

miR-23a 调控 ESRP1 干预直肠癌细胞增殖和凋亡

劳玲娟 宋新江 徐 佳

摘 要 目的 分析微小 RNA-23a (microRNAs-23a, miR-23a) 在直肠癌组织及细胞系中的相对表达水平, 以及 miR-23a 对直肠癌细胞增殖和凋亡的作用, 并分析其可能作用机制。方法 采用 qRT-PCR 检测 miR-23a 在 36 例直肠癌组织和癌旁正常组织中的表达水平; 利用 qRT-PCR 检测 miR-23a 在直肠癌 SW480 细胞及人正常结肠上皮细胞株 NCM460 中的表达; 合成 miR-23a 抑制剂 (inhibitor) RNA 片段和抑制剂阴性对照 RNA 片段 (inhibitor negative control, inhibitor NC), 并将其分别转染至 SW480 细胞后, 通过 CCK-8 法检测 miR-23a inhibitor 转染 SW480 细胞后对细胞增殖的影响; 流式细胞术检测转染后细胞凋亡率; Western blot 法检测上皮剪接调节蛋白 1 (epithelial splicing regulatory protein 1, ESRP1) 蛋白在 SW480 细胞中的表达水平; 构建野生型 pGL3-ESRP1-3'UTR (wt-pGL3-ESRP1-3'UTR) 或突变型 pGL3-ESRP1-3'UTR (mut-pGL3-ESRP1-3'UTR) 质粒, HEK293 和 SW480 细胞经上述质粒分别与 miR-23a inhibitor 或 inhibitor NC 共转染后测定双荧光素酶活性。结果 与癌旁正常组织相比较, miR-23a 在直肠癌组织中的相对表达水平明显上调, 差异有统计学意义 ($P=0.000$); 与 NCM460 细胞相比较, miR-23a 在 SW480 细胞中的表达量显著上调, 差异有统计学意义 ($P=0.000$); SW480 细胞转染 miR-23a inhibitor 后, 细胞增殖较 inhibitor NC 组下降 $35.54\% \pm 5.27\%$, 两组结果差异有统计学意义 ($P=0.000$); 转染 miR-23a inhibitor 后 SW480 细胞早期凋亡率明显高于 inhibitor NC 组 ($P=0.000$); 荧光素酶报告基因结果表明 ESRP1 是 miR-23a 的直接靶基因; SW480 细胞转染 inhibitor NC 后对 ESRP1 蛋白表达无明显影响, 而转染 miR-23a inhibitor 至 SW480 细胞后 ESRP1 蛋白表达水平明显升高。结论 miR-23a 在直肠癌组织和细胞系中的表达均显著升高, miR-23a 可通过下游靶基因 ESRP1 从而调控直肠癌细胞增殖和凋亡。

关键词 直肠癌 miR-23a ESRP1 凋亡

中图分类号 R735

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.06.031

miR-23a Regulates Proliferation and Apoptosis of Rectal Cancer via Targeting Gene ESRP1. Lao Lingjuan, Song Xinjiang, Xu Jia. Anorectal Surgery, Shaoxing Second Hospital, Zhejiang 312000, China

