

# miR494 对结直肠癌细胞迁移能力的影响及其分子机制

傅健飞<sup>1</sup>, 金霞云<sup>1</sup>, 徐锡枫<sup>1</sup>, 朱京京<sup>1</sup>, 王庆华<sup>1</sup>, 杜金林<sup>1</sup>, 郑 树<sup>2</sup>

(1. 金华市中心医院肿瘤内科, 浙江 金华 321000; 2. 浙江大学医学院附属第二医院肿瘤内科, 浙江 杭州 310009)

**摘要:**目的 探究 miR494 对结直肠癌细胞迁移能力的影响及其分子机制。方法 采用慢病毒包装系统建立 miR494-Lovo 细胞株(转染 miR494 前体载体)和 NC-Lovo 细胞株(转染对照载体)。采用定量 RT-PCR 检测转染率和上皮间质转化标志物 E-cadherin、N-cadherin、matrix metalloproteinase 2 (MMP2)、MMP9、vimentin 和 snail 表达情况。通过 transwell 和划痕实验检测细胞迁移能力。结果 与 NC-Lovo 细胞比较, miR494-Lovo 细胞中 miR494 高表达 ( $P < 0.05$ )。与 NC-Lovo 细胞比较, 转染 24 h 后, miR494-Lovo 细胞的迁移能力增强 ( $P < 0.05$ )。转染 48 h 后, miR494-Lovo 细胞 E-cadherin 表达升高, N-cadherin、MMP2、MMP9、vimentin 和 snail 表达下降(均  $P < 0.05$ )。结论 miR494 促进结直肠癌细胞迁移能力, 并可能与 EMT 发生有关。

**关键词:** 结直肠肿瘤/病理生理学; 肿瘤细胞, 培养的; miR394; 细胞运动; 上皮间质转化

中图分类号: R735.3; R730.23 文献标志码: A 文章编号: 1001-1692(2019)06-0503-05

## Effect of miR494 on migration of colorectal cancer cells and its molecular mechanism

Fu Jianfei<sup>1</sup>, Jin Xiayun<sup>1</sup>, Xu Xifeng<sup>1</sup>, Zhu Jingjing<sup>1</sup>, Wang Qinghua<sup>1</sup>, Du Jinlin<sup>1</sup>, Zheng Shu<sup>2</sup>

(1. Department of Oncology, Jinhua Central Hospital, Jinhua 321000, China;

2. Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of Zhejiang University

School of Medicine, Hangzhou 310009, China)

**Abstract: Objective** To investigate the molecular mechanism of miR494 in the migration of colorectal cancer cells. **Methods** Lentivirus packaging system was used to construct miR494-Lovo cell line with pre-miR494 vector transfection and NC-Lovo cell line with control vector transfection, and fluorescence quantitative RT-PCR was used to detect the transfection rate. Cell migration was detected by transwell and scratch test, and the levels of epithelial-mesenchymal transition (EMT) related proteins, including E-cadherin, N-cadherin, matrix metalloproteinase 2 (MMP2), MMP9, vimentin and snail, were detected by RT-PCR. **Results** miR494 was highly expressed in miR494-Lovo cells as compared with NC-Lovo cells ( $P < 0.05$ ). After 24 h transfection, the migration ability of miR494-Lovo cells was enhanced compared with that of NC-Lovo cells ( $P < 0.05$ ). After 48 h transfection, the expression of E-cadherin increased and the levels of N-cadherin, MMP2, MMP9, vimentin and snail decreased in miR494-Lovo cells (all  $P < 0.05$ ). **Conclusions** miR494 can promote the occurrence of EMT in colorectal cancer and increase the migration ability of colorectal cancer cells.

**Key words:** colorectal neoplasms/physiopathology; tumor cells, cultured; miR494; cell movement; epithelial-mesenchymal transition

收稿日期: 2019-09-24

DOI: 10.13267/j.cnki.syzlzz.2019.06.005

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LY19H160020); 金华市社会发展类重点项目(2019-3-013); 金华市社会发展类重点(2018-3-001d)

