

MicroRNA-875-5p 在结直肠癌组织的表达及其对结直肠癌细胞增殖、凋亡能力的影响

洪永刚¹, 郑浩², 黄智平³, 刘启志¹, 张卫¹, 郝立强¹

1.海军军医大学长海医院肛肠外科, 上海 200433;

2.海军军医大学东方肝胆外科医院肝外三科, 上海 200433;

3.中国人民解放军南部战区总医院肝胆外科, 广东 广州 510010

【摘要】 目的 探讨在结直肠癌中 MicroRNA(miR)-875-5p 的表达水平、细胞功能及调控机制。方法 通过 qRT-PCR 技术检测 miR-875-5p 在 62 例结直肠癌患者组织样本和永生化细胞器中的表达水平, 功能学实验揭示 miR-875-5p 对结直肠癌细胞增殖和凋亡能力的影响。双荧光素酶和免疫印迹实验研究 miR-875-5p 与靶基因 ELL2 蛋白表达量之间的关系。结果 miR-875-5p 在结直肠癌组织和结直肠癌细胞系中异常高表达。体外功能实验证实 miR-875-5p 可增强结直肠癌细胞增殖能力, 同时降低结直肠癌细胞凋亡。双荧光素酶和免疫印迹实验证实 miR-875-5p 直接靶向负向 ELL2-3'UTR 区并抑制其蛋白的表达。结论 miR-875-5p 在结直肠癌组织中高表达, miR-875-5p 可促进结直肠癌细胞的增殖和抑制凋亡, 其机制与下调 ELL2 表达有关。

【关键词】 结直肠癌; MicroRNA; 增殖; 凋亡; ELL2

Expression of microRNA-875-5p and its effect on proliferation and apoptosis of Colorectal carcinoma

HONG Yong-gang¹, ZHENG Hao², HUANG Zhi-ping³, LIU Qi-zhi¹, ZHANG Wei¹, HAO Li-qiang¹

1.Department of Anorectal surgery, Changhai Hospital, Naval Military Medical University, Shanghai 200433, China

2.Third Department of Hepatic Surgery, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Naval Military Medical University, Shanghai 200433, China

3.Department of Hepatobiliary Surgery, General Hospital of Southern Theatre Command, Guangzhou 510010, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression level, cell function and regulation mechanism of microRNA-875-5p in colorectal cancer (CRC). **Methods** The expression of microRNA-875-5p in 62 paired CRC tissues and CRC cells was detected by qRT-PCR. Functional experiments revealed the effect of microRNA-875-5p on the proliferation and apoptosis of CRC cells. Double luciferase and Western blotting were used to study the relationship between ELL2 and microRNA-875-5p. **Results** The expression of microRNA-875-5p was abnormally high in CRC tissues and CRC cell lines. Functional experiments in vitro confirmed that microRNA-875-5p could promote the proliferation and inhibit the apoptosis of CRC cells. Double luciferase and Western blotting experiments confirmed that microRNA-875-5p directly targeted the ELL2-3'UTR region and inhibited its expression. **Conclusion** MicroRNA-875-5p is highly expressed in colorectal cancer tissues. MicroRNA-875-5p can promote the proliferation and inhibit apoptosis of colorectal cancer cells, and its mechanism is related to down-regulation of ELL2 expression.

【Key words】 Colorectal carcinoma; MicroRNA; Proliferation; Apoptosis; ELL2

前言

结直肠癌(Colorectal carcinoma, CRC)是全球

致死率排名第三位的恶性肿瘤^[1], 每年造成约 60 万人死亡。然而, 由于结直肠癌发生和发展的分子机制尚不明确, 导致目前临床上结直肠癌的治疗前景尚不乐观。因此, 更好地了解结直肠癌的发病机制以及探索新治疗靶点, 对结直肠癌临床治疗具有重要意义^[2]。

MicroRNAs(miRNAs)是一类约 20-22 个核苷

基金项目:上海科委自然科学基金(16ZR1400800)

