

miRNA - 449a 在肺癌组织中的表达及其检测意义

林剑勇 邓益斌 陆小婵

摘 要 **目的** 探讨 miRNA - 449a 在肺癌组织中的表达及其临床应用价值。**方法** 收集右江民族医学院附属医院 2011 年 1 月 1 日 ~ 2013 年 6 月 30 日收治的 58 例肺癌患者为研究对象,采用反转录荧光定量聚合酶链式反应(RT - PCR)检测 miRNA - 449a 在肺癌组织和癌旁正常组织中的表达量,分析 miRNA - 449a 与临床病理特征的关系,并采用荧光电子显微镜观察 miRNA - 449a 模拟物对体外培养肺癌细胞株 95D 细胞凋亡的影响。**结果** 鳞癌组和腺癌组 miRNA - 449a 平均表达量均明显低于癌旁正常对照组($LSD - t = 6.712, P = 0.000$; $LSD - t = 4.572, P = 0.000$),其相对表达量与瘤体大小($u = 78.412, P = 0.012$)有关,与患者年龄($u = 920.000, P = 0.615$)、性别($u = 800.000, P = 0.215$)、病理类型($\chi^2 = 4.221, P = 0.155$)和临床分期($u = 754.000, P = 0.009$)无关。与阴性对照组比较,miRNA - 449a 模拟物可明显促进肺癌细胞的凋亡,且呈剂量依赖性。**结论** miRNA - 449a 在肺癌组织中呈低表达,可诱导肺癌细胞凋亡,发挥抑癌基因的作用,可能成为肺癌早期诊断与治疗的新分子靶标。

关键词 miRNA - 449a 肺癌 miRNAs 分子诊断

中图分类号 R961

文献标识码 A

DOI 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.01.018

Expression and Biological Function of miRNA - 449a in Lung Cancer. Lin Jianyong, Deng Yibin, Lu Xiaochan. Respiratory Department, Affiliated Hospital of Youjiang Medical College for Nationalities, Guangxi 533000, China

Abstract **Objective** To investigate the expression and biological function of miRNA - 449a in lung cancer. **Methods** A total of 58 patients with lung cancer were selected as research objects. The expression of miRNA - 449a in lung cancer tissues and matched normal tissues were detected by real time PCR. And the relationship between age, sex, tumor size and the level of miRNA - 449a were analysed. Chemiluminescence assay was applied to analyze the apoptosis after transfecting mimics of miRNA - 449a into non - small cell lung cancer. **Results** The level of miRNA - 449a was significantly lower in squamous carcinoma group and adenocarcinoma group than that of control group($LSD - t = 6.712, P = 0.000$; $LSD - t = 4.572, P = 0.000$; respectively). There was correlation between miRNA - 449a and tumor size($u = 78.412, P = 0.012$) and no correlation between miRNA - 449a and age($u = 920.000, P = 0.615$), gender($u = 800.000, P = 0.215$), pathological type($\chi^2 = 4.221, P = 0.155$) and clinic stage($u = 754.000, P = 0.009$), all the statistic P were higher than 0.05. Compared with negative control, miRNA - 449a mimics could induce apoptosis of lung cancer cell 95D with dose - effect dependent. **Conclusion** miRNA - 449a was down - regulated expression in lung cancer and induced apoptosis, which maybe play a role as a tumor suppressor gene.

Key words miRNA - 449a; Lung cancer; MicroRNA; Molecular diagnostic

miRNA(microRNA)是近年来新发现的一种内源性、非编码单链低分子 RNA,长度约为 20 ~ 25nt,其主要功能是与靶基因 mRNA 的非编码区或编码区不完全互补结合,促使靶基因 mRNA 降解或抑制转录后蛋白翻译过程,并在细胞的生长、增殖、凋亡和分化方面扮演着重要角色^[1,2]。miRNA - 449a 是 5 号染色体上 miRNA - 449 的编码产物之一,在结直肠癌、

肝癌和卵巢癌等癌症中均发现有表达且发挥一定生物学功能^[3]。而 miRNA - 449a 在肺癌中的表达及其生物学功能尚不清楚,因此,本研究拟采用反转录荧光定量 PCR 技术分别检测肺癌组织及远端正常组织中 miRNA - 449a 的表达差异,并观察其模拟物对肺癌细胞株 95D 细胞凋亡的影响,探讨其生物学功能。

