

MiR-200c 调节人结肠癌 SW480 细胞 迁移与侵袭的分子机制研究

何平*, 宋辉, 梁杰雄, 邵天松, 张钊, 李洋
(首都医科大学附属北京安贞医院普外科, 北京 100029)

摘要:目的 探究 miR-200c 对人结肠癌 SW480 细胞侵袭和迁移的影响及其相关机制。方法 将 SW480 细胞分为类似物转染组(转染 miR-200c 类似物)、抑制物转染组(转染 miR-200c 核酸抑制剂)、类似物阴性对照组(转染 miR-200c 类似物的无义序列)、抑制物阴性对照组[加入 miR-200c 核酸抑制剂的载体(不含 miR-200c 核酸抑制剂)]以及空白组(不进行任何处理)。实时定量聚合酶链式反应(real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)检测 12 h 和 24 h 转染效率。细胞划痕实验和 transwell 侵袭实验检测细胞迁移和侵袭。Western blot 法检测转染后 β -catenin 和 E-cadherin 的表达。结果 细胞划痕实验显示,类似物转染组 12 h 和 24 h 后伤痕宽度均高于类似物阴性对照组(均 $P < 0.05$),抑制物转染组均低于抑制物阴性对照组(均 $P < 0.05$)。Transwell 实验显示,与类似物阴性对照组和抑制物阴性对照组比较,类似物转染组 24 h 和 48 h 通过 8 μm 孔径的细胞数减少,抑制物转染组增多(均 $P < 0.05$)。类似物转染组 β -catenin 和 E-cadherin 的表达均升高,抑制物转染组各蛋白表达均下降(均 $P < 0.05$)。结论 miR-200c 可能通过 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制 SW480 细胞的侵袭和迁移。

关键词:结肠肿瘤/病理学;微 RNAs;细胞运动;肿瘤浸润;Wnt 蛋白质类/代谢; β 连环素/代谢;信号传导;肿瘤细胞,培养的

中图分类号:R735.3⁺5;R730.23 文献标志码:A 文章编号:1001-1692(2019)03-0210-05

Molecular mechanisms of miR-200c regulating invasion and migration of human colon cancer SW480 cells

He Ping, Song Hui, Liang Jiexiong, Shao Tiansong, Zhang Zhao, Li Yang

(Department of General Surgery, Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing 100029, China)

Corresponding to: He Ping, E-mail: 149155918@qq.com

Abstract: Objective To explore the effect of miR-200c on the invasion and migration of human colon cancer SW480 cells. **Methods** SW480 cells were divided into the analogue transfection group (SW480 cells transfected with miR-200c mimics), inhibitor transfection group (SW480 cells transfected with miR-200c nucleic acid inhibitor), analogue negative control group (SW480 cells transfected with miR-200c mimics nonsense sequence), inhibitor negative control group (SW480 cells added with miR-200c nucleic acid inhibitor carrier, without miR-200c nucleic acid inhibitors), and blank group (SW480 cells without any treatment). Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the transfection efficiency at 12 h and 24 h. Scratch experiments and transwell assays were used to detect cell migration and invasion. Western blot was used to detect the expression of β -catenin and E-cadherin after transfection. **Results** Scratch experiments showed that the wound widths at 12 h and 24 h of the analogue transfection group were higher than those in the analogue negative control group (both $P < 0.05$); and those of the inhibitor transfection group were lower than those of the inhibitor negative control group (both $P < 0.05$). Transwell assays showed that, compared with the analogue negative con-

收稿日期:2017-11-24

DOI:10.13267/j.cnki.syzlzz.2019.03.004

基金项目:国家自然科学基金(30972886)

作者简介:何平(1972-),男,北京人,副主任医师,博士,消化道肿瘤的基础与临床研究

* 通信作者 E-mail:149155918@qq.com

trol and inhibitor negative control groups, the number of cells passing through the 8 μm pore was significantly decreased at 24 h and 48 h in the analogue transfection group, and was significantly increased in the inhibitor transfection group (all $P < 0.05$). The expressions of β -catenin and E-cadherin were increased in the analogue transfection group, and the expression of each protein in the inhibitor transfection group was decreased significantly (all $P < 0.05$). **Conclusion** miR-200c can inhibit the invasion and migration of SW480 cells through Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words: colonic neoplasms/pathology; microRNAs; cell movement; neoplasm invasiveness; Wnt proteins/metabolism; beta catenin/metabolism; signal transduction; tumor cells, cultured

