分类号：R734.2 密级：一般

U D C ：616-006 编号：2010310184



广 州 医 科 大 学

博 士 学 位 论 文

**MicroRNA-29b** 在非小细胞肺癌转移中的作用及机制研究

研 究 生：王红艳

导 师：张雅洁 教授

申请学位级别：医学博士 年 级：二零一零级

学 科 专 业：内科学 研究方向：肿瘤病理

论文提交日期：二零一四年三月 论文答辩日期：二零一四年五月 学 位 类 型：医学科学学位 学位授予单位：广州医科大学

答辩委员会主席： 评 议 人：

二零一四年三月



**2010**级博士学位论文

**MicroRNA-29b** 在非小细胞肺癌转移中的作用及机制研究

**The Role and Mechanism of MicroRNA-29b in Metastasis of Non-Small Cell Lung Carcinoma**

研 究 生：王红艳

导 师：张雅洁 教授专 业：内科学

研究方向：肿瘤病理

**2014**年**5**月**·**广州

目 录

[中文摘要](#_Toc68611105) 3

[（1）成功构建了融合MMP2 及PTEN 基因野生型和突变型3’UTR 的](#_Toc68611106) 4

[（2）在转染MMP2基因野生型3’UTR载体实验组中，miR-29b mimic组与](#_Toc68611107) 5

[（3）在转染PTEN基因野生型3’UTR载体的实验中，miR-29b mimic组与](#_Toc68611108) 5

[（4）与A549-NC 细胞和A549 细胞相比，稳定过表达miR-29b 的](#_Toc68611109) 5

[（5）与A549-NC 细胞和A549 细胞相比，稳定过表达miR-29b 的](#_Toc68611110) 5

[（6）实时荧光定量PCR检测结果显示miR-29b在H460细胞中的表达最高，在A549-L、A549、A549-H细胞中的表达依次降低，Western blot检测结果显示](#_Toc68611111) 5

[结 论](#_Toc68611112) 5

[Abstract](#_Toc68611113) 6

[英汉缩略语名词对照](#_Toc68611114) 8

[前 言](#_Toc68611115) 11

[一、 肺癌发病死亡的流行病学情况](#_Toc68611116) 11

[二、 肿瘤的转移](#_Toc68611117) 11

[三、](#_Toc68611118) **[MicroRNA](#_Toc68611118)**[简介](#_Toc68611118) 11

[四、](#_Toc68611119) **[MicroRNA](#_Toc68611119)**[与肿瘤](#_Toc68611119) 12

[六、 非小细胞肺癌转移相关的](#_Toc68611120)**[MicroRNA](#_Toc68611120)** 12

[七、 本研究的目的与意义](#_Toc68611121) 12

[第一部分 非小细胞肺癌转移相关](#_Toc68611122)**[miRNAs](#_Toc68611122)**[的筛选及表达验证](#_Toc68611122) 13

[第一节 非小细胞肺癌转移相关](#_Toc68611123)**[miRNAs](#_Toc68611123)**[的筛选](#_Toc68611123) 13

[一、 材料](#_Toc68611124) 13

[1. 细胞](#_Toc68611125) 13

[2 X SuperArray PCR master mix美国SABiosciences公司](#_Toc68611126) 14

[二、 方法](#_Toc68611127) 14

[1. 细胞培养](#_Toc68611128) 14

[2.](#_Toc68611129) **[MACS](#_Toc68611129)**[法分选](#_Toc68611129)**[CD133](#_Toc68611129)**[阳性和](#_Toc68611129)**[CD133](#_Toc68611129)**[阴性](#_Toc68611129)**[A549](#_Toc68611129)**[细胞](#_Toc68611129) 14

**[3.](#_Toc68611130)** [抽提](#_Toc68611130)**[CD133](#_Toc68611130)**[阳性](#_Toc68611130)**[/](#_Toc68611130)**[阴性](#_Toc68611130)**[A549](#_Toc68611130)**[细胞的](#_Toc68611130)**[Total RNA](#_Toc68611130)** 15

[4.](#_Toc68611131) **[RNA](#_Toc68611131)**[质量检测](#_Toc68611131) 15

[5.](#_Toc68611132) **[cDNA](#_Toc68611132)**[合成](#_Toc68611132) 15

**[6.](#_Toc68611133)****[PCR](#_Toc68611133)** 16

[7. 数据分析](#_Toc68611134) 17

[8. 生物信息学分析](#_Toc68611135) 17

[三、 结果](#_Toc68611136) 17

[1. miRNA芯片结果](#_Toc68611137) 17

[2. 差异表达miRNAs靶基因的生物信息学预测](#_Toc68611138) 18

[3. hsa-miR-29b的基本信息及与其靶基因3’UTR区的结合预测](#_Toc68611139) 18

[第二节](#_Toc68611140) **[miR-29b](#_Toc68611140)**[在非小细胞肺癌组织和细胞株中的表达验证](#_Toc68611140) 20

[一、 材料](#_Toc68611141) 20

[1. 细胞](#_Toc68611142) 20

[2. 组织标本](#_Toc68611143) 20

[3. 主要试剂](#_Toc68611144) 20

[3. 主要仪器](#_Toc68611145) 20

[二、 方法](#_Toc68611146) 20

[1. 细胞培养](#_Toc68611147) 20

[2. 非小细胞肺癌和癌旁新鲜组织中的](#_Toc68611148)**[microRNA](#_Toc68611148)**[提取](#_Toc68611148) 20

[3. 非小细胞肺癌和癌旁石蜡组织中的](#_Toc68611149)**[microRNA](#_Toc68611149)**[提取](#_Toc68611149) 21

[（1) 每个组织蜡块切取厚度为20µm白片，共4张，用DEPC水处理后的镊子小心放入RNase-free的1.5mL EP管中；](#_Toc68611150) 21

[4. 非小细胞肺癌细胞株中的总](#_Toc68611151)**[RNA](#_Toc68611151)**[提取](#_Toc68611151) 22

[5.](#_Toc68611152) **[cDNA](#_Toc68611152)**[合成](#_Toc68611152) 22

[6.](#_Toc68611153) **[qPCR](#_Toc68611153)**[扩增](#_Toc68611153) 22

[（1) 冰上溶解qPCR primer.和Taqman Mix.注意避光。轻轻颠倒混匀或旋转混匀,](#_Toc68611154) 22

[（2) 准备配制反应体系：](#_Toc68611155) 22

[7. 统计分析](#_Toc68611156) 23

[三、 结果](#_Toc68611157) 23

[讨 论](#_Toc68611158) 27

[第二部分](#_Toc68611159) **[miR-29b](#_Toc68611159)**[对非小细胞肺癌细胞Th物学行为的影响](#_Toc68611159) 28

[第一节](#_Toc68611160) **[miR-29b](#_Toc68611160)**[过表达对非小细胞肺癌细胞体内外生物学行为的影响](#_Toc68611160) 28

[一、 材料](#_Toc68611161) 28

[1. 细胞、病毒、载体](#_Toc68611162) 28

**[2.](#_Toc68611163)** [主要试剂](#_Toc68611163) 29

**[3.](#_Toc68611164)** [主要仪器](#_Toc68611164) 29

[4 ℃、-20℃低温冰箱西门子公司](#_Toc68611165) 29

[二、 方法](#_Toc68611166) 30

[1. 细胞培养](#_Toc68611167) 30

[2. 慢病毒感染目的细胞](#_Toc68611168) 30

[3. 反复](#_Toc68611169)**[transwell](#_Toc68611169)**[分离高低转移能力的非小细胞肺癌细胞株](#_Toc68611169) 30

[4. 细胞体外侵袭试验](#_Toc68611170) 30

[5. 细胞体外迁移试验](#_Toc68611171) 30

[6. 瞬时转染](#_Toc68611172) 30

**[7.](#_Toc68611173)** [实时荧光定量](#_Toc68611173)**[PCR](#_Toc68611173)** 31

[8.](#_Toc68611174) **[CCK-8](#_Toc68611174)**[细胞增殖实验](#_Toc68611174) 31

[9. 裸鼠皮下成瘤实验](#_Toc68611175) 31

[10. 统计学分析](#_Toc68611176) 31

[三、 结果](#_Toc68611177) 31

[第二节](#_Toc68611178) **[miR-29b inhibitor](#_Toc68611178)**[对非小细胞肺癌细胞体内外生物学行为的影响](#_Toc68611178) 36

[一、 材料](#_Toc68611179) 36

[二、 方法](#_Toc68611180) 36

[1. 细胞培养](#_Toc68611181) 36

[2. 细胞瞬时转染](#_Toc68611182) 36

**[3.](#_Toc68611183)** [实时荧光定量](#_Toc68611183)**[PCR](#_Toc68611183)** 37

[4.](#_Toc68611184) **[CCK-8](#_Toc68611184)**[细胞增殖实验](#_Toc68611184) 37

[5. 细胞体外迁移实验](#_Toc68611185) 37

[6. 细胞体外侵袭实验](#_Toc68611186) 37

[7. 裸鼠皮下成瘤实验](#_Toc68611187) 37

[8. 统计学分析](#_Toc68611188) 37

[三、 结果](#_Toc68611189) 37

[1. miR-29b抑制后H460和A549-L细胞中miR-29b的表达变化](#_Toc68611190) 37

[2. miR-29b抑制后对H460和A549-L细胞体外增殖能力的影响](#_Toc68611191) 37

[3. miR-29b抑制后H460和A549-L细胞体外迁移能力的变化](#_Toc68611192) 37

[4. miR-29b抑制后H460和A549-L细胞体外侵袭能力的变化](#_Toc68611193) 38

[5. 抑制miR-29b慢病毒表达载体的鉴定和感染后H460细胞中miR-29b的表达鉴](#_Toc68611194) 38

[6. miR-29b inhibitor对H460裸鼠移植瘤生长的影响](#_Toc68611195) 39

[讨 论](#_Toc68611196) 40

[第三部分](#_Toc68611197) **[miR-29b](#_Toc68611197)**[靶基因的鉴定](#_Toc68611197) 41

[第一节 荧光素酶报告系统检测](#_Toc68611198)**[MMP2](#_Toc68611198)**[及](#_Toc68611198)**[PTEN](#_Toc68611198)**[与](#_Toc68611198)**[miR-29b](#_Toc68611198)** 41

[一、 材料](#_Toc68611199) 41

[1. 细胞、菌株、载体](#_Toc68611200) 41

**[2.](#_Toc68611201)** [主要试剂](#_Toc68611201) 41

**[3.](#_Toc68611202)** [主要仪器](#_Toc68611202) 42

[4 ℃、-20℃低温冰箱西门子公司](#_Toc68611203) 42

[二、 方法](#_Toc68611204) 42

**[1.](#_Toc68611205)** [目的基因MMP2-3’UTR和PTEN-3’UTR的扩增](#_Toc68611205) 42

**[2.](#_Toc68611206)** [表达载体psiCHECK-2-MMP2或PTEN基因的3’UTR的构建](#_Toc68611206) 44

[3. 表达载体突变型psiCHECK-2-MMP2或PTEN基因3’UTR的构建](#_Toc68611207) 45

[2mM dNTP mixture 10×buffer for iPCR模板](#_Toc68611208) 45

[4°C保存](#_Toc68611209) 46

[4. miRNA与质粒共转染细胞](#_Toc68611210) 46

[5. Lucifersae检测](#_Toc68611211) 48

[6. 统计分析](#_Toc68611212) 49

[三、 结果](#_Toc68611213) 49

[1. MMP2及PTEN基因的3'UTR区载体的构建](#_Toc68611214) 49

[2． MMP2 3’UTR区和PTEN 3’UTR区突变载体的构建](#_Toc68611215) 50

[3 ’UTR(B)的酶切鉴定](#_Toc68611216) 50

[第二节](#_Toc68611217) **[miR-29b](#_Toc68611217)**[靶向调控基因](#_Toc68611217)**[MMP2](#_Toc68611217)**[的表达](#_Toc68611217) 51

[一、 材料](#_Toc68611218) 51

**[1.](#_Toc68611219)** [细胞](#_Toc68611219) 51

**[2.](#_Toc68611220)** [主要试剂](#_Toc68611220) 51

**[3.](#_Toc68611221)** [主要仪器](#_Toc68611221) 52

[二、 方法](#_Toc68611222) 52

[2 h；弃封闭液，加入用3%BSA封闭液分别按1∶1000稀释的兔抗人MMP2、PTEN、](#_Toc68611223) 55

[1 min，并拍照记录。](#_Toc68611224) 55

[三、 结果](#_Toc68611225) 55

[2. miR-29b可与PTEN 3’UTR直接结合影响PTEN蛋白的表达](#_Toc68611226) 56

[讨 论](#_Toc68611227) 57

[3 ’UTR中miR-29b结合位点后，这种抑制作用消失。说明miR-29b可直接与MMP2](#_Toc68611228) 57

[第四部分](#_Toc68611229) **[miR-29b](#_Toc68611229)**[上游转录因子的预测和鉴定](#_Toc68611229) 57

[一、 材料](#_Toc68611230) 57

**[1.](#_Toc68611231)** [细胞、菌株、质粒](#_Toc68611231) 57

[2. 主要试剂](#_Toc68611232) 58

[3. 主要仪器](#_Toc68611233) 58

[5. 转录因子相关预测信息库](#_Toc68611234) 58

[二、 方法](#_Toc68611235) 58

[三、 结果](#_Toc68611236) 61

[讨 论](#_Toc68611237) 66

[参考文献](#_Toc68611238) 67

[综述](#_Toc68611239) 71

[参考文献](#_Toc68611240) 73

[学位论文原创性声明](#_Toc68611241) 75

[学位论文知识产权权属声明](#_Toc68611242) 75

[关于学位论文使用授权的说明](#_Toc68611243) 75

**MicroRNA-29b**在非小细胞肺癌转移中的作用及机制研究

博士研究生：王红艳

导师：张雅洁教授

# 中文摘要

研究背景与目的

肺癌是目前人类发病率及死亡率最高的恶性肿瘤。肺癌的主要病理类型包括非小细胞肺癌和小细胞肺癌两大类，其中非小细胞肺癌占肺癌总数的80%～

85%。导致非小细胞肺癌临床治疗失败和患者死亡的主要原因之一是肿瘤的侵袭和转移。因此，深入研究非小细胞肺癌转移过程的分子机制，寻找新的生物标记物和治疗靶标，是当前肿瘤研究领域的重要课题。

MicroRNA(miRNA)是一类长约22个核苷酸的非编码单链RNA，通过碱基互补配对方式结合到靶基因mRNA的3’UTR，对靶基因mRNA进行降解或者翻译抑制，实现对靶基因表达水平的转录后调控。目前人类基因组中已确认的

miRNA有2578个，可能参与人类30%的蛋白表达调控，影响着几乎所有的信号通路，与生长发育以及许多疾病的发生发展息息相关。在肿瘤中，异常表达的

miRNAs通过靶向癌基因或抑癌基因，发挥着类似抑癌基因或癌基因的作用，参与癌变进程的每一阶段，包括肿瘤的侵袭和转移。

为筛选与非小细胞肺癌转移相关的因子，本研究利用免疫磁珠分选(magnetic activated cell sorting, MACS)技术从人肺腺癌细胞株A549细胞中分选出CD133阳性和CD133阴性A549细胞株；利用miRNA PCR芯片和肿瘤转移相关基因芯片从分选后未经培养的两株原代细胞中筛选出差异表达的miRNAs和差异表达的转移相关基因；应用生物信息学技术对差异5倍以上的miRNAs进行靶基因预测，再将预测得到的靶基因与差异表达的转移相关基因进行比对。结果发现，在

CD133阳性A549细胞表达明显下调的7个miRNA中，microRNA-29b(miR-29b)

1

的靶基因与转移基因芯片中的差异基因交集最多，为4个。与CD133阴性细胞相比，CD133阳性A549细胞中miR-29b表达下调了7.6倍，4个交集靶基因PTEN、

ETV4、COL4A2、MMP2上调了1.11至4.20倍。由此，我们选择miR-29b作为非小细胞肺癌转移相关的候选miRNA，对miR-29b在非小细胞肺癌转移中的作用及其分子调控机制进行研究，选择与转移密切相关的MMP2和PTEN进行后续靶基因的验证，以期为基于miRNA的非小细胞肺癌的临床诊治工作提供科学依据。

研究方法

**1**、非小细胞肺癌转移相关**miRNAs**的筛选及表达验证

（1）利用miRNA PCR芯片从CD133阳性和CD133阴性A549细胞中筛选出差异miRNAs表达谱。以差异倍数＞5的miRNAs为检索词，利用三个常用数据库MicroRNA. org、Targetscans和Pictar对其靶基因进行预测，挑选出3个软件交集的靶基因，再与通过肿瘤转移相关基因芯片得到的两株细胞间差异表达的转移相关基因进行比对，筛选与非小细胞肺癌转移相关miRNAs。

（2）利用实时荧光定量PCR的方法检测miR-29b在非小细胞肺癌癌组织、配对癌旁组织和非小细胞肺癌细胞株中的表达情况，统计分析miR-29b表达与非小细胞肺癌临床病理特征的相关性。

**2**、**miR-29b**对非小细胞肺癌细胞生物学行为的影响

（1）利用表达miR-29b的慢病毒载体或对照慢病毒载体感染A549细胞，

96孔板有限稀释法挑选阳性单克隆，建立稳定过表达miR-29b的非小细胞肺癌细胞株和对照细胞株。采用反复Transwell分离高低转移能力的非小细胞肺癌细胞株A549-H和A549-L。利用阳离子脂质体法，将miR-29b mimic瞬时转染至内源性低表达miR-29b非小细胞肺癌细胞株A549-H中。利用CCK-8法、Transwell小室迁移实验及Boyden小室侵袭实验检测过表达miR-29b对非小细胞肺癌细胞

