

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.01.009

· 基础研究 ·

抑制 miR-21 表达对结肠癌 HCT116 细胞生物学行为的影响

熊兵红¹, 马利², 程勇¹, 张才全¹ (1. 重庆医科大学附属第一医院 普外科, 重庆市普外科学重点实验室, 重庆 400016; 2. 重庆市巴南区第二人民医院内科, 重庆 400054)

[摘要] 目的: 探讨抑制 miR-21 表达对结肠癌 HCT116 细胞增殖、周期、凋亡、侵袭和迁移等生物学行为的影响。方法: 实验分为 3 组, 以 miR-21 抑制剂转染 HCT116 细胞为转染抑制组 (IN), 另设阴性对照组 (NC)、空白对照组 (MOCK), 以 Real-time PCR 检测转染后 HCT116 细胞中 miR-21 的表达, 应用 MTT 法、流式细胞术、Transwell 侵袭和迁移实验检测转染后 HCT116 细胞的增殖、周期、凋亡、侵袭、迁移; 以 Western blotting 检测转染后 HCT116 细胞 PTEN 的表达, 荧光素酶报告实验检测转染后 HCT116 细胞 PTEN 的活性。结果: miR-21 抑制剂转染后, HCT116 细胞中 miR-21 的表达较 NC 和 MOCK 组细胞明显降低。下调 miR-21 后, HCT116 细胞的增殖能力明显降低 [72 h 时: (1.05 ± 0.45) vs (1.43 ± 0.02) , (1.45 ± 0.01) ; $t = 13.83, P = 0.000159$; $t = 14.88, P = 0.000119$], 细胞凋亡率显著增加 [$(16.30 \pm 1.00)\%$ vs $(1.87 \pm 0.53)\%$, $(1.86 \pm 0.12)\%$; $t = 25.01, P = 0.0000152$; $t = 24.985, P = 0.0000152$], 细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期, 细胞的侵袭 [(50 ± 2.0) vs (115 ± 3.0) , (111 ± 3.0) 个; $t = 29.09, P = 0.00000831$; $t = 31.23, P = 0.00000627$] 和迁移能力 [(22 ± 2.0) vs (52.3 ± 2.5) , (53.0 ± 1.0) 个; $t = 24.01, P = 0.0000178$; $t = 16.34, P = 0.0000820$] 明显下降。miR-21 抑制剂转染的 HCT116 细胞中 PTEN 的表达及其荧光素酶相对活性均显著增加。结论: miR-21 可能通过抑制 PTEN 进而调控大肠癌细胞生物学行为, PTEN 可能是 miR-21 的靶基因之一。

[关键词] miR-21; 大肠癌; 生物学行为; PTEN

[中图分类号] R735.3; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)01-0049-06

Impact of inhibition of miRNA-21 on biological functions of colorectal cancer cells

Xiong Bionghong¹, Ma Li², Cheng Yong¹, Zhang Caiquan¹ (1. Department of General Surgery, Key Laboratory of General Surgery of Chongqing, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Department of Internal Medicine, The Second People's Hospital of Banan District of Chongqing, Chongqing 400054, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the effects of microRNA-21 (miR-21) inhibition on the various functional aspects (e.g., proliferation, apoptosis, cell cycle and invasion and migration) of colon cancer HCT116 cells *in vitro*. **Methods:** HCT116 cells were transfected with an miR-21 inhibitor, a non-sequence specific inhibitor as a negative control and the transfection reagent as a mock control, respectively. The level of miR-21 in transfected HCT116 was determined by Real-time PCR. The Proliferation, apoptosis, cell cycle progression, invasion and migration of the transfectants were evaluated by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, flow cytometry (FCM), transwell invasion and migration assays, respectively. Protein level of phosphatase and tensin homolog (PTEN) and PTEN promoter activity in HCT116 cells after transfection were evaluated by Western blotting analysis and the luciferase reporter assay, respectively. **Results:** The level of miR-21 was significantly lower in HCT116 cells transfected with the miR-21 inhibitor than in cells transfected with non-specific inhibitor or mock. At 72 hours after transfection, the miR-21 inhibitor significantly suppressed HCT116 cell pro-

