

MiRNA-424 对人结肠癌细胞系 Lovo 细胞增殖及 Rspo3 基因表达的影响

林琳,周刘祥,王晓春

(中南大学湘雅医学院医学检验系,湖南长沙 410013)

摘要:[目的]探讨 miR-424 对人结肠癌 Lovo 细胞增殖及 Rspo3 基因表达的影响。[方法]运用实时荧光定量 PCR 检测 Lovo 细胞和正常结肠上皮组织 NCM460 细胞中 miR-424 与 Rspo3 mRNA 的表达水平。miR-424 抑制剂(inhibitor)转染 Lovo 细胞后,观察细胞增殖能力,及 miR-424、Rspo3 mRNA、miR-15/16/103 表达水平,Western blot 检测 Rspo3 蛋白表达水平。通过在线软件预测靶向 Rspo3 基因的 miRNA,并用双荧光素酶报告基因实验验证。[结果] MiR-424 与 Rspo3 mRNA 在结肠癌 Lovo 细胞中过表达($P<0.05$)。miR-424 inhibitor 组 Lovo 细胞增殖受到明显抑制($P<0.05$),且 Rspo3 基因表达量显著下降($P<0.05$),miR-15/16/103 均上调,其中 miR-103 上调最显著($P<0.05$)。双荧光素酶报告基因实验验证 miR-103 可靶向调控 Rspo3 基因的表达。[结论] miR-424 抑制剂可阻滞 Lovo 细胞增殖且通过反馈性上调 miR-103 靶向抑制 Rspo3 基因的表达。

关键词:miR-424;结肠癌;Lovo 细胞;增殖;Rspo3 基因

中图分类号:R735.3+5;R73-3 文献标识码:A 文章编号:1004-0242(2018)03-0223-06
doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2018.03.A012

Effects of MicoRNA-424 on Proliferation and Rspo3 Gene Expression in Human Colon Cancer Lovo Cell Line

LIN lin,ZHOU Liu-xiang,WANG Xiao-chun

(Department of Laboratory Medicine,Xiangya School of Medicine,Central South University,Changsha 410013,China)

Abstract:[Purpose] To investigate the effect of miR-424 on proliferation and RSPO3 gene expression in human colon cancer Lovo cell line. [Methods] Real-time quantitative PCR was used to detect the expressions of miR-424 and Rspo3 mRNA in colon cancer Lovo cells and normal colorectal epithelial NCM460 cells. After transfected with miR-424 inhibitor,negative control and liposome respectively,the proliferation of Lovo cells was detected by CCK-8 method. The expressions of Rspo3 mRNA and miR-15/16/103 were detected by real-time qPCR. The miRNAs targeting Rspo3 gene were predicted by prediction software and verified by dual luciferase reporter assay. [Results] MiR-424 and Rspo3 mRNA were overexpressed in Lovo cells ($P<0.05$). The proliferation of Lovo cells transfected with miR-424 inhibitor was significantly inhibited ($P<0.05$),and the expression of Rspo3 gene was significantly decreased ($P<0.05$),while miR-15/16/103 was upregulated ($P<0.05$). Dual luciferase reporter gene experiments confirmed that miR-103 targeted Rspo3 gene expression. [Conclusion] Inhibition of miR-424 can reduce the proliferation of Lovo cells and down-regulate the Rspo3 expression through the up-regulation of miR-103.

Key words:miR-424;colon cancer;Lovo cells;proliferation;Rspo3 gene

结肠癌是消化系统常见的恶性肿瘤,其发病机制受多种因素影响。近年研究关注其与微小 RNA (microRNA, miRNA) 的关系,如 miR-155 缺失可促进结肠癌发生^[1],miR-21 和 miR-145 共同调节结肠

癌干细胞等^[2]。MiR-424 与肿瘤的发生也存在密切的关联。研究显示,miR-424 可抑制肝细胞肿瘤的增殖^[3],促进前列腺肿瘤的生长^[4]。R-脊椎蛋白(R-spondin3, Rspo3)是一种新型的 Wnt 通路蛋白,参与调控细胞的增殖、分化以及形态发生,与多种肿瘤的发生发展存在密切联系。研究显示,Rspo3 蛋白可促进肺部肿瘤侵袭^[5],驱使肠道干细胞肿瘤的发生^[6]。本研究以

