

miR-519b-3p 表达与局部晚期直肠癌患者术前放化疗应答的相关性及机制研究

罗加林, 刘鲁迎, 沈金闻, 张娜, 孙权权, 刘鹏, 卢珂, 朱远

(中国科学院肿瘤与基础医学研究所, 中国科学院大学附属肿瘤医院, 浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022)

摘要: [目的] 研究 miR-519b-3p 表达与局部晚期直肠癌术前放化疗应答的相关性, 并探讨 miR-519b-3p 是否通过靶向作用 ARID4B 提高局部晚期直肠癌患者术前放化疗的反应性。[方法] 实时定量 PCR 检测局部晚期直肠癌患者 miR-519b-3p 的表达水平, 用 miR-519b-3p 模拟物或抑制剂转染 HCT116 或 SW480 细胞, 体外验证其表达水平与放化疗反应的相关性; 双荧光素酶报告实验用于检测 miR-519b-3p 与 ARID4B 之间的相互作用; 通过重组质粒构建及细胞转染调节相关基因在细胞内的表达, 通过建立裸鼠异位移植瘤模型, 在体验证 miR-519b-3p 对 ARID4B 的调节作用。[结果] 实验发现 miR-519b-3p 表达与局部晚期直肠癌患者对 pCRT 的反应性相关, miR-519b-3p 在局部晚期直肠癌患者中呈现为高表达。miR-519b-3p 的过表达增强了体外放化疗的反应性。在机理上, 我们发现 miR-519b-3p 直接与 ARID4B mRNA 的 3'UTR 结合, 其表达与 miR-519b-3p 表达呈负相关。功能实验显示 miR-519b-3p 以 ARID4B 依赖方式直接与直肠癌患者对术前放化疗的反应密切相关。[结论] miR-519b-3p 通过靶向作用 ARID4B 提高局部晚期直肠癌患者术前放化疗的反应性。

关键词: 局部晚期直肠癌; 术前同步放化疗; miR-519b-3p; ARID4B

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)07-0627-07

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.07.B008

Relationship Between Expression of MicroRNA-519b-3p and Preoperative Response to Chemoradiotherapy in Patients with Locally Advanced Rectal Cancer and Its Mechanism

LUO Jia-lin, LIU Lu-ying, SHEN Jin-wen, ZHANG Na, SUN Quan-quan, LIU Peng, LU Ke, ZHU Yuan

(Institute of Cancer Research and Basic Medical Sciences of Chinese Academy of Sciences, Cancer Hospital of University of Chinese Academy of Sciences, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China)

Abstract: [Purpose] To study the correlation between the expression of microRNA-519b-3p and preoperative response to chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer, and to explore whether microRNA-519b-3p can improve preoperative response to chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer patients by targeting ARID4B. [Methods] Real-time quantitative PCR was used to detect the expression of microRNA-519b-3p in patients with locally advanced rectal cancer. HCT116 or SW480 cells were transfected with mimic or inhibitor of microRNA-519b-3p. The correlation between the expression level and the response chemoradiotherapy was verified in vitro. Dual luciferase reporter assay was used to detect the interaction between microRNA-519b-3p and ARID4B. The related genes were regulated by recombinant plasmid and cell transfection. In vivo, the regulatory effect of microRNA-519b-3p on ARID4B was validated by establishing heterotopic xenograft tumor model in nude mice. [Results] It was found that the expression of microRNA-519b-3p was correlated with the responsiveness of LARC patients to pCRT. The expression of microRNA-519b-3p was high in LARC responders. Overexpression of microRNA-519b-3p enhances the responsiveness of chemoradiotherapy in vitro. In terms of mechanism, we found that microRNA-519b-3p directly bound to the 3'UTR of ARID4B, whose expression was negatively correlated with the expression of microRNA-519b-3p. Finally, functional experiments showed that miR-519b-3p was directly related to the response of rectal cancer patients to pCRT in an ARID4B-dependent manner. [Conclusion] Mir-519b-3p improves preoperative response to chemoradiotherapy in patients with locally advanced rectal cancer by targeting ARID4B.

Subject words: Locally advanced rectal cancer; preoperative concurrent chemoradiotherapy; miR-519b-3p; ARID4B

结肠直肠癌是常见的恶性肿瘤, 是第三大癌症

相关死亡原因^[1]。近一半直肠癌在诊断时就是局部晚期直肠癌 (locally advanced rectal cancer, LARC)^[2]。LARC 的主要疗法是根治性手术。在过去的几十年中, 许多治疗手段使得 LARC 局部复发率和生存率

通信作者: 朱远, 主任医师, 本科; 浙江省肿瘤医院腹部放疗科, 浙江省杭州市拱墅区半山山东路 1 号 (310022); E-mail: zhuyuan@zjcc.org.cn

