribo™ Transfection Control(Cy3), 使转染时终浓度分别为 50、80、100、120 nM; 室温孵育 5 min; 将二者轻轻混合, 室温培养 20 min 以形成 Transfection Control(Cy3)-lipo2000 混合物, 再加入含有细胞及培养液的 24 孔板中, 轻晃均匀; 将培养板置于 37 °C、CO₂ 培养箱中培养。24 h 后用荧光倒置相差显微镜检测转染情况。整个操作过程严格遵循 RNA 操作相关规则, 并且避光。胎盘蓝染色计数活细胞数。

1.3.2 miR-451 mimics/Negative 转染 转染前 24 h 接种 SW480 于 6 孔板, 待生长至 30%~50% 汇合时, 取 miR-451 mimics/Negative 10 μ L、脂质体 5 μ L, 分别经 Opti-MEM 稀释至 250 μ L, 于室温中作用 5 min 后将两者缓缓混合, 静置 20 min, 加入 SW480 中摇晃混匀。培养 6 h 后, 换含 10% 胎牛血清的 1640 培养液, 培养 24~48 h 后收集细胞用于后续实验。另设单纯脂质体转染组, 未转染细胞做对照组。实验重复 3 次。

1.4 CCK-8 检测肿瘤细胞增殖能力 按照 CCK-8 试剂盒说明书进行。将 SW480 细胞按 4×10^3 个/孔接种于 96 孔培养板(每孔 100 μ L)中, 待细胞贴壁后转染, 分别于转染后(24、48、72 h)加入 CCK-8 10 μ L, 37 °C、5% CO₂ 培养 2 h, 酶标仪测定 D450 值。每个处理组设 4 个复孔。重复 3 次。

1.5 miR-451 mimics 对 SW480 细胞凋亡的影响 用流式细胞仪分析肿瘤细胞凋亡。转染后 48 h 用胰酶消化细胞, 制成单细胞悬液, 离心。PBS 洗 2 次后用 PBS 重悬, 充分吹打。调整细胞密度为 1×10^6 个/mL, 加入 10 μ L Annexin V-FITC 和 10 μ L PI, 混匀, 进行流式细胞仪(BD FACS Vantage)检测。Annexin V 阳性/PI 阴性判断为早期凋亡, Annexin V 阳性/PI 阳性判断为晚期凋亡。二者合并计算细胞凋亡率。

1.6 侵袭能力检测 肿瘤细胞体外侵袭实验: 用 50 mg/L 基质胶(BD 公司) 1:4 稀释液包被 8 μ m 孔径 Transwell 小室滤膜的上表面, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中温育 1 h, 用 L-15 水化小室滤膜上、下表面。消化收集转染后 24 h 的细胞, 离心弃去培养液, 用 PBS 洗 1~2 遍, 用含 0.1% BSA 的 L-15 培养基重悬, 调整细胞密度至 1×10^5 /mL 的细胞悬液。24 孔板中放置 Transwell 侵袭小室, 先在小室上层分别加入事先制备好的 4 组细胞悬液 200 μ L, 轻轻摇匀。再向下室加入 600 μ L 含 10% FBS 的 L-15 培养液。置 24 孔板于 37 °C、无 CO₂ 培养箱中培养。48 h 后从孔板中移出小室, 用脱脂棉拭去小室滤膜上层未通过微孔的细胞, 将此滤膜先于 4% 多聚甲醛中固定 30 min, 1% 结晶紫染色 10 min, 使侵袭到滤膜下层的细胞充分着色呈紫蓝色, 轻轻洗脱残余染料, 倒置显微镜观察并拍照, 每组随机选择 5 个视野, 计数。并重复实验 3 次。

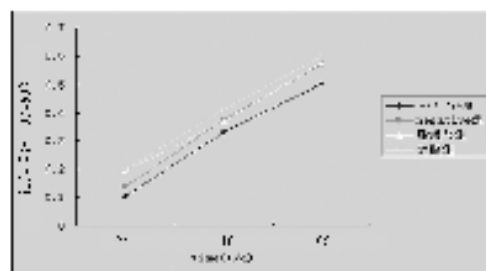
1.7 统计学方法 所有实验重复 3 次, 所得数据用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行正态性分析及方差齐性检验, 多组间比较应用单因素方差分析, 两组间比较采用 LSD 法。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 转染效率 随着转染剂量的增加, 转染进入细胞的荧光增多, 而终浓度为 100、120 nM 时, 转染效率都高(约 80%~90%)(见彩插 I 图 1)。50、80、100 nM 组死细胞都极少, 而 120 nM 组死细胞增加, 提示随着转染剂量增加, 细胞毒性也增加, 所以选择 100 nM 终浓度为实验转染 miR mimics/Negative 的优化浓度。