作者简介:洪永刚, 主治医师, E-mail:hyg810@163.com

通讯作者:郝立强, 副主任医师, 硕士生导师, E-mail: hao_liqiang@139.com

酸的内源性非编码 RNA 分子^[3],通过与一个或多个靶基因的 3'UTRs 碱基配对,介导转录后负调控^[4]。越来越多的证据表明,miRNAs 的异常表达在如结直肠癌、乳腺癌、肺癌以及前列腺癌等在内多种肿瘤中起到了重要作用^[5-8]。然而,目前对于 miR-875-5p 与 ELL2 在结直肠癌中可能的作用关系和潜在分子机制尚不清楚。

1 材料与方法

1.1 组织样本 62例结直肠癌组织样本(结肠癌:直肠癌=45:17)来自于2011年12月至2013年12月在海军军医大学第一附属医院进行根治手术的结直肠癌患者。癌旁组织距离癌灶边缘超过5cm。由本院拥有5年以上经验的病理医师检查每个组织样本确认组织类型。术后肿瘤组织立即冻存于-80℃液氮中以备后用。患者在手术前没有接受任何治疗。本研究经海军军医大学第一附属医院伦理委员会批准且所有患者均签署知情同意书。

1.2 细胞系培养和转染 人正常结肠上皮细胞 NCM460 以及人结直肠癌细胞 HCT116、SW480、HT29 和 SW620 均来自于中国科学院上海细胞科学研究所。细胞系在含 5% CO₂、37℃ 湿润的条件下,细胞培养于含 10% 胎牛血清和 1% 的双抗的 DMEM 培养基中。miR-875-5p inhibitor(抑制剂)和 miR-875-5p NC(阴性对照)、miR-875-5p mimic(模拟物)和 miR-875-5p control(对照组)均由广州瑞博生物技术有限公司提供。根据厂商说明书使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.)进行细胞转染。

1.3 Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)检测 具体操作步骤依照参考文献进行^[9]。简而言之,依照说明书,应用 Trizol 试剂抽提组织和细胞的总 RNA。用 M-MLV 逆转录酶合成 cDNA。使用 SYBR Green 实时 PCR 试剂盒在 Real-Time Thermocycler 7500 PCR 仪上进行 qRT-PCR 实验。以 U6 和 GAPDH 分别作为 miRNA 和 mRNA 基因的内参基因。使用 2^{-ΔΔCt} 方法计算基因的相对表达量。引物序列为:miR-875-5p:上游 5' CACATGGACATACGGGTT 3',下游 5' CATCTCCG ATTTGTTT CCT 3';U6:上游 5' CTTATGAGCGAGA ATGGG 3',下游 5' TAGGTTGTTGGGTTGTTT 3'; ELL2:上游 5' ACGGATTTCCACCCATTG 3',下游 5' GGAACCTCCTGGGATT 3';GAPDH:上游 5'

AACGGATTTGGTCGTATTG 3',下游 5' GGAAGAT GGTGATGGGATT 3'。

1.4 细胞增殖和凋亡实验 具体操作步骤依照参考文献进行^[9],简而言之按照 CCK-8 说明书分别于接种 96 孔板后第 1、2、3、4 和 5 天向每孔加入 10μL CCK-8 溶液,在培养箱中继续培养 1 h,用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度 (D450 nm)。以时间为横坐标,D450 nm 为纵坐标绘制细胞生长曲线。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。凋亡实验参照美国赛默飞公司 CellEvent Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay 试剂盒说明书进行。

1.5 Western Blot 具体操作步骤依照参考文献进行^[9]。简而言之,细胞长至 80%时,弃培养液,以预冷的 PBS 洗涤 2 次后,向培养瓶中加入适量蛋白裂解液,后续抽提、保存蛋白依照说明书进行。与文献进行电泳、转膜、封闭、孵育一抗、洗膜、孵育二抗、洗膜、ECL 显影。文中所用抗体 ELL2 (ab115027)和 GAPDH (ab181602)均为兔抗人多抗,购自美国 Abcam 公司。

1.6 双荧光素酶报告基因分析 ELL2 3'UTR 区野生型及突变型荧光素酶报告质粒由上海吉马生物制药有限公司合成,将 ELL2 野生型及突变型 3'UTR 区序列插入到 pmirGLO 载体 (Promega, E1330)酶切后构成 ELL2 3'UTR 区野生型及突变型荧光素酶报告质粒。使用荧光素酶检测试剂盒检测细胞,后续操作过程依照参考文献和试剂说明书进行^[9],应用美国 BioRad 公司单光子检测仪检测细胞荧光素酶的活性。计算相对荧光素酶活性,公式为萤火虫荧光素酶活性值/海肾荧光素酶活性值。每组实验重复 3 次,文中报告基因购自于上海吉马生物制药有限公司。

