

转染 microRNA-330-5p 对肺癌细胞侵袭和迁移能力的影响

王 剑¹, 陈清勇², 张晓敏¹, 何 聪¹

(1. 浙江中医药大学第二临床医学院, 浙江 杭州 310053;

2. 中国人民解放军第一一七医院, 浙江 杭州 310004)

摘 要: [目的] 探讨 miR-330-5p 表达对肺癌细胞增殖、侵袭和迁移能力等生物学行为的影响, 揭示 miR-330-5p 的作用机制。[方法] 分析非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞系 95C 和 95D 的 miRNA 表达谱芯片中 miR-330-5p 的表达情况并用靶标软件预测其靶基因; 转染 miR-330-5p 类似物 (mimics) 至 95D、转染 miR-330-5p 抑制剂 (inhibitor) 至 95C 中, 应用 CCK-8 法、transwell 小室法检测 miR-330-5p 对肺癌细胞增殖、侵袭迁移等生物学行为的影响; 应用 Western blot 法检测 miR-330-5p 表达对哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 表达水平的影响。[结果] miRNA 表达谱芯片显示 miR-330-5p 在 95D 中表达明显低于 95C; 靶标预测软件预测 *mTOR* mRNA 可能是 miR-330-5p 的靶基因; 转染 miR-330-5p mimics 后 95D 细胞增殖能力显著降低, 其 24h 侵袭穿膜细胞数明显低于对照组, mTOR 蛋白表达明显下调 ($P < 0.01$); 而转染 miR-330-5p inhibitor 后 95C 细胞的增殖能力增强, 其 24h 侵袭穿膜细胞数较对照组明显增加, mTOR 蛋白表达上调 ($P < 0.01$)。[结论] 提高 miR-330-5p 表达能够明显抑制肺癌细胞的增殖、侵袭与迁移能力, *mTOR* mRNA 可能是其重要的靶基因。

主题词: miR-330-5p; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR); 肺肿瘤; 侵袭; 增殖

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X (2014) 08-0648-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.08.B008

Impact of Transfection of MiR-330-5p on the Invasion and Metastasis of Lung Cancer Cells

WANG Jian¹, CHEN Qing-yong², ZHANG Xiao-min¹, et al.

(1. The 2nd Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. The 117th Hospital of PLA, Hangzhou 310004, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of miR-330-5p on the proliferation, invasion and metastasis ability of lung cancer cells and to reveal the possible mechanisms of miR-330-5p. [Methods] The expression level of miR-330-5p in non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines 95C and 95D was detected by miRNA expression profile chip technology, and the target genes were predicted by target genes prediction software. MiR-330-5p analogue (mimics) was transfected to high metastatic lung cancer cells (95D), while miR-330-5p (inhibitor) was transfected to low metastatic lung cancer cells (95C). The proliferation, invasion and metastasis ability of lung cancer cells was detected by CCK-8 and Transwell Chambers method, and the expression level of mTOR protein was determined by Western blot method. [Results] The results of miRNA expression profile chip showed that the expression level of miR-330-5p down-regulated in 95D and was significantly lower than that in 95C. *mTOR* mRNA may be a target gene of miR-330-5p predicting by target genes prediction software. After transfected with miR-330-5p mimics, the proliferation ability of 95D cells obviously decreased, the 24h number of cells with infiltration of membrane was significantly lower than that of the controls ($P < 0.01$), and the expression of mTOR protein down-regulated ($P < 0.01$). While after transfected with miR-330-5p inhibitor, the proliferation ability of 95C obviously increased, the 24h number of cells with infiltration of membrane was significantly higher than that of the controls ($P < 0.01$), and the expression of mTOR protein up-regulated ($P < 0.01$). [Conclusion] Increasing the miR-330-5p expression level might significantly inhibit the proliferation, invasion and metastasis ability of lung cancer cells, and *mTOR* mRNA may be a target gene of miR-330-5p.

