

刘友强,胡冀陶,李保坤,等. miR-424-5P 对结肠癌细胞增殖的影响及机制探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(9): 43-48.
Liu YQ, Hu JT, Li BK, et al. Effect of miR-424-5P on colon cancer cell proliferation and its mechanism of action [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(9): 43-48.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.09.008

miR-424-5P 对结肠癌细胞增殖的影响及机制探讨

刘友强¹, 胡冀陶¹, 李保坤¹, 席金川¹, 王贵英^{1,2*}

(1.河北医科大学第四医院外二科, 石家庄 050011; 2.河北医科大学第三医院, 石家庄 050051)

【摘要】 目的 观察 miR-424-5P 对结肠癌细胞增殖的影响,探讨 Src-YAP 信号通路在其中的作用。**方法** 以结肠癌 HT-29 细胞作为研究对象,转染法外源性上调 miR-424-5P 水平,设置空白组(Blank 组)、空载体组(NC 组)和过表达组(miR-424-5P-OV 组);RTFQ-PCR 检测 miR-424-5P 水平;MTT 法检测细胞活力;平板克隆实验检测细胞克隆形成能力;免疫荧光法检测 YAP 核质分布情况;Western blot 法检测 Src、YAP、LATS1 及各自磷酸化表达水平。**结果** 相较于 NC 组,miR-424-5P-OV 组 miR-424-5P RNA 水平明显上调($P<0.01$)。miR-424-5P 过表达明显降低 HT-29 细胞活力和克隆形成能力($P<0.01$)。Blank 组和 NC 组细胞 YAP 以核表达为主,细胞质分布较少,而 miR-424-5P-OV 组细胞 YAP 可见明显的细胞质和细胞核分布。miR-424-5P 过表达可显著上调 p-YAP 和 p-LATS1 蛋白表达水平($P<0.01$),下调 p-Src 蛋白表达水平($P<0.01$)。**结论** miR-424-5P 过表达可抑制结肠癌 HT-29 细胞增殖,该作用可能与 Src-YAP 通路信号减弱有关。

【关键词】 微小 RNA-424-5P;结肠癌;细胞;Src 激酶;Yes-相关蛋白
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 09-0043-06

Effect of miR-424-5P on colon cancer cell proliferation and its mechanism of action

LIU Youqiang¹, HU Jitao¹, LI Baokun¹, XI Jinchuan¹, WANG Guiying^{1,2*}

(1.Second Department of General Surgery,the Fourth Hospital of Hebei Medcial University, Shijiazhuang 050011, China.
2. the Third Hospital of Hebei Medcial University, Shijiazhuang 050051)

【Abstract】 Objective To observe the effect of miR-424-5P on Src-YAP signaling and the proliferation of colon cancer cells. **Methods** Colon cancer HT-29 cells were used. Exogenous up-regulation of miR-424-5P was achieved in HT-29 cells by transfection and a blank group (Blank group), an empty vector group (NC group) and an overexpression group (miR-424-5P-OV group) were prepared. RTFQ-PCR was used to detect the level of miR-424-5P. MTT assays were used to detect cell viability. The nuclear distribution of YAP was detected by immunofluorescence. Western blot was used to detect the levels of Src, YAP, LATS1 and their phosphorylation. **Results** Compared with the NC group, the miR-424-5P RNA level in the miR-424-5P-OV group was significantly increased ($P<0.01$). The overexpression of miR-424-5P significantly reduced the viability and colony-forming ability of HT-29 cells ($P<0.01$). In the blank and NC groups, YAP was mainly localized in the nucleus, with little cytoplasmic distribution, while in the miR-424-5P-OV group, YAP showed obvious

[基金项目] 2017 年河北省医学科学研究重点课题计划(20170165)。
[作者简介] 刘友强(1984—),男,主治医师,硕士,研究方向:结肠癌相关基础和临床研究。E-mail:2955446747lyq@sina.com
[通信作者] 王贵英(1969—),女,主任医师,博士生导师,普外科,研究方向:外科肿瘤基础和临床研究。E-mail:wangxincht@126.com

cytoplasmic and nuclear distribution. Overexpression of miR-424-5P significantly up-regulated p-YAP and p-LATS1 protein levels ($P < 0.01$) and down-regulated p-Src protein levels ($P < 0.01$). **Conclusions** Overexpression of miR-424-5P can inhibit the proliferation of colon cancer HT-29 cells, which may be related to weakened Src-YAP signaling.

