

· 论著 ·

## hsa-miRNA-30a-5p 促进肺癌细胞 A549 增殖的机制研究

周 静<sup>1</sup>, 吴 杲<sup>2</sup>, 马福家<sup>3</sup> (1. 宁波市妇女儿童医院, 浙江 宁波, 315012; 2. 海军军医大学附属长海医院虹口院区, 上海 200081; 3. 海军特色医学中心药剂科, 上海 200052)

**[摘要]** **目的** 研究 hsa-miRNA-30a-5p 促进肺癌细胞 A549 增殖的调控机制。**方法** 收集临床肺癌标本及癌旁组织 5 对, 用荧光定量法(real time-PCR)和蛋白质印迹法(Western blotting)分别检测肿瘤及其癌旁组织中 hsa-miRNA-30a-5p 和 SCARA5 的蛋白含量; 生物信息学预测 hsa-miRNA-30a-5p 与 SCARA5 基因 3'UTR 区结合位点, 并通过荧光素酶报告基因法进行结合位点验证; 构建 SCARA5 基因沉默表达载体 pshRNA-SCARA5, 脂质体瞬时转染 pshRNA-SCARA5 及 hsa-miRNA-30a-5p 阻遏物(miRNA-30a-5p inhibitor)到 A549 细胞, 转染后 48 h, real time-PCR 检测细胞内 hsa-miRNA-30a-5p 含量, Western blotting 检测细胞中 SCARA5 蛋白含量; MTT 法检测转染后 A549 细胞对数期增殖活性。**结果** 肺癌组织中 SCARA5 蛋白表达量明显低于癌旁组织, 组间差异显著( $P < 0.05$ ); 肺癌组织中 hsa-miRNA-30a-5p 含量则明显高于癌旁组织, 组间差异显著( $P < 0.05$ )。荧光素酶实验显示, 与报告基因表达载体单独转染组比较, miRNA-30a 拟似物(miRNA-30a-5p mimics)和 miRNA-30a-5p inhibitor 与野生型荧光素酶报告基因共转染组可以明显抑制或增强荧光素酶活性( $P < 0.05$ ); miRNA-30a-5p inhibitor 转染细胞后 48 h, 与转染对照组比较, 细胞内 hsa-miRNA-30a-5p 含量明显降低( $P < 0.05$ ), 阴性对照(miRNA-30a-5p NC)转染组和转染对照组细胞内 hsa-miRNA-30a-5p 含量无显著差异( $P > 0.05$ )。转染后 24~72 h, miRNA-30a-5p inhibitor 转染组 A549 细胞增殖活性明显降低( $P < 0.05$ ), 而 pshRNA-SCARA5 转染能够逆转 miRNA-30a-5p inhibitor 增强 A549 细胞增殖活性的趋势, 共转染组与 miRNA-30a-5p inhibitor 单独转染组及转染对照组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** Hsa-miRNA-30a-5p 通过抑制 SCARA5 基因表达, 增强 A549 细胞的增殖活性, 转染 miRNA-30a-5p inhibitor, 可以抑制 A549 细胞增殖活性。

**[关键词]** SCARA5; A549 细胞; hsa-miRNA-30a-5p; 增殖活性

**[中图分类号]** R734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2019)05-0433-07

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.05.009

## Study on the mechanism of proliferation of human lung cancer A549 cells regulated by hsa-miRNA-30a-5p

ZHOU Jing<sup>1</sup>, WU Gao<sup>2</sup>, MA Fujia<sup>3</sup> (1. Department of Pharmacy, Ningbo Women's and Children's Hospital, Ningbo, 315012, China; 2. Hongkou Branch, Changhai Hospital Affiliated to Naval Medical University, Shanghai, 200081, China; 3. Department of Pharmacy, Naval Special Medical Center, Shanghai 200052, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the regulation and mechanism of hsa-miRNA-30a-5p on the proliferation of human lung cancer A549 cells. **Methods** Five pairs of lung cancer and para-carcinoma tissues were harvested in clinical and measured for hsa-miRNA-30a-5p and SCARA5 levels by real-time PCR and western blotting, respectively. The theoretical binding site of hsa-miRNA-30a-5p in SCARA5's 3'UTR was predicted by bioinformatics, and validated by luciferase report assay. A549 cells were transfected with pshRNA-SCARA5 and miRNA-30a-5p inhibitor and 48 h later, the proliferation of A549 cells after genetic intervention was assayed by the MTT method, and the cell growth curve was plotted to observe the effect of hsa-miRNA-30a-5p knockdown on cell proliferation. **Results** For all five pairs of samples tested, hsa-miRNA-30a-5p was higher in the cancer tissues than in the adjacent tissue ( $P < 0.05$ ), and SCARA5 protein was lower in the cancer tissues than in the adjacent tissue ( $P < 0.05$ ). The bioinformatics analysis showed that there was a theoretical binding site of hsa-miRNA-30a-5p in SCARA5's 3'UTR. The luciferase assay showed that miRNA-30a mimics inhibited the luciferase expressed by the luciferase reporter vector carrying a wild-type SCARA5's 3'UTR (pGL3-WT-SCARA5) ( $P < 0.05$ , vs pGL3-WT-SCARA5 alone), and miRNA-30a-5p inhibitor enhanced the luciferase activity ( $P < 0.05$ , vs pGL3-WT-SCARA5 alone). No change was observed when miRNA-30a-5p mimics or miRNA-30a-5p inhibitor was co-transfected with the luciferase reporter vector carrying a mutant SCARA5's 3'

