

microRNA-21 对肺癌 A549 细胞增殖和 Smad7 表达的影响

李斌, 潘跃银, 杜瀛瀛

摘要 目的 探讨微小 RNA-21(miR-21) 对肺癌 A549 细胞中 Smad7 表达的调控和对肺癌 A549 细胞增殖的影响。方法 常规培养肺癌细胞系 A549, 经脂质体转染 miR-21 模拟物和抑制物及阴性对照片段 48 h 后, 采用 Western blot、qRT-PCR 法检测 Smad7 基因及蛋白的表达水平, MTT 法检测 A549 细胞增殖情况。结果 转染 miR-21 模拟物后 Smad7 的 mRNA 和蛋白表达量降低 ($P < 0.05$), 而转染 miR-21 抑制物后 Smad7 的 mRNA 和蛋白表达量升高 ($P < 0.05$); MTT 结果显示转染 miR-21 模拟物后细胞的增殖能力明显增强 ($P < 0.05$), 而转染 miR-21 抑制物后细胞增殖能力明显减弱 ($P < 0.05$)。结论 通过下调 miR-21 可提高 Smad7 的 mRNA 和蛋白表达, 进而抑制 A549 细胞的增殖。

关键词 肺癌; 微小 RNA-21; Smad7; 增殖

中图分类号 R 73.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)12-1766-04

2015-09-08 接收

基金项目: 安徽省科技攻关项目(编号: 1301042214); 安徽省 2012 年度科研计划项目(编号: 12070403072); 安徽省高校省级自然科学基金重点项目(编号: KJ2012A157)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院干部肿瘤科, 合肥 230022

作者简介: 李斌, 男, 硕士研究生;

潘跃银, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yueyinpan@gmail.com

肺癌是威胁人类健康最常见的恶性肿瘤之一, 恶性死亡率逐年上升^[1]。微小 RNA (microRNA, miR) 是近年来发现的一类长约 19~22 个核苷酸的非编码单链小分子 RNA, 其能与靶序列 mRNA 的 3' 非翻译区结合, 时序性调控基因表达, 在肿瘤细胞增殖、分化和凋亡中发挥重要的调控作用^[2]。文献^[3]报道, miR-21 在肺癌细胞中高表达, 但作用机制尚不清楚。研究^[4]证实, miR-21 通过作用于 Smad7 调控肺成纤维细胞的活化增殖。Smad7 是转化生长因子- β 1/Smad 信号通路负调控因子, 抑制细胞活化增殖^[5]。miR-21 是否靶向调控 Smad7 表达, 影响肺癌 A549 细胞增殖目前尚不十分清楚。该研究旨在探讨 miR-21 对肺癌中 Smad7 表达的调控和 A549 细胞增殖的影响, 以期研究 miR-21 在肺癌中的作用以及肺癌基因治疗新靶标开发提供前期实验基础。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 一抗 Smad7 购自美国 Cell signal 公司; β -actin 购自武汉博士德生物工程有限公司; 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG、辣根酶标记山羊抗兔 IgG 购自美国 Santa Cruz 公司; miR-21 模拟物和抑制物、EzOmics miRNA qPCR Detection Primer 试剂

Research for the relationship of ATP7B gene mutations and WD

Xu Bin¹, Yu Yuanxun¹, Bao Yuancheng², et al

(¹Anhui Medical College, Anhui Province Medical Genetics Center, Hefei 230061;

²Dept of Neurology, The First Affiliated Hospital of Anhui Traditional Chinese Medicine University, Hefei 230031)

Abstract Objective To sequence the WD ATP7B gene, analyze the relationship of the mutations and WD, find in Chinese WD patients the ATP7B gene complicated mutation meaning. **Method** Getting genomic DNA from clinically diagnosed 84 cases of WD patients and 20 cases of the health people, amplifying all exons 5' end \rightarrow + 3' end of ATP7B gene by PCR. PCR products and mutations were analyzed by DNA direct sequencing and analyzing the clinical meaning and the relationship with the mutations. **Results** We found in the 84 cases the ATP7B gene mutation rate was 82.14% and found some complicated mutations that were rarely reported in China and had relationship with WD. **Conclusion** ATP7B gene mutations have the heterogeneity and the mutation checking can find related ATP7B gene mutation carried WD patients.

