

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.09.007
文章编号: 1005-8982 (2019) 09-0034-05

MicroRNA-577 在肺癌组织中的表达 及对 NCI-H520 细胞侵袭的影响

黎伟¹, 王宋平²

(1. 成都市温江区人民医院 呼吸科, 四川 成都 611130; 2. 西南医科大学附属医院
呼吸一科, 四川 泸州 646000)

摘要: **目的** 探讨 microRNA-577 (miR-577) 在人肺鳞状细胞癌组织内的表达及对 NCI-H520 细胞侵袭的影响。**方法** 选取 2013 年 1 月—2016 年 12 月成都市温江区人民医院收治并行手术切除的 60 例肺鳞状细胞癌患者的癌组织和对应癌旁组织。检测 miR-577 的相对表达量, 分析 miR-577 表达的临床病理意义。采用人工合成的 miR-577 模拟物转染 NCI-H520 细胞, 检测 NCI-H520 细胞过表达 miR-577 后迁移、侵袭能力及 miR-577 下游潜在靶点 β -catenin 的表达变化。**结果** 肺鳞状细胞癌组织中的 miR-577 表达水平较癌旁组织降低 ($P < 0.05$), 低表达 miR-577 与患者存在淋巴结转移相关 ($P < 0.05$); 过表达 miR-577 能够削弱 NCI-H520 细胞迁移、侵袭能力及细胞内 β -catenin 的表达水平 ($P < 0.05$)。**结论** 肺鳞状细胞癌组织中 miR-577 表达降低, miR-577 可能通过下调 β -catenin 的表达来削弱肺癌细胞的侵袭能力。

关键词: 肿瘤, 鳞状细胞; 肿瘤浸润; MicroRNAs; β -catenin;
中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A

Effect miR-577 on cellular invasion in lung squamous cell carcinoma

Wei Li¹, Song-ping Wang²

(1. Department of Respiratory Medicine, Wenjiang People's Hospital of Chengdu, Chengdu, Sichuan 611130, China; 2. Department of Respiratory Medicine, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To study the expression of MicroRNA-577 (miR-577) in human lung squamous cell carcinoma and its effect for NCI-H520 cell invasion. **Methods** Totally 60 patients with lung squamous cell carcinoma and paired non-tumor tissues, who were collected during January 2013 to December 2016 were involved in this study. Expression of miR-577 was determined by qRT-PCR. MiR-577 mimics were used to over-express miR-577 in NCI-H520 cells. Cell invasion was identified by Transwell assay. The expression of β -catenin in NCI-H520 cells were detected by qRT-PCR and Western blotting. **Results** MiR-577 expression was decreased in lung squamous cell carcinoma tissues compared with normal tissue ($P < 0.05$). Low expression of miR-577 was associated with lymphatic metastasis. Over-expression of miR-577 in NCI-H520 cells decreased cell capability of migration and invasion ($P < 0.05$). Overexpression of miR-577 induced decreased expression of β -catenin ($P < 0.05$). **Conclusions** Decreased expression of miR-577 in lung squamous cell carcinoma may lead to improved invasive capability through β -catenin related pathways.

Keywords: tumor, squamous cell; tumor invasion; MicroRNAs; β -catenin

肺鳞状细胞癌是常见的胸部恶性肿瘤之一,尤其在长期吸烟人群中更为高发^[1]。肺鳞状细胞癌症状隐匿,病程进展快,许多患者就诊时已无根治手术机会,故患者术后生存率较低^[2]。微小核糖核苷酸(MicroRNA, miRNA)是一种长度较短的单链RNA,它能够通过结合miRNA的3'-端非编码区来抑制靶基因的表达^[3]。例如,miR-21在肺癌中呈高表达且这部分患者预后较差^[4];PDCD4被证实是miR-21^[5];Hedgehog通路的活性则可以被miR-218负性调节,进而逆转肺癌细胞多重耐药表型^[6]。目前研究表明,miR-577能够调控多种肿瘤进展^[7]。为研究miR-577在肺癌中的生物学功能,本研究利用慢病毒为载体制备miR-577过表达细胞模型。本研究旨在探索miR-577对肺癌侵袭的影响,以期miR-577成为肺癌分子治疗靶标提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2013年1月—2016年12月成都市温江区人民医院收治的肺鳞状细胞癌患者60例。其中,男性40例,女性20例,取其癌组织和对应癌旁组织。

