

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.10.001

miRNA-451 表达质粒的构建及对人 A549 肺癌细胞侵袭转移及凋亡的影响

姚莉¹, 孙艳¹, 查何¹, 彭惠民²

(重庆医科大学 1. 细胞生物学及遗传学教研室; 2. 分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016)

【摘要】目的: 探讨 miRNA-451 对人 A549 肺癌细胞侵袭转移及凋亡的影响。方法: Hsa-miRNA-451 序列通过 miRBase 数据库查找, 根据此序列设计出 2 条寡核苷酸片段, 将目的基因经过退火处理后克隆至真核表达载体 pGenesil-1.1 质粒中, 从而构建成 miRNA-451 真核表达载体 (pGenesil-1.1-miRNA-451 质粒)。将 pGenesil-1.1-miRNA-451 及 pGenesil-1.1-control 质粒分别转染人 A549 肺癌细胞, 经过 G418 的筛选, 建立 pGenesil-1.1-miRNA-451 及 pGenesil-1.1-control 稳定表达的细胞株。流式细胞术分析检测细胞凋亡的情况; Transwell 小室检测 miRNA-451 对细胞侵袭能力的影响; 细胞划痕实验检测细胞的迁移情况。结果: 经测序证实 miRNA-451 真核表达质粒构建成功, 与未处理的人 A549 肺癌细胞和稳定表达 pGenesil-1.1-control 的细胞相比, 稳定表达了 pGenesil-1-miRNA-451 的人 A549 肺癌细胞的侵袭和迁移能力均明显受到抑制影响, 而细胞凋亡无明显变化 ($P>0.05$)。结论: miRNA-451 对人 A549 肺癌细胞侵袭转移具有显著的抑制作用, 但对细胞凋亡作用不明显。

【关键词】肺癌; miRNA-451; 侵袭; 转移; 凋亡**【中国图书分类法分类号】**R394.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-04-05

Construction of miRNA-451 expression plasmid and its effect on invasion, metastasis and apoptosis in human A549 lung cancer cells

YAO Li¹, SUN Yan¹, ZHA He¹, PENG Huiming²

(1. Department of Cell Biology and Genetics; 2. Molecular Medicine and Tumor Research Center, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the effect of miRNA-451 on invasion, metastasis and apoptosis of human A549 lung cancer cells. **Methods:** Hsa-miRNA-451 sequence was found in miRBase database and two oligonucleotides were designed according to the sequence. The targeted gene was annealed and cloned to eukaryotic expression vector plasmid pGenesil-1.1 thus miRNA-451 eukaryotic expression vector was built (pGenesil-1.1-miRNA-451 plasmid). pGenesil-1.1-miRNA-451 and pGenesil-1.1-control plasmid were transfected into human A549 lung cancer cells and stably expressed pGenesil-1.1-miRNA-451 and pGenesil-1.1-control cell lines were established after being selected by G418. Flow cytometry was employed to detect cell apoptosis, transwell chambers to detect miRNA-451 cell invasion and cell scratch assay to detect cell metastasis. **Results:** Sequencing showed that miRNA-451 eukaryotic expression plasmids were successfully constructed. Cell invasion and metastasis were inhibited in stably expressed pGenesil-1.1-miRNA-451 cell lines compared with those in untreated human A549 lung cancer cells and stably expressed pGenesil-1.1-control cell lines, however, there was no change in cell apoptosis ($P>0.05$). **Conclusion:** miRNA-451 has significant inhibitory effect on invasion and metastasis of human A549 lung cancer cell, however, not on cell apoptosis.

