

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.05.002

· 基础研究 ·

miR-340 通过下调 *CCND1* 表达增加结直肠癌细胞对 5-Fu 的耐药

姜靖雯¹, 陈学武¹, 方唯意², 罗荣城² (1. 广州中医药大学附属海南省中医院 肿瘤科, 海南 海口 570203; 2. 南方医科大学中西医结合医院 肿瘤中心, 广东 广州 510515)

[摘要] **目的:**探讨细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)的编码基因 *CCND1* miR-340 介导的逆转结直肠癌细胞对 5-氟尿嘧啶(5-Fu)耐药的机制。**方法:**采用瞬时转染技术将结直肠癌细胞 HCT116、SW480 株分别转染 si-*CCND1* 和 miR340-mimic。应用 MTT 法检测转染后的结直肠癌细胞对 5-Fu 敏感性的变化,应用双荧光素酶试验验证 *CCND1* 对 miR340 参与的影响结直肠癌细胞对 5-Fu 敏感性的影响。**结果:**瞬时转染 si-*CCND1* 和过表达 miR-340 后,结直肠癌 HCT116 和 SW480 细胞的 IC₅₀ 值均显著低于对照组(10,10 vs 20 μmol/L 和 20,20 vs 40 μmol/L,均 $P < 0.05$)。共转染 *CCND1* 3'UTR 野生质粒和 miR-340 inhibitor 的结直肠癌 HCT116 和 SW48 细胞荧光素酶的活性显著高于共转染空载体和 mimic 细胞($P < 0.01$)。**结论:***CCND1* 作为不良因子通过抑制 miR340 的表达进而发挥增加结直肠癌细胞对 5-Fu 耐药的作用。

[关键词] 细胞周期蛋白 D1; *CCND1* 基因; miR-340; 结直肠癌; 5-氟尿嘧啶; 化疗耐药

[中图分类号] R730.5; R735.3+4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)05-0467-05

miR-340 enhances chemotherapy resistance of colorectal cancer cells to 5-Fu by down-regulating *CCND1* expression

JIANG Jingwen¹, CHEN Xuewu¹, FANG Weiyi², LUO Rongcheng² (1. Department of Oncology, Hainan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Haikou 570203, Hainan, China; 2. Tumor Center, Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of coding gene of cell cyclin D1 (*CCND1*) participating in miR-340-induced inhibition of chemotherapy resistance of colorectal cancer cells to 5-fluorouracil (5-Fu). **Methods:** Colorectal cancer HCT115 and SW480 cell lines were transfected with si-*CCND1* and miR340-mimic respectively by transient transfection technology. The sensitivity of cancer cells to 5-Fu after transfection was observed with MTT. The effect of *CCND1* on miR-340 mediated suppression of chemotherapy resistance of cancer cells to 5-Fu was validated by double luciferase test. **Results:** After transient transfection with si-*CCND1* or over-expression of miR-340, the IC₅₀ values of HCT116 and SW480 cell lines were significantly lower than that of control group [*CCND1* silencing: 10, 10 vs 20 μmol/L; miR-340 over-expressing: 20, 20 vs 40 μmol/L; all $P < 0.05$]. After co-transfection with *CCND1* 3'UTR wild plasmid and miR-340 inhibitor, the luciferase reporter activity in HCT 116 and SW480 cells were significantly higher than that of empty plasmid transfection group or mimic transfection group ($P < 0.01$). **Conclusion:** *CCND1*, as an unfavorable factor, enhances the chemo-resistance of colorectal cancer cells to 5-FU by inhibiting the expression of miR-340.

[Key words] cyclin D1; *CCND1* gene; miR-340; colorectal cancer; 5-fluorouracil (5-Fu); chemotherapy resistance

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(5): 467-471. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.05.002]

[基金项目] 广东省自然科学基金资助项目(No.2015A030311005)。Project supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province, China(No.2015A030311005)

[作者简介] 姜靖雯(1982-),女,博士,主要从事肿瘤耐药机制的研究, E-mail: jingwen_858812@163.com

[通信作者] 罗荣城(LUO Rongcheng, corresponding author), 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事肿瘤耐药的基础研究及肿瘤生物治疗的基础及临床研究, E-mail: Luorc01@163.com

[优先发表] http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170509.1027.004.html

