

## miR-145 在非小细胞肺癌中的表达及其对 N-cadherin 表达的调控

莫冬萍, 龚雪, 黄珮珺, 许雨乔, 黄蕾, 潘世扬, 徐建\*

(南京医科大学第一附属医院检验学部, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:检测 miR-145 在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中的表达,并探讨其调控神经性钙黏附蛋白(neural cadherin, N-cadherin)在 NSCLC 侵袭转移中的作用。方法:实时荧光定量 PCR 检测 31 例 NSCLC 组织中 miR-145 与 N-cadherin 的表达水平。采用脂质体法将 miR-145 mimics 瞬时转染至 SPC-A1 细胞,RT-PCR 和 Western blot 检测 N-cadherin 的表达变化;Transwell 实验检测转染后 SPC-A1 细胞的侵袭能力。结果:在 NSCLC 癌组织中,miR-145 与 N-cadherin 的表达水平分别表现为显著下调和上调,且表达水平与淋巴结转移密切相关。在 SPC-A1 细胞中,过表达 miR-145 能降低 N-cadherin 的表达,并抑制肿瘤细胞的侵袭。结论:miR-145 在 NSCLC 中低表达,其可能通过靶向调控 N-cadherin 而影响 NSCLC 的侵袭转移。

**[关键词]** 非小细胞肺癌;miR-145;N-cadherin;转移

**[中图分类号]** R734.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)07-945-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20150709

## Expression of miR-145 in non-small cell lung cancer and regulatory effect on N-cadherin

Mo Dongping, Gong Xue, Huang Peijun, Xu Yuqiao, Huang Lei, Pan Shiyang, Xu Jian\*

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

**[Abstract]** **Objective:**To detect the expression of miR-145 in non-small cell lung cancer (NSCLC) and explore its regulatory effect on N-cadherin in the invasion and metastasis of NSCLC. **Methods:**Real-Time PCR was performed to detect the expression of miR-145 and N-cadherin in 31 NSCLC tumor tissues. MiR-145 mimics was transiently transfected into SPC-A1 cells by lipofectamine method. RT-PCR and Western blot were used to detect the expression of N-cadherin. The invasion activity was detected using transwell assay. **Results:**MiR-145 expression was reduced significantly and N-cadherin expression was increased significantly in NSCLC tumor tissues, respectively. In addition, the expressions of miR-145 and N-cadherin were both closely correlated with lymph node metastasis. MiR-145 could significantly downregulate the expression of N-cadherin after transfection of mimics in SPC-A1 cells, and suppress invasion ability of cells. **Conclusion:**MiR-145 is downregulated in NSCLC, and may regulate the invasion and metastasis of NSCLC through targeting N-cadherin.

**[Key words]** NSCLC;miR-145;N-cadherin;metastasis

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(07):945-949]

肺癌严重危害人类健康,据世界卫生组织公布的资料显示,肺癌发病率和病死率均居全球癌症首位。肺癌患者中约 85%为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)。肺癌侵袭力强,易发生转移,75%以上的患者确诊时已为中晚期,5 年生存率不足 15%<sup>[1-2]</sup>。miR-145 是一种具有抑癌基因性质的微小核糖核酸,其与肿瘤细胞增殖、侵袭和转移相关,在前列腺癌和结直肠癌等肿瘤中低表达<sup>[3-4]</sup>。近

来有研究表明,与肿瘤转移密切相关的神经性钙黏附蛋白(neural cadherin, N-cadherin)是 miR-145 的靶基因<sup>[5]</sup>。本研究检测了 miR-145 在 NSCLC 中的水平,并初步探讨其调控 N-cadherin 表达在 NSCLC 侵袭转移中的作用。

