

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.05.004

低表达 miRNA-21 对人肺癌 H358 细胞增殖及凋亡作用的研究*

黄军霞¹, 李颖¹, 钊建波¹, 涂应锋^{2△}

(1. 浙江省衢州市开化县人民医院内科, 浙江衢州 324300; 2. 哈尔滨医科大学附属

第四临床医院心内科, 黑龙江哈尔滨 150001)

[摘要] 目的 探讨微 RNA(miRNA)-21 对人肺癌 H358 细胞体外增殖及诱导凋亡方面的作用。方法 采用体外转染法将 miRNA-21 抑制剂瞬时转染 H358 细胞 48 h 后, 应用定量 real-time PCR 特异探针法检测 H358 细胞中 miRNA-21 的表达水平, 应用 MTT 法检测 H358 细胞的生长情况, 荧光缺口末端标记法(TUNEL)法分析 H358 细胞凋亡情况, 并用 Western blot 检测 H358 细胞中抑癌基因 PTEN 表达的变化。结果 与对照组比较, miRNA-21 抑制剂转染组 H358 细胞的 miRNA-21 表达水平显著降低($P<0.05$), 细胞生长明显受到抑制($P<0.05$), 且通过 PTEN 靶蛋白诱导细胞凋亡($P<0.05$)。结论 低表达 miRNA-21 可以抑制人肺癌 H358 细胞的体外增殖, 诱导细胞凋亡, 为肺癌生物治疗提供新的治疗靶点。

[关键词] 肺肿瘤; 微 RNA; PTEN; 细胞凋亡

[中图分类号] R563.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)05-0588-04

Study on effects of low expression of miRNA-21 on proliferation and apoptosis of human lung cancer H358 cell*

Huang Junxia¹, Li Ying¹, Dou Jianbo¹, Tu Yingfeng^{2△}

(1. Department of Internal Medicine, Kaihua County People's Hospital, Quzhou, Zhejiang 324300, China; 2. Department of Cardiology, Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150001, China)

[Abstract] **Objective** To study the effects of microRNA-21 on the proliferation and apoptosis of human lung cancer cell line H358. **Methods** MiRNA-21 inhibitor was transiently transferred into human lung cancer cell line H358 by using transfection in vitro. The expression level of miRNA-21 in H358 cells was detected by real-time PCR before or after transfection. The MTT assay was used to assess the proliferation of H358 cells. And the cell apoptosis was analyzed by TUNEL Apoptosis Assay Kit. Furthermore, the expression of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN) was determined by the Western-blot assay. **Results** The expression of miRNA-21 was markedly decreased compared with the control group ($P<0.05$). The proliferation of miRNA-21 inhibitor-transfected H358 cells was obviously inhibited ($P<0.01$). And expression level of miRNA-21 in H358 cells was significantly decreased, the cell growth was significantly inhibited, moreover apoptosis was induced by PTEN target protein ($P<0.05$). **Conclusion** Low expression of miRNA-21 could inhibit the in vitro proliferation of H358 cells and induces apoptosis, which could provide a novel therapeutic target for anti-cancer biotherapy.

[Key words] lung neoplasms; microRNAs; PTEN; apoptosis

微 RNA(miRNAs, miRNA)是近年来发现的一类长度为 19~25 个核苷酸的非编码小分子 RNA。它主要通过靶目标基因 3'非翻译区的完全或不完全配对, 降解靶基因 mRNA 或抑制其翻译, 从而参与调控个体发育、细胞凋亡、增殖及分化等生命活动^[1]。实验证据表明, 如同癌基因或抑癌基因的功能, miRNA 可通过调控其靶基因参与的信号转导通路, 影响肿瘤的发生和发展^[2-3]。已证明, miRNA 能够调控多种生理学和病理学的过程, 如细胞分化, 细胞增殖和肿瘤形成。某些 miRNAs 可直接参与人类肿瘤(如肺癌、乳腺癌、颅脑肿瘤、肝癌、结直肠癌及淋巴瘤等)的形成^[4]。miRNA 既可作为癌基因又可作为抑癌基因, 参与人类肿瘤形成的多条信号通路。因此, miRNA 可能作为肿瘤预防和治疗的有效应用方法^[5]。miRNA-21 是新近报道的一种 miRNA 分子, 可以有效抑制乳腺癌、肝癌和胃癌等多种肿瘤的生长和转移^[4,6]。然而, miR-

