

论著·基础研究

miRNA-19a 对结肠癌 LoVo 细胞生物学特性影响的机制研究

杨庚¹, 李昱², 贺亚峰³

(陕西省西安市武警工程大学医院:1. 检验科;2. 卫勤科;3. 内科, 陕西西安 710086)

摘要:目的 探讨微小 RNA(miRNA)-19a 对结肠癌 LoVo 细胞生物学特性影响的可能机制。方法 采用脂质体介导的转染方法将 miRNA-19a 模拟物转染到人结肠癌细胞系 LoVo 细胞;检测转染后 miRNA-19a 基因的表达;利用 CCK8 试剂盒检测细胞的增殖能力, TUNEL 法检测细胞凋亡影响, 细胞侵袭小室法检测细胞的体外侵袭力, RT-PCR 和 Western blot 检测 Hsp90/Akt 信号通路的变化。结果 转染 miRNA-19a 的结肠癌 LoVo 细胞, miRNA-19a 表达上调, 细胞体外增殖能力增强, 细胞凋亡减少, 细胞的侵袭力增强;细胞 Hsp90 和 Akt 的基因和蛋白表达升高。结论 miRNA-19a 可通过上调 Hsp90/Akt 信号通路表达, 促进 LoVo 细胞增殖, 减少细胞凋亡, 增强 LoVo 细胞的侵袭能力。

关键词:miRNA-19a; 结肠癌; LoVo 细胞; 生物学特性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.05.005

中图法分类号:R735.3+5;R394.3

文章编号:1673-4130(2018)05-0530-04

文献标识码:A

The mechanism study of miRNA-19a impacting on biological characteristics of colon cancer LoVo cell

YANG Geng¹, LI Yu², HE Yafeng³

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Medical Services Section; 3. Department of Internal Medicine, People's Armed Police Hospital Engineering University of Xi'an City, Xi'an, Shaanxi 710086, China)

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of miRNA-19a impacting on biological characteristics of colon cancer Lovo cell. **Methods** miRNA-19a mimics was transfected into human colon cancer cell line LoVo cells by liposome mediated transfection. The expression of miRNA-19a gene after transfection was detected. Cell proliferation was detected by CCK8 Kit. The effect of apoptosis was detected by TUNEL method. In vitro invasiveness of cells was detected by cell invasion chamber method. Hsp90/Akt signaling pathways changes were detected by RT-PCR and Western blot. **Results** The expression of miRNA-19a were increased. The ability of proliferation were promoted in vitro. The cell apoptosis was reduced. The cell invasion was increased. The expression of Hsp90 and Akt gene and protein were increased. **Conclusion** miRNA-19a could enhance Lovo cell invasion ability by the method of raising the expression of Hsp90 and Akt signaling pathways, accelerating LoVo cell proliferation, reducing cell apoptosis.

Key words:miRNA-19a; colon cancer; LoVo cells; biological characteristics

结肠癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,其病死率高,在肿瘤中居第 2 位^[1]。在过去几十年中,结肠癌发病率仍呈上升趋势。近年来,随着医疗技术的发展,虽然越来越多的结肠癌患者在早期即可确诊,并可得到及时、恰当的治疗,但是仍有患者需要手术治疗且效果并不明显^[2]。因此,采用新的方法治疗结肠癌是十分必要的。微小 RNA(miRNAs)是内源性的非编码 RNAs,长度为 20~25 nt,在转录水平上调节基因表达^[3],其具有相对分子质量小、特异性高等优点,在多种病理生理过程中起重要作用,约有 30% 的基因受到 miRNAs 调节^[4]。miRNA 通过外来体或者连接蛋白来调节细胞内信号通路,miRNAs 作用在细胞接收器上,起到肿瘤抑制的作用,在多种肿瘤细胞

中均检测出异常 miRNAs。也有研究报道^[5],miRNA-19a 对胃癌细胞生长起到促进作用,同时可通过调节细胞抑制信号因子抑制肿瘤细胞的增殖,说明 miRNA-19a 有抑制癌细胞的作用。但是 miRNA-19a 对人结肠癌细胞系 LoVo 细胞的作用及机制的研究尚不充分,因此,本研究拟探讨 miRNA-19a 的作用机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 结肠癌 LoVo 细胞购自中国医学科学院,由本实验室冷冻保存。L-DMEM 培养基、胎牛血清和混合抗菌药物(青霉素、链霉素)购自 GIBCO 公司,胰蛋白酶购自 Sigma 公司,RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司, CCK8 溶液购自 Dojindo 公司, Tran-

