论著

文章编号:1000-5404(2010)16-1758-04

microRNA-133b 抑制人结直肠癌裸鼠皮下种植瘤生长

胡 桂,陈道瑾,李小荣,杨开焰 (410013 长沙,中南大学湘雅三医院普外二科)

【摘要】 **目的** 探讨 microRNA-133b(miR-133b)对人结直肠癌裸鼠皮下种植瘤生长的抑制作用,体内实验进一步验证 miR-133b 是一种新的抑癌基因。**方法** 30 只裸鼠按随机数字表法分为接种人结直肠癌细胞 SW-620 细胞组、接种 SW-620-HK 细胞组及接种 SW-620-133b 细胞组,每组 10 只,建立裸鼠皮下种植瘤模型,记录并比较各组种植瘤生长情况,TUNEL 法检测种植瘤细胞凋亡,荧光实时定量 PCR 检测各组种植瘤中 miR-133b 表达,Western blot 检测 c-met 表达。**结果** 各组裸鼠皮下接种肿瘤细胞 5 d 后均成功致瘤,成瘤率 100%;SW-620-133b 组种植瘤生长速度显著低于 SW-620 与 SW-620-HK 组($P<0.05$);终点时间第 30 天时,SW-620 组裸鼠皮下种植瘤的体积为(3.56±0.79)cm^3,SW-620-HK 组为(3.24±0.68)cm^3,显著大于 SW-620-133b 组肿瘤体积(0.85±0.14)cm^3($P<0.05$);SW-620-133b 组种植瘤质量为(1.15±0.16)g,明显低于 SW-620 组(4.02±0.64)g 及 SW-620-HK 组(3.81±0.61)g($P<0.05$);SW-620-133b 组肿瘤细胞凋亡率(30.28±3.47)%显著高于对照组 SW-620-HK(7.26±0.84)% 及空白组 SW-620(7.96±0.92)%($P<0.05$);SW-620-133b 组种植瘤中 c-met 表达量(0.19±0.02)较 SW-620 组(0.52±0.04)及 SW-620-HK 组(0.51±0.04)显著下降($P<0.05$)。**结论** 外源性高表达 miR-133b 可显著抑制人结直肠癌裸鼠皮下种植瘤的生长。

【关键词】 结直肠肿瘤;微 RNAs;动物实验;c-met
【中图法分类号】 R735.35;R73-352;R73-362 【文献标志码】 A

microRNA-133b inhibits growth of subcutaneous implantation tumor of human colorectal cancer in nude mice

Hu Gui, Chen Daojin, Li Xiaorong, Yang Kaiyan (Second Department of General Surgery, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan Province, 410013, China)

【**Abstract**】 **Objective** To explore the inhibitive effects of microRNA-133b (miR-133b) on the growth of implanted subcutaneous tumors in human colorectal tumor-bearing nude mice, and to investigate whether miR-133b is a new tumor suppressor *in vivo*. **Methods** Thirty nude mice were randomized into 3 groups, SW-620 group, SW-620-HK group and SW-620-133b group. The animal model of subcutaneous implantation tumor in nude mice was established by corresponding injecting 5×10^6 SW-620 cells, SW-620-HK (transfected with nonsense sequence) and SW-620-133b (transfected with miR-133b) subcutaneously, and the model was established when the tumor was 3 to 4 mm in diameter. The tumor growth in each group was recorded and compared. The mice was killed in 30 d. The cell apoptosis of implantation tumor was tested by TUNEL assay. The expression of miR-133b and c-met in each group were examined by real-time PCR and Western blotting, respectively. **Results** The model animals of human colorectal tumor-bearing mice were successfully established, with a tumor-formation rate of 100%. The growth curves of planted tumor showed that the tumor growth rate of SW-620-133b group was much slower than those of SW-620 and SW-620-HK groups ($P<0.05$). At the end point time, the average tumor volume of SW-620-133b group was smaller than those of SW-620 and SW-620-HK groups [(0.85±0.14) cm^3 *vs* (3.56±0.79) cm^3 and (3.24±0.68) cm^3, $P<0.05$]. The average tumor weight of SW-620-133b group was lighter than those of SW-620 and SW-620-HK groups [(1.15±0.16) g *vs* (4.02±0.64) and (3.81±0.61) g, $P<0.05$]. The cell apoptosis of SW-620-133b group was significantly higher than those of SW-620 and SW-620-HK groups [(30.28±3.47)% *vs* (7.96±0.92)% and (7.26±0.84)%, $P<0.05$]. The expression of c-met in SW-620-133b group was significantly deceased compared with those of SW-620 and SW-620-HK groups [(0.19±0.02) *vs* (0.52±0.04) and (0.51±0.04), $P<0.05$]. **Conclusion** The ectopic expression of miR-133b can effectively inhibit the growth of tumor in hu-

