

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)及二甲亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司, Gel Dox™ 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 °C,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 1 μg 总 RNA 反转录合成 cDNA,取 5 μL cDNA 稀释 4 倍后,取 2 μL 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 °C 预变性 3 s;95 °C 变性 10 s;60 °C 退火/延伸 30 s,重复 40 个循环;65~95 °C 每增加 0.5 °C 进行 5 s 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 10 min,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 10 min 后以反应生成复合物。将配置好的复合物铺在 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、48 h 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 100 μL)及含 0.5% MTT 的培养液(每孔 5 μL),于 37 °C,5%CO₂ 培养箱中孵育 4 h 后弃培养液,加入 100 μL DMSO 原液,振荡 10 min,待结晶完全溶解后用酶标仪于 490 nm 波长处测定吸光度(OD)值,实验重复 3 次。

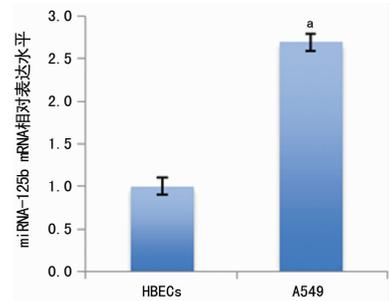
1.2.5 Transwell 小室细胞检测细胞侵袭能力 采用小室法检测细胞侵袭力:使用 PBS 将 50 mg/L 的 Matrigel 胶按照 1:8 的比例稀释后包被 Transwell 小室底部膜的上室面(每孔 100 μL),4 °C 风干后吸出残存液体。按照每孔 1×10⁴ 的密度将 3 组 A549 细胞接种于处理好的上室中,在下室中加入 500 μL 10%胎牛血清的培养基中培养 24 h。用 PBS 洗去残留培养基,4%的多聚甲醛固定过夜后洗去甲醛,HE 染色后洗去染色液。侵袭能力评价依照过膜细胞数:在 300 倍镜下选择小室中央区域,随机挑选 5 个视野并计数,求平均值。

1.2.6 miRNA-125b 靶基因检测 采用 targetscan(<http://www.targetsca.com>)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 30~60 min,4 °C,12 000×g 离心 5 min 获取总蛋白,BCA 法测浓度后各取 30 μg 蛋白在聚丙烯酰胺凝胶电泳,100 V 恒压转膜 60~90 min;5%脱脂奶粉/TBST 室温封闭 1~2 h,BMF(抗体 1:500)抗体 4 °C 孵育过夜;1:5 000 β-actin 室温孵育 90 min,TBST 洗膜 10 min×3 次,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔/鼠二抗室温孵育 2 h,TBST 洗膜 10 min×2 次,TBS 洗膜 5 min,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

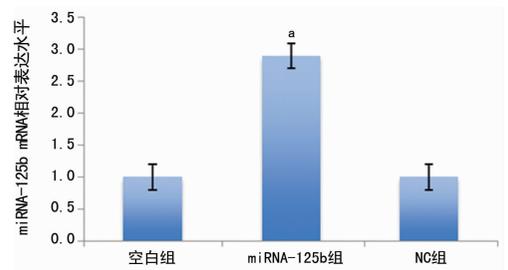
2.1 HBECS 及 A549 细胞 miRNA-125b 的表达水平比较 HBECS、A549 细胞 miRNA-125b 的表达水平分别为 1.0±0.1、2.7±0.4,与 HBECS 细胞比较,A549 细胞的 miRNA-125b 表达水平明显上升(*t*=5.925,*P*<0.05),见图 1。



^a:*P*<0.05,与 HBECS 细胞比较

图 1 两种细胞的 miRNA-125b 表达水平

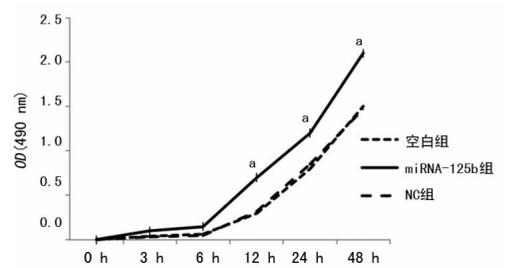
2.2 各组 A549 细胞的 miRNA-125b 表达水平比较 与空白组(1.0±0.2)比较,miRNA-125b 组细胞的 miRNA-125b (2.9±0.6)表达水平上升(*t*=6.249,*P*<0.05);NC 组的 miRNA-125b 表达水平(1.0±0.1)无明显变化(*t*=0.172,*P*>0.05),见图 2。



^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。

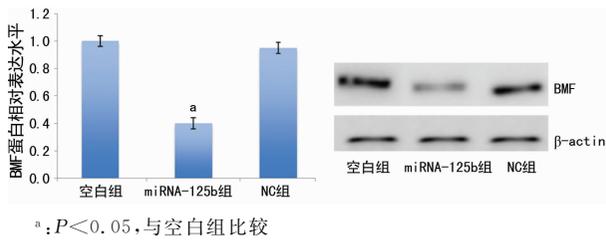


图 4 各组细胞的 BMF 表达水平

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 记忆位于 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] 陈劼. 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.