结肠癌的发病率呈逐年攀升的趋势,是发病率较高的胃肠道肿瘤。结肠肿瘤可沿肠壁进行环形发展,向肠壁深层浸润或沿肠管纵轴上下蔓延,不但能够进行局部侵犯,还能够进行扩散与转移。虽然还没有完全清楚结肠癌的发病机制,但值得指出的是结肠癌的发生和发展与癌前疾病、环境和遗传因素密切相关。结肠癌的侵袭与迁移可能与 miR-200 家族成员的作用相关。miR-200c 属于 miR-200 家族成员之一^[1-3],上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)可能与上述 miR-200 家族成员的异常表达密切相关,也就是说在上皮细胞转化为间质细胞的过程中,细胞具有入侵与转移的功能,这些功能不但参与器官纤维化和受损组织的愈合等生理过程,还参与癌症的发生和发展。我国目前尚无关于 miR-200c 参与癌症发生与发展的系统性研究。外源性微小核糖核酸(microribonucleic acid, miRNA)包括 miRNA 类似物与抑制物目前已经成功应用于探索干扰靶基因的功能和表达等方面。本文通过 miRNA 类似物以及抑制物改变结肠肿瘤细胞 miR-200c 表达探讨 miR-200c 对结肠肿瘤细胞生物学行为的影响以及其作用机制,以期为结肠癌治疗提供思路和理论支持。

1 材料与方法

1.1 试剂及细胞株

L-15 培养液(上海哈灵公司);脂质体 2000(上海拜力生物科技有限公司);miR-200c 类似物(miR-200c mimics)及 miR-200c 抑制物(miR-200c 核酸抑制剂)(上海拜力生物科技有限公司);人结肠癌细胞株 SW480(上海拜力生物科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 采用 L-15 培养液(含有 10% 胎牛血清),5% CO_2 37 $^\circ\text{C}$ 条件下进行 SW480 细胞培养。

1.2.2 分组 SW480 细胞分为类似物转染组(转染 miR-200c 类似物)、抑制物转染组(转染 miR-200c 核酸抑制剂)、类似物阴性对照组(转染 miR-

200c 类似物的无义序列)、抑制物阴性对照组[加入 miR-200c 核酸抑制剂的载体(不含 miR-200c 核酸抑制剂)]以及空白组(不进行任何处理)。

1.2.3 细胞转染实验 于 6 孔细胞培养板上接种处于对数期生长且经消化后的细胞,每孔的细胞数为 $(4 \sim 5) \times 10^5$ 个。当细胞融合 50% ~ 60% 时,按照脂质体 2000 说明书操作步骤转染 SW480 细胞,无义序列和 miR-200c 类似物以 50 nmo/L 为终浓度进行转染,无义序列和 miR-200c 抑制物以 100 nmo/L 为终浓度进行转染;总 RNA 的提取采用 Trizol 法,选择 miR-200c 特异性引物和反转录酶进行 cDNA 的合成,保存于 -20 $^\circ\text{C}$ 冰箱中备用。miR-200c 表达水平的检测采用荧光定量 PCR,具体反应条件如下:95 $^\circ\text{C}$ 预变性 20 s,95 $^\circ\text{C}$ 变性 10 s,60 $^\circ\text{C}$ 退火 20 s,70 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 s,共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 进行数据分析。

1.2.4 Western blot 检测 对转染 24 h 以及 48 h 的细胞进行收集,核蛋白提取采用核蛋白提取试剂盒(生工生物工程上海股份有限公司)并严格按照说明书中具体步骤操作;核蛋白分离采用聚丙烯酰胺凝胶电泳,80 V 恒压向 PVDF 膜转移;以 BSA 进行 1 h 的封闭,分别加入羊抗人 β -catenin 抗体(按照 1:300 稀释,购自上海优宁维生物科技有限公司)和 E-cadherin 抗体(按照 1:300 稀释,购自北京义翘神州科技有限公司),在 4 $^\circ\text{C}$ 的条件下过夜培养。第 2 天在室温条件下培养 0.5 h,洗膜,加入二抗(辣根过氧化物酶标记,按照 1:200 稀释),室温条件下培养 1 h。图像通过凝胶成像系统进行采集。