NA-21 是否在肺癌生长中发挥作用研究报道极少, 且其作用的分子机制目前尚不明确。因此, 本研究旨在观察 miRNA-21 对人肺癌 H358 细胞体外生长的影响, 以了解 miRNA-21 在肺癌生长中的可能作用及其机制, 为 miRNA 在肺癌临床生物治疗方面提供新的思路 and 方向。

1 材料与方法

1.1 材料 主要实验试剂: miRNA-21 抑制剂和抑制剂杂序由上海吉玛生物工程公司合成; 转染试剂 lipofectamine 2000 和 MTT 试剂盒购自 Roche 公司; SYBR Green PCR Master Mix 染料荧光定量 real-time PCR 试剂盒购自美国 Applied Biosystems 公司; 细胞培养液 RPMI 1640 购自 GibcoBRL 公司; 双抗(氨卞青霉素钠、硫酸链霉素)购自友康基业生物科技(北京)有限公司; 胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)购自 Gibco 公司; 抗 PTEN 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司。实

* 基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81401457); 中国国家博士后基金面上项目(2014M561376); 黑龙江省博士后资助经费(LBH-Z14143); 黑龙江省自然科学基金留学基金(LC2015038); 黑龙江省卫生计生委面上项目(2014-385)。作者简介: 黄军霞(1978-), 主治医师, 大学本科, 主要从事肺癌及肺血管疾病分子机制研究。△ 通讯作者, Tel: 13624606369; E-mail: tyfdoctor@163.com。

验仪器:蛋白电泳仪、PVDF 膜购于 BIO-RAD 公司;紫外分光光度仪(SmartSpecTM3000)购于美国 BIO-RAD 公司;Odyssey 红外荧光扫描成像系统购于美国 LI-COR 公司;6 孔板和 96 孔板购自上海拜力生物科技有限公司公司;共聚焦显微镜 FV300 购自日本 Olympus 公司。miRNA-21 引物序列上游:5'-GGG GTA GCT TAT CAG ACT G-3',下游:5'-TGG AGT CGG CAA TTG CAC TG-3';内参 U6 引物序列上游:5'-GCT TCG GCA CAT ATA CTA AAA T-3',下游:5'-CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT-3',均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 H358 细胞培养 人肺癌 H358 细胞,购于中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。用含 10%胎牛血清、1 000 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素的 RPMI1640 细胞培养液,于 37℃、5%CO₂ 条件下培养人肺癌 H358 细胞,待单层细胞生长达到 90%融合时,用胰蛋白酶消化细胞,收集细胞,PBS 冲洗 1 次后备用。细胞实验分组:转染试剂对照组、miRNA-21 抑制剂转染组和 miRNA-21 抑制剂杂序转染组。分别转染 48 h 后,用于后续的实验。

1.2.2 H358 细胞转染 收集处于对数生长期的人肺癌 H358 细胞,PBS 冲洗 1 次,将 5×10⁴ 个细胞重悬于 1 mL RPMI1640 培养液中,转移至 6 孔板,在 37℃、5%CO₂ 条件下培养。细胞培养 12 h 后,将 2 μL 转染试剂 lipofectamine 2000 与 5 nmol miRNA-21 抑制剂和 miRNA-21 抑制剂杂序以体积比 1:50 混合,室温放置 10 min 后,缓慢加入培养上清液中,摇晃混匀后继续培养。

1.2.3 MTT 实验 收集各组 H358 细胞,以 3×10³ 个细胞/孔接种于 96 孔培养板,每孔培养液总量 200 μL,于 37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养 48 h,加入 2 μg/mL 的 MTT 液(50 μL/孔),继续培养 3 h。吸出孔内培养液后,加入 DMSO 液(150 μL/孔),将培养板置于微孔板振荡器上振荡 10 min,使结晶物溶解。使用酶标仪检测各孔吸光度(D)值(波长 570 nm)。

