

miR-126 对结肠癌 SW480 细胞增殖、凋亡、周期及 SOX2 表达的影响

孟 玮¹, 宗治国², 史晓宇¹, 张 敬¹, 赵峻峰¹

(1. 河北北方学院附属第一医院肿瘤内科, 河北 张家口 075000; 2. 河北北方学院附属第一医院骨外科, 河北 张家口 075000)

【摘要】 目的 探讨 miR-126 通过靶向调控 SOX2 表达影响结肠癌细胞的增殖和凋亡。**方法** 脂质体 Lipofectamine™2000 将 miR-126 mimics 和 miR-126 NC 转入 SW480 细胞中, RT-PCR 法检测 miR-126 表达, MTT 法检测细胞活力, 流式细胞术检测细胞凋亡及细胞周期, RT-PCR 法及 western blot 检测细胞中 SOX2 蛋白及 mRNA 表达, 并进行荧光素酶报告基因分析。**结果** 与 miR-126 NC 组比较, miR-126 mimics 组 miR-126 表达量显著提高 ($P < 0.01$), 细胞活力降低 ($P < 0.01$), 细胞早期凋亡率及晚期凋亡率均显著提高 ($P < 0.01$), 细胞周期阻滞于 G1 期 ($P < 0.01$), 同时 miR-126 mimics 能够靶向下调 SOX2 蛋白及 mRNA 表达 ($P < 0.01$)。**结论** miR-126 mimics 通过靶向下调 SOX2 表达进而抑制 SW480 细胞增殖, 并诱导细胞凋亡。

【关键词】 miR-126; 结肠癌细胞 SW480; 增殖; 凋亡; SOX2

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 04-0093-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.04.016

Effect of miR-126 on proliferation and apoptosis in colon cancer cells via targeting regulation of SOX2 expression

MENG Wei¹, ZONG Zhiguo², SHI Xiaoyu¹, ZHANG Jin¹, ZHAO Junfeng¹

(1. Department of Oncology; 2. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

【Abstract】 Objective To explore the effect of miR-126 on proliferation and apoptosis in colon cancer cells via targeting regulation of SOX2 expression. **Methods** miR-126 mimics and miR-126 NC were transfected into SW480 cells by liposome Lipofectamine™2000. The expression of miR-126 was detected by RT-PCR. Cell viability was determined by MTT staining. Cell apoptosis and cell cycle were detected by flow cytometry. The expression of SOX2 protein and mRNA was measured by western blot and RT-PCR. Luciferase reporter analysis was performed. **Results** Compared with miR-126 NC, the expression of miR-126 was upregulated ($P < 0.01$), cell viability was reduced ($P < 0.01$), early cell apoptosis rate and late apoptosis rate were increased ($P < 0.01$), cell cycle was arrested at G1 phase ($P < 0.01$), meanwhile, miR-126 mimics targeted downregulation of the expression of SOX2 protein and mRNA ($P < 0.01$). **Conclusions** miR-126 mimics can inhibit SW480 cell proliferation and induce cell apoptosis by targeting downregulation of expression of SOX2.

【Key words】 miR-126; colon cancer cell SW480; proliferation; apoptosis; SOX2

结肠癌是一种常见的消化道恶性肿瘤,近年来由于人们生活方式转变、环境变化及遗传因素的影响,结肠癌的发病率呈上升趋势^[1-2]。研究发现结肠癌的发生发展与癌基因的激活、抑癌基因的失活密切相关^[3-4]。miRNA 是一类小分子的非编码 RNA,能够结合于靶基因的 mRNA 3' UTR 区域,参与细胞的增殖、分化与凋亡等^[5-6]。miRNA 在肿瘤中被分为“原癌 miRNA”或者“抑癌 miRNA”,进而参与肿瘤的发生发展^[3-4]。miR-126 在肺癌、肝癌、结肠癌、乳腺癌、宫颈癌等多种癌组织中低表达,因此被认为是一种抑癌 miRNA,但在结肠癌发生发展过程中的具体机制报道较少^[7-8]。同时 SOX2 是一种高度保守的能够维持胚胎干细胞功能的核转录因子,有研究表明 SOX2 可能是 miR-126 的下游靶基因^[9-10],因此本研究将探讨 miR-126 是否能够通过靶向调控 SOX2 表达影响结肠癌细胞的增殖与凋亡。

