

## microRNA-335 对人非小细胞肺癌细胞迁移、侵袭及增殖能力的影响

王 鹤<sup>1</sup>, 刘志利<sup>1</sup>, 德 伟<sup>2</sup>, 王朝霞<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第二附属医院肿瘤科, 江苏 南京 210011; <sup>2</sup>南京医科大学生物化学与分子生物学系, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的: 研究 microRNA-335(miR-335)在非小细胞肺癌中的表达及其对细胞迁移、侵袭能力与增殖能力的影响。方法: 采用荧光实时定量 PCR 检测 miR-335 在 12 对非小细胞肺癌与癌旁正常组织中的表达差异, 以及 miR-335 在非小细胞肺癌 SPCA-1 细胞与肺正常上皮细胞 16HBE 中的表达差异; 应用 Lipofectamine 2000 瞬时转染 anti-miR-335 下调 SPCA-1 细胞中 miR-335 的表达, 并通过荧光实时定量 PCR 验证; 划痕实验检测 miR-335 对 SPCA-1 细胞迁移能力的影响; Transwell 侵袭实验检测 miR-335 对 SPCA-1 细胞侵袭能力的影响; MTT 实验及克隆形成实验检测 miR-335 对 SPCA-1 细胞增殖能力的影响。结果: 与癌旁正常组织比较, miR-335 在非小细胞肺癌组织中显著高表达( $P < 0.05$ ); 与 16HBE 细胞比较, miR-335 在 SPCA-1 细胞中显著高表达 ( $P < 0.05$ ); 利用 Lipofectamine 2000 瞬时转染 anti-miR-335 入 SPCA-1 细胞 24 h 时 miR-335 表达明显减弱 ( $P < 0.01$ ); 抑制 miR-335 表达对 SPCA-1 细胞迁移和侵袭能力有显著的抑制作用, 抑制率分别为  $(42.8 \pm 2.7)\%$  ( $P < 0.01$ ) 及  $(73.25 \pm 4.4)\%$  ( $P < 0.01$ ); 抑制 miR-335 表达对 SPCA-1 细胞的增殖能力无明显影响。结论: miR-335 在非小细胞肺癌中呈高表达, miR-335 低表达能显著抑制 SPCA-1 细胞的迁移和侵袭能力, 但对 SPCA-1 细胞的增殖能力无明显影响。

**[关键词]** microRNA-335; 非小细胞肺癌; 迁移; 侵袭; 增殖

**[中图分类号]** R734.2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)06-795-05

## Effect of microRNA-335 on migration, invasion and proliferation of NSCLC cell

WANG He<sup>1</sup>, LIU Zhi-li<sup>1</sup>, DE Wei<sup>2</sup>, WANG Zhao-xia<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011; <sup>2</sup>Biochemistry and Molecular Biology Laboratory of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the expression of microRNA-335(miR-335) in non-small cell lung cancer(NSCLC) and its effect on migration, invasion and proliferation of NSCLC cell. **Methods:** Real-time quantitative PCR was used to detect and compare the expression of microRNA-335 in 12 pairs of non-small cell lung cancer, adjacent normal tissue, NSCLC cell line SPCA-1 and normal epithelium cell line 16HBE. The expression of miR-335 in SPCA-1 cell was down-regulated by anti-miR-335 transient transfection with Lipofectamine 2000, and the effect was identified by real-time quantitative PCR. Cell migration and invasion was measured *in vitro* by wound healing assay and transwell assay. The influence of miR-335 on SPCA-1 cell proliferation was detected by MTT assay and colony formation assay. **Results:** Compared with adjacent normal tissues, miR-335 in non-small cell lung cancer was significantly up-regulated( $P < 0.05$ ). Similar to that, the expression of miR-335 was significantly increased in SPCA-1 cell compared to 16HBE cell ( $P < 0.05$ ). The miR-335 expression of SPCA-1 cell was significantly down-regulated 24 hours after anti-miR-335 transfection ( $P < 0.01$ ). In SPCA-1 cell, decreased miR-335 significantly inhibited cell migration and invasion, with the inhibiting rates of  $(42.8 \pm 2.7)\%$  ( $P < 0.01$ ) and  $(73.25 \pm 4.4)\%$  ( $P < 0.01$ ), respectively. But, no effect on SPCA-1 cell proliferation was observed when the expression of miR-335 was inhibited. **Conclusion:** The expression of miR-335 is up-regulated in NSCLC. Down-regulating expression of miR-335 significantly inhibites migration and invasion of SPCA-1 cell while has no effect on cell proliferation.