A549和A549-H生长、迁移及侵袭能力的影响；裸鼠皮下成瘤实验检测稳定过表达miR-29b的非小细胞肺癌细胞的裸鼠皮下成瘤能力。

（2）利用阳离子脂质体法，将miR-29b inhibitor瞬时转染至内源性高表达miR-29b非小细胞肺癌细胞株H460和A549-L中，利用CCK-8法、Transwell小室迁移实验及Boyden小室侵袭实验检测抑制miR-29b对非小细胞肺癌细胞H460

2

和A549-L生长、迁移及侵袭能力的影响。利用表达miR-29b inhibitor的慢病毒载体或对照慢病毒载体感染H460细胞，经流式细胞仪分选建立稳定抑制miR-29b表达的非小细胞肺癌细胞株和对照细胞株。裸鼠皮下成瘤实验检测稳定抑制miR-29b表达的非小细胞肺癌细胞的裸鼠皮下成瘤能力。

**3**、**miR-29b**靶基因的鉴定

（1）分别构建融合MMP2、PTEN基因野生型和突变型3’UTR的荧光素酶报告基因载体，应用荧光素酶报告检测系统对miR-29b与MMP2、PTEN相互作用进行验证。

（2）利用阳离子脂质体法，将miR-29b mimic或miR-29b inhibitor瞬时转染至非小细胞肺癌细胞株中，利用实时荧光定量PCR和Western blot检测过表达和抑制miR-29b对MMP2、PTEN mRNA和蛋白表达水平的影响，并对miR-29b和MMP2在非小细胞肺癌细胞中的表达进行相关性分析。

**4**、**miR-29b**上游转录因子的预测和鉴定

通过Ensembl数据库在线获取miR-29b基因上游启动子序列，利用四个常用数据库Proscan、Consit、TFSEARCH及TRED预测及分析可能与miR-29b启动子结合的转录因子。构建过表达转录因子的质粒载体和融合miR-29b启动子序列的荧光素酶表达载体，利用荧光素酶报告检测系统检测转录因子对miR-29b启动子转录活性的影响。利用阳离子脂质体法，将过表达转录因子的质粒转染至非小细胞肺癌细胞株中，利用实时荧光定量PCR和Western blot检测转录因子对miR-29b和MMP2表达水平的影响。

研究结果

**1**、非小细胞肺癌转移相关**miRNAs**的筛选及表达验证

（1）与CD133阴性细胞相比，CD133阳性A549细胞表达差异达两倍或以上的miRNAs有51个，差异倍数＞5的有10个miRNAs，分别是表达下调的has-miR-337-3p, has-miR-33a, has-miR-32, has-miR-374b, has-miR-29b, has-miR-559，has-miR-219-5p和表达上调的has-miR-1，has-miR-512-5p, has-miR-639. 通过三个常用数据库预测7个表达下调miRNA的靶基因，发现has-miR-29b的4个靶基因包含在CD133阳性和CD133阴性A549细胞之间差异表达的转移相关基因中，CD133阳性A549细胞中miR-29b表达下调了7.6倍，

3

靶基因PTEN、ETV4、COL4A2、MMP2等上调了1.11至4.2倍。于是，我们选定hsa-miR-29b作为研究对象，选择与转移密切相关的MMP2、PTEN进行靶基因的鉴定。

（2）实时荧光定量PCR检测结果显示，在20对配对非小细胞肺癌石蜡组织中，癌组织中miR-29b的表达显著低于癌旁肺组织(P=0.001, t=-3.817)；miR-29b在10例新鲜非小细胞肺癌组织的表达显著低于配对癌旁肺组织(P<0.001, t=-9.016)。以永生化的人支气管上皮细胞16HBE为对照，miR-29b 在

9 种非小细胞肺癌细胞株中的表达具有显著性差异(F=99.444, P<0.001)；与

16HBE细胞比较，miR-29b在PAa、PGCL3、H520、A549、H1299、95D等 6

种细胞株中的表达显著降低(P=0.002；P=0.001；P=0.001；P=0.000；P=0.000;

P=0.000）；在H460细胞中的表达显著高于其他8种非小细胞肺癌细胞株（P=0.000；

P=0.000; P=0.000; P=0.000; P=0.000; P=0.000; P=0.000; P=0.000). miR-29b

在30例非小细胞肺癌组织中的表达与患者年龄、性别、组织学分型以及肿瘤分化程度均无显著性相关(P=0.578; P=0.862; P=0.625; P=0.891)，与临床分期和有无淋巴结转移有显著性相关(P=0.004; P=0.031)，Pearson相关分析显示，miR-29b表达与有无淋巴结转移呈负相关(r=-0.547, P =0.043)。

**2**、**miR-29b**对非小细胞肺癌细胞生物学行为的影响

2.1 **miR-29b**过表达对非小细胞肺癌细胞体内外生物学行为的影响

（1）建立了稳定过表达miR-29b的非小细胞肺癌细胞株A549-miR-29b-Clone2和对照细胞株A549-NC. 实时荧光定量PCR检测结果表明，A549-miR-29b-Clone2 细胞株中miR-29b 的表达显著高于A549 细胞

（P<0.001），而A549-NC细胞株中miR-29b的表达与A549细胞相比没有显著性差异（P=0.945）。

（2）采用反复Transwell实验获得了高低转移能力的非小细胞肺癌细胞株A549-H和A549-L。在体外迁移和侵袭实验中，A549-H细胞穿过小室膜的细胞数目明显多于A549-L细胞(t=-32.220, P<0.001; t=-28.461, P<0.001). A549-H

细胞中miR-29b的表达显著低于A549-L细胞(P=0.001). 相对于Blank组与NC

组，A549-H细胞组在转染miR-29b mimic后miR-29b表达显著升高(P=0.044，P

=0.044)。

（3）采用CCK-8法检测miR-29b对细胞体外增殖能力的影响，结果发现，

4

与A549和A549-NC细胞组相比，稳定过表达miR-29b的A549-miR-29b-Clone2细胞组的增殖能力显著降低(F=124. 596, P<0.001). 同样，与Blank组与NC组相比，A549-H细胞组在转染miR-29b mimic后增殖能力显著降低（F=10.343，

P<0.001）。说明过表达miR-29b可以抑制非小细胞肺癌细胞的增殖。

（4）Transwell小室迁移实验检测细胞体外迁移运动能力的变化，结果发现与A549和A549-NC细胞组相比，A549-miR-29b-Clone2细胞组穿过膜的细胞数目显著减少(F=31.613, P<0.001)。同样，与Blank组与NC组相比，A549-H细胞在转染miR-29b mimic后迁移运动能力显著降低(F=103.302, P<0.001). Boyden小室侵袭实验分析细胞体外侵袭能力的变化，结果发现，与A549和A549-NC细胞组相比，A549-miR-29b-Clone2细胞穿过基质胶的细胞数目显著减少（F=347.905, P<0.001）。同样，与Blank组与NC组相比，A549-H细胞在转染miR-29b mimic后侵袭能力显著降低(F=145.361, P<0.001)。说明过表达miR-29b可以抑制非小细胞肺癌细胞的迁移和侵袭能力。

（5）裸鼠皮下成瘤实验结果表明，与A549 和A549-NC 细胞组相比，

A549-miR-29b-Clone2 细胞组裸鼠皮下瘤体重量显著减轻(Welch=24.125,

P<0.001)，肿瘤生长速度显著减慢（F=29.782, P<0.001），体积也显著缩小

（F=58.302, P<0.001）。说明miR-29b在体内可以抑制非小细胞肺癌细胞的增殖和成瘤能力。

2.2 **miR-29b inhibitor**对非小细胞肺癌细胞体内外生物学行为的影响

（1）与Blank组与NC组比较，瞬时转染miR-29b inhibitor后H460和A549-L

细胞内的miR-29b的表达量显著下降(F=10.176, P=0.012; F=7.321, P=0.025)。

（2）采用CCK-8法检测miR-29b抑制后H460和A549-L细胞体外增殖能力的改变，结果发现，与Blank组与NC组细胞比较，miR-29b抑制后的H460和A549-L细胞增殖速度显著加快(F=86.935, P<0.001; F=80.856, P<0.001). 说

明抑制miR-29b能促进非小细胞肺癌细胞的体外增殖。

（3）Transwell小室迁移实验检测miR-29b抑制后细胞体外迁移运动能力的变化，结果发现，与Blank组与NC组细胞比较，miR-29b抑制后的H460和A549-L细胞穿过膜的细胞数显著增加(F=44.107, P<0.001; F=463.750, P<0.001)。

Boyden小室侵袭实验分析miR-29b抑制后细胞体外侵袭能力的变化，结果发现，与Blank组与NC组细胞比较，miR-29b抑制后的H460和A549-L细胞穿过基质

5

胶的细胞数显著增加(F=30.898, P<0.001; F=9.413, P<0.001). 说明抑制miR-29b

能促进非小细胞肺癌细胞的体外迁移和侵袭能力。

（4）建立了稳定抑制miR-29b表达的非小细胞肺癌细胞株H460-miR-29b-

inhibitor和对照细胞株H460-NC。裸鼠皮下成瘤实验结果表明，与H460和H460-NC细胞组相比，H460-miR-29b-inhibitor细胞组裸鼠皮下瘤体重量显著增加(Welch=16.773, P=0.002)，肿瘤生长速度显著增快(F=41.778, P<0.001)，体积也显著增大（F=17.267, P<0.001）。说明miR-29b抑制后可以增强非小细胞肺癌细胞在体内的增殖和成瘤能力。

**3**、**miR-29b**靶基因的鉴定

##### （1）成功构建了融合MMP2 及PTEN 基因野生型和突变型3’UTR 的

psiCHECK-2-MMP2 3'UTR与psiCHECK-2-Mut- MMP2 3'UTR载体、psiCHECK

-2-PTEN 3'UTR与psiCHECK-2–Mut1-3- PTEN 3'UTR载体。

##### （2）在转染MMP2基因野生型3’UTR载体实验组中，miR-29b mimic组与

Blank组、NC组相比荧光素酶活性均显著降低(P=0.023, P=0.018)；在转染MMP2基因3’UTR突变载体的实验组中，miR-29b mimic组与blank组、NC组相比荧光素酶活性无显著差异(P=0.166, P=0.111)，说明miR-29b能与MMP2基因3’UTR直接结合，从而抑制了荧光素酶的活性。

##### （3）在转染PTEN基因野生型3’UTR载体的实验中，miR-29b mimic组与

Blank 组、NC 组相比，荧光素酶活性均显著降低(P=0.000, P=0.031)；在转染

psiCHECK-2- Mut-1-PTEN 3'UTR或psiCHECK-2- Mut-2-PTEN 3'UTR载体的实

验中，miR-29b mimic 组与Blank 组、NC 组相比，荧光素酶活性均显著降低

(P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000), 在转染psiCHECK-3- Mut-3-PTEN 3'UTR

载体的实验中，miR-29b mimic组与Blank组、NC组相比，荧光素酶活性没有显著改变(P=0.540, P=0.238)，说明miR-29b可以和野生型PTEN 3'UTR两个结合位点直接结合从而抑制荧光素酶活性。

##### （4）与A549-NC 细胞和A549 细胞相比，稳定过表达miR-29b 的

A549-miR-29b-Clone2细胞中MMP2 mRNA表达显著降低(F=19.372, P=0.002)，

MMP2 蛋白表达也明显下调(F=146.189, P<0.001)；A549-H 细胞转染miR-29b

mimic后，与NC组相比，细胞中miR-29b的表达显著升高(P<0.001)，MMP2

mRNA 表达显著降低(P =0.048), MMP2 蛋白表达也明显下调(P<0.001). H460

6

和A549-L细胞在miR-29b inhibitor转染后，与Blank组和NC组相比，细胞中

miR-29b的表达显著降低(F=10.176, P=0.012; F=7.321, P=0.025)，MMP2 mRNA

表达显著升高(F=48.327, P=0.001; F=59.997, P=0.001)，MMP2蛋白表达也明显上调(F=59.997, P=0.001; F=25.384, P=0.018). 说明miR-29b可负调控MMP2

的表达。

##### （5）与A549-NC 细胞和A549 细胞相比，稳定过表达miR-29b 的

A549-miR-29b-Clone2细胞中PTEN mRNA和蛋白表达无显著差异(F=4.835，P

=0.056; F=1.041，P=0.409)；A549-H细胞转染miR-29b mimic后，与Blank组和NC组相比，细胞中PTEN mRNA和蛋白表达也没有显著差异(F=0.320，*p*P

=0.738; F=3.599，P=0.173). H460和A549-L细胞在miR-29b inhibitor转染后，与Blank组和NC组相比，细胞中PTEN mRNA和蛋白表达均无有显著差异

(F=0.541, P=0.608; F=1.142, P=0.380; F=1.179, P=0.370; F=3.040, P=0.196)。

但过表达miR-29b可使A549和A549-H细胞中PTEN蛋白表达出现下调趋势，反之，抑制内源性miR-29b表达则可H460和A549-L细胞中PTEN蛋白表达出现上调趋势。

##### （6）实时荧光定量PCR检测结果显示miR-29b在H460细胞中的表达最高，在A549-L、A549、A549-H细胞中的表达依次降低，Western blot检测结果显示

MMP2蛋白在A549-H细胞中的表达最高，在A549、A549-L、H460细胞中的表达依次降低，Spearman相关性分析显示miR-29b与MMP2蛋白在以上四种非小细胞肺癌细胞株中存在显著的负相关关系(r=-0.902, P<0.001)。

**4**、**miR-29b**上游转录因子的预测和鉴定

（1）通过Ensembl数据库在线获取编码miR-29b前体mir-29b-1序列所在基因的上游2kb作为mir-29b-1启动子序列。

（2）利用四个常用数据库Proscan、Consit、TFSEARCH及TRED预测及分析可能与mir-29b启动子结合的转录因子，综合四个软件的预测结果，挑选分值较高，且四个软件均有交集的转录因子SRF作为miR-29b的转录因子。

（3）成功构建了过表达SRF的SRF-EGFP-N1载体和融合miR-29b启动子序列的miR-29b promoter-PGL3-Basic载体。荧光素酶报告检测系统结果显示：

HEK293A细胞转染miR-29b promoter -PGL3-Basic后，荧光素酶活性较对照组明显增强(P=0.014)，说明miR-29b 启动子序列具有转录活性。共转染miR-29b

7

promoter-PGL3-Basic和SRF-pEGFP-N1后，荧光素酶活性较单转染miR-29b promoter -PGL3-Basic组显著降低(P=0.024)，表明转录因子SRF能抑制miR-29b启动子的转录活性。

（4）利用实时荧光定量PCR和Western blot检测转染过表达SRF质粒后，

A549及H460细胞中miR-29b和MMP2的表达，结果显示，两种细胞中SRF

mRNA的表达显著升高(t=-4.326, P=0.012; t=-7.774, P=0.001)，证实转染成功。两种细胞中miR-29b的表达较对照组显著降低(t=13.492, P<0.001; t=3.790, P=0.019), MMP2 mRNA的表达较对照组显著升高(t=-3.440, P=0.026; t=-5.931, P=0.004 ), MMP2蛋白表达显著上调（t=-8.794, P=0.001; t=-10.502, P=0.001），

提示SRF能抑制miR-29b的表达，促进MMP2蛋白的表达。

结 论

1、利用miRNA PCR芯片和肿瘤转移相关基因芯片相结合，综合生物信息学分析，成功筛选出非小细胞肺癌转移相关的miRNA——miR-29b，miR-29b在非小细胞肺癌组织和细胞株中表达下调，且其表达与非小细胞肺癌淋巴结转移呈负相关。

2、过表达miR-29b能抑制非小细胞肺癌细胞体内外的增殖、迁移及侵袭能力，而降低miR-29b的表达能促进非小细胞肺癌细胞体内外的增殖、迁移及侵袭能力。提示miR-29b在非小细胞肺癌中扮演了抑癌基因的角色。

3、在非小细胞肺癌细胞中，MMP2是miR-29b的下游靶基因。

4、SRF是上游调控miR-29b表达的转录因子，SRF通过与miR-29b的启动子结合，抑制miR-29b的转录，进而增强了MMP2的表达，因此，SRF/miR-29b/MMP2通路极有可能是非小细胞肺癌转移的新机制。

关键词：非小细胞肺癌； miR-29b；肿瘤转移； MMP2； SRF

8

**The Role and Mechanism of MicroRNA-29b in Metastasis of Non-Small**

**Cell Lung Carcinoma**

**Name: Wang Hongyan Supervisor: Prof. Zhang Yajie**

Abstract

**Background and purpose**

In terms of morbidity and mortality, lung carcinoma is the fastest growing type of malignant tumor. It is broadly classified based on pathological patterns: non-small cell (NSCLC) and small cell (SCLC). The former comprises 80%–85% of total lung carcinoma cases. The main factors responsible for NSCLC treatment failure are tumor invasion and metastasis. Therefore, studying the molecular mechanism of NSCLC metastasis and looking for new biomarker and therapy targets are two main topic in cancer research.

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules about 18–24 nucleotides in length that control gene expression post-transcriptionally. MiRNAs operate through sequence-specific, and often only partially complementary, interactions with the 3'untranslated region (UTR) of their mRNA targets, causing suppression of translation and mRNA decay. MiRNAs are involved in many fundamental cellular processes as 2578 of them are estimated to control> 30% of all protein-coding genes in human. Altered expression levels of miRNAs have been described in many cancers and result in aberrant expression of proteins that influence nearly all malignant behaviors, including invasion and metastasis.

