

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.29.009  
文章编号: 1005-8982 (2018) 29-0047-06

## MicroRNA-149 对肺鳞状细胞癌转移能力的 影响及分子机制研究

黄冬梅<sup>1</sup>, 李福祥<sup>2</sup>

(1. 西南医科大学附属医院 呼吸内科, 四川 泸州 646099; 2. 西南医科大学 临床医学院,  
四川 泸州 646000)

**摘要: 目的** 研究 microRNA-149 (miR-149) 在肺鳞状细胞癌 (LSCC) 的临床意义及其对细胞迁移和侵袭的作用。**方法** 选取 2010 年 1 月-2015 年 12 月西南医科大学附属医院收治的 60 例 LSCC 患者的癌灶及癌旁组织。采用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 miR-149 在 LSCC 及癌旁组织中的表达。通过转染 miR-149 模拟物升高 LSCC 细胞系 NCI-H226 中 miR-149 的表达, 划痕愈合试验检测过表达 miR-149 对 NCI-H226 细胞迁移的影响, Transwell 小室探究 miR-149 对 NCI-H226 侵袭的影响。qRT-PCR 及 Western Blot 检测 miR-149 过表达对 NCI-H226 细胞中叉头盒蛋白 M1 (FOXM1) 及其靶基因基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 表达的影响。**结果** miR-149 在 LSCC 中表达水平低于癌旁组织 ( $P < 0.05$ ); 过表达 miR-149 能够降低 NCI-H226 细胞的迁移及侵袭能力 ( $P < 0.05$ )。过表达 miR-149 能够下调其下游靶点 FOXM1 mRNA 和蛋白表达水平, 抑制 FOXM1 靶基因 MMP-2 的表达 ( $P < 0.05$ )。**结论** miR-149 在 LSCC 中呈低表达, miR-149 通过抑制 FOXM1/MMP-2 信号通路来抑制 LSCC 的细胞转移能力。

**关键词:** MiR-149; 抑制; 肺鳞状细胞癌; 抑制; 转移

**中图分类号:** R736.1

**文献标志码:** A

## Effect of miR-149 on metastasis of lung squamous cell carcinoma and its molecular mechanism

Dong-mei Huang<sup>1</sup>, Fu-xiang Li<sup>2</sup>

(1. Department of Respiratory Medicine, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646099, China; 2. Clinical Medical College of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression of miR-149 in lung squamous cell carcinoma (LSCC) and its role in tumor migration and invasion. **Methods** Sixty cases of LSCC and matched tumor adjacent tissues were collected in the Affiliated Hospital of Southwest Medical University between January 2010 and December 2015. The expression levels of miR-149 were detected by qRT-PCR. miR-149 mimics were transfected into NCI-H226 cells. Migration and invasion were determined by wound-healing assay and Transwell assay, respectively. The expressions of FOXM1 and MMP-2 were detected by real-time PCR and Western blot. **Results** The expression of miR-149 was down-regulated in the LSCC tissues ( $P < 0.05$ ). Over-expression of miR-149 inhibited migration and invasion of NCI-H226 cells ( $P < 0.05$ ). Moreover, the expressions of FOXM1 and MMP-2 were decreased after miR-149 over-expression ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** miR-149 is down-regulated in LSCC. miR-149 inhibits metastasis of LSCC by inhibiting FOXM1/MMP-2 signaling pathway.

