

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.15.001
文章编号: 1005-8982(2017)15-0001-04

基础研究·论著

miR-30a-5p 对肺癌细胞增殖与迁移的影响及其机制*

邱会¹, 胡敏², 钟敏钰¹

(1.湖北省武汉市第一医院 肿瘤科,湖北 武汉 430022;2.华中科技大学同济医学院
附属武汉中心医院 血管外科,湖北 武汉 430000)

摘要:目的 研究 miR-30a-5p 对非小细胞肺癌(NSCLC)增殖和迁移的影响,并探讨其调控机制。**方法** NSCLC A549 细胞系分成两组,miR-30a-5p 组和对照组,分别转染 miR-30a-5p mimics 和 microRNA scramble, MTT 实验及细胞划痕实验分别测定两组细胞增殖和迁移能力,实时聚合酶链反应(real time-PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)分别测定两组泛素蛋白连接酶(UBE3C)mRNA 和蛋白质表达水平。**结果** 培养 48 h 后,miR-30a-5p 组相对活细胞百分比低于对照组[(203.7±16.8)% vs(330.4±20.7%)($P=0.000$)];培养 72 h 后,miR-30a-5p 组相对活细胞百分比(258±30.2)%,对照组相对活细胞百分比(403.4±28.4)%,miR-30a-5p 组相对活细胞百分比低于对照组($P=0.001$)。细胞划痕实验示:miR-30a-5p 组划痕愈合率为(23.2±2.7)%,对照组划痕愈合率为(89.2±4.8)%,miR-30a-5p 组划痕愈合率低于对照组($P=0.000$)。real time-PCR 显示,miR-30a-5p 组 UBE3C mRNA 表达水平为(0.15±0.02),对照组 UBE3C mRNA 表达水平为(1.03±0.09),miR-30a-5p 组 UBE3C mRNA 表达水平低于对照组($P=0.000$);Western blot 显示,miR-30a-5p 组 UBE3C 蛋白表达水平为(1.57±0.26),对照组 UBE3C 蛋白表达水平为(5.32±0.42),miR-30a-5p 组 UBE3C 蛋白表达水平低于对照组($P=0.000$)。**结论** miR-30a-5p 抑制 NSCLC 增殖和迁移,其机制与下调 UBE3C 表达有关。

关键词: miR-30a-5p;非小细胞肺癌;增殖;迁移

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

miR-30a-5p inhibits proliferation and migration of non-small cell lung cancer cell and its mechanism*

Hui Qiu¹, Min Hu², Min-yu Zhong¹

(1. Department of Oncology, The First Hospital of Wuhan City, Wuhan, Hubei 430022, China;
2. Department of Vascular Surgery, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, the Central Hospital of Wuhan, Wuhan, Hubei 430000, China)

Abstract: Objective To investigate the role of miR-30a-5p on the regulation of the proliferation and migration of NSCLC, and its regulatory mechanism. **Methods** A549 cells were divided into two groups, miR-30a-5p group (transfected with miR-30a-5p mimics) and control group (transfected with microRNA scrambles). The proliferation and migration ability was measured by MTT assay and wound healing experiment, respectively. The expression level of UBE3C mRNA and protein was measured by RT-PCR and Western blot. **Results** The relative percentage of living cells in miR-30a-5p group was significantly lower than control group after culturing for 48 h, (203.7±16.8)% vs (330.4±20.7)%, $P=0.000$. There was (258±30.2)% of relative percentage of living cells in miR-30a-5p group, which was significantly lower than (403.4±28.4)% in the control group ($P=0.001$). The wound healing rate was (23.2±2.7%) in miR-30a-5p group, which was significantly lower than (89.2±4.8)% in the control group ($P=0.000$). RT-PCR indicated that the expression level of UBE3C mRNA

收稿日期:2016-09-08

* 基金项目:武汉市卫计委临床医学科研项目(No:WZ13Z03)

[通信作者] 钟敏钰, E-mail: zhongminy@126.com

was (0.15 ± 0.02) in miR-30a-5p group, which was significantly lower than (1.03 ± 0.09) in the control group ($P=0.000$). The expression level of UBE3C protein was (1.57 ± 0.26) in miR-30a-5p group, which was significantly lower than (5.32 ± 0.42) in control group ($P=0.000$). **Conclusions** MiR-30a-5p inhibits cell proliferation and migration of non-small cell lung cancer cell by suppressing UBE3C gene expression.