收稿日期:2017-11-16;修回日期:2017-12-18

基金项目:湖南省自然科学基金(10JJ5010);中南大学研究生自主探索创新项目(2017zzts846)

通讯作者:王晓春,E-mail:810768205@qq.com

人结肠癌 Lovo 细胞系为研究对象,miR-424 抑制物 (inhibitor)转染 Lovo 细胞后,观察 Lovo 细胞增殖能力及 *Rspo3* 基因表达变化情况,预测及验证靶向调控 *Rspo3* 基因的 miRNA,为后续科研以及临床治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

人结肠癌 Lovo 细胞系、正常结肠上皮组织细胞系 NCM460 细胞系来源于中南大学湘雅医学院医学检验系实验中心;RPMI-1640 培养液 (美国 Gibco 公司);胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料公司);Lipofectamine™ 2000、Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司);miR-424 inhibitor、miR-103 mimics、Nc (上海吉玛基因);CCK-8 (美国 Genview 公司);逆转录试剂盒、实时荧光定量 RT-PCR 试剂盒 (南京 Vazmye 公司);AG 22331 普通 PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司);StepOnePlus 实时荧光定量 PCR 仪、酶标仪 (美国 Bio-rad 公司);PI 染液 (美国 Sigma 公司);流式细胞仪 (美国 Coulter 公司);兔单克隆抗体 β -actin (美国 Senta 公司);鼠单克隆抗体 *Rspo3* (美国 ABclonal 公司);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG (北京鼎国公司);ECL 化学发光液 (美国 PIERCE 公司);化学发光凝胶成像分析仪 (美国 Bio-Rad 公司);双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (美国 Promega 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

取生长状态良好的结肠癌 Lovo 细胞,用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI-1640 培养液置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养,待细胞融合度达 80%~90% 时按照 1:3 传代,加入含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液吹打成细胞悬液,并细胞计数,调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml,在 6 孔细胞培养板中加入 2ml 细胞悬液,置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养用于后续实验。

1.2.2 细胞转染

将带有 Cy3 荧光标记的 miR-424 inhibitor、Negative control (NC) 干粉瞬时离心后,用含 DEPC 的 ddH₂O 溶解,吹打混匀,配置成终浓度为 20 μ mol/L

的工作液,-20℃ 贮存。取 1.2.1 中的细胞,按照 Lipofectamine™ 2000 试剂说明书进行转染,6h 后更换新的 RPMI-1640 培养液,继续培养用于后续实验。将 miR-424 inhibitor 转染 Lovo 细胞后,通过荧光显微镜和普通光学显微镜对比,计算转染效率。

1.2.3 CCK-8 检测细胞增殖

将转染后处于对数生长期的 Lovo 细胞用 2.5g/L 胰蛋白酶室温消化 1~2min。用 RPMI-1640 培养液调节细胞悬液浓度。以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,分别设置对照组 (仅含细胞、培养基)、空白组 (仅培养基) 及实验组 (miR-424 inhibitor 组、NC 组、lipo2000 组),每组各设 6 个复孔。分别于转染后 12、24、48、72、96h,每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液,继续培养 4h 后,用酶标仪测定在 450nm 处的 OD 值,计算增殖率。实验重复 3 次。

1.2.4 总 RNA 提取及逆转录

转染后 48h,细胞融合度达到 90% 时,弃掉培养液,按照 Trizol 试剂说明书提取总 RNA。通过紫外分光光度计测定 RNA 的纯度和浓度,取吸光度 (A₂₆₀/A₂₈₀) 为 1.8~2.2 样品按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录,得到 cDNA。

