

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)11-0057-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.11.013



miR - 558 对肺癌细胞增殖、迁移与凋亡的影响*

郭淑娟¹, 郑成玲¹, 高晓盼¹, 孙晓彤²

(1. 阳光融和医院, 山东 潍坊 261000; 2. 潍坊医学院麻醉学系, 山东 潍坊 261000)

摘要:目的 探讨 miR - 558 对肺癌细胞增殖、迁移及凋亡的影响。方法 收集医院 2020 年 5 月至 8 月收治的 35 例肺癌患者的癌组织及其癌旁组织样本, 并取对数生长期的 A549 细胞、人支气管上皮细胞 BEAS - 2B, 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)法检测 circ_0001017 和 miR - 558 表达水平。取对数生长期的 A549 细胞进行转染, 并分为空质粒(pcDNA)组(A 组)、pcDNA - circ_0001017 组(B 组)、pcDNA - circ_0001017 + miR - NC 组(C 组)、pcDNA - circ_0001017 + miR - 558 组(D 组)。采用双荧光素酶报告实验检测 circ_0001017 与 miR - 558 的靶向关系; 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法、平板克隆形成实验、Transwell 实验、流式细胞术分别检测细胞的活性、克隆、迁移、凋亡情况; 采用 qPCR 法检测 circ_0001017、miR - 558 表达水平; 采用免疫印迹(Western blot)法检测 B 细胞淋巴瘤因子 - 2 蛋白(Bcl - 2)和 Bcl - 2 相关 X 蛋白(Bax)的表达水平。结果 与癌旁组织比较, 肺癌组织中 circ_0001017 的表达水平显著降低($P < 0.05$), miR - 558 的表达水平显著升高($P < 0.05$); 与 BEAS - 2B 细胞比较, A549 细胞中 circ_0001017 的表达水平显著降低($P < 0.05$), miR - 558 的表达水平显著升高($P < 0.05$)。miR - 558 过表达可显著降低野生型载体(WT) - circ_0001017 的荧光素酶活性($P < 0.05$)。与 A 组比较, B 组细胞的增殖抑制率、凋亡率、circ_0001017 和 Bax 表达水平均显著升高($P < 0.05$), 细胞克隆形成数、迁移细胞数均显著减少($P < 0.05$), miR - 558 和 Bcl - 2 表达水平均显著降低($P < 0.05$); 与 C 组比较, D 组细胞的增殖抑制率、凋亡率、circ_0001017 和 Bax 表达水平均显著降低($P < 0.05$), 细胞克隆形成数、迁移细胞数均显著增多($P < 0.05$), Bcl - 2 和 miR - 558 表达水平均显著升高($P < 0.05$)。结论 过表达 miR - 558 会减弱过表达 circ_0001017 对肺癌细胞的增殖、克隆形成、迁移的抑制作用及促细胞凋亡作用。

关键词: circ_0001017; miR - 558; 肺癌; A549 细胞; 细胞增殖; 迁移; 细胞凋亡

Effect of miR - 558 on Proliferation, Migration and Apoptosis of Lung Cancer Cells

GUO Shujuan¹, ZHENG Chengling¹, GAO Xiaopan¹, SUN Xiaotong²

(1. Sunshine Union Hospital, Weifang, Shandong, China 261000; 2. Department of Anesthesiology, Weifang Medical College, Weifang, Shandong, China 261000)

