

MiR-19 反义核酸与 CD133⁺ HT29 细胞亚群对多柔比星敏感性关系的研究

潘海强, 沈锋, 崔焱辉, 蔡珂, 都志军(浙江省立同德医院肛肠科, 杭州 310012)

摘要:目的 探讨 miR-19 反义核酸与 CD133⁺ HT29 细胞亚群对多柔比星敏感性的关系并研究其机制。方法 用 RT-qPCR 方法检测 miR-19 在结直肠癌细胞中的表达水平。流式细胞术检测 miR-19 反义核酸和多柔比星对 HT29 细胞系的 CD133⁺ 细胞亚群种群比例的影响。MTT 法检测 miR-19 反义核酸对多柔比星杀伤 CD133⁺ HT29 细胞亚群能力的影响。利用生物信息学及 Western blot 法验证 miR-19 是否调节 CD133⁺ HT29 细胞亚群中 PTEN 的表达。运用 Western blot、免疫共沉淀、流式细胞术研究 miR-19 反义核酸影响多柔比星疗效的信号通路。结果 结直肠癌细胞系的 miR-19 表达水平显著高于正常结直肠上皮细胞系, 并且 CD133⁺ 细胞中的 miR-19 表达水平显著高于常规结直肠癌细胞。多柔比星体外单独治疗能提高 HT29 细胞系中 CD133⁺ 细胞亚群的比例, 然而联用 miR-19 反义核酸后 CD133⁺ HT29 细胞亚群的种群比例显著下降。MTT 结果表明 miR-19 反义核酸可显著增强多柔比星对 CD133⁺ HT29 细胞亚群的杀伤活性。Western blot 实验表明 miR-19 的靶基因可能为 PTEN。MiR-19 反义核酸可显著抑制 CD133⁺ HT29 细胞亚群 PI3K、AKT 和 Bad 的磷酸化, 增强 Bad 与 Bcl-2 和 Bcl-xl 的结合, 从而提高 CD133⁺ HT29 细胞亚群对多柔比星依赖的凋亡信号的敏感性, 促进 caspase-9 和 caspase-3 的活化。结论 MiR-19 反义核酸通过 PTEN/PI3K/AKT/Bad 途径提高 CD133⁺ HT29 细胞亚群对多柔比星的敏感性。

关键词: miR-19; PTEN; 多柔比星; 结直肠癌干细胞; Bad

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2017)02-0215-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.02.014

Study the Relationship Between MiR-19 Antisense Oligonucleotides and the Sensitivity of CD133⁺ HT29 Cell Subsets to Doxorubicin

PAN Haiqiang, SHEN Feng, CUI Junhui, CAI Ke, DU Zhijun(Department of Anus-intestines, Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the relationship between the miR-19 and the sensitivity of colorectal cancer stem cells to doxorubicin. **METHODS** The expression of miR-19 was detected by RT-qPCR assay in the colorectal cancer stem cells. Flow cytometry analysis was performed to measure the percentage of CD133⁺ population in the HT29 cell line treated with miR-19 and doxorubicin. MTT assay was performed to evaluate the effect of miR-19 antisense oligonucleotides on the doxorubicin-induced cell death in the CD133⁺ HT29 cell subsets. Bioinformatics and Western blot assays were performed to determine whether the expression of PTEN is regulated by miR-19. Western blot, co-immunoprecipitation and flow cytometry assays were performed to study the pathway of apoptosis in the CD133⁺ HT29 cell subsets co-treated with miR-19 antisense oligonucleotides and doxorubicin. **RESULTS** The expression of miR-19 was significantly higher in the colorectal cancer cell lines than that in the normal colorectal epithelial cell line. In addition, the expression of miR-19 was up-regulated in the cancer stem cells compared with the routine colorectal cancer cells. Single treatment of doxorubicin increased the percentage of CD133⁺ HT29 cell population. However, the combination with miR-19 antisense oligonucleotides significantly inhibited the enrichment of CD133⁺ cell population induced by the doxorubicin. In addition, the results of MTT assay showed that the anti-tumor effect of doxorubicin could be significantly enhanced when the miR-19 antisense oligonucleotides were transfected into the CD133⁺ HT29 cell subsets. The results of western blot indicated that the PTEN gene was the target of miR-19. Furthermore, the miR-19 antisense oligonucleotides significantly inhibited the phosphorylation of PI3K, ATK and Bad and increased the interaction with the Bad and Bcl-2 as well as Bcl-xl. Subsequently, the sensitivity of CD133⁺ HT29 cell subsets to the doxorubicin-induced apoptosis was significantly enhanced, and the activation of caspase-9 and caspase-3 was promoted. **CONCLUSION** MiR-19 antisense oligonucleotides increased the sensitivity of CD133⁺ HT29 cell subsets to doxorubicin through PTEN/PI3K/AKT/Bad pathway.

