

# miR-939对非小细胞肺癌侵袭能力及上皮细胞-间充质转化过程的影响

陈爱东, 魏磊, 刘胜平, 陈亦江\*

南京医科大学第一附属医院胸心外科, 江苏 南京 210029

**[摘要]** 目的:探索 miR-939对非小细胞肺癌的侵袭能力及上皮细胞-间充质转化过程(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的影响。方法:实时聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 miR-939在非小细胞肺癌组织中的表达。Transwell 侵袭实验分析 miR-939对细胞侵袭能力的影响。通过 Western blot 检测 EMT 相关标志物的表达水平。结果:与癌旁组织相比,miR-939在 NSCLC 组织中的表达水平明显升高,且与 TNM 分期和淋巴结转移密切相关;同时,与正常肺上皮细胞相比,miR-939在 NSCLC 细胞系中的表达也显著升高。下调 miR-939 表达后,细胞侵袭能力明显降低( $P < 0.05$ )。另外,miR-939 下调后可使 EMT 相关标志物 E-cadherin 升高, Vimentin 降低。结论:miR-939 可能作为不良因子,促进非小细胞肺癌侵袭转移,从而影响肿瘤发展。

**[关键词]** miRNAs; NSCLC; EMT; 侵袭

**[中图分类号]** R734.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2018)08-1054-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20180808

## Influence of miR-939 on NSCLC cell invasion and EMT process

Chen Aidong, Wei Lei, Liu Shengping, Chen Yijiang\*

Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

**[Abstract]** **Objective:** The purpose of this study was to examine the expression and biological role of miR-939 in human non-small cell lung cancer (NSCLC) and epithelial-mesenchymal transition (EMT) progress. **Methods:** Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression of miR-939 in NSCLC. Transwell analysis was used to determine the effect of miR-939 on cell invasion. EMT-related markers were detected by Western blot. **Results:** The expression of miR-939 in NSCLC tissues was significantly higher than that in adjacent non-cancerous tissues, and closely related to TNM staging and lymph node metastasis. Meanwhile, compared with normal lung epithelial cells, the expression of miR-939 in NSCLC cell lines was also significantly increased. The invasive ability of miR-939 cells was obviously decreased after down-regulation of miR-939 expression ( $P < 0.05$ ). In addition, miR-939 down-regulation caused E-cadherin increasing and Vimentin decreasing. **Conclusion:** miR-939 may serve as an adverse factor to promote cell invasion, thus affecting the development of NSCLC.

**[Key words]** miRNAs; NSCLC; EMT; invasion

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(08): 1054-1058]

肺癌是世界上最常见的癌症之一,对人类健康造成严重危害<sup>[1]</sup>。肺癌最常见的亚型是非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),约占全部肺癌的85%。由于缺乏对特定生物标志物的早期筛查和诊断,而且早期肺癌临床症状不明显,所以肺癌一经诊断大多已处于晚期阶段。肺癌患者的5年

**[基金项目]** 国家自然科学基金(981572263)

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

生存率仍低于10%<sup>[2]</sup>。因此,努力寻找新的生物标志物并探索其生物学功能,为肺癌患者提供准确的早期诊断和个体化治疗方案尤为重要。

miRNA是近年来发现的19~22个核苷酸的非编码单链RNA。大量研究表明miRNA参与多种疾病的发生发展过程,尤其是miRNA在肿瘤细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭等生物学过程中发挥着促癌或抑癌作用<sup>[3-4]</sup>。近年来,诸多研究已证实:许多miRNA

如 miR-126<sup>[5-6]</sup>、miR-16-1<sup>[7]</sup>可通过调控其靶基因参与肿瘤的发生发展。miR-939通过下调 APC2 促进卵巢癌细胞的增殖能力<sup>[8]</sup>。然而,miR-939在 NSCLC 中的功能及其作用机制罕有报道。

本文主要研究了 miR-939 在 NSCLC 组织及细胞系中的表达情况,进一步评估其对细胞侵袭能力及 EMT 的影响,不仅有助于 NSCLC 的临床诊疗,同时也为开发新型抗肺癌基因药物提供了有效的干预靶点和理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

