

微小 RNA-143 在结直肠癌组织中的表达及其对结肠癌细胞凋亡的影响

陈洪亮, 陈志良, 应晓江

(绍兴市人民医院, 浙江 绍兴 312000)

摘要: [目的] 探讨微小 RNA-143(miR-143)在结直肠癌组织中的表达及临床意义, 以及上调 miR-143 对于结直肠癌细胞凋亡的影响。[方法] 采用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative reverse transcription-PCR, real-time PCR)的方法在 45 例结直肠癌患者组织标本中检测 miR-143 的表达水平, 结合病理资料分析其临床意义。HCT-116 细胞转染 miR-143 mimics 后, 用流式细胞术检测 miR-143 对凋亡的影响。[结果] miR-143 在结肠癌组织中的相对表达量为 0.48(0.24~0.91), 在癌旁组织中的表达量为 1.64(0.83~1.87), 差异有统计学意义($P<0.001$), 且在黏液瘤患者中下调更明显($P<0.05$)。流式细胞术检测发现, 与对照组的细胞凋亡率($20.00\%\pm 2.00\%$)相比, 实验组的细胞凋亡率升高至 $31.83\%\pm 2.02\%$, 差异有统计学意义($P=0.002$)。[结论] miR-143 在结直肠癌组织中低表达, 并且与组织学类型有关; miR-143 表达上调可促进 HCT-116 细胞凋亡; miR-143 具有潜在抑癌作用。

关键词: 结直肠肿瘤; miR-143; 细胞凋亡

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2015)-09-0748-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.09.B010

Expression of MiR-143 in Colorectal Cancer and Its Role in Cell Apoptosis of Colonic Cancer Cell Lines

CHEN Hong-liang, CHEN Zhi-liang, YING Xiaojiang

(People's Hospital of Shaoxing, Shaoxing 312000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of miRNA-143(miR-143) in colorectal cancer and its significance, and to study the effect of up-regulation of miR-143 on cell apoptosis of colonic cancer cell lines. [Methods] Real-time quantitative reverse transcription-PCR assay was applied to detect the expression level of miR-143 in 45 samples of colorectal cancer tissues. Correlation between miRNA expression levels and clinical characteristics of the patients were also analyzed. HCT-116 cells were transfected with miR-143 mimics, and the cell apoptosis levels were detected by flow cytometry. [Results] The relative expression level of miR-143 in colorectal cancer tissues was 0.48 (0.24~0.91), which was significantly different compared with that in cancer adjacent tissues [1.64 (0.83~1.87), $P<0.001$]. The expression level of miR-143 was significantly lower in mucinous carcinoma compared with that in adenocarcinoma ($P<0.05$). The result of flow cytometry assay suggested that the ratio of apoptotic cells was ($31.83\%\pm 2.02\%$) in HCT-116 cells with overexpression of miR-143 (experimental group), which was significantly higher compared with that in control group [$20.00\%\pm 2.00\%$], $P=0.002$. [Conclusion] The expression level of miR-143 is low in colorectal cancer tissue, and is related to the histologic type. Moreover, up-regulation of miR-143 might promote the cell apoptosis of HCT-116 cells, which suggest miR-143 has a potential role on inhibition of tumor.

Subject words: colorectal neoplasms; miR-143; cell apoptosis

微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类长度为 19~25 个核苷酸的非编码单链 RNA, 广泛存在于真核细胞生物中, 可通过与靶基因 mRNA 的 3' 非编码区的

局部互补位点进行碱基配对, 在转录后水平发挥负性调控基因表达的重要作用^[2]。miRNA 调节超过 30% 的人类编码蛋白质的基因的表达, 在发育、分化、细胞增殖、凋亡及应激反应等过程中发挥重要作用^[3]。因此, miRNA 在肿瘤的发生、发展中所扮演的角色也受到越来越多研究者的关注, 而细胞凋亡过

通讯作者: 陈洪亮, 副主任医师, 学士; 浙江省绍兴市人民医院肛肠外科, 浙江省绍兴市中兴北路 686 号(312000); E-mail: sxsmyychl@163.com