作者简介:杨庚,男,主管技师,主要从事临床免疫研究。

本文引用格式:杨庚,李昱,贺亚峰. miRNA-19a 对结肠癌 LoVo 细胞生物学特性影响的机制研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(5): 530-

swell 侵袭小室购自 Chemicon 公司,多克隆兔抗体 Hsp90 和 Akt 购自 Proteintech 公司, GAPDH 抗体购自 Bioworld 公司,二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体)购自优维宁生物技术公司, RIPA 裂解液购自碧云天公司。

1.2 方法 实验于 2014 年 8 月至 2015 年 5 月在陕西省医学实验动物中心实验室完成,采用随机对照动物实验。

1.2.1 结肠癌 LoVo 细胞体外培养建立实验模型及实验分组 小心取出已冻存的结肠癌 LoVo 细胞(防止冷冻管爆裂),放入 37℃ 水浴,不间断、轻轻摇动冷冻管,使其充分融化 1 min,融化后,放置于无菌操作台中,吸取解冻完成的细胞悬浮液,加至预先配置好的 1:10 稀释的 L-DMEM 培养基,并将细胞接种于培养瓶中,静置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。培养 2~3 d 后更换新鲜培养基,将培养至第 3 代的结肠癌 LoVo 细胞分为转染组、阴性转染组和空白对照组。

1.2.2 脂质体介导 miRNA-19a 转染人结肠癌细胞系 LoVo 细胞 miRNA-19a 引物购自 AuGCT 公司,依据 YAMAMOTO 等^[5]检测出的 miRNA-19a 基因序列。合成的转染的 miRNA-19a 正向序列为 5'-AUC CGC GCG AUA GUA CGU AUU-3',反向序列为 5'-UAC GUA CUA UCG CGC GGA UUU-3'。阴性转染组 miRNA-19a 的正向序列为 5'-UGU GCA AAU CUA UGC AAA ACU GA -3',反向序列为 5'-UUA GUU UUG CAU AGU UGC AC-3'。依据试剂盒说明书的要求,在转染试剂 Lipofectamine 2000 下进行转染。合成复合物的条件为:转染组为 5 μL 的 miRNA-19a 溶液,5 μL 的 Lipofectamine 2000 转染试剂和 2 mL 的新鲜培养基;阴性转染组为 5 μL 的对照 miRNA-19a 溶液,5 μL 的 Lipofectamine 2000 转染试剂和 2 mL 的新鲜培养基;空白对照组为 2 mL 的新鲜培养基静置转染 20 min,7 h 后更换新鲜培养基。转染组、阴性转染组和空白对照组均多次转染,培养 48 h 后进行实验。

1.2.3 检测转染后 miRNA-19a 基因的表达 总 RNA 从转染 48 h 后的人结肠癌细胞系 LoVo 细胞中提取,按 Gbeo 公司 Trizol Total Isolation Reagent 说明书进行提取总 RNA 并以总 RNA 的 miRNA 为模板,参照说明书的逆转录酶法反转录合成 cDNA,在扩增仪上进行 RT-PCR。miRNA-19a 的上游引物为 5'-CTC TGA CGT TGA ACT GAG CTT TT-3',下游引物为 5'-GCA ATC TGA AAT GCC AAA GTG-3',扩增目的基因片段长度为 126 bp。内参物 GAPDH 的上游序列为 5'-GGT GGT CTC CTC TGA CTT CAACA-3',下游序列为 5'-GTT GCT GTA GCC AAATTC GTT GT-3',扩增目的基因片段长度为 127 bp。将 PCR 产物 10 μL 于 2% 琼脂糖凝胶电泳,采用凝胶自动成像及分析系统,电泳结果用凝胶图像分