1.2.5 细胞划痕实验 转染后细胞于 5% CO_2 37 $^\circ\text{C}$ 条件下过夜培养。第 2 天采用移液枪头在 6 孔板上垂直划线,以磷酸盐缓冲液洗涤 3 次,加入不含血清培养液;分别于 0 h、12 h 和 24 h 时对划痕处细胞迁移情况进行观察,拍摄照片;伤痕的宽度使用 Image-proplus 6.0 进行检测。SW480 细胞伤痕平均面积与 SW480 细胞伤痕长度之比即为 SW480 细胞伤痕宽度。

1.2.6 Transwell 细胞侵袭实验 在培养小室上铺采用 L-15 培养液 8 倍稀释的 Matrigel 基质胶,对稀释后 SW480 细胞进行接种;下室加入 500 μL 浓度为 15% 血清的 L-15 培养液,每组均设置 3 个复孔,5% CO_2 37 $^\circ\text{C}$ 条件下培养 24 h 和 48 h 后,将 transwell 小室取出,将孔中的培养液弃去,以 PBS 进行 3 次洗涤,染色采用浓度为 0.1% 的结晶紫,25 min 后以棉签将膜上层细胞去除。10 倍镜下随机选择 5 个视野计数,取平均数。所有实验重复 3 次。聚碳酸酯滤膜孔径为 8 μm 。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计学软件作数据分析。计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析或重复测量的方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。计数资料采用频数(百分比)表示,多组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-200c 对 SW480 细胞迁移能力的影响

细胞划痕实验显示(图 1),12 h 后类似物转染组和类似物阴性对照组伤痕宽度分别为 (589.60 ± 17.28) μm 和 (465.32 ± 16.60) μm ($P < 0.05$)。24 h 后类似物转染组和类似物阴性对照组伤痕宽度分别为 (523.82 ± 57.13) μm 和 (393.98 ± 7.53) μm ($P < 0.05$)。12 h 后抑制物转染组和抑制物阴性对照组伤痕宽度分别为 (430.92 ± 20.76) μm 和 (485.63 ± 16.65) μm ($P < 0.05$)。24 h 后抑制物转染组和抑制物阴性对照组伤痕宽度分别为 (221.37 ± 44.37) μm 和 (441.21 ± 22.40) μm ($P < 0.05$)。

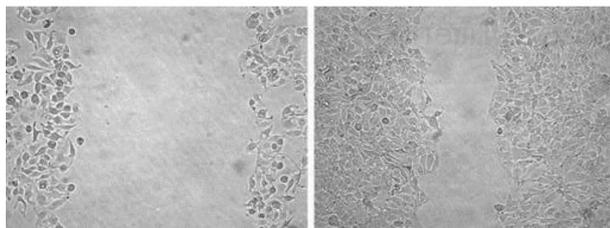


图 1 miR-200c 对 SW480 细胞迁移能力的影响($\times 100$)
Fig. 1 Effect of miR-200c on the migration of SW480 cells ($\times 100$)

2.2 miR-200c 对 SW480 细胞侵袭能力的影响

Transwell 侵袭实验显示,24 h 和 48 h 后类似物转染组通过 8 μm 孔径的细胞数目降低,与类似物

阴性对照组以及空白对照组间比较,差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$,图 2)。抑制物转染组细胞通过数目增加,高于抑制物阴性对照组以及空白对照组(均 $P < 0.05$)。提示 miR-200c 的过表达对 SW480 细胞侵袭产生抑制,miR-200c 的低表达能够促进 SW480 细胞的侵袭。

