

miR-148b 在肺腺癌中的表达及其功能分析*

510180 广州 广州医科大学附属广州市第一人民医院肿瘤科

方喜生, 刘国龙¹, 刘霞, 吕琳

【摘要】 目的 探讨微小 RNA-148b(miR-148b)在肺腺癌组织和细胞株中的表达及临床意义。方法 采用实时定量 PCR 检测 13 例肺腺癌及癌旁组织中 miR-148b 的表达,并检测其在肺腺癌细胞株 H1437、H1975、A549、PC14/B 和正常人肺上皮细胞株 HBE 中的表达,选取肺腺癌细胞株 miR-148b 表达水平最低者分别转染 miR-148b 模拟物(mimics)和 miR-148b control。通过 MTT 检测、低密度细胞集落形成实验、Transwell 实验检测 miR-148b 对细胞增殖、集落形成和侵袭能力的影响。结果 miR-148b 在肺腺癌和癌旁组织中的相对表达量分别为 0.61 ± 0.42 和 0.91 ± 0.32 ($P < 0.05$);与正常肺上皮细胞株 HBE (相对表达量设为 1.00)比较,4 种肺腺癌细胞株 H1437、H1975、A549、PC14/B 中 miR-148b 的表达量分别为 0.42 ± 0.08 、 0.38 ± 0.02 、 0.29 ± 0.03 和 0.21 ± 0.04 ($P < 0.05$),选取 PC14/B 细胞株进行后续实验。MTT 检测显示,实验第 3 天,转染 miR-148b mimics 的 PC14/B 细胞吸光值明显低于转染 miR-148b control 组 ($P < 0.05$);低密度细胞集落形成实验中,与转染了 miR-148b control 的 PC14/B 细胞(相对克隆数设为 100)相比,转染 miR-148b mimics 的 PC14/B 细胞的相对克隆数为 47 ± 8 ,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);Transwell 实验显示,转染 miR-148b mimics 后穿过基底膜的相对 PC14/B 细胞数为 82 ± 22 ,与 miR-148b control 组 (200 ± 34)相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 miR-148b 在肺腺癌组织和细胞中表达下调,且可抑制肺腺癌 PC14/B 细胞株的增殖、集落形成和侵袭能力。

【关键词】 微小 RNA; 肺腺癌; miR-148b; 增殖; 侵袭

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1009-0460(2014)10-0881-05

Expression and function of miR-148b in lung adenocarcinoma

FANG Xisheng, LIU Guolong, LIU Xia, LV Lin. Department of Medical Oncology, Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510180, China

Corresponding author: LIU Guolong, E-mail: liugl@fimmu.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression and clinical significance of miRNA-148b (miR-148b) in lung adenocarcinoma (LAC) tissues and cell lines. **Methods** Realtime-PCR was performed to detect the expression of miR-148b between 13 cases of LAC tissues and matched adjacent normal tissues. The expression of miR-148b was also detected in normal lung epithelial HBE cell line, and LAC cell lines H1437, H1975, A549 and PC14/B. The cell line with lowest expression was respectively transfected with miR-148b mimics and miR-148b control. Then, the effect of miR-148b on proliferation, colony formation and invasion ability were analyzed by MTT, low-density cell colony formation and transwell experiments. **Results** The average relative expression of miR-148b in LAC tissues and adjacent normal tissues were 0.61 ± 0.42 and 0.91 ± 0.32 ($P < 0.05$). The expression levels of miR-148b in the H1437, H1975, A549, PC14/B cell lines were 0.42 ± 0.08 , 0.38 ± 0.02 , 0.29 ± 0.03 and 0.21 ± 0.04 , lower than that in HBE cell line (the expression level was set as 1.00) with significance ($P < 0.05$). PC14/B cell line was selected for the following experiments. MTT analysis showed that the absorbance value of miR-148b mimics group was much lower than that of miR-148b control group from the 3th day of the test ($P < 0.05$). As for the low-density cell colony formation analysis, the relative colony formation number of PC14/B cells transfected with miR-148b mimics was 47 ± 8 , which was decreased significantly compared with miR-148b control group (set as 100) with significance ($P < 0.05$). Transwell test showed that there was significant difference in the relative numbers of cells migrated through the basement membrane between miR-148b mimics group (82 ± 22) and miR-148b control group (200 ± 34) with significance ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of miR-148b is down-regulated in both LAC tissue and cell lines. It can suppress the cell proliferation, colony formation and invasion ability of PC14/B cell *in vitro*.