### 1 对象和方法

#### 1.1 对象

组织标本均来自 2010 年 3 月~2011 年 12 月期间就诊于南京医科大学第一附属医院胸外科的 31 例经病理确诊为 NSCLC 的患者。所有患者术前

**[基金项目]** 江苏省实验诊断学重点实验室(XK201114)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail:xu\_jian79@163.com

均未接受任何抗肿瘤药物治疗,未进行介入治疗以及其他针对肿瘤的特殊治疗,其中男20例,女11例,年龄43~78岁,平均60.5岁。另取上述肺癌患者的癌旁正常肺组织作为对照。所有组织标本均置于液氮保存。肺腺癌细胞株 SPC-A1 购自中国科学院细胞库,支气管上皮细胞 BEAS-2B 由南京医科大学公共卫生学院王守林教授惠赠。

DMEM 培养液、RPMI-1640 培养液、胎牛血清(Gibco 公司,美国);miRNeasy Mini Kit(Qiagen,德国);miRute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒、miRute miRNA 荧光定量检测试剂盒以及 miR-145 和 U6 引物(北京天根公司);RNA 反转录试剂盒及 SYBR 试剂(TaKaRa 公司,日本);引物 N-cadherin、 $\beta$ -actin(南京金瑞斯公司);转染试剂 Lipofectamine™2000(Invitrogen 公司,美国);miR-145 mimics 及 control miRNA(广州锐博公司);兔抗人 N-cadherin 单抗(Cell Signaling 公司,美国);Transwell 小室(Corning 公司,美国);MaxGel™ ECM mixture(Sigma 公司,美国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 组织和细胞中 miR-145 表达水平的检测

采用 miRNeasy Mini Kit 提取总 RNA,miRute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒对获得的 miRNA 的 3' 端进行加“Poly A”处理,然后将 Poly A 化的 RNA 进行逆转录反应。以 U6 为内参,参照 miRute miRNA 荧光定量检测试剂盒说明书扩增 miR-145 基因。所有样本设置 3 个复孔,miR-145 相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法进行计算。

### 1.2.2 组织和细胞中 N-cadherin 表达水平的检测

采用 miRNeasy Mini Kit 提取总 RNA,采用 TaKaRa 公司反转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。以  $\beta$ -actin 为内参,荧光实时定量 PCR 检测 N-cadherin 基因的表达(N-cadherin 引物:正向,5'-GACAATGCCCTCAAGTGTT-3';反向,5'-CCATTAAGCCGAGTGATGGT-3'和  $\beta$ -actin 引物:正向,5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3';反向,5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3')。所有样本设置 3 个复孔,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算基因的相对表达量。

### 1.2.3 细胞培养及细胞转染

BEAS-2B 和 SPC-A1 分别在含有 100 U/mL 青霉素、100  $\mu$ g/mL 链霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液和 RPMI-1640 培养液中,置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养。待 SPC-A1 生长至对数期,调整细胞密度至  $3.0 \times 10^5$  个/孔,接种至 6 孔

板,24 h 后按照 Lipofectamine™2000 试剂说明书进行转染,将 miR-145 mimics 及阴性对照转染入 SPC-A1 细胞。miRNA 转染终浓度为 80 nmol/L。

### 1.2.4 N-cadherin 蛋白水平检测

收集转染 miR-145 mimics 和阴性对照 48 h 的 SPC-A1 细胞,裂解后,离心取上清并用 BCA 试剂定量。蛋白上样后,经 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭、抗体孵育、ECL 发光和成像等步骤后获得图像结果。

### 1.2.5 Transwell 侵袭实验

SPC-A1 细胞转染后 48 h 进行实验,采用 Transwell 侵袭实验检测转染 miR-145 对 SPC-A1 细胞侵袭能力的影响。ECM 胶与无双抗无血清培养液按 1:9 稀释混匀铺于培养小室上(70  $\mu$ L/孔),放入 37℃培养箱 3~4 h 待胶凝固。调至 SPC-A1 为  $6.0 \times 10^5$  个/mL,每孔加入 0.1 mL 无血清细胞混悬液即  $6.0 \times 10^4$  个/孔,下室中加入 500  $\mu$ L 含有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液。将细胞放入培养箱孵育 24 h 后,用棉棒将上室的 ECM 胶和细胞擦掉,弃去外室培养液,用 PBS 洗去残留培养液,随即用 0.1% 结晶紫染色 15~20 min。显微镜下随机选取 10 个高倍视野计数穿过膜的细胞数。实验重复 3 次。

