

microRNA-224 通过调节 Bim 影响人非小细胞肺癌的增殖与凋亡

魏晨晨,姜黎黎,陈沁楠,王鹤,王朝霞*

(南京医科大学第二附属医院肿瘤科,江苏 南京 210011)

[摘要] 目的:研究 microRNA-224(miR-224)在人非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中的表达及对 NSCLC 细胞增殖能力和凋亡的影响。方法:采用荧光实时定量 PCR(qPCR)检测 20 对 NSCLC 组织与癌旁组织中 miR-224 的表达量,以及 miR-224 在 NSCLC 细胞 A549 与正常肺支气管上皮细胞中的表达量,并计算差值;转染 anti-miR-224 至 A549 细胞,qPCR 检测 anti-miR-224 的转染效率;四甲基偶氮唑盐(MTT)实验及克隆形成实验检测 miR-224 对 A549 细胞增殖能力的影响,流式细胞技术检测细胞周期及凋亡;荧光素酶报告实验证实 miR-224 与靶基因 Bim 的结合;qPCR 及 Western blot 检测转染 anti-miR-224 后 A549 细胞中 Bim 的表达量。结果:与癌旁正常组织相比,miR-224 在 NSCLC 组织及细胞中均显著高表达($P < 0.05$);抑制 miR-224 能够显著抑制 A549 细胞的增殖能力并促进凋亡,并促进了 Bim 的表达。结论:miR-224 在 NSCLC 中呈高表达,miR-224 能够通过调控 Bim 抑制 A549 细胞的增殖能力并诱导凋亡。

[关键词] microRNA-224;非小细胞肺癌;增殖;凋亡

[中图分类号] Q813;R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)08-942-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160809

MicroRNA-224 effect proliferation and apoptosis of NSCLC cell via downregulation of Bim

Wei Chenchen, Jiang Lili, Chen Qinnan, Wang He, Wang Zhaoxia*

(Department of Oncology, the Secord Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the expression of microRNA-224 (miR-224) in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its effect proliferation and apoptosis of NSCLC cell. **Methods:** Real-time quantitative PCR (qPCR) was used to detect and compare the expression of miR-224 in 20 pairs of NSCLC, adjacent normal tissue, NSCLC cell line A549 and normal epithelium cell line 16HBE. The expression of miR-224 in A549 cell was down-regulated by anti-miR-224 transient transfection, and the effect was identified by qPCR. The influence of miR-224 on A549 cell proliferation was detected by MTT assay and colony formation assay. Flow cytometry was used to test cell cycle and apoptosis. The expression of Bim was tested by anti-miR-224 transient transfection, and the effect was identified by qPCR and western blot. **Results:** Compared with adjacent normal tissues, miR-224 were significantly up-regulated in NSCLC tissue and cell. ($P < 0.05$). Down-regulating miR-224 can inhibits proliferation and accelerates apoptosis as well as increasing the expression of Bim. **Conclusion:** The expression of miR-224 is up-regulated in NSCLC. MiR-224 can promotes proliferation and inhibits apoptosis by down-regulating Bim.

[Key words] microRNA-224; non-small cell lung cancer; proliferation; apoptosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(08): 942-946]

肺癌是导致癌症相关死亡的主要原因之一,尽管近年来在临床靶向治疗上有一定突破,但是非小

细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 的 5 年生存率仍只有 15%。因此,发现早期诊断的分子标记和有效的靶向治疗靶点是一个重要研究方向。微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 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中发挥类似癌基因或抑癌基因的作用^[1]。近年来,本课题组运用 miRNA 芯片高通量分析技术筛选并发现 miR-451、miR-21、

[基金项目] 国家自然科学基金 (81272601, 81472198); 江苏省科技厅临床医学科技专项 (BL2014096); 江苏省医学重点人才基金 (RC2011080)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: zhaoxiawang88@126.com

miR-335、miR-194 等^[2-5]在 NSCLC 发生发展中发挥重要作用,进一步通过荧光实时定量 PCR 验证发现,miR-224 在 NSCLC 癌组织和癌旁组织中的表达有显著差异,在 NSCLC 细胞 A549 中显著高表达,遂将 anti-miR-224 转染进 A549 细胞,观察其对细胞增殖、凋亡的影响,并探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

