

## miRNA-19b对结肠癌细胞增殖活性的影响

程秀琴, 张迎娣, 张红杰

### ■背景资料

微小RNA(micro RNA, miRNA)是一类非编码单链小分子RNA, 可在转录后水平调控靶基因的表达, 参与个体发育、细胞凋亡、增殖等生命活动。miR-17-92是首个发现的非编码致癌基因簇。miR-19b是该基因簇中的一员, 在结肠癌组织中高表达。经生物信息学预测发现, 细胞因子信号转导抑制蛋白3(suppressor of cytokine signaling, SOCS3)是miR-19b的靶基因之一。SOCS3在结肠癌中低表达。miR-19b的促癌作用可能与靶向调控SOCS3相关。

程秀琴, 张迎娣, 张红杰, 南京医科大学第一附属医院消化内科 江苏省南京市 210029  
 程秀琴, 在读硕士, 主要从事消化系统炎症性肠病的基础和临床研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81270469

作者贡献分布: 此课题由张红杰设计; 研究过程由程秀琴与张迎娣操作完成; 数据分析由程秀琴与张迎娣完成; 本论文由张红杰与程秀琴撰写完成。

通讯作者: 张红杰, 主任医师, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院消化内科。

hjjzhang06@163.com

电话: 025-68136255

收稿日期: 2015-01-24 修回日期: 2015-03-13

接受日期: 2015-03-18 在线出版日期: 2015-04-08

### miRNA-19b regulates proliferation of human colon cancer cell line HT-29

Xiu-Qin Cheng, Ying-Di Zhang, Hong-Jie Zhang

Xiu-Qin Cheng, Ying-Di Zhang, Hong-Jie Zhang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81270469

Correspondence to: Hong-Jie Zhang, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. hjzhang06@163.com

Received: 2015-01-24 Revised: 2015-03-13

Accepted: 2015-03-18 Published online: 2015-04-08

### Abstract

**AIM:** To investigate whether miR-19b influences the proliferation of human colon cancer cell line HT-29 and the possible mechanisms.

**METHODS:** Potential targets of miR-19b were predicted using computer-aided algorithms TargetScan, PicTar and microRNA.org. We

transfected HT-29 cells with synthetic miR-19b mimic or miR-19b inhibitor using Lipofectamine 2000 to up-regulate or down-regulate miR-19b. Protein levels of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3), cyclinD1, signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and phosphorylated-STAT3 (p-STAT3) were determined by Western blot. CCK8 and flow cytometry were conducted for the detection of proliferation ability and cell cycle of the treated cells.

**RESULTS:** Compared to control cells, overexpression of miR-19b in HT-29 cells down-regulated the protein level of SOCS3 ( $P < 0.01$ ), but not that of SOCS3 mRNA. Furthermore, down-regulation of SOCS3 by miR-19b caused phosphorylation of STAT3 ( $P < 0.01$ ) as well as induced expression of cyclinD1 ( $P < 0.01$ ), which could promote cell proliferation ( $P < 0.01$ ) by transition from G<sub>1</sub> phase to S and G<sub>2</sub> phase ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). On the contrary, down-regulation of miR-19b in HT-29 cells could restrain cell proliferation ( $P < 0.01$ ), restore cell arrest ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), activate STAT3 ( $P < 0.01$ ) and induce expression of cyclinD1 ( $P < 0.01$ ) due to up-regulated expression of SOCS3 ( $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Expression of miR-19b not only regulates the proliferation but also influences the cell cycle of HT-29 cells, possibly by inhibiting the expression of SOCS3.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Colon neoplasms; miR-19b; Cell proliferation; Cell cycle

### ■同行评议者

卢宁, 副主任医师, 中国人民解放军兰州军区乌鲁木齐总医院肿瘤科

Cheng XQ, Zhang YD, Zhang HJ. miRNA-19b regulates proliferation of human colon cancer cell line HT-29. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(10): 1568-1576 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/1568.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i10.1568>

## 摘要

**目的:** 探讨miR-19b对结肠癌细胞HT-29增殖的影响及可能的机制。

**方法:** 生物信息学软件预测miR-19b的靶基因, 采用脂质体介导的转染方法将miR-19b模拟物或抑制物转染到人结肠癌细胞系HT-29; 检测转染后miR-19b和靶基因的表达; 利用CCK8试剂盒检测细胞的增殖能力, 流式细胞术检测miR-19b对细胞增殖周期的影响。

**结果:** 在结肠癌细胞HT-29中高表达miR-19b可显著降低细胞因子信号转导抑制蛋白3(suppressor of cytokine signaling, SOCS3)的表达( $P<0.01$ ), 促进信号转导与转录激活子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)的磷酸化及细胞周期蛋白D1(cyclinD1)的表达( $P<0.01$ ); 相反, 抑制miR-19b后细胞内SOCS3蛋白的表达显著增加( $P<0.01$ ), STAT3的磷酸化及cyclinD1的表达均下降( $P<0.01$ )。HT-29细胞内miR-19b的变化不影响细胞中SOCS3的mRNA水平。同时, CCK8检测发现升高miR-19b的水平可促进细胞的增殖( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), 流式结果表明高表达miR-19b后处于增殖期细胞比例较对照组升高( $P<0.01$ ), 降低miR-19b的水平, 增殖期的细胞比例下降( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), 抑制细胞的增殖( $P<0.01$ )。

**结论:** miR-19b的表达可影响结肠癌细胞周期, 促进结肠癌细胞的增殖活性, 可能通过靶向调控SOCS3的表达来实现。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:** 结肠肿瘤; miR-19b; 细胞增殖; 细胞周期

**核心提示:** miR-19b可能通过负性调控细胞因子信号转导抑制蛋白3(suppressor of cytokine signaling)的表达影响信号转导与转录激活子3(signal transducer and activator of transcription 3)的磷酸化, 促进细胞增殖, 诱导结肠癌的发生。

程秀琴, 张迎娣, 张红杰. miRNA-19b对结肠癌细胞增殖活性的影响. *世界华人消化杂志* 2015; 23(10): 1568-1576 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/1568.asp>

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/1568.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i10.1568>

