

miR-139-5p 在结肠炎相关肿瘤中的作用机制

刘洁琼, 李科, 曹永清

长沙市第一医院血液肿瘤科, 湖南长沙 410005

摘要: **目的** 探讨微小核糖核酸(microRNA, miR)-139-5p 在结肠炎相关肿瘤(CAC)中的作用机制。**方法** 选取 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 24 只, 随机分为 miR-139-5p 敲除型组(miR-139-5p 基因敲除小鼠)和对照组(miR-139-5p 基因野生型小鼠), 各 12 只, 建立 CAC 动物模型。观察两组结肠肿瘤生长情况, 实时荧光定量 PCR 检测增殖细胞核抗原(PCNA)以及促炎因子 mRNA 相对表达量。**结果** miR-139-5p 敲除型组小鼠肿瘤数为(12.56 ± 3.61)个, 明显多于对照组(5.22 ± 1.30)个($P < 0.01$); miR-139-5p 敲除型组小鼠肿瘤直径为(3.51 ± 0.82)mm, 明显大于对照组的(2.03 ± 0.96)mm($P < 0.01$); miR-139-5p 敲除型组小鼠 PCNA mRNA 相对表达量为 2.71 ± 0.78, 明显高于对照组的 1.06 ± 0.34($P < 0.01$); miR-139-5p 敲除型组小鼠白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、环氧合酶 2(COX2)和巨噬细胞炎性蛋白(MIP2)的 mRNA 相对表达量分别为 1.65 ± 0.71、2.13 ± 0.84、6.56 ± 1.24 和 7.06 ± 1.16, 明显高于对照组的 0.93 ± 0.43、1.08 ± 0.75、1.22 ± 0.43、1.20 ± 0.57($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** miR-139-5p 在 CAC 的发生过程中具有重要意义, 具有抑制炎症因子表达、阻止肿瘤细胞过度增殖等作用。

关键词: 结肠炎相关肿瘤; 微小核糖核酸-139-5p; 基因敲除; 增殖细胞核抗原; 炎症因子; 实时荧光定量聚合酶链反应

中图分类号: R 735.3⁺5 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2016)12-1618-03

Effect and mechanism of miR-139-5p in colitis associated cancer

LIU Jie-qiong, LI Ke, Cao Yong-qing

Department of Hematology and Oncology, the First Hospital of Changsha, Changsha, Hunan 410005, China

Abstract: Objective To investigate the effect of miR-139-5p in colitis associated cancer (CAC) and its mechanism. **Methods** Twenty-four SPF grade C57BL/6 male were selected, and 12 miR-139-5 p knockout mice of them were served as miR-139-5 p knockout group, while 12 wild type mice of them were served as control group. CAC animal models were established by the method of intraperitoneal injection of azoxymethane (AOM) and alternative drinking dextran sulfate-sodium (DSS) water and normal drinking water. The mice were killed after four weeks. The growth situation of colon tumor was observed, and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the relative expression levels of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) mRNA and proinflammatory factors mRNAs. **Results** The number of tumor in miR-139-5 p knockout group was more than that in control group [(12.56 ± 3.61) vs (5.22 ± 1.30), $P < 0.01$]. The diameter of tumor in miR-139-5 p knockout group was greater than that in control group [3.51 ± 0.82)mm vs (2.03 ± 0.96)mm, $P < 0.01$]. Compared with control group, the relative expression quantity of PCNA mRNA in miR-139-5 p knockout group was higher than that in control group [(2.71 ± 0.78) vs (1.06 ± 0.34), $P < 0.05$]. The relative expression quantities of interleukine-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), cyclooxygenase-2 (COX2) and macrophage inflammatory protein-2 (MIP2) mRNAs in miR-139-5 p knockout group were higher than those in control group [(1.65 ± 0.71), (2.13 ± 0.84), (6.56 ± 1.24), (7.06 ± 1.16) vs (0.93 ± 0.43), (1.08 ± 0.75), (1.22 ± 0.43), (1.20 ± 0.57), $P < 0.05$, $P < 0.01$]. **Conclusion** miR-139-5p plays an important role in the process of CAC occurrence, and it has the effects inhibiting expressions of inflammatory factors and preventing excessive proliferation of tumor cells.

