

MicroRNA-200c在结直肠癌中的表达及对侵袭和转移的影响

叶伟标^{1,2}, 徐咏强¹, 李好玲¹, 卢碧燕^{2,3}, 杨湘玲^{2,3}, 刘焕亮^{2,3}, 李仲均¹

(1. 南方医科大学附属东莞人民医院, 广东 东莞 523059; 2. 广东省结直肠盆底疾病研究重点实验室, 广东 广州 510655; 3. 中山大学附属第六医院, 广东 广州 510655)

摘要:【目的】探讨microRNA-200c(miR-200c)在结直肠癌中的表达及其对SW620肠癌细胞株侵袭和转移能力的影响。【方法】采用实时荧光定量PCR检测45例结直肠癌组织和配对邻近正常肠粘膜组织中miR-200c的表达水平;利用脂质体将miR-200c模拟物瞬时转染SW620细胞株,通过Western blot检测上皮间质转化相关蛋白E-cadherin和Vimentin的表达;CCK-8试剂盒和Transwell小室装置检测上调miR-200c的表达对SW620细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响。【结果】miR-200c在伴有淋巴结转移的结直肠癌组织中的表达明显下调。体外细胞实验显示,SW620细胞株在转染miR-200c模拟物后,ZEB1蛋白表达受抑制,上皮表型标志物E-cadherin表达升高,而间质表型标志物Vimentin表达下降;上调miR-200c表达可抑制SW620细胞增殖、侵袭和迁移。【结论】miR-200c低表达与结直肠癌侵袭和转移相关,其机制可能是通过调控上皮间质转化过程实现的。

关键词: microRNA-200c; 结直肠癌; 肿瘤转移; 上皮间质转化

中图分类号: R735.3

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2018)03-0335-06

Expression of MicroRNA-200c in Colorectal Carcinomas and Its Role on Tumor Cell Migration and Invasion

YE Wei-biao^{1,2}, XU Yong-qiang¹, LI Yu-ling¹, LU Bi-yan^{2,3}, YANG Xiang-ling^{2,3},
LIU Huan-liang^{2,3}, LI Zhong-jun¹

(1. Dongguan Hospital of Southern Medical University, Dongguan 523059, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Colorectal and Pelvic Floor Diseases, Guangzhou 510655, China; 3. The Sixth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, China.)

Corresponding to: LI Zhong-jun; E-mail: zhongjunsysu@163.com

Abstract: 【Objective】 To investigate the expression of microRNA-200c (miR-200c) in colorectal carcinomas (CRC), and analyze its role on tumor cell migration and invasion. 【Methods】 The expression levels of miR-200c in CRC tissues and adjacent normal mucosa were assessed by real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR). miR-200c mimics were transiently transfected into human colorectal cancer cells, and their roles on cell migration and invasion were analyzed by Transwell assay. Cell proliferation was measured using the Cell Counting kit-8. The expression levels of epithelial and mesenchymal markers as well as related transcription factor ZEB1 were detected by Western blotting. 【Results】 Lower miR-200c expression was found in primary CRC tissues with lymph node metastasis compared to those without lymph node metastasis and adjacent normal mucosa. Transfection of miR-200c mimics suppressed proliferation, and reduced invasion and migration in SW620 cells. Furthermore, up-regulation of miR-200c inhibited ZEB1, and resulted in increased E-cadherin and reduced Vimentin gene expression. 【Conclusion】 miR-200c was associated with invasive

收稿日期: 2017-12-12

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(81702399); 广东省医学科研基金(C2017034)

作者简介: 叶伟标, 硕士, 研究方向: 结直肠癌分子机制, E-mail: billea_sysu@163.com; 李仲均, 通信作者, 副教授, 硕士生导师, E-mail: zhongjunsysu@163.com

and metastatic behavior of CRC. These effects may be mediated through regulation of epithelial-mesenchymal transition.