**[作者简介]** 周 静, 主管药师, Email: 610487852@qq.com

**[通讯作者]** 马福家, 副主任药师, 研究方向: 临床药学与药事管理, Tel: 17317712756, Email: mfujia@126.com

UTR(pGL3-MT- SCARA5)( $P > 0.05$ , vs pGL3-WT- SCARA5 alone). Hsa-miRNA-30a-5p level in A549 cells transfected with miRNA-30a inhibitor for 48 h was significantly decreased( $P < 0.05$ , vs cell control or NC), and there was no difference in hsa-miRNA-30a-5p between the negative control and the transfection control( $P > 0.05$ ). The proliferation of A549 cells was suppressed by transfection with miRNA-30a-5p inhibitor 24-72 h after transfection( $P < 0.05$ , vs control or NC). **Conclusion** Hsa-miRNA-30a-5p could increase the proliferation in A549 cells *via* suppressing the expression of SCARA5, and transfection of miRNA-30a-5p inhibitor could inhibit the proliferation of A549 cells *via* up-regulating SCARA5 expression.

**[Key words]** SCARA5; A549; hsa-miRNA-30a-5p; proliferation activity

我国每年新发现肺癌病例数约为 70 万<sup>[1]</sup>, 而肺癌致死率已上升至恶性肿瘤病死率的首位<sup>[2]</sup>, 寻找新的潜在肺癌基因治疗靶点, 开发更为有效的肺癌治疗方案, 已成为关乎全民健康的迫切问题。hsa-miRNA-30a-5p 定位于人 6 号染色体, 其家族与肿瘤的相关报道多集中于肝癌及乳腺癌研究领域。A 类清道夫受体 5-SCARA5, 位于 8 号染色体短臂, 被称为“低调的抑癌高手”。SCARA5 在肝癌、宫颈癌和乳腺癌的发生发展中扮演着重要角色, 与这些类型的肿瘤侵袭和迁移也有密切的关系<sup>[3]</sup>。但与肺癌的相关研究未见有相关报道。在本研究中, 我们拟对临床肺癌标本中的 hsa-miRNA-30a-5p 和 SCARA5 表达及相关性做出检测和分析, 用高通量方法做进一步验证 hsa-miRNA-30a-5p 与 SCARA5 的表达差异, 同时分析两者的相关性, 在此基础上, 我们通过生物信息学分析 hsa-miRNA-30a-5p 和 SCARA5 基因 3'-UTR 区的结合关系, 并通过荧光素酶报告基因法进行证实, 最终拟通过干预 A549 细胞内 hsa-miRNA-30a-5p 含量来调控肿瘤细胞增殖活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

人肺癌标本及癌旁组织取自解放军第 455 医院, 人肺癌 A549 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, RPMI1640 培养基、0.25% 胰蛋白酶、胎牛血清(FBS)、Lipofectamine 2000 转染试剂、RNA 提取试剂盒(Trizol)及反转录试剂盒(M-MLV)均购自美国 Invitrogen 公司, 荧光素酶报告基因表达载体(pGL3-promoter)和荧光素酶检测系统(Promega 公司), SCARA5 蛋白一抗及二抗均购自美国 Santacruz 公司, 细胞及组织总蛋白提取及定量试剂盒、化学发光试剂盒均购自美国 Thermo 公司, miRNA 合成及测序均由上海生工工程有限公司进行, MTT(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide) 和二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司, 无内毒素质粒 DNA 提

取试剂盒(Qiagen 公司), 荧光定量检测试剂盒、限制性内切酶、连接酶、切胶回收试剂盒均购自 Takara 公司, pshRNA 基因沉默表达载体(美国 Systembio 公司)。

### 1.2 仪器和设备

细胞培养箱(美国 Thermo 公司), 水平离心机、高速低温离心机以及微量移液器(Eppendorf 公司), 电泳仪、垂直电泳槽及转膜仪(上海天能公司), 酶标仪及紫外分光光度检测仪(Thermo 公司), PCR 仪(BioRad 公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 肺癌标本中 hsa-miRNA-30a-5p 及 SCARA5 蛋白含量检测

收集肺腺癌及其癌旁组织 5 对, 组织取好之后用生理盐水漂洗, 后用滤纸吸干水分, 然后将组织装入冻存管, 编号后液氮保存。开始检测实验前, 取出液氮保存的组织样本, 切取 2 份各 200 mg 左右的组织, 每份组织加入 1 ml 经 4℃ 预冷的 Trizol, 使用电动匀浆器进行组织匀浆, 匀浆液 4℃ 下以 12 000 × g 离心 2 min, 收集上清液, 然后酚氯仿法提取组织 Total RNA。RNA 通过琼脂糖凝胶电泳观察完整性, 并通过紫外分光光度仪检测 RNA 浓度。取 2 μg RNA 经 M-MLV 反转录制备 cDNA, 荧光定量法检测组织中 hsa-miRNA-30a-5p 含量。另取相同大小组织, 加入 1 ml 组织裂解液 T-MER, 经充分匀浆后进行组织蛋白提取和定量, 实验过程完全按照试剂盒说明书进行, 蛋白提取完成后, 通过 Western blotting 检测组织中 SCARA5 蛋白相对含量。