1 材料和方法

1.1 细胞株

结肠癌 SW480 细胞购于中国科学院细胞库,目录号 TCHu172。

1.2 主要试剂与仪器

miR-126 mimics 和 miR-126 NC 均购于上海吉马生物技术有限公司;兔抗人 SOX2 及 GAPDH 多克隆抗体均购于美国 Abcam 公司;胎牛血清,DMEM 培养基均购于美国 Hyclone 公司;BCA 蛋白测定试剂盒,MTT 均购于南京凯基生物技术有限公司;Trizol 总 RNA 提取试剂盒,LipofectamineTM3000 脂质体,一步法 miRNA 反转录试剂盒均购于大连宝生生物技术有限公司;重组质粒 pGL-3 SOX2 3' UTR-Wt 及 pGL-3 SOX2 3' UTR-Mut 购于广州锐博生物技术有限公司。

DYCZ-40D 型转印电泳仪均购于北京六一仪器厂;Mini-PROTEAN # 1658000 小型垂直电泳仪,GelDoc 2000 凝胶成像系统购于美国伯乐公司;MK3 型酶标仪,FACSCanto II 型流式细胞仪均购于美国 BD 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 miRNA 的转染

当 SW480 细胞密度达到 50% 时候,利用 LipofectamineTM3000 脂质体将 miR-126 mimics 和 miR-126 NC 转染到 SW480 细胞并于 6 h 后换液,再

继续培养 48 h,RT-PCR 法检测细胞中 miR-126 的表达。

1.3.2 RT-PCR 法检测细胞中 miR-126 表达

根据 Trizol 试剂盒提取细胞中总 RNA,并检测总 RNA 的纯度,接着根据反转录试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA,逆转录产物以琼脂糖凝胶电泳。反应体系:Rnase 9.5 μ L,模板 1 μ L,上游引物 1 μ L,下游引物 1 μ L,UltraSYBR Mixture 12.5 μ L。反应程序:预变性:95 $^{\circ}$ C,5 min;变性:95 $^{\circ}$ C,20 s;退火:50 $^{\circ}$ C,30 s;延伸:72 $^{\circ}$ C,30 s。引物序列如下:miR-126:上游引物:5'-GCUCGUACCGUGAGUA AU-3',下游引物:5'-CAGTGCAGGGTCCGAGGT-3',SOX2:上游引物:5'-GCTACAAGACAACACCCTGAT-3',下游引物:5'-CAATCTCCTAAGCCACGAG-3',GAPDH:上游引物 5'-TCAACGACCACCTTTGTCAAGCTCA-3',下游引物:5'-GCTGGTG GTCCAGGGGTCTTACT-3'。

1.3.3 MTT 法检测细胞活力

将 5×10^3 个 SW480 细胞接种到 96 孔板并培养 24 h,按“1.3.2”进行转染 48 h 后,加入 20 μ L 终浓度为 5 mg/mL 的 MTT 孵育 4 h 后,弃去上清液,继续加入 150 μ L 二甲基亚砷,震荡 10 min,在酶标仪 570 nm 处测吸光值。

1.3.4 Annexin V-FITC/PI 法检测细胞凋亡情况

将 8×10^3 个 SW480 细胞接种到 6 孔板,培养 24 h 后,按“1.3.2”进行转染 48 h 后,每组收集 1×10^5 /mL 个细胞,再加入结合缓冲液吹打混匀后,依次加入 5 μ L 的 Annexin V-FITC 及 PI,继续吹打混匀,并于室温避光孵育 10 min,于 1 h 内在流式细胞仪上进行细胞凋亡分析。

1.3.5 流式细胞术检测细胞周期

将 8×10^3 个 SW480 细胞接种到 6 孔板,培养 24 h 后,按“1.3.2”进行转染 48 h 后,每组收集 1×10^5 /mL 个细胞,加入 RNase 吹打混匀后于室温下孵育 1 h,再加入 PI 染液于室温下孵育 30 min,在流式细胞仪上进行细胞周期分析。

