

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.09.004
文章编号: 1005-8982 (2019) 09-0016-05

MicroRNA-433 在非小细胞肺癌 A549 细胞增殖及迁移中的作用

郑庆凯¹, 张晓萍², 邵润霞²

(1. 焦作市人民医院 呼吸内科, 河南 焦作 454000; 2. 郑州大学第二附属医院 呼吸内科, 河南 郑州 450014)

摘要: 目的 研究 microRNA-433 (miR-433) 对人非小细胞肺癌 (NSCLC) A549 细胞增殖及迁移的作用。**方法** 采用实时聚合酶链反应 (real-time PCR) 检测 miR-433 在 A549、NCI-H1299、NCI-H358 以及人肺成纤维细胞系 HFL1 中的表达。不同浓度 miR-433 mimic 转染 A549 细胞, 选取最佳浓度进行后续实验; MTT 法检测细胞增殖情况; Transwell 检测细胞迁移情况; 双荧光素酶报告基因法检测 miR-433 与 p21 活化激酶 4 (PAK4) 的靶向关系; Western blotting 检测 PAK4、单丝氨酸蛋白激酶 1 (LIMK1)、磷酸化单丝氨酸蛋白激酶 1 (p-LIMK1)、丝切蛋白 (Cofilin) 和磷酸化丝切蛋白 (p-Cofilin) 的表达。**结果** 与 HFL1 比较, miR-433 在 3 种 NSCLC 中的表达均降低。过表达 miR-433 48 h 后, A549 细胞增殖和迁移能力降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。双荧光素酶报告基因法证明 PAK4 为 miR-433 的靶向调节基因, 且 PAK4 在 3 种 NSCLC 中的表达均上升。过表达 miR-433 后细胞中 PAK4、p-LIMK1、p-Cofilin 的表达均降低, 与 mimic control 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** miR-433 能通过靶向下调 PAK4 的表达, 抑制 LIMK1/Cofilin 信号通路, 抑制 A549 细胞的增殖及迁移。

关键词: 癌, 非小细胞肺; microRNAs; p21 活化激酶 4; 增殖; 迁移

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Role of MiRNA-433 in proliferation and migration of A549 cells

Qing-kai Zheng¹, Xiao-ping Zhang², Run-xia Shao²

(1. Department of Respiratory Medicine, The People's Hospital of Jiaozuo City, Jiaozuo, Henan 454000, China; 2. Department of Respiratory Medicine, The Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450014, China)

Abstract: Objective To analyze the effect of miR-433 on the proliferation and migration of A549 cells. **Methods** The expression of miR-433 in A549, NCI-H1299, NCI-H358 and HFL1 cells was measured by Real-time PCR. A549 cells were transfected with different concentrations of miR-433 mimic for an optimal concentration. Transfection efficiency was measured by Real-time PCR. The cell proliferation was measured by MTT. The cell migration was measured by Transwell. The expression of PAK4, LIMK1, p-LIMK1, cofilin and p-cofilin was measured by Western blotting. **Results** MiR-433 was down-regulated in A549, NCI-H358 compared with HFL1 cells. Overexpression of miR-433 suppressed A549 cell proliferation and migration capability at 48 h ($P < 0.05$). Dual-luciferase reporter gene assay showed that PAK4 was the target of miR-433. In addition, PAK4 was up-regulated in NSCLCs. Furthermore, overexpression of miR-433 significantly decreased the expression of PAK4, p-LIMK1 and p-cofilin ($P < 0.05$) compared with those in mimic control group. **Conclusion** MiR-433 suppresses A549 cell

收稿日期: 2018-10-31

[通信作者] 邵润霞, E-mail: runxiashao3@sina.com; Tel: 17761686276

proliferation and migration through inhibiting PAK4/LIMK1/Cofilin pathway.