1.7 统计学分析 统计分析采用 SPSS18.0 统计软件进行统计分析。使用 *t* 检验来比较两组测量数据。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MiR-875-5p 在结直肠癌细胞和组织中上调表达 为了阐明 miR-875-5p 在 CRC 中的表达情况,首相通过 qRT-PCR 技术检测了 miR-875-5p 在 4 株 CRC 细胞系和正常结肠上皮细胞系 NCM460 中的表达水平。如图 1A 所示,与 NCM460 相比,miR-875-5p 在 4 株 CRC 细胞系 (HCT116、SW480、HT29 和 SW620)中上调表达。接下来利用

qRT-PCR 技术检测了 62 例配对的 CRC 肿瘤和对应癌旁组织中 miR-875-5p 的表达水平。结果显示,与匹配的癌旁组织相比,CRC 组织中的 miR-875-5p 上调表达(图 1B)。为了评估了 miR-875-5p 表达与 CRC 患者预后的关系,我们将 62 例肝结肠癌患者按照 miR-875-5p 的中位表达分为高/低两组。生存曲线显示,miR-875-5p 表达较高的患者与 miR-875-5p 表达较低的患者相比预后更差(图 1C-D)。以上结果提示上调 miR-875-5p 与 CRC 患者的临床预后相关,并可能在 CRC 的发展或进程中起着积极作用。

2.2 miR-875-5p 促进 CRC 细胞增殖且抑制 CRC 细胞凋亡 为了研究 miR-875-5p 在 CRC 中的生物学作用,将 miR-875-5p 模拟物转染至 HT29 和 SW620 细胞中,并利用 qRT-PCR 技术检测了转染效率,结果提示转染 miR-875-5p 模拟物后 CRC 细胞中 miR-875-5p 上调表达明显,提示转染模拟物成功(图 2A)。接下来利用 CCK-8 技术分析

miR-875-5p 对 CRC 细胞增殖能力的影响,结果提示与 Control 组细胞相比,miR-875-5p mimic 组细胞的增殖能力明显提高(图 2B-C)。与此同时观察到,与 Control 组细胞相比,miR-875-5p mimic 组中 caspase-3/7 的活性降低(图 2D)。以上结果提示,miR-875-5p 可促进 CRC 细胞增殖且抑制 CRC 细胞凋亡。

2.3 下调 miR-875-5p 的表达可抑制 CRC 细胞增殖并促进 CRC 细胞凋亡 接下来将 miR-875-5p 抑制剂转染至 HT29 和 SW620 细胞,同样利用 qRT-PCR 技术检测了转染效率,结果提示转染 miR-875-5p 抑制剂后 CRC 细胞中 miR-875-5p 下调表达明显,提示转染抑制剂成功(图 3A)。CCK-8 实验证实降低 miR-875-5p 的表达可显著地抑制 CRC 细胞的增殖能力(图 3B-C)。此外,与 NC 组细胞相比,miR-875-5p inhibitor 组中 caspase-3/7 的活性降低(图 2D)。与此同时观察到,与 NC 组细胞相比,miR-875-5p 抑制剂组中