2.2 miR-451 mimics 对 SW480 增殖能力的影响 各组细胞

生长曲线较为相似, 增殖速度无明显差别(图 2)。



miR-451 mimics 对 SW480 增殖能力无明显影响。

图 2 miR-451 mimics(100 nM)转染对 SW480 细胞增殖能力的影响

2.3 miR-451 mimics 对 SW480 细胞凋亡的影响 对照组细胞凋亡率为(5.81±1.20)%, Negative 组细胞凋亡率为(9.57±2.92)%, miR-451 转染组细胞凋亡率为(6.33±2.89)%, 脂质体组细胞凋亡率为(5.60±2.63)%. 各组细胞间凋亡发生率比较差异无统计学意义(P>0.05)。

2.4 细胞侵袭能力 对照组细胞具有一定的侵袭能力, 48 h 通过 8 μ m 孔径的细胞数为(33±7)个。miR-451 转染组为(17±2)个, Negative 组为(29±5)个, 脂质体组为(31±7)个。Negative 组、脂质体组侵袭能力与对照组一致, miR-451 转染组最低(见彩插 I 图 3)。

3 讨 论

肿瘤的侵袭转移是一个多步骤、多因素参与的复杂过程。包括各种黏附相关分子、蛋白水解酶类、许多细胞因子及调节因子、信号转导通路分子、肿瘤侵袭转移相关基因及转移抑制相关基因和一些癌基因、抑癌基因等。miR 参与对肿瘤侵袭转移相关分子的基因表达调控研究已经成为肿瘤研究的热点。在大多数高侵袭性的乳腺癌细胞系(如 MDA-MB-231)中, miR-126 和 miR-335 表达缺失, 通过逆转录病毒转导的方法恢复 miR-126 或 miR-335 的表达可以使癌细胞的转移活性减少 80%。Tavazoie 等^[6]证明细胞形态的改变与减少细胞运动性有关, 它限制细胞的侵袭转移。miR-335 负调控组与肿瘤远端转移相关的靶基因, 这些靶基因因为祖细胞转录因子 SOX4 和细胞外基质成分钙黏蛋白 C。Ma 等^[7]证明 miR-10b 的表达与肿瘤的血管侵袭有关, 同时 miR-10b 特异性增加肿瘤细胞的侵袭, 但不影响细胞的生活力和增殖。将过表达 miR-10b 的乳腺癌细胞系 SUM159 注射到小鼠乳房脂肪细胞中可以观察到肿瘤细胞簇的肺部微小转移, 并有部分细胞转移到胸膜。Sengupta 等^[8]应用芯片技术发现 miR-29c 在鼻咽癌中的表达是正常鼻咽组织的 1/5。进一步研究表明, miR-29c 调控的基因为细胞外基质蛋白, 包括胶原和层粘连蛋白 γ_1 , 它们参与鼻咽癌的侵袭转移。miR 与肝癌侵袭转移的研究也备受关注^[9]。影响结肠癌预后的主要因素为结肠癌的侵袭转移情况, 因此研究与结肠癌侵袭及转移密切相关的特定 miR 具有重要意义。

miR-451 是一个多功能 miR, 已被发现在多种恶性肿瘤中发挥重要作用。最近研究表明, miR-451 具有不同的功能, 在多种生理和病理过程中(如造血系统分化^[10]、血液系统疾病^[11]、神经发育^[12]、心血管疾病^[13]、癌症发生等)起重要作用。实验表明, miR-451 在多种恶性肿瘤中(如胶质母细胞瘤^[14]、胃肠癌^[2]、头颈部鳞状细胞癌^[15]等)异常表达, miR-451 还通过靶向 MDR 调控卵巢癌^[16]、乳腺癌^[17]耐药。

但此前尚未有 miR-451 与胃肠癌侵袭具有相关性的报道。

2010 年 Godlewski 等^[5]研究了 miR-451 表达对脑胶质瘤迁移的影响。球体实验、划痕实验及小室侵袭实验均发现 miR-451 降低球体迁移,深入研究发现 miR-451 通过影响细胞骨架而调控迁移。生物信息学方法预测及荧光素酶实验证实胶质瘤细胞中 CAB39 是 miR-451 的一个功能相关靶标。提示 miR-451 也有可能在胃肠癌的侵袭及转移中扮演重要角色。因此,本研究对 miR-451 的功能进行了进一步的研究,通过功能检测发现,miR-451 的表达能够抑制 SW480 的侵袭能力。