Key words: microRNA-200c (miR-200c); colorectal carcinomas; tumor metastasis; epithelial-mesenchymal transition

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(3): 335-340]

结直肠癌是最常见的消化系统恶性肿瘤之一,其发病率呈逐年上升趋势。根据WHO新近的肿瘤流行病学统计数据(GLOBOCAN 2012),2012年全球范围内结直肠癌新发病例数约为136万,死亡病例数约为69万^[1]。尽管以手术为主,辅以放化疗、靶向生物治疗等的综合性治疗方法不断取得进展,但中晚期结直肠癌患者预后尚无明显改善,5年生存率仍徘徊于50%~60%。肿瘤转移是结直肠癌患者死亡的主要原因,因而研究肿瘤转移相关的机制具有重要的意义。microRNAs(miRNAs)是一类在人体内广泛分布、具有高度保守性的内源性非编码单链小分子RNA,可通过与靶mRNA特异性碱基的配对结合,诱导靶mRNA降解或者阻遏其转录后翻译,参与靶基因的表达调控^[2-3]。miRNAs在调控胚胎发育、免疫应答、细胞分化、血管生成、肿瘤转移等病理生理过程中起重要作用^[4]。在前期实验中,我们通过基因芯片技术筛选出结直肠癌样本中具有差异性表达的miRNAs,其中miR-200c的表达显著下调。miR-200c在乳腺癌、胰腺癌中已被证实具有抑癌功能,但是miR-200c在结直肠癌中的表达及其作用机制尚不明确。本研究拟检测miR-200c在结直肠癌中的表达情况,分析其与患者的临床病理参数的相关性,利用体外细胞实验观察miR-200c对结直肠癌细胞株增殖、侵袭和迁移的影响,探讨其中可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

组织标本:收集2013年1月至2014年12月期间南方医科大学附属东莞人民医院肿瘤外科收治并手术切除结直肠癌患者的石蜡存档标本45例,其中不伴有淋巴结转移者25例,伴有淋巴结转移者20例。所有入选的结直肠癌病例术前均未行放化疗或靶向治疗,术后经病理诊断证实为结直肠癌。本研究使用的组织标本获得医院

伦理委员会批准。细胞系:人肠癌细胞株SW620购自中国科学院上海细胞库。主要试剂:RPMI-1640培养基、Lipofectamine™ 2000购自Life Technologies;RNAiso Plus购自Takara;miRNeasy FFPE Kit购自Qiagen;miRcute miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit、miRcute miRNA qPCR Detection Kit购自TIANGEN;兔抗人 β -actin多克隆抗体购自Abcam;小鼠抗人E-cadherin单克隆抗体、山羊抗人Vimentin多克隆抗体、山羊抗人ZEB1多克隆抗体购自Santa Cruz;Transwell小室购自Corning;Matrigel基质胶购自BD;CCK-8试剂盒购自Beyotime;miR-200c mimics、negative control购自GenePharma。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染 结直肠癌细胞株SW620用含体积分数10%胎牛血清的RPMI-1640培养基在37℃、体积分数为5%CO₂及95%空气饱和湿度条件下培养。取对数生长期的细胞以2×10⁵/孔的密度接种于6孔板中,使用Lipofectamine™ 2000试剂将miR-200c mimics(miR-200c组)、negative control(NC组)转染至SW620,同时仅以Lipofectamine™ 2000试剂转染细胞者设为空白对照组(Blank组)。

1.2.2 RNA提取、cDNA逆转录及Real-time PCR 石蜡包埋组织常规3 μ m厚度切片,苏木素-伊红染色,显微镜下避开出血、坏死区域选取肿瘤组织及邻近正常结直肠粘膜组织,5 μ m厚度切片5张,使用miRNeasy FFPE Kit提取并纯化miRNA。细胞miRNA采用RNAiso Plus提取。应用miRcute miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit(含有通用引物)将miRNA逆转录成cDNA;以cDNA为模板使用miRcute miRNA qPCR Detection Kit进行PCR扩增。miR-200c上游引物序列为5'-ACTGCCGGTAATGATGGA-3';U6上游引物序列为5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'。