【基金项目】 教育部博士培养基金(200805330040)
【通信作者】 陈道瑾,电话:(0731)88618032,E-mail:chendaojin0202@hotmail.com

man colorectal tumor-bearing nude mice.

[Key words] colorectal neoplasms; microRNAs; animal experimentation; c-met

Supported by the Doctoral Programs of Ministry of Education (200805330040). Corresponding author: Chen Daojin, Tel: 86-731-88618032, E-mail: chendaojin0202@hotmail.com

microRNA(miRNA)是一类内源性小分子非编码单链 RNA,长约 18~26 个核苷酸(nt),广泛存在于真核生物中,通过碱基配对的方式作用于相应靶 mRNA,导致靶 mRNA 降解或抑制转录后翻译,从而调节细胞增殖、分化与凋亡,参与个体发育、机体代谢以及肿瘤发生、发展等过程[1,2]。

Bandres 等[3]应用基因芯片证实:miR-133b 在结直肠癌组织中的表达显著低于正常组织并与结直肠癌的分化程度相关。本实验的前期研究亦发现 miR-133b 在多种结直肠癌细胞中的表达降低甚至缺失,将 miR-133b 转染人 SW-620 细胞后可抑制细胞的增殖[4]。但是,恶性肿瘤的生长是肿瘤细胞与细胞周围环境相互作用总效应的综合表现,体外细胞实验并不能完全代表肿瘤在活体内发生、发展的真实情况。为了验证 miR-133b 在活体内是否同样具有肿瘤抑制作用,本实验建立基于人结直肠癌细胞 SW-620 的裸鼠皮下种植瘤模型,评价 miR-133b 对结直肠癌生长的抑制作用及其可能的作用靶点,为其作为一种可能的结直肠癌治疗靶点提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 细胞株 人结直肠癌细胞 SW-620、LoVo 购自中南大学湘雅医学院细胞中心,常规于含 100 g/L 胎牛血清(FBS)的 RPMI1640 培养液中,37 ℃、50 ml/L CO_2 条件下培养。稳定转染并表达 miR-133b 及对照无意义序列的 SW-620 细胞株分别命名为 SW-620-133b 及 SW-620-HK,由本实验室建立并于含 400 μg/ml G418,100 g/L 胎牛血清的 RPMI1640 选择性培养液中保持筛选压力,培养条件为 37 ℃、50 ml/L CO_2。

1.1.2 实验动物 BALB/c 雌性裸鼠(SPF 级)共 30 只,体质量 15~20 g,5 周龄,购于中南大学湘雅医学院实验动物中心。裸小鼠皮肤红润,活动积极,生活状况良好。饲养环境为无特异致病原体(SPF)级,层流罩内饲养,无菌标准饲料及饮水,保持动物房温度在 23~25 ℃,湿度在 40%~60%。

1.1.3 试剂 RPMI1640 培养基、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶购自 GIBCO 公司,Trizol 购自 Invitrogen 公司,荧光定量 PCR 试剂盒购自 Ambion 公司,原位细胞凋亡检测试剂盒(TUNEL 法)购自 Promag 公司,兔抗人 c-met 一抗、辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗购自美国 Santa Cruz 公司,化学发光试剂购自法国 PIERCE 公司。