1.2.5 实时荧光定量 PCR

反应体系为 20 μ l,包括 Green master mix 10 μ l,前向引物 0.4 μ l,后向引物 0.4 μ l,ROX reference dye1 0.4 μ l,cDNA 2.0 μ l,灭菌蒸馏水至 20 μ l。循环参数为:95℃ 5min,95℃ 10s,56℃ 30s,40 个循环,95℃ 15s,60℃ 1s,95℃ 15s。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算相对表达量。每个样品设 6 个复管,实验重复 3 次。

1.2.6 Western blot

取上述 Lovo 细胞接种于 6 孔板中,于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 48h 后收集。设置实验组 miR-424 inhibitor 组、NC 组和 lipo2000 组。根据全蛋白质提取试剂盒和 BCA 蛋白质提取试剂盒说明书操作提取上述 Lovo 细胞的总蛋白质并进行定量。按照 50 μ g 总蛋白质上样,经 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,冰水浴中 100V、60min 条件下电转移至 PVDF 膜上。37℃、50g/L 脱脂牛奶 (TBST 配制) 封闭 2h,分别加入鼠单克隆抗体 *Rspo3* (1:1000 稀释)、兔单克隆抗体 β -actin (1:5000 稀释) 4℃ 过夜。TBST 洗涤 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 和山羊抗兔 IgG (均为 1:5000 稀释),37℃ 温育 1h, TBST

洗涤3次,经化学发光法(ECL)显色,于化学发光凝胶成像分析仪上成像,Image J图像处理软件对条带灰度值进行分析。公式:目的蛋白灰度值/ β -actin 灰度值。实验重复3次。

1.2.7 双荧光素酶报告基因检测

由上海吉玛合成 Rspo3-WT 3'UTR、Rspo3-mutant 3'UTR,重组入双荧光素酶报告基因质粒 psi-CHECK2 多克隆位点,分别获得野生型和突变型。将 Lovo 细胞接种于24孔板,待细胞融合度达80%左右进行转染,将0.2 μ g的双荧光素酶报告质粒及20nmol/L终浓度的 miR-103 mimics 或阴性对照共转染 Lovo 细胞,5h后更换1640完全培养基,48h后检测荧光素酶活性。

1.3 统计学处理

采用 Origin 8 统计软件进行。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间的比较用配对 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 MiR-424 与 Rspo3 在结肠癌 Lovo 细胞中的表达水平

荧光定量 PCR 结果显示 Lovo 细胞中 miR-424 与 Rspo3 mRNA 的表达水平均高于正常结肠上皮组织细胞系 NCM460 ($t=37.041, P=0.001; t=20.000, P=0.002$; Figure 1)。表明 miR-424 及 Rspo3 基因可能参与结肠癌的发生发展。

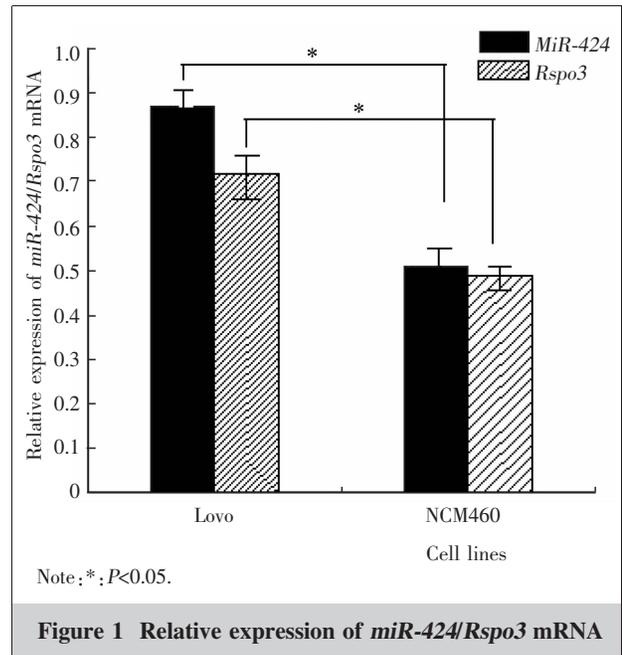


Figure 1 Relative expression of miR-424/Rspo3 mRNA

2.2 转染后 miR-424 表达情况

MiR-424 inhibitor 转染 Lovo 细胞 48h 后,置于荧光显微镜和普通显微镜下观察,转染效率为 $90.53\% \pm 3.82\%$ (Figure 2)。荧光定量 PCR 结果显示,miR-424 inhibitor 组与其他组相比较明显受到抑制 ($t=103.923, P < 0.001$; Figure 3)。表明转染 48h 后 miR-424 inhibitor 进入细胞并发挥作用,为后续实验奠定基础。

