

miR-638 对人肺腺癌细胞凋亡的影响

曹艳,王鹏,娄莹芳,李大千,吴蕾,陈丹,谢而付,顾兵,徐华国,王芳,徐建,潘世扬*

(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:探讨 miR-638 在肺腺癌中的表达及其与肺腺癌细胞凋亡的关系。方法:应用 real-time RT-PCR 的方法检测了 miR-638 在肺腺癌细胞株 SPC-A1 中的表达情况,并采用脂质体法将 miR-638 模拟物瞬时转染入 SPC-A1。实验设置空白对照组、无关 miRNA 阴性对照组和 miR-638 转染组,转染后在荧光显微镜下观察转染效率,实时荧光定量 RT-PCR 检测 miR-638 的表达,流式细胞术检测各组细胞凋亡率。结果:与正常细胞相比,miR-638 在肺腺癌细胞中低表达。SPC-A1 细胞转染 miR-638 模拟物后,细胞凋亡率相对于空白组和阴性对照组显著升高($P < 0.05$)。结论:miR-638 在肺腺癌中低表达,且能够促进肺腺癌细胞凋亡,可作为后续肺癌生物治疗的新分子靶标。

[关键词] 凋亡;miR-638;肺腺癌

[中图分类号] R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)03-287-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20140303

Impact of miR-638 on apoptosis of lung adenocarcinoma cells

Cao Yan, Wang Peng, Lou Jianfang, Li Daqian, Wu lei, Chen Dan, Xie Erfu, Gu Bing, Xu Huaguo, Wang Fang, Xu Jian, Pan Shiyang*

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

[Abstract] **Objective:** To investigate expression of miR-638 and effects of miR-638 on apoptosis of lung adenocarcinoma cell line (SPC-A1). **Methods:** The expression of miR-638 in lung adenocarcinoma cell line was detected by real-time RT-PCR. Mimics of miR-638 were transiently transfected into SPC-A1 by using lipofectamine method. SPC-A1 cells were transfected with miR-638 mimics or non-special oligonucleotides (as negative control) or nothing (as blank control). After transfection, transfection efficiency was observed by fluorescence microscope. MiR-638 levels were detected by real-time quantitative RT-PCR. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. **Results:** We observed that miR-638 was significantly inhibited in lung adenocarcinoma cells compared with that in normal cells. Cell apoptosis rate was increased significantly in cells transfected with miR-638 ($P < 0.05$) compared with negative and blank control cells. **Conclusion:** MiR-638 was poorly expressed in lung adenocarcinoma cells, and it could dramatically promote apoptosis of lung adenocarcinoma cells, thus provides a new target for the use of miR-638 in lung cancer biotherapy.

[Key words] apoptosis; miR-638; lung adenocarcinoma

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(03): 287-290]

成熟的微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类小的非编码单链 RNA, 由 20~23 个核苷酸组成, 通过

与 mRNA 的碱基互补配对影响 mRNA 的稳定性和 (或) 蛋白翻译过程, 在转录后水平的调节中发挥了重要作用^[1-2], 参与到各项生命活动中, 如细胞周期、侵袭转移、增殖分化和耐药等^[3-4], 在肿瘤的发生发展过程中扮演着重要角色^[5-6]。目前国内外仅有少数文献报道 miR-638 在某些肿瘤中表达异常, 但其在肺腺癌中的表达水平和具体功能仍然未知。本研究以肺腺癌细胞株 SPC-A1 为研究对象, 探讨 miR-638 在肺腺癌细胞中的表达及其对人肺腺癌细胞凋亡的影响。

[基金项目] 国家自然科学基金 (81371894, 81302531, 81272324, 81201359, 81101322); 江苏省实验诊断学重点实验室 (XK201114); 江苏高校优势学科建设工程基金项目; 教育部博导基金 (20113234110012); 国家临床重点专科建设项目

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

1 材料和方法

1.1 材料

人肺腺癌细胞 SPC-A1 和人胚肺成纤维细胞 HFL-1 购自中国科学院上海细胞库, 分别用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 和 F-12K 培养液(Invitrogen 公司, 美国)在 37℃, 5% CO₂ 恒温培养箱中培养。所有 miRNA 均由广州锐博公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染

实验设置未处理 SPC-A1 细胞作为空白组, 转染线虫 miRNA 的 SPC-A1 细胞作为阴性对照组, 化学合成的 has-miR-638 模拟物转染的细胞作为 miR-638 转染组, 参照 Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司, 美国)试剂盒说明进行转染, 使用 5 μl Lipofectamine 2000, miRNA 转染终浓度为 100 nmol/L。

