

## miRNA145 联合二甲双胍对人结直肠癌细胞株 HCT116 增殖的影响

王钟林<sup>1,2</sup>, 张冬生<sup>1</sup>, 王 勇<sup>1</sup>, 孙跃明<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院普外科, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>连云港市第二人民医院普外科, 江苏 连云港 222000)

**[摘要]** 目的:探讨 miRNA145 联合二甲双胍对人结直肠癌细胞株 HCT116 增殖的影响。方法:慢病毒法将 miRNA145 转染入人结直肠癌细胞株 HCT116, 实时定量 PCR 检测细胞 miRNA145 表达的变化。通过 CCK-8 细胞增殖实验检测 miRNA145 和/或二甲双胍对 HCT116 细胞增殖的影响。通过 Western blot 检测 miRNA145 和/或二甲双胍对细胞 AMPK、mTOR 蛋白表达水平的影响。结果:CCK-8 实验表明 miRNA145、二甲双胍均具有抑制 HCT116 细胞增殖的作用,二者联用使细胞增殖受到更大程度的抑制。Western blot 结果表明,二甲双胍、miRNA145 以及二者联用可进一步促进 AMPK 的活化进而影响 mTOR 蛋白表达水平。结论:miRNA145 联合应用二甲双胍具有更强的抑制人结肠癌细胞株 HCT116 增殖的作用。

**[关键词]** miRNA145;二甲双胍;结直肠癌;增殖

**[中图分类号]** R735.37

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)12-1703-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20151206

## The effects of miRNA145 combined with metformin on the proliferation of human HCT116 cancer cells

Wang Zhonglin<sup>1,2</sup>, Zhang Donsheng<sup>1</sup>, Wang Yong<sup>1</sup>, Sun Yueming<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Department of General Surgery, the Second People's Hospital of Lianyungang, Lianyungang 222000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of miRNA145 combined with metformin on the proliferation of human HCT116 cancer cells. **Methods:** miRNA145 overexpression mediated by recombinant lentivirus was employed in HCT116 cells. Cell proliferation assay by CCK-8 method was conducted to determine the roles of miRNA145 and/or metformin on the cancer cells. Western blot analysis was used to determine the expression levels of AMPK and mTOR proteins. **Results:** Both miRNA 145 and metformin can inhibit the cell proliferation of HCT116. The combination of miRNA 145 and metformin exerted a much stronger inhibitory effect on cell proliferation than any of the two. The activation level of AMPK was also higher by the combination, and the p-mTOR expression level was lower by the combination. **Conclusion:** miRNA145 and metformin can exert an anticancer effect synergistically.

**[Key words]** miRNA145; metformin; colorectal cancer; proliferation

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(12): 1703-1706]

MicroRNA(miRNA)是真核生物内源性的单链非编码短序列 RNA, 长度约 22 个核苷酸。miRNA 通过与靶 mRNA 3'非翻译区特定位点互补结合, 导致靶 mRNA 降解或翻译抑制, 从而通过转录后水平调控基因的表达, 进而影响细胞的分化、增殖或凋亡<sup>[1-2]</sup>。作为 21 世纪生命科学研究的重要发现之一,

miRNA 迅速成为研究热点。MicroRNA145(miRNA145)是 miRNA 家族中的重要成员, 其作为一种抑癌基因可抑制肿瘤细胞的生长、增殖与侵袭能力<sup>[1-3]</sup>。研究表明, miRNA145 在结直肠癌中呈显著的低表达状态<sup>[4]</sup>, 以 miRNA145 作为治疗结直肠癌的研究靶位现已成为热点。

随着人们生活方式的改变, II 型糖尿病的发生率快速增长。二甲双胍(Met)是一种胰岛素增敏剂, 现已作为治疗 II 型糖尿病的常用口服药物。此外, 二甲双胍亦可降低恶性肿瘤的发生率和死亡率<sup>[5]</sup>,