To screen the metastasis-related miRNAs of NSCLC, we isolated CD133- positive and CD133-negative subpopulation from human lung adnocarcinoma A549 cells by MACS. And then we screened the differentially expressed miRNA profiles and cancer metastasis related genes of these two cell lines by miRNA PCR arrays and tumor metastasis DNA microarray respectively. We predicted target gene of

9

Significantly different miRNAs by bioinformatics, and intersected the search results. Then further to find the intersection between predicted target gene expression and metastasis related gene expression. Among the seven downregulated miRNAs in CD133-positive A549 cells, the metastasis-related genes microarray contained the four target genes of hsa-miR-29b. MiR-29b was downregulated 7.6-fold in CD133-positive cells; however, its target genes PTEN, ETV4, COL4A2, and MMP2 were upregulated 1.11- to 4.20-fold. So we choose miR-29b as candidate NSCLC metastasis-related miRNAs, and selected MMP2 and PTEN as targets. Further, we identified the role of miR-29b and analyzed its possible molecular mechanism in NSCLC. All above may provide scientific foundation basis for NSCLC prevention and treatment based on miRNA.

**Methods**

**1. Screening and identifying the metastasis-related miRNAs of NSCLC**

(1) Microarray analysis was performed to obtain the miRNA expression Profiles between CD133 positive and CD133 negative A549 cell line. Three commonly databases including microRNA. org, TargetScan and Pictar were used to forecast the target genes with the search terms of miRNAs with> 5-fold change. We selected target genes with high predictive values (at least predicted by three databases), then compared with differentially expressed metastasis related genes between CD133- positive and CD133-negative cells, found the intersection and screened the metastasis- related miRNAs of NSCLC.

(2) Real-time PCR was used to detect the expression of miR-29b in paired NSCLC tissues and NSCLC cell lines. Pearson correlation and clinical pathological analysis were then carried out．

**2. Effect of miR-29b on Biological behavior of NSCLC**

(1) The mir-29b lentivirus vector was transfected into A549 cells to generate lentiviral stock. An" empty" vector was utilized as a negative control. Colonies with GFP expression were selected by limiting dilution assay of 96-well plate to expand culture. The repeated transwell assays were used to separate high-invasion and low-invasion NSCLC cell sublines. CCK-8 assay, Transwell and Boyden chamber were utilized to determine the ability of cell growth, cell migration and invasion in vitro. In vivo subcutaneous tumorigenesity in nude mice was used to evaluate the effect of overexpressed miR-29b on NSCLC cell lines.

(2) The miR-29b inhibitor was transfected transiently into NSCLC cell lines,

10

CCK-8 method, Transwell and Boyden chamber were utilized to determine the ability of cell growth, cell migration and invasion in vitro. The miR-29b inhibitor lentivirus vector was transfected into H460 cells to generate lentiviral stock. An" empty" vector was utilized as a negative control. In vivo subcutaneous tumorigenesity in nude mice was used to evaluate the effect of downexpressed miR-29b on NSCLC cell lines.

**3. Identification the target gene of miR-29b**

(1) The wild and mutate 3'UTR of MMP2, PTEN gene respectively was cloned into a psi-CHECK-2 vector. The Luciferase reporter system was utilized to identify the MMP2, PTEN as targets of miR-29b.

(2) The miR-29b mimic or miR-29b inhibitor was transfected transiently into NSCLC cell lines, Real-time PCR and Western blot were used to detect the expression of MMP2 or PTEN after transfection in NSCLC cell lines respectively．Spearman correlation was used to analyze their expressions．

**4. Predicting and confirming the transcription factor of miR-29b**

(1) The Ensembl databases was used to find the promoter sequence of miR-29b, and four commonly databases including Proscan, Consit, TFSEARCH and TRED were used to predict the transcription factor of miR-29b.

(2) The SRF CDS was cloned into a pEGFP-N1 vector and the sequence of miR-29b promoter was cloned into a PGL3-basic vector. Luciferase activity assay was emploied to confirm the relationship between miR-29b and SRF.

(3) The transcription factor was transfected transiently into NSCLC cell lines, Real-time PCR and Western blot were used to detect the expression of miR-29b and MMP2 after transfection respectively．

**Results**

**1. Screening and identification of the metastasis-related miRNAs of NSCLC**

(1) Fifty-one miRNAs were differentially expressed with≥2-fold change in CD133-positive cells compared with CD133-negative cells. 10 miRNAs (downregulated: hsa-miR-337-3p, hsa-miR-33a, hsa-miR-32, hsa-miR-374b, hsa-miR-29b, hsa-miR-559, hsa-miR-219-5p; upregulated: hsa-miR-1, hsa-miR-512-5p, hsa-miR-369) with differential ratios> 5 between CD133-positive and -negative cells were selected for target gene prediction using bioinformatics analysis. To relate miRNA downregulation to target gene expression, the overlap in the target genes predicted by the seven downregulated miRNAs and those on the

11

Metastasis-related gene microarray was identified. Of the seven miRNAs, the metastasis-related genes microarray contained the four target genes of hsa-miR-29b. MiR-29b was downregulated 7.6-fold in CD133-positive cells; however, its target genes PTEN, ETV4, COL4A2, and MMP2 were upregulated 1.11- to 4.20-fold. So we choose miR-29b as candidate NSCLC metastasis-related miRNAs, and selected MMP2 and PTEN as targets.

(2) In 20 cases of paired of Paraffin embedded NSCLC tissues, the expression of miR-29b in NSCLC tissues was significantly lower than in normal tissues (P =0.001, t=-3.817); In 10 cases of paired of fresh NSCLC tissues, the expression of miR-29b in NSCLC tissues was also significantly lower than in normal tissues(P <0.001, t=-9.016). Compared to 16HBE control cells, miR-29b expression had significant difference in 9 NSCLC cell lines (F=99.444, P <0.001). In PAa, PGCL3, H520, A549, H1299 and 95D cell lines, miR-29b expression was significantly lower than 16HBE cells (P=0.002; P=0.001; P=0.001; P=0.000; P=0.000; P=0.000). In H460 cell lines, miR-29b expression was significantly higher than other 8 NSCLC cell lines (P=0.000; P=0.000; P=0.000; P=0.000; P=0.000; P=0.000; P=0.000; P=0.000). Clinicopath- ological analysis showed that there was no significant relationship of miR-29b expression in 30 cases of NSCLC tissues with age, gender, histology and

Differentiation (P=0.578; P=0.862; P=0.625; P=0.891), while there was significant relationship of miR-29b expression with lymphatic metastasis and clinic stage (P=0.004; P=0.031). The expressions of miR-29b and lymphatic metastasis of NSCLC tissues had significant negative correlation by Pearson correlation analysis (r=-0.547, P =0.043).

**2. Effect of miR-29b on Biological behavior of NSCLC**

**2.1 Effect of miR-29b overexpression on Biological behavior in NSCLC cell lines**

(1) Established stable miR-29b overexpressed A549-miR-29b-Clone2 NSCLC cells and control A549-NC cells. Real-time PCR results showed that miR-29b expression in A549-miR-29b-Clone2 cells was higher than A549-NC cells(P<0.001), while there were no statistical differences between A549-NC cells and A549 cells(P

=0.945).

(2) Created high-invasion (A549-H) and low-invasion (A549-L) NSCLC cell sublines from A549 cell by using the repeated transwell assay. In vitro migration and invasion ability of A549-H cell sublines were greater than A549-L cell sublines

12

(T=-32.220, P<0.001; t=-28.461, P<0.001). miR-29b expression in A549-H cell sublines was lower than A549-L cell sublines (P=0.001).

(3) CCK-8 assay showed that compared with A549 cells and A549-NC cells group, the proliferation abilities of A549-miR-29b-Clone2 cells were significantly decreased (F=124. 596, P<0.001). Compared with blank and NC group, the proliferation abilities of A549-H cells after transfection of miR-29b mimic were significantly decreased (F=10.343, P<0.001). The results indicate that overexpression of miR-29b could suppress proliferation abilities of NSCLC cells.

(4) In vitro Transwell chamber assay results showed that compared to A549 cells and A549-NC cells group, the migration abilities of A549-miR-29b-Clone2 cells were significantly decreased (F=31.613, P<0.001). Compared to blank and NC group, the migration abilities of A549-H cells after transfection of miR-29b mimic were significantly decreased (F=103.302, P<0.001). These results show that overexpression of miR-29b could suppress migration abilities of NSCLC cells.

(5) In vitro Boyden chamber assay results showed that compared to A549 cells or A549-NC cells group, the invasion abilities of A549-miR-29b-Clone2 cells were significantly decreased (F=347.905, P<0.001). Compared to blank and NC group, the invasion abilities of A549-H cells after transfection of miR-29b mimic were significantly decreased (F=145.361, P<0.001). These dates indicate that overexpression of miR-29b could suppress invasion abilities of NSCLC cells.

(6) In vivo subcutaneous tumorigenesity in nude mice showed that compared to A549 cells or A549-NC cells group, tumor weight, growth rate and volume of A549-miR-29b-Clone2 cells were significantly decreased (Welch=24.125, P<0.001; F=29.782, P<0.001; F=58.302, P<0.001). These results illustrate that overexpression of miR-29b could suppress proliferation and tumorigenic abilities of NSCLC cells.

**2.2 Effect of miR-29b inhibitor on Biological behavior of the NSCLC cell lines**

(1) Compared to blank group and NC group, the expression of miR-29b was significantly decreased after transfecting miR-29b inhibitor into H460 and A549-L cells (F=10.176, P=0.012; F=7.321, P=0.025).

(2) CCK-8 assay showed that compared to blank group and NC group, the proliferation abilities of H460 and A549-L after transfection of miR-29b inhibitor were significantly increased (F=86.935, P<0.001; F=80.856, P<0.001). These results indicate that downregulation of miR-29b expression could raise proliferation abilities of NSCLC cells.

13

(3) In vitro Transwell chamber assay results showed that migration abilities of H460 and A549-L cells were markedly increased after transfection of miR-29b inhibitor (F=44.107, P<0.001; F=463.750, P<0.001). These results indicate that downregulation of miR-29b expression could increase migration abilities of NSCLC cells.

(4) In vitro, Boyden chamber assay results showed that invasive abilities of H460 and A549-L cells were markedly decreased after transfection of miR-29b inhibitor (F=30.898, P<0.001; F=9.413, P<0.001). These results indicate that downregulation of miR-29b expression could promote invasion abilities of NSCLC cells.

(5) Established stable miR-29b downexpressed H460-miR-29b-inhibitor NSCLC cells and control H460-NC cells. In vivo subcutaneous tumorigenesity in nude mice showed that compared to H460 cells or H460-NC cells group, tumor weight, growth rate and volume of H460-miR-29b-inhibitor cells were significantly increased (Welch=24.125, P<0.001; F=29.782, P<0.001; F=58.302, P<0.001). These

Results illustrate that downexpression of miR-29b could enhance proliferation and tumorigenic abilities of NSCLC cells.

**3. Identification the target gene of miR-29b**

(1) The recombinant vector psiCHECK-2-MMP2 3'UTR, psiCHECK-2-Mut- MMP2 3'UTR, psiCHECK-2-PTEN 3'UTR and psiCHECK-2–Mut1-3-PTEN 3'UTR were verified by sequencing.

(2) Luciferase reporter system showed that the luciferase activity was decreased significantly in miR-29b mimic group compared with blank group and NC group after transfection of wild-type psiCHECK-2-MMP2 3'UTR plasmid (P=0.023, P=0.018). There was no significant difference of luciferase activity in miR-29b mimic group, NC group and blank group after transfection of Mut-type psiCHECK-2-Mut-MMP2 3'UTR plasmid (P=0.166, P=0.111). Thses results prove that miR-29b inhibits the activity of luciferase through the binding sites of MMP2 3'UTR region.

(3) Luciferase reporter system showed that the luciferase activity were decreased significantly respectively in miR-29b mimic group compared with blank group or NC group after transfection of wild-type psiCHECK-2-PTEN 3'UTR plasmid (P=0.000, P=0.031) and Mut-type psiCHECK-2-Mut-1-2-PTEN 3'UTR plasmid(psiCHECK-2- Mut-1-PTEN 3'UTR: P=0.000, P=0.000; psiCHECK-2-Mut-2-PTEN 3'UTR: P=0.000, P=0.000). There was no significant difference of luciferase activity in miR-29b mimic group, NC group and blank group after transfection of Mut-type psiCHECK-2-Mut-3-

14

PTEN 3'UTR plasmid (P=0.540, P=0.238). These results demonstrate that miR-29b inhibits the activity of luciferase through the binding two sites of PTEN 3'UTR region.

(4) Real-time PCR and Western Blot results showed that compared to A549 cells and A549-NC cells, MMP2 mRNA and protein expression in A549-miR-29b-Clone2 cells were significantly decreased (F=19.372, P=0.002; F=146.189, P<0.001). After transfection of miR-29b mimic, miR-29b expression in A549-H cells was higher than NC group (*p*<0.001), while MMP2 mRNA and protein expression in A549-H cells were significantly down-regulated (P =0.048; P<0.001). After transfection of miR-29b inhibitor, miR-29b expression in H460 and A549-L cells was lower than blank group and NC group (F=10.176, P=0.012; F=7.321, P=0.025), while MMP2 mRNA and protein expression in H460 and A549-L cells were significantly up-regulated (H460: F=48.327, P=0.001; F=59.997, P=0.001; A549-L: F=59.997, P=0.001; F=25.384, P =0.018). These results indicate that MMP2 negatively regulated by miR-29b.

(5) The mRNA and protein levels of PTEN in A549-miR-29b-Clone2 cells have no significant difference compared with A549 cells or A549-NC cells (F=4.835, P=0.056; F=1.041, P=0.409). After transfection of miR-29b mimic, the mRNA and protein levels of PTEN in A549-H cells have no significant change compared to blank group and NC group (F=0.320, P=0.738; F=3.599, P=0.173). After transfection of miR-29b inhibitor, the mRNA and protein levels of PTEN in H460 and A549-L cells have no significant change compared with blank group and NC group (H460: F=0.541, P=0.608; F=1.142, P=0.380; A549-L: F=1.179, P=0.370; F=3.040, P=0.196). But PTEN protein expression in the A549 and A549-H cell line tended toward downregulation following miR-29b overexpression. By contrast, PTEN protein expression in the H460 and A549-L cell line tended toward upregulation following inhibition of miR-29b expression.

(6) Real-time PCR results showed that miR-29b expression in H460 cells was higher than in A549-L, A549 and A549-H cells. Western Blot results showed that MMP2 protein expression in A549-H cells was higher than A549, A549-L and H460 cells. The expressions of miR-29b and MMP2 had significant negative correlation in 4 NSCLC cell lines by Spearman correlation analysis(r=-0.902, P<0.001).

**4. Predicting and confirming the transcription factor of miR-29b**

(1) Obtaining the upstream 2KB sequence of mir-29b-1 gene as mir-29b-1

15

Promoter sequence through the Ensembl databases.

(2) Results of four common databases showed that SRF (predicted by four databases) had the high predictive values. So we considered transcription factor SRF as a putative upstream regulator of miR-29b.

(3) The recombinant vector SRF-pEGFP-N1 and miR-29b promoter-PGL3-basic were verified by sequencing. Luciferase activity assay results showed that the luciferase activity was increased significantly in transfecting miR-29b promoter-PGL3-basic group compared to the PGL3-basic group (P=0.014). But after co-transfection of miR-29b promoter-PGL3-basic plasmid and SRF-pEGFP-N1 plasmid, the luciferase activity was decreased significantly compared to the miR-29b promoter-PGL3-basic group(P=0.024).

(4) Real-time PCR and Western Blot results showed that miR-29b expression were decreased markedly in A549 and H460 cells after tranfected with SRF-pEGFP-N1 plasmid (A549: t=13.492, P<0.001; H460: t=3.790, P=0.019), while expression of MMP2 mRNA and protein were increased (A549: t=-3.440, P=0.026; H460: t=-5.931, P=0.004 ) (A549: t=-8.794, P=0.001; H460: t=-10.502, P=0.001 ).

**Conclusion**

zkq 20160323

1. We used miRNA PCR array and tumor metastasis related gene microarray

Combined with bioinformatics analysis method to screen the NSCLC metastasis-related miR-29b. We further identified that miR-29b expression were deseased in NSCLC tissues and cell lines, and had significant negative correlation with lymphatic metastasis of NSCLC tissues.

2. Overexpression of miR-29b could suppress migration and invasion abilities of NSCLC cells, while downregulation of miR-29b expression could promote migration abilities of NSCLC cells, which suggests that miR-29b should be a tumor suppressor miRNAs.

3. MMP2 is a direct target gene of miR-29b in NSCLC.

4. SRF inhibits the expression of miR-29b, and then promotes the expression of MMP2. SRF/miR-29b/MMP2 model may be a new regulating model in NSCLC invasion and metastasis.