Keywords: miR-30a-5p; non-small cell lung cancer; proliferation; migration

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 是肺癌的主要类型, 恶性程度高^[1-2]。目前, 虽然得益于手术、放化疗的进展, NSCLC 治疗效果有所进步, 但其 5 年生存率仍不到 15%^[3], 肿瘤恶性增殖和迁移仍是影响预后的重要原因^[4]。深入探讨 NSCLC 增殖和迁移的机制对设计新的治疗药物具有重要的意义。miR-30a-5p 是 miR-30 家族的成员之一, 长度在 22 bp, 在肝细胞癌^[5]、神经胶质瘤^[6]、乳腺癌^[7]及结肠癌^[8]中被报道调节增殖、凋亡、侵袭和迁移。但是 miR-30a-5p 在 NSCLC 发生、发展中的作用尚未见报道。选取 2014 年 3 月-2016 年 1 月研究 miR-30a-5p 对 NSCLC 增殖和迁移的影响, 并探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM 培养基、胎牛血清及胰蛋白酶(购自美国 Gibco 公司), A549 细胞(购自美国 ATCC 公司), Trizol(购自美国 Invitrogen 公司), 实验所需一抗(购自美国 Santa Cruz 公司), 辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(购自英国 Abcam 公司), microRNA scrambles、miR-30a-5p mimics 均由上海吉玛公司定制合成, 转染试剂 Liposome™ 2000(购自美国 Invitrogen 公司)。

1.2 细胞培养及转染

将 A549 细胞加入 DMEM 培养基, 于 37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 培养箱中培养, 48 h 后传代。将细胞分为 miR-30a-5p 组和对照组 (Scrambles 组), 采用 Lipofectamine™ 2000 分别转染 miR-30a-5p mimics 和 microRNA scrambles, 转染后继续培养 24 h。

1.3 细胞增殖能力观察

采用噻唑蓝(MTT)法实验, A549 细胞以每孔 1×10^5 个细胞接种于 12 孔板中, 培养过夜后行相应的转染实验。在培养中培养 48 和 72 h 后添加 5 mg/ml 的 MTT 溶液 40 μ l, 孵育 4 h 后每孔加入 200 μ l 二甲基亚砷(DMSO), 摇床上充分震荡。490 nm 波长测定吸光度值。相对活细胞百分比 = (实验组数值 / 对照组数值) \times 100%, 实验重复 3 次, 取平均值, 相对

活细胞百分比越高, 表示增殖能力越强。

1.4 细胞迁移能力观察

采用细胞划痕实验。将两组细胞培养于 6 孔板, 待细胞融合后, 用灭菌枪头沿直线用力划直线。划痕后即刻和 48 h 在显微镜下观察细胞划痕修复情况, 使用 Wim Scratch 在线图像分析系统测定细胞划痕面积, 计算划痕愈合率。划痕愈合率 = (划痕后即刻的划痕面积 - 划痕后 48 h 的划痕面积) / 划痕后即刻的划痕面积 \times 100%。实验重复 3 次, 取平均值。划痕愈合率越高, 表示细胞迁移能力越强。

1.5 RNA 提取和实时聚合酶链反应

为测量泛素蛋白连接酶(Uniquitin-protein ligase, UBE3C)的 mRNA 水平, 按照 Trizol reagent(美国 Invitrogen 公司)说明书提取总 RNA, 将所得的 RNA 使用 Im Prom- II 逆转录系统(美国 Roche 公司)逆转录。使用 SYBR Green PCR master mix 试剂(美国 Roche 公司)在 ABI 7500 实时 PCR 仪(美国 ABI 公司)中进行实时聚合酶链反应(real-time polymerase chain reaction, real time-PCR)。选取的引物如下: UBE3C(正向引物: 5'-GTGCCCGCTGCTTCGGC GGC-3'; 反向引物: 5'-CCTCCTTCTGCTCGCGCCG CC-3')。 β -actin 基因作为内参(正向引物: 5'-TGCA CCCAGCACAAATGAA-3'; 反向引物, 3'-CTAAGTCAT AGTCCGCCTAGAAGCA-5')。

