

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.04.012  
文章编号: 1005-8982 (2018) 04-0057-05

## MicroRNA-204 在非小细胞肺癌患者组织中的表达及对癌细胞增殖和凋亡的影响

许有忠, 田作春, 李才

(海南省第三人民医院 心胸外科, 海南 三亚 572000)

**摘要: 目的** 观察 microRNA-204 (miR-204) 在非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者体内的表达水平及对癌细胞增殖的影响, 探讨 miR-204 在非小细胞肺癌中的临床意义及可能分子机制。**方法** 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 miR-204 在肺癌及癌旁组织中的表达情况; 用化学合成的 miR-204 模拟物和抑制物转染人非小细胞肺癌 A-549 肺癌细胞, CCK-8 法检测细胞增殖的情况, 流式检测细胞凋亡情况, qRT-PCR、Western blot 法分别检测 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达。**结果** miR-204 在肺癌组织中表达水平与对应癌旁组织比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 肺癌组织低于癌旁组织; 肺癌组织中 miR-204 低表达与分期、肿瘤大小、肿瘤淋巴结转移相关 ( $P < 0.05$ ); miR-204 可抑制 A-549 细胞的增殖, 促进细胞凋亡, 并下调 Bcl-2 的 mRNA 与蛋白表达水平。**结论** miR-204 在非小细胞肺癌组织中表达下调并与肺癌恶性临床病理特征有关, miR-204 可能通过调节 Bcl-2 的表达从而影响非小细胞肺癌细胞的增殖及凋亡。

**关键词:** 非小细胞肺癌; MicroRNA-204; 细胞增殖; 细胞凋亡; Bcl-2

**中图分类号:** R734.2

**文献标识码:** A

## miRNA-204 expression in non-small cell lung cancer tissue and its effect on cancer cell proliferation and apoptosis

You-zhong Xu, Zuo-chun Tian, Cai Li

(Department of Cardiothoracic Surgery, the Third People's Hospital of Hainan Province, Sanya, Hainan 572000, China)

**Abstract: Objective** To observe the expression of miRNA-204 in the lung tissue of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients and its effect on lung cancer cell proliferation and apoptosis. **Methods** qRT-PCR was used to detect the expression of miRNA-204 in the lung cancer and peri-cancerous tissues. After A-549 cells were interfered with miRNA-204 mimics, the cell proliferation was observed using CCK-8, cell apoptosis was observed by flow cytometry, and the mRNA and protein levels of Bcl-2 were detected by qRT-PCR and Western blot respectively. **Results** The expression of miRNA-204 in the NSCLC tissues was significantly lower than that in the peri-cancerous tissues ( $P < 0.05$ ). And the low-expression of miRNA-204 in the NSCLC tissues was associated with tumor size and lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ). After interference of miRNA-204 mimics in the A-549 cells, the cell proliferation was reduced and the cell apoptosis was increased, and the mRNA and protein levels of Bcl-2 were decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The expression of miRNA-204 in the NSCLC tissues is decreased and related to the malignant clinicopathological features of lung cancer. miRNA-204 may affect the proliferation and apoptosis of non-small cell lung cancer cells by regulating Bcl-2 expression.