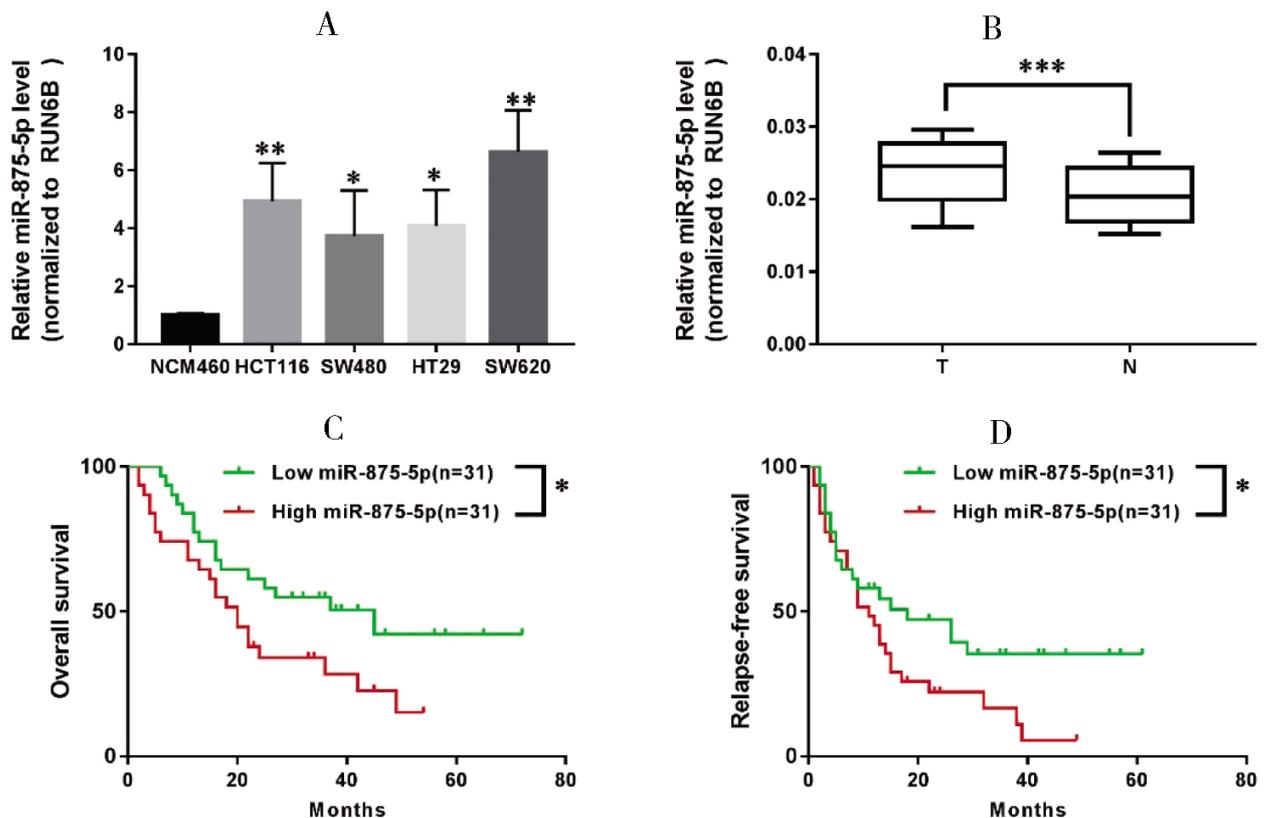


Fig 1 miR-875-5p is up-regulated in CRC and correlated with prognosis of CRC patients

A. qRT-PCR 检测 miR-875-5p 在人 CRC 细胞株(HCT116、SW480、HT29、SW620)和正常结肠上皮细胞(NCM460)的相对表达水平,以 U6 为内参基因。B. qRT-PCR 检测 miR-875-5p 在 62 对配对的 CRC 组织(T)和相邻的正常组织(N)中的相对表达水平,以 U6 为内参基因。C 和 D. 根据 miR-875-5p 表达分组的患者 Kaplan-Meier 曲线分析 miR-875-5p 的表达与 CRC 者总生存率和复发率的关系。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

