

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.08.011

· 临床研究 ·

## MicroRNA-99a 促进结肠癌细胞的增殖和迁移及其可能机制

宋军, 汤黎明, 刘坤, 刘寒旻, 周艳(南京医科大学附属常州二院, 江苏常州 213003)

**[摘要]** **目的:**探讨结肠癌患者组织中 microRNA-99a 表达水平以及对结肠癌细胞增殖和迁移的影响。**方法:**取南京医科大学附属常州二院胃肠病中心 49 例结肠癌患者肿瘤组织、癌旁组织(癌旁 5cm)标本以及结肠癌细胞 HCT-116、HT-29、SW-480、Caco-2 和正常结肠上皮细胞 HCoePic, 采用实时荧光定量 PCR 检测结肠癌患者肿瘤组织和结肠癌细胞中 microRNA-99a 表达水平; 结肠癌细胞株 HT-29 转染 microRNA-99a 抑制剂后, CCK-8 法检测 microRNA-99a 对结肠癌细胞增殖的变化; transwell 法观察 microRNA-99a 对结肠癌细胞迁移的影响; Western blotting 检测了 HT-29 中 FGFR-3 的表达水平。**结果:**microRNA-99a 表达在结肠癌组织中明显高于癌旁组织( $6.27 \pm 0.48$  vs  $1.34 \pm 0.54$ ,  $P < 0.05$ )、在肿瘤细胞中明显高于正常结肠上皮细胞( $5.48 \pm 0.34$ ,  $7.67 \pm 0.24$ ,  $5.78 \pm 0.22$ ,  $6.28 \pm 0.44$  vs  $1.45 \pm 0.37$ ,  $P < 0.05$ )。转染 microRNA-99a 抑制剂后, HT-29 细胞的增殖和迁移能力均明显下降( $P < 0.05$ ); 同时, HT-29 中 FGFR-3 显著降低( $P < 0.05$ )。**结论:**microRNA-99a 在结肠癌组织中高表达, 低表达 microRNA-99a 可减弱结肠癌细胞的增殖和迁移能力, 且可能通过 FGFR-3 信号通路发挥作用。

**[关键词]** microRNA-99a; 结肠癌; 增殖; 迁移; FGFR3**[中图分类号]** R730.2; R735.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)08-0880-04

## MicroRNA-99a promotes proliferation and migration of colon cancer cell and its anti-tumor mechanism

SONG Jun, TANG Liming, LIU Kun, LIU Hanyang, ZHOU Yan (Affiliated Changzhou Second Hospital of Nanjing Medical University, Changzhou 213003, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of microRNA-99a in the tumor tissues of colon cancer patients and its effect on cancer cell proliferation and migration. **Methods:** 49 pairs of cancer tissue and adjacent tissue (5 cm away from cancer tissue) from colon cancer patients that treated in Gastrointestinal Center of Affiliated Changzhou Second Hospital of Nanjing Medical University, and colon cancer cell lines (HT-29, HCT-116, SW480, Caco-2) as well as normal epithelial Hcoepic cell line were selected for our research. Quantitative real-time PCR was used to detect the levels of microRNA-99a in tumor tissues, adjacent tissues and tumor cells; After transfection of microRNA-99a inhibitor, we used CCK-8 to test the cell proliferation, transwell assay to observe the cell migration, and Western blotting to examine the levels of FGFR3 in HT-29 cells. **Results:** The expression of microRNA-99a in the cancer tissues was significantly higher than that in normal para-cancerous tissues ( $6.27 \pm 0.48$  vs  $1.34 \pm 0.54$ ,  $P < 0.05$ ), and its expression in tumor cells was significantly higher than that in normal colon epithelial cells ( $5.48 \pm 0.34$ ,  $7.67 \pm 0.24$ ,  $5.78 \pm 0.22$ ,  $6.28 \pm 0.44$  vs  $1.45 \pm 0.37$ ,  $P < 0.05$ ). After microRNA-99a inhibitor transfection, cell proliferation and migration of HT-29 cells were significantly decreased ( $P < 0.05$ ); , in the meanwhile, the mRNA and protein levels of FGFR3 were significantly decreased in HT-29 cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** microRNA-99a was highly expressed in the tumor tissue of colon cancer patients and colon cancer cells, and low expression of microRNA-99a may weaken the proliferation and migration ability of cancer cells, which might be accomplished through FGFR3 signaling pathway.