Abstract Objective To elucidate the relative level of miR-23a RNA in rectal cancer tissues and cell line as well as the effects of miR-23a on the cell proliferation and apoptosis of rectal cancer cells in vitro. **Methods** Quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was applied in assessment of the transcription of miR-23a in rectal cancer tissues and in *vitro* cells. The RNA fragment of miR-23a inhibitor and inhibitor NC were synthesized and transfected into SW480 cells. Cell proliferation was evaluated with Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay. The apoptotic rate was analyzed by flow cytometry. The expression of ESRP1 was detected by western blot. Wild-type pGL3-ESRP1-3'UTR (wt-pGL3-ESRP1-3'UTR) or mutant pGL3-ESRP1-3'UTR (mut-pGL3-ESRP1-3'UTR) plasmids and miR-23a inhibitor RNA fragments or inhibitor NC RNA fragments were co-transfected into HEK293 and SW480 cells, then the Promega dual luciferase reporter gene assay kit was used to examine the dual luciferase activity in SW480 cells. **Results** The relative RNA level of miR-23a was significantly promoted in both rectal cancer tissue samples and SW480 cells. After SW480 cells were transfected with miR-23a inhibitor, human rectal cancer cell line SW480 with down-regulation of miR-23a showed significant inhibition of cell proliferation compared with negative control ($P=0.000$). Furthermore, our data demonstrated clearly that the inhibition of miR-23a promoted apoptosis in SW480 cells ($P=0.000$). Luciferase assay showed that ESRP1 was a direct target gene of miR-23a. **Conclusion** The expression of miR-23a is clearly associated with the growth and apoptosis of human rectal cells by targeting ESRP1, whilst miR-23a may be used as a potential therapeutic target for the treatment of rectal cancer in the future.

Key words Rectal cancer; miR-23a; ESRP1; Apoptosis

基金项目: 湖南省岳阳市 2014 年第三批科技基金资助项目

作者单位: 312000 绍兴第二医院肛肠外科 (劳玲娟、宋新江); 414000 岳阳市一人民医院胃肠外科 (徐佳)

通讯作者: 徐佳, 电子信箱: hosrmlan@163.com

直肠癌作为消化系统常见的恶性肿瘤,目前居我国因癌症死因第5位,对我国人民的生命健康构成了极大的威胁^[1]。长期以来,miRNA作为占人类基因组中99%的非编码序列受到基因研究者们越来越多的关注,miRNAs没有开放性阅读框而不能编码蛋白质,但miRNAs可通过与靶基因的3'-非编码区的不完全配对在转录后水平参与靶基因的调控,从而在机体发育、细胞增殖与凋亡等重要生理活动中扮演着重要的作用^[2,3]。

miR-23a作为定位于染色体19p13.12上miR-23a/24/27a家族成员之一,不仅在控制正常细胞异常生长方面miR-23a起到重要作用,同时与多种恶性肿瘤细胞生长和转移等恶性生物学行为关系密切^[4-6]。但miR-23a在直肠癌中的表达和作用尚不明确,仍待进一步研究。为此,本次研究拟分析miR-23a在直肠癌组织和体外细胞中的表达,同时进一步研究其对体外直肠癌细胞生长和凋亡的影响,探讨miR-23a对直肠癌发生发展的生物学意义。

材料与方法

1. 组织标本:收集2014年5月~2015年5月间在岳阳市一人民医院胃肠外科经手术切除的36例新鲜直肠癌组织及癌旁正常组织标本,其中男性25例,女性11例,患者年龄36.5~72.3岁,平均年龄 61.4 ± 4.3 岁。所有纳入本次队列的患者均经过两位经验丰富的病理科专家分别确诊为直肠腺癌,且所有患者均未接受新辅助治疗。其他排除标准包括不伴有下咽困难、急慢性感染、充血性心力衰竭、COPD和肝硬化。

2. 试剂:自美国Gibco公司购入DMEM、胎牛血清、Opti-MEM培养基以及含EDTA的胰蛋白酶;自美国Epitomics公司购入ESRP1兔抗人多克隆抗体和 β -actin小鼠抗人单克隆抗体;自美国Invitrogen公司购入Trizol试剂和Lipofectamine2000;自中国GenePharma公司购入inhibitor NC和miR-23a inhibitor;自日本TaKaRa株式会社购入miRNA提取试剂盒、PrimeScriptTM RT-PCR试剂盒、RT-PCR试剂盒和细胞蛋白提取试剂盒;自南京凯基生物科技发展有限公司购入Annexin V/PI凋亡检测试剂盒;自上海碧云天生物技术有限公司购入CCK-8试剂盒;自美国GenePharma公司购入miR-23a和U6的引物;自美国Promega公司购入野生型pGL3-ESRP1-3'UTR(wt-pGL3-ESRP1-3'UTR)和变型pGL3-ESRP1-3'UTR(mut-pGL3-ESRP1-3'UTR)质粒、