[Keywords] microRNA-424-5P; colon cancer; cells; Src kinase; Yes-related protein

结肠癌(colon cancer)是常见的恶性肿瘤,发病率位居全球第三位^[1]。随着医疗卫生事业的发展,医疗水平取得了显著提升,但结肠癌患者仍然呈现较高复发率^[2-3]。因此,有效的治疗方法仍是临床迫切需求的。微小 RNA(miRNA)是长度为 20~25 个核苷酸的小型非编码 RNA,可通过转录后调控来调节下游靶标的表达^[4]。miR-424-5p 是 miRNA 中的一员,研究报道,miR-424-5p 通过靶向 ARK5 可抑制肝内胆管癌的转移和侵袭^[5]。一项关于肝癌转移的研究发现,miR-424-5p 异常表达与失巢凋亡和 EMT 密切相关,且其下调明显促进了肝癌的进展^[6]。还有研究显示,miR-424-5p 可以通过下调 BCL-2 的表达来抑制肺癌细胞 A549 增殖^[7]。这些提示,miR-424-5p 可能在肿瘤中负性调控细胞恶性生物学行为。但也有研究报道 miR-424-5p 可促进肿瘤细胞恶性生物学行为。一项喉鳞状细胞癌的研究发现,miR-424-5p 可通过介导 CADM1 促进细胞侵袭^[8]。而在结肠癌中,miR-424-5p 的生物学作用还不清楚,有待于进一步研究。本研究以结肠癌 HT-29 细胞作为研究对象,通过外源性上调 miR-424-5P 水平,观察细胞增殖能力变化,并对其机制进行探讨,为临床治疗结肠癌提供基础理论支持。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

人结肠癌 HT-29 细胞系购自中科院上海细胞库。

1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、RPMI1640 培养基、磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer solution, PBS)购自美国 Gibco 公司;细胞计数试剂盒 8(Cell Counting Kit-8, CCK-8)购自美国 MCE 公司;二甲基亚砜(DMSO)和 TRIzol 购自美国 Sigma 公司;YAP 抗体(货号 14074)、Phospho-YAP 抗体(货号 53749)、Src 抗体(货号 2109T)、Phospho-Src 抗体(货号 12432S)、LATS1 抗体(货号 3477T)、Phospho-LATS1 抗体(货号 8654S)购自美国 CST 公司;GAPDH 抗体(货号 abs830030)、抗兔 IgG-HRP 二抗(货号 Abs20040)购自上海爱必信公司;总蛋白提取

试剂盒、细胞裂解液、结晶紫染液购自上海碧云天公司;聚偏二氟乙烯膜(PVDF)膜购自美国 Millipore 公司;miR-424-5P 慢病毒表达载体转染试剂盒购自上海吉凯基因公司;逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)试剂盒和实时定量 PCR(Q-PCR)试剂盒购自美国 Promega 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

HT-29 细胞培养于含 10% FBS 和 1% 青-链霉素的 RPMI1640 培养基中,细胞置于 37℃、5% CO₂、95% 空气的培养箱中。

1.3.2 慢病毒转染法上调 miR-424-5P 水平

以每孔 5×10^5 个细胞接种 HT-29 细胞于 6 孔板中。次日进行转染。转染前稀释病毒液,准备两管含 10 μg/mL 聚凝胺的 RPMI1640 培养基各 1 mL,分别加入 100 μL 重组 miR-424-5P 基因慢病毒原液和空载病毒原液,混匀。以上述混合液分别处理细胞,前者设为过表达组(miR-424-5P-OV 组),后者设为空载体组(NC 组),同时以等量培养处理的细胞作为空白组(Blank 组),放置在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中过夜培养,24 h 后更换新鲜的 RPMI1640 培养基,48 h 后传代至培养皿中继续培养,嘌呤霉素筛选稳定过表达 miR-424-5P 的细胞株。

