

网络出版时间: 2020-12-9 14:54 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20201208.0843.007.html>

基因干扰 miR-105 抑制 非小细胞肺癌细胞的干细胞样特性、恶性增殖和侵袭

李纪远¹, 马新², 张灿斌¹, 王献¹, 郑帅玉¹, 尚自强¹

摘要 目的 探究基因干扰 miR-105 对非小细胞肺癌细胞的干细胞样特性、恶性增殖和侵袭的影响。方法 RT-PCR 检测 33 例肺癌患者肺组织及癌旁组织中 miR-105 表达水平。转染 miR-105 inhibitor 至 A549 细胞, 将细胞随机分为 3 组(Control、inhibitor-NC、miR-105 inhibitor 组) 进行后续实验。RT-PCR 检测 miR-105 表达水平; 成球实验检测细胞成球率、成球直径; Western blot 检测 SOX2、OCT4 蛋白表达水平; 流式分选检测 CD133⁺ 细胞数; 克隆形成实验检测细胞增殖; Transwell 检测细胞侵袭; Western blot 检测 VEGF 蛋白表达水平。结果 癌旁组织中 miR-105 表达水平低于癌组织。与 Control 组相比较, miR-105 inhibitor 组 miR-105 表达水平降低($P < 0.05$), 细胞成球率、成球直径降低($P < 0.05$), SOX2、OCT4 蛋白水平降低($P < 0.05$), CD133⁺ 细胞数降低($P < 0.05$), 克隆形成率降低($P < 0.05$), 侵袭细胞数降低($P < 0.05$), VEGF 蛋白水平降低($P < 0.05$)。结论 基因干扰 miR-105 可抑制非小细胞肺癌细胞的干细胞样特性、恶性增殖和侵袭。

关键词 非小细胞肺癌; miR-105; 干细胞样特性; 侵袭

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)01-0033-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.01.007

肺癌的发病率是目前所有癌症类型中最高的, 其中 85% 是非小细胞肺癌^[1]。超过 50% 的肺癌患者在确诊 1 年后死亡^[2]。肺癌晚期患者往往由于癌细胞从原发部位转移至远处器官导致预后不良和治疗失败。当前, 化学疗法、放射疗法和靶向疗法是比较有效的肺癌治疗方法, 但由于化疗药物耐药性, 化学疗法的应用受到限制^[3], 因此进一步探究预防肺癌发生发展的可能靶点非常必要。

微小 RNA 是一大类内源性微小非编码 RNA, 长度为 21~22 个核苷酸, 可调节约 30% 的人类基

因表达^[4]。越来越多的证据表明, 微小 RNA 可以作为癌基因和抑癌基因参与肿瘤的发展。microRNA-105(miR-105) 与肝癌、结肠癌和卵巢癌的发生发展有着密切关系^[5]。已有研究^[6]表明 miR-105 通过上调 Mcl-1 促进非小肺癌细胞的上皮-间质转化。能靶向负调控 KIFC1 抑制非小细胞肺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力^[7]。但 miR-105 对非小细胞肺癌的具体作用机制仍不清楚。该文旨在探究基因干扰 miR-105 对非小细胞肺癌细胞的干细胞样特性、恶性增殖和侵袭的影响, 为靶向治疗非小细胞肺癌提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验试剂 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培养基(货号: 12100-046)、青链霉素(货号: 15140-122)、胎牛血清(货号: 26400-036)、胰蛋白酶(货号: 15050-057)和 F12 培养基(货号: 21700-075) 购自美国 Gibco 公司; LipoRNAiTM 转染试剂(货号: C0535)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号: P0012) 购自上海碧云天生物技术研究; Transwell (货号: 3374) 购自美国 Corning 公司; Anti SOX2(货号: ab97959)、OCT4(货号: ab18976)、VEGF(货号: ab2350)、 β -actin(货号: ab8227) 购自英国 Abcam 公司。