20 例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 A549 及正常支气管上皮细胞株 16HBE 由南京医科大学生化实验室提供。DMEM、RPMI1640 培养基、胎牛血清(FBS, Gibco 公司,美国),RNA 抽提剂(Trizol, Invitrogen 公司,美国)。anti-miR-224 由美国 Invitrogen 公司合成,control miRNA 为阴性对照(negative control, NC)。Lipofectamine2000(Invitrogen 公司,美国)。四甲基偶氮唑盐(MTT),二甲基亚砜(DMSO),结晶紫染色液,PBS (Gibco 公司,美国)。荧光素酶报告系统(Promega 公司,美国),荧光定量多聚酶链反应(PCR)试剂盒(TaKaRa 公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

A549 细胞在含 10%FBS 的 RPMI1640 培养液,37℃ 5%CO₂ 及相对湿度条件下培养,肺正常上皮细胞使用 10%FBS 的 DMEM 培养液,其余条件相同。

1.2.2 细胞转染

对数生长期 A549 细胞于转染前 24 h 接种于 6 孔板(3×10⁵ 个/孔),培养至细胞达 70%~80% 融合度时进行细胞转染。按照说明书将 100 pmol anti-miR-224 转染入 A549 细胞中,转染 control miRNA 组作为阴性对照。37℃ 5%CO₂ 培养箱中继续培养后进行相关实验检测。

1.2.3 荧光实时定量 PCR(qPCR)

miRNA 的逆转录-实时定量多聚酶链反应(RT-qPCR)参照 Chen 等^[6]的方法。对 miR-224 设计 1 条逆转录引物以及相应的 1 对 PCR 引物(表 1)。10 μL 逆转录体系中 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 仪进行 PCR 检测。试剂采用 FastStart DNAMaster SYBRGreen I 试剂盒。PCR 条件为 95℃ 30 s,95℃ 5 s,60℃ 34 s,进行 40 个循环;采用 GAPDH 作为内参。3 次独立样本经过实验后得到的数据通过比较 Ct 值法(2^{-ΔΔCt})进行相关定量分析。

表 1 逆转录引物及 PCR 引物序列

Table 1 Sequences of reverse transcription primers and PCR primers

基因引物	序列(5'→3')
miR-224	
RT 引物	CTTGCATCACCAGAGAACGAACGGAACC
PCR 引物	上游:GCGAGGTCAAGTCACTAGTGTT 下游:CGAGAAGCTTGCATCACCAGAGAACG
U6	
PCR 引物	上游:CTCGCTTCGGCAGCACA 下游:AACGCTTCACGAATTTGCGT

1.2.4 MTT 实验

收集上述细胞制备单细胞悬液,2 000 个/孔接种于 96 孔板,每组细胞设置 6 个复孔。37℃5%CO₂ 饱和湿度下培养 24~96 h,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μL,继续孵育 4 h,弃孔内培养基,每孔加入 150 μL 二甲基亚砜,震荡 10 min,待结晶物充分溶解后,酶标检测仪 490 nm 处检测各孔吸光度值。

1.2.5 克隆形成实验

接种各实验组细胞至 6 孔板,每孔 1 000 个细胞,吹打均匀,继续培养 4 d 后更换培养基,待 10 d 后出现肉眼可见的克隆后终止培养,用 4%甲醇固定 15 min,结晶紫染色 10 min,洗净晾干,拍照记录。

1.2.6 流式细胞技术检测细胞凋亡

将对数生长期的 A549 细胞,调整浓度至 3×10⁵ 个/mL,以 2 mL/孔接种于 6 孔板,置于 37℃ 5% CO₂ 及饱和湿度条件下的培养箱中培养至细胞贴壁,转染 48 h 分别收集各处理组 A549 细胞,用 PBS 洗涤细胞 2 次收集细胞,按操作说明采用 AV/PI 双染,避光放置 10 min,流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.2.7 荧光素酶报告实验

荧光素酶报告载体瞬时共转染 293T 细胞,48 h 后裂解细胞,检测双荧光素酶活性,验证 miRNA 抑制靶基因 Bim 翻译水平。

1.2.8 蛋白质免疫印迹(Western blot)