**Keywords:** miR-149; down-regulation; lung squamous cell carcinoma; metastasis

收稿日期: 2018-05-11

[通信作者] 李福祥, E-mail: lfx98@163.com

肺鳞状细胞癌 (lung squamous cell carcinoma, LSCC) 是我国常见的呼吸系统恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。MicroRNAs 是一类长度在 25 个核苷酸以内的单链、短序列 RNA<sup>[2]</sup>。MicroRNAs 通过结合靶基因信使 RNA 的 3' 端非编码区来抑制靶基因的表达<sup>[3]</sup>。研究发现, microRNA-149 (miR-149) 的异常表达与肝癌、胃癌等多种肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[3-4]</sup>。因而, miR-149 被认为是一种具有潜在应用价值的肿瘤评估指标。本研究通过检测 miR-149 在 LSCC 中的表达及其在癌细胞转移中的作用机制, 以期为 LSCC 的诊治提供新的分子靶点。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2010 年 1 月-2015 年 12 月于西南医科大学附属医院呼吸内科就诊的 60 例 LSCC 患者的癌灶及癌旁组织。其中, 男性 32 例, 女性 28 例; 患者年龄 35 ~ 61 岁。人肺上皮细胞 BEAS-2B 和 LSCC 细胞系 YTM1C-90、HB-99 及 NCI-H226 购自中国科学院上海细胞库。杜尔伯科极限必需培养基 (Dulbecco minimum essential medium, DMEM) (11965-084)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (16000044) 购自美国 Gibco 公司, RNA 提取试剂 (Trizol, 15596026)、Lipofectamine™ 3000 转染试剂 (L3000015) 及一步法 RT-PCR 试剂盒 (10928042) 购自美国 Invitrogen 公司, miR-149 mimics、阴性对照 mimics、miR-149 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 引物试剂盒及 RNU6B qRT-PCR 引物试剂盒购自广州锐博基因有限公司, 叉头盒蛋白 M1 (forkhead box protein M1, FOXM1) 引物 (正向引物: 5' -GGGCGCACGGCGGAAGATGAA-3'; 反向引物: 5' -CCACTCTTCCAAGGGAGGGCTC-3')、基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 引物 (正向引物: 5' -CAGGACATTGTCTTTGATGCATCGC-3'; 反向引物: 5' -TGAAGAAGTAGCTATGACCACCGCC-3') 及 GAPDH 引物 (正向引物: 5' -CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3'; 反向引物: 5' -AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3') 由上海生工生物工程股份有限公司合成, Transwell 小室 (#3458) (美国康宁公司), Matrigel (354230) (美国 B&D 公司), FOXM1 (ab83097)、MMP-2 (ab37150)

及 GAPDH (ab9485) 抗体 (美国 Abcam 公司), ECL 化学发光试剂盒 (WBKLS0050) (美国密理博公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 qRT-PCR** 通过 Trizol 试剂提取标本及细胞 RNA, 配制逆转录及 PCR 扩增体系。逆转录条件为: 50℃ 逆转录 30 min, 94℃ 失活 2 min, 循环 1 次后 94℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 30 s, 68℃ 延伸 3 min, 共 40 个循环后 72℃ 继续延伸 10 min。通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法检测 miR-149 的相对含量。

**1.2.2 细胞培养及 mimics 转染** NCI-H226 细胞在含 10% FBS 的 DMEM 培养基中培养至稳定传代 2 ~ 3 代。过夜增殖至愈合度达 70%, 接种 6 孔细胞培养板。miR-149 组由 100 pmol miR-149 模拟物及 5  $\mu$ l 转染试剂构成; miR-NC 组由 100 pmol 的阴性对照模拟物及 5  $\mu$ l 转染试剂构成。用无血清 DMEM 培养液添加至 1 ml/孔。4 h 后更换完全培养基继续培养。

**1.2.3 细胞划痕愈合试验** 将转染 24 h 后的 NCI-H226 细胞接种于 6 孔板中, 接种密度以过夜铺满为准。无血清 DMEM 培养基饥饿细胞 4 h 减弱细胞间连接。用 100  $\mu$ l 的枪头由每孔中线划过, PBS 清洗 6 孔板, 使用无血清 DMEM 培养基补充至 2 ml/孔。培养 48 h 后观察细胞的迁移。