## 1.3 统计学方法

实验数据采用 SPSS16.0 和 GraphPad Prism v5 进行分析。两组独立样本均值比较采用 *t* 检验, Wilcoxon Signed Ranks Test 分析 miR-145 与 N-cadherin 在癌组织与癌旁组织的表达差异,组织中 miR-145 与 N-cadherin 表达模式与 NSCLC 临床参数的关系采用  $\chi^2$  检验。 $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-145/N-cadherin 在癌组织中的表达及与 NSCLC 临床参数的关系

与癌旁组织相比,癌组织中 miR-145 和 N-cadherin 表达水平分别显著下调( $P < 0.01$ )和上调( $P < 0.05$ ,图 1)。两者的表达水平与肺癌患者的性别、年龄以及是否吸烟、肿瘤的大小、组织的病理类型、TNM 分期无显著关系,而与淋巴结转移密切相关( $P < 0.05$ ,表 1)。癌组织中 miR-145 表达上调者淋巴结转移率(4/14)明显低于表达下调者淋巴结转移率(11/17)( $\chi^2=4.014, P < 0.05$ );N-cadherin 表达上调者淋巴结转移率(11/16)明显高于表达下调者淋巴结转移率(4/15)( $\chi^2=5.49, P < 0.05$ ,表 1)。

### 2.2 miR-145/N-cadherin 在 SPC-A1 细胞株中的表达

RT-PCR 结果显示,miR-145 在肺腺癌细胞株 SPC-A1 中表达水平明显降低,为正常支气管上皮细胞株 BEAS-2B 中的 5.02%, 差异有统计学意义 ( $t=35.87, P < 0.01$ , 图 2A)。与之相反,N-cadherin 在 SPC-A1 细胞中高表达,为 BEAS-2B 中的 2.02 倍,差异有统计学意义( $t=2.94, P < 0.05$ ,图 2B)。

### 2.3 miR-145 抑制 SPC-A1 细胞 N-cadherin 的表达水平

通过瞬时转染使 SPC-A1 细胞过表达 miR-145, 分别采用实时定量 RT-PCR 以及 Western blot 的方法,检测 N-cadherin 基因 mRNA 和蛋白表达水平。结

果显示, 转染组中 N-cadherin 的 mRNA 表达水平呈降低趋势,差异有统计学意义( $t=8.1, P < 0.01$ ,图 3A); 同时转染组中 N-cadherin 蛋白条带亦减弱(图 3B), 证实 miR-145 能够抑制 N-cadherin 的表达。

### 2.4 miR-145 抑制 SPC-A1 细胞的侵袭

侵袭实验结果显示(图 4),miR-145 mimics 转染组穿透 Transwell 小室基底膜和 ECM 胶的 SPC-A1 细胞数( $155.7 \pm 6.9$ )个较阴性对照组( $330.4 \pm 10.2$ )个明显减少,差异有统计学意义( $t=17.3, P < 0.01$ ), 提示 miR-145 能抑制 SPC-A1 细胞的侵袭能力。

表 1 miR-145/ N-cadherin 与肺癌临床病理的相关性

Table 1 Correlation between miR-145/N-cadherin status and clinical characteristics in patients with NSCLC