收稿日期: 2014-12-10; **修回日期:** 2015-01-27

程的紊乱可能与许多疾病的发生有直接或间接的关系。本研究旨在探讨 miR-143 在结直肠癌组织中的表达水平,以及 miR-143 表达异常对结肠癌细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

收集 2012 年 6 月至 2013 年 12 月在绍兴市人民医院进行结直肠癌手术的组织标本 45 例。每例标本都包括结直肠原发肿瘤组织,以及上下切缘正常黏膜且术后病理证实无癌组织侵犯的癌旁组织。新鲜标本离体后迅速置于液氮中保存。这 45 例患者在术前都未接受任何的化疗和放疗。结肠癌细胞株 HCT-116 由中国科学院上海生命科学院细胞库提供。用于 HCT-116 细胞培养的 McCoy's 5A 培养液、胎牛血清(FBS)和青霉素、链霉素双抗均购于美国 Gibco 公司。Annexin V-FITC 试剂盒购自深圳欣博盛生物科技有限公司。miRNA mimic、negative control 试剂盒以及用于转染 mimics 的 ribo FECT™ CP Transfection kit 转染试剂盒购自广州锐博生物科技有限公司。用于提取组织和细胞总 RNA 的 Trizol 试剂、miRNA 逆转录试剂盒和 TaqMan miRNA assay (包括内参 U6 和 miR-143) 试剂盒都购自美国 Life Technology 公司。

1.2 方法

1.2.1 组织标本及结肠癌细胞总 RNA 的提取

取适量组织或细胞标本,加入 1ml Trizol 制成匀浆,室温静止放置 5min;加入 0.2ml 的氯仿,上下充分振荡,混匀后静置 5min;4℃ 15 000r/min 离心 15 min,吸取上层无色液相至另一管中,加入 0.5 ml 异丙醇,室温下放置 15 min;4℃ 15 000r/min 离心 15min,可见 RNA 沉淀在管底部或侧壁。后弃去上清液,加 75%的乙醇 1ml 混匀,4℃ 7500r/min 离心 5 min,弃上清液,静置 15min 后用无 RNA 酶水充分溶解,混匀,采用 Nanodrop 仪器检测 RNA 浓度及 A_{260}/A_{280} 的数值。

1.2.2 miRNA 表达水平检测

采用 qRT-PCR 的方法检测患者癌组织及癌旁组织 miR-143 的表达,按照 miRNA 逆转录试剂盒和 TaqMan miRNA assay 检测试剂盒说明书操作。取

10ng 左右总 RNA 反转录成 cDNA,再以稀释 5 倍的 cDNA 为模板,qPCR 扩增 miRNA 及 U6 的基因片段。反转录选用 5μl 反应体系:总 RNA 模板 10ng (1.67μl)、100mmol/L dNTPs 0.05μl、逆转录酶(50U/μl) 0.33μl、10×逆转录 buffer 0.5μl、RNA 酶抑制剂 0.063μl、5×逆转录引物 1μl 和无 RNA 酶水 1.387μl。反应条件为:16℃ 30min、42℃ 30min、85℃ 5min。qRT-PCR 选用 10μl 反应体系:TaqMan Universal PCR MasterMix 5μl、20×TaqMan miRNA probe 0.5μl、逆转录产物 4.5μl。反应在 7500 Real Time PCR System(Applied Biosystems 公司)实时荧光定量 PCR 仪上进行,反应条件为:95℃预变性 10min,然后按 95℃×15s,60℃×1min 进行 40 个循环。每个样本做 3 个复孔,取其平均值作为 miRNA 的表达量。miRNA 的相对表达量用 $-\Delta Ct$ 表示,其中 $\Delta Ct = Ct_{miR-143} - Ct_{U6}$ 。

1.2.3 细胞培养

HCT-116 细胞使用 McCoy's 5A 培养液进行培养,加入 10%的 FBS 及 1×PEST,在 37℃、CO₂ 体积分数为 5%的水饱和湿度条件下培养。每 1~2d 换液传代 1 次。当细胞生长至 $10^6 \sim 10^7$ 时收集细胞,备用提取 RNA。