作者简介: 傅健飞(1980-), 男, 浙江金华人, 副主任医师, 博士, 从事结直肠癌基础与临床研究

结直肠癌发病率在中国逐年增加, 是最常见的消化道肿瘤。其中 15% ~ 25% 的患者表现为同时性肝转移, 另有近 50% 的患者结直肠癌原发灶切除后 2 年出现异时性肝转移<sup>[1-2]</sup>。估计有 50% ~ 60% 的结直肠癌患者会出现肝转移<sup>[3-5]</sup>。因此, 减少患者复发转移发生率以及提高患者无瘤生存期是后肿瘤时代的研究重点。

microRNA (miRNA) 通过作用于靶基因在肿瘤的发生中发挥相关生物调节作用,但其机制尚不明确<sup>[6]</sup>。Strubberg 等<sup>[7]</sup>总结分析与结直肠癌发生和发展相关的 miRNA,提出 miRNA 可作为结直肠癌新的生物标志物。miRNA 对结直肠癌肝转移具有一定的调节作用<sup>[8-9]</sup>。Huang 等<sup>[10]</sup>认为,miRNA 是预测肝转移发生的标志物。芯片筛选发现,神经母细胞瘤中 miR494 表达升高<sup>[11]</sup>。随后在脑胶质瘤<sup>[12]</sup>、肝癌<sup>[13]</sup>和乳腺癌<sup>[14]</sup>中都有发现 mir494 促进肿瘤的发生和发展。而 miR494 在子宫颈癌<sup>[15]</sup>、胃癌<sup>[16]</sup>、胆管癌<sup>[17]</sup>和胰腺癌<sup>[18]</sup>中发现 miRNA494 发挥抑癌作用。在肺癌中,有研究认为 miR494 是促癌的<sup>[19-20]</sup>,也有研究认为其发挥抑癌作用<sup>[21]</sup>。结直肠癌相关研究认为 miR494 是促癌的,但只通过 miR494 瞬转 SW480 和 SW620 细胞后采用 transwell 实验明确其促进结直肠癌细胞侵袭,并没进一步深入的研究<sup>[22]</sup>。

本课题组既往通过芯片筛选显示,miR494 在结直肠癌肝转移组表达升高;同时石蜡组织验证表明,其高表达与肝转移相关,并且与预后相关。本研究拟通过建立 miR494 稳定高表达的 Lovo-miR494 细胞株,通过体外细胞实验验证 miR494 引起肝转移的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与试剂

人结肠癌细胞株 Lovo, SW480, SW620, RKO 和 HT-26 细胞株购于美国标准细胞培养库 ATCC。Trizol 试剂购自北京天根生化科技有限公司。F-12、1640 和 DMEM 培养液购自美国 GIBCO 公司。Transwell 室购自美国 BD Biosciences 公司。结晶紫粉末购自美国 Sigma 公司。

### 1.2 qRT-PCR 检测 miR494 及上皮间质转化相关指标的表达

根据 Trizol 试剂说明书提取结肠癌细胞株细胞中的总 RNA,用核酸蛋白分析仪检测 RNA 浓度和纯度,使用 SYBR 预混试剂进行反转录和 PCR 反应。扩增引物序列如下: miR494 正向引物为 5' CAGCAAAAGGCTCGAGCAGTGCCATGTAGATTCGG-3', 反向引物为 5' ATTCTGATCAGGATCCGCATGGCACCCTGTCAG-3'; N-cadherin 正向引物为 5' CATCCTGCTTATCCTTGTG 3', 反向引物为 5' TAGTCTGGTCTTCTTCTC 3'; E-cadherin 正向引物为 5' GAGAACGCATTGCCACATACAC 3', 反向引物

为 5' AAGAGCACCTTCCATGACAGAC 3'; Vimentin (VIM) 正向引物为 5' GCGTGAAATGGAAGAGAAC 3', 反向引物为 5' TGAAGAGGCAGAGAAATC 3'; Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) 正向引物为 5' TTGACGGTAAGGACGGACTC 3', 反向引物为 5' GGCGTCCCATACTTCACAC 3'; Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) 正向引物为 5' AAGGGCGTCGTGGT-TCCAATC 3', 反向引物为 5' AGCATTGCCGTCCTGGGTGTAG 3'; Snail family zinc finger 1 (SNAIL) 正向引物为 5' TTCCTGAGCTGGCCTGTCTG 3', 反向引物为 5' TGGCCTGAGGGTTCCTTGTG3'; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 作为内参,正向引物为 5' CACCCACTCCTCCACCTTTG 3', 反向引物为 5' CCACCACCCTGTTGCTGTAG 3'。基因扩增反应条件均为 95℃ 预变性 10 min, 95℃ 变性 10 s, 60℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 34 s, 共 35 个循环。每个样品 3 个重复,以 GAPDH 为内参。