**1.2.4 Transwell 小室** 基质胶按 1 : 8 稀释后, 在 Transwell 小室膜的上室面加入 100  $\mu$ l/孔基质胶, 上层加入 250  $\mu$ l 细胞悬液, 25 孔板内加入含 10% FBS 的培养基, 培养 12 h。擦净上室面细胞, 4% 多聚甲醛固定剩余细胞后使用 Giemsa 染液染色。统计下室面细胞个数, 以每个小室的平均细胞数为最终计数。

**1.2.5 Western blot 检测** 提取转染 72 h 后的 NCI-H226 细胞总蛋白。10% SDS-PAGE 胶垂直电泳分离蛋白, 采用 BIO-RAD 湿转系统, 70 V 恒压转膜 150 min, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h; 用 5% 脱脂奶粉溶液按 1 : 1 000 稀释 FOXM1、MMP-2 及 GAPDH 抗体。在 4℃ 条件下孵育相应条带过夜。洗去残余一抗后采用 1 : 5 000 稀释的 HRP 标记山羊抗兔或抗鼠二抗室温孵育条带 1 h。于暗室内, 用 ECL 法发光观察蛋白表达。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 13.0 统计学软件, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用  $t$  检验或方差分析; 计数资料以率 (%) 表示, 比较用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-149 在 LSCC 中的表达

miR-149 在 LSCC 中的相对表达量为  $(2.116 \pm 0.107)$ , 在癌旁组织为  $(8.763 \pm 0.341)$ , 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t=2.241, P=0.040$ )。以 LSCC 组织中 miR-149 平均表达水平为界, 将 60 例患者分成 miR-149 高表达组 ( $\geq 2.116$ ) 23 例和 miR-149 低表达组 ( $< 2.116$ ) 37 例。对两组患者的临床病理特征进行分析, LSCC 组织中 miR-149 高表达与淋巴结转移、TNM 分期有关 ( $P < 0.05$ )。见附表和图 1。

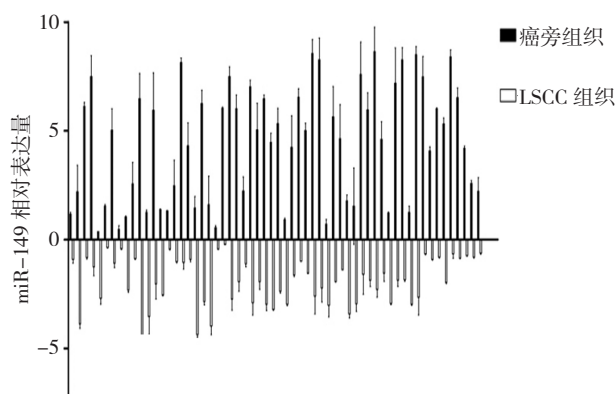


图 1 miR-149 在 LSCC 组织中的相对表达量

附表 不同影响因素的 miR-149 高表达率比较

因素	例数	高表达例 (%)	$\chi^2$ 值	$P$ 值
<b>性别</b>				
男	32	9 (28.13)	3.023	0.112
女	28	14 (50.00)		
<b>年龄</b>				
$\leq 50$ 岁	38	13 (34.21)	0.745	0.421
$>50$ 岁	22	10 (45.45)		
<b>肿瘤数量</b>				
1 个	25	12 (48.00)	1.694	0.282
$\geq 2$ 个	35	11 (31.43)		
<b>肿瘤直径</b>				
$\leq 2$ cm	24	13 (54.17)	4.242	0.058
$>2$ cm	36	10 (27.78)		
<b>淋巴结转移</b>				
是	34	9 (26.47)	4.671	0.037
否	26	14 (53.85)		
<b>TNM 分期</b>				
I+II	28	15 (53.57)	5.157	0.034
III+IV	32	8 (25.00)		