### 2.2 生物信息学预测 hsa-miRNA-30a-5p 与 SCARA5 (NM\_173833.5) 3'-UTR 结合位点

采用 Targetscan 预测软件对 SCARA5 (NM\_173833.5) 3'-UTR 区与 hsa-miRNA-30a-5p 进行结合位点预测, 预测结果显示(图 2A), hsa-miRNA-30a-5p 在 SCARA5 的 3'-UTR 区存在 8 个碱基的种子区“5'-UGUUUACA-3'”。

### 2.3 载体构建

化学法合成长链 DNA, 5'-CTAGATGCATTT

CAGGGACTGCATTTTCAGGGAC TGCATTTCA GGGAC-3', 下游引物, 5'-AGATC GTCCCT-GAAATGCAGTCCCTGAAATGCAGTCCCTGA AATGCA-3', 两端分别添加 Xba I 酶切位点, 片段包含 hsa-miRNA-30a-5p 与 SCARA5 基因 3' UTR 区结合位点, 长链退火形成双链 DNA, 后克隆至荧光素酶报告基因表达载体 pGL3-promoter, 重组载体经序列分析后命名为野生型荧光素酶报告基因表达载体 pGL3-WT-SCARA5。使用同样的方法将预测结合位点进行错义突变, 即由“5'-UGUUUACA-3'”突变为“5'- AUUCUGUA-3'”, 构建突变型荧光素酶报告基因表达载体 pGL3-MT-SCARA5, 根据 SCARA5(NM\_173833. 5) 的基因信息, 设计针对其编号取的 siRNA 序列 5'-GCAACGCCAGCGAG-GACAC-3', 然后根据 siRNA 序列设计两条互补的长链 DNA, 上下游引物分别添加酶切位点 BamHI 和 EcoRI 及保护碱基, 上游引物序列: 5'- GATC-CGCAACGCCAGCGAGGACAC CTTCCTGT-CAGAGTGTCTCGCTGGCGTTGCTTTTTG -3'; 下游引物序列: 5'- AATTCAAAAAG-CAACGCCAGCGAGGACAC TCTGACAGGAAG GTGTCCTCGCTGGCGTTGCC -3', 双链 DNA 经退火形成双链 DNA, 并克隆至基因表达载体, 构建 SCARA5 基因表达载体 pshRNA- SCARA5。重组载体经序列分析无误后, 扩增转化菌株, 进行无内毒素质粒 DNA 提取, 提取过程严格按照试剂盒说明书进行, 使用 dH<sub>2</sub>O 将质粒 DNA 终浓度调整至 500 ng/ $\mu$ l, -20℃ 保存。

化学合成 miRNA-30a-5p mimics (5' - uGuAAACAuCCuCGACuGGAAG-3'), inhibitor (5'-CuuCCAGuCGAGGAuGuuuACA-3') 及阴性对照 (NC, 5'-CuuCCAGuCGAGGAuGuuuACA- 3'), RNA 末端加 tt 保护碱基。

#### 2.4 Hsa-miRNA-30a-5p 与 SCARA5 靶位关系的验证

选取对数生长期的 A549 细胞, 胰酶消化法制备细胞悬液, 台酚蓝染色后使用血细胞计数板进行活细胞计数, 使用完全培养基 (RPMI1640 + 10% FBS) 调整细胞密度为  $1 \times 10^5$  个/ml, 接种细胞于 6 孔板, 每孔加 2 ml 细胞悬液, 37℃ 和 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h, 参照 Lipofectmaine 2000 转染试剂说明书进行质粒和 RNA 共转染实验。转染分为 9 组: A549 对照组、pGL3-WT-SCARA5 组、pGL3-MT-SCARA5 组、miRNA30a-5p NC + pGL3-WT-SCARA5 组、miRNA30a-NC + pGL3-MT-SCARA5 组、miRNA30a-5p mimics + pGL3-WT-

SCARA 组、miRNA30a-5p mimics + pGL3-MT-SCARA 组、miRNA30a-5p inhibitor + pGL3-WT-SCARA 组和 miRNA30a-5p inhibitor + pGL3-MT-SCARA 组, 每组细胞转染 100 ng 的海肾荧光素酶表达质粒 (pGL3-TK) 作为荧光素酶活性的检测参照。A549 细胞转染后 48 h, 使用 Promega 公司的双荧光素酶检测系统和荧光素酶检测仪, 检测转染后细胞荧光素酶活性。

#### 2.5 转染 miRNA30a-5p inhibitor 对肺癌 A549 的影响

取对数生长期的 A549 细胞, 0.25% 胰酶消化后收集细胞,  $1\ 500 \times g$  水平离心 2 min, 收集细胞, 使用含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基重悬细胞, 并调整细胞密度至  $1 \times 10^5$  个/ml, 接种细胞到 6 孔细胞培养板, 每孔添加 2 ml 细胞悬液, 37℃ 和 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h, 然后进行转染实验, 转染过程及 RNA 用量完全参照试剂盒 Lipofectmaine 2000 说明书。实验分为 4 组, A549 细胞对照组、miRNA-30a NC 转染组、miRNA-30a-5p inhibitor 转染组和 miRNA-30a-5p inhibitor 且 pshRNA-SCARA5 转染组。转染后 48 h, 收集细胞, 提取细胞 Total RNA, 荧光定量法检测 hsa-miRNA-30a-5p 含量, 同时, 提取细胞总蛋白, 用 Western blotting 法检测胞内 SCARA5 蛋白相对含量。