Abstract: Objective To investigate the effect of miR - 558 on the proliferation, migration and apoptosis of lung cancer cells. **Methods** The cancer tissue and adjacent tissue specimens of 35 patients with lung cancer admitted to the hospital from May to August 2020 were collected. The human lung cancer cells A549 and human bronchial epithelial cells BEAS - 2B in logarithmic growth phase were selected, to detect the expression levels of circ_0001017 and miR - 558 by the real - time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR) method. The A549 cells in logarithmic growth phase were selected for transfection and divided into the empty plasmid (pcDNA) group (group A), pcDNA - circ_0001017 group (group B), pcDNA - circ_0001017 + miR - NC group (group C), and pcDNA - circ_0001017 + miR - 558 group (group D). The dual - luciferase reporter assay was used to detect the targeting relationship between circ_0001017 and miR - 558. The MTT assay, plate clone formation assay, Transwell assay and flow cytometry were used to detect the cell activity, cloning, migration, and apoptosis, respectively. The qPCR method was used to detect the expression levels of circ_0001017 and miR - 558. The Western blot was used to detect the expression levels of B - cell lymphoma - 2 protein (Bcl - 2) and Bcl - 2 - associated X protein (Bax). **Results** Compared with those in the adjacent tissues, the expression level of circ_0001017 in the lung cancer tissue significantly decreased ($P < 0.05$), while the expression level of miR - 558 significantly increased ($P < 0.05$). Compared with those in the BEAS - 2B cells, the expression level of circ_0001017 in A549 cells significantly decreased ($P < 0.05$), while the expression level of miR - 558 significantly increased ($P < 0.05$). Overexpression of miR - 558 could significantly decrease the luciferase activity of wild - type vector (WT) - circ_0001017 ($P < 0.05$). Compared with those in group A, the proliferation inhibition rate, the apoptosis rate, and the expression levels of circ_0001017 and Bax in group B significantly increased ($P < 0.05$), while the number of cell clone formation and cell migration significantly decreased ($P < 0.05$), and the expression levels of miR - 558 and Bcl - 2 significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with those in group C, the proliferation inhibition rate, the apoptosis rate, and the expression levels of circ_0001017 and Bax in group D significantly decreased ($P < 0.05$), while the number of cell clone formation and cell

* 基金项目: 山东省自然科学基金[ZR2019PH037]。

第一作者: 郭淑娟, 女, 硕士, 主治医师, 研究方向为肺癌的诊治, (电子信箱) gope_doctor_256@163.com。

migration significantly increased ($P < 0.05$), and the expression levels of Bcl-2 and miR-558 significantly increased ($P < 0.05$).
Conclusion Overexpression of miR-558 can weaken the effect of overexpression of circ_0001017 on the inhibition of the proliferation, clone formation, migration, and promote cell apoptosis.

Key words: circ_0001017; miR-558; lung cancer; A549 cells; cell proliferation; migration; apoptosis

肺癌细胞增殖及转移能力强,导致患者预后较差^[1]。因此,探究肺癌相关的分子生物标志物对于提供新的肺癌治疗靶点及提高患者预后十分重要。环状RNA(circRNA)是通过反向剪接形成的一种RNA分子,富含微小RNA(miRNA)结合位点,可充当miRNA的海绵分子,调节肿瘤细胞生物学行为,可能作为肿瘤治疗的潜在靶点^[2-3]。既往研究显示, circ_0001017在胶质瘤细胞中呈低表达^[4],但在肺癌细胞中的表达水平未知。CircRNA, Circular RNA Interactome 数据库预测显示, circ_0001017与miR-558存在结合位点。有研究表明, miR-558在肺癌细胞中呈高表达^[5]。基于此,本研究中探讨了 circ_0001017与miR-558的表达对人肺癌细胞A549增殖、迁移及凋亡的影响。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂、细胞与组织

仪器:CFX Opus 96型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Bio-Rad公司);DM4000型显微镜(德国Leica公司);HERAcell 240i型CO₂细胞培养箱, Varioskan LUX型多功能酶标仪,均购于美国Thermo Fisher Scientific公司;FACS Aria™ Fusion型流式细胞仪(美国BD公司)。

试剂:Lipofectamine 2000(批号为11668019), Trizol试剂(批号为15596026),均购自美国Invitrogen公司;miRNA提取试剂盒(批号为DP501), circ_0001017反转录试剂盒(批号为KR211), miR-558反转录试剂盒(批号为FP313), SYBR Green试剂盒(批号为FP411),均购自北京天根生化科技有限公司;pcDNA, pcDNA-circ_0001017,均购自上海吉满生物科技有限公司;miR-NC, miR-558 mimics,均购自广州锐博生物科技有限公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒(美国Promega公司,批号为E2920);四甲基偶氮唑盐(MTT)试剂盒(批号为M1020),细胞凋亡检测试剂盒(批号为CA1020), Transwell小室(批号为3422),均购自北京索莱宝科技有限公司;兔抗人B细胞淋巴瘤因子2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax)一抗(批号为ab32503), Bcl-2一抗(批号为ab182858),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(批号为ab9485),山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(批号为ab6721),均购自美国Abcam公司。