收稿日期: 2019-03-31; **修回日期:** 2019-06-05

降低^[3]。越来越多证据表明,术前放化疗(preoperative chemoradiotherapy, pCRT)是 LARC 的有效治疗方法,可减小肿瘤并增加根治性手术实施的可能性,但仍然有大约 40% LARC 患者在 pCRT 后疗效差^[4]。因此,迫切需要寻找 pCRT 疗效的新型预测生物标志物。

微小 RNA (miRNA) 是非编码 RNA (ncRNA) 的亚群,其不具有编码能力,但具有各种生物学功能^[5]。微小 RNA 是 19~25 个核苷酸,并通过 3'-UTR-miRNA 靶标的转录后调节发挥功能^[6]。越来越多证据表明,miRNA 在各种生物过程中发挥着重要作用,特别是在人体癌症中^[7]。microRNA-16-5p 过表达通过靶向作用乳腺癌中的 VEGFA 来抑制细胞增殖和侵袭,以及引发细胞凋亡^[8]。miRNA 表达失调也与结直肠癌相关^[9]。近年来研究发现一些 miRNA 与术前放化疗肿瘤反应密切相关,并且可作为生物标志物^[10-11]。为了确定结直肠癌患者对术前放化疗反应的新型有效生物标志物,我们分析了在线数据集 (GSE98959),并将 miR-519b-3p 作为预测性标志物,拟通过一系列实验研究明确 miR-519b-3p 表达与局部晚期直肠癌术前放化疗应答的相关性及其相关机制。

1 资料与方法

1.1 临床标本

本研究纳入术前放化疗原发性直肠癌,随后在浙江省肿瘤医院接受了手术患者 55 例。55 例 LARC 患者的临床和病理特征如下:中位年龄 56 岁 (41~76 岁),男性 31 例,女性 24 例,Ⅱ期 4 例,Ⅲ/Ⅳ期 51 例,CEA $\geq$ 5ng/ml 12 例,CEA<5ng/ml 43 例,肿瘤退缩分级 1 级 11 例,2 级 8 例,3 级 22 例,4 级 10 例,5 级 4 例,术后化疗方案:卡培他滨 29 例,卡培他滨+奥沙利铂 14 例,5-Fu 5 例,5-Fu+奥沙利铂 7 例。本研究经浙江省肿瘤医院伦理委员会批准。

1.2 RNA 干扰

原发癌组织在切取后立即在液氮中快速冷冻,然后储存在-80℃下,接着进行 RNA 提取。

MiR-519b-3p 模拟物或抑制剂以及阴性对照物购自 RiboBio 公司 (中国广州)。根据厂商说明用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 转染细胞。

1.3 推定 MiR-519b-3p 靶基因

最初使用 TargetScan 软件 (www.targetscan.org) 搜索推定的 MiR-519b-3p 靶基因。我们只考虑了保守靶基因中的保守位点,使用 GraphPad Prism 软件 (版本 4.03) 搜索与 miR-519b-3p 表达量成反比关系的靶基因的表达 (Pearson 相关性)。

1.4 克隆实验

结肠直肠肿瘤细胞系 HCT116 和 SW480 获自美国典型培养物中心 (ATCC),并按照其推荐方案进行培养。将细胞以低密度 (每孔 500 个细胞) 铺板于 4 孔板中 (1.9cm² 孔区域),并用 Lipofectamine RNAiMAX 转染试剂 (Invitrogen) 进行转染。用 miR-519b-3p 模拟物或抑制剂 (Life Technologies) 瞬时转染 HCT116 和 SW480 细胞。转染后 24h,用 5 μ M 氟尿嘧啶 (5-Fu, Libbs) 处理细胞,并使用 GammaCell 3000 设备 (Elan) 用 1Gy 剂量的 HCT116 和 2Gy 剂量的 SW480 进行照射。12d 后定量分析集落形成。将细胞用甲醛固定,用结晶紫染色并风干。对于菌落定量分析,用 10% 乙酸溶解染色剂,并使用 Infinite 200 PRO (Tecan Group Ltd) 在 595nm 处测量吸光度。

1.5 细胞增殖实验

通过细胞计数试剂盒检测细胞增殖情况。细胞在 96 孔板中生长,每孔 1×10^4 ,并在 37℃ 5% CO₂ 环境下孵育至细胞比率达到 70%。转染 24h 后,处理细胞并孵育 48h。将 10 μ l CCK8 溶液接种到每个孔中。用 Sunrise Microplate Reader (Tecan, Switzerland) 测量 450nm 处的吸光度。

1.6 细胞凋亡检测

在膜联蛋白 V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (KeyGEN, 南京) 的 FACS Aria 流式细胞仪 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) 上,通过流式细胞技术分析细胞凋亡。

1.7 逆转录和实时 PCR

使用 mirVana miRNA 分离试剂盒分离总 RNA,包括小 RNA。使用 TaqMan MicroRNA 试剂盒,根据厂商说明进行 miRNA 的定量分析,并使用 U6 小核 RNA 作为内部对照。在 CFX96 仪器上进行实时 PCR 分析和数据收集。

