

生殖系疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002487

miR-21在结肠癌细胞失巢凋亡调节中的作用及机制研究

黄体政¹, 孙 鹤¹, 肖 军²

(1. 湖北航天医院消化内科, 孝感 432000; 2. 武汉大学中南医院消化内科, 武汉 430071)

【摘要】目的:探讨 miR-21 在结肠癌细胞失巢凋亡调节中的作用及机制。**方法:**qRT-PCR 检测 30 例结肠癌组织中的 miR-21 表达,并评估其与临床病理特征和预后的关系;利用结肠癌 HT-29 细胞及其失巢凋亡抵抗亚群 HT-29/AR 细胞探讨 miR-21 表达水平与失巢凋亡抗性的关系;Western blot 检测 PDCD4、PTEN 蛋白表达水平变化,并利用双荧光素酶报告基因实验验证 miR-21 对其 3' UTR 的直接结合作用。**结果:**miR-21 在结肠癌组织中的表达明显高于癌旁组织,且与肿瘤细胞分化程度、淋巴结转移状态及 TNM 分期显著相关,其高表达患者预后较差;与 HT-29 细胞相比,HT-29/AR 细胞 miR-21 明显上调,且 miR-21 模拟物转染可以明显提高 HT-29 细胞的失巢凋亡抗性;Western blot 及双荧光素酶报告基因实验证实 miR-21 可通过抑制 PDCD4 和 PTEN 蛋白表达水平增加结肠癌细胞的失巢凋亡抗性。**结论:**miR-21 可通过靶向抑制 PDCD4 和 PTEN 表达参与人结肠癌细胞失巢凋亡的调控。

【关键词】miR-21;结肠癌;失巢凋亡;PDCD4;PTEN**【中图分类号】**R735.35**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2020-02-19

Role and possible mechanism of miR-21 on the regulation of anoikis resistance in human colon carcinoma

Huang Tizheng¹, Sun He¹, Xiao Jun²

(1. Department of Gastroenterology, Hubei Aerospace Hospital; 2. Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University)

【Abstract】Objective: To investigate the role and possible mechanism of miR-21 on the regulation of anoikis in human colon carcinoma. **Methods:** The expression level of miR-21 in 30 cases of colon cancer was examined by qRT-PCR, and its correlation with clinicopathologic features and prognosis was further analyzed. HT-29 cells and its derivative HT-29/AR (subpopulation of HT-29 cells that acquired resistance to anoikis) were used to explore the relationship between the expression of miR-21 and anoikis resistance. Western blot was used to detect changes of PDCD4 and PTEN, and dual-luciferase reporter assay was applied to verify the direct conjunction of miR-21 to its 3' UTR. **Results:** Expression of miR-21 in human colon carcinoma tissues was higher than that in adjacent tissues; was significantly correlated with poor differentiation, lymph node metastasis and TNM stage; patients with high expression of miR-21 had poor prognosis. Compared with HT-29 cells, miR-21 expression in HT-29/AR cells was significantly increased and transfection of miR-21 mimics was able to promote the anoikis resistance of HT-29 cells. Western blot and dual-luciferase reporter assay demonstrated that miR-21 was able to increase the anoikis resistance of colon carcinoma cells by inhibiting expression of PDCD4 and PTEN. **Conclusion:** The miR-21 can participate in regulating anoikis in human colon carcinoma cells by targeted inhibiting PDCD4 and PTEN.

【Key words】miR-21; colon carcinoma; anoikis; PDCD4; PTEN

失巢凋亡(anoikis)是指细胞与细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)失去接触而诱导的一种程

序性死亡,主要作用是防止脱落细胞种植并生长于其他不适宜的地方,对维持机体稳态不可或缺^[1]。一些易发生转移的恶性肿瘤细胞具有极强的抗失巢凋亡能力,自瘤体脱落进入脉管系统后不发生凋亡,从而更易完成转移过程。因此,失巢凋亡抑制(anoikis

作者介绍:黄体政,Email:13886378366@139.com,

研究方向:大肠癌发生发展的分子机制。

优先出版:https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200507.1728.042.html