**Keyword:** NSCLC; MiR-29b; Metastasis; MMP2; SRF

16

# 英汉缩略语名词对照

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **英文缩写** | **英文全称** | **中文全称** |
| Amp | ampicillin | 氨苄青霉素 |
| bp | Base pair | 碱基对 |
| BSA | Bovine serum albumin | 牛血清白蛋白 |
| DEPC | diethylpyrocarbonate | 焦碳酸二乙酯 |
| DNA | Deoxyribonucleic acid | 脱氧核糖核酸 |
| dNTP | Deoxyribonucleoside triphosphate | 脱氧核糖核苷三磷酸 |
| HRP | Horseradish Peroxidase | 辣根过氧化物酶 |
| GFP | Green fluorescent protein | 绿色荧光蛋白 |
| kb | Kilobase pari zkq 20160323一千个碱基对 | |
| MACS | Magnetic activated cell sorting | 免疫磁珠分选技术 |
| miRNA | microRNA | 微小 RNA |
| NSCLC | Non Small cell lung cancer | 非小细胞肺癌 |
| nt | nucleotide | 核苷酸 |
| OD | Optical density | 吸光度 |
| ORF | Open Reading Frame | 开放阅读框 |
| PAGE | Polyacrylamide gel electrophoresis | 聚丙烯酞氨凝胶电泳 |
| PBS | Phosphate Buffer Saline | 磷酸盐缓冲液 |
| PCR | Polymerase chain reaction | 聚合酶链式反应 |
| PMSF | Phenylmethyl sulfonylfluoride | 苯甲基磺酞氟化物 |

17

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| rpm | Revolutions per minute | 转数/分 |
| RNA | Ribonucleic acid | 核糖核酸 |
| RISC | RNA-induced transcriptional silencing | RNA 介导基因沉默复合体 |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate | 十二烷基硫酸钠 |
| TEMEM | Tetramethylenediamine | 四甲基乙二胺 |
| Tris | Tris-base | 三轻基氨基甲烷 |
| 3'-UTR | 3'-untranslated region | 3'非翻译区 |

zkq 20160323

18

前 言

### 一、 肺癌发病死亡的流行病学情况

肺癌是人类常见的恶性肿瘤，国际癌症研究中心公布的一份研究报告称，到

2020年，全球每年新增癌症患者将达到1500万，其中，肺癌位居首位，将达120万[2]。在我国，近20年来，不论城市还是农村，肺癌是发病率及死亡率上升幅度最大的恶性肿瘤，据统计，2010年中国每年新发肺癌病例约60万，每年死亡约49万[3]。肺癌的主要病理类型包括非小细胞肺癌和小细胞肺癌两大类，其中非小细胞肺癌占肺癌总数的80%～85%[4]。尽管科学家多年来在原癌基因、抑癌基因、相关信号转导通路研究方面做出了不懈的努力，对非小细胞肺癌的诊断和治疗水平有了较大提高，但是非小细胞肺癌患者的5年生存率仍然不容乐观，在发展中国家仍不足9%，在美国等西方发达国家仍未超过16%，且伴有远处转移的肺癌患者5年生存率仅为2%[5]。导致非小细胞肺癌临床治疗失败和患者死亡的主要原因之一是肿瘤的侵袭转移[6]。因此，深入研究非小细胞肺癌转移过程的分子机制，寻找新的生物标记物和治疗靶标z，kq是当2前01治60疗32研3究领域的重要课题。

### 二、 肿瘤的转移

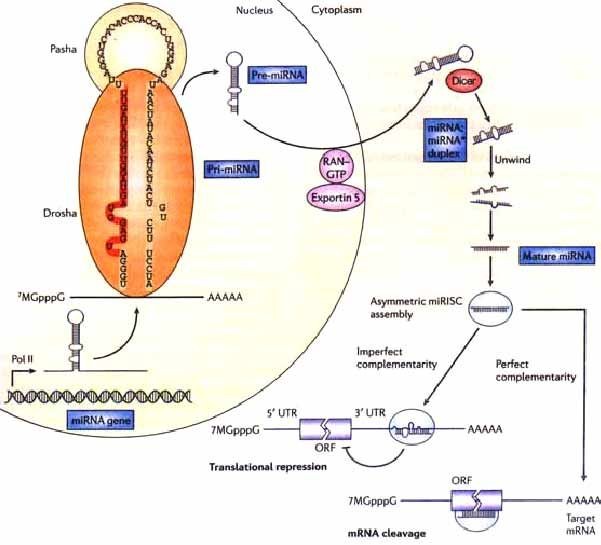
转移是恶性肿瘤致死最主要的原因，约90%的肿瘤患者最终死于转移[7, 8]。肿瘤转移是指癌细胞从原发病灶脱落并在机体远侧器官形成继发病灶的复杂过程。就血源性转移而言，癌细胞从原发病灶脱落开始到转移病灶形成，至少需要经过6个环节[9]：（1）癌细胞穿越肿瘤基底膜进入血液循环；（2）癌细胞随血液循环转运至全身并存活下来；（3）癌细胞穿出血管内皮屏障进入靶器官；（4）癌细胞在靶组织存活；（5）癌细胞增殖形成微转移；（6）癌细胞启动血管生成并进一步发展成为转移病灶。由此可见，肿瘤侵袭转移是一个多步骤、多阶段、连续复杂的生物学过程，涉及多因素、多水平的调节。近年来，一种新的调节基因的微

RNA(microRNA, miRNA)使经典的分子生物学理论发生了重大变革，为人们认识非小细胞肺癌转移调控机制提供了新的理念。

### 三、 **MicroRNA**简介

microRNAs (miRNAs)是一类长约22个核苷酸的非编码的单链RNA分子，它们广泛存在于植物、线虫和人类的细胞中，其基因通常以单拷贝、多拷贝或基

19



zkq 20160323

因簇等形式存在于基因组中[10-12]. miRNAs基因通常由RNA聚合酶II(Pol II)转录，最初产物为大的具有帽子结构(7MGpppG)和多聚腺苷酸尾巴(AAAAA)的pri-miRNA. pri-miRNA在RNase III Drosha和其辅助因子Pasha的作用下被处理成近70个核苷酸组成的pre-miRNA前体产物，RAN–GTP和exportin 5将这种前体分子输送到细胞质中。由RNase III Dicer将其剪切产生约为22个核苷酸长度的miRNA: miRNA\*双链，双链解开后miRNA\*迅速被降解，miRNA被引导进入miRISC复合体中。与RISC结合的miRNA，通过特异的碱基配对方式结合到靶基因mRNA的3'UTR，指导miRISC复合体对靶基因mRNA进行降解或者翻译抑制，实现对靶基因表达水平的转录后调控[11-14]（图1）。

图1 miRNAs的生物合成

Figure 1 The processes of miRNA biogenesis.

研究发现，大多数动物RISC中的单链miRNA与靶mRNA的3’UTR不完全配对，从而抑制该基因的翻译过程。最近，也有报道发现，miRNA也可以作用于靶mRNA的开放阅读框或5’UTR而促进该基因的翻译[15-18]。目前人类基因组中已确认的miRNA有2578个(Sanger Institution于2013年6月发布的数据库资料, 20.0版本, 参见[http: //www. mirbase. org/](http://www.mirbase.org/) index. shtml)，可能参与人类30%的蛋白表达调控，影响着几乎所有的信号通路，与生长发育以及许多疾病的发生发展息息相关[19] 。一个miRNA可以作用多个靶基因，多个miRNAs也可以调

20

节同一个基因[20]。这种复杂的调节网络既可以通过一个miRNA来调控多个基因的表达，也可以通过几个miRNAs的组合来精细调控某个基因的表达。

### 四、 **MicroRNA**与肿瘤

研究发现超过一半的miRNA基因位于肿瘤相关的脆性位点、杂合型丢失区(minimal regions of loss of heterozygosity)、微小扩增区(minimal regions of amplication, minimal amplicons)或断裂点区(common breakpoint region)[21]，表明

miRNA在肿瘤发生过程中起着至关重要的作用。越来越多的研究表明，miRNA的表达水平在许多肿瘤中发生改变，并参与调节很多重要的肿瘤相关基因，如Ras[22]，p53[23]，c-Myc[24]，Bcl-2[25]等，影响肿瘤细胞增殖、凋亡和分化等生物学活动，从而引起广泛的恶变。异常表达的miRNA通过靶向抑癌基因或癌基因发挥着类似癌基因或抑癌基因的作用[26]。因不同肿瘤类型及其阶段不同，miRNA表达谱呈现不同的特征，其在肿瘤诊断及治疗方面具有潜在应用价值。研究证明不同类型肿瘤的miRNAs表达相对于正常组织具有其鲜明特征，在患者血清中存在差异表达的miRNAs的稳定分布，且分布特征与肿瘤组织miRNAs表达具有高

度一致性，miRNA的异常表达已被认为是一种非常重要的癌变信号[27, 28]。在肿

瘤分型中，miRNA

zkq 20160323

[29]

的表达谱比蛋白编码基因表达谱更加准确

，因此，miRNA

更有可能成为肿瘤早期诊断的新型肿瘤标志分子、判断预后的新指标和治疗的新靶点[30]，明确肿瘤相关基因的miRNA调控机制，对于肿瘤的防治具有重要意义。**五、MicroRNA与肿瘤转移**

癌症最致命的特点是其具有侵袭和转移的能力。许多研究表明，miRNAs几乎参与癌变进程的任一阶段，包括肿瘤的侵袭和转移。一些肿瘤细胞过表达的

miRNA如miR-103 /107家族可以通过靶向Dicer减少miRNA的生物合成、诱导上皮间质转换(EMT)、从而促进肿瘤的侵袭和转移[31, 32]。还有一些miRNA如miR-101在肿瘤组织中明显下调，通过抑制组蛋白甲基转移酶、下调促转移基因，抑制肿瘤的侵袭和转移[33, 34]。miR-21 是目前发现的较常见的转移相关

miRNA，具有原癌基因活性的miR-21位于染色体的脆性区域17q23.2，它在多种肿瘤如胶质瘤、乳腺癌、肝癌、结直肠癌中过表达，并与乳腺癌等肿瘤的恶性分级呈正相关。研究发现在胶质瘤细胞中，miR-21靶向调控RECK的表达，RECK是金属蛋白酶(MMPs)的膜锚定抑制剂，它的低表达或失活是影响许多肿瘤细胞的侵袭和转移能力的重要因素，miR-21通过抑制RECK上调MMP-2、MMP-9

21

等MMPs活性，调节肿瘤侵袭和血管新生能力[35]。miR-21还通过负调控抑癌基因PTEN的表达，促进肝癌细胞的增殖和侵袭能力[36]；通过抑制PCD4 (programmed cell death 4) mRNA的翻译，抑制结直肠癌细胞的侵袭和血管浸润

[37]. miR-200家族作为肿瘤细胞侵袭转移抑制因子已经逐渐被接受。研究证实miR-200家族可通过直接靶向抑制转录因子ZEB1/ZEB2的表达，进而增加E-cadherin的表达，阻止EMT的发生[38]。有趣的是，ZEB1和ZEB2还能够通过与miR-200家族通用启动子的E-box或Z-box结合直接抑制miR-200家族的转录[39, 40]。这样，在miR-200家族和ZEB 1 /ZEB2之间就形成了负反馈调节环路来保持EMT和MET之间的平衡。此外，miR-200a可下调β-连环蛋自(CTNNBI)的表达，进而抑制Wnt/β-catenin信号通路，抑制鼻咽癌细胞的增值、迁移和侵袭[41]。miR-200b可通过靶向抑制血管内皮生长因子(VEGF)、血管内皮生长因子受体(Flt-1和KDP)的表达，负性调控肿瘤血管的生成，影响肿瘤的侵袭和转移[42]。miR-200c可通过下调膜突蛋自(MSN)的表达进而抑制乳腺癌和子宫内膜癌细胞的迁移[43]。

### 六、 非小细胞肺癌转移相关的**MicroRNA**

近年来，一些与非小细胞肺癌转移密切相关的miRNAs相继被证实，且其功能研究亦取得一定进展。let-7是较早发现的与肺癌细胞侵袭转移相关的miRNA家族，let-7低表达可上调Ras蛋白表达水平，Ras蛋白是一个膜相关的GTPase信号蛋白，调节细胞生长、分化。let-7还可以调控HMGA2基因的表达，HMGA2蛋白是一种高迁移率组A蛋白，在90%以上的肺癌中都有表达，而且与肺癌患者的存活率呈负相关，let-7通过HMGA2这一靶基因而调控肺癌细胞的迁移能力[44]。Garofalo等[45]发现，在侵袭性非小细胞肺癌细胞中，过表达的miR-221和miR-222通过靶向作用于肿瘤抑制因子PTEN和TIMP3可诱导TRAIL耐药，并通过激活AKT 通路和金属肽酶来促进细胞转移。他们进一步发现，癌基因

MET通过转录因子c-Jun参与miR-221和miR-222的活化。Gibbons等[46]发现，miR-200的过表达可消除转移性肺腺癌细胞的上皮间质转化、侵袭和转移的能力。Wang等[47]研究发现，在肺癌细胞上过度表达的miR-183通过抑制细胞粘附分子埃兹蛋白(ezrin)的表达而改变细胞粘附力与侵袭力，抑制肺癌细胞的转移及侵袭。Ma等[31]研究发现miR-10b在转移性MDA-MB-231乳腺癌细胞中高表达并促进肿瘤迁移侵袭，其机制为miR-l0b受到转录因子Twist诱导上调后能抑制

22

编码同源框Homeobox D10的mRNA的翻译从而导致促转移基因RhoC的表达上调。进一步研究发现，在荷瘤鼠中采用miRNA抑制剂沉默miR-10b可显著提高Hoxd10的水平，并明显抑制肺转移的形成，而正常动物可耐受miR-10b 的

miRNA抑制剂，miR-10b有可能成为新型抗转移药物开发的靶标。因此，研究

miRNA在恶性肿瘤转移中的变化及其规律，鉴定出miRNA所调节的靶基因、明确miRNA在疾病进程中的生物学功能，对基于miRNA分子靶向药物的研发、应用具有重要意义。

### 七、 本研究的目的与意义

为筛选与非小细胞肺癌转移相关的因子，本课题组在前期研究中，以CD133

为标记物，利用免疫磁珠分选方法对人肺腺癌细胞株A549 中进行分选，通过

MS阳性分选柱和LD阴性分选柱分选得到CD133阳性A549细胞株和CD133阴性A549细胞株。检测它们的生物学行为发现，与CD133阴性细胞相比，CD133阳性A549细胞在无血清培养基中悬浮生长并形成“sphere”，能被血清诱导分化，且CD133阳性A549细胞平均克隆形成率显著高于CD133阴性细胞。说明CD133阳性细胞具有自我更新、诱导分化、高增殖潜能等肿瘤干细胞样特性。然后，我们在133例人非小细胞肺癌组织中利用免疫组织化学检测了CD133的表达，并分析了其与患者临床病理特征的相关性。发现非小细胞肺癌组织中CD133的阳性表达率显著高于正常肺组织，而且CD133的表达与非小细胞肺癌淋巴结转移呈正相关。因此，我们选择CD133阳性与CD133阴性A549细胞为细胞模型来筛选与非小细胞肺癌转移相关的miRNAs，利用miRNA PCR芯片（MAH-3100A，共检测与人类疾病相关的376个miRNA）和SuperArray第二代功能分类的肿瘤转移相关基因芯片（PAHS-028A，共检测与肿瘤转移相关的84个基因）对分选后未经培养的CD133阳性A549细胞和CD133阴性A549细胞进行检测，筛选出了差异表达的miRNAs和与差异表达的转移相关基因。随后，利用生物信息学预测显著差异的miRNAs的靶基因，并对检索结果进行交集，再将预测得到的靶基因与肿瘤转移相关基因芯片上的基因进行比对，进一步寻找交集。结果发现，在CD133阳性A549细胞表达明显下调的7个miRNA中，has-miR-29b的4个靶基因包含在肿瘤转移相关基因芯片中，CD133阳性A549细胞中miR-29b表达下调了7.6倍，而其靶基因PTEN、ETV4、COL4A2、MMP2等上调了1.11 至

4.2倍。由此，我们筛选出miR-29b作为非小细胞肺癌转移相关的候选miRNA。

23

鉴于PTEN、MMP2在肿瘤转移中的重要作用，我们对miR-29b是否调控PTEN

和MMP2进行后续实验研究。

因此，本课题拟在前期研究的基础上，以筛选出的miR-29b为切入点，对

miR-29b在非小细胞肺癌转移中的作用及其分子机制进行研究。研究内容如下：

1、非小细胞肺癌转移相关miRNAs的筛选及表达验证利用miRNA PCR芯片和肿瘤转移相关基因芯片两种高通量方法，并结合生物信息学分析筛选出非小细胞肺癌转移相关的候选miRNA——miR-29b；利用实时荧光定量PCR的方法检测miR-29b在非小细胞肺癌组织、配对癌旁组织和非小细胞肺癌细胞株中的表达情况。

2、miR-29b对非小细胞肺癌细胞体内外生物学行为的影响建立高低转移能力的非小细胞肺癌细胞株A549-H和A549-L；通过向A549-H中转染miR-29b

mimics和建立稳定过表达miR-29b的非小细胞肺癌细胞株，在细胞水平和动物模型水平比较miR-29b导入前后对非小细胞肺癌细胞生长、迁移和侵袭的影响；通过向H460和A549-L细胞中转染miR-29b inhibitor和建立稳定抑制miR-29b表达的非小细胞肺癌细胞株，比较抑制miR-29b前后对非小细胞肺癌细胞在体内外生长、迁移和侵袭的影响。

3、miR-29b 靶基因的鉴定应用双荧光素酶报告基因系统对miR-29b 与

MMP2、PTEN相互作用进行验证，通过实时荧光定量PCR和Western blot检测miR-29b对MMP2、PTEN mRNA和蛋白表达水平的影响，并对它们在非小细胞肺癌细胞中的表达进行相关性分析，确定miR-29b的靶基因。

4、miR-29b上游转录因子的预测和鉴定利用计算机软件预测及分析可能与miR-29b启动子结合的转录因子，利用荧光素酶报告检测系统确定两者之间的调节关系，利用实时荧光定量PCR和Western blot检测转录因子对miR-29b 和

