

microRNA-486对结直肠癌裸鼠皮下移植瘤生长抑制作用及其机制的研究

张冉冉, 连海峰, 刘成霞

滨州医学院附属医院消化内科, 山东 滨州 256603

[摘要] 背景与目的: 越来越多的证据表明microRNA在生物进程的各个阶段发挥重要作用。在不同的恶性肿瘤中microRNA-486表达上调或者下调, 但microRNA-486对人结直肠癌潜在的作用尚不清楚。该研究旨在探讨其对细胞系SW620裸鼠皮下移植瘤生长情况的影响及其可能的作用机制。方法: 取18只裸鼠, 按简单随机法分为实验组、阴性对照组和空白对照组。每组5只, 分别皮下接种SW620细胞。造模成功后实验组、阴性对照组、空白对照组每3天分别于瘤周注射miRNA-486过表达质粒、空白载体及等量PBS, 比较各组裸鼠皮下瘤体的体积, 接种3周后处死裸鼠, 取出皮下瘤组织, 用免疫组织化学法和Western blot法分析比较neuropilin-2的表达。结果: 实验组瘤体生长速度明显低于阴性对照组和空白对照组; 实验组裸鼠皮下种植瘤的大小为 $(0.32 \pm 0.12) \text{ cm}^3$, 阴性对照组为 $(0.77 \pm 0.31) \text{ cm}^3$, 空白对照组为 $(0.82 \pm 0.18) \text{ cm}^3$; 实验组瘤体体积显著小于其他两组体积($P=0.006$); 实验组瘤体质量为 $(0.40 \pm 0.08) \text{ g}$, 明显低于阴性对照组 $(0.75 \pm 0.18) \text{ g}$ 及空白对照组 $(0.79 \pm 0.18) \text{ g}$ ($P=0.008$); 实验组种植瘤中neuropilin-2的表达量较另外两组下降($P=0.000$)。结论: 注射miR-486过表达质粒后结直肠癌细胞SW620裸鼠皮下移植瘤的生长可受到抑制, 其作用可能是通过降低neuropilin-2的表达来实现的。miR-486有望成为结直肠癌治疗新的靶点。

[关键词] miRNA-486; 结直肠肿瘤; 神经纤毛蛋白-2; 移植瘤

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2015.10.008

中图分类号: R735.3+5; R735.3+7 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2015)10-0802-05

Inhibitory effect of miR-486 on xenografted human colorectal carcinoma growth and its possible mechanism ZHANG Ranran, LIAN Haifeng, LIU Chengxia (Department of Gastroenterology, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256603, Shandong, China)

Correspondence to: LIU Chengxia E-mail: phdlcx@163.com

[Abstract] **Background and purpose:** This study was to investigate the effect of miRNA-486 on the growth of human colorectal cancer cell line SW620 xenograft in nude mice and to explore the possible mechanism of action. **Methods:** Eighteen mice were randomly divided into three groups, including the experimental group, the negative control group and the blank control group. Each group contained 6 mice. The SW620 cell line was inoculated subcutaneously into nude mice to establish the model of human colorectal cancer xenografts. Peritumoral injection of miRNA-486 overexpression plasmid, or blank vector and PBS were performed every 3 days. The volumes of subcutaneous tumors in each group of inoculated mice were compared. Then mice were sacrificed 3 weeks after infection. Immunohistochemistry and Western blot were used to measure the expression of neuropilin-2 (NRP2). **Results:** The growth rate of tumors in the experimental group was significantly lower than that in the negative control group and the blank control group. After 21 days, the size of transplanted tumors in the experimental group nude mice was $(0.32 \pm 0.12) \text{ cm}^3$, that in the negative control group was $(0.77 \pm 0.31) \text{ cm}^3$, and that in blank control group was $(0.82 \pm 0.18) \text{ cm}^3$. Tumor mass in the experimental group was significantly smaller than that in the other two groups ($P=0.006<0.05$). Tumor mass in the experimental group was $(0.40 \pm 0.08) \text{ g}$, significantly smaller than that in the negative control group $(0.75 \pm 0.18) \text{ g}$ and in the blank control group $(0.79 \pm 0.18) \text{ g}$ ($P=0.008<0.05$). Compared with the expression of NRP2 in other groups, the growth of tumor in the experimental group declined ($P=0.000<0.05$). **Conclusion:** Colorectal cancer cell line SW620 xenografted tumor in nude mice can be suppressed after injection of miR-486, which may decrease the expression of NRP2.