**Keywords:** non-small cell lung cancer; miRNA-204; cell proliferation; cell apoptosis; Bcl-2

收稿日期: 2017-02-25

非小细胞肺癌 (non-small-cell lung cancer, NSCLC) 是癌症死亡的主要原因之一<sup>[1]</sup>。由于早期诊断率低, 只有大约 20% 的病例能够在早期进行有效的手术切除<sup>[2]</sup>。此外, 非小细胞肺癌复发率高, 约 50% 的患者手术后会发生远处复发。因此, 寻找特异性和敏感性均较高的肿瘤标志物, 并与多种筛查方法相结合有望提高对非小细胞肺癌的早期诊断。微小 RNA (microRNA) 在肿瘤组织中性质稳定、功能广泛<sup>[3]</sup>。研究发现, microRNA-204 (miR-204) 在子宫内膜样腺癌<sup>[4]</sup>、鼻咽癌<sup>[5]</sup>等肿瘤组织中表达降低, 并与临床病理特征及预后相关; 且上调肿瘤细胞中 miR-204, 可以抑制细胞增殖及促进肿瘤细胞凋亡、抑制迁移、增加对化疗药物的敏感性。在胆管癌的研究中发现, 将 miR-204 模拟物导入胆管癌细胞系后能够负向调控 Bcl-2 的表达, 且能够促进化疗药物氟尿嘧啶激发的细胞凋亡<sup>[6]</sup>。但 miR-204 在非小细胞肺癌中的作用尚不十分明确。本研究通过对 NSCLC 患者病变组织中 miR-204 的表达进行检测, 以便了解 miR-204 在非小细胞肺癌中的临床意义, 并对 miR-204 影响癌细胞增殖和凋亡的机制进行初步探究。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

选择海南省第三人民医院收治的 NSCLC 患者 60 例, 其中, 男性 34 例, 女性 26 例; 年龄 42 ~ 77 岁, 平均 (56.4 ± 7.9) 岁。分别取其肺癌组织及对应的癌旁组织, 手术切除标本立即放入液氮中保存, 随后转入 -80℃ 冰箱保存备用。同时收集患者临床病理特征资料。所有病例术前均尚未接受化疗或放疗。所有样本均经研究对象同意, 并签署知情同意书。

### 1.2 主要试剂

人非小细胞肺癌 A-549 细胞株购自上海中国科学院细胞库, F12K 培养基、胎牛血清、双抗购自美国 Gibco 公司, CCK-8 细胞增殖检测试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物技术公司, RNA 提取试剂盒购自美国 Omega 公司, 逆转录试剂盒、DNA Marker、SYBR 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 试剂盒等均购自大连宝生物工程有限公司。miR-204 模拟物、miR-204 抑制物及 miR-204 和内参 U6 的引物由上海英骏生物技术有限公司设计合成, 兔抗人 Bcl-2 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司, HRP 标记的

羊抗兔二抗、兔抗人 b-actin 购自北京博奥森生物技术有限公司, 脂质体 2000 购自美国 Invitrogen 公司, BCA 试剂盒购自广州碧云天有限公司。

### 1.3 细胞转染及细胞增殖实验

非小细胞肺癌 A-549 细胞株培养在 37℃、5% 二氧化碳 CO<sub>2</sub> 饱和湿度细胞培养箱中, 细胞培养液为 F12K 培养基 (含有 10% 胎牛血清、100 u/ml 青霉素和 100 u/ml 链霉素)。转染分为 4 组: 对照组、阴性对照组、miR-204 模拟物组、miR-204 抑制物组。按说明书将各组转染物与脂质体 2000 混合静止后转染 A-549 细胞。另取各组转染 48 h 后的细胞以 100 μl/孔 (约含 1 × 10<sup>4</sup> 个细胞) 接种于 96 孔板中, 每组设 6 个平行孔, 细胞培养箱培养 24、48 和 72 h 后, 各孔加入 10 μl CCK-8 溶液, 继续孵育 4 h, 酶标仪 (CliniBiog 酶标仪) 在 450 nm 波长测定各孔吸光度 (OD 值), 以 OD 值代表细胞相对增殖水平。实验重复 3 次。

### 1.4 细胞凋亡情况检测

4 组细胞转染后培养 48 h, 分别取 1 × 10<sup>5</sup> 个细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 500 μl 结合液重悬细胞。随后加入 5 μl Annexin V-FITC 混匀后, 加入 5 μl Propidium Iodide, 混匀, 室温避光孵育 15 min。采用流式细胞仪 (BD FACSCzlibur) 检测细胞凋亡情况, 计算凋亡率。实验重复 3 次。