1.2 方法

1.2.1 人结直肠癌细胞裸鼠皮下种植瘤模型的建立及分组 将实验裸鼠按随机数字表法分为 3 组,每组 10 只,分别为接种 SW-620 细胞组、接种 SW-620-HK 细胞组、接种 SW-620-133b 细胞组。取各组对数生长期的人结肠癌细胞,胰酶消化后,PBS 液清洗 2 次,制成单细胞悬液,调整细胞浓度至 1×10^7/ml,每只裸鼠接种 0.2 ml 单细胞悬液(含细胞 5×10^6)于一侧腋下略往背部靠近的皮下(避免注射到皮内)。种植瘤长至直径 3~4 mm 时,即认为致瘤成功。

1.2.2 种植瘤的测量及获取 成瘤后每 5 天测 1 次各组裸鼠肿瘤的大小,用游标卡尺测量肿瘤最大长径(L)和最大横径(S),换算成肿瘤的体积(V):$V(cm^3)=0.5\times L\times S^2$。30 d 后,拉颈处死全部裸鼠,取肿瘤观察并测瘤质量,抑瘤率 =(对照组瘤质量 - 实验组瘤质量)/对照组瘤质量 ×100%,获取的肿瘤进行下一步实验。

1.2.3 TUNEL 法检测种植瘤细胞凋亡 取液氮罐中保存的肿瘤组织,常规制病理石蜡切片,按试剂盒说明的步骤进行染色。在高倍镜视野下随机选取 5 个视野进行阳性细胞计数,按公式计算凋亡指数(AI)。

1.2.4 荧光实时定量 PCR 检测 miR-133b 表达 miRNA 的 qRT-PCR 参照 Chen 等[5]的方法。对 miR-133b 设计 1 条带茎环结构的逆转录引物以及相应的 1 对 PCR 引物(序列见表 1);10 μl 逆转录体系中 M-MLV 逆转录酶 100 U、50 nmol/L 茎环结构的引物、总 RNA 50 ng;用相应的 PCR 引物在 PRISM 7000 型定量 PCR 仪(Applied Biosystems)进行 PCR 定量检测。PCR 条件为 94 ℃ 30 s,60 ℃ 60 s,进行 40 个循环;采用 U6 RNA 作为内标。样品目的基因的相对表达率(relative expression, RQ)采用 ΔΔCT 方法计算,RQ = 2ΔΔCT(CT 表示反应的实时荧光强度显著大于背景值时的循环数,$\Delta CT_{sample}=CT_{sample}-CTU6_{sample}$,$\Delta CT_{control}=CT_{control}-CTU6_{control}$,$\Delta\Delta CT=CT_{sample}-\Delta CT_{control}$),以 LoVo 细胞作为相对表达的标准。

表 1 qRT-PCR 检测 miR-133b 的引物序列

基因	引物	序列(5′→3′)
miR-133b (59 bp)	RT 引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTG-GATACGACTAGCTG
	PCR 引物	上游:CTTTGGTCCCCTTCAACCA
		下游:GTGCAGGGTCCGAGGT
U6 (94 bp)	PCR 引物	上游:CTCGCTTCGGCAGCACA
		下游:AACGCTTCACGAATTTGCGT

1.2.5 Western blot 检测 c-met 蛋白表达 提取组织总蛋白,测定蛋白含量。20 μg 蛋白在浓度为 10% 的聚丙烯酰胺凝胶中电泳(130 V,110 min),电泳完毕将蛋白转至聚乙烯二氟(PVDF)膜(300 mA,75 min),5% 脱脂奶粉室温阻断 2 h,1∶150 的 c-met 一抗 4 ℃孵育过夜,TBST 液洗 3 次,1∶3 000 辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h,最后使用化学发光试剂,室温反应 5 min,化学发光成像仪下拍照。

1.3 统计学分析

所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用随机区组设计资料的方差分析。统计均用 SPSS 12.0 软件完成。