[基金项目] 重庆市自然科学基金资助项目 (No. csts2012JJA0038)。Project supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (No. csts2012JJA0038)

[作者简介] 熊兵红 (1979 -), 男, 湖北省荆州市人, 硕士, 主治医师, 主要从事胃肠道肿瘤的临床及其基础方面的研究。E-mail: xbh791220@163.com

[通信作者] 张才全 (Zhang Caiquan, corresponding author), E-mail: 280343115@qq.com

liferation (1.05 ± 0.45 vs 1.43 ± 0.02 and 1.45 ± 0.01 , $P < 0.001$), significantly increased HCT116 cell apoptosis ($[16.30 \pm 1.00]\%$ vs $[1.87 \pm 0.53]\%$ and $[1.86 \pm 0.12]\%$, $P < 0.0001$) and HCT cell cycle arrest in G_0/G_1 phase, and significantly decreased the invasion (50 ± 2.0 vs 115 ± 3.0 and 111 ± 3.0 , $P < 0.0001$) and migration abilities (22 ± 2.0 vs 52.3 ± 2.5 and 53.0 ± 1.0 , $P < 0.0001$), as compared with the two controls. Moreover, miR-21 inhibition resulted in remarkable increases in protein levels and activity of PTEN in HCT116 cells. **Conclusion:** MicroRNA21 may regulate proliferation/apoptosis, invasion and migration of colorectal cancer cells, possibly through modulating the expression and activity of PTEN.

[**Key words**] miR-21; colorectal cancer; biological behavior; PTEN

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(1): 49-54]

大肠癌(colorectal cancer, CRC)是消化道常见肿瘤,是男性发病率第三、女性第二的肿瘤,在世界多数国家的发病率呈上升趋势。在我国,CRC排在恶性肿瘤致死因素的第四位^[1]。现在认为,CRC的发生是一个多因素、多阶段和多基因改变协同作用的过程,癌基因和抑癌基因的表达失调是CRC发生的分子基础。证据^[2]显示,miRNAs与肿瘤的发生密切相关,很可能是一类潜在的癌基因或抑癌基因。研究^[2]发现,miR-21作为一种原癌基因在人类多种肿瘤组织中表达上调,例如脑胶质瘤、子宫颈癌、卵巢癌、肺癌、胆管癌、前列腺癌、乳腺癌、食管癌、肝癌、胰腺癌、胃癌、B细胞淋巴瘤等,并可能参与肿瘤的浸润转移,但miR-21在CRC中其具体作用机制尚不清楚。本研究拟抑制CRC细胞中miR-21的表达,研究其对细胞生物学行为的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

含10%小牛血清的RPMI-1640、DMEM培养基购自Gibco公司,CCK-8试剂购自Dojindo公司,Lipofectamine™2000转染试剂购自Invitrogen公司,miR-21抑制剂(Anti-miR™ miR-21 Inhibitor)及其阴性对照品购于美国Ambion公司,引物由上海生工生物工程公司合成。总RNA提取试剂盒和反转录试剂购自TaKaRa公司。MiR-21 qPCR检测试剂盒SYBR Premix Ex Taq™ Quantitect SYBR Green PCR kit购自TaKaRa。PTEN抗体购自Cell Signaling公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗、兔抗人β-actin及ECL发光试剂盒均购自Santa Cruz公司。BCA法蛋白质定量试剂盒购自海门碧云天公司,pGL3-control质粒、荧光素酶双报告基因检测系统(Dual-Luciferase Reporter Assay System)均购自Promega公司,Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit试剂盒购自美国Invitrogen公司,碘化丙啶(propidium iodide,PI)及RNaseA购自美国Santa Cruz公司。

1.2 细胞及细胞培养

结肠癌细胞HCT116由本实验室保存传代,HCT116用含10%小牛血清、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素的DMEM培养液,在37℃、饱和湿度、5% CO₂的培养箱中培养,取对数生长期的细胞进行实验。