### 1.3 慢病毒载体稳转细胞株的建立

合成 pre-miR494 序列,采用 pCMV-G&RN-U6-shRNA 载体构建 miR494 前体载体(北京天根生化科技有限公司,中国)。通过慢病毒包装系统分别包装含 miR494 前体载体和对照载体的慢病毒颗粒,侵染 Lovo 细胞株后分别建立得到 miR494-Lovo 细胞株和 NC-Lovo 细胞株<sup>[23]</sup>。

### 1.4 划痕试验检测结直肠癌细胞迁移能力

用记号笔画线作为标记,将细胞用胰酶消化计数后取  $8 \times 10^5$  个分入 35 mm<sup>2</sup> 培养皿中培养。吸去培养液,用 200  $\mu$ L 枪头垂直于记号笔标记划线,用磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 反复冲洗去除划下的细胞,加入无血清培养液继续培养。在 0 h、24 h 和 48 h 分别拍照,选取记号笔画的线和细胞划痕的交点作为观察点,以定点观察。

### 1.5 Transwell 试验检测结直肠癌细胞迁移能力

实验前 24 h 将细胞培养液换成无血清 1640 培养液,1  $\times$  PBS 浸泡 24 孔板及 transwell 小室 (8  $\mu$ m) 5 min,胰酶消化细胞,用无血清培养液洗涤细胞,接种 0.5 mL 细胞悬液 ( $3 \times 10^4$  细胞/mL) 到 transwell 小室内,下层的 24 孔板中加入 0.75 mL 含 10% 胎牛血清的 1640 培养液,每组 3 复孔,48 h 后用棉棒轻轻拭去上层细胞,迁移至下层的细胞用 1 mL 4% 甲醛溶液,用 1 mL 0.5% 结晶紫溶液染色,置于 200 倍显微镜下观察,计数每个视野中的细胞数。

### 1.6 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件分析数据。采用方差分析

分析两组以上的数据,独立  $t$  检验分析两组间数据。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR494 在结直肠癌细胞株中的表达

SW460、SW260、RKO、HT-29 和 Lovo 细胞 qRT-PCR 检测 miR494 的相对表达量分别为  $(10.120 \pm 0.389)$ 、 $(2.747 \pm 0.208)$ 、 $(4.968 \pm 0.311)$ 、 $(2.069 \pm 0.0868)$  和  $(1.186 \pm 0.108)$ , 其中 Lovo 细胞表达最低, SW260 细胞表达最高 (图 1)。本研究选取 Lovo 细胞株用于后续研究。

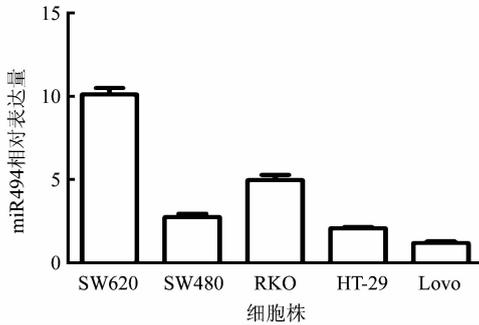


图 1 不同结直肠癌细胞株中 miR494 的相对表达量

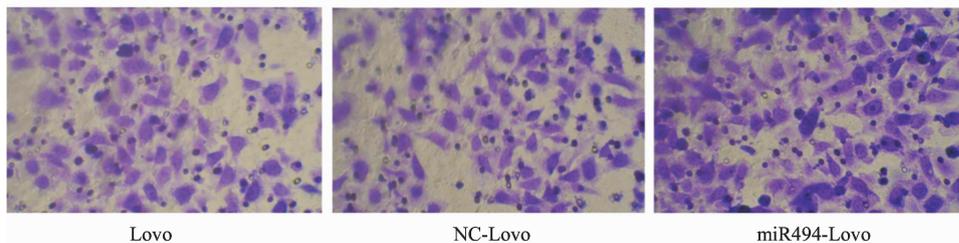
Fig. 1 Relative expression of miR494 in different colorectal cancer cell lines

### 2.2 慢病毒建立 miR494-Lovo 细胞株和 NC-Lovo 细胞株

通过慢病毒包装系统建立 miR494-Lovo 细胞株和 NC-Lovo 细胞株。转染 24 h 后, qRT-PCR 检测 Lovo、NC-Lovo 和 miR494-Lovo 细胞中 miR494 的相对表达量分别为  $(1.216 \pm 0.482)$ 、 $(1.110 \pm 0.062)$  和  $(12.670 \pm 0.838)$ , miR494-Lovo 细胞中 miR494 表达量高于 Lovo 细胞与 NC-Lovo 细胞 (均  $P < 0.05$ , 图 2)。