1.2 细胞培养 33 例肺癌及癌旁组织来源于河南科技大学第一附属医院, 所有涉及研究的标本取材均预先征得患者及家属知情同意, 并经过医院伦理委员会批准, RT-PCR 检测肺癌组织和癌旁组织中 miR-105 表达水平。人非小细胞肺癌细胞 A549 来源于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, 将细胞培养于 DMEM 培养基中, 添加 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素, 置于 37℃ 含 5% CO₂ 的培养箱中培养, 每 24 h 更换新鲜培养基, 1:2 传代。选用对数生长期细胞为实验用细胞。

1.3 RT-PCR 用 TRIzol 法从 A549 细胞中提取总 RNA, 用 Nanodrop 分光光度计测定吸光度值(A₂₆₀/A₂₈₀), 按试剂盒说明书进行 cDNA 合成和 PCR 的

2020-07-29 接收

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目(编号: 2018020274)

作者单位: 河南科技大学第一附属医院¹ 胸外科、² 风湿科, 洛阳 471000

作者简介: 李纪远, 男, 硕士, 副主任医师, 责任作者, E-mail: lijyuan1006@126.com

扩增,反应条件为: 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 扩增 35 个循环; 72 ℃ 延长 10 min。存储在 4 ℃ 条件下。反应产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离。

1.4 细胞处理及分组 取对数生长期的 A549 细胞 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 细胞密度达 60% 时, 按 LipoRNAi™ 转染试剂说明书的方法将 inhibitor-NC、miR-105 inhibitor 转染至 A549 细胞, 细胞分为: Control 组、inhibitor-NC 组和 miR-105 inhibitor 组。

1.5 成球实验 将各组细胞经流式细胞仪计数后铺至超低黏附 96 孔板。每孔 100 μ l F12 成球培养基, 含 10 个活细胞, 各铺 10 个复孔。静置培养 14 d 后倒置显微镜下观察成球率及成球直径。成球率 = 每孔细胞球数目总和 / 每孔加入的细胞数 $\times 100\%$ 。

1.6 流式分选检测 CD133 取对数生长期的 A549 细胞, 0.01% PBS 清洗 2 次后用 0.25% 胰酶消化, 培养液终止, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 调整细胞密度为 5×10^6 个/ml。分别加入抗 CD133 抗体, 用流式细胞仪进行检测。

1.7 克隆形成实验 在培养皿中培养细胞至大约 30% 汇合度, 继续培养 4 d, 吹散为单个细胞, 用 6 孔板培养, 每孔约 500 个细胞, 培养 14 d, 弃掉培养基, 用乙醇固定 30 min, 接着用 0.5% 结晶紫染色, 用去离子水漂洗晾干, 进行拍照观察。

1.8 Transwell 实验 取 300 μ l 无血清培养基, 4 ℃ 下加入 60 μ l Matrigel, 混匀, 平均加入小室, 置于 37 ℃ 培养箱中孵育 5 h, 将 100 μ l 细胞用无血清培养基清洗 3 次, 配成细胞悬液加入 Transwell 小室, 下室中加入 600 μ l 含有 20% 胎牛血清的培养基, 置于 37 ℃ 培养箱中孵育 24 h, 取出 Transwell 用 PBS 洗 2 次, 5% 戊二醛固定, 0.1% 结晶紫染色 0.5 h 后于荧光显微镜下观测。

1.9 Western blot 实验 收集各组细胞在冰上溶解 25 min。以 12 000 r/min 离心 10 min, 加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液进行总蛋白提取, 用 BCA 试剂盒测定蛋白质含量。提取等量的蛋白质样品 (20 mg), 在 100 ℃ 条件下变性 5 min。使用 SDS-PAGE 凝胶电泳法分离并转移至 PVDF 膜, 在 4 ℃ 条件下加入相应一抗并孵育过夜, 清洗, 然后在 4 ℃ 下加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 孵育 2 h, 最后加入发光液, 曝光处理。ImageJ 软件统计灰度值。