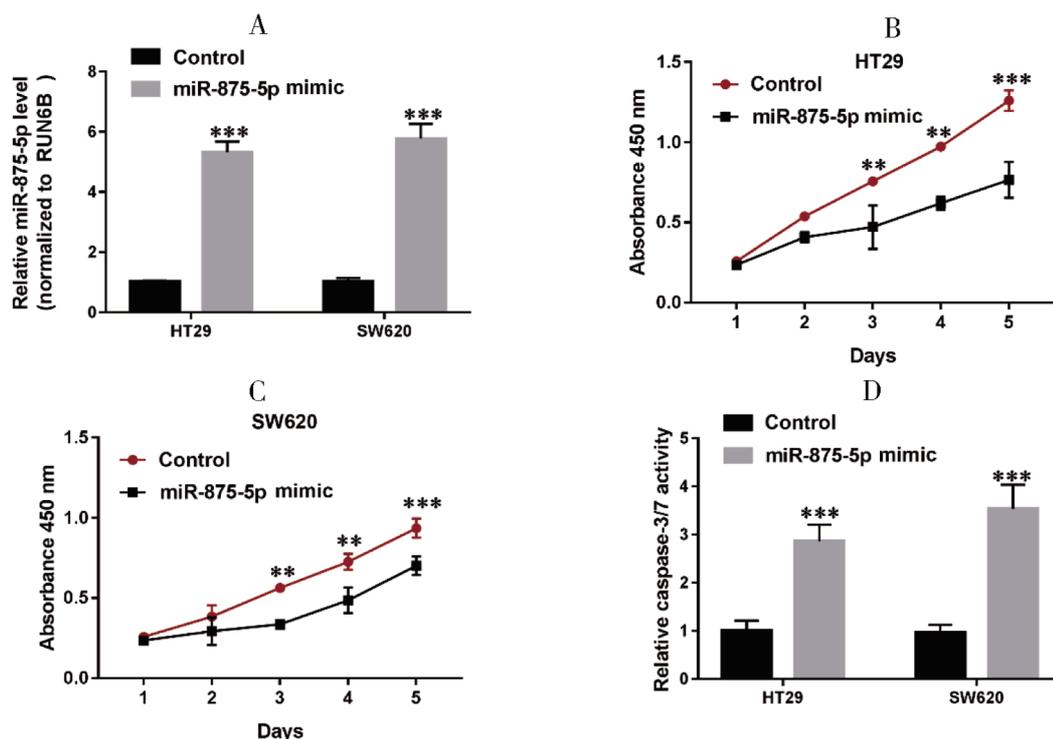


Fig 2 miR-875-5p promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in CRC cells
 A. qRT-PCR 检测转染 miR-875-5p 模拟物后 HT29 和 SW620 细胞中 miR-875-5p 的相对表达水平,以 U6 为内参基因。B 和 C. CCK-8 检测转染 miR-875-5p 模拟物后 HT29 和 SW620 细胞的增殖能力。D. 过表达 miR-875-5p 降低了 HT29 和 SW620 细胞的 caspase-3/7 活性。* $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