1.3.3 MTT 法检细胞活力

将各组细胞按每孔 9000 个接种于 96 孔板中,每组 6 个重复孔,72 h 后每孔直接加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL),放入细胞培养箱继续避光培养 4 h,弃上清,每孔加二甲基亚砜(DMSO)150 μL,于酶标仪上测定各孔 490 nm 的吸光度值。

1.3.4 实时荧光定量聚合酶链反应(RTFQ-PCR)检测 miR-424-5P 水平

当细胞生长至对数期时收集各组细胞,采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,并将总 RNA 逆转录为 cDNA,稀释反转录好的 cDNA 至 500 μL,充分混匀备用。取出配制好的各引物,并按上游引物与下游引物 1:1 稀释,按 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒添加各试剂以准备反应体系,在 ABI 7300 型 RTFQ-PCR 系统中进行扩增,设置反应条件:

95℃ 10 s, 95℃ 10 s, 60℃ 60 s, 共 40 个循环, 每组设置 6 个重复孔。2^{-△△Ct}法计算 miR-424-5P 的相对表达水平。

1.3.5 平板克隆实验检测各组细胞克隆形成能力

待各组细胞生长至对数期时消化细胞并制备细胞悬液, 以每孔 500 个细胞接种于 6 孔板中, 置于培养箱培养 18 d, 吸出旧培养基, 以固定液(4%多聚甲醛)固定 10 min, PBS 洗两遍, 加入结晶紫染液染色 15 min, 双蒸水洗去染液。于倒置显微镜下拍照计数, 克隆形成率(%) = 克隆数/接种细胞数 × 100%。

1.3.6 免疫荧光检测各组细胞 YAP 核质分布情况

各组细胞传代于放好爬片的 6 孔培养板中, 24 h 时以固定液(4%多聚甲醛)固定 15 min, 室温条件下以 Triton X-100 处理 10 min。同时配制 5%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)的 PBS 封闭液, 封闭细胞 2 h, 于 4℃ 条件下孵育 YAP 一抗(1:500)过夜, PBST 洗 3 次, 滴加稀释好的荧光二抗(1:300)避光孵育 1 h, PBS 洗 3 遍, DAPI 染色 5 min, 洗去后封片, 倒置荧光显微镜观察并拍照。

1.3.7 Western blot 法检测各蛋白表达

配制 RIPA 细胞裂解液(使用前 RIPA, 蛋白抑制剂, 磷酸酶抑制剂, 多种蛋白酶抑制剂按照 100:1:1:1 混合)并置于冰上备用, 将各组细胞传代至 6 cm 培养皿, 生长至对数期时取出细胞, PBS 洗两遍, 各加入 150 μL RIPA 裂解液, 冰上孵育 20 min, 用细胞刮刀刮下各组细胞并转移至 1.5 mL EP 管中, 4℃、12000 r/min 离心 20 min, 吸取上清液至 0.5 mL EP 管中, 冰上备用, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 按需求加入蛋白上样缓冲液(loading buffer)和双蒸水以配制蛋白上样样品。电泳: 10% SDS-PAGE 凝胶电泳进行蛋白分离, 每孔蛋白上样量为 30 μg。转膜: 将凝胶上的分离蛋白通过转膜仪转印至 PVDF 膜上。室温条件下, 以 5%脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 2 h, 按抗体要求加入 Src(1:1000)、p-Src(1:1000)、LATS1(1:5000)、p-LATS1(1:1000)、YAP(1:1000)、p-YAP(1:1000)、GAPDH(1:2000) 4℃ 避光孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 每次 20 min, 加入抗兔 IgG-HRP 二抗(1:3000), 室温避光孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 20 min。通过 ECL 化学发光试剂盒显色, 凝胶成像仪进行成像并读取灰度值, 以 GAPDH 灰度值进行归一化处理并计算相对蛋白表达量。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 和 Graphpad 6.0 统计软件对实验结果进行分析处理。数据以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 所有数据以正态性检验发现均为正态分布, 组内两样本数据采用 *t* 检验, 多样本采用单因素方差分析, 后以 LSD-*t* 检验进行事后检验。*P* < 0.05 为数据差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞 miR-424-5P 表达水平