1.10 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件对实验数据进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较采用方差分析法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组织 miR-105 的表达水平 收集 33 例肺癌病人肺癌组织样本, 通过 RT-PCR 检测肺癌组织和癌旁组织中 miR-105 表达水平, 结果如图 1A 所示, 癌旁组织中 miR-105 表达水平低于癌组织; 通过 RT-PCR 检测各组细胞 miR-105 表达水平, 结果如图 1B 所示, 与 Control 组相比较, miR-105 inhibitor 组 miR-105 表达水平降低 ($F = 476.8, P < 0.05$)。

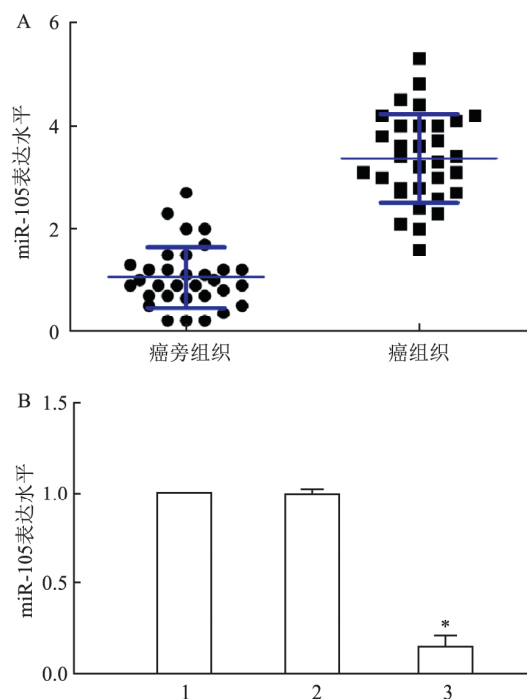


图1 不同组织 miR-105 表达水平

A: 肺癌组织和癌旁组织中 miR-105 表达水平; B: miR-105 表达水平直方图; 1: Control 组; 2: inhibitor 组; 3: miR-105 inhibitor 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$

2.2 基因干扰 miR-105 对 A549 细胞成球率、成球直径影响 通过成球实验检测各组细胞成球率、成球直径, 结果如图 2 所示, 与 Control 组相比较, miR-105 inhibitor 组细胞成球率、成球直径降低 ($F = 40.08, 14.50, P < 0.05$)。

2.3 基因干扰 miR-105 对 A549 细胞 SOX2、OCT4 蛋白表达水平的影响 通过 Western blot 检测各组细胞 SOX2、OCT4 蛋白表达水平, 结果见图 3, 与 Control 组比较, miR-105 inhibitor 组 SOX2、OCT4 蛋白水平降低 ($F = 54.61, 55.21, P < 0.05$)。

2.4 基因干扰 miR-105 对 A549 细胞 CD133⁺ 细胞数的影响 通过流式分选检测各组细胞 CD133⁺ 细胞数, 见图 4, 与 Control 组比较, miR-105 inhibitor 组 CD133⁺ 细胞数降低 ($F = 47.07, P < 0.05$)。