**[Key words]** microRNA-335; non-small cell lung cancer; migration; invasion; proliferation

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(6): 795-799]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30973477); 江苏省自然科学基金(BK2010590); 江苏省六大人才高峰项目(09-B1-021)资助

\*通讯作者, E-mail: misswangzhaoxia@yahoo.com.cn

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是临床最常见的一种肺癌类型, 约占肺癌总数的 80%~85%。由于大多数患者在患病早期没有明

显的症状,确诊时多已进入中晚期阶段,治疗效果及预后较差。近年来,微小 RNA(microRNAs, miRNAs)的发现为肿瘤治疗靶点的研究带来了新的曙光,它是一类长约 22 个核苷酸的非编码小 RNA,通过降解靶基因 mRNA 或抑制其翻译而在肿瘤的发生、发展过程中发挥着类似于癌基因和抑癌基因的功能<sup>[1]</sup>。最近研究发现 miR-335 在结肠癌、儿童急性粒细胞性白血病及星形细胞瘤中呈现高表达<sup>[2-4]</sup>。Shu 等<sup>[4]</sup>发现过表达 miR-335 可促进星形细胞瘤细胞迁移、侵袭及增殖能力。本课题组等利用 miRNA 芯片技术,获得了 NSCLC 癌组织与癌旁正常肺组织的 miRNA 差异表达图谱,并通过荧光实时定量 PCR 鉴定了 40 个差异表达的 miRNAs,发现与癌旁正常肺组织相比,在非小细胞肺癌组织中 miR-335 表达显著增高<sup>[5]</sup>。本研究进一步检测了 miR-335 在非小细胞肺癌组织以及细胞水平的表达情况;将人工合成的 anti-miR-335 瞬时转染 NSCLC 细胞 SPCA-1,观察其对该细胞迁移、侵袭及增殖能力的影响,并探讨可能的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

12 例人非小细胞肺癌组织标本由南京医科大学第二附属医院提供。NSCLC 细胞株 SPCA-1 与人肺正常上皮细胞 16HBE 由南京医科大学生化实验室提供。DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)(GIBCO 公司,美国)。RNA 抽提试剂(TRIZOL, Takara 公司,日本)。Anti-miR-335 由美国 Invitrogen 公司合成, control miRNA 为阴性对照(negative control, NC)。Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司,美国)。基质胶

(matrigel, BD Bioscience 公司,美国)。Transwell 小室(Costar 公司,美国)。3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐、二甲基亚砜(DMSO)、结晶紫(台盼蓝)染液、PBS(Hyclone 公司,美国)。荧光定量多聚酶链反应(PCR)试剂盒(Ambion 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

SPCA-1 细胞及正常肺上皮细胞均在含 10%FBS 的 DMEM 培养液, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 及相对湿度条件下培养。

#### 1.2.2 细胞转染

对数生长期 SPCA-1 细胞于转染前 24 h 接种于 6 孔板中(3 × 10<sup>5</sup> 个/孔), 培养至细胞达 70% 融合度时进行细胞转染。按照 Invitrogen 公司的操作说明将 100 pmol anti-miR-335 转染入 SPCA-1 细胞中, 转染 control miRNA 组为阴性对照, 单独转染脂质体组为空白对照组。37°C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养后进行相关检测。

