MiR-100-5p 和 miR-199b-5p 靶向结合 mTOR 诱导结肠癌细胞自噬*

薛淑慧[1]，石 萌[2**]
（1. 北京中医药大学孙思邈医院 消化内科，陕西 铜川 727000；2. 安康市中心医院 肿瘤科，陕西 安康 725000）

［摘 要］**目的**：研究结肠癌（CRD）细胞中 miR-100-5p 和 miR-199b-5p 与 mTOR 诱导的自噬之间的关系。**方法**：选取人 CRC SW480 细胞株，分别用 miR-100-5p 和 miR-199b-5p 的 mimics 和抑制剂转染 SW480 细胞，采用实时定量 PCR 检测转染后 2 种 miRNA 的表达量、自噬基因 *Beclin*1 和 *LC*3 的表达量，CCK-8 检测细胞存活率，流式细胞技术检测细胞凋亡率，荧光素酶实验检测 2 种 miRNA 与 mTOR 之间的关系。**结果**：与对照组比较，转入 miR-100-5p 和 miR-199b-5p mimics 的 SW480 细胞中 *Beclin*1 和 *LC*3 的表达水平显著增加（$P<0.05$），经 miR-100-5p 和 miR-199b-5p mimics 转染的 SW480 细胞生长更慢（$P<0.05$），同时细胞凋亡率增加（$P<0.05$）；荧光素酶报告基因结果显示，与对照组相比，miR-100-5p 和 miR-199b-5p mimics 组的 miR-100-5p 和 miR-199b-5p 表达水平都显著降低，表明 *mTOR* 3'UTR 区可能是 miR-100-5p and miR-199b-5p 的结合部位。**结论**：miR-100-5p 和 miR-199b-5p 可能通过靶向 *mTOR* 诱导 SW480 细胞的自噬死亡。

［关键词］miR-100-5p；miR-199b-5p；自噬；mTOR；结肠癌
［中图分类号］R735.3 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707（2018）02-0179-05
DOI：10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.02.010

Autophagy of Colon Cancer Cells by Targeting miR-100-5p and miR-199b-5p Combined with mTOR

XUE Shuhui[1], SHI Meng[2]
(*1. Gastroenterology Department, Sun Simiao Hospital of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Tongchuan 727000, Shaanxi, China; 2. Oncology Department, Ankang Central Hospital of Shaanxi Provence, Ankang 725000, Shaanxi, China*)

［**Abstract**］**Objective**: To study on the relationship between miR-100-5p, miR-199b-5p and mTOR induced autophagy in colon cancer (CRD) cell. **Methods**: Human CRC SW480 cell lines were selected and transfected into SW480 cells with mimics and inhibitor of miR-100-5p as well as miR-199b-5p, respectively. Real-time quantitative PCR was used to detect the expression of two kinds of miRNA and the expression of autophagy gene Beclin1 and LC3 after transfection. The cell survival rate was detected by CCK-8, cell apoptosis rate was detected by flow cytometry, and the relationship between 2 kinds of miRNA and mTOR was detected by luciferase test. **Results**: Compared with the control group, the expression of Beclin1 and LC3 in SW480 cells transferred to miR-100-5p and miR-199b-5p mimics was significantly increased ($P<0.05$); Growth of SW480 cells transfected with miR-100-5p and miR-199b-5p mimics was slower ($P<0.05$); at the same time, the rate of apoptosis increased ($P<0.05$). The results of luciferase reporter gene showed that the expression levels of miR-100-5p and miR-199b-5p in miR-100-5p and miR-199b-5p mimics groups were significantly lower than those in

*［基金项目］陕西省自然基础计划项目（2015JM8427）
**通信作者 E-mail：506337865@qq.com
网络出版时间：2018-02-14 网络出版地址：http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20180214.1220.019.html

the control group, indicating that mTOR 3′UTR region might be the binding site of miR-100-5p and miR-199b-5p. **Conclusions**: MiR-100-5p and miR-199b-5p may induce autophagy death of SW480 cells by targeting mTOR.

