

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.05.009

过表达 miRNA-125b 促进肺癌细胞 A549 的增殖、侵袭能力及其机制研究^{*}

张华勇¹, 韩 强¹, 李俏敏², 钟北龙¹

(中山大学附属第五医院:1. 胸心外科;2. 麻醉科, 广东珠海 519000)

[摘要] **目的** 探讨过表达 miRNA-125b 对肺癌细胞 A549 的增殖、侵袭能力的影响及其机制。**方法** 将 A549 细胞分为 3 组:miRNA-125b 组(miR-125b 模拟物),NC 组(NC 模拟物)及空白组(同等体积的混有转染剂的胎牛血清),采用 Q-PCR 检测 miRNA-125b 的转染及表达效率。MTT 法分析各组细胞的增殖能力,Transwell 小室实验检测细胞的侵袭能力。采用 Western blot 法检测各组细胞 Bcl-2 调节因子(BMF)的表达水平。**结果** 与空白组比较,miRNA-125b 组细胞的 miRNA-125b 表达水平、增殖能力及侵袭能力上升($P<0.05$);NC 组的上述指标无明显变化($P>0.05$)。与空白组比较,miRNA-125b 组细胞的 BMF 表达水平下降($P<0.05$);NC 组的 BMF 表达水平无明显变化($P>0.05$)。**结论** miRNA-125b 能通过抑制 BMF 的表达促进肺癌细胞 A549 的增殖及侵袭。

[关键词] 微 RNA-125b; 肺肿瘤; 细胞增殖; 侵袭能力
[中图法分类号] R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)05-0604-03

miRNA-125b over-expression for promoting proliferation and invasion ability of lung cancer A549 cells and its mechanism^{*}

ZHANG Huayong¹, HAN Qiang¹, LI Qiaomin², ZHONG Beilong¹

(1. Department of Cardiothoracic Surgery; 2. Department of Anesthesiology, Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai, Guangdong 519000, China)

[Abstract] **Objective** To study the influence of miRNA-125b over-expression on proliferation and invasion ability of lung cancer A549 cells and its mechanism. **Methods** A549 cells were divided into 3 groups:miRNA-125b group(transfected with miRNA-125b mimics),NC group(transfected with NC mimics) and blank group(same volume of GIBCO serum mixed with transfection agent). The transfection and expression efficiency of miRNA-125b was detected with Q-PCR,the proliferation ability was detected with MTT,and the invasion ability was detected with the transwell chamber test. The expression level of BMF in A549 cells was detected with Western blot. **Results** Compared with the blank group,the expression level of miRNA-125b,proliferation ability and invasion ability in the miRNA-125b group were increased($P<0.05$);while the above indexes in the NC group demonstrated no significant change($P>0.05$). Compared with the blank group,the expression level of BMF in the miRNA-125b group was decreased ($P<0.05$);while which in the NC group had no significant change($P>0.05$). **Conclusion** miRNA-125b can promote the proliferation and invasion ability of A549 cells via inhibiting the expression of BMF.

[Key words] micorRNA-125b;lung neoplasms;cell proliferation;invasion ability

近 50 年来许多国家都报道肺癌的发病率和病死率均明显升高,肺癌已经是我国死亡率第 1 位的恶性肿瘤,严重危害人民群众的身体健康^[1]。肺癌患者早期诊断较为困难,故多数患者在就诊时已经处于肿瘤中晚期,预后较差。微小 RNA(miRNAs,miRNA)是一类小分子的非编码单链 RNA,长度为 20~24 个核苷酸,具有广泛的生物功能;人类约 1/3 的基因的表达受 miRNA 调节,过程包括早期发育、细胞增殖、细胞凋亡及脂肪酸的代谢^[2-3]。越来越多的研究证明 miRNA 与多种肿瘤的发生、发展具有密切的相关性,其中 miRNA-125b 在口腔癌及子宫内膜癌等肿瘤组织中明显升高,并能通过多种机制影响肿瘤细胞的增殖、凋亡及侵袭性^[4-5]。但 miRNA-125b 与肺癌的相关性研究较少。作者旨在探讨过表达 miRNA-125b 促进肺癌细胞 A549 的增殖、侵袭能力及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料 实验细胞:正常人支气管上皮细胞(human bronchial epithelial cells,HBECs)及人非小细胞肺癌(NSCLC)细胞 A549 购自上海天呈医疗科技股份有限公司。主要试剂及仪