各组细胞生长至对数期后, RTFQ-PCR 检测 miR-424-5P 水平, 结果显示, Blank 组、NC 组及 miR-424-5P-OV 组细胞相对 miR-424-5P RNA 水平分别为(8.60 ± 0.71)、(9.30 ± 0.72)和(53.22 ± 4.33), 组间总体比较存在显著性差异(*P* < 0.01, *F* = 301.10), 事后两两比较发现, 相较于 NC 组, miR-424-5P-OV 组 miR-424-5P RNA 水平明显上调(*P* < 0.01, 图 1)。

2.2 各组细胞活力比较

MTT 结果显示, Blank 组和 NC 组细胞活力曲线相类似, 而 miR-424-5P-OV 组细胞活力曲线较为平缓。在 72 h 时, Blank 组、NC 组及 miR-424-5P-OV 组细胞活力分别为(306.55 ± 8.20)、(310.89 ± 8.20)和(188.26 ± 3.10), 组间总体比较存在显著性差异(*P* < 0.01, *F* = 288.78), 事后两两比较发现, 与 NC 组相比, miR-424-5P-OV 组细胞活力明显减弱(*P* < 0.01, 图 2)。

2.3 各组细胞克隆形成能力比较

采用平板克隆实验检测各组细胞克隆形成能力, 结果显示, Blank 组、NC 组及 miR-424-5P-OV 组细胞克隆形成率分别为 100%、(106.25 ± 8.20)和(43.26 ± 3.10), 组间总体比较存在显著性差异(*P* < 0.01, *F* = 140.70), 事后两两比较发现, 相较于 NC 组, miR-424-5P-OV 组克隆形成能力明显减弱(*P* < 0.01, 图 3)。

2.4 各组细胞 YAP 核质分布情况

免疫荧光实验观察各组细胞 YAP 细胞核和细胞质分布情况, 结果显示, Blank 组和 NC 组细胞 YAP 以核表达为主, 细胞质分布较少。miR-424-5P-OV 组细胞 YAP 可见明显的细胞质和细胞核分布, 见图 4。

