

## 顺铂诱导 SPC-A1 人肺腺癌细胞凋亡过程中 miR-27a 的表达及意义

朱善军, 韩月, 徐娟, 谢而付, 陈丹, 张美娟, 张燕, 娄鉴芳, 曹艳, 许雨乔, 孙瑞红, 王芳, 潘世扬\*  
(南京医科大学第一附属医院检验学部, 国家临床检验重点专科, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:检测 miR-27a 在顺铂(DDP)体外诱导人肺腺癌细胞株 SPC-A1 凋亡过程中的表达变化,探讨其与细胞凋亡之间的相关性及其检测的临床意义。方法:体外培养 SPC-A1 细胞,实验组加入终浓度为 2.5  $\mu\text{g/ml}$  DDP,同时设置不加 DDP 的对照组。观察 12、24、48 和 72 h 后显微镜下细胞形态学变化,流式细胞术检测细胞凋亡率,real-time PCR 检测培养上清液中和 SPC-A1 细胞内 miR-27a 的表达变化。结果:DDP(2.5  $\mu\text{g/ml}$ )组 SPC-A1 细胞形态呈凋亡改变,在 48 和 72 h 凋亡率分别为(59.3  $\pm$  2.5)%和(76.4  $\pm$  3.1)%,均显著高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。DDP (2.5  $\mu\text{g/ml}$ )组培养上清液中和 SPC-A1 细胞内 miR-27a 含量在 24、48 和 72 h 均显著高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。DDP (2.5  $\mu\text{g/ml}$ )组培养上清液中 miR-27a 含量在 12、24、48 和 72 h 逐渐升高,两两比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:miR-27a 在 DDP 诱导的 SPC-A1 细胞凋亡中表达升高,提示其可能参与细胞凋亡调控;对 miR-27a 进行定量检测有望用于对肺腺癌化疗疗效的评估。

**[关键词]** 顺铂;肺癌 SPC-A1;细胞凋亡;miR-27a

**[中图分类号]** Q786

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)07-873-04

**doi:**10.7655/NYDXBNS20130703

## Expression changes and significance of miR-27a in cisplatin-induced apoptosis of human lung adenocarcinoma cell line SPC-A1

Zhu Shanjun, Han Yue, Xu Juan, Xie Erfu, Chen Dan, Zhang Meijuan, Zhang Yan, Lou Jianfang, Cao Yan, Xu Yuqiao, Sun Ruihong, Wang Fang, Pan Shiyang\*

(Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, National Key Clinical Department of Laboratory Medicine, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression changes of miR-27a in human lung adenocarcinoma cell line SPC-A1 after cisplatin chemotherapy *in vitro*, and to discuss its relationship with cell apoptosis and clinical significance. **Methods:** SPC-A1 cells were cultured *in vitro* and treated with DDP at 2.5  $\mu\text{g/ml}$  for 12, 24, 48 and 72 h. Cell morphology was observed by phase contrast microscope, as well as cell apoptosis was detected by flow cytometry; expression changes of miR-27a both in cultural supernatants and SPC-A1 cells were analyzed by real-time PCR. **Results:** SPC-A1 cells showed morphological changes of apoptosis in the DDP (2.5  $\mu\text{g/ml}$ ) group. The apoptotic rates of SPC-A1 cells at 48 and 72 h in the DDP (2.5  $\mu\text{g/ml}$ ) group [(59.3  $\pm$  2.5)% and (76.4  $\pm$  3.1)%, respectively] were higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). PCR analysis demonstrated that the levels of miR-27a were significantly increased in the DDP (2.5  $\mu\text{g/ml}$ ) group both in cultural supernatants and SPC-A1 cells compared to the level of the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The level of miR-27a raised in human lung adenocarcinoma cell line SPC-A1 after cisplatin chemotherapy *in vitro*. Quantitative analysis of miR-27a may have important value for chemotherapy monitoring of lung adenocarcinoma.

