

## Mir-16 对人肺腺癌 A549 细胞增殖及凋亡的影响

汪旭东<sup>1</sup>, 区伟俊<sup>2</sup>, 鲁建军<sup>2</sup>, 罗红鹤<sup>2</sup>, 顾勇<sup>2\*</sup>

(1.暨南大学附属第一医院胸外科, 广东 广州 510630; 2.中山大学附属第一医院胸外科, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】探讨基因 Mir-16 在肺腺癌细胞株 A549 中的表达状况以及 Mir-16 对 A549 细胞生物学行为的影响。【方法】Mir-16 在肺腺癌细胞中的含量采用实时荧光定量 PCR 的检测, 后将 Mir-16 转染至 A549 细胞, 用 MTS、流式细胞仪检测细胞的增殖、凋亡及细胞周期。构建野生型及突变型 WIP1 3'-UTR 的荧光素酶报告载体, 检测荧光素酶的相对活性, 验证在肺腺癌中 WIP1 是 Mir-16 的作用靶点。【结果】在人肺腺癌 A549 细胞中 Mir-16 呈低表达; 将 Mir-16 转染至 A549 细胞后表达上升, 并可促进 A549 细胞的增值率明显降低; 早期凋亡的细胞比例增加; 处于 G1 期的细胞比例明显增加, 处于 S 期的细胞比例明显减少。与各对照组相比, Mir-16 显著抑制野生型 WIP1-3' UTR 表达载体的荧光素酶活性。【结论】Mir-16 在肺腺癌细胞中低表达, 并抑制肺腺癌细胞的增殖及促进细胞的早期凋亡, 有望成为肺腺癌靶向治疗的新靶点。

**关键词:** 基因 Mir-16; 肺腺癌; A549 细胞株; 基因表达; 凋亡

**中图分类号:** R734      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2013)06-0825-06

### Effect of Mir-16 on Proliferation and Apoptosis in Human A549 Lung Cancer Cells

WANG Xu-dong<sup>1</sup>, OU Wei-jun<sup>2</sup>, LU Jian-jun<sup>2</sup>, LUO Hong-he<sup>2</sup>, GU Yong<sup>2</sup>

(1.Department of Thoracic Surgery, The First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510630, China;

2.Department of Thoracic Surgery, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】To investigate the expression of Mir-16 in lung adenocarcinoma cancer line and to observe the effect of Mir-16 on the biological behaviors of human lung adenocarcinoma cancer A549 cell. 【Methods】The expression of Mir-16 in A549 cells was examined by quantitative real-time (qRT)-PCR. Mir-16 mimics was chemically synthesized and transfected into A549 cells by Lipofectamine 2000. The cell cycle and apoptosis changes were assayed by flow cytometry, the cell proliferation was measured by MTS assay. The wild-type and mutant WIP1 3'-UTR luciferase reporter vectors were constructed. The relative activity of renilla luciferase was detected to confirm the binding site of Mir-16 on WIP1 mRNA. 【Results】The expression of Mir-16 is reduced in A549 cell compared with the normal bronchial epithelial cell. Transfection of Mir-16 mimics significantly suppressed the luciferase reporter containing wild type not mutant WIP1 3'-UTR. Furthermore enforced expression of Mir-16 lead to reduced A549 cell proliferation and promote apoptosis. 【Conclusion】Therapeutic strategies to resume miRNA-16 expression may be benefit to the patients with NSCLC in the future.

**Key words:** Mir-16; lung adenocarcinoma; cell line A549; gene expression; apoptosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(6): 825-830]

microRNA(miRNA)是一类长度为 18~25 个核苷酸的小分子非编码 RNA, 作为基因表达转录后的调节者, 不同的 miRNA 分别以癌基因或者抑癌基因的形式在恶性肿瘤的发生发展中发挥着重要的作用<sup>[1-3]</sup>。Mir-16 最早是在慢性粒细胞白血病

发现的, 并且认为它是一种抑癌基因<sup>[4]</sup>。然而在肺癌中 Mir-16 是原癌基因还是抑癌基因, 以及作用机制仍然不明确<sup>[5-6]</sup>。本研究中我们首先检测在肺腺癌细胞中 Mir-16 的表达情况, 在此基础上我们瞬时转染 Mir-16 进入 A549 细胞并观察其对肺腺

