

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2020.01.05

◆ 论著 ◆

miR-200a 对非小细胞肺癌迁移、侵袭的调控作用及机制研究

王亚飞, 张振军, 杜雪菲, 宋长亮

(邯郸市中心医院西区肿瘤一科, 河北 邯郸 056000)

【摘要】目的: 研究 miR-200a 对非小细胞肺癌迁移、侵袭的调控作用及机制。**方法:** 培养肺癌 A549 细胞并分组, 阴性对照 (NC) 过表达组转染 NC 的模拟物, miR-200a 过表达组转染 miR-200a 的模拟物, NC 抑制组转染 NC 的抑制物, miR-200a 抑制组转染 miR-200a 的抑制物。采用划痕实验检测细胞的迁移能力, 采用 transwell 检测细胞的侵袭能力, 采用 Western blotting 检测迁移基因 N-钙黏蛋白 (N-cadherin) 及波形蛋白 (Vimentin)、侵袭基因基质金属蛋白酶 (MMP) 2 及 MMP9、 β -catenin 的表达量。**结果:** 与 NC 过表达组比较, miR-200a 过表达组的迁移和侵袭能力明显减弱, N-cadherin、Vimentin、MMP2、MMP9、 β -catenin 的表达量明显减少; 与 NC 抑制组比较, miR-200a 抑制组的迁移和侵袭能力明显增强, N-cadherin、Vimentin、MMP2、MMP9、 β -catenin 的表达量明显增加。**结论:** miR-200a 能够抑制非小细胞肺癌的迁移、侵袭且这一抑制作用与靶向抑制 β -catenin 有关。

【关键词】 非小细胞肺癌; miR-200a; β -catenin; 迁移; 侵袭

【中图分类号】 R734.2 **【文献标志码】** A

Regulation of miR-200a on migration and invasion of non-small cell lung cancer and its mechanisms

WANG Ya-fei, ZHANG Zhen-jun, DU Xue-fei, SONG Chang-liang

(Department of Cancer, West District of Handan Central Hospital, Handan 056000, Hebei, China)

【Abstract】Objective: To study the regulatory effect and mechanism of miR-200a on migration and invasion of non-small cell lung cancer. **Methods:** Lung cancer A549 cells were cultured and grouped. NC over-expression group was transfected NC mimics, miR-200a over-expression group was transfected mimics, NC inhibiting group was transfected NC inhibitors, and miR-200a inhibiting group was transfected miR-200a inhibitors. Wound healing test was used to detect the migration ability of cells, transwell was used to detect the invasion ability of cells, western blot was used to detect the expression of migration genes N-cadherin and Vimentin, invasion genes matrix metalloproteinase (MMP) 2 and MMP9, β -catenin. **Results:** Compared with NC overexpression group, the migration and invasion ability of miR-200a overexpression group was significantly weakened, and the expression of N-cadherin, Vimentin, MMP2, MMP9 and β -catenin were significantly reduced. Compared with NC inhibition group, the migration and invasion ability of miR-200a inhibition group was significantly enhanced, and the expression of N-cadherin, Vimentin, MMP2, MMP9 and β -catenin was significantly increased. **Conclusion:** miR-200a can inhibit the migration and invasion of non-small cell lung cancer, and this inhibition is related to the targeting inhibition of β -catenin.

【Key words】 Non-small cell lung cancer; miR-200a; β -catenin; Migration; Invasion

肺癌是全球范围内高发的恶性肿瘤之一, 其中非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 是最常见的肺癌病理类型, 病情进展快、5 年生存率低。癌细胞的迁移和侵袭是造成 NSCLC 病灶浸润、淋巴结转移及远处转移的重要病理环节, 同时也是影响病情预后的重要因素。因此, 阐明 NSCLC 细胞迁移和侵袭的调控机制对疾病新治疗靶点的探寻具

有重要意义。

微小 RNA (microRNA, miR) 是近年来受到越来越多关注的一类在转录后水平调节基因表达的小分子 RNA。多种 miRs 被证实能够通过转录后水平抑制原癌基因的表达来实现抑癌作用。在 NSCLC 及结肠癌、卵巢癌、胰腺癌等其他等多种恶性肿瘤的发生发展过程中, miR-200a 在肿瘤病灶内均呈显著

基金项目: 河北省医学科学研究重点课题计划 (20191834)