(2020-05-08)

resistance)被认为是肿瘤细胞转移的先决条件之一^[1-3]。作为致癌 miRNA, miR-21 通过参与调控多种抑癌基因如 PDCD4、PTEN 等的表达在多种肿瘤的发生发展中起重要作用^[4]。本研究首先利用 qRT-PCR 检测 miR-21 在结肠癌组织中的表达,探讨 miR-21 表达水平与患者临床病理特征及预后的关系;然后利用基因转染等方法,观察 miR-21 对结肠癌 HT-29 细胞失巢凋亡的调节作用,并利用 Western blot 和双荧光素酶报告基因实验初步探讨其可能分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究中的 30 例结肠癌患者肿瘤组织及对应癌旁组织(距切缘>2 cm)样本由湖北航天医院胃肠外科在 2013 年 1 月至 6 月间手术切除取得,所有患者术前均未行放化疗及分子靶向治疗。所有病例均有完整的临床病理资料及 5 年以上随访资料。

1.2 细胞培养

将 poly-HEMA 溶于 95%乙醇后反复吹打,配成终浓度为 50 mg/mL 的 poly-HEMA 工作液,将其加入 6 孔细胞培养板,室温下自然晾干,即得抗附着细胞培养板^[5]。使用前将 poly-HEMA 包被细胞培养板置于紫外灯下照射 1 h 消毒。将人结肠癌 HT-29 细胞悬浮培养于 poly-HEMA 包被细胞培养板,持续 14 d,筛选得到可抵抗失巢凋亡的 HT-29 细胞亚群,命名为 HT-29/AR (HT-29/anoikis-resistance)细胞。

1.3 细胞转染

miR-21 模拟物(miR-21 mimics)及模拟物的阴性对照由 Ribobio 公司合成。体外培养的 HT-29 细胞进入对数生长期后,接种于 6 孔细胞培养板中继续培养 24 h。利用 miR-21 模拟物(或阴性对照)-Lipofectamine 2000(Invitrogen)混合液转染细胞,24 h 后行相关检测。

1.4 qRT-PCR 检测

采用 Trizol 试剂提取组织和细胞总 RNA,测定浓度后行逆转录。取 10 μ L 逆转录产物进行 PCR 反应。反应条件:95 $^{\circ}$ C, 5 min;35 个 PCR 循环(95 $^{\circ}$ C, 10 s;60 $^{\circ}$ C, 20 s;72 $^{\circ}$ C, 20 s;收集荧光)。数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析,以 U6 snRNA 为内参,定量计算人结肠癌、癌旁组织及 HT-29 细胞、HT-29/AR 细胞 miR-21 表达水平。

1.5 失巢凋亡检测

正常培养的 HT-29 细胞胰酶消化后,悬浮培养 48 h,收集细胞,1 000 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤 1 次,应用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡情况。对于处于悬浮培养状态的 HT-29/AR 细胞,将其收集转移至普通细胞培养板中继续培养 24 h,然后胰酶消化,重新悬浮培养 48 h,收集细胞,

1 000 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤 1 次,应用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡情况。

1.6 Western blot 检测

应用 Western blot 检测细胞 PDCD4、PTEN 蛋白表达水平,以 β -actin 表达水平为内参。

1.7 双荧光素酶报告基因实验

根据生物信息学预测结果,分别构建含有 miR-21 结合靶位点的 PDCD4 3'UTR 片段荧光素酶报告基因载体(pMIR-PDCD4-3'UTR)和 PTEN 3'UTR 片段荧光素酶报告基因载体(pMIR-PTEN-3'UTR),以及相对应的突变型报告基因载体(pMIR-mut-PDCD4-3'UTR 和 pMIR-mut-PTEN-3'UTR)。将对数生长期的 HT-29 细胞接种于 96 孔板中,将其分为 2 大组:PDCD4 实验组和 PTEN 实验组。PDCD4 实验组又分为 4 小组:pMIR-PDCD4-3'UTR+miR-21 模拟物组、pMIR-PDCD4-3'UTR+miR-21 模拟物对照组、pMIR-mut-PDCD4-3'UTR+miR-21 模拟物组、pMIR-mut-PDCD4-3'UTR+miR-21 模拟物对照组;PTEN 实验组也相应分为 4 小组:pMIR-PTEN-3'UTR+miR-21 模拟物组、pMIR-PTEN-3'UTR+miR-21 模拟物对照组、pMIR-mut-PTEN-3'UTR+miR-21 模拟物组、pMIR-mut-PTEN-3'UTR+miR-21 模拟物对照组。37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后弃掉上清,根据 Promega 公司双荧光素酶基因检测试剂盒说明书向各孔内加入萤火虫和海肾荧光素酶试剂,检测各孔的荧光活性。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 miR-21 在结肠癌组织中的表达及与预后的相关性