A:SW-620 组;B:SW-620-HK 组;C:SW-620-133b 组

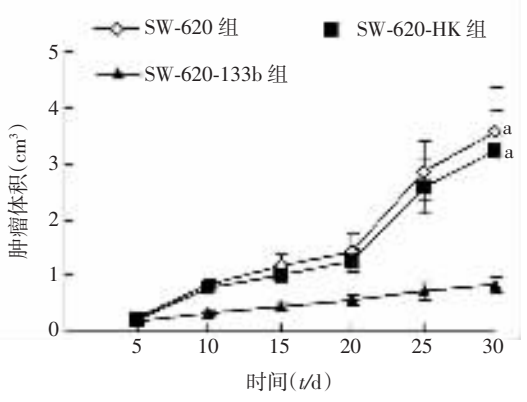
图1 人结直肠癌细胞裸鼠皮下种植瘤模型大体观察

2 结果

2.1 miR-133b 对裸鼠皮下种植瘤生长的影响

裸鼠皮下接种 SW-620、SW-620-HK 及 SW-620-133b 单细胞悬液后,全部存活并有肿瘤形成,致瘤成功率 100%。各组种植瘤持续生长,未出现致瘤裸鼠死亡,第 30 天时拍照记录并处死裸鼠获取肿瘤(图 1)。

绘制肿瘤生长曲线(图 2),SW-620-133b 组种植瘤生长速度显著低于 SW-620 与 SW-620-HK 组($P<0.05$),SW-620 与 SW-620-HK 组间无明显差异($P>0.05$);终点时间第 30 天时,SW-620 组和 SW-620-HK 组裸鼠皮下种植瘤的体积显著大于 SW-620-133b 组裸鼠皮下种植瘤的体积($P<0.05$)。



a:$P<0.05$,与 SW-620-133b 组比较

图2 各组裸鼠种植瘤生长曲线分析

2.2 miR-133b 对肿瘤质量的影响及抑瘤率

终点时间处死裸鼠获取各组肿瘤,称取肿瘤质量,SW-620-133b 组种植瘤质量为(1.15±0.16)g,明显低于 SW-620 组(4.02±0.64)g 及 SW-620-HK 组(3.81±0.61)g($P<0.05$),SW-620 与 SW-620-HK 组间肿瘤质量无明显差异($P>0.05$);与 SW-620 组比较,SW-620-HK 组及 SW-620-133b 组的抑瘤率分别为 71.0% 及 5.2%。

2.3 miR-133b 对种植瘤细胞凋亡的影响

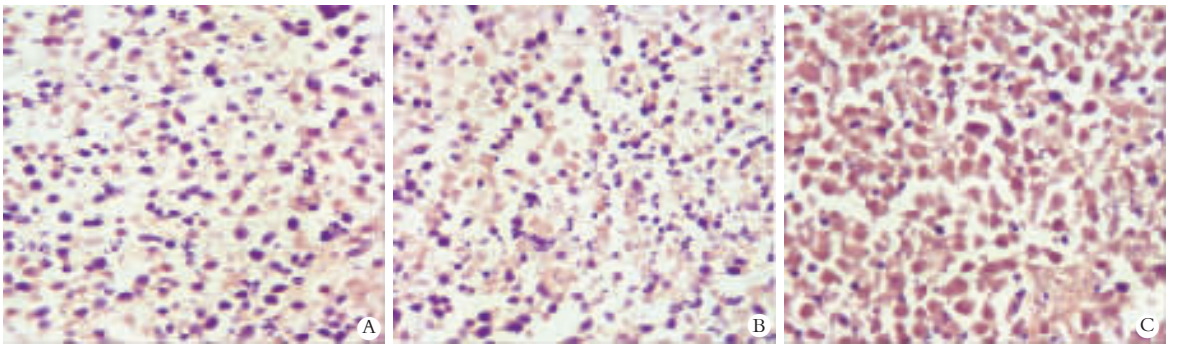
各组种植瘤细胞的凋亡情况如图 3 所示,高表达 miR-133b 的细胞 SW-620-133b 组 AI 值为(30.28±3.47)%,显著高于对照组 SW-620-HK(7.26±0.84)% 及空白组 SW-620(7.96±0.92)%($P<0.05$);SW-620-HK 组与 SW-620 组间 AI 值无明显差异($P>0.05$)。结果说明 miR-133b 在体内实验中可促进肿瘤细胞凋亡从而抑制肿瘤生长。

