

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2022.02.002

❖ 基础研究 ❖

## MiR-24 对肺癌 A549 细胞增殖和迁移的影响

杜娟, 严馨, 邱丽, 易静叶, 阳甜

(西安交通大学第一附属医院呼吸与危重症医学科, 陕西 西安 710061)

**【摘要】目的:** 分析 MiR-24 对肺癌 A549 细胞增殖和迁移的影响, 并探讨其作用机制。**方法:** 人肺癌 A549 细胞分为观察组 (MiR-24 拟似物)、抑制组 (MiR-24 抑制物) 和对照组, 培养 0、12、24 和 48 h; MTT 法、划痕实验和 Transwell 法检测 MiR-24 对人肺癌 A549 细胞增殖和迁移能力, qPCR 和 Western blot 检测 MiR-24 对肺癌 A549 相关因子 (MMP-2 和 MMP-9) mRNA 和蛋白表达的影响。**结果:** 0 h 时, 观察组和抑制组的增殖活力与对照组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 在 12、24 和 48 h, 观察组的细胞增殖活力低于抑制组 ( $P < 0.05$ ); 观察组的迁移细胞数、侵袭细胞数和愈合率均低于对照组和抑制组 ( $P < 0.05$ ), 且对照组低于抑制组 ( $P < 0.05$ ); 观察组的 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达和 mRNA 表达水平均低于对照组和抑制组 ( $P < 0.05$ ), 且对照组低于抑制组 ( $P < 0.05$ )。**结论:** MiR-24 可有效抑制肺癌 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭, 且其作用机制可能与下调 MMP-2 和 MMP-9 的表达有关。

**【关键词】** MiR-24; 肺癌细胞; 细胞增殖; 细胞迁移; 基质金属蛋白酶

**【中图分类号】** R73-36; R734.2 **【文献标志码】** A

## Effect of miR-24 on the proliferation and migration of lung cancer A549 cells

DU Juan, YAN Xin, QIU Li, YI Jing-ye, YANG Tian

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi, China)

**【Abstract】 Objective:** To analyze the effects of miR-24 on proliferation and migration of lung cancer A549 cells and explore its mechanism. **Methods:** Human lung cancer A549 cells were divided into observation group (miR-24 agglomerate), inhibitory group (miR-24 inhibitory) and control group, cultured 0, 12, 24 and 48 h. MTT method, scratch experiment and Transwell method MiR-24 was detected by human lung cancer A549 cell proliferation and migration, qPCR and Western blot were used to detect the effect of MiR-24 on the mRNA and protein expression of A549 related factor (MMP-2 and MMP-9) in lung cancer. **Results:** At 0 h, there was no significant difference in proliferation activity between the observation group, the inhibitory group and the control group ( $P > 0.05$ ), and the cell proliferation activity of the observation group was lower than that of the inhibitory group at 12, 24 and 48 h ( $P < 0.05$ ). The number of migration cells, the number of invasion cells and the healing rate of the observation group were lower than those of the control group and inhibitory group ( $P < 0.05$ ), and the control group was lower than the inhibitory group ( $P < 0.05$ ). The MMP-2 and MMP-9 protein expression and mRNA expression of the observation group was lower than those of the control group and inhibitory group ( $P < 0.05$ ), and the control group was lower than the inhibitory group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** MiR-24 can effectively inhibit proliferation, migration and invasion of lung cancer A549 cells, and its mechanism may be related to down regulating the expression of MMP-2 and MMP-9.

**【Key words】** MiR-24; Lung cancer; Cell proliferation; Cell migration; Matrix metalloproteinases

肺癌是世界范围内发病率和死亡率均较高的恶性肿瘤疾病<sup>[1]</sup>, 截止 2013 年我国的肺癌发生率和病死率均居恶性肿瘤首位, 严重威胁人类的生命健康<sup>[2]</sup>。其中, 非小细胞肺癌作为肺癌的常见亚型, 约占所有病例的 85%, 传统的化疗药物虽然可有效延长患者的生存期, 但治疗副作用较大, 严重时还会

危及患者生命<sup>[3-4]</sup>。微小核糖核酸 24 (micro ribonucleic acid 24, MiR-24 等微小核糖核酸 (micro ribonucleic acid, miRNA) 作为机体内的癌基因或抑癌基因, 可通过抑制细胞因子的表达调控细胞的凋亡和分化过程, 进而影响宫颈癌、胆管癌等多种恶性肿瘤疾病的发生和进展<sup>[5-7]</sup>。异常表达的 MiR-24 在恶