[Key words] miRNA-486; Colorectal cancer; Neuropilin -2 (NRP2); Xenografted tumor

结直肠癌是世界上最常见的病死率较高的恶性肿瘤之一^[1]。尽管诊断技术和治疗水平日益提高,但转移和复发仍然是结直肠癌患者不可避免的结局^[2-3]。因此,尽早地发现肿瘤并阻断肿瘤进一步发展是目前研究的热点。miRNA是一组非编码小RNA序列,它在调控基因表达方面发挥着重要作用^[4]。既往研究发现,miRNA参与肿瘤发生、发展和转移中的各个方面^[5]。而我们前期的研究发现,miR-486表达上调可以削弱结直肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力^[6]。本研究旨在通过结直肠癌裸鼠皮下移植瘤模型的建立进一步探讨miR-486在结直肠癌的演变过程中所发挥的作用,同时,我们还检测了各组移植瘤中神经毡蛋白-2(neuropilin-2, NRP2)蛋白的表达情况,进一步探讨miR-486在结直肠癌中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

实验中所用的SPF级BALB/c裸鼠购自北京华阜康生物科技有限公司[许可证号:SCXK(京)2014-0004],miRNA-486过表达质粒、空白载体由上海吉玛基因公司构建,结直肠癌细胞株SW620购自武汉博士德生物工程有限公司,RPMI-1640培养基、胎牛血清购自美国Hyclone公司,Lipofectamine™2000购自美国Invitrogen生命技术公司,兔多克隆NRP2抗体购自英国Abcam公司,miR-486引物购自广州市锐博生物科技有限公司,逆转录试剂盒及SYBR Premix试剂盒购自日本TaKaRa公司,免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,Western blot凝胶试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,PVDF膜购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

结直肠癌细胞SW620用含10%胎牛血清的

PMRI1640培养基培养,在37℃、CO₂体积分数为5%的培养箱中培养,隔天进行换液,待细胞密度达80%~90%时可进行传代。

1.2.2 细胞转染

按照Lipofectamine™2000转染说明书进行转染,转染过程在24孔板中进行,转染前12h种板,按照质粒:脂质体0.5:1、1:1、1:2三种比例分别进行转染,荧光显微镜下筛选最佳转染浓度。

1.2.3 裸鼠皮下移植瘤模型的建立

收集对数生长期的SW620结直肠癌细胞,计数后重悬于无血清PMRI1640培养基中,配制每200μL含1×10⁷个肿瘤细胞的悬液。用微量注射器将200μL细胞悬液注射于BALB/c裸鼠右侧腋窝中部背侧皮下。细胞接种过程需遵循无菌操作原则,避免漏液和污染,接种前30min需紫外照射操作台。裸鼠移植瘤长至0.05cm³时即认为造模成功。本实验中实验组、阴性对照组及空白对照组各5只裸鼠,接种7d后均可在皮下触到肿瘤长出,造模成功率100%。造模成功后,实验组每3d于瘤周注射miRNA-486过表达质粒。阴性对照组注射空载体,空白对照组注射等量PBS^[7]。15d后结束治疗,处死裸鼠,取出皮下瘤体。将部分肿瘤组织放入4%多聚甲醛中4℃固定,其余组织放入-80℃冰箱中用于之后研究。