KEY WORDS: miR-19; PTEN; doxorubicin; colorectal cancer stem cells; Bad

肿瘤干细胞, 又称为肿瘤起始细胞或干细胞样肿瘤细胞, 是肿瘤组织细胞群体中一群有干细胞特征的特殊肿瘤细胞, 表达 CD133、Bmi-1 和 Oct4

等干细胞表面标志。近期的文献报道这群肿瘤干细胞对化疗有较强的抵抗性, 这些有很强自我更新能力的肿瘤干细胞是造成肿瘤化疗失败和复发的重

作者简介: 潘海强, 男, 硕士, 主治医师

Tel: (0571)89972372

E-mail: tongdepanhaiqiang@163.com

要因素^[1-2]。结直肠癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤, 由于结直肠癌较易发生肝转移, 其致死率居于所有恶性肿瘤前列^[3]。对于不适宜进行手术治疗的晚期结直肠癌患者而言, 化疗是一项重要的治疗手段。多柔比星又称为阿霉素, 是一种抗肿瘤抗生素, 它能嵌入到肿瘤细胞的 DNA 中, 从而抑制 RNA 和 DNA 的合成并诱导细胞进入凋亡程序^[4]。多柔比星是治疗结直肠癌的有效药物, 然而结直肠癌干细胞对多柔比星的高度抵抗性往往造成化疗的失败^[5], 因此靶向于结直肠癌干细胞的辅助治疗是提高多柔比星的抗肿瘤活性的有效方法。

研究表明 microRNA(miRNA)与肿瘤的发生和肿瘤的药物抵抗密切相关。miRNAs 是一种由 19~25 个核苷酸组成的内源性的非编码单链 RNA, 它们能与目标 mRNA 的 3'UTR(3'非编码区)发生互补配对, 从而抑制 mRNA 的转录并使之降解, 调节相应基因的表达^[6]。研究表明, miRNA 在肿瘤细胞中调节各种生理活动, 影响细胞的增殖、分化、凋亡等功能^[7]。本研究的目的在于探讨 miR-19 反义核酸是否能调节结直肠癌干细胞对多柔比星治疗的敏感性。

1 材料

1.1 细胞培养

人正常结直肠上皮细胞系 FHC^[8], 人结直肠癌细胞系 HT29, SW480, SW620 购于美国 ATCC。CD133⁺ HT29 细胞亚群用流式细胞仪进行分选, CD133 阳性的 HT29 细胞即为 HT29 肿瘤干细胞^[9]。各细胞系培养在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中, 在 37 °C 恒温培养箱中培养, 通入 5% CO₂。

1.2 试剂和仪器

多柔比星(批号: D1515)、噻唑蓝(MTT)、凋亡检测试剂盒(批号: APOAF)购于美国 Sigma-Aldrich。DMEM 培养基购于美国 Gibco; 蛋白提取液、PTEN、磷酸化 PI3K、磷酸化 AKT、磷酸化 Bad、活化 caspase-9、活化 caspase-3、Bad、Bcl-2、Bcl-xl 和 β -actin 兔抗人抗体购于美国 Cell Signaling。CD133-FITC 荧光抗体购于美国 BD 公司。MiR-19 反义核酸(ACACGUUUAGGUACGUUUUGACU), 阴性对照寡核苷酸(NCO, UUGUUACUUACUGUAGACGGU), PTEN siRNA (sense: GCACAAGAGGCCCUAGAUUTT, anti-sense: AAUCUAGGGCCUCUUGUGCTT)购于上海吉玛生物; Trizol 试剂、Lipofectamine 2000 购于美国 Invitrogen。SYBR Green 试剂(大连

TaKaRa); PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成; ECL 试剂盒(美国 Pierce, 批号: 34079); 蛋白 G 免疫共沉淀琼脂糖珠(美国 Santa Cruz); TECAN Sunrise Microplate Reader 型酶标仪(瑞士 TECAN 公司)。BD FACS Aria II 型流式细胞分选仪(美国 BD Biosciences 公司)。Mini-PROTEAN Tetra 型电泳仪号(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 HT29 肿瘤干细胞的分选

CD133 阳性的 HT29 细胞被认为是 HT29 肿瘤干细胞^[9]。分选步骤如下: 将 HT29 细胞系用 FITC 标记的 CD133 抗体在冰上暗处孵育 40 min。孵育完毕后用冰预冷的生理盐水将细胞在 1 200 r·min⁻¹ 下离心清洗 2 次后用流式细胞仪进行细胞分选。CD133 阳性的 HT29 细胞即为 HT29 肿瘤干细胞。

2.2 荧光定量 PCR 检测 miR-19 的表达

将培养细胞的总 RNA 用 Trizol 试剂按操作说明书进行提取, 以提取的总 RNA 为模板, 采用茎环法用 miR-19 特异性引物进行逆转录。miR-19 的逆转录引物序列: 5'-CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGCAATTCAGTTGAGACACGUUU-3'。之后以逆转录产物为模板, 用 SYBR Green 试剂按其试剂说明书操作步骤进行定量 PCR 扩增, 以 U6 snRNA 作为内参。