基金项目: 陕西省重点研发项目 (2019KW-034)

作者简介: 杜娟 (1974 -), 女, 副主任护师。E-mail: djyxqlyt@163.com

通讯作者: 阳甜, 博士。E-mail: 826256508@qq.com

性肿瘤疾病的发生和发展过程中发挥出了“致癌”或“抑癌的作用”,甚至在恶性肿瘤疾病的放疗治疗中也发挥出了一定的作用。然而,临床中针对其在肺癌细胞中的影响研究却相对较少,且其作用机制尚不明确。本研究分析 MiR-24 对肺癌 A549 细胞增殖和迁移的影响,并探讨其作用机制,期望为肺癌的靶向治疗提供新方向。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

人肺癌 A549 细胞购于中国科学院细胞库;细胞培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清[赛默飞世尔科技(中国)有限公司],台盼蓝染色检测试剂盒(上海碧云天),噻唑蓝 [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT](上海碧云天),兔抗基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinases-2, MMP-2)(美国 Abcam 公司),兔抗基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinases-9, MMP-9)(美国 Abcam 公司),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)(美国 Abcam 公司),TUNEL 染色试剂盒(上海碧云天),青霉素/链霉素双抗(美国 Gibco 公司),MiR-24 拟似物(CATGAGGGCAGAAACCGATGCAA)和 MiR-24 抑制物(GTTGCATCGTTTCTGCCCTCATG)由广州锐博生物有限公司合成,二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(上海碧云天),辣根过氧化物酶标记山羊抗兔(上海碧云天)

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 将人肺癌细胞 A549 放入 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的双抗细胞培养基中,并将其放置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 的细胞培养箱(山东博科生物产业有限公司, QP-50)内培养,待细胞长满约 90% 时进行传代,培养后取对数生长的细胞用于实验。将加入 MiR-24 拟似物的细胞作为观察组,加入 MiR-24 抑制物的细胞作为抑制组,另设空白对照作为对照组。

1.2.2 MTT 检测细胞增殖能力 将人肺癌 A549 细胞接种于 1 × 10<sup>4</sup>/孔的 96 孔板(赛默飞世尔科技有限公司)内,12 h 后分别转染 MiR-24 拟似物和抑制物,分别作为观察组和抑制组,另设空白对照组,并在处理后分别于 0、12、24 和 48 h 各个不同时间段分别加入 MTT,于 37 °C 条件下孵育 4 h,随后加入 100 μL DMSO,震荡 15 min 后于 490 nm 处测量吸光值(optical density, OD),以反映细胞增殖活力。OD<sub>490</sub> 值越高,细胞的活力越高。平行试验 3 次。

1.2.3 划痕实验检测细胞迁移能力 将处理后的

人肺癌 A549 细胞接种于 6 孔板内,每孔 3 mL,待细胞生长至 90% 融合后使用 200 μL 的吸头在孔板内垂直划痕,使用磷酸盐缓冲液(PBS)对清洗 3 次后,将 A549 细胞分为 3 组,分别加入无血清培养基(对照组)、MiR-24 拟似物(观察组)和抑制物(抑制组)继续培养,每组设立 2 个复孔,培养时间均为 24 h。分别于实验 0 h 和 24 h 于光学显微镜下观察划痕伤口的宽度并做好记录,计算创面的愈合率作为细胞迁移能力的判定依据。创面愈合率 = (1-24 h 创面宽度/0 h 创面宽度) × 100% [8]。

1.2.4 Transwell 法检测细胞侵袭能力 将对数生长的人肺癌 A549 细胞接种于 Transwell 小室中,每孔密度为 1 × 10<sup>5</sup>,终体积为 200 μL,将 600 μL 的无血清培养基加入至下室内,待 12 h 后更换培养基,将 A549 细胞分为 3 组,分别加入无血清培养基(对照组)、MiR-24 拟似物(观察组)和抑制物(抑制组)继续培养,每组设立 2 个复孔。转染 24 h 后,使用棉签将上层细胞擦去,使用浓度为 95% 的乙醇溶液固定 20 min 后,使用 4% 的台盼蓝染色 20 min,于 200 倍的显微镜下观察实验结果,每个小室随机抽取 6 个视野拍照并计算穿膜细胞个数。