1.6 UBE3C 蛋白表达测定

采用蛋白免疫印迹法(Western blot)。收集两组细胞, 加入裂解液提取细胞总蛋白, 以每孔 30 μ g 总蛋白上样, 浓缩胶 80 V 电泳 40 min, 分离胶 100 V 电泳 2 h。常规湿法转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h; 分别加入 UBE3C 抗体和 GAPDH 过夜, 抗体稀释度均为 1 : 200。加入二抗山羊抗鼠 1 : 1 000 孵育 2 h。ECL 化学发光, 凝胶成像系统显影。用 Quantity One 1-D 分析软件(美国 Bio-Rad 公司)对蛋白印迹条带进行定量。以目的蛋白测定值与 GAPDH 的比值作为目标蛋白的相对表达量。

1.7 统计学方法

数据分析采用 Graphpad 6.0 统计作图软件, 计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 计量数据用 t

检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组转染对细胞增殖的影响

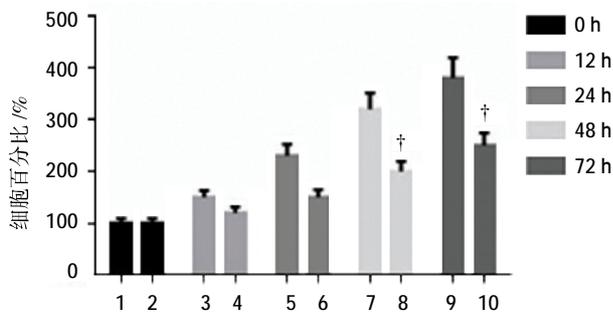
培养 48 h 后, miR-30a-5p 组相对活细胞百分比低于对照组 $[(203.7 \pm 16.8)\% \text{ vs } (330.4 \pm 20.7)\%, t = -8.231, P = 0.000]$; 培养 72 h 后, miR-30a-5p 组相对活细胞百分比 $(258 \pm 30.2)\%$, 对照组相对活细胞百分比 $(403.4 \pm 28.4)\%$, miR-30a-5p 组相对活细胞百分比低于对照组 $(t = -6.074, P = 0.001)$ 。见图 1。

2.2 两组转染对 A549 细胞迁移的影响

细胞划痕实验示, miR-30a-5p 组划痕愈合率为 $(23.2 \pm 2.7)\%$, 对照组划痕愈合率为 $(89.2 \pm 4.8)\%$, miR-30a-5p 组划痕愈合率低于对照组 $(t = -20.757, P = 0.000)$ 。见图 2。

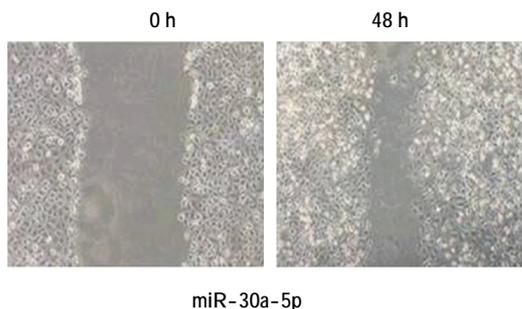
2.3 miR-30a-5p 对 UBE3C 基因表达的影响

real time-PCR 示, miR-30a-5p 组 UBE3C mRNA 表达水平为 (0.15 ± 0.02) , 对照组 UBE3C mRNA 表达水平为 (1.03 ± 0.09) , miR-30a-5p 组 UBE3C mRNA 表达水平低于对照组 $(t = -16.532, P = 0.000)$; Western blot 示, miR-30a-5p 组 UBE3C 蛋白表达水平为 (1.57 ± 0.26) , 对照组 UBE3C 蛋白表达水平为