1.2.3 Western blot检测蛋白的表达水平 收集细胞加入细胞裂解液RIPA裂解细胞;转移至1.5 mL

的EP管中,12 000 r/min, ($r=8.7$ cm),离心10 min,收集上清液;加入2×样品缓冲液混匀,加热煮沸3~5 min,体积分数为10%聚丙烯酰胺凝胶电泳;0.2 A、15 V电转移至PVDF膜,体积分数为5%脱脂奶粉封闭1 h;分别加入用封闭液稀释的ZEB1(稀释度1:500)、E-cadherin(稀释度1:1 000)、Vimentin(稀释度1:1 000)、 β -actin(稀释度1:1 000)抗体,4℃孵育过夜;TBST洗膜3次,加入相应的第二抗体(稀释度1:1 000),37℃,孵育1.5 h,ECL化学发光显影。

1.2.4 细胞迁移实验 将各组细胞用无血清RPMI-1640培养基制成 1×10^5 /mL的细胞悬液,以每孔200 μ L接种于Transwell的上室,下室加入500 μ L含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基,每组细胞设3个复孔,37℃培养48 h后,40 g/L多聚甲醛固定,用棉签擦去上室细胞,DAPI染色,100倍镜下随机取4个视野,计算迁移细胞数目。

1.2.5 细胞侵袭实验 Matrigel基质胶按1:4稀释后包被Transwell上室,室温放置过夜至凝固,其余实验步骤和计算方法同迁移实验。

1.2.6 CCK-8细胞增殖实验 各组细胞转染后,在不同时间点分别向每孔加入10 μ L CCK-8应用液,置于37℃避光继续培养1 h,用Model 680酶标仪在波长450 nm处读取吸光度值。

1.3 统计学处理

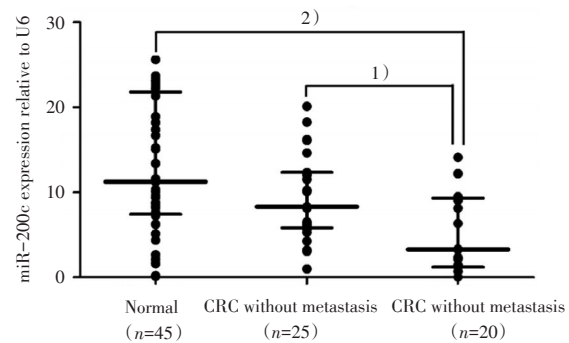
统计学分析采用SPSS 18.0软件包。数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)或中位数(四分位间距)表示。两组间数据比较采用 t 检验。两组间miR-200c表达水平比较及其与临床病理参数的关系分析采用Mann-Whitney U 检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-200c表达情况及临床病理特征分析

利用实时荧光定量RT-PCR和原位杂交技术检测45例结直肠癌组织和配对邻近正常肠粘膜组织中miR-200c的表达水平,结果显示,在伴有淋巴结转移的结直肠癌组织中的miR-200c表达水平明显低于不伴有淋巴结转移的结直肠癌组织和邻近正常肠粘膜组织($P < 0.05$;图1)。miR-200c表达水平与淋巴结转移相关($P < 0.05$),而与患者的年龄、性别、肿瘤分化程度等临床病理

参数无明显相关性($P > 0.05$,表1)。



Expression of miR-200c was analyzed using real-time quantitative RT-PCR. miR-200c was significantly downregulated in primary CRC with lymph node metastasis. 1) $P < 0.05$ vs CRC without lymph node metastasis ($U=138.0$, $P=0.011$); 2) $P < 0.05$ vs adjacent normal mucosa ($U=195.0$, $P=0.000$)

图1 Real-time PCR检测miR-200c在结直肠癌和正常肠粘膜组织中的表达情况

Fig.1 The expression of miR-200c in primary CRC tissues and adjacent normal mucosa