肺癌细胞系 H1299、SPCA1、A549、H358 及人肺正常细胞系 16HBE(上海中国科学院);TRIzol 试剂盒, NanoDrop 300 分光光度计, SuperScript II 第 1 链 cDNA 合成试剂盒, miRNA TaqMan 测定(Thermo Fisher 公司,美国);miR-939 抑制剂(inhibitor)和抑制剂阴性对照(inhibitor negative control, inhibitor NC)的寡核苷酸由 RiboBio(广州 RiboBio 公司)合成;24 孔板及 8 mm 孔径的小室(Millipore 公司,德国);小鼠单克隆 E-钙黏着蛋白(E-cadherin),波形蛋白(Vimentin, 1:1 000 稀释),抗 GAPDH 的抗体(1:1 000 稀释)(Santa Cruz 公司,美国)。

NSCLC 标本及癌旁组织来源于在南京医科大学第一附属医院手术患者,标本取下后在液氮中直接冷冻并储存于-80℃直至进一步分析。本研究所有操作及人体实验均符合并得到伦理委员会的批准;所有在本研究中接受实验的患者都签署了同意书;所有临床手术均按照南京医科大学第一附属医院伦理委员会标准及规范进行。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

所有细胞系在 37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下保存在培养基(DMEM)或含 10%FBS 的 RPMI-1640 中。

#### 1.2.2 实时定量 RT-PCR

用 TRIzol 试剂盒从细胞系或临床样品中提取总 RNA, RNA 质量通过 NanoDrop 300 分光光度计确认。使用 SuperScript II 第 1 链 cDNA 合成试剂盒进行逆转录。使用 miRNA TaqMan 测定,对 ABI Prism 7900 检测系统进行 miR-939 的 RT-PCR。GAPDH 作为内参。

#### 1.2.3 瞬时转染

miR-939 抑制剂(inhibitor)和抑制剂阴性对照(inhibitor negative control, inhibitor NC)的寡核苷酸

由 RiboBio 合成。用 Lipofectamine2000 将 inhibitor 和 inhibitor NC 转染至 H1299 和 SPCA1 细胞系。

#### 1.2.4 侵袭实验

使用 24 孔板及 8 mm 孔径的小室进行细胞侵袭实验。将转染的 H1299 或 SPCA1 细胞(1×10<sup>5</sup>个/孔)铺在含有 1%FBS 的培养基中的上室中。下室中充满含有 10%FBS 的培养基。24 h 后,将迁移到下室的细胞用 70%乙醇固定并用苏木精染色。

#### 1.2.5 Western blot 检测

提取细胞中的蛋白并通过 10%SDS 分离,用牛奶(5%无脂)封闭,然后加入小鼠单克隆 E-钙黏着蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin, 1:1 000 稀释)、抗 GAPDH 的抗体(1:1 000 稀释, Santa Cruz 公司,美国)。使用 Bio-Rad Laboratories (Richmond 公司,美国)进行分析。GAPDH 作为内参。

### 1.3 统计学方法

统计分析通过 STATA 软件(版本 11.0)进行。*t* 检验用于分析体外研究中的统计学差异。通过卡方检验分析 NSCLC 患者临床因素的统计学差异。 $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 NSCLC 组织中 miR-939 的表达增加