Subject words: miR-330-5p; mammalian target of rapamycin (mTOR); lung neoplasms; infiltration; proliferation

微小 RNA (microRNA) 是指长度约 21~25nt 的

基金项目: 南京军区“334”高层次科技人才培养工程; 浙江省科技计划项目 (2013C33209); 杭州市医疗卫生科研项目 (20130633B29)

通讯作者: 陈清勇, 主任医师, 博士; 解放军第一一七医院呼吸科, 浙江省杭州市江干区机场路 40 号 (310004); E-mail: cqyong117@163.com

收稿日期: 2014-04-30; **修回日期:** 2014-06-22

某些特殊的小型非编码 RNA, 能与靶 mRNA 的 3' UTR 通过不完全碱基互补配对方式结合, 在转录水平促进靶 mRNA 的降解, 抑制其翻译过程, 从而发挥负调控基因表达作用^[1]。研究显示, miR-330 与许

多肿瘤的增殖和转移密切相关^[2],我们对 miR-330-5p 与肺癌的关系进行研究。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)在肺癌发生、发展、治疗和预后中具有重要的作用^[3],miR-330-5p 是否与其存在调控关系目前尚无报道。本研究通过设计高转移性肺癌细胞 95D 中过表达 miR-330-5p 和低转移性肺癌细胞 95C 中低表达 miR-330-5p 的方法,研究 miR-330-5p 对肺癌细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响及其与 mTOR 表达水平的关系,揭示其可能存在的相关信号通路,为进一步深入研究肺癌的诊断、治疗及判断预后提供可靠依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

NSCLC 细胞系 95D、95C(解放军第一一七医院呼吸病实验室提供)。

1.1.2 实验试剂及仪器

RPMI 1640 (GIBCO 公司),二甲基亚砜(dimethylsulfoxide,DMSO,杭州化学试剂有限公司),mTOR 兔多克隆抗体(Cell Signaling 公司), β -actin 鼠单抗(Sigma 公司),辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)和辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG(杭州联科生物有限公司),Trizol 试剂(Gibco 公司),CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所),Transwell Chamber 8 μ m 孔径(美国 Costar 公司),Western blot luminol 试剂盒(以色列 Biological Industries 公司),PVDF 膜(MILLIPORE 公司),Tween-20(AMRESCO 分装)。成像仪(美国 BIO-RAD 公司),分光光度计 721 型(上海光谱仪器有限公司),高速低温离心机(德国 Sorvall 公司),倒置荧光显微镜(美国 LEICA 公司),垂直电泳仪(美国 BIO-RAD 公司),电泳转膜仪(美国 BIO-RAD 公司),显微镜成像系统(日本 NIKON 公司)。

miR-330-5p mimics 及 negative control 均为购自上海吉玛制药技术有限公司的双链 siRNA,其基因序列分别为:miR-330-5p mimics:(forward) 5'-UCU-CUGGGCCUGUGUCUUAGGC-3',(reverse) 5'-CUAA-GACACAGGCCCCAGAGAUU-3';negative control(NC):(forward) 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',(re-

verse) 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。miR-330-5p inhibitor 及 negative control 购自上海诺百生物科技有限公司,其基因序列为:miR-330-5p inhibitor:5'-GCCUAAGACACAGGCCCCAGAGA-3',negative control (NC):(forward) 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',(reverse) 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。

1.2 方法

1.2.1 miRNA 表达谱芯片检测

取约 10^7 处于对数生长期的 95D 和 95C 细胞,常规细胞培养,用 Trizol 试剂提取总 RNA;取 40 μ g 总 RNA 送上海诺百公司应用 TaqMan Array Human MicroRNA A+B Cards Set v3.0 芯片进行 miRNA 芯片检测。

1.2.2 miRanda 软件预测 miR-330-5p 靶基因

miRanda 软件(<http://www.microrna.org/microrna/home.do>)预测 mTOR mRNA 是否为 miR-330-5p 的靶基因。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞增殖