**[Key words]** microRNA-99a; colon cancer; proliferation; migration; FGFR3

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(8): 880-883. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.08.011]

**[基金项目]** 常州市科技基础研究计划资助(No. CJ20122014)。Project supported by the Changzhou Basic Research Program of Science and Technology(No. CJ20122014)**[作者简介]** 宋军(1991-), 男, 硕士生, 主要从事胃肠肿瘤学的基础与临床研究, E-mail: sindro329@163.com**[通信作者]** 汤黎明(TANG Liming, corresponding author), 博士, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事胃肠肿瘤学的基础与临床研究, E-mail: drtanglm@gmail.com**[优先发表]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170731.0934.002.html>

结肠癌是常见的恶性肿瘤之一,是男性第三大常见肿瘤、女性第二大常见肿瘤,而且男性的发病例比女性的发病率高,并且在不同的国家发病率呈现不同的发病率<sup>[1]</sup>,严重威胁着人类的生命健康。目前结肠癌的治疗方式还是以手术治疗为主,辅以化疗和放疗。而结肠癌的发生发展以及疾病的转归是个复杂、多基因、多因素参与的过程,但其发病机制尚未完全明确,越来越多的学者关注结直肠癌细胞内的基因表达对结肠癌的影响。microRNA(miRNA)最先由 Ambros 在 1993 年发现<sup>[2]</sup>,是一类小分子非编码 RNA,包含约 22 个核苷酸,在肿瘤的发生发展过程中发挥了重要作用<sup>[3]</sup>。microRNA-99a(miRNA-99a)已经被证实在骨肉瘤<sup>[4]</sup>、乳腺癌<sup>[5]</sup>、肾细胞癌<sup>[6]</sup>等多种肿瘤细胞中表达显著下调的,提示 miRNA-99a 可能是一个潜在的肿瘤抑制剂,miRNA-99a 对结肠癌细胞影响的报道尚少,本研究观察 miRNA-99a 在结肠癌患者组织中的表达及其对结肠癌细胞增殖和迁移能力的影响,从而为结肠癌的防治提供一定的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 临床标本

收集南京医科大学附属常州二院存档的结肠癌标本,每例标本分别取自结肠癌肿瘤组织(且术后经病理证实为结肠癌)和癌旁结肠组织。新鲜标本离体后迅速置于液氮中,并于液氮罐中保存。本研究所有患者均已签署知情同意书并得到医院伦理委员会的批准。

### 1.2 细胞株与试剂

结肠癌 HT-29、HCT-116、Caco-2、SW480、正常结肠上皮细胞株 HCoePic 均购自上海中科院细胞库。

DMEM 培养基购自 GIBCO 公司,胎牛血清(FBS)购自 GIBCO 公司,miRNA-99a inhibitor、稳定阴性对照组 miRNA-99a NC 和引物 U6、FGFR 均购自广州锐博公司, RNA 提取试剂盒 TRIzol 购自 Invitrogen 公司, Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司, 逆转录试剂盒购自 TAKARA 公司, QPCR 试剂购自 Vazyme 公司, 凋亡检测试剂盒购自 BD 公司, Transwell 小室购自 BD 公司, 抗成纤维细胞因子受体 3 (FGFR3) 抗体购自 Abcam 公司, CCK-8 试剂购自日本 Dojindo 公司。

### 1.3 细胞培养与转染

HT-29 细胞在含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基中培养,至对数生长期,接种于 10 cm 培养皿中培养,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱, 孵育细胞。