作者简介: 王亚飞 (1980 -), 女, 硕士, 主治医师。E-mail: mycentre@126.com

低表达的趋势^[1-4],提示 miR-200a 可能具有抑癌作用、其表达减少会使抑癌作用减弱,进而引起肿瘤的发生。但 miR-200a 是否直接参与 NSCLC 细胞迁移、侵袭的调控尚未明确。为此,本研究以 NSCLC 细胞株 A549 为实验对象,具体分析了 miR-200a 对非小细胞肺癌迁移、侵袭的调控作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

肺癌 A549 细胞株购自中科院上海细胞资源中心,DMEM、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶购自 Gibco 公司,RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天公司,N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9 的单克隆抗体购自 Abcam 公司。显微镜购自 Nikon 公司,化学显影仪购自 Bio-rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 A549 细胞培养及分组 A549 细胞用含有 10% FBS 的 DMEM 培在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中贴壁培养,当细胞铺满培养板底面 90% 时、用 0.125% 胰蛋白酶进行消化及传代培养,当传代得到足够数量的细胞后,将细胞接种在不同规格的培养板内并进行分组,阴性对照(negative control, NC)过表达组转染 NC 的模拟物,miR-200a 过表达组转染 miR-200a 的模拟物,NC 抑制组转染 NC 的抑制物,miR-200a 抑制组转染 miR-200a 的抑制物。

1.2.2 细胞迁移的划痕试验检测 A549 细胞接种在 6 孔板中,用 200 μL 的移液头在培养孔底部中央做一纵行划痕并在显微镜下拍照记录,划痕面积记为 A₀;不同条件处理 24 h 后,再次在显微镜下拍照记录,划痕面积记为 A₂₄。按照公式(A₀-A₂₄)/A₀ 计算相对愈合面积。

1.2.3 细胞侵袭的 transwell 检测 A549 细胞用无血清 DMEM 重悬后接种在涂有基质胶的 transwell 上层小室内,下层小室内加入 600 μL 含有 10% FBS 的 DMEM,不同条件处理 24 h 后用磷酸盐缓冲液漂洗小室 3 遍,用棉签擦去上层未侵袭的细胞后用 4% 多聚甲醛固定过夜,第二天用结晶紫染色后在显微镜观察、计数侵袭细胞数目。

1.2.4 细胞中基因表达的 Western blotting 检测 A549 细胞接种在 6 孔板中、转染后 24 h 收集细胞,加入 RIPA 裂解液提取细胞中的蛋白,用 BCA 蛋白定量试剂盒检测总蛋白含量后取 30 μg 总蛋白在聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳、电转移至 NC 膜,用 5% 脱脂牛奶在室温封闭 2 h 后用 Vimentin、N-cadherin、MMP2、MMP9、β-catenin 的第一抗体在 4 °C 孵育过

夜;第二天,洗膜后在室温孵育第二抗体 2 h,最后在化学显影仪中曝光得到蛋白条带,根据条带的灰度值计算蛋白表达量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,两组间相对愈合面积、侵袭数目、Vimentin、N-cadherin、MMP2、MMP9、β-catenin 的比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-200a 对 A549 细胞迁移的调控作用

采用划痕实验检测 A549 细胞的迁移能力,通过计算相对愈合面积并分析可知,与 NC 过表达组比较,miR-200a 过表达组的相对愈合面积明显减少($P < 0.05$),与 NC 抑制组比较,miR-200a 抑制组的相对愈合面积明显增多($P < 0.05$)。见图 1。

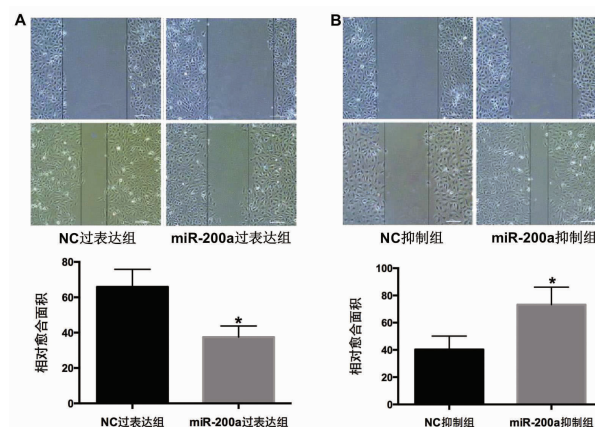


图 1 miR-200a 对 A549 细胞迁移能力的调节作用

A.过表达 miR-200a 后 A549 细胞的迁移;B.抑制 miR-200a 后 A549 细胞的迁移;* $P < 0.05$ 。

采用 Western blotting 检测 A549 细胞中迁移基因 N-cadherin、Vimentin 的表达量。与 NC 过表达组比较,miR-200a 过表达组细胞中 N-cadherin 及 Vimentin 的表达量明显减少($P < 0.05$),与 NC 抑制组比较,miR-200a 抑制组细胞中 N-cadherin 及 Vimentin 的表达量明显增多($P < 0.05$)。见图 2。