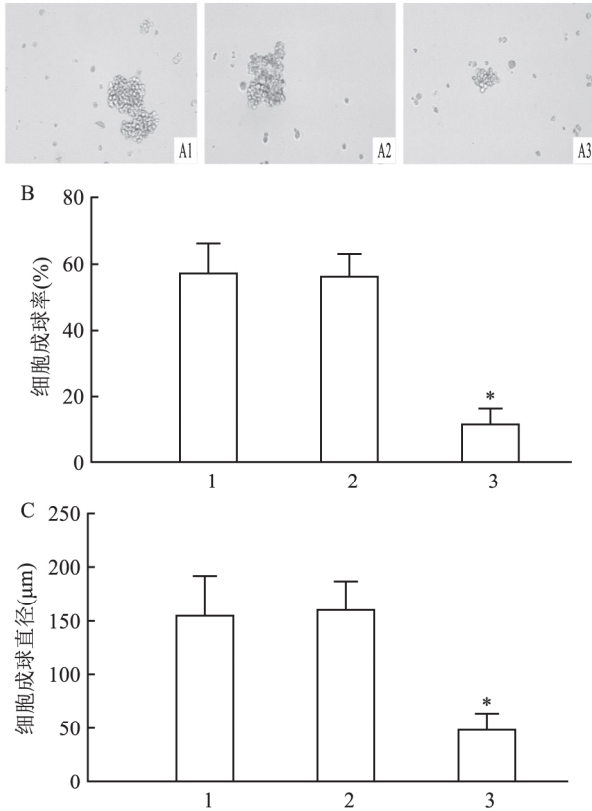


图2 基因干扰 miR-105 对 A549 细胞成球率、成球直径的影响

A: 细胞成球实验 ×200; B: 细胞成球率直方图; C: 细胞成球直径直方图; 1: Control 组; 2: inhibitor 组; 3: miR-105 inhibitor 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$

2.5 基因干扰 miR-105 对 A549 细胞增殖的影响
通过克隆形成实验检测各组细胞增殖情况, 见图 5, 与 Control 组相比较, miR-105 inhibitor 组克隆形成率降低 ($F = 54.41, P < 0.05$)。

2.6 基因干扰 miR-105 对 A549 细胞侵袭和

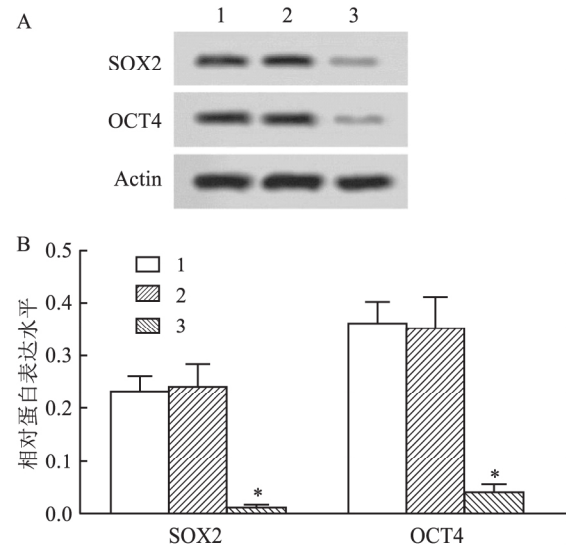


图3 基因干扰 miR-105 对 A549 细胞 SOX2、OCT4 蛋白表达水平的影响

A: SOX2、OCT4 蛋白表达; B: SOX2、OCT4 蛋白表达直方图; 1: Control 组; 2: inhibitor 组; 3: miR-105 inhibitor 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$

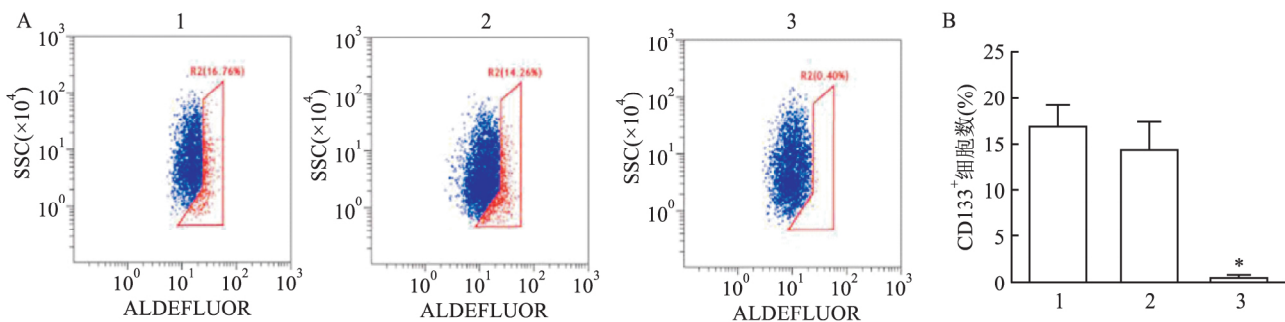


图4 基因干扰 miR-105 对 A549 细胞 CD133⁺ 细胞数的影响

A: 流式分选检测 CD133⁺ 细胞数; B: CD133⁺ 细胞数直方图; 1: Control 组; 2: inhibitor 组; 3: miR-105 inhibitor 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$