1.2.2 RNA 提取及 RT-PCR

终浓度为 100 nmol/L 的 miRNA 转染 SPC-A1 12 h 后收集空白组、阴性对照组和 miR-638 转染组细胞, 同时收集处于自然对数生长期的 HFL-1 和 SPC-A1 细胞, 采用 miRNeasy MiNi Kit (Qiagen 公司, 德国)提取总 RNA, RNA 经 microRNA 逆转录试剂盒(ABI 公司, 美国)合成 cDNA 后, 用含特异性引物和探针的 TaqMan microRNA Assay Kit (ABI 公司, 美国)检测 miR-638 水平, U6 作为内参。扩增条件如下: 95℃ 10 min 预变性, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 45 个循环。反应结束后得到 Ct 值, 根据公式 $Ca/Cb = 2^{\Delta Ct_b - \Delta Ct_a}$ ($\Delta Ct = Ct_{miR-638} - Ct_{U6}$) 计算相对含量^[7]。

1.2.3 细胞凋亡检测

终浓度为 100 nmol/L 的 miRNA 转染 72 h 后收集空白组、阴性对照组和 miR-638 模拟物组 SPC-A1 细胞, 制备成单个细胞悬液, 预冷的 PBS 洗 2 遍, 采用 FITC-Annexin V 和 PI 双抗体标记(BD Biosciences 公司, 美国)后流式细胞仪 (BD Biosciences 公司, 美国)检测各组细胞的总凋亡率。实验重复 3 次。

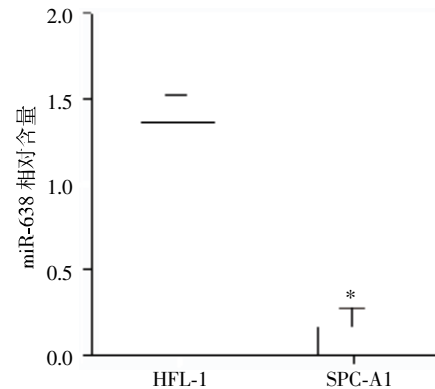
1.3 统计学方法

所有计量结果均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS16.0 进行分析, 组间比较采用方差分析, 两两比较采用 SNK 法, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-638 在肺腺癌细胞中的表达

为了明确 miR-638 在肺腺癌细胞系中的表达情况, 采用 real-time RT-PCR 相对定量的方法, 以正常细胞人胚肺成纤维细胞 HFL-1 中 miR-638 的表达为对照, U6 为内参, 检测了 SPC-A1 中 miR-638 的表达情况。结果显示, SPC-A1 中 miR-638 的含量显著低于 HFL-1, 仅为 HFL-1 的 1/6 ($P = 0.037$, 图 1)。



与 HFL-1 比较, * $P = 0.037$ ($n = 3$)。

图 1 miR-638 在肺腺癌细胞中低表达

Figure 1 MiR-638 is down-regulated in lung adenocarcinoma cells

2.2 荧光镜下观察转染效率

使用荧光显微镜观察 CY-3 标记的 miR-638 模拟物及其阴性对照转染 SPC-A1 细胞 5 h 后的转染效率, miR-638 转染组及其阴性对照组具有数量较多的荧光表达, 可见转染效率均高于 90%(图 2)。

2.3 转染后各组细胞 miR-638 的表达

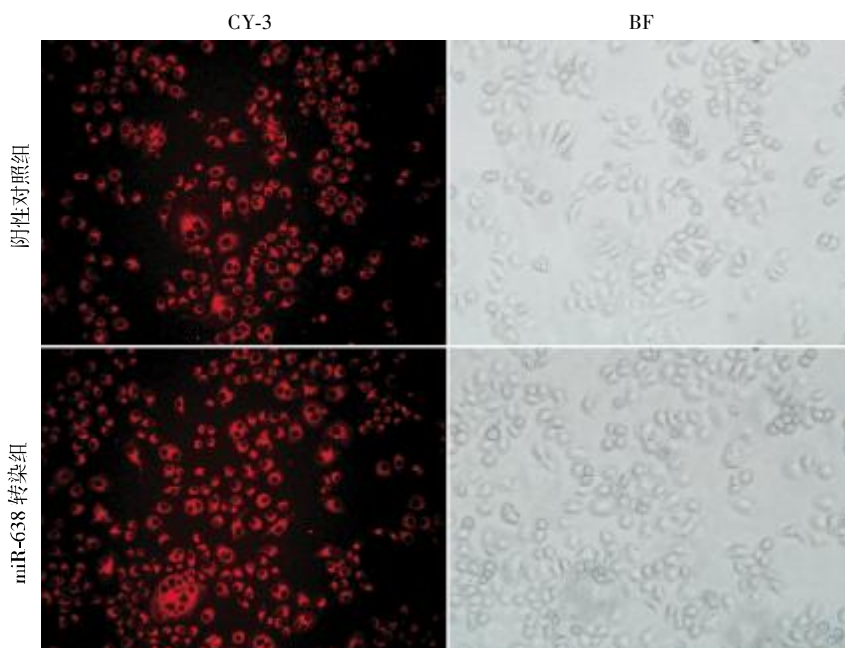
转染 12 h 后, real-time RT-PCR 检测空白组、阴性对照组和 miR-638 转染组中 miR-638 的相对含量。miR-638 转染组的 miR-638 表达明显上调, 与空白组相比上调了约 2 000 倍, 差异具有统计学意义 ($P < 0.001$); 而阴性对照组与空白对照组比较, miR-638 表达水平差异无统计学意义 ($P = 0.996$, 图 3)。