2.3 MTT 法检测多柔比星对 CD133⁺ HT29 细胞亚群和常规 HT29 细胞的杀伤活性

将 CD133⁺ HT29 细胞亚群和常规 HT29 细胞按每孔 5×10^3 接种在 96 孔板上孵育过夜, 用 (0~2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 多柔比星处理肿瘤细胞 48 h, 之后加入 20 mL MTT (5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 培养 4 h, 移除孔内培养基, 加入 100 μL 二甲亚砜, 570 nm 波长下测定 OD 值。细胞活力结果用多柔比星处理组与对照组的 OD 值比值表示。

2.4 MTT 法检测 miR-19 反义核酸和多柔比星对 CD133⁺ HT29 细胞亚群细胞活力的影响

将 CD133⁺ HT29 细胞亚群按每孔 5×10^3 接种在 96 孔板上, 分为对照组、多柔比星组、miR-19 反义核酸组和多柔比星+miR-19 反义核酸组。对照组为 CD133⁺ HT29 细胞亚群用 Lipofectamine 2000 转染 NCO 培养 24 h, 之后更换新鲜培养基不加药物继续培养 48 h。多柔比星组为 CD133⁺ HT29 细胞亚群用 Lipofectamine 2000 转染 NCO 培养 24 h, 之后更换新鲜培养基加入 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 多柔比星继

续培养 48 h。miR-19 反义核酸组为 CD133⁺ HT29 细胞亚群用 Lipofectamine 2000 转染 miR-19 反义核酸培养 24 h, 之后更换新鲜培养基不加药物继续培养 48 h。多柔比星+miR-19 反义核酸组为 CD133⁺ HT29 细胞亚群用 Lipofectamine 2000 转染 miR-19 反义核酸培养 24 h, 之后更换新鲜培养基加入 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 多柔比星继续培养 48 h。处理完毕后在细胞培养基中加入 20 mL MTT (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 培养 4 h, 移除孔内培养基, 加入 100 μL 二甲亚砜, 570 nm 波长下用酶标仪测定 OD 值。细胞活力结果用实验组与对照组的 OD 值比值表示。

2.5 CD133⁺ HT29 细胞亚群所占比例的测定

按“2.4”项下方法处理 HT29 细胞系, 之后在细胞培养基中加入 CD133 抗体在暗处孵育 20 min 后将细胞用流式细胞仪进行分析, 计算 CD133 阳性的 HT29 细胞所占总 HT29 细胞的比例。

2.6 免疫共沉淀

按“2.4”项下方法处理 CD133⁺ HT29 细胞亚群, 之后对细胞进行计数, 取 2×10^6 的各组细胞用免疫沉淀缓冲液进行裂解, 缓冲液的成分如下: 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.4), 1% NP-40 细胞裂解液, 150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 1% 混合蛋白酶抑制剂(Sigma-Aldrich)。CD133⁺ HT29 细胞亚群在裂解液下处理 15 min 后, 将其在 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 10 min, 收取上清液并在其中加入 Bad 抗体孵育过夜, 之后加入蛋白 G 琼脂糖珠孵育 2 h。孵育完成后将其在 1 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 速度下离心 5 min, 将琼脂糖珠离心至管底, 之后将上清小心吸去, 琼脂糖珠用免疫沉淀缓冲液洗涤 2 次后加入 Western blot 上样缓冲液, 沸水浴煮 5 min 后备用, 用于检测与 Bad 结合的 Bcl-2 和 Bcl-xl 蛋白。

2.7 Western blot 试验

按“2.4”项下方法处理 CD133⁺ HT29 细胞亚群, 之后用蛋白提取液提取总蛋白质。将总蛋白质或从“2.5”所述步骤中得到的免疫共沉淀蛋白用 12.5% SDS-PAGE 进行电泳分离。分离完以后通过电转方法将蛋白质从分离胶上转到 PVDF 膜上, 用 PTEN、磷酸化 PI3K、磷酸化 AKT、磷酸化 Bad、活化 caspase-9、活化 caspase-3、Bad、Bcl-2、Bcl-xl 或 β -actin 兔抗人抗体孵育过夜, 之后再用带辣根过氧化物酶的二抗孵育 2 h, 蛋白条带用 ECL 试剂盒显色发光。

2.8 细胞凋亡试验

按“2.4”项下方法处理 CD133⁺ HT29 细胞亚

群, 之后按照凋亡试剂盒说明书步骤将 PI(碘化丙啶)和 Annexin-V 加入细胞中孵育 20 min, 采用流式细胞术检测肿瘤细胞的凋亡, Annexin-V 阳性细胞即为凋亡细胞。

2.9 统计学方法

实验重复 3 次, 实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 并用 SPSS 15.0 统计分析软件进行处理, P 值计算采用非配对双边 t 检验进行分析, $P<0.05$ 认为有显著性差异。