* 基金项目:广州市科技计划资助项目(2013J4100027)

¹ 通讯作者, E-mail: liugl@fimmu.com

【Key Words】 microRNA; Lung adenocarcinoma; miR-148b; Proliferation; Invasion

肺癌是人类高发的恶性肿瘤,占肿瘤总发病率的 13%、总死亡率的 18%,其死亡率在恶性肿瘤中居首位^[1]。肺癌中约 80%以上为非小细胞肺癌,主要分为鳞癌、腺癌及腺鳞癌等,其中肺腺癌最为常见,大约占非小细胞肺癌的 50%^[2]。肺腺癌远处转移多见,一旦发生,治愈率非常低。

MicroRNA,即微小 RNA(miRNA),是生物体内一类小 RNA。其长约 19~24nt,为非编码基因,通过序列互补特异性结合到靶基因 mRNA 的 3' 非翻译区上(3'-untranslated region, 3' UTR),从而抑制该 mRNA 翻译或诱导该 mRNA 降解,进而在转录后水平上对该基因表达进行调控。随着人类对基因以及基因调控研究的深入,据估计有大于 1/3 的基因表达受到不同 miRNA 的影响^[3]。目前,已发现数千种 miRNA,广泛参与到细胞的生长、增殖、侵袭、分化、凋亡等一系列进程中^[4-5]。有证据表明,在多种肿瘤中都存在 miRNA 的异常表达,miRNA 可能作为一类潜在的癌基因或抑癌基因起作用,国内目前已有多位学者总结其与消化系肿瘤、乳腺癌、神经胶质瘤等恶性肿瘤的关系^[6-10]。

miR-148b 定位于染色体 12q13.13 上,已有研究发现 miR-148b 低表达于多种肿瘤组织,但其功能目前尚不清楚。本研究拟首先在肺腺癌组织以及肺腺癌细胞株中观察 miR-148b 的表达,然后通过转染 miR-148b 观察其对肺腺癌细胞增殖、集落形成、侵袭能力的影响,探讨 miR-148b 在肺腺癌中的表达及意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肺腺癌细胞株 A549、H1437、H1975、PC14/B 和正常人肺上皮细胞株 HBE 由中山大学肿瘤防治中心提供,4 株细胞均用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基于 37℃、5%CO₂ 饱和湿度的培养箱内培养。

1.1.2 组织样本 收集 2012 年 1 月至 2012 年 12 月广州市第一人民医院病理科 13 例肺腺癌术后病理组织及癌旁组织用于检测 miR-148b 的表达,所有组织均经福尔马林固定后石蜡包埋,备用。肺腺癌组织均经病理学证实。患者在术前均未行放、化疗。

1.1.3 主要试剂及仪器 逆转录酶购自 Promega

公司,逆转录试剂盒购自 TaKaRa 公司,2×SYBR Green qPCR Mix 购自 Invitrogen 公司,Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 MBI Fermentas 公司,miRNA mimics 购自 Dharmacon 公司。7900HT 荧光定量 PCR 仪购自 ABI 公司,艾本德 3111 电动移液管购自北京伯乐生命科学发展有限公司,C150 系列细胞培养箱购自 Binder 公司,MINI200 离心机购自丁氏机械有限公司,CKX41 倒置相差显微镜购自 Olympus 公司。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取 细胞先去除培养基,肺腺癌组织先将组织用液氮研碎,利用 Trizol 法提取细胞及组织总 RNA。1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性,分光光度计检测 RNA 的浓度及纯度。