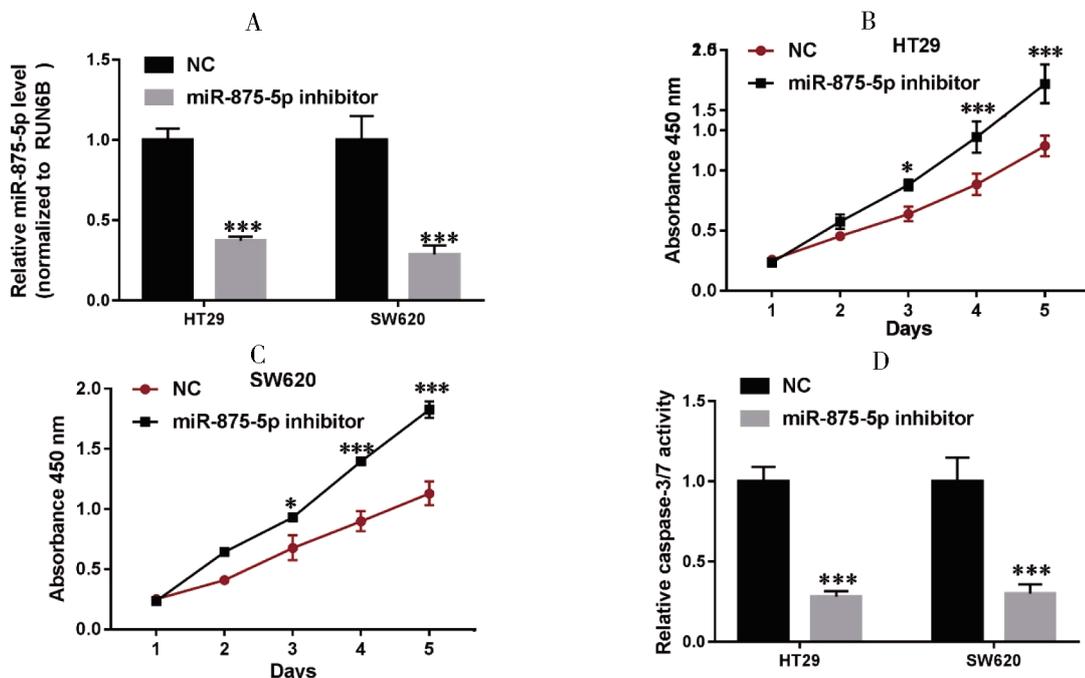


Fig 3 Knockdown of miR-875-5p inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in CRC cells
 A. qRT-PCR 检测转染 miR-875-5p 抑制剂后 HT29 和 SW620 细胞中 miR-875-5p 的相对表达水平,以 U6 为内参基因。B 和 C. CCK-8 检测转染 miR-875-5p 抑制剂后 HT29 和 SW620 细胞的增殖能力。D. 抑制 miR-875-5p 表达提高 HT29 和 SW620 细胞的 caspase-3/7 活性。* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$

caspase-3/7 的活性增强(图 3D)。这些观察结果表明,下调 miR-875-5p 的表达可抑制 CRC 细胞增殖并促进 CRC 细胞凋亡。

2.4 ELL2 是 miR-875-5p 的直接靶点 为了探索 miR-875-5p 促进 CRC 增殖和抑制凋亡的机制,利用在线预测软件(www.targetscan.org/vert_72/)预测了 miR-875-5p 的潜在作用靶点,结合预测结果和参阅相关文献,提示 ELL2 可能是 miR-875-5p 的作用靶点,我们将含有 miR-875-5p 预测结合位点或突变位点的 ELL2 的 3'-UTR 区域克隆到荧光素酶载体中(图 4A)。如图 4B-C 所示,过表达 miR-875-5p 会显著抑制 ELL2-3'-UTR-wt 报告基因的荧光素酶活性,但是对 ELL2-3'-UTR-mut 报告基因的荧光素酶活性没

有任何作用。此外,过表达 miR-875-5p 降低了 ELL2 mRNA(图 4D)和蛋白质表达(图 4E)的水平,这表明,在 CRC 中 miR-875-5p 可直接靶向 ELL2 并降低其表达。

3 讨论

近十年来,CRC 的治疗进展程度甚微。miRNAs 的发现为理解癌症的分子机制和治疗提供了独特的思路。miRNAs 在各种癌症中的作用越来越受到人们的关注。近年来大量研究报道证实 miR-875-5p 在多种肿瘤组织中异常下调表达并发挥着重要抑癌基因的作用,其中包括肝细胞癌^[10]、宫颈癌细胞^[11]以及肺癌^[12]等等。也有报道称 miR-875-5p 可以靶向调控 SATB2 蛋白,对 SATB2 蛋