2.4 miR-133b 在各组种植瘤中的表达

获取肿瘤后,qRT-PCR 检测 miR-133b 在各组种植瘤中的相对表达量。由于 SW-620 及 SW-620-HK 中无法检测到 miR-133b 的表达,因此,我们选择 miR-133b 在 LoVo 细胞中的表达量作为相对定量的标准。SW-620-133b 组中 miR-133b 的表达显著升高,是 LoVo 细胞中 miR-133b 表达的 35.8 倍($P<0.05$)。

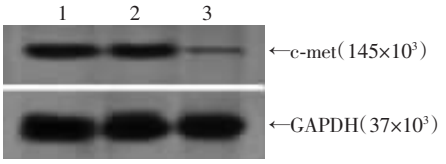
2.5 Western blot 检测 c-met 蛋白的表达

c-met 在各组种植瘤中的表达如图 4 所示,比较经 GAPDH 标准化后的各组 c-met 相对表达量,SW-620-133b 组种植瘤中 c-met 相对表达量(0.19±0.02)较 SW-620 组(0.52±0.04)及 SW-620-HK 组(0.51±0.04)显著下降($P<0.05$);SW-620 组及 SW-620-HK 组间 c-met 相对表达量无明显改变($P>0.05$)。



A:SW-620 组;B:SW-620-HK 组;C:SW-620-133b 组

图3 免疫组化染色观察 miR-133b 对各组种植瘤细胞凋亡的影响 (TUNEL ×400)



1：SW-620 组；2：SW-620-HK 组；3：SW-620-133b 组

图 4 Western blot 检测 c-met 在各组种植瘤中的表达

3 讨论

近年来，随着 microRNA 相关研究的不断深入，microRNA 在肿瘤中的突出作用日益受到人们的重视，在不同的肿瘤中检测特定的 miRNA 的表达变化很可能成为肿瘤诊断、分期和预后预测的有力工具[6]。miRNA 异常表达与肿瘤相关的观察结果几乎涉及了大部分常见恶性肿瘤，如慢性淋巴细胞性白血病中的 miR-15a 和 miR-16-1[7]；结直肠癌中的 miR-199a；乳头状甲状腺瘤、恶性胶质瘤中的 miR-221 及 miR-222[8]；睾丸生殖细胞瘤中的 miR-372 和 miR-373[9]；乳腺癌、肺癌中的 miR-21[10]；霍金森淋巴瘤、B 细胞型淋巴瘤中的 miR-155 等[11]。

miR-133b 是最近发现的一种在结直肠肿瘤中表达明显下调的 microRNA。Crawford 等[12]最近也报道了 miR-133b 在肺癌细胞中具有抑制肺癌细胞增殖及促进凋亡的作用。本课题前期的研究发现 miR-133b 在多种人结直肠癌细胞系中的表达下调，对结直肠癌细胞的生长具有明显的抑制作用[4]。为了验证 miR-133b 在体内复杂的环境中是否同样具有抑瘤作用并探讨其可能的作用机制，本实验构建了基于 SW-620 细胞的人结直肠癌裸鼠荷瘤模型，评估 miR-133b 在活体内的抑瘤效应。