1.8 体内实验

将 4 周龄的无胸腺 BALB/c 裸鼠饲养在特定的无病原体条件下。按照批准的方案对小鼠开展实验。收集处理过的细胞,并用 PBS 洗涤。然后将 1×10^7 个

细胞皮下注射到每只小鼠的腹侧，进行肿瘤形成测定。每 7d 检查肿瘤体积。

1.9 荧光素酶分析

将含有推定的 miR-519b-3p 结合位点的 ARID4B 3' UTR 序列克隆并插入 pmirGLO 载体 (Promega, Madison, WI, USA)。将细胞接种在 96 孔板中，并用重组质粒或空 pmirGLO 载体和 miR-519b-3p 模拟物、抑制剂或阴性对照共转染。在转染后 24h 用双荧光素酶报告分析系统 (Promega) 测量荧光素酶活性。将荧光素酶活性相对于 Renilla 荧光素酶活性进行标准化。

1.10 统计学处理

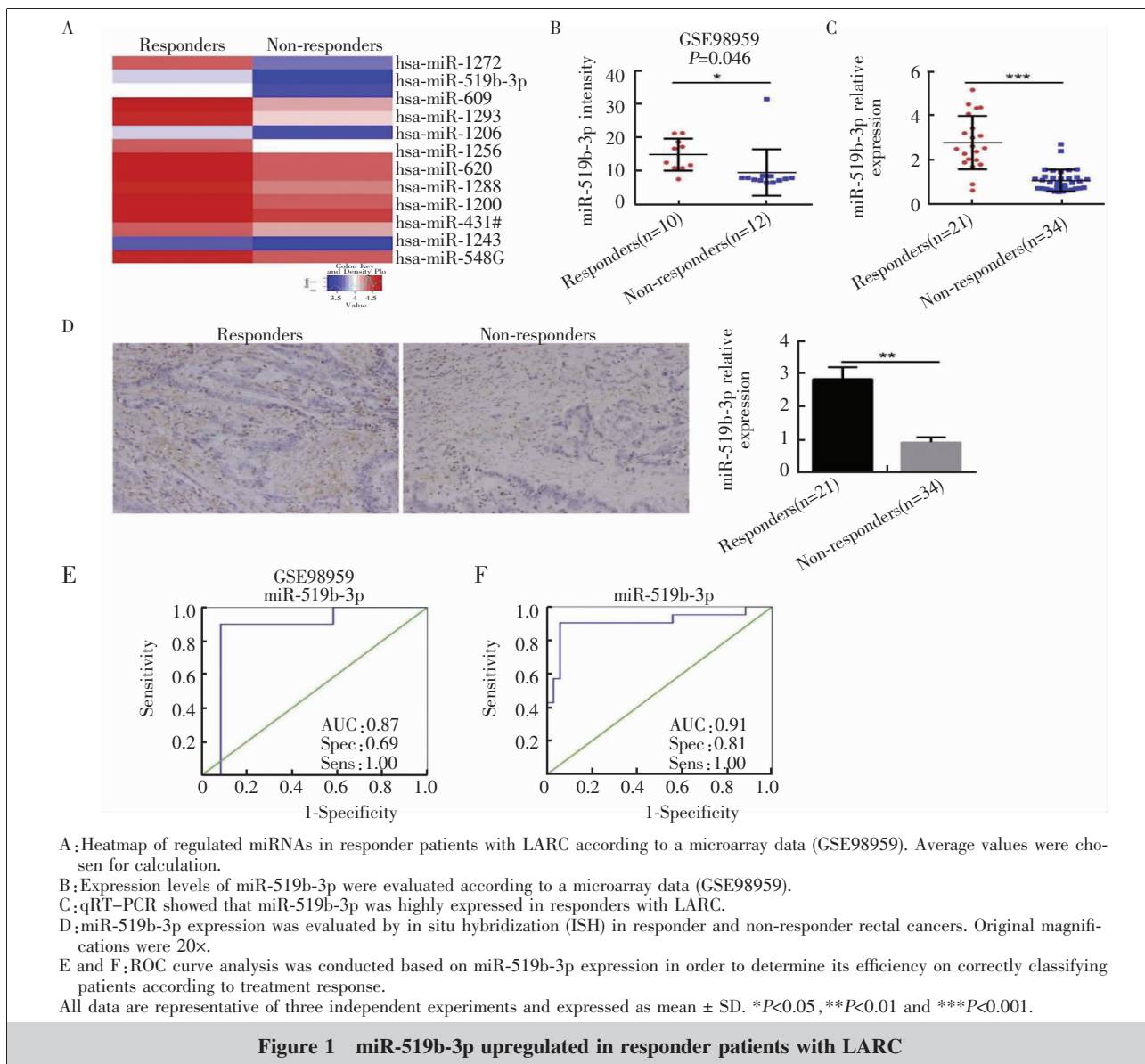
采用 SPSS 20.0 (IBM, SPSS, Chicago, IL, USA) 和