1.2.4 细胞转染

转染前 1d,将适量(约 $4 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$)细胞接种在 24 孔细胞培养板上,每孔加入完全培养基(包括培养液、FBS 和双抗)465.75 μl。密切观察细胞生长情况,当细胞密度达到 30%~50%时,开始进行实验组(miRNA mimics)和对照组(negative control,NC)的转染。首先用 30μl 的 1×ribo FECT™ CP Buffer 稀释 1.25μl 的 20umol/L miRNA mimics (或 NC) 储存液,轻轻混匀;加入 3μl 的 ribo FECT™ CP Reagent,轻轻吹打混匀,室温孵育 15min;将以上约 34.25μl 的混合液加入到细胞培养基中,使细胞培养基终体积约为 500μl,而 miRNA mimics 或 NC 的终浓度为 50nmol/L,轻轻摇晃细胞培养板使其与培养液混匀。将细胞培养板置于 CO₂ 体积分数为 5%的培养箱中,在 37℃下继续培养 24h 后进行转染后细胞凋亡实验的检测。

1.2.5 细胞凋亡检测

取实验组及对照组细胞数量约为 10^6 ,用 4℃无菌 PBS 液洗涤细胞 2 次,用 250μl 结合缓冲液将细胞稀释为浓度 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ /ml 细胞悬浮液。取 195μl

细胞悬浮液加入 5μl FITC 标记的 Annexin-V ,混匀后静置 3min,然后加入 10μl 浓度为 20μg/ml 的 PI。混匀后室温避光温育 10min。加入 300μl 的结合缓冲液,混匀,立即进行流式细胞仪检测。实验重复 3 次,每次做 3 个复孔。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 11.0 软件对数据进行统计分析,数据用中位数(四分位数间距) 或平均值±标准差表示,组间差异采用 Student’s t 检验,P<0.05 为差异有统计学意义(双侧检验)。

2 结 果

2.1 miR-143 在癌组织和癌旁组织中的表达水平

miR-143 在 45 例患者癌组织中的表达量为 0.48 (0.24~0.91), 在癌旁组织中的表达量为 1.64 (0.83~1.87),差异有统计学意义(P<0.001)(Figure 1)。

2.2 miR-143 相对表达量与各临床指标间的关系

miR-143 在黏液性癌中的表达量为 0.46±0.42, 低于在非黏液性癌中的表达量 0.77±0.56,差异具有统计学意义(P=0.041)。而癌组织中 miR-143 表达水平与患者的年龄、性别、肿瘤位置、浸润深度、分期和分化程度无相关关系,在各指标组间差异无统计学意义(P>0.05,Table 1)。

2.3 上调 miR-143 表达量对结肠癌细胞凋亡的影响

转染 mimics 进入 HCT-116 细胞后,与对照组相比,实验组 miR-143 表达量明显上调(P<0.001,Figure 2)。细胞转染 24h 后检测其细胞凋亡率,结果表明,实验组凋亡率为 31.83%±2.02%,高于对照组的凋亡率 (20.00%±2.00%), 差异有统计学意义 (P=0.002,Figure 3)。

3 讨 论

miRNA 可广泛调节基因的表达并参与调控许多生命过程, 近几年的研究表明,miRNA 可能通过类似癌基因、抑癌基因等方式调控肿瘤的发生和发展过程 [4],对细胞的增殖、凋亡和周期产生影响 [5]。本研究对 miR-143 在 45 例结直肠癌组织和癌旁组织中表达进行了检测, 结果表明 miR-143 在癌组织

