

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.11.002

顺铂致 A549 细胞 miR-16 与 bcl-2 表达的变化

李有杰¹, 孙强¹, 岳真¹, 郝青², 高宗华¹, 张丽霞³, 谢书阳¹

Expression Changes of miR-16 and bcl-2 in A549 Cells Treated with Cisplatin

LI You-jie¹, SUN Qiang¹, YUE Zhen¹, HAO Qing², GAO Zong-hua¹, ZHANG Li-xia³, XIE Shu-yang¹

1. Institute of Medical Molecular Genetics, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China; 2. Department of Pathology, Binzhou Central Hospital; 3. Experiment Medical Research Center, Binzhou Medical University

Corresponding Author: XIE Shu-yang, E-mail: shuyangxie@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To explore the expression changes of miR-16 and bcl-2 in the A549 lung cancer cell lines treated with Cisplatin. **Methods** The growth inhibition rate of lung cancer cells was analyzed by MTT assay, the number of dead cells was determined by counting of trypan blue exclusion staining cells and the morphology of A549 cells was observed by the inverted microscope to determine the appropriate Cisplatin concentration. Then the miRNA was extracted from the A549 cells, the changes of miR-16 expression in the control group and the dosing group were analyzed by Real-time PCR and miRNA's downstream regulating genes were evaluated by microRNA.org analysis software. The expression of bcl-2 protein in the two groups was detected by Western blot. **Results** After Cisplatin treatment, the number of A549 dead cells was significantly increased. The expression of miR-16 in Cisplatin group was significantly higher than that in the control group. However, the expression of bcl-2 protein in Cisplatin group was lower than that in control group. **Conclusion** Cisplatin induced lung cancer A549 cell apoptosis; miR-16 down-regulated the expression of bcl-2 protein as a tumor suppressor genes, involved in the mechanism of A549 cell death induced by Cisplatin.

Key words: miR-16; bcl-2; Cisplatin; Lung cancer

摘要:目的 研究顺铂作用于 A549 细胞后, miR-16 和 bcl-2 的表达变化, 并探讨两者的相关性。**方法** 采用 MTT 法测定顺铂对 A549 细胞的抑制率、锥虫蓝拒染法检测细胞凋亡率, 倒置显微镜观察细胞形态, 确定合适的药物浓度; 然后提取细胞中的 miRNA, 用实时定量 PCR 技术定量分析 miR-16 在对照组细胞和加药组细胞中的表达变化; 通过 microRNA.org 等分析软件预测 miR-16 的下游调控基因; 采用 Western blot 方法分析细胞中 bcl-2 蛋白的表达变化。**结果** 在顺铂诱导作用下, A549 细胞凋亡率明显增加; miR-16 在顺铂作用后的细胞中表达显著升高, 而 bcl-2 蛋白显著低表达。**结论** 顺铂可以促使肺癌 A549 细胞凋亡; miR-16 具有抑癌基因活性, 能负调控 bcl-2 蛋白的表达, 参与顺铂致 A549 细胞死亡的作用。

关键词: miR-16; bcl-2; 顺铂; 肺癌

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)11-1224-04

收稿日期: 2010-12-15; **修回日期:** 2011-06-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30801324); 山东省自然科学基金资助项目(ZR2009CQ033); 教育厅课题资助项目(J08LG15, J10LC60)

作者单位: 1. 264003 山东烟台, 滨州医学院医学分子遗传研究所; 2. 滨州市中心医院病理科; 3. 滨州医学院实验医学研究中心

通信作者: 谢书阳, E-mail: shuyangxie@yahoo.com.cn

作者简介: 李有杰(1979-), 男, 硕士, 讲师, 主要从事肿瘤分子生物学的研究

0 引言

顺铂(Cisplatin, DDP)是治疗肺癌最常用的化疗药物之一。该药为金属铂类络合物, 具有广谱抗癌、对厌氧细胞有效的特点。在细胞内, DDP 先将分子中的氯解离, 然后与 DNA 上的鸟嘌呤、腺嘌呤和胞嘧啶形成 DNA 单链内两点的交叉联结, 也可能形成双链间的交叉联结, 从而破坏 DNA 的结构和功能。肿瘤细胞由于增殖较快, 对 DDP 的细胞毒作用较正常细胞更为敏感, 但长期使用会产生很大