收集对数期细胞,调整细胞悬液浓度,96 孔板每孔加入 100 μ l 培养基铺板,使待测细胞密度调至 5 000cells/孔,分为:95D 空白对照组(control 组)、95D 阴性对照组(95D-negative control 组)与 95D miR-330-5p 转染组(miR-330-5p mimics 组);95C 空白对照组(control 组)、95C 阴性对照组(95C-negative control 组)与 95C miR-330-5p 转染组(miR-330-5p inhibitor 组),边缘孔用无菌 PBS 填充,5%CO₂、37℃ 孵育培养过夜。分别在 24、48、72、96h 时检测细胞增殖情况:每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液,继续培养 4h,在酶标仪 A₄₅₀ 处测量各孔的吸光值。按下列公式计算细胞存活率:细胞存活率(%)=(实验组 A 值-空白对照组 A 值)/(阴性对照组 A 值-空白对照组 A 值) $\times$ 100%。

1.2.4 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

Transwell 培养板上室加入 200 μ l 无血清培养基制备的细胞悬液(3×10^4 个),下室加入 10%胎牛血清的培养基 600 μ l,37℃、5%CO₂ 培养 12h。小心取出上室,并做好标记,用 PBS 清洗 3 次,用冰预冷的甲醇固定 30min,结晶紫染色 45min,用 PBS 清洗,棉签擦去上室未转移细胞。倒置显微镜下计数移至微孔膜下层的细胞,每个样本计数 5~10 个视野。使用 Image-pro Plus 软件计数。

1.2.5 Western blot 检测细胞内 mTOR 蛋白表达水平

取 1ml PBS(4℃预冷)洗涤细胞 2 次后,每孔细胞加 100μl RIPA 裂解液,于冰上裂解 30min,用枪将细胞碎片和裂解液移至 1.5ml 离心管中,于 4℃下 12 000r/min 离心 10min,将上清分装到 0.5ml 的离心管中-80℃保存,用 BCA 法蛋白含量的测定试剂盒测定样品中的蛋白含量。取 30μg 总蛋白,煮沸变性后在 12%SDS-PAGE 电泳 (120V 恒压电泳 2h),取出水凝胶,100V 1h 转印至 PVDF 膜,将转印膜移至含有 50g/L 的脱脂牛奶粉液的平皿中,摇床上封闭 2h,再加 mTOR 兔多克隆抗体、β-actin 鼠单抗 (1:1 000 稀释),4℃孵育过夜,洗膜后与羊抗兔 IgG、羊抗鼠 IgG 二抗 (1:10 000 稀释)接触,室温下孵育 2h,洗膜后添加 ECL 发光试剂进行 X 胶片曝光,凝胶图象处理系统分析目标带光密度值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。数据统计采用 $\bar{x}\pm s$, 两两比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 miRNA 表达谱芯片结果

应用 TaqMan Array Human MicroRNA A +B Cards Set v3.0 芯片检测,共发现 21 个与 95D 细胞及 95C 细胞相关的 microRNA,其中 12 个 microRNA 表达下调,9 个 microRNA 表达上调,而 miR-330-5p 在高转移性的 95D 中表达明显低于低转移性的 95C 细胞(Table 1)。

2.2 miRNA 靶 mRNA 预测结果

miRanda 靶基因预测软件显示 *mTOR* mRNA 的 3'UTR 区的某些保守位点与 miR-330-5p 高分数匹配(达 90%),提示 *mTOR* 可能是 miR-330-5p 的靶基因(Figure 1)。