[**Key words**] miR-100-5p; miR-199b-5p; autophagy; mTOR; colon cancer

结肠癌(colon cancer,CRC)是最常见的消化系统恶性肿瘤之一。近年来,CRC 的发病率和死亡率持续增高,发病年龄逐渐年轻化,且预后差[1-3]。有研究表明肿瘤的发生是由基因突变导致正常细胞的无限增殖和凋亡抵抗所引起,细胞自噬则是一种细胞凋亡样的生物学现象,自噬是细胞自我破坏的高度保守过程,胞质蛋白和细胞器等细胞质成分被封闭会形成双膜自噬体;这些囊泡可以被溶酶体水解酶进行降解以供细胞循环利用,与癌症和其他疾病有关[4-6],但关于其在 CRC 细胞的生长和转移中作用的报道甚少。mTOR 基因位于 1 号染色体,编码丝氨酸/苏氨酸激酶,涉及许多细胞信号通路,包括自噬信号通路[7]。有研究发现 mTOR 激酶的磷酸化与 CRC 细胞的增殖、存活、侵袭及转移有关[8-9]。有趣的是,一些 microRNA(miRNA)的降解与 mTOR 激酶的表达上调具有协同关系,miRNA 是由 19 到 25 个核苷酸组成的小的非编码 RNA 分子,可以下调基因表达[10]。Torres 等[11]指出 miR-100、miR-99a 及 miR-199b 在肿瘤组织和血浆中水平降低,Wu 等[12]进一步证明 miRNA-199a-3p 可以通过靶向 mTOR 来调节肿瘤细胞的增殖,本研究分别用 miR-100-5p 和 miR-199b-5p 的 mimics 和抑制剂转染 SW480 细胞,检测转染后 2 种 miRNA、自噬基因 *Beclin*1 和 *LC*3 的表达量,同时检测细胞的存活率及凋亡率,采用荧光素酶实验检测 CRC 细胞中 miR-100-5p 和 miR-199b-5p 与 mTOR 诱导的自噬之间的关系。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人 CRC 细胞株 SW480(购自中国科学院上海细胞库),Lipofectamine 2000 转染试剂盒(Thermo Fisher,Waltham,USA)、miR-100-5p 及 miR-199b-5p 的 miRNA mimics、inhibitor 及 NC(上海吉玛制药技术有限公司),雷帕霉素(Sigma-Aldrich,St Louis,MO),TRIzol Plus RNA 纯化试剂盒(Invitrogen),Precision nanoScript Reverse Transcription 试剂盒(Primer Design),miRcute Plus miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit(北京天根生化科技有限公司),Dual-Glo 荧光素酶测定系统(Promega,Madison,USA)。

1.2 方法

1.2.1 SW480 细胞培养及分组 将 SW480 细胞株培养于含有 2% 青霉素/链霉素与 10% 胎牛血清的 L-15 培养基混合液中,37 ℃、5% CO_2 条件下培养,当细胞达到对数生长期时,可进行实验。使用 Lipofectamine 2000 转染试剂,分别用 miR-100-5p、miR-199b-5p 的 miRNA mimics、inhibitor 及 NC 分别转染 SW480 细胞,分别记为 miR-100-5p、miR-199b-5p 实验组(mimics)、抑制组(inhibitor)和对照组(NC)共 6 组,转染后采用 CCK-8 试剂盒检测细胞活性,Annexin V-FITC 试剂检测细胞凋亡率(流式细胞仪检测)。

1.2.2 自噬基因 *Beclin*1 及 *LC*3 测定 采用 TRIzol Plus RNA 纯化试剂盒提取总 RNA,并使用 Precision nanoScript Reverse Tran scription 试剂盒对总 RNA(500 ng)进行逆转录,采用 PCR 法扩增自噬基因 *Beclin*1,*LC*3 和内参基因 GADPH;反应体系 20 μL,模板 1 μL、SuperReal PreMix Plus(SYBR Green) 10 μL、上下游引物各 0.6 μL 及 ddH_2O 7.8 μL;反应条件,95 ℃ 15 min 预变性、95 ℃ 10 s、60 ℃ 20s 及 72 ℃ 30 s,共 45 个循环。*Beclin*1 的引物 F 为 GGAGCTGCCGTTATA CTGTTC、R 为 TCTCCACATCCATCCTGTAGG,*LC*3 的引物 F 为 GGTGATCATCGAGCGCTACA、R 为 CGCCGGATGATCTTGACCAA,GADPH 的引物为 F 为 AGGTCGGTGTGAACGGATTTG、R 为 GGGGTCGTTGATGGCAACA。

1.2.3 miR-100-5p 和 miR-199b-5p 在 SW480 细胞中的表达 使用 miRcute Plus miRNA First-Strand cDNA Synthesis 试剂盒对 miRNA 进行逆转录。反应体系:miRNA 第 1 链 cDNA 1 μL,2×miRute miRNA 预混合物 5 μL,上、下游引物 0.2 μL 及 ddH_2O 3.6 μL。反应条件:94 ℃ 2 min,94 ℃