收稿日期: 2013-07-14

基金项目: 广东省科技计划项目(2009B030801132)

作者简介: 汪旭东, 硕士, 住院医师, E-mail: wangxudong0303@163.com; \* 通信作者: 顾勇, 博士, 硕士生导师, 副主任医师, E-mail: guyong64@163.com

癌细胞体外增殖、凋亡及细胞周期的影响,以期探讨肺腺癌的发病机制及治疗的新靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株及主要试剂

人肺腺癌细胞 A549 购于中山大学动物实验中心、人正常支气管上皮细胞 HBE 购自湖南永泰生物技术有限公司;1640 培养基、胎牛血清购自 hyclone;Opti-MEM 培养基、PBS、胰酶购自 Gibco;Trizol、Lipofectamine™ RNAiMAX 转染试剂购自 Invitrogen;M-MLV、Rnasin inhibitor、psiCHECK-2、DpnI 酶购自 Promega;SYBR Green PCR Master Mix 购自 TOYOBO;PrimeSTAR HS、DNA-Polymerase、T4 DNA Ligase、DL2000、1 ku DNA Ladder Marker、NotI、XhoI、TaKaRa Taq™ 购自 TaKaRa;OneStep RT-PCR 试剂盒均为 Qiagen 产品;Dual-Luciferase Reporter Assay System;Promega;DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 DONGSHENG BIOTECH;高纯质粒小量提取试剂盒购自 G-SHUN、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒购自 Keyge;引物合成:上海生工、基因测序:华大基因、Mir-16 的片段模拟物 mimics 合成:广州锐博生物科技有限公司。

### 1.2 细胞培养

人肺腺癌细胞 A549 细胞接种于含 100 mL/L FBS 低糖 DMEM 培养液,置于 37 °C、体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养,倒置显微镜观察培养情况,每周传代 2~3 次,选择 50 代以内的细胞进行转染。

### 1.3 实验分组

未转染的 A549 细胞为空白对照组,转染空白载体的 A549 细胞为阴性对照组,转染了 Mir-16 的 A549 细胞为特异转染组,以及正常的支气管上皮细胞组。

### 1.4 转染

转染前 24 h 前分别取对数生长期 A549 细胞以  $5 \times 10^4$  个/孔接种于 6 孔板,细胞融合度达 30%~50% 时将吸取 20  $\mu$ m Mir-16 母液 1.25  $\mu$ L 溶解到 100  $\mu$ L Opti-MEM 培养基为 A 液,取 2  $\mu$ L Lipofectamine™ RNAiMAX 试剂溶解于 100  $\mu$ L 的 Opti-MEM 培养基为 B 液,将 A 液和 B 液混合静置 20 min 后加到细胞培养板中,培养板中预先加

入 300  $\mu$ L 无双抗培养基。转染后 4 h 换为 1640 培养基。

### 1.5 定量 PCR 检测 Mir-16 在转染后细胞中的表达

转染 48 h 后,分别收集各组细胞,使用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,以 U6 为内参进行 RT-PCR 扩增反应体积为 20  $\mu$ L,扩增体系:2  $\times$  PCR premix 10  $\mu$ L,primers 0.8  $\mu$ L, cDNA 1  $\mu$ L,H<sub>2</sub>O 补足体积 20  $\mu$ L。反应条件:95 °C:5 min;95 °C:15 s;65 °C:15 s;72 °C:32 s;40 个循环。每个样品设置 3 个复孔。产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,UVP 凝胶成像系统扫描电泳结果。

### 1.6 MTS 检测 Mir-16 对细胞在增殖的影响

分别取无转染的细胞、转染 Mir-16 以及空白载体的细胞消化重悬,调整细胞浓度为  $1 \times 10^5$  个/mL,加入 96 孔板中培养,每孔 100  $\mu$ L,即每孔细胞为  $1 \times 10^4$  个,分别在 24、48、72、96 h,在对应的培养孔中加入 MTS 试剂 (CellTiter 96® AQ<sub>ueous</sub> One Solution Cell Proliferation Assay) 每孔 20  $\mu$ L,在 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 的环境下避光孵育 3 h,用酶标仪读取 490 nm 吸光度值。