Key words Wilson disease; exons; gene mutations; PCR

盒、EzOmics One-Step qPCR 试剂盒购自美国 Biomic 公司; Lipofectamine™ 2000 Reagent、TRIzol Reagent 购自美国 Invitrogen 公司; RT-PCR 试剂盒、SYBR-Green qPCR Master Mix 购自立陶宛 MBI Fermentas 公司; 引物合成均由上海生工生物工程有限公司提供。

1.2 细胞培养 人非小细胞肺癌 A549 细胞株购自中科院上海细胞库。在含 100 ml/L 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素及 2 mmol/L 谷氨酰胺的 RPMI1640 细胞培养基中,于 37 °C、5% CO₂ 全湿度培养。当细胞贴壁达 80% ~ 90% 时,按 5×10^5 /ml 的细胞密度接种于 6 孔板中。

1.3 瞬时转染 取对数生长期 A549 细胞进行转染实验。转染前 1 d,将 A549 细胞计数后,接种于 24 孔板,用无血清不含抗生素的 RPMI1640 培养液稀释待转染。成熟 miR-21 抑制物、模拟物和其阴性对照由美国 Biomic 生物技术公司设计并合成。引物序列如下: miR-21 模拟物正义链 (sense): 5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3',反义链 (anti-sense): 5'-AACAUCAUCUGAUAAGCUAAU-3', miR-21 抑制物序列 (sequences): 5'-UCAACAUCAGUCUGAUAAGCUA-3'。将 miR-21 抑制物、模拟物和阴性对照与脂质体 Lipofectamine™ 2000 Reagent 混匀,室温静置 20 min 后,加入相应各孔细胞中,于 37 °C、5% CO₂ 保温箱孵育 4 ~ 6 h,更换含血清 RPMI1640 24 h 和 48 h 后提取转染后细胞的总 RNA 和总蛋白。

1.4 MTT 比色法检测细胞增殖 设计分组: 转染 miR-21 抑制物组、转染 miR-21 模拟物和阴性对照组。将处于对数生长期的各实验组 A549 细胞胰蛋白酶消化后,用完全培养基重悬形成细胞悬液。用血球计数板进行细胞计数。铺板细胞密度为 1 500 个/孔铺于 96 孔板中,每组 5 个复孔,每孔 100 μl,共 5 张 96 孔板,连续监测 5 d,铺板过程中要确保每孔加入细胞数一致。置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。从铺板后第 2 天开始,培养终止前 4 h,每孔加入 10 μl MTT (5 g/L),无需换液 4 h 后,吸弃培养液,每孔加入 100 μl DMSO 终止反应,振荡器震荡 5 ~ 10 min 使结晶充分溶解,酶标仪 490 nm 处测定吸光度 (absorbance, A) 值。

1.5 细胞蛋白质提取 取转染后细胞,加入蛋白裂解液 400 μl,按 1 ml 裂解液加 10 μl PMSF 原则加入 PMSF 混匀,在摇床上冰浴 30 min。裂解完后,然后

转移裂解液至离心管中 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液分装转移至新的离心管中。

1.6 细胞 RNA 提取 取转染后细胞,加入 Trizol 1 ml 后充分混匀;加入氯仿 0.2 ml,充分混匀,室温下孵育 10 min,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液至 EP 管;加入等体积异丙醇,-20 °C 助沉 30 min,4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液;75% 乙醇 (含 DEPC 水) 洗涤沉淀 1 次,4 °C、12 000 r/min 离心 5 min,弃乙醇层;真空干燥 5 ~ 10 min,加 DEPC 水振荡溶解 RNA 沉淀,-80 °C 保存备用。

1.7 Western blot 法检测 Smad7 的表达 将提取的细胞蛋白定量,然后通过 SDS-PAGE 电泳分离,PVDF 转膜后封闭 3 h,加入 Smad7 和 β-actin 一抗孵育过夜,然后加 Smad7 和 β-actin 二抗孵育 1 h 后,化学发光法显示蛋白条带,胶片显影、定影。成像结果采用 Quantity One V 4.6 软件分析,测定主带的灰度值以计算 Smad7 蛋白表达水平,结果重复 3 次。