3 结果

3.1 结直肠癌 CD133⁺细胞亚群过表达 miR-19

荧光定量 PCR 结果显示, 结直肠癌细胞的 miR-19 表达水平显著高于正常结肠上皮细胞 FHC(图 1A)。将 3 种结直肠癌细胞系的 CD133⁺细胞亚群分离出来后进行 PCR 检测, 结果显示结直肠癌 CD133⁺细胞亚群的 miR-19 表达水平与常规结直肠癌细胞相比显著升高(图 1B), 表明 miR-19 可能在结直肠癌 CD133⁺细胞亚群中发挥促肿瘤作用。

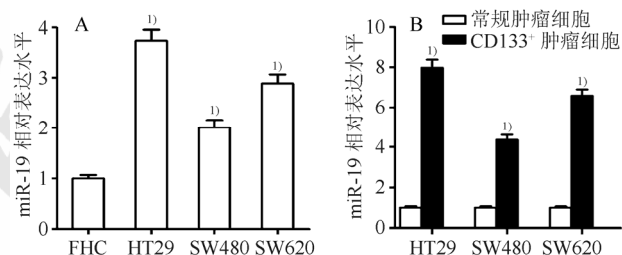


图 1 结直肠癌 CD133⁺细胞亚群过表达 miR-19($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

A-miR-19 的表达水平在结直肠癌细胞中显著下调; 与 FHC 细胞相比, $^{1)}P<0.05$; B-结直肠癌 CD133⁺细胞亚群的 miR-19 表达水平显著高于常规结直肠癌细胞; 与相应的常规结直肠癌细胞相比, $^{1)}P<0.05$ 。

Fig. 1 miR-19 was overexpressed in the CD133⁺ colorectal cancer cells($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

A-the expression of miR-19 was significantly up-regulated in the colorectal cancer cells; compared with the FHC cells, $^{1)}P<0.05$; B-the expression of miR-19 was significantly higher in the CD133⁺ colorectal cancer cells than that in the routine colorectal cancer cells; compared with the corresponding routine colorectal cancer cells, $^{1)}P<0.05$.

3.2 miR-19 反义核酸提高 CD133⁺ HT29 细胞亚群对多柔比星的敏感性

MTT 实验结果显示, CD133⁺ HT29 细胞亚群对多柔比星的敏感性显著低于常规 HT29 细胞, 表明 CD133⁺ HT29 细胞亚群对多柔比星存在抵抗性(图 2A)。为了研究 miR-19 反义核酸是否能增强多柔比星对 CD133⁺ HT29 细胞亚群的杀伤活性, 在 CD133⁺ HT29 细胞亚群中转染 miR-19 反义核酸, miR-19 反义核酸的转染效率见图 2B。流式细胞实验结果显示, 多柔比星单独治疗能显著提高 HT29

细胞系中 CD133⁺细胞的比例,然而联用 miR-19 反义核酸后,CD133⁺ HT29 细胞亚群的比例显著下降(图 2C)。同时,MTT 实验结果显示转染 miR-19 反义核酸能显著提高多柔比星对 CD133⁺ HT29 细胞亚群的杀伤活性(图 2D)。这些实验结果表明 miR-19 反义核酸能显著提高 CD133⁺ HT29 细胞亚群对多柔比星的敏感性。

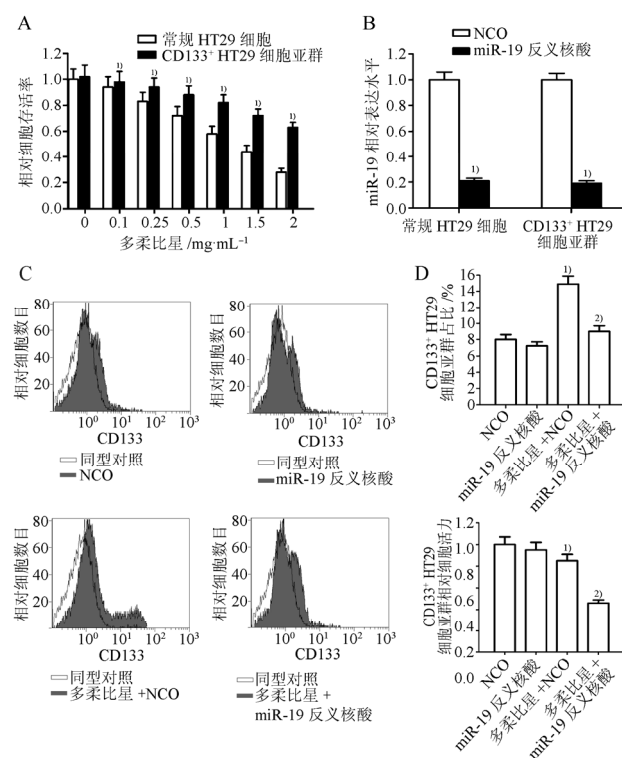


图 2 miR-19反义核酸提高CD133⁺ HT29细胞亚群对多柔比星的敏感性($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