Key words: Colitis associated cancer; miR-139-5p; Gene knockout; Proliferating cell nuclear antigen; Inflammatory factor; Quantitative real-time polymerase chain reaction

结直肠癌是一种较为常见的消化道恶性肿瘤, 其发病率和病死率均较高, 严重影响患者的生活质

量^[1]。结直肠癌的发生与环境因素、特殊的肠道共生菌和病原体以及慢性肠道炎症有关, 尤其是溃疡性结肠炎和克罗恩病等炎性肠病诱导的结肠肿瘤为广大医师所关注, 临床上也多将这种由结肠炎反复发作诱导发生并不断发展进化的结直肠癌称为结肠炎相

关肿瘤(CAC)^[2]。目前临床上治疗CAC的主要方式是手术、化疗、放疗等,其虽能取得一定的效果,但术后转移率和复发率均较高,而寻找更好的生物靶向指标以进行早期诊断和治疗对于CAC患者的预后具有重要的意义^[3]。研究表明,微小核糖核酸(miRNA, miR)-139-5p在结直肠癌的发生和发展过程中发挥着重要的作用^[4],其在结直肠癌组织中的表达较邻近正常组织明显降低,但其作用机制目前尚不清楚。为了进一步探讨miR-139-5p在CAC中的作用机制,本研究对miR-139-5p基因敲除小鼠和miR-139-5p基因野生型小鼠分别建立CAC动物模型,并观察比较两组小鼠的结肠肿瘤生长情况和增殖细胞核抗原(PCNA)以及促炎因子水平。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物 选取 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 24 只, 周龄 8~10 周, 体重 18~25 g, 均购自中国科学院上海实验动物中心。其中, 12 只为 miR-139-5p 基因敲除小鼠, 12 只为 miR-139-5p 基因野生型小鼠。

1.2 试剂与仪器 氧化偶氮甲烷(AOM)和葡聚糖硫酸钠盐(DSS)均购自 Sigma 公司; 免疫组化染色试剂盒和 DAB 试剂盒均购自北京中金杉公司; Trizol 试剂盒、DRR036A 逆转录试剂盒和 PCR 定量试剂盒均购自美国 Takara 公司。L-25 型显微镜, 日本奥林巴斯公司; FS-7900 型荧光定量 PCR 仪, 美国应用生物系统公司。

1.3 CAC 动物模型建立及评价 两组小鼠进行正常饲养后于实验的第 1 天进行 AOM(8.5 mg/kg) 腹腔注射, 1 周后给予 2% DSS 饮水服用, 连续 6 d 后再换成正常饮用水, 2 周后再重复 2% DSS 饮水, 连续 6 d 后再换成正常饮用水, 如此循环 3 次, 恢复 4 周后处死小鼠。记录整个实验过程中所有小鼠的体重变化、排便性状和便血情况, 并按相应标准进行评分。评分标准如下, 粪便性状: 0 分为正常; 1 分为粪便成形略软; 2 分为粪便非常软; 3 分为腹泻; 4 分为痢疾样便; 便血程度: 0 分为便潜血阴性; 1 分为便潜血阳性; 2 分为便中有可见血; 3 分为可见直肠出血。

1.4 免疫组织化学检测 将小鼠处死后取结肠组织置于福尔马林溶液中固定, 作 4 mm 左右的蜡状切片后采用免疫组织化学染色 SP 法进行染色, DAB 显色后显微镜下观察结果。具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测 采用 Trizol 试剂盒提取结肠组织内 RNA, 利用 DRR036A 逆转录试剂盒进行 RNA 逆转录后采用荧光定量 PCR 仪和 PCR 检测

试剂盒进行 PCNA 及促炎因子[环氧合酶 2(COX2)和巨噬细胞炎性蛋白 2(MIP2)] mRNA 相对表达量的检测, 具体检测步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.6 统计学处理 数据处理分析采用 SPSS 19.0 软件。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较使用独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组小鼠结肠肿瘤形成数目、大小比较 miR-139-5p 敲除型组小鼠肿瘤数为 (12.56 ± 3.61) 个, 明显多于对照组 ($P < 0.01$); miR-139-5p 敲除型组小鼠肿瘤直径为 (3.51 ± 0.82) mm, 明显大于对照组 ($P < 0.01$)。见表 1。