**[基金项目]** 江苏省六大人才高峰项目(2013)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: jssnyueming@163.com

对肿瘤患者具有一定保护作用。

本研究意在探讨联合应用 miRNA145 和二甲双胍治疗肿瘤的可行性。通过转染 miRNA145 慢病毒进入人结直肠癌细胞株 HCT116, 观察 miRNA145 对细胞增殖的影响。并探究 miRNA145 和二甲双胍对 HCT116 增殖的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人结直肠癌细胞株 HCT116 由南京医科大学第一附属医院普外科实验室保存提供。二甲双胍购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; miRNA145 慢病毒载体购自上海吉玛制药有限公司; Cell Counting Kit-8 (CCK-8 试剂盒) 购自南京碧云天生物技术有限公司; AMP 激活的蛋白激酶 (AMPK)、Phospho-AMPK $\alpha$  (Thr172)、mTOR、Phospho-mTOR (Ser2448)、 $\beta$ -actin 一抗购自美国 CST 公司。HRP 标记的山羊抗兔抗体购自美国 Abcam 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养和实验分组

HCT116 细胞培养于含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$  的条件下。取对数生长期细胞, 通过慢病毒转染将过表达 miRNA145 质粒 (LV-miRNA145) 和空白质粒 (LV-NC) 分别转染细胞。转染时根据感染复数 (MOI)=30 加入病毒液, 转染 24 h 后更换为普通培养液, 并使用嘌呤霉素筛选 2 周后得到实验用细胞。

实验分组: ①空白组, ②空白质粒 (LV-NC) 组, ③miRNA145 质粒 (LV-miRNA145) 组, ④二甲双胍 (Met) 处理组, ⑤miRNA145 质粒+二甲双胍 (miRNA145+Met) 处理组, 根据后续各实验要求选择相应分组。

#### 1.2.2 细胞中 RNA 的提取

收集细胞, 按 1 $\times$ 10 $^6$  个细胞加 1 mL TRIzol 提取细胞中的总 RNA, 整个操作过程均在冰上进行, RNA 溶于 DEPC 水中, 紫外分光光度计 Nanodrop 检测 RNA 浓度及纯度, 光吸收值 (260 nm/280 nm) 为 1.8~2.0, 认为 RNA 纯度合格。

#### 1.2.3 实时定量 RT-PCR 检测细胞 miRNA145 的表达

用 qRT-PCR 反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 工作浓度为 1 000 ng/ $\mu$ L。引物序列: miRNA-145 正向引物 5'-GTCCAGTTTTCCCAGGAAT-3', 反向引物 5'-TGGTGTCGTGGAGTCG-3'; 内参 U6 正向引物 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 反向引物 5'-

AACGCTTCACGAATTTGCGT-3', 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 40 个循环; 从 55 $^{\circ}$ C 至 95 $^{\circ}$ C, 每 0.5 $^{\circ}$ C 为间隔绘制溶解曲线, 记录每个反应管中荧光信号到达所设定阈值时所经历的循环数即 Ct 值。根据下述公式计算 miRNA145 相对表达倍数, 实验重复 3 次, 每次设 3 个复孔。

$$\Delta Ct = Ct_{miRNA145-CtU6}, \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(实验组)} - \Delta Ct_{(对照组)},$$

实验组 miRNA145 相对表达倍数 =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

#### 1.2.4 CCK-8 检测细胞增殖

收集对数生长期的肿瘤细胞消化成单细胞, 以 5 000 个/孔、100  $\mu$ L/孔细胞悬液接种至 96 孔培养板, 孵育 24 h 后, 依据不同处理条件处理后, 每孔加入 CCK-8 溶液 10  $\mu$ L, 常规条件下孵育 2 h, 酶标仪检测 450 nm 波长处每孔的吸光度值, 按照公式计算细胞存活率 (%) = (处理组平均吸光度值 - 空白组平均吸光度值) / (对照组平均吸光度值 - 空白组平均吸光度值)  $\times$  100%。实验重复 3 次, 每次设 3 个复孔。

#### 1.2.5 Western blot 检测细胞 AMPK、mTOR 表达水平

收集对数生长期的肿瘤细胞, PBS 洗涤 2 次, 加入适当裂解液冰上裂解, 4 $^{\circ}$ C 14 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 行蛋白定量。取定量总蛋白上样, SDS-PAGE 电泳分离 1~2 h, 蛋白转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入 AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR、 $\beta$ -actin 一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗涤, 加入相应二抗孵育 2 h, TBST 洗涤, 暗室曝光, 扫描图像, Quantity One 凝胶定量软件分析目的蛋白相对表达量。实验重复 3 次, Quantity One 4.6.2 凝胶定量软件分析目的蛋白相对表达量, 以各个实验组与对照组的比值作出直方图。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析。计量数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。P  $\leq$  0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 转染后细胞 miRNA145 的表达