#### 1.2.3 荧光实时定量 PCR

miRNA 的逆转录-实时定量多聚酶链反应(qRT-PCR)参照 Chen 等<sup>[6]</sup>的方法。对 miR-335 设计 1 条逆转录引物以及相应的 1 对 PCR 引物(序列见表 1); 10 μl 转录体系中 M-MLV 逆转录酶 100 U, 50 nmol/L 引物, 总 RNA 50 ng; 用相应的 PCR 引物在 PRISM7000 型定量 PCR 仪(Applied Biosystems 公司, 美国)进行 PCR 定量检测。试剂采用 FastStart DNAMaster SYBRGreen I 试剂盒。PCR 条件为 95°C 30 s, 95°C 5 s, 60°C 34 s, 进行 40 个循环; 采用 U6 RNA 作为内参。3 次独立样本经过 3 次独立实验后得到的数据, 通过比较 CT 值法(2<sup>-ΔΔCT</sup>)进行相对定量分析。

表 1 qRT-PCR 检测 miR-335 的引物序列

Table 1 The primer sequences for miR-335 detection in qRT-PCR

| 基因      | 引物     | 序列(5'→3')  |
|---------|--------|--|
| miR-335 | RT 引物  | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACA     |
|         | PCR 引物 | 上游: AGCCGTCAAGAGCAATAACGAA<br>下游: GTGCAGGGTCCGAGGT |
| U6      | PCR 引物 | 上游: CTCGCTTCGGCAGCACA<br>下游: AACGCTTCACGAATTTGCGT  |

#### 1.2.4 细胞划痕实验

将细胞按 1 × 10<sup>6</sup> 个/孔接种于 6 孔培养板。当细胞长至 80%~90%, 融合形成单细胞层时, 用 200 μl 无菌枪头在单层细胞上垂直划过, 形成一个创伤口。用 PBS 洗 3 次以去除细胞碎片, 剩余细胞继续培养, 于 24 h 时在倒置显微镜下观察伤口愈合情况。

#### 1.2.5 Transwell 侵袭实验

将 Matrigel 原液于冰箱内 4°C 冰浴过夜融化, 用融化的 Matrigel 原液和预冷无血清 DMEM 培养液配制 Transwell chamber 上室凝胶液(0.8 g/L), 以每孔 100 μl 包被 Transwell 上室, 37°C 放置 4 h 使其成胶。每个处理组细胞浓度为 1 × 10<sup>6</sup> 个/ml, 每个

transwell 上室加入 200  $\mu$ l 细胞悬液, 下室加入 600  $\mu$ l 条件培养基 (含有 20%FBS), 置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>, 培养箱培养。每个处理组设 3 个复孔。培养 48 h 后从双室培养板中取出 Transwell 小室, 吸弃小室内的液体, 用棉签擦净基底膜胶, PBS 漂洗后立即使用 4%多聚甲醛固定 15 min; PBS 漂洗 2 次, 每次 2 min; 0.1%结晶紫溶液染色 30 min, ddH<sub>2</sub>O 漂洗, 200 倍镜下观察并拍照, 选取上、中、下 3 个视野计数, 取均数作为透膜细胞数。

### 1.2.6 MTT 实验

收集上述各实验组细胞制备成单细胞悬液, 3 000 个/孔接种于 96 孔培养板, 每组细胞设 5 个平行孔。37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度下培养 24 h~96 h, 每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 20  $\mu$ l, 继续孵育 4 h, 弃孔内培养液, 每孔加入 150  $\mu$ l 二甲基亚砜 (DMSO), 振荡 10 min, 待结晶物充分溶解后, 酶标仪检 490 nm 处各孔吸光度值。

### 1.2.7 细胞平板克隆形成实验

接种各实验组细胞至 6 孔板, 每孔细胞数 800 个, 分布均匀, 继续培养 10 d, 出现肉眼可见的克隆后终止培养, 用 4%多聚甲醛固定 15 min, 结晶紫染液染色 5 min, 洗净晾干, 拍照记录。

### 1.3 统计学方法

所有实验重复 3 次, 运用 SPSS15.0 统计软件分析。数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。采用方差分析 (两两比较采用成组 *t* 检验) 和 *t* 检验,  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结 果