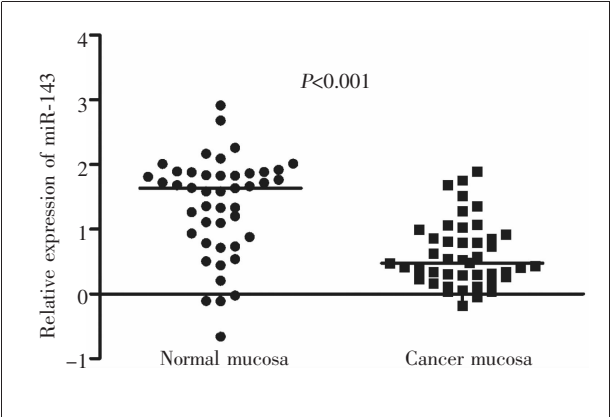


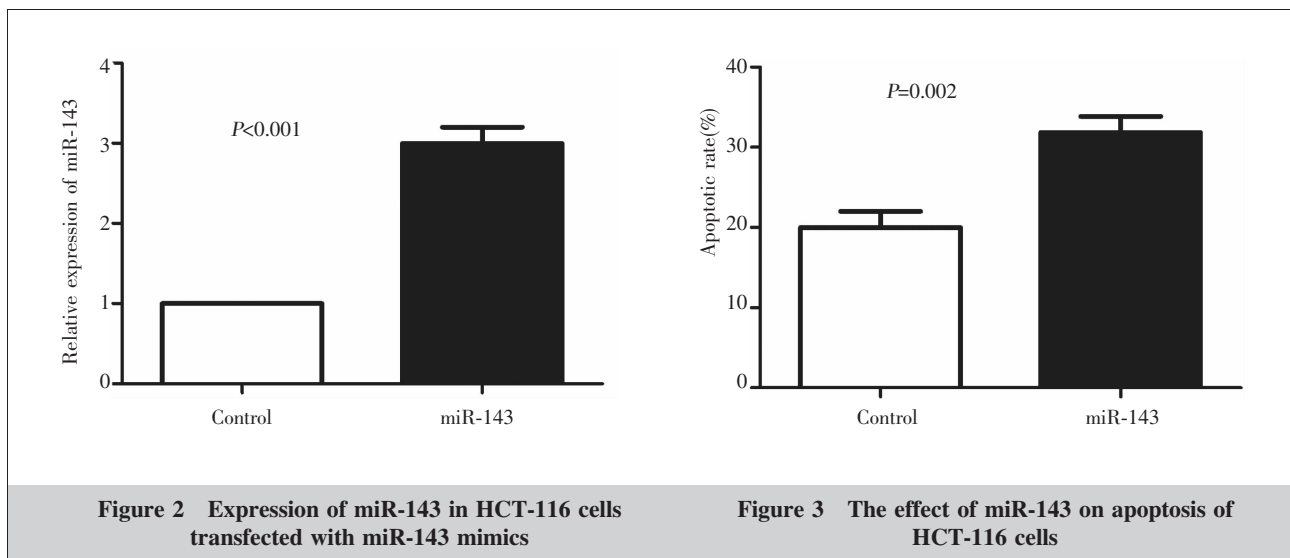
Figure 1 Expression level of miR-143 in normal mucosa and cancer mucosa

Table 1 The correlation of miR-143 expression with clinical characteristics of colorectal cancer

Variables	N	miR-143	t	P
Gender				
Male	26	0.51 ± 0.33	1.65	0.113
Female	19	0.78 ± 0.66		
Age(years old)				
<57	22	0.75 ± 0.55	1.91	0.063
≥57	23	0.46 ± 0.44		
Location				
Rectum	14	0.63 ± 0.54	-0.23	0.819
Colon	31	0.59 ± 0.50		
Invasive depth				
T ₁ +T ₂	25	0.66 ± 0.62	0.92	0.366
T ₃ +T ₄	20	0.53 ± 0.30		
TNM stage				
I + II	32	0.63 ± 0.56	0.55	0.588
III	13	0.54 ± 0.36		
Pathological type				
Mucinous carcinoma	23	0.46 ± 0.42	2.11	0.041
Adenocarcinoma	22	0.77 ± 0.56		
Differentiation				
Poor	20	1.08 ± 0.96	-1.09	0.353
Moderate+well	25	0.56 ± 0.43		

中的表达量显著低于癌旁组织, 且癌组织中 miR-143 表达量与结直肠癌的病理类型有关。另外,上调 miR-143 可使结肠癌细胞的凋亡水平显著增加。以上研究结果初步表明,miR-143 可能通过促进细胞凋亡从而发挥与抑癌基因功能相似的生物学作用。