【Key words】lung cancer; miRNA-451; invasion; metastasis; apoptosis

肺癌是最常见的肺原发性恶性肿瘤, 中国肺癌死亡率居癌症之首, 过去几十年中, 肺癌的发病率

和死亡率明显有升高的趋势^[1]。研究者希望通过深入研究探索肺癌发生发展的分子生物学基础找到最终的解决方法, 以提高肺癌的早期诊断率, 配合外科手术达到最终的治疗目的^[2]。

目前, 对于肺癌出现的机理尚未明确阐释, 微小 RNA (microRNA, miRNA) 的出现为研究肺癌提供了更广阔的思路。miRNA 长约 20~25 个核苷酸, 是 1

作者介绍: 姚莉 (1985-), 女, 硕士,

研究方向: microRNA 在肺癌疾病中的分子机制。

通信作者: 彭惠民, 男, 教授, Email: phm614@qq.com。

基金项目: 国家自然科学基金课题资助项目 (编号: 30800534); 重庆医科大学重点科研课题资助项目 (编号: XBZD201001)。

种非常保守的内源性非编码单链小 RNA 分子^[3], 通过结合特定的靶 mRNA, 从而调控蛋白质的表达实现基因调控的^[4]。现在大量的研究结果证实, miRNA 在肺癌细胞的发生, 增殖, 转移及浸润过程中发挥了重要的作用^[5]。

近年来, 在乳腺癌、胃肠道肿瘤及胶质瘤中均有关于 miRNA-451 的报道研究, 而在肺癌方面报道甚少。有文献报道 miRNA-451 经过 RT-PCR 验证, 在肺癌中呈低表达, 提示 miRNA-451 可能参与了早期肺癌的发生^[6]。

本课题通过构建 pGenesil-1.1-miRNA-451 的真核表达质粒, 并将其转染到人肺腺癌细胞(A549)中, 观察上调 miRNA-451 对 A549 细胞凋亡、侵袭和转移的影响, 从而更进一步研究 miRNA-451 在肺癌中产生的生物学作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、菌株及质粒 人肺腺癌细胞(A549)、感受态细胞 DH5 α 均由本实验室保存, pGenesil-1.1 载体、pGenesil-1.1-control(阴性对照质粒)均购自武汉晶赛生物工程有限公司。

1.1.2 试剂 质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自鼎国生物技术有限责任公司; 各种限制性内切酶、T4DNA 连接酶、RT-PCR 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司; RNAse 和 Lipofectamine™ 2000 脂质体转染试剂盒购自 Invitrogen 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 miRNA-451 真核表达质粒的构建及鉴定

1.2.1.1 miRNA-451 转录模板 DNA 链的设计与合成 hsa-miRNA-451 序列 AAACCGTTACCATTACTGAGTT 通过 miR-Base 数据库查找, 根据此序列设计出 2 条寡核苷酸片段: hsa-miRNA-451-1.1-A, 5'-[CACC]AAACCGTTACCATTACTGAGTT[TTTTTG]-3'; hsa-miRNA-451-1.1-B, 5'-[AGCTC][AAAAAA]AACTCAGTAATGGTAACGGTTT-3', 合成自武汉晶赛生物工程有限公司。

1.2.1.2 miRNA-451 真核表达质粒的构建 pGenesil-1.1 质粒, 是含有人 hU6 启动子的 siRNA 真核表达载体, 卡那霉素为该质粒的抗性标记。首先进行 DNA 单链模板退火, 然后用 T4 连接酶将其与经 Eco I 酶切的线性 pGenesil-1.1 空载体进行连接, 最后将连接产物转化至感受态细胞 DH5 α , 挑取单克隆菌落, 进行卡那霉素抗性克隆筛选。

1.2.1.3 miRNA-451 真核表达质粒的酶切鉴定及测序 由于质粒载体 pGenesil-1.1 里面本来只有 1 个 Sac I 的酶切位点, 而合成的寡核苷酸片段中有 1 个 Sac I 酶切位点, 因此用限制性内切酶 Sac I 做酶切鉴定, Sac I 酶切时应该能切出

约 900 bp 的 1 条 DNA 条带, 通过电泳观察酶切片段的分子量大小初步进行鉴定, 然后送武汉晶赛生物工程有限公司进行测序, 测序出正确的重组质粒, 且被命名为 pGenesil-1.1-hsa-miRNA-451。