2.3 CCK-8 检测细胞增殖

MiR-424 inhibitor 组与其他两组相比,转染 48h 时细胞增殖受抑制最明显,且差异具有统计学意义

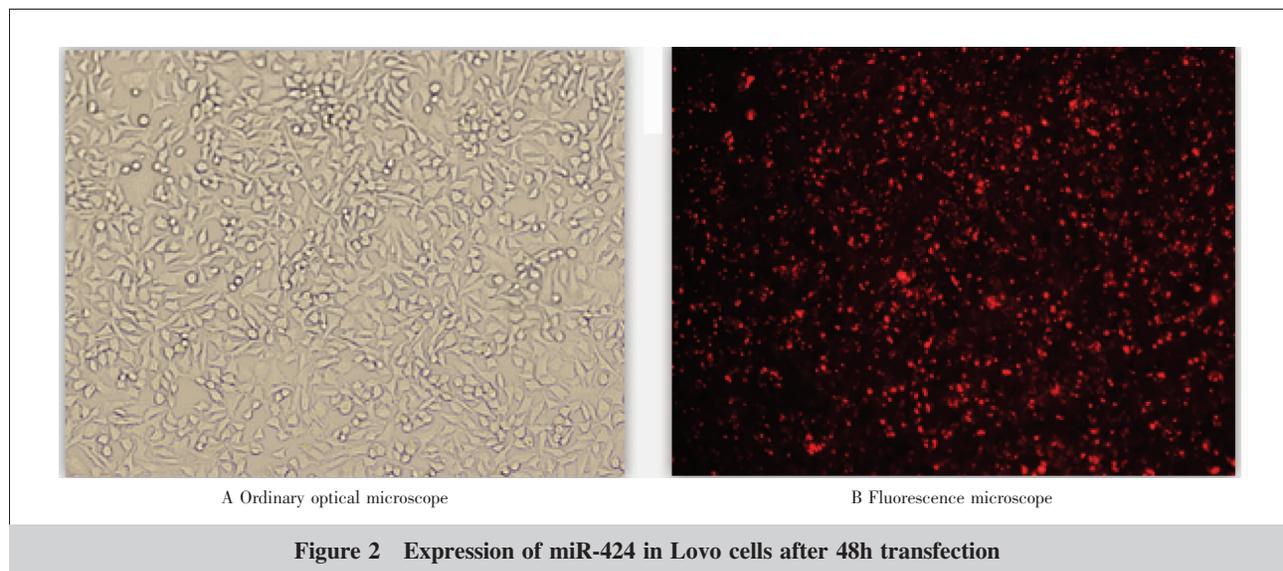
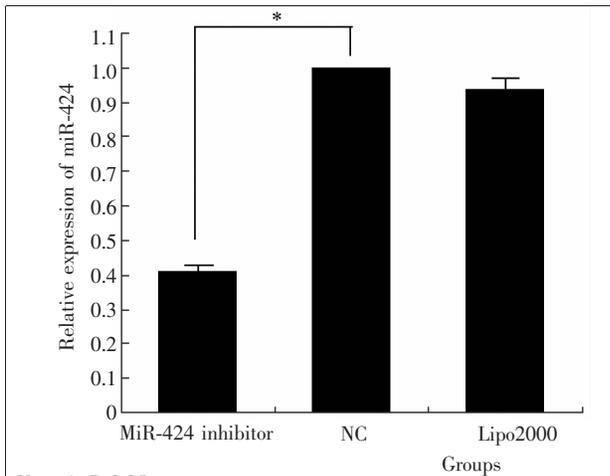
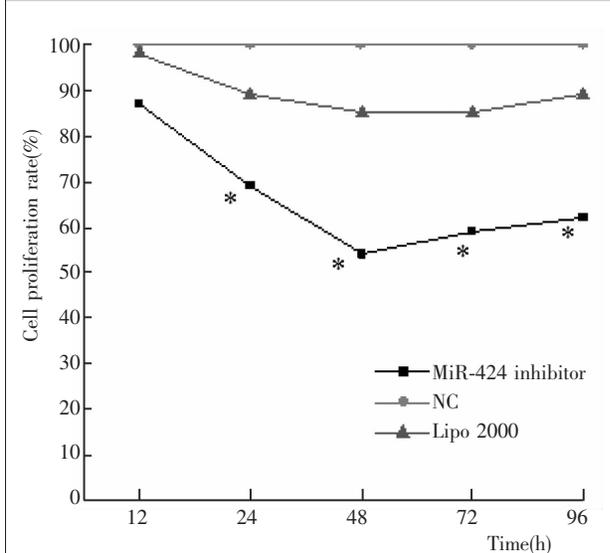