### 2.2 过表达 miR-149 对 NCI-H226 转移能力的影响

BEAS-2B、YTMLC-90、HB-99 及 NCI-H226 细胞中 miR-149 相对表达量分别为  $(1.035 \pm 0.003)$ 、 $(0.577 \pm 0.108)$ 、 $(0.564 \pm 0.101)$  和  $(0.382 \pm 0.084)$ , 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=41.860, P=0.038$ )。与 BEAS-2B 比较, NCI-H226、YTMLC-90 及 HB-99 细胞中 miR-149 的表达量均降低 (见图 2)。利用瞬时转染技术在 NCI-H226 细胞内过表达 miR-

149, miR-NC 组和 miR-149 组的 miR-149 相对表达量分别为  $(1.042 \pm 0.021)$  和  $(5.462 \pm 0.105)$ , 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t=4.031, P=0.010$ ) (见图 3)。细胞划痕愈合结果显示, miR-NC 组和 miR-149 组划痕剩余距离百分比分别为  $(46.414 \pm 5.561) \%$  和  $(78.083 \pm 7.133) \%$ , 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t=3.119, P=0.024$ )。过表达 miR-149 能抑制 NCI-H226 细胞迁移 (见图 4)。Transwell 小室结果表明, miR-NC 组和 miR-149 组侵袭细胞分别为

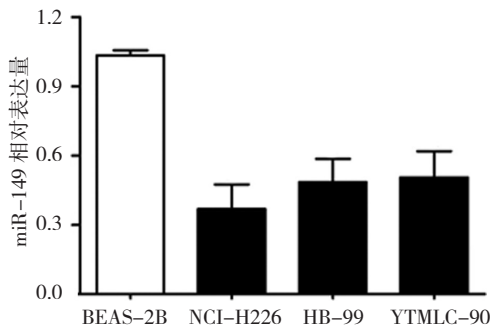


图 2 miR-149 在肺上皮细胞和 LSCC 细胞中的表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