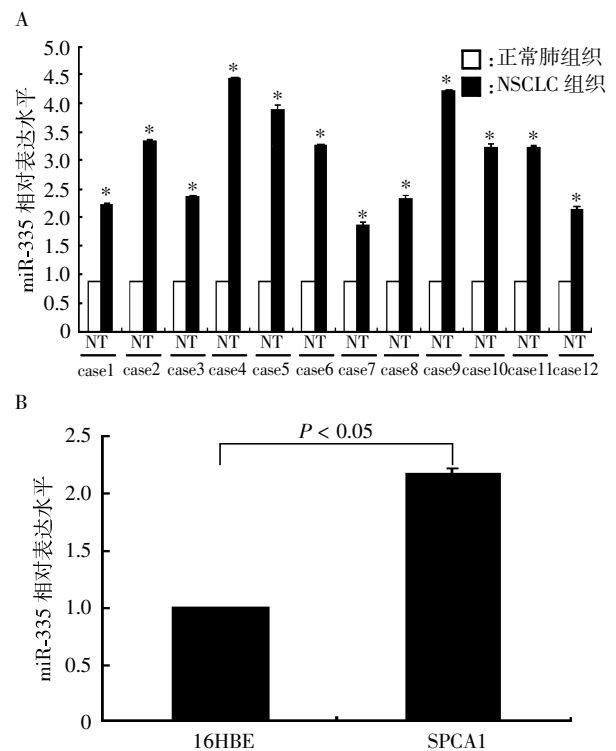
### 2.1 miR-335 在 NSCLC 标本及细胞系中的表达

对提取的 12 对标本的 RNA 进行荧光实时定量 PCR 检测后得出每个标本的 CT 值, 统计分析后得到 NSCLC 组织相对癌旁正常肺组织的 miR-335 表达率平均为  $3.20 \pm 0.86$ , 即 NSCLC 组织中 miR-335 表达水平明显高于正常肺组织 ( $P < 0.05$ , 图 1A)。miR-335 在 NSCLC 细胞 SPCA-1 中的表达显著高于在肺正常细胞 16HBE 中的表达 ( $P < 0.05$ , 图 1B)。

### 2.2 实时定量 PCR 验证转染效果

为确定 anti-miR-335 是否成功导入 SPCA-1 细胞中, 在转染 24 h 后, 用荧光实时定量 PCR 相对定量的方法检测了 miR-335 的表达情况, 结果发现转染 24 h 时, anti-miR-335 转染组中 miR-335 的表达较对照组明显降低 ( $P < 0.01$ , 图 2), 该结果表明瞬时转染成功, 后继实验可以采用 anti-miR-335 转染

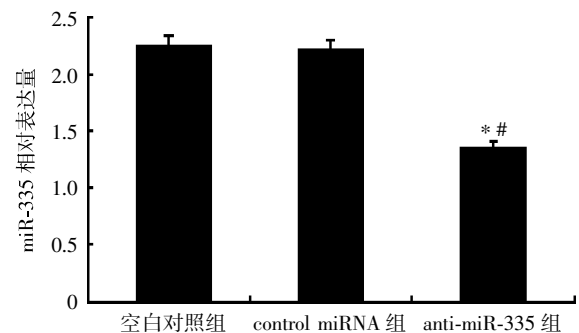
24 h 的细胞进行分析。



A: miR-335 在 12 对 NSCLC 标本中的表达 ( $P < 0.05$ ); B: miR-335 在 NSCLC 细胞株和正常肺上皮细胞中的表达。

图 1 miR-335 在非小细胞肺癌中的表达

Figure 1 The expressin of miR-335 in NSCLC



与空白对照组比较,  $*P < 0.01$ ; 与 control miRNA 组比较,  $\#P < 0.01$ 。

图 2 实时定量 PCR 检测瞬时转染后 miR-335 表达结果

Figure 2 Result of miR-335 expression after transient transfection assayed by real-time quantitative PCR

### 2.3 miR-335 对 SPCA-1 细胞迁移能力的影响

0 h 和 24 h 时点 SPCA-1 细胞迁移率对比结果显示, anti-miR-335 转染组细胞迁移能力显著低于 control miRNA 组和空白对照组 ( $P < 0.01$ ), 说明 miR-335 能明显抑制 SPCA-1 细胞的迁移能力, 抑制率为  $(42.8 \pm 2.7)\%$  (图 3)。