首先应用 qRT-PCR 检测人结肠癌组织中 miR-21 的表达情况。结果显示,在 30 例人结肠癌手术切除标本中,癌组织 miR-21 表达水平明显高于癌旁组织(配对样本 t 检验,以 $-C_t$ 表示, 5.39 ± 0.36 vs. 2.71 ± 0.22 , $P<0.01$,图 1A);进一步以 miR-21 中位表达水平(median=5.51)为界将 30 例患者分为 miR-21 高表达组和 miR-21 低表达组,每组 15 例(图 1B),Kaplan-Meier 生存分析结果显示,miR-21 高表达组患者生存时间明显低于低表达组(Log-rank test, $P<0.05$,图 1C)。

2.2 miR-21 表达水平与结肠癌临床病理特征的关系

miR-21 表达水平与分化程度、淋巴结转移状态及 TNM 分期明显相关(表 1)。在低分化及未分化结肠癌组织中,miR-21 表达水平明显高于中高分化者($P<0.05$);有淋巴结转移者 miR-21 表达水平明显高于无淋巴结转移者($P<0.05$);在高 TNM 分期(Ⅲ期及Ⅳ期)患者中,miR-21 表达水平明显高于低 TNM 分期(Ⅰ期及Ⅱ期)患者($P<0.05$)。miR-21 表达与年龄、性别、浸润深度无关($P>0.05$)。