2.2 miR-200a 对 A549 细胞侵袭的调控作用

采用 Transwell 检测 A549 细胞的侵袭能力,通过计数侵袭细胞并分析。与 NC 过表达组比较,miR-200a 过表达组的侵袭细胞数目明显减少($P < 0.05$),与 NC 抑制组比较,miR-200a 抑制组的侵袭细胞数目明显增多($P < 0.05$)。见图 3。

采用 western blot 检测 A549 细胞中侵袭基因 MMP2、MMP9 的表达量。与 NC 过表达组比较,miR-200a 过表达组细胞中 MMP2 及 MMP9 的表达

量明显减少 ($P < 0.05$), 与 NC 抑制组比较, miR-200a 抑制组细胞中 MMP2 及 MMP9 的表达量明显增多 ($P < 0.05$)。见图 4。

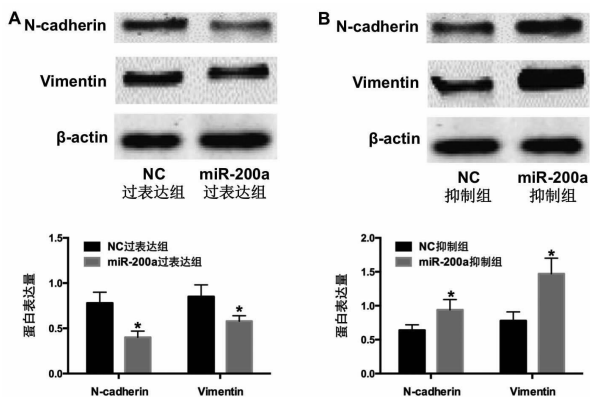


图 2 miR-200a 对 A549 细胞中迁移基因表达的调节作用
A. 过表达 miR-200a 后 A549 细胞中迁移基因的表达; B. 抑制 miR-200a 后 A549 细胞中迁移基因的表达; * $P < 0.05$ 。

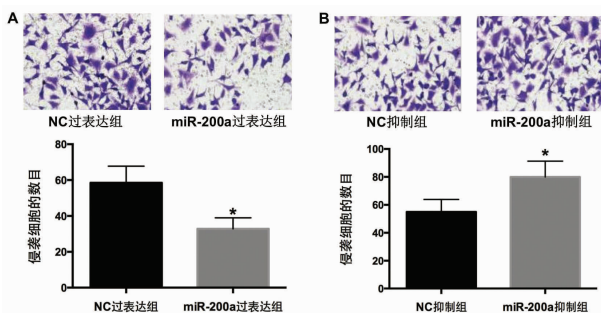


图 3 miR-200a 对 A549 细胞侵袭能力的调节作用 ($\times 200$)
A. 过表达 miR-200a 后 A549 细胞的侵袭; B. 抑制 miR-200a 后 A549 细胞的侵袭; * $P < 0.05$ 。

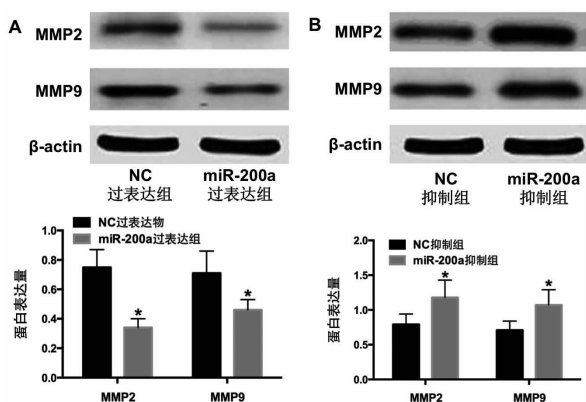


图 4 miR-200a 对 A549 细胞中侵袭基因表达的调节作用
A. 过表达 miR-200a 后 A549 细胞中侵袭基因的表达; B. 抑制 miR-200a 后 A549 细胞中侵袭基因的表达; * $P < 0.05$ 。