HCT116 细胞转染 LV-miRNA145 和 LV-NC 48 h 后, 应用实时定量 RT-PCR 检测空白对照组、LV-NC 组和 LV-miRNA145 组中 miRNA145 相对表达量 (图 1)。LV-miRNA145 组 miRNA145 表达较 LV-NC 组及空白对照组明显升高, 差异有统计学意义 (P <

0.05);LV-NC 组 miRNA145 表达量较空白对照组相比无明显差异( $P > 0.05$ )。

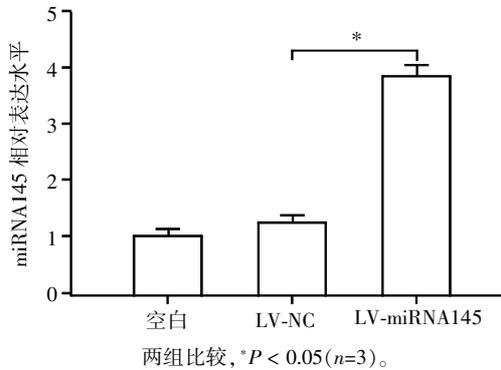


图 1 转染后各组细胞内 miRNA145 相对表达水平的变化  
Figure 1 The relative expression levels of miRNA145 after transfection

### 2.2 二甲双胍对 HCT116 细胞增殖的影响

将 HCT116 细胞分别用 2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 mmol/L 的二甲双胍干预,培养 24 h、48 h、72 h 后用 CCK-8 染色法检测二甲双胍对细胞增殖的影响(图 2)。结果表明,与对照组相比二甲双胍干预后细胞增殖受到抑制,并表现为时间-剂量依赖性。

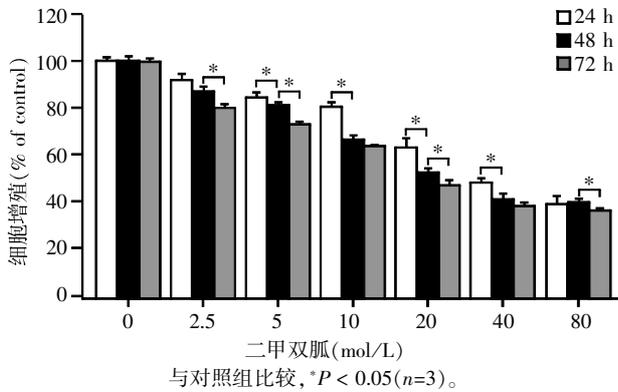


图 2 二甲双胍对 HCT116 细胞增殖的影响  
Figure 2 The effect of metformin on the proliferation of HCT116 cells

### 2.3 miRNA145 单独或联合二甲双胍对 HCT116 细胞增殖的影响

HCT116 空白组培养 24、48、72 h 后,细胞存活率分别为  $(231.43 \pm 5.34)\%$ 、 $(470.37 \pm 4.62)\%$ 、 $(1151.43 \pm 7.17)\%$ 。LV-miRNA145 转染组 24、48、72 h 细胞存活率分别为  $(162.45 \pm 6.28)\%$ 、 $(361.39 \pm 11.28)\%$ 、 $(740.41 \pm 12.27)\%$ 。两组之间各时间点差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 3)。