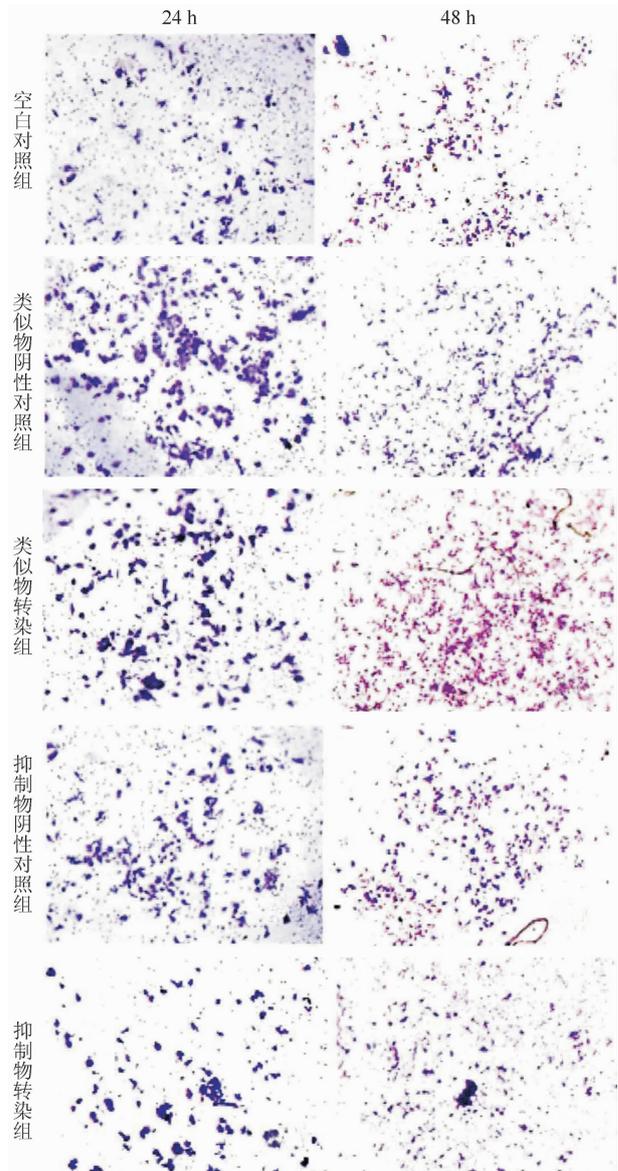


图 2 miR-200c 对 SW480 细胞侵袭能力的影响($\times 200$)
Fig. 2 Effect of miR-200c on the invasion of SW480 cells ($\times 200$)

2.3 miR-200c 对 SW480 细胞 β -catenin 和 E-cadherin 表达的影响

类似物转染组细胞 β -catenin 和 E-cadherin 蛋白表达均升高(均 $P < 0.05$),抑制物转染组细胞 β -catenin 和 E-cadherin 蛋白表达均降低(均 $P < 0.05$,图 3)。

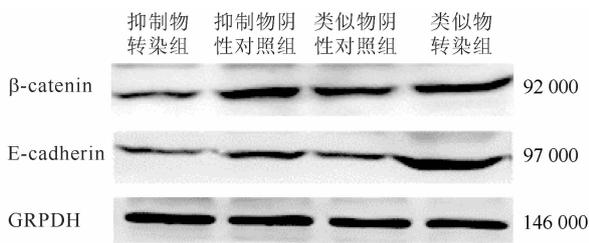


图 3 miR-200c 对 SW480 细胞 β -catenin 和 E-cadherin 表达的影响

Fig. 3 Effect of miR-200c on the expression of β -catenin and E-cadherin in SW480 cells

3 讨论

在肿瘤 EMT、侵袭和转移的过程中 miR-200 家族扮演重要角色^[4-6]。EMT 与胚胎发育、组织重建、慢性炎症反应、肿瘤转移以及纤维化疾病密切相关,主要特征包括细胞角蛋白细胞骨架向波形蛋白为主的细胞骨架的转化、细胞黏附分子表达水平降低以及具有间充质细胞的形态特征等。上皮细胞通过上皮向间质转化丧失细胞极性,丧失连接基底膜等上皮表型,具有较高的侵袭、迁移、抗凋亡能力以及对细胞外基质进行降解的能力。EMT 是来源于上皮细胞的恶性肿瘤细胞得到迁移与侵袭能力的主要生理过程。