GraphPad Prism 软件开展统计学分析。 t 检验和单因素方差分析分别用于分析两组或多组分析。Pearson 相关性分析用于确定相关性。用 Kaplan-Meier 法计算总体生存曲线，并用对数秩检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-519b-3p 在 LARC 应答患者中显著性上调

我们分析了 22 例 LARC 患者组成的在线 miRNA 微阵列数据集 (GSE98959)。为了鉴定能够预测肿瘤对 pCRT 反应的分子标志物，我们对完全应答者和非应答者开展了 miRNA 表达分析，一些



miRNA 在应答者中高度表达 (Figure 1A)。其中, miR-519b-3p 是上调最显著的 miRNA ($P < 0.05$) (Figure 1B)。为了进一步验证该分子,我们分析了 55 例 LARC 患者的 miR-519b-3p 表达量。qRT-PCR 结果显示, miR-519b-3p 在应答患者 ($n=21$) 中表现出比非应答者 ($n=34$) 更高的表达水平 (Figure 1C)。原位杂交实验 (ISH) 结果显示, 应答者中 miR-519b-3p 的表达水平显著性高于非应答者组 (Figure 1D)。

根据数据集 (GSE98959) 测量了 miR-519b-3p 的 ROC 曲线下面积 (AUC) (Figure 1E)。miR-519b-3p 的 AUC 为 0.87。miR-519b-3p 敏感度和特异性分别为 100% 和 69%。此外,我们还基于 55 例 LARC 患者确定了 miR-519b-3p 的 AUC, 并获得了类似的结果 (Figure 1F)。miR-519b-3p 的 AUC、敏感度和特异性分别为 0.91、100% 和 81%。