人类 miR-143 基因位于第 5 号染色体上, 在肿瘤中,miR-143 基因所处位置为缺失高频区 [6],因此 miR-143 在肿瘤细胞或组织中常表现为低表达状



态,如 B 细胞恶性肿瘤^[7]和胃癌^[8]等。除此之外,Kulda 等^[9]采用 qRT-PCR 方法对 46 对结肠癌组织和癌旁组织的 miR-143 表达水平进行了检测,发现结肠癌组织中 miR-143 的表达水平也显著低于癌旁组织,且在结直肠癌肝转移的组织中的水平也显著低于正常组织^[9]。同样地,Wang 等^[10]在 98 对原发性结直肠癌的癌组织和癌旁正常黏膜组织中也检测了 miR-143,发现与癌旁正常组织相比,结肠癌组织中 miR-143 表达水平显著下降,而直肠癌组织和癌旁组织中 miR-143 表达水平无显著差异^[10]。本研究通过 qRT-PCR 方法检测 miR-143 在结直肠癌组织及正常黏膜组织中的表达,发现 miR-143 在结直肠癌组织中低表达,与上述研究结果一致。

黏液癌是组织学分型中的一个重要亚型。我国研究人员对 2079 例结直肠癌患者的临床资料及预后生存期进行回顾性研究,发现黏液癌患者的预后与其他亚型结直肠癌患者相比更差^[11]。本实验通过分析临床病理资料发现,miR-143 的相对表达量在黏液癌中又显著低于其他类型的结直肠癌,提示 miR-143 可能对判断结直肠癌的恶性程度及预后有一定的意义。一项研究表明,结肠癌细胞 miR-143 能调节结肠癌转移相关基因 *MACC1* 和致癌基因 *K-ras* 的表达,有望成为结直肠癌预后标志物^[12]。资料显示,国内年龄<39 岁恶性肿瘤发病率处于较低水平,>40 岁后发病率快速升高,80 岁以后达到高峰^[13]。Chang 等^[14]通过对 1988~2007 年 124 314 例在台湾癌症登记的结直肠癌患者进行流行病学统计分

析时发现,高年龄组结直肠癌患者的比例增加。本研究分析发现,miR-143 在老龄患者中的表达量较低(P 值为临界值 0.063),可能与随年龄增长结直肠癌发病率逐步增高相关。

miR-143 具有与抑癌因子相似的生物学功能,已被越来越多研究证明。Liu 等^[15]对转染了 miR-143 表达载体的结肠腺癌细胞系 SW480 进行研究发现,miR-143 可抑制细胞增殖,并下调 *K-ras* 蛋白水平。在神经胶质瘤细胞中,miR-143 可下调 *N-ras* 表达,抑制 PI3K/AKT 和 MAPK/ERK 信号通路,减少神经胶质瘤细胞的迁移和浸润,减缓肿瘤生长速度和血管生成,从而达到抑制神经胶质瘤的作用^[16]。除此之外,miRNA 还可通过影响细胞凋亡从而参与癌症的发生发展过程^[17]。例如,在肺癌细胞中,miR-143 可通过调节蛋白激酶 C 的表达从而影响肺癌细胞的增殖和凋亡^[18]。在去分化的脂肪肉瘤细胞中,高表达 miR-143 能抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,并下调一系列与细胞增殖与凋亡有关的基因的表达^[19]。然而,miR-143 与细胞凋亡之间的关系在结直肠癌中的报道较少。本研究发现 HCT-116 细胞中,实验组 miR-143 表达量高于对照组,且上调 miR-143 表达量可提高 HCT-116 细胞的凋亡率,发挥抑癌作用。

综上所述,miR-143 可通过促进凋亡发挥抑癌作用,但具体信号通路有待进一步的研究。miR-143 有望作为一个新的结直肠癌生物学标志物或基因治疗的新的药物靶点,而其下游靶基因还有待后续研究证明。

参考文献:

- [1] Ferrari P, Jenab M, Norat T, et al. Lifetime and baseline alcohol intake and risk of colon and rectal cancers in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC)[J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(9): 2065–2072.
- [2] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. *Nature*, 2004, 431(7006): 350–355.
- [3] Harfe BD. MicroRNAs in vertebrate development [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2005, 15(4): 410–415.
- [4] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281–297.
- [5] Liu W, Mao SY, Zhu WY. Impact of tiny miRNAs on cancers[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(4): 497–502.
- [6] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(9): 2999–3004.
- [7] Akao Y, Nakagawa Y, Kitade Y, et al. Downregulation of microRNAs-143 and -145 in B-cell malignancies[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(12): 1914–1920.
- [8] Takagi T, Iio A, Nakagawa Y, et al. Decreased expression of microRNA-143 and -145 in human gastric cancers[J]. *Oncology*, 2009, 77(1): 12–21.
- [9] Kulda V, Pesta M, Topolcan O, et al. Relevance of miR-21 and miR-143 expression in tissue samples of colorectal carcinoma and its liver metastases[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2010, 200(2): 154–160.
- [10] Wang CJ, Zhou ZG, Wang L, et al. Clinicopathological significance of microRNA-31, -143 and -145 expression in colorectal cancer[J]. *Dis Markers*, 2009, 26(1): 27–34.
- [11] Song W, Wu SJ, He YL, et al. Clinicopathologic features and survival of patients with colorectal mucinous, signet-ring cell or non-mucinous adenocarcinoma: experience at an institution in southern China [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2009, 122(13): 1486–1491.
- [12] Tokarz P, Blasiak J. The role of microRNA in metastatic colorectal cancer and its significance in cancer prognosis and treatment[J]. *Acta Biochim Pol*, 2012, 59(4): 467–474.
- [13] Chen WQ, Zhang SW, Zheng RS, et al. Report of cancer incidence and mortality in China, 2009[J]. *China Cancer*, 2013, 22(1): 2–12. [陈万青, 张思维, 郑荣寿, 等. 中国 2009 年恶性肿瘤发病和死亡分析 [J]. *中国肿瘤*, 2013, 22(1): 2–12.]
- [14] Chang HC, Horng JT, Lin WC, et al. Evaluation of the appropriate age range of colorectal cancer screening based on the changing epidemiology in the past 20 years in taiwan[J]. *ISRN Gastroenterol*, 2012, 2012: 960867.
- [15] Liu H, Zhang SZ, Cai SR, et al. Effect of microRNA143 expression on cell proliferation in colonic carcinoma[J]. *Chinese Journal of Oncology*, 2008, 30(7): 498–501. [刘宏, 张苏展, 蔡善荣, 等. MicroRNA143 表达对结肠癌组织中细胞增殖的影响及其作用机制 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2008, 30(7): 498–501.]
- [16] Wang L, Shi ZM, Jiang CF, et al. MiR-143 acts as a tumor suppressor by targeting N-RAS and enhances temozolomide-induced apoptosis in glioma [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(14): 5416–5427.
- [17] Wang Y, Lee CG. MicroRNA and cancer—focus on apoptosis[J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(1): 12–23.
- [18] Zhang N, Su Y, Xu L. Targeting PKCepsilon by miR-143 regulates cell apoptosis in lung cancer [J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(22): 3661–3667.
- [19] Ugras S, Brill E, Jacobsen A, et al. Small RNA sequencing and functional characterization reveals MicroRNA-143 tumor suppressor activity in liposarcoma [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(17): 5659–5669.

郑重声明

本刊作者谨防商务网站虚假征稿

《肿瘤学杂志》官网网址为: <http://www.chinaoncology.cn> 请作者直接点击进入网页, 注册并登录采编系统进行投稿。如有疑问请致电 0571-88122280, 88122281, 13758247950, 13757142507 查询。本刊邮箱为 zlxzz04@126.com 不再接受邮件投稿, 所有稿件均通过采编系统管理, 作者可通过采编系统查阅稿件审理进展。通过百度、谷歌等搜索后出现的注有《肿瘤学杂志》字样的代理征稿等相关信息, 本刊均未同其签订过委托、授权或合作协议, 敬请作者谨防上当!