本研究细胞划痕实验显示,类似物转染组 12 h 和 24 h 后伤痕宽度高于 miR-200 类似物阴性对照组,抑制物转染组低于抑制物阴性对照组。Transwell 实验显示,与类似物阴性对照组和抑制物阴性对照组比较,类似物转染组 24 h 和 48 h 通过 8 μ m 孔径的细胞数减少,抑制物转染组增多。已知 miR-200 家族成员的上调可促进细胞转移^[7-9],转录因子 GA-TA 结合蛋白-3 (GA-TA-binding protein-3, GATA3) 可通过抑制 miR-200 的表达对肿瘤细胞的转移起促进作用^[10]。miR-200c 抑制 SW480 细胞侵袭与迁移的机制可能与靶向抑制转录因子锌指结构蛋白 1 (zinc-finger E-box-binding homeobox 1, ZEB1) 相关^[11-12]。转录因子 ZEB1 能够对多种基因的表达产生抑制作用,并可能通过降低 E-cadherin 的表达,促进 EMT,最终起到促进肿瘤细胞侵袭的作用。若 miR-200c 的表达水平增加,蛋白水平与 mRNA 水平的 ZEB1 表达水平均降低。

细胞质中存在 2 种 catenin 间的平衡状态的变化可能与肿瘤细胞的侵袭与迁移能力相关。 β -catenin 不仅与 E-cadherin 结合成复合体参与细胞的黏

附,还是 Wnt/ β -catenin 信号通路的重要成员^[13]。在各种肿瘤细胞中均发现 E-cadherin/catenin 与组织学特征密切相关^[14]。本研究发现,类似物转染组 β -catenin 和 E-cadherin 的表达均升高,抑制物转染组各蛋白表达下降。这说明 miR-200 可调节 EMT 过程。miR-200 家族成员能够对转录因子 ZEB1 与 ZEB2 的表达产生抑制作用,而 ZEB1 与 ZEB2 同样能够反过来抑制 miR-200 家族成员的表达^[15-17],即 miR-200 家族成员可通过反馈调节对 EMT 过程起抑制作用^[18-20],本研究与此相互印证。

Wnt/ β -catenin 信号通路是参与调控 EMT 的重要通路之一^[21-22]。当 Wnt/ β -catenin 信号途径被激活时,E-cadherin/catenin 复合物稳定性遭到破坏,核内聚集大量的 β -catenin 并与 T 细胞因子组合成为复合体,通过影响 EMT 相关蛋白的表达量,最终引起 EMT 发生。Wnt/ β -catenin 信号通路的主要标志包括细胞内 β -catenin 的异常表达。 β -catenin 核内积聚多发生在肿瘤组织侵袭边缘的去分化肿瘤组织中,而 EMT 发生的主要部位之一即肿瘤侵袭边缘。

综上所述,本研究显示,过表达 miR-200c 对 SW480 细胞的侵袭与迁移能力产生抑制,增加 E-cadherin 和 β -catenin 的表达水平。miR-200c 表达水平降低则促进 SW480 细胞的侵袭与迁移能力,并降低 E-cadherin 和 β -catenin 的表达水平。这提示可通过 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制 SW480 细胞的侵袭和迁移,EMT 中 miRNA 的复杂调节可能可以通过 miR-200c 的信号转导来解释。

参考文献:

- [1] Gao HX, Yan L, Li C, et al. miR-200c regulates crizotinib-resistant ALK-positive lung cancer cells by reversing epithelial-mesenchymal transition via targeting ZEB1 [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(5): 4135 - 4143.
- [2] Meng X, Müller V, Milde-Langosch K, et al. Circulating cell-free miR-373, miR-200a, miR-200b and miR-200c in patients with epithelial ovarian cancer [J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 924(1): 3 - 8.
- [3] Damiano V, Brisotto G, Borgna S, et al. Epigenetic silencing of miR-200c in breast cancer is associated with aggressiveness and is modulated by ZEB1 [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2016, 56(2): 147 - 158.
- [4] Li Q, Zhang C, Chen R, et al. Disrupting MALAT1/miR-200c sponge decreases invasion and migration in endometrioid endometrial carcinoma [J]. Cancer Lett, 2016, 383(1): 28 - 40.