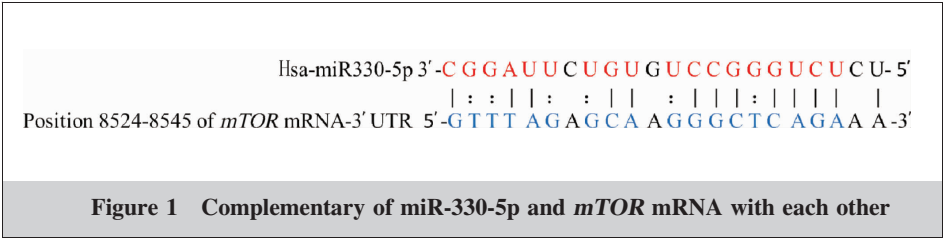


Table 1 The different expression levels of miR-330-5p in 95D and 95C cells showed by miRNA expression profile chip

MiRBase_human_18th	Absolute value (95D vs 95C)	Delta Ct of 95D (95D vs 95C)	Avg Delta Ct of 95C	Avg Delta Ct of 95D	Fold change (95D/95C)	Style
Hsa-miR-15a-5p	9.500641	9.500641	11.123661	20.624302	0.001380454	Down
Hsa-miR-202-3p	9.207548	9.207548	7.453230	16.660778	0.001691422	Down
Hsa-miR-330-5p	9.125927	9.125927	11.498375	20.624302	0.001789873	Down
Hsa-miR-485-5p	7.333627	7.333627	13.290675	20.624302	0.006199523	Down
Hsa-miR-205-5p	6.878516	6.878516	13.745786	20.624302	0.008498854	Down
Hsa-miR-184	6.645562	6.645562	13.978740	20.624302	0.009988183	Down
Hsa-miR-26b-3p	6.187652	6.187652	14.164925	20.352577	0.013719274	Down
Hsa-miR-153	6.153619	6.153619	14.470683	20.624302	0.014046758	Down
Hsa-miR-522-3p	6.018767	6.018767	14.605535	20.624302	0.015423062	Down
Hsa-miR-511	5.933036	5.933036	14.691266	20.624302	0.016367344	Down
Hsa-miR-544a	5.843255	5.843255	14.781047	20.624302	0.017418268	Down
Hsa-miR-541-3p	5.396539	5.396539	15.227763	20.624302	0.023739955	Down
Hsa-miR-25-5p	7.515235	7.515235	20.607635	13.092400	182.9410467	Up
Hsa-miR-34b-5p	6.575157	6.575157	20.607635	14.032478	95.34973342	Up
Hsa-miR-125b-5p	6.267791	6.267791	20.607635	14.339844	77.05362900	Up
Hsa-miR-363-5p	5.645309	5.645309	20.607635	14.962326	50.05037593	Up
Hsa-miR-641	5.595001	5.595001	20.607635	15.012634	48.33515624	Up
Hsa-miR-155-3p	5.420246	5.420246	20.607635	15.187389	42.82098272	Up
Hsa-miR-124-3p	5.392210	5.392210	21.141695	15.749485	41.99687280	Up
Hsa-miR-589-5p	5.391115	5.391115	21.141695	15.750580	41.96500943	Up
Hsa-miR-424-3p	5.227765	5.227765	17.295204	12.067439	37.47262140	Up

2.3 CCK-8 实验结果

上调 miR-330-5p 使 95D 细胞的增殖率明显低于对照组 (P 值均为 0.00), 下调 miR-330-5p 使 95C 细胞的增殖率高于对照 (P 值均为 0.00) (Figure 2)。

2.4 Transwell 结果

mimic 转染 95D 细胞 24h 后, 其侵袭穿膜细胞数与 control 组和 negative control (NC) 组比较明显减少 (P 值均为 0.00), control 组与 NC 组之间则无统计学差异 ($P=0.054$)。而 inhibitor 转染 95C 细胞 24h 后, 其侵袭穿膜的细胞数较 control 组和 NC 组明显