Figure 2 Expression of miR-424 in Lovo cells after 48h transfection



Note: *; $P < 0.05$.

Figure 3 Relative expression of *miR-424* after transfection



Note: *; $P < 0.05$.

Figure 4 Cell proliferation rates

($t=32.806, P=0.001$; Figure 4)。表明 *miR-424* 受抑制时可阻滞结肠癌 Lovo 细胞的增殖。

2.4 *Rspo3* 基因表达变化情况

细胞转染 48h 后, *miR-424* inhibitor 组 Lovo 细胞 *Rspo3* mRNA 表达水平显著下降 ($t=91.799, P < 0.001$; Figure 5), *Rspo3* 蛋白表达量受抑制 ($t=19.692, P=0.003$; Figure 6)。以上结果表明, *miR-424* 抑制剂可下调 Lovo 细胞 *Rspo3* 基因的表达。

2.5 其他内源性 miRNA 表达情况

通过荧光定量 PCR 检测 *miR-424* inhibitor 转染后 *miR-15*、*miR-16*、*miR-103* 的表达情况。结果显示, 当 *miR-424* 受到抑制时, *miR-15/16/103* 均有不同程

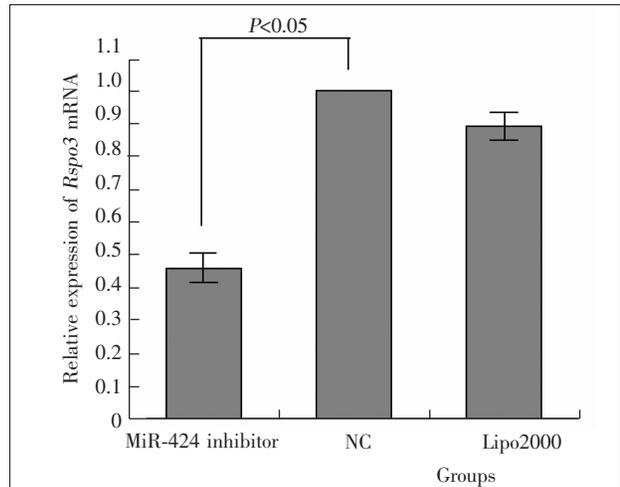
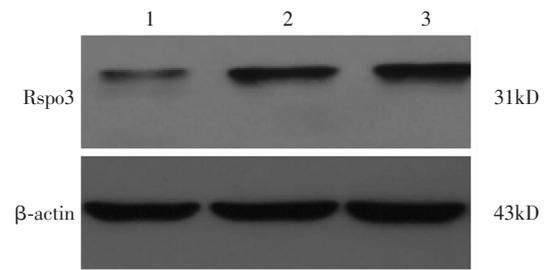


Figure 5 Relative expression of *Rspo3* mRNA after transfection



Note: 1. *miR-424* inhibitor; 2. NC; 3. Lipo2000.