- [5] Guo E, Wang Z, Wang S. MiR-200c and miR-141 inhibit ZEB1 synergistically and suppress glioma cell growth and migration [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20 (16):3385 – 3391.
- [6] Sulaiman SA, AbMutalib NS, Jamal R, et al. miR-200c regulation of metastases in ovarian cancer: potential role in epithelial and mesenchymal transition [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7(8):271.
- [7] Muto Y, Suzuki K, Kato T, et al. Heterogeneous expression of zinc-finger E-box-binding homeobox 1 plays a pivotal role in metastasis via regulation of miR-200c in epithelial-mesenchymal transition [J]. *Int J Oncol*, 2016, 49 (3):1057 – 1067.
- [8] Jiang Z, Tao JH, Zuo T, et al. The correlation between miR-200c and the severity of interstitial lung disease associated with different connective tissue diseases [J]. *Scand J Rheumatol*, 2016, 16(7):1 – 8.
- [9] Guo J, Fang W, Sun L, et al. Reduced miR-200b and miR-200c expression contributes to abnormal hepatic lipid accumulation by stimulating JUN expression and activating the transcription of sreb1 [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (24):36207 – 36219.
- [10] Yang Y, Ahn YH, Gibbons DL, et al. The Notch ligand Jagged2 promotes lung adenocarcinoma metastasis through a miR-200-dependent pathway in mice [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(4):1373 – 1385.
- [11] Yang Y, Ahn YH, Chen Y, et al. ZEB1 sensitizes lung adenocarcinoma to metastasis suppression by PI3K antagonism [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(6):2696 – 2708.
- [12] Del Vecchio G, De Vito F, Saunders SJ, et al. RNA-binding protein HuR and the members of the miR-200 family play an unconventional role in the regulation of c-Jun mRNA [J]. *RNA*, 2016, 22(10):1510 – 1521.
- [13] Jenkins LM, Singh P, Varadaraj A, et al. Altering the proteoglycan state of T β R III/Betaglycan modulates canonical Wnt/ β -catenin signaling [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(49):25716 – 25728.
- [14] Kitase Y, Shuler CF. Microtubule disassembly prevents palatal fusion and alters regulation of the E-cadherin/catenin complex [J]. *Int J Dev Biol*, 2013, 57(1):55 – 60.
- [15] Cheng Y, Zhang X, Li P, et al. MiR-200c promotes bladder cancer cell migration and invasion by directly targeting RECK [J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9(8):5091 – 5099.
- [16] Jepsen RK, Novotny GW, Klarskov LL, et al. Investigating intra-tumor heterogeneity and expression gradients of miR-21, miR-92a and miR-200c and their potential of predicting lymph node metastases in early colorectal cancer [J]. *Exp Mol Pathol*, 2016, 101(2):187 – 196.
- [17] Peng Y, Zhu X, Qiu L, et al. Electroneutral composite polymersomes self-assembled by amphiphilic polyphosphazenes for effective miR-200c *in vivo* delivery to inhibit drug resistant lung cancer [J]. *Biomaterials*, 2016, 106 (11):1 – 12.
- [18] Li Y, Nie Y, Tu S, et al. Epigenetically deregulated miR-200c is involved in a negative feedback loop with DNMT3a in gastric cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(4):2108 – 2116.
- [19] Shan W, Zhang X, Li M, et al. Over expression of miR-200c suppresses invasion and restores methotrexate sensitivity in lung cancer A549 cells [J]. *Gene*, 2016, 593 (2):265 – 271.
- [20] Yoshimatsu G, Takita M, Kanak MA, et al. MiR-375 and miR-200c as predictive biomarkers of islet isolation and transplantation in total pancreatectomy with islet auto-transplantation [J]. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2016, 23(9):585 – 594.
- [21] Xiao C, Wu CH, Hu HZ, et al. LncRNA UCA1 promotes epithelial-mesenchymal transition (EMT) of breast cancer cells via enhancing Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20 (13):2819 – 2824.
- [22] Ma X, Yan W, Dai Z, et al. Baicalein suppresses metastasis of breast cancer cells by inhibiting EMT via down-regulation of SATB1 and Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2016, 10(4):1419 – 1441.