2.2 两组 PCNA 的表达情况 miR-139-5p 敲除型组小鼠 PCNA mRNA 相对表达量为 2.71 ± 0.78 , 明显高于对照组的 1.06 ± 0.34 ($t = 6.717, P < 0.01$)。免疫组化染色显示 PCNA 定位于细胞核内, 呈棕黄色或棕褐色颗粒, miR-139-5p 敲除型细胞核 PCNA 染色明显强于对照组。见图 1。

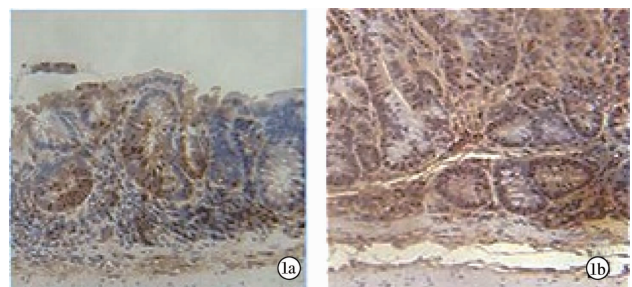
2.3 两组肿瘤组织中促炎因子的 mRNA 相对表达量比较 miR-139-5p 敲除型组小鼠 IL-6、TNF- α 、COX2、MIP2 的 mRNA 相对表达量分别为 1.65 ± 0.71 、 2.13 ± 0.84 、 6.56 ± 1.24 和 7.06 ± 1.16 , 明显高于对照组 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

表 1 两组小鼠结肠肿瘤形成数目、大小比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 只数 | 肿瘤数(个) | 肿瘤直径(mm) |
|----------------|----|------------------|-----------------|
| miR-139-5p 敲除组 | 12 | 12.56 ± 3.61 | 3.51 ± 0.82 |
| 对照组 | 12 | 5.22 ± 1.30 | 2.03 ± 0.96 |
| <i>t</i> 值 | | 6.627 | 4.061 |
| <i>P</i> 值 | | <0.01 | <0.01 |

表 2 两组肿瘤组织中促炎因子的 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 只数 | IL-6 | TNF- α | COX2 | MIP2 |
|----------------|----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| miR-139-5p 敲除组 | 12 | 1.65 ± 0.71 | 2.13 ± 0.84 | 6.56 ± 1.24 | 7.06 ± 1.16 |
| 对照组 | 12 | 0.93 ± 0.43 | 1.08 ± 0.75 | 1.22 ± 0.43 | 1.20 ± 0.57 |
| <i>t</i> 值 | | 3.005 | 3.230 | 14.095 | 15.706 |
| <i>P</i> 值 | | <0.05 | <0.05 | <0.01 | <0.01 |



注: 1a: 对照组; 1b: miR-139-5p 敲除组。

图 1 PCNA 免疫组化染色 ($\times 400$)

3 讨论

结直肠癌发病率和病死率均较高,仅次于胃癌、食管癌和原发性肝癌,且多发于一些中老年患者^[5-6]。结直肠癌患者的早期症状并不明显,但随着癌肿的增大会逐渐出现排便习惯改变、便血、腹泻、腹痛与便秘交替、局部腹痛等症状,晚期则表现贫血、体重减轻等全身症状,严重影响患者的生活质量,甚至导致死亡^[7-8]。其发病原因多认为与炎症诱导有关,而由炎症性肠病反复发作导致的结直肠癌又被称为 CAC^[9]。已有研究表明,炎症性肠病患者结直肠癌的发生风险较正常人群明显偏高^[10],且随着患病时间的增加而递增,约有 20% 结肠炎长期病史患者最终可进展为结直肠癌,其中约一半患者死于结直肠癌的各种并发症。

采用手术和化疗、放疗的方式治疗 CAC,虽然能取得一定效果,但患者的病死率仍然很高^[11]。miRNA 是一类重要的内源性单链非编码小 RNA 分子,可调控细胞的发育、增殖、分化、代谢、凋亡和应激等过程,其表达水平在多种肿瘤中发生改变,并参与原癌基因或抑癌基因的作用^[12-13]。有研究表明,miRNA 与结肠癌的发生、发展、转移和预后有着密切的联系^[14],但其机制目前尚不清楚,且不同的 miRNA 其作用也不相同。miR-139-5p 可明显抑制癌细胞的侵袭和转移,但却不具有明显的细胞调控功能,其在结肠癌等多种癌组织中的表达均明显降低,但能否将其作为结直肠癌的判断指标和治疗靶点仍需作进一步研究^[15]。