临床参数	n	miR-145 低表达 ( $\leq$ 中位数)	miR-145 高表达 ( $>$ 中位数)	P 值	N-cadherin 低表达 ( $\leq$ 中位数)	N-cadherin 高表达 ( $>$ 中位数)	P 值
例数	31	17	14		15	16	
年龄(岁)							
$\leq 60$	17	7	10	0.092	8	9	0.870
$> 60$	14	10	4		7	7	
性别							
男	20	11	9	0.981	9	11	0.611
女	11	6	5		6	5	
吸烟史							
否	17	9	8	0.815	9	8	0.623
是	14	8	6		6	8	
肿瘤大小(cm)							
$\leq 3.0$	18	10	8	0.925	9	9	0.833
$> 3.0$	13	7	6		6	7	
组织类型							
腺癌	17	7	10	0.200	8	9	0.415
鳞癌	14	10	4		7	7	
肿瘤分级							
I + II	21	12	9	0.519	10	11	0.901
III	10	5	5		5	5	
淋巴结转移							
否	16	6	10	0.045	11	5	0.019
是	15	11	4		4	11	

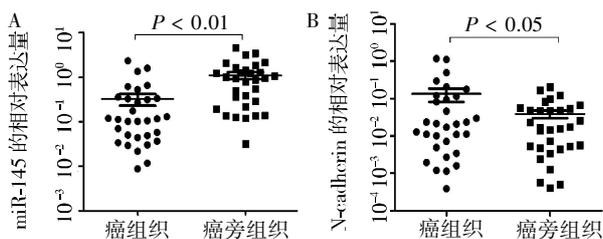


图 1 miR-145 和 N-cadherin 在 NSCLC 组织中的表达水平  
Figure 1 Relative miR-145 and N-cadherin expression level in NSCLC tissues

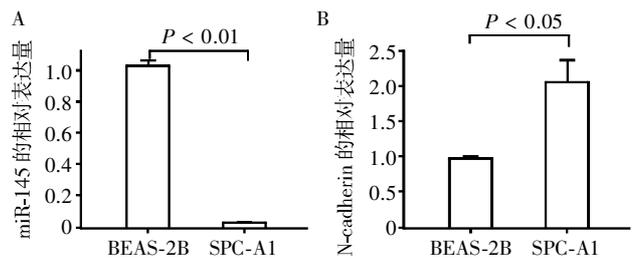


图 2 miR-145 和 N-cadherin 在 BEAS-2B 和 SPC-A1 细胞中的相对含量  
Figure 2 Relative expression levels of miR-145 and N-cadherin in BEAS-2B and SPC-A1

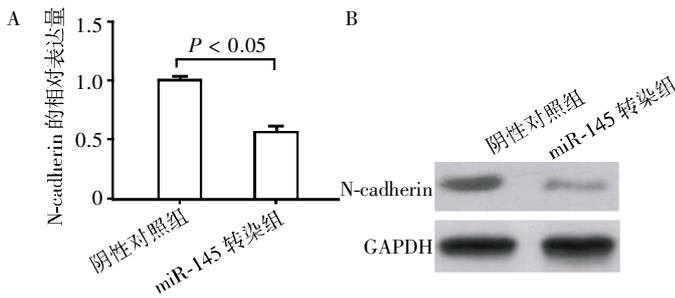


图 3 SPC-A1 过表达 miR-145 后 N-cadherin 的表达水平  
Figure 3 Expression of N-cadherin in SPC-A1 transfected with miR-145 mimics

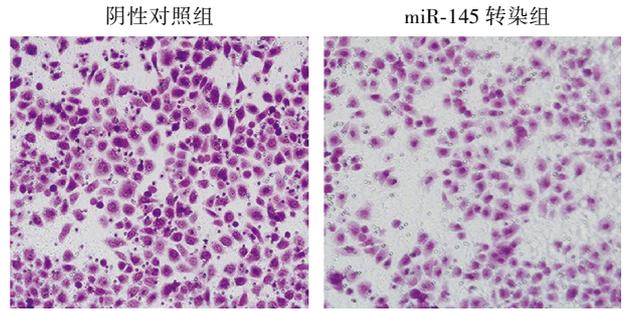


图 4 转染 miR-145 mimics 抑制 SPC-A1 细胞的侵袭(×200)  
Figure 4 miR-145 mimics transfection inhibited the invasion ability of SPC-A1 cells (×200)