器:miRNA-125b 模拟物、阴性对照(negative control,NC)模拟物购自上海伯豪生物技术有限公司,RPM2-1640 培养液及胎牛血清购自美国 Gibco 公司,噻唑蓝(MTT)及二甲基亚砷(DMSO)购自美国 Sigma 公司,Gel DoxTM XR+凝胶成像系统购自美国 Bio-RAD 公司,Bcl-2 调节因子(BMF)及 GAPDH 抗体、BCA 定量及 Western blot 试剂购自美国 Invitrogen 公司,RNA 提取及 PCR 试剂购自瑞士 Roche 公司,PCR 引物由宁波康贝生化有限公司合成(miRNA-125b 上游引物:5'-GCU CCC UGA GAC CCU AAC-3',下游引物:5'-CAG TGC AGG GTC CGA GGT-3';GAPDH 上游引物:5'-AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG-3',下游引物:5'-GGG GTC GTT GAT GGC AAC A-3');超净无菌工作台购自德国 Spetec 公司,细胞培养箱购自美国 Thermo 公司,低速离心机购自美国 Beckman Coulter 公司,倒置荧光显微镜购自日本 Olympus 公司,酶标仪购自美国 Biotek 公司,PCR 仪购自美国 Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 按 3×10^5 个/mL 的密度将细胞悬液接种

^{*} 基金项目:珠海市科技计划项目(2015A1005)。 作者简介:张华勇(1983—),主治医师,硕士研究生,主要从事胸部肿瘤的诊治研究。

于96孔板培养,于37℃,5%CO₂培养箱中培养,待细胞面积生长至70%~80%后传代。

1.2.2 Q-PCR检测HBECS及A549细胞的miRNA-125b表达水平 按照Trizol™试剂盒说明书提取HBECS及A549细胞总RNA,测定RNA浓度及纯度,取1μg总RNA反转录合成cDNA,取5μL cDNA稀释4倍后,取2μL为模板,分别以目的基因及内参GAPDH的引物进行Q-PCR,反应条件:95℃预变性3s;95℃变性10s;60℃退火/延伸30s,重复40个循环;65~95℃每增加0.5℃进行5s读板,形成溶解曲线。所有样本均设置3个平行管,基因表达量以平行管平均循环阈值(cycle-threshold,Ct)表示,应用2^{-ΔΔCt}法计算并比较两种细胞miRNA-125b表达水平。

1.2.3 细胞转染 操作按照miRVana™miRNA步骤进行:将转染液以1:30的比例加入RPM2-1640无血清培养基中混匀后静置10min,将miRNA-125b模拟物及NC模拟物分别加入混有转染剂的培养基中混匀,静置10min后以反应生成复合体。将配置好的复合体铺在96孔板并轻轻晃动,加入3×10⁵个/mL的细胞悬液,混匀后置于培养箱中培养。将A549细胞分为3组:miRNA-125b组(加入miRNA-125b模拟物),NC组(加入NC模拟物)及空白组(同等体积的混有转染剂的胎牛血清),采用Q-PCR检测miRNA-125b的转染及表达效率。

1.2.4 MTT检测细胞增殖能力 于细胞传代后3、6、12、24、48h采用MTT检测A549细胞的增殖:各组细胞处理完后去除培养基,加入RPM2-1640培养液(每孔100μL)及含0.5%MTT的培养液(每孔5μL),于37℃,5%CO₂培养箱中孵育4h后弃培养液,加入100μL DMSO原液,振荡10min,待结晶完全溶解后用酶标仪于490nm波长处测定吸光度(OD)值,实验重复3次。