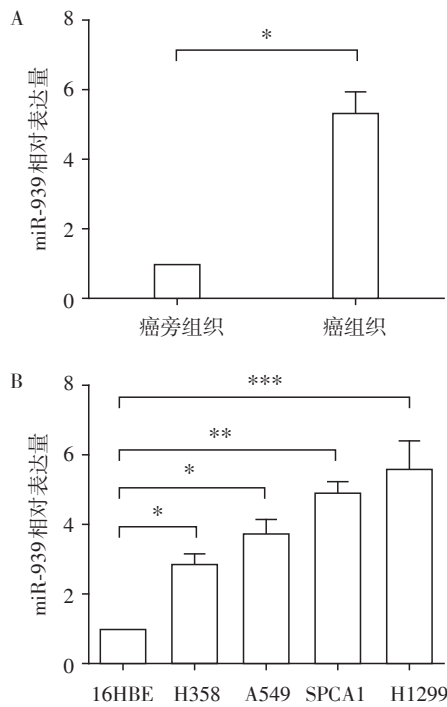
本研究收集了 NSCLC 患者的临床标本(癌/癌旁组织),通过 qRT-PCR 检测并比较 miR-939 在癌组织与相邻癌旁组织中的表达水平。结果显示:与癌旁组织相比较,miR-939 在癌组织中的表达显著升高(图 1A)。此外,结合 NSCLC 患者的临床特征(表 1),研究发现 miR-939 的差异表达与患者年龄、性别、吸烟史无关,但与肿瘤分期、淋巴结转移密切相关。由此可推测 miR-939 可能作为癌基因,促进 NSCLC 发展。

### 2.2 NSCLC 细胞系中 miR-939 表达明显增加

通过 qRT-PCR 方法检测 NSCLC 细胞系(H1299、SPCA1、A549、H358)和正常肺上皮细胞系(16HBE)中 miR-939 的表达水平。分析结果显示, NSCLC 细胞系(H1299、SPCA1、A549、H358)中 miR-939 的表达水平明显高于 16HBE,其结果支持临床分析结果(图 1B)。基于 miR-939 在细胞系中差异表达,本研究挑选了 H1299 和 SPCA1 细胞系用于后续的细胞实验。

### 2.3 miR-939 下调抑制 NSCLC 细胞的侵袭能力

分析发现 miR-939 的差异表达与淋巴结转移有关,为在体外探索 miR-939 对 NSCLC 细胞侵袭转移



A:通过qRT-PCR实验检测miR-939在癌组织及癌旁组织中的表达水平,GAPDH作为内参,两组比较,\* $P < 0.05$ ;B:通过qRT-PCR实验检测miR-939在NSCLC细胞(H358、A549、SPCA1、H1299)及正常肺上皮细胞(16HBE)中的表达水平,GAPDH作为内参,两组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ 。

图1 miR-939在NSCLC组织及细胞系中表达升高

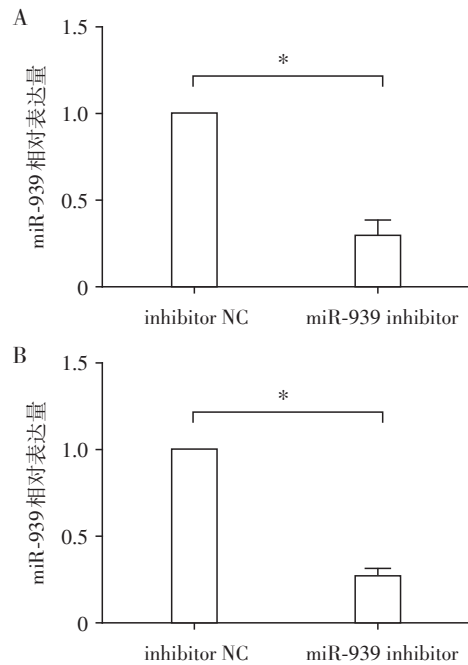
Figure 1 miR-939 was increased in NSCLC tissues and cell lines

表1 miR-939与NSCLC患者临床特征之间的关系

Table 1 The relationship between miR-939 and clinical features in patients with non-small cell lung cancer (n)

临床特征	总数	miR-939表达量		P值
		高	低	
总数	50	25	25	
年龄(岁)				0.152
≤ 60	21	8	13	
> 60	29	17	12	
性别				0.156
男	27	11	16	
女	23	14	9	
吸烟史				0.089
有	26	16	10	
无	24	9	15	
TNM分期				0.023
I~II	28	10	18	
III~IV	22	15	7	
淋巴结转移				0.018
有	18	13	5	
无	32	12	20	

方面的调控机制,本研究将miR-939抑制剂(inhibitor)和抑制剂对照组(inhibitor NC)分别转染细胞系。qRT-PCR方法验证其转染效率,结果显示:与对照组inhibitor NC相比较,在转染miR-939 inhibitor的细胞中miR-939表达显著减少(图2)。