材料与方法

1. 一般材料:(1)病例资料:收集 2011 年 1 月 ~ 2013 年 6 月在笔者医院就诊并经手术病理诊断确诊的肺癌患者手术切除新鲜标本 58 例,其中,男性 40 例,女性 18 例;鳞癌 22 例,腺癌 36 例;年龄 ≥ 50 岁者 42 例,年龄 < 50 岁者 16 例;瘤体 ≥ 5 cm 者 38 例,瘤体 < 5 cm 者 20 例,取肺癌组织及远端对照

基金项目:广西壮族自治区自然科学基金资助项目(2011GXNSFA04215)

作者单位:533000 百色,广西壮族自治区右江民族医学院附属医院呼吸内科(林剑勇),医学检验科(邓益斌、陆小婵)

通讯作者:邓益斌,电子信箱:dengyb75@163.com

正常组织(距癌组织 > 5cm)。所有肺癌患者术前均未做放疗、化疗及其他针对肿瘤的治疗。标本留取前已经医院伦理委员会批准,并由患者签署知情同意书。全部标本手术后 30min 内保存于液氮中。人肺癌细胞株 95D 细胞(购自美 ATCC 细胞库)用 10% 胎牛血清(含氨基酸和葡萄糖)的培养基于 37℃、5% CO₂ 湿化培养箱中培养。(2)主要试剂与仪器:Tizol 试剂盒、Lipofectamin™ 2000 等购自美国 Invitrogen 公司;反转录荧光定量 PCR 试剂盒购自上海生工生物工程股份有限公司;Annexin V - FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物技术有限公司;引物及 miRNA - 449a 模拟物的设计与合成由上海生工生物工程股份有限公司完成;荧光电子显微镜为尼康(Niko)公司产品;PCR 扩增仪为美国 Thermo 公司产品。

2. 方法:(1)总 RNA 提取:从液氮中取组织约 500mg,采用 Tizol 试剂提取总 RNA,利用紫外分光光度计检测提取 RNA 浓度和纯度,当 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值为 1.8 ~ 2.1 认为提取的 RNA 纯度合格。并采用 1% 琼脂糖凝胶电泳法鉴定 RNA 的完整性,当 28S/18S 亮度比值 > 2.0 认为提取的 RNA 完整性良好。(2)miRNA - 449a 定量检测:采用反转录荧光定量 PCR 技术,以 U6 为内参。①内参 U6 引物设计:U6 反转录引物:5' - GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGA CAAAATATGGAAGTGC - 3',上游引物:5' GGGTGCTCGCT - TCGGCAGC - 3',下游引物:5' - CAGTGCAGGGTCCGAGGT - 3';②总 RNA 反转录为 cDNA:利用反转录引物,把总 RNA 反转录为 cDNA,其反应体系为:10 × 反转录缓冲液 1.5 μl, 100nmol/L dNTPs 0.15 μl,反转录酶 1.0 μl, RNase 抑制剂 0.19 μl,反转录引物 3.0 μl,总 RNA 5.0 μl,加 DEPC 水至 15 μl,轻轻混匀后,16℃,30min;42℃,60min;85℃,5min;4℃,保存;③荧光定量 PCR 检测:反应体系为:2 × PCR 缓冲液 10 μl,20 × miRNA - 449a 特定引物和荧光探针 1 μl,反转录产物 1 μl,加 DEPC 水至 20 μl,置 ABI 7500 荧光 PCR 仪上按照 95℃ 5min,95℃ 15s,60℃ 45s 反应 40 个循环,采集数据分析结果。(3)miRNA - 449a 模拟物抑制细胞增殖分析:采用 Lipofectamin™ 2000 分别将不同浓度的 miRNA - 449a 模拟物及阴性对照转染体外培养的人肺癌细胞株 95D 细胞,荧光电子显微镜下观察细胞凋亡情况。脂质体转染严格按试剂说明书操作。

3. 统计学方法:采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,试验资料中的计量资料均做正态性检验,以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。符合正态分布的资料,多组间比较行单因素方差分析及 LSD 和 HSD 法的多重比较;若不符合正态分布,两组间各指标间的比较,采用两独立样本非参数 Mann - Whitney 检验,多组间比较行 Kruskal - Wallis 分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. RNA 纯度与 miRNA - 449a 的表达:RNA 经紫外分光光度计检测,A₂₆₀/A₂₈₀ 比值为 2.06, A₂₆₀/A₂₃₀