1.2 细胞来源及主要试剂

NCI-H520细胞(ATCC[®] HTB-182[™])由本院实验室保存;miR-577慢病毒颗粒(病毒载体类型:psi-LVRH1GP)购自广州复能基因公司,miR-577及U6引物购自广州锐博生物科技有限公司,Trizol试剂(15596026)、RT-PCR试剂盒(Super Script[®] One-Step RT-PCR System with Platinum[®] Taq DNA Polymerase, 10928042)及qRT-PCR试剂盒(DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit, F415L)均购自美国Invitrogen公司,CCK-8试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒(E606336)购自上海生工生物工程有限公司,兔抗人 β -catenin多克隆抗体(ab16051)、MMP-7抗体(ab5706)及鼠抗人 β -actin单克隆抗体(ab8226)均购自美国Abcam公司。

1.3 qRT-PCR

标本及细胞RNA由Trizol试剂提取。qRT-PCR条件设定为:逆转录50℃预变性30 min,94℃变性2 min,循环1次;94℃预变性15 s,60℃退火30 s,68℃延伸3 min,循环40次;72℃再延伸10 min,循环1次。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法检测miR-577及 β -catenin mRNA的相对含量。 β -catenin及内参GAPDH引物由上海生工

生物工程有限公司合成。 β -catenin引物序列:正向引物5'-CATCCGGAAGAACTGGT-3';反向引物5'-TC CCACAAAGCCAACTC-3'。GAPDH引物序列:正向引物5'-TACTAGCGTTTTACGGGCG-3';反向引物5'-TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA-3'。

1.4 细胞培养及慢病毒感染

NCI-H520细胞于适宜条件下培养至稳定传代。将NCI-H520细胞按适宜密度接种6孔板。实验分组:miR-577组:每孔加入1 ml miR-577慢病毒上清液、2 ml完全培养基及15 μ g polybrene;miR-NC组:每孔加入1 ml miR-control慢病毒上清液、2 ml完全培养基及15 μ g polybrene。转染48 h后,使用含2 μ g/ml Puromycin筛选稳转细胞。

1.5 划痕愈合试验

NCI-H520铺满6孔板。100 μ l的枪头制作划痕,以无血清DMEM培养基培养细胞48 h。倒置白光显微镜下观察细胞迁移,以Image J软件定量统计迁移距离。以细胞迁移48 h后剩余空白距离与原始测量之比,即剩余距离百分比表示细胞迁移能力。

1.6 Transwell 侵袭小室

以无血清培养基接种NCI-H520细胞 2×10^4 个/孔,小室内加入750 μ l有血清正常培养基。培养24 h后移除培养基,甲醛固定细胞,结晶紫染色。倒置白光显微镜下观察细胞侵袭,计数侵袭细胞数目。

1.7 Western blotting

RIPA试剂提取细胞总蛋白,凝胶垂直电泳分离蛋白,70 V恒压转膜150 min,5%牛血清白蛋白封闭1 h后将条带孵育于1:1 000稀释的相应一抗中。4℃过夜后,使用1:5 000稀释的辣根过氧化物酶标记二抗孵育条带1 h。ECL法曝光条带。

1.8 免疫组织化学染色

组织切片常规预处理后滴加1:100稀释的一抗,4℃孵育过夜。清洗残余一抗后,使用HRP标记的二抗结合对应的一抗,DAB法显色。按如下方法计算IHC评分:<5%,0分;5%~15%,1分;16%~50%,2分;51%~75%,3分;>75%,4分。

1.9 统计学方法

数据分析采用SPSS 13.0统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用 t 检验,计数资料以例(%)表示,比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为