1.3 Lipofectamine™2000法介导miR-21抑制剂对HCT116细胞的转染

将HCT116细胞经过0.25%胰蛋白酶消化传代,取对数生长期细胞 2×10^5 个接种于6孔板,按实验设计分别转染miR-21抑制剂组(IN)、阴性对照组(NC)和空白对照组(blank control,MOCK)。分别用250 μl无血清RPMI 1640稀释Lipofectamine™2000转染试剂8 μl和miR-21抑制剂/NC/PBS 12.5 μl,室温静置5 min,然后将转染试剂分别与稀释miR-21抑制剂/NC/PBS混合,室温下静置20 min后,分别铺到6孔板中的实验组、阴性对照组和空白对照组(转染HCT116细胞用无血清DMEM),在37℃、5% CO₂的培养箱培养,供后续实验使用。

1.4 Real-time PCR检测转染后HCT116细胞中miR-21的表达

按TRIzol说明书抽提总RNA,分别测定RNA在分光光度计280、260和230 nm的光密度值,计算浓度并评估纯度。按照试剂盒说明书分别测定miR-21,以U6snRNA为内参照,实验重复3次。以阴性对照组及空白对照组细胞为校准样本,转染组细胞为实验样本,分别计算ΔCt值,以Folds = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示miR-21在转染组中的表达相对于对照组的倍比关系。

1.5 MTT法检测miR-21转染对HCT116细胞增殖的影响

取HCT116细胞 2×10^3 个/孔接种于96孔板,分3组,每组设5个复孔。培养24 h后,3组复孔分别加入miR-21抑制剂/NC/PBS和转染试剂,每孔的终体积为200 μl,测定0、1、2、3、4 d时各孔的光密度D值(各孔加入MTT试剂20 μl,在37℃培养

箱内孵育 4 h,于酶标仪上测定 D 值),绘制细胞增殖曲线。实验重复 3 次。

1.6 流式细胞术检测转染后 HCT116 细胞周期和凋亡

以 HCT116 细胞 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板,分实验组、阴性对照组和空白组。于培养箱中培养 24 h 后分别加入转染试剂与 miR-21 inhibitor/NC/PBS,在 37℃ 培养箱内培养 24、48、72 h 后,离心收集细胞;采用 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒,按操作说明进行凋亡染色,上流式细胞仪检测细胞凋亡,实验共重复 3 次。

细胞周期检测时,用流式细胞仪,按操作说明检测细胞周期,计数分别计数 G_0/G_1 、S 和 G_2/M 期的细胞比例,实验共重复 3 次。

1.7 Transwell 小室检测细胞迁移和侵袭能力

将 Matrigel 用无血清 RPMI 1640 培养基按 1:1 比例配制成细胞外基质胶,按 30 μ l/室加入 Transwell 小室聚碳酸酯膜(直径 6.5 mm,孔径 8 μ m)上面,包被细胞外基质胶。转染 HCT116 细胞 24 h 后,用 2.5% 胰酶消化,悬浮于无血清 RPMI 1640 培养基中,调整细胞密度为 1×10^6 /ml。

细胞迁移实验:用未包被细胞外基质胶的 Transwell 小室,在小室的上室中加入 100 μ l 细胞悬液,下室中加入 600 μ l 含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基,置于 37℃、5% CO_2 、饱和湿度培养箱中孵育 14 h;每组设 3 个平行孔,实验重复 3 次。孵育结束后,擦除小室滤膜内表面的细胞,用 4% 多聚甲醛固定、PBS 轻洗,0.1% 结晶紫染色,200 倍显微镜下分别计数穿过膜的细胞(迁移细胞及侵袭细胞)并拍照,随机选取 5 个视野,取其平均值。细胞侵袭实验:用聚碳酸酯膜包被了细胞外基质胶的 Transwell 小室,在小室的上室中加入 200 μ l 细胞悬液,在培养箱中孵育 24 h,余同迁移实验。

1.8 Western blotting 检测转染后 HCT116 胞细胞中 PTEN 蛋白的表达

转染后 72 h 分别进行细胞裂解收集蛋白,行 SDS-PAGE 分离蛋白,并转至硝酸纤维素膜上,常规抗体杂交,增强化学发光剂显色。用 Bio-Rad 凝胶成像仪显色,进行发光检测,Quantity One 软件分析凝胶图像的灰度值。以 β -actin 蛋白为内参照,以 PTEN 条带与 β -actin 条带灰度值的比值表示 PTEN 表达的相对值。实验数据均重复 3 次。