### 1.5 肺癌组织和细胞中总 RNA 提取及 qRT-PCR 检测

冻存肺癌组织及其对应癌旁组织各取约 100 mg × 6 份、4 组转染后的 A-549 细胞各收集约 1 × 10<sup>7</sup> 个细胞, 分别加入 1 ml Trizol, 用总 RNA 试剂盒提取总 RNA, 经紫外分光光度计对提取的总 RNA 检测纯度及定量。将总 RNA 按照逆转录试剂盒说明书逆转录成 cDNA; 取 cDNA 采用 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪进行 qRT-PCR 检测。qRT-PCR 反应条件: 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 1 min, 共 40 个循环。引物序列见表 1。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法表示相对表达量。

### 1.6 Western blot 检测

各组转染细胞培养 48 h, 胰酶消化收集各组的细胞, 蛋白裂解液处理并制备蛋白样品。BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 根据蛋白定量结果调整每孔上样量, 将蛋白样品在 10% SDS-PAGE 胶中进行电泳 (Bio-Rad SDS-PAGE 电泳仪), 电泳结束后用湿转法将蛋白转到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温震荡封闭 2 h, TBS-T 洗膜后分别加入 Bcl-2 (1 : 1 000 稀释)、β-actin (1 :

表1 qRT-PCR的引物序列

基因	引物序列	引物长度 / 产物长度 / bp	bp
<b>miR-204</b>			
正向	AACCUGAUCCCGUCUGAGAUUG	21	78
反向	CCGGAUCAAGAUAGUUCGGUU	21	
<b>Bcl-2</b>			
正向	TTCTTTGAGTTCGCTGGGGTC	21	304
反向	TGCATATTTGTTGGGGCAGG	21	
<b>U6</b>			
正向	CTCGCTTCGGCAGCACA	17	94
反向	AACGCTTCACGAATTT	16	

300 稀释)一抗,4℃冰箱孵育过夜。TBS-T洗膜后,加入二抗(1:5 000 稀释)室温孵育1 h,加发光液进行化学发光显影,凝胶成像仪(JS-300 凝胶图像分析仪)拍照。

### 1.7 统计学方法

采用SPSS 20.0 软件进行数据分析。计量资料均符合正态分布,以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间的比较采用单因素方差分析,两两组间比较为HSD-*q* 检验,多时点的比较采用重复测量设计的方差分析,不同组织的 mRNA 表达水平的比较为配对 *t* 检验,miR-204 相对表达与肺癌患者临床病理参数的关系采用  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同组织中 miR-204 的 mRNA 表达水平及其与各临床特征参数的关系

与对应癌旁组织比较,肺癌组织中 miR-204 的 mRNA 表达水平降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ) (见表2)。人为界定肺癌组织中 miR-204 的 mRNA 相对表达量  $< 2.41$  为低表达,  $\geq 2.41$  为高表达。再按基线指标或临床病理特征的不同水平进行比较,结果显

示,肺癌组织中 miR-204 低表达与分期、淋巴结转移及肿瘤大小相关( $P < 0.05$ ) (见表3)。

### 2.2 miR-204 对 A-549 细胞增殖和凋亡的影响

miR-204 对人 A-549 细胞增殖和凋亡影响资料的比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点间的细胞增殖相对量差异有统计学意义( $F = 416.149, P = 0.000$ )。②4组细胞增殖相对量的整体比较差异有统计学意义( $F = 136.071, P = 0.000$ )。③4组的细胞增殖相对量的变化趋势差异有统计学意义( $F = 35.666, P = 0.000$ )。见表4。

表2 肺癌组织及其对应癌旁组织中 miR-204 的 mRNA 表达水平 ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

组别	mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
肺癌组织	2.41 ± 0.91	9.361	0.000
癌旁组织	5.62 ± 1.08		

表3 miR-204 相对表达与肺癌患者临床病理参数的关系

基线或病理参数	mRNA		$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
	低表达 ( $n = 35$ )	高表达 ( $n = 25$ )		
<b>年龄</b>				
<55 岁	15	12	0.156	0.693
$\geq 55$ 岁	20	13		
<b>性别</b>				
男	17	16	1.403	0.236
女	18	9		
<b>分期</b>				
I、II	11	15	4.848	0.028
III、IV	24	10		
<b>淋巴结转移</b>				
无	13	17	5.554	0.018
有	22	8		
<b>肿瘤大小</b>				
<3 cm	11	16	6.251	0.012
$\geq 3$ cm	24	9		