差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-577 在肺鳞状细胞癌组织中的表达

肺鳞状细胞癌组织中 miR-577 的表达水平与癌旁组织比较, 差异有统计学意义 ($t = 2.319, P = 0.027$), 癌组织中 miR-577 的表达水平 (0.421 ± 0.073) 低于癌旁组织中 miR-577 的表达水平 (1.1398 ± 0.086)。

2.2 miR-577 表达与肺鳞状细胞癌临床病理特征的关系

以肺癌组织中 miR-577 在肺癌组织中平均表达水平为界值, 分为 miR-577 高表达及低表达。结果表明, 淋巴结转移较多出现在 miR-577 低表达的肺癌组织中, 提示 miR-577 可能与肿瘤侵袭转移相关。见表 1。

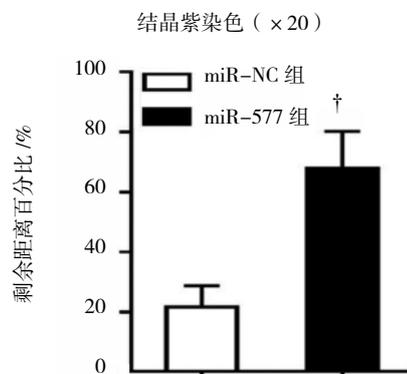
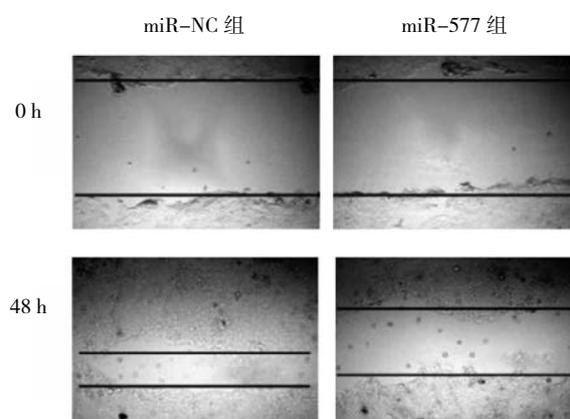
2.3 miR-577 抑制 NCI-H520 细胞迁移及侵袭

如图 1 所见, miR-577 组细胞内 miR-577 表达水平与 miR-NC 组比较, 差异有统计学意义 ($t = 11.285, P = 0.008$), miR-577 组细胞 miR-577 表达升高。细胞划痕愈合试验检测得知, 过表达 miR-577 在体外降低 NCI-H520 细胞的迁移能力, 差异有统计学意义 ($t = 7.423, P = 0.019$)。迁移与侵袭是肿瘤转移的 2 个

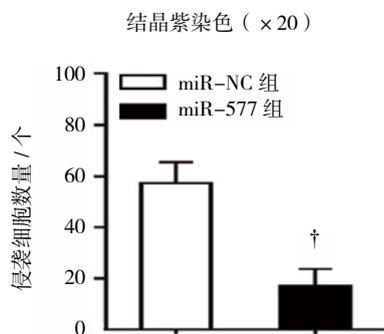
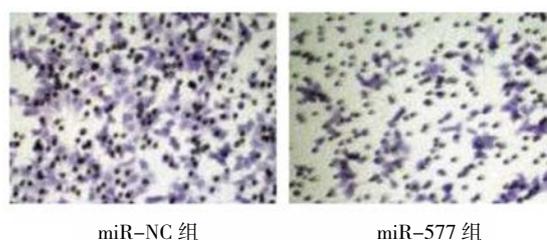
表 1 肺鳞状细胞癌临床病理特征与 miR-577 表达的关系 ($n = 60$, 例)

临床病理特征	miR-577 高表达 ($n = 19$)	miR-577 低表达 ($n = 41$)	χ^2 值	P 值
年龄				
>50 岁	8	24	1.408	0.235
≤ 50 岁	11	17		
性别				
男	10	30	2.465	0.116
女	9	11		
吸烟与否				
是	7	21	1.078	0.299
否	12	20		
肿瘤直径				
<5 cm	13	19	3.376	0.066
≥ 5 cm	5	22		
淋巴结转移				
无	12	15	4.560	0.033
有	6	26		