## 0 引言

近年随着人们生活水平的提高, 饮食结构的改变, 我国结肠癌发病率上升<sup>[1,2]</sup>。其死亡率在我国也明显增加<sup>[3]</sup>。目前结肠癌发生机制尚未完全阐明, 其发生发展与遗传、饮食、环境等因素密切相关。因而开展结肠癌发病机制研究, 为寻找新的诊断及治疗靶点具有重要意义。

近年来, 微小RNA(micro RNA, miRNA)作为新的研究切入点, 为癌症的诊断与治疗开辟了一条新途径<sup>[4,5]</sup>。miRNA是一类非编码单链小分子RNA, 约20-23个核糖核苷酸, 可与靶基因mRNA的3'端非翻译区(3' untranslated region, 3'UTR)互补结合, 降解靶基因的mRNA或抑制其翻译, 在转录后水平负性调控靶基因的表达, 参与个体发育、细胞凋亡、增殖等生命活动<sup>[6-8]</sup>。

大部分miRNA在基因组上定位于与肿瘤相关的脆性位点(fragile site)<sup>[9]</sup>, 提示miRNA在肿瘤发生过程中起着至关重要的作用, 其功能可能类似于抑癌基因和原癌基因。miR-19b是致癌基因簇miR-17-92中的一员<sup>[10]</sup>, 该基因簇可通过调节某些靶基因而发挥促癌作用<sup>[11]</sup>, 参与癌症的发生, 如miR-92a在结肠癌中明显升高, 可靶向调节B细胞慢性淋巴细胞白血病/淋巴瘤(B-cell CLL/lymphoma 2, Bcl-2)蛋白家族促凋亡成员之一Bim基因的表达, 影响细胞凋亡参与结肠癌发生发展<sup>[10]</sup>。有研究<sup>[12]</sup>表明, miR-19b在结肠癌组织中呈高表达。miR-19b对细胞增殖有着怎样的影响尚不明确。本研究旨在探讨miR-19b对结肠癌细胞增殖的影响及其可能机制, 为寻找结肠癌新治疗途径提供新的视角。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** HT-29细胞购自上海细胞库; McCoy's 5A培养基和胎牛血清(FBS)(Gibco, 美国); Lipofectamine 2000(Invitrogen, 美国); miR-19b模拟物(mimic)、模拟物对照(mimic nc)、抑制物(inhibitor)、抑制物对照(inhibitor nc)(GenePharma, 上海); 细胞因子信号转导抑制蛋白3(suppressor of cytokine signaling, SOCS3) mRNA primer(Invitrogen); TRIzol(Invitrogen); 强效蛋白裂解液(Beyotime, 中国); 兔SOCS3抗体

## ■ 研究前沿

SOCS3与细胞增殖相关, 在结肠癌中低表达。miR-19b是致癌基因, 在结肠癌中高表达, 其具体致癌机制仍不明确。寻找新的结肠癌研究靶点是亟需解决的问题。

## ■ 相关报道

Han等发现miR-19b可在转录后水平负性调控SOCS3的表达, 参与动脉粥样硬化的发生. SOCS3在多种癌症低表达, 可诱导信号转导与转录激活子3(signal transducer and activator of transcription 3)的磷酸化, 有利于肿瘤细胞的增殖及存活, 促进癌症的发生.

(Abcam, 美国); 兔细胞周期蛋白D1(cyclinD1)、信号转导与转录激活子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、p-STAT3(CST, 美国); 鼠 $\alpha$ -Tubulin(Beyotime, 中国); HRP标记的羊抗兔、羊抗鼠二抗(Santa Cruz, 美国); AMV酶、dNTP、Taq酶(TaKaRa, 中国); 显影液(Thermo, 美国); CCK8试剂盒(上海和元生物); PI染液(Invitrogen).

## 1.2 方法

1.2.1 HT-29细胞的培养及细胞转染: HT-29细胞接种于10%FBS的McCoy's 5A培养基中, 37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中培养, 至对数生长期用于实验. 细胞铺于6孔板中, 待细胞长至70%密度时根据Lipofectamine 2000说明书转染等量的miR-19b mimic和mimic nc、miR-19b inhibitor和inhibitor nc, 6 h后换成2%FBS培养基, 培养24 h或48 h后检测RNA或蛋白SOCS3、STAT3、p-STAT3、cyclinD1的表达.

1.2.2 实时荧光定量PCR(qRT-PCR): 从转染miR-19b mimic或inhibitor 24 h后的HT-29细胞中提取总RNA, 1  $\mu$ g总RNA用于逆转录, 反应条件为16 °C 30 min, 42 °C 30 min及85 °C 5 min. 1  $\mu$ L RT产物构建20  $\mu$ L PCR体系扩增miR-19b、U6、SOCS3 mRNA及GAPDH, 引物序列: SOCS3(sense): 5'-GGAGTTCCTGGACCAG-TACG-3', SOCS3(antisense): 5'-TTCTTGTGCTTGTGCCATGT-3', GAPDH(sense): 5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3', GAPDH(antisense): 5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'. mRNA扩增参数为95 °C预变性5 min, 95 °C 15 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 扩增40个循环. miRNA扩增参数为95 °C预变性5 min, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 扩增40个循环. 相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示, 其中SOCS3 mRNA的 $\Delta C_t = C_{t_{SOCS3 \text{ mRNA}}} - C_{t_{GAPDH}}$ , miR-19b的 $\Delta C_t = C_{t_{miR-19b}} - C_{t_{U6}}$ , 两者的 $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{处理组}} - \Delta C_{t_{对照组}}$ .

1.2.3 Western blot分析: 细胞处理后去掉培养液, 用PBS洗1遍, 胰酶消化后低速离心, 用PBS再洗2遍, 离心收集细胞. 加入裂解液后冰上裂解30 min, 提取细胞总蛋白. 所有样本均用BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量, 加入Loading buffer后煮沸变性. 用10%SDS-PAGE进行凝胶电泳, 经电转移至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭1 h, 加入SOCS3抗体(1:1000)、STAT3抗体(1:1000)、磷酸化STAT3

抗体(1:1000)或cyclinD1抗体(1:1000), 4 °C过夜. TBST洗膜3次 $\times$ 10 min后, 加入羊抗兔抗体(1:4000), 37 °C孵育1 h, 再行TBST洗膜3次 $\times$ 10 min, 加入显影液后孵育曝光. 实验在相同的条件下重复3次.