**[Key words]** cisplatin; SPC-A1; cell apoptosis; miR-27a

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(7): 873-876]

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助(81272324, 81000754, 81101322, 81201359); 江苏省实验诊断学重点实验室基金(XK201114); 江苏高校优势学科建设工程资助

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: sypan@njmu.edu.cn

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类长度为 21~24 个核苷酸的非编码小分子 RNA, 可在转录水平调控靶基因表达<sup>[1-2]</sup>。据报道, 一些 miRNA 广泛参与细胞增殖、分化、凋亡和基因调控, 在肿瘤的发生、

发展中扮演重要角色<sup>[3-4]</sup>。文献报道,miR-27a 作为肿瘤相关基因,其异常表达与人类食管癌、肝癌、胃癌和结直肠癌等恶性肿瘤存在相关性<sup>[5-7]</sup>。顺铂(cisplatin, DDP)是目前治疗肺癌等肿瘤的常用药物之一,具有直接细胞毒作用,可诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[8]</sup>。本实验以人肺腺癌细胞株 SPC-A1 为研究对象,检测 miR-27a 在 DDP 诱导的 SPC-A1 细胞凋亡过程中的表达变化,探讨其与细胞凋亡的相关性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人肺腺癌细胞株 SPC-A1 购自中国科学院上海细胞库;顺铂购自济南齐鲁制药厂;倒置相差显微镜为日本奥林巴斯公司生产的 DP70 型;流式细胞仪为美国 BD 公司的 FACS101 型;QIAzol Lysis Reagent、miRNeasy Mini Kit 购自美国 Qiagen 公司;TaqMan MiRNA 逆转录试剂盒、miRNA 特异性茎环结构(stem-loop)逆转录引物、双重荧光定量 PCR 引物和探针购自美国 Applied Biosystems 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

SPC-A1 细胞生长于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中,37℃ 5%CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养,贴壁生长。将对数生长期细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化,接种到 6 孔板中,待细胞铺满板底 75%~80% 时,加入 DDP 终浓度为 2.5 μg/ml 的培养液,同时设置不加 DDP 的对照组,分别作用 12、24、48 和 72 h。

#### 1.2.2 细胞形态学观察

采用倒置相差显微镜观察细胞培养过程中的形态变化并摄片。

#### 1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡

收集 SPC-A1 细胞,用冷 PBS 洗 2 遍,调整成终浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml 的单细胞悬液。在 100 μl 单细胞悬液中,加入 5 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI,轻轻混匀,避光室温反应 15 min,再加入 400 μl 标记缓冲液,立刻上机检测,每个样本均做 3 个复管。

#### 1.2.4 培养上清中 RNA 提取

QIAzol 试剂法提取培养上清样本中总 RNA,在变性处理后加入同一终浓度 ( $10^{-5}$  pmol/μl) 的 cel-miR-39 作为内参照,同步提取。

#### 1.2.5 SPC-A1 细胞内 RNA 提取

QIAzol 试剂法提取 SPC-A1 细胞内总 RNA,并测定其浓度和纯度。

#### 1.2.6 miR-27a 定量检测

包括特异性茎环结构(stem-loop)逆转录和荧光定量 PCR 两个步骤。以线虫 cel-miR-39 作为培养上清中内参照,以 U6 snRNA 为内参照。逆转录反应条件为:16℃ 30 min,42℃ 30 min,85℃ 5 min,4℃ +∞;得到 cDNA 后进行荧光定量 PCR,对 miR-27a 表达情况进行检测,每个样本均做 3 个复管。荧光定量 PCR 反应条件为:95℃ 10 min,95℃ 15 s,60℃ 1 min,45 个循环,数据采集和处理由软件 SDS system software 完成,计算方法为  $2^{-\Delta Ct}$ 。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计软件处理,计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。多组比较采用单因素方差分析 *F* 检验,两两比较采用 *q* 检验, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞形态学观察

DDP 组细胞呈凋亡改变,出现皱缩、变圆、脱落,透亮度和黏附力下降,胞质内黑色颗粒增多,折光性减弱,培养基中可见细胞碎片;随着 DDP 作用时间延长,凋亡细胞比例增加。而对照组细胞贴壁生长,呈椭圆形或类圆形,排列紧密(图 1)。

### 2.2 流式细胞术检测 SPC-A1 细胞凋亡率

DDP 组细胞凋亡率在 48 和 72 h 显著高于对照组,差异均有显著性 ( $P < 0.05$ ),且细胞凋亡率在 24、48 和 72 h 逐渐升高,两两比较差异均有显著性 ( $P < 0.05$ ,表 1)。