#### 2.6 A549 细胞增殖活性的检测

实验分为 4 组, A549 细胞对照组、miRNA-30a-5p NC 转染组、miRNA-30a-5p inhibitor 转染组和 miRNA-30a-5p inhibitor 且 pshRNA-SCARA5 转染组。取转染后 48 h 的 A549 细胞, 胰酶消化法制备细胞悬液, 离心收集细胞沉淀, 用含 10% FBS 的 RPMI1640 完全培养基调整细胞密度至  $1 \times 10^5$  个/ml, 接种细胞到 96 孔细胞培养板, 每孔添加 100  $\mu$ l 细胞悬液, 轻晃培养板使其分布均匀, 37℃ 和 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养细胞, 并于接种后的 24、48、72 h, 采用 MTT 法检测细胞活性。检测前, 每孔细胞加入 5 mg/ml MTT 溶液 10  $\mu$ l, 轻晃使其分布均匀, 继续培养 4 h, 去上清液, 每孔加入 150  $\mu$ l DMSO 溶液, 37℃ 孵育 15 min, 酶标仪检测 570 nm 波长 (A<sub>570</sub>) 细胞液的吸光度值, 根据吸光度值制作细胞对数期生长曲线。

#### 2.7 real time-PCR 检测 hsa-miRNA-30a-5p 含量

取 2  $\mu$ g 的 Total RNA, 反转录制备 cDNA, 反转录过程使用特异反转录引物, H. sapiens 6 snRNA: 5'-TACCTTGCGAAGTGCTTAAAC-3'; hsa-miRNA-30a-5p, 5'-GTCGTATCCAGTGC GTGTCGTG GAGTCGGCAATTGCACTGGAT-ACGACTTCC-3', 取 2  $\mu$ l 反转录产物作为 PCR 模

板, 荧光定量法检测 hsa-miRNA-30a-5p 含量。2<sup>ΔΔCt</sup> 法分析定量结果, 内参选用 U6 (NM\_001101.3)。PCR 引物序列: U6 上游引物 5'-GTGCTCGCTTCGGC AGCACAT-3', 下游引物 5'-TACCTTGCGAAGTGC TTAAAC-3'; hsa-miRNA-30a-5p 上游引物 5'-GCCGGCGCCCGAGCTCTGGCTC-3', 下游引物 5'-TGTAACATCTCGACTGGAAG-3'。PCR 使用 20 μl 体系, 其中, SYBR Premix Ex Taq 10 μl, 引物 (20 μmol/L) 各取 0.2 μl, 模板使用量为 2 μl, 反应体系用 dH<sub>2</sub>O 补足。PCR 条件: 95℃ 变性 10 s; 58℃ 退火 10 s; 72℃ 延伸 10 s, 循环数设置为 40。结果分析中, 以 U6 作为对照, 通过 Ct 值进行数据分析。Ct 值通过交点法计算获得, 即通过扩增曲线与阈值线的交点来计算 Ct 值。相对定量的结果则通过 ΔΔCt 法进行解析, 目的基因相对于内参基因的表达量为 2<sup>ΔCt</sup> = 2<sup>C<sub>mi</sub>-C<sub>mi</sub></sup>。

## 2.8 Western blotting 检测 SCARA5 蛋白含量

将浓度测定后的总蛋白以每组 10 μl 进行垂直电泳, SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离胶浓度为 10%, 经 110 V 电压 90 min 电泳后, 立春红染色观察蛋白条带是否完整, 400 mA 电流转膜 90 min, 转膜后以 5% 的脱脂牛奶封闭 2 h, 4℃ 一抗过夜孵育,

SCARA5 和 GAPDH 一抗 (TBST) 稀释比分别为 1:300 和 1:1 000; TBST 洗膜 3 次, 加入二抗孵育 2 h, 羊抗鼠二抗稀释比为 1:2 000; TBST 洗膜 3 次, 添加化学发光液反应底物, 暗室曝光, 扫描曝光底片, 统计目的条带光密度值 (D 值)。D 值目的蛋白/D 值 GAPDH, 即为 SCARA5 蛋白的相对含量。

## 2.9 统计学方法

实验所得数据均以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用单因素方差分析, 其中, 多组资料两两比较采用 LSD 多重检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义, 所有分析均以 SPSS 13.0 统计软件完成。

## 3 结果

### 3.1 肿瘤标本中 hsa-miRNA-30a-5p 与 SCARA5 蛋白含量检测

Hsa-miRNA-30a-5p 相对含量检测数据 (图 1A) 显示, 与癌旁组织比较, 肺癌组织中的 hsa-miRNA-30a-5p 含量明显降低, 组间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 数据以 (均值 ± 标准差) 表示, 实验设置 3 次独立的生物学重复; SCARA5 蛋白含量检测结果 (图 2B) 显示, 肺癌组织和癌旁组织中蛋白含量分别为 (1.00 ± 0.38) 和 (4.29 ± 1.18), 统计结果显示, 组间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