本研究分别选取 miR-139-5p 基因敲除小鼠和 miR-139-5p 基因野生型小鼠,利用 AOM 和 DSS 建立 CAC 动物模型,对比分析两组结肠肿瘤生长情况和 PCNA 以及促炎因子水平的差异。研究结果表明,miR-139-5p 敲除型组小鼠平均肿瘤数明显多于对照组,提示 miR-139-5p 与结肠癌发生有着密切关系,其能抑制癌细胞的生长并促进其凋亡,进而抑制肿瘤的发生。进一步观察发现,miR-139-5p 敲除型组小鼠 PCNA mRNA 相对表达量明显高于对照组,免疫组化染色也显示 miR-139-5p 敲除型小鼠细胞核 PCNA 染色明显强于对照组,提示 miR-139-5p 能进一步抑制 PCNA 的表达,进而抑制肿瘤的发生。同时发现,miR-139-5p 敲除型组小鼠 IL-6、TNF- α 、COX2 和 MIP2 的 mRNA 相对表达量明显高于对照组,提示

miR-139-5p 能明显抑制 IL-6、TNF- α 、COX2 和 MIP2 等促炎因子的表达,进而抑制炎症的发生和发展,最终降低 CAC 的发生率。

综上所述,miR-139-5p 在 CAC 的发生过程中具有重要意义,其具有抑制炎症因子表达、阻止肿瘤细胞过度增殖等作用。限于本研究样本的不足,对于 miR-139-5p 抑制促炎因子表达的机制及能否将 miR-139-5p 作为治疗 CAC 患者的靶点仍需作进一步深入研究。

参考文献

- [1] 张发恩. 三维适形放疗联合 FOLFOX 治疗直肠癌的临床效果观察[J]. 现代仪器与医疗, 2015, 21(1): 33-35.
- [2] 李伟伟, 韩文晓, 赵新华, 等. 微小 RNA-155 在结肠炎相关结肠癌发生过程中的表达变化[J]. 中华肿瘤杂志, 2014, 36(4): 257.
- [3] León-Cabrera S, Callejas BE, Ledesma-Soto Y. Extraintestinal helminth infection reduces the development of colitis-associated tumorigenesis[J]. Int J Biol Sci, 2014, 10(9): 948-956.
- [4] 王静. TLI 在结肠炎相关结直肠癌动物模型中作用的初步探讨[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015, 3(6): 15-16.
- [5] Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer[J]. Lancet, 2014, 383(9927): 1490-1502.
- [6] Di Franco S, Todaro M, Dieli F, et al. Colorectal cancer defeating? Challenge accepted! [J]. Mol Aspects Med, 2014, 39(6): 61-81.
- [7] Souverijn JH. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening[J]. N Engl J Med, 2014, 371(2): 187.
- [8] Rogler G. Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer[J]. Cancer Lett, 2014, 345(2): 235-241.
- [9] 贾丹丹, 戚文娟, 程莉, 等. 溃疡性结肠炎相关性结直肠癌的危险因素及癌变机制[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(3): 720-722.
- [10] 李艳萍. 溃疡性结肠炎癌变机制的研究及结肠肠息肉危险因素分析[D]. 北京: 北京协和医学院, 2014, 12(8): 114-116.
- [11] 崔伟, 陈纲, 孙亮, 等. 老年结直肠癌患者术后早期化疗的安全性研究[J]. 临床军医杂志, 2011, 39(5): 905-906.
- [12] 肖亮, 王志明. microRNA 在肝细胞癌发生发展和诊治中的作用[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(1): 106-110.
- [13] 张祖雯, 赵菊梅. MicroRNA 在 HPV 相关宫颈癌中的研究进展[J]. 医学综述, 2014, 20(21): 3890-3893.
- [14] Shen K, Mao R, Ma L, et al. Post-transcriptional regulation of the tumor suppressor miR-139-5p and a network of miR-139-5p-mediated mRNA interactions in colorectal cancer[J]. FEBS J, 2014, 281(16): 3609-3624.
- [15] Song M, Yuan Y, Zhang J, et al. MiR-139-5p inhibits migration and invasion of colorectal cancer by downregulating AMFR and NOTCH1 [J]. Protein Cell, 2014, 5(11): 851-861.

收稿日期: 2016-07-04 编辑: 王国品