2.2 miR-200c对结直肠癌细胞株增殖能力的影响

实时荧光定量RT-PCR检测结果显示,miR-200c mimics转染可明显上调SW620细胞内miR-200c表达,与阴性对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。CCK-8法检测细胞增殖显示,上调miR-200c的表达可抑制SW620细胞增殖($P < 0.05$;图2)。

2.3 miR-200c对结直肠癌细胞株迁移和侵袭能力的影响

采用Transwell小室装置检测结果显示,过表达miR-200c可抑制SW620细胞株的迁移和侵袭能力($P < 0.05$;图3,4)。

2.4 miR-200c对结直肠癌细胞株上皮间质转化相关因子表达的影响

Western blot检测结果显示,转染miR-200c mimics上调SW620细胞内miR-200c表达后,与阴性对照组相比,ZEB1表达受抑制,上皮表型标志物E-cadherin表达升高,而间质表型标志物Vimentin表达下降($P < 0.05$;图5)。

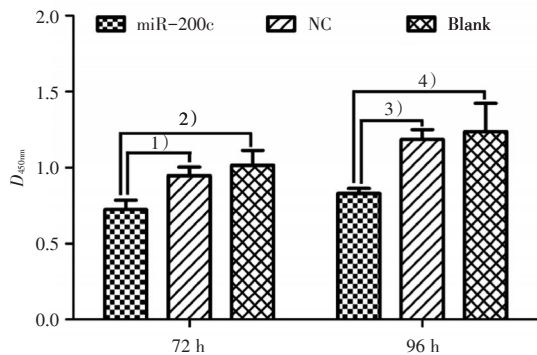
3 讨论

结直肠癌是我国近年来发病率上升较快的恶

表1 miR-200c表达与结直肠癌临床病理参数的关系

Table 1 Correlations of miR-200c expression levels with clinicopathological variables in patients with CRC

Clinicopathological variable	Total [n(%)]	Expression levels of miR-200c in CRC Median (IQR)	U	P
Gender			237.0	0.981
Male	28 (62.2)	6.45 (2.53, 12.21)		
Female	17 (37.8)	8.30 (3.23, 11.78)		
Age			304.0	0.057
≤60	15 (33.3)	6.24 (1.47, 8.30)		
>60	30 (66.7)	9.14 (3.31, 12.23)		
Location			185.5	0.219
Rectal	17 (37.8)	5.65 (1.69, 11.07)		
Colon	28 (62.2)	8.13 (3.77, 12.21)		
Differentiation			150.0	0.073
Poor	5 (11.1)	3.25 (1.34, 6.72)		
Well-Moderate	40 (88.9)	8.21 (3.24, 12.21)		
Lymph node invasion			130.5	0.006 ¹⁾
No	25 (55.6)	8.30 (5.83, 12.35)		
Yes	20 (44.4)	3.29 (1.22, 9.31)		

1): $P < 0.05$ 

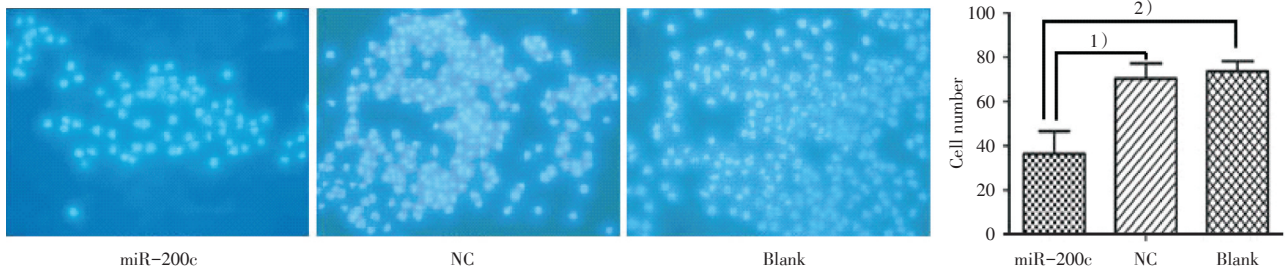
Cell proliferation was measured using the Cell Counting kit-8. Absorbance value was significantly declined at 72 h and 96 h after transfection of miR-200c mimics. At 72 h, 1): $P < 0.05$ vs Negative control (NC) group ($t = -4.734$, $P = 0.009$); 2): $P < 0.05$ vs Blank group ($t = -4.532$, $P = 0.011$); $n = 3$. At 96 h, 3): $P < 0.05$ vs Negative control (NC) group ($t = -8.007$, $P = 0.001$); 4): $P < 0.05$ vs Blank group ($t = -3.813$, $P = 0.019$); $n = 3$.