1.2.4 缺口末端标记法(TUNEL)法检测细胞凋亡 首先将 H358 细胞爬片,爬满细胞的载玻片用 PBS 洗涤 1 次,冲洗时动作需轻柔。室温下晾干载玻片,使细胞贴得更牢。4%多聚甲醛固定细胞 30 min。PBS 冲洗 2 次,每次 5 min。4 mL 3% H₂O₂ 加 36 mL 甲醇配制的封闭液封闭细胞 10 min。PBS 洗 2 次,每次 5 min。加入含 0.1% Triton X-100 和 0.1%柠檬酸三钠的穿透液,冰上孵育 2 min。使用 Roche 原位细胞死亡检测试剂盒(In situ cell death detection kit)进行 TUNEL 染色,检测细胞凋亡。根据 Roche 说明书制备 TUNEL 反应混合液,每张载玻片加 50 μL TUNEL 反应混合液于玻片上,放入避光湿盒中,于 37℃孵箱中反应 1 h。PBS 洗 2 次,每次 5 min。37℃培养箱 DAPI 孵育 10 min,细胞核呈现蓝染。

1.2.5 细胞中 RNA 的提取、逆转录以及实时定量 PCR 分析 miRNA-21 的表达 首先是用 1 mL Trizol 吹打溶解贴壁的细胞,并将含有细胞的 Trizol 液收集在进口的 1.5 mL EP 中。每支 EP 管中再加入 0.2 mL 氯仿进行萃取,剧烈摇荡 EP 管 15 s,经 4℃ 13 500 r/min 离心 15 min。取少量上层水相液体置于新的进口离心管中,每支管中加入 0.5 mL 异丙醇,混匀后室温放置 10 min,再经 4℃ 13 500 r/min 离心 10 min,此时

形成 RNA 沉淀。将混合液体轻轻倒出,再用 1 mL 的 75%乙醇溶液洗涤沉淀,静置后在 4℃ 10 600 r/min 离心 5 min。弃去上清液,EP 管于室温条件干燥 5 min,再用适量的 DEPC 水充分溶解干燥的 RNA。按照 0.5 μg RNA 的加样量,充分混合样品、dNTP、逆转录酶、RT buffer 和 ddH₂O 配制成 20 μL 反应体系,最后经 AJ000 程序经行逆转录,所得 cDNA 样品于一 20℃冰箱中保存。经 SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒进行 PCR 反应,反应体系为:SYBR Green Mix 10 μL,上游引物 1 μL,下游引物 1 μL,cDNA 1 μL,补充去离子水 7 μL。选择 U6 作为内参。

1.2.6 Western blot 分析 PTEN 蛋白的表达 将各组细胞培养瓶置于冰上,PBS 洗涤细胞 3 次,每个培养瓶中加入适量细胞裂解液(Ripa:蛋白酶抑制剂=100:1),收集培养瓶壁上的细胞,放置冰上裂解 30 min,13 500 r/min 离心 15 min,吸取上清液置于一 80℃冰箱中保存。取 1 μL 样品应用 BCA 试剂盒测定细胞中蛋白质浓度。依次配制 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离胶,5%SDS-PAGE 积层胶,每个孔道中加入等质量(80~100 μg)的样品,电泳 60~90 min,溴酚蓝快迁移出分离胶时停止电泳。恒定 300 mA 电流,转膜时间为 80 min。取出 NC 膜置于 5%的脱脂奶粉中,在 4℃的环境中封闭 2 h。分别用一抗 PTEN 抗体(1:200)、GAPDH(1:1 000)在 4℃冰箱中孵育过夜。取出孵育过抗体的 NC 膜,用 PBS-T 洗涤 3 次。然后用(1:4 000)稀释的红外荧光标记二抗均匀铺展在 NC 膜上,避光孵育 1 h 后用 PBS-T 洗涤 3 次。最后将各条 NC 膜用 Odyssey 红外荧光扫描成像系统进行检测,并且计算相应条带的灰度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间差异采用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组细胞 miRNA-21 表达水平及 H358 细胞增殖比较 结果显示,miRNA-21 抑制剂转染组 miRNA-21 的表达水平较转染试剂对照组和 miRNA-21 抑制剂杂序转染组明显降低($P < 0.05$);miRNA-21 对人肺癌 H358 细胞增殖的影响,与转染试剂对照组比较,转染 miRNA-21 抑制剂后人肺癌 H358 细胞的增殖明显下调($P < 0.05$);而转染 miRNA-21 抑制剂杂序对人肺癌 H358 细胞的增殖无明显的影响,见表 1。

表 1 各组细胞 miRNA-21 表达水平及 H358 细胞增殖比较($\bar{x} \pm s$)