Figure 6 Expression of *Rspo3* protein after transfection

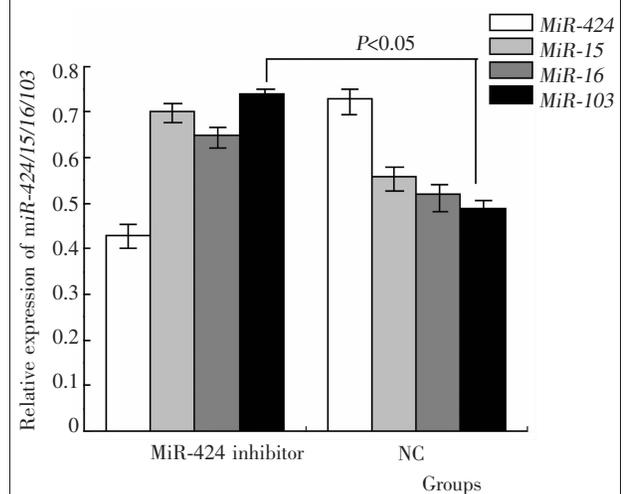
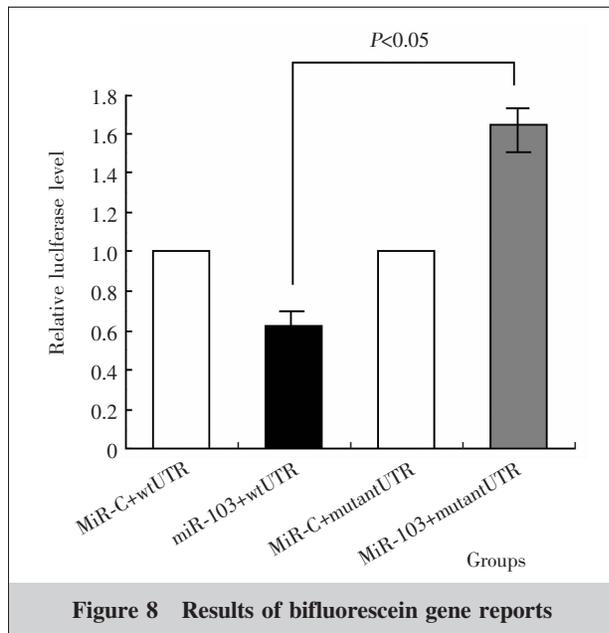


Figure 7 Relative expressions of *miR-424/15/16/103* after transfection

度的表达上调, 其中 *miR-103* 过表达最显著 ($t=29.103, P=0.001$; Figure 7)。表明 *miR-424* 受抑制时可反馈性上调 *miR-103*。

2.6 靶向调控 *Rspo3* 基因的 miRNA 预测及验证

通过 Targetscan (<http://www.targetscan.org/>)、miRNADA (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>)、miRDB (<http://mirdb.org/miRDB/>) 三大数据库预测发现 *miR-103* 可靶向调控 *Rspo3* 基因。双荧光素酶报告基因实验证明 *miR-103* 可特异结合 *Rspo3* 的 3' UTR 而抑制其表达, 预测的结合位点突变时, 该基因的抑制效应也随即消失 ($t=84.870, P<0.001$; Figure 8)。表明 *miR-103* 可通过与靶基因 *Rspo3* 的 3' UTR 直接作用下调其表达水平。



3 讨论

MiR-424 位于染色体 Xq26.3, 其表达异常与多种肿瘤发生发展有关。研究显示, miR-424 可以通过靶向调控成纤维细胞生长因子受体 (*FGFR1*) 抑制血管瘤细胞的增殖与迁移^[7]。在急性骨髓性白血病中, miR-424 通过调控多形性腺瘤基因 (*PLAG1*) 增加药物治疗的敏感度。以上研究提示, miR-424 不仅促进肿瘤的发生, 同时可以作为辅助治疗肿瘤的新型药物。本研究发现, 在结肠癌 Lovo 细胞中 *miR-424* 处于过表达状态, 转染 *miR-424* inhibitor 后 Lovo 细胞中 *miR-424* 表达量显著下降, 且细胞增殖受到抑制, 表明在结肠癌 Lovo 细胞中下调 *miR-424* 可以有效抑制肿瘤细胞的增殖, 为结肠癌的临床治疗提供新的思路。