1.3.6 Western blot 检测细胞中 SOX2 表达

将 8×10^3 个 SW480 细胞接种到 6 孔板,培养 24 h 后,按“1.3.2”转染 48 h 后,收集细胞并裂解,离心得到上清液就是总蛋白,并用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。蛋白煮沸 10 min 变性后,制作浓缩胶及分离胶,室温水封 30 min。30 ng 样品上样后进行十二烷基苯磺酸钠凝胶电泳,PVDF 湿法转膜。2% 的 BSA 室温下孵育 1 h,一抗溶液(兔 SOX2 及 GAPDH

多克隆抗体,稀释度为1:100)4℃过夜孵育,第2天在室温条件下,于二抗溶液孵育1~2 h,在凝胶成像系统中曝光。

1.3.7 荧光素酶报告基因表达分析

将 miR-126 mimics + pGL-3 SOX2 3' UTR-Wt, miR-126 NC + pGL-3 SOX2 3' UTR-Wt, miR-126 mimics + pGL-3 SOX2 3' UTR-Mut, miR-126 NC + pGL-3 SOX2 3' UTR-Mut 四组重组载体转染到 SW480 细胞,采用双荧光素酶系统检测酶活性。计算公式:相对荧光值 = 萤火虫荧光素梅荧光值/海肾荧光素梅荧光值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件分析数据,实验数据以平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 *t* 检验分析两组之间数据差异性,以 *P* < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 miR-126 mimics 转染效果的检测

miR-126 mimics 和 miR-126 NC 转染 SW480 细胞 48 h 后,与 miR-126 NC 组 (0.14 ± 0.01) 比较,miR-126 mimics 组 (0.92 ± 0.08) 中 miR-126 表达量显著上调 (*P* < 0.01)。

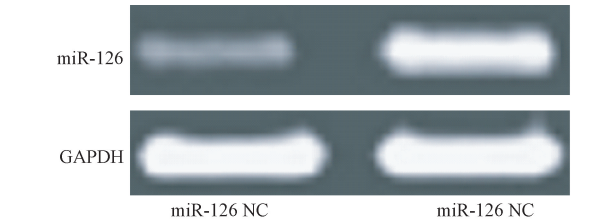
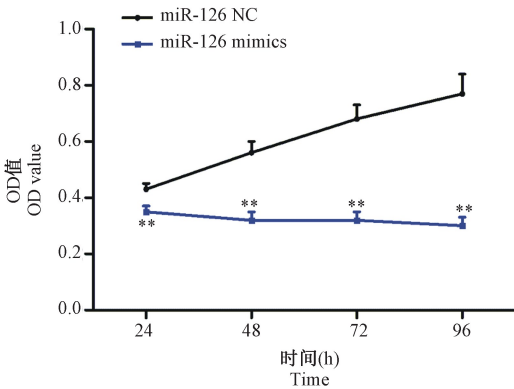


图1 miR-126 mimics 转染效果的检测

Fig.1 Transfection effects of miR-126 mimics

2.2 miR-126 mimics 对 SW480 细胞活力的影响

miR-126 mimics 和 miR-126 NC 转染 SW480 细胞 24、48、72 h 后,与 miR-126 NC 组比较,miR-126 mimics 组细胞活力逐渐降低 (*P* < 0.01)。



注:与 miR-126 NC 比较, ***P* < 0.01。

图2 miR-126 mimics 对 SW480 细胞活力的影响

Note. Compared with miR-126 NC, ***P* < 0.01.

Fig.2 Effect of miR-126 mimics on SW480 cell viability

2.3 miR-126 mimics 对 SW480 细胞凋亡及细胞周期的影响

如图 3,图 4 及表 1 所示,miR-126 mimics 和 miR-126 NC 转染 SW480 细胞 48 h 后,与 miR-126 NC 组比较,miR-126 mimics 组细胞早期凋亡率及晚期凋亡率均显著提高 (*P* < 0.01),且细胞周期阻滞于 G1 期 (*P* < 0.01)。