Keywords: cancer, non-small cell lung; MicroRNAs; PAK4; proliferation; migration

肺癌已成为人类癌症死亡的首要原因,其中,非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占肺癌总数的80%,由于临床缺乏早期有效诊断的生物学标志物,其5年生存率仍少于15%^[1]。我国每年约有40万人被确诊患有肺癌,且预计到2025年,人数将达到100万人/年。因此,寻找能早期诊断的生物学标志物具有重要意义。

MicroRNA(miRNA)是一类长度约22个核酸的非编码内源性小RNA,通过与目的基因的3'-非编码区(3'-UTR)相结合,调控靶基因的表达,从而参与调控个体发育、细胞凋亡、增殖及分化等生命活动^[2]。研究表明,miRNAs的异常表达与肺癌的发生、发展密切相关,如miR-509-5p^[3]、miR-512-5p^[4]、miR-513^[5]等。据报道,miR-433在多种肿瘤中的表达下调,且发挥抑癌的作用,如口腔鳞状细胞癌^[6]、结直肠癌^[7]等,而其在肺癌中的表达及具体的作用机制尚未见报道,因此,本文旨在研究miR-433对A549细胞增殖及迁移的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料

NSCLC细胞系A549、NCI-H1299、NCI-H358,人肺成纤维细胞系HFL1,HEK293细胞等购自美国Abcam公司;DMEM培养基、10%胎牛血清、青霉素100 u/ml、链霉素100 mg/ml购自美国Gibco公司,miR-433模拟物(miR-433 mimic)以及模拟物对照(mimic control)均由广州锐博生物科技有限公司合成,Lipofectamine™3000购自Thermo Fisher Scientific,Trizol购自美国Invitrogen公司,逆转录试剂盒、SYBR Premix Ex Taq™II试剂盒购自日本TaKaRa公司,MTT、RIPA裂解液购自美国Sigma公司,Transwell小室购自美国BD Biosciences公司,双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国Promega公司,兔抗人p21活化激酶4(p21-activated kinase 4,PAK4)、单丝氨酸蛋白激酶1(LIM domain kinase 1,LIMK1)、磷酸化单丝氨酸蛋白激酶1(phospho-LIM domain kinase 1,p-LIMK1)多克隆抗体购自美国Abcam公司,兔抗人丝切蛋白(Cofilin)和磷酸化丝切蛋白(p-cofilin)多克隆抗体购自美国CST公司。

1.2 细胞培养

细胞均培养在含10%胎牛血清的DMEM培养基中,于37℃、5%二氧化碳CO₂培养箱中进行培养。根据生长情况,每2~4天传代1次,取对数期的细胞用于后续实验。

1.3 细胞转染

将A549细胞培养至80%融合时,按照Lipofectamine™3000转染试剂说明书进行转染。分为空白对照组、miR-433 mimic(50、80及100 nmol/L)组、mimic control组。转染48 h后,Real-time PCR检测转染效率,选取最佳浓度进行后续实验。

1.4 real-time PCR检测miR-433水平

收集细胞,利用Trizol法提取总RNA,然后按照逆转录试剂盒说明书合成cDNA,再按照SYBR Premix Ex Taq™II试剂盒说明书于ABI 7500仪器(美国应用生物系统公司)进行real-time PCR,具体反应程序为:95℃预变性30 s;95℃变性5 s,60℃退火30 s,共40个循环。目的基因表达量按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

1.5 MTT检测细胞活力

将处于对数生长期的A549细胞以 1×10^5 个/ml浓度接种于96孔细胞培养板,于转染48 h后加入5 μg/μl的MTT溶液20 μl,孵育4 h后每孔分别加入150 μl的DMSO溶液,最后于490 nm波长处检测各组吸光度(Absorbance, A)值。

1.6 Transwell检测细胞迁移能力

将A549细胞调整为 2×10^5 个/ml,取200 μl加入到Transwell™小室内,并进行转染。24孔板中加入500 μl含10%血清的DMEM完全培养基,将Transwell™小室放入24孔板中,继续培养48 h后取出。弃掉上室培养液,加入4%多聚甲醛固定10 min,经PBS清洗后再用1%结晶紫染色3 min,PBS清洗小室。最后于倒置显微镜下进行观察。随机选取5个高倍镜视野,对穿过底膜的细胞进行计数。

1.7 荧光素酶活性实验检测miR-433对PAK4的靶向性

将包含PAK4野生型(WT)的3'-UTR的pmirGLO质粒和PAK3突变型(Mut)的3'-UTR的pmirGLO质粒分别与miR-433 mimic和mimic control转染