### 2.4 miR-335 对 SPCA-1 细胞侵袭能力的影响

SPCA-1 细胞转染 anti-miR-335 组细胞穿膜数为  $(112.5 \pm 15)$  个, 显著低于 control miRNA 组的

(422.5 ± 12.0)个和空白对照组的(430.6 ± 17.0)个( $P < 0.01$ ),表明抑制 miR-335 表达能显著抑制 SPCA-1 细胞的侵袭能力(图 4),抑制率为(73.25 ± 4.40)%。

### 2.5 miR-335 对 SPCA-1 细胞增殖能力的影响

将 anti-miR-335 及阴性对照 control miRNA 转染 SPCA-1 细胞后,通过 MTT 方法检测细胞生长曲线(图 5A)。结果表明,与转染 control RNA 的 SPCA-1 细胞相比,转染了 anti-miR-335 的 SPCA-1 细胞增殖能力未发生明显变化( $P > 0.05$ );同样细胞平板

克隆形成实验表明,与转染 control miRNA 组相比,anti-miR-335 转染组 SPCA-1 细胞增殖能力无明显改变( $P > 0.05$ ,图 5B),进一步证实了 miR-335 对 SPCA-1 细胞增殖能力无明显影响。

### 3 讨论

miRNAs 是一种广泛存在的对基因表达进行转录后水平调控的分子,具有调控基因表达及细胞增殖、分化和凋亡等多种功能,几乎在所有肿瘤的发生或发展过程中均可检测到 miRNAs 的过表达或表

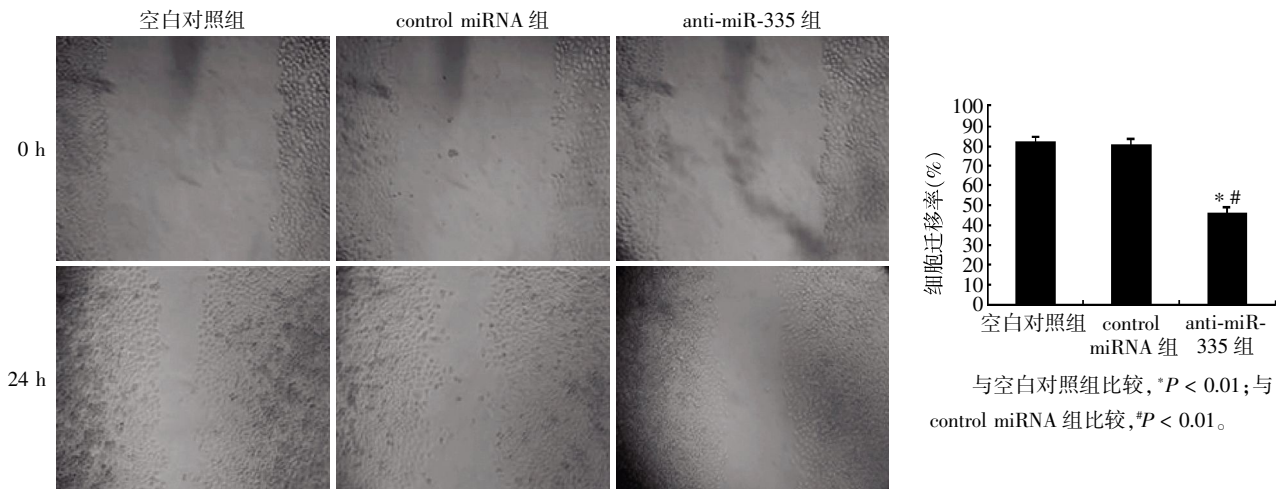


图 3 miR-335 对 SPCA-1 细胞迁移能力的影响  
Figure 3 The effect of miR-335 on SPCA-1 migration