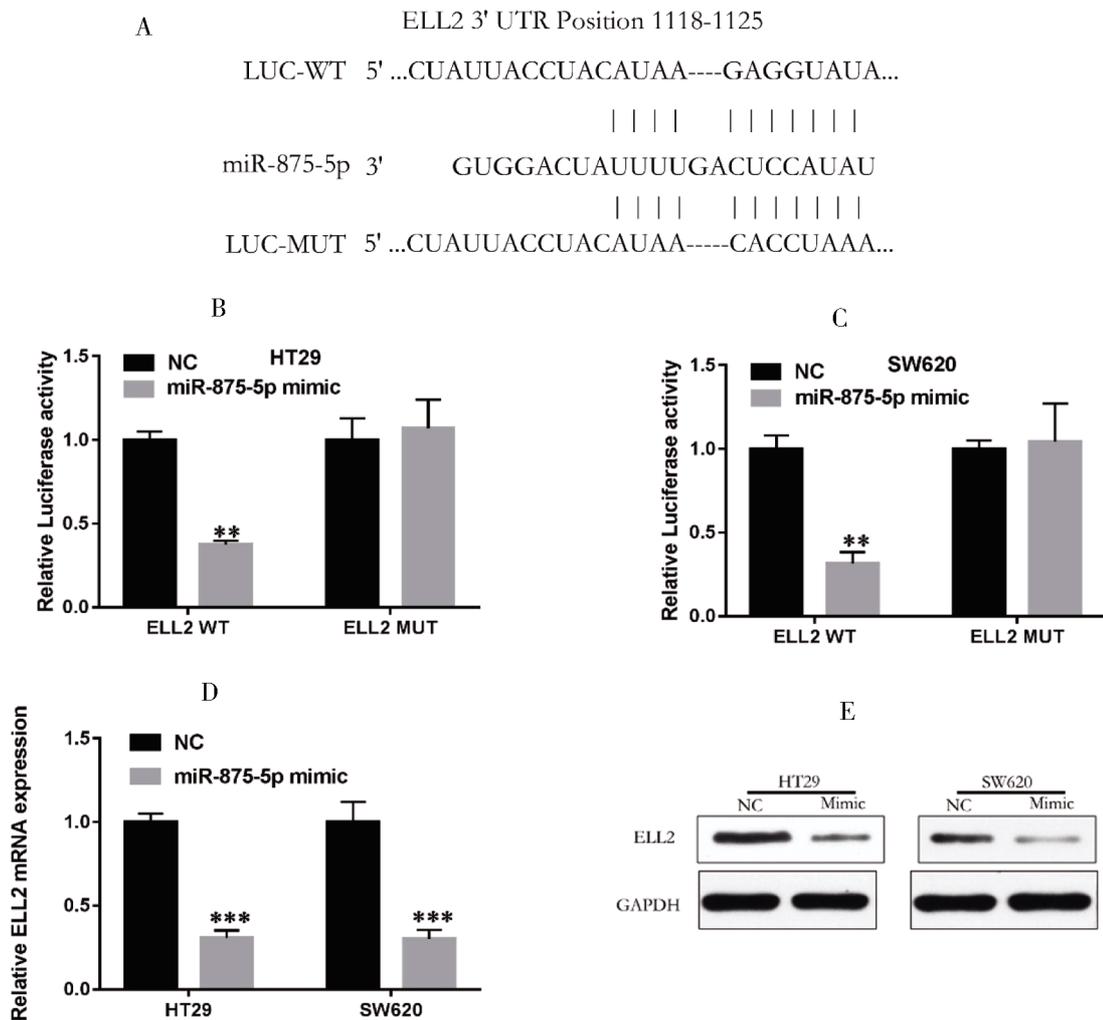


Fig 4 ELL2 is a direct target of miR-875-5p

A. 在线生物信息学软件预测结果表明 ELL2 基因的 3'-UTR 有 miR-875-5p 的结合位点。B 和 C. 过表达 miR-875-5p 降低了 HT29 和 SW620 细胞中 ELL2 3'-UTR WT 荧光素酶活性,而未改变突变的 ELL2 3'-UTR MUT 中荧光素酶活性。D 和 E. qRT-PCR 和 western blot 检测过表达 miR-875-5p 后 HT29 和 SW620 细胞中 ELL2 的 mRNA 和蛋白水平。^{**} $P < 0.01$;^{***} $P < 0.001$

白基因表达有负向调控作用,从而抑制肺癌细胞的转移和侵袭能力^[12]。此外,研究证实过表达 miR-875 抑制宫颈癌细胞生长,并促进其凋亡^[11]。这些结果提示 miR-875-5p 在肿瘤的发展中的发挥着重要抑癌作用。

在本研究中,首先检测 miR-875-5p 在 CRC 组织和细胞系中的表达情况,实验结果提示 miR-875-5p 在 CRC 组织和细胞系中异常上调表达,且 miR-875-5p 的高表达与结直肠癌患者的预后不良显著相关。细胞生物学实验证实,我们探索了 miR-875-5p 在细胞增殖和凋亡中是 CRC 的肿瘤驱动因子。以上结果提示 miR-875-5p 与结直肠癌的发生和发展密切相关。

