

肺癌组织中 miRNA-449a 的表达及其临床意义^{*}

林剑勇¹, 邓益斌^{2△}, 罗艳红², 陆小婵², 黄永秩² (右江民族医学院附属医院: 1. 呼吸内科; 2. 医学检验科, 广西百色 533000)

【摘要】 目的 探讨 miRNA-449a 在肺癌细胞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 日至 2013 年 6 月 30 日收治的 58 例肺癌患者作为研究对象, 采用逆转录荧光定量聚合酶链反应检测 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($t=6.712, P<0.05; t=4.572, P<0.05$), 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

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.03.011 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)03-0314-03

Expression and its clinical significance of miRNA-449a in lung cancer^{*} LIN Jian-yong¹, DENG Yi-bin^{2△}, LUO Yan-hong², LU Xiao-chan², HUANG Yong-zhi² (1. Department of Respiratory; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Youjiang Medical College for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the expression and its clinical significance of miRNA-449a in lung cancer. **Methods** Totally 58 patients with lung cancer were selected as research objects from Affiliated Hospital of Youjiang Medical College for Nationalities on January 1, 2011 to June 30, 2013. The expression of miRNA-449a in lung cancer tissues and matched normal tissues were detected by real time PCR. And the relationship between clinical pathological features and the level of miRNA-449a were analysed. Fluorescent electronic microscope 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($t=6.712, P<0.05; t=4.572, P<0.05$; 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 $P>0.05$. Compared with negative control group, miRNA-449a mimics could induce apoptosis of lung cancer cell 95D with dose-effect dependent. **Conclusion** miRNA-449a is lower expression in lung cancer, can induced apoptosis, which maybe play a role as a tumor suppressor gene, and as a new molecular targets of early diagnosis and treatment of lung cancer.

【Key words】 miRNA-449a; lung cancer; microRNAs; molecular diagnostic

microRNA(miRNA)是近年来新发现的一种内源性、非编码单链小分子 RNA, 长度约为 20~25 个核苷酸, 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, 本研究拟采用逆转录荧光定量聚合酶链反应(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, 并观察其模拟物对人肺癌细胞株 95D 细胞

凋亡的影响, 探讨其生物学功能。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2011 年 1 月至 2013 年 6 月在本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 40 例, 女 18 例; 鳞癌 22 例, 腺癌 36 例; 年龄大于或等于 50 岁 42 例, 年龄小于 50 岁 16 例; 瘤体大于或等于 5 cm 38 例, 瘤体小于 5 cm 20 例, 取肺癌组织及远端对照正常组织(距癌组织大于 5 cm)。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 30 min 内保存于液氮中。人肺癌细胞株 95D 细胞用 10% 胎牛血清(含氨基酸和

^{*} 基金项目: 广西壮族自治区自然科学基金(2011GXNSFA04215)。

作者简介: 林剑勇, 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事呼吸系统疾病, 尤其是肺癌的基础与临床研究。

[△] 通讯作者, E-mail: dengyb75@163.com。

葡萄糖)的培养基于 37 ℃、5%CO₂ 湿化培养箱中培养。

1.2 仪器与试剂 Tizol 试剂盒、Lipofectamin™ 2000 等购自美国 Invitrogen 公司;逆转录荧光定量 PCR 试剂盒购自上海生工生物工程股份有限公司;AnnexinV-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。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 提取 从液氮中取组织约 500 mg,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 亮度比值大于 2.0 认为提取的 RNA 完整性良好。

1.3.2 miRNA-449a 定量检测 采用逆转录荧光定量 PCR 技术,以 U6 为内参。(1)内参 U6 引物设计:U6 逆转录引物为 5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA AAA TAT GGA ACT GC-3',上游引物为 5'-GGG TGC TCG CTT CGG CAG C-3',下游引物为 5'-CAG TGC AGG GTC CGA GGT-3'。(2)总 RNA 逆转录为 cDNA:利用逆转录引物,把总 RNA 逆转录为 cDNA,其反应体系为 10× 逆转录缓冲液 1.5 μL,100 nmol/L dNTPs 0.15 μL,逆转录酶 1.0 μL,RNase 抑制剂 0.19 μL,逆转录引物 3.0 μL,总 RNA 5.0 μL,加焦碳酸二乙酯(DEPC)水至 15 μL,轻轻混匀后,16 ℃ 30 min;42 ℃ 60 min;85 ℃ 5 min;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,逆转录产物 1 μL,加 DEPC 水至 20 μL,置 ABI 7500 荧光 PCR 仪上按照 95 ℃ 5 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 45 s 反应 40 个循环,采集数据分析结果。