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是消化道发病率最高恶性肿瘤之一,也是病死率较高的肿瘤之一^[1],约5%~15%的CRC患者就诊时小于50岁^[2-4]。外科手术、化疗是CRC主要治疗手段。5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)是CRC常用的化疗药物之一,其耐药的出现严重影响了治疗效果。有研究^[5-10]发现,细胞周期蛋白D1(cyclin D1)在肝癌、胃癌、肺癌、鼻咽癌和卵巢癌中高表达,由人类染色体11q13的CCND1基因编码。CCND1除了参与调控细胞周期、肿瘤增殖以外,近年的研究发现影响多个化疗药物的敏感性,如CCND1高表达与睾丸癌^[11]、乳腺癌^[12]、头颈部鳞癌^[13]、胰腺癌^[14]对顺铂的耐药存在相关性,也与多发性骨髓瘤^[15]多发耐药有关。miR-340通过靶向NF-E2相关因子2(NF-E2-related factor 2, Nrf2)介导的抗氧化途径逆转肝癌细胞对顺铂的耐药^[16]。目前,尚未见有关miR-340逆转结直肠癌细胞对于5-Fu的耐药机制研究报道^[17-18]。本课题通过miR-340调控CCND1的表达观察其与结直肠癌细胞对5-Fu敏感性的关系,旨在探讨CCND1参与miR-340介导的逆转结直肠癌细胞对5-Fu耐药的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

人结直肠癌细胞株HCT116和SW480均为南方医科大学中西医结合医院肿瘤中心保存。瞬转siRNA、miR-340 mimic及inhibitor分别应用广州市锐博生物科技有限公司siRNA试剂盒、miR-340 mimic试剂盒和miR-340 inhibitor试剂盒。荧光素酶活性检测应用Promega公司Dual-Luciferase® Reporter Assay System试剂盒。点突变实验应用上海英潍捷基公司Gene Tailor™ Site-Directed Mutagenesis System。

1.2 实时荧光定量PCR检测si-CCND1、miR-340瞬时转染结直肠癌细胞的干扰效率

取 2.5×10^5 个细胞铺6孔板,保证细胞能单个贴壁且密度在70%~80%。瞬时转染siRNA分为实验组si-CCND1(3个片段)和阴性对照(si-NC)组,按试剂盒说明书操作进行转染。瞬转干扰片段作用48 h后提取细胞的RNA,逆转录后进行实时荧光定量PCR检测。瞬时转染miR-340 mimic分为过表达组(miR-340 mimic)和阴性对照组(miR-Ctr),按试剂盒说明书操作进行转染。48 h后提取RNA,经逆转录后行实时荧光定量PCR以确定miR-340的过表达效率。实验重复3次。

1.3 MTT法检测5-Fu作用于转染后的结直肠癌细胞的IC₅₀值

取对数期的si-CCND1组、si-NC组、miR-340组和miR-Ctr组细胞接种于96孔板 1×10^4 个/孔,每组设立5个复孔,同时设立仅加培养基的空白对照,入37℃、5%CO₂的培养箱中培养,9~12 h细胞贴壁后,加入质量浓度依次为0、5、10、20、40、80 μmol/L的5-Fu。48 h后,酶标仪在490 nm波长处测定光密度(D)值。实验重复3次。

1.4 重组真核表达载体psiCHECK/CCND1 3'UTR的构建

依据生物信息学软件的预测,用PrimerPremier 5.0系统进行引物构建,用PCR扩增CCND1的3'UTR端,且3'UTR端要包含miR-340结合位点的上下游。上游引物5'端加进Xho I酶切位点,下游引物5'端加进Not I酶切位点,同时添进几个保护性碱基。凝胶回收PCR产物、酶切反应、纯化酶切产物、连接反应、连接产物的转化、重组载体PCR鉴定、重组载体的提取等步骤逐一完成。

1.5 重组质粒psiCHECK-2/CCND13'UTR的点突变

根据Gene Tailor™ Site-Directed Mutagenesis System说明书操作,突变反应包括3个步骤:甲基化反应、突变反应和转化反应。最后得到目的突变质粒psiCHECK-2/CCND1 mt 3'UTR。

1.6 荧光素酶活性检测miR-340对CCND1的调控作用

按照Dual-Luciferase® Reporter Assay System说明书进行操作。将Passive Lysis Buffer裂解的细胞转到荧光素酶报告专用96孔板中,首先检测萤火虫荧光素酶,将萤火虫荧光素酶检测试剂II加入样品中,产生的光信号至少持续1 min。定量萤火虫荧光强度后,再在同一个样品中加入Stop & Glo®试剂,终止萤火虫荧光素酶反应,同时启动海肾荧光素酶反应。以萤火虫荧光素酶与海肾荧光素酶活性的比值(R/F)作为荧光素酶的相对活性,进行不同组之间的比较和分析。