Rspo3 基因编码表达的 *Rspo3* 蛋白是 *Rspo* 蛋白家族的一员, 其家族包括 4 个成员即 *Rspo1-4*, 其中 *Rspo3* 蛋白受到广泛关注。*Rspo3* 蛋白与 LGR-4 配体结合通过 Wnt 信号通路调控肿瘤的发生, 也可通过 ZNRF3/RNF43 信号传导模块调控恶性肿瘤的发展过程^[8]。在肠道肿瘤中, Han 等^[9]发现 *Rspo2* 和 *Rspo3* 融合可以驱使肠道肿瘤发生并维持肿瘤细胞的生存。*Rspo3* 蛋白在结肠癌的发生发展中扮演着重要角色, 抑制 *Rspo3* 蛋白的表达水平将有助于结肠癌的预防与治疗。

本研究中 *miR-424* inhibitor 转染 Lovo 细胞后 *Rspo3* mRNA 以及蛋白表达量均显著下降。而在经典理论中, miRNA 与靶基因的特殊序列结合, 诱导靶 mRNA 的剪切或遏制其翻译达到调控靶基因表达的目的, 是一种负向调控。表明在本研究中 *miR-424* 不能直接靶向调控 *Rspo3* 基因, 而是通过其他途径间接影响其表达。途径一, Khan 等^[10]研究表明 miRNA 受抑制可导致其他内源性 miRNA 上调。本研究中 *miR-424* 受抑制后可导致其他内源性 miRNA 的反馈性上调, 如 *miR-15/16/103*, 其中 *miR-103* 上调最显著, 并通过预测软件以及实验证明 *miR-103* 可以靶向下调 *Rspo3* 基因的表达。途径二, *miR-424* 可损害泛素化以激活 *STAT3* 基因, *STAT3* 因子可通过刺激 β -Catenin 的表达影响 Wnt 信号通路^[11]。*Rspo3* 蛋白也可通过 β -Catenin 调控 Wnt 信号通路。当 *miR-424* 受抑制时不会激活 *STAT3* 基因的表达, 则 β -Catenin 反馈性上调, 因此 *Rspo3* 蛋白受到反馈性抑制。由此推测 *miR-424* 的变化可间接影响 *Rspo3* 蛋白的表达, 此方面还需进一步的研究证实。

综上所述, 本研究结果表明, *miR-424* 受抑制可阻滞结肠癌 Lovo 细胞的增殖, 并通过反馈性上调 *miR-103* 靶向下调 *Rspo3* 蛋白的表达。提示 *miR-424* 抑制剂可以作为 *Rspo3* 蛋白高表达性结肠癌的治疗用药, 为结肠癌的预防及治疗提供新的方向。

参考文献:

- [1] Velazquez KT, Enos RT, McClellan JL, et al. MicroRNA-155 deletion promotes tumorigenesis in the azoxymethane/dextran sulfate sodium model of colon cancer [J]. *Am J Physiol-Gastro*, 2016, 310(6):347-358.
- [2] Yu Y, Nangiamakker P, Farhana L, et al. MiR-21 and miR-145 cooperation in regulation of colon cancer stem