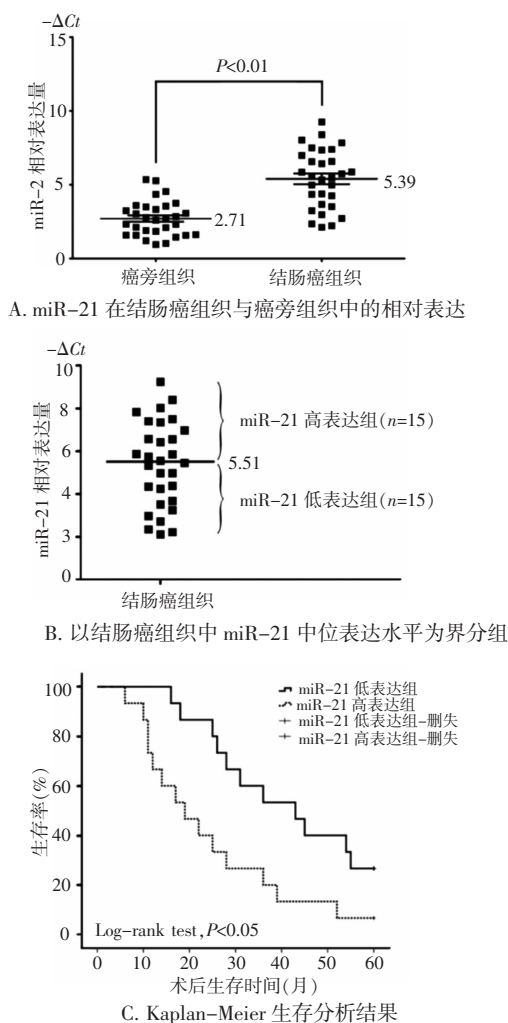


图 1 miR-21 在结肠癌组织中的表达及其与预后的相关性

表 1 miR-21 表达水平与结肠癌临床病理特征的关系

变量	例数	miR-21 表达水平	P 值
年龄 (岁)			
≥60	16	4.99 ± 1.92	0.166
<60	14	5.99 ± 1.91	
性别			
男	19	5.05 ± 1.99	0.129
女	11	6.18 ± 1.74	
分化程度			
中高分化	16	4.78 ± 1.73	0.037
低分化及未分化	14	6.25 ± 1.95	
浸润深度			
T1/T2	18	5.08 ± 1.78	0.192
T3/T4	12	6.04 ± 2.12	
淋巴结转移			
阴性	17	4.71 ± 1.67	0.014
阳性	13	6.44 ± 1.91	
TNM 分期			
I / II	17	4.71 ± 1.67	0.014
III / IV	13	6.44 ± 1.91	

2.3 miR-21 高表达促进结肠癌细胞失巢凋亡抗性

应用聚羟乙基异丁烯酸 (poly-HEMA) 处理过的培养皿对 HT-29 结肠癌细胞进行悬浮培养,持续 14 d,筛选出具有失巢凋亡抗性的 HT-29 细胞亚群,命名为 HT-29/AR 细胞。qRT-PCR 检测结果显示,与亲本细胞 HT-29 相比,HT-29/AR 细胞 miR-21 表达水平明显升高 ($P<0.05$,图 2A、B)。以 miR-21 模拟物 (miR-21 mimics) 转染 HT-29 细胞后,其抗失巢凋亡能力明显增加 ($P<0.05$,图 2C、D)。上述结果证实 miR-21 高表达与结肠癌细胞失巢凋亡抗性增加直接相关。

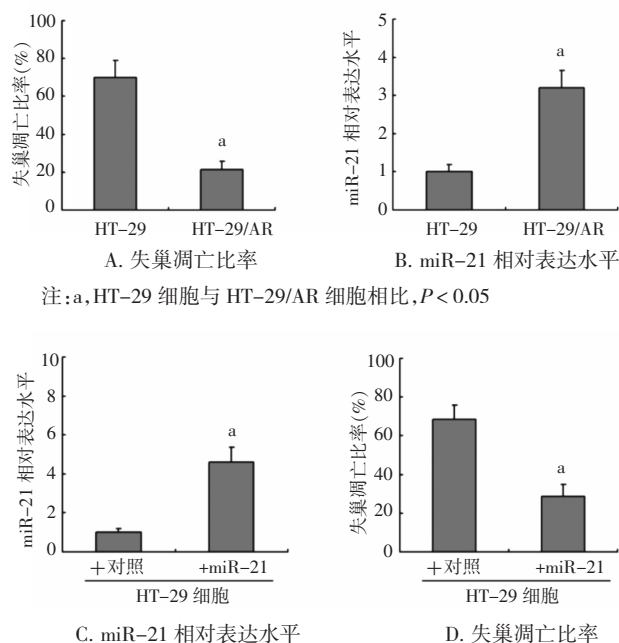
注:a, HT-29 细胞与 HT-29/AR 细胞相比, $P<0.05$ 注:a, HT-29 细胞 + 对照与 HT-29 细胞 + miR-21 相比, $P<0.05$

图 2 HT-29 细胞失巢凋亡抗性与 miR-21 表达水平变化相关

2.4 miR-21 通过靶向 PDCD4 和 PTEN 基因抑制结肠癌细胞失巢凋亡

PDCD4 是一种重要的细胞凋亡蛋白,在诱导细胞正常凋亡过程中起关键作用,已被证实是 miR-21 的主要靶基因之一^[6]。PTEN 是具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因,在细胞凋亡过程中发挥重要作用,目前已被证实是 miR-21 的直接靶基因^[4,7]。Western blot 检测结果显示,PDCD4 和 PTEN 在 HT-29/AR 细胞中的表达水平均明显低于其亲本 HT-29 细胞;miR-21 模拟物转染也可明显降低 HT-29 细胞 PDCD4 和 PTEN 蛋白表达水平,提示在结肠癌细胞中,PDCD4 和 PTEN 均是 miR-21 的直接功能靶基因。为进一步证实这一猜想,分别构建含有 miR-21 结合靶位点的 PDCD4 3'UTR 片段荧光素酶报告基因载体 (pMIR-PDCD4-3'UTR) 和 PTEN 3'UTR 片段荧光素酶报告基因载体 (pMIR-PTEN-3'UTR),以及相对应的突变型报告基因载体 (pMIR-mut-PDCD4-3'UTR 和 pMIR-mut-PTEN-3'UTR)。图 3B 显示生物信息学分析所预测 PDCD4 3'UTR 和 PTEN 3'UTR 与 miR-21 结合的匹配序列及构建突变型报告基因载体的突变序列。双荧光素酶报告