图2 CCK-8检测miR-200c mimics转染对SW620细胞增殖的影响

Fig.2 The effect of miR-200c on SW620 cell proliferation evaluated using CCK-8

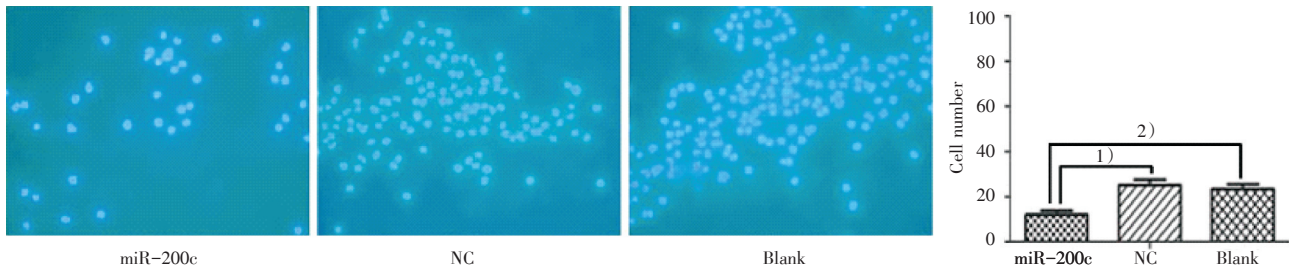
性肿瘤之一。根据国际癌症研究机构(IARC)发布的《Cancer Incidence in Five Continents》(CI5)监测数据显示,2003-2007年间我国上海地区男性结肠癌和直肠肛门癌发病率较1973-1977年间分

别增加138%和31%,而女性分别增加146%和49%^[5]。尽管早期筛查和治疗手段不断获得突破,但是中晚期结直肠癌的死亡率仍然居高不下。肿瘤转移是结直肠癌治疗失败和患者死亡的主要原因。肿瘤转移是一个多阶段、多因素的恶性演进过程,涉及众多基因的异常表达与调控^[6-7]。miR-200c属于miR-200家族成员,其编码基因位于人类12号染色体(12p13.31)。近年研究表明,miR-200c在多种肿瘤中表达失调,通过对其靶基因的转录后调控发挥抑癌基因或促癌基因的作用,参与肿瘤的发生、发展^[8-9]。Ibrahim等^[10]对22例卵巢浆液性癌的miRNA表达谱进行检测分析,发现miR-200c上调最显著,miR-200c通过与DLC-1作用,促进肿瘤细胞增殖与克隆形成能力。Sundarajan等^[11]利用荧光素酶报告基因系统,证实了在乳腺癌细胞中MYLK和TKS5均为miR-200c的靶基因;miR-200c通过下调MYLK和TKS5蛋白的表达,抑制乳腺癌细胞侵袭和迁移。在本研究中,我们发现miR-200c在伴有淋巴结转移的结直肠癌组织中表达明显下调,而在不伴有淋巴结转移的结直肠癌组织和正常肠粘膜组织中表达无显著性差异;miR-200c的表达水平与患者的年龄、性别、肿瘤发生部位、肿瘤分化程度等临床病理参数无关,但与淋巴结转移相关;结直肠癌组织中