析系统分析电泳条带吸光度(A)值,计算 S100A11 与 GAPDH 的 A 比值,各组实验均需重复 3 次。

1.2.4 利用 CCK8 试剂盒检测细胞的增殖能力 转染组、阴性转染组和空白对照组的结肠癌 LoVo 细胞被 miRNA-19a 转染后,平铺于 96 孔板中,细胞浓度为 1×10^5 个/100 μL。室温下,放置于 5% CO₂ 培养箱中预孵育培养板中的细胞,分别测定 3 组细胞的增殖活力。在 96 孔板中,每孔加入 10 μL CCK-8,3 组细胞分别于 37℃ 下,5% CO₂ 培养箱培养 2 h。用紫外分光光度计对转染组、阴性转染组和空白对照组的结肠癌 LoVo 细胞增殖活性进行测量,测定波长为 450 nm。

1.2.5 TUNEL 法检测细胞的凋亡情况 检测结肠癌 LoVo 细胞的凋亡情况,需严格按照贝克曼库尔特公司试剂盒说明书进行操作。标记 dUTP 缺口末端,该末端以脱氧核苷酸转移酶转导。分别将 miRNA-19a 转染后的转染组、阴性转染组和空白对照组的结肠癌细胞系 LoVo 细胞,采用多聚甲醛固定。每片标本加入 5 μL/片的 TUNEL 混合液和 50 μL 的 POD 转化剂,将各组标本片放置于 37℃ 湿盒中,30 min, PBS 冲洗 3 次,每次 5~6 min。中性树胶封片,光学显微镜下观察,棕黄色为凋亡细胞核,深蓝色为未凋亡细胞核,结肠组织的凋亡情况由凋亡指数(AI)表示。

1.2.6 细胞侵袭小室法检测细胞的体外侵袭力 聚碳酸酯微孔膜分隔的侵袭小室,置于全培养液中,并在培养液中加入 1 000 μL,10% 小牛血清,静置 2 h,用胰蛋白酶消化被 miRNA-19a 转染后的结肠癌细胞系 LoVo 细胞和被 miRNA-19a 阴性转染的结肠癌细胞系 LoVo 细胞,不含血清的培养基洗涤多次,并用 0.1% BSA 的全培养基重悬细胞,细胞计数约为 2×10^5 个/mL。将小室置于 37℃ 下,5% CO₂ 培养箱中过夜。取出后,在高倍光镜下观察,随机挑选 10 个视野,分别对被 miRNA-19a 转染后的结肠癌细胞系 LoVo 细胞和被 miRNA-19a 阴性转染的结肠癌细胞系 LoVo 细胞进行计数,细胞的侵袭力即为计算的均值^[6]。

1.2.7 RT-PCR 检测 Hsp90 与 Akt 信号通路的变化 总 RNA 从转染组结肠癌细胞系 LoVo 细胞和阴性转染组结肠癌细胞系 LoVo 细胞中提取。按 Gbeo 公司 Trizol Total Isolation Reagent 说明书进行提取总 RNA 并以总 RNA 的 miRNA 为模板,参照说明书的逆转录酶法反转录合成 cDNA,在扩增仪上进行 RT-PCR。吸取 2 μL 悬浮细胞液,上、下游引物各加入 1 μL 悬浮细胞液。Hsp90 的上游引物为 5'-GCA GCA AAG AAA CAC CTG GAG-3',下游引物为 5'-TCC ATG CGT GAT GTG TCG TC-3',扩增目的基因片段长度为 302 bp^[7]。Akt 的上游引物为 5'-AAT ACC TGG TGT CGG TCT CA-3',下游引物为 5'-TCG AGC TCA TCC TAA TGG AG-3',扩增目的基因片段长度为 210 bp。内参物 β-actin 的上游序列为

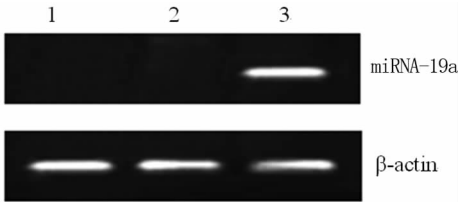
5'-CCG ACA GGA TGC AGA AGG AGA T-3',下游序列为 5'-GTC AAG AAA GGG TGT AAC GCA ACT-3',扩增目的基因片段长度为 238 bp。用凝胶图像分析系统分析电泳条带 A 值,计算与 β -actin A 的比值。

