

· 论 著 ·

miR-363 靶向作用于 CTHRC1 对结直肠癌细胞增殖和迁移的影响

唐映, 陈浩军, 陈晓华

广州市番禺中心医院消化内科, 广东 广州 511400

摘要: **目的** 观察微小 RNA (microRNA, miRNA)-363 在结直肠癌组织中的表达及其对结肠癌细胞增殖和迁移的影响, 并探讨其可能的机制。 **方法** 选择 96 例结直肠癌患者手术切除后癌组织、癌旁正常组织标本及 6 种结肠癌细胞株与正常结肠上皮细胞株。实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 miR-363 在结直肠癌组织和各种细胞株中的表达。以 miR-363 模拟物 (mimics)、miR-363 抑制剂 (inhibitor) 及空白对照分别转染结直肠癌细胞 HCT116, 采用细胞计数试剂盒 (CCK8) 法和细胞划痕实验分别检测转染 miR-363 mimics 和 miR-363 inhibitor 后结直肠癌细胞 HCT116 的增殖能力和 SW480、SW620 迁移能力, Western blot 法检测结直肠癌细胞 HCT116 中胶原三股螺旋重复蛋白 1 (CTHRC1) 的表达。 **结果** 与癌旁组织比较, miR-363 在结直肠癌组织表达显著下调; 与正常结肠上皮细胞株比较, 6 种结直肠癌细胞株中 miR-363 表达显著下调, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。转染 miR-363 mimics 可显著抑制结直肠癌细胞 HCT116 的增殖和 SW480、SW620 迁移能力。与转染空白对照比较, 转染 miR-363 mimics 后结直肠癌细胞 HCT116 中 CTHRC1 的相对表达量显著减低, 而转染 miR-363 inhibitor 后结直肠癌细胞 HCT116 中的 CTHRC1 相对表达量显著增加, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05), 表明 miR-363 可抑制 CTHRC1 蛋白的表达。 **结论** miR-363 可抑制结直肠癌细胞的增殖和迁移能力, 其机制可能与靶向作用于 CTHRC1 蛋白有关。

关键词: 结直肠癌; 微小 RNA-363; 胶原三股螺旋重复蛋白 1; 增殖; 迁移

中图分类号: R 735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2017)08-1035-04

Influence of miR-363 on proliferation and migration of colorectal cancer cell by targeting CTHRC1

TANG Ying, CHEN Hao-jun, CHEN Xiao-hua

Department of Gastroenterology, Guangzhou Panyu Central Hospital, Guangzhou, Guangdong 511400, China

Abstract: Objective To observe the expression of microRNA (miRNA)-363 in colorectal cancer tissues and the influence on proliferation and migration of colorectal cancer cells and explore its potential mechanism. **Methods** The specimens of cancerous tissues and paracancerous tissues resected by operation in 96 cases of colorectal cancer and 6 colon cancer cell lines and normal colorectal epithelial cell strain were selected. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) method was used to detect the expressions of miRNA-363 in colorectal cancer tissues and different cell lines. After transfection of colorectal cancer cells with miR-363 mimics, miR-363 inhibitor and blank control, cell counting kit-8 (CCK8) assay and cell wound scratch assay were used to respectively detect the proliferation ability of rectal cancer HCT116 cells and migration abilities of rectal cancer SW480 and SW620 cells. Western blot method was used to detect the expression of collagen three stranded helix repeat containing 1 (CTHRC1) in colorectal cancer HCT116 cells. **Results** Compared with paracancerous tissues, the expression of miR-363 in colorectal cancer tissues was down-regulated significantly ($P < 0.05$). Comparison with normal colorectal epithelial cell strain, the expressions of miR-363 in 6 colon cancer cell lines were down-regulated significantly (all $P < 0.05$). After being transfected with miR-363 mimics, the proliferation ability of HCT116 cells and migration abilities of SW480 and SW620 cells can be significantly inhibited. Compared with transfecting blank control, the relative expression level of CTHRC1 in colorectal cancer HCT116 cells after transfection of miR-363 mimics significantly decreased, while it significantly increased after transfection of miR-363 inhibitor. These results show that miR-363 can inhibit the expression of CTHRC1. **Conclusion** miR-363 could inhibit the proliferation and migration abilities of colorectal cancer cells, and the mechanism may be related to its targeting effect on CTHRC1 protein

Key words: Colorectal cancer; MicroRNA-363; Collagen three stranded helix repeat containing 1; Proliferation; Migration