至 HEK293 细胞, 每组各重复 6 个孔, 转染后 48 h, 利用双荧光素酶检测试剂盒检测萤火虫荧光素酶活性, 同时检测海肾荧光素酶活性作为内参对照。

1.8 Western blotting 检测蛋白水平

将处于对数生长期的 A549 细胞以 1×10^5 个/ml 浓度接种于 24 孔细胞培养板, 转染 48 h 后收集各组细胞, 加入 RIPA 裂解细胞, 提取细胞总蛋白。取 30 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 然后转移至 PVDF 膜上, 经 5% 脱脂牛奶封闭后, 分别加入相应 PAK4 (1 : 1 000 稀释)、LIMK1/p-LIMK1 (1 : 1 000 稀释)、cofilin/p-cofilin (1 : 1 000 稀释) 等一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。然后加入辣根过氧化物酶偶联的抗兔 (1 : 2 000 稀释) 二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。加入 ECL 发光剂进行显色, 曝光拍照。

1.9 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用重复测量设计的方差分析或单因素方差分析, 其中两两比较采用 LSD-*t* 检验。两组间差异比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-433 在 NSCLC 细胞中的表达情况

miR-433 在多组间的表达, 经单因素方差分析比较, 差异有统计学意义 ($F = 20.364, P = 0.003$)。miR-433 在 NSCLC 细胞系 A549 (0.420 ± 0.047)、NCI-H1299 (0.510 ± 0.082)、NCI-H358 (0.480 ± 0.032) 中的表达与人肺成纤维细胞系 HFL1 (1.00 ± 0.12) 比较下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 过表达 miR-433 对 A549 细胞增殖的影响

过表达 miR-433 后, 不同浓度组间 miR-433 表

达, 差异有统计学意义 ($F = 26.321, P = 0.004$)。与空白对照组 (1.00 ± 0.12) 比较, 50、80 及 100 nmol/L 的 miR-433 mimic 表达量分别为 (75.06 ± 5.82)、(142.02 ± 10.25)、(106.89 ± 8.57) 可促进 miR-433 的表达, 其中, 80 nmol/L 的 miR-433 mimic 转染后, miR-433 表达量最高 ($P < 0.05$) (见表 1)。80 nmol/L 的 miR-433 mimic 转染对 A549 细胞增殖的影响, 采用重复测量设计的方差分析, 结果显示: ①不同时间点的 A549 细胞增殖率有差异 ($F = 11.539, P = 0.001$); ②3 组间 A549 细胞增殖率有差异 ($F = 6.651, P = 0.019$), miR-433 mimic 组与 mimic control 比较, 细胞增殖能力较低, 抑制细胞增殖效果较好; ③ miR-433 mimic 组与 mimic control 组 A549 细胞增殖率变化趋势有差异 ($F = 5.379, P = 0.025$)。见表 1。

表 1 80 nmol/L 的 miR-433 mimic 转染对 A549 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0.23 ± 0.015	0.72 ± 0.044	1.31 ± 0.072
mimic control 组	0.21 ± 0.023	0.68 ± 0.055	1.28 ± 0.123
miR-433 mimic 组	0.24 ± 0.042	0.51 ± 0.082	0.95 ± 0.071

2.3 过表达 miR-433 对 A549 细胞迁移的影响

Transwell 结果显示, 过表达 miR-433 后, 空白对照组 A549 细胞迁移数为 (89.25 ± 7.71) 个/视野, mimic control 组为 (84.33 ± 8.32) 个/视野, miR-433 mimic 组为 (31.76 ± 4.66) 个/视野, 3 组间比较, 差异有统计学意义 ($F = 3.991, P = 0.020$)。与 mimic control 组比较, miR-433 mimic 组 A549 细胞迁移能力降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.4 miR-433 对 PAK4 的靶向性