1.8 qRT-PCR 法检测 Smad7 的表达 采用 TRIzol 法提取各组细胞总 RNA。反转录成 cDNA 并进行荧光定量 PCR。选用 β-actin 为内参基因。每个反应设 3 个复管,反应结束后,荧光定量 PCR 仪自动分析各管的循环阈值 (threshold cycle, Ct)。采用 $2^{-\Delta Ct}$ 法计算各组组织中目的基因的相对表达量,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算实验组目的基因表达相对于对照组表达的倍数。各组 ΔCt 值: Ct 目的基因 - Ct 内参基因 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ 实验组 - ΔCt 对照组。引物序列: Smad7 上游引物: 5'-GAGGATGGAACCTTTGGGTCTC-3',下游引物: 5'-TCATTTCTTGATTAGGGTGGT-3'; β-actin 上游引物: 5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3',下游引物: 5'-CAAACATGATCTGGGTCATCT-TCTC-3'。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 瞬时转染 miR-21 抑制物和模拟物后 miR-21 表达变化 瞬时转染 A549 细胞 miR-21 抑制物和模拟物 48 h 后,miR-21 抑制物组 miR-21 表达明显低于阴性对照组,差异有统计学意义 ($F = 28.13, P < 0.05$); miR-21 模拟物组 miR-21 表达明显高于阴性对照组,差异有统计学意义 ($F = 20.85, P < 0.05$)。见图 1。

2.2 瞬时转染 miR-21 抑制物和模拟物对 Smad7

mRNA 表达的影响 瞬时转染 A549 细胞 miR-21 抑制物和模拟物 48 h 后 ,miR-21 抑制物组 Smad7 mRNA 表达明显高于阴性对照组 ,差异有统计学意义($F = 30.06 , P < 0.05$) ; miR-21 模拟物组 Smad7 mRNA 表达明显低于阴性对照组 ,差异有统计学意义($F = 29.35 , P < 0.05$) 。见图 2。

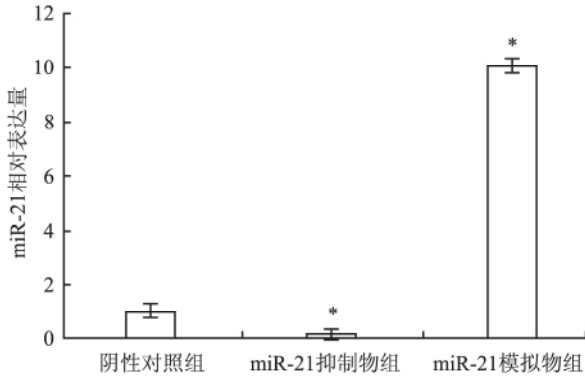


图1 qRT-PCR 法检测瞬时转染 A549 细胞 miR-21 抑制物和模拟物后 miR-21 表达变化
与阴性对照组比较: * $P < 0.05$

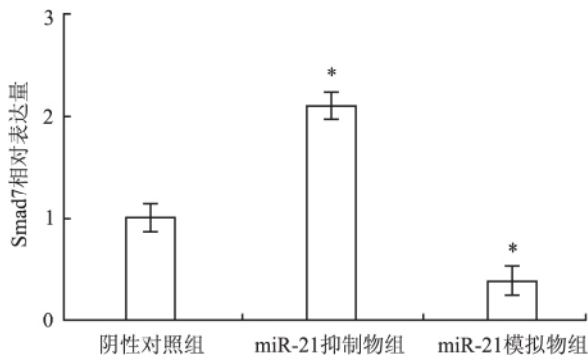


图2 qRT-PCR 法检测瞬时转染 A549 细胞 miR-21 抑制物和模拟物后 Smad7 表达变化
与阴性对照组比较: * $P < 0.05$

2.3 瞬时转染 miR-21 抑制物和模拟物对 Smad7 蛋白表达的影响 瞬时转染 A549 细胞 miR-21 抑制物和模拟物 48 h 后 ,miR-21 抑制物组 Smad7 蛋白表达明显高于阴性对照组 ,差异有统计学意义($F = 22.35 , P < 0.05$) ; miR-21 模拟物组 Smad7 蛋白表达明显低于阴性对照组 ,差异有统计学意义($F = 20.89 , P < 0.05$) 。见图 3。