表4 miR-204 对人 A-549 细胞增殖和凋亡的影响比较 ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

组别	相对量	细胞增殖			凋亡率 /%
		24 h	48 h	72 h	
对照组	2.31 ± 0.03	0.92 ± 0.02	1.05 ± 0.11	1.32 ± 0.12t	14.71 ± 1.10
阴性对照组	2.20 ± 0.05	0.82 ± 0.03	0.94 ± 0.05	1.25 ± 0.05	17.28 ± 0.90
抑制物组	1.01 ± 0.03	0.87 ± 0.03	1.38 ± 0.11	1.52 ± 0.04	12.08 ± 0.70
模拟物组	4.03 ± 0.08	0.62 ± 0.02	0.69 ± 0.02	0.80 ± 0.02	21.90 ± 1.20

经 qRT-PCR 检测 A-549 细胞转染 miR-204 效果。与阴性对照组相比, miR-204 模拟物组的 A-549 细胞增殖水平降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而 miR-204 抑制物组细胞增殖水平则略有增高。miR-204 模拟物组细胞凋亡率较阴性对照组升高, 而 miR-204 抑制物组细胞凋亡率降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。此结果提示 miR-204 表达水平可能与 A-549 细胞增殖及凋亡密切相关。miR-204 对 A-549 细胞增殖和凋亡影响见图 1、2。

### 2.3 miR-204 对 A-549 细胞 Bcl-2 表达的影响

为了进一步探讨 miR-204 影响 A-549 细胞增殖及凋亡的机制, 本研究检测了转染 miR-204 模拟物后 A-549 细胞中 Bcl-2 的表达水平。结果发现, 与阴性对照组相比, 转染 miR-204 模拟物的 A-549 细胞中 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白水平均降低, 而转染 miR-204

抑制物的细胞中 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白水平则增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示了 miR-204 可能是通过调节 Bcl-2 的表达水平来影响癌细胞的增殖及凋亡。见表 5、图 3。