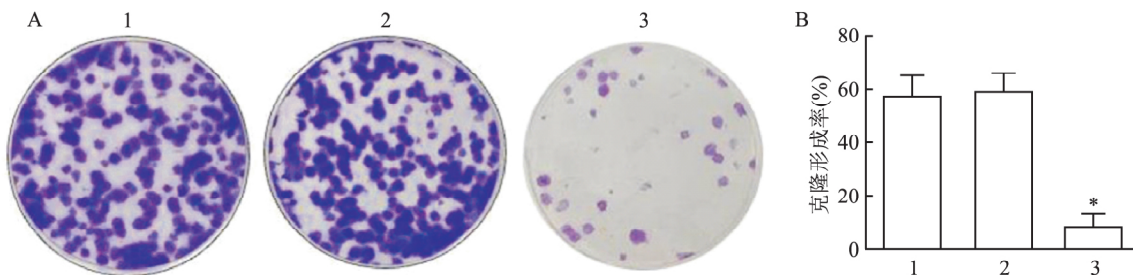


图5 基因干扰 miR-105 对 A549 细胞增殖的影响

A: 克隆形成实验 ×200; B: 细胞克隆形成率直方图; 1: Control 组; 2: inhibitor 组; 3: miR-105 inhibitor 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$

VEGF 蛋白表达水平的影响 通过 Transwell 检测各组细胞侵袭,见图 6A,与 Control 组相比较,miR-105 inhibitor 组侵袭细胞数降低 ($F = 11.34, P < 0.05$);通过 Western blot 检测各组细胞 VEGF 蛋白表达水平,见图 6B,与 Control 组相比较,miR-105 inhibitor 组 VEGF 蛋白水平降低 ($F = 18.48, P < 0.05$)。

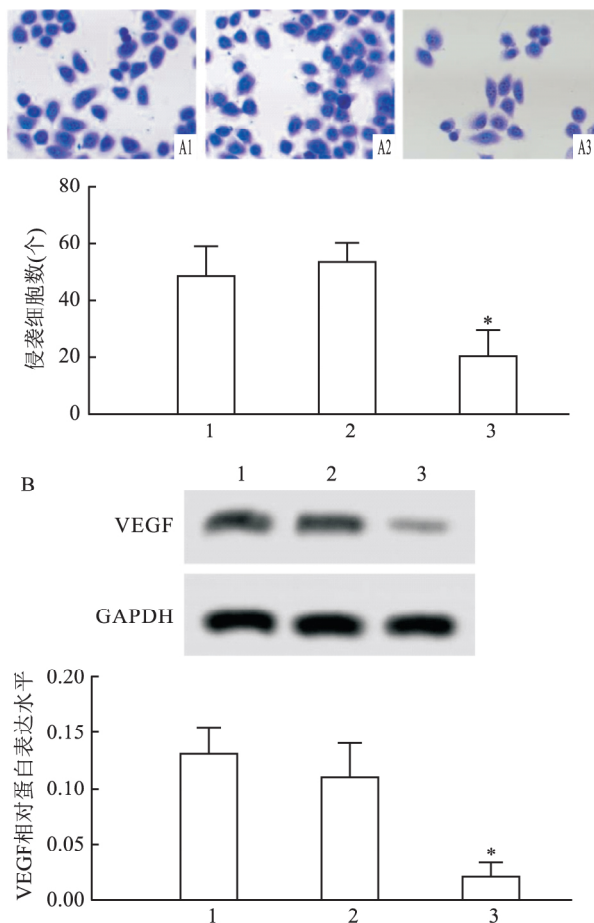


图 6 基因干扰 miR-105 对 A549 细胞侵袭和 VEGF 蛋白表达水平的影响

A: Transwell 检测细胞侵袭 $\times 200$; B: VEGF 蛋白表达; 1: Control 组; 2: inhibitor 组; 3: miR-105 inhibitor 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

