

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.06.01

❖ 基础研究 ❖

# miR-614 过表达抑制肺腺癌 A549 细胞增殖、侵袭及裸鼠移植瘤生长

黎亮, 蔡仁中, 李高, 黄修明

(海南省人民医院胸外科, 海南 海口 570311)

**【摘要】目的:** 探讨 miR-614 过表达对肺腺癌 A549 细胞增殖、侵袭及裸鼠移植瘤生长的影响。**方法:** 将培养至对数生长期的人 A549 细胞分为对照组、miR-NC 组(脂质体转染 miR-NC mimic)和 miR-614 组(脂质体转染 miR-614 mimic)。RT-qPCR 检测每组 A549 细胞中 miR-614 的表达, CCK-8 法检测每组 A549 细胞增殖活性; Transwell 法检测检测每组 A549 细胞侵袭细胞数, Western Blot 法检测每组 A549 细胞血管内皮生长因子(VEGF)、基质金属蛋白酶(MMP)-2、金属蛋白酶组织抑制因子-2(TIMP-2)和 Ki-67 蛋白的相对表达量。皮下种植 0.2 mL 各组 A549 细胞悬液( $5 \times 10^6$ /mL), 构建裸鼠移植瘤的模型, 每周测量 1 次移植瘤组织的体积, 造模 5 周后进行移植瘤组织称重。**结果:** miR-614 组 A549 细胞增殖活性和侵袭细胞数低于 miR-NC 组( $P < 0.05$ ), 细胞 VEGF, MMP-2 和 Ki-67 蛋白表达低于 miR-NC 组( $P < 0.05$ ), TIMP-2 蛋白表达高于 miR-NC 组( $P < 0.05$ ); miR-614 组裸鼠移植瘤质量低于 miR-NC 组, 且造模 3 周、4 周和 5 周后, 移植瘤体积低于 miR-NC 组( $P < 0.05$ )。**结论:** miR-614 过表达可抑制 A549 细胞的增殖和侵袭, 进而抑制肿瘤生长。

**【关键词】** miR-614; A549 细胞; 增殖; 侵袭; 移植瘤; 裸鼠

**【中图分类号】** R734.2 **【文献标志码】** A

## Effects of miR-614 overexpression on proliferation and invasion of lung adenocarcinoma A549 cells and growth of transplanted tumor in nude mice

LI Liang, CAI Ren-zhong, LI Gao, HUANG Xiu-ming

(Department of Thoracic Surgery, Hainan General Hospital, Haikou 570311, Hainan, China)

**【Abstract】Objective:** To explore the effects of miR-614 overexpression on proliferation and invasion of lung adenocarcinoma A549 cells and growth of transplanted tumor in nude mice. **Methods:** Human A549 cells were divided into control group, miR-NC group (liposome was transfected with miR-NC mimic) and miR-614 group (liposome was transfected with miR-614 mimic). The expression of miR-614 in each group was detected by RT-PCR. The proliferation activity of cells was detected by CCK-8. The cells invasion was detected by Transwell. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase (MMP)-2, tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) and Ki-67 protein were detected by Western blot. The subcutaneous implantation of 0.2 mL A549 cells suspension ( $5 \times 10^6$ /mL) in each group was conducted to establish the transplanted tumor model of nude mice. The tumors volume was measured once a week, which were weighed at 5 weeks after molding. **Results:** The proliferation activity and number of invasive A549 cells in miR-614 group were lower than those in miR-NC group ( $P < 0.05$ ), the expression of VEGF, MMP-2 and Ki-67 protein were lower than those in miR-NC group ( $P < 0.05$ ), while expression of TIMP-2 protein was higher than that in miR-NC group ( $P < 0.05$ ). The mass of transplanted tumors in miR-614 group was lower than that in miR-NC group, and volume of transplanted tumor was smaller than that in miR-NC group at 3, 4 and 5 weeks after molding ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Overexpression of miR-614 will inhibit the proliferation and invasion of A549 cells, and inhibit tumor growth.