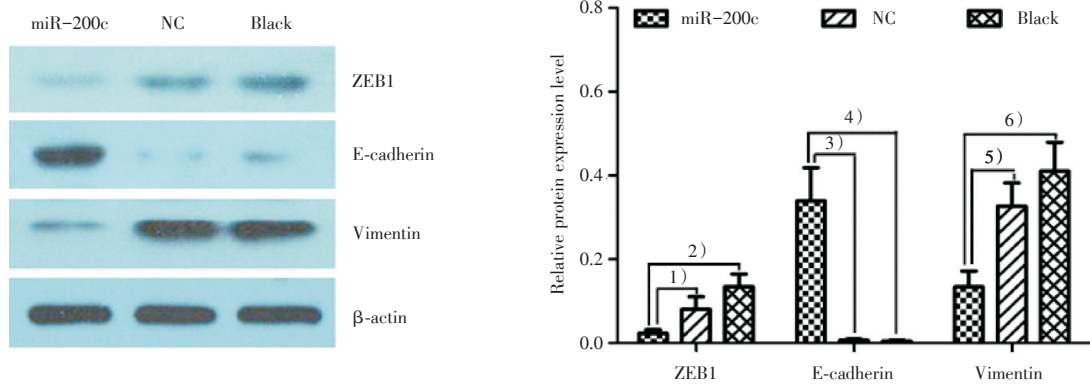
Transwell migration assay of human colorectal adenocarcinoma cell line SW620. Cells in four random fields of view at 100× magnification were counted and expressed as the average number of cells per field of view. 1): $P < 0.05$ vs Negative control (NC) group ($t = -3.122$, $P = 0.035$); 2): $P < 0.05$ vs Blank group ($t = -3.820$, $P = 0.019$); $n = 3$.

图3 上调 miR-200c 表达对 SW620 细胞迁移能力的影响
Fig.3 The effort of miR-200c mimics on SW620 cell migration



Transwell invasion assay of human colorectal adenocarcinoma cell line SW620. Cells in four random fields of view at 100× magnification were counted and expressed as the average number of cells per field of view. 1): $P < 0.05$ vs Negative control (NC) group ($t = -4.255$, $P = 0.013$); 2): $P < 0.05$ vs Blank group ($t = -4.064$, $P = 0.015$); $n = 3$.

图4 上调 miR-200c 表达对 SW620 细胞侵袭能力的影响
Fig.4 The effect of miR-200c mimics on SW620 cell invasion



Western blot analysis showed that miR-200c inhibited the expression of ZEB1 and Vimentin, and increased the expression of E-cadherin. 1): $P < 0.05$ vs Negative control (NC) group ($t = -5.865$, $P = 0.004$); 2): $P < 0.05$ vs Blank group ($t = -3.557$, $P = 0.024$); 3): $P < 0.05$ vs Negative control (NC) group ($t = 4.116$, $P = 0.015$); 4): $P < 0.05$ vs Blank group ($t = 4.053$, $P = 0.0015$); 5): $P < 0.05$ vs Negative control (NC) group ($t = -2.845$, $P = 0.047$); 6): $P < 0.05$ vs Blank group ($t = -3.51$, $P = 0.025$); $n = 3$.

图5 上调 miR-200c 对 ZEB1 和上皮间质转化相关标志物表达的影响
Fig.5 Overexpression of miR-200c inhibited ZEB1, and increased E-cadherin and reduced Vimentin expression

miR-200c 表达水平低的患者更容易发生淋巴结转移,提示 miR-200c 表达下调可能与结直肠癌转移有关。因此,我们进一步观察了 miR-200c 对结

直肠癌细胞株增殖、侵袭和迁移能力的影响。体外细胞实验证实,过表达 miR-200c 可抑制肠癌细胞株的增殖、侵袭和迁移能力,这与 Ceppi 等^[12]在

非小细胞肺癌中的研究结果相类似。

上皮间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)是上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程,在肿瘤的侵袭和转移中发挥重要作用。上皮表型标志物E-cadherin的表达减弱而间质表型标志物Vimentin的表达增强被认为是EMT过程的标志。miR-200c参与调控EMT过程已经在膀胱癌、卵巢癌等多种肿瘤中得到证实^[13-14]。目前研究发现,miR-200c主要通过调节ZEB1/ZEB2、FHOD1、HMGB1、PPM1F等靶点调控EMT^[15]。在本研究中,我们采用蛋白印