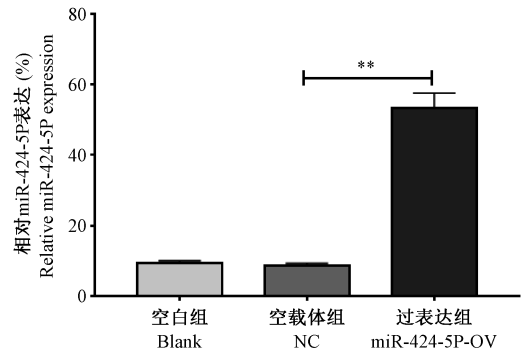
2.5 各组细胞 Src、YAP、LATS1 及磷酸化表达差异

Western blot 法检测各组细胞 Src、p-Src、YAP、

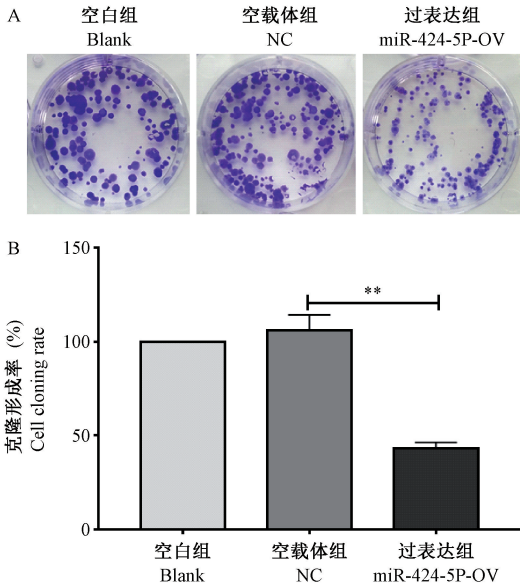
p-YAP、LATS1、p- LATS1 蛋白表达,结果显示,各组细胞 Src、YAP、LATS1 蛋白表达无明显变化,Blank 组、NC 组及 miR-424-5P-OV 组 p-Src 蛋白表达水平分别为 100%、(98.60±8.30)%和(23.25±2.03)%,组间总体比较存在显著性差异($P<0.01$, $F=238.40$),事后两两比较发现,相较于 NC 组,miR-424-5P-OV 组 p-Src 蛋白表达明显下调($P<0.01$);p-YAP 蛋白表达水平分别为 (56.36±5.00)%、(58.92±4.63)%和(179.55±12.50)%,组间总体比较存在显著性差异($P<0.01$, $F=220.30$),事后两两比较发现,相较于 NC 组,miR-424-5P-OV 组 p-YAP 蛋白表达明显上调($P<0.01$);p-LATS1 蛋白表达水平分别为 (12.30±1.15)%、(13.58±1.20)%和 (123.75±9.26)%,组间总体比较存在显著性差异($P<0.01$, $F=420.40$),事后两两比较发现,相较于 NC 组,miR-424-5P-OV 组 p- LATS1 蛋白表达明显上调($P<0.01$,图 5)

3 讨论

miR-424-5P 作为 miRNA 家族的一员,已证明在乳腺癌、卵巢癌、肝癌、胰腺癌及肺癌等恶性肿瘤中发挥重要作用^[9-10]。但 miR-424-5P 在结肠癌中的生物学功能还不清楚。本研究通过过表达结肠癌 HT-29 细胞 miR-424-5P 表达水平,发现细胞活力和克隆形成能力均明显降低。克隆形成能力可反应细胞群体依赖性和增殖能力变化。因此提示,miR-424-5P 可抑制 HT-29 细胞增殖。为了观察

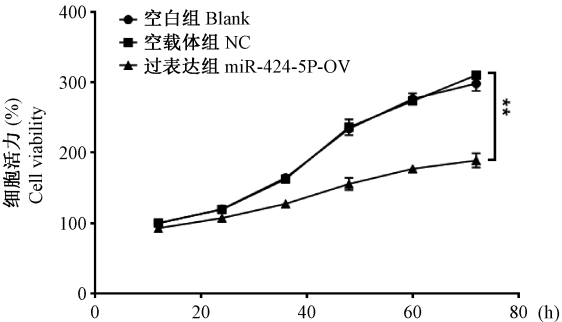


注:与空载体组相比, ** $P<0.01$ 。
图 1 各组细胞 miR-424-5P 表达水平
Note. Compared with NC group, ** $P<0.01$.



注:与空载体组相比, ** $P<0.01$ 。
图 3 各组细胞克隆形成能力
Note. Compared with NC group, ** $P<0.01$.
Figure 3 Cell cloning ability of each group

Figure 1 miR-424-5P expression levels in each group



注:与空载体组相比, ** $P<0.01$ 。
图 2 各组细胞活力比较
Note. Compared with NC group, ** $P<0.01$.