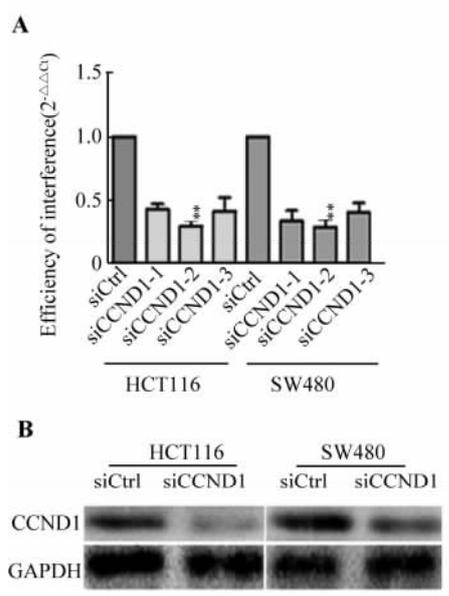
1.7 统计学处理

采用SPSS 20.0统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内比较采用独立样本t检验,两组比较采用配对t检验。不同组别之间同一个药物浓度的D值比较采用未配对t检验,同一个组不同药物浓度的D值采用One-Way ANOVA方法分析。不同的药物浓度之间的两两比较,使用Dunnett统计学方法。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠癌 HCT116 和 SW480 细胞 si-*CCND1* 的干扰效率

qRT-PCR 检测结果(图 1A)显示,2 号 si-*CCND1* 干扰效率均最高($F = 292.762, 651.150$; 均 $P < 0.01$)。将 2 号片段瞬转到结直肠癌 HCT116 和 SW480 细胞中,48 h 后提取细胞的蛋白,Western blotting 检测结果(图 1B)显示,HCT116 和 SW480 细胞中的 *CCND1* 都被有效地干扰,确证可以进行下一步实验。



** $P < 0.01$ vs siCtrl group

A: qRT-PCR; B: Western blotting

图 1 结直肠癌细胞 si-*CCND1* 的干扰效率

Fig. 1 Interference effect of si-*CCND1* in the colorectal cancer cells

2.2 干扰 *CCND1* 后结直肠癌细胞对 5-Fu 敏感性增加

MTT 法检测结果显示,结直肠癌 HCT116 和 SW480 细胞中 si-*CCND1* 组 IC_{50} 值为 $10 \mu\text{mol/L}$, 对照组为 $20 \mu\text{mol/L}$ 。MTT 法检测结果(图 2)显示,瞬转 si-*CCND1* 后结直肠癌 HC T116 和 SW480 细胞对 5-Fu 的敏感性均有增加($t = 292.767, 651.150$; 均 $P < 0.05$)。

2.3 瞬转 miR-340 后结直肠癌细胞过表达 miR-340

qRT-PCR 检测结果显示,瞬转 miR-340(48 h)后结直肠癌 HC T116 和 SW480 细胞表达效率显著高于 NC 组[(25.38 ± 1.04)、(37.21 ± 0.99) vs

(1.00 ± 0.00)倍, $t = 1.273, 70.642$; 均 $P < 0.01$]。

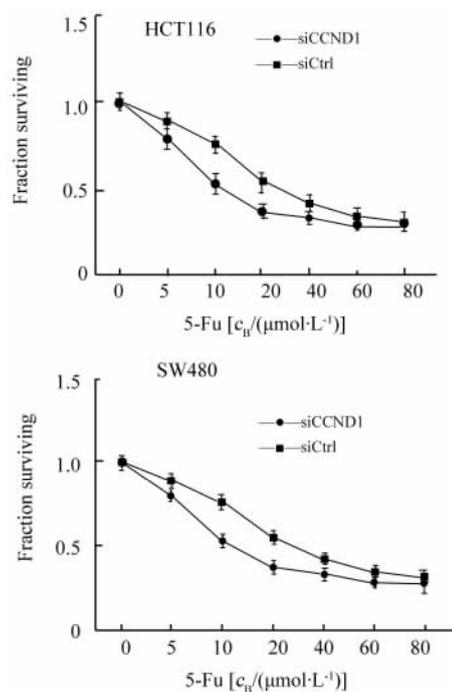


图 2 干扰 *CCND1* 对结直肠癌细胞 5-Fu 敏感性的影响

Fig. 2 Effect of interfering *CCND1* on sensitivity of the colorectal cancer cells to 5-Fu