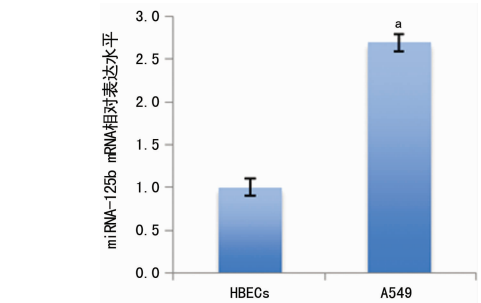
1.2.5 Transwell小室细胞检测细胞侵袭能力 采用小室法检测细胞侵袭:使用PBS将50mg/L的Matrigel胶按照1:8的比例稀释后包被Transwell小室底部膜的上室面(每孔100μL),4℃风干后吸出残存液体。按照每孔1×10⁴的密度将3组A549细胞接种于处理好的上室中,在下室中加入500μL 10%胎牛血清的培养基中培养24h。用PBS洗去残留培养基,4%的多聚甲醛固定过夜后洗去甲醛,HE染色后洗去染色液。侵袭能力评价依照过膜细胞数:在300倍镜下选择小室中央区域,随机挑选5个视野并计数,求平均值。

1.2.6 miRNA-125b靶基因检测 采用targetscan(<http://www.targetscan.org>)根据3'-UTR预测miRNA-125b的靶基因因为BMF,Western blot检测3组A549细胞的BMF表达水平:按照说明书用蛋白裂解液(含磷酸酶抑制剂)裂解30~60min,4℃,12000×g离心5min获取总蛋白,BCA法测浓度后各取30μg蛋白在聚丙烯酰胺凝胶电泳,100V恒压转膜60~90min;5%脱脂奶粉/TBST室温封闭1~2h,BMF(抗体1:500)抗体4℃孵育过夜;1:5000β-actin室温孵育90min,TBST洗膜10min×3次,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔/鼠二抗室温孵育2h,TBST洗膜10min×2次,TBS洗膜5min,ECL发光试剂盒显色,显影,Gel DOXTM XR+凝胶成像系统成像,图像分析采用QuantityOne软件,取各条带透光体积与内参条带的比值作为目标蛋白相对表达量,实验重复3次。

1.3 统计学处理 采用SPSS21.0统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用t检验或单因素方差分析,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

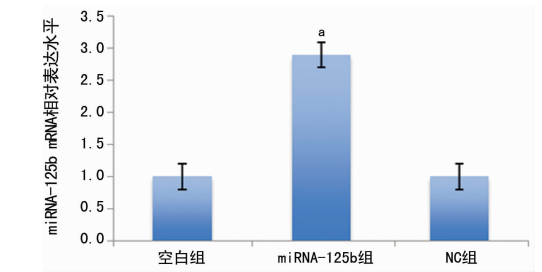
2.1 HBECS及A549细胞miRNA-125b的表达水平比较 HBECS、A549细胞miRNA-125b的表达水平分别为1.0±0.1、2.7±0.4,与HBECS细胞比较,A549细胞的miRNA-125b表达水平明显上升($t=5.925, P<0.05$),见图1。



^a: P<0.05,与HBECS细胞比较

图1 两种细胞的miRNA-125b表达水平

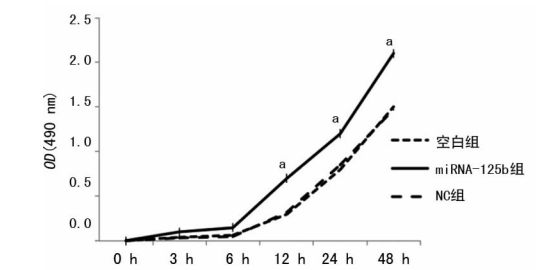
2.2 各组A549细胞的miRNA-125b表达水平比较 与空白组(1.0±0.2)比较,miRNA-125b组细胞的miRNA-125b(2.9±0.6)表达水平上升($t=6.249, P<0.05$);NC组的miRNA-125b表达水平(1.0±0.1)无明显变化($t=0.172, P>0.05$),见图2。