1.2.2 人 A549 肺癌细胞的培养及稳定转染 37 °C, 5%CO₂, 10%胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)的达尔伯克改的伊格尔培养基(Dulbecco's modified eagle's medium, DMEM)的条件下进行细胞培养, 待细胞生长良好后利用脂质体转染试剂盒将 pGenesil-1.1-hsa-miRNA-451 质粒和 pGenesil-1.1-control 质粒分别转染人 A549 肺癌细胞, 转染 24 h 后, 更换为选择性培养基(含 600 μ g/ml 的 G418 和 10%FBS 的 DMEM 高糖培养基), 筛选 2 周可见抗性克隆形成, 挑取单克隆再以维持培养基(400 μ g/ml 维持量的 G418)扩大培养, 以此建立稳定转染的人 A549 肺癌细胞系。

1.2.3 实时荧光定量 PCR(Real-time quantitative PCR, RT-qPCR)检测转染后 miRNA-451 的表达 转染 48 h 后, 提取 A549、A549-control 和 A549-miRNA-451 3 组细胞总 RNA, 以 U6 作参照, 进行 RT-qPCR 扩增, 反应体系 20 μ l, 其中 2 $\times$ Real-time Buffer 10 μ l, miR special Primer set(5 μ mol/L) 0.2 μ l, DNA polymerase(5 U/ μ l)1 μ l, cDNA 2 μ l, dH₂O 6.8 μ l。反应条件: 95 °C 30 s, 1 个循环; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环。

1.2.4 Transwell 体外侵袭实验 用预冷的无血清 DMEM 培养基按 7:1 稀释 ECM 基质胶, 取 40 μ l 稀释液加入 Transwell 上室, 放置于 37 °C、5%CO₂ 的孵箱中。30 min 后取出孔板, 收集 A549、经过 18 h 转染的 A549-miRNA-451 和 A549-control 3 组细胞, 在上室加入每毫升含有 2.5 $\times$ 10⁵ 个细胞的无血清培养基 100 μ l, 下室加入含 10%FBS 的培养基 600 μ l, 在 37 °C、5%CO₂ 条件下培养 16 h。然后取出培养板, 小心洗去多余培养基, 用磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline, PBS)反复清洗 3 次, 甲醇室温固定 30 min, 轻轻用棉签擦去微孔膜上表面的细胞, PBS 清洗后用苏木素染色, 3 min 后洗去染液。最后将小室倒置载玻片上, 光学显微镜镜下观察。

1.2.5 细胞划痕实验 将对数生长期的人 A549 肺癌细胞、稳定表达了 pGenesil-1.1-control 及 pGenesil-1.1-hsa-miRNA-451 的人 A549 肺癌细胞, 经过胰酶消化吹打混匀并充分重悬后, 进行细胞计数。将细胞稀释至 1 $\times$ 10⁵ 个/孔, 接种至 24 孔细胞培养板, 加入含 10%FBS 的培养基, 放入 37 °C, 5%CO₂ 培养箱中进行培养, 待细胞长成单层后将培养液弃去, 在单层细胞的中央 24 孔板底部用灭菌枪头在划出一划痕, 吸取死亡细胞后进行显微镜下拍照, 再加入无血清培养基, 放入 37 °C, 5%CO₂ 培养箱中进行培养, 24 h 后于相同位置再次拍照。

1.2.6 流式细胞术 转染 24 h 后, 依据凋亡试剂盒收集 A549、A549-miRNA-451 和 A549-control 3 组细胞, 用 PBS 洗涤 1 次, 离心沉淀后, 加入 0.5 ml PBS 重悬细胞, 再加入 61 μ l FITC-annexin V 和 20 μ l PI, 室温下避光孵育 15 min, 离心弃上清, 加入 300 μ l 结合缓冲液, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, 计数 1 $\times$ 10⁴ 个细胞, 实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,实验数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组数据的比较采用一维方差进行数据分析,以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pGenesil-1.1-miRNA-451 真核表达质粒的酶切鉴定及测序