2.3 miR-200a 对 A549 细胞中 β -catenin 的靶向调控作用

采用 western blot 检测 A549 细胞中 β -catenin 的表达量。与 NC 过表达组比较, miR-200a 过表达

组细胞中 β -catenin 的表达量明显减少 ($P < 0.05$), 与 NC 抑制组比较, miR-200a 抑制组细胞中 β -catenin 的表达量明显增多 ($P < 0.05$)。见图 5。

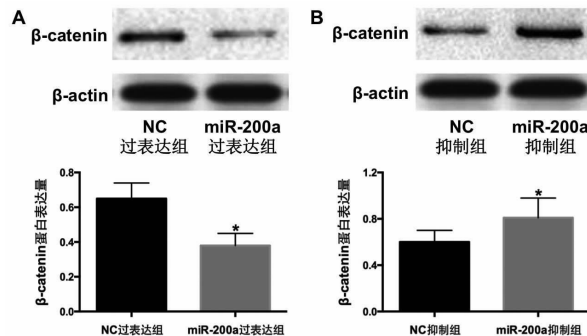


图 5 miR-200a 对 A549 细胞中 β -catenin 表达的调节作用
A. 过表达 miR-200a 后 A549 细胞中 β -catenin 的表达; B. 抑制 miR-200a 后 A549 细胞中 β -catenin 的表达; * $P < 0.05$ 。

3 讨论

癌细胞的迁移和侵袭是 NSCLC 病灶内重要的病理特征, 但迁移和侵袭的具体调控机制仍未阐明。miR-200a 是在多种恶性肿瘤中呈低表达趋势的一种 miR, 且多项细胞实验证实 miR-200a 能够通过靶向 PI3K/AKT、TRAIL 等途径来使肝癌细胞、胃癌细胞的增殖受抑制、凋亡受促进^[5-6]。为了明确 miR-200a 在 NSCLC 迁移和侵袭中的调控作用, 在本实验中, 转染 miR-200a 模拟物和抑制物的方式被用于过表达或抑制 A549 细胞中 miR-200a 的表达。过表达 miR-200a 后, A549 细胞的迁移和侵袭能力明显减弱, 而抑制 miR-200a 后, A549 细胞的迁移和侵袭能力明显增强, 说明 miR-200a 具有抑癌作用、能够使 NSCLC 细胞的迁移和侵袭发生抑制。

在 NSCLC 细胞迁移的过程中, 细胞的上皮表型向间质表型转化能够使细胞运动和迁移能力增强; N-cadherin 和 Vimentin 是两种间质标志基因, 在 NSCLC 中呈高表达趋势且能促进 NSCLC 细胞的迁移^[7-8]。在 NSCLC 细胞侵袭的过程中, 细胞外基质和基底膜中的多种蛋白成分被水解, 进而能够使细胞发生侵袭^[9-10]; MMP2 和 MMP9 是两种介导细胞外基质和基底膜水解的蛋白酶, 在 NSCLC 中呈高表达趋势且能促进 NSCLC 细胞的侵袭^[11-12]。本实验在过表达或抑制 miR-200a 后检测了 A549 细胞中上述迁移和侵袭基因的表达量。过表达 miR-200a 后, A549 细胞中 N-cadherin、Vimentin、MMP2 和 MMP9 的表达明显减少; 而抑制 miR-200a 后, A549 细胞中 N-cadherin、Vimentin、MMP2 和 MMP9 的表达明显增多。这一结果与细胞迁移和侵袭能力变化的结果吻合, 更进一步证实 miR-200a 能够抑制 NSCLC 细胞

的迁移和侵袭。

miR 调控基因表达的方式是与靶基因 mRNA 的 3'UTR 结合,所产生的效应是靶基因表达下调。在 target scan 网站中进行生物信息学分析可知,miR-200a 并不直接结合 N-cadherin、Vimentin、MMP2 和 MMP9 四种基因 mRNA 的 3'UTR,这一结果提示 miR-200a 可能不直接调控上述迁移和侵袭基因。进一步进行生物信息学分析,miR-200a 能够靶向 Wnt 通路中核心基因 β -catenin mRNA 的 3'UTR,也有研究证实 miR-200a 能够靶向结合 β -catenin mRNA 的 3'UTR^[13-14]。Wnt/ β -catenin 通路在 NSCLC 的迁移和侵袭中起到重要作用, β -catenin 能够在细胞核内启动 N-cadherin、Vimentin、MMP2 和 MMP9 等的表达并促进细胞迁移、侵袭^[15-17]。本实验对 β -catenin 的分析显示:过表达 miR-200a 后,A549 细胞中 β -catenin 的表达明显减少,而抑制 miR-200a 后,A549 细胞中 β -catenin 的表达明显增多,说明 miR-200a 能够靶向抑制 β -catenin 的表达,这也可能是 miR-200a 抑制 NSCLC 细胞迁移和侵袭的机制。