1.2.5 Western blot 检测相关蛋白的表达水平 细胞处理 24 h 后进行收集,裂解后再次收集细胞总蛋白,取等量的蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后将其转印至聚偏氟乙烯(poly(1,1-difluoroethylene), PVDF)膜上,使用含有 5% 脱脂奶粉的封闭液将其封闭 60 min,随后加入兔抗 MMP-2(1:2 000)、兔抗 MMP-9(1:4 000)和鼠抗 β-actin(1:8 000),于 4 °C 的条件下反应 8 h,使用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:10 000)于室温条件下反应 60 min,以 GAPDH 作为内参照,使用凝胶分析软件进行分析,观察内参泳道灰度及目的条带之间的比值作为蛋白相对表达水平。

1.2.6 实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)检测相关 mRNA 表达 利用 qPCR 法针对人肺癌 A549 细胞中的 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 表达水平进行检测,采用 TRizol 法提取细胞总 RNA 后进行逆转录反应,反应条件为:37 °C 条件下反应 15 min,98 °C 条件下反应 5 min,反应结束后将 cDNA 稀释至 5 倍,放置于 -20 °C 的条件下保存,随后使用检测试剂盒(天根生化科技有限公司)配置反应体系并在 PCR 仪(赛默飞世尔科技有限公司)上进行反应,反应条件为:95 °C 条件下 15 min,95 °C 条件下 10 s,62 °C 条件下 10 s,共计反应 40 个循环后,使用仪器自带的程序分析溶解曲线。

### 1.3 统计学分析

使用 SPSS22.0 软件进行统计分析。计量资料采用( $\bar{x} \pm s$ )表示,两两比较使用独立样本 *t* 检验,多组间比较使用单因素 ANOVA 分析。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MiR-24 对肺癌 A549 细胞增殖的影响

0 h 时,观察组和抑制组的 OD<sub>490</sub> 值比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );在 12、24 和 48 h,观察组的 OD<sub>490</sub> 值低于对照组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 MiR-24 对肺癌 A549 细胞增殖的影响( $\bar{x} \pm s, OD_{490}$ )

组别	0 h	12 h	24 h	48 h
观察组	0.26 ± 0.02	0.35 ± 0.02 *	0.47 ± 0.02 *	0.63 ± 0.03 *
抑制组	0.25 ± 0.02	0.56 ± 0.03	0.76 ± 0.03	1.06 ± 0.03
<i>F</i> 值	0.333	47.172	84.913	221.847
<i>P</i> 值	0.729	<0.001	<0.001	<0.001

\*  $P < 0.05$ ,与抑制组比较。

### 2.2 MiR-24 对肺癌 A549 细胞迁移和侵袭的影响

单因素 ANOVA 分析结果显示,各组间的迁移细胞数、侵袭细胞数和愈合率比较,观察组 < 对照组 < 抑制组,且组间三项指标比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 2、图 1 和图 2。

### 2.3 MiR-24 对肺癌 A549 细胞相关蛋白表达的影响

单因素 ANOVA 分析结果显示,MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平比较,观察组 < 对照组 < 抑制组,组间两项指标比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 3 和图 3。

表 2 MiR-24 对肺癌 A549 细胞迁移和侵袭的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	迁移细胞数(个)	愈合率(%)	侵袭细胞数(个)	0 h 创面宽度	24 h 创面宽度
对照组	115.33 ± 6.51	51.57 ± 6.30	55.47 ± 3.06	0.85 ± 0.03	0.42 ± 0.06
观察组	86.33 ± 6.11 **	26.64 ± 1.29 **	37.00 ± 4.58 **	0.88 ± 0.05	0.65 ± 0.05 **
抑制组	120.33 ± 5.03 *	72.03 ± 4.67 *	82.33 ± 2.52 *	0.89 ± 0.07	0.26 ± 0.03 **
<i>F</i> 值	28.886	73.756	128.155	0.470	49.414
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	0.646	<0.001