的不良反应,严重影响患者的生存质量。

肺癌是发病率和死亡率增长最快、对人类健康和生命威胁最大的恶性肿瘤。目前,肺癌的发病率和死亡率在男性均占第一位;在女性,肺癌的发病率仅次于乳腺癌。因此,探讨肺癌的发病机制,找到治疗药物的靶位点非常迫切。近年来研究发现,在肺癌中表达上调的 miRNA 有 miR-189、miR-126、miR-30a、miR-143、miR-145、miR-188、miR-331 等,而表达下调的 miRNA 有 miR-200b、let-7、miR-16、miR-15 等^[1]。本实验采用 DDP 诱导肺癌细胞株 A549 凋亡,研究 miR-16 和 bcl-2 在细胞中的表达变化,旨在探讨肺癌发病的分子机制,为肺癌的早期诊断和治疗提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

顺铂(山东齐鲁制药厂);胎牛血清、F12 培养液(美国 Gibco 公司);四甲基偶氮唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司);RT-PCR 试剂盒、PCR 试剂盒、Trizol 试剂盒等(大连宝生物公司);miRNA 提取试剂盒、Polymerase A 试剂盒(Ambion 公司);兔抗人单克隆抗体(武汉博士德生物公司);羊抗兔 IgG(北京中杉公司);引物由上海赛百盛生物科技有限公司合成;其他试剂为国产分析纯。

1.2 细胞株及其培养

肺癌细胞株 A549 购自中科院上海细胞生物学研究所,于含有 10% 胎牛血清的 F12 培养液中,置 37℃、5% CO₂ 饱和湿度环境下培养,贴壁生长,每 2 天传代一次。

1.3 MTT 法检测不同浓度 DDP 对 A549 细胞的抑制率

取生长状态良好的 A549 细胞接种于 96 孔培养板,每孔接种 1×10^4 个细胞,加入 150 μ l 培养液,培养 24 h 使细胞贴壁生长后用 DDP 处理。实验分 5 组,药物浓度依次为 0、1.5、3.0、4.5、6.0 μ g/ml。待药物作用 24 h 后,吸掉培养液,每孔加入 150 μ l 新鲜培养液和 10 μ l 0.5% MTT 溶液,继续培养;4 h 后,小心吸掉上清液,每孔加入 100 μ l DMSO,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。置酶标分析仪于 490 nm 处测量各孔 OD 值。计算每个加药组细胞的抑制率后,选取 4.5 μ g/ml 这一浓度作为后续实验的药物浓度。

1.4 倒置显微镜下观察细胞的形态

4.5 μ g/ml DDP 作用 24 h 后,倒置显微镜下观察 DDP 处理前后 A549 细胞形态变化。

1.5 锥虫蓝拒染法检测细胞死亡率

将对照组和加药组细胞用胰蛋白酶消化 2 min 后,2 000 r/min 离心 2 min 收集沉淀细胞,弃上清液后每管里加入 50 μ l 培养液并吹打均匀;取 20 μ l 细胞悬液加 10 μ l 0.4% 锥虫蓝溶液,混匀,染色 4 min 后,分别取对照组和加药组细胞少许于载玻片两端,做好标记;倒置显微镜下观察,记录不同视野中细胞凋亡率。细胞凋亡率 = 凋亡细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.6 实时定量 PCR 检测细胞内 miR-16 的表达