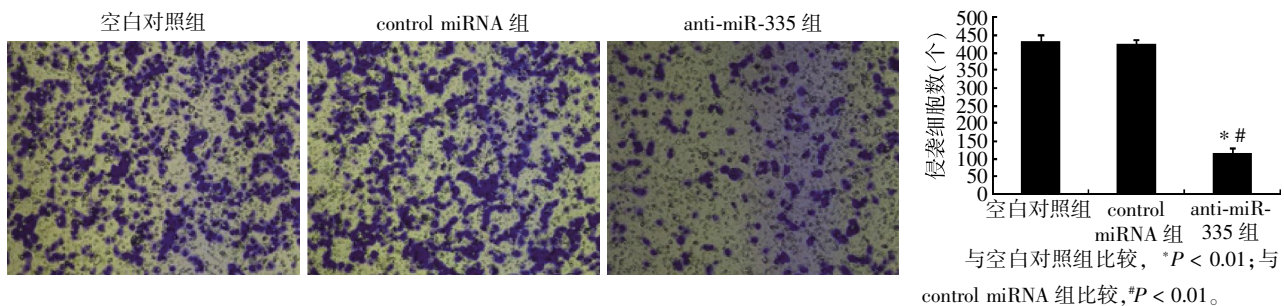
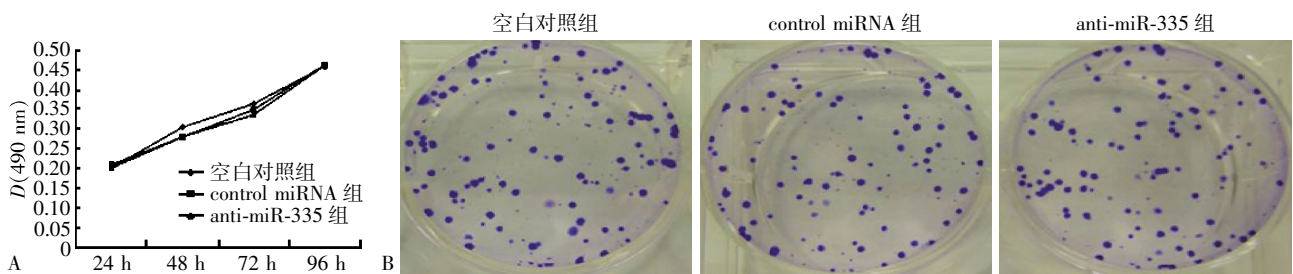


图 4 miR-335 对 SPCA-1 细胞侵袭能力的影响  
Figure 4 The effect of miR-335 on SPCA-1 invasion



A: MTT 实验结果; B: 胞平板克隆形成实验结果。

图 5 miR-335 对 SPCA-1 细胞增殖能力的影响  
Figure 5 The effect of miR-335 on SPCA-1 proliferation

达缺失,表现出类似癌基因或抑癌基因的作用<sup>[7-8]</sup>。如 miR-192、miR-194、miR-215 在结肠癌中表达水平下调且与临床病理特征相关<sup>[9]</sup>;miR-143、miR-145 在肝外胆管癌中低表达,上调 miR-143、miR-145 表达能够抑制胆管癌细胞增殖,诱导细胞凋亡和细胞周期阻滞<sup>[10]</sup>;miR-200c、miR-141 在膀胱肿瘤组织高于癌旁正常膀胱组织且其表达量与膀胱肿瘤恶性程度相关<sup>[11]</sup>;miR-26a 在胆管癌中表达水平上调且具促进细胞增殖的能力<sup>[12]</sup>。目前只有少部分 miRNA 的生物学功能得到确定,而大部分则尚未阐明。因此,对在肿瘤中具有显著表达差异的 miRNA 进行生物学功能研究是必须而有重要意义的。