MMP2表达水平的影响，揭示miR-29b在肿瘤中表达的调控机制。

24

# 第一部分 非小细胞肺癌转移相关**miRNAs**的筛选及表达验证

我们的前期研究发现与CD133阴性细胞相比，CD133阳性A549细胞具有肿瘤干细胞样特性；在人体非小细胞肺癌组织中CD133的表达与非小细胞肺癌淋巴结转移呈正相关。因此，CD133阳性A549细胞与CD133阴性A549细胞具有不同的转移潜能。为维持CD133阳性细胞的未分化状态，我们对MACS分选后的CD133阳性和CD133阴性A549细胞未经培养直接用于实验，利用miRNA

PCR芯片和转移相关基因芯片筛选出差异表达的miRNAs和与差异表达的转移相关基因。以差异倍数＞5 的miRNAs 为检索词，利用三个常用数据库

MicroRNA. org、Targetscans和Pictar对其靶基因进行预测，挑选出软件交集后，再与两株细胞间差异表达的转移相关基因进行比对，进一步寻找交集，筛选与非小细胞肺癌转移相关的miRNA。利用实时荧光定量PCR在非小细胞肺癌组织和细胞中验证其表达，并分析其与患者临床病理特征的相关性，初步评估miR-29b在非小细胞肺癌转移中的应用价值。

## 第一节 非小细胞肺癌转移相关**miRNAs**的筛选

### 一、 材料

#### 1. 细胞

人肺腺癌细胞株A549引自广州医科大学中心实验室。

2.主要试剂

试剂名称品牌或生产厂家

RPMI 1640培养基Gibco公司

新生牛血清（NBS）Gibco公司

胰蛋白酶Gibco公司

青/链霉素Gibco公司

TRIzol Invitrogen公司

25

磁珠分选试剂盒德国Miltenyi公司

RT2 miRNA First Strand Kit美国SABiosciences公司

#### 2 X SuperArray PCR master mix美国SABiosciences公司

Human Genome RT²miRNA PCR Array(PAHS-3100A) 美国SABiosciences公司

RT Profiler PCR Array Human Tumor Metastasis(PAHS-028A)

3.主要仪器

美国SABiosciences公司

仪器名称品牌或生产厂家

二氧化碳培养箱美国Thermo公司

倒置普通显微镜Nikon公司

超净工作台苏州安泰公司

CASY全自动细胞分析仪Roche公司

恒温干燥箱上海精宏实验设备有限

公司

液氮罐Thermo公司

高压灭菌器TOMY公司

磁性分选架德国Miltenyi公司

台式高速离心机Eppendorf公司

低温高速离心机Thermo公司

微量紫外分光光度计NanoDrop®ND-2000

多功能凝胶成像仪系统BioRad公司

荧光定量PCR仪ABI 7500

4. miRNA靶基因相关预测信息库MiRanda: http: / /[www. microrna. org](http://www.microrna.org/) TargetScan: http: / /[www. targetscan. org](http://www.targetscan.org/) Pictar: http: / /[www. pictar. org](http://www.pictar.org/)

RNAhybr[id: http: //bibiserv. techfak. uni-bielefeld. de/rnahybrid](http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid)

5. miRNA基本信息数据库

MiRBase数据库: http: / /[www. mirbase. org](http://www.mirbase.org/)

26

### 二、 方法

#### 1. 细胞培养

A549细胞按常规方法在含10%胎牛血清的RPMI 1640完全培养基中培养，细胞置5%CO2，37℃饱和温度培养箱中传代培养，倒置显微镜下观察生长情况，取对数生长期的细胞进行实验。

#### 2. **MACS**法分选**CD133**阳性和**CD133**阴性**A549**细胞

2.1 CD133阳性细胞分选

(1)细胞在75cm2培养瓶中生长达对数生长期时，胰酶消化，制成单细胞悬液，计数，取≦107个细胞进行实验；

(2) 1000rpm离心，10min. 弃上清，2-3ml buffer重悬细胞，1000rpm离心10min；

(3)弃上清，300µL buffer重悬细胞；

(4)向细胞悬液中依次加入100µL l FcR blocking Reagent、100µL CD133 Micro

Beads，至4℃冰箱育30min；

(5)加入上述总体积10-20倍的buffer洗涤；

(6) 1000rpm离心10min，弃上清；

(7) 500µL buffer重悬细胞；

(8)取阳性分选柱（MS分选柱）安装于分选架上；

(9) 500µL buffer润柱，废液缸接液；

(10)在分选柱下放置一无菌离心管，收集细胞；

(11)将细胞悬液加入MS分选柱中；

(12)液滴静止后取500µL buffer冲洗×2次，收集流出液（含CD133阴性细胞）；

(13) 1000rpm离心10min，弃上清；

(14) 1000µL buffer重悬细胞。

(15)在MS分选柱下放置另一无菌离心管，收集细胞。

(16)迅速加入500µL buffer，装上柱芯，快速推柱芯，收集流出液为CD133阳性细胞。

2.2 CD133阴性细胞分选

(1)在分选架上安装阴性分选柱（LD分选柱）；

(2) 2000µL buffer润柱，废液缸接液；

27

（3）在LD分选柱下放置一无菌离心管，收集细胞；

（4）将MS柱分选过程收集的流出液加入LD分选柱中；

（5）液滴静止后取500µL buffer冲洗×2次，收集流出液为CD133阴性细胞；

（6）1000rpm离心10min，收集细胞。

#### **3.** 抽提**CD133**阳性**/**阴性**A549**细胞的**Total RNA**

用Trizol法提取细胞总RNA，按照Invitrogen Trizol Reagent试剂说明书进行。

3.1匀浆MS柱分选获得CD133阳性细胞及LD柱分选获得CD133阴性细胞，不经培养，直接离心沉淀细胞，每5～10×106细胞加入1 ml TRIzol试剂。室温放置

5min，不时晃动，然后将裂解液移至1.5ml EP管中；

3.2两相分离每1ml的TRIzol试剂匀浆的样品中加入0.2ml的氯仿，盖紧管盖。涡旋剧烈振荡管体15秒后，室温育5min。4℃下12,000g离心15 min。离心后混合液体将分为下层的红色酚氯仿相，中间层核上层的无色的水相，RNA全部被分配于水相中；

3.3 RNA沉淀将水相转移到新离心管中，加入0.5ml的异丙醇。混匀后室温育15

min后，于4℃12,000 g离心10 min；

3.4 RNA清洗弃上清液，加入1ml的75%乙醇，清洗RNA沉淀。上下颠倒振荡后，

4℃7,500g离心5 min；

3.5重新溶解RNA沉淀去除乙醇溶液，空气中干燥RNA沉淀5-10min，溶解RNA时，先加入无RNA酶的水用枪反复吹打几次，然后55到60℃孵育10min。获得的

RNA溶液保存于-70℃。

#### 4. **RNA**质量检测

4.1 RNA浓度和纯度检测使用NanoDrop 2000测RNA浓度和纯度，RNA溶液的

A260/A280的比值范围在1.8到2.1用于后述实验。

4.2 RNA完整性检测取5µl RNA，加1µl的6×buffer，1%琼脂糖凝胶电泳100V电压10-15min，凝胶成像系统紫外透射光下观察RNA的5S核糖体RNA、28S和18S核糖体RNA的条带。28S核糖体RNA条带的密度大约是18S核糖体RNA条带的2倍，三条条带完整的样本用于后述实验。

#### 5. **cDNA**合成

按照RT2 miRNA First Strand Kit (SABio)试剂盒说明书进行。

28

5.1配制反应体系：

Component Volume

Total RNA 1.5µg

MiRNA RT Primer & ERC Mix (M1) 1.0µl 5X miRNA RT Buffer 2 (M5) 2.0µl

MiRNA RT Enzyme Mix (M3) 1.0µl

Nucleotide Mix (M4) 1.0µl

RNase-free H2O补至10.0µl

5.2

轻弹管底或移液枪轻轻吹打混匀后短暂离心。

5.3 50°C温育120min。

5.4 95°C温育5 min使酶失活，同时降解去除RNA。

5.5放置冰浴至少1 min，而后在10µl cDNA中加90µl灭菌水混匀，置冰浴待用或-20°C保存。

#### **6.** **PCR**

按照2X SuperArray PCR master mix (SABio, Cat. No. PA-112)试剂盒说明书进行。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 6.1 样品准备: |  | |
|  | Component | Volume |
|  | 2X SuperArray PCR master mix  已稀释的 cDNA | 2000µl  102µl |
|  | ddH2O  总体积 | 1898µl  4000µl |
| 6.2 加样 |  |  |

(1)小心打开PCR Array上的膜。

(2)加10ul混合液到PCR Array对应的每个孔中。

(3)小心盖上盖子密封PCR Array。

(4)在设置PCR程序前将准备好的PCR Array放在冰上。

(5)实时定量PCR程序设置完后，将PCR Array置于实时定量PCR仪进行PCR

反应。

所设置的程序如下：

29

步骤设置

聚合酶激活/变性 95℃，10 分钟

扩增 40 个循环 95℃，15 秒

60℃，1分钟收集荧光

#### 7. 数据分析

溶解曲线分析

采用ΔΔCt方法。计算每个处理组中的每个耐药基因的ΔCt. ΔCt (group 1) = average Ct– average of HK genes' Ct for group 1 array，ΔCt (group 2) = average Ct– average of HK genes' Ct for group 2 array. 计算2个PCR Array（或两组）中每个耐药基因的ΔΔCt. ΔΔCt =ΔCt (组2) -ΔCt (组1)（组1是CD133阴性细胞组，组2是CD133阳性细胞组）。通过2-ΔΔCt计算组2与组1对应基因的表达差异。筛选出2-ΔΔCt≥2.0或≤0.5的基因作为差异表达miRNAs。

#### 8. 生物信息学分析

以课题中miRNA 芯片检测结果中有差异表达miRNA 为检索词，应用

[www. targetscan. org](http://www.targetscan.org/)，[www. pictar. org](http://www.pictar.org/)，[www. microrna. org](http://www.microrna.org/)三个数据库进行其靶基因的预测，将3个数据库的预测结果取交集，即预测得到可信度和准确性较高的靶基因。再将预测得到的靶基因与差异表达的转移相关基因进行比对，挑选出与本课题转移相关基因芯片检测出的差异表达基因一致的基因。

### 三、 结果

#### 1. miRNA芯片结果

为了探寻与非小细胞肺癌转移相关的miRNAs，我们利用SABiosciences公司的miRNA PCR芯片（MAH-3100A，共检测与人类疾病相关的376个miRNA）检测了分选后未经培养的CD133阳性和CD133阴性细胞的miRNAs表达，结果发现：从扩增曲线可见所有样品均已进入平台期，说明反应条件设定准确（图

1-1）。与CD133阴性肺腺癌细胞相比，CD133阳性细胞在376个检测的miRNAs中表达差异达两倍或以上的有51个，占38.3%（51/133）。其中14个miRNAs在CD133阳性细胞中表达均增高，37个miRNAs在CD133阳性细胞中表达均降低（图1-2A）。差异倍数＞5的有10个miRNA，分别是表达下调的has-miR-337-3p，

30

has-miR-33a, has-miR-32, has-miR-374b, has-miR-29b, has-miR-559，has-miR-219-5p；表达上调的has-miR-1, has-miR-512-5p，has-miR-639。为了了解这些差异miRNAs通过哪些肿瘤转移相关基因来参与CD133阳性肺腺癌细胞的转移，我们结合前期利用SABiosciences公司的第二代功能分类的肿瘤转移相关基因芯片（PAHS-028A，共检测与肿瘤转移相关的84个基因）对CD133阳性和CD133阴性细胞筛选出的转移相关的差异基因。与CD133阴性细胞相比，

CD133阳性细胞在84个检测的转移相关基因中表达差异达两倍或以上的有19个，占22%（19/84），全部为表达量升高的基因，其中CD82基因的表达差异最为显著，上调了12倍（图1-2B）。

CD133阴性细胞(PAHS-3100) CD133阳性细胞(PAHS-3100)





图1-1 实时荧光定量PCR扩增曲线

Fig. 1 Amplification curves of CD133 positive and CD133 negative cells

31



图1-2 CD133阳性和CD133阴性A549细胞中差异表达的miRNAs与肿瘤转移相关基因（A：miRNA芯片筛选CD133阳性和CD133阴性A549细胞中差异表达的miRNAs；B：功能基因芯片筛选CD133阳性和CD133阴性A549细胞中差异表达的肿瘤转移相关基因）

Fig. 1-2 Changes in relative expression for miRNAs and tumor metastasis genes between CD133+ and CD133\_ cell. (A: MiRNAs differentially expressed in

32

CD133+ cells versus CD133\_ comparison. Hierarchical clustering analysis of the 51 miRNA genes with a> two-fold increase or decrease significantly different expression in CD133+ A549 cells. B: Screening differentially expressed metastasis associated genes in CD133+ cells and CD133\_ of lung carcinoma cells using cDNA Microarry. )

#### 2. 差异表达miRNAs靶基因的生物信息学预测

由于miRNA对靶基因的表达进行负调控，因此，我们将表达下调的7个miRNA（has-miR-337-3p, has-miR-33a, has-miR-32, has-miR-374b, has-miR-29b, has-miR-559, has-miR-219-5p）作为检索词，应用[www. targetscan. org](http://www.targetscan.org/) ，

[www. pictar. org](http://www.pictar.org/)，[www. microrna. org](http://www.microrna.org/)预测其靶基因，并对检索结果进行交集，再预测得到的靶基因与肿瘤转移相关基因芯片上的基因进行比对，进一步寻找交集。这些差异表达的miRNAs的靶基因不仅是三个数据库共同预测的交集，而且也是转移相关差异基因。因此，我们将他们纳入初步研究对象。结果发现，经

Microrna. org、TargetScan、Pictar三个数据库预测has-miR-29b的靶基因交集有

132个基因，其中4个靶基因包含在肿瘤转移相关基因芯片中，而且其表达不同程度的上调（图1-3）。在7个表达下调miRNA中，只有has-miR-29b的4个靶基因包含在肿瘤转移相关基因芯片中，而其他6个miRNAs的靶基因与肿瘤转移相关基因芯片上的基因均没有交集。CD133阳性细胞miR-29b表达下调了7.6倍，而其靶基因PTEN、ETV4、COL4A2、MMP2等上调了1.11至4.2倍。经PUBMED文献检索，hsa-miR-29b在非小细胞肺癌转移中研究不多，因此我们将他纳入研究对象。

33



图1-3 Microrna. org、TargetScan、Pictar三个数据库预测has-miR-29b的靶基因的交集

Fig. 1-3 The intersection of target genes predicted by microRNA. org、TargetScan and Pictar

#### 3. hsa-miR-29b的基本信息及与其靶基因3’UTR区的结合预测

MiRBase数据库显示，has-mir-29b序列是研究者在对HeLa细胞中核糖核蛋白复合物进行RNA鉴定时克隆到的，当时命名为miR-102, 后发现与鼠miR-29b同源，改名为miR-29b. 全长共23nt，即5’-UAGCACCAUUU GAAAUCAGUGUU-3'，位于染色体7q32.3 和1q32.2 负链。microRNA. org、

targetscan 和pictar 数据库均预测到在功能分类基因芯片上差异表达的基因

MMP2、PTEN是miR-29b的靶基因。Targetscan数据库显示：miR-29b与MMP2的3’UTR区有一个结合位点，与PTEN的3’UTR区有两个结合位点，均以不完全互补的方式结合。Has-miR-29b 5'端的第2～8位碱基序列，即“种子序列”与MMP2 3'UTR区299～305bp、PTEN 3'UTR区676～683bp和1741～1747bp 均

以完全互补的方式结合（图1-4A,1-5A）。通过对预测靶基因MMP2、PTEN mRNA

3'UTR序列对比分析，发现它们与miR-29b的结合位点具有高度的进化保守性

（图1-4B,1-5B），RNAhybrid 数据库计算出其二聚体结构的自由能分别为

-20.4kcal/mol、-23.0kcal/mol和-20.9kcal/mol，可作为继续研究的候选靶基因（图

1-4C,1-5C）。我们推测miR-29b对MMP2、PTEN蛋白的表达起抑制作用。

34



图1-4 生物信息学预测miR-29b与MMP2 3’UTR区的结合情况（A、Targetscan预测miR-29b与MMP2 3’UTR区的结合位点；B、miR-29b与MMP2 3’UTR区的结合位点高度保守；C、RNAhybrid计算miR-29b与MMP2 3’UTR区二聚体结构的自由能）

Fig. 1-4 The binding sites of MMP2 3'UTR region with miR-29b predicted by TargetScan



35

图1-5 生物信息学预测miR-29b与PTEN 3’UTR区的结合情况（A、Targetscan预测miR-29b与PTEN 3’UTR区的结合位点；B、miR-29b与PTEN 3’UTR区的结合位点高度保守；C、RNAhybrid计算miR-29b与PTEN 3’UTR区二聚体结构的自由能）

Fig. 1-5 The binding sites of PTEN 3'UTR region with miR-29b predicted by TargetScan

36

## 第二节 **miR-29b**在非小细胞肺癌组织和细胞株中的表达验证

### 一、 材料

#### 1. 细胞

非小细胞肺癌细胞株的收集：16HBE，永生化人支气管上皮细胞；A549, 人肺腺癌细胞；PAa，人肺腺癌细胞；PGCL3, 人高转移巨细胞肺癌；PLAM，肺腺癌胸水转移癌；H1299, 人非小细胞肺癌细胞，均来源于广州医科大学中心实验室。H460，人大细胞肺癌细胞；H446，人小细胞肺癌细胞株；H520，人肺鳞状上皮细胞癌；95D，人高转移肺巨细胞癌株，均来源南方医肿瘤研究所。95C，人低转移肺巨细胞癌株来源中ft大学肿瘤研究所。