### 1.7 流式细胞学检测细胞凋亡变化

细胞转染 48 h 后胰酶消化制成细胞悬液,离心收集细胞,PBS 洗涤细胞两次后计数  $4 \times 10^5$  个细胞,加入 500  $\mu$ L Binding Buffer 及 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 混匀,再加入 5  $\mu$ L PI 染色液混匀,室温避光条件下染色 15 min,标准程序流式细胞仪进行检测细胞凋亡。

### 1.8 流式细胞学检测细胞周期变化

细胞转染 48 h 后胰酶消化制成细胞悬液,预冷 PBS 洗涤细胞两次,70% 预冷的乙醇固定细胞,过夜后离心收集细胞,并以 1 mL 的 PBS 洗涤细胞,加入 100  $\mu$ g/mL RNase A 37 °C 孵育 30 min,加入 500  $\mu$ L 碘化丙啶染色液 (PI) 4 °C 避光孵育 30 min,计数  $3 \times 10^4$  个细胞,按标准程序流式细胞仪检测细胞周期。

### 1.9 荧光素酶报告基因的检测

microRNA 靶点预测软件 (Targetscan) 提示 WIP1 mRNA 3'-UTR 可以和 Mir-16 相互结合。体外合成带有酶切位点的 PCR 扩增引物,将其插入到 psi-CHECK-2 载体海肾荧光素酶编码基因的下流,构建野生型的 WIP1 3'-UTR 荧光素酶表达载体,根据 Mir-16 与 WIP1 的 3'-UTR 相结合的

种子序列区进行突变,构建突变型的 WIP1 的 3'-UTR 荧光素酶表达载体。将 5  $\mu$ L 连接产物分别加入至 50  $\mu$ L DH5 $\alpha$  感受态细胞中,将菌液均匀涂布于含氨苄青霉素(Amp; 100  $\mu$ g/mL)的 LB 平板上,平板上挑取单克隆菌落,经热裂解去上清做 PCR 鉴定阳性克隆,予以质粒提取盒提取质粒行 *Xho*I 和 *Not*I 双酶切和测序鉴定酶切产物,以含溴化乙锭(EB)的 1%琼脂糖凝胶电泳分离,凝胶成像系统成像。Mir-16 片段模拟物 mimics 分别与上述构建的两种质粒共转染细胞(Mir-16 组),同时设立 Mir-16 阴性对照片段分别与两种质粒共转染(NC 组)以及单独质粒转染(blank 组)作为对照。转染 48 h 后,使用双荧光素酶检测试剂盒,检测海肾荧光酶的活性,同时检测萤火虫荧光素酶活性作内参。

### 1.10 统计学方法

本实验中结果均进行 3 次重复,所得结果中各组数据之间的统计学差异均采用方差分析(ANOVA)方法进行比较,当  $P < 0.05$  时认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 检测 Mir-16 mRNA 在 A549 细胞与正常支气管上皮细胞以及转染后的表达

运用定量 RT-PCR 分别检测转染 Mir-16 的 A549 细胞、转染空白载体的 A549 细胞、未转染的 A549 细胞及正常支气管上皮细胞中 Mir-16 的表达差异。结果显示 A549 细胞中的 Mir-16 的表达低于正常的支气管上皮细胞,而转染了 Mir-16 的 A549 细胞中 Mir-16 表达明显增高,显著高于转染空白载体的对照细胞以及未转染的 A549 细胞中的 Mir-16 的表达,表明在肺腺癌细胞中与正常支气管上皮细胞相比 Mir-16 的表达下降,而转染了 Mir-16 的 A549 细胞表达上升,说明 Mir-16 被成功转染至 A549 细胞中(图 1)。