A-CD133⁺ HT29细胞亚群对多柔比星的敏感性显著低于常规 HT29 肿瘤细胞;与相同浓度多柔比星处理的常规 HT29 肿瘤细胞相比, $^{1)}P<0.05$ 。B-转染 miR-19 反义核酸显著抑制 HT29 细胞中的 miR-19 表达水平;与 NCO 组相比, $^{1)}P<0.05$ 。C-miR-19 反义核酸抑制多柔比星依赖的 CD133⁺ HT29 细胞亚群比例的上调;与 NCO 组相比, $^{1)}P<0.05$;与多柔比星组相比, $^{2)}P<0.05$ 。D-转染 miR-19 反义核酸显著提高 CD133⁺ HT29 细胞亚群对多柔比星的敏感性;与 NCO 组相比, $^{1)}P<0.05$;与多柔比星组相比, $^{2)}P<0.05$ 。

Fig. 2 miR-19 antisense oligonucleotides increased the sensitivity of CD133⁺ HT29 cell subsets to doxorubicin($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

A-the sensitivity to doxorubicin in the CD133⁺ HT29 cell subsets was significantly lower than that in the routine HT29 cells; compared with the routine HT29 cancer cells treated with equal concentrations of doxorubicin, $^{1)}P<0.05$. B-transfection with miR-19 antisense oligonucleotides significantly inhibited the expression of miR-19 in the HT29 cells; compared with the NCO group, $^{1)}P<0.05$. C-miR-19 inhibited the doxorubicin-dependent enrichment of CD133⁺ HT29 cell population; compared with the NCO group, $^{1)}P<0.05$; compared with the doxorubicin group, $^{2)}P<0.05$. D-miR-19 antisense oligonucleotides significantly enhanced the sensitivity of CD133⁺ HT29 cell subsets to doxorubicin; compared with the NCO group, $^{1)}P<0.05$; compared with the doxorubicin group, $^{2)}P<0.05$.

3.3 miR-19 反义核酸上调 CD133⁺ HT29 细胞亚群中 PTEN 的表达

生物信息学(<http://www.targetscan.org/>)结果表明 PTEN mRNA 3'UTR 的第 411~417 位碱基序列(UUUGCAC),第 1221~1228 位碱基序列(UUUGCACA),第 2252~2258 位碱基序列(UUUGCAC)均能与 miR-19 互补结合,提示 PTEN 可能是 miR-19 的靶点。Western blot 实验结果显示,3 种结直肠癌 CD133⁺细胞的 PTEN 表达水平均显著低于相应常规结直肠癌细胞(图 3A),结合图 1B 的结果,表明在结直肠癌 CD133⁺细胞中 miR-19 的表达水平与 PTEN 呈负相关。通过进一步的实验结果显示在 CD133⁺ HT29 细胞亚群中转染 miR-19 反义核酸后 PTEN 的表达水平显著上升,表明 PTEN 是 miR-19 的直接靶点且 miR-19 反义核酸能显著上调 CD133⁺ HT29 细胞亚群中 PTEN 的表达水平(图 3B)。

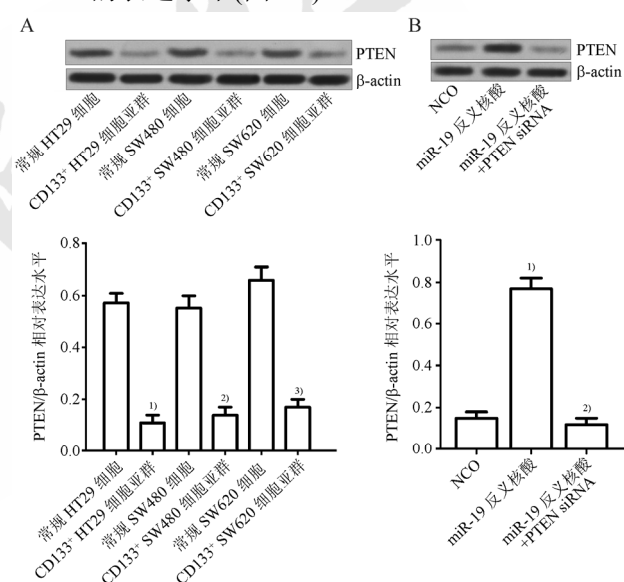


图 3 miR-19 反义核酸上调 CD133⁺ HT29 细胞亚群中 PTEN 的表达($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

A-PTEN 表达水平在结直肠癌 CD133⁺细胞中显著下调;与常规 HT29 细胞相比, $^{1)}P<0.05$;与常规 SW480 细胞相比, $^{2)}P<0.05$;与常规 SW620 细胞相比, $^{3)}P<0.05$ 。B-miR-19 反义核酸上调 CD133⁺ HT29 细胞亚群中 PTEN 的表达水平;与 NCO 组相比, $^{1)}P<0.05$;与 miR-19 反义核酸组相比, $^{2)}P<0.05$ 。