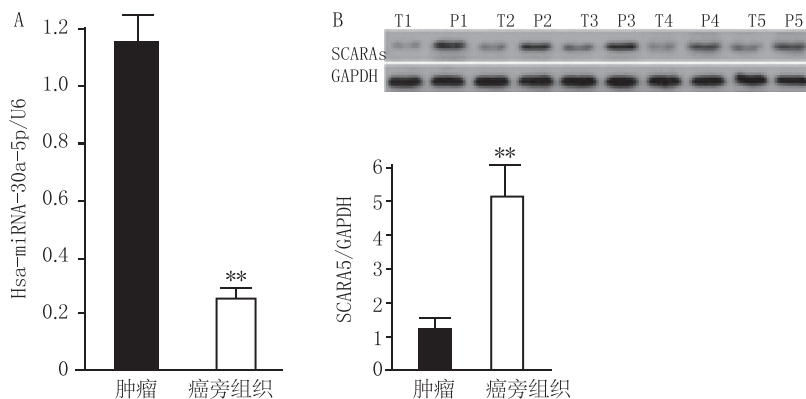


图 1 肿瘤标本中 hsa-miRNA-30a-5p 与 SCARA5 蛋白含量检测

A. 肺癌及癌旁组织中 hsa-miRNA-30a-5p 相对含量检测结果, U6 为内参;

B. 肺癌及癌旁组织中 SCARA5 蛋白表达检测结果, GAPDH 为参照蛋白; \*\*  $P < 0.01$ , 与肿瘤组比较

### 3.2 Hsa-miRNA-30a-5p 与 SCARA5 靶位关系验证

生物信息学预测显示, hsa-miRNA-30a-5p 在 SCARA5 基因 3' UTR 区有 8 个碱基的结合位点 (图 2A)。分别将 miRNA-30a-5p mimics、miRNA-30a-5p inhibitor、miRNA-30a-5p NC 与两组荧光素酶报告基因表达载体 pGL3-WT-SCARA5 和 pGL3-MT-SCARA5 进行共转染, 转染后 48 h, 荧光素酶相对活性检测结果显示 (图 2B), miRNA-

30a-5p mimics 能够明显抑制野生型荧光素酶表达载体荧光素酶活性, 从 (3.98 ± 0.61) 降至 (1.62 ± 0.31), 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而 miRNA-30a-5p inhibitor 则能够增强野生型荧光素酶报告基因表达载体的荧光素酶活性, (3.98 ± 0.61) 上升至 (6.27 ± 0.35), 组间差异显著 ( $P < 0.05$ ); 对于突变型荧光素酶报告基因表达载体, 无论 miRNA-30a-5p mimics 或者 miRNA-30a-5p inhibitor 都对

其无明显影响。以上数据和结果说明, hsa-miRNA-30a-5p 与 SCARA5 基因之间的预测靶位确实存在。

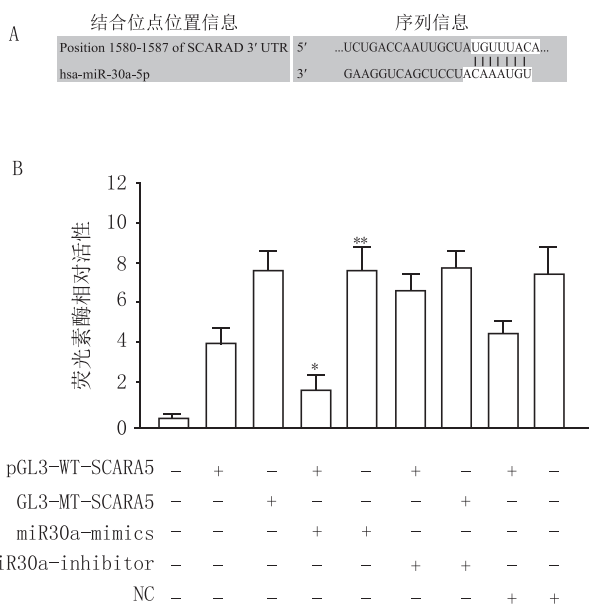


图2 荧光素酶活性检测

A. hsa-miRNA-124-3p 与 SCARA5 基因 3'UTR 结合位点的生物信息分析; B. A549 细胞转染后 24 h, 细胞内荧光素酶活性检测结果  
注:“+”代表转染,“-”代表不转染

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , 与 pGL3-WT-SCARA5 转染组比较

### 3.3 转染后 A549 细胞内 hsa-miRNA-30a-5p 及 SCARA5 蛋白含量检测

A549 细胞转染 miRNA-30a inhibitor 后 48 h, 细胞内 hsa-miRNA-30a-5p 含量明显降低(图 3A), 与对照组比较, 差异显著 ( $P < 0.05$ ), 而 miRNA-30a-5pNC 转染组 hsa-miRNA-30a-5p 含量与对照组比较, 无明显差异 ( $P > 0.05$ ); 蛋白含量检测结果说明(图 3B), 转染 miRNA-30a-5p inhibitor 后 48 h, 细胞内 SCARA5 含量明显上升, 与细胞对照组比较, 差异显著 ( $P < 0.05$ ), 而 miRNA-30a-5p inhibitor 与沉默载体 pshRNA-SCARA5 共转染组细胞内 SCARA5 蛋白表达与对照组比较, 无明显差异 ( $P > 0.05$ )。