#### 2. 组织标本

收集广州医学院第一附属医院自2005年到2008年手术切除的20对配对肺癌石蜡包埋组织，2012年手术切除的10对配对肺癌新鲜组织标本，标本收集获得了临床医学伦理委员会的批准。患者术前均未接受化疗和放疗，平均年龄48岁，其中鳞癌4例，腺癌26例；临床分期Ⅰ期10例，Ⅱ期9例，Ⅲ

期11例；伴淋巴结转移者14例，无转移者16例。

#### 3. 主要试剂

试剂名称品牌或生产厂家

胎牛血清(FBS) Gibco公司

MirVanaTM RNA Isolation Kit ABI公司RecoverAllTM Total Nucleic Acid Isolation Kit ABI公司TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit ABI公 司

TaqMan®MicroRNA Assays ABI公司TaqMan®Universal Master Mix, No AmpErase®UNG ABI公司其余试剂同第一部分第一节

#### 3. 主要仪器

仪器名称品牌或生产厂家

PCR仪Biometra公司

37

紫外线投射仪ULTRAVTOLET

Products, LTD

涡旋混合器其林贝尔仪器制造公司

其余仪器同第一部分第一节

### 二、 方法

#### 1. 细胞培养

16HBE和人肺癌细胞A549、PAa、PGCL3、PLAM、H1299培养液为含10%新生牛血清的1640完全培养基，人肺癌细胞H460、H446、H520、95D、95C培养液为含10%胎牛血清的1640完全培养基，细胞在5%CO2，37℃饱和温度培养箱中传代培养，细胞呈单层贴壁生长，取对数生长期的细胞进行实验。

#### 2. 非小细胞肺癌和癌旁新鲜组织中的**microRNA**提取

用mirVanaTM RNA Isolation Kit（ABI）提取Small RNA，具体步骤如下：

(1)适量组织迅速置于用液氮预冷过的研钵中，使之浸没于液氮中，开始研磨，研磨过程中要始终保持液氮浸没组织，直至将组织研成粉末状；

(2)将研磨好的组织倒入预冷过的匀浆器中，加入10 倍体积的Lysis/Binding

Solution，迅速涡旋混均呈匀浆；

(3)加入1/10体积的Homogenate additive，涡旋混均，冰上放置10分钟。以上操作均在冰上；

(4)加入与lysis/Binding Solution相同体积的acid-phenol: chloroform，涡旋30-60秒，室温10, 000g离心5分钟，离心后混合液分成两相，取上清置一新管中，记体积。分相不好，重新离心；

(5)加入1/3倍体积100%乙醇于上清中，涡旋彻底混均。将纯化柱放至收集管中，把上述混合液加入纯化柱中，体积不超过700µL，10, 000g离心15秒。收集过滤液；

(6)加入2/3倍体积100%乙醇于过滤液中，涡旋彻底混均。换一新的纯化柱放至收集管中，把上述混合液加入纯化柱中，体积不超过700µL，10, 000g离心15秒。弃过滤液；

(7)加入700µL wash 1于纯化柱中清洗纯化拄，10, 000g离心10秒，弃过滤液。加入500µL wash 2/3清洗纯化柱第二次，10, 000g离心10秒，弃过滤液。再重复上述步骤一次；

38

(8)将纯化柱放置到新的收集管中，柱中心加入100µL 95℃预热的Elution

Solution，室温最高转速离心20-30秒，收集管中液体即为提取的Small RNA，可放置在-70℃保存；

(9) RNA质量检测：使用NanoDrop 2000测RNA浓度和纯度，RNA溶液的A260/A280

的比值范围在1.8到2.1用于后述实验。

#### 3. 非小细胞肺癌和癌旁石蜡组织中的**microRNA**提取

RNA实验用品均用0.1%DEPC水处理后再高温高压灭菌，以保证无RNase. 用RecoverAllTM Total Nucleic Acid Isolation Kit(ABI)提取总RNA，具体步骤如下所示。

3.1脱蜡

##### （1) 每个组织蜡块切取厚度为20µm白片，共4张，用DEPC水处理后的镊子小心放入RNase-free的1.5mL EP管中；

(2)加lmL100％二甲苯于上述EP管中，简单漩涡震荡混合，简单离心使黏附于管壁上的组织完全浸没于二甲苯中；

(3) 50℃水浴3 min，加热溶解石蜡；

(4)室温下，最大速离心2min后，弃去二甲苯；

(5)加1mL100％无水酒精于EP管中，漩涡震荡混合，最大速离心2min；

(6)弃去酒精，重复（5）一次；

(7)再次简单离心收集并尽可能弃去管底残留的乙醇；

(8)打开EP管盖，于室温放置30min，以去除残留乙醇。

3.2蛋白酶消化

(1)每个EP管组织中加入Digestion Buffer 200µL+Protease 4L；

(2)轻旋EP管混匀并使组织完全浸没于液体中；

(3)于50℃水浴15min，然后80℃水浴15min。

3.3核酸的分离

(1)按照说明书配制Isolation Additive/ethanol混合液；

(2)向每个样品中加790µL Isolation Additive/ethanol混合液，枪头吹打混匀；

(3)每个样品准备一个Collecton Tube，向每个带有过滤小室的收集管中加入

700µL重悬样品的Isolation Additive/ethanol混合液；

(4) 10000g离心30s；弃去滤过液，重新放好过滤小室；

39

(5)重复上述（1）～（4）过程，直至所有混合液都通过滤膜；

(6)加700µL Wash 1于小室中，10000g离心30s，弃过滤液；

(7)加500µL Wash 2/3于小室中，10000g离心30s，弃过滤液；

(8)再次离心30s，以去除残留的液体。

3.4核酸的纯化

(1)按照说明书配制DNase mix；

(2)加60µL DNase mix至小室中央，盖紧管盖，室温放置30min；

(3)加700µL Wash 1至小室中央，室温30~60s; 10000g离心30s,弃过滤液；

(4)加500µL Wash 2/3至小室中央，10000g离心30s，弃去过滤液；

（5）重复(1)～(3)一次；

(6)用Wash 2/3再洗一次，10000g离心l min，除去残留液体；

(7)将过滤小室转移至另一新的Collecton Tube中，向每一小室中央加60µL Elution Solution，盖紧管盖，室温放置l min；

（8）13000g离心l min，-20℃或-80℃长期保存。

3.5 RNA质量检测

使用NanoDrop 2000测RNA浓度和纯度，RNA溶液的A260/A280的比值范围在

1.8到2.1用于后述实验。

#### 4. 非小细胞肺癌细胞株中的总**RNA**提取

用Trizol法提取细胞总RNA，操作方法同第一节3。。

#### 5. **cDNA**合成

实验操作按照TaqMan®MicroRNA Reverse Transcription Kit(ABI)和TaqMan®MicroRNA Assays(ABI)说明书进行。特异的RT引物和TaqMan探针被用于定量检测hsa-miR-29( TM:00413, PN: 4427957), U6 (TM:001093, PN: 4427957)

为内参。具体步骤如下：

(1)将试剂盒中成分放置冰上溶解，冰上溶解RT primer；

(2)准备the RT master mix,配制反应体系：

Component Volume/15-µL Reaction

DNTP mix (100mM total) 0.15µL MultiScribe™Reverse Transcriptase(50 U/µL) 1.00µL 10✕Reverse Transcription Buffer 1.50µL

40

RNase Inhibitor, 20U/µL 0.19µL

Nuclease-free water 4.16µL

Total 7.00µL

(3)每15µL体系中包括7µL master mix, 3µL RT primer, 5µL RNA sample；

(4)移液枪轻轻吹打混匀后短暂离心。不要涡旋；

(5)加5µL total RNA, 轻轻混匀，短暂离心；

(6)冰上溶解RT primer, 涡旋混匀，短暂离心；

(7)加3µL RT primer, 轻轻混匀， 短暂离心；

(8)冰上育5分钟；

(9)上机RT，反应条件如下：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Step type | Time(min) | Temperature(°C) |
| HOLD | 30 | 16 |
| HOLD | 30 | 42 |
| HOLD | 5 | 85 |
| HOLD |  | 4 |

(10)放置冰浴待用或-20°C保存。

#### 6. **qPCR**扩增

实验操作按照TaqMan®Universal Master Mix, No AmpErase®UNG (5 mL)

（ABI）和TaqMan®MicroRNA Assays(ABI)说明书进行。具体步骤如下：

##### （1) 冰上溶解qPCR primer.和Taqman Mix.注意避光。轻轻颠倒混匀或旋转混匀,

短暂离心；

##### （2) 准备配制反应体系：

Component Volume/20-µL Reaction

Taqman Universal PCR Master Mix II, no UNG 10µL Nuclease-free water 7.67µL

20✕Taqman Small RNA Assay 1.00µL

Product from RT reaction 1.33µL

Total 20.00µL

(3)轻轻混匀，短暂离心.去气泡；

(4)上机PCR，反应条件如下：

41

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Step type | Time | Temperature(°C) |
| HOLD | 10分 | 95 |
| Denature | 15秒 | 95 |
| Extend | 60秒 | 60 |

#### 7. 统计分析

数据分析采用ΔΔCt方法。通过2-ΔΔCt方法分析QPCR获得相对基因表达差异。每个样本的CT值求得平均后（3复孔求平均值）减去各自的内参的平均CT得到ΔCT值。需要比较的两个样本之间的△CT值相减得到△△CT值。然后求2-ΔΔCt获得相对基因表达差异的倍数。

用SPSS13.0对数据进行统计分析。配对样本的t检验用于分析miR-29b在非小细胞肺癌和癌旁肺组织中的显著差异；独立样本的t检验用于分析miR-29b的表达与临床病理参数的关系；多组间的均数比较采用单因素方差分析，方差分析前进行方差齐性检验，方差齐采用oneway Anova，多重比较采用LSD法；方差不齐采用近似F检验的Welch法，多重比较采用Dunett's T3法；miR-29b表达经正态性检验服从正态分布，miR-29b的表达与临床分期和淋巴结转移的相关性分析用Pearson分析；取α＝0.05为检验标准。

### 三、 结果

3.1非小细胞肺癌组织中miR-29b的表达

利用实时荧光定量PCR检测了20对配对非小细胞肺癌及癌旁肺石蜡组织和

10对配对非小细胞肺癌及癌旁肺新鲜组织中miR-29b的相对表达水平，以U6作为内参，用-△CT值表示miR-29b的相对表达量。结果显示，20例非小细胞肺癌石蜡组织中miR-29b 的表达水平为-1.893±1.367，显著低于癌旁肺组织

-0.6.5±0.639(*p*=0.001, t=-3.817)(图1-6A); miR-29b在10例新鲜非小细胞肺癌组织的表达显著低于癌旁肺组织(*p*<0.001, t=-9.016)(图1-6B)。

42



图1-6 实时荧光定量PCR检测非小细胞肺癌组织中miR-29b的表达(A、非小细胞肺癌组织及癌旁肺石蜡组织；B、非小细胞肺癌及癌旁肺新鲜组织)

Fig.1-6 Expressin levels of miR-29b in clinical NSCLC tissues by real-time PCR. A: qPCR of miR-29b levels in 20 pairs of paraffin-embedded NSCLC tissues; B: qPCR of miR-29b levels in 10 pairs of fresh NSCLC tissues.

3.2非小细胞肺癌细胞株中miR-29b的表达

利用实时荧光定量PCR检测9种非小细胞肺癌细胞株和永生化的人支气管上皮细胞中miR-29b的表达，以永生化的人支气管上皮细胞16HBE为对照组，9种非小细胞肺癌细胞株为实验组，对获得的样品Ct值进行相对定量计算分析，结果显示：miR-29b在9种非小细胞肺癌细胞株和16HBE间的表达具有显著性差异（F=99.444, *p*<0.001）；两两比较显示H460细胞中miR-29b的表达最高，且显著高于其他8种非小细胞肺癌细胞(*p* =0.000; *p* =0.000; *p* =0.000; *p* =0.000; *p* =0.000; *p* =0.000; *p* =0.000; *p* =0.000); miR-29b在PAa、PGCL3、H520、A549、

H1299、95D等肺癌细胞株中的表达较16HBE表达显著降低(*p* =0.002; *p* =0.001; *p* =0.001; *p* =0.000; *p* =0.000; *p* =0.000)；在高转移性细胞株95D中的表达显著低于低转移性细胞株95C细胞(*p* =0.000)（图1-7）。

43

广州医科大学博士学位论文



3.5

3

2.5

2

1.5

1

0.5

0

16HBE H460 95C PLAM PAa PGCL3 H520 A549 H1299 95D

图1-7 实时荧光定量PCR检测miR-29b在9种非小细胞肺癌细胞株中的表达

Fold change of miRNA

Fig. 1-7 Expressin of miR-29b in 9 NSCLC cell lines by real-time PCR

3.3 miR-29b的表达水平与临床病理特征的相关性分析

对30例非小细胞肺癌组织中miR-29b的表达与临床病理参数的关系进行分析，结果显示：miR-29b在30例非小细胞肺癌组织中的表达与患者年龄、性别、组织学分型以及肿瘤分化程度均无显著性关系（*p*=0.578；*p*=0.862；*p*=0.625；

*p*=0.891）；与临床分期和转移有显著性关系(*p*=0.004; *p* =0.031) (表1-4)。两两比较发现，miR-29b表达在临床Ⅲ期非小细胞肺癌患者显著低于临床Ⅰ期非小细胞肺癌患者(*p*=0.001)，miR-29b在伴有淋巴结转移的非小细胞肺癌组织中表达显著低于非淋巴结转移组(*p*=0.031)。为了明确miR-29b的表达与临床分期和淋巴结转移的关系，我们用Pearson相关分析进一步统计。结果显示，miR-29b表达与临床分期不相关(r=-0.123, *p*=0.734)；与淋巴结转移(r=-0.5470.300, *p*=0.043)呈负相关（表1-5）

表1-4 MiR-29b在非小细胞肺癌组织中表达的临床病理分析

Tab. l-4 Clinicopathologic characteristics of miR-29b expression in NSCLC patients

| Features | Case(n) | % | -△CT | p |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Age |  |  |  |  |
| >60 | 14 | 46.67 | -2.044±1.311 |  |
| =<60 | 16 | 53.33 | -1.807±0.989 | 0.578 |
| Gender |  |  |  |  |
| Male | 16 | 53.33 | -1.883±0.722 |  |
| Female | 14 | 46.67 | -1.957±1.508 | 0.862 |
|  |  | 44 |  |  |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 4 | 13.33 | -2.182±0.858 |  |
| 26 | 86.67 | -1.877±1.182 | 0.625 |
| 21 | 70 | -1.931±1.344 |  |
| 9 | 30 | -1.886±0.401 | 0.891 |
| 10 | 33.33 | -1.122±0.638 |  |
| 9 | 30 | -1.881±0.453 |  |
| 11 | 36.67 | -2.671±1.398 | 0.004 |
| 16 | 53.33 | -1.505±0.799 |  |
| 14 | 46.67 | -2.389±1.302 | 0.031\* |

Histology Squamous cancer Adenocarcinoma Differentiation Well+Moderate Poor

Clinic Stage

ⅠⅡ Ⅲ

Lymphatic Metastasis No

Yes

\**p*<0.05

表1-5 MiR-29b的表达在非小细胞肺癌中与临床分期及淋巴结转移的关系Tab. l-5 Relative of miR-29b expression, clinic stage and lymphatic metastasis in NSCLC patients

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Features Case(n) | -△CT | r | *p* |
| Stage  Ⅰ 10 | -1.122±0.638 |  |  |
| Ⅱ 9 | -1.881±0.453 |  |  |
| Ⅲ 11 | -2.671±1.398 | -0.123 | 0.734 |
| Lymphatic Metastasis  No 16 | -1.505±0.799 |  |  |
| Yes 14 | -2.389±1.302 | -0.547 | 0.043\* |

\**p*<0.05

45

# 讨 论

芯片检测是目前最常用的miRNA筛选方法之一，具有高通量、敏感性强等优点，缺点是假阳性率较高。本实验所用的芯片是美国SuperArray公司的miRNA

PCR芯片，含有384条人类miRNA，内部重复3次。它将检测精度提高到了与实时定量PCR相当的水平，芯片检测后无需再进行PCR验证。

目前，研究者们寻找转移相关的miRNAs的方法多采用miRNA芯片技术对癌组织和正常组织、转移瘤和原发瘤、高低转移潜能的细胞之间进行差异表达

miRNAs的筛选。Iorio等[48]利用芯片技术比较了76例乳腺癌组织和10例正常乳腺组织中miRNAs表达差异，其中29个miRNAs在肿瘤中表达下调，15 个

miRNAs能将两者正确分开。差异最为明显的miRNAs包括miR-125b, miR-145, miR-155和miR-21，它们的表达与乳腺癌特异的病理参数如ER状态、分期、增殖指数、血管侵润等有关。研究还发现let-7在淋巴结转移或高增殖指数的样品中低表达，提示let-7低表达与不良预后相关。Tavazoie等[49]利用miRNA芯片技术比较不同转移潜能的乳腺癌细胞株miRNAs表达差异，发现一组miRNAs在高转移潜能的乳腺癌细胞中明显减少。用逆转录病毒将miR-335, miR-206和miR-126导入癌细胞中，可以抑制肿瘤细胞的肺转移和骨转移。分析原发乳腺癌组织发现miR-335, miR-206或miR-126低表达的患者出现转移复发的间期短，而且miR-335或miR-126低表达的患者较高表达的患者总体存活率低。因此miR-126和miR-335被认为人类乳腺癌的转移抑制miRNA。