将 miRNA145 慢病毒转染干预的 HCT-116 细胞用 5 mmol/L 的二甲双胍处理 24、48、72 h,CCK-8 检测 HCT-116 细胞增殖情况。结果显示(图 3),LV-

miRNA145 转染干预的 HCT116 细胞在二甲双胍的作用下,细胞增殖受到进一步抑制。且二者联合对细胞增殖的抑制作用较二甲双胍单用作用更大。

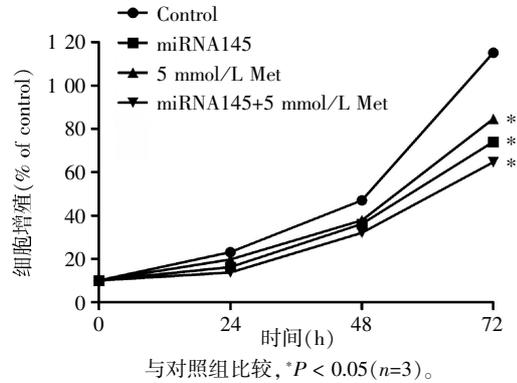


图 3 miRNA145 和/或二甲双胍对 HCT116 细胞增殖的影响  
Figure 3 The effect of miRNA145 and/or metformin on the proliferation of HCT116 cells

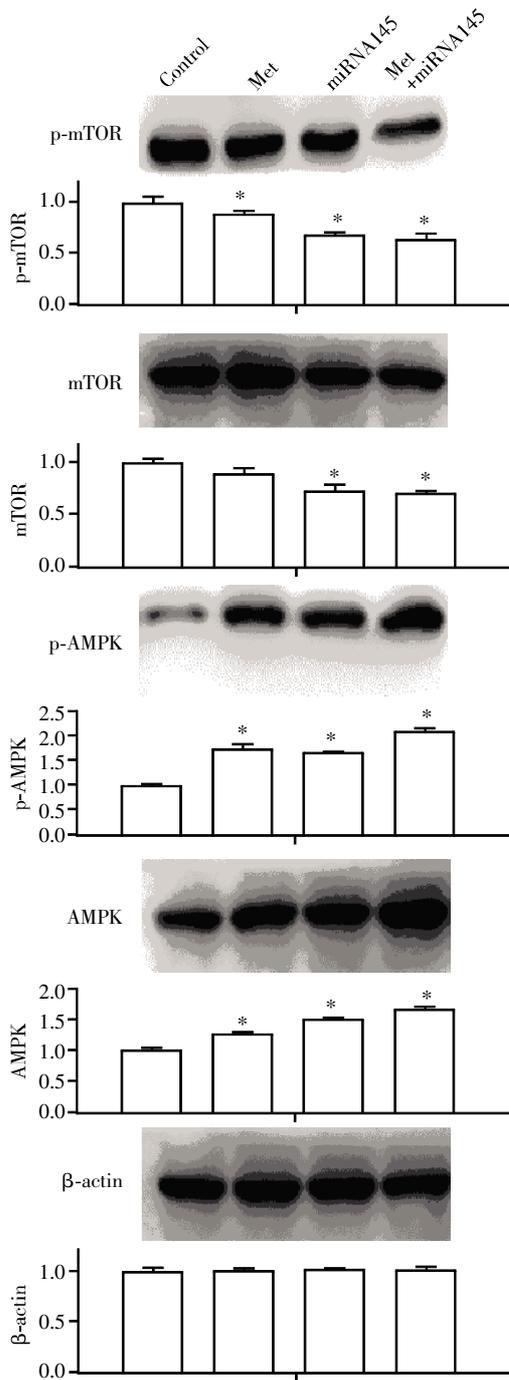
### 2.4 二甲双胍和/或 miRNA145 对 HCT116 细胞 AMPK、mTOR 表达的影响

Western blot 结果显示,HCT-116 细胞经过 5 mmol/L 二甲双胍处理或 miRNA145 慢病毒转染,其 AMPK 表达总量均较对照组增高,且 AMPK 磷酸化程度亦明显增高(图 4),均具有显著的统计学差异,表明二者均可促进 AMPK 的活化。miRNA145 联合二甲双胍处理后 AMPK 磷酸化程度更高,提示二者具有协同活化 AMPK 的作用。mTOR 在二者的作用下,磷酸化水平明显降低,表明二者联用对 mTOR 具有显著的抑制作用。