Fig. 3 miR-19 antisense oligonucleotides up-regulated the expression of PTEN in the CD133⁺ HT29 cell subsets($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

A-the expression of PTEN was significantly down-regulated in the colorectal CD133⁺ stem cells; compared with the routine HT29 cancer cells, $^{1)}P<0.05$; compared with the routine SW480 cancer cells, $^{2)}P<0.05$; compared with the routine SW620 cancer cells, $^{3)}P<0.05$. B-the expression of PTEN was up-regulated by miR-19 antisense oligonucleotides in the CD133⁺ HT29 cell subsets; compared with the NCO group, $^{1)}P<0.05$; compared with the miR-19 antisense oligonucleotides group, $^{2)}P<0.05$.

3.4 MiR-19 反义核酸通过 PTEN/PI3K/AKT/Bad 途径提高 CD133⁺

HT29 细胞亚群对多柔比星的敏感性 Western blot 实验结果显示, 转染 miR-19 反义核酸能显著抑制 PI3K、AKT 和 Bad 的磷酸化, 而多柔比星单独处理对 PI3K、AKT 和 Bad 的磷酸化水平影响不大, 同时转染 PTEN siRNA 能显著减弱 miR-19 反义核酸对 PI3K、AKT 和 Bad 磷酸化程度的抑制作用, 表明 miR-19 反义核酸通过上调 PTEN 的表达抑制 CD133⁺ HT29 细胞亚群中 PI3K/AKT/Bad 通路的磷酸化(图 4A)。图 4B 的结果显示 miR-19 反义核酸诱导的 Bad 去磷酸化显著增强了 Bad 蛋白与 Bcl-2 和 Bcl-xl 的相互作用, 从而抑制了 Bcl-2 和 Bcl-xl 的活性。进一步实验结果显示, miR-19 反义核酸能显著促进多柔比星依赖

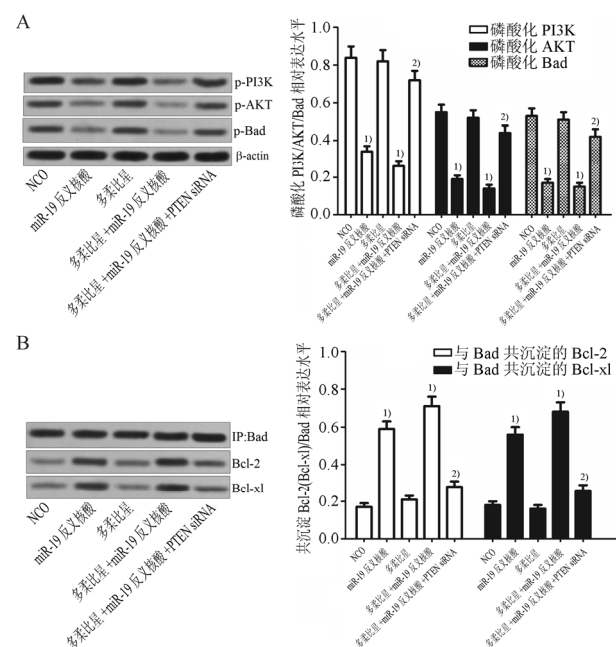


图 4 MiR-19 反义核酸通过 PTEN/PI3K/AKT 途径促进 Bad 与 Bcl-2 及 Bcl-xl 的相互作用($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

A-miR-19 反义核酸抑制 CD133⁺ HT29 细胞亚群中 PI3K、AKT 和 Bad 的磷酸化; 与 NCO 组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与多柔比星+miR-19 反义核酸组相比, ²⁾ $P<0.05$ 。B-miR-19 增强反义核酸增强 Bad 与 Bcl-2 和 Bcl-xl 蛋白的相互作用; 与 NCO 组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与多柔比星+miR-19 反义核酸组相比, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 4 MiR-19 antisense oligonucleotides promoted the interaction with Bad and Bcl-2/Bcl-xl through the PTEN/PI3K/AKT pathway($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

A-miR-19 antisense oligonucleotides inhibited the phosphorylation of PI3K, AKT, and Bad; compared with the NCO group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the doxorubicin+ miR-19 antisense oligonucleotides group, ²⁾ $P<0.05$ 。B-miR-19 antisense oligonucleotides enhanced the interaction with the Bad and the Bcl-2 as well as the Bcl-xl; compared with the NCO group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the doxorubicin+ miR-19 antisense oligonucleotides group, ²⁾ $P<0.05$ 。

的 caspase-9 和 caspase-3 的活化(图 5A), 最后诱导 CD133⁺ HT29 细胞亚群发生凋亡(图 5B)。另外, 转染 PTEN siRNA 后多柔比星联合 miR-19 反义核酸诱导的 Bcl-2 和 Bcl-xl 的失活和凋亡的发生均受到显著抑制, 表明 miR-19 反义核酸通过上调 PTEN 的表达促进多柔比星诱导的凋亡途径。