2.4 过表达 miR-340 增加结直肠癌细胞对 5-Fu 的敏感性

MTT 法检测结果(图 3)显示,过表达 miR-340 后,结直肠癌 HC T116 和 SW480 细胞的 IC_{50} 值均有下降,两株细胞对 5-Fu 的敏感性均有增加($P < 0.05$)。

2.5 miR-340 直接调控结直肠癌细胞 *CCND1* 的表达

双荧光素酶实验结果(图 4)表明,过表达 miR-340 可抑制 *CCND1* 的表达,抑制 miR-340 的表达可以增加 *CCND1* 的表达。

2.6 *CCND1* 3'UTR 与 miR-340 inhibitor 共转染对荧光素酶活性的影响

双荧光素酶报告验证结果(图 5)显示,共转染 *CCND1* 3'UTR 野生质粒和 miR-340 mimic 可明显降低荧光素酶的活性($t = 42.099, P < 0.01$)。*CCND1* 3'UTR 野生质粒与 miR-340 inhibitor 共转染可明显增加荧光素酶活性($t = -49.602, P < 0.01$)。而 *CCND1* 3'UTR 突变质粒分别与 miR-340 mimic 和 inhibitor 共转染后,不改变荧光素酶活性($P > 0.05$)。

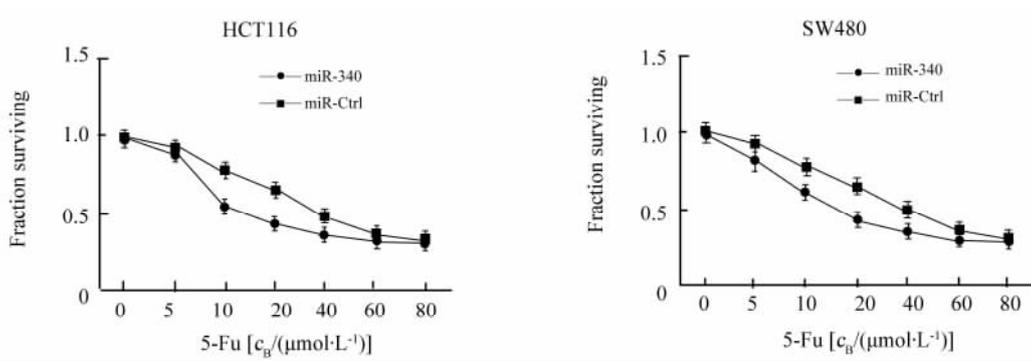
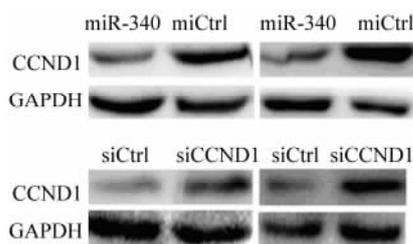


图3 过表达 miR-340 对结直肠癌细胞 5-Fu 敏感性的影响

Fig. 3 Effect of over-expression of miR-340 on sensitivity of the colorectal cancer cells to 5-Fu



A: HCT116 cell line; B: SW480 cell line

图4 miR340 对结直肠癌细胞 CCND1 表达的影响

Fig. 4 Effect of miR340 on expression of CCND1 in the colorectal cancer cells

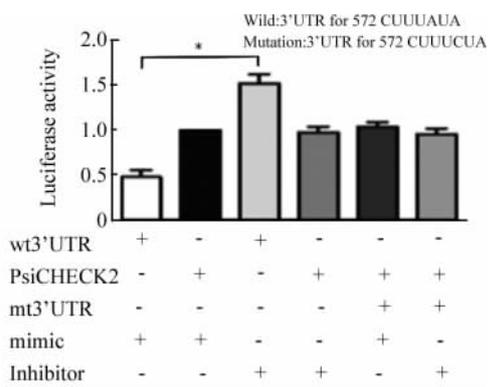


图5 双荧光素酶报告实验证实 miR-340 靶向 CCND1 的 3'UTR

Fig. 5 Double luciferase assay confirmed that miR-340 directly targets CCND1 3'UTR