Target Scan Human 7.0 软件预测结果表明, PAK4

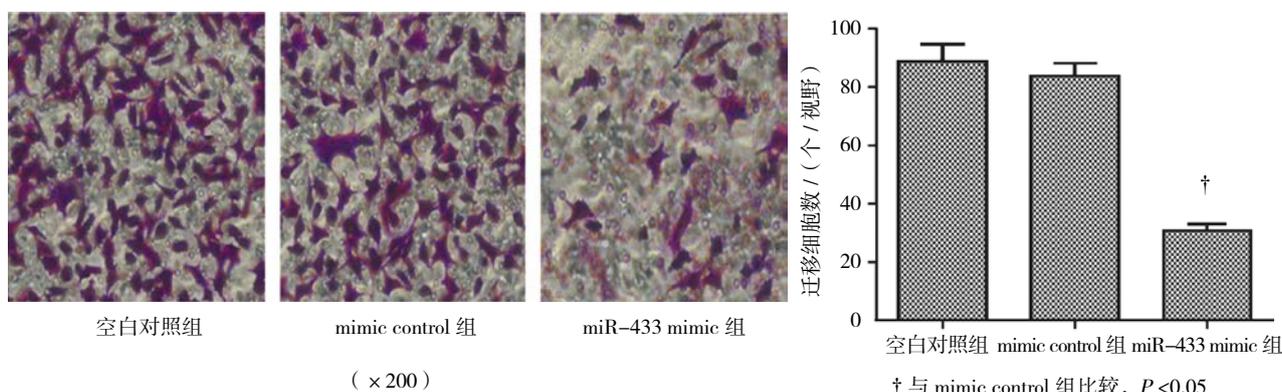
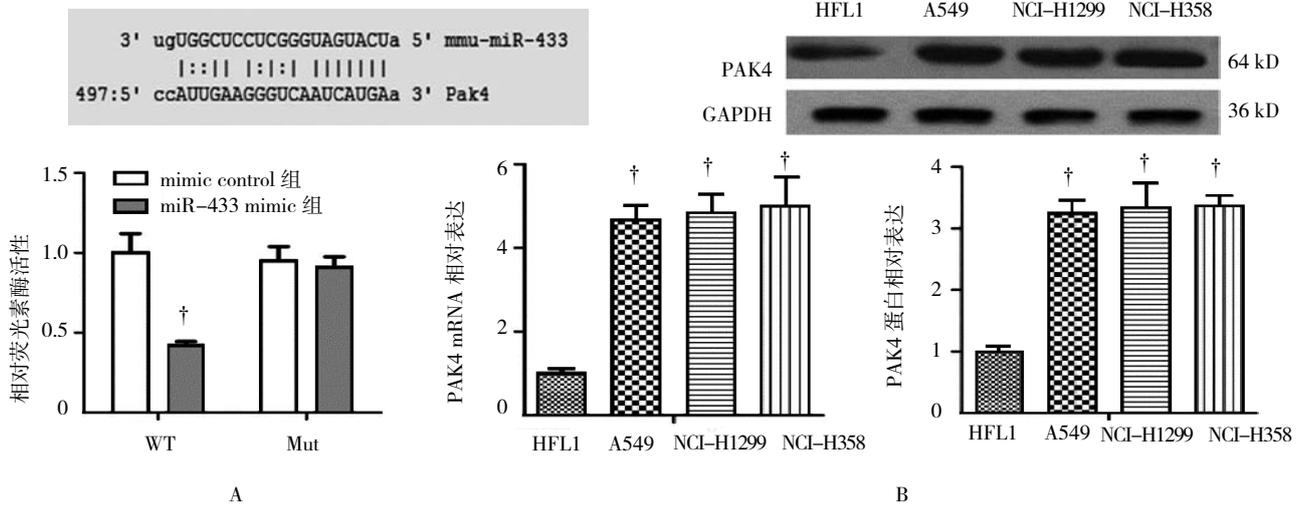


图 1 miR-433 mimic 转染对 A549 细胞迁移的影响

为 miR-433 的潜在靶基因。荧光素酶活性实验结果表明, 在转染野生型 PAK4 3'-UTR 的质粒时, 与 mimic control 组比较, miR-433 mimic 可抑制相对荧光素酶活性 [(1.00 ± 0.13) VS (0.42 ± 0.09) (P=0.015)], 而在转染突变型 PAK4 3'-UTR 的质粒时, miR-433 mimic 对相

对荧光素酶活性无影响 [(0.95 ± 0.09) VS (0.91 ± 0.07)] (见图 2A)。此外, real-time PCR 和 Western blotting 结果显示 PAK4 在 3 种人 NSCLC 细胞系中的表达上升, 差异有统计学意义 (P<0.05) (见图 2B 和表 2)。



A: 荧光素酶实验。†与 mimic control 组比较, P<0.05。B: 各种细胞中 PAK4 mRNA 和蛋白表达水平。†与 HFL1 比较, P<0.05

图 2 miRNA-433 靶基因检测结果

表 2 不同细胞中 PAK4 mRNA 和蛋白的相对表达 (x̄ ± s)