迹法观察到过表达miR-200c可抑制SW620细胞中ZEB1表达,上调E-cadherin表达,下调Vimentin表达,据此我们推测miR-200c可能通过抑制上皮间质表型转化过程,参与调控结直肠癌的侵袭和转移。

综上所述,miR-200c过表达能够抑制结直肠癌细胞增殖、侵袭和迁移,在结直肠癌侵袭和转移过程中起重要作用。miR-200c可能通过ZEB1调控上皮间质表型转化过程而介导上述生物学效应,但其具体作用机制仍然有待深入研究。

参考文献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Kim YK, Kim VN. Processing of intronic microRNAs [J]. *EMBO J*, 2007, 26(3): 775-783.
- [3] Okamura K, Hagen JW, Duan H, et al. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila* [J]. *Cell*, 2007, 130(1): 89-100.
- [4] Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M, et al. MicroRNAs--the micro steering wheel of tumour metastases [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(4): 293-302.
- [5] 张玥,石菊芳,黄慧瑶,等. 中国人群结直肠癌疾病负担分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2015, 36(7): 709-714.
Zhang Y, Shi JF, Huang HY, et al. Burden of colorectal cancer in China [J]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 2015, 36(7): 709-914.
- [6] Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework [J]. *Cell*, 2006, 127(4): 679-695.
- [7] Ombrato L, Malanchi I. The EMT universe: Space between cancer cell dissemination and metastasis initiation [J]. *Crit Rev Oncog*, 2014, 19(5): 349-361.
- [8] Mutlu M, Raza U, Saatci Ö, et al. miR-200c: a versatile watchdog in cancer progression, EMT, and drug resistance [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2016, 94(6): 629-644.
- [9] Kumar S, Nag A, Mandal CC. A comprehensive review on miR-200c, a promising cancer biomarker with therapeutic potential [J]. *Curr Drug Targets*, 2015, 16(12): 1381-1403.
- [10] Ibrahim FF, Jamal R, Syafruddin SE, et al. MicroRNA-200c and microRNA-31 regulate proliferation, colony formation, migration and invasion in serous ovarian cancer [J]. *J Ovarian Res*, 2015, 12(8): 56-69.
- [11] Sundararajan V, Gengenbacher N, Stemmler MP, et al. The ZEB1/miR-200c feedback loop regulates invasion via actin interacting proteins MYLK and TKS [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(29): 27083-27096.
- [12] Ceppi P, Mudduluru G, Kumarswamy R, et al. Loss of miR-200c expression induces an aggressive, invasive, and chemoresistant phenotype in non-small cell lung cancer [J]. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(9): 1207-1216.
- [13] Chen D, Zhang Y, Wang J, et al. MicroRNA-200c overexpression inhibits tumorigenicity and metastasis of CD117+CD44+ ovarian cancer stem cells by regulating epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Ovarian Res*, 2013, 6(1): 50-60.
- [14] Neves R, Scheel C, Weinhold S, et al. Role of DNA methylation in miR-200c/141 cluster silencing in invasive breast cancer cells [J]. *BMC Res Notes*, 2010, 3(1): 219-223.
- [15] Jurmeister S, Baumann M, Balwierz A, et al. MicroRNA-200c represses migration and invasion of breast cancer cells by targeting actin-regulatory proteins FHOD1 and PPM1F [J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(3): 633-651.

(编辑 余菁)