1.2.4 CCK8测细胞增殖能力: 取对数生长期细胞 $1 \times 10^5$ /mL悬液每孔100  $\mu$ L接种于96孔板中随机分组, 每组设6个复孔. 培养24 h后弃去培养基. 按说明书对照组加入Lipofectamine 2000及miR-19b mimic nc或inhibitor nc, 实验组加入Lipofectamine 2000及miR-19b mimic或inhibitor. 余加上无血清培养基补足到每孔100  $\mu$ L. 6 h后换成2%FBS的培养基. 于转染后12、24、36、48 h给予每孔10  $\mu$ L的CCK8试剂. 各组37 °C孵育2 h后在450 nm波长下的酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度取各组平均吸光度. 每组实验重复3次.

1.2.5 流式细胞术测定细胞周期: 取对数生长期细胞悬液每孔500  $\mu$ L接种于24孔板中培养24 h弃去培养基随机分组. 按照说明书对照组加入Lipofectamine 2000和miR-19b mimic nc或inhibitor nc, 实验组加入Lipofectamine 2000及miR-19b mimic或inhibitor. 无血清培养基补足各孔至500  $\mu$ L, 6 h后换成2%FBS的培养基, 再培养24 h后收集细胞. 低速离心5 min加入PBS洗涤细胞2次, 离心去除PBS加入1 mL预冷乙醇4 °C过夜. 低速离心5 min后加入PBS洗涤细胞2次, 加入含0.3% Triton和50  $\mu$ g/mL RNaseA的PBS, 37 °C孵育30 min. 离心后PBS洗2遍, 收集细胞加入PI染液700  $\mu$ L 37 °C避光染色15 min. 取 $10^4$ 个细胞在BD FACS流式细胞仪分析每个样品. FlowJo软件进行曲线拟合分析计算DNA含量得出细胞周期百分比.

**统计学处理** 受试样品数据以mean $\pm$ SD表示. 所有数据采用SPSS20.0处理, 进行统计学分析. 两组之间比较用 $t$ 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义.

## 2 结果

2.1 miR-19b在HT-29细胞中的转染效率 HT-29细胞转染miR-19b mimic 24 h后, 经qRT-PCR检测发现细胞内的miR-19b水平较对照组明显升高( $P < 0.01$ ). 反之, 转染miR-19b inhibitor后, HT-29细胞内的miR-19b水平较对照组显著下降( $P < 0.01$ ). 说明脂质体介导的miR-19b细胞转



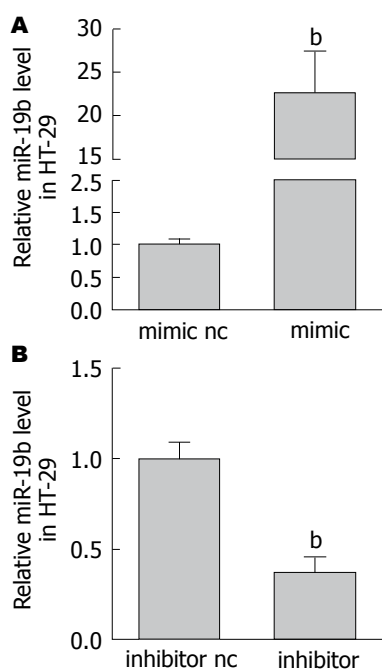


图1 miR-19b在HT-29细胞中的转染效率。A: 转染miR-19b mimic后对HT-29细胞内miR-19b的水平; B: 转染miR-19b inhibitor后对HT-29细胞内miR-19b的水平。<sup>b</sup> $P<0.01$  vs 对照组。miR-19b mimic: miR-19b模拟物; mimic nc: miR-19b模拟物对照组; miR-19b inhibitor: miR-19b抑制物; inhibitor nc: miR-19b抑制物对照组。

染成功(图1)。

2.2 过表达及抑制miR-19b对HT-29细胞增殖能力的影响 采用CCK8检测法, 观察miR-19b对HT-29细胞增殖活力的影响。结果显示高表达miR-19b, 结肠癌HT-29细胞的增殖能力在24、36、48 h均较对照组明显升高, 差异有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。反之, 降低miR-19b水平, HT-29细胞增殖能力在24、36、48 h均较对照组明显下降( $P<0.01$ )。提示miR-19b与结肠癌HT-29细胞的增殖能力成正相关(图2)。

2.3 过表达及抑制miR-19b对细胞周期的影响 HT-29细胞转染miR-19b mimic和mimic nc 24 h后进行流式细胞术分析, 结果显示miR-19b mimic组G<sub>1</sub>期细胞的比例低于对照组( $72.45\% \pm 0.58\%$  vs  $83.77\% \pm 0.43\%$ ), S期及G<sub>2</sub>期细胞比例分别占 $14.67\% \pm 0.98\%$ 、 $9.85\% \pm 0.64\%$ , 明显高于与对照组( $8.08\% \pm 1.05\%$ 、 $6.14\% \pm 0.63\%$ )。提示过表达miR-19b可使结肠癌HT-29细胞G<sub>1</sub>期的细胞比例减少, 促进细胞向增殖周期(S+G<sub>2</sub>)期转变( $P<0.01$ )。同时, 用流式细胞术检测HT-29细胞转染miR-19b inhibitor和inhibitor nc 24 h后的细胞周期变化。miR-19b