增加 (P 值均为 0.00), control 组与 NC 组之间则无统计学差异 ($P=0.424$) (Figure 3, Table 2)。

2.5 Western blot 检测结果

与 control 组和 NC 组比较, 转染 miR-330-5p mimics 后, 95D 细胞的 mTOR 水平表达下调 (P 值均为 0.00), control 组与 NC 组之间比较则无统计学差异 ($P=0.111$)。而 95C 转染 miR-330-5p inhibitor 后, 其 mTOR 的蛋白表达水平较 control 组和 NC 组上调 (P 值分别为 0.001 和 0.002), control 组与 NC 组之间比较则无统计学差异 ($P=0.577$) (Figure 4, Table 3)。

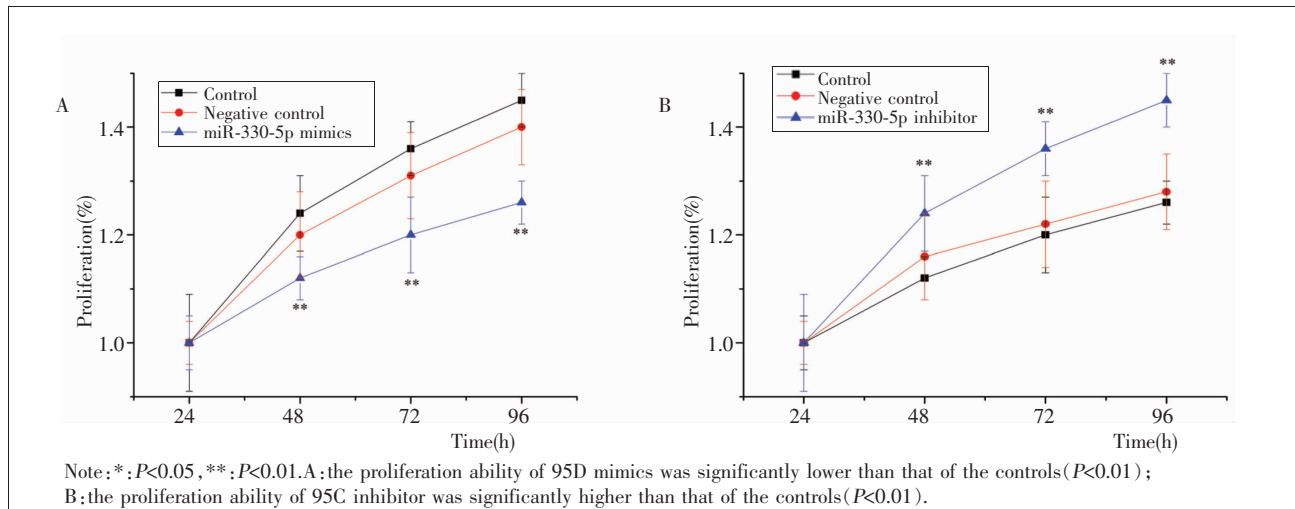


Figure 2 The effect of lung cancer cells on the proliferation ability after transfected with miR-330-5p