比值为 2.21,说明总 RNA 纯度较高,无蛋白及 DNA 的污染。图 1 显示,28S、18S 条带清晰,28S/18S 亮度比值 > 2.0,说明提取的总 RNA 完整性好,无明显降解。癌旁正常对照组、鳞癌组、腺癌组的 miRNA - 449a 平均表达量分别为 2.74 ± 1.55 、 1.48 ± 1.63 和 1.52 ± 1.54 。3 组整体差异有统计学意义($F = 56.81$, $P = 0.001$)。鳞癌组和腺癌组与癌旁正常对照组相比较均发现,miRNA - 449a 表达量显著性降低($LSD - t = 6.712$, $P = 0.000$; $LSD - t = 4.572$, $P = 0.000$);鳞癌组 miRNA - 449a 表达量与腺癌组相比较差异无统计学意义。

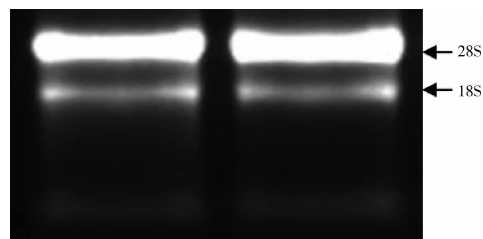


图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

2. miRNA - 449a 表达与临床病理特征关系:将 58 例肺癌患者按照临床病理特征因素(年龄、性别、病例类型、临床分期和瘤体直径)进行分类,进一步分析 miRNA - 449a 相对表达量与肺癌患者临床特征的关系,表 1 显示,miRNA - 449a 表达与瘤体直径有关($P = 0.012$),与其他临床病理特征无相关性, (P 均 > 0.05)。

表 1 58 例肺癌患者 miRNA - 449a 表达与临床病理特征关系($\bar{x} \pm s$)

临床特征	n	miRNA - 449a 相对表达量	u	P
年龄(岁)				
< 50	16	1.88 ± 0.78	920.000	0.615
≥ 50	42	1.83 ± 0.91		
性别				
男性	40	1.91 ± 0.93	800.000	0.215
女性	18	1.85 ± 0.82		
病理类型				
鳞癌	22	2.01 ± 0.88	4.221 *	0.155
腺癌	36	1.75 ± 0.81		
临床分期				
I ~ II	21	1.55 ± 0.82	754.000	0.091
III ~ IV	37	1.89 ± 0.78		
瘤体直径(cm)				
< 5	20	1.23 ± 0.73	78.412	0.012
≥ 5	38	0.62 ± 0.59		

* Kruskal Wallis 检验,其余 Mann - Whitney 检验

3. miRNA - 449a 模拟物对细胞凋亡的影响: 转染 48h 后, 采用 MTT 比色法测定各组吸光度值 A, 阴性对照组、10mg/ml 组和 20mg/ml 组的 A 值分别为 1.35 ± 1.02 、 0.71 ± 0.54 和 0.45 ± 0.38 。3 组整体差异有统计学意义 ($F = 57.33$, $P = 0.002$)。图 2 显示, 10mg/ml 组和 20mg/ml 组的细胞凋亡数 (染成红色) 显著高于阴性对照组。

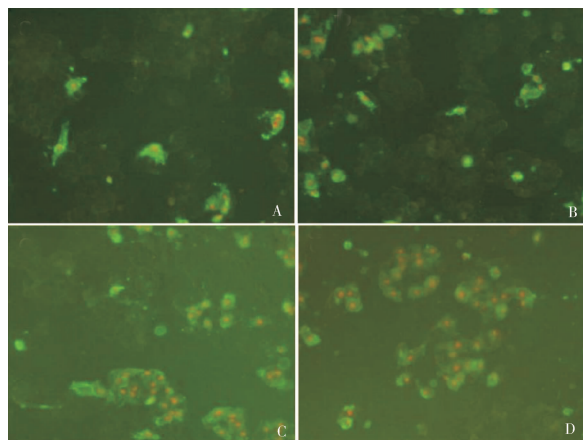


图 2 荧光电子显微镜下, miRNA - 449a 诱导肺癌细胞株 95D 细胞凋亡情况 (化学发光法, $\times 200$)