pRL-TK质粒及双荧光素酶报告基因检测试剂盒。

3. 细胞培养:人胚肾细胞株HEK-293T、人直肠癌低分化腺癌细胞株SW480及人正常结肠上皮细胞株NCM460均由上海细胞生物研究所提供。细胞培养于DMEM培养基中,培养基中补充10%胎牛血清、青霉素(100U/ μ l)和链霉素(100 μ g/ml)。细胞在37℃且CO₂含量约为5%的细胞培养箱内进行培养。当细胞生长至占培养瓶底面积90%以上时用胰蛋白酶消化并用于实验。

4. qRT-PCR检测miRNA的表达:对于检测miR-23a的表达,按照miRNA提取试剂盒制造商的指示进行操作。miR-23a上游引物序列为:5'-CCAGATCAGGCATCCTATTTG-3',下游引物序列为5'-TATCATTGTCGAATTCCAGTGT-3',内参U6上游引物序列为:5'-GCTTCGCCAATTTGGGGTTG-3',下游引物序列为5'-GTTGGTTCTGACGGTATCA-3'。依照Prime ScriptTM RT-PCR试剂盒根据制造商的指示,cDNA经反转录生成。对miRNA进行定量分析检测步骤如下:95℃温度下2min,然后在95℃温度下反应45s和60℃温度下反应60s,持续30个循环,每个样本检测3次。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法计算miR-23a的相对表达差异倍数,实验重复3次。

5. 转染miR-23a inhibitor及inhibitor NC至SW480细胞:为转染miR-23a至SW480细胞中,简述如下,将SW480细胞接种于6孔细胞培养板中(2×10^5 个每孔),使用含10%胎牛血清及不含抗生素的DMEM培养液培养,当细胞生长达到30%~40%融合,根据Lipofectamine2000制造商的指示进行细胞转染操作,转染5h后更换完全培养基。

6. CCK-8法检测细胞增殖:将SW480细胞以每孔 5×10^3 个播种至96孔板中。在每个培养孔中添加完全培养基至100 μ l,并将细胞放置于37℃含5%CO₂细胞培养箱中至细胞融合,每孔添加CCK-8溶液(0.01毫升/孔)反应1h,用酶标仪测定490nm波长处吸光度值(A_{490}),实验重复5次,取平均值。

7. 流式细胞术检测SW480细胞凋亡:待SW480细胞转染48h后,细胞被冰PBS缓冲液洗涤3次后使用胰酶消化。加入2.5 μ l Annexin V试剂和50 μ l结合缓冲液在室温下黑暗中反应15min,随后添加5 μ l碘化丙啶(PI)和50 μ l结合缓冲液在室温下黑暗中孵育5min。细胞悬浮在Annexin V试剂,细胞浓度为 $1 \times 10^5 \sim 10^6$ 个每100 μ l,所有样品使用流式细胞仪进行了分析,实验重复3次,取平均值。

8. Western blot 法检测细胞中 ESRP1 蛋白的表达:SW480 细胞在冰冷的 PBS 液中洗涤 3 次后重悬于细胞裂解液(100 微升/孔)中。当细胞裂片至于冰上反应 30min, 再在 4℃ 温度下 12000 × *g* 离心 20min, 收集上清后使用 BCA 蛋白检测试剂盒对蛋白质浓度进行定量分析。蛋白质样品(30μg)使用 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳进行后转移到 0.45μm 的硝酸纤维素膜上, 并使用 5% 脱脂奶粉于 4℃ 下孵育过夜, 该膜在 4℃ 与 ESRP1 (1:1000) 及 β-actin (1:10000) 一抗在室温下反应 30min 后, 在室温下与二抗再次孵育 1h。以内参 β-actin 蛋白条带灰度值的比值来校正 ESRP1 蛋白的光密度值。