### 2.3 miR494 促进结直肠癌细胞的迁移

通过划痕实验和 transwell 检测细胞的迁移能



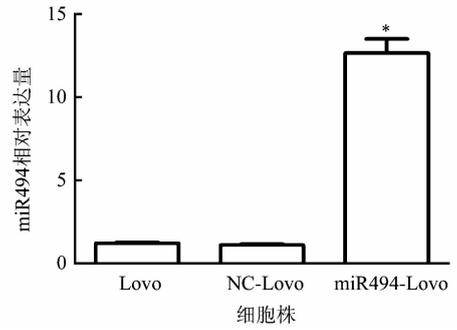
Lovo

NC-Lovo

miR494-Lovo

图 4 转染 48 h 后 transwell 试验检测 Lovo、NC-Lovo 和 miR494-Lovo 细胞迁移能力 ( $\times 400$ )

Fig. 4 Transwell assay detecting the cell migration of Lovo, NC-Lovo and miR494-Lovo after 48 h transfection



\* 与 Lovo 细胞和 NC-Lovo 细胞比较, 均  $P < 0.05$

图 2 Lovo、NC-Lovo 和 miR494-Lovo 细胞株中 miR494 的相对表达量

Fig. 2 Relative expression of miR494 in Lovo, NC-Lovo and miR494-Lovo cell lines

力, 在 24 h 及 48 h 时, miR494-Lovo 细胞迁移能力较 NC-Lovo 细胞和 Lovo 细胞增强 (图 3~4)。

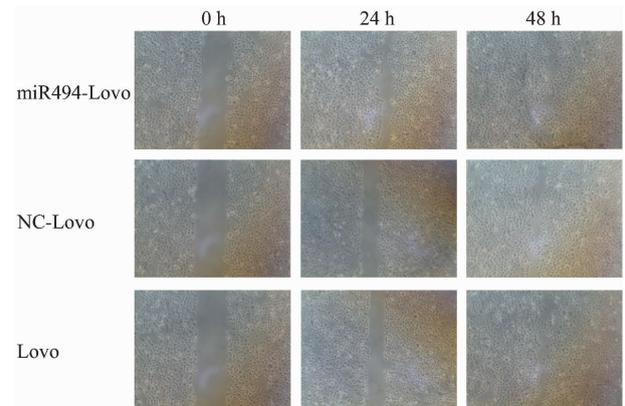
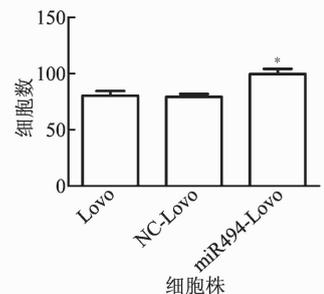


图 3 划痕试验光学显微镜下结果 ( $\times 100$ )

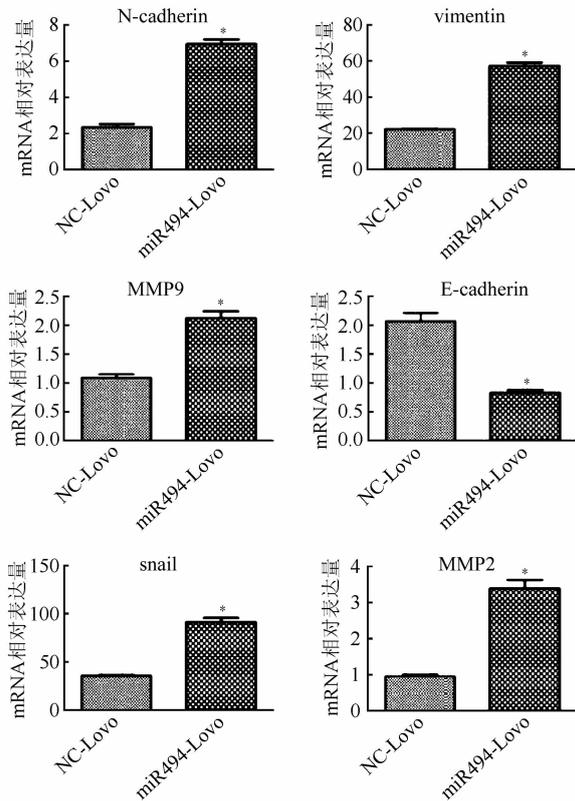
Fig. 3 Scratch test results under light microscope ( $\times 100$ )