基因实验结果显示,与阴性对照相比,转染 miR-21 并共转染 pMIR-PDCD4-3'UTR 或 pMIR-PTEN-3'UTR 质粒后,HT-29 细胞荧光素酶活性明显下降($P<0.05$);而在共转染 miR-21 与 pMIR-mut-PDCD4-3'UTR 或 pMIR-mut-PTEN-3'UTR 质粒的 HT-29 细胞中,其细胞荧光素酶活性未见明显变化($P>0.05$)。这一结果进一步证实在 HT-29 细胞中,miR-21 可通过与 PDCD4 或 PTEN 相应 3'UTR 靶位点结合而对其蛋白表达水平进行负性调控。

3 讨论

MicroRNAs(miRNAs)是一类由内源基因编码的长度为 20~25 个核苷酸的非编码单链 RNA,可特异性识别靶 mRNA 的 3'UTR 区并与其结合,引起靶 mRNA 的降解,从而对基因进行转录后表达调控。作为一种新型基因调控分子,miRNA 在疾病尤其是肿瘤的发生发展过程中起着非常重要的作用。miR-21 是人类组织和细胞中较早发现、广泛存在的 miRNA 分子之一,定位于 17q23.2 染色体 FRA17B 脆性区域上,是具有自主转录单位的 miRNA,且高度保守。Chan 等^[8]首次报道 miR-21 在人恶性胶质瘤组织中高表达,并与细胞凋亡抑制有关。随后的研究表明,miR-21 在几乎所有实体肿瘤如肺癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌等中呈明显高表达,通过作用于多种靶基因

如 PDCD4、PTEN、BCL2、TPM1 等参与细胞凋亡、增殖、分化等的调控,与肿瘤细胞生长、转移、耐药等恶性表型密切相关。本研究应用 qRT-PCR 技术检测了 30 例结肠癌组织中 miR-21 的表达,结果显示相对于对应癌旁正常组织,其表达水平明显上调,且与肿瘤分化程度及淋巴结转移相关。低分化及未分化结肠癌组织 miR-21 表达水平明显高于中高分化组织,且 miR-21 高表达者更易出现淋巴结转移。生存分析结果显示,miR-21 高表达患者生存期明显低于 miR-21 低表达者,提示 miR-21 高表达与结肠癌患者不良预后相关。这些结果与 Peng 等^[9]的报道结果一致,均证实 miR-21 高表达与结肠癌的发生发展密切相关。

肿瘤转移(tumor metastasis)是指恶性肿瘤细胞脱离原发生长部位,通过脉管或体腔等途径在机体远内远离原发部位的器官或组织继续生长,形成同性质肿瘤(转移瘤)的过程。转移是恶性肿瘤最重要的生物学特征之一,也是导致肿瘤复发和影响预后的重要因素。研究表明,肿瘤的转移过程涉及基质降解、细胞脱落并黏附、新生血管生成等多个环节^[10]。失巢凋亡对维持机体组织稳态不可或缺,其主要作用是防止细胞异常生长或细胞黏附到异常的细胞外基质上。抵抗失巢凋亡是肿瘤细胞转移的先决条件之一^[2-3,10]。部分肿瘤细胞脱离细胞外基质的黏附