通过qRT-PCR实验检测将inhibitor NC和miR-939 inhibitor转染H1299(A)和SPCA1(B)后miR-939的表达水平。GAPDH作为内参,两组比较,\* $P < 0.05$ 。

图2 转染miR-939 inhibitor可使miR-939表达水平降低

Figure 2 miR-939 was down-regulation via transfecting with miR-939 inhibitor

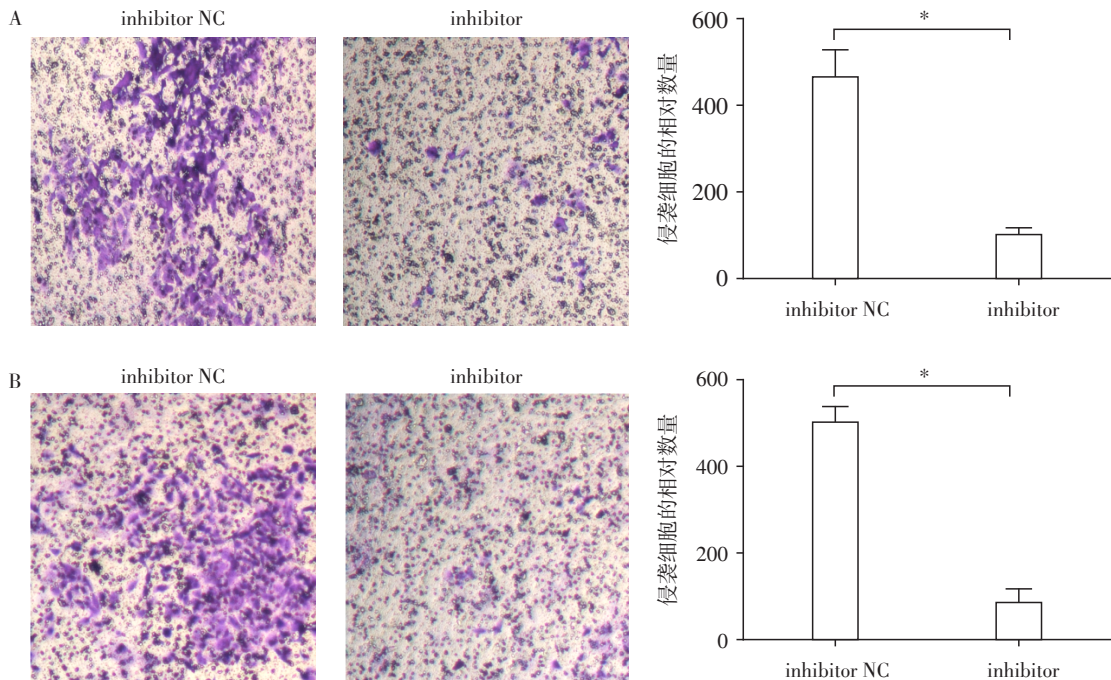
通过Transwell侵袭实验检测miR-939对NSCLC细胞侵袭能力的影响,结果显示:与inhibitor NC相比,inhibitor组侵入下室的细胞明显减少(图3),表明miR-939下调抑制NSCLC细胞的侵袭能力。

#### 2.4 下调miR-939可抑制EMT过程

EMT是指在特定生理或病理条件下,上皮细胞向间质细胞发生转化的现象。发生EMT的细胞更容易迁移和侵袭,EMT在多种恶性肿瘤侵袭转移中的作用已成为相关领域的研究热点。在此,本研究也进一步探索了miR-939对EMT过程的影响,通过Western blot实验发现:下调miR-939后E-cadherin表达水平升高,Vimentin表达水平降低(图4)。该结果表明下调miR-939可抑制EMT过程。