20 s、65 ℃ 30 s 循环 5 次，72 ℃ 34 s、94 ℃ 20 s 及 60 ℃ 34 s 循环 40 次。采用 Dual-Glo 荧光素酶测定系统检测 miR-100-5p 和 miR-199b-5p 对 mTOR 基因的影响。

1.3　数据处理

采用 SPSS 23.0 软件对数据录入及分析，正态分布数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，组间比较采用单因素 ANOVA 分析，两两比较采用 t 检验，以 $P<0.05$ 为有显著统计学意义。

2　结果

2.1　自噬基因 *Beclin*1 和 *LC*3 在 SW480 细胞中的表达

SW480 细胞经过转染后，与对照组比较，miR-100-5p 和 miR-199b-5p 实验组的自噬基因 *Beclin*1 和 *LC*3 表达量显著上调（$P<0.05$），抑制组的自噬基因表达量均显著下调（$P<0.05$），见表 1。

表 1　*Beclin*1 和 *LC*3 基因在 SW480 细胞中的相对表达量

Tab. 1　Relative expression of Beclin1 and LC3 genes in SW480 cells

组别	*Beclin*1 相对表达量		*LC*3 相对表达量	
	Has-miR-100-5p	Has-miR-199b-5p	Has-miR-100-5p	Has-miR-199b-5p
对照组	1	1	1	1
实验组	1.38 ± 0.12(1)	1.92 ± 0.16(2)	1.37 ± 0.12(1)	1.57 ± 0.13(2)
抑制组	0.58 ± 0.03(1)	0.63 ± 0.08(1)	0.83 ± 0.09(1)	0.87 ± 0.08(1)

与对照组相比，(1) $P<0.05$，(2) $P<0.01$

2.2　miR-100-5p 和 miR-199b-5p 在 SW480 细胞中的表达

SW480 细胞经过转染后，与对照组比较，实验组 miR-100-5p 和 miR-199b-5p 的表达显著增高（$P<0.01$），而抑制组 miR-100-5p 和 miR-199b-5p 的表达水平则差异无统计学意义（$P>0.05$），见表 2。

表 2　miR-100-5p 和 miR-199b-5p 在 SW480 细胞中的相对表达量

Tab. 2　Relative expression levels of miR-100-5p and miR-199b-5p in SW480 cells

组别	Has-miR-100-5p	Has-miR-199b-5p
对照组	1	1
实验组	9.29 ± 0.73(1)	26.41 ± 2.10(1)
抑制组	0.24 ± 0.09	0.29 ± 0.01

(1) 与对照组比较，$P<0.01$

2.3　miR-100-5p 和 miR-199b-5p 抑制 SW480 细胞增殖

SW480 细胞转染时，设立相应对照，分别为空白对照（mock）组、inhibitor 对照（NC-inhibitor）组及 mimics 对照（NC-mimics）组，分别在转染 24 和 48 h 时测定细胞活力。与 NC-mimics 组比较，miR-100-5p 和 miR-199b-5p mimics 组的细胞活力都显著降低（$P<0.05$）；与 NC-inhibitor 组比较，miR-199b-5p inhibitor 组的细胞活力都显著提高（$P<0.05$），见表 3。

表 3　SW480 细胞转染 24 h 和 48 h 后细胞活力（以 mock 为标准）

Tab. 3　Cell viability of SW480 cells after 24 and 48 hours of transfection

组别	细胞活力	
	24 h	48 h
mock	100	100
NC-mimcs	97.56 ± 4.88	100.46 ± 3.51
NC-inhibitor	96.38 ± 2.69	101.46 ± 2.35
has-miR-100-5p mimics	89.06 ± 2.55(1)	93.68 ± 1.69(1)
has-miR-100-5p inhibitor	94.35 ± 2.54(1)	103.11 ± 1.07(1)
has-miR-199b-5p mimics	88.10 ± 2.09(1)	91.92 ± 3.49(1)
has-miR-199b-5p inhibitor	104.98 ± 1.63(1)	109.50 ± 1.95(1)

(1) 与相应对照组比较，$P<0.05$

2.4　miR-100-5p 和 miR-199b-5p 诱导 SW480 细胞凋亡

SW480 细胞经过转染后，在 24 h 测定细胞凋亡比例，与 NC-mimics 组相比，miR-100-5p 和 miR-199b-5p mimics 组的细胞凋亡比例均显著增高（$P<0.05$），见表 4。