^a: P<0.05,与空白组比较

图2 各组细胞的miRNA-125b表达水平

2.3 各组A549细胞增殖能力比较 与空白组及NC组细胞比较,miRNA-125b组细胞的增殖能力明显增加($P<0.05$);NC组与空白组细胞的增殖能力比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图3。



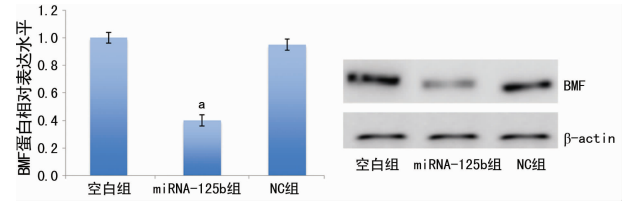
^a: P<0.05,与空白组比较

图3 各组细胞的增殖能力比较

2.4 各组A549细胞侵袭能力比较 空白组、miRNA-125b组、NC组过膜细胞数分别为(21.0±4.0)、(28.0±5.0)、(22.0±5.0)个。与空白组比较,miRNA-125b组细胞的侵袭能力上升($t=2.984, P<0.05$);NC组与空白组的侵袭能力比较,差异无统计学意义($t=0.357, P>0.05$)。

2.5 各组A549细胞的BMF表达水平 与空白组(1.0±0.1)比较,miRNA-125b组细胞的BMF(0.4±0.2)表达水平下降($t=5.921, P<0.05$);NC组的BMF(0.9±0.1)表达水平

无明显变化($t=0.285, P>0.05$),见图 4。



a: $P<0.05$,与空白组比较

图 4 各组细胞的 BMF 表达水平

3 讨论

目前,我国肺癌的发生率呈现逐年上升的趋势,其中 85% 的患者为 NSCLC。NSCLC 的恶性程度较高,肿瘤进展较快,多数患者在确诊时已经出现转移,患者预后较差^[6]。miRNA 是一种内源性非编码单链 RNA 分子,参与转录后基因表达调控。目前为止,动植物及病毒中已经发现有超过 20 000 个 miRNA 分子^[7]。既往研究发现,多种疾病(心血管疾病、糖尿病及多种恶性肿瘤)患者存在异常的 miRNA 表达谱系,且 miRNA 在外周血中的存在较为稳定,多种 miRNA 在疾病诊断中的价值引起临床上的关注。对 miRNA 生物学活性的深入了解,以 miRNA 作为疾病治疗潜在靶点的研究已引起广泛关注^[8-9]。

miRNA-125b 属于 miRNA-125 家族,在不同生物学过程中发挥重要作用。miRNA-125b 与肿瘤的发生、发展具有密切相关性,miRNA-125b 在多种肿瘤组织中表达水平升高,本研究中,与 HBECs 相比,肺癌细胞 A549 的表达水平明显上升。既往研究发现,化疗失败的白血病患者 miRNA-125b 水平明显上升,而高表达的 miRNA-125b 能够有效抑制多种化疗药物引起的白血病细胞凋亡,增强肿瘤细胞的耐药性^[10];但 miRNA-125b 的过量表达后子宫内膜癌细胞的增殖能力下降,细胞周期停滞于 G₁ 期,细胞凋亡增加^[11]。上述结果说明 miRNA-125b 的作用具有组织特异性,本研究旨在观察 miRNA-125b 对肺癌细胞 A549 的增殖及侵袭能力的影响,并探讨其机制。

本研究通过 miRNA-125b 模拟物转染的方式构建 miRNA-125b 的高表达模型,经过转染后,A549 细胞的 miRNA-125b 表达水平明显上调,细胞的增殖能力及侵袭能力增加。miRNA-125b 调节细胞生物活性的机制较为复杂,既往研究发现 BMF 是 miRNA-125b 的潜在靶基因。BMF 属于 Bcl-2 家族,是常见的肿瘤促凋亡蛋白之一,人体 BMF 基因位于 15 号染色体 q14,在多种组织(肾脏、胰腺及造血系统等)中广泛表达^[12]。在正常细胞中,BMF 与动力蛋白复合物结合,处于静止状态;BMF 与动力蛋白复合物解离后参与线粒体途径的细胞凋亡,BMF 表达水平的下降或表达缺失导致细胞凋亡途径受阻,细胞的增殖能力增加^[13-14]。