应用 miRNA 提取试剂盒提取小 RNA,提取步骤按照试剂盒说明书进行;用 Polymerase A 加 poly A 尾后进行 RT 反应(引物:5'-AACATGTA-CAGTCCATGGATG(dT)₃₀-3');得到 cDNA 后进行实时定量 PCR,对细胞内 miR-16 的表达情况进行检测。以人 5S rRNA 作为参照,扩增 5S rRNA 的上游引物序列:5'-GCCATACCACCCTGAACG-3';下游引物序列:5'-AACATGTACAGTCCATG-GATG-3'。扩增 miR-16 基因的上游引物序列:5'-TAGCAGCACATAAATATTGGCG-3';下游引物序列:5'-AACATGTACAGTCCATGGATG-3'。反应条件为:95℃ 5 s 预变性,95℃ 4 s,54℃ 15 s,72℃ 6 s,40 个循环,每个循环 72℃ 时测定各管荧光值。数据收集和标准曲线的生成由仪器自带软件 Rotor-Gene 6.0.41 完成。

1.7 Western blot 检测细胞内 bcl-2 蛋白的表达

在收集的细胞中加适量裂解液和蛋白酶抑制剂,冰上裂解 20 min 以上,12 000 r/min,离心 5 min。吸上清液于新的 EP 管中,加入 5 \times 上样缓冲液,煮沸 5 min;各取 20 μ l 进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后,将胶切下,转膜仪将蛋白转至 PVDF 膜;转膜结束后,将膜取出,用 PBST 洗 3 次,然后将膜封闭 2 h;PBST 洗膜,加一抗(按说明书上的要求进行稀释),4℃ 过夜;PBST 洗膜,加 HRP 标记的二抗(稀释比例为 1:500),37℃ 孵育 2 h;PBST 洗膜,加入化学发光反应混合液,反应后进入暗室曝光。

1.8 统计学方法

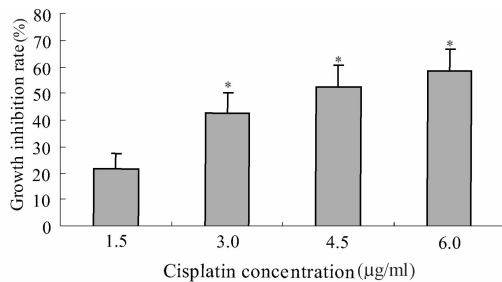
采用统计学软件 SPSS 13.0 进行方差分析及 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法筛选合适的 DDP 作用浓度

结果表明,在不同 DDP 浓度处理 A549 细胞后,细胞生长受到不同程度的抑制作用。当 DDP 浓度在 3~4.5 μ g/ml 时,其对 A549 细胞的抑制作用已较为明显,见图 1。在本实验后续研究中所选

DDP 浓度为 4.5 μg/ml。



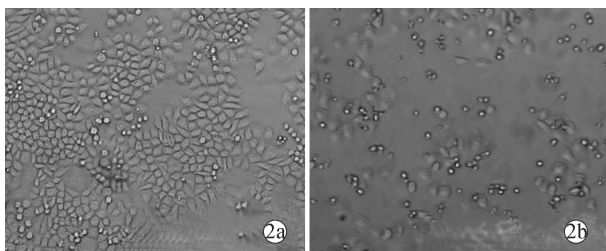
* : $P < 0.01$, vs. 1.5 μg/ml group

图 1 MTT 法检测 A549 细胞生长抑制率

Figure 1 Growth-inhibitory rate of A549 analyzed by MTT assay

2.2 DDP 处理后细胞形态改变

在加药处理 24 h 后,光学显微镜下可见 DDP 处理 A549 细胞后,细胞形态发生明显改变,凋亡细胞数显著增多,见图 2。



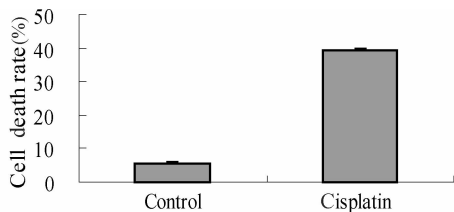
Control group; Cisplatin group

图 2 光学显微镜观察 A549 细胞形态 (×100)