因为质粒载体 pGenesil-1.1 里面本来只有 1 个 *Sac* I 的酶切位点,而质粒 hsa-miRNA-451 均能够被 *Sac* I 所酶切出 1 条约 900 bp 的 DNA 条带如图 1,说明目的基因片段 hsa-miRNA-451 已经插入到质粒载体 pGenesil-1.1 里,然后送武汉晶赛生物技术有限公司测序鉴定,结果如图 2 所示:从第 358 到第 379 个碱基序列结果与我们设计的寡核苷酸片段完全吻合,证实重组质粒构建成功。

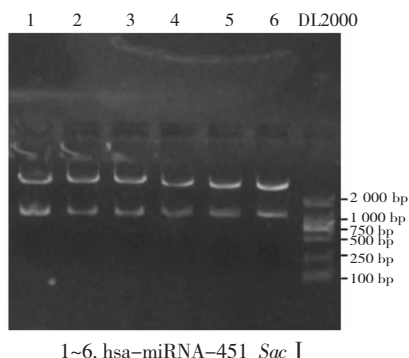


图 1 重组质粒 pGenesil-1.1-hsa-miRNA-451 的酶切鉴定电泳图

Fig.1 Restriction endonuclease electrophoresis of recombinant plasmid pGenesil-1.1-hsa-miRNA-451

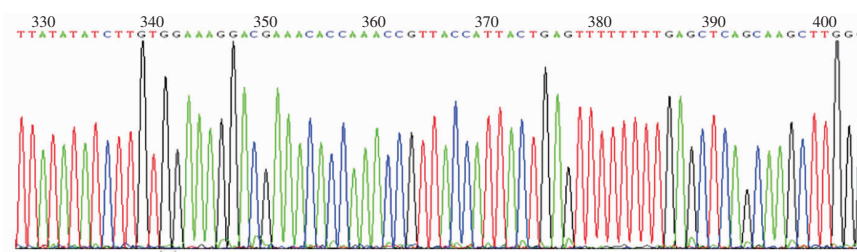
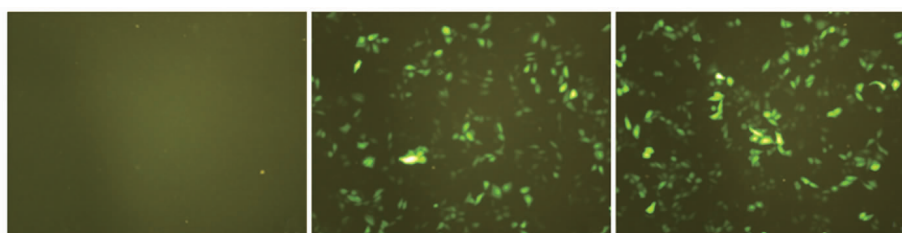


图 2 pGenesil-1-miRNA-451 测序图谱
Fig.2 Sequencing map of PGenesil-1-of miRNA-451



A. A549 B. A549-control C. A549-miRNA-451

图 3 转染 24 h 荧光表达情况 (200 ×)

Fig.3 Fluorescence expression at 24h after the transfection (200 ×)

2.2 建立稳定转染 pGenesil-1.1-miRNA-451 及 pGenesil-1.1-control 的人肺癌 A549 细胞株

使用荧光显微镜观察质粒转染细胞 24 h 后荧光表达情况,未转染质粒的人 A549 肺癌细胞组无荧光表达,而转染了 pGenesil-1.1-control 及 pGenesil-1.1-hsa-miRNA-451 的人 A549 肺癌细胞组,具有细胞数量较多的荧光表达,可见转染效率均高于 60%,见图 3。

2.3 实时荧光定量 PCR 检测转染后 miRNA-451 的表达

结果如图 4 所示:经 RT-qPCR 检测转染后 miRNA-451 的表达,A549-miRNA-451 细胞组 miRNA-451 表达明显比 A549 细胞组和 A549-control 细胞组高约 4.3 倍,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 Transwell 小室检测细胞侵袭能力