表 4　SW480 细胞转染 24 h 时细胞凋亡比例

Tab. 4　Apoptosis rate of SW480 cells after 24 hours of transfection

组别	凋亡比例
mock	5.95 ± 0.3
NC-mimics	6.59 ± 0.8
NC-inhibitor	7.66 ± 0.38
has-miR-100-5p mimics	11.48 ± 0.26(1)
has-miR-100-5p inhibitor	5.39 ± 0.19
has-miR-199b-5p mimics	14.96 ± 0.39(2)
has-miR-199b-5p inhibitor	5.80 ± 0.28

(1) 与对照组相比，(1) $P<0.05$，(2) $P<0.01$

2.5　*mTOR* 是 miR-100-5p 和 miR-199b-5p 的靶基因

为了研究 miR-100-5p 和 miR-199b-5p 与 mTOR 直接的关系，本研究在 HEK293 细胞中做了荧光素酶报告实验，结果显示，与 mock 组相比，mimics 组 miR-100-5p and miR-199b-5p 的表达水平显著降低（$P<0.05$），表明 *mTOR* 3'UTR 区可能是 miR-100-5p 和 miR-199b-5p 的结合部位，见表 5。

表 5　荧光素酶报告实验中 miRNA 相对表达量

Tab. 5　Relative expression levels of miRNA in luciferase reporter assay

组别	miRNA 相对表达量
mock	1
has-miR-100-5p mimics	0.64 ± 0.03(1)
has-miR-199b-5p mimics	0.72 ± 0.09(1)

(1) 与 mock 组相比，$P<0.05$

3　讨论

本文研究了 SW480 细胞中两种 miRNA（miR-100-5p 和 miR-199b-5p）和自噬相关基因 *Beclin*1 和 *LC*3 的表达水平。本研究发现与对照组相比，转入 miR-100-5p 和 miR-199b-5p mimics 的 SW480 细胞中 *Beclin*1 和 *LC*3 的表达水平显著增加。此外，经 miR-100-5p 和 miR-199b-5p mimics 转染的 SW480 细胞生长更慢；同时细胞凋亡率增加。最后，荧光素酶报告基因结果显示，与对照组相比，miR-100-5p 和 miR-199b-5p mimics 组的 miR-100-5p 和 miR-199b-5p 表达水平都显著降低。基于以上的结果，推测 miR-100-5p 和 miR-199b-5p 可能通过靶向 *mTOR* 诱导 SW480 细胞的自噬死亡。

MicroRNA 通常与靶 mRNA 的 3'UTR 结合，抑制 mRNA 翻译或诱导 mRNA 降解。许多研究已发现 miRNA 在肿瘤细胞中的异常表达，这表明 miRNA 可能具有类似原癌基因或肿瘤抑制基因的功能[13]。MiR-100-5p 在头颈鳞状细胞癌组织中表达量较低[14]。MiRNA-199b-5p 参与 Notch 信号通路，已经发现与乳腺癌，卵巢癌，肺癌和肾癌有关[15]。本研究发现转染细胞中 miR-100-5p，miR-199a-3p 和 miR-199b-5p 的过度表达会抑制人 CRCSW480 细胞增殖并加速细胞凋亡。这些结果都表明 miR-100-5p 和 miR-199b-5p 可能在癌症的发生发展中起重要作用。

细胞自噬是对代谢和环境压力的保守的程序化反应，自噬的不同阶段分别由一些重要的基因调控，如 *Beclin*1 和 *LC*3。*Beclin*1 参与了早期的自噬体形成步骤[16]。*Beclin*1 在乳腺癌，卵巢癌和结直肠癌细胞中的表达水平较低[17-18]。而 *LC*3 与自噬体数量密切相关，在自噬体的后期形成中起重要作用[19]。本研究发现经 miR-100-5p 和 miR-199b-5p mimics 转染的人 CRCSW480 细胞中，*Beclin*1 和 *LC*3 的表达水平都显著增加。基于此，推测 miR-100-5p 和 miR-199b-5p 可能通过靶向 *mTOR* 对影响自噬，因此本实验进一步研究了使用荧光素酶报告基因测定 miR-100-5p 和 miR-199b-5p 与 mTOR 之间的关联。

mTOR 是自噬信号通路中的主要靶标，在细胞生长、增殖、分化、细胞周期调控等方面起重要作用。mTOR 也被发现在前列腺，肝脏和头颈癌中的表达量增加[20]。在本研究中，荧光素酶报告实验结果显示，与 mock 组相比，mimics 组的 miR-100-5p and miR-199b-5p 表达水平显著降低（$P<0.05$），表明 *mTOR* 3'UTR 区可能是 miR-100-5p and miR-199b-5p 的结合部位，进一步揭示了 miR-100-5p 和 miR-199b-5p 与 mTOR 之间的关系。