组别	miRNA-21	H358 细胞增殖
转染试剂对照组	1.00±0	1.02±0.03
miRNA-21 抑制剂转染组	0.42±0.25 ^a	0.53±0.08 ^a
miRNA-21 抑制剂杂序转染组	1.02±0.13	1.04±0.06

^a: $P < 0.05$,与转染试剂对照组比较。

2.2 低表达 miRNA-21 对人肺癌 H358 细胞凋亡的影响 TUNEL 染色法结果显示,与转染试剂对照组细胞凋亡率(10.35±0.22)%比较,H358 细胞转染 miRNA-21 抑制剂后,被 TUNEL 染色染成绿色的凋亡细胞明显增多,为(38.65±0.73)%,两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);而 miRNA-21 抑制剂杂序转染组,未引起细胞凋亡数量的增加,见图 1、2。

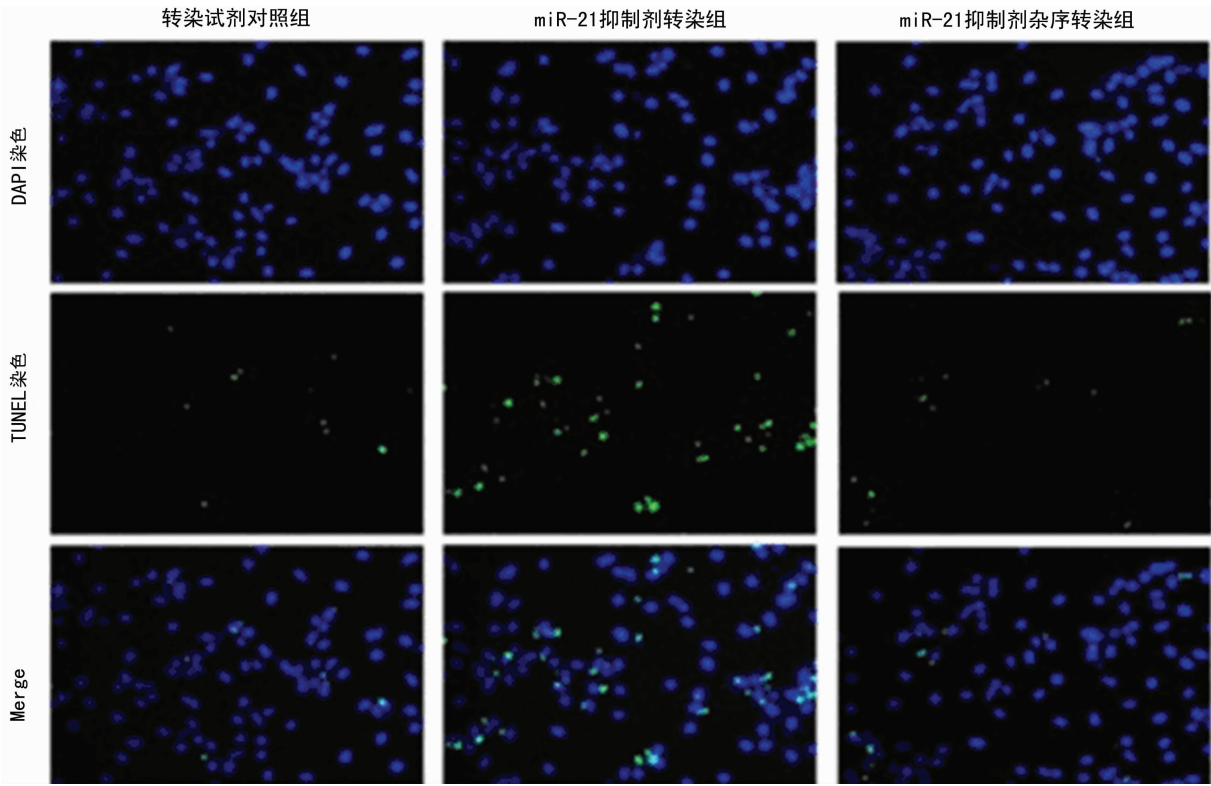
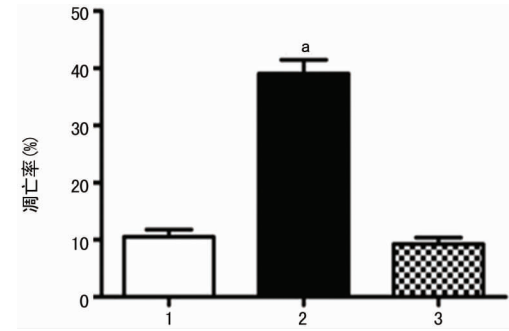
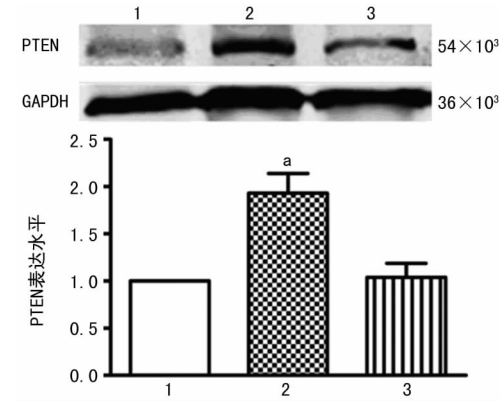