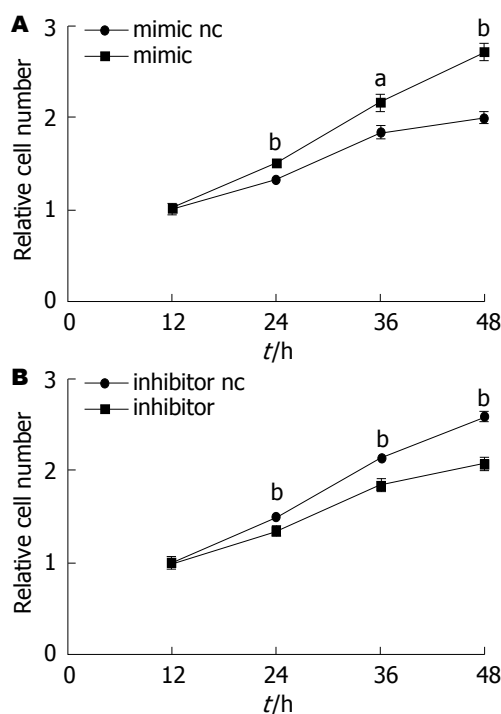


图2 过表达或抑制miR-19b对HT-29细胞增殖能力的影响。A: 过表达miR-19b对HT-29细胞增殖能力的影响; B: 抑制miR-19b对HT-29细胞增殖能力的影响。<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 对照组。miR-19b mimic: miR-19b模拟物; mimic nc: miR-19b模拟物对照组; miR-19b inhibitor: miR-19b抑制物; inhibitor nc: miR-19b抑制物对照组。

inhibitor组G<sub>1</sub>期的细胞比例( $83.27\% \pm 0.75\%$ )高于对照组( $77.18\% \pm 0.79\%$ ), 细胞S期及G<sub>2</sub>期分别占 $6.21\% \pm 0.68\%$ 、 $6.47\% \pm 0.22\%$ , 明显低于与对照组( $10.96\% \pm 0.37\%$ 、 $10.52\% \pm 1.14\%$ )。说明抑制miR-19b可以抑制HT-29细胞增殖, 使G<sub>1</sub>期的细胞比例增多, 抑制细胞向增殖周期(S+G<sub>2</sub>)期转变( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。综上实验结果说明, miR-19b可通过影响细胞周期而改变细胞的增殖活性(图3)。

2.4 miR-19b对HT-29细胞的SOCS3 mRNA及蛋白表达的影响 SOCS3是细胞增殖相关的重要细胞因子。同时经生物信息学预测SOCS3可能是miR-19b的靶基因。本研究推测miR-19b对细胞增殖能力的影响是否是通过负性调控细胞内SOCS3的表达而发挥作用。

HT-29细胞转染miR-19b mimic或inhibitor 24 h后, 用qRT-PCR检测细胞内的SOCS3 mRNA, 发现SOCS3 mRNA在mimic或inhibitor组中较对照组差异均无统计学意义。转染后48 h提取细胞总蛋白, 用Western blot检测细胞内SOCS3的蛋白水平。过表达miR-19b可明显抑制HT-29细胞内SOCS3蛋白的表达( $P<0.01$ ), 抑

#### 创新点

本研究首次探讨了结肠癌中高表达的miR-19b对SOCS3蛋白的调控及可能机制, 进一步证实了miR-19b可能参与结肠癌的发生, 为结肠癌的诊疗提供新的研究方向。

## 应用要点

本研究发现, miR-19b可在转录后水平靶向调控SOCS3的表达, 高表达miR-19b可抑制SOCS3的表达, 促进细胞增殖. 与结肠癌组织中miR-19b及SOCS3的表达一致, 从而为临床上结肠癌的治疗提供可能的新途径.

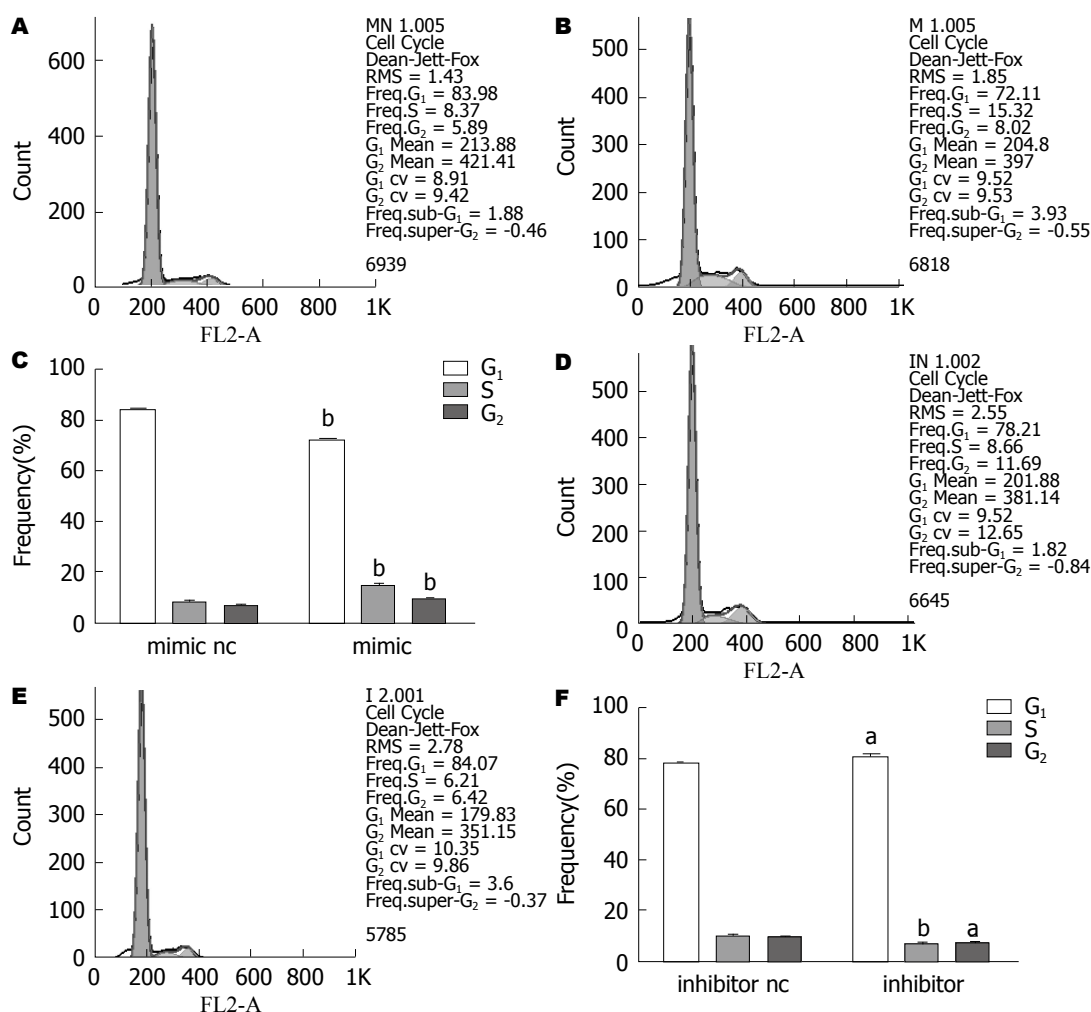


图3 过表达或抑制miR-19b对细胞周期的影响. A: mimic nc组; B: mimic组; C: 过表达miR-19b的细胞周期变化; D: inhibitor nc组; E: inhibitor组; F: 抑制miR-19b的细胞周期变化. <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组. miR-19b mimic: miR-19b模拟物; mimic nc: miR-19b模拟物对照组; miR-19b inhibitor: miR-19b抑制物; inhibitor nc: miR-19b抑制物对照组.