采用 lipofectamine™2000 对人结肠癌细胞株 HT-

29 进行 miRNA-99a inhibitor 的转染,并以 PBS、miRNA-99a NC 作为对照,于 48 h 后检测其干扰效率。

### 1.4 实时荧光定量 PCR 检测 miRNA-99a 和 FGFR3 表达水平

将留存的结肠癌组织、癌旁组织和培养的结肠癌细胞以及转染后的结肠癌细胞 HT-29,按照产品说明书提取 RNA,以 U6 作为内参,实时荧光定量 PCR 检测 miRNA-99a 的表达水平和 FGFR3 mRNA 的表达水平,结果采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法进行相对定量分析。实验重复 3 次。miRNA-99a、U6 引物由广州锐博公司设计; FGFR3 上游为 5'-CTGCGTC GTGGAGAACAAG-3', FGFR3 下游为 5'-CCGAGACAGCTCCCATT TG-3'。

### 1.5 CCK-8 检测转染 miRNA-99a 抑制剂对 HT-29 细胞增殖的影响

将对数生长期的细胞以 20×10<sup>4</sup> 个/孔接种至 24 孔板,4 h 后转染 miRNA-99a 抑制剂,4-6h 更换正常培养基,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 16 h 后,以 1 000 个/孔接种至 96 孔板,每组设置 6 个复孔,同时设置不含细胞的空白培养基作为对照,培养 1、2、3、4 d 后,分别在孔中加入 10 μl CCK-8 试剂,37 °C 孵育 1 h,用酶标仪检测 450 nm 处的光密度(D)值,每孔实测 D 值需减去空白对照组 D 值,去除每组最大值和最小值,取剩下四孔平均 D 值。实验重复 3 次。

### 1.6 流式细胞仪检测转染 miRNA-99a 抑制剂对 HT-29 细胞凋亡的影响

将对数生长期的细胞以 20×10<sup>4</sup> 个/孔接种至 6 孔板,4 h 后转染 miRNA-99a 抑制剂,4-6 h 更换正常培养基,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h,消化收集 HT-29 细胞,按照说明书行 AnnexinV 及 PI 双染色,并用流式细胞仪检测早期凋亡细胞。实验重复 3 次。

### 1.7 Transwell 检测转染 miRNA-99a 抑制剂对 HT-29 细胞迁移的影响

将转染 miRNA-99a 16 h 后的 HT-29 细胞,用无血清培养基将细胞饥饿 12 h 后,消化收集 HT-29 细胞,以 3×10<sup>4</sup> 个/孔接种至 transwell 小室内,小室上侧为无血清培养液,下侧为含 10% 胎牛血清的培养液,48 h 后用 0.1% 结晶紫染色,显微镜下观察,计算迁移至对侧的细胞数。实验重复 3 次。

### 1.8 Western blotting 检测 HT-29 细胞转染 miRNA-99a 抑制剂后 FGFR3 蛋白表达水平

转染后结肠癌细胞培养至对数生长期,按照蛋白提取步骤提取总蛋白,用 BCA 法测定总蛋白浓度,经 SDS-PAGE 点用后转移到 NC 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 1.5 h, TBST 洗涤后,分别加入 1:1 000 抗 FGFR3 抗体、1:500 抗 GADPH 抗体,4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤后加入 1:5 000 辣根过氧化物酶标记的羊

抗兔二抗, 37 °C 孵育 1 h, 再用 TBST 洗涤, 化学发光并曝光成像。Western blotting 检测以 GAPDH 条带作为内参, FGFR3 条带与其比较, 观察 FGFR3 蛋白表达变化。实验重复 3 次。

### 1.9 统计学处理

采用 SPSS22.0 软件进行统计学分析。多组比较采用单因素方差分析, 两组间的差异比较则采用 Student's-*t* 检验, 显著性水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 结肠癌患者组织中 miRNA-99a mRNA 高表达

miRNA-99a 在结肠癌组织中表达明显高于对应的癌旁组织 ( $6.27 \pm 0.48$  vs  $1.34 \pm 0.54$ ,  $P < 0.05$ )。