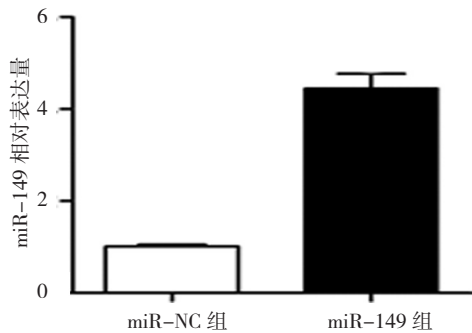


图 3 两组 miR-149 相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

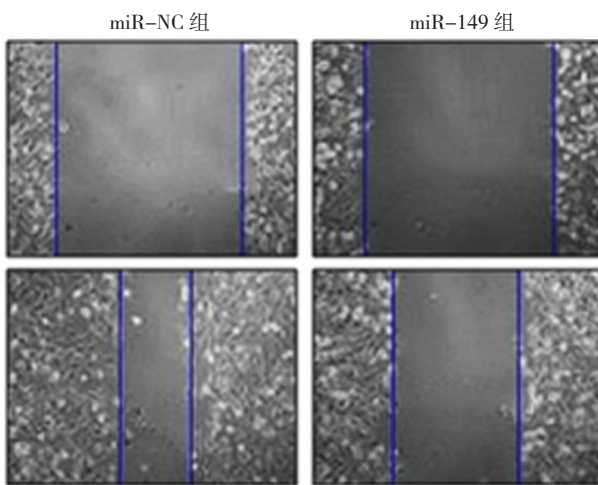


图 4 miR-149 对 LSCC 细胞迁移的影响

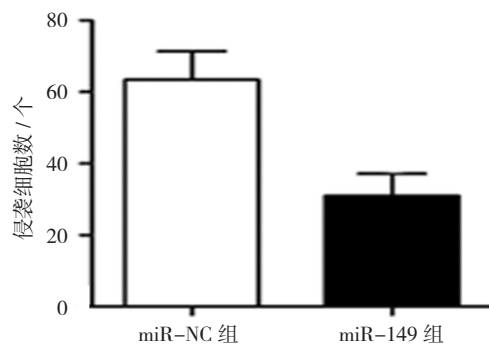
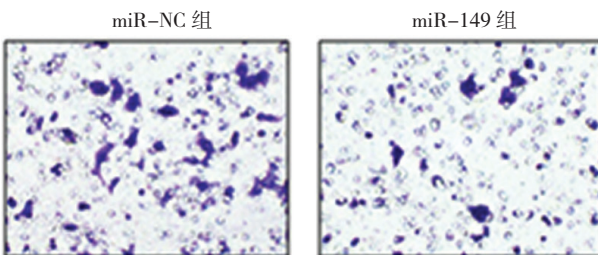
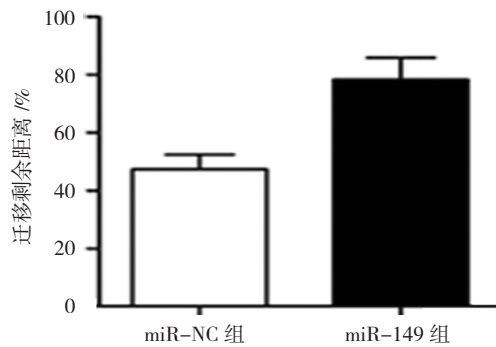


图 5 miR-149 对 LSCC 细胞侵袭的影响

( $462.546 \pm 8.475$ ) 和 ( $37.194 \pm 7.281$ ) 个, 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t=3.247, P=0.019$ ), 过表达 miR-149 能抑制 NCI-H226 细胞侵袭 (见图 5)。

### 2.3 miR-149 靶向下调 NCI-H226 细胞内 FOXM1 的表达

通过对 TARGETSCAN 及 MIRANDA 等生物信息学数据库的检索发现, 转录因子 FOXM1 可能是 miR-149 的下游潜在作用靶点之一。为验证这一假设, 笔者检测了过表达 miR-149 的 NCI-H226 细胞中 FOXM1 的表达变化。miR-NC 组和 miR-149 组 NCI-H226 细胞内 FOXM1 mRNA 的相对表达量分别为 ( $1.043 \pm 0.074$ ) 和 ( $0.434 \pm 0.051$ ), 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t=3.083, P=0.032$ ), 过表达 miR-149 能够下调 NCI-H226 细胞内 FOXM1 mRNA 的表达水平 (见图 6)。miR-NC 组和 miR-149 组 NCI-H226 细胞内 FOXM1 蛋白的相对表达量分别为 ( $0.803 \pm 0.116$ ) 和 ( $0.423 \pm 0.065$ ), 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t=3.064, P=0.037$ ), 过表达 miR-149 能够下调 NCI-H226 细胞内 FOXM1 蛋白

的表达 (见图 7)。同时, 对细胞迁移和侵袭具有重要促进作用的基质金属蛋白酶 MMP-2, miR-NC 组和 miR-149 组中 MMP-2 mRNA 的相对表达量分别为  $(1.153 \pm 0.141)$  和  $(0.412 \pm 0.059)$ , 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t = 3.310, P = 0.021$ ) (见图 8)。miR-NC 组和 miR-149 组中 MMP-2 蛋白的相对表达量分别为  $(0.760 \pm 0.111)$  和  $(0.432 \pm 0.109)$ , 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t = 3.303, P = 0.026$ ) (见图 9)。