### 3.4 hsa-miRNA-30a-5p 含量变化对 A549 细胞增殖活性的影响

细胞瞬时转染后 24~72 h, 各组细胞增殖活性检测结果(图 4)显示, 转染后 48、72 h, 与转染对照组比较, miRNA-30a-5p inhibitor 转染组 A549 细胞增殖活性明显降低 ( $P < 0.05$ ), pshRNA-SCARA5 与 miRNA-30a-5p inhibitor 转染组细胞增殖活性则明显增强 ( $P < 0.01$ ), 恢复到基因干预前的水平。

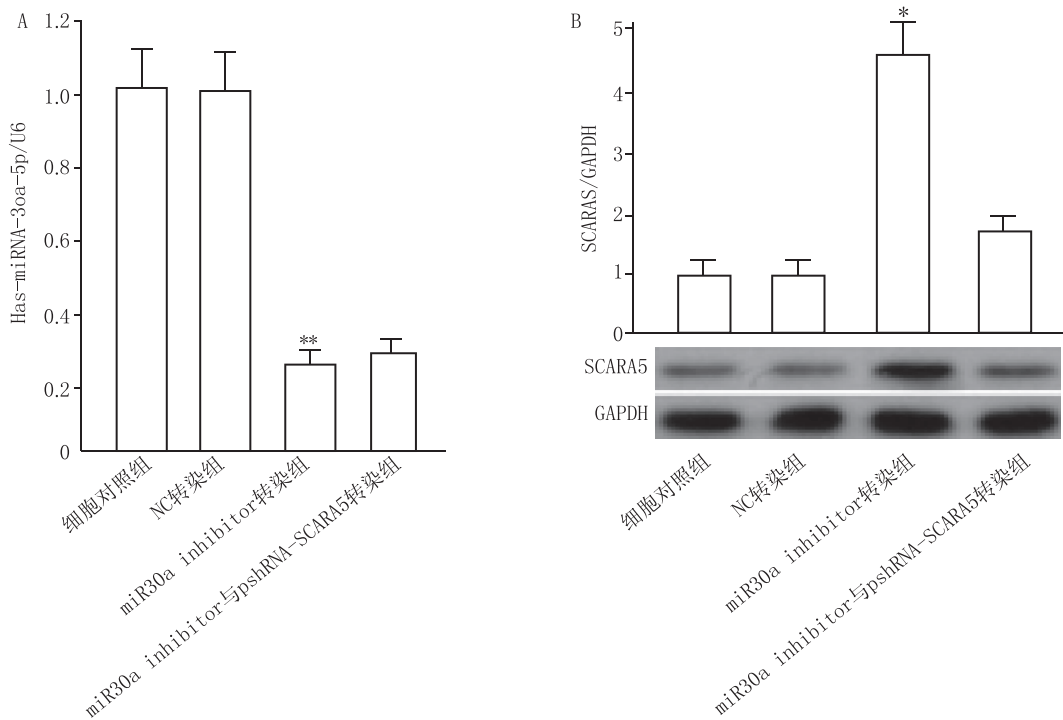


图3 转染后 A549 细胞内 hsa-miRNA-30a-5p 及 SCARA5 蛋白含量检测

A. A549 细胞转染后 48 h, 各组细胞内 hsa-miRNA-30a-5p 含量检测结果;  
B. A549 细胞转染后 48 h, 各组细胞内 SCARA5 蛋白含量检测结果

\*  $P < 0.05$ , 与细胞对照组比较

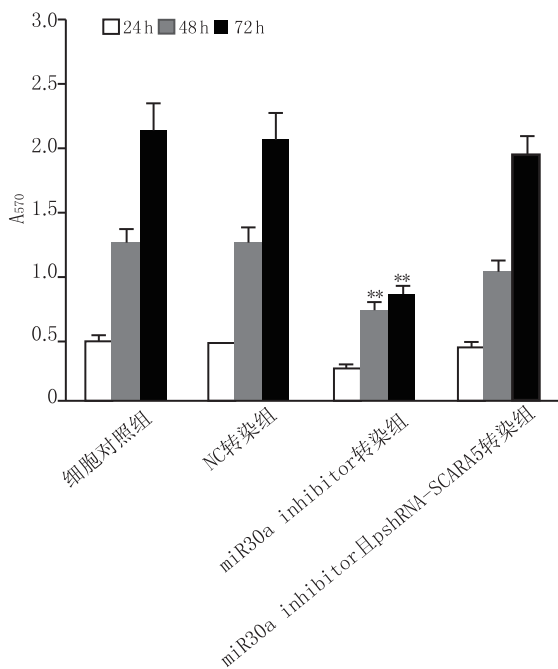


图 4 A549 细胞增殖活性检测

\*\*  $P < 0.01$ , 与细胞对照组(相同时间点)比较

#### 4 讨论

微小 RNA(miRNA) 属于内源性非编码 RNA, 广泛分布于基因组, 其成熟体长度一般为 20~25 个碱基。从遗传进化学角度来讲, miRNA 具有高度保守性。miRNA 具有多种生物功能, 这些功能主要通过对其靶基因的调控来实现, miRNA 通过种子区可以与其靶基因 3'-UTR 区结合, 从而抑制基因翻译<sup>[4]</sup>。miRNA 与肿瘤关系密切, 可调节细胞凋亡、生长、增殖、迁移、侵袭, 通过参与多种信号通路的靶蛋白的克隆形成和血管生成, 参与关键的发病机制<sup>[5-6]</sup>。Winther 等研究表明, miRNA-21 可作为食管腺癌及食管鳞癌的独立预后因素<sup>[7]</sup>。Wang 等通过研究发现, miRNA-128b 在胃癌的发病进程中起重要作用, 过表达 miRNA-128b 可抑制胃癌细胞的增殖, 同时诱导胃癌细胞产生凋亡<sup>[8]</sup>。miRNA-10a, miRNA-26, miRNA-126a, miRNA-210, miRNA-342 和 miRNA-519a 被证实可以作为乳腺癌的生物学标志物, 且与乳腺癌对一线用药他莫昔芬的药物敏感性有关<sup>[9]</sup>。miRNA-29b 及 miRNA17 则被证实肠癌的调控机制失活中扮演了关键角色<sup>[10-11]</sup>。这些研究表明, miRNA 是多种肿瘤发病机制的内在原因, 而其也可以成为肿瘤基因治疗的切入点。过去的 4 年中, 肺癌的总体 5 年生存率仅上升了 4%, 早期较低的诊断率是改善肺癌预后的主要障碍, 肺癌切除术患者生存率大于 80%, 这也

表明肺癌的早期检测和诊断对提高患者的生存率至关重要, 而血清中 miRNA 作为非侵入性肺癌生物标志物被陆续发现和证实<sup>[12]</sup>。Chen 等研究证实, miRNA-25 可以通过其靶基因 RGS3 调控非小细胞肺癌细胞株 A549 和 H520 的增殖和侵袭<sup>[13]</sup>。另外, 还有 miRNA-143-3p, miRNA-218, miRNA130 家族<sup>[14-16]</sup> 和 miRNA-630<sup>[17]</sup> 均与肺癌的生物学调控机制有关。所有这些研究表明, miRNAs 在肺癌的发病机制中很可能形成一个网络调控系统, 对相关的 miRNA 进行研究, 将有助于寻找新的 miRNA 靶基因和新的肺癌基因治疗靶点<sup>[18]</sup>。