结直肠癌是人类最常见的肿瘤之一,其发病率和死亡率在全世界分别居第 3 位和第 4 位,患者 5 年生存率仅约 50%^[1]。结直肠癌的发生是一个受到多基因调控的复杂过程,晚期结直肠癌患者有较差化疗药物敏感性,预后极差。微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类长约 22 个核苷酸的非编码单链小分子 RNA,其可通过特异性促进某些 mRNA 的降解来抑制 mRNA 翻译过程,从而起到对某些靶基因产生调控作用,进而参与细胞的生长、分化和凋亡等多种过程^[2]。目前,已发现的 miRNA 有 500 多种,其中有近一半与肿瘤的发生过程密切相关^[3]。胶原三股螺旋重复蛋白 1(CTHRC1)是动脉损伤过程中筛选出的一种分泌性糖蛋白,具有促进细胞迁移和减少胶原沉积的功能^[4]。近年研究发现,CTHRC1 在结直肠癌等多种实体瘤中表达异常,且可能参与肿瘤组织侵袭和转移的过程。本研究通过检测结直肠癌组织和细胞中 miR-363 的表达情况,分析其对结直肠癌细胞增殖和迁移的影响,并通过生物信息学软件预测 miR-363 的靶基因,探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 8 月至 2015 年 10 月来我院就诊的结直肠癌患者 96 例,年龄(51.9 ± 6.1)岁,患者均经组织病理学确诊,且术前均未进行任何化疗和放疗。经手术切除后取其结直肠癌组织和癌旁正常组织(距离癌灶组织边缘 > 5 cm)标本,并迅速放入液氮保存。6 种结肠癌细胞株(DLD-1、SW480、SW620、Caco-2、HCT116 和 HT-29)及正常结肠上皮细胞 FHC 均购自于中国医学科学院基础医学研究所。荧光定量 PCR 仪 7500(美国 ABI 公司),酶标仪 PerkinElmer(美国 Enspire 公司),倒置显微镜 IX51(日本 Olympus 公司),RNA 提取试剂盒(日本 Takara 公司),脂质体 Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司),RT-PCR 反转录试剂盒及荧光定量试剂盒(日本 Takara 公司),miR-363 模拟物(miR-363 mimics)和 miR-363 抑制剂(miR-363 inhibitor)(广州锐博生物),鼠抗人 CTHRC 抗体及 GAPDH 抗体(美国 Santa Cruz 公司)。

1.2 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)法检测 miR-363 在结直肠癌组织及细胞株中的表达 按照说明书,以 RNAiso™ Plus 提取新鲜冰冻组织及细胞株中总 RNA,采用 PrimeScript™ RT Master Mix 合

成 cDNA,并采取荧光定量 PCR 试剂盒和 ABI 7500 PCR 仪进行 PCR 反应,操作过程严格按照试剂盒说明书进行,miR-363 正向引物序列为:5'-CGA ATG TCC GTC ACA TCT-3',反向引物序列为:5'-GTG CAC GGG CAG AGG T-3',PCR 反应条件为 95 °C 10 min,95 °C 15 s,60 °C 60 s,一共进行 40 个循环并绘制扩增曲线。采用 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 法分析, Δct 为循环阈值,为目的基因与内参基因的 ct 值比较后再将实验组与空白对照组进行比较,即 $\Delta\Delta ct = \Delta ct$ 结直肠癌组织 - Δct 正常组织。所有反应设 3 个重复。

1.3 细胞计数试剂盒(CCK-8)法检测 miR-363 对结直肠癌细胞增殖的影响 在结直肠癌 HCT116 细胞中分别转染 miR-363 mimics、miR-363 inhibitor 和空白对照,转染 24 h 后将细胞按照 1×10^3 (200 μ l)接种于 96 孔板中,待 4 h 后细胞基本贴壁,加入 100 μ l 培养液和 10 μ l 的 CCK-8,置于 37 °C CO₂ 细胞培养箱中培养。采用 CCK-8 试剂盒对不同时间点(1、2、3、4、5 d)的结直肠癌细胞增殖能力进行检测,并绘制细胞生长曲线。操作过程严格按照 CCK-8 试剂盒说明书进行。