2.2 干预 miR-519b-3p 表达改变体外放化疗反应性

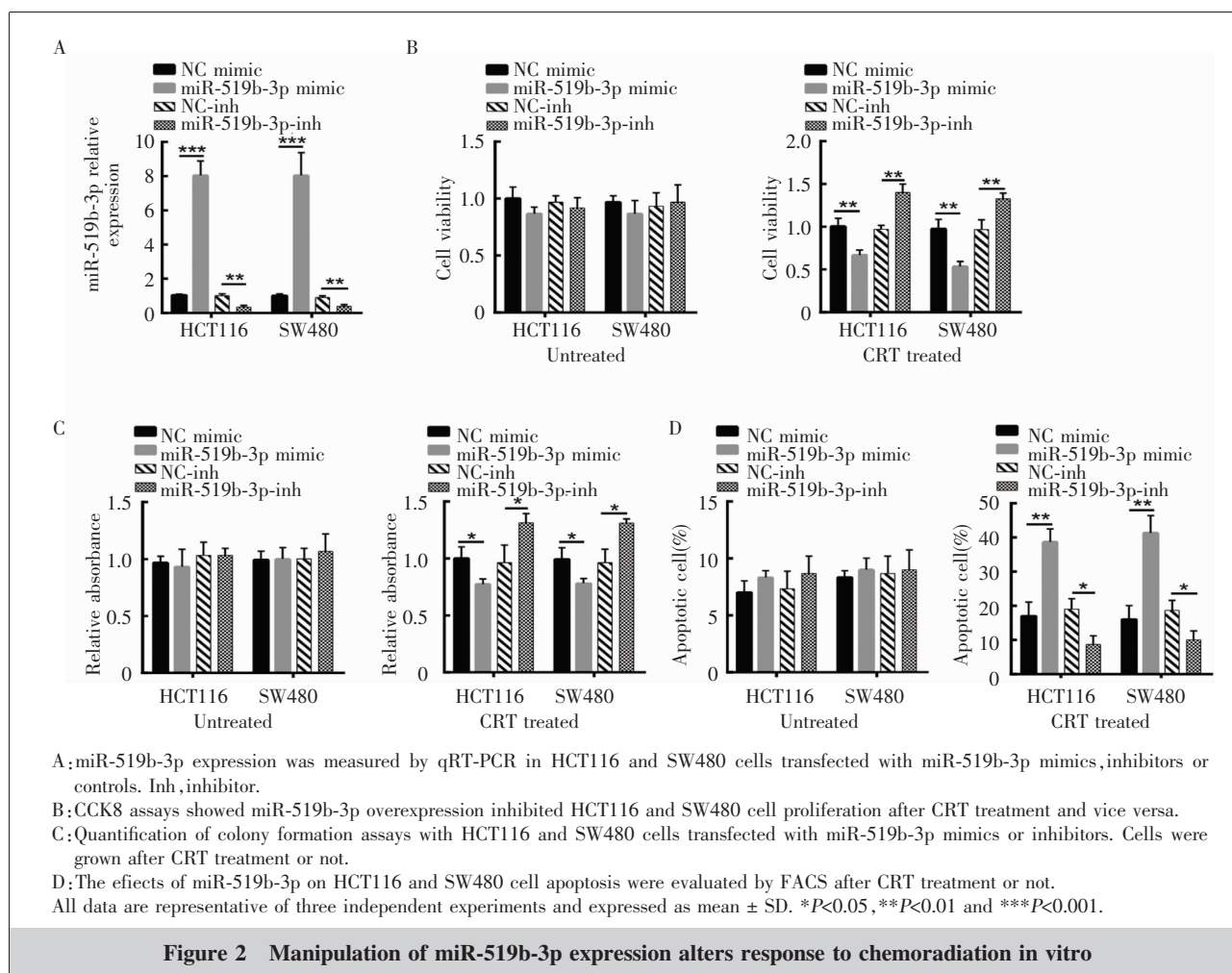
为了进一步探讨 miR-519b-3p 对直肠癌患者对

pCRT 的反应,我们在体外对 HCT116 和 SW480 细胞进行了类似的处理,用 miR-519b-3p 模拟物或抑制剂转染 HCT116 或 SW480 细胞。miR-519b-3p 被有效上调或下调 (Figure 2A)。

我们进行了 CCK8 和克隆形成实验以评估 miR-519b-3p 对放化疗的敏感性。用对照组细胞进行实验,或进行辐射/5-Fu 处理。CCK8 和克隆形成测定显示, miR-519b-3p 模拟物使得 HCT116 和 SW480 细胞对放化疗更敏感,而 miR-519b-3p 抑制剂会得到相反的结果 (Figure 2B 和 C)。此外,miR-519b-3p 模拟物在放化疗后会增加 HCT116 和 SW480 细胞凋亡,而 miR-519b-3p 抑制剂会减少细胞凋亡 (Figure 2D)。

2.3 ARID4B 是 miR-519b-3p 的直接靶标

为了搜索 miR-519b-3p 的靶基因,我们使用包括 TargetScan 和 miRanda 在内的在线工具进行生物信息学分析。ARID4B 是一种染色质重塑蛋白,引起



了我们的注意。我们在 ARID4B 的 3'UTR 中说明了预测的结合位点(Figure 3A)。为了验证它们的相互作用,我们进行了双荧光素酶报告基因活性测定。

miR-519b-3p 过表达显著性抑制用 3'UTR-WT 转染的 HCT116 和 SW480 细胞中的荧光素酶活性,反之亦然(Figure 3B)。然而,该结合位点的突变消除了这种趋势(Figure 3B)。鉴于 miRNA 对靶基因表达的负调控作用,我们分析了 miR-519b-3p 和 ARID4B 之间的表达关系,结果显示 miR-519b-3p 和 ARID4B 之间存在显著性负相关($r=-0.55, P<0.001$)(Figure 3C)。此外,HCT116 和 SW480 细胞中 miR-519b-3p 过表达显著性降低 ARID4B 表达,反之亦然(Figure 3D)。此外,我们分析了 55 例 LARC 患者中 ARID4B 的表达,发现与应答者相比,非应答者中 ARID4B 的表达水平显著性升高(Figure 3E)。

2.4 miR-519b-3p 通过体外和体内靶向作用 ARID4B 调节对放化疗的反应

为了进一步确定 miR-519b-3p 对 pCRT 反应的

调节是否依赖于 ARID4B,我们分析了用 miR-519b-3p 模拟物转染的 HCT116 和 SW480 细胞中的 ARID4B 表达。ARID4B mRNA 和蛋白水平恢复到对照组水平(Figure 4A,4B)。克隆形成测定和细胞凋亡分析显示,miR-519b-3p 模拟物使得 HCT116 和 SW480 细胞对放化疗更敏感,而异位表达同时使 ARID4B 的敏感性降低(Figure 4C,4D)。

此外,我们将处理过的细胞注射到裸鼠进行异种移植实验。5 周后测量肿瘤重量,结果显示 miR-519b-3p 模拟物会抑制体内肿瘤生长,而 ARID4B 表达水平的恢复逆转了这种效应(Figure 4E)。

3 讨论

最近证据表明,术前放化疗随后进行根治性手术是局部晚期直肠癌患者的有效治疗方法。然而,仍然有大约 40%LARC 患者在 pCRT 后显示出反应差或无反应^[4]。为了避免不必要的毒性和昂贵的放化