### 2.2 Mir-16 对细胞在增殖的影响

分别在细胞培养后 24、48、72、96 h 检测增殖情况,结果发现转染了 Mir-16 的 A549 细胞在培养 96 h 后检测细胞增殖明显减慢(图 2)。

### 2.3 Mir-16 对细胞凋亡的影响

用 Annexin V-FITC 进行细胞染色,应用流式细胞仪分别检测 3 组不同细胞凋亡的情况,验证

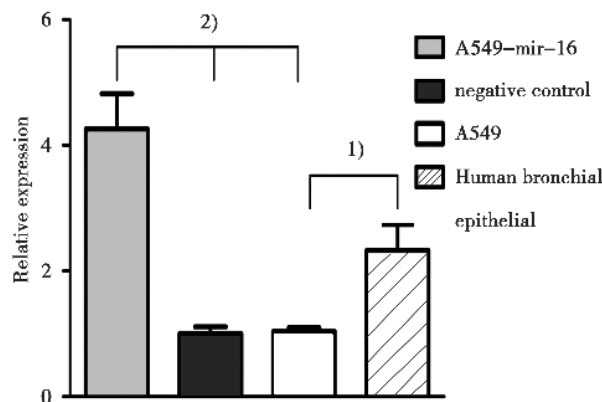


图 1 Mir-16 的表达

Fig.1 The expression of Mir-16

Real-time RT-PCR revealed that the expression level of Mir-16 is decreased in A549 cells compared to the normal human bronchial epithelial cells, 1)  $P < 0.05$ . After transfection, the expression level of Mir-16 in the A549 cells is higher than other cells, 2)  $P < 0.05$ . values represent means from three separate experiments.

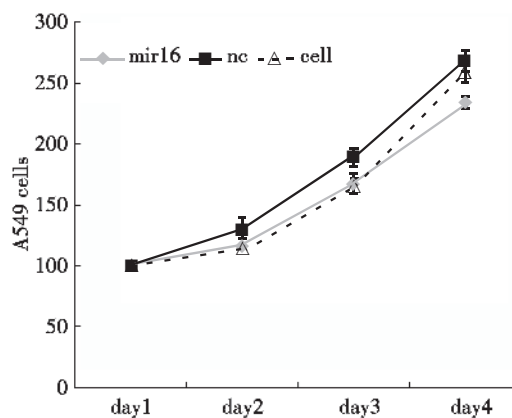


图 2 Mir-16 对细胞增殖的影响

Fig.2 Effect of Mir-16 on growth of A549 cells

MTS growth curves indicated that the proliferation rate of A549 cells transfected with Mir-16 is significantly decreased compare to the other cells (values represent means from three separate experiments,  $P < 0.05$ ).

Mir-16 对 A549 细胞凋亡的影响,结果发现相对于空白对照组以及未转染细胞组,转染 Mir-16 后 A549 细胞的早期凋亡明显增多(图 3)。

### 2.4 Mir-16 对细胞周期的影响

应用流式细胞仪检测转染 Mir-16 后 A549 细胞周期的影响,结果发现, Mir-16 转染后 A549 细胞与 NC 组、cell 组相比 G1 期明显延长, S 期明显缩短,细胞生长延滞(图 4)。

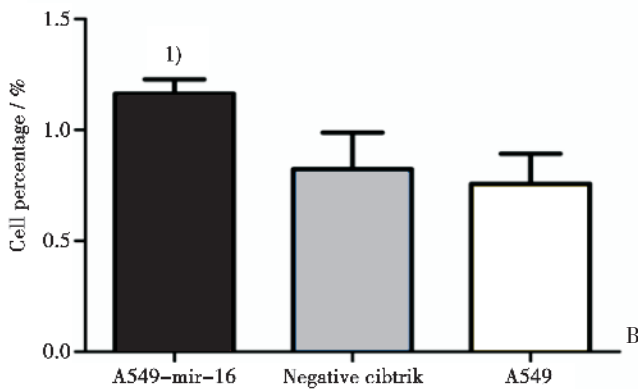
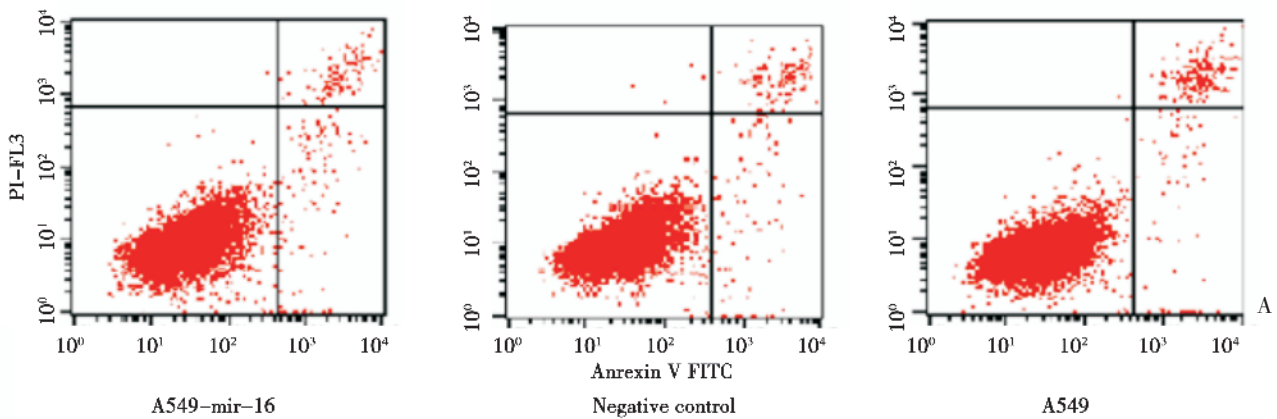