**【Key words】** miR-614; A549 cell; Proliferation; Invasion; Transplanted tumor; Nude mice

肺癌是一种常见的恶性程度较高的呼吸系统肿瘤。据统计, 肺癌的发病率在男性恶性肿瘤患者中居于第一位, 在女性患者中居于第二位, 其死亡率在

男性和女性恶性肿瘤患者中均居于首位<sup>[1]</sup>。肺癌的病因复杂, 其发生机制尚未完全明确, 临床治疗采用外科手术尽可能切除病变组织, 同时联合术前或

术后放化疗,以期延长生存时间,但术后生存率仍较低<sup>[2]</sup>。近年,有研究<sup>[3-4]</sup>研发了肺癌的分子靶向药物,并将其应用于临床研究,发现分子靶向药物可明显延长患者的生存期。研究肺癌发生和进展机制,以指导临床新靶向药物研发,获得了研究者的广泛关注。miR-614是新发现的一种与癌症有关的miRNA,在卵巢癌<sup>[5]</sup>和胰腺癌<sup>[6]</sup>中均表现出了异常的高表达,且过表达miR-614可以抑制肿瘤细胞的增殖。然而,部分研究<sup>[7]</sup>显示,miR-614过表达可以调节嘌呤霉素敏感性氨肽酶的表达,抑制肺癌细胞增殖和侵袭,但miR-614在肺癌中的具体作用尚不明确。本研究分析了miR-614过表达对肺癌细胞生长和侵袭的影响,旨在为肺癌患者的临床治疗提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物、材料与仪器

BALB/C裸鼠,36只,雄性,鼠龄4~5周,体重18~22g,平均(20±2)g,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司[动物许可证号SCXK(京)2016-0006],保持室温恒定为25℃,模拟昼夜每12h更换1次光照条件,动物自由摄食与饮水。

人A549细胞购自中国中科院上海细胞所;RPMI1640培养基、胎牛血清、RT-qPCR试剂盒均购自中国北京索莱宝科技有限公司;miR-614 mimic(序列54~76位点5'-GAA CGC CUG UUC UUG CCA GGU GG-3')及其阴性对照miR-NC mimic(序列5'-CAG UAC UUU UGU GUA GUA CAA-3')均由中国上海吉凯基因有限公司合成;Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000转染试剂盒购自中国上海远慕生物科技有限公司;RT-qPCR引物均由中国上海生工生物工程有限公司合成;CCK-8检测试剂盒(货号:KTC011001)和Transwell小室(货号:K917-24)均购自中国艾美捷科技有限公司;内参β肌动蛋白(β-actin,货号:13653S)、兔抗人血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)(货号:2463S)、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP)(货号:4022S)、金属蛋白酶组织抑制因子-2(tissue inhibitor of metalloproteinase-2, TIMP-2)(货号:5738S)、Ki-67抗体(货号:9129S)及辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔二抗(货号:14708S)均购自美国CST公司。MK3型全自动酶标仪购自Thermo Scientific公司;3111型CO<sub>2</sub>培养箱购自Thermo Scientific公司;7500 RT-PCR系统购自于美国Applied Biosystems;光学显微镜(BX60型)购自日本Olympus公司。

### 1.2 A549细胞培养和分组

采用含10%胎牛血清的RPMI1640培养基培养A549细胞,在温度37℃、体积分数5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养24h。将对数生长期A549细胞分为对照组、miR-NC组和miR-614组。miR-614组按照Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000转染试剂操作步骤进行细胞转染,取培养至对数生长期的细胞,用2.5%胰蛋白酶消化,收集细胞,以1×10<sup>3</sup>个/孔细胞接种于12孔板内,待细胞生长至50%左右融合时,进行转染操作,每孔板加入20 pmol的miR-614 mimic(终浓度为10 pmol/mL)和10 μL的转染试剂,转染5h后,更换正常培养基培养。miR-NC组转染miR-NC,对照组不进行转染操作。