A. 阴性对照组; B. 脂质体对照组; C. 10mg/ml 模拟物组; D. 20mg/ml 模拟物组

讨 论

肺癌是一种多基因疾病, 其发生、发展是多因素参与、多种相关基因失活共同作用的结果, 是高发生率和病死率的癌症之一, 也是预后较差的癌症之一。miRNA 是一类长约 20 ~ 23nt 的可调控基因表达的高度保守非编码小 RNA, 在肿瘤发生、发展和转移中起着促进或抑制的作用。有资料表明, miRNA - 145、miRNA - 34a、miRNA - 212、miRNA - 182 等 miRNA 可通过增加凋亡蛋白的表达, 诱导肿瘤细胞凋亡, 从而阻遏肿瘤细胞的生长^[4~7]。此外, 还发现肺癌患者血清中 miRNA - 21 的表达显著高于良性肺部疾病患者及健康体检者^[8]。因此认为, miRNA 可能成为肿瘤基因诊断与治疗研究的潜在靶标, 是目前肿瘤领域的研究新热点。

本研究结果显示, miRNA - 449a 在肺癌组织中的表达明显比正常对照组低 ($P < 0.05$), 而且与瘤体直径有关 ($P < 0.05$), 与年龄、性别无关, 提示 miRNA - 449a 参与了肺癌的发生、发展过程, 可能是一个潜在的抑癌因子, 但其表达机制仍不清楚, 可能与表观

遗传学 (如甲基化等) 的调控有关。为了验证 miRNA - 449a 对肿瘤细胞增殖和凋亡的作用机制, 本研究设计合成 miRNA - 449a 模拟物, 并以阳离子脂质体介导体外转染肺癌细胞株 95D 细胞, 荧光电子显微镜下观察发现, 与阴性对照组比较, miRNA - 449a 模拟物能够明显诱导肺癌细胞的凋亡, 且随着 miRNA - 449a 浓度的增高肿瘤细胞的凋亡呈上升趋势, 说明 miRNA - 449a 通过诱导肺癌细胞凋亡来发挥抑癌基因的作用, 但诱导或阻断哪些凋亡蛋白的表达, 从而上调或下调哪些通路的信号, 还有待于进一步研究。

尽管本研究结果初步证实 miRNA - 449a 在肺癌细胞中有抑癌基因作用, 但体外实验细胞微环境毕竟与体内不同, 有可能因为细胞表观遗传学的改变影响实验结果的准确性, 因此, 有待进一步在动物实验中加以验证。总之, miRNA - 449a 在肺癌发生、发展过程中通过诱导细胞凋亡发挥抑癌基因的作用, 可能成为肺癌早期诊断与治疗的新分子靶标。

参考文献

- Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, *et al.* Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels [J]. *Nature*, 2010, 466(7308): 835 - 840
- Lujambio A, Lowe SW. The microcosmos of cancer [J]. *Nature*, 2012, 482(7385): 347 - 355
- Yang X, Feng M, Jiang X, *et al.* MiRNA - 449a and miRNA - 449b are direct transcriptional targets of E2F1 and negatively regulate pRb - E2F1 actively through a feedback loop by targeting CDK6 and CDC25A [J]. *Genes Dev*, 2009, 23(20): 2388 - 2393
- Cho WC, Chow AS, Au JS. Restoration of tumor suppressor has - miR - 145 inhibits cancer cell growth in lung adenocarcinoma patients with epidermal growth factor receptor mutation [J]. *Eur J Cancer*, 2009, 45: 2197 - 2206
- Duan W, Gao L, Wu X, *et al.* MicroRNA - 34a is an important component of PRIMA - 1 - induced apoptotic network in human lung cancer cells [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127: 313 - 320
- Incoronato M, Garofalo M, Urso L, *et al.* MiR - 212 increase tumor necrosis factor - related apoptosis - inducing ligand sensitivity in non - small cell lung cancer by targeting the anti - apoptotic protein PED [J]. *Cancer Res*, 2010, 70: 3638 - 3646
- 徐彪, 夏伟, 邵宁生, 等. 肺鳞癌组织 Has - miR - 182 差异表达的研究 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2013, 20(16): 1225 - 1228
- 胡俊庭, 鲍蕴文, 白艳, 等. 肺癌患者血清 miRNA - 21 表达临床意义探讨 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2014, 21(1): 39 - 42

(收稿日期: 2014 - 06 - 12)

(修回日期: 2014 - 06 - 25)