图 1 各组 H358 细胞 TUNEL 染色显示图像(×200)



1: 转染试剂对照组; 2: miRNA-21 抑制剂转染组; 3: miRNA-21 抑制剂杂序转染组; ^a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图 2 各组 H358 细胞凋亡结果比较



1: 转染试剂对照组; 2: miRNA-21 抑制剂转染组; 3: miRNA-21 抑制剂杂序转染组; ^a: $P < 0.05$, 与转染试剂对照组比较。

图 3 Western blot 检测人肺癌 H358 细胞中 PTEN 的表达

2.3 低表达 miRNA-21 对人肺癌 H358 细胞中 PTEN 表达的

影响 与 miRNA-21 抑制剂杂序转染组和转染试剂对照组比较,miRNA-21 抑制剂转染组可以显著促进 H358 细胞中 PTEN 的表达($P < 0.05$),见图 3。

3 讨 论

miRNA 最早是在肿瘤疾病的鉴别诊断中,对 10 种肿瘤进行了 miRNA 微阵列表达谱的研究,结果表明肿瘤的类型不同,其组织中的 miRNA 表达谱也会存在很大差异^[7]。通过病毒或脂质体技术将 miRNA 分子包裹后转入细胞中,导致肿瘤细胞死亡,此方法常用于治疗肺癌等特殊肿瘤。这些技术是通过调控侧序列和 pre-miRNA 发夹的表达,激发合成内源性的 miRNA,从而达到抑制靶基因的目的^[8]。Cheng 等^[9]通过合成抗 miRNA 的反义寡核苷酸序列,使其高效地转染到细胞中,达到干预 miRNA 抑制细胞生长和促进凋亡等生理作用。

近年来的研究显示,miRNA-21 在不同肿瘤中呈差异性表达,其作用类似于癌基因,在肿瘤发生、发展过程中起关键的调控作用^[10-11]。研究证明 miRNA-21 通过抑制前凋亡基因,而起致癌基因的作用。有学者推测,抑制 miRNA-21 的表达是否能够抑制肿瘤的生长。Li 等^[12]发现,过表达的 miRNA-21 使肿瘤细胞对某些抗肿瘤药物的敏感性降低,有促进肿瘤生长的作用。此外,临床相关的研究还表明,肿瘤组织中如果 miRNA-21 高表达则提示肿瘤预后较差,并且化疗的效果也不佳^[13]。

目前针对 miRNA-21 靶分子的研究证明,miRNA-21 的明确靶点有 PTEN、PDCD4、Maspin、TPM1 等^[14]。在本研究中,采用体外转染后 MTT 法检测发现,敲除 H358 肺癌细胞中 miRNA-21 的表达,可以抑制 H358 肺癌细胞的体外生长;TUNEL 实验进一步证实,通过敲除 H358 肺癌细胞 miRNA-21 的表达可以诱导其凋亡。此外,Yan 等^[15]通过检测 113 例乳腺癌标本后发现 miRNA-21 在乳腺癌中表达上调,通过进一

步研究还发现 miRNA-21 在乳腺癌中的高表达与这些患者的预后密切相关,并且 miRNA-21 对预后的影响与疾病阶段相对独立;该学者还发现,在乳腺癌中抑制 miRNA-21 可以诱导凋亡,并且下调抗凋亡基因 Bcl-2 的表达,提示 miRNA-21 可以作为乳腺癌的一个治疗靶点。