9. 荧光素酶报告基因检测:将野生型 pGL3-ESRP1-3'UTR (wt-pGL3-ESRP1-3'UTR) 或突变型 pGL3-ESRP1-3'UTR (mut-pGL3-ESRP1-3'UTR) 质粒与 pRL-TK 质粒共转染入 HEK293 和 SW480 细胞中, 再分别将等量的 miRNA-23a inhibitor

或 inhibitor NC 再转染至 HEK293 和 SW480 细胞中, 48h 后收集细胞, 根据双荧光素酶报告基因检测试剂盒制造商的要求对双荧光素酶活性进行分析检测。

10. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析, 数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 使用 *t* 检验和方差分析对所得样本数据进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. miR-23a 在直肠癌组织和细胞系中的表达: qRT-PCR 检测结果表明, 在 36 例直肠癌标本中, 有 32 例标本中的 miR-23a 表达显著上调, 与癌旁正常组织相比较, 差异有统计学意义 ($P = 0.000$); 同时分析 miR-23a 在直肠癌 SW480 细胞和人正常结肠上皮细胞株 NCM460 中的表达, 结果表明 miR-23a 在 SW480 细胞中的表达较 NCM460 细胞明显增加, 差异有统计学意义 ($P = 0.000$, 图 1)。

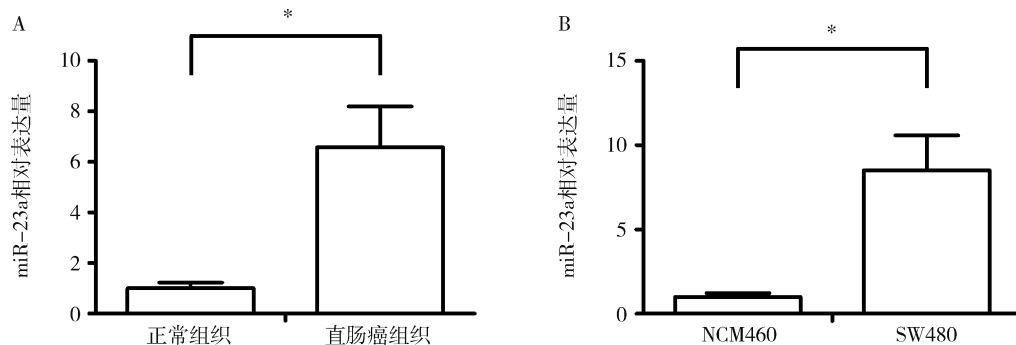


图 1 miR-23a 在直肠癌组织和细胞系中的表达

A. qRT-PCR 检测 miR-23a 在人直肠癌组织和癌旁正常组织中的表达; B. 在人直肠癌细胞株 SW480 和人正常结肠上皮细胞株 NCM460 中的表达; * $P = 0.000$

2. 转染 miR-23a inhibitor 对 SW480 细胞增殖和凋亡的影响:利用 qRT-PCR 检测分别转染 miR-23a inhibitor 或 inhibitor NC 入 SW480 细胞 48h 后对 miR-23a 相对表达水平的影响。SW480 细胞经转染 miR-23a inhibitor 对 miR-23a 在 SW480 细胞中的表达有明显抑制作用, 与 inhibitor NC 组相比较, 差异有统计学意义 ($P = 0.000$), 而 inhibitor NC 对 SW480 细胞中 miR-23a 的相对表达量无明显影响 (图 2A)。与对照组相比较, 转染 inhibitor NC 对 SW480 细胞吸光度无明显影响; 而转染 miR-23a inhibitor 后 SW480 细胞吸光度较 inhibitor NC 组降低 38.62% ± 5.48%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 2B)。通过 Annexin V 流式细胞术对转染后细胞凋亡进行检测结果表明, SW480 细胞经转染 miR-23a in-

hibitor 或 inhibitor NC 48h 后细胞早期凋亡率分别为 14.5% ± 2.1% 和 3.8% ± 0.5%, 与对照组细胞 (2.4% ± 0.4%) 相比较, 差异有统计学意义 ($F = 81.524$, $P = 0.000$, 图 2C)。