1.3.3 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 细胞进行分析,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。

1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 对数据进行统计分析。试验资料中的计量资料均做正态性检验。符合正态分布的资料,多组间比较行单因素方差分析及 *t* 检验;若不符合正态分布,两组各指标间的比较采用两独立样本非参数 Mann-Whitney *U* 检验,多组间比较行 Kruskal-Wallis 分析。检验水准 α=0.05,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 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 污染。图 1 显示,28S、18S 条带清晰,28S/18S 亮度比值大于 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 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*<0.05)。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(*t*=6.712,*P*<0.01;*t*=4.572,*P*<0.01);鳞癌组 miRNA-449a 表达量与腺癌组相比较,差异无统计学意义(*P*>0.05)。

2.2 miRNA-449a 表达与临床病理特征关系 见表 1。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、临床分期和瘤体大小)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 表达与瘤体大小有关(*P*<0.05),与其他临床病理特征无相关性(*P*>0.05)。

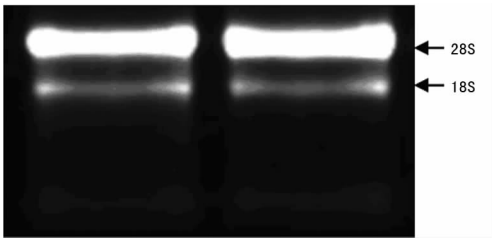


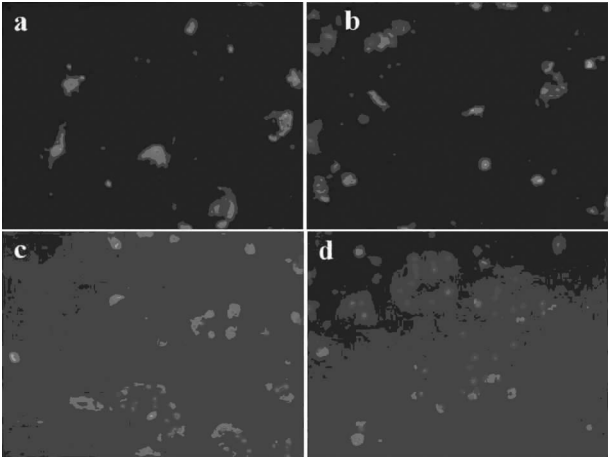
图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

表 1 58 例肺癌患者 miRNA-449a 表达与临床病理特征关系(±s)

临床特征		<i>n</i>	miRNA-449a 相对表达量	<i>U</i>	<i>P</i>
年龄(岁)	<50	16	1.88±0.78	920.000	0.615
	≥50	42	1.83±0.91		
性别	男	40	1.91±0.93	800.000	0.215
	女	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(cm)	<5	20	1.23±0.73	78.412	0.012
	≥5	38	0.62±0.59		

注:* Kruskal Wallis 检验;其余 Mann-Whitney 检验。

2.3 miRNA-449a 模拟物对细胞凋亡的影响 转染 48 h 后,采用 MTT 比色法测定各组 *A* 值,阴性对照组、10 mg/mL 组和 20 mg/mL 组 *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*<0.05)。图 2 显示,10 mg/mL 组和 20 mg/mL 组细胞凋亡数(染成红色)显著高于阴性对照组。



注:a 为阴性对照组;b 为脂质体对照组;c 为 10 mg/mL 模拟物组;d 为 20 mg/mL 模拟物组。

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,200×)

3 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,是高发率和高病死率的癌症

之一,也是预后较差的癌症之一。miRNA 是一类长约 20~23 nt 的可调控基因表达的高度保守非编码小 RNA,在肿瘤发生、发展和转移中起促进或抑制的作用。有资料表明,miRNA-145^[4]、miRNA-34a^[5]、miRNA-212^[6]、miRNA-182^[7]等 miRNA 可通过增加凋亡蛋白的表达,诱导肿瘤细胞凋亡,从而阻遏肿瘤细胞生长。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,差异有统计学意义($P<0.05$),而且与肿瘤大小有关($P<0.05$),与年龄、性别无关,提示 miRNA-449a 参与了肺癌的发生、发展过程,可能是一项潜在的抑癌因子,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凋亡,且随着 miRNA-449a 浓度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,但体外试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试验结果的准确性,因此,有待进一步在动物试验中加以验证。

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

[1] Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, et al. Mammalian mi-

croRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels[J]. *Nature*, 2010, 466(738):835-840.