Figure 2 Comparison of cell viability in each group

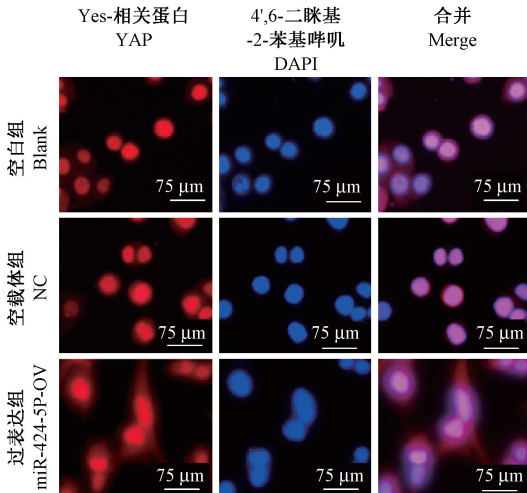
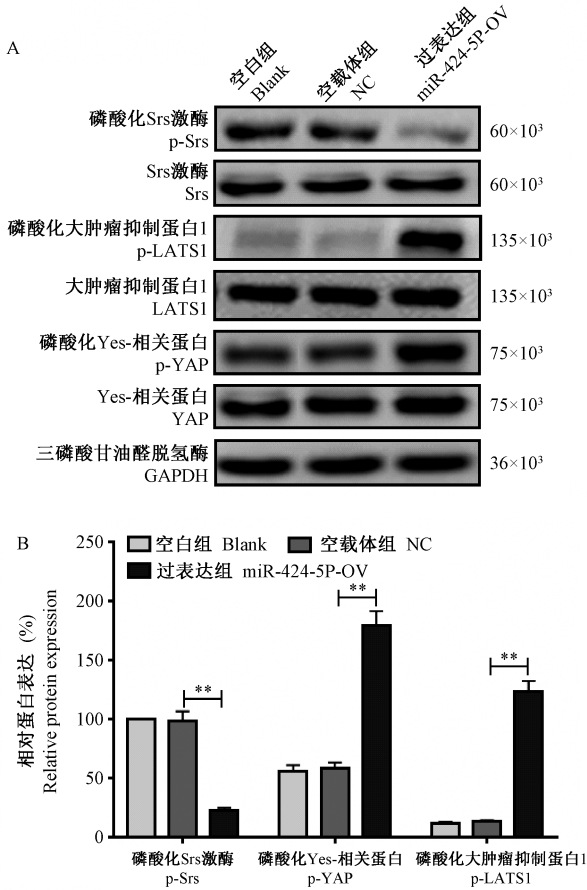


图 4 各组细胞 YAP 核质分布情况
Figure 4 Distribution of YAP nucleus in each group



注:与空载体组相比, ** $P<0.01$ 。

图 5 各组细胞 Src、YAP、LATS1 及磷酸化表达差异

Note. Compared with NC group, ** $P<0.01$.

Figure 5 Different expressions of Src, YAP, LATS1 and their phosphorylation in each group of cells

miR-424-5P 抑制 HT-29 细胞增殖的信号机制,本研究在分子水平上进行了研究。免疫荧光结果显示,miR-424-5P 过表达可增加 YAP 的细胞质分布。观察 YAP 相关蛋白表达发现,YAP 及其上游信号蛋白 LATS1 的磷酸化水平均显著升高。一般来说,YAP 磷酸化时定位于细胞质,而去磷酸化后进入细胞核直接参与靶基因的转录,从而促进细胞增殖^[11-13],提示本研究 miR-424-5P 对细胞增殖的抑制效应可能与 LATS1-YAP 磷酸化激活有关。

Src 作为一种癌基因,已发现与多种肿瘤发生发展密切相关,可介导肿瘤细胞的黏附、迁移和侵袭等恶性生物学行为。同时,研究还发现,Src 在恶性肿瘤细胞增殖中也发挥关键介导作用^[14-15]。最近的研究报道,Src 参与调节 YAP 的磷酸化水平,抑制 Src 可促进 YAP 的磷酸化^[16-17]。基于上述报道,本研究对 Src 进行了观察。结果发现,miR-424-5P 过表达后 TH-29 细胞 Src 磷酸化水平显著降低。

提示,miR-424-5P 可能通过抑制 Src,从而诱导 LATS1 磷酸化,进而磷酸化 YAP。但 miR-424-5P 对 Src 的调控机制还不清楚,有待于进一步研究。

当前,虽然 miRNA 仍然是研究热点,但仍有一部分 miRNA 的生物学功能待于研究。本研究发现 miR-424-5P 过表达可抑制结肠癌 HT-29 细胞增殖,而该作用可能抑制 Src 磷酸化,进而磷酸化 YAP 并使后者入核减少有关。这为揭示 miR-424-5P 在结肠癌细胞中的生物学功能提供了基础理论支持。但肿瘤具有异质性,miRNA 在不同肿瘤细胞中的功能也不完全一致,这给 miRNA 的研究增加了严峻的挑战。因此,对于 miRNA 与肿瘤的关系还需要更多研究进行探讨。

