

AEG-1 抑制 miR-137 对非小细胞肺癌增殖调控作用

常永梅^{1*}, 王明智², 孙 聪¹, 颜文森¹, 刘庆峰¹, 江小运¹, 王 钧¹

(1.广东省第二人民医院呼吸内科, 广东 广州 510317; 2.广东省第二人民医院心胸外科)

摘要: **目的** 探讨 AEG-1 在 miR-137 抑制非小细胞肺癌(NSCLC)增殖中的作用及机制。**方法** 收集 2013 年 2 月~2014 年 5 月在本院手术治疗的 65 例 NSCLC 患者肿瘤标本,提取 RNA,qRT-PCR 检测 NSCLC 组织、A549、H460 及 16HBE 细胞中 miR-137 与 AEG-1 的表达,统计分析 NSCLC 组织中 miR-137 与胶质细胞上调基因 1 (AEG-1)表达的相关性;将 A549 细胞根据不同转染试剂分成 4 组:转染 miR-137 mimics 及空载体组,转染 miR-137 mimics 及 AEG-1 表达载体组,转染 miR-137 inhibitor 及 siRNA 无关序列组,转染 miR-137 inhibitor 及 AEG-1 siRNA 组。用 Lipofectamine 2000 进行转染,生长曲线实验检测转染后细胞增殖情况。**结果** 在 NSCLC 组织中 miR-137 与 AEG-1 的表达呈负相关;miR-137 表达高的 NSCLC 细胞中 AEG-1 表达降低;共同转染 miR-137 mimics 与 AEG-1 过表达载体的 A549 细胞在 48 h 的细胞数高于对照组,而共同转染 miR-137 inhibitor 与 AEG-1 siRNA 的 A549 细胞在 48 h、72 h 的细胞数低于对照组。**结论** miR-137 与 AEG-1 在 NSCLC 组织及细胞中表达呈负相关;AEG-1 逆转 miR-137 对 NSCLC 细胞增殖的作用。

关键词: miR-137;非小细胞肺癌;胶质细胞上调基因 1;增殖

中图分类号:R734.2

文献标识码:A

AEG-1 Reverses the Inhibition of Non-small Cell Lung Cancer Proliferation Induced by MiR-137

CHANG Yongmei, WANG Mingzhi, SUN Cong, et al

(Department of Respiratory Medicine, Guangdong No.2 Provincial People Hospital, Guangzhou, Guangdong 510317, China)

Abstract: **Objective** To investigate the the function of AEG-1 (astrocyte elevated) in the process of miR-137 inhibiting the proliferation of non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** Sixty five samples in our hospital from Feb. 2013 to May 2014 were collected. And RNA was extracted from these samples. QRT-PCR was conducted to detect the expression of miR-137 and AEG-1 in NSCLC tissues, and A549, H460 and 16HBE cells. The correlation between miR-137 and AEG-1 in NSCLC tissues was statistically analyzed. A549 cells were divided into four groups according to the transfection treatment: miR-137 mimics plus empty vector group, miR-137 mimics plus AEG-1 expression vector group, miR-137 inhibitor plus scramble sequence group, and miR-137 inhibitor plus AEG-1 siRNA group. The growth curve assay was performed to detect the cells proliferation after transfection treatment. **Result** The expression of miR-137 is negatively correlated with the AEG-1 in NSCLC tissues. The expression of AEG-1 was decreased in miR-137 overexpressed NSCLC cells. The cell number of A549 co-transfected with miR-137 mimics and AEG-1 expression vector was larger than the control group in 48 h. And, the cell number of A549 co-transfected with miR-137 inhibitor and AEG-1 siRNA was smaller than the control group in 48 h and 72 h. **Conclusion** The expression of miR-137 is negatively correlated with the expression of AEG-1 in NSCLC tissues and cells; AEG-1 reversed the effect of miR-137 in the proliferation of NSCLC cell.

Key words: miR-137; non-small cell lung cancer; AEG-1; proliferation

收稿日期:2016-01-28;修回日期:2016-04-28

基金项目:广东省科技计划项目(2014A020212447)。

* 通讯作者, E-mail: cym891@163.com.