制miR-19b则促进HT-29细胞内SOCS3蛋白的表达( $P < 0.01$ ). 结合图4所示, 改变HT-29细胞内的miR-19b不影响SOCS3 mRNA的表达, 但可影响SOCS3的蛋白水平, 提示miR-19b可能在转录后水平抑制SOCS3的表达, 与miRNA的经典生物调控方式一致<sup>[6,7]</sup>(图4).

**2.5 miR-19b调控SOCS3蛋白表达影响STAT3的磷酸化** SOCS3是JAK/STAT3的负性调控者<sup>[13,14]</sup>. 高表达miR-19b可抑制HT-29细胞内SOCS3蛋白的表达, 同时促进细胞内STAT3的磷酸化( $P < 0.01$ ). 降低HT-29细胞中miR-19b可促进SOCS3蛋白的表达, 进而抑制STAT3的磷酸化( $P < 0.01$ ). 提示miR-19b对SOCS3的负性调控可能介导STAT3的磷酸化(图5).

**2.6 miR-19b对HT-29细胞周期蛋白cyclinD1表达的影响** *CyclinD1*是STAT3通路的重要下游基因, 可以调控细胞周期, 促进细胞向增殖期

S+G<sub>2</sub>期转变<sup>[15-17]</sup>. 过表达miR-19b的HT-29细胞内的STAT3磷酸化明显增加, 同时其细胞内cyclinD1的表达同步升高( $P < 0.01$ ). 抑制miR-19b则减少HT-29细胞内STAT3的磷酸化, 进而减少细胞内cyclinD1的表达( $P < 0.01$ ). 而我们之前的结果2和结果3均提示miR-19b有促进细胞向增殖周期转化, 增殖能力提高, 提示miR-19b可能是通过改变细胞内cyclinD1的表达从而调控细胞周期, 影响细胞增殖(图6).

## 3 讨论

结肠癌是消化系常见的恶性肿瘤, 其发病在世界范围内男性居各恶性肿瘤第3位, 女性居第2位<sup>[18]</sup>. 目前结肠癌发生发展的确切机制尚未完全明了. miRNA是新发现的一类小分子RNA. 研究<sup>[19,20]</sup>表明, 血清中特异性表达的miRNA有望成为结肠癌新的早期监测指标. 另外, 在肿

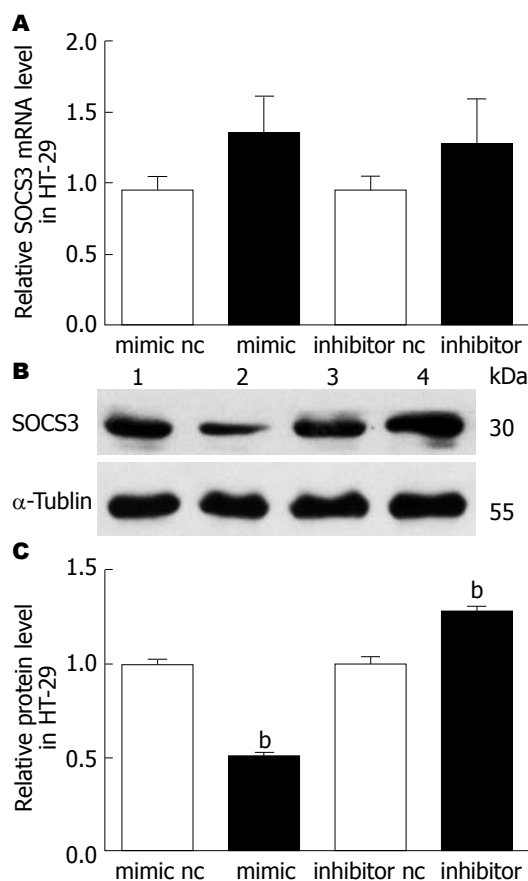


图 4 miR-19b对HT-29细胞的SOCS3 mRNA及蛋白表达的影响。A: miR-19b对HT-29细胞的SOCS3 mRNA的影响; B: Western blot检测SOCS3蛋白表达; C: SOCS3蛋白灰度分析结果。1: mimic nc; 2: mimic; 3: inhibitor nc; 4: inhibitor. <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组。miR-19b mimic: miR-19b模拟物; mimic nc: miR-19b模拟物对照组; miR-19b inhibitor: miR-19b抑制物; inhibitor nc: miR-19b抑制物对照组。

瘤组织中, 不同的组织来源和分期可能存在不同的miRNA表达谱<sup>[21]</sup>, 异常表达的miRNA与细胞周期的调控<sup>[22]</sup>及癌细胞对化疗药物的敏感性相关<sup>[23]</sup>, 并可根据miRNA的表达谱对多种低分化肿瘤进行分类<sup>[24]</sup>, 表明miRNA在结肠癌的筛选、早期诊断、肿瘤缓解和防止复发等方面有着重要的应用前景<sup>[25]</sup>。

miR-17-92是首个发现的非编码致癌基因簇<sup>[26]</sup>, 包括6个成熟的miRNA: miR-17、miR-18a、miR-19a、miR-20a、miR-19b和miR-92a<sup>[10]</sup>。在多种癌症中高表达, 抑制细胞凋亡<sup>[26,27]</sup>, 在B细胞淋巴瘤中, 过表达的miR-19可以抑制抑癌基因同源性磷酸酶-张力蛋白(phosphatase and tensin homolog, PTEN)的表达, 进而促进细胞的增殖和恶变<sup>[28]</sup>。5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)可以影响肿瘤细胞的细胞周期发挥抗肿瘤的作用, 而miR-19b在