1.2.8 Western blot 检测 Hsp90 与 Akt 信号通路的变化 转染组和阴性转染组的人结肠癌细胞 LoVo 细胞,加入 100 μ L 含有蛋白抑制剂 PMSF 的 RIPA 细胞裂解液(预先冰浴 10 min),测定蛋白含量^[8]。4%聚丙烯酰胺凝胶电泳后封闭 1 h。一抗稀释后放入培养皿中,加入 PVDF 膜,4 $^{\circ}$ C 恒温过夜,过夜振荡孵育后,取出聚偏氟乙烯膜,用 TBS 液冲洗多次,每次浸润 5 min。与二抗反应,常温下振荡孵育 2 h,取出聚偏氟乙烯膜,用 TBS 液冲洗多次,每次浸润 5 min。按照说明书要求,对 PVDF 膜进行荧光染色、曝光、显影、定影,通过 Alpha2200 图像分析仪对各组条带扫描拍照,进行半定量分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行统计学分析,所有计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间的数据比较采用方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 miRNA-19a 基因的表达 通过 RT-PCR 法检测的转染组、阴性转染组和空白对照组人结肠癌细胞系 LoVo 细胞 miRNA-19a 基因的表达,转染组 miRNA-19a 表达水平较高,而阴性转染组和空白组未发现 miRNA-19a 基因的表达,见图 1。



注:1~3 分别为空白对照组、阴性转染组、转染组

图 1 各组 miRNA-19a 基因的表达

2.2 细胞的增殖能力 对转染组、阴性转染组和空白对照组的人结肠癌细胞系 LoVo 细胞进行了 CCK-8 细胞增殖试验,结果表明,空白对照组、阴性转染组、转染组的 A 值分别为 0.748 ± 0.026 、 0.893 ± 0.017 、 1.246 ± 0.035 ,转染了 miRNA-19a 基因的转染组 LoVo 细胞增殖能力明显增强,高于阴性转染组($t=20.2860$, $P<0.01$)和空白对照组($t=10.4373$, $P<0.01$),差异均有统计学意义。

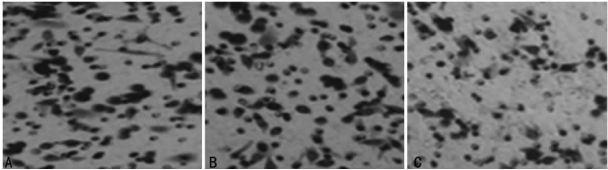
2.3 细胞凋亡情况 TUNEL 法检测结果显示,棕黄色为凋亡细胞核,深蓝色为未凋亡细胞核;转染组的人结肠癌细胞系 LoVo 细胞凋亡情况得到明显改善,细胞凋亡数量较少,且明显低于阴性转染组和空白对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。阴性转染组的细胞凋亡数量低于空白对照组,空白对照组呈现正常生理规律的细胞凋亡情况,见图 2。

2.4 细胞的体外侵袭力 对比转染组、阴性转染组和空白对照组的人结肠癌细胞系 LoVo 细胞的细胞体外侵袭能力,发现转染组的细胞侵袭能力明显高于阴性转染组,因此推测转染 miRNA-19a 基因可提高细胞的侵袭能力,见图 3。



注:A 为空白对照组;B 为阴性转染组;C 为转染组

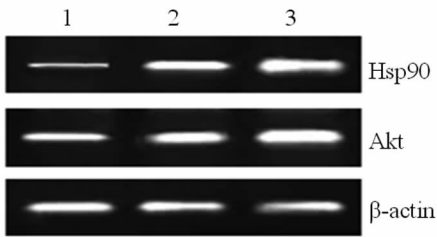
图 2 各组 LoVo 细胞凋亡情况($\times 200$)



注:A 为空白对照组;B 为阴性转染组;C 为转染组

图 3 各组 LoVo 细胞的侵袭力($\times 200$)