SCARA5 于 2009 年被我国科学家发现, 一系列的研究表明, SCARA5 基因作为肝癌抑制基因, 在肝癌组织中表达下降, SCARA5 的肝癌抑制作用可能是通过抑制 FAK 蛋白的激活来实现的<sup>[3]</sup>。Khamas 等通过研究证实, SCARA5 在肠癌中表达异常<sup>[19]</sup>。在胶质瘤细胞 U251 中过表达 SCARA5, 可以显著抑制肿瘤细胞的增殖, 显著降低克隆形成、迁移和体外侵袭, 体内实验也表明, SCARA5 过表达可以抑制皮下肿瘤的增殖<sup>[20]</sup>。Liu 等通过实验证实, SCARA5 与 A549 细胞的 EMT 有关, 并认为是转录因子 SNAIL1 的负调控作用所致<sup>[21]</sup>。Hsa-miRNA-30a-5p 及其家族是高度保守的 miRNA 家族, 与肿瘤发生、发展密切相关, hsa-miRNA-30a-5p 下游目标包括转录因子如 ITGB3、DTL、EWS-FLI 和 CD99 等, 通过调节这些下游目标蛋白的表达, 参与调节结直肠癌、尤文瘤等类型肿瘤的发生与发展<sup>[22-24]</sup>。Hsa-miRNA-30a-5p 与肺癌的相关研究较少, 与 SCARA5 的相关研究则目前未见报道。我们在肺癌组织中验证 SCARA5 的表达, 数据显示 SCARA5 在肺癌组织中的表达量明显低于癌旁组织, hsa-miRNA-30a-5p 在肺癌与癌旁组织中的表达与 SCARA5 呈显著负相关。

我们的研究显示, hsa-miRNA-30a-5p 与 SCARA5 具有显著负相关性, hsa-miRNA-30a-5p 在肺癌中的高表达导致了肿瘤组织内 SCARA5 表达的显著降低。MTT 检测结果显示, 通过 miRNA-30a-5p inhibitor 转染可以明显抑制 A549 细胞对数生长期增殖活性, 当 miRNA-30a-5p inhibitor 与 SCARA5 基因沉默同时进行, A549 细胞增殖活性又恢复到基因干预前的水平。这些数据说明, miRNA-30a-5p inhibitor 确实是通过抑制 A549 细胞内 hsa-miRNA-30a-5p 的表达, 增强了其靶蛋白 SCARA5 含量, 而高表达的 SCARA5 则明显抑制了 A549 细胞的增殖活性, 因此在肺癌细胞 A549

中, SCARA5 显然作为抑癌蛋白发挥作用。

本研究的意义在于证实 hsa-miRNA-30a-5p 是肺癌细胞中 SCARA5 蛋白低表达的主要因素, 通过抑制肿瘤细胞内 hsa-miRNA-30a-5p, 可以显著上调其靶蛋白 SCARA5 的表达, 进而显著抑制肿瘤细胞 A549 的增殖活性。该实验结果提示我们, hsa-miRNA-30a-5p 可成为潜在的肺癌基因治疗靶点。

### 【参考文献】

[1] 陈万青, 张思维, 邹小农. 中国肺癌发病死亡的估计和流行趋势研究[J]. 中国肺癌杂志, 2010, 13(5): 488-493.