将变性完成的蛋白样品按 40 μg/孔,加入预先制好的变性聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)的加样孔中;电泳 45~50 min,使样本中的蛋白分离。电泳结束后根据目的蛋白的大小,将特定位置的胶条切至合适大小,接通电源,恒流 1 mA/cm²,根据不同蛋白分子量的大小选择合适的转膜时间。用 1×TBST 缓冲液配制的 5%脱脂奶粉稀释一抗,4℃轻摇过夜。1×TBST 缓冲液洗膜,5 min×3 次。分别加入 1×TBST 缓冲液配制的 5%脱脂奶粉稀释的辣根过氧化物酶标记的抗兔或小鼠 IgG,室温中振摇

孵育 2 h, 1 × TBST 缓冲液洗膜, 10 min × 3 次。避光配制 ECL-plus 显色液, 混匀后滴加在放置平整的塑封膜上, 待反应 1 min, 随即将 NC 膜夹入塑封膜中。在暗室中覆盖感光胶片, 根据荧光强度决定曝光时间。

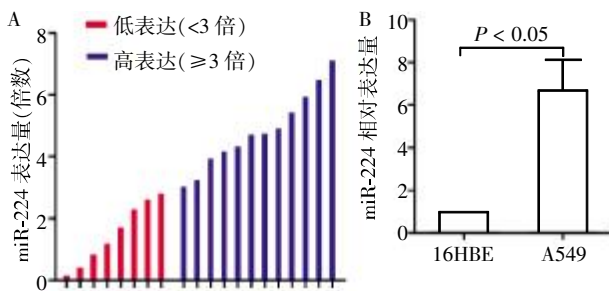
1.3 统计学方法

所有实验重复 3 次, 运用 SPSS15.0 统计软件分析。数据用均数 ± 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), $P \leq 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-224 在 NSCLC 标本及细胞系中的表达量

对提取的 20 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 组织相对癌旁正常组织的 miR-224 表达率平均为 3.56, 即 NSCLC 组织中 miR-224 表达水平显著高于癌旁组织 ($P < 0.05$, 图 1A)。miR-224 在 NSCLC 细胞 A549 中的表达高于 16HBE 中的表达 ($P < 0.05$, 图 1B)。



A: miR-224 在 20 对标本中的相对表达量 (NSCLC 组织相对于癌旁组织的表达水平); B: miR-224 在正常肺上皮细胞 16HBE 和 NSCLC 细胞 A549 中表达水平。

图 1 miR-224 在 NSCLC 组织和细胞中相对表达水平
Figure 1 Expression of miR-224 in NSCLC tissue and cell

2.2 qPCR 验证转染效率

为验证 anti-miR-224 是否成功导入 A549 细胞中, 在转染 48 h 后, qPCR 检测了 miR-224 的表达水平, 结果发现转染了 anti-miR-224 组中 miR-224 的表达量较对照组明显降低 ($P < 0.05$, 图 2), 该结果表明瞬时转染成功。接下来的实验采用 anti-miR-224 转染 48 h 的细胞进行分析。

2.3 miR-224 对 A549 细胞增殖能力的影响

将 anti-miR-224 及阴性对照 control miRNA 转染 A549 细胞后, 通过 MTT 方法检测细胞生长曲线。结果表明, 与转染 control RNA 的 A549 细胞相比, 转染了 anti-miR-224 的 A549 细胞增殖能力显

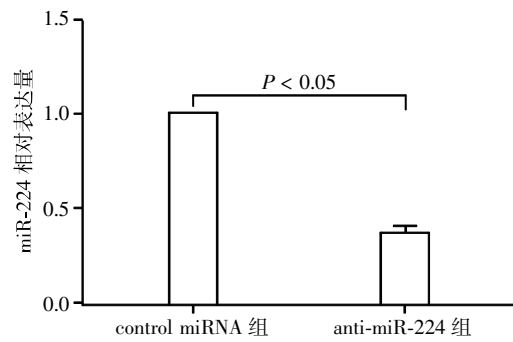
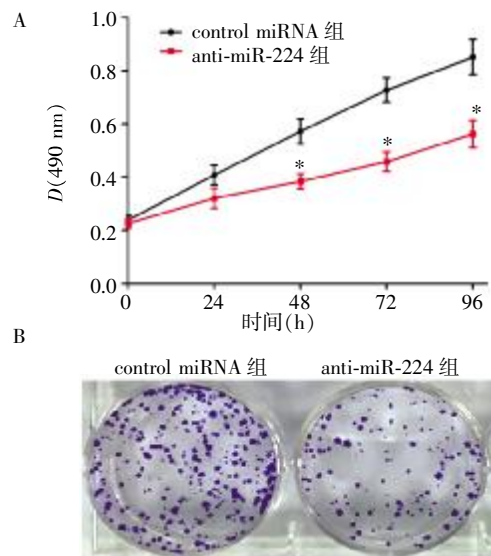