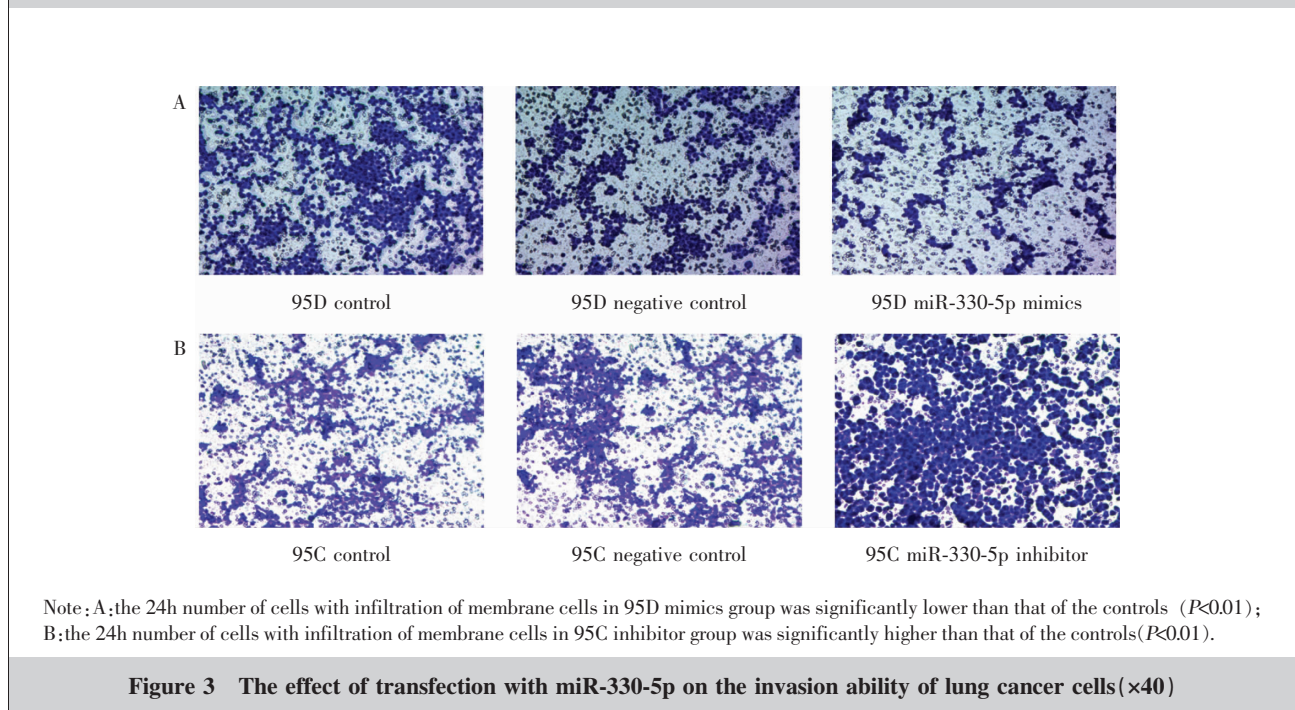


Figure 3 The effect of transfection with miR-330-5p on the invasion ability of lung cancer cells ($\times 40$)

Table 2 The effect of transfection with miR-330-5p on the invasion ability of the lung cancer cells($\bar{x}\pm s$)

Groups	Number of cells with infiltration of membrane	F	P
95D control group	613±41.23	58.665	<0.01
95D NC group	692±48.79		
95D miR-330-5p mimics group	381±7.55*		
95C control group	823±84.51	36.651	<0.01
95C NC group	866±48.60		
95C miR-330-5p inhibitor group	1214±42.47**		

Note:*,compared with 95D control group and NC group, $P<0.01$;
**,compared with 95C control group and NC group, $P<0.01$.

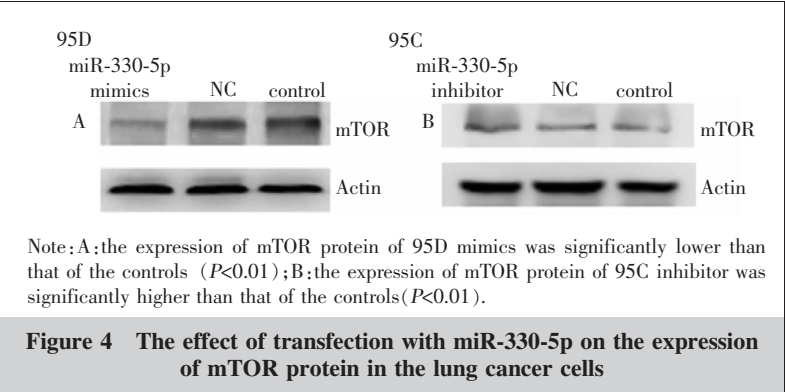


Table 3 The effect of transfection with miR-330-5p on the expression of mTOR protein in the lung cancer cells($\bar{x}\pm s$)