肺癌是全球引起死亡最高的恶性肿瘤。大约70%~80%的肺癌是非小细胞肺癌(non small cell lung cancer, NSCLC),包括鳞状细胞癌、腺癌、大细胞癌^[1]。非小细胞肺癌的预后很差,尽管今年化疗药物研究进展及治疗手段的进步,NSCLC的5年总体生存率仍不超过11%。NSCLC的主要死亡原因是化疗耐药性和转移,但是NSCLC转移的机制仍不清楚^[2]。

微小RNA是小的非编码RNA,其在肿瘤发生和发展中发挥重要作用。miRNAs与靶基因的3'非翻译区(3' untranslated regions, 3'-UTRs)结合,引起靶基因mRNA降解或抑制翻译^[3]。越来越多的证据表明miRNAs在NSCLC的转移过程中发挥重要作用。许多miRNA在NSCLC中发挥抑瘤作用,抑制转移,如:miR-200c^[4]、miR-26b^[5],而另一些miRNA发挥促进NSCLC转移的功能,如:miR-1260b^[6]。miR-137通过靶向SLC22A18、Cdc42、Cdk6抑制NSCLC增殖^[7],也可通过靶向BMP7抑制NSCLC细胞侵袭转移^[8]。有研究表明,miR-137通过靶向胶质细胞上调基因(Astrocyte elevated gene 1, AEG-1)抑制卵巢癌细胞生长^[9]。而NSCLC中,miR-137与AEG-1的表达调控关系尚无报道。本研究拟通过研究miR-137在NSCLC中对AEG-1表达调控的作用,探讨miR-137抑制NSCLC侵袭转移的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 NSCLC细胞株A549、H460及正常的肺支气管上皮细胞系16HBE从ATCC购买。细胞培养基:DMEM,10%胎牛血清,2 μmol/L谷氨酰胺,100 IU/mL青霉素及100 μg/mL硫酸链霉素,在37℃5%二氧化碳环境中培养。

1.2 临床标本收集及资料 人非小细胞肺癌取自广东省第二人民医院2013年2月~2014年5月手术治疗的65例患者,这些患者中无人接受手术前化疗。记录患者年龄、性别、组织学分级、肿瘤大小、浸润深度和淋巴结转移等资料。本研究经广东省第二医学伦理委员会批准。

1.3 试剂 AEG-1过表达载体购自武汉三鹰公司。AEG-1 siRNA购自Qiagen公司。转染试剂为Lipofectamine 2000(Life)。

1.4 总RNA提取、逆转录 用Trizol(Life)提取

RNA。用Nanodrop 2000(Thermo)测定RNA浓度及纯度。用cDNA合成试剂盒及miRNA特异性检测试剂盒(Genecopeia)。cDNA合成的条件为:50℃30 min,85℃5 min。

1.5 细胞转染 将NSCLC A549细胞接种于6孔板,分成4组:转染miR-137 mimics及空载体组,转染miR-137 mimics及AEG-1表达载体组,转染miR-137 inhibitor及siRNA无关序列组,转染miR-137 inhibitor及AEG-1 siRNA组。用Lipofectamine 2000进行转染,根据转染试剂说明书进行操作。转染48 h后提取RNA及蛋白。

1.6 生长曲线 将A549细胞接种至24孔板,5 000/孔。细胞贴壁后,分成4组(同1.5分组及名称)进行处理于转染24 h、48 h、72 h行细胞计数,绘制生长曲线。

1.7 荧光实时定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示基因或miRNA表达, $\Delta\Delta CT = (CT_{miRNA} - CT_{U6})_{癌} - (CT_{miRNA} - CT_{U6})_{癌旁}$ 。AEG-1的表达以GAPDH为内参,使用以下引物:F: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC, R: GAAGATGGTGATGGGATTTC。 $\Delta\Delta CT = (CT_{AEG-1} - CT_{GAPDH})_{癌} - (CT_{AEG-1} - CT_{GAPDH})_{癌旁}$,仪器为Light Cycler 480 II(Roche Diagnostics; Indianapolis, IN)。

1.8 统计学方法 采用SPSS13.0统计软件对实验数据进行分析,两组间均数比较采用 t 检验,多组间均数比较采用方差分析,相关性分析用Pearson检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 miR-137与AEG-1在NSCLC组织及细胞中表达呈负相关 qRT-PCR检测了NSCLC组织及细胞中miR-137与AEG-1的表达。相关性分析显示在NSCLC组织中miR-137与AEG-1的表达呈负相关($r = -0.5285, P < 0.001$) (图1)。miR-137在NSCLC细胞中的表达显著低于肺支气管上皮细胞16HBE($P < 0.05$),而NSCLC中AEG-1的表达明显高于16HBE($P < 0.01$),miR-137及AEG-1在NSCLC及16HBE细胞中的表达相反(图2)。

2.2 AEG-1逆转miR-137对NSCLC细胞增殖的作用 在转染miR-137 mimics的A549细胞中同时转染AEG-1过表达载体,细胞48 h细胞数高于对照组($P < 0.05$);在转染miR-137 inhibitor的A549细胞