机制实验中,荧光素酶报告试验证明在 CRC 细胞中,上调 miR-373-3p 的表达抑制了 ELL2 的 3'-UTR-WT 序列的报告基因的荧光素酶活性。此外,我们发现在 CRC 细胞中 ELL2 受到 miR-875-5p 的负向调控。这些结果表明 ELL2 是 miR-875-5p 在 CRC 中的直接作用靶点。ELL2 是位于 5 q15 处的 RNA 聚合酶 II 延伸因子的 ELL 家族的成员之一,ELL 家族蛋白被证实在细胞的正常和病理过程中发挥着重要作用^[13]。最近的研究表明,ELL 蛋白可通过作用 E3 泛素连接酶阻碍 c-Myc 被蛋白酶降解,从而促进了肿瘤的增殖和转移^[14]。也有其他报道称,ELL 蛋白可以与 p53 蛋白相互作用从而促进肿瘤生长^[15]。然而,目前本研究还没有通过细胞功能学实验证实 miR-875-5p 确实通过靶向 ELL2 蛋白来调控 CRC 细胞的增殖和凋亡,因此,miR-875-5p 靶向 ELL2 蛋白调控结直肠癌增殖的作用和分子机制还有待进一步研究。

综上所述,本研究表明 miR-875-5p 在 CRC 肿瘤组织和细胞中上调表达,miR-875-5p 通过靶向 ELL2 来促进 CRC 细胞癌细胞增殖和抑制凋亡。miR-875-5p /ELL2 轴为 CRC 的发病机制提供了新的认识,并可能成为 CRC 治疗的潜在治疗靶点。

参考文献

- [1] R S, C D, A J. Colorectal cancer statistics, 2014 [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2014, 64(2): 104-117.
- [2] Grady WM, Markowitz SD. The molecular pathogenesis of colorectal cancer and its potential application to colorectal cancer screening [J]. Digestive Diseases & Sciences, 2015, 60(3): 762-772.
- [3] Victor A. The functions of animal micrnas [J]. Nature, 2004, 431(7006): 350-355.
- [4] Acunzo M, Croce CM. Downregulation of mir-15 a and mir-16-1 at 13 q14 in chronic lymphocytic leukemia [J]. Clinical Chemistry, 2016, 62(4): 655.
- [5] Jin-hua Y, Xing-guo Z, Hui-min L, et al. Mir-34 a/c-dependent pdgfr- α/β downregulation inhibits tumorigenesis and enhances trail-induced apoptosis in lung cancer [J]. Plos One, 2015, 8(6): e67581.
- [6] Shen K, Liang Q, Xu K, et al. Mir-139 inhibits invasion and metastasis of colorectal cancer by targeting the type i insulin-like growth factor receptor [J]. Biochemical Pharmacology, 2012, 84(3): 320-330.
- [7] Sonja Khan CLB, James Ryan, Arisha Sahrudin, Gregory O' Neill, Deirdre Wall, Catherine Curran, John Newell, Michael J. Kerin, Roisin M. Dwyer. Mir-379 regulates cyclin b1 expression and is decreased in breast cancer [J]. Plos One, 2013, 8(7): e68753.
- [8] Liu R, Li J, Teng Z, et al. Overexpressed microrna-182 promotes proliferation and invasion in prostate cancer pc-3 cells by down-regulating n-myc downstream regulated gene 1 (ndrg1)[J]. Plos One, 2013, 8(7): e68982.
- [9] Dang S, Zhou J, Wang Z, et al. Mir-299-3 p functions as a tumor suppressor via targeting sirtuin 5 in hepatocellular carcinoma[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106(: 966-975.
- [10] Xu Q, Zhu Q, Zhou Z, et al. Microrna-876-5p inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting bcl6 corepressor like 1 [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103(: 645-652.
- [11] Qingqing, Xiaoyan, Zhang, et al. Two less common human micrnas mir-875 and mir-3144 target a conserved site of e6 oncogene in most high-risk human papillomavirus subtypes[J]. Protein & Cell, 2015, 6(8): 575-588.
- [12] Wang J, Lu Y, Ding H, et al. The mir-875-5p inhibits satb2 to promote the invasion of lung cancer cells [J]. Gene, 2018, 644(: 13-19.
- [13] Shilatifard A, ., Duan DR, Haque D, ., et al. Ell2, a new member of an ell family of rna polymerase ii elongation factors [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(8): 3639-3643.
- [14] Chen Y, Zhou C, Ji W, et al. Ell targets c-myc for proteasomal degradation and suppresses tumour growth [J]. Nature Communications, 2016, 7(: 11057.
- [15] Shinobu N, ., Maeda T, ., Aso T, ., et al. Physical interaction and functional antagonism between the rna polymerase ii elongation factor ell and p53 [J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(24): 17003.