Groups	mTOR	F	P
95D control group	0.757±0.011	344.449	<0.01
95D NC group	0.731±0.026		
95D miR-330-5p mimics group	0.429±0.062*		
95C control group	0.386±0.023	20.024	<0.01
95C NC group	0.399±0.029		
95C miR-330-5p inhibitor group	0.519±0.031**		

Note:*,compared with 95D control group and NC group, $P<0.01$;
**,compared with 95C control group and NC group, $P<0.01$.

3 讨 论

很多研究已报道，一些 microRNA 对肺癌细胞增殖和侵袭能力具有不同的调控作用，如 miR-206 可抑制肺癌细胞增殖和转移^[4]，而 miR-544a 可抑制钙黏素表达从而促进肺癌转移^[5]。miR-330-5p 是新近发现的一种 microRNA，目前尚无关于 miR-330-5p 与肿瘤分化、增殖及转移关系的研究，其对肺癌细胞增殖和转移是促进还是抑制作用及相关机制尚不明确。本研究利用 miRNA 表达谱芯片技术，发现 miR-330-5p 在高转移性的 95D 细胞中低表达，而在

低转移性的 95C 细胞中相对 95D 细胞高表达。我们猜测，正是这种表达的差异导致两种细胞株恶性程度的不同，即 miR-330-5p 低表达可能增加了肺癌细胞的恶性程度，增加 miR-330-5p 表达可能抑制肺癌细胞的增殖和转移能力，削弱其恶性程度。因此，我们设计在高转移性的 95D 细胞中增加 miR-330-5p 的表达，即转染 miR-330-5p mimics；在低转移性的 95C 细胞中降低 miR-330-5p 表达，即转染 miR-330-5p inhibitor，再进一步应用 CCK-8 法、Transwell 实验证实，增加 miR-330-5p 表达后，95D 细胞增殖速度及侵袭、迁移能力明显弱于对照 ($P<0.01$)，而降低 miR-330-5p 表达的 95C 细胞，其增殖速度及侵袭、迁移能力明显强于两对照 ($P<0.01$)。这说明，miR-330-5p 对肺癌细胞增殖、侵袭和迁移具有抑制作用。

虽然上述方法证实 miR-330-5p 可抑制肺癌细胞增殖、侵袭和迁移，但其作用机制尚不明确。研究显示，mTOR 是调控蛋白质翻译和细胞周期进展的核心调控者，可调控肿瘤细胞增殖和侵袭^[6]，而阻断 PI3K/AKT/mTOR 信号通路，可抑制下游蛋白合成，从而诱导肺癌细胞自噬和凋亡^[7]。国外研究显示，mTOR mRNA 可作为一些 miRNA 的靶基因，从而抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭，诱导细胞凋亡。如 Hu 等^[8]发现，miR-99a 可直接抑制 mTOR 蛋白表达，从而引起乳腺癌细胞的凋亡；Imam 等^[9]发现，miRNA-204 通过降低 mTOR 蛋白表达，可显著抑制一些肿瘤细胞的增殖、侵袭能力。miR-330-5p 已被上述实验证实可抑制肺癌细胞增殖和侵袭能力，然而其是否通过调控 mTOR mRNA 转录来实现还需证实。我们在实验前期应用 miRanda 靶基因预测软件预测到 mTOR mRNA 的 3' UTR 区的某些保守位点与 miR-330-5p 基因序列高分匹配，匹配分数可达 90%，这意味着 mTOR mRNA 很有可能是 miR-330-5p 的靶基因。为进一步

验证两者间是否存在调控关系,我们应用 Western blot 发现,转染 miR-330-5p mimics 后,95D 细胞的 mTOR 蛋白表达明显低于对照组 ($P<0.01$),而转染 miR-330-5p inhibitor 能使 95C 的 mTOR 蛋白表达高于对照组 ($P<0.01$),从而在蛋白水平证实 miR-330-5p 可通过调节 mTOR 表达来调控肺癌细胞的行为,抑制其增殖和迁移能力。