\*  $P < 0.05$ ,与对照组比较;# $P < 0.05$ ,与抑制组比较。

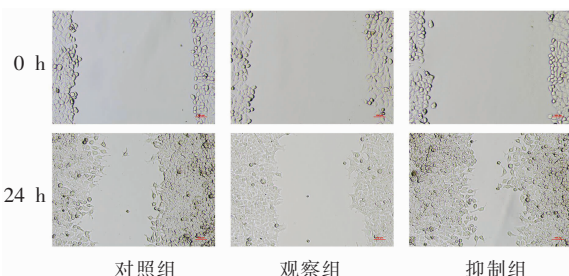


图 1 MiR-24 对肺癌 A549 细胞迁移能力的影响

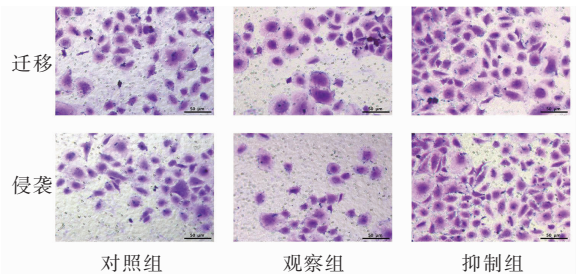


图 2 MiR-24 对肺癌 A549 细胞侵袭能力的影响

表 3 MiR-24 对肺癌 A549 细胞相关蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	MMP-2	MMP-9
对照组	0.09 ± 0.01	0.22 ± 0.03
观察组	0.05 ± 0.02 * #	0.11 ± 0.03 * #
抑制组	1.12 ± 0.04 *	1.20 ± 0.06 *
<i>F</i> 值	2 107.170	666.255
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001

\*  $P < 0.05$ ,与对照组比较;# $P < 0.05$ ,与抑制组比较。

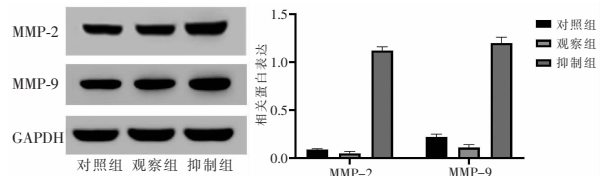


图 3 MiR-24 对肺癌 A549 细胞 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的影响

### 2.4 MiR-24 对肺癌 A549 细胞相关 mRNA 表达的影响

单因素 ANOVA 分析结果显示,MMP-2 和 MMP-9 mRNA 表达水平比较,观察组 < 对照组 < 抑制组,组间两项指标比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 4。

表 4 MiR-24 对肺癌 A549 细胞相关 mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	MMP-2	MMP-9
对照组	0.95 ± 0.11	0.98 ± 0.15
观察组	0.53 ± 0.08 * #	0.61 ± 0.11 * #
抑制组	1.84 ± 0.52 *	1.91 ± 0.32 *
<i>F</i> 值	13.939	29.472
<i>P</i> 值	0.006	0.001

\*  $P < 0.05$ ,与对照组比较;# $P < 0.05$ ,与抑制组比较。

## 3 讨论

肺癌是目前导致癌症相关性死亡的常见病因,每年有 180 万的肺癌新发病例,且有 160 万人因肺癌死亡<sup>[9]</sup>,而肺癌患者的 5 年生存率仅有 4% ~ 17%<sup>[10]</sup>。临床中,针对肺癌患者的治疗方式包括手术治疗、药物治疗和放射干预治疗等,随着近年来临床治疗水平的不断提升,各种治疗方式虽取得了一定的进步,但肺癌患者的远期生存率仍相对较低,因

此迫切需要一种更加有效的治疗手段<sup>[11]</sup>。近年来,大量临床研究<sup>[12-15]</sup>发现 miRNA 广泛存在于人体的体液、组织以及血液当中,在肿瘤的发生、发展以及预后中至关重要,由于其可在血清中稳定存在,且具有一定的重复性,因此在临床中有较好的应用价值<sup>[12]</sup>。譬如, MiR-21、MiR-34 和 MiR-23 等多种 miRNA 均在肺癌组织中存在明显的表达异常,对肺癌的发生和发展有重要作用<sup>[13-15]</sup>。

MiR-24 在人体多种组织内广泛存在,可调控细胞的生长发育和增殖、凋亡,但在不同细胞内对细胞的增殖和凋亡调控作用却并不相同<sup>[16-17]</sup>。本研究发现观察组在 12 h、24 h 和 48 h 的细胞增殖率低于抑制组 ( $P < 0.05$ ),观察组的迁移细胞数、侵袭细胞数和愈合率均低于对照组和抑制组 ( $P < 0.05$ ),且对照组低于抑制组 ( $P < 0.05$ ),说明 MiR-24 过表达可有效抑制肺癌 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭能力,与既往研究<sup>[18]</sup>结果相似。

MMP 是一种内肽酶,可降解大部分的细胞外基质成分,具有促进肿瘤细胞突破组织屏障,侵袭邻近组织的能力<sup>[19]</sup>。MMP-2 和 MMP-9 在许多肿瘤组织中均有所表达,不仅影响肿瘤细胞的组织屏障及其侵袭邻近组织的能力,且对肿瘤细胞的黏附能力也可以产生一定的作用<sup>[20]</sup>。本研究发现,MMP-2、MMP-9 蛋白以及两者 mRNA 的表达比较,观察组 > 对照组 > 抑制组 ( $P < 0.05$ ),提示 MiR-24 可能通过对 MMP-2 和 MMP-9 表达水平的调控,进而对肺癌 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭能力产生抑制作用。

综上所述,MiR-24 可有效抑制肺癌 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭,且其作用机制与对 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的下调有关。

#### 参考文献

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: A Cancer Journal of Clinicians, 2018, 68(6): 394-424.