3. ESRP1 是 miR-23a 的直接靶基因:通过 miRNA 预测软件 targetscan 进行分析可知, miR-23a 与 ESRP1 3'UTR 存在结合位点, 推测 ESRP1 可能是 miR-23a 的靶向调控基因 (图 3A); 为了进一步验证 miR-23a 与 ESRP1 3'UTR 是否能直接结合, 通过构建野生型 pGL3-ESRP1-3'UTR (wt-pGL3-ESRP1-3'UTR) 或突变型 pGL3-ESRP1-3'UTR (mut-pGL3-ESRP1-3'UTR) 质粒, 再分别与 miRNA-23a inhibitor 或 inhibitor NC 共转染至 HEK293 和 SW480 细胞中。结果表明野生型 ESRP1 3'UTR 质粒和 miR-

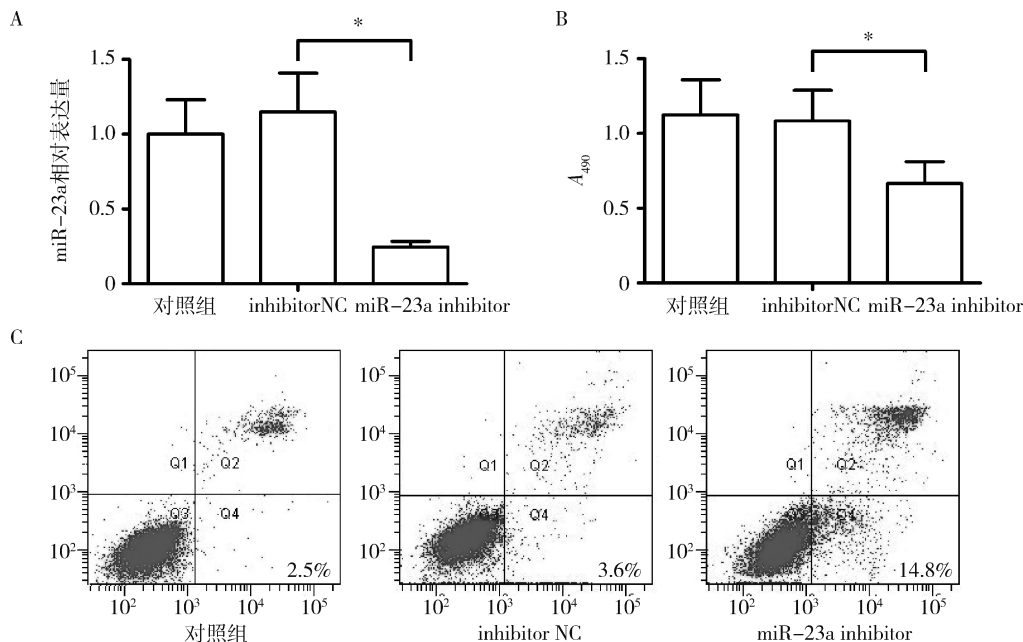


图2 qRT-PCR检测转染miR-23a inhibitor或inhibitor NC至SW480细胞后的影响

A. 对miR-23a表达的影响; B. 对细胞增殖的影响; C. 对细胞凋亡的影响; * $P=0.000$

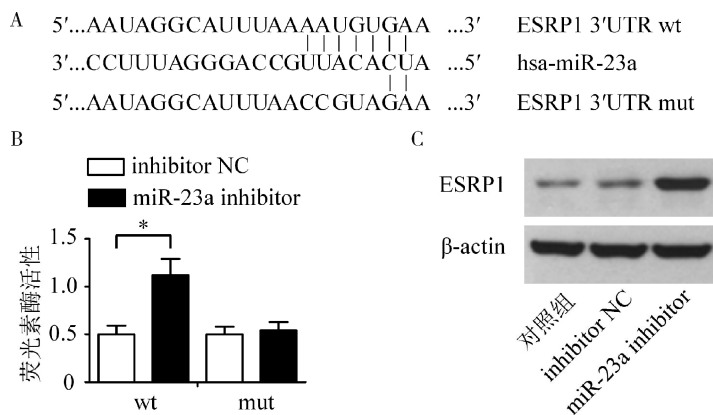


图3 ESRP1是miR-23a的直接靶基因研究结果

A. miR-23a与野生型和突变型ESRP1 3'UTR预测结合位点图; B. 荧光素酶报告基因检测miR-23a与ESRP1 3'UTR端的结合情况; C. Western blot法检测转染miR-23a inhibitor或inhibitor NC至SW480细胞后对ESRP1蛋白的表达的影响; * $P<0.01$