研究者们虽然利用了miRNA芯片高通量，高灵敏及并行处理的优势，但往往不得不面对繁多的实验结果，如何在众多的差异基因中选择有意义的研究目标成了棘手的问题。由于miRNA是通过调控靶基因而发挥生物学效应，因此本课题除了采用miRNA PCR芯片外，还结合前期肿瘤转移相关基因芯片的结果，通过两个高通量芯片对高低转移潜能的CD133阳性和CD133阴性A549细胞进行筛选，筛选出差异表达的miRNAs谱和转移相关基因。我们将两个芯片结果结合起来分析，这样就大大缩小了筛选的范围，同时使预测更准确，更快捷。CD133阳性与CD133阴性A549细胞来源于同一肺腺癌母株，可保证遗传背景一致，最大程度消除了细胞株之间的差异，从而保证可筛选到真正反映非小细胞肺癌转移的特异miRNAs。

46

目前，生物信息学手段是研究miRNA必不可少的工具。绝大多数的miRNAs

通过碱基配对的方式结合到靶mRNA的3’UTR，靶基因3’UTR区具有与miRNA

5’端至少7个连续核苷酸的完全配对区域(2-8nt)，miRNA的该部分序列称为“种子”序列；mRNA与miRNA种子序列互补的区域在物种中经常具有保守性。基于这两个特征，多个miRNA靶基因的预测软件应运而生。如TargetScan、PicTar、

miRanda、RNAhybrid、DIANA-microT等。TargetScan是Lewis等于2003年基于靶基因跨物种保守和miRNA-靶基因二聚体热力学特征开发的哺乳类动物靶基因预测软件，它基于在mRNA的3’UTR搜索与miRNA的5’端“种子”序列完全互补的序列，并以RNAFold软件计算结合位点的热力学稳定性，最后得到评分最高的mRNA序列。PicTar是Krek和Grum 编写的一种更为高级的miRNA靶基因预测方法，可以在脊椎动物、线虫和果蝇中预测miRNA的靶基因，它采用RNAhybrid评估miRNA和靶基因二聚体结合能来实现miRNA靶基因预测，不但预测了含单个miRNA结合位点的靶基因，而且预测了多个小RNA协同作用的靶基因，即靶基因含有多个不同miRNA结合位点。miRanda是Enright等于2003年5月开发的第一个miRNA靶基因预测软件，它采用动态规划算法比对来识别给定miRNA在基因组上的靶位点，然后根据物种间的保守性来寻找可能的靶基因。这些软件各有优势，但共同的缺点就是假阳性率太高。为了降低假阳性率，本研究中我们结合两个芯片的结果，将这3个常用软件同时应用，对预测结果进行交集。

经miRNA PCR芯片筛选我们获得了51个差异表达的miRNAs，其中14 个

miRNAs在CD133阳性细胞中表达增高，37个miRNAs表达降低。为了了解这些差异miRNAs通过哪些肿瘤转移相关基因来参与CD133阳性A549细胞的转移，我们结合前期肿瘤转移相关基因芯片的结果：与CD133阴性细胞相比，CD133阳性A549细胞表达差异的转移相关基因有19个，全部为表达量升高的基因。由于miRNA对靶基因的表达进行负调控，因此miRNA和靶基因在同一细胞或组织中的表达趋势应相反。据此，我们将表达下调的7个miRNA（has-miR-337-3p, has-miR-33a, has-miR-32, has-miR-374b, has-miR-29b, has-miR-559, has-miR-219-5p）作为检索词，应用计算机软件预测其靶基因，并对检索结果进行交集，再将预测得到的靶基因与肿瘤转移相关基因芯片上的基因进行比对，进一步寻找交集。这样这些差异表达的miRNAs的靶基因不仅是三个数据库共同预

47

测的交集，而且也是转移相关差异基因。结果发现，在7个表达下调miRNA中，has-miR-29b的4个靶基因包含在肿瘤转移相关基因芯片中，而其他6个miRNAs的靶基因与肿瘤转移相关基因芯片上的基因均没有交集。CD133阳性A549细胞miR-29b表达下调了7.6倍，而其靶基因PTEN、ETV4、COL4A2、MMP2等上调了1.11至4.2倍。经PUBMED文献检索，发现hsa-miR-29b与肿瘤密切相关，它在急慢性白血病[50-52] 、肺癌[53, 54] 、肝癌[55] 、胃癌[56] 、前列腺癌[57] 、乳腺癌[58, 59]等多种肿瘤中异常表达。但研究者对它在非小细胞肺癌中作用不多，尤其与非小细胞肺癌转移相关的研究寥寥无几，因此我们将它纳入研究对象。

人类miR-29b包括miR-29b1和miR-29b2，分别与miR-29a和miR-29c形成非编码转录的单拷贝基因簇，位于染色体7q32.3和1q32.2负链，因两者序列完全一致，故统称miR-29b. miR-29家族成员之间的序列相似性很高，其中miR-29a和miR-29c仅第10位核苷酸有差别，其余完全一致。miR-29b序列的3’端最后

6个核苷酸稍有变化，其余部分与家族成员基本一致。与大多数miRNA不同，miR-29b主要定位于核内，它的这个功能特点主要是由其3’末端的六个核苷酸所决定的，由于miR-29b能够入核，参与基因的转录调节，因此它具有与miR-29a、miR-29c 完全不同的作用机制和功能。miR-29a/b1 基因簇位于普通型脆性位点

FRA7H内，提示miR-29a/ b1可能为疾病相关基因。miR-29b2/c基因毗邻免疫相关基因如补体激活家族受体和细胞表而抗原等蛋白质编码基因，因此，miR-29b2/c基因可能与免疫反应和调节相关。最近[http: //microrna. sangerac. uk](http://microrna.sangerac.uk/)数据库中发布了hsa-miR-29b又一新的成熟体，即hsa-miR-29b-5p，并将先前发现的成熟体命名为hsa-miR-29b-3p。因此，hsa-miR-29b现在包括两种成熟体形式，即：hsa-miR-29b-3p和hsa-miR-29b-5p。目前，关于miR-29b-5p的研究报道不多，在已有的研究报道中，hsa-miR-29b的研究主要集中在hsa-miR-29b-3p。本课题研究对象也是hsa-miR-29b-3p，处于惯例，在本论文中，我们书写为miR-29b。

为了进一步了解miR-29b在非小细胞肺癌组织和细胞株中的表达情况，本研究利用实时荧光定量PCR检测了30对配对的非小细胞肺癌组织和9种非小细胞肺癌细胞株中miR-29b的表达，结果显示，miR-29b在20例非小细胞肺癌石蜡组织中的表达明显低于癌旁组织(*p*=0.001, t=-3.817)；在10例非小细胞肺癌新鲜组织中的表达也明显低于癌旁组织(*p*<0.001, t=-9.016)；与永生化的支气管上皮细胞相比，miR-29b在PAa、PGCL3、H520、A549、H1299、95D等多种非小细

48

胞肺癌细胞株中表达下调(*p* =0.002; *p* =0.001; *p* =0.001; *p* =0.000; *p* =0.000; *p*

=0.000），提示miR-29b在非小细胞肺癌的发生发展中可能起到一个抑癌基因的作用。Yanaihara等[60]通过对104例肺癌和癌旁肺组织的miRNA表达谱进行差异分析，发现有43个miRNAs表达明显异常，其中miR-29b明显下调。与本研究结果一致。为了进一步了解miR-29b是否与转移有关，我们对30例非小细胞肺癌组织组织中miR-29b的表达与临床病理指标的关系进行分析，结果显示，miR-29b的表达情况与患者年龄、性别、肿瘤组织学类型以及分化程度均无显著关系，与有无淋巴结转移显著负相关(r=-0.5470.300, p*p* =0.043). miR-29b在伴有淋巴结转移的非小细胞肺癌组织的表达显著低于不伴有淋巴结转移的癌组织（*p*

=0.031），提示miR-29b可能与非小细胞肺癌的转移密切相关。由于本次研究收集的病例有限，我们将通过扩大样本量来进一步证实。

综上所述，我们利用两种芯片——miRNA PCR芯片和肿瘤转移相关基因芯片相结合并综合生物信息学分析的方法，初步筛选出非小细胞肺癌转移相关的miR-29b，并验证miR-29b在非小细胞肺癌组织和细胞株中表达下调，且其表达与非小细胞肺癌淋巴结转移呈负相关。

49

# 第二部分 **miR-29b**对非小细胞肺癌细胞Th物学行为的影响

我们采用实时荧光定量PCR检测了miR-29b在非小细胞肺癌组织和细胞中的表达，发现miR-29b在非小细胞肺癌中表达明显下调。为了明确miR-29b在非小细胞肺癌中的生物学功能，我们一方面建立稳定过表达miR-29b的非小细胞肺癌细胞株，并利用反复transwell分离出高低转移能力的非小细胞肺癌细胞株，以及在内源性低表达miR-29b 的非小细胞肺癌细胞A549-H 中转染miR-29b

mimic，上调细胞中miR-29b表达水平获得gain-of-function表型，进而进行一系列体外细胞水平和体内动物模型上的功能学实验；另一方面，利用化学合成的miR-29b inhibitor将内源性高表达miR-29b的非小细胞肺癌细胞H460和A549-L中的miR-29b下调或抑制，并建立稳定抑制miR-29b表达的非小细胞肺癌细胞株，获得loss-of-function表型，反向验证miR-29b的生物学功能。

## 第一节 **miR-29b**过表达对非小细胞肺癌细胞体内外生物学行为的影响

### 一、 材料

#### 1. 细胞、病毒、载体

人非小细胞肺癌细胞株A549细胞引自广州医科大学中心实验室。过表达miR-29b慢病毒（LV-has-mir-29b-1）及阴性对照病毒LV-CON157购自上海吉凯公司，慢病毒表达载体能表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP )（如图2-1）。Has-miR-29b mimic以及对照委托上海吉凯制药技术有限公司合成，序列如下：

Oligo Sequence(5' to 3')

Has-miR-29b Mimic Mimic NC

Sense: UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU Anti-sense: CACUGAUUUCAAAUGGUGCUAUU Sense: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT

Anti-sense: ACGUGACACGUUCGGAGAATT

50



2. 实验动物

图2-1 慢病毒表达载体结构图

Figure 2-1 Expression lentivirus vector of miR-29b

14只BALB/c裸鼠购自广东省实验动物中心，3～5周龄，雄性，体重16士2克。严格饲养在恒温（20℃～26℃），恒湿(50%～56% )、无特定病原体(specific pathogen-free, SPF )的空气洁净层流架内，裸鼠盒、空气过滤罩、垫料、饲料和饮水等均经高压蒸汽灭菌，并在无菌条件下适时更换。

#### **2.** 主要试剂

试剂名称品牌或生产厂家

RPMI 1640培养基Gibco公司

DMEM basic培养基Gibco公司

胎牛血清（FBS）Gibco公司

新生牛血清（NBS）Gibco公司

胰蛋白酶Gibco公司

青/链霉素Gibco公司

TRIzol Invitrogen公司

RecoverAllTM Total Nucleic Acid Isolation Kit ABI公司TaqMan®MicroRNA Reverse Transcription Kit ABI公司TaqMan®MicroRNA Assays ABI公司TaqMan®Universal Master Mix, No AmpErase®UNG ABI公司

Polybrene Sigma公司

Matrigel胶BD公司

51

Lipofectamine RNAiMAX invitrogen公司

OPTI-MEM Invitrogen公司

RNA oligo上海吉玛公司

CCK-8日本同仁公司

#### **3.** 主要仪器

仪器名称品牌或生产厂家

二氧化碳培养箱美国Thermo公司

超净工作台苏州安泰公司

生物安全柜ESCD公司

Casy全自动细胞分析仪Roche公司

倒置普通显微镜Nikon公司

倒置相差显微镜(TS100) Nikon公司

台式高速离心机Eppendorf公司

微量紫外分光光度计NanoDrop®ND-2000

荧光定量PCR仪ABI 7500

Milli-Q系统纯水制备仪Millipore公司

DNA电泳仪BioRad公司

制冰机星崎冷热机械有限公司

#### 4 ℃、-20℃低温冰箱西门子公司

-80℃低温冰箱Thermo公司

低温高速离心机Thermo公司

隔水式恒温培养箱上海一恒科学仪器有限公司

电子天平Sartorius公司

52

### 二、 方法

#### 1. 细胞培养

同第一部分第二节细胞培养。

#### 2. 慢病毒感染目的细胞

参照慢病毒使用操作手册进行实验。

第一天，将A549细胞铺96孔板，每孔细胞数2xl03个，加入含10%胎牛血清的

DMEM 培养基90µL，孵育过夜。

第二天，实验组每孔加入10µL miR-29b慢病毒上清（滴度为4xl06TU/ mL），再加入5µg/mL的polybrene；阴性对照组每孔加入10µL Negative Control 慢病毒上清

（滴度为4xl06TU/ mL），再加入5µg/rnL的polybrene，孵育过夜。

第三天，用无polybrene的含10%胎牛血洁的DMEM培养基进行换液，继续孵育

72 小时。

第六天，荧光显微镜下观察荧光。

由于载体GV209只带有绿色荧光标记(GFP)而不带抗性标记，因而病毒感染后稳定细胞株的建立不能采用常规的抗生素筛选单克隆的方法。鉴于慢病毒感染效率较高，本研究依据GFP标记，对多克隆细胞进行96孔板有限稀释，进行单克隆细胞的挑选：消化单克隆细胞为单细胞悬液，计数，每种细胞准备10mL全培养基，加入100个细胞，充分混匀，96孔板每孔加入100µL。次日细胞贴壁后观察孔中细胞，挑选只有一个细胞且发绿色荧光的孔作为稳定过表达或空载对照的候选单克隆。

#### 3. 反复**transwell**分离高低转移能力的非小细胞肺癌细胞株

肿瘤细胞的体外侵袭能力使用Corning公司的转移小室（8µm孔径，6.5mm直径）进行检测。实验方法如下：

3.1将Matrigel从-80℃冰箱转移冰盒中，置于到4℃冰箱解冻过夜；

3.2在转移小室中加入1ml无血清无双抗DMEM，使聚碳酸酯膜泡在DMEM之中并置于4℃冰箱预冷2h，同时将实验所需枪头及EP管置于冰上预冷；

3.3吸出转移小室中的DMEM，用预冷枪头加30uL1.25mg/mLMatrigel入转移小室的上室，37℃放置2h，包被聚碳酸酯膜；

3.4用胰蛋白酶消化细胞，1×PBS洗两次，离心后重悬于无血清无双抗DMEM，

53

血球计算板计数，调整细胞密度至2×105个/ml；

3.5吸出转移小室中的DMEM，在下室中加入700µl含10％FBS的DMEM，加入200µl细胞悬液到转移小室的上室，置于37℃培养24h；

3.6小心弃除小室上、下室中的培养液，均用PBS洗3次，轻轻吸去残余液体。上、下室中分别加入适量胰酶，待细胞被消化后分别将上、下室的细胞接种到

24孔中继续扩大培养后进行第二轮transwell 试验，方法同上，如此重复10次。

3.7收集从第l到10次实验均穿过小室膜的细胞扩大培养，其转移能力较强，收集10次实验均未穿过小室膜的细胞扩大培养，其转移能力较弱。扩大培养的细胞用于后续实验 。



图2-2 分离高低转移能力的非小细胞肺癌细胞株过程示意图

Figure 2-2 General scheme of the establishment of high and low invasion cell sublines derived from NSCLC cell line

#### 4. 细胞体外侵袭试验

4.1～4.5实验步骤同2.1至2.5

4.6取出小室，用棉签轻轻擦掉膜上面的细胞，将转移小室中的聚碳酸酯膜用

1×PBS润洗一次，甲醇固定15min后用0.1％的结晶紫染色20min，1×PBS润洗三次；

4.7在显微镜下计数转移到膜另外一面的细胞并照相，每孔拍5个视野。

#### 5. 细胞体外迁移试验

Transwell小室制备过程中不进行Matrigel胶的包被，直接水化使用，其他步骤同Transwell侵袭试验 。

#### 6. 瞬时转染

54

采用阳离子脂质体转染，操作方法按照Lipofectamine RNAiMAX（invitrogen）说明书进行，以6孔板为例。实验分4组，分别是A549-H组、A549-H-miR-29b mimic组（转染miR-29b mimic）、A549-H -NC组（转染miR-29b mimic NC）、A549-H -NC-FAM组（转染miR-29b mimic NC-FAM，该组设置目的是观察转染效率）。从公司买来的RNA oligo为粉末状，使用前加入适量体积的DEPC水配成20μM的溶液待用。

6.1转染前一天，以合适的细胞密度（A549细胞4×105个）接种到6孔培养板上。转染时，细胞要达到70%～80%的融合；

6.2配制溶液1: 242µl无血清培养基+ 8µl lipofectamine RNAiMAX per well

（总体积250µl），轻轻混匀，温育5min；溶液2: 237.5µl无血清培养基+6.25µl miR-29b mimic per well（总体积250µl，miR-29b mimic终浓度为50nM），轻轻混匀，温育5min；

6.3将溶液1与溶液2混合，室温下置20min；

6.4与此同时，将6孔板中的细胞用无血清培养基冲洗细胞两遍后，加入2ml

无血清培养基；

6.5将溶液1与溶液2的混合液逐滴加入孔中，摇动培养板，轻轻混匀。在

37℃，5％的CO2中保温5~6小时；

6.6 6小时后，更换含有血清的全培养基，在37℃，5％的CO2中48~72h检测转染水平。

#### **7.** 实时荧光定量**PCR**

实验步骤同第一部分第二节方法4-6.。

#### 8. **CCK-8**细胞增殖实验

实验各分3组，分别是A549组、A549-miR-29b Clone2组、A549-NC组和

A549-H组、A549-H-NC组、A549-H-miR-29b mimic组。选择对数生长期细胞， 用

0.25%胰蛋白酶消化，PRMI1640完全培养液调制成1.5×104 /ml细胞悬液，接种在96孔培养板内，每孔100L，各组设3个复孔。培养第1~7天后，每孔加入