图 3 Mir-16 对细胞凋亡的影响

Fig.3 Effect of Mir-16 on cell apoptosis

A: Flow cytometry pictures of cell apoptosis (lower right quadrant, one of the three separate results was showed); B: Percentage of three groups in early stage apoptosis. Flow cytometry showed that the percentage of Mir-16 transfected A549 cells in early stage apoptosis is higher than that of other two groups (values represent means from three separate experiments, 1)  $P < 0.05$ ).

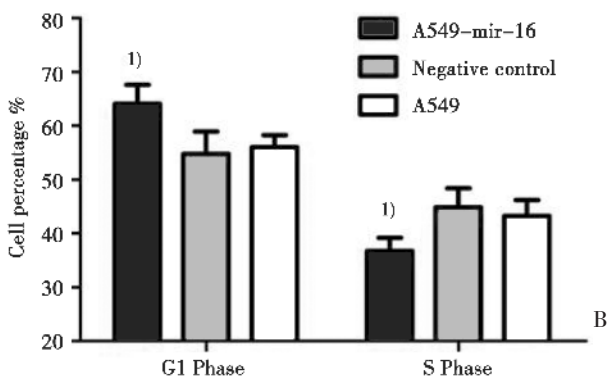
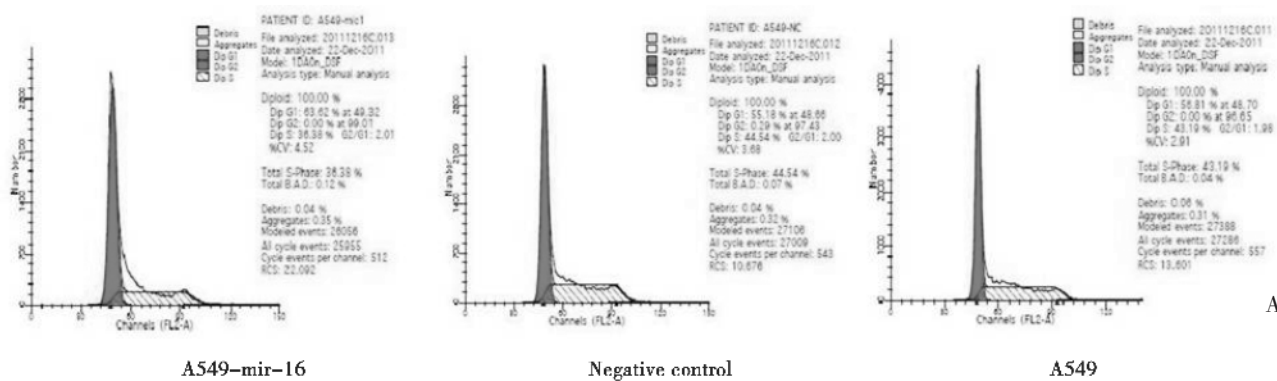


图 4 Mir-16 对细胞周期的影响

Fig4 Effect of Mir-16 on cell cycle of A549 cells

A: Flow cytometry pictures of cell cycle (one of the three separate results was showed); B: Flow cytometry results showed that the percentage of A549 cells transfected with Mir-16 in the G0-G1 phase is higher than the other two groups, which paralleled with decrease in the S phase (values represent means from three separate experiments). 1)  $P < 0.05$ .