肺癌是全世界公认的高度侵袭性肿瘤,在中国肺癌的发病率和死亡率极高。随着科技的进步,早期诊断、手术治疗和靶向治疗已取得了巨大进展,但肺癌患者的预后仍然很差,其 5 年生存率仅为 15%^[8]。新的肿瘤标记物和治疗靶点是未来肺癌诊断治疗的方向。研究^[9]表明 microRNA 在肺癌的病理进程中起重要作用,microRNA 可用于肺癌的早期诊断及治疗。

肿瘤干细胞是存在于肿瘤组织中具有自我更新能力的细胞,其可分化成为不同家族的肿瘤细胞构成整个肿瘤。肿瘤细胞获得干细胞表型后具有较强的成球能力,并分化成其他类型的肿瘤细胞,肿瘤干细胞表型的获得是恶性肿瘤重要的生物学特性,也是肿瘤复发的重要因素之一。研究表明肺癌的发生发展、复发、转移、抗辐射以及耐药性等恶性表型特征都与肺癌干细胞相关^[10]。SOX2 与 OCT4 作为癌症干细胞标志物,在维持干细胞多能性方面起着重要作用,其参与肿瘤细胞的增殖、分化、侵袭、转移、耐药、复发等过程^[11]。CD133 是肿瘤干细胞标志物,在肺癌干细胞的分离、纯化中具有重要作用,与肺癌细胞耐药、预后及靶向治疗密切相关^[12]。夏凡等^[13]研究提示 miR145 通过下调 OCT4 表达抑制 A549 细胞干细胞特性。本研究表明基因干扰 miR-105 具有降低 A549 细胞成球率、成球直径和 CD133⁺ 细胞数,下调 A549 细胞 SOX2、OCT4 蛋白表达水平的作用,提示基因干扰 miR-105 表达可抑制 A549 干细胞样特性。

肺癌细胞的增殖、侵袭是影响肺癌预后及病情转归的重要生物学行为。抑制肺癌细胞增殖和侵袭是治疗肺癌的重要方式。肺癌细胞的增殖、侵袭受到细胞内多种基因的调控。血管生成是肿瘤发展的特征,VEGF 在肿瘤发生发展过程中起着重要作用,通过刺激肺血管内皮细胞分化增殖和迁移、提高血管通透性、浸润淋巴管等促进肺癌的进展和转移。谢易等^[14]研究表明 miR-105 在骨关节炎中通过负向调控 FUT4 影响骨关节炎软骨细胞的增殖和凋亡。Liu et al^[15]研究提示 miR-105 上调通过直接靶向 SOX9 的 mRNA 并抑制下游 TCF4、c-MYC、Cyclin D1 和 AXIN2 蛋白表达来抑制增殖和侵袭并诱导胶质瘤细胞凋亡。该研究表明基因干扰 miR-105 具有抑制 A549 细胞增殖、侵袭和下调 VEGF 蛋白表达水平的作用。

综上所述,该研究表明基因干扰 miR-105 对 A549 细胞干样特性、增殖和侵袭的影响:降低成球率、成球直径和 CD133⁺ 细胞数,下调 A549 细胞 SOX2、OCT4 蛋白表达水平,抑制 A549 细胞增殖、侵袭和下调 VEGF 蛋白表达水平。该文为非小细胞肺癌的靶向治疗提供了一定的实验依据。

参考文献

- [1] Zhao Y F, Han M L, Xiong Y J, et al. A miRNA-200c/cathepsin L feedback loop determines paclitaxel resistance in human lung