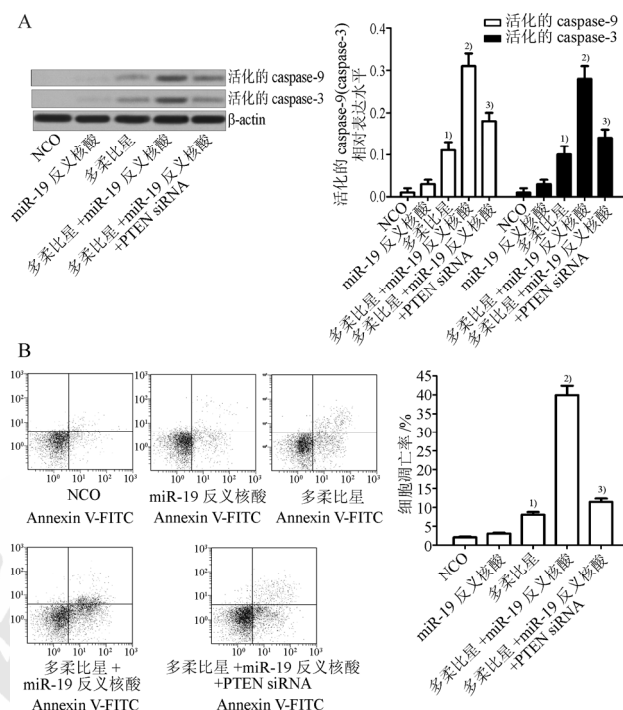


图 5 MiR-19 反义核酸提高多柔比星对 CD133⁺ HT29 细胞亚群的凋亡诱导活性($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

A-miR-19 反义核酸促进多柔比星依赖的 caspase-9 和 caspase-3 的活化; 与 NCO 相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与多柔比星组相比, ²⁾ $P<0.05$; 与多柔比星+miR-19 反义核酸组相比, ³⁾ $P<0.05$ 。B-miR-19 反义核酸促进多柔比星依赖的凋亡的发生; 与 NCO 相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与多柔比星组相比, ²⁾ $P<0.05$; 与多柔比星+miR-19 反义核酸组相比, ³⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 5 MiR-19 antisense oligonucleotides increased the sensitivity of CD133⁺ HT29 cell subsets to doxorubicin-induced apoptosis($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

A-miR-19 antisense oligonucleotides promoted the doxorubicin-dependent activation of caspase-9 and caspase-3; compared with the NCO group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the doxorubicin group, ²⁾ $P<0.05$; compared with the doxorubicin + antisense oligonucleotides group, ³⁾ $P<0.05$ 。B-miR-19 antisense oligonucleotides promoted the doxorubicin-dependent apoptosis in the CD133⁺ HT29 cell subsets; compared with the NCO group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the doxorubicin group, ²⁾ $P<0.05$; compared with the doxorubicin + antisense oligonucleotides group, ³⁾ $P<0.05$ 。

4 讨论

研究表明 miR-19 在多种肿瘤中是一个肿瘤促进因子, 如 Li 等^[10]发现 miR-19 在肺癌细胞中过表达, 且 miR-19 能通过促进肿瘤细胞的上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition)促进肿瘤的侵袭和转移。在结直肠癌中, 也有报道表明 miR-19

通过下调谷氨酰胺转移酶-2 的表达诱导肿瘤细胞发生转移^[11],然而 miR-19 在肿瘤干细胞中的作用,至今仍很少报道。在本研究中,实验结果显示 3 种结直肠癌细胞系的 miR-19 水平显著高于正常结肠上皮细胞系 FHC,提示 miR-19 在结直肠癌中起肿瘤促进作用,这与文献报道一致。更为重要的是,实验结果显示 miR-19 在 CD133⁺ HT29 细胞亚群中异常高表达,而阻断 miR-19 后该群细胞对多柔比星的敏感性显著提高,表明 miR-19 反义核酸能以 CD133⁺细胞为靶点提高多柔比星对结直肠癌的治疗效果。

PTEN 是一种已知的抑癌基因,能通过抑制 PI3K/AKT 信号通路阻断肿瘤的发生。研究表明 PTEN 在多种肿瘤中表达失调,PTEN 基因的突变或缺失是肿瘤发生的一个独立危险因素^[12-13]。最近的文献报道 PTEN 的表达受 miRNAs 的调控,因此 miRNAs/PTEN 通路和肿瘤的生长、迁移、侵袭和化疗抵抗密切相关^[14-15]。在本研究中,作者发现 PTEN 基因在结直肠癌 CD133⁺细胞中受 miR-19 的调控,且 miR-19/PTEN 通路决定了 CD133⁺ HT29 细胞亚群对多柔比星的敏感性。