### 1.3 RT-qPCR检测各组细胞miR-614表达

将培养至对数生长期A549细胞,采用RT-PCR检测各组细胞miR-614表达,miR-614上游引物:5'-AAA GAC ATA GGA TAG AGT CAC CTC-3',下游引物:5'-CAG TGC GTG TCG TGG AGT-3',扩增片段72bp;内参为U6,上游引物:5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3',下游引物:5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3',扩增片段94bp;采用2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法计算相对表达量。

### 1.4 CCK-8检测A549细胞增殖

将培养至对数生长期A549细胞制备成单细胞悬液,以1×10<sup>3</sup>个/孔将接种于96孔培养板中,于温度37℃、体积分数5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养,分别在培养的0、24、48、72和96h,严格按照试剂盒的说明进行CCK-8检测,酶标仪检测波长为450nm处各孔吸光度值。

### 1.5 Transwell检测A549细胞侵袭

将培养至对数生长期A549细胞制备成单细胞悬液,以2×10<sup>5</sup>个/mL接种于24孔培养板中,取100 μL加于上室,培养48h后,取出Transwell小室,常规固定和染色,显微镜下观察并计数膜下室表面细胞数。

### 1.6 Western Blot检测A549细胞VEGF、MMP-2、Ki-67蛋白表达

取培养至对数生长期A549细胞,提取细胞中的总蛋白并根据试剂盒进行蛋白定量,经凝胶电泳、转PVDF膜,脱脂牛奶封闭,加一抗VEGF(1:200)、MMP-2(1:500)、Ki-67(1:500),4℃孵育过夜,加二抗(1:4000),室温孵育2h,显影,以β-actin(1:500)为内参,分析蛋白相对表达量。

### 1.7 裸鼠移植瘤模型建立

A549细胞悬液制备:取各组培养至对数生长期的A549细胞,收集细胞,重悬,调整细胞浓度为5×

$10^6/\text{mL}$ 。

36 只裸鼠于室温、昼夜光照、自由摄食与饮水条件下预饲养 7 d,随机分为对照组、miR-NC 组和 miR-614 组,每组 12 只。miR-NC 组和 miR-614 组裸鼠,在背部尾侧皮下种植 0.2 mL 对应组 A549 细胞悬液( $5 \times 10^6/\text{mL}$ ),建立裸鼠移植瘤模型,肉眼可见皮下成瘤,即为造模成功。对照组注射等体积生理盐水。每周测量 1 次,计算移植瘤体积 =  $0.5 \times$  最小径<sup>2</sup>  $\times$  最大径,背部尾侧皮下接种 5 周后,切除移植瘤组织并称量。

## 1.8 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料均采用( $\bar{x} \pm s$ )表示,3 组间比较采用单因素方差分析比较,3 组内两两组间的比较采用 SNK-q 分析。 $P < 0.05$  表示有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组 A549 细胞中 miR-614 表达

miR-614 mRNA 的表达水平在 A549 细胞 miR-614 组高于 miR-NC 组( $2.75 \pm 0.31$  vs.  $0.38 \pm 0.05$ ,  $P < 0.05$ ),miR-NC 组细胞 miR-614 水平与对照组比较,差异无统计学意义( $0.38 \pm 0.05$  vs.  $0.37 \pm 0.04$ ,  $P > 0.05$ )。

### 2.2 各组 A549 细胞的增殖情况

miR-614 组 A549 细胞增殖活性低于 miR-NC 组( $P < 0.05$ ),miR-NC 组细胞增殖活性与对照组无明显差异( $P > 0.05$ )。见图 1。