### 2.2 结肠癌细胞中 miRNA-99a mRNA 高表达

MiRNA-99a 在结肠癌细胞 HCT-116、HT-29、SW-480、Caco-2 中的表达明显高于正常的 HCoePic 结肠上皮细胞 ( $5.48 \pm 0.34$ 、 $7.67 \pm 0.24$ 、 $5.78 \pm 0.22$ 、 $6.28 \pm 0.44$  vs  $1.45 \pm 0.37$ ,  $P < 0.05$ )。

### 2.3 结肠癌细胞转染 miRNA-99a 抑制剂后 mRNA 表达水平显著降低

结肠癌细胞株 HT-29 转染 miRNA-99a 抑制剂后, 转染 miRNA-99a 抑制剂组与 PBS、NC 对照组相比, miRNA-99a mRNA 的表达水平显著降低 ( $1.45 \pm 0.32$  vs  $7.57 \pm 0.33$ 、 $7.90 \pm 0.26$ ,  $P < 0.05$ ), 提示低表达 miRNA-99a 结肠癌细胞构建成功。

### 2.4 结肠癌细胞中 miRNA-99a 对细胞增殖的影响

结肠癌细胞 HT-29 转染 miRNA-99a 抑制剂后, 同对照组相比, 结肠癌细胞 HT-29 增殖显著减少 ( $P < 0.05$ , 图 1)。

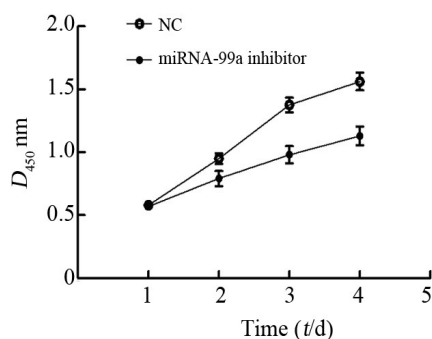


图 1 miRNA-99a 对结肠癌细胞 HT-29 增殖的影响

Fig.1 Effect of miRNA-99a on cell proliferation in HT-29 cell

### 2.5 结肠癌细胞中 miRNA-99a 对细胞凋亡的影响

结肠癌细胞 HT-29 转染 miRNA-99a 抑制剂后, NC 组与转染 miRNA-99a 组细胞凋亡率分别为 ( $1.36 \pm 0.22$ )%、( $8.62 \pm 0.32$ )%, 同对照组相比, 结肠癌细胞 HT-29 凋亡显著增多 ( $P < 0.05$ )。

### 2.6 结肠癌细胞中 miRNA-99a 对细胞迁移的影响

结肠癌细胞 HT-29 转染 miRNA-99a 抑制剂后, 同对照组相比, 结肠癌细胞迁移明显减少 [ $(320 \pm 23)$  vs  $(143 \pm 25)$  个,  $P < 0.05$ , 图 2)。

### 2.7 结肠癌细胞 HT-29 转染 miRNA-99a 抑制剂后 FGFR3 mRNA 和蛋白表达影响

转染 miRNA-99a 抑制剂后, 检测结肠癌细胞 HT-29 的 FGFR3 mRNA 和蛋白表达水平, 结果发现, 与对照组比较, FGFR3 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低 (图 3)。

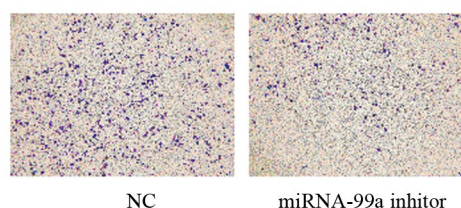


图 2 结肠癌细胞中 miRNA-99a 对 HT-29 细胞迁移的影响 ( $\times 40$ )

Fig. 2 Effect of miRNA-99a on cell migration in HT-29 cell ( $\times 40$ )

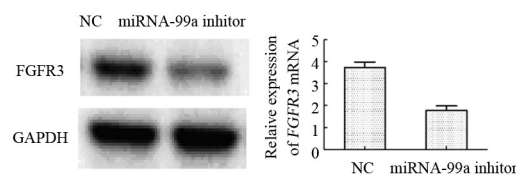


图 3 转染 miRNA-99a 抑制剂后 HT-29 中 FGFR3 mRNA 和蛋白的表达变化

Fig. 3 Expression of FGFR3 mRNA and protein in HT-29 cell after transfection with miRNA-99a inhibitor