- cells[J]. Mol Cancer, 2015, 14(1):98–108.
- [3] Hao Y, Wei Z, Xiao S, et al. MicroRNA-424 inhibits Akt3/E2F3 axis and tumor growth in hepatocellular carcinoma[J]. Oncotarget, 2015, 6(29):27736–27750.
- [4] Dallavalle C, Albino D, Civenni G, et al. MicroRNA-424 impairs ubiquitination to activate STAT3 and promote prostate tumor progression[J]. J Clin Invest, 2016, 126(12):4585–4602.
- [5] Gong X, Yi J, Carmon K S, et al. Aberrant RSP03-LGR4 signaling in Keap1-deficient lung adenocarcinomas promotes tumor aggressiveness [J]. Oncogene, 2015, 34(36):4692–4701.
- [6] Hilkens J, Timmer NC, Boer M, et al. RSP03 expands intestinal stem cell and niche compartments and drives tumorigenesis[J]. Gut, 2017, 66(6):1095–1105.
- [7] Lili Y, Jun D, Fan L, et al. The expression and function of miR-424 in infantile skin hemangioma and its mechanism [J]. Sci Rep, 2017, 7:11846–11860.
- [8] Hao HX, Jiang X, Feng C. Control of Wnt receptor turnover by R-spondin-ZNRF3/RNF43 signaling module and its dysregulation in cancer[J]. Cancers, 2016, 8(6):54–66.
- [9] Han T, Schatoff E M, Murphy C, et al. R-spondin chromosome rearrangements drive Wnt-dependent tumour initiation and maintenance in the intestine[J]. Nature Commun, 2017, 8:15945–15957.
- [10] Khan AA, Betel D, Miller ML, et al. Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs[J]. Nat Biotechnol, 2009, 27(6):549–555.
- [11] Ibrahim S, Ghamdi S, Baloch K, et al. STAT3 paradoxically stimulates β -catenin expression but inhibits β -catenin function[J]. Inter J Exp Pathol, 2014, 95(6):392–400.

凡临床试验都应在中国临床试验注册中心注册

全球临床试验注册制度由世界各国政府共同决定由 WHO 领导建立。临床试验注册具有伦理和科学的双重意义,目的是为了尊重和珍惜所有试验参与者的贡献,他们的贡献用于改善全社会的医疗保健,因此,任何临床试验都与公众利益相关。公开临床试验的信息,并将其置于公众监督之下是试验研究者的义务和道德责任。临床试验注册不仅能确保追溯每个临床试验的结果,公开在研试验或试验结果信息还有助于减少不必要的重复研究。

中国临床试验注册中心(Chinese Clinical Trial Register, ChiCTR)为国家卫生计生委(原卫生部)下属的国家临床试验注册中心,是世界卫生组织国际临床试验注册协作网一级注册机构(World Health Organization International Clinical Trial Registration Platform Primary Register, WHO ICTRP Primary Register),由中国循证医学中心和四川大学华西医院等于 2005 年 7 月 25 日正式成立并运行。

ChiCTR 的宗旨是联合中国和全球的临床医师、临床流行病学家、统计学家、流行病学家和医疗卫生管理者,严格科学地管理中国临床试验信息,提高其质量,为广大医务工作者、医疗卫生服务消费者和政府卫生政策制定者提供可靠的临床证据,让医疗卫生资源更好地服务于中国人民和全人类的健康事业。

所有在人体实施的试验均属于临床试验,都应该先注册后实施。凡已注册临床试验都会被授予 WHO ICTRP 全球统一的唯一注册号。

我国众多医学期刊已和中国临床试验注册中心共同建立了临床试验报告发表机制,正在分步实施优先发表、直到只发表具有全球性唯一的注册号的临床试验报告。

ChiCTR 接受中国地区及全球的临床试验注册申请,还接受获得 WHO ICTRP 认证的二级注册机构输送的注册资料,并向 WHO ICTRP 中央数据库输送注册信息供全球检索。除注册临床试验外,ChiCTR 以中国循证医学中心、循证医学教育部网上合作研究中心、中国 Cochrane 中心、英国 Cochrane 中心、四川大学华西医院国际临床流行病学网华西资源与培训中心为人才和技术支持平台,负责指导临床试验设计、中心随机、论文写作、教育培训,推动提高我国临床试验的质量。

通过 ChiCTR 检索入口网址 www.chictr.org,公众可方便地查询已注册临床试验信息,并与 WHO 全球检索入口链接,可方便地查询全球已注册临床试验。