### 3 讨论

许多研究已经表明miRNA可作为促癌基因或



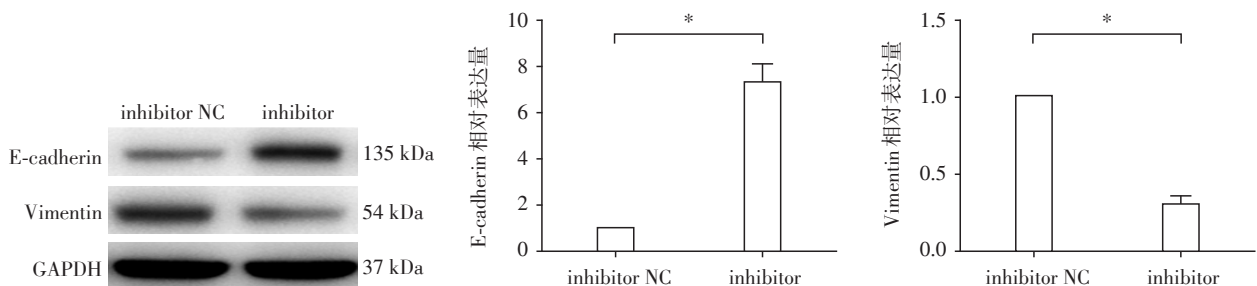
采用Transwell侵袭实验检测转染 inhibitor NC 和 inhibitor 后 H1299(A) 和 SPCA1(B) 细胞的侵袭能力, 两组比较, \* $P < 0.05$ 。

图3 下调 miR-939 可抑制细胞的侵袭能力

Figure 3 Down-regulation of miR-939 could inhibit cell invasive ability

抑癌基因参与不同肿瘤的发生发展过程,如miRNA-221在肾细胞癌中的表达增加,并通过控制TIMP2促进细胞增殖、迁移和侵袭<sup>[9]</sup>。在胃癌中,miR-29a通过调控回旋同源物可抑制细胞迁移和侵袭<sup>[10]</sup>。通过靶向调控TIAM1,低表达miR-329能够影响胃癌侵袭和生长<sup>[11]</sup>。另外,许多特殊的miRNA已被证实是多发性恶性肿瘤患者早期诊断和预后的生物标志物。miR-197的下调可以预测食管癌患者的不良预后<sup>[12]</sup>,miR-126和miR-200c参与NSCLC患者的预后<sup>[13]</sup>。本研究发现:miR-939在NSCLC癌组织中的表达显著高于癌旁组织,进一步结合患者临床资料分析发现,miR-939在NSCLC中的差异表达与肿

瘤分期和淋巴结转移密切相关,这表明miR-939在NSCLC中可作为促癌基因参与肿瘤发展,尤其是肿瘤的侵袭转移过程。同时,本研究通过qRT-PCR检测发现NSCLC细胞系(H1299、SPCA1、A549、H358)中miR-939的表达水平明显高于16HBE,其结果支持临床分析结果。随后,通过miR-939抑制剂成功将H1299和SPCA1细胞系中miR-939的表达量下调。并通过体外细胞实验初步研究了miR-939在细胞侵袭方面的功能作用,在H1299和SPCA1细胞系中,沉默miR-939可抑制细胞的侵袭能力。由此说明,miR-939作为促癌基因可能参与了肿瘤细胞的侵袭转移过程。



采用Western blot实验检测EMT相关标志物E-cadherin和Vimentin的表达水平。GAPDH作为内参,两组比较,\* $P < 0.05$ 。