### 2.3 培养上清液中 miR-27a 含量

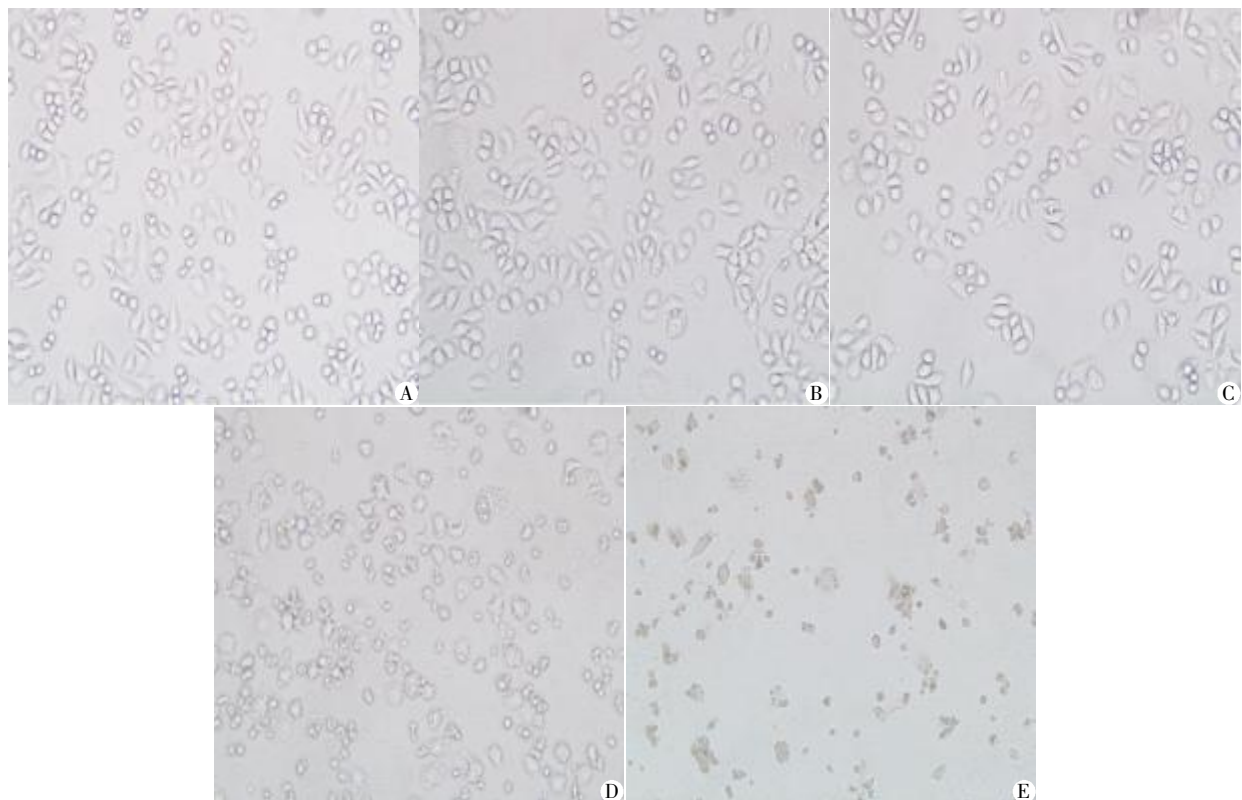
DDP 组 miR-27a 含量在 24、48 和 72 h 均显著高于对照组,差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。对照组 miR-27a 含量在 12、24 和 48 h 均无显著变化,在 72 h 含量升高,与其他各时间段比较,差异均有显著性 ( $P < 0.05$ )。DDP 组 miR-27a 含量在 12、24、48 和 72 h 逐渐升高,两两比较差异均有显著性 ( $P < 0.05$ ,图 2)。

### 2.4 SPC-A1 细胞内 miR-27a 含量

DDP 组 miR-27a 含量在 12、24、48 和 72 h 均显著高于对照组,差异有显著性 ( $P < 0.05$ );在 24、48 和 72 h 均显著高于 12 h,差异有显著性 ( $P < 0.05$ ,图 3);但 24、48 和 72 h 含量无显著变化。对照组 miR-27a 含量在 12、24、48 和 72 h 均无显著变化,两两比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

肺癌已成为人类病死率最高的肿瘤类疾病之



A:空白对照组, 12 h; B:DDP 2.5 μg/ml, 12 h; C:DDP 2.5 μg/ml, 24 h; D:DDP 2.5 μg/ml, 48 h; E:DDP 2.5 μg/ml, 72 h.