1.9 双荧光素酶报告实验检测 PTEN 活性

根据多种 miRNA 靶基因生物信息学在线分析软件,如 TargetScan、miRanda、Pictar 等,预测 miR-21 可能的靶基因,并获取含有作用位点的片段序列。

设计引物,PTEN-3'-UTR-WT:上游为 5'-TTGTGG CAACAGATAAGTTTGCAGTTGGCTAAGAGAGGTT-3',下游为 5'-CATTCCTTAACCCGAATACATGCAT-TAGA ATGTAGCAAAA-3';PTEN-3'-UTR-MT:上游为 5'-TTGTGGCAACAGCTGAATCTGCAGTTGGCTAAGA GAGGTT-3',下游为 5'-ATGTAGCAAAAACCCTTCG-GAAACCTCTCTTAGCCAACTGC-3'。扩增出包含有 miR-21 保守性结合位点的 3'-UTR-WT 及 3'-UTR-MT,扩增产物凝胶电泳,然后行目的基因切胶回收,再行目的基因和载体的连接,构建 pGL3-PTEN-3'-UTR 和 PTEN-3'-UTR-MT 载体,再依次行转化感受态菌、目的基因测序、质粒 DNA 抽提,将重组质粒转染 293T 细胞,然后行双荧光素酶分析,以荧光素酶活性间接表示 PTEN 蛋白的活性。

1.10 统计学处理

采用 SPSS1 7.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两个样本均数比较采用 t 检验,多个样本均数比较采用 One-way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-21 抑制剂转染后 HCT116 细胞中 miR-21 的表达

转染抑制组(IN)及阴性对照组(NC)、空白对照组(MOCK)miR-21 相对表达量分别为 0.643 ± 0.01 、 1.02 ± 0.01 、 1.05 ± 0.02 。抑制组 miR-21 表达水平则明显低于空白对照组和阴性对照组(IN vs NC: $t = 33.52$, $P = 0.000\ 004\ 72$;IN vs MOCK: $t = 21.32$, $P = 0.000\ 028\ 6$;图 1)。

2.2 下调 miR-21 抑制 HCT116 细胞的增殖

转染抑制组(IN)及阴性对照组(NC)、空白对照组(MOCK)的 D 值分别为: 1.05 ± 0.45 、 1.43 ± 0.02 、 1.45 ± 0.01 。与对照组相比,实验组在 72 h 后 D 值明显下降,具有统计学意义(IN vs NC: $t = 13.83$, $P = 0.000\ 159$;IN vs MOCK: $t = 14.88$, $P = 0.000\ 119$),对照组之间无统计学差异($t = 1.58$, $P = 0.18$,图 1)。可见,下调 miR-21 可以有效抑制 HCT116 细胞的增殖。

2.3 miR-21 下调导致 HCT116 细胞阻滞于 G_0/G_1 期

细胞周期分析(图 2)显示,空白与阴性对照组细胞 G_0/G_1 期为 $(40.42 \pm 10.41)\%$ 、 $(40.41 \pm 11.13)\%$,组间无差异($t = 0.004$, $P = 0.997$);转染 miR-21 抑制剂的 HCT116 细胞 48 h 后处于 G_0/G_1 期的细胞明显增多 $(65.35 \pm 7.25)\%$ (IN vs MOCK: $t = 34.031$, $P = 0.000\ 004\ 45$;IN vs NC: $t = 32.51$,

$P=0.000\ 005\ 34$)。空白与阴性对照组细胞 S 期分别为(54.74 ± 6.11)%、(54.33 ± 16.87)%, 对照组间无差异($t=0.42, P=0.708$); 转染 anti-miR-21 的细胞组 S 期为(33.04 ± 16.25)%, 转染之后的细胞 S 期比例较对照组明显降低(图 3, IN vs MOCK: $t=14.88, P=0.000\ 030\ 4$; IN vs NC: $t=13.83, P=0.000\ 102$), 表明细胞有丝分裂能力下降。