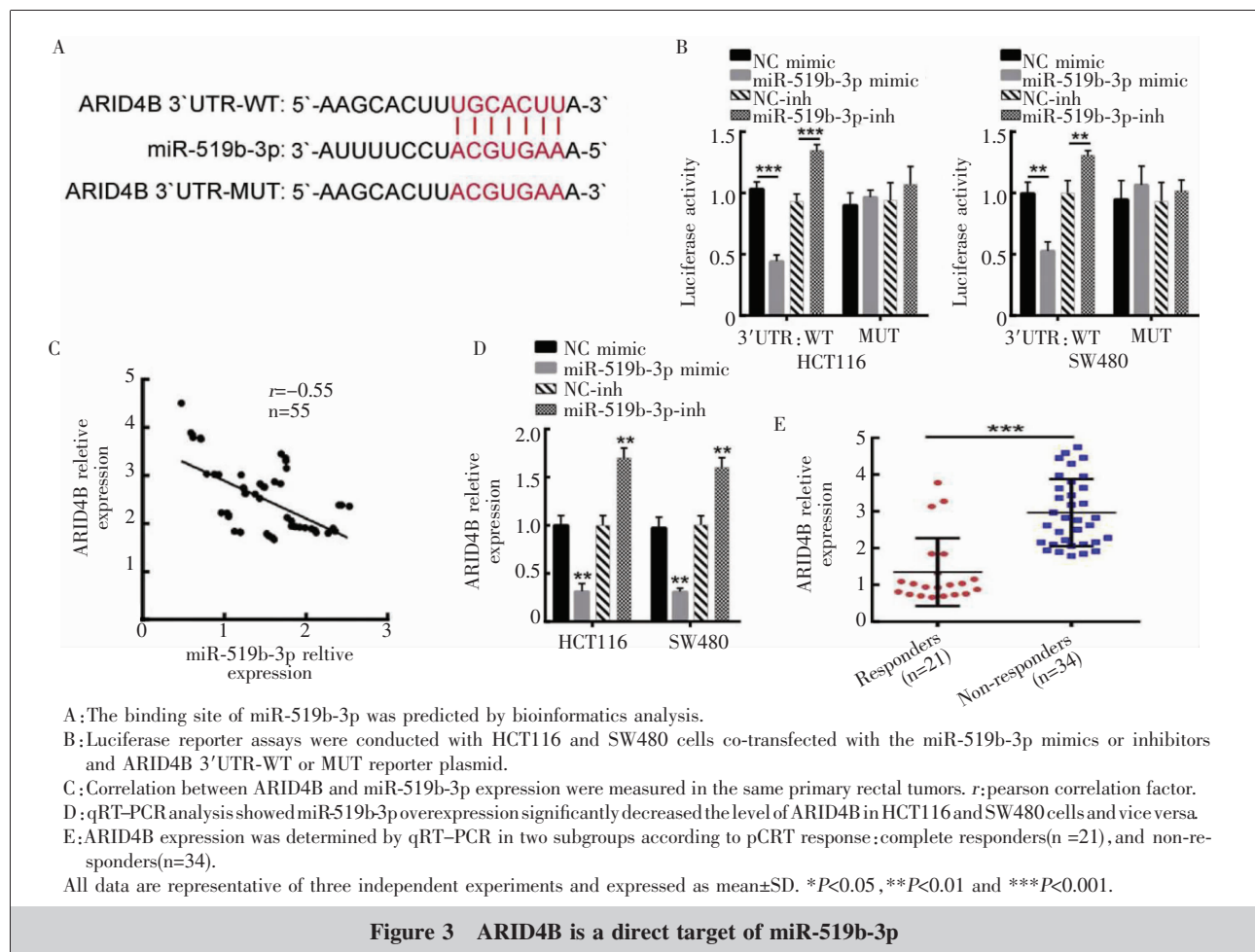
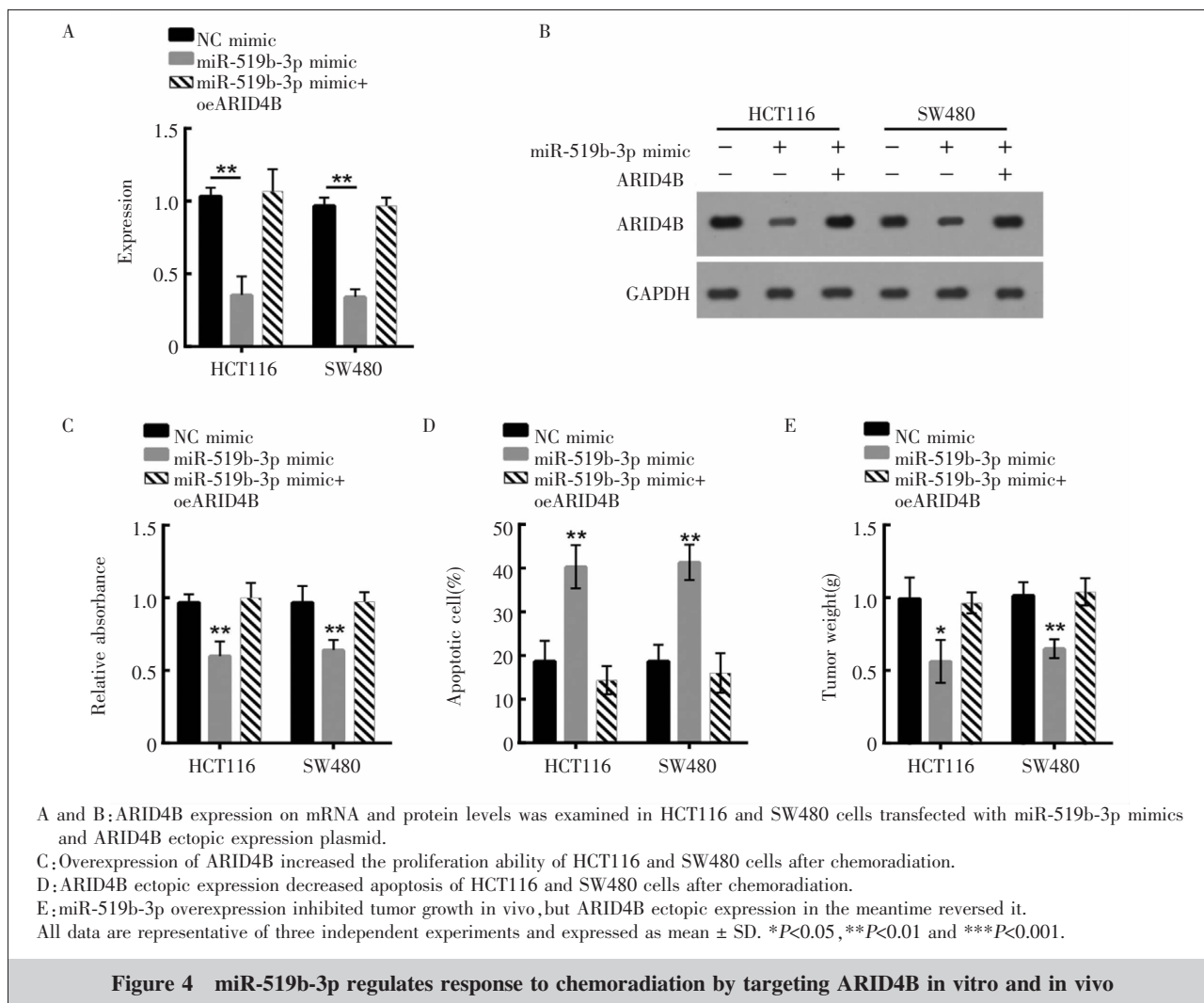