23a inhibitor共转染后的荧光素酶活性较野生型ESRP1 3'UTR质粒和inhibitor NC共转染后的荧光素酶活性明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。而突变型ESRP1 3'UTR质粒和miR-23a共转染组与突变型ESRP1 3'UTR质粒和inhibitor NC共转染组的荧光素酶活性相比较,差异无统计学意义($P>0.05$),从而表明ESRP1是miR-23a的直接靶向基因(图3B)。另外,Western blot法检测结果显示,miR-23a inhibitor转染至SW480细胞后对ESRP1蛋白的表达有明显上调作用,而转染inhibitor NC至SW480细胞后对ESRP1蛋白的表达无显著影响(图

3C)。

讨 论

本研究笔者通过分析miR-23a在直肠癌组织和癌旁正常组织中的表达差异,结果表明miR-23a不仅在直肠癌组织中的表达较正常直肠组织明显升高,同时在体外直肠癌细胞株中的表达也高于正常结肠上皮细胞中的表达,这种miR-23a在良恶性组织及细胞中的表达差异表明miR-23a与直肠癌细胞的发生和发展可能存在一定的关联,与文献报道相仿^[7]。

随着近几十年来对miRNAs与恶性肿瘤的关系

研究的不断深入,当前应用 miRNAs 用于结直肠癌的治疗引起胃肠外科研究人员的关注。有研究通过基因芯片定量对结直肠癌组织中数百种 miRNAs 表达谱进行分析,结果有 24 种 miRNAs 在结直肠癌组织中表达水平异常^[8]。沉默 miR-6734 可延缓结直肠癌细胞增殖,降低其恶性侵袭性行为,并诱导细胞凋亡^[9]。另外有报道称 miR-200 家族可通过下调 Notch 通路从而在调控结直肠癌增殖和凋亡中发挥重要作用^[10]。近期研究发现 miR-23a 在结肠癌组织中表达较正常结肠组织中表达明显上调^[7]。本研究发现,miR-23a 在直肠癌细胞系中的表达明显高于正常结肠上皮细胞中的表达,为进一步研究 miR-23a 与直肠癌细胞体外恶性生物学行为的关系,笔者通过 miR-23a inhibitor 下调 SW480 细胞中 miR-23a 的表达,发现下调 miR-23a 不仅离体试验中对 SW480 细胞增殖有明显抑制作用,同时可促进细胞凋亡。同样,以往研究表明,miR-23a 在调控宫颈癌、前列腺癌等多种恶性肿瘤增殖和凋亡中也发挥了关键调控作用^[4-6]。但其确切的作用机制目前尚不十分明确。

为进一步研究 miR-23a 调控直肠癌细胞生长和凋亡的作用机制,笔者通过生物信息学分析 miR-23a 为 ESRP1 潜在的上游调控因子,同时通过荧光素酶报告基因,在 SW480 细胞中验证了 ESRP1 是 miR-23a 的直接靶向基因。ESRP1 作为一种定位于细胞核内的蛋白,其可通过直接结合特异性 mRNAs 序列,调控细胞免疫、增殖、凋亡和转移等多种相关基因的表达,使其在蛋白表达水平发生转变,从而在调节恶性肿瘤的多种恶性生物学行为中发挥了重要作用^[11,12]。Ishii 等^[13]发现 ESRP1 在结肠上皮细胞中的异常表达可上调 E-cadherin 的表达,增强细胞的黏附性,从而抑制结肠上皮细胞的成瘤性。同时 ESRP1 在哺乳动物上皮细胞系发生上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程中表达下调,而异位表达的 ESRP1 则可逆转上皮细胞向间质表型转变^[13]。本研究发现下调 miR-23a 可上调其下游靶向基因 ESRP1 在直肠癌 SW480 细胞中的表达,同时显著抑制直肠癌细胞增殖并有效诱导细胞凋亡,从而表明 miR-23a 可能通过靶向调控 ESRP1 从而在调控直肠癌增殖和凋亡过程中发挥了一定作用,但目前其具体调控机制仍不明确。