[2] 李媛秋, 代敏, 陈元立, 等. 中国省区水平肺癌死亡率估计方法研究[J]. 中国肺癌杂志, 2011, 14(2): 120-126.

[3] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.

[4] ISSAC B, GALOIAN K, GUETTOUCHE T, et al. Genome-wide mRNA and miRNA expression data analysis to screen for markers involved in sarcomagenesis in human chondrosarcoma cell lines[J]. Genom Data, 2014, 2: 320-324.

[5] MISHRA S, YADAV T, RANI V. Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2016, 98: 12-23.

[6] WINTHER M, ALSNER J, TRAMM T, et al. Evaluation of miR-21 and miR-375 as prognostic biomarkers in esophageal cancer[J]. Acta Oncol, 2015, 54(9): 1582-1591.

[7] WANG P, GUO X Y, ZONG W, et al. MicroRNA-128b suppresses tumor growth and promotes apoptosis by targeting A2bR in gastric cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 467(4): 798-804.

[8] EGELAND N G, LUNDE S R, JONSDOTTIR K, et al. The role of microRNAs as predictors of response to tamoxifen treatment in breast cancer patients[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(10): 24243-24275.

[9] LI L P, GUO Y, CHEN Y Z, et al. The diagnostic efficacy and biological effects of microRNA-29b for colon cancer[J]. Technol Cancer Res Treat, 2016, 15(6): 772-779.

[10] KNUDSEN K N, NIELSEN B S, LINDEBJERG J, et al. MicroRNA-17 is the most up-regulated member of the mir-17-92 cluster during early colon cancer evolution[J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0140503.

[11] I H, CHO J Y. Lung cancer biomarkers[J]. Adv Clin Chem, 2015, 72: 107-170.

[12] CHEN Z Z, WU Y, MENG Q T, et al. Elevated microRNA-25 inhibits cell apoptosis in lung cancer by targeting RGS3[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2016, 52(1): 62-67.

[13] DONG W, YAO C P, TENG X P, et al. MiR-140-3p suppressed cell growth and invasion by downregulating the expression of ATP<sub>8</sub>A1 in non-small cell lung cancer[J]. Tumour Biol, 2016, 37(3): 2973-2985.

[14] SONG L, LI D, ZHAO Y K, et al. MiR-218 suppressed the growth of lung carcinoma by reducing MEF2D expression[J]. Tumour Biol, 2016, 37(3): 2891-2900.

[15] LIN L, LIN H B, WANG L, et al. MiR-130a regulates macrophage polarization and is associated with non-small cell lung cancer[J]. Oncol Rep, 2015, 34(6): 3088-3096.

[16] SONG Y F, HONG J F, LIU D L, et al. MiR-630 targets LMO3 to regulate cell growth and metastasis in lung cancer[J]. Am J Transl Res, 2015, 7(7): 1271-1279.

[17] MA R Q, WANG C Y, WANG J J, et al. MiRNA-mRNA interaction network in non-small cell lung cancer[J]. Interdiscip Sci, 2016, 8(3): 209-219.

[18] HUANG J, ZHENG D L, QIN F S, et al. Genetic and epigenetic silencing of SCARA5 may contribute to human hepatocellular carcinoma by activating FAK signaling[J]. J Clin Invest, 2010, 120(1): 223-241.

[19] KHAMAS A, ISHIKAWA T, SHIMOKAWA K, et al. Screening for epigenetically masked genes in colorectal cancer Using 5-Aza-2'-deoxycytidine, microarray and gene expression profile[J]. Cancer Genom Proteomics, 2012, 9(2): 67-75.

[20] YAN N, ZHANG S, YANG Y, et al. Therapeutic upregulation of class A scavenger receptor member 5 inhibits tumor growth and metastasis [J]. Cancer Sci, 2012, 103(9): 1631-1639.

[21] LIU J, HU G, CHEN D, et al. Suppression of SCARA5 by Snail1 is essential for EMT-associated cell migration of A549 cells[J]. Oncogenesis, 2013, 2: e73.

[22] WEI W, YANG Y, CAI J, et al. MiR-30a-5p suppresses tumor metastasis of human colorectal cancer by targeting ITGB3 [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 39(3): 1165-1176.

[23] BARANISKIN A, BIRKENKAMP-DEMTRODER K, MAGHNOUJ A, et al. MiR-30a-5p suppresses tumor growth in colon carcinoma by targeting DTL [J]. Carcinogenesis, 2012, 33(4): 732-739.

[24] FRANZETTI G A, LAUD-DUVAL K, BELLANGER D, et al. MiR-30a-5p connects EWS-FLI1 and CD99, two major therapeutic targets in Ewing tumor[J]. Oncogene, 2013, 32(33): 3915-3921.

【收稿日期】 2018-12-11 【修回日期】 2019-04-03  
【本文编辑】 李睿旻