组别	PAK4 mRNA	PAK4 蛋白
HFL1	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.08
A549	4.67 ± 0.34†	3.25 ± 0.21†
NCI-H1299	4.86 ± 0.42†	3.35 ± 0.39†
NCI-H358	5.01 ± 0.68†	3.38 ± 0.15†

注: †与 HFL1 比较, P<0.05

2.5 过表达 miR-433 对 PAK4/LIMK1/Cofilin 信号通路的影响

由表 3 和图 3 可见, miR-433 mimic 转染后, 3 组间 PAK4、p-LIMK1 和 p-Cofilin 的相对表达水平经单

表 3 miR-433 mimic 转染对 PAK4/LIMK1/Cofilin 表达的影响 (x̄ ± s)

组别	PAK4	p-LIMK1	p-Cofilin
空白对照组	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.07
mimic control 组	1.13 ± 0.08	1.12 ± 0.06	1.08 ± 0.12
miR-433 mimic 组	0.46 ± 0.05	0.34 ± 0.08	0.16 ± 0.08
F 值	5.165	8.491	18.365
P 值	0.015	0.009	0.000

因素方差分析比较, 差异均有统计学意义 (P<0.05)。与 mimic control 组比较, miR-433 mimic 转染后细胞

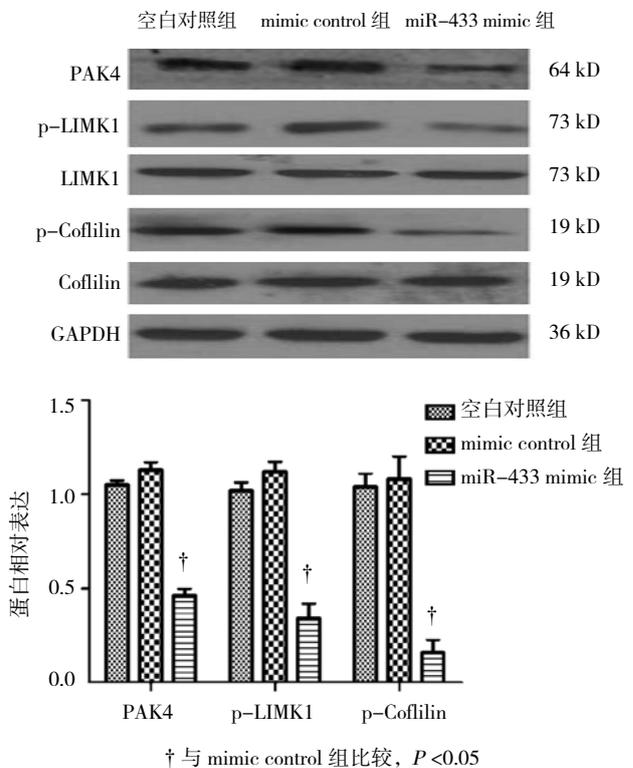


图 3 miR-433 mimic 转染对 PAK4/LIMK1/Cofilin 信号通路的影响

中 PAK4、p-LIMK1 以及 p-Cofilin 的相对表达均降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

研究报道, miR-433 编码的基因位于第 12 号染色体, 与多种肿瘤的发生、发展密切相关^[8]。如 miR-433 通过靶向调节 Notch1 的表达, 抑制卵巢癌细胞的侵袭和迁移^[9]; miR-433 通过抑制环磷腺苷效应元件结合蛋白 (CREB) 的表达, 抑制胶质瘤细胞的增殖、侵袭及迁移^[10]。本研究结果表明, miR-433 在 A549、NCI-H1299、NCI-H358 等 NSCLC 细胞中的表达下降, 且过表达 miR-433 可抑制 A549 细胞增殖及迁移。说明 miR-433 可能在肺腺癌的发生、发展中发挥一定的抑癌作用。

PAK4 属于丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶家族中的成员, 是 Rho-GTP 酶家族的下流效应器。PAK4 在各种细胞生命活动中具有重要的作用, 其表达异常即可导致肿瘤的发生、发展、侵袭、转移等^[11]。已有研究报道, PAK4 在多种肿瘤中异常表达, 如胃癌中的 p-PAK4 呈高表达, 与胃癌不良预后相关^[12]; 高表达的 PAK4 可通过激活 PI3K/Akt 通路促进乳腺癌的发展^[13]。此外, PAK4 在肺癌组织中呈异常高表达^[14], 本研究结果同样显示, PAK4 在 3 种 NSCLC 细胞中的表达上升, 且发现 PAK4 为 miR-433 的靶向调节基因, 过表达 miR-433 后 PAK4 的表达降低。