### 3 讨论

成熟的 miRNAs 是一类长度 20~23 个核苷酸的内源性单链非编码小分子 RNA，可影响细胞增殖、凋亡和代谢等多项生命活动。miRNAs 与肿瘤的发生发展密切相关，在大量肿瘤组织和细胞系中均可以检测到 miRNAs 的异常表达<sup>[6-7]</sup>。miR-145 是一种具有抑癌基因性质的 miRNA，研究发现其在多种肿瘤中呈低表达。本实验通过 RT-PCR 法检测了 31 例 NSCLC 癌组织以及 NSCLC 细胞系中 miR-145 的表达水平，发现 miR-145 在癌组织及细胞系中均呈低表达，这一结果与胡静雯等<sup>[8]</sup>的报道一致。同时，miR-145 的表达量与肺癌患者的性别、年龄、是否吸烟、肿瘤大小、病理类型、TNM 分期均无显著关系，但与组织的淋巴结转移密切相关，miR-145 低表达的患者更容易发生淋巴结转移，上述结果提示 miR-145 可能通过作用于某些基因表达调控 NSCLC 的侵袭转移。

现阶段 miR-145 与肿瘤的机制研究主要集中于细胞增殖方面。Yin 等<sup>[9]</sup>发现 miR-145 可通过下调 OCT4 基因表达抑制肺腺癌干细胞的增殖，推测 miR-145 的低表达是肺癌发生的重要分子机制之一。Chen 等<sup>[10]</sup>报道 miR-145 可调控靶基因 c-Myc，阻断肺癌细胞 A549 和 H23 由 G1 期向 S 期的转变，抑制细胞增殖。Cho 等<sup>[11]</sup>发现 miR-145 通过上皮生长因子受体(EGFR)和 NUDT1 抑制肺癌细胞增殖。在乳腺癌中，过表达 miR-145 可以下调靶基因 RTKN 的表达，抑制乳腺癌细胞 MCF-7 增殖，促进凋亡<sup>[12-13]</sup>。近年来有研究报道 miR-145 在肿瘤的侵袭转移中也发挥着重要的作用。Chiyomaru 等<sup>[14]</sup>报道 SWAP70 和 FSCN1 是 miR-145 的靶基因，沉默 SWAP70 和 FSCN1 可抑制前列腺癌细胞迁移和侵袭。

N-cadherin 是钙黏连蛋白家族成员，被证实多种恶性肿瘤中过表达并且与肿瘤的浸润和转移密切相关。N-cadherin 在上皮组织中的异位表达可以影响上皮细胞的形态和生物学行为，诱导上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)，介导细胞间黏附及信号转导<sup>[15-17]</sup>。NSCLC 易发生转移，EMT 是其中的关键步骤。有研究显示，高表达 N-cadherin 的 NSCLC 更易发生转移，且与 EMT 密切相关<sup>[18-19]</sup>，但 NSCLC 中调控 N-cadherin 表达的机制尚未完全明了。在本研究中，NSCLC 癌组织及细胞中 N-cadherin 基因表达上调，其表达水平与肺癌患者的一般临床病理参数(性别、年龄以及是否吸烟、肿瘤的大小、组织的病理类型、TNM 分期)无相关性，但与淋巴结转移密切相关。在体外细胞实验中，通过瞬时转染使 SPC-A1 细胞过表达 miR-145，Western blot 和 RT-PCR 检测证明 miR-145 可以下调 N-cadherin 表达，Transwell 侵袭实验显示过表达 miR-145 能抑制 SPC-A1 细胞的侵袭转移能力。上述结果提示，miR-145 可能通过靶向调控 N-cadherin 影响 NSCLC 的侵袭转移。Gao 等<sup>[5]</sup>在胃癌研究中有类似的报道，他们发现低表达的 miR-145 可导致靶基因 N-cadherin 的水平升高，从而促进胃癌的侵袭和转移。