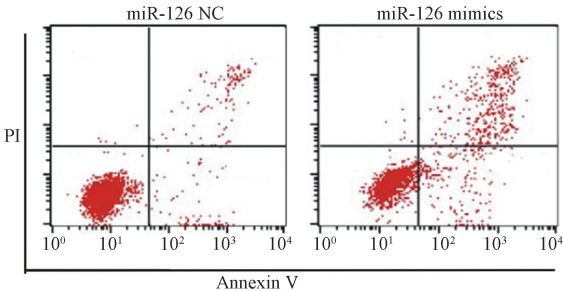


图3 miR-126 mimics 对 SW480 细胞凋亡的影响

Fig.3 Effect of miR-126 mimics on SW480 cell apoptosis

2.4 报告基因分析

将 miR-126 mimics + pGL-3 SOX2 3' UTR-Wt, miR-126 NC + pGL-3 SOX2 3' UTR-Wt, miR-126

表1 miR-126 mimics 对 SW480 细胞凋亡及细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$, %)

Tab.1 Effect of miR-126 mimics on SW480 cell apoptosis and cell cycle

组别 Groups	细胞凋亡率 Apoptosis rate		细胞周期 Cell cycle		
	早期凋亡率 Early apoptosis rate	晚期凋亡率 Late apoptosis rate	G1 期 G1 phase	S 期 S phase	G2 期 G2 phase
miR-126 NC	2.31 ± 0.23	3.04 ± 0.30	50.58 ± 5.05	28.45 ± 2.84	20.97 ± 2.10
miR-126 mimics	17.96 ± 1.80 **	18.86 ± 1.88 **	63.49 ± 6.35 **	20.65 ± 2.06 **	15.86 ± 1.58 **

注:与 miR-126 NC 比较, ***P* < 0.01。

Note. Compared with the miR-126 NC, ***P* < 0.01.

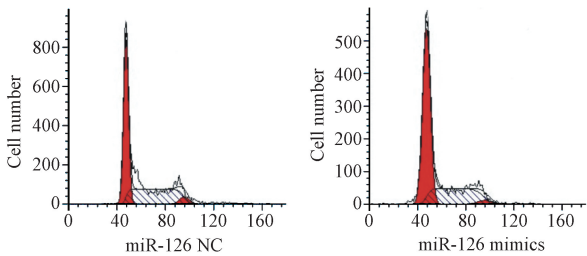


图 4 miR-126 mimics 对 SW480 细胞周期的影响

Fig. 4 Effect of miR-126 mimics on SW480 cell cycle

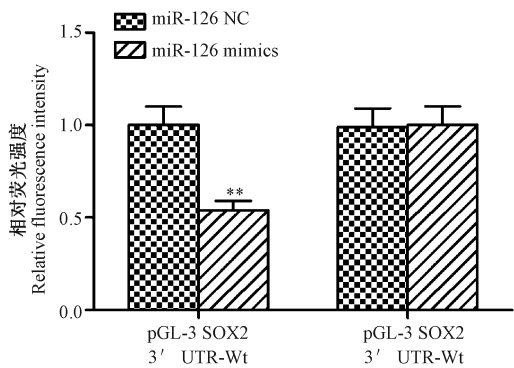
mimics + pGL-3 SOX2 3' UTR-Mut, miR-126 NC + pGL-3 SOX2 3' UTR-Mut 四组重组载体转染到 SW480 细胞, 结果发现 miR-126 mimics + pGL-3 SOX2 3' UTR-Wt 组荧光强度最低 ($P < 0.01$), 其它几组荧光强度差异无显著性 ($P > 0.05$)。

2.5 miR-126 mimics 对 SW480 细胞中 SOX2 蛋白及 mRNA 表达量的影响

如图 6 所示, miR-126 mimics 和 miR-126 NC 转染 SW480 细胞 48 h 后, 与 miR-126 NC 组比较, miR-126 mimics 组 SOX2 蛋白及 mRNA 表达量显著下调 ($P < 0.01$)。

3 讨论

miRNA 是一类高度保守的能够与靶基因 3' UTR 区域结合的非编码 RNA 分子, 进而负性调控靶基因的转录, 参与细胞的增值、分化与凋亡。研究发现 miRNA 基因组主要位于肿瘤基因的脆性区, 因此常作为癌基因或者抑癌基因参与肿瘤的发生