微观过程, 因此本研究还通过 transwell 小室检测细胞侵袭的变化。过表达 miR-577 表达后, miR-577 组肺



过表达 miR-577 对 NCI-H520 细胞迁移的影响。† 与 miR-NC 组比较, $P < 0.05$



过表达 miR-577 对 NCI-H520 侵袭的影响。† 与 miR-NC 组比较, $P < 0.05$

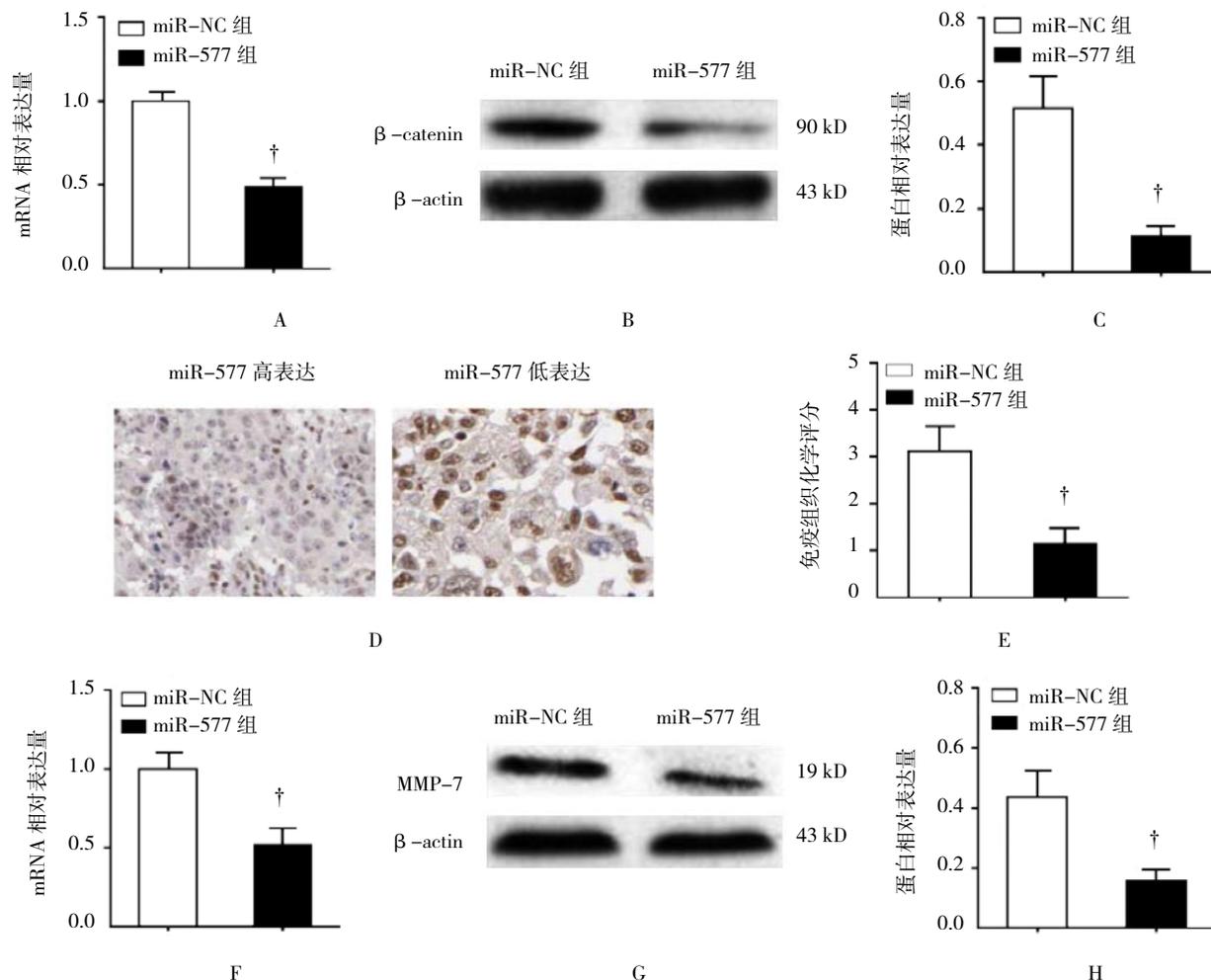
图 1 过表达 miR-577 表达对肺鳞状细胞癌 NCI-H520 细胞迁移、侵袭的影响