## 3 讨论

miRNA 具有广泛的基因调节功能,参与调控一系列的生物学进程,包括细胞增殖、凋亡和能量代谢等。在肿瘤发生发展过程中,miRNA 可以通过调节癌基因或抑癌基因的表达,参与细胞生物程序的调控,从而间接起着“癌基因或抑癌基因”的功能<sup>[1-2]</sup>。本研究通过慢病毒法将 LV-miRNA145 转入人结直肠癌细胞 HCT-116,获得 miRNA145 表达水平增高的结直肠癌细胞。CCK-8 实验证实 miRNA145 表达增高使细胞增殖受到显著抑制。

糖尿病亦可显著增加恶性肿瘤发生发展的风险<sup>[6]</sup>。二甲双胍是临床上治疗糖尿病的一线药物。它可使肝脏糖异生减少,同时增加骨骼肌、脂肪等组织对葡萄糖的吸收和利用,从而降低血糖。研究证实二甲双胍对肿瘤的抑制机制与 AMPK 激活后抑制 mTOR 有关<sup>[7]</sup>。本实验将 HCT-116 细胞用不同浓



与同一靶蛋白对照组比较, \* $P < 0.05$  ( $n=3$ )。

图 4 二甲双胍和/或 miRNA145 对 HCT116 细胞 AMPK、mTOR 表达的影响

Figure 4 The effects of miRNA145 and/or metformin on the protein expressions of AMPK and mTOR

度的二甲双胍处理, CCK-8 法检测结果表明二甲双胍可抑制细胞增殖, 并呈时间-剂量依赖性。AMP 激活的蛋白激酶 AMPK 是一种进化上高度保守的异源三聚体蛋白激酶复合物, 在缺血、缺氧、低血糖及热休克等细胞或环境应激状态下, AMP/

ATP 的比例增高, 进而引起细胞 AMPK 的激活。活化的 AMPK 除了参与调控能量代谢, 还可在基因层面参与调节细胞内转录水平, 阻滞细胞分裂周期进而抑制细胞增殖。AMPK 在多种代谢性疾病及肿瘤疾病的发生发展中起到了重要作用, 已经成为药物研究的新靶点<sup>[8]</sup>。研究表明, AMPK 的激活可以导致哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 活性的抑制。mTOR 是参与细胞生长、增殖、分化的重要调节因子, 肿瘤的发生与 mTOR 信号通路异常有关。本研究结果表明二甲双胍可促进 AMPK 的高表达及活化, 二甲双胍与 miRNA145 的联用可激活 AMPK, 抑制 mTOR。二者对肿瘤抑制作用的机制尚待进一步探讨。

本研究中通过体外实验探讨了 miRNA-145 联合二甲双胍对结肠癌细胞增殖的影响, 并对可能的作用机制做了初步研究。结果表明, 两者联用可以产生更强的肿瘤抑制作用, 并可能是通过活化 AMPK, 进一步抑制 mTOR 信号通路来发挥作用。我们将进一步在体内实验中加以证实, 并对其作用机制进行深入研究。

[参考文献]

- [1] Hammond SM. MicroRNAs as tumor suppressors[J]. Nat Genet, 2007, 39(5): 582-583
- [2] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(4): 259-269
- [3] 王 勇, 孙跃明. microRNA143、microRNA145 对胆管癌细胞株 QBC939 生长周期及凋亡的影响[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2010(5): 612-616
- [4] 袁 源. miRNA-145 在胆囊癌发病过程中的调控作用及机制研究[D]. 长沙: 中南大学, 2014
- [5] 赖水青, 李延兵. 二甲双胍抑制恶性肿瘤的作用及相关机制研究进展 [J]. 实用医学杂志, 2012(16): 2657-2659
- [6] Vinikoor LC, Long MD, Keku TO, et al. The association between diabetes, insulin use, and colorectal cancer among Whites and African Americans [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009, 18(4): 1239-1242
- [7] Zakikhani M, Dowling RJ, Sonenberg N, et al. The effects of adiponectin and metformin on prostate and colon neoplasia involve activation of AMP-activated protein kinase [J]. Cancer Prev Res (Phila), 2008, 1(5): 369-375
- [8] Fumarola C, Caffarra C, La Monica S, et al. Effects of sorafenib on energy metabolism in breast cancer cells: role of AMPK-mTORC1 signaling [J]. Breast Cancer Res Treat, 2013, 141(1): 67-78

[收稿日期] 2015-09-12