Figure 3 ARID4B is a direct target of miR-519b-3p



疗,直接进行手术,有必要提前确定无应答的 LARC 患者。因此,迫切需要鉴定能预测 pCRT 反应的生物标志物。

越来越多的证据表明,miRNA 可能作为直肠癌患者的预测性分子标志物^[12-13]。例如,miR-194 可以作为 LARC 患者对新辅助化放疗反应的预测性生物标志物^[14-16]。然而,没有证据表明存在适用于所有 LARC 患者的生物标志物。由于肿瘤样本的异质性,需要识别更多有效的生物标志物。根据微阵列数据集,我们确定 miR-519b-3p 在应答 LARC 患者中的表达水平显著性高于非应答者。为了进一步证实这一发现,我们分析了 55 例接受 pCR 治疗的 LARC 患者,通过 qRT-qPCR 和 ISH,我们仍然发现 miR-519b-3p 的表达水平在应答者中显著性上调。此外,为了探索 miR-519b-3p 表达是否可作为 LARC 患者

分类为应答者的预测性生物标志物,我们根据数据集(GSE98959)测量了 55 例患者的 miR-519b-3p 的 ROC 曲线下面积,两项结果均表明 miR-519b-3p 是一种良好的分子标志物。

到目前为止,miR-519b-3p 功能几乎未知。一项研究表明 microRNA-519b-3p 会抑制喉部鳞状细胞 Hep-2 细胞的生长^[17]。为了进一步确定 miR-519b-3p 是否真正促进对 pCRT 的反应敏感性,我们用 HCT116 和 SW480 细胞进行了体外实验。CCK8 和克隆形成测定均证明,miR-519b-3p 过表达增加了 HCT116 和 SW480 细胞对放化疗的敏感性。根据我们的数据,miR-519b-3p 是直肠癌的良好预测生物标志物;然而,miR-519b-3p 是否在其他癌症治疗中的抵抗性方面发挥关键作用,仍然是不明确的。