1.4 划痕实验法检测 miR-363 对结直肠癌细胞迁移能力的影响 将处于对数生长期的结直肠癌细胞 SW480 和 SW620 消化并制成单细胞悬液,将细胞接种到 6 孔板中,用含 10% 胎牛血清的 1640 培养液将细胞密度调整为 2.5×10^5 个/ml,取 2 ml 该细胞悬液加入到每个孔中,置于 CO₂ 培养箱进行培养。约 24 h 后,当细胞汇合率达到 90% 以上时,进行划痕实验检测细胞的迁移能力。在普通显微镜下观察并采集培养 0、24、48 h 后细胞迁移情况的图像,对图像进行分析并计算迁移率。

1.5 Western blot 检测 CTHRC1 蛋白的表达 结直肠癌细胞 HCT116 经裂解后提取其总蛋白,并利用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。配置 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶,以 40 μ g 的上样量进行上样,以 60 V 和 100 V 恒压电泳,湿转移至聚偏二氯乙烯膜(PVDF 膜)上,将 PVDF 膜放入封闭液中室温封闭 1 h。分别加入 1:1 000 稀释后的 CTHRC 抗体,4 °C 孵育过夜, PVDF 膜经 TBST 洗涤 3 次后,加入 1:5 000 洗膜后加过氧化物酶标记的二抗,于室温下摇床孵育 1 h,经显色后进行 X 线胶片感光、显影和定影,并利用 Quantity One 软件进行图像分析。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分

析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验或方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 TargetScan 和 miRanda 等软件对 miR-363 靶基因进行预测。

2 结果

2.1 结直肠癌组织及细胞株中 miR-363 的相对表达情况 癌组织中 miR-363 的相对表达水平明显低于癌旁组织 (0.49 ± 0.13 vs 1.08 ± 0.24 , $P < 0.05$); 6 种结直肠癌细胞株 (DLD-1、SW480、SW620、Caco-2、HCT116 和 HT-29) 中 miR-363 的相对表达水平明显低于正常细胞 [$(0.41 \pm 0.06, 0.50 \pm 0.07, 0.36 \pm 0.06, 0.69 \pm 0.09, 0.33 \pm 0.05, 0.49 \pm 0.06)$ vs 1.0 , P 均 < 0.05]。

2.2 miR-363 对结直肠癌细胞增殖活性的影响 与转染空白对照比较,转染 miR-363 inhibitor 后,结直肠癌细胞 HCT116 中 miR-363 表达显著降低 (0.41 ± 0.08 vs 1.0),而在转染 miR-363 mimics 后显著升高 (7.48 ± 0.76 vs 1.0),差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。根据不同时间点结直肠癌细胞的生长情况绘制生长曲线图 (图 1),可见转染 miR-363 inhibitor 组细胞的活力显著升高,而转染 miR-363 mimics 组的结直肠癌细胞生长活力变化不大,两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 miR-363 对结直肠癌细胞 SW480 和 SW620 迁移能力的影响 细胞划痕实验结果显示,转染 miR-363 mimics 后结直肠癌细胞 SW480 和 SW620 的迁移率分别为 0.279 ± 0.019 和 0.261 ± 0.019 ,显著低于转染空白质粒的 0.721 ± 0.029 和 0.731 ± 0.032 ,差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。见图 2。

2.4 miR-363 对 CTHRC1 蛋白表达的影响 通过靶基因预测网站 TargetScan 和 miRanda 预测 miR-363 的靶基因,结果得出 miR-363 可与 CTHRC1 的 3'UTR 端结合。为进一步验证 miR-363 对 CTHRC1 蛋白可能的影响,在细胞转染 24 h 后,检测结直肠癌细胞 HCT116 中 CTHRC1 蛋白的表达情况,结果显示,转染 miR-363 mimics 后结直肠癌细胞中 CTHRC1 的表达量 (0.31 ± 0.07) 显著低于对照组,而转染 miR-363 inhibitor 组 CTHRC1 相对表达量为 (2.46 ± 0.37),显著高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),表明 miR-363 可抑制 CTHRC1 蛋白的表达。见图 3、图 4。