### 2.4 miR494 促进结直肠癌细胞 EMT 发生

转染 48 h 后, RT-PCR 检测显示, 与 NC-Lovo 细胞比较, miR494-Lovo 细胞 E-cadherin 表达升高, N-cadherin、MMP2、MMP9、vimentin 和 snail 表达下降 (均  $P < 0.05$ , 图 5)。



细胞株



\* 与 NC-Lovo 细胞比较,  $P < 0.05$

**图 5** 转染 48 h 后 RT-PCR 检测 NC-Lovo 和 miR494-Lovo 细胞上皮间质转化标志蛋白表达情况

**Fig. 5** RT-PCR results of the expression of epithelial-mesenchymal transition related proteins in NC-Lovo and miR494-Lovo cells after 48 h transfection

### 3 讨论

近年来, miRNAs 作为表观遗传修饰的重要调控分子,在结直肠癌中起着重要作用。研究表明, miR494 可以通过靶向于 P190B Rho GTPase Activating Protein 5 影响表皮生长因子受体的稳定性,增加肿瘤的侵袭能力<sup>[12]</sup>。在敲除 SMAD3 裸鼠模型中,乳腺癌细胞 4T1 通过作用转化生长因子受体,募集肿瘤微环境中的骨髓来源的抑制性细胞(myeloid derived suppressor cells, MDSCs)<sup>[14]</sup>。MDSC 细胞内 miR494 水平升高,可以通过靶向人类第十号染色体缺失与磷酸酶和张力蛋白同源基因(gene of phosphate and tension homology deleted on chromosome ten, PTEN),让 MDSC 释放更多 MMP,进一步促进肿瘤细胞侵袭转移。前列腺癌的相关研究表明, miR494 作用于人趋化因子受体 4 (chemokine receptor, CXCR4),抑制前列腺癌细胞的迁移能力<sup>[24]</sup>。miR494 可引起 SW480 和 SW620 肠癌细胞株侵袭性

增加<sup>[22]</sup>。本研究也表明, miR494 多表达的 Lovo 细胞迁移能力增加。

研究显示, miR494 在结直肠癌肝转移患者中表达高于无肝转移患者,提示 miR494 与结直肠癌肝转移的发生有密切关系, PEA15 蛋白可通过激活 ERK/MAPK 通路影响结直肠癌上皮间质转化的发生从而促进结直肠癌肝转移的发生<sup>[25]</sup>。EMT 的发生与肿瘤的发展密切相关。本研究结果也表明, miR494 促进结直肠癌 EMT 的发生。

综上所述,本研究筛选出低表达的 Lovo 细胞株,通过慢病毒构建的 miR494 过表达细胞株迁移能力增强,且 EMT 的发生被促进,提示 miR494 对结直肠癌转移具有潜在的正向调控作用。其具体机制有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Go S, Takehiro N, Hidetoshi E, et al. Surgical outcome of extended liver resections for colorectal liver metastasis compared with standard liver resections [J]. *Mol Clin Oncol*, 2018, 9(1): 104 - 111.
- [2] 万德森, 张苏展, 陈玉泽, 等. 贝伐珠单抗联合以 5-FU 为基础的双药化疗用于结直肠癌肝转移患者新辅助治疗: 一项多中心单臂研究 [J]. *实用肿瘤杂志*, 2018, 33(1): 41 - 46.
- [3] Dulundu E, Attaallah W, Tilki M, et al. Simultaneous resection for colorectal cancer with synchronous liver metastases is a safe procedure; Outcomes at a single center in Turkey [J]. *Biosci Trends*, 2017, 11(2): 235 - 242.
- [4] Shiozawa K, Watanabe M, Ikehara T, et al. Comparison of contrast-enhanced ultrasonography with Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI in the diagnosis of liver metastasis from colorectal cancer [J]. *J Clin Ultrasound*, 2017, 45(3): 138 - 144.
- [5] Baltruskeviciene E, Schveigert D, Stankevicius V, et al. Down-regulation of miRNA-148a and miRNA-625-3p in colorectal cancer is associated with tumor budding [J]. *Bmc Cancer*, 2017, 17(1): 607.
- [6] 程先硕, 刘萍, 杨之斌. miRNA-145 在结直肠癌中的作用及临床应用价值研究进展 [J]. *实用肿瘤杂志*, 2019, 34(3): 273 - 276.
- [7] Strubberg AM, Madison BB. MicroRNAs in the etiology of colorectal cancer: pathways and clinical implications [J]. *Dis Model Mech*, 2017, 10(3): 197 - 214.
- [8] Chorti A, Bangeas P, Papavramidis TS, et al. Role of microRNA in the diagnosis and therapy of hepatic metastases from colorectal cancer [J]. *MicroRNA (Shariqah, United Arab Emirates)*, 2018, 7(3): 167 - 177.