## 3 讨论

结肠癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一, 中国最新癌症 5 年生存率调查报告指出, 结肠癌的 5 年生存率仅为 47.2%<sup>[7]</sup>。由于结肠癌早期诊断率低、已发生淋巴及远处转移, 常常在患者就诊时就已经失去了根治性手术的机会, 对放疗化疗敏感性的个体差异也是导致部分患者术后早期复发、远处转移的主要原因, 因而结肠癌的治疗预后总体而言较差, 因而寻找新的有效的结肠癌分子标志物和生物靶点治疗越来越受到关注, microRNA 可能成为生物靶向治疗的新靶点, 可能为肿瘤治疗带来新的希望。

microRNA 作为一种新型的调控因子, 调节细胞的增殖、分化和凋亡等过程<sup>[8]</sup>。有研究<sup>[9]</sup>显示 miRNA-99a 在膀胱癌组织和细胞中显著降低, 体外过表达 miRNA-99a 可通过作用于 FGFR3 而抑制膀胱癌细胞

T24 和 EJ 的增殖、迁移和侵袭, 这表明 miRNA-99a 可通过 FGFR3 成为治疗膀胱癌的潜在靶点; 另有研究<sup>[10]</sup>表明 miRNA-99a 在肺癌组织和细胞中显著降低, 体外过表达 miRNA-99a 可通过调节 IGF-1R 通路来抑制肺癌细胞 A549 和 H1299 的增殖、克隆形成及迁移, 这显示 miRNA-99a 具有作为肺癌诊断和治疗新靶点的潜能; 此外还有研究<sup>[11]</sup>表明 microRNA 可通过调节 mTOR 通路来促进食管鳞状上皮细胞癌的凋亡, 这表明 miRNA-99a 可能成为食管鳞状上皮细胞癌诊断和治疗新靶点的潜能。

FGFR 属于受体型蛋白酪氨酸激酶, 目前已知的 FGFR 主要包括 4 种类型, 即 FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4<sup>[12]</sup>。临床发现多种癌症发生中伴随着肿瘤组织的 FGFR 过表达和激活, 它们可促进肿瘤血管生成和肿瘤细胞分裂增殖等<sup>[13]</sup>。

本研究发现结肠癌组织和细胞中 miRNA-99a 的表达明显升高, 转染 miRNA-99a 抑制剂后, 抑制了结肠癌细胞 HT-29 的增殖、迁移和侵袭, 促进了细胞的凋亡; 此外, 转染 miRNA-99a 后 *FGFR3* mRNA 和蛋白水平明显下降, 推测 microRNA99a 可能通过下调 *FGFR3* 来抑制结肠癌细胞的增殖、迁移, 促进了细胞的凋亡。这与 Sonvilla<sup>[14]</sup>的结果是一致的, *FGFR3* 表达抑制了结肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 促进了细胞的凋亡。

综上, 本研究发现 miRNA-99a 的低表达可有效抑制结肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 与之前的文章结果出现相反的结果, 可能是由于组织和细胞特异性所决定的, 疾病发展是动态发展变化的, 甚至在不同的发展阶段, 作用结果也可能不同, 此外还可能与调控的信号通路不同以及信号通路的交叉作用有关, 从而导致出现了相反的结论。如 microRNA-223 在肝癌中可通过 Rab1 介导的 mTOR 激活来抑制肝癌细胞的增殖和促进肝癌细胞的凋亡<sup>[15]</sup>, 在肺癌中 microRNA-223 可通过激活 NF- $\kappa$ B 信号通路促进肺癌细胞 A549 的增殖和迁移, 抑制肺癌细胞的凋亡<sup>[16]</sup>。由此可见 microRNA 在不同癌症中可能发挥不同的作用。未来的研究可以选取更多的组织样本, 更深入的研究 *FGFR3* 上下游调控基因的表达改变, 以及与其它通路的交叉作用, 系统的认识 miRNA-99a 对结肠癌的作用机制, 另外还可以引入动物实验, 以验证体外实验的结果。这可以为 microRNA 在结肠癌诊断和生物靶向治疗提供更好的理论基础。