2.4 MTT 实验结果显示 瞬时转染 A549 细胞 miR-21 抑制物和模拟物 48 h 后 ,miR-21 抑制物组细胞增殖活性明显低于阴性对照组 ,差异有统计学意义($F = 18.68 , P < 0.05$) ; miR-21 模拟物组细胞

增殖活性明显高于阴性对照组 ,差异有统计学意义($F = 17.54 , P < 0.05$) 。见图 4。

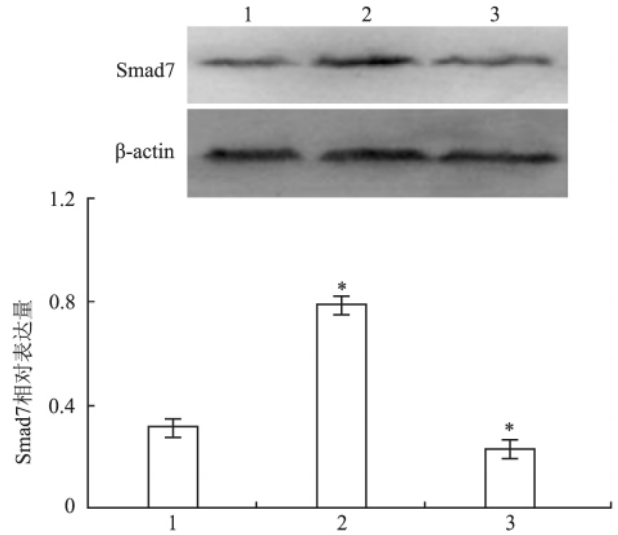


图3 Western blot 法检测瞬时转染 A549 细胞 miR-21 抑制物和模拟物后 Smad7 表达变化

1: 阴性对照组; 2: miR-21 抑制物组; 3: miR-21 模拟物组; 与阴性对照组比较: * $P < 0.05$

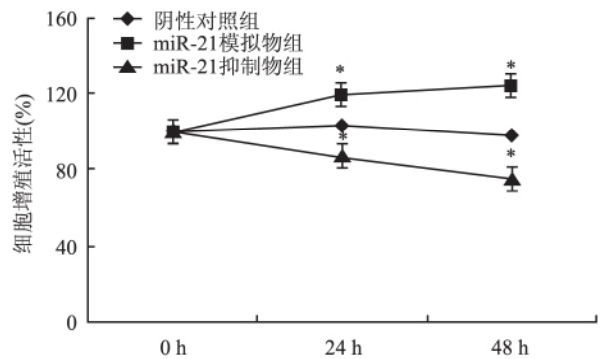


图4 MTT 法检测瞬时转染 A549 细胞 miR-21 抑制物和模拟物 24 h 和 48 h 后细胞增殖活性变化
与阴性对照组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

研究^[6]证实 miR 具有调节包括细胞分化、增殖、凋亡或坏死以及发育等多种生物生命活动过程的作用。研究^[7]显示 ,多种 miR 在肺癌组织中存在异常表达 ,与肺癌发生发展密切相关。miR 不但可以作为肿瘤的早期诊断指标 ,还可以作为肿瘤治疗的潜在靶点。文献^[8]报道已证实 ,miR-21 在肺癌中高表达 ,但具体机制尚不十分清楚。

文献^[9]报道 ,Smad7 在耐顺铂肺癌 A549 细胞株中表达降低。此外 ,生物信息学提示 ,Smad7 是

miR-21 潜在作用靶基因^[10]。本研究将 miR-21 模拟物和抑制物转染 A549 细胞,通过 qRT-PCR 法分析显示,转染后 miR-21 模拟物细胞中 miR-21 的表达明显增加;转染后 miR-21 抑制物细胞中 miR-21 的表达明显降低;瞬时转染 A549 细胞 miR-21 抑制物和模拟物后,miR-21 抑制物组 Smad7 mRNA 和蛋白表达明显高于阴性对照组;miR-21 模拟物组 Smad7 mRNA 和蛋白表达明显低于阴性对照组。