2.4 转染后各组细胞的凋亡率变化

为了进一步了解 miR-638 在肺腺癌细胞中的作用, 利用流式细胞术检测各组转染 72 h 后的细胞凋亡率。结果如图 4 所示, miR-638 转染组的细胞凋亡率为 $(18.73 \pm 1.51)\%$, 显著高于阴性对照组 $(7.16 \pm 0.56)\%$ 和空白组 $(5.58 \pm 0.92)\%$ ($P < 0.001$), 而空白组和阴性对照组无明显差异 ($P = 0.086$)。

3 讨论

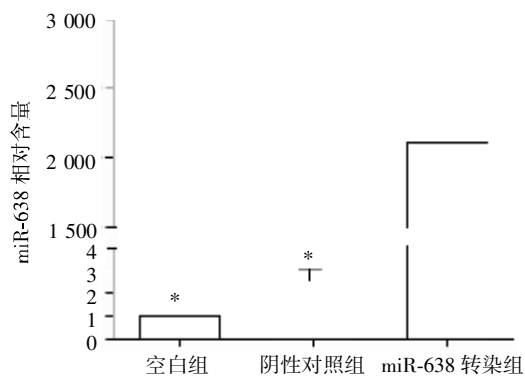
肺癌是全球发病率和病死率最高的癌症之一, 其中 80%~85% 为非小细胞肺癌(non-small cell lung



CY-3:红色荧光;BF:可见光。

图 2 转染 5 h 后荧光显微镜下观察转染效率($\times 200$)

Figure 2 Observation of transfection efficiency under the fluorescence microscope($\times 200$)



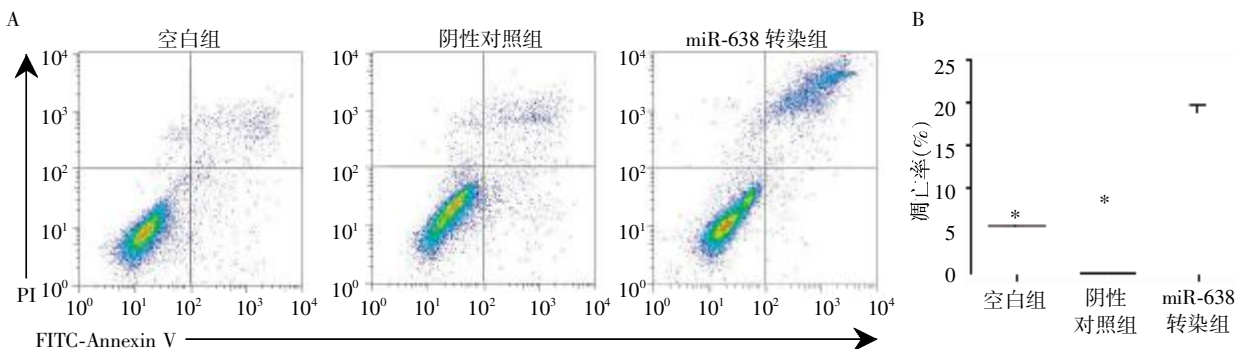
与 miR-638 转染组比较, $*P < 0.001 (n = 4)$ 。

图 3 转染 12 h 后各组细胞内 miR-638 表达水平的变化

Figure 3 RT-PCR analysis of miR-638 expression 12 h after transfection

cancer, NSCLC)^[8]。NSCLC 患者生存率虽与临床分期有关,但总体预后较差,5 年生存率约为 15%,相比 40 多年前仅提高了 5%^[9]。因此,寻求新的有效治疗靶点是研究关键。当前研究显示 miRNA 具有广泛的基因调节功能,能通过基因活动的各个层面进行调节,包括凋亡。例如,miR-148a、miR-143 和 miR-7 都能通过抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达促进肿瘤细胞凋亡^[10-12];miR-192 可直接靶向作用于视网膜母细胞瘤蛋白 1 导致细胞增殖受阻,通过半胱天冬酶途径诱导肺癌细胞凋亡^[13]。