综上所述,本研究表明 miR-23a 可对体外直肠癌细胞增殖和凋亡产生一定程度的调控作用,但

miR-23a 是否对体内直肠癌同样具有调节增殖和凋亡能力尚未可知,同时虽然证实 miR-23a 可负向调控其靶向基因 ESRP1 在直肠癌细胞中的表达,但 ESRP1 调节直肠癌细胞增殖和凋亡的具体作用机制仍需进一步实验明确。本研究为当前临床直肠癌基因治疗提供一个新的作用靶点,在揭示直肠癌的发病机制及治疗上具有一定的积极意义。

参考文献

- Wolff HA, Dröge LH. The EXPERT - C trial defines a reference for future research: quality of life and bowel function in patients with locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant chemotherapy followed by chemoradiation therapy before surgery [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2015, 93(2):313-315
- Yu X, Zhao W, Yang X, et al. miR-375 affects the proliferation, invasion, and apoptosis of HPV16-positive human cervical cancer cells by targeting IGF-1R [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2016, 26(5):851-858
- MacLean JA, King ML, Okuda H, et al. WNT7A regulation by miR-15b in ovarian cancer [J]. *PLoS One*, 2016, 11(5):e0156109
- Yang Z, Wang XL, Bai R, et al. miR-23a promotes IKK α expression but suppresses ST7L expression to contribute to the malignancy of epithelial ovarian cancer cells [J]. *Br J Cancer*, 2016, 115(6):731-740
- Aghaee-Bakhtiari SH, Arefian E, Naderi M, et al. MAPK and JAK/STAT pathways targeted by miR-23a and miR-23b in prostate cancer: computational and in vitro approaches [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(6):4203-4212
- Wen YC, Lee WJ, Tan P, et al. By inhibiting snail signaling and miR-23a-3p, osthole suppresses the EMT-mediated metastatic ability in prostate cancer [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(25):21120-21136
- 唐海林, 邓敏, 廖前进, 等. miR-23a 与转移抑制因子 1 在结肠癌中的表达及其临床意义[J]. *中华病理学杂志*, 2012, 41(1):28-32
- Tanaka R, Tomosugi M, Sakai T, et al. MEK inhibitor suppresses expression of the miR-17-92 cluster with G1-phase arrest in HT-29 human colon cancer cells and MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(9):4537-4543
- Kang MR, Park KH, Yang JO, et al. miR-6734 up-regulates p21 gene expression and induces cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells [J]. *PLoS One*, 2016, 11(8):e0160961
- Suliman MA, Zhang Z, Na H, et al. Niclosamide inhibits colon cancer progression through downregulation of the Notch pathway and upregulation of the tumor suppressor miR-200 family [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(3):776-784
- Kikuchi M, Yamashita K, Waraya M, et al. Epigenetic regulation of ZEB1-RAB25/ESRP1 axis plays a critical role in phenylbutyrate treatment-resistant breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(2):1741-1753
- Yae T, Tsuchihashi K, Ishimoto T, et al. Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell [J]. *Nat Commun*, 2012, 6(3):883-884
- Ishii H, Saitoh M, Sakamoto K, et al. Epithelial splicing regulatory proteins 1 (ESRP1) and 2 (ESRP2) suppress cancer cell motility via different mechanisms [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(40):27386-27399

(收稿日期:2016-11-14)

(修回日期:2016-11-29)