细胞:人肺癌细胞A549,人支气管上皮细胞BEAS-2B,均购自美国生物标准品资源中心(ATCC)。

组织:收集医院2020年5月至8月收治的35例肺癌患者(均经病理学检查确诊为肺癌)的癌组织及其癌旁

组织(≥ 5 cm处的正常组织)标本,保存在液氮内备用。

1.2 方法

细胞转染与分组:取对数生长期A549细胞接种于6孔板中,待细胞生长汇合度达80%时进行转染,将转染试剂与转染物稀释液充分混匀后加入培养A549细胞的6孔板中,6 h后将培养基更换为含10%胎牛血清的DMEM完全培养基培养48 h。将转染空质粒(pcDNA)、pcDNA-circ_0001017、pcDNA-circ_0001017+miR-NC、pcDNA-circ_0001017+miR-558 mimics的A549细胞分别记为A组、B组、C组、D组。

miR-558、circ_0001017表达水平检测:采用实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)法。用Trizol试剂提取患者肺癌组织、癌旁组织与BEAS-2B细胞、A549细胞,以及“细胞转染与分组”项下各组细胞的总RNA,再用miRNA提取试剂盒提取上述组织或细胞的总miRNA,分别用相应反转录试剂盒将总RNA和总miRNA转录合成cDNA,并通过qPCR反应扩增后检测 circ_0001017和miR-558的表达水平。

circ_0001017与miR-558的靶向关系检测:采用双荧光素酶报告实验。用circ_0001017与miR-558的结合位点构建野生型载体WT-circ_0001017,用点突变试剂盒将结合位点进行突变后构建突变型载体MUT-circ_0001017,按“细胞转染与分组”项下转染方法将上述荧光素酶报告基因载体与miR-NC或miR-558 mimics共转染至A549细胞,培养48 h,检测相对荧光素酶活性。

细胞活性测定:取“细胞转染与分组”项下4组细胞各适量,分别接种于96孔板(密度为 2×10^3 个/孔),每孔加入20 μ L MTT溶液,再加入150 μ L二甲基亚砜(DMSO)。以酶标仪检测490 nm波长处各孔的吸光度值(A),检测细胞活性,按公式计算,增殖抑制率(%) = $(A_{\text{对照组}} - A_{\text{实验组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

细胞克隆实验:采用平板克隆形成实验。取“细胞转染与分组”项下4组细胞各500个,接种于6孔板中,培养14 d,弃去培养基,用预冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,加入500 μ L甲醇固定20 min,用1%结晶紫染色液染色15 min,显微镜下观察细胞克隆形成数。

细胞凋亡率测定:采用流式细胞术。取“细胞转染与分组”项下4组细胞各适量,用预冷PBS洗涤,加500 μ L Binding Buffer重悬细胞,加入Annexin V-FITC与PI各5 μ L,室温避光孵育10 min,于1 h内以流式细胞仪检测细胞凋亡情况,并记录细胞凋亡率。

细胞迁移测定:采用Transwell实验。取“细胞转染与分组”项下4组细胞各适量,制备细胞悬液,取200 μ L接种于上室,下室加入含胎牛血清的培养液,培养24 h,用4%多聚甲醛固定20 min,0.1%结晶紫染色液染色10 min,显微镜下观察细胞迁移情况。

Bax和Bcl-2蛋白表达水平检测:采用免疫印迹(Western blot)法。取“细胞转染与分组”项下4组细胞各适量,加入RIPA裂解液,提取总蛋白,检测蛋白浓度,加上样缓冲液于100 $^{\circ}$ C高温变性10 min。取40 μ g蛋白进行SDS-PAGE反应,转移至PVDF膜,用5%脱脂牛奶封闭2 h,之后加入Bax一抗(1:1 000, V/V)、Bcl-2一抗(1:1 000, V/V)及内参GAPDH抗体(1:2 000, V/V),4 $^{\circ}$ C孵育过夜,再加入山羊抗兔IgG二抗(1:3 000, V/V),37 $^{\circ}$ C孵育2 h,使用Quantity One软件对蛋白条带进行定量。