鳞状细胞癌 NCI-H520 细胞侵袭数量较 miR-NC 组降低, 差异有统计学意义 ($t=6.742, P=0.023$)。

2.4 过表达 miR-577 对下游靶点 β -catenin 的调控作用

与 miR-NC 组比较, miR-577 组的 NCI-H520 细胞内 β -catenin mRNA ($t=8.531, P=0.017$) 及蛋白 ($t=9.781, P=0.015$) 水平均下降。在 miR-577 表达量

相对较高的肺癌组织中, β -catenin 的免疫组织化学 SP 染色强度降低, 差异有统计学意义 ($t=2.211, P=0.032$)。此外, 有结果显示, 基质金属蛋白酶 7 (matrix metalloproteinase 7, MMP-7) 是 β -catenin 调节肿瘤侵袭能力的效应基因之一。过表达 miR-577 后细胞内 MMP-7 的 mRNA ($t=4.808, P=0.036$) 及蛋白 ($t=5.117, P=0.029$) 的表达水平下降。见图 2。



A~C: 过表达 miR-577 对 β -catenin mRNA 及蛋白表达水平的影响; D、E: miR-577 高表达的肿瘤组织内 β -catenin 表达水平降低 (SP 染色 $\times 400$); F~H: 过表达 miR-577 对 MMP-7 mRNA 及蛋白表达水平的影响。 \dagger 与 miR-NC 组比较, $P < 0.05$

图 2 过表达 miR-577 对 NCI-H520 细胞内 β -catenin 及 MMP-7 表达的影响

3 讨论

miR-577 作为一种新发现 microRNA, 其在不同类型的恶性肿瘤中的表达情况并不完全清楚^[8]。本研究中, 通过 qRT-PCR 检测得知, 肺鳞状细胞癌组织中 miR-577 的表达水平呈降低趋势。这表明在 miR-577 在肺鳞状细胞癌中可能是一种抑癌因子。为验证这一假设, 本研究设计了一系列体外细胞学实验。通过实

验结果证实, miR-577 具有削弱肿瘤细胞迁移及侵袭的效果。另外, 最新文献也指出, miR-577 也能够抑制肿瘤细胞的增殖并促进细胞凋亡^[9]。说明 miR-577 的抗肿瘤效应具有生物多样性, 值得在今后的工作中进一步深入研究。

miRNA 能够通过结合靶基因 3'-UTR 区而发挥负向调控作用^[10]。通过生物信息学检索分析发现, β -catenin 的 mRNA 存在 miR-577 的结合位点。既往

研究^[11]表明, β -catenin 在肺鳞状细胞癌内高表达且具有促癌作用, 其可能是 miR-577 的潜在靶点之一。通过 qRT-PCR 及 Western blotting 实验发现, 过表达 miR-577 在体外的确能下调 β -catenin 的表达水平, 进一步通过免疫组织化学染色发现高表达 miR-577 的肿瘤组织中 β -catenin 的表达也有所降低。基质金属蛋白酶对肿瘤侵袭转移均具有促进作用^[12-13]。而肺癌侵袭转移表型的改变中是否涉及 MMP-7 表达的变化尚不清楚。 β -catenin 是一种重要的癌性转录因子^[14-15], 研究指出, MMP-7 的转录可能受到 β -catenin 的调节^[16]。本研究中, 在过表达 miR-577 后发现, 在下调 β -catenin 表达水平的同时 MMP-7 的表达水平也出现下降, 提示 miR-577 的抑制肿瘤迁移及侵袭作用可能是通过抑制 β -catenin/MMP-7 信号通路活化实现。