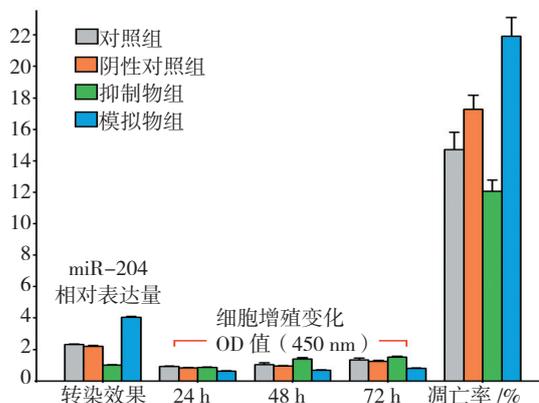


图 1 miR-204 对 A-549 细胞增殖和凋亡的影响

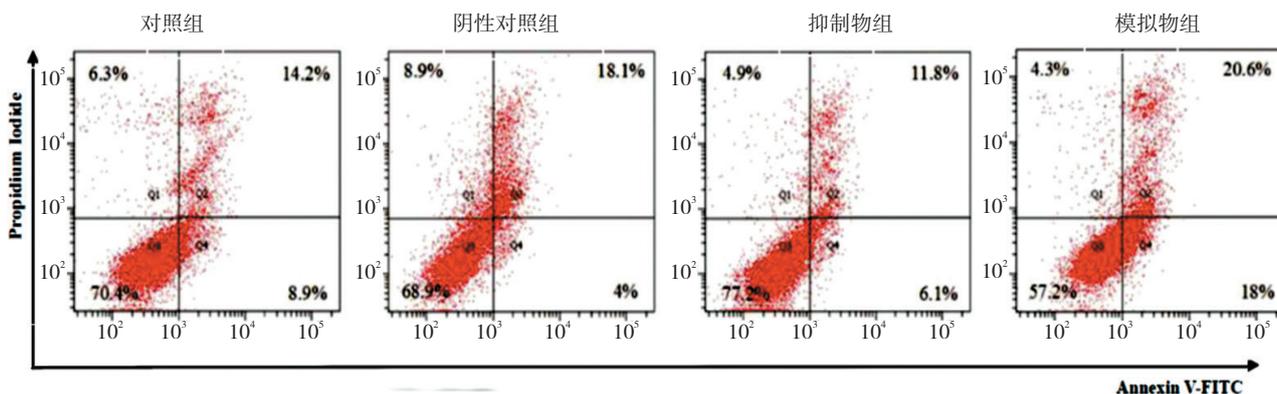


图 2 miR-204 对 A-549 细胞凋亡的影响

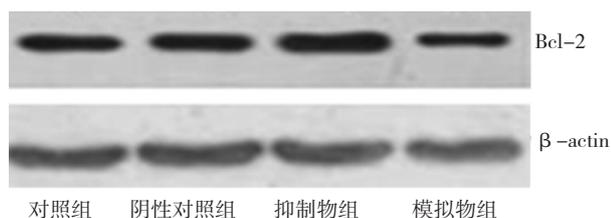


图 3 各组转染细胞中 Bcl-2 蛋白表达水平

表 5 miR-204 对 A-549 细胞 Bcl-2 表达水平的影响 ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	Bcl-2 水平	F 值	P 值
对照组	0.98 ± 0.07	255.042	0.000
阴性对照组	0.92 ± 0.04		
抑制物组	1.40 ± 0.08		
模拟物组	0.48 ± 0.02		

### 3 讨论

尽管非小细胞肺癌的发病机制在蛋白及基因水平得到深入认识, 手术、放化疗等为主的综合治疗有了长足的发展, 但非小细胞肺癌的早期诊断和预后并没有明显进展。miRNAs 是一类高度保守的非编码单链小分子 RNA, 在细胞生物学中发挥重要作用。最近, 研究证明 NSCLC 中 miRNAs 的表达与其预后有关<sup>[7-8]</sup>, 研究发现在有淋巴结转移的 NSCLC 患者中, 肿瘤细胞高表达 miRNA-21 提示预后较好。在非小细胞肺癌组织中有多种 miRNAs 表达上调或下调, 可作为非小细胞肺癌的癌基因或抑癌基因, 在非小细胞肺癌分化、浸润及转移过程中发挥重要的作用<sup>[9]</sup>。

近年来, 研究表明 miR-204 可能成为一种新的致癌基因或抑癌基因<sup>[10-11]</sup>。在前列腺癌中, miR-204 发挥癌基因的作用, miR-204 的高表达能导致前列腺行

生上皮因子 (prostate-derived epithelial factor, PDEF) 的丢失从而促使前列腺癌发生<sup>[12]</sup>。而在头颈部鳞状上皮细胞癌细胞株中过表达的 miR-204, 通过抑制肿瘤相关靶基因的表达, 并在体外抑制肿瘤的黏附、迁移和侵袭, 减少了实验性肺转移的程度, 发挥抑癌基因的作用<sup>[13]</sup>。本研究发现, 非小细胞肺癌组织中 miR-204 相对表达量低于癌旁组织, 并且在细胞增殖实验中, 转染 miR-204 模拟物的 A-549 细胞增殖水平受到抑制, 而转染 miR-204 抑制物细胞增殖水平则略有增高。实验结果提示 miR-204 可能作为一种抑癌基因通过抑制癌细胞的增殖来参与非小细胞肺癌的发生、发展。