1.2.4 肿瘤生长情况的观察

造模成功后,每3d测量瘤体最长径、最短径,并计算肿瘤体积。肿瘤体积的计算公式为: $V=1/2 LW^2$ (L 为瘤体最长径, W 为瘤体最短径),计算肿瘤体积并绘制生长曲线。接种细胞第15天时处死裸鼠,取出肿瘤组织测肿瘤质量,计算肿瘤生长抑制率。肿瘤生长抑制率= $(1-处理组肿瘤质量/对照组肿瘤质量) \times 100\%$ 。

1.2.5 RT-PCR方法检测结直肠癌移植瘤内miR-486的表达水平

从肿瘤组织中提取RNA并测定RNA浓度,当RNA的纯度在1.8~2.0范围内可进行下一步实

验。逆转录及SYBR实验步骤按照日本TaKaRa公司试剂盒说明书进行,以u6作为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对实验结果进行分析。

1.2.6 免疫组织化学和Western blot分别检测NRP2蛋白的表达

将组织块固定常规石蜡切片,操作步骤按中杉金桥公司免疫组化试剂盒说明书进行。NRP2蛋白阳性细胞内出现棕黄色颗粒,计数5个高倍视野中的阳性细胞数,计数平均阳性细胞数,计算IHS评分。评分标准:A为阳性细胞数分级<1%为0,1%~≤10%为1,>10~≤50%为2,>50~≤80%为3,>80~≤100%为4,B为阳性细胞显色强度分级0(阴性)、1(弱阳性)、2(阳性)、3(强阳性)IHS=A×B。

从组织中提取蛋白,用组织裂解液裂解肿瘤组织并提取总蛋白。BCA法检测蛋白浓度并计算上样量,8%聚丙烯凝胶电泳,PVDF膜转膜,7%脱脂奶粉封闭2 h,加入NRP2一抗,4℃封闭过夜(1:800),加入HRP标记的羊抗兔二抗(1:5000)室温封闭1 h,洗膜,ECL放射自显影并计算灰度值。

1.3 统计学处理

应用SPSS13.0软件进行数据统计,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,对多组数据采用Oneway ANOVA检验,组间比较采用Tukey检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 miR-486对裸鼠皮下结直肠癌移植瘤生长的影响

裸鼠皮下接种SW620细胞后,7 d内造模成功率为100%。每3 d测量裸鼠皮下移植瘤体积,绘制移植瘤生长曲线(图1)。结果显示:实验组中裸鼠体积为 $(0.33\pm 0.04)\text{cm}^3$,而阴性对照组及空白对照组分别为 $(0.60\pm 0.18)\text{cm}^3$ 及 $(0.59\pm 0.21)\text{cm}^3$ 。实验组移植瘤生长速度低于阴性对照组和空白对照组,阴性对照组与空白对照组差异无统计学意义($P>0.05$)。于第3周末取出皮下移植瘤,3组中瘤体质量差异有统计学意义($P=0.008$)。Tukey检验两两比较发现,实验组移植瘤质量显著小于空白对照组 [$(0.42\pm 0.04)\text{g}$ vs $(0.75\pm 0.12)\text{g}$, Mean Diff.=0.34, $P<0.05$],抑瘤率达46.67%,而阴性对照组与空白对照组比较差异无统计学意义 [$(0.75\pm 0.12)\text{g}$ vs $(0.79\pm 0.18)\text{g}$, Mean Diff.=0.04, $P>0.05$]。

2.2 结直肠癌皮下移植瘤中miR-486的表达

采用Tukey检验方法进一步进行两两组间比较,结果发现,与空白对照组比较,实验组移植瘤中miR-486的表达显著升高,差异有统计学意义(10.74 ± 0.30 vs 1.00 , $P<0.05$),而阴性对照组与空白对照组比较差异无统计学意义(1.09 ± 0.23 vs 1.00 , $P>0.05$)。