3 讨论

miRNAs 具有广泛多样的生物学功能,参与人体生命过程中一系列的重要进程,其可通过识别并互补结合目的基因的 3'UTR 端来直接靶向目的基因,下调目的基因的表达,进而发挥其生物学功能。

miR-340(定位在 5q35.3)在乳腺癌中通过靶向 c-Met 可抑制细胞的增殖、侵袭和迁移,且其低表达与预后相关^[18];在骨肉瘤中通过靶向 ROCK1 抑制细胞的增殖和转移^[19];在结直肠癌中抑制细胞增殖和转移^[20-21];在黑色素瘤中抑制 RAS-RAF-MAPK 通路^[22];在肝癌中可通过靶向 Nrf 相关通路增加细胞对顺铂的敏感性^[16];在神经胶质瘤细胞中可抑制其对替莫唑胺的敏感性^[23]。可见,miR-340 作为一个抑癌基因起抑制肿瘤的作用。本课题主要探讨 miR-340 表达水平与结直肠癌细胞耐药的相关性,进一步阐明其影响结直肠癌细胞对 5-Fu 敏感性的作用机制。

本研究通过瞬转 si-CCND1 和 miR-340 mimic,发现 CCND1 和 miR-340 均可以影响结直肠癌细胞对 5-Fu 的敏感性,并通过计算机生物学信息预测发现 CCND1 可能是 miR-340 的下游靶点。为了验证生物信息学检测的结果,应用荧光素酶报告试验发现了 miR-340 和 CCND1 的表达水平的变化具有同步性,即抑制 miR-340 的表达水平可以促进 CCND1 表达水平的增加,进一步说明了 miR-340 可以直接作用于 CCND1,即通过直接结合靶向 CCND1 的 3'UTR 区来达到抑制 CCND1 的结果,其结果是可以减少结直肠癌细胞对 5-Fu 的耐药性,增加其化疗敏感性。而结直肠癌作为最常见的消化系统肿瘤,以氟尿嘧啶为基础药物的化疗方案是最主要的治疗手段之一,而结直肠癌细胞对于氟尿嘧啶类药物的耐药严重影响了临床疗效。如何逆转其耐药、增加结直肠癌细胞对氟尿嘧啶的敏感性对于提高临床疗效尤为重要。因此,本研究结果预示着有可能将 miR-340 作为治疗的一个靶点去进一步研究如何克服结直肠癌细胞对氟尿嘧啶类药物的耐药,提高临床化疗的疗效,造福广大肿瘤患者。

[参考文献]