1.3 统计学处理

采用SPSS 21.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 circ_0001017与miR-558表达水平

与癌旁组织比较,肺癌组织中circ_0001017的表达水平显著降低($P < 0.05$),miR-558的表达水平显著升高($P < 0.05$)。与BEAS-2B细胞比较,A549细胞中circ_0001017的表达水平显著降低($P < 0.05$),miR-558的表达水平显著升高($P < 0.05$)。详见表1。

表1 circ_0001017与miR-558在组织与细胞中的表达水平($\bar{X} \pm s$)

Tab.1 Expression levels of circ_0001017 and miR-558 in tissues and cells ($\bar{X} \pm s$)

RNA	组织($n=35$)				细胞($n=9$)			
	癌旁组织	肺癌组织	t 值	P	BEAS-2B	A549	t 值	P
circ_0001017	2.86 $\pm$ 0.41	0.87 $\pm$ 0.19	26.053	<0.05	2.33 $\pm$ 0.11	0.98 $\pm$ 0.04	34.601	<0.05
miR-558	0.36 $\pm$ 0.09	0.96 $\pm$ 0.15	20.292	<0.05	0.41 $\pm$ 0.06	1.02 $\pm$ 0.07	19.849	<0.05

与A组比较,B组细胞中circ_0001017的表达水平显著升高($P < 0.05$),miR-558的表达水平显著降低($P < 0.05$);与B组、C组比较,D组细胞中circ_0001017的表达水平显著降低($P < 0.05$),miR-558的表达水平显著升高($P < 0.05$)。详见表2。

2.2 circ_0001017与miR-558靶向关系验证

circ_0001017与miR-558存在互补序列,详见表3。miR-558过表达可显著降低野生型载体WT-circ_0001017的荧光素酶活性($P < 0.05$),详见表4。

2.3 细胞活性与克隆形成数

与A组比较,B组细胞的增殖抑制率显著升高($P < 0.05$),细胞克隆形成数显著减少($P < 0.05$);与B组、C组比较,D组细胞的增殖抑制率显著降低($P < 0.05$),细胞

克隆形成数显著增多($P < 0.05$)。详见表5。

表2 各组细胞中circ_0001017与miR-558表达水平比较($\bar{X} \pm s, n=9$)

Tab.2 Comparison of expression levels of circ_0001017 and miR-558 in each group ($\bar{X} \pm s, n=9$)

RNA	A组	B组	C组	D组	F 值	P
circ_0001017	1.00 $\pm$ 0.05	2.64 $\pm$ 0.18 ^a	2.61 $\pm$ 0.17	2.59 $\pm$ 0.18 ^{bc}	246.745	<0.05
miR-558	0.99 $\pm$ 0.08	0.28 $\pm$ 0.04 ^a	0.29 $\pm$ 0.06	0.75 $\pm$ 0.06 ^{bc}	292.954	<0.05

注:与A组比较,^a $P < 0.05$;与B组比较,^b $P < 0.05$;与C组比较,^c $P < 0.05$ 。表5、表6同。

Note: Compared with those in group A, ^a $P < 0.05$. Compared with those in group B, ^b $P < 0.05$. Compared with those in group C, ^c $P < 0.05$ (for Tab.2 and Tab.5-6).