图 2 qPCR 检测转染 anti-miR-224 后 miR-224 的表达效率
Figure 2 qPCR test the expression of miR-224 after transfected with anti-miR-224

著降低 ($P < 0.05$, 图 3A)。同样克隆形成实验表明, 转染了 anti-miR-224 的 A549 细胞克隆形成能力低于 control RNA 组 (图 3B)。



A: MTT 实验, 两组比较, * $P < 0.05$ ($n=3$); B: 克隆形成实验。

图 3 miR-224 对 A549 细胞增殖能力的影响

Figure 3 Effect of miR-224 on A549 cell proliferation

2.4 miR-224 对 A549 细胞凋亡的影响

在 A549 细胞中分别转染 anti-miR-224 和 control miRNA 后 48 h, 流式细胞检测细胞的凋亡比例, 发现转染了 anti-miR-224 后凋亡率明显上升 (图 4)。

2.5 荧光素酶报告证实 miR-224 与 Bim 结合位点

应用 TargetScan、PicTar、miRanda 软件分析发现 miR-224 与 Bim 3'-UTR 区域存在互补结合, 推测 miR-224 通过结合 Bim 发挥调控作用。为了验证 Bim mRNA 的 3'-UTR 区域是否是 miR-224 的直接功能区域, 扩增了 Bim 基因 3'-UTR 片段, 其中即含有 miR-224 的可能结合位点。将 pEZX-luc-Bim/3'-

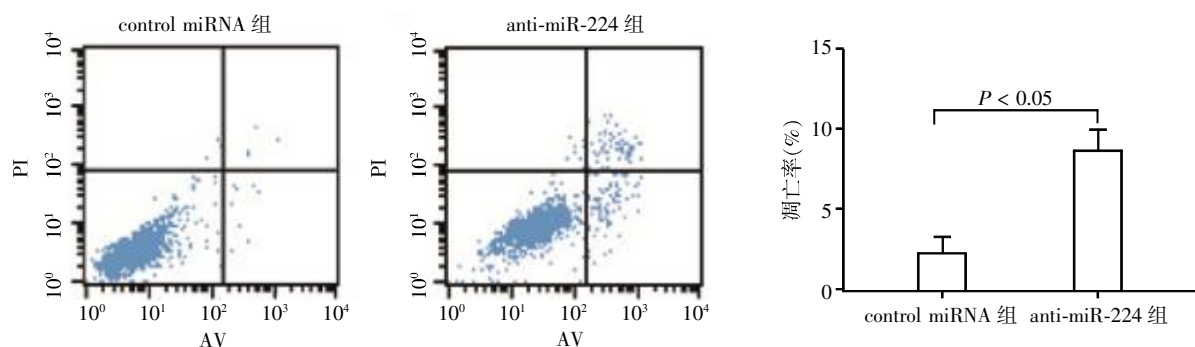
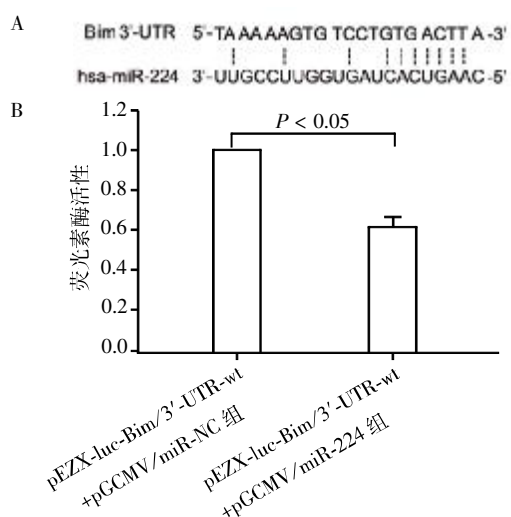