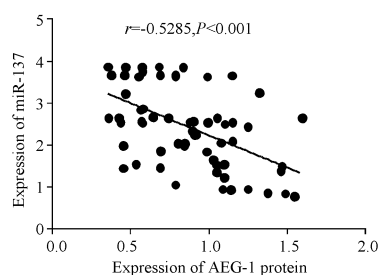


图 1 NSCLC 组织中 miR-137 与 AEG-1 表达相关性分析

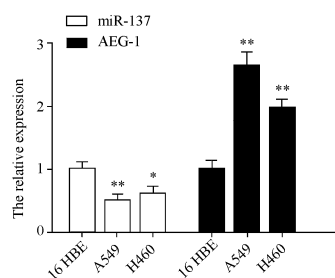


图 2 miR-137 及 AEG-1 在 NSCLC 细胞及肺支气管上皮细胞中的表达 与 16 HBE 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

中同时转染 AEG-1 siRNA, 细胞 48 h 及 72 h 的细胞数低于对照组 ($P < 0.05$ 。见图 3)。

3 讨 论

研究证实, miRNAs 在 NSCLC 发生发展过程中发挥重要作用^[10]。miRNAs 作为肿瘤抑制或致癌基因参与肿瘤发展的多个过程, 包括细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭^[11]。miR-137 在多种肿瘤中发挥抑瘤作用。最新的研究表明, miR-137 可通过靶向表皮生长因子受体抑制甲状腺癌的增殖^[12]。在肺癌中, miR-137 可抑制肺癌的增殖并促进肺癌的紫杉醇和顺铂的药物敏感性^[13], 还能通过靶向骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein 7, BMP7) 抑制 NSCLC 细胞迁移和增殖^[8], 也可通过抑制 KIT 的表达抑制小细胞肺癌细胞增殖^[14]。

AEG-1 已被确认为是在许多恶性肿瘤进展和转移过程中的一个重要的致癌基因, 它可调控 Ras、PI3K / Akt、NF- κ B、ERK 和 Aurora-A 激酶等多个信号通路。AEG-1 在肺癌中表达增加, 促进 NSCLC 迁移^[15], 可通过活化 Wnt/ β -catenin 信号通路诱导肺癌细胞发生上皮间质样变^[16]。针对 AEG-1 的治疗手段应具有抑制转移、肿瘤生长、提高化疗敏感性等特性。研究表明, AEG-1 在肿瘤中的表达受多个

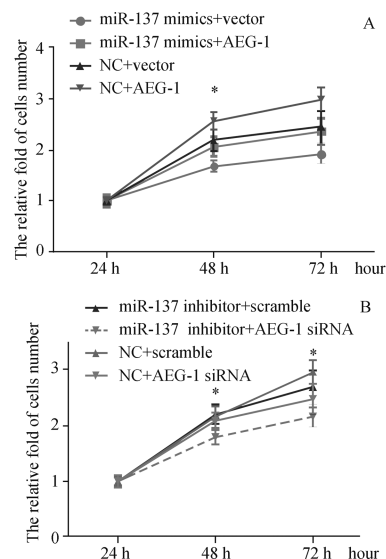


图 3 miR-137 与 AEG-1 对 NSCLC 细胞增殖的影响 A: miR-137 mimics 及 AEG-1 对 A549 细胞增殖的影响; B: miR-137 inhibitor 及 AEG-1 siRNA 对 A549 细胞增殖的影响。Scramble: 无关序列; NC: inhibitor 的对照序列; * $P < 0.05$

miRNA 调控, 其中包括 miR-137^[9]。但 miR-137 与 AEG-1 在肺癌中的表达尚无研究。因此, 本研究通过 qRT-PCR 的方法检测了 65 例 NSCLC 组织中 miR-137 及 AEG-1 mRNA 的表达, 并且证实两者在 NSCLC 组织中表达呈反比。这与已报道的两者在卵巢癌中的表达变化相似。已知, miR-137 为抑癌 miRNA, 在肺癌可抑制细胞增殖, 而 AEG-1 在肺癌中表达增加, 并且参与促进 NSCLC 细胞增殖^[17]。作为 miR-137 的靶基因, AEG-1 是否参与了 miR-137 对 NSCLC 细胞功能的调控? 于是, 本研究检测了 miR-137 与 AEG-1 共同对 NSCLC 细胞增殖的影响。结果证实, miR-137 与 AEG-1 共同高表达组细胞增殖率明显高于 miR-137 高表达组, miR-137 与 AEG-1 共同表达抑制组细胞增殖率低于 miR-137 高表达组。这说明 AEG-1 作为 miR-137 的靶基因逆转了 miR-137 抑制 NSCLC 细胞增殖的作用。

本研究证实了 NSCLC 组织及细胞中 miR-137 与 AEG-1 表达呈负相关, 并且 AEG-1 可逆转 miR-137 对 NSCLC 细胞增殖抑制作用。但是 AEG-1 的这种作用调控的下游信号通路尚不清楚, 这成为我们后续研究的方向。

参考文献:

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61: 69-90.