图4 下调 miR-939 可抑制 EMT 过程

Figure 4 Down-regulation of miR-939 could suppress EMT

肿瘤的侵袭转移是导致患者预后不良的主要因素之一,EMT已被证实在肿瘤的侵袭转移过程中扮演着重要角色。EMT过程在胚胎发育、慢性炎症、组织重建、癌症转移和多种纤维化疾病中发挥了重要作用,其主要特征有细胞黏附分子(如E-cadherin)表达的减少、细胞角蛋白细胞骨架转化为波形蛋白(Vimentin)为主的细胞骨架及形态上具有间充质细胞的特征等。通过EMT过程,上皮细胞失去了细胞极性,失去与基底膜的连接等上皮表型,获得了较高的迁移与侵袭、抗凋亡和降解细胞外基质的能力等间质表型<sup>[14-17]</sup>。本研究通过Western blot实验发现:在H1299和SPCA1细胞系中,下调miR-939后E-cadherin表达水平升高,Vimentin表达水平降低。该结果表明:下调miR-939可抑制EMT过程。进而说明,miR-939通过调控EMT参与肿瘤的侵袭转移过程。至于其具体机制仍尚不明确,因为肿瘤的发生发展过程,尤其是肿瘤的侵袭转移这一重要过程,不是某一个基因或者某两个因子所决定的,而是由多个因素多个网络共同作用的复杂过程,因此,miR-939是如何参与NSCLC发生发展过程仍需要更深入更大规模的实验进一步研究与验证。

综上所述,miR-939作为一种新的促癌基因,可调控NSCLC细胞的侵袭能力及EMT过程,其不仅有助于NSCLC的临床诊疗,同时也为开发新型抗肺癌基因药物提供了有效的干预靶点和理论依据。

#### [参考文献]

- [1] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010[J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5):277-300
- [2] Sanchez De Cos J, Sojo Gonzalez MA, Montero MV, et al. Non-small cell lung cancer and silent brain metastasis. Survival and prognostic factors[J]. Lung Cancer, 2009, 63(1):140-145
- [3] Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy [J]. Trends Mol Med, 2014, 20(8):460-469
- [4] Kang SM, Lee HJ. MicroRNAs in human lung cancer[J]. Exp Biol Med(Maywood), 2014, 239(11):1505-1513
- [5] Wang CZ, Yuan P, Li Y. MiR-126 regulated breast cancer cell invasion by targeting ADAM9 [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(6):6547-6553
- [6] Kong R, Ma Y, Feng J, et al. The crucial role of miR-126 on suppressing progression of esophageal cancer by targeting VEGF-A[J]. Cell Mol Biol Lett, 2016, 21(1):3
- [7] Kang W, Tong JH, Lung RW, et al. Targeting of YAP1 by microRNA-15a and microRNA-16-1 exerts tumor suppressor function in gastric adenocarcinoma [J]. Mol Cancer, 2015, 14(3):52
- [8] Ying X, Li-Ya Q, Feng Z, et al. MiR-939 promotes the proliferation of human ovarian cancer cells by repressing APC2 expression[J]. Biomed Pharmacother, 2015, 71(4):64-69
- [9] Lu GJ, Dong YQ, Zhang QM, et al. miRNA-221 promotes proliferation, migration and invasion by targeting TIMP2 in renal cell carcinoma[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(5):5224-5229
- [10] Liu X, Cai J, Sun Y, et al. MicroRNA-29a inhibits cell migration and invasion via targeting Roundabout homolog 1 in gastric cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(3):3944-3950
- [11] Li Z, Yu X, Wang Y, et al. By downregulating TIAM1 expression, microRNA-329 suppresses gastric cancer invasion and growth [J]. Oncotarget, 2015, 6(19):17559-17569
- [12] Wang TY, Liu SG, Zhao BS, et al. Implications of microRNA-197 downregulated expression in esophageal cancer with poor prognosis [J]. Genet Mol Res, 2014, 13(3):5574-5581
- [13] Kim MK, Jung SB, Kim JS, et al. Expression of microRNA miR-126 and miR-200c is associated with prognosis in patients with non-small cell lung cancer[J]. Virchows Arch, 2014, 465(4):463-471
- [14] Ghahhari NM, Babashah S. Interplay between microRNAs and WNT/beta-catenin signalling pathway regulates epithelial-mesenchymal transition in cancer [J]. Eur J Cancer, 2015, 51(12):1638-1649
- [15] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(3):178-196
- [16] Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition [J]. Sci Signal, 2014, 7(344):re8
- [17] Nowrin K, Sohal SS, Peterson G, et al. Epithelial-mesenchymal transition as a fundamental underlying pathogenic process in COPD airways: fibrosis, remodeling and cancer [J]. Expert Rev Respir Med, 2014, 8(5):547-559

[收稿日期] 2018-01-17