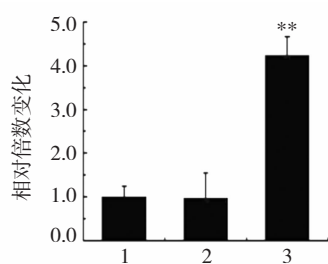
转染 18 h 后,在预先铺好的基质胶上加入等量细胞,16 h 后观察细胞穿过微孔膜情况并计数,结果见图 5。转染了 pGenesil-1.1-miRNA-451 的 A549,穿过微孔膜细胞数约是未转染的人 A549 肺癌细胞组的 30%,转染了 pGenesil-1.1-control 的 A549,穿过微孔膜细胞数与未转染的人 A549 肺癌细胞组相比无明显变化,说明 miRNA-451 对人 A549 肺癌细胞的侵袭能力产生了抑制作用。

2.5 细胞划痕实验检测细胞的迁移情况

细胞划痕实验结果见图 6。24 h 后,A549-control 细胞组与未转染的 A549 细胞组相比,两组细胞的迁移距离无明显差异,而 A549-miRNA-451 细胞组间距明显比未转染的 A549 细胞间距大,说明 miRNA-451 对 A549 细胞的迁移产生了抑制作用。

2.6 流式细胞术分析细胞凋亡

流式细胞术测细胞凋亡结果见图 7,A、B 组和 C 组细胞凋亡率分别为 $(3.06 \pm 0.85)\%$ 、 $(2.52 \pm 0.56)\%$ 和 $(5.22 \pm 1.68)\%$,



1. A549 细胞; 2. A549-control; 3. A549-miRNA-451

**: $P < 0.05$ ($n = 3$)

图 4 RT-qPCR 检测 miRNA-451 在 3 种细胞中的表达

Fig.4 Expression of miRNA-451 in three kinds of cells detected by RT-qPCR

统计学分析显示,各组细胞凋亡率之间无明显差异($P > 0.05$),结果表明 A549-miRNA-451 细胞组与 A549-control 细胞组和未转染的 A549 细胞组相比凋亡率无明显差别,说明 miRNA-451 对 A549 细胞的凋亡作用影响不明显。

3 讨论

伴随着 miRNA 功能性研究的不断发展,大量研究表明 miRNA 表达调控的异常与肿瘤的发生发

展有着密切的联系^[7]。在肿瘤发展过程中,miRNA 通过对细胞增殖、凋亡及侵袭转移产生影响,从而发挥癌基因或抑癌基因的作用。本实验通过构建 miRNA-451 真核表达载体,上调 miRNA-451 的表达,研究 miRNA-451 对肺癌 A549 细胞侵袭、转移和凋亡的调控作用。

Esau 等^[8]使用 pCR3 质粒有效地上调了 miRNA 基因的表达。在此次实验中选用的是含有 hU6 启动子的 siRNA 真核表达载体 pGenesil-1.1 质粒,将 DNA 序列转录成单链 RNA,对于原核细胞的筛选是因为该质粒含有卡那霉素抗性基因,而对真核细胞的筛选是因为该质粒含有新霉素抗性基因,pGenesil-1.1 质粒还含有 1 个增强型绿色荧光蛋白基因,方便了对质粒转染和稳定筛选进行直接观察。在该项实验中,通过酶切、测序证实,成功构建了 miRNA-451 真核表达载体,并且通过转染技术和 G418 筛选获得了稳定表达 miRNA-451 的 A549 细胞株。