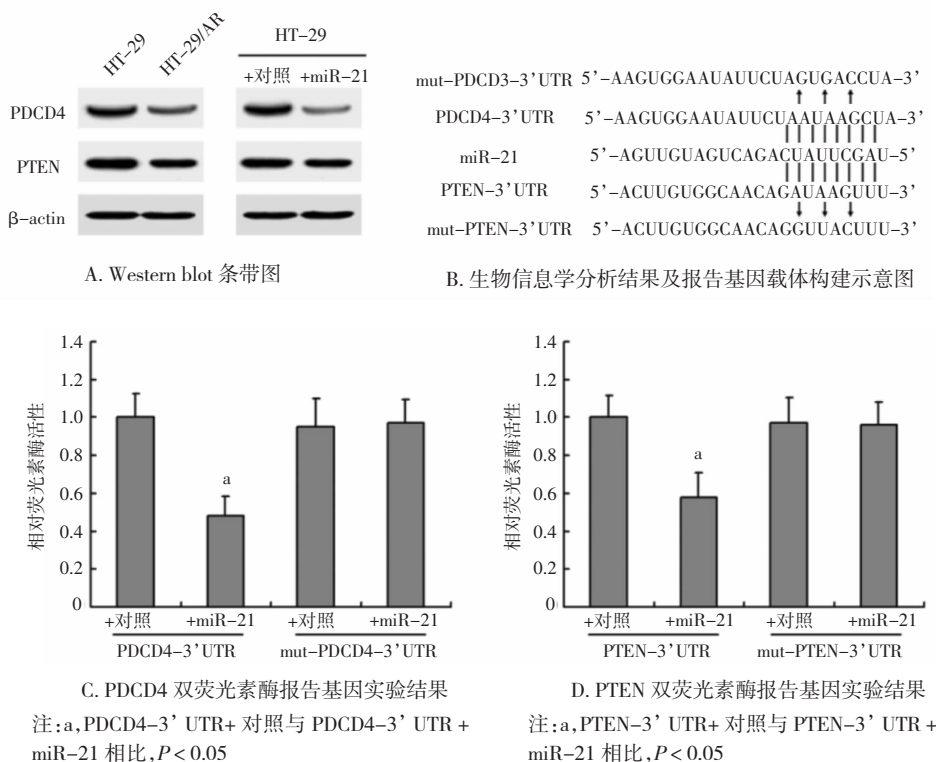


图3 PDCD4 和 PTEN 是 miR-21 的直接功能靶基因

和细胞间的接触后,并不发生凋亡,而是重新获得附着能力得以扩散和转移。

PDCD4 是近年新发现的与凋亡密切相关的肿瘤抑癌基因。研究发现,PDCD4 在多种肿瘤中缺失或下调表达,与肿瘤的生长、分化等密切相关。Lin 等^[11]发现 miR-206 可通过抑制 PDCD4 的表达参与肿瘤干细胞失巢凋亡抵抗的调控。PTEN 是一个具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因,在细胞凋亡调控中起关键作用。已有多个研究显示,PTEN 可参与肿瘤细胞失巢凋亡的调控^[12-13]。miR-21 已在多个研究中被证实在结肠癌组织中明显上调表达,但尚未见报道其参与失巢凋亡抵抗的调控。PDCD4 和 PTEN 是 miR-21 最为人所知的 2 个靶基因,已有多个研究显示 miR-21 可同时通过对这 2 个靶基因蛋白表达的抑制作用参与肿瘤细胞生物学行为的调控。Yan 等^[14]研究显示,miR-21 可通过对 PDCD4 和 PTEN 蛋白表达的抑制参与唾液腺腺样囊性癌细胞增殖及转移的调控。Wang 等^[15]研究显示,在神经母细胞瘤细胞中,miR-21 可通过对 PDCD4 和 PTEN 蛋白表达的抑制参与其凋亡的调控。Zhao 等^[16]则报道 miR-21 可通过抑制 PDCD4 和 PTEN 蛋白表达,抑制食管腺癌细胞失巢凋亡的发生。由此推测,在结肠癌细胞中上调表达的 miR-21 通过抑制靶基因 PDCD4 和 PTEN 蛋白表达水平而参与失巢凋亡抵抗的调节。本研究首先利用悬浮培养法筛选出具有失巢凋亡抗性的 HT-29 细胞亚群,命名为 HT-29/AR, qRT-PCR 结果显示 miR-21 表达水平明显升高; Western blot 结果显示在 HT-29/AR 细胞中,PDCD4 和 PTEN 蛋白表达水平较 HT-29 细胞均明显下调,这一结果提示 miR-21 高表达与结肠癌细胞失巢凋亡抗性增加有关,且可能通过抑制 PDCD4 和 PTEN 蛋白表达水平而发挥这一作用。此外,利用 miR-21 模拟物转染 HT-29 细胞,结果显示转染后细胞抗失巢凋亡能力明显增加,且其 PDCD4 和 PTEN 蛋白表达水平也明显受抑。这进一步证实 miR-21 通过抑制 PDCD4 和 PTEN 蛋白表达水平而参与结肠癌细胞失巢凋亡调控。后续的双荧光素酶报告基因实验显示,在 HT-29 细胞中,miR-21 能直接与 PDCD4 和 PTEN 的 3'UTR 相结合,说明 PDCD4 和 PTEN 均是 miR-21 的直接功能靶基因。