1: 对照组 0 h 组; 2: miR-30a-5p 0 h 组; 3: 对照组 12 h 组; 4: miR-30a-5p 12 h 组; 5: 对照组 24 h 组; 6: miR-30a-5p 24 h 组; 7: 对照组 48 h 组; 8: miR-30a-5p 48 h 组; 9: 对照组 72 h 组; 10: miR-30a-5p 72 h 组。† 与对照组比较, $P < 0.01$

图 1 MTT 法检测两组相对活细胞百分比



对照组 (Scramble)

图 2 两组划痕后即刻和 48 h 在显微镜下观察的细胞划痕修复情况

(5.32 ± 0.42) , miR-30a-5p 组 UBE3C 蛋白表达水平低于对照组 $(t = -13.149, P = 0.000)$ 。见图 3。

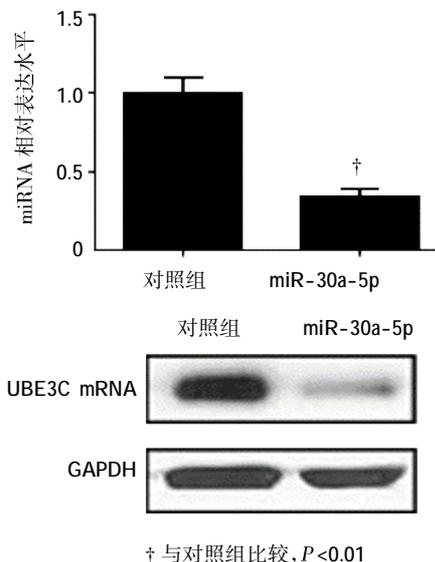


图 3 两组 UBE3C mRNA 和蛋白表达水平

3 讨论

肺癌是个备受关注的全球性健康问题,在西方国家,发病率在逐渐下降,然而在中国,发病率却在持续增长,并且在国内是常见的肿瘤致死性疾病,据国家肿瘤癌症登记中心(national central cancer registry, NCCR)统计,在城市肺癌发病率为 52.52/100 000 人;在农村,发病率为 39.54/100 000 人,在所有肿瘤中排第 1 位。肺癌致死率在所有肿瘤中也排第 1 位,2010 年肺癌死亡率为 37/100 000 人^⑧。NSCLC 是肺癌的主要病理类型,恶性程度高,在诊断时往往已经晚期,已经失去手术机会。明确 NSCLC 的发病机制对提高 NSCLC 的诊治效果具有重要的意义。

miRNA 是一种小的非编码单链 RNA,长度约 19 ~ 22 bp,其可通过在逆转录水平与靶标基因的 mRNA 的 3' 非翻译序列相结合,介导靶标 mRNA 的降解,

从而抑制靶标基因的表达^[5-6]。miRNA 在 NSCLC 的多种作用已被报道,王富民等人^[9]发现,miR-183 在无复发者血浆中含量高于复发者,且 miR-183 是 NSCLC 患者总生存率的独立影响因素。罗湘玉等人^[10]报道,NSCLC 组织中 miR-222 阳性表达率高于正常肺组织,并可能与 NSCLC 的发生、发展相关。miR-30a-5p 是 miR-30 家族的成员之一,长度为 22 bp, JIA 等人^[9]发现,miR-30a-5p 在胶质瘤细胞及组织中呈高表达,且用反义核苷酸下调 miR-30a-5p 表达可抑制胶质瘤细胞增殖和侵袭,诱导凋亡,提示 miR-30a-5p 在胶质瘤中起促癌的作用。与之相反, HE 等人^[9]报道,miR-30a-5p 通过靶向 AEG-1 基因在肝细胞癌细胞系中可抑制细胞增殖,并激活 caspase-3/7 进而诱导凋亡。代航等人^[11]发现,miR-30a-5p 可抑制肝癌细胞株 SMCC-7721 增殖,促进凋亡,抑制其迁移和侵袭能力。通过调控 ERK/Ets-1 信号通路,miR-30a-5p 抑制三阴性乳腺癌增殖、迁移和侵袭^[6]。在结肠癌中,miR-30a-5p 通过靶向无齿同源蛋白抑制结肠癌生长表明 miR-30a-5p 在不同的肿瘤中起着相反的作用^[7]。