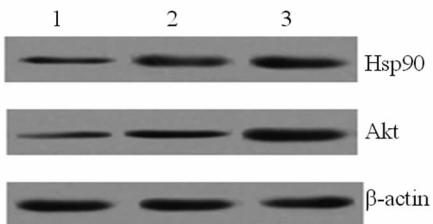
2.5 Hsp90 与 Akt 的 miRNA 表达 由 RT-PCR 检测转染组、阴性转染组和空白对照组的结果显示,转染 miRNA-19a 基因的结肠癌细胞 LoVo 细胞的 Hsp90 和 Akt 表达水平升高后,阴性转染组的信号通路 Hsp90 和 Akt 的 miRNA 表达水平明显低于转染组,但高于空白对照组,空白对照组的信号通路 Hsp90 和 Akt 的 miRNA 表达水平最低,见图 4。



注:1~3 分别为空白对照组、阴性转染组、转染组

图 4 各组 Hsp90 和 Akt 的 miRNA 表达

2.6 Hsp90 与 Akt 的蛋白表达 转染组、阴性转染组和空白对照组的信号通路 Hsp90 和 Akt 的蛋白表达结果显示,可见转染组的 Hsp90 和 Akt 蛋白表达明显高于阴性转染组和空白对照组,阴性转染组的 Hsp90 和 Akt 信号通路表达高于空白对照组,各组间差异具有统计学意义($P<0.05$),Western blot 的蛋白检测结果与 RT-PCR 的 miRNA 检测结果一致,见图 5。



注:1~3 分别为空白对照组、阴性转染组、转染组

图 5 各组 Hsp90 和 Akt 的蛋白表达

3 讨 论

结肠癌难以治愈、复发率较高、易发生转移,因此治疗结肠癌具有很高的难度。近年来,利用 miRNA 治疗恶性肿瘤,也成为新的治疗方法。miRNA 可调节不同的肿瘤过程,包括肿瘤形成、肿瘤复发和肿瘤细胞的转移^[9]。miRNA 调节基因的转录水平,其作用机制为与靶分子 miRNA 的 3'-UTR 区域进行特异性识别并结合,加速靶分子的 miRNA 的降解,同时抑制翻译过程^[10]。miRNA-17-92 家族是 miRNA 的重要组成部分,该家族共有 6 个 miRNA,分别为 miRNA-19a、miRNA-19b、miRNA-17、miRNA-92a、miRNA-18a、miRNA-20a。已有研究表明,肝癌、恶性黑色素瘤和 B 细胞淋巴瘤等恶性肿瘤都与 miRNA-17-92 的调节有关^[11]。而 miRNA-19a 和 miRNA-19b 是 miR-17-92 家族中的重要成员,参与多种肿瘤形成的调节作用^[12]。miRNA-19a 的调节机制尚未明确,但已有研究表明 miRNA-19a 和 miR-19b 参与了细胞新陈代谢、血管生成、细胞自噬相关的细胞信号通路、细胞周期和其他癌症通路的调节过程^[13]。

Akt 是一种氨基酸蛋白激酶,称为蛋白激酶 B (PKB),可磷酸化特异蛋白的丝氨酸/苏氨酸蛋白位点,调节特异蛋白^[14]。Akt 是信号转导通路的关键靶点之一,卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌及胃癌等均与 Akt 有关,肿瘤细胞中可以检测出 Akt 的高水平表达,Akt 很可能是致癌因子。热休克蛋白 90-Hsp90 可与 Akt 结合,改变 Akt 的三维结构,使其可以维持高活性并充分发挥作用。Hsp90 与 Akt 相结合,可促进细胞凋亡,降低细胞增殖,抑制细胞活性^[15]。本研究中,用脂质体介导的方法将 miRNA-19a 转染至人结肠癌细胞系 LoVo 细胞。通过检测 miRNA-19a 基因,可以发现 miRNA-19a 基因在人结肠癌细胞系 LoVo 细胞中得到高水平表达,这为后续研究提供了物质基础。利用 CCK8 试剂盒检测结果,转染 miRNA-19a 的人结肠癌细胞系 LoVo 细胞后,细胞增殖能力明显增强,明显高于阴性转染组和空白对照组的细胞增殖能力。TUNEL 和细胞侵袭小室法分别检测细胞凋亡和体外侵袭力,转染组的细胞凋亡数量明显低于阴性转染组和空白对照组,侵袭能力却明显高于阴性转染组和空白对照组。可见转染了 miRNA-19a 基因,可提高人结肠癌细胞系 LoVo 细胞的增殖能力和细胞侵袭能力、同时较少细胞的凋亡。通过 RT-PCR 和 Western blot 检测 Hsp90/Akt 信号通路的 miRNA 和蛋白的表达水平,转染组的 Hsp90 和 Akt 的 miRNA 和蛋白的表达水平均高于阴性转染组和空白对照组。