通过观察并记录各组裸鼠种植瘤的生长情况，我们发现高表达 miR-133b 对裸鼠种植瘤的生长具有显著的抑制作用并可诱导肿瘤细胞凋亡。由于是建立于稳定转染细胞系基础上的种植瘤，因此可很好的排除其他混杂因素的影响，我们可将实验组肿瘤生长的抑制效应归因于实验组肿瘤细胞高表达 miR-133b，即 miR-133b 可有效抑制结直肠癌生长，且 miR-133b 的促凋亡作用是其抑瘤效应的重要机制之一。通过 microRNAs 靶点预测软件的分析，我们发现 c-met 原癌基因是 miR-133b 的重要靶点之一，c-met 在许多消化道肿瘤的发生发展中具有重要作用，体内外实验均证实有促进肿瘤生长及转移的作用[13-15]。本实验中 c-met 在高表达 miR-133b 的 SW-620-133b 组种植瘤中的表达明显降低，与 miR-133b 的抑癌效应是一致的，因此推测 c-met 可能是 miR-133b 有效作用靶点，但 miR-133b 是否直接作用于 c-met 的 3′非编码区而抑制其表达还有待进一步的研究证实。

本实验证实 miR-133b 在结直肠癌中确实是一种抑癌基因，其在体内实验中对结直肠癌生长的抑制作用是明确有效的，c-met 原癌基因可能是其有效靶点之一。但与其他 microRNA 类似，miR-133b 的抑癌效应是其作用于多个靶点综合效应的表现，miR-133b 通过调控哪些靶基因而表现出肿瘤抑制的生物学功能仍然是我们下一步的研究重点。相信随着对 miRNA 研究的进一步深入，将为结直肠癌的临床诊断及治疗提供新的策略和方案。

参考文献：

[1] Pillai R S. MicroRNA function：multiple mechanisms for a tiny RNA？[J]. RNA, 2005, 11(12)：1753-1761.

[2] 王涛，艾国平，邹仲敏，等. 微小 RNA 分子 miR-21 和 miR-22 对 C2C12 细胞成肌分化影响的研究[J]. 第三军医大学学报，2008，30(9)：803-806.

[3] Bandres E, Cubedo E, Agirre X, *et al*. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues[J]. Mol Cancer, 2006, 5：29.

[4] 胡桂，陈道瑾，李小荣，等. microRNA-133b 抑制人结直肠癌细胞迁移和侵袭的研究[J]. 中国普通外科杂志，2010，19(4)：359-362.

[5] Chen C, Ridzon D A, Broomer A J, *et al*. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR[J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(20)：e179.

[6] Croce C M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer[J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(10)：704-714.

[7] Calin G A, Cimmino A, Fabbri M, *et al*. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(13)：5166-5171.

[8] Sredni S T, Bonaldo-Mde F, Costa F F, *et al*. Upregulation of mir-221 and mir-222 in atypical teratoid/rhabdoid tumors：potential therapeutic targets[J]. Childs Nerv Syst, 2010, 26(3)：279-283.

[9] Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, *et al*. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis[J]. Nat Cell Biol, 2008, 10(2)：202-210.

[10] Mei M, Ren Y, Zhou X, *et al*. Downregulation of miR-21 enhances chemotherapeutic effect of taxol in breast carcinoma cells[J]. Technol Cancer Res Treat, 2010, 9(1)：77-86.

[11] Pedersen I M, Otero D, Kao E, *et al*. Onco-miR-155 targets SHIP1 to promote TNFalpha-dependent growth of B cell lymphomas[J]. EMBO Mol Med, 2009, 1(5)：288-295.

[12] Crawford M, Batte K, Yu L, *et al*. MicroRNA 133B targets pro-survival molecules MCL-1 and BCL2L2 in lung cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 388(3)：483-489.

[13] 谢斌，唐春，吴刚，等. c-Met、MMP-2、MMP-9 在肝细胞癌中的表达及临床意义[J]. 第三军医大学学报，2008，30(12)：1140-1143.

[14] De-Oliveira A T, Matos D, Logullo A F, *et al*. MET Is highly expressed in advanced stages of colorectal cancer and indicates worse prognosis and mortality[J]. Anticancer Res, 2009, 29(11)：4807-4811.

[15] Moore A E, Greenhough A, Roberts H R, *et al*. HGF/Met signalling promotes PGE(2) biogenesis *via* regulation of COX-2 and 15-PGDH expression in colorectal cancer cells[J]. Carcinogenesis, 2009, 30(10)：1796-1804.

（收稿 2010-03-04 修回 2010-04-06）
（编辑 王 红）