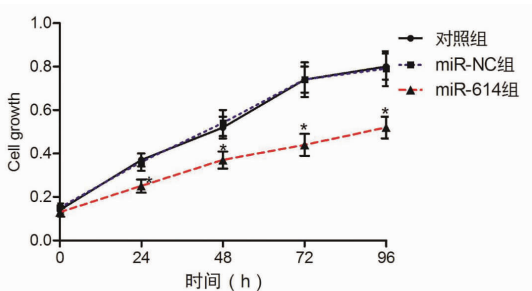


图 1 各组 A549 细胞的增殖情况

\* $P < 0.05$ , 与 miR-NC 组比较。

### 2.3 各组 A549 细胞侵袭细胞数

miR-614 组 A549 细胞侵袭细胞数低于 miR-NC 组( $74.21 \pm 10.96$  vs.  $127.34 \pm 17.66$ ,  $P < 0.05$ ),miR-NC 组细胞侵袭细胞数与对照组比较,差异无统计学意义( $127.34 \pm 17.66$  vs.  $129.48 \pm 18.52$ ,  $P > 0.05$ )。见图 2。

### 2.4 各组 A549 细胞 VEGF、MMP-2、TIMP-2、Ki-67 蛋白表达

miR-614 组 A549 细胞 VEGF、MMP-2 和 Ki-67

蛋白表达低于 miR-NC 组( $P < 0.05$ ),TIMP-2 蛋白表达高于 miR-NC 组( $P < 0.05$ );miR-NC 组细胞 VEGF、MMP-2、TIMP-2 和 Ki-67 蛋白表达与对照组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图 3。

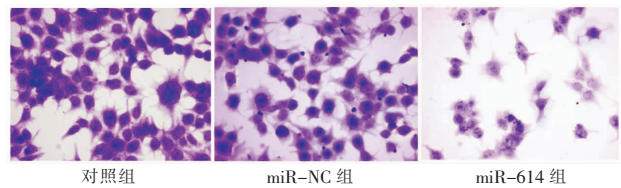


图 2 各组 A549 细胞侵袭细胞数( $\times 400$ )

对照组:结晶紫染色后膜下室细胞呈蓝紫色;miR-NC 组:膜下室细胞数与对照组无明显差异;miR-614 组:膜下室存在少量紫色细胞。

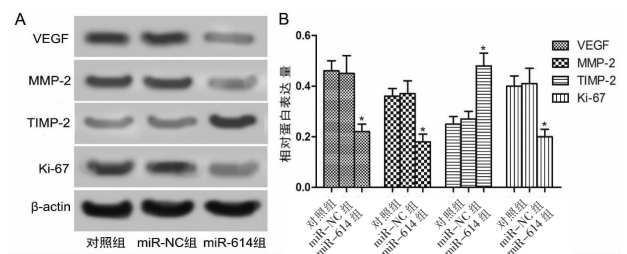


图 3 各组 A549 细胞 VEGF、MMP-2、TIMP-2、Ki-67 蛋白表达

A.Western Blot 检测蛋白的表达情况;B.各组细胞蛋白相对表达量;\* $P < 0.05$  与对照组比较。

### 2.5 各组裸鼠移植瘤的生长

miR-614 组裸鼠移植瘤质量低于 miR-NC 组 [ $(1.41 \pm 0.46)$  g vs.  $(2.63 \pm 0.42)$  g,  $P < 0.05$ ],miR-NC 组裸鼠移植瘤质量与对照组无明显差异 [ $(2.63 \pm 0.42)$  g vs.  $(2.60 \pm 0.41)$  g,  $P > 0.05$ ];且造模 3 周、4 周和 5 周后,miR-614 组裸鼠移植瘤体积低于 miR-NC 组( $P < 0.05$ ),miR-NC 组裸鼠移植瘤体积与对照组无明显差异( $P > 0.05$ )。见图 4。