综上所述，miR-145 在 NSCLC 中表达下调，其可负性调控 N-cadherin 基因的表达，影响 NSCLC 的侵袭转移。miR-145 可能作为一个潜在的靶点，用于 NSCLC 转移的预防与治疗。

#### [参考文献]

[1] Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(2):104-117  
 [2] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1):11-30  
 [3] Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, et al. MicroRNA

- expression profiling in prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(13):6130-6135
- [4] Ozen M, Creighton CJ, Ozdemir M, et al. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer[J]. *Oncogene*, 2008, 27(12):1788-1793
- [5] Gao P, Xing AY, Zhou GY, et al. The molecular mechanism of microRNA-145 to suppress invasion-metastasis cascade in gastric cancer[J]. *Oncogene*, 2013, 32(4):491-501
- [6] Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, et al. miRNAs in human cancer[J]. *J Pathol*, 2011, 223(2):102-115
- [7] Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJ. The long and short of microRNA[J]. *Cell*, 2013, 153(3):516-51
- [8] 胡静雯, 杨欣, 王洁, 等. 微小 RNA-145 通过调控上皮细胞间质化抑制肺腺癌起始细胞的发生[J]. *中华实验外科杂志*, 2013, 30(3):549-551
- [9] Yin R, Zhang SA, Wu YQ, et al. microRNA-145 suppresses lung adenocarcinoma-initiating cell proliferation by targeting OCT4[J]. *Oncol Rep*, 2011, 25(6):1747-1754
- [10] Chen Z, Zeng H, Guo Y, et al. miRNA-145 inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation by targeting c-Myc[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29(1):151
- [11] Cho WC, Chow AS, Au JS. MiR-145 inhibits cell proliferation of human lung adenocarcinoma by targeting EGFR and NUDT1[J]. *RNA Biol*, 2011, 8(1):125-131
- [12] Sachdeva M, Mo YY. MicroRNA-145 Suppresses cell invasion and metastasis by directly targeting mucin 1 [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(1):378-387
- [13] Radojicic J, Zaravinos A, Vrekoussis T, et al. MicroRNA expression analysis in triple-negative (ER, PR and Her2/neu) breast cancer[J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(3):507-517
- [14] Chiyomaru T, Tatarano S, Kawakami K, et al. SWAP70, actin-binding protein, function as an oncogene targeting tumor-suppressive miR-145 in prostate cancer[J]. *Prostate*, 2011, 71(14):1559-1567
- [15] Shih WT, Yamada S. N-cadherin as a key regulator of collective cell migration in a 3D environment [J]. *Cell Adh Migr*, 2012, 6(6):513-517
- [16] Zablocki GJ, Ruzycki PA, Overturf MA, et al. Aldose reductase-mediated induction of epithelium-to-mesenchymal transition (EMT) in lens [J]. *Chem Biol Interact*, 2011, 191(1-3):351-356
- [17] Kamikihara T, Ishigami S, Arigami T, et al. Clinical implications of N-cadherin expression in gastric cancer[J]. *Pathol Int*, 2012, 62(3):161-166
- [18] Zhang X, Liu G, Kang Y, et al. N-cadherin expression is associated with acquisition of EMT phenotype and with enhanced invasion in erlotinib-resistant lung cancer cell lines[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3):e57692
- [19] Liu S, Miao Y, Fan C, et al. Clinicopathologic correlations of liver kinase B1, E-cadherin, and N-cadherin expression in non-small cell lung cancer[J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2013, 21(4):334-340

[收稿日期] 2015-01-13

本刊现已启用网上稿件管理系统, 作者登陆  
<http://jnmunjmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件  
审理情况。