关于 microRNA 在肿瘤中一表达机制, 目前认为主要与两方面因素有关: ①长链非编码 RNA 作为分子海绵结合 miRNA, 导致 miRNA 的表达下降, 并失去生物活性。例如, 具有抑癌作用的 miR-504 在肝癌中表达下调, 其原因正是由于长链非编码 RNA KCNQ10T1 在 HCC 中的高表达导致大量 miR-504 下调。②第 2 种潜在的机制是 miRNA 表达的表观遗传学调控。如 miR-483-3p 因启动子区域的甲基化而沉默, miR-483-3p 下调后导致非小细胞肺癌对吉非替尼的化疗抵抗。对 miR-577 在肺癌中异常表达的具体机制尚需要进一步研究。

综上所述, miR-577 在肺鳞状细胞癌中低表达, 上调 miR-577 可能通过抑制 β -catenin/MMP-7 信号通路的活化来实现的。

参 考 文 献:

- [1] 冯稳, 张冰, 于庆凯. 核因子 E2 相关因子 2 在肺腺癌中的表达及临床意义[J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(4): 29-32.
- [2] 袁世璋, 杜小军. 肺癌根治性袖状切除术和全肺切除术治疗非小细胞肺癌的比较研究[J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(36): 94-96.
- [3] TU K, ZHENG X, DOU C, et al. MicroRNA-130b promotes cell aggressiveness by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human hepatocellular carcinoma[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(11): 20486-20499.
- [4] TU H, SUN H, LIN Y, et al. Oxidative stress upregulates PDCD4 expression in patients with gastric cancer via miR-21[J]. Curr Pharm Des, 2014, 20(11): 1917-1923.
- [5] ETO K, IWATSUKI M, WATANABE M, et al. The microRNA-21/PTEN pathway regulates the sensitivity of HER2-positive gastric cancer cells to trastuzumab[J]. Ann Surg Oncol, 2014, 21(1): 343-350.
- [6] ZHANG X L, SHI H J, WANG J P, et al. MiR-218 inhibits multidrug resistance (MDR) of gastric cancer cells by targeting Hedgehog/smoothed[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(6): 6397-6406.
- [7] JI H, CHEN M, GREENING D W, et al. Deep sequencing of RNA from three different extracellular vesicle (EV) subtypes released from the human LIM1863 colon cancer cell line uncovers distinct miRNA-enrichment signatures[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e110314.
- [8] XUE K C, HU D D, ZHAO L, et al. MiR-577 inhibits papillary thyroid carcinoma cell proliferation, migration and invasion by targeting SphK2[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(17): 3794-3800.
- [9] WANG L Y, LI B, JIANG H H, et al. Inhibition effect of miR-577 on hepatocellular carcinoma cell growth via targeting β -catenin[J]. Asian Pac J Trop Med, 2015, 8(11): 923-929.
- [10] ZHANG W, SHEN C, LI C, et al. MiR-577 inhibits glioblastoma tumor growth via the Wnt signaling pathway[J]. Mol Carcinog, 2016, 55(5): 575-585.
- [11] SHANG S, HUA F, HU Z W. The regulation of β -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities[J]. Oncotarget, 2017, 8(20): 33972-33989.
- [12] CHEN W, ZHU H, YIN L, et al. lncRNA-PVT1 facilitates invasion through upregulation of MMP-9 in nonsmall cell lung cancer cell[J]. DNA Cell Biol, 2017, 36(9): 787-793.
- [13] MU N, GU J, LIU N, et al. PRL-3 is a potential glioblastoma prognostic marker and promotes glioblastoma progression by enhancing MMP-7 through the ERK and JNK pathways[J]. Theranostics, 2018, 8(6): 1527-1539.
- [14] WANG T, LIU X, TIAN Q, et al. Reduced SPOCK1 expression inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation and migration through Wnt/ β -catenin signaling[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(3): 637-644.
- [15] TONG J B, ZHANG X X, WANG X H, et al. Qiyusanlong decoction suppresses lung cancer in mice via Wnt/ β -catenin pathway[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(4): 5320-5327.
- [16] SHIN S, IM H J, KWON Y J, et al. Human steroid sulfatase induces Wnt/ β -catenin signaling and epithelial-mesenchymal transition by upregulating Twist1 and HIF-1 α in human prostate and cervical cancer cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(37): 61604-61617.

(张西倩 编辑)