图 1 SPC-A1 细胞的形态学变化 (× 200)

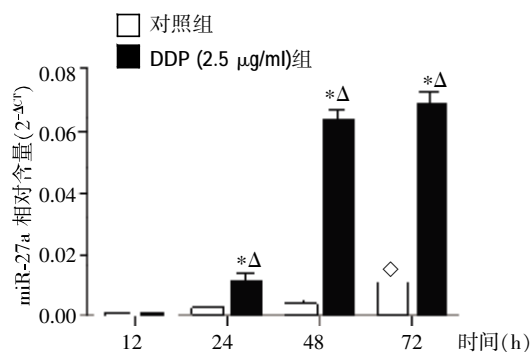
Figure 1 Morphological changes of SPC-A1 cells (× 200)

表 1 SPC-A1 细胞凋亡率

Table 1 Apoptosis rate of SPC-A1 cells (%)

组别	12 h	24 h	48 h	72 h
DDP (2.5 μg/ml)组	4.49±1.70	5.06±1.59	59.3±2.54 <sup>*Δ</sup>	76.4±3.11 <sup>*Δ</sup>
对照组	2.76±0.29	2.89±0.65	2.61±0.54	2.68±0.43

与对照组比较, \*P < 0.05; 与 DDP 组 12 h 比较, <sup>Δ</sup>P < 0.05。

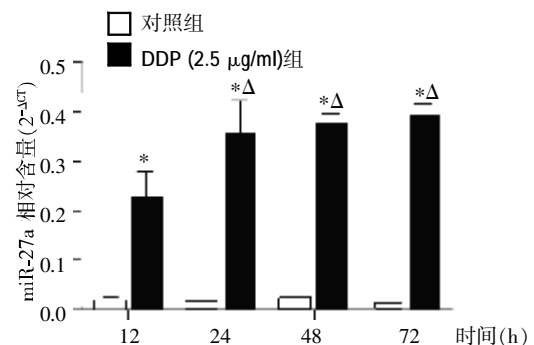


与对照组比较, \*P < 0.05; 与 DDP 组 12 h 比较, <sup>Δ</sup>P < 0.05; 与对照组 12 h 比较, <sup>◇</sup>P < 0.05。

图 2 培养上清中不同时间段 miR-27a 含量比较

Figure 2 miR-27a relative quantity in cultural supernatants at different times

一, 据统计全球每年大约有 130 万人死于该病<sup>[9]</sup>。在肺癌患者中, 80% 以上为非小细胞肺癌 (non-small



与对照组比较, \*P < 0.05; 与 DDP 组 12 h 比较, <sup>Δ</sup>P < 0.05。

图 3 SPC-A1 细胞内不同时间段 miR-27a 含量比较

Figure 3 miR-27a relative quantity in SPC-A1 cells at different times

cell lung cancer, NSCLC), 且其发病率呈逐年上升趋势。调查表明, NSCLC 在干预后 5 年存活率仅为 15%<sup>[10]</sup>。因此, 如何实现肺癌的早期诊断、早期及个体化治疗亟待解决。

miRNAs 已成为生命科学领域的研究热点。研究报告, miRNAs 可能参与调控人类近 70% 的基因表达, 揭示了其在癌症、炎症等疾病中的关键作用<sup>[11]</sup>。本研究发现, 与对照组比较 DDP (2.5 μg/ml) 组 SPC-A1 细胞在 12 和 24 h 凋亡率均无显著变化