综上所述，miR-100-5p 和 miR-199b-5p 可能通过靶向 *mTOR* 诱导人 CRCSW480 细胞的自噬死亡。

4　参考文献

[1] BENEDIX F, KUBE R, MEYER F, et al. Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival[J]. Dis Colon Rectum, 2010,53 (1):57-64.

[2] 李颖,宋焱峰,郭宙平,等. 快速康复外科模式应用于结直肠癌患者围手术期 60 例效果评价[J]. 兰州大学学报(医学版), 2017,43 (3):52 - 57.
[3] 寇卫政,杨晓煜,褚秀峰,等. 消癌平注射液联合 CapeOX 方案治疗晚期结直肠癌疗效观察[J]. 新乡医学院学报, 2016,33 (6):500 - 503.
[4] ARACHICHE A,GOZUACIK D. Autophagy in Health and Disease[J]. Anticancer Res, 2015,35 (2):72 - 78.
[5] 郑军,辛宗山,操儒道,等. 自噬机制在大鼠终板软骨退变进程中的作用[J]. 贵州医科大学学报, 2017,42 (8):906 - 910.
[6] 陈禹廷,刘俊杰,丁家杉,等. 抑制 JNK 通路对蛛网膜下腔出血大鼠海马区神经细胞自噬与学习记忆功能的影响[J]. 新疆医科大学学报, 2017,40 (2):196 - 200.
[7] SAXTON R A, SABATINI D M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease [J]. Cell, 2017, 168 (6):960.
[8] JOHNSON S M,GULHATI P,RAMPY B A,et al. Novel expression patterns of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway components in colorectal cancer[J]. J Am Coll Surgeons, 2010,210 (5):767.
[9] 高嵩,于燕. mTOR 信号通路与肿瘤发生的机制研究[J]. 国外医学(医学地理分册), 2016,37 (4):353 - 356.
[10] FARAZI T A,SPITZER J I,MOROZOV P,et al. miRNAs in human cancer [J]. J Pathol, 2011,223(2):102 - 115.
[11] TORRES K T,ANNA PESCI,MARCELLO C,et al. Deregulation of miR-100,miR-99a and miR-199b in tissues and plasma coexists with increased expression of mTOR kinase in endometrioid endometrial carcinoma[J]. BMC Cancer, 2012,12 (1):369.
[12] WU D,HUANG H J,HE C N,et al. MicroRNA-199a-3p Regulates Endometrial Cancer Cell Proliferation by Targeting Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)[J]. Int J Gynecol Cancer, 2013,23 (7):1191 - 1197.
[13] KARA M,YUMRUTAS O,OZCAN O,et al. Differential expressions of cancer-associated genes and their regulatory miRNAs in colorectal carcinoma[J]. Gene, 2015,567 (1):81 - 86. .
[14] NETWORK T C G A. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas[J]. Nature, 2015,517 (7536):576.
[15] FANG C,ZHAO Y,GUO B. MiR-199b-5p targets HER2 in breast cancer cells[J]. J Cell Biochem, 2013,114 (7):1457.
[16] PATTINGRE S,ESPERT L,BIARDPIECHACZYK M,et al. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes[J]. Biochimie, 2008,90 (2):313 - 323.
[17] WU S,SUN C,TIAN D,et al. Expression and clinical significances of Beclin1,LC3 and mTOR in colorectal cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol 2015,8 (4):3882.
[18] MIRACCO C,CEVENINI G,FRANCHI A,et al. Beclin 1 and LC3 autophagic gene expression in cutaneous melanocytic lesions[J]. Hum Pathol, 2010,41 (4):503 - 512.
[19] KABEYA Y, MIZUSHIMA N, UENO T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p,is localized in autophagosome membranes after processing[J]. Embo J, 2014,22 (17):4577 - 4577.
[20] SABATINI D M. mTOR and cancer:insights into a complex relationship[J]. Nat Rev Cancer, 2006,6 (9):729 - 734.

(2017-11-20 收稿,2018-01-31 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 乐　萍