- [2] Gao D, Vahdat LT, Wong S, et al. Microenvironmental regulation of epithelial-mesenchymal transitions in cancer [J]. *Cancer Res*, 2012, 72:4883-4889.
- [3] Chou J, Shahi P, Werb Z. microRNA-mediated regulation of the tumor microenvironment [J]. *Cell Cycle*, 2013, 12: 3262-3271.
- [4] Jiao A, Sui M, Zhang L, et al. MicroRNA-200c inhibits the metastasis of non-small cell lung cancer cells by targeting ZEB2, an epithelial-mesenchymal transition regulator [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(4): 3349-3355.
- [5] Li D, Wei Y, Wang D, et al. MicroRNA-26b suppresses the metastasis of non-small cell lung cancer by targeting MIEN1 via NF- κ B/MMP-9/VEGF pathways [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 472(3): 465-470.
- [6] Xu L, Li L, Li J, et al. Overexpression of miR-1260b in non-small cell lung cancer is associated with Lymph Node Metastasis [J]. *Aging Dis*, 2015, 6(6): 478-485.
- [7] Zhang B, Liu T, Wu T, et al. microRNA-137 functions as a tumor suppressor in human non-small cell lung cancer by targeting SLC22A18 [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 74: 111-118.
- [8] Yang YR, Li YX, Gao XY, et al. MicroRNA-137 inhibits cell migration and invasion by targeting bone morphogenetic protein-7 (BMP7) in non-small cell lung cancer cells [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9): 10847-10853.
- [9] Guo J, Xia B, Meng F, et al. miR-137 suppresses cell growth in ovarian cancer by targeting AEG-1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 441(2): 357-363.
- [10] Du L, Pertsemidis A. microRNA regulation of cell viability and drug sensitivity in lung cancer [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2012, 12: 1221-1239.
- [11] Angulo M, Lecuona E, Sznajder JI. Role of MicroRNAs in lung disease [J]. *Arch Bronconeumol*, 2012, 48: 325-330.
- [12] Dong S, Jin M, Li Y, et al. miR-137 acts as a tumor suppressor in papillary thyroid carcinoma by targeting CX-CL12 [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(4): 2151-2158.
- [13] Yang YR, Li YX, Gao XY, et al. MicroRNA-137 inhibits cell migration and invasion by targeting bone morphogenetic protein-7 (BMP7) in non-small cell lung cancer cells [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9): 10847-10853.
- [14] Li P, Ma L, Zhang Y, et al. MicroRNA-137 down-regulates KIT and inhibits small cell lung cancer cell proliferation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2014, 68(1): 7-12.
- [15] Zhu R, Tian Y. Astrocyte elevated gene-1 increases invasiveness of NSCLC through up-regulating MMP7 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(3): 1187-1195.
- [16] He W, He S, Wang Z, et al. Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) induces epithelial-mesenchymal transition in lung cancer through activating Wnt/ β -catenin signaling [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 107.
- [17] Meng F, Zhang L, Shao Y, et al. microRNA-377 inhibits non-small-cell lung cancer through targeting AEG-1 [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(11): 13853-13863.

(本文编辑:蒋湘莲)

(上接第 278 页)

- [12] Chong Z, Feng Y. DL-3-n-butylphthalide induces brain damage in mice with closed head injury [J]. *Chinese Medica Journal (English Edition)*, 2000, 113(7): 613-616.
- [13] Wang W, Cha XX, Reiner J, et al. Synthesis and biological activity of n-butylphthalide derivatives [J]. *Eur J Med Chem*, 2010, 45(5): 1941-1946.
- [14] Ahmad A, Khan MM, Raza SS, et al. Ocimum sanctum attenuates oxidative damage and neurological deficits following focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Neurol Sci*, 2012, 33(6): 1239-1247.
- [15] 张培蕾, 鲁海涛, 朱悦奇, 等. 丁苯酞对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *介入放射学杂志*, 2012, 21(3): 239-242.
- [16] Li L, Zhang B, Tao Y, et al. DL-3-n-butylphthalide protects endothelial cells against oxidative/nitrosative stress, mitochondrial damage and subsequent cell death after oxygen glucose deprivation in vitro [J]. *Brain Res*, 2009, 1290: 91-101.
- [17] 万鹤鸣, 王滨. 丁基苯酞对血管性痴呆患者血清自由基及血液流变学的影响 [J]. *新乡医学院学报*, 2011, 28(2): 187-189.
- [18] Peng Y, Xing C, Xu S, et al. L-3-n-butylphthalide improves cognitive impairment induced by intracerebroventricular infusion of amyloid- β peptide in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 621(1-3): 38-45.

(本文编辑:蒋湘莲)