图 4 流式细胞技术检测细胞凋亡

Figure 4 Detection of apoptosis by flow cytometry

UTR-wt 载体与 pGCMV/miR-224 或 pGCMV/miR-NC 共转染 293T 细胞。结果表明,共转染了 pEZX-luc-Bim/3'-UTR-wt 载体与 pGCMV/miR-224 的 293T 细胞荧光素酶活性显著抑制($P < 0.05$,图 5)。



A:miR-224 与 Bim3'-UTR 区域结合的序列分析;B: 将 pEZX-luc-Bim/3'-UTR-wt 与 pGCMV/miR-224 共转染后,与对照组相比荧光素酶报告活性降低。

图 5 miR-224 与 Bim 3'-UTR 区域存在结合位点

Figure 5 miR-224 can bind with Bim 3'-UTR site

2.6 miR-224 调控促凋亡蛋白 Bim

为了探究 miR-224 下游调控的可能机制,我们通过 qPCR 和 Western blot 检测了一些相关蛋白的表达量。结果发现转染了 anti-miR-224 后,与对照组相比,Bim 的表达量上调(图 6)。因此认为 miR-224 可能通过调控 Bim 的表达,参与 A549 细胞的增殖、凋亡的调控。

3 讨论

最近越来越多的 miRNAs 被鉴定,许多研究表明 miRNAs 在癌症发病过程中发挥重要作用,并可

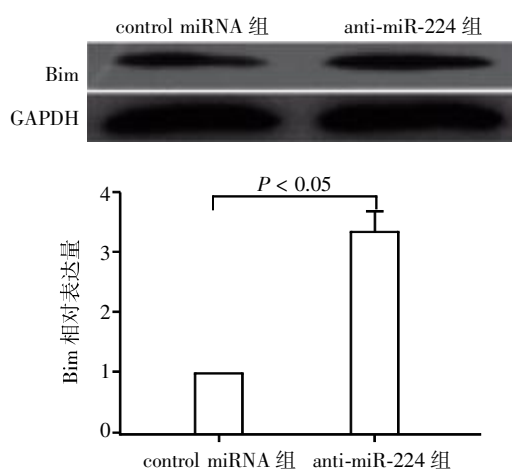


图 6 干扰 miR-224 后 Bim 的表达水平

Figure 6 Expression of Bim after down-regulating of miR-224

能为这种疾病生物学发生提供新的见解。然而,目前仅有少量的 miRNAs 被证明参与 NSCLC 的发生发展,并已经成为研究的前沿和热点。它们在肿瘤中发挥癌基因或者抑癌基因的作用。例如 miR-451、miR-187 在肺癌中低表达且与临床病理特征相关。本课题组前期研究^[2]发现 miR-451 通过调节 RAB14 在非小细胞肺癌中行使抑癌基因作用。Mirzadeh 等^[7]发现 miR-187 在肺癌组织中低表达,过表达 miR-187 可将 A549 细胞阻滞在 G1 期,并且通过统计学分析发现 miR-187 可作为肺癌预后的分子标记物。此外,miRNAs 也行使癌基因的作用,Liu 等^[8]发现 miR-196a 通过调控 HOXA5 促进 NSCLC 细胞增殖和侵袭。

最新研究发现,miR-224 不仅在前列腺癌^[9-10]、结直肠癌^[11]、肝癌^[12]等恶性肿瘤中呈现高表达,还参与肿瘤的耐药。本课题组前期研究^[13]发现 miR-224 在耐顺铂 A549 细胞中高表达,通过调控 P21 参与肺腺癌的顺铂耐药。Feng 等^[14]发现 miR-224-