[2] 孙可欣, 陈万青, 赫捷, 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.

[3] Jonna S, Subramaniam DS. Molecular diagnostics and targeted therapies in non-small cell lung cancer (NSCLC): an update[J]. Discovery Medicine, 2019, 27(148): 167-170.

[4] Osmani L, Askin F, Gabrielson E, et al. Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy[J]. Seminars in Cancer Biology, 2018, 52(1): 103-109.

[5] Qadir MI, Faheem A. miRNA: A diagnostic and therapeutic tool for pancreatic cancer[J]. Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression, 2017, 27(3): 197-204.

[6] 张贤雨, 马欢, 席强, 等. 局部晚期宫颈癌患者同步放疗后应用 TP 方案巩固化疗效果及血清 miR-155、miR-24 水平变化[J]. 山东医药, 2020, 60(29): 43-45.

[7] 李彩云, 毛静月, 张峥程, 等. 宫颈癌患者血清 miR-24 和 miR-155 表达水平及临床意义[J]. 中国妇幼保健, 2019, 34(8): 1864-1866.

[8] 韩延忠, 沈娟, 吴立蓉, 等. 虎杖苷对 2 型糖尿病小鼠溃疡创面愈合影响的实验研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(19): 1934-1937.

[9] Bade BC, Cruz CSD. Lung Cancer 2020: Epidemiology, etiology, and prevention[J]. Clinics in Chest Medicine, 2020, 41(1): 1-24.

[10] Kawamura H, Morishima T, Sato A, et al. Effect of adjuvant chemotherapy on survival benefit in stage III colon cancer patients stratified by age: a Japanese real-world cohort study[J]. BMC Cancer, 2020, 20(1): 19.

[11] 杜淑芳, 苏智霞, 樊肖冲, 等. 苏芬太尼通过 PI3K/Akt 信号通路对肺癌 A549 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响[J]. 中国实验诊断学, 2021, 25(3): 429-433.

[12] Shao T, Wang G, Chen H, et al. Survey of miRNA-miRNA cooperative regulation principles across cancer types[J]. Briefings in Bioinformatics, 2019, 20(5): 1621-1638.

[13] Powrózek T, Małecka-Massalska T. MiRNA and lung cancer radiosensitivity: a mini-review[J]. European Reviews for Medical and Pharmacological Sciences, 2019, 23(19): 8422-8428.

[14] Mao Y, Xue P, Li L, et al. Bioinformatics analysis of mRNA and miRNA microarray to identify the key miRNA gene pairs in small cell lung cancer[J]. Molecular Medicine Reports, 2019, 20(3): 2199-2208.

[15] Guo S, Zhang J, Zhao YY, et al. The expressions of miR-151a-5p and miR-23b in lung cancer tissues and their effects on the biological functions of lung cancer A549 cells[J]. European Reviews for Medical and Pharmacological Sciences, 2020, 24(12): 6779-6785.

[16] 苏书娟, 樊涛, 孙义长, 等. miR-24 对肺癌 A549 细胞化疗敏感性的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(6): 1042-1048.

[17] Dong X, Liu Y. Expression and significance of miR-24 and miR-101 in patients with advanced gastric cancer[J]. Oncology Letters, 2018, 16(5): 5769-5774.

[18] 王黎明, 杨大业, 仇剑, 等. miR-24 对肺癌生物学功能的抑制作用[J]. 中国医科大学学报, 2019, 48(1): 71-74.

[19] 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]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2019, 455(1-2): 195-206.

[20] Wang X, Chen Q, Zhang X, et al. Matrix metalloproteinase 2/9-triggered-release micelles for inhaled drug delivery to treat lung cancer: preparation and in vitro/in vivo studies[J]. International Journal of Nanomedicine, 2018, 13(13): 4641-4659.

(收稿日期: 2021-05-11)

修回日期: 2021-06-28)