Figure 2 A549 cell cytomorphology under inverted microscope (×100)

2.3 锥虫蓝拒染法检测细胞死亡率

倒置显微镜下观察对细胞的着色情况,锥虫蓝检测法中,活细胞不着色,而死细胞则被染成蓝色。取不同视野观察,两组细胞分别记录 10 组,计算两组细胞的死亡率,见图 3。加药组细胞死亡数明显升高,DDP 对肺癌细胞具有较好的药效作用。



* : $P < 0.01$, vs. control group

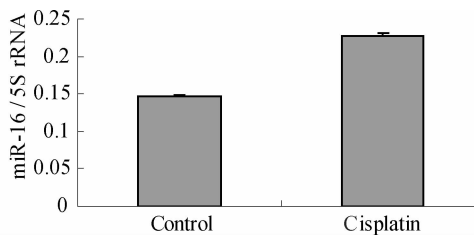
图 3 锥虫蓝拒染法检测细胞死亡率

Figure 3 Cell death rate analyzed by trypan blue exclusion test

2.4 实时定量 PCR 检测细胞内 miR-16 的表达

为了准确检测 miR-16 在细胞中的表达情况,本实验采用实时荧光定量 PCR 的方法来进行定量分析,获得 5S rRNA 和 miR-16 在样本中的拷贝

数。与对照组相比,miR-16 在加药组细胞中显著高表达,见图 4。



* : $P < 0.01$, vs. control group

图 4 实时定量 PCR 检测细胞中 miR-16 的表达

Figure 4 The miR-16 expression by Real-time PCR in A549 cells

2.5 Western blot 检测细胞内 bcl-2 蛋白的表达

通过 microRNA TargetScan (<http://www.targetscan.org/>)、microRNA.org (<http://www.microRNA.org/microRNA/home.do>) 和 mirbase (<http://www.mirbase.org>) 等预测软件分析发现 bcl-2 的 3'-UTR 区存在 miR-16 的调节位点,见图 5,提示 miR-16 可能调控癌基因 bcl-2 的表达。因此,我们进一步应用 Western blot 分析细胞内 bcl-2 蛋白的表达情况,结果显示加药组细胞的 bcl-2 蛋白表达量比对照组明显减少,见图 6。

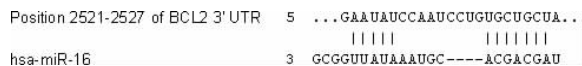


图 5 miR-16 与 bcl-2 匹配位点图

Figure 5 Match sites between miR-16 and bcl-2

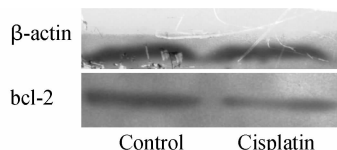


图 6 Western blot 检测细胞内 bcl-2 的表达

Figure 6 Western blot results of bcl-2 protein in A549 cells

3 讨论

miRNA 是近年来生命科学领域的一个研究热点,自从 1993 年首次报道以来^[2],现已发现了 2 000 多种,它们几乎存在于所有生物中,其长度为 19~25 个核苷酸,是一类保守、短序列、内源性非编码的单链小分子 RNA,通过与其靶 mRNA 分子的 3' 端非编码区(3'-UTR)互补结合而介导转录后水平的调控^[3],miRNA 参与了发育、细胞分化、细胞凋亡、脂类代谢和激素分泌等多种生理过程,以及白血病、肺癌、结肠癌、糖尿病和病毒感染等多种病理过程^[4]。第一个有关 miRNA 与肺癌的报道显示^[5],

let-7 在肺癌中表达下调,功能被抑制,导致靶蛋白癌基因 RAS 表达升高,从而使得肺癌细胞活性增强,肺癌患者生存期缩短、预后差,提示 let-7 和肺癌的发生、发展有着密切关系。研究表明,超过一半的 miRNA 位于肿瘤相关基因组的区域和脆性位点、杂合型丢失区、扩增区或断裂点区^[6]。miRNA 实际上可作为致癌基因或抑癌基因而发挥作用。