1.2.2 逆转录 RNA 测浓度后行逆转录反应,采用 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit,反应条件为:42℃ 1h,70℃ 5min;miRNA 逆转录使用茎环法,反应条件为:72℃ 5min,42℃ 60min,80℃ 10min。

1.2.3 实时定量 PCR (qPCR) 检测 在 ABI 7900HT 荧光定量 PCR 仪系统上按照标准程序进行 qPCR。qPCR 引物由 Premier Primer 5.0 software 设计,序列如下:miR-148b 反向引物:5'-CTCAACTG-GTGTCTGGGA-3'。miR-148b 上游:5'-CAGTGCG-TGCTCTGGAG-3';下游:5'-GGGTCAGTGCATCA-CAGAA-3'。反应条件为:95℃ 10min,95℃ 15s,60℃ 1min;45 个循环。选取 U6 为内参。实验重复 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示癌细胞 miR-148b 的表达情况, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{miR-148b} - Ct_{U6})_{癌细胞} - (Ct_{miR-148b} - Ct_{U6})_{HBE}$ 。采用 $2^{-\Delta Ct}$ 法表示肺癌组织中 miR-148b 的表达情况, $\Delta Ct = Ct_{miR-148b} - Ct_{U6}$ 。筛选表达量最低的细胞株进行后续实验。

1.2.4 转染 转染前 1 天,细胞铺板,在 6 孔板中每孔接种 2×10^5 个 PC14/B 细胞,待细胞达到 30%~50% 汇合度进行转染;根据转染样品的个数,每个样品取出两个无 RNA 酶的 EP 管,每个 EP 管中加入 250μl Opti-MEM 转染优化培养基;在一个 EP 管中加入 5μl RNAiMAX,另一个 EP 管中加入 5μl 50nmol/L 的 miR-148b mimics(上游:5'-UCAGUGC-AUCACAGAACUUUGU-3',下游:5'-AAAGUUCU-GUGAUGCACUGAAU-3')或作为对照的 miR-148b control(上游:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-

3', 下游: 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'); 将加有 miR-148b mimics 或 miR-148b control 的 EP 管中的液体吸入盛有 RNAiMAX 的 EP 管中, 将上述混合液体加入已换液的 6 孔板中, 置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中继续培养 24~72h, 备用。

1.2.5 细胞增殖实验 (MTT 实验) 将 MTT 0.5g, 溶于 100ml 磷酸缓冲液 (PBS) 配置 MTT 工作液。将转染 24h 后的 PC14/B 细胞接种 96 孔板, 24h 后加入 MTT 工作液, 37°C 避光孵育 4h, 弃去孔中的培养基, 每孔加入 DMSO 200 μ l, 摇床上放置 10min, 在多功能酶标仪 (490nm 波段) 上测量各孔吸光值 (A), 连续监测并记录。实验重复 3 次。

1.2.6 低密度细胞集落形成实验 将转染 24h 后的 PC14/B 细胞用胰酶消化计数, 按 500 个细胞每孔接种于 6 孔板中, 每孔加入 2ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基进行培养, 每 3 天更换新鲜的培养基, 连续培养 2 周。2 周后吸除培养基, 用 1 \times PBS 洗涤细胞, 每个孔加入 1ml 甲醇固定 15min, 弃去甲醇后加入 0.1% 结晶紫染液染色 15min, 弃去结晶紫染液, 用 PBS 反复洗涤至溶液变成无色。将 6 孔板放在扫描仪下进行扫描。实验重复 3 次。