3 讨论

miRNA 是一种长度约为 22 nt 的非编码 RNA,通

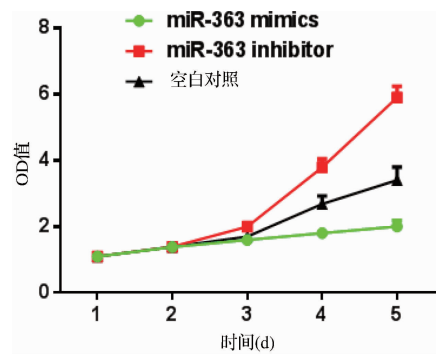


图 1 不同转染组结直肠癌细胞 HCT116 的生长曲线

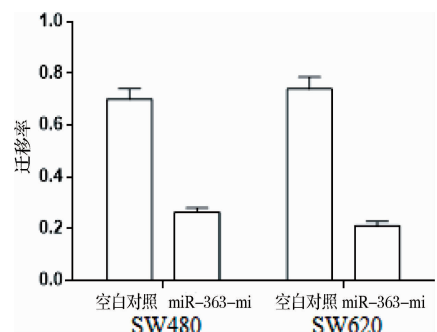


图 2 转染 miR-363 mimics 后两种结直肠癌细胞的迁移率

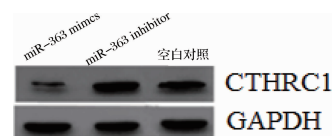


图 3 Western blot 检测不同转染组 HCT116 细胞中 CTHRC1 蛋白的表达

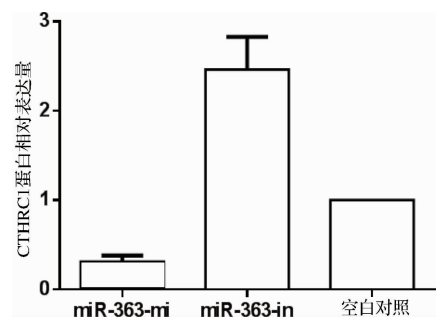


图 4 不同转染组结直肠癌细胞 HCT116 中 CTHRC1 蛋白表达情况

过对特异性基因的沉默,miRNA 可对某些 mRNA 产生降解作用进而抑制特定蛋白质的合成,因此,miRNA 是在转录水平调控基因的表达水平^[5]。有研究证实,miRNA 可对多种疾病的生理、病理过程产生影响,如调控细胞的增殖和凋亡等。近年来,miRNA 在肿瘤发生发展过程中的作用越来越受到关注,某些 miRNA 可直接参与人类肿瘤的形成。肿瘤的进展是一个涉及多种基因调控、含有多个步骤的复杂过程,miRNA 的表达在其中发挥重要作用,但目前关于 miRNA 发挥其相关调控作用的分子机制尚不明确。

miR-363 是近年来发现的一种新型小分子 RNA,其作为 miRNA 家族中的成员之一,参与某些肿瘤的

发生和发展过程。miR-363 首次被发现于有淋巴结转移的头颈部肿瘤组织中显著低表达,同样在某些高侵袭能力的肿瘤细胞系中也存在表达量下调,进一步研究发现,miR-363 可通过靶向抑制平足蛋白(PD-PN)来影响肿瘤细胞的侵袭和迁移能力^[6-7]。Qiao 等^[8]研究表明,miR-363 可调控神经母细胞瘤的发生发展和转移的过程。根据肿瘤组织的不同,miR-363 的表达水平及其所发挥的功能不一样,Li 等^[9]的文献调研结果发现,miR-363 在肾癌、胃癌、结直肠癌、头颈部肿瘤和神经母细胞瘤等肿瘤组织中表达有统计学差异。另有研究显示,miR-363 与结直肠癌患者的临床分期和淋巴结转移相关^[10],但其具体功能目前还鲜见报告。

本研究结果显示,miR-363 在结直肠癌组织中显著低表达,同样在 6 种结直肠癌细胞系中的表达水平也显著低于正常结直肠黏膜细胞,提示 miR-363 参与了结直肠癌的发生和进展过程。同时,本研究通过转染 miR-363 mimics 和 miR-363 inhibitor,实现对结直肠癌细胞 HCT116 中 miR-363 的水平进行调控,CCK-8 法检测结果显示,转染 miR-363 mimics 的细胞生长速度较慢,而转染 miR-363 inhibitor 的细胞生长速度显著上升,这表明在结直肠癌发展的过程中,miR-363 可能通过抑制结直肠癌细胞的增殖而发挥抑癌基因的作用。进一步研究发现,转染 miR-363 mimics 后结直肠癌细胞 SW480 和 SW620 的迁移率显著降低,提示 miR-363 可抑制结直肠癌细胞的迁移能力。