Bad 是 Bcl-2 促凋亡蛋白家族成员,是 AKT 激酶的底物。非磷酸化的 Bad 能与抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-xl 结合,使之失活从而发挥促凋亡作用。然而,当 Bad 被 PI3K/AKT 途径磷酸化后,磷酸化的 Bad 会从其与 Bcl-2 或 Bcl-xl 形成的异二聚体中分离出来,并与 14-3-3 支架蛋白结合从而失去促凋亡活性^[16-17]。本研究的实验结果表明 miR-19 反义核酸能上调结直肠癌干细胞中的 PTEN 表达水平,从而抑制肿瘤细胞的 PI3K/AKT 通路,使 Bad 蛋白保持在非磷酸化活性状态中,从而抑制 Bcl-2 和 Bcl-xl 的抗凋亡活性提高了 CD133⁺ HT29 细胞亚群对多柔比星诱导的凋亡通路的敏感性。

综上所述,本研究证明了 miR-19 反义核酸能显著降低结直肠癌 CD133⁺细胞对多柔比星的抵抗性。通过机制研究发现,miR-19 反义核酸通过上调 PTEN 的表达抑制 PI3K/AKT/Bad 信号通路,从而促进多柔比星对 CD133⁺细胞的凋亡诱导活性。这些研究为如何提高多柔比星对结直肠癌的疗效提供了新的思路。

REFERENCES

- [1] SCHMOHL J U, VALLERA D A. CD133, selectively targeting the root of cancer [J]. *Toxins (Basel)*, 2016, 8(6): E165.
- [2] ZHANG G F, LI C X, CHEN H B, et al. Cancer stem cell targets-a review [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(10): 2045-2051.
- [3] DU Z, YU Y, ZHANG W. Adverse events of bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer: a meta-analysis [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2012, 29(6): 542-547.
- [4] KANNO S I, YOMOGIDA S, ISHIKAWA M, et al. Combined effect of papuamine and doxorubicin in human breast cancer MCF-7 cells [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(2): 547-550.
- [5] ATASHPOUR S, FOULADDEL S, AZIZI E, et al. Quercetin induces cell cycle arrest and apoptosis in CD133(+) cancer stem cells of human colorectal HT29 cancer cell line and enhances anticancer effects of doxorubicin [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2015, 18(7): 635-643.
- [6] GARGALIONIS A N, BASDRA E K. Insights in microRNAs biology [J]. *Curr Top Med Chem*, 2013, 13(13): 1493-1502.
- [7] HE H, TIAN W, JIANG K, et al. MiR-944 functions as a novel oncogene and regulates the chemoresistance in breast cancer [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(2): 1599-1607.
- [8] TAO Y J, LI Y J, XU L, et al. Antisense oligonucleotides against microRNA-21 reduced the proliferation and migration of human colon carcinoma cells [J]. *Cancer Cell Int*, 2015, 15(1): 1-10.
- [9] DOU J, NI Y, ZHAO F, et al. Decreasing lncRNA HOTAIR expression inhibits human colorectal cancer stem cells [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(1): 98-108.
- [10] LI J, YANG S, XIAO D, et al. MicroRNA-19 triggers epithelial-mesenchymal transition of lung cancer cells accompanied by growth inhibition [J]. *Lab Invest*, 2015, 95(9): 1056-1070.
- [11] CELLURA D, PICKARD K, PEAKE N J. miR-19-Mediated Inhibition of Transglutaminase-2 Leads to Enhanced Invasion and Metastasis in Colorectal Cancer [J]. *Mol Cancer Res*, 2015, 13(7): 1095-1105.
- [12] TAY Y, KATS L, PANDOLFI P P. Codingindependent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs [J]. *Cell*, 2011, 147(2): 344-357.
- [13] XU W, YANG Z, LU N, et al. Posttranslational regulation of phosphatase and tensin homolog (PTEN) and its functional impact on cancer behaviors [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2014, 8(10): 1745-1751.
- [14] WU W, YANG J, ZHOU Y, et al. MicroRNA-32 (miR-32) regulates phosphatase and tensin homologue (PTEN) expression and promotes growth, migration, and invasion in colorectal carcinoma cells [J]. *Mol Cancer*, 2013, 12(1): 186-195.
- [15] MA F, ZHANG J, GUO B, et al. Upregulated microRNA-301a in breast cancer promotes tumor metastasis by targeting PTEN and activating Wnt/beta-catenin signaling [J]. *Gene*, 2014, 535(2): 191-197.
- [16] FU Z, YANG J, LI J, et al. Effects of piceatannol and pterostilbene against β -amyloid-induced apoptosis on the PI3K/Akt/Bad signaling pathway in PC12 cells [J]. *Food Funct*, 2016, 7(2): 1014-1023.
- [17] ZHANG H, XIONG Z, ZHANG Z, et al. Glucagon-like peptide-1 protects cardiomyocytes from advanced oxidation protein product-induced apoptosis via the PI3K/Akt/Bad signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(2): 1593-601.

收稿日期: 2016-06-16