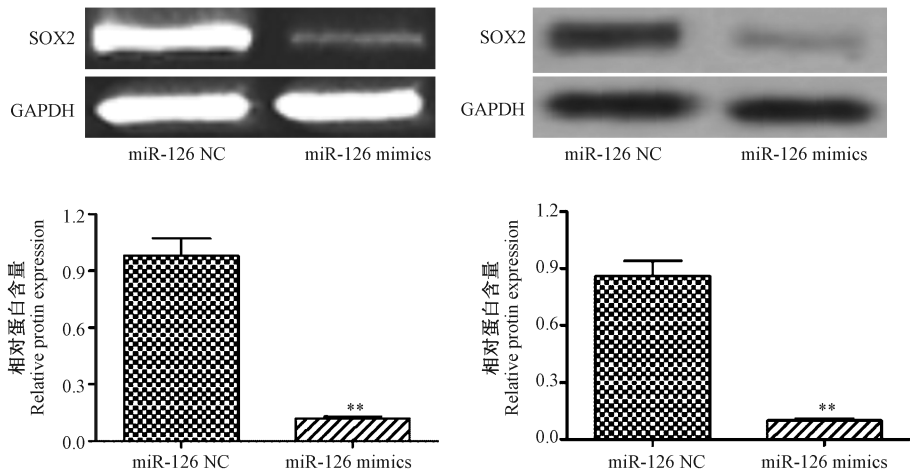
注: 与 miR-126 NC 比较, $**P < 0.01$ 。

图 5 报告基因分析

Note. Compared with the miR-126 NC, $**P < 0.01$.

Fig. 5 Reporter gene analysis

发展^[3-4]。2003 年 Michael 等^[6]学者首次报道了结肠癌中存在差异性表达的 miRNA (miR-143 及 miR-145), 其表达量显著下调, 且发现 G 蛋白 $\gamma 7$ 和 HGK 等是其靶基因。后续研究人员通过微阵列芯片分析法及 RT-PCR 技术不断在肠癌组织中发现异常表达的 miRNA^[5-6]。至此 miRNA 作为肠癌的潜在诊断标志物, 受到了研究人员的极大关注, 并成为近几年的研究热点^[5-6]。miR-126 是最早在人乳腺癌中被发现的且基因组位于人类染色体 9q34.3 上的一种抑癌 miRNA, 在血管丰富的组织中高表达, 如肺、心等^[7-8]。研究表明 miR-126 在多数肿瘤组织中低表达, 并与肿瘤的发生发展密切相关^[7-8]。如 Dfaz 等^[11]首次发现 miR-126 在结肠癌中低表达, 并与病理分级有关。后续研究者进一步证实了 miR-



注: 与 miR-126 NC 比较, $**P < 0.01$ 。

图 6 miR-126 mimics 对 SW480 细胞中 SOX2 表达的影响

Note. Compared with the miR-126 NC, $**P < 0.01$.

Fig. 6 Effect of miR-126 mimics on the expression of SOX2 in SW480 cells

126 在结肠癌组织中的低表达,但具体的作用机制尚未明确,因此本研究将对此展开探讨^[8, 12]。本研究首先利用脂质体转染 miR-126 mimics 和 miR-126 NC, RT-PCR 结果证实转染成功。接着采用 MTT 及 annexin V-FITC/PI 流式双染技术检测 miR-126 mimics 对 SW480 细胞活力及细胞凋亡的影响,结果表明 miR-126 mimics 能显著降低 SW480 细胞活力,并提高细胞早期凋亡率及晚期凋亡率,此结论与以往观点一致^[13],说明 miR-126 mimics 能显著的抑制 SW480 细胞增殖,并诱导细胞凋亡。肿瘤细胞的无限增殖与凋亡受限制源自于细胞周期的不可控制,特别是细胞周期调控点的紊乱,如 G1、G2 及 S 期,此细胞周期调控点也是众多抗肿瘤药物的作用靶点^[14-15]。因此本研究继续利用流式细胞术检测 miR-126 mimics 对 SW480 细胞周期的影响,结果表明 miR-126 mimics 能使细胞周期阻滞于 G1 期。从而说明 miR-126 mimics 能显著的抑制 SW480 细胞增殖,并诱导细胞凋亡。