- [9] Li W, Chang J, Tong D, et al. Differential microRNA expression profiling in primary tumors and matched liver metastasis of patients with colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(22): 35783 – 35791.
- [10] Huang S, Tan X, Huang Z, et al. microRNA biomarkers in colorectal cancer liver metastasis [J]. *J Cancer*, 2018, 9(21): 3867 – 3873.
- [11] Zhao JJ, Yang J, Lin J, et al. Identification of miRNAs associated with tumorigenesis of retinoblastoma by miRNA microarray analysis [J]. *ChNS*, 2009, 25(1): 13 – 20.
- [12] Kwak SY, Yang JS, Kim BY, et al. Ionizing radiation-inducible miR-494 promotes glioma cell invasion through EGFR stabilization by targeting p190B RhoGAP [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1843(3): 508 – 516.
- [13] Zhang J, Zhu Y, Hu L, et al. miR-494 induces EndMT and promotes the development of HCC (Hepatocellular Carcinoma) by targeting SIRT3/TGF- $\beta$ /SMAD signaling pathway[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 7213.
- [14] Liu Y, Lai L, Chen Q, et al. MicroRNA-494 is required for the accumulation and functions of tumor-expanded myeloid-derived suppressor cells via targeting of PTEN [J]. *J Immunol*, 2012, 188(11): 5500 – 5510.
- [15] Cheng L, Kong B, Zhao Y, et al. miR-494 inhibits cervical cancer cell proliferation through upregulation of SOCS6 expression [J]. *Oncol Lett*, 2017, 15(3): 3075 – 3080.
- [16] Yu Y, Yu X, Liu H, et al. miR-494 inhibits cancer initiating cell phenotypes and reverses resistance to lapatinib by downregulating FGFR2 in HER2 positive gastric cancer[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(2): 998 – 1007.
- [17] Li L, Li Z, Kong X, et al. Down-regulation of microRNA-494 via loss of SMAD4 increases FOXM1 and beta-catenin signaling in pancreatic ductal adenocarcinoma cells [J]. *Gastroenterology*, 2014, 147(2): 485 – 497.
- [18] Yang Y, Tao X, Li CB, et al. MicroRNA-494 acts as a tumor suppressor in pancreatic cancer, inhibiting epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion by binding to SDC1 [J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(3): 1204 – 1214.
- [19] Liu L, Jiang Y, Zhang H, et al. Overexpressed miR-494 down-regulates PTEN gene expression in cells transformed by anti-benzo (a) pyrene-trans-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide [J]. *Life Sci*, 2010, 86(5/6): 192 – 198.
- [20] Romano G, Acunzo M, Garofalo M, et al. MiR-494 is regulated by ERK1/2 and modulates TRAIL-induced apoptosis in non-small-cell lung cancer through BIM down-regulation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(41): 16570 – 16575.
- [21] Ohdaira H, Sekiguchi M, Miyata K, et al. MicroRNA-494 suppresses cell proliferation and induces senescence in A549 lung cancer cells [J]. *Cell Prolif*, 2012, 45(1): 32 – 38.
- [22] Sun HB, Chen X, Ji H, et al. miR494 is an independent prognostic factor and promotes cell migration and invasion in colorectal cancer by directly targeting PTEN [J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(6): 2486 – 2494.
- [23] 王 韵, 吉 宁, 周 敏, 等. microRNA-223 过表达与抑制表达慢病毒载体的构建及鉴定 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2015(5): 13 – 17.
- [24] Shen PF, Chen XQ, Liao YC, et al. MicroRNA-494-3p targets CXCR4 to suppress the proliferation, invasion, and migration of prostate cancer [J]. *Prostate*, 2014, 74(7): 756 – 767.
- [25] Tang B, Liang W, Liao Y, et al. PEA15 promotes liver metastasis of colorectal cancer by upregulating the ERK/MAPK signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2018, 41(1): 43 – 56.