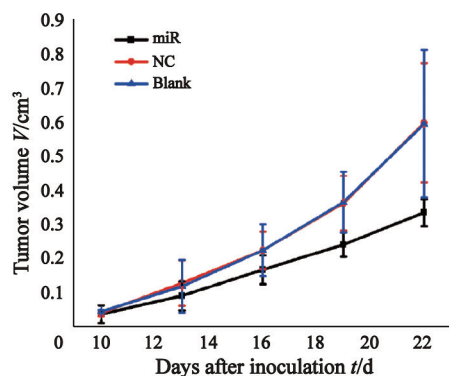


图1 各组裸鼠胃癌移植瘤生长曲线

Fig.1 Growth curve of tumor volume in mice

2.3 免疫组化方法检测裸鼠皮下移植瘤中NRP2蛋白的表达

NRP2蛋白主要定位于结直肠癌细胞胞质内(图2)。免疫组织化学染色可将蛋白染成棕黄色。每张切片中随机观察5个视野并计算IHS评分,实验组得分为 2.20 ± 0.84 ,而阴性对照组及空白对照组得分分别为 6.40 ± 0.89 、 6.20 ± 1.48 。实验组与阴性对照组和空白对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),而阴性对照组与空白对照组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 Western blot测定NRP2蛋白在结直肠癌裸鼠皮下移植瘤中的表达

NRP2蛋白在各组中表达情况见图3。蛋白

表达量计算经GAPDH进行标准化,实验组移植瘤中NRP2的相对表达量较阴性对照组及空白对照组明显下调,差异有统计学意义($P = 0.000$),而阴性对照组及空白对照组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

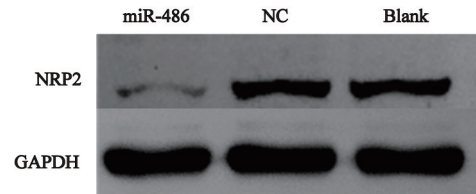


图3 各组结直肠癌裸鼠皮下移植瘤NRP2表达情况
Fig. 3 The expression of NRP2 in subcutaneously xenografted colorectal carcinoma in nude mice

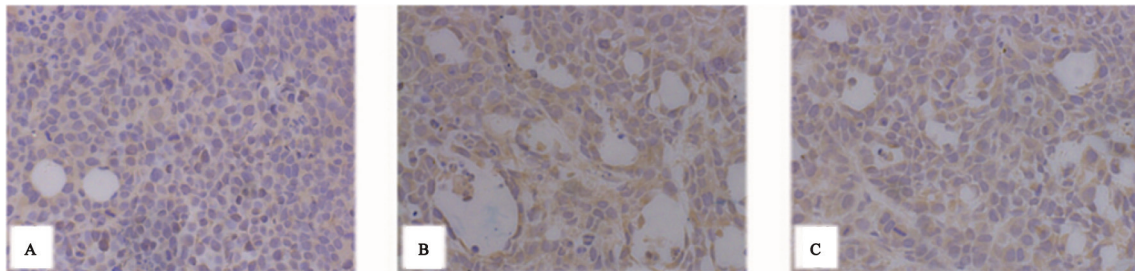


图2 移植瘤组织中NRP2蛋白的分布情况

Fig. 2 The distribution of NRP2 protein in xenografted tumor tissues

A: miR-486 group; B: Normal control group; C: Blank control group

3 讨论

随着人类对分子生物学的不断深入,miRNA在肿瘤发生、发展中的作用逐渐被人们所发现、了解。以miRNA作为肿瘤学标志物及治疗靶点的新思路、新方法已成为当前的研究热点。miR-486是目前研究较为深入的miRNA。Oh等^[8]发现在胃癌组织中miR-486会表达下调,抑制miR-486的表达能促进胃癌细胞的增殖。此外,Peng等^[9]体内、体外实验证明,上调miR-486的表达能够降低肺癌细胞的增殖和迁移能力,同时能够抑制肺癌肿瘤的生长。Zhang等^[10]研究也证实miR-486可在乳腺癌中发挥抑癌基因的作用。本实验通过建立结直肠癌裸鼠移植瘤模型来研究miR-486在结直肠癌细胞生