miR-16 基因簇位于第 13 号染色体的 14.3 区域,通过在转录后水平上靶向作用于 bcl-2 蛋白而诱导细胞凋亡^[7]。研究发现在大多数 CLL 中存在 miR-16 和 miR-15a 基因的缺失和表达水平下调^[8]。miR-16 有望成为 bcl-2 蛋白高表达的恶性肿瘤的药物作用靶点。由于肺癌的早期诊断方法至今没有突破性进展,确诊肺癌后仅 20% 的患者尚具备手术切除的条件。即使是这些可手术的患者,部分患者也需要进行术前辅助化疗及术后巩固性化疗。由此可见,通过对 miR-16 的研究可以更好的指导肺癌的化疗,有望面对肺癌早期难发现的严峻现状,从而治愈肺癌。

bcl-2 作为一个重要的癌基因,在肿瘤发生、发展及预后中具有举足轻重的地位;下调 bcl-2 的表达,可以降低细胞的增殖和侵袭能力^[9]。bcl-2 蛋白的表达与 miR-16 存在相关性^[10],Calin 等^[11]发现 miR-16 靶向作用于多种癌基因而影响恶性肿瘤的预后。近几年,有关 miR-16 的研究报道越来越多,但对于 miR-16 在肺癌细胞中与 bcl-2 蛋白表达的关系还不明确,其具体的生物学功能也不清楚。

本研究结果发现 miR-16 在加药组细胞中高表达,提示其很可能具有抑癌基因作用,可抑制肺癌细胞的增殖和诱导细胞凋亡,miR-16 可能成为肿瘤治疗的新靶点。为了探讨 miR-16 致细胞死亡的可能机制,用 microRNA TargetScan、microRNA.org 和 mirbase 等软件进行预测分析,发现 miR-16 可能调控癌基因 bcl-2 的表达。实验结果表明 bcl-2 在 DDP 作用后表达下调,这提示 miR-16 负调节 bcl-2 的表达参与了 DDP 对 A549 细胞化疗过程,

可能是 DDP 作用机制之一。

本实验通过研究肺癌 A549 细胞中 miR-16 和 bcl-2 的表达量的变化,探讨了 DDP 作用的可能机制,说明 miRNA 在恶性肿瘤的发生和发展中扮演着重要角色,参与了癌细胞重要的细胞生物程序的调控,间接地起着“促癌和抑癌基因”的功能。

参考文献:

- [1] Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(16): 7065-7070.
- [2] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [3] Ajay SS, Athey BD, Lee I. Unified translation repression mechanism for microRNAs and upstream AUGs [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 155.
- [4] Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease [J]. *Development*, 2005, 132(21): 4653-4662.
- [5] Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga enhances oncogenic transformation [J]. *Science*, 2007, 315(5818): 1576-1579.
- [6] Cummins JM, Velculescu VE. Implications of micro-RNA profiling for cancer diagnosis [J]. *Oncogene*, 2006, 25(46): 6220-6227.
- [7] Kutay H, Bai S, Datta J, et al. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas [J]. *J Cell Biochem*, 2006, 99(3): 671-678.
- [8] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR-15 and miR-16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(24): 15524-15529.
- [9] 王天路, 孙涛, 陶轶. 探讨 bcl-2 下调后对胶质瘤细胞系的增殖、凋亡和侵袭能力的影响 [J]. *肿瘤防治研究*, 2009, 36(2): 95-99.
- [10] 李琼, 王阁. MicroRNAs 与 p53 基因在肿瘤中相互关系的研究进展 [J]. *世界华人消化杂志*, 2008, 16(12): 1332-1336.
- [11] Callin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(9): 2999-3004.

[编辑:周永红;校对:刘红武]