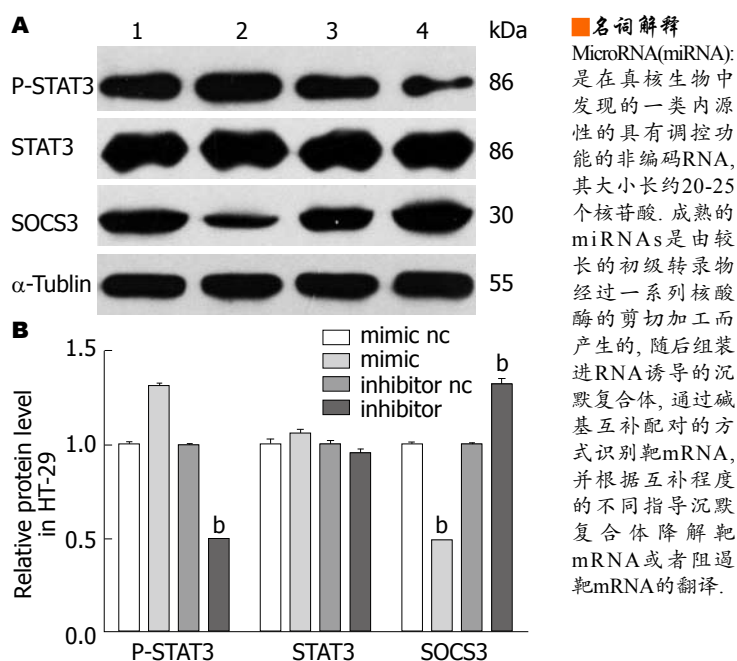


图 5 miR-19b调控SOCS3蛋白表达影响STAT3的磷酸化。A: Western blot检测miR-19b对SOCS3蛋白、STAT3及STAT3磷酸化水平的影响; B: 灰度分析miR-19b调控过程中SOCS3蛋白、STAT3及STAT3磷酸化水平。1: mimic nc; 2: mimic; 3: inhibitor nc; 4: inhibitor. <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组。miR-19b mimic: miR-19b模拟物; mimic nc: miR-19b模拟物对照组; miR-19b inhibitor: miR-19b抑制物; inhibitor nc: miR-19b抑制物对照组。

DLD-1/R结肠癌细胞系中升高, 作用于细胞增殖相关蛋白人脯氨酸/谷氨酸富含性剪切因子(splicing factor proline/glutamine-rich, SFPQ)和禽急性髓细胞白血病病毒致癌基因同源基因2(v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 2, MYBL2), 导致5-FU的抗肿瘤作用失效<sup>[29]</sup>。说明miR-19b可能介导了化疗药物的耐药性<sup>[10,12,28,29]</sup>。miR-19b可促进结肠腺瘤向结肠腺癌转变<sup>[30]</sup>, 与癌症患者的生存率成负相关<sup>[12]</sup>。在正常肠上皮中, miR-17-92基因簇参与肠上皮的分化成熟和自我更新。但在结肠癌组织中, 升高的miR-17-92可以抑制转录因子E2F1(E2F transcription factor 1)的表达, 促进细胞增殖及抑制细胞凋亡<sup>[10]</sup>。miR-19b作为此基因簇中的一员, 也是重要的致癌基因, 与多种癌症的发生相关<sup>[31]</sup>。文献[18,20]报道, miR-19b在结肠癌中高表达, 而SOCS3蛋白在结肠癌中表达减少<sup>[32]</sup>。

SOCS3是JAK/STAT3通路的负性调控者<sup>[13,14]</sup>。在多种癌症(如肺癌及胆管癌)中, SOCS3基因启动子的超甲基化会沉默SOCS3的生物学功能, 诱导STAT3的磷酸化, 有利于肿瘤细胞的

#### 名词解释

MicroRNA(miRNA): 是在真核生物中发现的一类内源性的具有调控功能的非编码RNA, 其大小长约20-25个核苷酸。成熟的miRNAs是由较长的初级转录物经过一系列核酸酶的剪切加工而产生的, 随后组装进RNA诱导的沉默复合体, 通过碱基互补配对的方式识别靶mRNA, 并根据互补程度的不同指导沉默复合体降解靶mRNA或者阻遏靶mRNA的翻译。

### 同行评价

本文研究设计合理, 方法正确, 结果可信, 具有一定的创新性和学术价值, 论文写作简洁、流畅, 数据分析合理正确, 为临床上结肠癌提供新的研究方向。

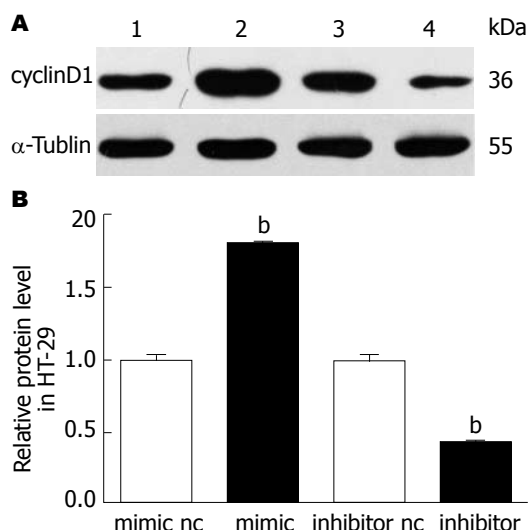


图6 miR-19b对HT-29细胞cyclinD1表达的影响。A: Western blot检测cyclinD1表达; B: cyclinD1蛋白灰度分析结果。1: mimic nc; 2: mimic; 3: inhibitor nc; 4: inhibitor。b $P<0.01$  vs 对照组。miR-19b mimic: miR-19b模拟物; mimic nc: miR-19b模拟物对照组; miR-19b inhibitor: miR-19b抑制物; inhibitor nc: miR-19b抑制物对照组。