## 2.5 荧光素酶报告基因的检测

预测软件提示 WIP1 是 Mir-16 的靶基因之一(图 5)。构建 WIP1 基因 3'UTR 的载体,首先扩增 WIP1 基因 3'UTR,切胶回收产物后将其连接至质粒中,对构建的质粒进行酶切鉴定和测序提示载体构建成功(图 6),同法构建 WIP1 基因 3'UTR 突变载体。应用双荧光素酶报告基因检测两种荧光素酶的发光信号,结果显示当 Mir-16 与野生型 WIP1 共转染实验组与突变型 WIP1 共转染组相比,能明显降低荧光素酶活性,荧光信号明显减弱,说明 Mir-16 能够与野生型 WIP1 基因 3'UTR 结合,从而抑制荧光素酶的活性,但是不能与突变型 WIP1 基因 3'UTR 相结合,因此认为 WIP1 可能为 Mir-16 的靶基因。NC 组及空白组均无明显差异(图 7)。



图 5 WIP1 是 Mir-16 的靶基因之一

Fig.5 WIP1 is one of the target gene of Mir-16

Predicted Mir-16 sequence and putative recognition sites with 3'-UTR of WIP1.

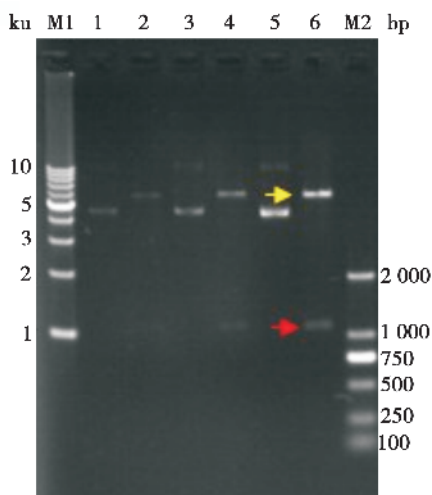


图 6 构建 WIP1 基因 3'UTR 的载体

Fig.6 Construction of renilla luciferase reporter

To clone the WIP1 3'-UTR protein containing the miRNA-16 target site and not containing the Mir-16 target site (mutant WIP1 3'-UTR) into a renilla luciferase reporter construction

## 3 讨论

目前研究发现在肺癌中大概有 40 ~ 45 种

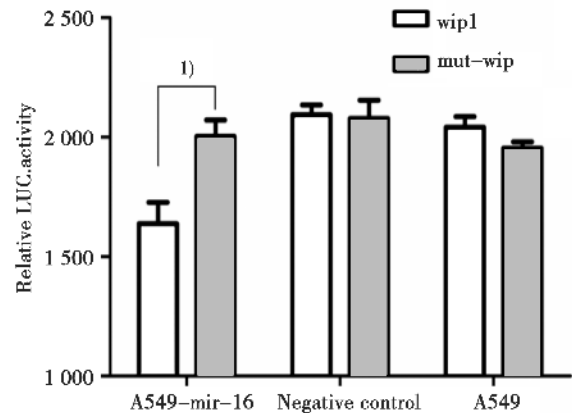


图 7 荧光素酶活性的检测

Fig.7 Luciferase activity using wild-type and mutated WIP1-3'-UTR constructs

Luciferase activity of A549 cells after transfection with Mir-16, negative control or no transfected Mir-16 and then also co-transfected with vector containing either WT-WIP1-3'-UTR or MUT-WIP1 3'-UTR. A significant reduction of the luciferase activity was observed in A549 transfected with Mir-16 and WT-WIP1-3'-UTR than with MUT-WIP1 3'-UTR. There were no significant differences in other two groups (values represent means from three separate experiments, 1)  $P < 0.05$ ).