肿瘤抑制因子 PTEN 是 miRNA-21 的一个重要靶点,并且增加 miRNA-21 的表达会导致肿瘤细胞中 PTEN 的表达下调,会促进肿瘤的生长。Zhu 等^[16] 证明 miRNA-21 可以通过下调肿瘤抑制基因 TPM1 以及促凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,同时还可以调控 PTEN 和 PDCD4 的表达,促进细胞增殖,促进乳腺癌细胞的侵袭和转移。本研究同样证实通过敲除 H358 肺癌细胞中 miRNA-21 的表达,肿瘤抑制因子 PTEN 表达明显的升高,诱导细胞凋亡。然而,miRNA-21 参与调控肺癌发生发展的调控机制还有待进一步的研究。

总而言之,通过本研究证实,低表达 miRNA-21 可以抑制人肺癌 H358 细胞的体外生长,这可能与促进肺癌细胞 PTEN 的表达及诱导细胞凋亡有关。在后续研究中,本课题组将进一步探讨 miRNA-21 在肺癌细胞增殖作用中的分子机制,为肺癌发生发展机制的研究以及临床肺癌分子生物治疗提供一种全新的分子靶点。

参考文献

[1] Chen X. A microRNA as a translational repressor of AP-ETALA2 in Arabidopsis flower development[J]. Science, 2004,303(5666):2022-2025.

[2] Tu Y, Gao X, Li G, et al. MicroRNA-218 inhibits glioma invasion, migration, proliferation, and cancer stem-like cell self-renewal by targeting the polycomb group gene Bmi1 [J]. Cancer Res, 2013,73(19):6046-6055.

[3] Pu X, Roth JA, Hildebrandt MA, et al. MicroRNA-related genetic variants associated with clinical outcomes in early-stage non-small cell lung cancer patients[J]. Cancer Res, 2013,73(6):1867-1875.

[4] Zhao D, Tu Y, Wan L, et al. In vivo monitoring of angiogenesis inhibition via down-regulation of mir-21 in a VEGFR2-luc murine breast cancer model using bioluminescent imaging[J]. PLoS One 2013,8(8):e71472.

[5] Li F, Liu J, Li S. MicorRNA 106b approximately 25 cluster and gastric cancer[J]. Surg Oncol, 2013,22(2):e7-10.

[6] Li L, Zhou L, Li Y, et al. MicroRNA-21 stimulates gastric cancer growth and invasion by inhibiting the tumor sup-

pressor effects of programmed cell death protein 4 and phosphatase and tensin homolog[J]. J BUON, 2014, 19(1):228-236.

[7] Subramanian S, Lui WO, Lee CH, et al. MicroRNA expression signature of human sarcomas[J]. Oncogene, 2008, 27(14):2015-2026.

[8] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. Nature, 2005,435(7043):834-838.

[9] Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, et al. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis[J]. Nucleic Acids Res, 2005,33(4):1290-1297.

[10] Wu L, Li G, Feng D, et al. MicroRNA-21 expression is associated with overall survival in patients with glioma[J]. Diagn Pathol, 2013,10(8):200-212.

[11] Zhang W, Bai W. MiR-21 suppresses the anticancer activities of curcumin by targeting PTEN gene in human non-small cell lung cancer A549 cells[J]. Cli Translat Oncol, 2014,16(8):708-713.

[12] Li Y, Li W, Yang Y, et al. MicroRNA-21 targets LRRFIP1 and contributes to VM-26 resistance in glioblastoma multiforme[J]. Brain Res, 2009,1286(7):13-18.

[13] Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma[J]. JAMA, 2008, 299(4):425-436.

[14] Li T, Li D, Sha J, et al. MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009,383(3):280-285.

[15] Yan LX, Huang XF, Shao Q, et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis[J]. RNA, 2008,14(11):2348-2360.

[16] Zhu S, Wu H, Wu F, et al. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis[J]. Cell Res, 2008,18(3):350-359.

(收稿日期:2015-06-27 修回日期:2015-09-22)

《重庆医学》开通微信公众平台

《重庆医学》已开通微信公众平台(微信号:ChongqingMedicine),《重庆医学》将以微信平台渠道向广大读作者发送终审会动态报道、各期杂志目录、主编推荐文章、学术会议、《重庆医学》最新资讯等消息。欢迎广大读作者免费订阅。读作者可以点击手机微信右上角的“+”,在“添加朋友”中输入微信号“ChongqingMedicine”,或在“添加朋友”中的“查找公众号”一栏输入“重庆医学”,添加关注。