增殖及存活, 促进癌症的发生<sup>[33-35]</sup>。而肠上皮细胞中STAT3的磷酸化可诱导上皮细胞的增殖及炎症诱导的癌症发生<sup>[36]</sup>, 与肺癌及胆管癌中STAT3的高度磷酸化可诱导细胞癌变的作用相似<sup>[33-35]</sup>。CyclinD1是STAT3的重要下游基因, STAT3对细胞增殖的影响可能是通过诱导cyclinD1等的表达<sup>[15,16]</sup>, 调节细胞的增殖周期<sup>[17]</sup>, 抑制细胞凋亡, 诱导细胞的癌变。

经生物信息学预测软件Target Scan、PicTar及microRNA.org发现, miR-19b可靶向调控SOCS3。另有研究<sup>[37]</sup>表明miR-19b可在转录后水平负性调控SOCS3的表达, 参与动脉粥样硬化的发生。提示miR-19b可通过影响SOCS3的表达从而改变细胞的功能。本研究发现, 在结肠癌HT-29细胞中, 过表达或抑制miR-19b(图1)可影响细胞的增殖能力(图2), 这一生物调节机制可能是通过在转录后水平抑制SOCS3的表达(图4)发挥作用, 而SOCS3水平的改变进一步影响STAT3的磷酸化(图5)及其下游靶基因之一细胞周期蛋白cyclinD1的表达(图6), 影响了细胞的增殖周期来调节细胞的增殖活性(图3)。以上研究提示miR-19b影响细胞增殖, 这一作用可能是通过对SOCS3的靶向调控作用, 介导了STAT3的磷酸化, 进而影响cyclinD1表达实现, 该研究与Han等<sup>[37]</sup>的研究结果类似。

总之, miR-19b的高表达能够促进结肠癌细胞的增殖活性, 影响细胞周期, 提示miR-19b在结肠癌中可能扮演致癌基因的角色, 这与其在结肠癌组织中表达上调时的生物作用一致。SOCS3可能为miR-19b的促癌作用靶点, miR-19b作为新的研究靶点也为结肠癌病因的探讨及治疗提供了新的研究方向。

## 4 参考文献

- Center MM, Jemal A, Ward E. International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 1688-1694 [PMID: 19505900 DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0090]
- 李宝国. 结肠癌诊治的回顾与展望. 齐齐哈尔医学院学报 2010; 31: 2124-2126
- Wan DS. [Epidemiologic trend of and strategies for colorectal cancer]. *Ai Zheng* 2009; 28: 897-902 [PMID: 19728903 DOI: 10.5732/cjc.008.10833]
- Chen X, Wang K, Chen J, Guo J, Yin Y, Cai X, Guo X, Wang G, Yang R, Zhu L, Zhang Y, Wang J, Xiang Y, Weng C, Zen K, Zhang J, Zhang CY. In vitro evidence suggests that miR-133a-mediated regulation of uncoupling protein 2 (UCP2) is an indispensable step in myogenic differentiation. *J Biol Chem* 2009; 284: 5362-5369 [PMID: 19073597 DOI: 10.1074/jbc.M807523200]
- Chen X, Guo X, Zhang H, Xiang Y, Chen J, Yin Y, Cai X, Wang K, Wang G, Ba Y, Zhu L, Wang J, Yang R, Zhang Y, Ren Z, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. *Oncogene* 2009; 28: 1385-1392 [PMID: 19137007 DOI: 10.1038/onc.2008.474]
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297 [PMID: 14744438 DOI: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5]
- Chen K, Rajewsky N. Deep conservation of microRNA-target relationships and 3'UTR motifs in vertebrates, flies, and nematodes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2006; 71: 149-156 [PMID: 17381291 DOI: 10.1101/sqb.2006.71.039]
- 姚育红, 廖爱军, 陈娟, 戴勇. miR-181a、miR-181b在人胃癌细胞和组织中的表达. 世界华人消化杂志 2015; 23: 30-36
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 2999-3004 [PMID: 14973191 DOI: 10.1073/pnas.0307323101]
- Tsuchida A, Ohno S, Wu W, Borjigin N, Fujita K, Aoki T, Ueda S, Takanashi M, Kuroda M. miR-92 is a key oncogenic component of the miR-17-92 cluster in colon cancer. *Cancer Sci* 2011; 102: 2264-2271 [PMID: 21883694 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.02081.x]
- Monzo M, Navarro A, Bandres E, Artells R, Moreno I, Gel B, Ibeas R, Moreno J, Martinez F, Diaz T, Martinez A, Balagué O, Garcia-Foncillas J. Overlapping expression of microRNAs in human embryonic colon and colorectal cancer. *Cell Res*