miR-126 同众多 miRNA 一样,基本都是通过靶向调控靶基因转录进而参与细胞的增殖、分化、凋亡及细胞周期等生物学行为。有研究显示 SOX2 是 miR-126 的下游靶基因之一^[9],但在结肠癌进展过程中尚未得到验证,因此本研究将探讨 miR-126 是否能够靶向调控 SOX2 的表达。SOX 基因家族最早发现于 Y 染色体缺失的小鼠上,该家族成员广泛分布于鸟类、鱼类、果蝇、哺乳动物中,迄今为止已发现超过 30 种。SOX-2 是 SOX 基因家族的一员,是与哺乳动物性别决定基因相关的一种核转录因子,对胚胎形成、发育,神经发育,性别决定起着重要作用,特别对于维持胚胎干细胞的全能性起着关键性作用。近些年来研究也发现 SOX2 对肿瘤的发生发展过程起着重要作用,在结肠癌、肺癌、肝癌中高表达^[10]。本研究首先探讨 miR-126 mimics 对 SW480 细胞中 SOX2 表达的影响,western blot 及 RT-PCR 结果显示 miR-126 mimics 组 SOX-2 蛋白及 mRNA 表达量均较 miR-126 NC 组显著下调,说明 miR-126 mimics 能够负性调控 SOX2 表达。接着荧光素酶报告基因表达也证实了 miR-126 mimics 能靶向结合于 SOX2 的 3' UTR 区域,进一步说明 miR-126 mimics 在 SW480 细胞中对 SOX-2 的负性调控,继而发挥其对 SW480 细胞的增殖抑制及凋亡诱导作用。

综上所述,miR-126 mimics 能显著降低 SW480

细胞活力,诱导细胞凋亡,阻滞细胞周期于 G1 期,是通过负性调控 SOX2 表达实现的。

参考文献:

- [1] 王莉莉,雷蕾,杨进. 结直肠癌表观遗传学研究进展 [J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(1): 200-204.
- [2] 陈铁晖,黄少芬,李晓庆,等. 福建省 2007-2011 年恶性肿瘤死亡流行病学特征及变化趋势分析 [J]. 中国预防医学杂志, 2013, 14(5): 370-374.
- [3] Ahmed FE. miRNA as markers for the diagnostic screening of colon cancer [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2014, 14(4): 463-485.
- [4] Kanematsu S, Tanimoto K, Suzuki Y, et al. Screening for possible miRNA-mRNA associations in a colon cancer cell line [J]. Gene, 2014, 533(2): 520-531.
- [5] Gambari R, Brognara E, Spandidos DA, et al. Targeting oncomiRNAs and mimicking tumor suppressor miRNAs: New trends in the development of miRNA therapeutic strategies in oncology (Review) [J]. Int J Oncol, 2016, 49(1): 5-32.
- [6] Michael MZ, O'Connor SM, van Holst Pellekaan NG, et al. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia [J]. Mol Cancer Res, 2003, 1(12): 882-891.
- [7] 李少君,段建敏. miRNA-126 与肿瘤靶基因的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(7): 1150-1153.
- [8] 岑俊威,曾骏成,周宇. miRNA-126 与消化系统疾病关系的研究进展 [J]. 新医学, 2015, 46(10): 645-649.
- [9] Zhao C, Li Y, Zhang M, et al. miR-126 inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis of hepatocellular carcinoma cells partially by targeting Sox2 [J]. Hum Cell, 2015, 28(2): 91-99.
- [10] 纪晓宁,王小杰. 基因 Sox2 与肿瘤的研究进展 [J]. 肿瘤防治研究, 2014, 41(12): 1352-1356.
- [11] Diaz R, Silva J, Garcia JM, et al. Deregulated expression of miR-106a predicts survival in human colon cancer patients [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2008, 47(9): 794-802.
- [12] Jia AY, Castillo-Martin M, Bonal DM, et al. MicroRNA-126 inhibits invasion in bladder cancer via regulation of ADAM9 [J]. Br J Cancer, 2014, 110(12): 2945-2954.
- [13] Ebrahimi F, Gopalan V, Wahab R, et al. Deregulation of miR-126 expression in colorectal cancer pathogenesis and its clinical significance [J]. Exp Cell Res, 2015, 339(2): 333-341.
- [14] McNerny CJ. Cell cycle regulated transcription: from yeast to cancer [J]. F1000Res, 2016, 5.
- [15] Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy [J]. Nat Rev Cancer, 2017, 17(2): 93-115.

[收稿日期]2017-09-27