结直肠癌的发生和发展过程受到多种基因和蛋白的调控,对这些相关基因和蛋白的研究对了解结直肠癌的发病机制具有重要意义。CTHRC1 是一个 25 kD 大小的分泌性糖蛋白,其主要功能是抑制胶原机制的合成,在乳腺癌、结直肠癌、肝癌和食管癌等恶性肿瘤中,CTHRC1 蛋白均存在异常表达^[11-12]。Tang 等^[11]通过免疫组化等方法发现在非侵袭性的黑色素瘤中,CTHRC1 表达量显著下调,而在转移性和侵袭性的黑色素瘤组织中表达显著上调。Tan 等^[13]研究发现,结直肠癌患者肿瘤组织中 CTHRC1 的表达与结直肠癌分化程度和临床分期具有显著相关性。Kim 等^[14]发现,CTHRC1 在结直肠癌组织中高表达,通过在结直肠癌细胞系中过表达 CTHRC1 可提高细胞的增殖、迁移和侵袭能力,而靶向沉默 CTHRC1 表达则可降低结直肠癌细胞 HT-29 的增殖能力。本研究结果表明,在结直肠癌细胞 HCT116 中过表达 miR-

363 后,CTHRC1 蛋白的表达量显著降低,而抑制 miR-363 后 CTHRC1 表达显著升高,说明 miR-363 对结直肠癌细胞 CTHRC1 的表达具有抑制作用。

综上所述,miR-363 在结直肠癌组织和细胞系中低表达,过表达 miR-363 可抑制结肠癌细胞的增殖过程,并抑制肿瘤细胞的迁移能力。

参考文献

- [1] 李慧慧,宋宝,王哲海.结直肠癌 miRNA 相关基因单核苷酸多态性与预后相关性研究现状[J].中华肿瘤防治杂志,2014,21(1):77-80.
- [2] 严秀蕊,王立斌,李玉奎,等.结直肠癌组织中 miRNA 的差异表达研究[J].重庆医科大学学报,2014,39(3):295-298.
- [3] 严秀蕊,王立斌,陈冬梅,等.人结直肠癌组织 miR-363 表达对细胞增殖与迁移活性影响的观察[J].中华肿瘤防治杂志,2014,21(7):509-513.
- [4] Tan F,Liu F,Liu H, et al. CTHRC1 is associated with peritoneal carcinomatosis in colorectal cancer: a new predictor for prognosis [J]. Med Oncol,2013,30(1):473.
- [5] 陈恩碧,邹继彬,黄勇波,等. CTHRC1 和 NFE2L3 在结直肠癌组织中的表达及相关性[J].中国当代医药,2012,19(16):8-9.
- [6] 李新华,张桂英,李乾,等.直肠癌组织异常表达 miRNAs 的鉴定[J].中南大学学报(医学版),2012,37(7):662-668.
- [7] Luo X,Burwinkel B,Tao S, et al. MicroRNA signatures: novel biomarker for colorectal cancer[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2011,20(7):1272-1286.
- [8] Qiao J, Lee S, Paul P, et al. miR-335 and miR-363 regulation of neuroblastoma tumorigenesis and metastasis [J]. Surgery, 2013, 154(2):226.
- [9] Li M, Guan X, Sun Y, et al. miR-92a family and their target genes in tumorigenesis and metastasis[J]. Exp Cell Res, 2014, 323(1):1.
- [10] Zhang R, Li Y, Dong X, et al. miR-363 sensitizes cisplatin-induced apoptosis targeting in Mcl-1 in breast cancer[J]. Med Oncol, 2014, 31(12):347.
- [11] Tang L, Dai DL, Su M, et al. Aberrant expression of collagen triple helix repeat containing 1 in human solid cancers[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(12):3716-3722.
- [12] 李靖涛,赵洪川,高春,等. CTHRC1 和 VEGF-C 在直肠癌组织中的表达及相关性[J].世界华人消化杂志,2009,17(13):1318.
- [13] Tan F, Liu F, Liu H, et al. CTHRC1 is associated with peritoneal carcinomatosis in colorectal cancer: a new predictor for prognosis [J]. Med Oncol, 2013, 30(1):1-7.
- [14] Kim HC, Kim YS, Oh HW, et al. Collagen triple helix repeat containing 1 (CTHRC1) acts via ERK-dependent induction of MMP9 to promote invasion of colorectal cancer cells [J]. Oncotarget, 2014, 5(2):519-529.

收稿日期:2017-02-20 修回日期:2017-03-15 编辑:王国品