综上所述,miR-330-5p 在肺癌细胞中低表达,提高其表达水平可显著抑制癌细胞增殖、侵袭和迁移能力,其作用机制可能是通过抑制靶基因 *mTOR* mRNA 转录 mTOR 蛋白,miR-330-5p 可作为肺癌分子靶向治疗的潜在靶位基因。

参考文献:

- [1] Lund E, Güttinger S, Calado A, et al. Nuclear export of microRNA precursors[J]. Science, 2004, 303(5654): 95-98.
- [2] Ruike Y, Ichimura A, Tsuchiya S, et al. Global correlation analysis for micro-RNA and mRNA expression profiles in human cell lines[J]. J Hum Genet, 2008, 53(6): 515-523.
- [3] Conde E, Angulo B, Tang M, et al. Molecular context of the EGFR mutations: evidence for the activation of mTOR/S6K signaling[J]. Clin Cancer Res, 2006 12(3 Pt 1): 710-717.
- [4] Wang X, Ling C, Bai Y, et al. MicroRNA-206 is associated with invasion and metastasis of lung cancer [J]. Anat Rec, 2011, 294(1): 88-92.
- [5] Mo X, Zhang F, Liang H, et al. miR-544a promotes the invasion of lung cancer cells by targeting cadherina 1 in vitro [J]. Onco Targets Ther, 2014, 7: 895-900.
- [6] Tsurutani J, Fukuoka J, Tsurutani HJ, et al. Evaluation of two phosphorylation sites improves the prognostic significance of Akt activation in non-small-cell lung cancer tumors[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(2): 306-314.
- [7] Li YC, He SM, He ZX, et al. Plumbagin induces apoptotic and autophagic cell death through inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway in human non-small cell lung cancer cells[J]. Cancer Lett, 2013, 344(2): 239-259.
- [8] Hu Y, Zhu Q, Tang LL. MiR-99a antitumor activity in human breast cancer cells through targeting of mTOR expression[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e92099.
- [9] Imam JS, Plyler JR, Bansal H, et al. Genomic loss of tumor suppressor miRNA-204 promotes cancer cell migration and invasion by activating AKT/mTOR/Rac1 signaling and actin reorganization[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e52397.

关于启用稿件远程处理系统的通知

本刊已启用稿件远程处理系统,该系统包括作者在线投稿/查询、主编办公、专家审稿、编辑办公等功能,通过网上投稿、网上查稿、网上审稿,实现作者、编辑、审稿专家的一体化在线协作处理,从而构建一个协作化、网络化、角色化的编辑稿件业务处理平台。对于广大作者而言,该系统最大的优点是支持在线投稿,方便作者及时了解稿件处理进程,缩短稿件处理时滞。使用过程中具体注意事项如下:

(1)第1次使用本系统投稿的作者,必须在“作者登录”中先注册,才能投稿。注册时各项信息请填写完整。作者自己设定用户名和密码,该用户名密码长期有效。

(2)已注册过的作者,请不要重复注册,否则将导致查询稿件信息不完整。如果遗忘密码,可以致电编辑部查询。

(3)作者投稿请点击“作者登录”,登录后按照提示操作即可。投稿成功后,系统自动发送回执邮件,作者投稿后请随时关注邮箱提示,也可随时点击“作者登录”,获知该稿件的审理情况、处理进展、审稿意见等。

稿件远程处理系统启用后,我刊只接受网上投稿,不再接收电子邮件投稿和纸质稿,《肿瘤学杂志》网址:
<http://www.chinaoncology.cn>

如有任何问题,请与编辑部联系!联系电话:0571-88122280。

《肿瘤学杂志》编辑部