本研究探讨 miR-30-5p 对非小细胞肺癌 A549 细胞的增殖与迁移的影响。结果显示,miR-30a-5p 组相对活细胞百分比低于对照组,miR-30a-5p 组划痕愈合率低于对照组,表明 miR-30a-5p 在 NSCLC 中抑制增殖和迁移,起着抑癌的作用,与肝细胞癌^[4]、三阴乳腺癌^[6]及结肠癌^[7]的结果一致,而与胶质瘤^[9]的结果相反,可能是由于 miR-30a-5p 在不同的肿瘤中所起的作用不一致有关。进一步探讨机制发现,miR-30a-5p 组 UBE3C mRNA 和蛋白表达水平低于对照组,UBE3C 对多种肿瘤的生长均存在正调控作用,例如,UBE3C 促进黑色素瘤细胞的增殖与迁移^[12],UBE3C 促进肾细胞癌的迁移^[13],UBE3C 促进肝癌肿瘤的生长等^[14],故 miR-30a-5p 抑癌作用可能与下调 UBE3C 表达,进而发挥抑制增殖和迁移有关。

综上所述,本研究发现 miR-30-5p 对非小细胞肺癌具有抑制增殖和迁移的作用,其机制可能与下调 UBE3C 表达有关,这为 NSCLC 的增殖及迁移提供新机制,有可能做为新的治疗靶点。

参 考 文 献:

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(1): 7.
- [2] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. International Journal of Cancer, 2015, 136(5): E359-E386.
- [3] STEEG P S. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells[J]. Nature Reviews Cancer, 2003, 3(1): 55-63.
- [4] HE R, YANG L, LIN X, et al. MiR-30a-5p suppresses cell growth and enhances apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via targeting AEG-1[J]. International Journal of Clinical & Experimental Pathology, 2015, 8(12): 15632.
- [5] JIA Z, WANG K, WANG G, et al. MiR-30a-5p antisense oligonucleotide suppresses glioma cell growth by targeting SEPT7[J]. PloS One, 2013, 8(1): e55008.
- [6] LI W, LIU C, ZHAO C, et al. Downregulation of β 3 integrin by miR-30a-5p modulates cell adhesion and invasion by interrupting Erk/Ets 1 network in triple-negative breast cancer [J]. International Journal of Oncology, 2016, 48(3): 1155-1164.
- [7] BARANISKIN A, BIRKENKAMP-DEMTRODER K, MAGHNOUJ A, et al. MiR-30a-5p suppresses tumor growth in colon carcinoma by targeting DTL[J]. Carcinogenesis, 2012, 33(4): 732-739.
- [8] ZHOU C. Lung cancer molecular epidemiology in China: recent trends[J]. Translational Lung Cancer Research, 2014, 3(5): 270-279.
- [9] 王富民, 张寰, 曲金力, 等. 非小细胞肺癌患者血浆 miR-10b, miR-122, miR-16 和 miR-183 水平及其与总生存期的关系[J]. 山东医药, 2016, 56(8): 17-19.
- [10] 罗湘玉, 罗卫民, 张军, 等. 非小细胞肺癌组织中 miR-222, TIMP3 的表达变化及意义[J]. 山东医药, 2015, 55(27): 51-53.
- [11] 代航, 康冰, 左的于, 等. MicroRNA-30a-5p 对肝癌细胞株 SMMC-7721 增殖凋亡及侵袭转移的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2014, 22(12): 915-920.
- [12] TANG L, YI X M, CHEN J, et al. Ubiquitin ligase UBE3C promotes melanoma progression by increasing epithelial-mesenchymal transition in melanoma cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(13): 15738-15746.
- [13] WEN J L, WEN X F, LI R B, et al. UBE3C promotes growth and metastasis of renal cell carcinoma via activating wnt/ β -catenin pathway[J]. PloS One, 2015, 10(2): e0115622.
- [14] JIANG J H, LIU Y F, KE A W, et al. Clinical significance of the ubiquitin ligase UBE3C in hepatocellular carcinoma revealed by exome sequencing[J]. Hepatology, 2014, 59(6): 2216-2227.