研究发现 miR-335 在不同的肿瘤中发挥着不同的作用,miR-335 在乳腺癌、胃癌中低表达,过表达后抑制肿瘤侵袭、转移<sup>[13-14]</sup>,发挥着类似于肿瘤抑制基因的功能,而在星形细胞瘤中 miR-335 高表达,能促进肿瘤细胞增殖、侵袭<sup>[4]</sup>,发挥着癌基因的作用。本课题组利用 miRNA 芯片技术,获得了 NSCLC 癌组织与癌旁正常肺组织的 miRNA 差异表达图谱,并通过荧光实时定量 PCR 鉴定了 40 个差异表达的 miRNAs,发现与癌旁正常肺组织相比较,在 NSCLC 组织中 miR-335 表达显著增高<sup>[5]</sup>。本研究在 NSCLC 组织及细胞水平对 miR-335 进行的荧光实时定量 PCR,进一步验证了 miR-335 在 NSCLC 呈现高表达,因此本研究推测 miR-335 可能在 NSCLC 中发挥类似癌基因的功能。为了证实这一猜想,本课题组进一步研究了 miR-335 对 NSCLC SPCA-1 细胞的迁移、侵袭及增殖能力的影响。首先人工合成 anti-miR-335 并将其转染入 SPCA-1 细胞中,通过荧光实时定量 PCR 证实了转染成功,miR-335 表达抑制,随后的细胞迁移和侵袭实验显示,抑制 miR-335 表达的 SPCA-1 细胞无论在细胞的迁移能力还是侵袭能力上都较正常人肺上皮细胞显著降低;但 MTT 实验和细胞平板克隆形成实验表明 miR-335 对 SPCA-1 细胞的增殖能力无明显影响。上述结果部分证实了之前的推断。由此可以获得初步结论:NSCLC 高表达 miR-335 与癌细胞的迁移和侵袭能力密切相关;下调 miR-335 的表达可显著抑制 NSCLC 的迁移和侵袭能力,提示 miR-335 可能是 NSCLC 基因诊断和治疗的新靶点,可为 NSCLC 侵袭、转移的诊断提供有用的指标,也将为临床治疗 NSCLC 提供新的策略和方案。

[参考文献]

[1] Farazi TA, Spitzer JJ, Morozov P, et al. MiRNAs in human

cancer[J]. *J Pathol*, 2011, 223(2):102-115

- [2] Vickers MM, Bar J, Gorn-Hondermann I, et al. Stage-dependent differential expression of microRNAs in colorectal cancer; potential role as markers of metastatic disease [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2012, 29(2):123-132
- [3] Luo XQ, Xu L, Ke ZY, et al. MicroRNA expression in childhood acute granulocytic leukemia and its subtypes [J]. *Chinese Journal of Oncology*, 2011, 33(11):831-835
- [4] Shu M, Zheng X, Wu S, et al. Targeting oncogenic miR-335 inhibits growth and invasion of malignant astrocytoma cells[J]. *Molecular Cancer*, 2011, 10:59
- [5] Wang R, Wang ZX, Yang JS, et al. MicroRNA-451 functions as a tumor suppressor in human non-small cell lung cancer by targeting ras-related protein 14 (RAB14) [J]. *Oncogene*, 2011, 30(23):2644-2658
- [6] Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(20):e179
- [7] Lal A, Navarro F, Maher CA, et al. MiR-24 Inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to "seedless" 3' UTR microRNA recognition elements [J]. *Mol Cell*, 2009, 35(5):610-625
- [8] Sevignani C, Calin GA, Nnadi SC, et al. MicroRNA genes are frequently located near mouse cancer susceptibility loci [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(19):8017-8022
- [9] Chiang Y, Song Y, Wang Z, et al. microRNA-192, -194 and -215 are frequently downregulated in colorectal cancer [J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2012, 3(3):560-566
- [10] 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, 30(5):612-616
- [11] 李鹏超, 陶俊, 吕强, 等. MiR-200c 和 miR-141 在膀胱移行细胞癌中的表达研究 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2010, 30(6):768-771
- [12] Zhang J, Han C, Wu T. MicroRNA-26A enhances cholangiocarcinoma growth through degradation of GSK-3 $\beta$  and activation of  $\beta$ -catenin [J]. *Hepatology*, 2011, 54 (Suppl 1):1356A-1357A
- [13] Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis [J]. *Nature*, 2008, 451(7175):147-152
- [14] Xu Y, Zhao F, Wang Z, et al. MicroRNA-335 acts as a metastasis suppressor in gastric cancer by targeting Bcl-2 and specificity protein 1 [J]. *Oncogene*, 2012, 31(11):1398-1407

[收稿日期] 2012-01-09