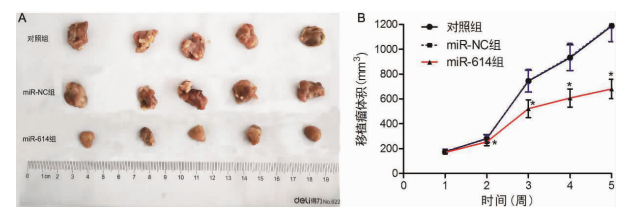


图 4 造模 5 周后各组裸鼠移植瘤组织

A.裸鼠移植瘤组织;B.移植瘤体积变化;\* $P < 0.05$ , 与对照组比较。

## 3 讨论

肺腺癌 A549 细胞来源于非小细胞癌,是一种较为常见的肺癌,约占所有肺癌的 80%,生存率较低,临床主要采用手术切除联合术前或术后的放化疗,以期尽可能清除病灶组织,延长生存时间<sup>[8]</sup>。miR-614 是一种新型 miRNAs,可以调节多种靶 mRNA 的表达,并调控细胞的增殖、分化、凋亡等多种病理生理过程<sup>[9]</sup>。miR-614 的表达与肺癌细胞的转

移有关,且 miR-614 的高水平表达可以抑制细胞的恶性生物学行为<sup>[10]</sup>。本研究进行了脂质体转染,以探讨 miR-614 过表达对 A549 细胞生长的影响,结果显示 miR-614 过表达可以显著抑制 Ki-67 蛋白表达和 A549 细胞的增殖活性。Ki-67 是一种常用的 A549 细胞增殖标记蛋白,其表达水平随细胞有丝分裂进程而变化,在细胞有丝分裂的 G0 期几乎不表达,到细胞有丝分裂的 G1 期后期开始出现表达,S 期、G2 期表达均表现持续升高的趋势,在有丝分裂的 M 期的表达水平最高,而后随着有丝分裂进程的结束,Ki-67 表达迅速降解<sup>[11-12]</sup>。Xu 等<sup>[13]</sup>研究显示非小细胞癌患者癌组织中 Ki-67 蛋白表达水平与肿瘤的进展有关,其高表达患者的预后较差,可用于临床预后评估,提示 miR-614 过表达可以 Ki-67 蛋白表达,抑制 A549 细胞增殖,抑制肺癌的进展。

本研究结果显示 miR-614 过表达可以显著 MMP-2 蛋白表达,抑制 A549 细胞侵袭。MMP-2 属于 MMPs 家族,其催化区结构中包含半胱氨酸的嵌入物,在生理静息状态下一般被结构中的前肽区遮挡,当 MMP-2 被激活后,这些嵌入物可以结合并裂解明胶、胶原和弹性蛋白,降解细胞外基质,还可以调节肿瘤细胞之间的黏附,促进血管生成和细胞侵袭<sup>[14]</sup>。TIMP-2 是主要由肿瘤细胞及间质细胞分泌的 MMP-2 蛋白抑制因子,可以抑制 MMP-2 的活性,保护细胞外基质和基膜的完整性,抑制肿瘤细胞发生侵袭<sup>[15]</sup>。Cao 等<sup>[16]</sup>研究显示,MMP-2/TIMP-2 蛋白表达可以调节肺癌细胞的侵袭能力、黏附能力、血管形成等,是促进肺癌浸润转移的关键。因此,miR-614 过表达可以抑制 MMP-2/TIMP-2 蛋白表达,抑制 A549 细胞侵袭。

本研究中,miR-614 过表达可以显著抑制肺腺癌 A549 细胞中 VEGF 蛋白表达。VEGF 是细胞内最主要的促血管生成因子,可以促进肿瘤细胞血管形成,在肺癌的进展中具有重要作用<sup>[17]</sup>。研究<sup>[18-19]</sup>显示,VEGF 蛋白表达升高可以通过促进血管形成,改变肿瘤细胞微环境,为肿瘤细胞提供丰富的营养,促进 A549 细胞的增殖活性,提示 miR-614 过表达可能通过 VEGF 蛋白表达,抑制肺癌细胞增殖。Deng 等<sup>[20]</sup>研究显示,VEGF 可以直接或间接促进 MMP-2 表达,促进肿瘤细胞的侵袭,同时 VEGF 诱导的血管形成也可以为癌细胞的侵袭和转移提供通道,促进肺癌的恶性进展。研究结果表明,miR-614 过表达可以抑制肺腺癌 A549 细胞中 VEGF 蛋白表达,抑制 A549 细胞的增殖活性和侵袭能力。本研究中,miR-614 过表达可以降低裸鼠移植瘤组