通过 MTT 实验显示转染 miR-21 模拟物的细胞较转染阴性对照组的细胞 $A_{490\text{nm}}$ 值明显增加,同时,转染 miR-21 抑制物的细胞较转染阴性对照组的细胞 $A_{490\text{nm}}$ 值明显降低,提示 miR-21 模拟物促进 A549 细胞的增殖,而 miR-21 抑制物抑制 A549 细胞的增殖。以上结果提示 miR-21 抑制物抑制 A549 细胞的增殖可能是通过促进 Smad7 表达引起的;而 miR-21 模拟物促进 A549 细胞的增殖可能是通过减少 Smad7 表达引起的。

综上所述,miR-21 通过对肺癌细胞中 Smad7 表达的靶向调控,进而影响肺癌 A549 细胞活化增殖,提示 miR-21 是肺癌 A549 细胞活化增殖的潜在的靶向分子,可以为干预和预防肺癌提供新思路。

参考文献

- [1] 张云,王华素,夏觅真等.基于肺癌细胞特异性结合肽检测肺癌的免疫酶法[J].安徽医科大学学报,2014,49(9):1329-33.
- [2] Fischer S, Handrick R, Aschrafi A, et al. Unveiling the principle

- of microRNA-mediated redundancy in cellular pathway regulation [J]. RNA Biol 2015, 12(3): 238-47.
- [3] 刘凤林,王新锋,王兴武等.非小细胞肺癌组织 miRNA-21 表达及预后相关性研究[J].中华肿瘤防治杂志,2012,19(18):1397-9.
- [4] Liu G, Friggeri A, Yang Y, et al. miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis [J]. J Exp Med, 2010, 207(8): 1589-97.
- [5] Dong X, Zhang C, Ma S, et al. High concentrations of mast cell chymase facilitate the transduction of the transforming growth factor- β 1/Smads signaling pathway in skin fibroblasts [J]. Exp Ther Med, 2015, 9(3): 955-60.
- [6] Zhao C, Sun W, Zhang P, et al. miR-214 promotes osteoclastogenesis by targeting Pten/PI3k/Akt pathway [J]. RNA Biol, 2015, 12(3): 343-53.
- [7] Siristatidis C, Vogiatzi P, Brachnis N, et al. Review: MicroRNAs in assisted reproduction and their potential role in IVF failure [J]. In vivo 2015, 29(2): 169-75.
- [8] Yang J S, Li B J, Lu H W, et al. Serum miR-152, miR-148a, miR-148b, and miR-21 as novel biomarkers in non-small cell lung cancer screening [J]. Tumour Biol 2015, 36(4): 3035-42.
- [9] Jeon W K, Hong H Y, Seo W C, et al. Smad7 sensitizes A549 lung cancer cells to cisplatin-induced apoptosis through heme oxygenase-1 inhibition [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 420(2): 288-92.
- [10] He X, Xie J, Zhang D, et al. Recombinant adeno-associated virus-mediated inhibition of microRNA-21 protects mice against the lethal schistosome infection by repressing both IL-43 and transforming growth factor beta 1 pathways [J]. Hepatology, 2015, 61(6): 2008-17.

Influence of miR-21 control Smad7 expression and lung cancer A549 cell line proliferation

Li Bin, Pan Yueyin, Du Yingying

(Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore miR-21 regulation of Smad7 in lung cancer A549 cell line as well as its impact on the proliferation of lung cancer A549 cell line. **Methods** miR-21 mimic and inhibitors in lung cancer A549 cell line were transfected by using Lipofectamine 2000 Reagent. After 48 h, Western blot and qRT-PCR were applied to assess the expression of protein and mRNA of Smad7. MTT assay was used to determine the proliferation influence of the transfected lung cancer A549 cell line. **Results** Western blot and qRT-PCR showed that A549 cell transfected miR-21 mimic exhibited down-regulated Smad7 protein and mRNA expression, and A549 cell transfected miR-21 inhibitor exhibited up-regulated Smad7 protein and mRNA expression. The A549 cell proliferation activity decreased significantly after transfected miR-21 inhibitors. **Conclusion** miR-21 inhibitors can increase Smad7 protein and mRNA expression, and suppress the proliferation activity of lung cancer A549 cell significantly.

Key words lung cancer; microRNA-21; Smad7; proliferation