肿瘤细胞侵袭和转移能力是恶性的生物学行为,也是引起肺癌高死亡率的因素之一^[9]。2010 年

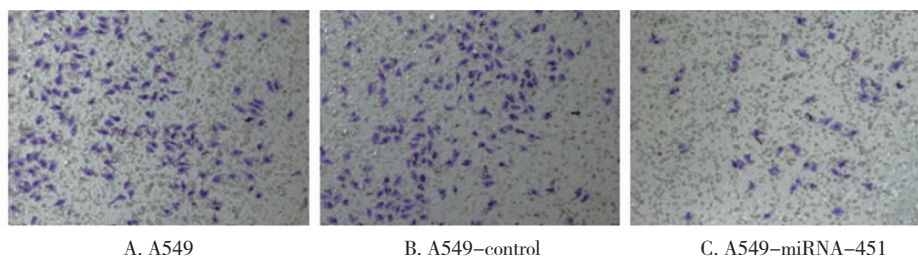


图 5 细胞侵袭能力 (苏木精染色, 200 ×)

Fig.5 Cell invasion (hematoxylin staining, 200 ×)

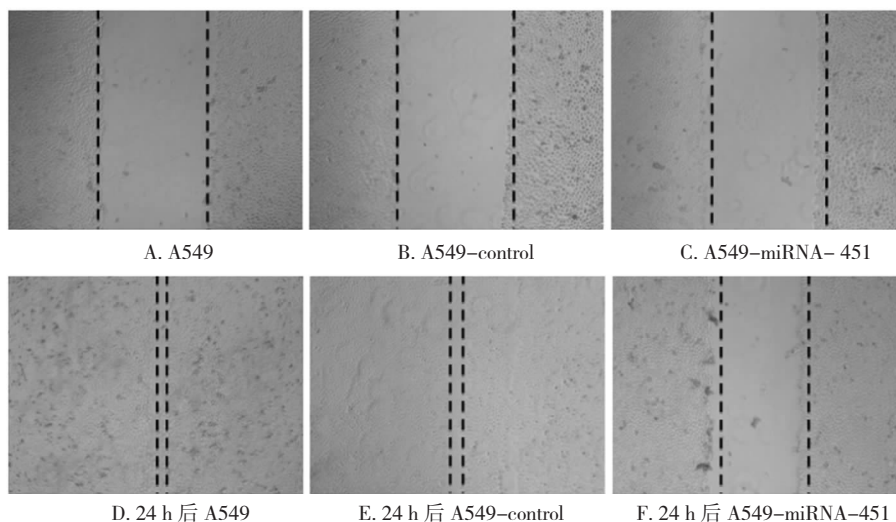


图 6 细胞迁移情况 (200 ×)

Fig.6 Cell migration (200 ×)

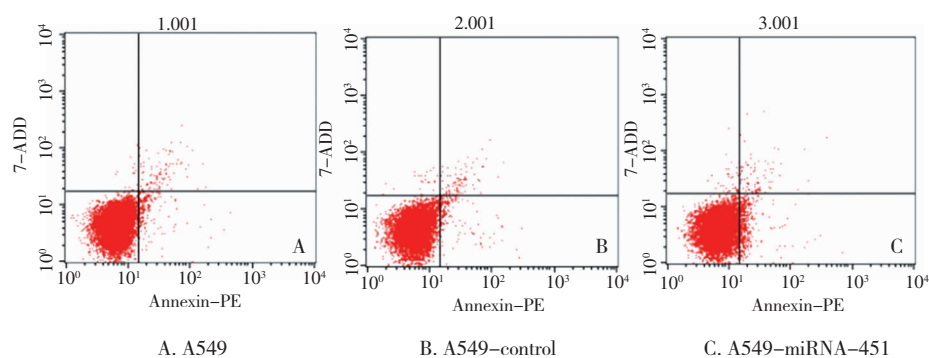


图 7 细胞凋亡情况

Fig.7 Cell apoptosis

Godlewski等^[10]研究了 miRNA-451 的高表达对于脑胶质瘤细胞侵袭和转移具有显著的抑制作用,而 miRNA-451 对人 A549 肺癌细胞的侵袭和迁移能力是否具有抑制作用目前并未有详细报道。本研究用 Transwell 体外侵袭实验去检测细胞体外侵袭的能力,用细胞划痕实验检测细胞的迁移能力,结果显示转染 pGenesil-1.1-miRNA-451 的 A549 细胞侵袭和迁移能力下降,转染 pGenesil-1.1-control 的 A549 和未转染的 A549 细胞侵袭和转移能力未受到很明显的影 响。这一研究表明 miRNA-451 的高表达能够对 A549 细胞在体外的侵袭和转移能力具有抑制作用,但 miRNA-451 调控细胞侵袭能力和转移的详细机制仍需要进一步的研究。