( $P > 0.05$ ),提示24 h内DDP 2.5  $\mu\text{g/ml}$ 诱导SPC-A1细胞凋亡的作用不显著。培养上清中miR-27a含量测定结果显示,DDP (2.5  $\mu\text{g/ml}$ )组miR-27a含量在24、48和72 h均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ),且在12、24、48和72 h逐渐升高,两两比较差异有显著性( $P < 0.05$ ),呈时间依赖性。这与本实验观察得到的SPC-A1细胞凋亡规律一致。上述结果表明,培养上清中miR-27a含量随SPC-A1细胞凋亡增加而升高。因此,本文推测培养上清中miR-27a主要来自SPC-A1细胞凋亡释放。此外,对照组miR-27a含量在72 h升高,与其他各时间段比较差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。本文认为可能是培养时间延长,细胞自身不断凋亡,释放的miR-27a在培养上清中不断积累的结果。SPC-A1细胞内miR-27a含量测定结果显示,对照组miR-27a含量在12、24、48和72 h均无显著变化,这表明对照组细胞处在凋亡和增殖的动态平衡,所以miR-27a含量相对稳定。DDP(2.5  $\mu\text{g/ml}$ )组miR-27a含量在12、24、48和72 h均显著高于对照组,差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。上述结果表明,SPC-A1细胞内miR-27a含量随细胞凋亡增加而升高,这与培养上清miR-27a含量检测结果和SPC-A1细胞凋亡规律相一致。此外,本研究发现DDP (2.5  $\mu\text{g/ml}$ )组miR-27a含量在24、48和72 h均显著高于12 h,差异有显著性( $P < 0.05$ );但24、48和72 h含量并不随时间延长而增加,推测其原因:①24 h前细胞增殖速率大于凋亡,细胞数量增加,所以miR-27a含量增加;②细胞在48 h和72 h已大量凋亡,数量显著减少,所以miR-27a含量24 h后无显著变化。

近年来对miRNA及其表达模式的研究发现,这类分子被认为可作为新的生物标志物,为癌症的诊断与治疗开辟一条新途径<sup>[12-13]</sup>。在人类血清/血浆中miRNA稳定存在,且在低温状态(-80 $^{\circ}\text{C}$ )中比较稳定,长时间的储存不会导致miRNA的严重降解及影响其表达<sup>[14]</sup>。Boeri等<sup>[15]</sup>对肺癌中miRNA的研究表明,miRNA在肿瘤组织中的表达与临床相关病理特征有关,并通过实验验证了血浆miRNA作为生物标志物的可能。本研究结果表明,miR-27a在DDP诱导的SPC-A1细胞凋亡中表达升高,提示其可能参与细胞凋亡调控。因此,血浆miR-27a有可能在肺癌的个体化治疗以及预后监测等方面发挥作用。

## [参考文献]

- [1] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004, 431(7006): 350-355
- [2] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297
- [3] Barbarotto E, Schmittgen TD, Calin GA. MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile [J]. Int J Cancer, 2008, 122(5): 969-977
- [4] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(4): 259-269
- [5] Zhang H, Li M, Han Y, et al. Down-regulation of miR-27a might reverse multidrug resistance of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Dig Dis Sci, 2010, 55(9): 2545-2551
- [6] Huang S, He X, Ding J, et al. Upregulation of miR-23a approximately 27a approximately 24 decreases transforming growth factor-beta-induced tumor-suppressive activities in human hepatocellular carcinoma cells[J]. Int J Cancer, 2008, 123(4): 972-978
- [7] Zhao X, Yang L, Hu J. Down-regulation of miR-27a might inhibit proliferation and drug resistance of gastric cancer cells[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011, 30: 55
- [8] Mizutani Y, Bonavida B, Nio Y, et al. Enhanced susceptibility of cis-diamminedichloroplatinum-treated K562 cells to lysis by peripheral blood lymphocytes and lymphokine activated killer cells[J]. Cancer, 1993, 71(4): 1313-1321
- [9] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics. 2009 [J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225-249
- [10] Collins LG, Haines C, Perkel R, et al. Lung cancer: diagnosis and management[J]. Am Fam Physician, 2007, 75(1): 56-63
- [11] Huang Y, Shen XJ, Zou Q, et al. Biological functions of microRNAs[J]. Bioorga Khim, 2010, 36(6): 747-752
- [12] Huang Z, Huang D, Ni S, et al. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer[J]. Int J Cancer, 2010, 127(1): 118-126
- [13] Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, et al. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) [J]. Methods, 2010, 50(4): 298-301
- [14] 张晓娟,董静,马红霞,等.血清/血浆miRNA检测方法探讨与建立[J].南京医科大学学报:自然科学版, 2011, 31(4): 529-531
- [15] Boeri M, Verri C, Conte D, et al. MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(9): 3713-3718

[收稿日期] 2013-02-08