- cancer A549 cells *in vitro* through regulating epithelial-mesenchymal transition [1]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(6): 1034 – 47.
- [2] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87 – 108.
- [3] Bhardwaj V, Mandal A. Next-generation sequencing reveals the role of epigallocatechin-3-gallate in regulating putative novel and known microRNAs which target the MAPK pathway in non-small-cell lung cancer A549 cells [J]. *Molecules*, 2019, 24(2): 368.
- [4] Wang H, Zhu L J, Yang Y C, et al. MiR-224 promotes the chemoresistance of human lung adenocarcinoma cells to cisplatin *via* regulating G1/S transition and apoptosis by targeting p21WAF1/CIP1 [J]. *Br J Cancer*, 2014, 111(2): 339 – 54.
- [5] 吴庭苗, 马雨水, 卢改霞, 等. miR-105-1 在原发性肝癌中表达的研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(4): 542 – 5.
- [6] Jin X F, Yu Y, Zou Q, et al. MicroRNA-105 promotes epithelial-mesenchymal transition of nonsmall lung cancer cells through up-regulating Mcl-1 [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 120(4): 5880 – 8.
- [7] 继 聪, 王 薇, 刘建伟, 等. miR-105 靶向负调控 KIFC1 抑制非小细胞肺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力 [J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(8): 1432 – 8.
- [8] Su C Y, Cheng X, Li Y S, et al. MiR-21 improves invasion and migration of drug-resistant lung adenocarcinoma cancer cell and transformation of EMT through targeting HBP1 [J]. *Cancer Med*, 2018, 7(6): 2485 – 503.
- [9] Ma J, Lin Y, Zhan M, et al. Differential miRNA expressions in peripheral blood mononuclear cells for diagnosis of lung cancer [J]. *Lab Invest*, 2015, 95(10): 1197 – 206.
- [10] Liu L, Zhang L, Yang L, et al. Anti-CD47 antibody as a targeted therapeutic agent for human lung cancer and cancer stem cells [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 404.
- [11] Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, et al. Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy [J]. *Ann Surg Oncol*, 2009, 16(12): 3488 – 98.
- [12] 马雪曼, 张培彤. CD133 肿瘤干细胞标志物在肺癌中的应用进展 [J]. *中国肿瘤*, 2014, 23(3): 224 – 7.
- [13] 夏 凡, 王仪民, 王 辉. P53 通过促进 miR-145 的表达抑制肺腺癌 A549 细胞的干细胞特性 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(1): 58 – 63.
- [14] 谢 易, 魏 杰, 龚泰芳. miR-105 靶向调控 FUT4 影响骨关节炎软骨细胞增殖和凋亡的研究 [J]. *中华骨与关节外科杂志*, 2019, 12(6): 458 – 63.
- [15] Liu X Y, Wang H Q, Zhu Z Y, et al. MicroRNA-105 targets SOX9 and inhibits human glioma cell progression [J]. *FEBS Lett*, 2016, 590(23): 4329 – 42.

Gene interference miR-105 inhibits the stem cell-like characteristics, malignant proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells

Li Jiyan¹, Ma Xin², Zhang Canbin¹, et al

(¹Dept of Chest Surgery, ²Dept of Rheumatology,

The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000)

Abstract Objective To investigate the effects of gene interference with miR-105 on stem cell-like characteristics, malignant proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells. **Methods** RT-PCR was used to detect the expression level of miR-105 in lung tissues and adjacent tissues of 33 patients with lung cancer. After transfection of miR-105 inhibitor into A549 cells, the cells were randomly divided into three groups: Control group, inhibitor-NC group and miR-105 inhibitor group for follow-up experiments. The expression level of miR-105 was detected by RT-PCR. The pellet formation rate and pellet formation diameter were measured by pellet formation experiment. Western blot was used to detect the expression levels of SOX2 and OCT4 proteins. The number of CD133 positive cells was determined by flow separation. Cell proliferation was detected by clone formation assay. Transwell was used to detect cell invasion; Western blot was used to detect VEGF protein expression level. **Results** The results showed that the expression level of miR-105 in paracancer tissues was lower than that in cancer tissues. Compared with the Control group, miR-105 inhibitor group of miR-105 expression level decreased ($P < 0.05$), the cells into a ball rate, into a ball diameter decreased ($P < 0.05$), SOX2, OCT4 protein levels ($P < 0.05$) and CD133 positive cells were lower ($P < 0.05$), clone formation rate was lower ($P < 0.05$), invasive cells were lower ($P < 0.05$), VEGF protein levels were lower ($P < 0.05$). **Conclusion** Gene interference with miR-105 can well inhibit stem cell-like characteristics, malignant proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells.

Key words non-small cell lung cancer; microRNA-105; stem cell like characteristics; invasion