细胞的凋亡异常在肿瘤发病学上也具有重要的地位^[11]。为此,本研究用流式细胞术检测转染细胞的凋亡情况,结果显示转染 pGenesil-1.1-miRNA-451 的 A549 细胞与转染 pGenesil-1.1-control 的 A549 和未转染的 A549 细胞相比,凋亡情况没有明显变化。表明 miRNA-451 高表达对 A549 细胞的凋亡作用影响不明显。吴春蓉等^[12]的研究也证实 miRNA-451 过表达对人结肠癌细胞系 SW620 凋亡无明显影响,这与本研究结果相一致。

综上所述,本实验构建了 miRNA-451 真核表达载体,应用转染和 G418 稳定筛选技术,获得了稳定表达 miRNA-451 的人 A549 肺癌细胞株,这为 miRNA-451 后续功能研究提供了可靠的细胞模型。同时,本研究对 miRNA-451 生物学功能进行了基础性研究,为肺癌发病机理的阐明和肺癌的防治均提供了较为详细的实验依据。由于 miRNA 分子量小,易于操作,使得这些特定的 miRNA 对于肺癌治疗的手段成为一个可能。

参 考 文 献

- [1] Sterlacci W, Fiegl M, Tzankov A. Prognostic and predictive value of cell cycle deregulation in non-small-cell lung cancer[J]. Pathobiology, 2012, 79(4): 175-194.
- [2] Nugent W C, Edney M T, Hammernriss P G, et al. Non-small cell lung cancer at the extremes of age: impact on diagnosis and treatment [J]. Ann Thorac Surg, 1997, 63(1): 193-197.
- [3] Lu J, Getz G, Miska E A, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. Nature, 2005, 435(7043): 834-838.
- [4] Lewis B P, Burge C B, Bartel D P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. Cell, 2005, 120(1): 15-20.
- [5] Wang Y, Lee C G. MicroRNA and cancer-focus on apoptosis[J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(1): 12-23.
- [6] Gao W, Shen H, Liu L X, et al. MiR-21 overexpression in human primary squamous cell lung carcinoma is associated with poor patient prognosis[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(4): 557-566.
- [7] 陈荣新, 叶胜龙. MicroRNAs 与肿瘤的研究进展[J]. 国际外科学杂志, 2007, 34(3): 171-173.
- [8] Chen R X, Ye S L. MicroRNAs and tumor[J]. International Journal of Surgery, 2007, 34(3): 171-173.
- [9] Esau C, Kang X L, Peralta E, et al. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation[J]. J Biol Chem, 2004, 279(50): 52361-52365.
- [10] Liu Y, Xiao S, Wang L, et al. Cathepsin B on invasion and metastasis of gastric carcinoma[J]. Chin Med J (Engl), 1998, 111(9): 784-788.
- [11] Godlewski J, Nowicki M O, Bronisz A, et al. MicroRNA-451 regulates lkb1/ampk signaling and allows adaptation to metabolic stress in glioma cells[J]. Mol Cell, 2010, 37(5): 620-632.
- [12] Hermeking H. The mir-34 family in cancer and apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2009, 17(2): 193-199.
- [13] 吴春蓉, 罗治彬, 陈伟. MiR-451 对结肠癌细胞系 SW620 生物学行为的影响[J]. 解放军医学杂志, 2011, 36(5): 478-482.
- [14] Wu C R, Luo Z B, Chen W. Effects of miR-451 on the biological behavior of colorectal carcinoma cell line SW620[J]. Med J Chin PLA, 2011, 36(5): 478-482.

(责任编辑: 关蕴良)