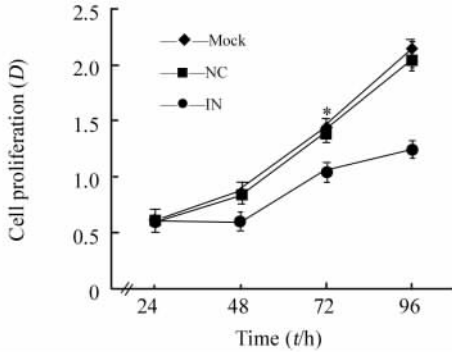


图 1 下调 miR-21 抑制 HCT116 细胞的增殖
Fig. 1 Downregulation of miR-21 inhibited proliferation of HCT116 cells

2.4 miR-21 下调后促进细胞凋亡

流式细胞仪检测结果(图 3)显示, 转染 48 h

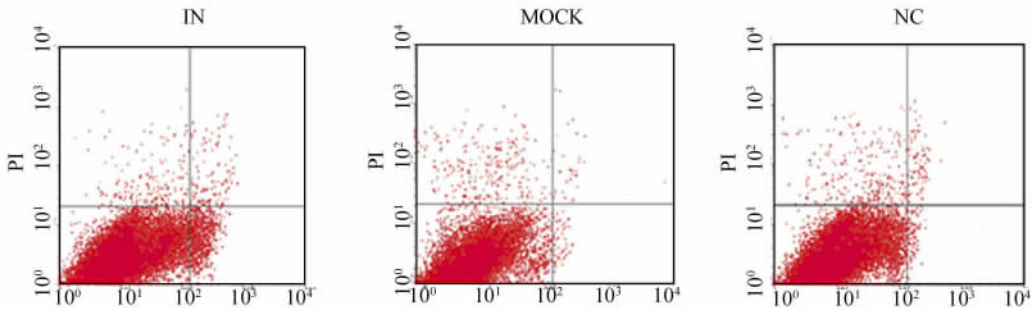


图 3 流式细胞仪检测 miR-21 下调后 HCT116 细胞的凋亡

Fig. 3 Apoptosis of HCT116 cells after miR-21 downregulation as detected by flow cytometry

2.5 miR-21 下调后抑制 HCT116 细胞的侵袭和迁移

miR-21 抑制剂组穿过细胞数(50 ± 2.0)与空白对照组(115 ± 3.0)和阴性对照组(111 ± 3.0)相比明显减少(IN vs NC: $t=29.09, P=8.31 \times 10^{-6}$; IN vs MOCK: $t=31.23, P=6.27 \times 10^{-6}$), 提示下调 miR-21 细胞中的表达则显著降低细胞的侵袭能力。同样, miR-21 被抑制后, 与空白对照组(52.33 ± 2.50)和阴性对照组(53 ± 1.0)相比, 迁移细胞数(22 ± 2.0)明显减少(IN vs NC: $t=24.01, P=1.78 \times 10^{-5}$; IN vs

MOCK: $t=16.34, P=8.20 \times 10^{-5}$)。后, 实验组的凋亡率为(16.30 ± 1.0)%, 而 HCT116 细胞空白对照组和 NC 组细胞的分别为(1.87 ± 0.53)%和(1.86 ± 0.12)%; 实验组和 NC 组、空白对照组之间的凋亡率差别有统计学意义(IN vs NC: $t=25.01, P=0.000\ 015\ 2$; IN vs MOCK: $t=24.985, P=0.000\ 015\ 2$), 而对照组之间无统计学差异($t=1.265, P=0.275$)。由此可见抑制 miR-21 能促进细胞凋亡。