#### [参 考 文 献]

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108. DOI : 10.3322/caac.21262.
- [2] LEE R C, FEINBAUM R L, AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. Cell, 1993, 75(5): 843-854.
- [3] SHENOUDA S K, ALAHARI S K. microRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor[J]. Cancer Metast Rev, 2009, 28(3/4): 369-378. DOI: 10.1007/s10555-009-9188-5.
- [4] ZHAO J, CHEN F, ZHOU Q, et al. Aberrant expression of miRNA-99a and its target gene mTOR associated with malignant progression and poor prognosis in patients with osteosarcoma [J]. OncoTargets Ther, 2016, 9(3): 1589-1597. DOI: 10.2147/OTT.S102421.
- [5] WANG X, LI Y, QI W, et al. MiRNA-99a inhibits tumor aggressive phenotypes through regulating HOXA1 in breast cancer cells[J]. Oncotarget, 2015, 6(32): 32737-32747. DOI: 10.18632/oncotarget.5355.
- [6] CUI L, ZHOU H, ZHAO H, et al. MiRNA-99a induces G1-phase cell cycle arrest and suppresses tumorigenicity in renal cell carcinoma[J]. BMC cancer, 2012, 12(11): 546-556. DOI: 10.1186/1471-2407-12-546.
- [7] ZENG H, ZHENG R, GUO Y, et al. Cancer survival in China, 2003-2005: a population-based study[J]. Int J Cancer, 2015, 136(8): 1921-1930. DOI: 10.1002/ijc.29227.
- [8] WANG Y, LEE C G. MicroRNA and cancer--focus on apoptosis[J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(1): 12-23. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00510.x.
- [9] WU D, ZHOU Y, PAN H, et al. miRNA-99a inhibiting cell proliferation, migration and invasion by targeting fibroblast growth factor receptor 3 in bladder cancer[J]. OncoL Lett, 2014, 7(4): 1219-1224. DOI : 10.3892/ol.2014.1875.
- [10] CHEN C, ZHAO Z, LIU Y, et al. miRNA-99a is downregulated and promotes proliferation, migration and invasion in non-small cell lung cancer A549 and H1299 cells[J]. OncoL Lett, 2015, 9(3): 1128-1134. DOI : 10.3892/ol.2015.2873.
- [11] YAN B, FU Q, LAI L, et al. Downregulation of microRNA 99a in oral squamous cell carcinomas contributes to the growth and survival of oral cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2012, 6(3): 675-681. DOI : 10.3892/mmr.2012.971.
- [12] ESWARAKUMAR V P, LAX I, SCHLESSINGER J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2005, 16(2): 139-149. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2005.01.001.
- [13] FOTH M, AHMAD I, VAN RHIJN B W, et al. Fibroblast growth factor receptor 3 activation plays a causative role in urothelial cancer pathogenesis in cooperation with Pten loss in mice[J]. J Pathol, 2014, 233(2): 148-158. DOI : 10.1002/path.4334.
- [14] SONVILLA G, ALLERSTORFER S, HEINZLE C, et al. Fibroblast growth factor receptor 3-IIIc mediates colorectal cancer growth and migration[J]. Br J Cancer, 2010, 102(7): 1145-1156. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605596
- [15] DONG Z, QI R, GUO X, et al. MiR-223 modulates hepatocellular carcinoma cell proliferation through promoting apoptosis via the Rab1-mediated mTOR activation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 483(1): 630-637. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.12.091.
- [16] HUANG L, LI F, DENG P, et al. MicroRNA-223 Promotes Tumor Progression in Lung Cancer A549 Cells via Activation of the NF- $\kappa$ B Signaling Pathway[J]. Oncol Res, 2016, 24(6): 405-413. DOI: 10.3727/096504016X14685034103437.

[收稿日期] 2017-04-17

[修回日期] 2017-06-10

[本文编辑] 韩丹