- 2008; 18: 823-833 [PMID: 18607389 DOI: 10.1038/cr.2008.81]
- 12 Yu G, Tang JQ, Tian ML, Li H, Wang X, Wu T, Zhu J, Huang SJ, Wan YL. Prognostic values of the miR-17-92 cluster and its paralogs in colon cancer. *J Surg Oncol* 2012; 106: 232-237 [PMID: 22065543 DOI: 10.1002/jso.22138]
  - 13 Suzuki A, Hanada T, Mitsuyama K, Yoshida T, Kamizono S, Hoshino T, Kubo M, Yamashita A, Okabe M, Takeda K, Akira S, Matsumoto S, Toyonaga A, Sata M, Yoshimura A. CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation. *J Exp Med* 2001; 193: 471-481 [PMID: 11181699 DOI: 10.1084/jem.193.4.471]
  - 14 Park EJ, Park SY, Joe EH, Jou I. 15d-PGJ2 and rosiglitazone suppress Janus kinase-STAT inflammatory signaling through induction of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) and SOCS3 in glia. *J Biol Chem* 2003; 278: 14747-14752 [PMID: 12584205 DOI: 10.1074/jbc.M210819200]
  - 15 李敏, 周颖, 彭程, 冯定庆, 李彩荣, 凌斌, 肖卫华. STAT3、cyclinD1、cyclinB1在卵巢上皮性癌的表达及意义. *现代妇产科进展* 2008; 17: 745-747
  - 16 Alvarez JV, Frank DA. Genome-wide analysis of STAT target genes: elucidating the mechanism of STAT-mediated oncogenesis. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 1045-1050 [PMID: 15539936 DOI: 10.4161/cbt.3.11.1172]
  - 17 Michaud-Levesque J, Bousquet-Gagnon N, Béliveau R. Quercetin abrogates IL-6/STAT3 signaling and inhibits glioblastoma cell line growth and migration. *Exp Cell Res* 2012; 318: 925-935 [PMID: 22394507 DOI: 10.1016/j.yexcr.2012.02.017]
  - 18 Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol* 2003; 16: 376-388 [PMID: 12692203 DOI: 10.1097/01.MP.0000062859.46942.93]
  - 19 Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J, Poon TC, Ng SS, Sung JJ. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut* 2009; 58: 1375-1381 [PMID: 19201770 DOI: 10.1136/gut.2008.167817]
  - 20 Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer* 2010; 127: 118-126 [PMID: 19876917 DOI: 10.1002/ijc.25007]
  - 21 Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, Yuen ST, Chan TL, Kwong DL, Au GK, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Harris CC. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* 2008; 299: 425-436 [PMID: 18230780 DOI: 10.1001/jama.299.4.425]
  - 22 Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 857-866 [PMID: 17060945 DOI: 10.1038/nrc1997]
  - 23 Nakajima G1, Hayashi K, Xi Y, Kudo K, Uchida K, Takasaki K, Yamamoto M, Ju J. Non-coding MicroRNAs hsa-let-7g and hsa-miR-181b are Associated with Chemoresponse to S-1 in Colon Cancer. *Cancer Genomics Proteomics* 2006; 3: 317-324 [PMID: 18172508]
  - 24 Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin SF, Dunning MJ, Barbosa-Morais NL, Teschendorff AE, Green AR, Ellis IO, Tavaré S, Caldas C, Miska EA. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol* 2007; 8: R214 [PMID: 17922911]
  - 25 曹锴, 狄建彬, 魏文祥, 庞智. miRNA在结肠癌早期诊断和筛选中的作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3615-3619
  - 26 He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernandez-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005; 435: 828-833 [PMID: 15944707 DOI: 10.1038/nature03552]
  - 27 Hong L, Lai M, Chen M, Xie C, Liao R, Kang YJ, Xiao C, Hu WY, Han J, Sun P. The miR-17-92 cluster of microRNAs confers tumorigenicity by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Res* 2010; 70: 8547-8557 [PMID: 20851997 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1938]
  - 28 Olive V, Bennett MJ, Walker JC, Ma C, Jiang I, Cordon-Cardo C, Li QJ, Lowe SW, Hannon GJ, He L. miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev* 2009; 23: 2839-2849 [PMID: 20008935 DOI: 10.1101/gad.1861409]
  - 29 Kurokawa K, Tanahashi T, Iima T, Yamamoto Y, Akaike Y, Nishida K, Masuda K, Kuwano Y, Murakami Y, Fukushima M, Rokutan K. Role of miR-19b and its target mRNAs in 5-fluorouracil resistance in colon cancer cells. *J Gastroenterol* 2012; 47: 883-895 [PMID: 22382630 DOI: 10.1007/s00535-012-0547-6]
  - 30 Diosdado B, van de Wiel MA, Terhaar Sive Droste JS, Mongera S, Postma C, Meijerink WJ, Carvalho B, Meijer GA. MiR-17-92 cluster is associated with 13q gain and c-myc expression during colorectal adenoma to adenocarcinoma progression. *Br J Cancer* 2009; 101: 707-714 [PMID: 19672269 DOI: 10.1038/sj.bjc.6605037]
  - 31 Tanzer A, Stadler PF. Molecular evolution of a microRNA cluster. *J Mol Biol* 2004; 339: 327-335 [PMID: 15136036 DOI: 10.1016/j.jmb.2004.03.065]
  - 32 Shen A, Chen Y, Hong F, Lin J, Wei L, Hong Z, Sferra TJ, Peng J. Pien Tze Huang suppresses IL-6-inducible STAT3 activation in human colon carcinoma cells through induction of SOCS3. *Oncol Rep* 2012; 28: 2125-2130 [PMID: 23027374 DOI: 10.3892/or.2012.2067]
  - 33 He B, You L, Uematsu K, Zang K, Xu Z, Lee AY, Costello JF, McCormick F, Jablons DM. SOCS-3 is frequently silenced by hypermethylation and suppresses cell growth in human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 14133-14138 [PMID: 14617776 DOI: 10.1073/pnas.2232790100]
  - 34 Isomoto H. Epigenetic alterations in cholangiocarcinoma-sustained IL-6/STAT3 signaling in cholangio- carcinoma due to SOCS3 epigenetic silencing. *Digestion* 2009; 79 Suppl 1: 2-8 [PMID: 19153483 DOI: 10.1159/000167859]
  - 35 Isomoto H, Mott JL, Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Haan S, Gores GJ. Sustained IL-6/STAT-3 signaling in cholangiocarcinoma cells due



- to SOCS-3 epigenetic silencing. *Gastroenterology* 2007; 132: 384-396 [PMID: 17241887 DOI: 10.1053/j.gastro.2006.10.037]
- 36 Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, Scheller J, Rose-John S, Cheroutre H, Eckmann L, Karin M. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 2009; 15: 103-113 [PMID: 19185845 DOI: 10.1016/j.ccr.2009.01.001]
- 37 Han H, Wang YH, Qu GJ, Sun TT, Li FQ, Jiang W, Luo SS. Differentiated miRNA expression and validation of signaling pathways in apoE gene knockout mice by cross-verification microarray platform. *Exp Mol Med* 2013; 45: e13 [PMID: 23470715 DOI: 10.1038/emmm.2013.31]

编辑: 韦元涛 电编: 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》正文要求

**本刊讯** 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空 1 格写标题; 2 级标题后空 1 格接正文. 以下逐条陈述: (1) 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2) 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3) 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4) 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: … 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  ( $P > 0.05$  不注). 如同一表中另有一套  $P$  值, 则<sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$ ; 第3套为<sup>e</sup> $P < 0.05$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$ .  $P$  值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P < 0.01$ ,  $t = 4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、- 应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用  $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$  表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小  $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$ , 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴. (5) 志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.