3p 通过 FUT4 参与乳腺癌的多药耐药进程。He 等^[15]发现,miR-224 在食管上皮内瘤样病变和食管鳞癌中相对于癌旁组织高表达,通过调控 PHLPP1 和 PHLPP2 促进细胞增殖、迁移和侵袭,并抑制凋亡。Ling 等^[11]的研究表明,miR-224 在结直肠癌组织中相对高表达,并且可以通过负向调控 SMAD4 从而促进结直肠癌的转移。本课题组通过 qPCR 发现 miR-224 在 NSCLC 组织和细胞均较癌旁组织和正常肺上皮细胞中高表达,因此本研究推测 miR-224 可能在 NSCLC 中行使癌基因的作用。为了证实这一猜想,我们进一步研究了 miR-224 对细胞增殖和凋亡的影响。首先人工合成 anti-miR-224,并将其转染入 A549 细胞,qPCR 证实转染成功,miR-224 表达抑制。随后 MTT、克隆形成实验以及流式细胞技术检测细胞凋亡证实,抑制 miR-224 后能够显著抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡。上述结果证实了本项研究的前期假设。此外,生物信息学分析发现,Bim 可能是 miR-224 的下游靶基因,并通过荧光素酶报告证实,miR-224 与 Bim 的 3'-UTR 区域存在结合位点,并通过 qPCR 和 Western blot 实验验证,抑制 miR-224 表达后,Bim 的表达量显著上调。Bim 是 Bcl-2 家族中的一种促凋亡蛋白,在肿瘤发生中起重要作用。由此,我们获得初步结论:miR-224 在 NSCLC 中高表达与癌细胞的增殖和凋亡密切相关,并且与 Bim 的 3'-UTR 区域存在结合位点,因此我们认为 miR-224 可通过抑制 Bim 的表达促进细胞增殖,抑制细胞凋亡。提示 miR-224 可能是 NSCLC 基因诊断和治疗的新靶点,可为临床治疗 NSCLC 提供新的策略和方法。

[参考文献]

- [1] Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, et al. miRNAs in human cancer[J]. *J Pathol*, 2011, 223(2): 102-115
- [2] 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
- [3] Liu ZL, Wang H, Liu J, et al. MicroRNA-21 (miR-21) expression promotes growth, metastasis, and chemo- or radioresistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 372(1-2): 35-45
- [4] 王鹤, 刘志利, 德伟, 等. microRNA-335 对人非小细胞肺癌细胞迁移、侵袭及增殖能力的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2012, 32(6): 795-799
- [5] 徐江浩, 刘晶, 王鹤, 等. miR-194 对非小细胞肺癌 A549/DDP 细胞顺铂耐药性的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34(6): 711-715
- [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] Mirzadeh AF, Naeli P, Malakootian M, et al. Two lung development-related microRNAs, miR-134 and miR-187, are differentially expressed in lung tumors [J]. *Gene*, 2016, 577(2): 221-226
- [8] Liu XH, Lu KH, Wang KM, et al. MicroRNA-196a promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and invasion through targeting HOXA5 [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 348
- [9] Fu H, He HC, Han ZD, et al. MicroRNA-224 and its target CAMKK2 synergistically influence tumor progression and patient prognosis in prostate cancer [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(3): 1983-1991
- [10] Goto Y, Nishikawa R, Kojima S, et al. Tumour-suppressive microRNA-224 inhibits cancer cell migration and invasion via targeting oncogenic TPD52 in prostate cancer [J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(10): 1973-1982
- [11] Ling H, Pickard K, Ivan C, et al. The clinical and biological significance of MIR-224 expression in colorectal cancer metastasis [J]. *Gut*, 2016, 65(6): 977-989
- [12] An F, Olaru AV, Mezey E, et al. MicroRNA-224 induces G1/S checkpoint release in liver cancer [J]. *J Clin Med*, 2015, 4(9): 1713-1728
- [13] Wang H, Zhu LJ, Yang YC, et al. MiR-224 promotes the chemoresistance of human lung adenocarcinoma cells to cisplatin via regulating G(1)/S transition and apoptosis by targeting p21(WAF1/CIP1) [J]. *Br J Cancer*, 2014, 111(2): 339-354
- [14] Feng X, Zhao L, Gao S, et al. Increased fucosylation has a pivotal role in multidrug resistance of breast cancer cells through miR-224-3p targeting FUT4 [J]. *Gene*, 2016, 578(2): 232-241
- [15] He X, Zhang Z, Li M, et al. Expression and role of oncogenic miRNA-224 in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 575

[收稿日期] 2016-01-23