既往研究发现,miRNA 主要通过两种机制调节靶向基因的表达:(1)miRNA 与靶基因完全互补结合,切割靶基因的 mRNA 从而抑制其表达;(2)当 miRNA 与靶基因不完全互补时,miRNA 主要抑制靶基因的翻译过程,而不影响 mRNA 的稳定性^[15]。部分 miRNA 可以通过上述两种机制抑制靶基因的表达,而 miRNA-125b 对靶基因 BMF 的作用机制有待于进一步研究。

综上所述,miRNA-125b 能通过抑制 BMF 的表达促进肺

癌细胞 A549 的增殖及侵袭。

参考文献

[1] ETTINGER D S, AKERLEY W, BEPLER G, et al. Non-small cell lung cancer[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2010, 8(7): 740-801.

[2] 陈勃. 血液中 microRNA-21 对肺癌诊断价值的 Meta 分析[J]. 重庆医学, 2015, 44(17): 2389-2391.

[3] 郭迪, 李宏云, 杨华. miRNA-152 表达与 NSCLC 对顺铂耐药的关系及其机制研究[J]. 重庆医学, 2016, 45(10): 1297-1301.

[4] ZUBERI M, KHAN I, MIR R, et al. Utility of serum miR-125b as a diagnostic and prognostic indicator and its alliance with a panel of tumor suppressor genes in epithelial ovarian cancer[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0153902.

[5] 王淑芳, 冯玉珍, 霍新龙. microRNA 在子宫内膜癌发生、发展及临床诊治中的研究[J]. 中国医药导报, 2013, 10(6): 30-32.

[6] 丁明建, 王闻哲, 王孝举. microRNA 在肺癌中的表达及其临床意义[J]. 中国临床药理学杂志, 2013, 29(12): 965-968.

[7] 刘换新, 郭琳琅. microRNA 在肺癌早期诊断及预后中的应用[J]. 临床与实验病理学杂志, 2013, 29(11): 1232-1234.

[8] 常甜甜, 刘东华. microRNA 与肺癌侵袭转移、诊断、治疗、预后关系的研究现状[J]. 辽宁医学院学报, 2016, 37(2): 96-100.

[9] 吴传勇, 薛剑, 姜加陶. microRNA 在肺癌诊断、治疗及预后判断中的作用[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2011, 31(3): 368-372.

[10] ZHOU L, BAI H, WANG C, et al. microRNA-125b promotes leukemia cell resistance to daunorubicin by inhibiting apoptosis[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(5): 1909-1916.

[11] 常军, 刘玲芳, 郑殊娟, 等. 过表达 miR-125b 对子宫内膜癌 HEC-1B 细胞周期、增殖和凋亡的影响及其可能的机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2014, 21(3): 303-308.

[12] FIORI M E, BARBINI C, HAAS T L, et al. Antitumor effect of miR-197 targeting in p53 wild-type lung cancer[J]. Cell Death Differ, 2014, 21(5): 774-782.

[13] LIEW S H, VAITHIYANATHAN K, COOK M, et al. Loss of the proapoptotic BH3-only protein BCL-2 modifying factor prolongs the fertile Life span in female mice[J]. Biol Reprod, 2014, 90(4): 77-80.

[14] TAN B S, TIONG K H, CHOO H L, et al. Mutant p53-R273H mediates cancer cell survival and anoikis resistance through AKT-dependent suppression of BCL2-modifying factor(BMF)[J]. Cell Death Dis, 2015, 6(7): e1826.

[15] 申娴, 张艳秋, 王希恺, 等. 微小 RNA-125b 对肺癌细胞 95D 生物学功能的影响[J]. 环境与职业医学, 2016, 33(5): 444-449.