表3 circ_0001017与miR-558的互补序列

Tab.3 Complementary sequences of circ_0001017 and miR-558

RNA	互补序列
WT-circ_0001017	5'-AUGUAGCAGACCAUGCAGCUCG-3'
miR-558	3'-UAAAACCAUGUCGUCGAGU-5'
MUT-circ_0001017	5'-AUGUAGCAGACCAUCAGAGCAG-3'

表4 双荧光素酶报告实验结果($\bar{X} \pm s, n=9$)

Tab.4 Results of dual-luciferase reporter assay ($\bar{X} \pm s, n=9$)

RNA	WT-circ_0001017	MUT-circ_0001017
miR-NC	0.99 $\pm$ 0.06	1.01 $\pm$ 0.07
miR-558	0.40 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.08
t 值	24.545	0.282
P	<0.05	>0.05

表5 各组细胞的活性与克隆形成数比较($\bar{X} \pm s, n=9$)

Tab.5 Comparison of activity and number of cell clone formation in each group ($\bar{X} \pm s, n=9$)

组别	增殖抑制率(%)	克隆形成数(个)
A组	0.02 $\pm$ 0.02	126.33 $\pm$ 8.07
B组	42.79 $\pm$ 1.48 ^a	57.67 $\pm$ 4.03 ^a
C组	42.64 $\pm$ 1.51	56.22 $\pm$ 4.96
D组	16.83 $\pm$ 1.83 ^{bc}	105.22 $\pm$ 4.76 ^{bc}
F 值	2 021.182	343.775
P	<0.05	<0.05

2.4 细胞迁移与凋亡

与A组比较,B组细胞的凋亡率显著升高($P < 0.05$),迁移细胞数显著减少($P < 0.05$);与B组、C组比较,D组细胞的凋亡率显著降低($P < 0.05$),迁移细胞数显著增多($P < 0.05$)。详见图1及表6。

2.5 Bax与Bcl-2蛋白表达水平

与A组比较,B组细胞中Bax蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$),Bcl-2蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$);与B组、C组比较,D组细胞中Bax蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$),Bcl-2蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$)。

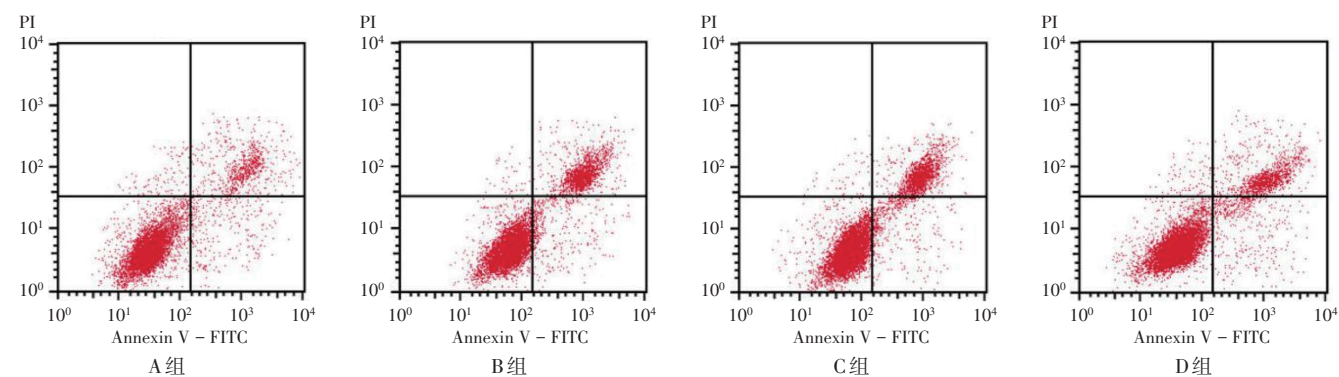


图1 细胞凋亡情况

Fig. 1 Apoptosis of lung cancer cells

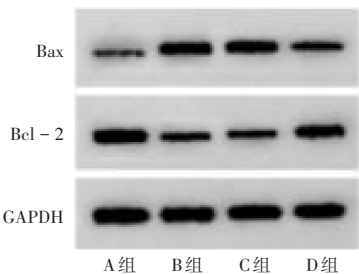


图2 Bax与Bcl-2蛋白表达电泳图

Fig. 2 Electropherograms of Bax and Bcl-2 protein expression

表6 各组细胞凋亡率与迁移数及蛋白表达水平比较($\bar{X} \pm s, n = 9$)

Tab. 6 Comparison of apoptosis rate, cell migration number, and protein expression levels in each group ($\bar{X} \pm s, n = 9$)