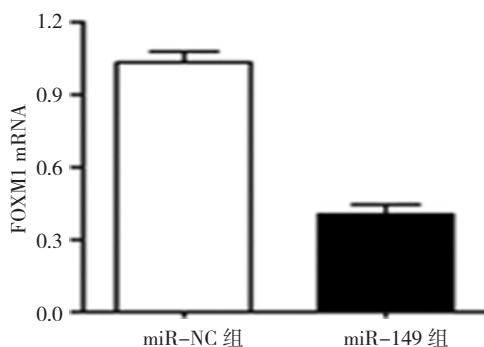


图 6 两组 FOXM1 mRNA 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

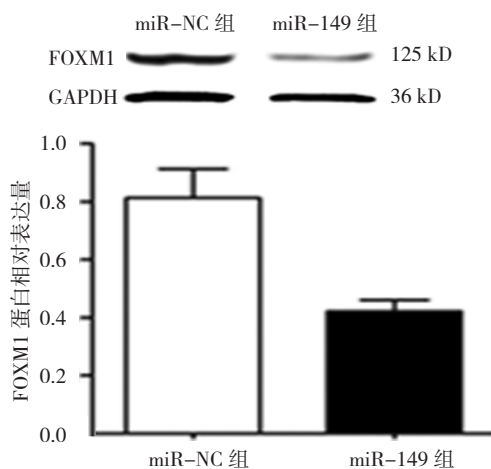


图 7 两组 FOXM1 蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

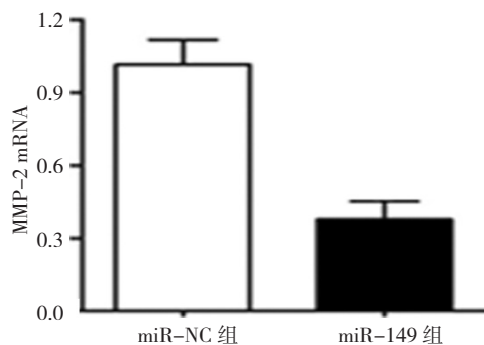


图 8 两组 MMP-2 mRNA 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

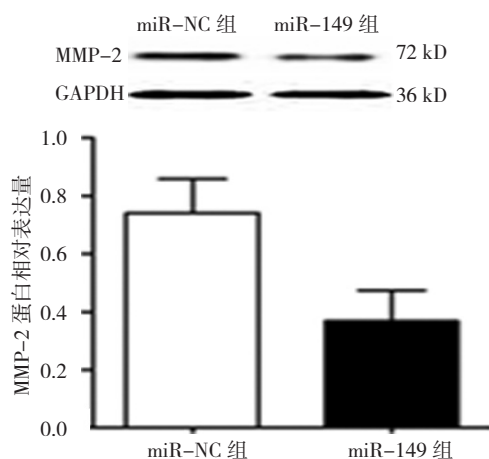


图 9 两组 MMP-2 蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

### 3 讨论

miR-149 编码基因位于人类染色体 2q37.3 上<sup>[5]</sup>。miR-149 在生理和病理生理过程中发挥重要作用。例如, 在骨关节炎患者的软骨细胞中检测到 miR-149 的表达下调, 并且与炎症调节因子白介素 6 的表达升高有关, 提示 miR-149 在炎症发生、发展中起重要作用<sup>[6]</sup>。除此之外, 由吸烟导致的慢性阻塞性肺病细胞中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的过度分泌也被证实与 miR-149 表达下调相关<sup>[7]</sup>。近年来对 miR-149 功能的研究多集中于肿瘤学领域, 在脑胶质母细胞瘤、结肠癌、前列腺癌及胃癌中均发现 miR-149 的表达下调<sup>[8-11]</sup>。

在本研究中, 笔者通过对 LSCC 及癌旁组织的检测发现, miR-149 在 LSCC 中的表达明显降低, 并且与肿瘤淋巴结转移及 TNM 分期相关, 提示 miR-149 可能通过抑制 LSCC 细胞转移而抑制肿瘤发展。为此, 笔者通过在 LSCC 的 NCI-H226 细胞中过表达 miR-149 并借助划痕愈合实验及 Transwell 小室实验证明 miR-149 能够抑制 NCI-H226 细胞的迁移和侵袭能力。为探讨 miR-149 的作用机制, 笔者通过生物信息学检索发现, FOXM1 可能是 miR-149 的作用靶点之一。FOXM1 已在包括肺癌在内的多种人类恶性肿瘤中被证明具有促进肿瘤转移的作用<sup>[12-13]</sup>。笔者通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测发现 miR-149 负向调控 FOXM1 的表达。并且, FOXM1 转录靶点 MMP-2 的表达水平也受到抑制。MMP-2 是一种被广泛认可的参与分解细胞外机制而促进细胞迁移侵袭的基质金属蛋白酶, 其表达改变从分子水平解释了过表达 miR-149 后细胞迁移及侵袭能力变化的原因<sup>[14]</sup>。