Bcl-2 是细胞凋亡调控因子, 作为一种原癌基因能广泛抑制细胞凋亡, 从而有利于肿瘤细胞的生长<sup>[14-16]</sup>。CHEN 等<sup>[6]</sup>将 miR-204 模拟物导入胆管癌细胞系中, 发现外源性 miR-204 具有负向调控 Bcl-2 的作用, 且有利于化疗药物氟尿嘧啶激发的细胞凋亡。在本研究细胞增殖实验中, 转染 miR-204 模拟物的细胞增殖水平受到抑制, 而转染 miR-204 抑制物细胞增殖水平则略有增高。流式检测转染后细胞凋亡情况, 发现模拟物组细胞凋亡率较阴性对照组升高, 而抑制物组细胞凋亡率降低。为进一步探讨 miR-204 影响肺癌细胞增殖及凋亡的可能机制, 本研究检测了转染 miR-204 肺癌细胞中 Bcl-2 的表达情况, 结果表明, 高表达 miR-204 后, 肺癌细胞中 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达水平均降低, 抑制 miR-204 后细胞中 Bcl-2 的表达水平则升高, 提示 miR-204 影响肺癌细胞增殖及凋亡的作用可能通过调控 Bcl-2 的表达而发挥效应。

综上所述, miR-204 在非小细胞肺癌的发生与发展过程中可能发挥类似抑癌基因的作用, 这种作用可能是通过调节靶基因 Bcl-2 影响细胞增殖及凋亡而实现的。

#### 参 考 文 献:

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5-29.
- [2] 丁斐嘉, 邵群慧, 张鸣号, 等. 检测 GK19 基因对诊断非小细胞肺癌外周血微转移的意义[J]. 宁夏医科大学学报, 2014, 36(9): 962-965.
- [3] PILECZKI V, COJOCNEANU-PETRIC R, MARALANI M, et al. MicroRNAs as regulators of apoptosis mechanisms in cancer[J]. Clujul Med, 2016, 89: 50-55.
- [4] 刘婕, 万晓春, 吕卫东, 等. miRNA 在防治非小细胞肺癌中的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(10): 1966-1970.
- [5] MA L, DENG X, WU M, et al. Down-regulation of miRNA-204 by LMP-1 enhances CDC42 activity and facilitates invasion of EBV-associated nasopharyngeal carcinoma cells[J]. FEBS Lett, 2014, 588(9): 1562-1570.
- [6] CHEN L, YAN H X, YANG W, et al. The role of microRNA expression pattern in human intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. J Hepatol, 2009, 50(2): 358-369.
- [7] YU S L, CHEN H Y, CHANG G C, et al. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer[J]. Cancer Cell, 2008, 13(1): 48-57.
- [8] LANDI M T, ZHAO Y, ROTUNNO M, et al. MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(2): 430-441.
- [9] SKRZYPSKI M, CZAPIEWSKI P, GORYCA K, et al. Prognostic value of microRNA expression in operable non-small cell lung cancer patients[J]. Br J Cancer, 2014, 110(4): 991-1000.
- [10] SHI Y, HUANG J, ZHOU J, et al. MicroRNA-204 inhibits proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition in osteosarcoma cells via targeting Sirtuin 1[J]. Oncol Rep, 2015, 34(1): 399-406.
- [11] YIN J J, LIANG B, ZHAN X R. microRNA-204 inhibits cell proliferation in T-cell acute lymphoblastic leukemia by down-regulating SOX4[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(8): 9189-9195.
- [12] TURNER D P, FINDLAY V J, MOUSSA O, et al. Mechanisms and functional consequences of PDEF protein expression loss during prostate cancer progression[J]. Prostate, 2011, 71(16): 1723-1735.
- [13] LEE Y, YANG X, HUANG Y, et al. Network modeling identifies molecular functions targeted by miR-204 to suppress head and neck tumor metastasis[J]. PLoS Comput Biol, 2010, 6(4): e1000730.
- [14] BRENNER D, MAK T W. Mitochondrial cell death effectors[J]. Curr Opin Cell Biol, 2009, 21(6): 871-877.
- [15] GHIOTTO F, FAIS F, BRUNO S. BH3-only proteins: the death-puppeteer's wires[J]. Cytometry A, 2010, 77(1): 11-21.
- [16] CZABOTAR P E, LESSENE G, STRASSER A, et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(1): 49-63.

(张蕾 编辑)