参考文献:

[1] Klein A, Tate DJ, Jayasekeran V, et al. Thermal ablation of mucosal defect margins reduces adenoma recurrence after colonic endoscopic mucosal resection [J]. Gastroenterology, 2019, 156

- (3): 604–613.
- [2] Guraya SY. Pattern, stage, and time of recurrent colorectal cancer after curative surgery [J]. Clin Colorectal Cancer, 2019, 18(2): e223–e228.
- [3] Stower H. Predicting colon cancer recurrence [J]. Nat Med, 2018, 24(7): 898.
- [4] Wang R, Sun Y, Yu W, et al. Downregulation of miRNA-214 in cancer-associated fibroblasts contributes to migration and invasion of gastric cancer cells through targeting FGF9 and inducing EMT [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 20.
- [5] Wu J, Yang B, Zhang Y, et al. miR-424-5p represses the metastasis and invasion of intrahepatic cholangiocarcinoma by targeting ARK5 [J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(8): 1591–1599.
- [6] Zhang Y, Li T, Guo P, et al. miR-424-5p reversed epithelial-mesenchymal transition of anchorage-independent HCC cells by directly targeting ICAT and suppressed HCC progression [J]. Sci Rep, 2014, 4: 6248.
- [7] 严贝芬, 郑月茂, 吴海波. miR-424-5p 通过下调 BCL-2 的表达抑制人肺癌 A549 细胞增殖 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2017, 33(2): 176–183.
- [8] Li Y, Liu J, Hu W, et al. miR-424-5p promotes proliferation, migration and invasion of laryngeal squamous cell carcinoma [J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 10441–10453.
- [9] Bai X, Lu D, Lin Y, et al. A seven-miRNA expression-based prognostic signature and its corresponding potential competing endogenous RNA network in early pancreatic cancer [J]. Exp Ther Med, 2019, 18(3): 1601–1608.
- [10] Li Y, Zhao L, Zhao P, et al. Long non-coding RNA LINC00641 suppresses non-small-cell lung cancer by sponging miR-424-5p to upregulate PLSCR4 [J]. Cancer Biomark, 2019, 26(1): 79–91.
- [11] Chen W, Wang H, Liu Y, et al. Linc-RoR promotes proliferation, migration, and invasion via the Hippo/YAP pathway in pancreatic cancer cells [J]. J Cell Biochem, 2020, 121(1): 632–641.
- [12] Cai D, Feliciano D, Dong P, et al. Phase separation of YAP reorganizes genome topology for long-term YAP target gene expression [J]. Nat Cell Biol, 2019, 21(12): 1578–1589.
- [13] Chen W, Bai Y, Patel C, et al. Autophagy promotes triple negative breast cancer metastasis via YAP nuclear localization [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 520(2): 263–268.
- [14] Ma X, Qiu Y, Zhu L, et al. NOD1 inhibits proliferation and enhances response to chemotherapy via suppressing SRC-MAPK pathway in hepatocellular carcinoma [J]. J Mol Med (Berl), 2020, 98(2): 221–232.
- [15] Ha YNE, Dai Y, Wufuer D, et al. Second-generation Src/Abl inhibitor bosutinib effectively induces apoptosis in human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells via inhibiting Src/Abl signaling [J]. Neoplasia, 2020, 67(1): 54–60.
- [16] Sun J, Wang X, Tang B, et al. A tightly controlled Src-YAP signaling axis determines therapeutic response to dasatinib in renal cell carcinoma [J]. Theranostics, 2018, 8(12): 3256–3267.
- [17] Taniguchi K, Wu LW, Grivennikov SI, et al. A gp130-Src-YAP module links inflammation to epithelial regeneration [J]. Nature, 2015, 519(7541): 57–62.

[收稿日期] 2020-03-12