LIMK1 是 PAK4 下游的靶蛋白, 通过调节 Cofilin 的磷酸化水平调节激动蛋白细胞骨架的重组, 参与肿瘤血管形成、细胞侵袭和迁移^[15]。研究表明, LIMK1/Cofilin 信号通路在多种肿瘤的发生、发展过程中被激活, 如鼻咽癌^[16]。本结果同样表明, PAK4/LIMK1/Cofilin 信号通路在 A549 细胞中被激活, 而过表达 miR-433 可抑制 PAK4/LIMK1/Cofilin 信号通路。表明 miR-433 对肺腺癌的抑制作用可能是通过抑制 PAK4/LIMK1/Cofilin 信号通路实现。

综上所述, miR-433 可通过抑制 PAK4/LIMK1/Cofilin 信号通路, 抑制 A549 细胞的增殖及迁移, 为 NSCLC 的治疗提供新的靶点及理论基础。

参考文献:

[1] WEI C, WANG J, LIU S, et al. MicroRNA-361-3p suppresses

tumor cell proliferation and metastasis by directly targeting SH2B1 in NSCLC[J]. *J Exp & Clin Cancer Res*, 2016, 35(1): 76.

[2] 黄晓明, 孙建立, 洪碧玲. miRNA 对非小细胞肺癌影响的研究进展 [J]. *湖南中医杂志*, 2015, 31(3): 158-160.

[3] WANG P, DENG Y, FU X. MiR-509-5p suppresses the proliferation, migration, and invasion of non-small cell lung cancer by targeting YWHAG[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482(4):935-941.

[4] CHU K, GAO G, YANG X, et al. MiR-512-5p induces apoptosis and inhibits glycolysis by targeting p21 in non-small cell lung cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(2): 577-586.

[5] SHAN N, SHEN L, WANG J, et al. MiR-153 inhibits migration and invasion of human non-small-cell lung cancer by targeting ADAM19[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 456(1): 385-391.

[6] WANG XC, MA Y, MENG PS, et al. miR-433 inhibits oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell growth and metastasis by targeting HDAC6[J]. *Oral Oncol*, 2015, 51(7): 674-682.

[7] LI J, MAO X, WANG X, et al. miR-433 reduces cell viability and promotes cell apoptosis by regulating MACC1 in colorectal cancer[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(1): 81-88.

[8] 王香琛, 吕晓红, 马焱, 等. microRNA-433 与肿瘤 [J]. *解剖科学进展*, 2015(4): 423-425.

[9] LIANG T, GUO Q, LI L, et al. MicroRNA-433 inhibits migration and invasion of ovarian cancer cells via targeting Notch1[J]. *Neoplasma*, 2016, 63(5): 696-704.

[10] SUN S, WANG X, XU X, et al. MiR-433-3p suppresses cell growth and enhances chemosensitivity by targeting CREB in human glioma[J]. *Oncotarget*, 2016, 8(3):5057-5068.

[11] 杨建树. P-21 活化激酶 4 基因在结直肠癌中的表达及其临床意义 [D]. 济南: 济南大学, 2014.

[12] LI D, YE Z, ZHI L, et al. Activated Pak4 expression correlates with poor prognosis in human gastric cancer patients[J]. *Tumor Biol*, 2015, 36(12): 9431-9436.

[13] HE LF, XU HW, CHEN M, et al. Activated-PAK4 predicts worse prognosis in breast cancer and promotes tumorigenesis through activation of PI3K/AKT signaling[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(11):17573-17585.

[14] CAI S, YE Z, WANG X, et al. Overexpression of P21-activated kinase 4 is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer and promotes migration and invasion[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 34(1): 48.

[15] 李冬霞, 王永玲, 蔡松旺. PAK4-LIMK1-Cofilin 信号通路对非小细胞肺癌迁移及侵袭能力的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(12): 2130-2135.

[16] CHOW SE, WANG JS, LIN MR, et al. Downregulation of p57kip² promotes cell invasion via LIMK/cofilin pathway in human nasopharyngeal carcinoma cells[J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(11): 3459-3468.

(王荣兵 编辑)