目前对于 miR-638 的研究结果显示在基底细胞癌、胃癌和 68% 的 NSCLC 组织中 miR-638 水平降低^[14-16],与本研究结果一致。同时,在山竹子素、吉



A: 流式细胞术检测 miRNA 转染后 3 组的凋亡情况;B: 3 组凋亡率的数值统计,与 miR-638 转染组比较, $*P < 0.001 (n = 4)$ 。

图 4 转染 72 h 后各组细胞凋亡率的变化

Figure 4 The effects of miRNA-638 on apoptosis of SPC-A1 cells after 72 h post-transfection

西他滨作用于胰腺癌 PaCa 细胞和卷线孢菌素作用于肺腺癌 A549 细胞引起的肿瘤细胞凋亡中,研究者也发现了 miR-638 的表达上调^[17-18],均提示 miR-638 可能与细胞凋亡有关。本研究通过体外实验利用模拟物过表达方法,获得 miR-638 含量增高的肺腺癌细胞,进行 miR-638 的功能试验,从流式细胞仪检测的凋亡结果可以看出,miR-638 表达量增高的肺腺癌细胞凋亡率显著升高,直接证实其具有促进肺腺癌细胞凋亡的功能。

miR-638 在肺癌细胞中低表达,且上调其表达后能够促进肺腺癌细胞凋亡。随着研究的不断深入,miR-638 可能会成为治疗肺腺癌的一个新靶点。但是,关于 miR-638 对肺腺癌细胞促凋亡作用的具体机制及作用靶点有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Pencheva N, Tavazoie SF. Control of metastatic progression by microRNA regulatory networks [J]. *Nature Cell Biol*, 2013, 15(6): 546-554
- [2] 李鹏超, 陶俊, 吕强, 等. MiR-143 在膀胱移行细胞癌中的表达和功能 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2010, 30(9): 1235-1239
- [3] 马涛, 陆肖玮, 王嘉园, 等. miR-342-3p 在乳腺癌组织中的表达及意义 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2013, 33(7): 907-1010
- [4] Besse A, Sana J, Fadrus P, et al. MicroRNAs involved in chemo- and radioresistance of high-grade gliomas [J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(4): 1969-1978
- [5] Farazi TA, Spitzer JJ, Morozov P, et al. miRNAs in human cancer [J]. *J Pathol*, 2011, 223(2): 102-115
- [6] Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJ. The long and short of microRNA [J]. *Cell*, 2013, 153(3): 516-519
- [7] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [8] Rivera S, Quero L, Wong Hee Kam S, et al. Targeted therapies and radiation therapy in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Radiother*, 2011, 15(6-7): 527-535
- [9] Korpany G, Smyth E, Carney DN. Update on anti-angiogenic therapy in non-small cell lung cancer: Are we making progress? [J]. *J Thorac Dis*, 2011, 3(1): 19-29
- [10] Zhang H, Li Y, Huang Q, et al. MiR-148a promotes apoptosis by targeting Bcl-2 in colorectal cancer [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(11): 1702-1710
- [11] Zhang H, Cai X, Wang Y, et al. microRNA-143, down-regulated in osteosarcoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity by targeting Bcl-2 [J]. *Oncol Rep*, 2010, 24(5): 1363-1369
- [12] Xiong S, Zheng Y, Jiang P, et al. MicroRNA-7 inhibits the growth of human non-small cell lung cancer A549 cells through targeting BCL-2 [J]. *Int J Biol Sci*, 2011, 7(6): 805-814
- [13] Feng S, Cong S, Zhang X, et al. MicroRNA-192 targeting retinoblastoma 1 inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis in lung cancer cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(15): 6669-6678
- [14] Li D, Wang Q, Liu C, et al. Aberrant expression of miR-638 contributes to benzo (a)pyrene-induced human cell transformation [J]. *Toxicol Sci*, 2012, 125(2): 382-391
- [15] Sand M, Skrygan M, Sand D, et al. Expression of microRNAs in basal cell carcinoma [J]. *Br J Dermatol*, 2012, 167(4): 847-855
- [16] Yao Y, Suo AL, Li ZF, et al. MicroRNA profiling of human gastric cancer [J]. *Mol Med Rep*, 2009, 2(6): 963-970
- [17] Parasramka MA, Ali S, Banerjee S, et al. Garcinol sensitizes human pancreatic adenocarcinoma cells to gemcitabine in association with microRNA signatures [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2013, 57(2): 235-248
- [18] Chen WS, Hou JN, Guo YB, et al. Bostrycin inhibits proliferation of human lung carcinoma A549 cells via down-regulation of the PI3K/Akt pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011, 30(1): 17

[收稿日期] 2013-12-19