组别	凋亡率(%)	迁移细胞数(个)	蛋白表达水平	
			Bax	Bcl-2
A组	6.90 ± 0.62	169.33 ± 10.72	0.12 ± 0.02	0.74 ± 0.05
B组	22.51 ± 1.23 ^a	82.33 ± 3.40 ^a	0.55 ± 0.05 ^a	0.22 ± 0.02 ^a
C组	22.41 ± 1.40	82.89 ± 5.34	0.53 ± 0.04	0.23 ± 0.01
D组	11.01 ± 0.47 ^{bc}	140.56 ± 8.34 ^{bc}	0.23 ± 0.02 ^{bc}	0.54 ± 0.04 ^{bc}
F值	561.530	301.744	341.571	501.587
P	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

详见图2及表6。

3 讨论

CircRNA具有高度保守性,且比线性RNA更稳定,其在肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭等过程中发挥着重要调控作用,并可能作为肿瘤诊断的潜在生物学标志物^[6-7],如circ_0053063可通过靶向调节miR-330-3p抑制乳腺癌细胞增殖及恶性生物学行为^[8]。肺癌组织中circ_0026344表达水平降低,而过表达circ_0026344后可通过下调miR-938表达抑制肺癌细胞迁移和侵袭,并促进细胞凋亡^[9]。在胃癌细胞中circ_0001017表达水平降低,过表达可调控miR-543/PHLPP2表达而增强胃癌细胞顺铂敏感性^[10];circ_0001017也可通过充当miR-197的海绵分子而抑制胃癌细胞的增殖及转移^[11]。有研究显示,在胶质瘤组织和细胞中,circ_0001017表达水平降低,而过表达circ_0001017可抑制胶质瘤细

胞增殖、上皮细胞-间充质转化(EMT)、迁移和侵袭,并促进胶质瘤细胞凋亡,其抑瘤作用的机制可能与调控Let-7g-3p和NDST3有关^[4]。本研究结果显示,在肺癌组织和A549细胞中,circ_0001017表达水平降低,提示circ_0001017在肺癌发生及发展过程中可发挥抑癌基因作用。Bcl-2和Bax分别为抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白,当细胞凋亡发生时,Bax可从细胞质转移至线粒体外膜而增强膜的通透性,从而促进细胞色素C释放和细胞凋亡^[12-13]。本研究结果显示,circ_0001017过表达后肺癌细胞增殖、克隆形成能力减弱,细胞凋亡率及Bax表达水平升高,Bcl-2表达水平降低,同时细胞迁移能力减弱,提示circ_0001017具有抑制肺癌细胞恶性生物学行为的作用,具有作为肺癌靶向治疗新靶点的潜力。

双荧光素酶报告实验检测显示,miR-558过表达可降低野生型载体WT-circ_0001017的荧光素酶活性,证实circ_0001017可靶向结合miR-558。已有研究显示,miR-558在胃癌细胞中上调,过表达miR-558会促进胃癌细胞增殖、迁移、侵袭和EMT能力^[14]。另外,miR-558在肺癌细胞中上调,过表达miR-558会促进肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭,并能降低肺癌细胞对紫杉醇的敏感性^[15]。MAO等^[16]的研究显示,过表达miR-558后会减弱过表达circ_0001320对肺癌细胞增殖、侵袭的抑制作用,其可能是与肺癌密切相关的标志物和治疗靶点。本研究结果显示,肺癌组织和A549细胞中miR-558的表达水平升高,miR-558过表达可减弱circ_0001017过表达对肺癌细胞增殖、克隆形成、迁移的抑制作用及其对细胞凋亡的促进作用,提示circ_0001017/miR-558分子轴在肺癌细胞生长及转移过程中可发挥重要调控作用。

综上所述,肺癌组织和细胞中circ_0001017表达下调,miR-558表达上调。过表达miR-558会减弱过表达circ_0001017对肺癌细胞增殖、克隆形成、迁移的抑制作用及对细胞凋亡的促进作用。

参考文献

[1] JU Y, YUAN B, WU W, et al. CircRNA ANXA2 Promotes Lung