综上所述,本研究结果显示 miR-200a 能够抑制 NSCLC 细胞的迁移、侵袭,并且这一抑制作用与靶向抑制 β -catenin 有关。

参考文献

- [1] Liu C, Hu W, Li LL, *et al.* Roles of miR-200 family members in lung cancer; more than tumor suppressors [J]. *Future Oncol*, 2018, 14(27):2875-2886.
- [2] Karihtala P, Porvari K, Soini Y, *et al.* Expression Levels of microRNAs miR-93 and miR-200a in Pancreatic Adenocarcinoma with Special Reference to Differentiation and Relapse-Free Survival [J]. *Oncology*, 2019, 96(3):164-170.
- [3] Santasusagna S, Moreno I, Navarro A, *et al.* Prognostic Impact of miR-200 Family Members in Plasma and Exosomes from Tumor-Draining versus Peripheral Veins of Colon Cancer Patients [J]. *Oncology*, 2018, 95(5):309-318.
- [4] Shi M, Mu Y, Zhang H, *et al.* MicroRNA-200 and microRNA-30 family as prognostic molecular signatures in ovarian cancer: A meta-analysis [J]. *Medicine*, 2018, 97(32):e11505.
- [5] Yao WF, Liu JW, Huang DS. miR-200a inhibits cell proliferation and EMT by down-regulating the ASPH expression levels and affecting ERK and PI3K/Akt pathways in human hepatoma cells [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(4):1117-1130.
- [6] Guo T, Zhang Y, Qu X, *et al.* miR-200a enhances TRAIL-induced apoptosis in gastric cancer cells by targeting A20 [J]. *Cell Biol Int*, 2018, 42(5):506-514.
- [7] Luo T, Wang L, Wu P, *et al.* Downregulated vimentin and upregulated E-cadherin in T1 stage non-small-cell lung cancer; does it suggest a mesenchymal-epithelial transition? [J]. *Neoplasma*, 2017, 64(5):693-699.
- [8] Tsoukalas N, Aravantinou-Fatorou E, Tolia M, *et al.* Epithelial-Mesenchymal Transition in Non Small-cell Lung Cancer [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(4):1773-1778.
- [9] Andriani F, Landoni E, Mensah M, *et al.* Diagnostic role of circulating extracellular matrix-related proteins in non-small cell lung cancer [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1):899.
- [10] Berg J, Halvorsen AR, Bengtson MB, *et al.* Levels and prognostic impact of circulating markers of inflammation, endothelial activation and extracellular matrix remodelling in patients with lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1):739.
- [11] Merchant N, Nagaraju GP, Rajitha B, *et al.* Matrix metalloproteinases; their functional role in lung cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2017, 38(8):766-780.
- [12] Wu Z, He D, Zhao S, *et al.* IL-17A/IL-17RA promotes invasion and activates MMP-2 and MMP-9 expression via p38 MAPK signaling pathway in non-small cell lung cancer [J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 455(1-2):195-206.
- [13] Fu N, Zhao SX, Kong LB, *et al.* LncRNA-ATB/microRNA-200a/ β -catenin regulatory axis involved in the progression of HCV-related hepatic fibrosis [J]. *Gene*, 2017, 30(618):1-7.
- [14] 王欣,徐渴,曾强,等.小鼠 β -catenin 基因 3 端非编码区荧光素酶报告载体的构建及其与 miR-200a 靶向调控关系的研究 [J]. *环境与健康杂志*, 2018, 35(4):299-302.
- [15] Wu C, Zhuang Y, Jiang S, *et al.* Cinnamaldehyde induces apoptosis and reverses epithelial-mesenchymal transition through inhibition of Wnt/ β -catenin pathway in non-small cell lung cancer [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2017, 84:58-74.
- [16] O'Leary K, Shia A, Schmid P. Epigenetic Regulation of EMT in Non-Small Cell Lung Cancer [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2018, 18(1):89-96.
- [17] Jiang GY, Zhang Y, Zhang XP, *et al.* Inversin correlates with the malignant phenotype of non-small cell lung cancer and promotes the invasiveness of lung cancer cells [J]. *Tumor Biology*, 2017, 39(6):1-9.

(收稿日期:2019-11-15)

学术编辑:赵妍丽)