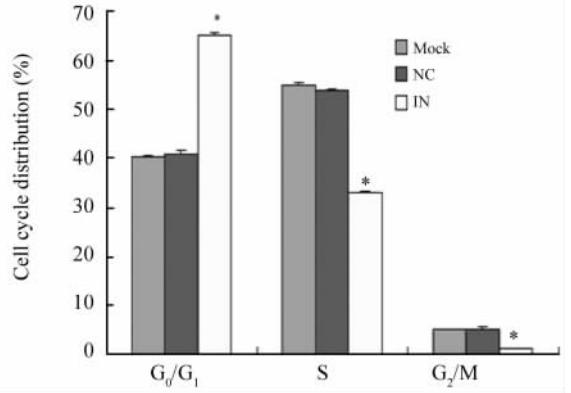


图 2 miR-21 下调后 HCT116 细胞周期的变化
Fig. 2 Cell cycle change of HCT116 cells after miR-21 downregulation

* $P < 0.05$ vs Mock or NC group

MOCK: $t=16.34, P=8.20 \times 10^{-5}$)。

2.6 miR-21 下调后增加 HCT116 细胞中 PTEN 蛋白的表达

结果(图 4)显示, PTEN 蛋白在转染抑制组(IN)及阴性对照组(NC)、空白对照组(MOCK)中的相对表达量分别为 $2.01 \pm 0.12, 1.02 \pm 0.07$ 和 1.03 ± 0.09 , 在抑制组表达明显升高(IN vs NC: $t=27.839, P=9.904 \times 10^{-6}$; IN vs MOCK: $t=28.068, P=9.59 \times 10^{-6}$)。由此可见, 下调 miR-21 后可增

加 HCT116 细胞中 PTEN 蛋白的表达。

2.7 miR-21 下调后荧光素酶相对活性(PTEN 活性)的变化

PTEN-3'-UTR-WT 共转染组,抑制 miR-21 后荧光素酶相对活性明显增加,方差分析表明,4 组间 PTEN 活性差异有统计学意义($F = 609.452, P = 8.85 \times 10^{-10}$)。LSD 法两两比较显示,PTEN-3'-UTR-WT 共转染组与其 NC 对照组($P = 5.83 \times 10^{-10}$)及 PTEN-3'-UTR-MT + IN 组的差异有统计学意义($P = 4.49 \times 10^{-10}$) (图 5);PTEN-3'-UTR-MT 组抑制 miR-21 后,荧光素酶相对活性与其阴性对照组比较差异无统计学意义($P = 0.855$)。

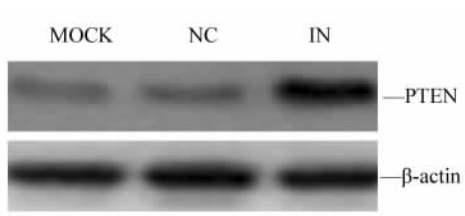


图 4 miR-21 下调后 HCT116 细胞中 PTEN 蛋白的表达

Fig. 4 PTEN protein expression in HCT116 cells after miR-21 downregulation detected by Western blotting

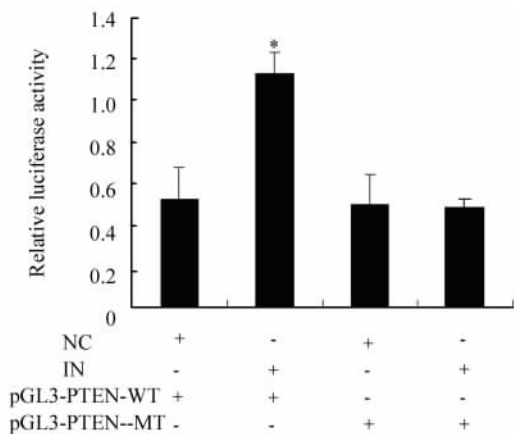


图 5 miR-21 下调后 PTEN 活性的变化

Fig. 5 Change of PTEN activity in HCT116 cells after miR-21 downregulation by luciferase reporter assay