综上所述, miR-149 在 LSCC 中表达下调并与肿

瘤转移表型关系密切。在体外, miR-149 能够通过抑制 FOXM1/MMP-2 信号通路的表达来抑制 LSCC 细胞的迁移和侵袭能力, 最终抑制肿瘤进展。

#### 参 考 文 献:

- [1] HOU S, ZHOU S, QIN Z, et al. Evidence, mechanism, and clinical relevance of the transdifferentiation from lung adenocarcinoma to squamous cell carcinoma[J]. *Am J Pathol*, 2017, 187(5): 954-962.
- [2] BOUFRAQECH M, KLUBO-GWIEZDZINSKA J, KEBEBEW E. MicroRNAs in the thyroid[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2016, 30(5): 603-619.
- [3] LIN L, ZHANG Y D, CHEN Z Y, et al. The clinicopathological significance of miR-149 and PARP-2 in hepatocellular carcinoma and their roles in chemo/radiotherapy[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(9): 12339-12346.
- [4] CÎMPEANU R A, POPESCU D M, BURADA F, et al. miR-149 rs2292832 C>T polymorphism and risk of gastric cancer[J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2017, 58(1): 125-129.
- [5] LIM J J, SHIN D A, JEON Y J, et al. Association of miR-146a, miR-149, miR-196a2, and miR-499 polymorphisms with ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): DOI: 10.1371/journal.pone.0159756.
- [6] SANTINI P, POLITI L, VEDOVA P D, et al. The inflammatory circuitry of miR-149 as a pathological mechanism in osteoarthritis[J]. *Rheumatol Int*, 2014, 34(5): 711-716.
- [7] SHEN W, LIU J, ZHAO G, et al. Repression of Toll-like receptor-4 by microRNA-149-3p is associated with smoking-related COPD[J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2017, 12(241): 705-715.
- [8] GHASEMI A, FALLAH S, ANSARI M. MicroRNA-149 is epigenetically silenced tumor-suppressive microRNA, involved in cell proliferation and downregulation of AKT1 and cyclin D1 in human glioblastoma multiforme[J]. *Biochem Cell Biol*, 2016, 94(6): 569-576.
- [9] LI H, REN Y, XIA L, et al. Association of microRNA-149 polymorphism with lung cancer risk in chinese non-smoking female: a case-control study[J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): DOI: 10.1371/journal.pone.0163626.
- [10] CHEN Y, ZHAO J, LUO Y, et al. Downregulated expression of miRNA-149 promotes apoptosis in side population cells sorted from the TSU prostate cancer cell line[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(5): 2587-2600.
- [11] CAO D, JIA Z, YOU L, et al. 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid suppresses gastric cancer by activation of miR-149-3p-Wnt-1 signaling[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(44): 71960-71973.
- [12] AHMED M, UDDIN S, HUSSAIN A R, et al. FoxM1 and its association with matrix metalloproteinases (MMP) signaling pathway in papillary thyroid carcinoma[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(1): e1-e13.
- [13] XU X S, MIAO R C, WAN Y, et al. FoxM1 as a novel therapeutic target for cancer drug therapy[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(1): 23-29.
- [14] JIA H, ZHANG Q, LIU F, et al. Prognostic value of MMP-2 for patients with ovarian epithelial carcinoma: a systematic review and meta-analysis[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2017, 295(3): 689-696.

(李科 编辑)