- [1] FERLAY J, SHIN H R, BRAY F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: Globocan 2008[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(14): 2893-2917. DOI:10.1002/ijc.25516.
- [2] RUSTGI A K. The genetics of hereditary colon cancer[J]. *Genes Dev*, 2007, 21(20): 2525-2238. DOI:10.1101/gad.1593107.
- [3] HOPPER J L, BISHOP D, EASTON D F. Population-based family studies in genetic epidemiology[J]. *Lancet*, 2005, 366(9494): 1397-1406. DOI:10.1016/S0140-6736(05)67570-8.
- [4] LIMBURG P J, HARMSSEN W S, CHEN H H, et al. Prevalence of alterations in DNA mismatch repair genes in patients with young-onset colorectal cancer[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2011, 9(6): 497-502. DOI: 10.1016/j.cgh.2010.10.021.
- [5] XIA B, YANG S, LIU T, et al. miR-211 suppresses epithelial ovarian cancer proliferation and cell-cycle progression by targeting cyclin D1 and CDK6[J/OL]. *Mol Cancer*, 2015, 14(11): 57 [2016-10-20]. <http://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-015-0322-4>. DOI: 10.1186/s12943-015-0322-4.
- [6] KIM M K, PARK G H, EO H J, et al. Tanshinone I induces cyclin D1 proteasomal degradation in an ERK1/2 dependent way in human colorectal cancer cells[J/OL]. *Fitoterapia*, 2015, 101:162-168 [2016-10-20]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X1500012X>. DOI: 10.1016/j.fitote.
- [7] HUANG X H, JIAN W H, WU Z F, et al. Small interfering RNA (siRNA)-mediated knockdown of macrophage migration inhibitory factor (MIF) suppressed cyclin D1 expression and hepatocellular carcinoma cell proliferation[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(14): 5570-5580. DOI: 10.18632/oncotarget.2141.
- [8] STAHL P, SEESCHAAF C, LEBOK P, et al. Heterogeneity of amplification of HER2, EGFR, CCND1 and MYC in gastric cancer [J/OL]. *BMC Gastroenterol*, 2015, 15: 7 [2016-10-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4324419/>. DOI: 10.1186/s12876-015-0231-4.
- [9] LIU Z, LONG X, CHAO C, et al. Knocking down CDK4 mediates the elevation of let-7c suppressing cell growth in nasopharyngeal carcinoma[J/OL]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 274 [2016-10-20]. <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-14-274>. DOI: 10.1186/1471-2407-14-274.
- [10] LIAO K, LI J, WANG Z. Dihydroartemisinin inhibits cell proliferation via AKT/GSK3 β /cyclinD1 pathway and induces apoptosis in A549 lung cancer cells[J/OL]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(12): 8684-8689 [2016-10-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4314032/>.
- [11] NOEL E E, YESTE-VELASCO M, MAO X, et al. The association of CCND1 overexpression and cisplatin resistance in testicular germ cell tumors and other cancers[J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(6): 2607-2615. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090780.
- [12] BOSTNER J, AHNSTROM WALTERSSON M, FORNANDER T, et al. Amplification of CCND1 and PAK1 as predictors of recurrence and tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer [J]. *Oncogene*, 2007, 26(49): 6997-7005. DOI: 10.1038/sj.onc.1210506.
- [13] ZHANG P, ZHANG Z, ZHOU X, et al. Identification of genes associated with cisplatin resistance in human oral squamous cell carcinoma cell line[J/OL]. *BMC Cancer*, 2006, 6: 224 [2016-10-20]. <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-6-224>. DOI: 10.1186/1471-2407-6-224.
- [14] BILIRAN H J R, WANG Y, BANERJEE S, et al. Overexpression of cyclin D1 promotes tumor cell growth and confers resistance to cisplatin-mediated apoptosis in an elastase-myc transgene-expressing pancreatic tumor cell line[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(16): 6075-6086. DOI:10.1158/1078-0432.
- [15] SEWIFY E M, AFIFI O A, MOSAD E, et al. Cyclin D1 amplification in multiple myeloma is associated with multidrug resistance expression[J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2014, 14(3): 215-222. DOI: 10.1016/j.clml.2013.07.008.
- [16] SHI L, CHEN Z G, WU L L, et al. miR-340 reverses cisplatin resistance of hepatocellular carcinoma cell lines by targeting Nrf2-dependent antioxidant pathway[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(23): 10439-10444. DOI:10.7314/APJCP.2014.15.23.10439.
- [17] ZHOU X, WEI M, WANG W. MicroRNA-340 suppresses osteosarcoma tumor growth and metastasis by directly targeting ROCK1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 437(4): 653-658. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.07.033.
- [18] WU Z S, WU Q, WANG C Q, et al. miR-340 inhibition of breast cancer cell migration and invasion through targeting of oncoprotein c-Met[J]. *Cancer*, 2011, 117(13): 2842-2852. DOI: 10.1002/cncr.25860.
- [19] ZHOU X, WEI M, WANG W. MicroRNA-340 suppresses osteosarcoma tumor growth and metastasis by directly targeting ROCK1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 437(4): 653-658. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.07.033.
- [20] SUN Y, ZHAO X, ZHOU Y, et al. miR-124, miR-137 and miR-340 regulate colorectal cancer growth via inhibition of the Warburg effect[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(4): 1346-1352. DOI: 10.3892/or.2012.1958.
- [21] TAKEYAMA H, YAMAMOTO H, YAMASHITA S, et al. Decreased miR-340 expression in bone marrow is associated with liver metastasis of colorectal cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(4): 976-985. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0571.
- [22] POENITZSCH S A, SETALURI V, SPIEGELMAN V S. MicroRNA-340 as a modulator of RAS-RAF-MAPK signaling in melanoma[J/OL]. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 563:118-124 [2016-10-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4221550/>. DOI: 10.1016/j.abb.2014.07.012.
- [23] YAMASHITA D, KONDO T, OHUE S, et al. miR340 suppresses the stem-like cell function of glioma-initiating cells by targeting tissue plasminogen activator[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(6): 1123-1233. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0938.

[收稿日期] 2016 - 12 - 22

[修回日期] 2017 - 02 - 28

[本文编辑] 党瑞山