长、增殖中的作用。实验组我们注射miR-486的过表达质粒,对照组分别采用阴性对照组和空白对照组,阴性对照组注射空载体质粒,有效地排除了注射载体对实验的影响,而空白对照组我们注射的是等量的PBS,排除了细胞培养和肿瘤生长中各种不可避免因素的影响,这样,实验组各组之间的差异我们可以归结于是miR-486对肿瘤的影响。实验结果发现,转染miR-486后,实验组miR-486的表达丰度可上调10倍左右,同时肿瘤体积明显小于其他两组,抑瘤率可达46.67%。此外,我们的前期实验发现,miR-486可在转录后水平上直接抑制NRP2的表达,NRP2首次作为轴突导向分子被发现,在神经系统发育过程中发挥重要作用。而近年来,NRP2被发现在胃癌^[11]和结直肠癌^[12]的淋巴结转移中发挥重要作用,但NRP2是否对肿瘤的

生长有影响目前鲜有研究。本实验中我们发现经瘤周注射miRNA-486治疗后, 免疫组织化学及Western blot实验均能发现NRP2的表达明显下调($P < 0.05$), 而肿瘤的体积、重量明显下降, 这说明miR-486可能是通过降低NRP2的表达从而抑制肿瘤的生长。

综上所述, 本研究证明miR-486可以抑制结直肠癌肿瘤的生长, 而这一作用可能与抑制NRP2蛋白的表达有关, 因此, miR-486有望成为结直肠癌治疗的新靶点。

[参 考 文 献]

- [1] FERLAY J, STELIAROVA-FOUCHER E, LORTET-TIEULENT J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012 [J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(6): 1374-1403.
- [2] MARKOWITZ S D, DAWSON D M, WILLIS J, et al. Focus on colon cancer [J]. *Cancer Cell*, 2002, 1 (3), 233-236.
- [3] LABIANCA R, NORDLINGER B, BERETTA G D, et al. Primary colon cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up [J]. *Ann Oncol*, 2010, 21(Suppl 5): v70-v77.
- [4] DE LA GARZA-RODEA A S, BALDWIN D M, OSKOUIAN B, et al. Sphingosine phosphate lyase regulates myogenic differentiation via S1P receptor-mediated effects on myogenic microRNA expression [J]. *FASEB J*, 2014, 28 (1): 506-519.
- [5] 张 芳, 李 洋, 吴 衢, 等. MiR-192靶向负调控Bim表达诱导肺癌顺铂耐药 [J]. *中国肺癌杂志*, 2014, (5): 384-390.
- [6] 刘成霞, 李 明, 连海峰, 等. miRNA-486-5p对结肠癌细胞株SW620生物学行为的影响 [J]. *山东大学学报: 医学版*, 2015, (1): 16-20.
- [7] DAI L, WANG W, ZHANG S, et al. Vector-based miR-15a/16-1 plasmid inhibits colon cancer growth *in vivo* [J]. *Cell Biol Int*, 2012, 36(8): 765-770.
- [8] OH H K, TAN A L, DAS K, et al. Genomic loss of miR-486 regulates tumor progression and the OLFM4 antiapoptotic factor in gastric cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17 (9): 2657-2667.
- [9] PENG Y, DAI Y, HITCHCOCK C, et al. Insulin growth factor signaling is regulated by microRNA-486, an underexpressed microRNA in lung cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(37): 15043-15048.
- [10] ZHANG G, LIU Z, CUI G, et al. MicroRNA-486-5p targeting PIM-1 suppresses cell proliferation in breast cancer cells [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(11): 11137-11145.
- [11] 徐卫国, 刘 云, 贾纯亮, 等. 胃癌组织中神经纤毛蛋白2表达与肿瘤淋巴管新生和临床病理因素的相关性 [J]. *中华医学杂志*, 2014, (14): 1067-1070.
- [12] OU J J, WEI X, PENG Y, et al. Neuropilin-2 mediates lymphangiogenesis of colorectal carcinoma via a VEGFC/VEGFR3 independent signaling [J]. *Cancer Lett*, 2015, 358 (2): 200-209.

(收稿日期: 2015-06-30 修回日期: 2015-09-07)