1.2.7 Transwell 细胞体外侵袭实验 选择杯底孔径为 8 μ m 的聚碳酸脂微孔滤膜封闭的 12 孔板嵌套 Transwell 小室, 临用前紫外灯照射 Transwell 小室 2h, 水化滤膜 90min; 选取指数生长期的 PC14/B 细胞, 用 DMEM (含 1% 小牛血清) 稀释制备 3.5 \times 10⁴ 个/ml 的细胞悬液; 细胞悬液按每孔 100 μ l 加入 Transwell 小室, 每组 3 孔, Transwell 下室加入 DMEM (10% 小牛血清); 36h 后弃去孔内培养液用棉签拭去上室未穿膜的细胞, 结晶紫染色后, 上室倒置于显微镜下计数穿膜细胞数, 随机计数 3 个视野 (\times 40) 内的细胞数, 重复 3 次, 计算平均值。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 16.0 版软件进行数据分析。组间比较采用独立样本 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-148b 在肺腺癌组织中的表达 qPCR 检测显示, 13 例肺腺癌组织中 miR-148b 的平均相对表达量为 0.61 \pm 0.42, 癌旁组织中为 0.91 \pm 0.32, miR-148b 在肺腺癌组织中的表达低于癌旁组织 (*P* < 0.05)。

2.2 miR-148b 在肺腺癌细胞中的表达 将 HBE 细胞中 miR-148b 的相对表达量设为 1.00, 肺腺癌细胞株 H1437、H1975、A549、PC14/B 中 miR-148b 的相对表达量分别为 0.42 \pm 0.08、0.38 \pm 0.02、0.29 \pm 0.03 和 0.21 \pm 0.04, 均低于 HBE 细胞, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。其中, PC14/B 细胞 miR-148b 的相对表达量最低, 选取该细胞株进行后续实验。

2.3 miR-148b 对肺腺癌细胞增殖的抑制作用 在分别转染 miR-148b mimics 和 miR-148b control 的 PC14/B 细胞中, MTT 检测结果显示, 从第 3 天开始, miR-148b mimics 组细胞的 A 值显著低于 miR-148b control 组 (*P* < 0.05)。见表 1。

2.4 miR-148b 对肺腺癌细胞克隆形成的抑制作用 将转染 miR-148b mimics 和 miR-148b control 的 PC14/B 细胞进行结晶紫染色, 观察细胞克隆形成数量。结果发现, 与 miR-148b control 组比较, miR-148b mimics 组形成的细胞克隆数量及克隆大小均降低。与 miR-148b control 组相比 (其相对克隆数设为 100), miR-148b mimics 组 PC14/B 细胞的相对克隆数为 47 \pm 8, 两组差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。见图 1。

2.5 miR-148b 对肺腺癌细胞侵袭能力的影响 在转染 miR-148b mimics 或 miR-148b control 的 PC14/B 细胞的 Transwell 实验中发现, 转染 miR-148b mimics 后穿透基底膜的 PC14/B 细胞数量明显减少, 其穿膜相对细胞数为 82 \pm 22, 与 miR-148b control 组的 200 \pm 34 相比, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。见图 2。

表 1 转染 miR-148b mimics 对肺腺癌 PC14/B 细胞吸光值的影响

组别	d ₁	d ₂	d ₃	d ₄
miR-148b control 组	0.32 \pm 0.05	0.52 \pm 0.04	0.75 \pm 0.04*	1.23 \pm 0.06*
miR-148b mimics 组	0.32 \pm 0.04	0.39 \pm 0.04	0.53 \pm 0.04	0.81 \pm 0.06