miRNA 在发挥功能期间,通常靶向作用 mRNA

的 3'UTR^[5,18]。为了探索 miR-519b-3p 对 pCRT 反应调节的分子机制, 我们利用生物信息学分析发现 ARID4B 是 miR-519b-3p 的靶基因。ARID4B 是依赖于 α -乙酰化酶的 SIN3A 转录抑制复合物的重要亚基, 其在多种细胞中起作用, 包括细胞增殖、分化、细胞凋亡和肿瘤发生^[19]。Tsai WC 等^[20]研究发现, ARID4B 是预测胶质瘤和脑膜瘤肿瘤行为的良好生物标志物。ARID4B 会促进乳腺肿瘤生长和转移^[21]。然而, ARID4B 在结直肠癌中的作用很大程度上是未知的。在本研究中, 我们发现 ARID4B 是 miR-519b-3p 的靶标, 并且 ARID4B 表达水平在 pCRT 的应答者中显著性下调。此外, 通过一些体外和体内功能实验, 我们证明了 miR-519b-3p 介导以 ARID4B 依赖性方式调节了 LARC 患者对放化疗反应。然而, ARID4B 调节的下游信号传导仍有待阐明。总之, miR-519b-3p/ARID4B 轴为 LARC 患者对 pCRT 反应的预测生物标志物。

参考文献:

- [1] D'Angelo E, Fassan M, Maretto I, et al. Serum miR-125b is a non-invasive predictive biomarker of the pre-operative chemoradiotherapy responsiveness in patients with rectal adenocarcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(19):28647-28657.
- [2] Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014[J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(2):104-117.
- [3] D'Angelo E, Zanon C, Sensi F, et al. miR-194 as predictive biomarker of responsiveness to neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with locally advanced rectal adenocarcinoma[J]. *J Clin Pathol*, 2018, 71(4):344-350.
- [4] Agostini M, Zangrando A, Pastrello C, et al. A functional biological network centered on XRCC3: a new possible marker of chemoradiotherapy resistance in rectal cancer patients[J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(8):1160-1171.
- [5] Slattery ML, Pellatt AJ, Lee FY, et al. Infrequently expressed miRNAs influence survival after diagnosis with colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(48):83845-83859.
- [6] Hidaka S. Conflicting effects by antibodies against connexin36 during the action of intracellular Cyclic-AMP onto electrical synapses of retinal ganglion cells[J]. *J Integr Neurosci*, 2016, 15(4):571-591.
- [7] Li W, Yang W, Liu Y, et al. microRNA-378 enhances inhibitory effect of curcumin on glioblastoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(43):73938-73946.
- [8] Qu Y, Liu H, Lv X, et al. microRNA-16-5p overexpression suppresses proliferation and invasion as well as triggers apoptosis by targeting VEGFA expression in breast carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(42):72400-72410.
- [9] Huang L, Cai JL, Huang PZ, et al. miR19b-3p promotes the growth and metastasis of colorectal cancer via directly targeting ITGB8[J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(10):1996-2008.
- [10] Svoboda M, Sana J, Fabian P, et al. microRNA expression profile associated with response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer patients[J]. *Radiat Oncol*, 2012, 7:195.
- [11] Bartel DP. microRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2):281-297.
- [12] Rimkus C, Friederichs J, Boulesteix AL, et al. Microarray-based prediction of tumor response to neoadjuvant radiochemotherapy of patients with locally advanced rectal cancer[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2008, 6(1):53-61.
- [13] Kheirlesei EA, Miller N, Chang KH, et al. miRNA expressions in rectal cancer as predictors of response to neoadjuvant chemoradiation therapy[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2013, 28(2):247-260.
- [14] D'Angelo E, Zanon C, Sensi F, et al. miR-194 as predictive biomarker of responsiveness to neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with locally advanced rectal adenocarcinoma[J]. *J Clin Pathol*, 2018, 71(4):344-350.
- [15] Du B, Wang X, Wu D, et al. microRNA expression profiles identify biomarkers for predicting the response to chemoradiotherapy in rectal cancer[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(2):1909-1916.
- [16] Cheng WC, Liao TT, Lin CC, et al. RAB27B-activated secretion of stem-like tumor exosomes delivers the biomarker microRNA-146a-5p, which promotes tumorigenesis and associates with an immunosuppressive tumor microenvironment in colorectal cancer[J]. *Int J Cancer*, 2019, doi:10.1002/ijc.32338.
- [17] Shen Z, Zhan G, Deng H, et al. Growth inhibitory effect of microRNA-519b-3p on larynx squamous Hep-2 cells[J]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2014, 49(2):151-156.
- [18] Qian Y, Feng L, Wu W, et al. microRNA expression profiling of pancreatic cancer cell line L3.6p1 following B7-H4 knockdown[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(2):494-504.
- [19] Goldberger N, Walker RC, Kim CH, et al. Inherited variation in miR-290 expression suppresses breast cancer progression by targeting the metastasis susceptibility gene Arid4b[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(8):2671-2681.
- [20] Tsai WC, Hueng DY, Nieh S, et al. ARID4B is a good biomarker to predict tumour behaviour and decide WHO grades in gliomas and meningiomas[J]. *J Clin Pathol*, 2017, 70(2):162-167.
- [21] Winter SF, Lukes L, Walker RC, et al. Allelic variation and differential expression of the mSIN3A histone deacetylase complex gene arid4b promote mammary tumor growth and metastasis[J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(5):e1002735.