织的体积,减轻移植瘤质量,提示 miR-614 过表达可以抑制移植瘤的生长,结果与细胞实验基本一致,说明 miR-614 过表达可以抑制肺癌的生长和转移。

综上所述,miR-614 过表达可以抑制 VEGF、MMP-2/TIMP-2 和 Ki-67 蛋白表达,抑制肺腺癌 A549 细胞的增殖活性和侵袭能力,抑制移植瘤组织的生长和转移,临床有望作为肺癌治疗的新靶点。但本研究尚处于初步研究阶段,样本量较小,仍需大样本量的细胞水平和动物水平实验加以验证。

#### 参考文献

- [1] 孙可欣,郑荣寿,曾红梅,等. 2014 年中国肺癌发病和死亡分析[J]. 中华肿瘤杂志,2018,40(11):805-811.
- [2] Reck M, Taylor F, Penrod JR, et al. Impact of nivolumab versus docetaxel on health-related quality of life and symptoms in patients with advanced squamous non-small cell lung cancer: results from the checkmate 017 study[J]. J Thorac Oncol, 2018, 13(2):194-204.
- [3] Nagasaka M, Gadgeel SM. Role of chemotherapy and targeted therapy in early-stage non-small cell lung cancer[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2018, 18(1):63-70.
- [4] Shroff GS, de Groot PM, Papadimitrakopoulou VA, et al. Targeted therapy and immunotherapy in the treatment of non-small cell lung cancer[J]. Radiol Clin North Am, 2018, 56(3):485-495.
- [5] Zhang J, Gao D, Zhang H. Upregulation of miR-614 promotes proliferation and inhibits apoptosis in ovarian cancer by suppressing PPP2R2A expression[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(5):6285-6292.
- [6] Mao Y, Shen J, Lu Y, et al. RNA sequencing analyses reveal novel differentially expressed genes and pathways in pancreatic cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(26):42537-42547.
- [7] 律方,薛奇. miR-614 通过调控靶基因 PSA 表达抑制人肺癌细胞的侵袭和增殖能力[J]. 中国肺癌杂志, 2014, 17(10):715-721.
- [8] Saito S, Espinoza-Mercado F, Liu H, et al. Current status of research and treatment for non-small cell lung cancer in never-smoking females[J]. Cancer Biol Ther, 2017, 18(6):359-368.
- [9] 李文科,何佳. MiR-641 在肝细胞癌中的表达及其对 HepG2 细胞功能的影响[J]. 海南医学, 2019, 30(1):9-12.
- [10] 侯秋雨,魏亮,尚利峰. miR-614 通过调控靶基因 PSA 表达影响肺癌细胞的侵袭和增殖[J]. 医学分子生物学杂志, 2020, 17(4):325-330.
- [11] Chen YH, Zhou BY, Wu GC, et al. Effects of exogenous IL-37 on the biological characteristics of human lung adenocarcinoma A549 cells and the chemotaxis of regulatory T cells[J]. Cancer Biomark, 2018, 21(3):661-673.
- [12] Glatzel-Plucinska N, Piotrowska A, Grzegorzolka J, et al. SATB1 level correlates with Ki-67 expression and is a positive prognostic factor in non-small cell lung carcinoma[J]. Anticancer Res, 2018, 38(2):723-736.
- [13] Xu J, Liu P, Da J, et al. Prognostic value of Ki-67 in stage I non-small-cell lung cancer: a meta-analysis involving 1931 patients[J]. Pathol Res Pract, 2019, 215(5):855-860.

(下转第 688 页)