注: * *P* < 0.05

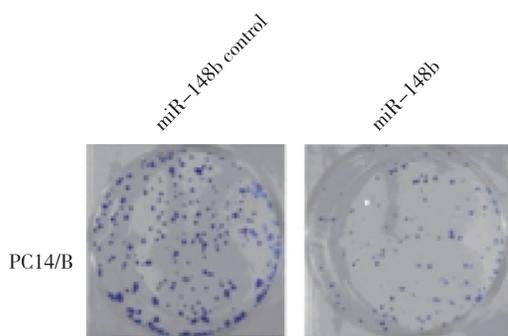


图 1 转染 miR-148b mimics 对肺腺癌 PC14/B 细胞克隆形成的影响

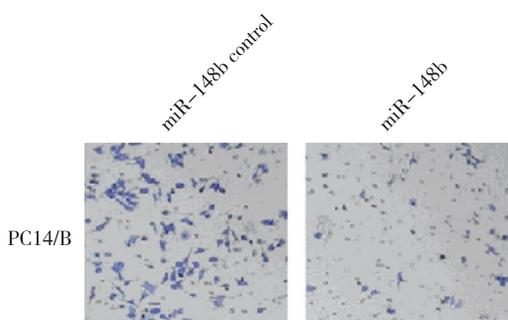


图 2 转染 miR-148b mimics 对肺腺癌 PC14/B 细胞侵袭的影响

3 讨论

异常表达的 miRNAs 频繁在各类肿瘤中呈现, 研究报道 miRNAs 在癌症的发生、发展过程中发挥了非常重要作用。但是 miRNAs 对肺腺癌的影响和相应的分子机制研究目前仍处于初步阶段。因此, 识别对肺腺癌发展必需的 miRNAs 及其作用靶点, 可能会为肺腺癌的靶向治疗提供重要的临床指导意义。本研究发现 miR-148b 在肺腺癌组织和细胞株 H1437、H1975、A549、PC14/B 中的表达均明显降低, 尤其在肺腺癌细胞株 PC14/B 中最低。选取 PC14/B 细胞转染 miR-148b mimics 后, 细胞的增殖、克隆形成及侵袭能力均受到抑制, 提示肺腺癌的侵袭浸润可能与 miR-148b 的表达下降有关, 推测 miR-148b 在肺腺癌中具有抑癌效应。

miRNA 作为一种非编码 RNA 基因产物, 调节人类近 1/3 的基因表达, 且部分 miRNA 的表达失调与肿瘤的发生、发展密切相关, 其发挥着癌基因或抑癌基因的功能。近年来, miRNAs 异常表达与肺腺癌发病的关系受到国内外学者的广泛重视。miRNA 具有广泛的基因调节功能, 包括凋亡, 且能

通过基因活动的各个层面进行调节。文献报道, miR-148a、miR-638 和 miR-7 均能通过抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达促进肿瘤细胞凋亡。亦有研究发现, 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^[11]; 而 miRNA-10b 可以促进肺腺癌 A549 细胞的增殖及侵袭能力^[12]。本研究则发现, miR-148b 在肺腺癌组织和肺腺癌细胞株 H1437、H1975、A549、PC14/B 中的表达明显降低。

既往研究证实, miRNAs 通过一些靶点下游的信号通路来调控细胞凋亡与细胞周期。例如 miR-497 通过靶点下游胰岛素样生长因子 1 受体, 增加了结肠癌细胞的凋亡^[13]; miR-26a 通过直接作用靶点 cyclin D1 和 cyclin D2 诱导肝癌细胞周期阻滞在 G₁ 期^[14]; 而 miR-21 通过靶点 hMSH2 来抑制肺癌的增殖, 诱导细胞周期阻滞在 S 期^[15]。在非小细胞肺癌中 Hu 等^[16]研究证实 miR-193b 对肿瘤细胞增殖具有抑制作用, 其机制是通过调控 CCND1 起作用。刘向华等^[17]发现非小细胞肺癌组织及细胞中 miR-196a 的表达上调能够抑制 p27^{kip1} 的表达和显著促进细胞增殖, 影响非小细胞肺癌的发生与发展。本研究将 miR-148b mimics 导入肺腺癌 PC14/B 细胞株中, 其增殖受到抑制, 表明 miR-148b mimics 可降低肿瘤细胞的克隆形成能力, 与文献报道一致, 但其具体作用机制还有待进一步研究。