因此,miRNA-19a 基因可提高结肠癌细胞系 LoVo 细胞的增殖能力和细胞侵袭能力,减少细胞凋亡的机制很可能是上调 Hsp90/Akt 信号通路的表达。本研究结果显示,上调 miRNA-19a 可提高 Hsp90/

Akt 信号通路表达,促进 LoVo 细胞增殖,减少细胞凋亡,增强 LoVo 细胞的侵袭能力。本研究为结肠癌的治疗提供了新的方法和依据。

参考文献

- [1] ZHENG Z X,ZHENG R S,ZHANG S W,et al. Colorectal cancer incidence and mortality in China,2010[J]. Asian Pac J Cancer Prev,2014,15(19):8455-8460.
- [2] WANG M J,WANG Z Q,WANG R,et al. The elderly patients with colorectal cancer need careful multidisciplinary evaluation and optimizing comprehensive management [J]. Int J Colorectal Dis,2015,30(5):713-714.
- [3] 万慧芳,余波,涂硕,等. 川芎嗪对人结肠癌 LoVo 细胞增殖与凋亡的影响[J]. 中成药,2014,36(7):1367-1371.
- [4] THURINGER D,JEGO G,BERTHENET K,et al. Gap junction-mediated transfer of miR-145-5p from microvascular endothelial cells to colon cancer cells inhibits angiogenesis[J]. Oncotarget,2016,7(19):28160-28168.
- [5] YAMAMOTO K,ITO S,HANAFUSA H,et al. Uncovering direct targets of miRNA-19a involved in lung cancer progression [J]. PLoS One,2015,10(9):e0137887.
- [6] 滕家安,秦俭. 甘精胰岛素对人结肠癌 LOVO 细胞作用的研究[J]. 中国临床新医学,2015,8(10):897-901.
- [7] 张永国,郭晓钟,王红红,等. miR-187 影响结肠癌 LOVO 细胞恶性生物学行为的研究[J]. 现代肿瘤医学,2014,22(1):26-29.
- [8] CHEN X J,SHI K Q,WANG Y Q,et al. Clinical value of integrated-signature miRNAs in colorectal cancer:miRNA expression profiling analysis and experimental validation [J]. Oncotarget,2015,6(35):37544-37556.
- [9] 叶亚峻,朱小存,朱治淮,等. 靶向蛋白酪氨酸磷酸酶 1 B 小分子干扰 RNA 对结肠癌 LoVo 细胞增殖和成瘤能力的影响[J]. 交通医学,2013,27(1):21-26.
- [10] VALIUNAS V,WANG H Z,LI L,et al. A comparison of two cellular delivery mechanisms for small interfering RNA [J]. Physiol Rep,2015,3(2):e12286.
- [11] 王辉,张滩,张伟,等. 非小细胞肺癌中 miRNA-19a 和 miR-19b 的表达及临床意义[J]. 现代肿瘤医学,2015,23(21):3078-3081.
- [12] HONG X,SIN W C,HARRIS A L,et al. Gap junctions modulate glioma invasion by direct transfer of microRNA [J]. Oncotarget,2015,6(17):15566-15577.
- [13] 袁琦,张征,胡小宣,等. 姜黄素对人结肠癌 Lovo 细胞 VEGF 表达的影响[J]. 中外医疗,2014,34(35):35-37.
- [14] 王天宝,石汉平,韩方海,等. 细胞自噬与结肠癌 Lovo 细胞迁移和侵袭的相关性研究[J]. 中华结直肠疾病电子杂志,2013,2(2):15-18.
- [15] ZHANG S Z,TAO L,PENG Y X,et al. Gap junctions enhance the antiproliferative effect of microRNA-124-3p in glioblastoma cells [J]. J Cell Physiol,2015,230(10):2476-2488.