作者使用 siR-RiboTM Transfection Control(Cy3)作为转染效率判断的间接指标,其与 hsa-miR-451 mimics 片段大小相似,但是带 Cy3 荧光基团,在相同的操作条件下,检测不同浓度下的转染效率,便于实验转染 mimics 筛选有效剂量,mimics 组及 negative 组未带荧光基团,主要考虑后续实验中如流式检测会带来干扰。本研究结果显示,随着转染剂量的增加,转染进入细胞的荧光增多,而终浓度为 100、120 nM 时,转染效率都高(约 80%~90%)。而 120 nM 时细胞毒性增加,作者选择 100 nM 作为实验优化剂量。

miR mimics 是运用化学方法合成的 miR 模拟物,能模拟细胞中 miR 的高表达水平,进一步增强内源 miR 的调控作用,进行功能获得性(gain-of-function)研究。本研究通过直接瞬时转染 miR mimics 对 miR-451 的功能进行检测,这种方法的优点在于化学合成 miR 简单、快捷,避免了构建表达载体的步骤,能够有效提高特定 miR 的表达,但缺点是增强表达的持续时间较短,而且转染后表达量到底增高多少、能持续多久,还有待于荧光定量 PCR 检测。因此,miR-451 转染后对细胞增殖和凋亡无影响的实验结果尚不能肯定是 miR-451 确实对 SW480 细胞增殖和凋亡无影响,还是 miR-451 表达量太低所致,尚有待于进一步探讨。

综上所述,本实验利用 miR 转染技术提高 miR-451 在转染细胞中的表达;采用 Transwell 实验发现提高 miR-451 的表达能够抑制 SW480 细胞的侵袭能力。首次发现了 miR-451 在结肠癌细胞系 SW480 的侵袭转移中发挥重要作用,为 miR 作为靶向肿瘤基因治疗的新靶点提供了重要的实验依据。但 miR-451 是通过靶向哪个或者哪些基因而调控侵袭能力的尚有待于更进一步的探讨。对 miR 及其调控网络的深入理解,以及对 miR 功能和相关靶位点的全面阐明必将给未来 miR 在肿瘤临床、诊断和治疗中的应用带来广阔前景。

参考文献:

- [1] Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, et al. Clustering and conservation patterns of human microRNAs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(8):2697.
- [2] Bandres E, Bitarte N, Arias F, et al. microRNA-451 regulates macrophage migration inhibitory factor production and proliferation of gastrointestinal cancer cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(7):2281.
- [3] Verjans E, Noetzel E, Bektas N, et al. Dual role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human breast cancer[J]. *BMC Cancer*, 2009, 9:230.
- [4] He XX, Chen K, Yang J, et al. Macrophage migration inhibitory factor promotes colorectal cancer[J]. *Mol Med*, 2009, 15(1):1.
- [5] Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A, et al. MicroRNA-451 regulates LKB1/AMPK signaling and allows adaptation to metabolic stress in glioma cells[J]. *Mol Cell*, 2010, 37(5):620.
- [6] Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis[J]. *Nature*, 2008, 451(7175):147.
- [7] Ma L, Ruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumor invasion and metastasis initiated by micrRNA-10b in breast cancer[J]. *Nature*, 2007, 449(7163):682.
- [8] Sengupta S, Den-Boon JA, Chen IH, et al. MicroRNA-29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(15):5874.
- [9] Bunhu A, Jia HL, Forgues M, et al. Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2008, 47(3):897.
- [10] Papapetrou EP, Korkola JE, Sadelain M, et al. A genetic strategy for single and combinatorial analysis of mirna function in mammalian hematopoietic stem cells[J]. *Stem Cells*, 2010, 28(2):287.
- [11] Bruchova-Votavova H, Yoon D, Prchal JT. miR-451 enhances erythroid differentiation in K562 cells[J]. *Leuk Lymphoma*, 2010, 51(4):686.
- [12] Zhang Z, Chang H, Li Y, et al. MicroRNAs: potential regulators involved in human anencephaly[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(2):367.
- [13] Bostjancic E, Zidar N, Glavac D. MicroRNA microarray expression profiling in human myocardial infarction[J]. *Dis Markers*, 2009, 27(6):255.
- [14] Gal H, Pandi G, Kanner AA, et al. MIR-451 and Imatinib mesylate inhibit tumor growth of Glioblastoma stem cells, *Biochem*[J]. *Biophys Res Commun*, 2008, 376(1):86.
- [15] Hui AB, Lenarduzzi M, Krushel T, et al. Comprehensive microRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(4):1129.
- [16] Zhu H, Wu H, Liu XP, et al. Role of microRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR1/P-glycoprotein expression in human cancer cells[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2008, 76(5):582.
- [17] Kovalchuk O, Filkowski J, Meservy J, et al. Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(7):2152.

(收稿日期:2010-04-02 修回日期:2010-05-30)