肿瘤的一个重要特征是无限生长性, 癌基因的激活和抑癌基因的缺失是癌变的重要原因。本研究证实 miR-148b 在肺腺癌中低表达, 增加其表达可以明显抑制肿瘤细胞的增殖。本研究首次表明, miR-148b 作为一种肿瘤抑制基因在肺腺癌细胞中发挥了重要的功能。因此, 将 miR-148b 导入肿瘤细胞将阻止肿瘤的发展。在后续的研究中, 我们拟寻找 miR-148b 调控肿瘤增殖、侵犯的靶基因, 并通过构建动物模型在体内进行验证, 为进一步确立 miR-148b 作为预防和治疗肺腺癌的新靶点提供充分的科学依据。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Subramanian J, Morgensztern D, Goodgame B, et al. Distinctive characteristics of non-small cell lung cancer (NSCLC) in the young: a surveillance, epidemiology, and end results (SEER) analysis[J]. J Thorac Oncol, 2010, 5(1): 23-28.
- [3] Taft RJ, Pheasant M, Mattick JS. The relationship between non-

- protein-coding DNA and eukaryotic complexity [J]. *Bioessays*, 2007, 29(3): 288-299.
- [4] Wong TS, Man OY, Tsang CM, et al. MicroRNA let-7 suppresses nasopharyngeal carcinoma cells proliferation through downregulating c-Myc expression [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(3): 415-422.
- [5] Xia H, Ng SS, Jiang S, et al. miR-200a-mediated downregulation of ZEB2 and CTNNB1 differentially inhibits nasopharyngeal carcinoma cell growth, migration and invasion [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(1): 535-541.
- [6] 邱萍, 邱峰. microRNAs 与胃癌治疗 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2014, 19(1): 90-94.
- [7] 姜志锋, 邵君飞. microRNA 与神经胶质瘤的研究进展 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2010, 15(6): 560-563.
- [8] 江文洋, 康敢军, 谢颂平, 等. miR-155 与消化系统肿瘤关系的研究进展 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2014, 19(5): 473-476.
- [9] 陈彪, 徐细明. miRNA 在原发性肝癌中的研究进展 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2012, 17(10): 946-950.
- [10] 罗燕红, 王科明. 微小 RNA 与乳腺癌相关性的研究进展 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2011, 6(2): 179-182.
- [11] 曹艳, 王鹏, 娄鉴芳, 等. miR-638 对人肺腺癌细胞凋亡的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34(3): 287-290.
- [12] 刘翼, 李明慧, 郭文佳, 等. MicroRNA-10b 对人肺腺癌细胞株 A549 增殖及侵袭能力的影响 [J]. *实用癌症杂志*, 2013, 28(5): 469-471.
- [13] Guo ST, Jiang CC, Wang GP, et al. MicroRNA-497 targets insulin-like growth factor 1 receptor and has a tumour suppressive role in human colorectal cancer [J]. *Oncogene*, 2013, 32(15): 1910-1920.
- [14] Yang X, Liang L, Zhang XF, et al. MicroRNA-26a suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma by targeting interleukin-6-Stat3 pathway [J]. *Hepatology*, 2013, 58(1): 158-170.
- [15] Chao TF, Xiong HH, Liu W, et al. MiR-21 mediates the radiation resistance of glioblastoma cells by regulating PDCD4 and hMSH2 [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2013, 33(4): 525-529.
- [16] Hu H, Li S, Liu J, et al. MicroRNA-193b modulates proliferation, migration, and invasion of non-small cell lung cancer cells [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2012, 44(5): 424-430.
- [17] 刘向华, 林梦洁, 尹凌帝, 等. miR-196a 调控 p27kip1 促进非小细胞肺癌细胞增殖的机制研究 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2013, 18(11): 961-965.

收稿日期:2014-07-27; 修回日期:2014-09-03