miRNA 表达异常,其中一些在肺癌的发生发展过程中扮演者重要的角色,其中最著名的就是 Let-7 家族<sup>[7]</sup>。而 Mir-16 最早是在慢性淋巴细胞白血病发现的,在直肠癌、胰腺癌、胶质瘤等肿瘤中 Mir-16 的扮演的是抑癌基因的角色,而在肺癌中 Mir-16 的作用机制仍不明确。

细胞增殖及凋亡的异常对细胞的生长和肿瘤的发生起着重要的作用。恶性肿瘤细胞的死亡和凋亡较正常细胞相比有缺陷,而在肿瘤细胞中凋亡抑制往往造成肿瘤细胞生长失控。大多数化疗药物通过诱导细胞凋亡杀灭肿瘤细胞,而恶性肿瘤细胞可通过一些机制逃避凋亡<sup>[8-9]</sup>。所以目前治疗的热点就是利用基因技术诱导肿瘤细胞凋亡,来增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性和减少对化疗药物的耐药性。我们这里所探讨的是 miRNA-16 能否在肺癌中发挥抑制肿瘤细胞增殖及促进其凋亡的作用。通过采用直接瞬时转染 microRNA 对 Mir-16 的功能进行直接研究,通过将 Mir-16 转染入 A549 细胞,使 Mir-16 表达上升,结果显示上升的 miRNA-16 可以显著抑制肺癌细胞的生长和促进其早期凋亡,说明 miRNA-16 是具有抑

癌基因的功能, 所以提高 miRAN-16 的表达水平能够作为以后肺腺癌治疗的一个新的策略。

为了了解 miRNA-16 影响肺癌细胞生物学特性的可能机制, 我们使用了双荧光素酶报告基因系统, 是目前最有效的验证方法, 具有高度敏感性和特异性。我们发现 miRNA-16 可以明显降低野生型的 WIP1 基因 3'-UTR 的报告质粒的荧光素酶活性, 而对突变型 WIP1 基因 3'-UTR 的报告质粒的荧光素酶活性没有明显的作用, 从而验证了 miRNA-16 可以直接与 WIP1 基因 3'-UTR 结合, 所以 WIP1 可能是 miRNA-16 的靶基因。

WIP1 在大多数肿瘤类型中呈多表达, 并且在肿瘤发生过程中发挥了重要的作用。WIP1 已经证明可以通过沉默靶基因而促进肿瘤的转化和增强肿瘤的生物侵略性<sup>[10-11]</sup>, 但 WIP1 致癌的机理还没有完全阐述清楚。

综上所述本实验对 Mir-16 的生物学功能进行了基础性的研究, 同时发现原癌基因 WIP1 与 Mir-16 存在一定的关系, 那么 Mir-16 发挥其抑癌基因的作用是否通过其对 WIP1 的抑制作用, 将进行更深入的研究。

#### 参考文献:

- [1] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia [J]. Proc Natl Acad Sci, 2002, 99(24): 15524-15529.
- [2] Michael MZ, O'Connor SM, van Holst Pellekaan NG, et al. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia [J]. Mol Cancer Res, 2003, 1(12): 882-891.
- [3] Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets [J]. Proc Natl Acad Sci, 2006, 103(7): 2257-2261.
- [4] Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, et al. Mir-15a and Mir-16-1 cluster functions in human leukemia [J]. Proc Natl Acad Sci, 2008, 105(13): 5166-5171.
- [5] Lu Y, Okubo T, Rawlins E, et al. Epithelial progenitor cells of the embryonic lung and the role of microRNAs in their proliferation [J]. Proc Am Thorac Soc, 2008, 5(3): 300-304.
- [6] Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues [J]. RNA, 2008, 14(5): 844-52.
- [7] Kumar MS, Erkeland SJ, Pester RE, et al. Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family [J]. Proc Natl Acad Sci, 2008, 105(10): 3903-3908.
- [8] Cory S, Adams CS. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(9): 647-656.
- [9] Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(6): 401-410.
- [10] Bulavin DV, Demidov ON, Saito S, et al. Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity [J]. Nat Genet, 2002, 31(2): 210-215.
- [11] Li J, Yang Y, Peng Y, et al. Oncogenic properties of PPM1D located within a breast cancer amplification epicenter at 17q23 [J]. Nat Genet, 2002, 31(2): 133-134.

(编辑 徐杰)