[2] Lujambio A, Lowe SW. The microcosmos of cancer[J]. *Nature*, 2012, 482(7385):347-355.

[3] Yang X, Feng M, Jiang X, et al. miR-449a and miR-449b are direct transcriptional targets of E2F1 and negatively regulate pRb-E2F1 activity through a feedback loop by targeting CDK6 and CDC25A[J]. *Genes Dev*, 2009, 23(20):2388-2393.

[4] Cho WC, Chow AS, Au JS. Restoration of tumour suppressor hsa-miR-145 inhibits cancer cell growth in lung adenocarcinoma patients with epidermal growth factor receptor mutation[J]. *Eur J Cancer*, 2009, 45(12):2197-2206.

[5] 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(2):313-320.

[6] Inconato M, Garofalo M, Urso L, et al. miR-212 increases tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in non-small cell lung cancer by targeting the antiapoptotic protein PED[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(9):3638-3646.

[7] 徐彪, 夏伟, 邵宁生, 等. 肺鳞癌组织 Hsa-mir-182 差异表达的研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2013, 20(16):1225-1228.

[8] 胡俊庭, 鲍蕴文, 白艳, 等. 肺癌患者血清 microRNA-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:2014-08-12 修回日期:2014-10-10)

(上接第 313 页)

感染性疾病的病程而言,滞后明显,影响到临床的诊断和治疗。

由此可见,新技术、新方法的普及和开发更灵敏、更特异,便于临床实验室开展的侵袭性真菌感染的快速诊断方法,也是当前应对该疾病不断发展的重要途径。

参考文献

[1] 张晓兵, 龚雅利, 府伟灵. 69 例真菌血症临床回顾性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2009, 19(14):1895-1897.

[2] Richardson M, Lass-Flörl C. Changing epidemiology of systemic fungal infections[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2008, 14(Suppl 4):5-24.

[3] Martin GS. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2012, 10(6):701-706.

[4] 中华内科杂志编辑委员会. 血液/恶性肿瘤患者侵袭性真菌感染的诊断标准和治疗原则(草案)[J]. *中华内科学杂志*, 2005, 44(7):554-556.

[5] 马晓波, 吕晓菊, 牛菲菲, 等. 真菌血症 31 例临床分析[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2007, 7(1):19-21.

[6] Maschmeyer G. The changing epidemiology of invasive fungal infections: new threats[J]. *Int J Antimicrob A-*

gents, 2006, 27(Suppl 1):3-6.

[7] 余旻, 俞康龙, 林兆奋, 等. 危重病患者获得性真菌血症的临床研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2001, 11(1):7-9.

[8] Akca S, Haji-Michael P, De Mendonça A, et al. Time course of platelet counts in critically ill patients[J]. *Crit Care Med*, 2002, 30(4):753-756.

[9] 王兵, 韩鸢赢, 李红洁, 等. 危重患者血小板减少症发病危险因素及预后分析[J]. *中国急救医学*, 2008, 28(12):1072-1076.

[10] 陈岩, 王淑惠, 黄宝青, 等. 血浆 1,3-β-D-葡聚糖检测对恶性血液病患者侵袭性真菌感染的诊断价值[J]. *检验医学*, 2013, 28(1):7-10.

[11] Forrest GN, Mankes K, Jabra-Rizk MA, et al. Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization-based identification of *Candida albicans* and its impact on mortality and antifungal therapy costs[J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(9):3381-3383.

[12] 潘峰, 周东风, 肖晶, 等. 一步法 PCR 联合荧光原位杂交检测曲霉菌属感染标本[J]. *中华医院感染学杂志*, 2012, 22(10):2223-2226.

(收稿日期:2014-07-11 修回日期:2014-10-08)