综上所述,miR-21 高表达与结肠癌的发生发展有关,其可通过靶向抑制 PDCD4 和 PTEN 表达增强结肠癌细胞失巢凋亡抗性,从而促进结肠癌细胞转移。因此,抑制 miR-21 表达可作为结肠癌细胞转

移防治的一个靶点。

参 考 文 献

- [1] Hawk MA, Schafer ZT. Mechanisms of redox metabolism and cancer cell survival during extracellular matrix detachment[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(20): 7531-7537.
- [2] Jin K, Li T, van Dam H, et al. Molecular insights into tumour metastasis: tracing the dominant events[J]. *J Pathol*, 2017, 241(5): 567-577.
- [3] 张亚飞, 章必成, 房殿春. 失巢凋亡及其在转移性肿瘤治疗中的意义[J]. *临床误诊误治*, 2012, 25(4): 61-63.
- [4] Pfeffer SR, Yang CH, Pfeffer LM. The role of miR-21 in cancer[J]. *Drug Dev Res*, 2015, 76(6): 270-277.
- [5] Zhang Y, Zhang A, Fang D, et al. MiR-26a regulates cell cycle and anoikis of human esophageal adenocarcinoma cells through Rb1-E2F1 signaling pathway[J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(2): 1711-1720.
- [6] Wang G, Wang JJ, Tang HM, et al. Targeting strategies on miRNA-21 and PDCD4 for glioblastoma[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2015, 580: 64-74.
- [7] Xu W, Yang Z, Zhou SF, et al. Posttranslational regulation of phosphatase and tensin homolog (PTEN) and its functional impact on cancer behaviors[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2014, 8: 1745-1751.
- [8] Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(14): 6029-6033.
- [9] Peng Q, Zhang X, Min M, et al. The clinical role of microRNA-21 as a promising biomarker in the diagnosis and prognosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(27): 44893-44909.
- [10] Cheung KJ, Ewald AJ. A collective route to metastasis: seeding by tumor cell clusters[J]. *Science*, 2016, 352(6282): 167-169.
- [11] Lin CC, Sharma SB, Farrugia MK, et al. Kruppel-like factor 4 signals through microRNA-206 to promote tumor initiation and cell survival[J]. *Oncogenesis*, 2015, 4: e155.
- [12] McCarroll JA, Gan PP, Erlich RB, et al. TUBB3/ β III-tubulin acts through the PTEN/AKT signaling axis to promote tumorigenesis and anoikis resistance in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(2): 415-425.
- [13] Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(12): 3481-3498.
- [14] Yan F, Wang C, Li T, et al. Role of miR-21 in the growth and metastasis of human salivary adenoid cystic carcinoma[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(3): 4237-4244.
- [15] Wang Z, Yao W, Li K, et al. Reduction of miR-21 induces SK-N-SH cell apoptosis and inhibits proliferation via PTEN/PDCD4[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(6): 4727-4733.
- [16] Zhao M, Wang L, Zhang Y, et al. MiR-21 suppresses anoikis through targeting PDCD4 and PTEN in human esophageal adenocarcinoma[J]. *Curr Med Sci*, 2018, 38(2): 245-251.

(责任编辑:唐秋姗)