* $P < 0.05$ vs other groups

3 讨论

目前研究认为,大肠癌的发生、发展是多因素、多阶段、多因子的复杂过程,在此过程中癌基因的激活与抑癌基因的丢失或表达失调是其重要原因。miRNA 是近年发现的一类内源性非编码单链 RNA,

miRNAs 与肿瘤的发生密切相关,有人提出了“癌 miRNAs 与抑癌 miRNAs”的观点^[3,4],即 miRNAs 在肿瘤的发生与发展过程中既可扮演癌基因也可扮演抑癌基因的角色。miR-21 是一种癌基因,在各种肿瘤中表达明显上升,与肿瘤细胞的生长、增殖、侵袭转移等生物学行为密切相关。它的编码基因定位于 17q23.2,即液泡膜蛋白基因(vacuole membrane protein-1, *VMPI*)编码区,*VMPI* 基因的第十内含子。miR-21 在 CRC 中高表达,但 miR-21 在 CRC 中的具体调节机制尚不明了^[5]。miRNA 具有调节下游靶基因表达的作用,因此在大多肿瘤中高表达的 miR-21 很可能是通过调节同增殖、凋亡、侵袭或迁移相关基因的表达而发挥促进肿瘤发生发展的作用。Meng 等^[6,7]最早发现,miR-21 可以在胆管癌、肝癌细胞中作用于肿瘤抑制基因 *PTEN* 并促进肿瘤细胞侵袭和迁移。抑癌基因 *PTEN* 是 miR-21 的一个靶基因,miR-21 通过靶向作用于 *PTEN*,促进了胆管癌的生长。抑制肝癌细胞中 miR-21 表达时,能增加 *PTEN* 的表达,减少细胞增生、迁移和侵袭。增加 miR-21 表达时,能减少 *PTEN* 的表达,增加细胞增生、迁移和侵袭^[6,7]。再次证明了 *PTEN* 是 miR-21 的一个直接靶基因。

Asangani 等^[8]发现,miR-21 在 CRC 细胞株中可通过转录后水平下调肿瘤抑制 *PDCD4* 基因的表达,从而促进肿瘤细胞的侵袭和迁移。Chan 等^[9]发现,在成胶质细胞瘤中高表达的 miR-21 具有抗肿瘤细胞凋亡的作用。在胃癌细胞 AGS 中,抑制其 miR-21 表达时,能增加 *RECK* 的表达,减少细胞增生、迁移和侵袭,反之亦然^[10]。在胃癌细胞 BGC-823 中,miR-21 可通过靶向 *PTEN* 促进细胞的增殖和侵袭^[11]。这些均提示,肿瘤中高表达的 miR-21 可能发挥类似原癌基因作用,通过反向调节肿瘤抑制基因和/或控制细胞分化或凋亡的基因从而促进肿瘤的形成。

但也有不一致的报道,Medina 等^[12]通过裸鼠实验证明仅仅过表达 miR-21 就可引发肿瘤的发生,Hailey 等^[13]却通过体外实验证明 miR-21 过表达并不能导致肿瘤的发生,在非小细胞肺癌中 *PTEN* 并非 miR-21 的靶标。Cheng 等^[14]报道,在 HeLa 细胞中抑制 miR-21 时,HeLa 细胞会显著加快生长。Si 等^[15]在乳腺癌细胞 MCF-7 中的研究发现,MCF-7 细胞中 miR-21 与 *PTEN* 并不存在这样的调节关系。Folini 等^[16]发现敲除前列腺癌细胞中 miR-21 表达,不影响其增值、侵袭能力和放疗敏感性,也不调节肿瘤抑制因子 *PTEN*、*PDCD-4* 的表达,表明 miR-21

的致癌属性存在细胞和组织依赖性。Wang 等^[17]发现 miR-21 在 Cdc25A 过表达的结肠癌细胞中低表达。可见,人们对 miR-21 的作用及其与 PTEN 的关系还没有达成共识,故需要进一步研究。

本研究通过 LipofectamineTM 2000 转染 miR-21 抑制剂后, HCT116 细胞中 miR-21 表达水平明显下降。抑制 miR-21 后, G₀/G₁ 期比例明显增加, S 期比例减少。说明 miR-21 抑制剂能使 CRC 细胞停滞于 G₀/G₁ 期, 有效地干扰了肿瘤细胞的有丝分裂过程。抑制 miR-21 后, 其凋亡率明显增加, 故 miR-21 抑制剂能促进诱导细胞凋亡, 说明 miR-21 是一个抗凋亡因子, 与前面研究相似^[9-11, 18]。

本研究结果显示, miR-21 影响着肿瘤的多种生物学行为, 初步阐明了抑制 miR-21 后在结肠癌细胞的增殖、侵袭、迁移、凋亡、周期等方面所起的重要作用。抑制 miR-21 的表达可抑制 CRC 细胞的增殖, 而且可使癌细胞 G₀/G₁ 期的比例增加, 促进诱导细胞的凋亡, 使癌细胞 S 期的比例增加; 另外, miR-21 表达下降后 HCT116 细胞的侵袭、迁移能力降低。抑制其 miR-21 表达时, 能增加 PTEN 的表达, 抑制细胞增生、迁移和侵袭。表明 miR-21 可通过靶向 PTEN 促进细胞的增殖和侵袭。

本研究表明, 在 CRC 细胞株中, PTEN 可能是 miR-21 的靶基因, 说明 miR-21 可能通过抑制 PTEN 促进肿瘤细胞的侵袭和转移, 可能是其参与肿瘤发生、发展的机制之一, 但其具体调控机制还有待进一步研究, 随着 miRNAs 研究的深入, 特别是其对肿瘤细胞调控网络的深入了解, 可能会发现 miR-21 具有更多的功能和作用靶点。

[参 考 文 献]

[1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.

[2] Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors [J]. N Engl J Med, 2005, 353(17): 1768-1771.

[3] Manikandan J, Aarathi JJ, Kumar SD, et al. The potential role of non-coding microRNAs in understanding cancer [J]. Bioinformatics, 2008, 2(8): 330-334.

[4] Cho WC. OncomiRs: The discovery and progress of microRNAs in cancers [J]. Mol Cancer, 2007, 6(1): 60.

[5] Xiong BH, Cheng Y, Ma L, et al. MiR-21 regulates biological behavior through the PTEN/PI-3K/Akt signaling pathway in hu-

man colorectal cancer cells [J]. Int J Oncol, 2013, 42(1): 219-228.

- [6] Meng F, Henson R, Lang M, et al. Involvement of human microRNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines [J]. Gastroenterology, 2006, 130(7): 2113-2129.
- [7] Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer [J]. Gastroenterology, 2007, 133(2): 647-658.
- [8] Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer [J]. Oncogene, 2008, 27(15): 2128-2136.
- [9] Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an anti-apoptotic factor in human glioblastoma cells [J]. Cancer Res, 2005, 65(14): 6029-6033.
- [10] Zhang Z, Li Z, Gao C, et al. miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression [J]. Lab Invest, 2008, 88(12): 1358-1366.
- [11] Zhang BG, Li JF, Yu BQ, et al. microRNA-21 promotes tumor proliferation and invasion in gastric cancer by targeting PTEN [J]. Oncol Rep, 2012, 27(4): 1019-1026.
- [12] Medina PP, Nolde M, Slack FJ, et al. OncomiR addiction in an *in vivo* model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma [J]. Nature, 2010, 467(7311): 86-90.
- [13] Hatley ME, Patrick DM, Garcia MR, et al. Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21 [J]. Cancer Cell, 2010, 18(3): 282-293.
- [14] Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, et al. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(4): 1290-1297.
- [15] Si ML, Zhu S, Wu H, et al. miR-21-mediated tumor growth [J]. Oncogene, 2007, 26(19): 2799-2803.
- [16] Folini M, Gandellini P, Longoni N, et al. miR-21: An oncomir on strike in prostate cancer [J]. Mol Cancer, 2010, 9(1): 12.
- [17] Wang P, Zou F, Zhang X, et al. MicroRNA-21 negatively regulates Cdc25A and cell cycle progression in colon cancer cells [J]. Cancer Res, 2009, 69(20): 8157-8165.
- [18] Liu M, Tang Q, Qiu M, et al. MiR-21 targets the tumor suppressor RhoB and regulates proliferation, invasion and apoptosis in colorectal cancer cells [J]. FEBS Lett, 2011, 585(19): 2998-3005.

[收稿日期] 2013 - 11 - 30

[修回日期] 2014 - 01 - 15

[本文编辑] 黄静怡