CCK-8 10L，继续孵育1-2小时，立即比色，酶标仪上检测细胞存活情况，测定波长为450nm处各孔的吸光度(OD)值。实验重复3次。

#### 9. 裸鼠皮下成瘤实验

对数期生长的细胞用胰酶消化制成单细胞悬液，PBS洗3遍后，进行细胞计

55

数。调整细胞密度，制备成0.2m1含有2×106个细胞的悬液，备用。取4～5周龄雌性BALB/c裸鼠14只，7只为一组，每组分别接种3组细胞，即将A549组、A549-miR-29b Clone2组、A549-NC组细胞分别注射到裸鼠左侧腋部皮下及右背腋皮下，注射细胞数为2×l06个，每隔2-3天用游标卡尺测量瘤体直径，连续观察

20天。观察各组细胞在裸鼠体内的成瘤率、肿瘤大小及生长速度，20天后处死裸鼠。

#### 10. 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行数据分析，实时荧光定量PCR、迁移实验和侵袭实验进行方差齐性检验和单因素的方差分析，方差齐采用oneway Anova，多重比较采用LSD法；方差不齐采用近似F检验的Welch法，多重比较采用Dunett's T3法；细胞体外生长实验采用析因设计的方差分析，多重比较采用LSD法；皮下成瘤实验采用重复测量数据的方差分析，取α= 0.05为检验标准。

### 三、 结果

l. MiR-29b慢病毒表达载体的鉴定和感染

将商品化的miR-29b慢病毒表达载体质粒测序并同源比较，结果显示测序结果经Blast比对，与miR-29b的前体序列完全一致（图2-3）。分别将miR-29b慢病毒与阴性对照病毒感染293A及A549细胞，感染72小时后荧光显微镜下检测到两种细胞中均发绿色荧光（图2-4）。对发光的多克隆细胞进行96孔板有限稀释，挑选只有一个细胞且发绿色荧光的孔作为稳定过表达或空载对照的候选单克隆（图2-5）。



图2-3 miR-29b慢病毒表达载体质粒测序结果图

Fig. 2-3 Partial sequencing map and blast results of miR-29b overexpressing lentiviral vector

56



图2-4 慢病毒感染目的细胞HEK293A和A549的荧光图（放大倍数：x100）Fig. 2-4 Flurescent images of cell clones after lentivirus packaging and transfection (Original magnification: X100)



图2-5 单克隆细胞(A, B: LV-has-mir-29b-1单克隆细胞; C, D: CON157单克隆细胞。A, C: 可见光图; B, D:荧光图。放大倍数: X200)

Fig.2-5 Figures of cell clones (A, B: single cell clones of LV-has-mir-29b-1; C, D: single cell clone of CON157. A, C: observed by visible light; B, D: observed by fluorescence microscope. Original magnification: X200)

2. 实时荧光定量PCR鉴定miR-29b过表达单克隆细胞中miR-29b的表达

57

实时荧光定量PCR运用2-ΔΔCt法计算3个过表达单克隆1-3和对照中miR-29b相对于空载A549的表达倍数（表2-1）。结果表明，相对于空载A549，对照单克隆细胞中miR-29b表达倍数为1.412，没有显著差异（*p*=0.945）；过表达后的单克隆细胞1-3中miR-29b表达倍数分别为2.788、2.859和2.174倍，均有显著差异（*p*=0.001，



3.5

3

2.5

2

1.5

1

0.5

0

A549

A549-NC A549- A549- A549-

miR29b- miR29b- miR29b- Clone1 Clone2 Clone3

*p*<0.001，*p*=0.015）。与对照单克隆细胞相比，过表达后的单克隆细胞1和2中miR-29b表达均有显著差异（*p*=0.005, *p*=0.003），单克隆细胞3中miR-29b表达没有显著差异（*p*=0.183）。单克隆细胞2中miR-29b的表达量最高（图2-6）。选取表达最高单克隆2细胞（命名为A549-miR-29b-Clone2）以及对照NC细胞（命名为A549-NC）进行下游实验。

Fold change of miRNA

图2-6 实时荧光定量PCR检测miR-29b过表达单克隆细胞中miR-29b的表达倍数Fig.2-6 Expression folds of A549-miR-29b-Clone1-3 and NC detected by Real-time PCR

3. 成功建立了不同转移能力的非小细胞肺癌细胞株

通过10次Transwell侵袭实验，收集反复10次后最终穿过小室膜的高转移潜能非小细胞肺癌细胞（命名为A549-H）和反复10次后最终没有穿过小室膜的低转移潜能非小细胞肺癌细胞（命名为A549-L）。随后，我们采用Transwell迁移和侵袭实验鉴定A549-L和A549-H细胞的迁移和侵袭能力，用实时荧光定量PCR检测A549-L和A549-H细胞中miR-29b的表达。结果显示，在迁移和侵袭实验中，A549-H细胞穿过小室膜的细胞数目明显多于A549-L细胞(t=-32.220, *p*<0.001; t=-28.461, *p*<0.001)，表明A549-H细胞的迁移和侵袭能力高于A549-L细胞（图

58

2-7,8, 表2-2). 以永生化的人支气管上皮细胞16HBE为对照组，A549-L细胞中miR-29b的表达显著高于16HBE细胞(*p* =0.029)，A549-H细胞中miR-29b的表达显著低于16HBE细胞(*p* <0.001)；A549-L细胞中miR-29b的表达显著高于A549-H细胞(*p*=0.001) (图2-9，表2-3)。



图2-7 A549-L和A549-H细胞体外迁移和侵袭能力的比较(放大倍数: X200) Fig.2-7 Comparison of cell migration and invasion ability of A549-L and A549-H cells (original magnification: X200)



图2-8 A549-L和A549-H细胞的迁移和侵袭能力的比较(mean±SD, \**p*<0.05) Fig.2-8 Comparison of cell migration and invasion ability of A549 and A549-H cells (mean±SD, \**p*<0.05)

59



图2-9 实时荧光定量PCR检测A549-L和A549-H细胞中miR-29b的表达倍数

(Mean±SD, \**p*<0.05)

Fig. 2-9 Expression folds of miR-29b between A549-L and A549-H detected by Real-time PCR(mean±SD, \**p*<0.05)

4. miR-29b过表达后A549-H细胞中miR-29b的表达变化

实时荧光定量PCR检测转染50nM miR-29b mimic 48h后A549-H细胞中

miR-29b的相对表达。结果表明，相对于Blank组与NC组，A549-H细胞在转染后miR-29b表达显著升高(*p*=0.044, *p*=0.044) (图2-10, 表2-4). 表明miR-29b mimic可以有效地上调A549-H细胞中miR-29b的表达。



图2-10 实时荧光定量PCR检测A549-H细胞中miR-29b过表达后miR-29b的表达

(Mean±SD, \**p*<0.05)

Fig. 2-10 Expression folds of miR-29b overexpression cells detected by Real-time PCR(mean±SD, \**p*<0.05)

60

5. miR-29b过表达对A549和A549-H细胞体外增殖能力的影响

采用CCK-8法对过表达后细胞体外增殖能力的改变进行检测，对A549组、A549-NC组和A549-miR-29b-Clone2组细胞的增殖情况用析因设计的方差分析，三组细胞的增殖能力具有显著差异(F=124.596, *p* <0.001)（图2-11, 表2-5），三组细胞生长时间水平具有显著差异（F=525.009, *p* <0.001），时间与分组之间交互效应显著(F=4.639, *p* =0.004)，A549-miR-29b-Clone2组细胞较A549组、A549-NC组细胞增殖缓慢（*p* <0.001, *p* <0.001）。

A549-H组、A549-H -NC组、A549-H-miR-29b mimic组细胞的增殖情况用析因设计的方差分析，结果显示：三组细胞的增殖能力具有显著差异（F=10.343，*p*

<0.001)(图2-12, 表2-6 )，三组细胞生长时间水平具有显著差异（F=209.681，*p*

<0.001)，时间与分组之间不存在交互效应(F=1.370, *p* =0.233), A549-H-miR-29b

mimic组细胞较A549-H组、A549-H -NC组细胞增殖缓慢(P<0.001, *p* =0.001)。

OD value



A549

A549-NC

A549-miR-29-Clone2

4

3.5

3

2.5

2

1.5

1

0.5

0

Day 1 Day 2 Day 3

Day 4

TIME

Day 5 Day 6 Day 7

图2-11 A549组、A549-NC组和A549-miR-29b-Clone2组细胞的体外生长曲线Fig.2-11 Cell growth curves of A549, A549- NC and A549-miR-29b-Clone2. Each value represents the mean士SD of absorbance value(OD ) for cells.

61



A549-H A549-H-NC

A549-H-miR-29b mimic

4

3.5

3

2.5

2

1.5

1

0.5

0

Day 1 Day 2 Day 3 Day 4 Day 5 Day 6

图2-12 MiR-29b对A549-H细胞增殖能力的影响

OD value

Fig. 2-12 Effects of MiR-29b on cell proliferations of A549-H cells by CCK-8 method

6. miR-29b过表达对A549细胞体外迁移运动能力的影响

采用Transwell小室检测miR-29b过表达后细胞体外迁移运动能力的变化，结果发现A549组、A549-NC组和A549-miR-29b组三组细胞迁移能力的差异具有显著性(F=31.613, *p* <0.001)（图2-13，14和表2-7）。两两比较结果发现，与A549组、A549-NC组细胞相比，A549-miR-29b组细胞穿过膜的细胞数显著减少（*p* <0.001, *p*

<0.001），其迁移能力明显降低。

A549-H组、A549-H -NC组、A549-H-miR-29b mimic组三组细胞迁移能力的差异具有显著性(F=103.302, *p* <0.001)(图2-13，14和表2-7 ). 两两比较结果发现，与A549-H组、A549-H -NC组细胞相比，A549-H-miR-29b mimic组细胞穿过膜的细胞数显著减少（*p* <0.001, *p* <0.001），其迁移能力明显降低。

62



图2-13 Transwell小室检测miR-29b过表达后A549和A549-H细胞的迁移能力(放大倍数: X200)

Fig. 2-13 Comparison of cell migration ability of A549 and A549-H cells transfected with miR-29b overexpression with Transwell chamber(original magnification: X200)



图2-14 miR-29b过表达后A549和A549-H细胞的迁移能力(mean±SD, \**p*<0.05) Fig.2-14 Migration ability of A549 and A549-H cells after transfected with miR-29b overexpression(mean±SD, \**p*<0.05)

7. miR-29b过表达对A549细胞体外侵袭能力的影响

采用Boyden小室的方法分析过miR-29b表达后细胞体外侵袭能力的变化，结果发现A549组、A549-NC组和A549-miR-29b组三组细胞侵袭能力的差异具有显著性(F=347.905, *p* <0.001)（图3-16和表3-8）。两两比较结果发现，与A549组、A549-NC组细胞相比，A549-miR-29b组细胞穿过基质胶的细胞数显著减少（*p*

63

<0.001, *p* <0.001)，其体外侵袭能力明显降低。

A549-H组、A549-H -NC组、A549-H-miR-29b mimic组三组细胞侵袭能力的差异具有显著性(F=145.361, *p* <0.001)(图3-15和表3-7 ). 两两比较结果发现，与A549-H组、A549-H -NC组细胞相比，A549-H-miR-29b mimic组细胞穿过膜的细胞数显著减少（*p* <0.001, *p* <0.001），其侵袭能力明显降低。



图2-15 Boyden小室检测miR-29b过表达后A549和A549-H细胞的侵袭能力(放大倍数: X200)

Fig. 2-15 Comparison of cell invasion ability of A549 and A549-H cells transfected with miR-29b overexpression with Boyden chamber(original magnification: X 200)



图2-16 miR-29b过表达后A549和A549-H细胞的侵袭能力(mean±SD, \**p*<0.05) Fig.2-16 Invasion ability of A549 and A549-H cells after transfected with miR-29b

64

Overexpression(mean±SD, \**p*<0.05)

8. miR-29b对A549裸鼠移植瘤生长的影响

A549细胞、A549-NC细胞及A549-miR-29b细胞在裸鼠腋窝皮下接种后5天左右开始成瘤，20天后处死裸鼠摘除皮下肿瘤，测量肿瘤体积、重量，固定包埋后进行HE染色。重复测量数据的方差分析结果显示：三组细胞在裸鼠皮下的成瘤能力具有显著差异(F=58.302, *p*<0.001)（图2-17, 表2-10），三组细胞成瘤后的生长速度具有显著差异（F=29.782, *p*<0.001），时间与分组之间具有交互效应

（F=5.100, *p*<0.001）；两两比较结果显示，A549细胞组及A549-NC细胞组相比，瘤体重量与体积无显著性差异(*p*=0.933, *p*=0.147), A549-miR-29b细胞组较A549细胞组及A549-NC细胞组，瘤体重量与体积均显著降低（*p*=0.013, *p*=0.001; *p*<0.001, *p*<0.001）(表2-9, 表2-10 ). 说明miR-29b基因导入A549细胞后，能显著抑制细胞在裸鼠体内的生长。



65



图2-17 MiR-29b对裸鼠皮下成瘤的影响(A：裸鼠皮下肿瘤生成情况；B：肿瘤皮下生长曲线) (mean±SD)

Figure 2-17 Effects ofmiR-29b on subcatenous tumor growth in vivo. A: Subcatenous tumor growth of nude mice. B: Growth curveof subcatenous tumor. The tumor diameter indicated as mean土SOof six mice (mean±SD)

表2-9 3组不同处理的A549细胞裸鼠皮下移植瘤重量(mean±SD)

Tab.2-9 Average weight of subcutaneous tumor in 3 different groups of A549 cell lines(mean±SD)

| Cells | n | Weight of subcutaneous tumor (mean±SD) |
| --- | --- | --- |
| A549 | 7 | 0.438±0.141 |
| A549-NC | 7 | 0.391±0.192 |
| A549-miR-29b | 7 | 0.082±0.053 |
| Welch值 |  | 24.125 |

*p*值 <0.001

66

## 第二节 **miR-29b inhibitor**对非小细胞肺癌细胞体内外生物学行为的影响

### 一、 材料

人非小细胞肺癌细胞株H460细胞引自南方医科大学肿瘤研究所，A549-L细胞为广州医科大学病理教研室自存。抑制miR-29b表达慢病毒（LV-has-miR-29b

-3p-inhibitor）及阴性对照病毒LVCON053购自上海吉凯公司，慢病毒表达载体能表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP )（如图2-18）。Has-miR-29b inhibitor以及对照委托上海吉凯制药技术有限公司合成，序列如下：

Oligo Sequence(5' to 3')

Has-miR-29b Inhibitor Inhibitor NC

AACACUGAUUUCAAAUGGUGCUA CAGUACUUUUGUGUAGUACAA

其余材料同第二部分第一节



### 二、 方法

图2-18 慢病毒表达载体结构图

Figure 2-18 Expression lentivirus vector of miR-29b

#### 1. 细胞培养

同第二部分第一节

#### 2. 细胞瞬时转染

实验分4组，分别是Blank组、Inhibitor组（转染miR-29b inhibitor）、NC

组（转染miR-29b inhibitor NC）、NC-FAM组（转染miR-29b inhibitor NC-FAM，

67

该组设置目的是观察转染效率）。miR-29b inhibitor转染终浓度为100nM。实验步骤同第二部分第一节方法6。。

#### **3.** 实时荧光定量**PCR**

实验步骤同第一部分第二节方法4-6.。

#### 4. **CCK-8**细胞增殖实验

实验步骤同第二部分第一节方法8。。

#### 5. 细胞体外迁移实验

实验步骤同第二部分第一节方法5。。

#### 6. 细胞体外侵袭实验

实验步骤同第二部分第一节方法4。。

#### 7. 裸鼠皮下成瘤实验

抑制miR-29b表达慢病毒（LV-has-miR-29b-3p-inhibitor）及阴性对照病毒LV-CON053感染H460细胞，实验步骤同第二部分第一节。依据GFP标记利用流式细胞仪分选出阳性感染细胞。实时荧光定量PCR检测H460细胞感染慢病毒后miR-29b的表达。裸鼠皮下成瘤实验分三组：H460组、H460-miR-29b inhibitor组、H460-NC组，三组细胞分别注射到裸鼠左侧腋部皮下、右背腋皮下及左侧背部皮下，注射细胞数为1×l06个。动物实验步骤同第二部分第一节。

#### 8. 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行数据分析，实时荧光定量PCR、迁移实验和侵袭实验进行方差齐性检验和单因素的方差分析，方差齐采用oneway Anova，多重比较采用LSD法；方差不齐采用近似F检验的Welch法，多重比较采用Dunett's T3法；细胞体外生长实验采用析因设计的方差分析，多重比较采用LSD法；皮下成瘤实验采用重复测量数据的方差分析，取α= 0.05 为检验标准。

### 三、 结果

#### 1. miR-29b抑制后H460和A549-L细胞中miR-29b的表达变化

实时荧光定量PCR检测转染100nM miR-29b inhibitor 48h后H460和A549-L细胞中miR-29b的相对表达。结果表明，相对于Blank组与NC组，H460细胞在转染后miR-29b表达显著降低（*p*=0.005, *p*=0.014）；同样，A549-L细胞在转染后miR-29b表达也显著降低（*p*=0.011, *p*=0.027）（图2-18, 表2-11）. 表明miR-29b inhibitor

68

可以有效地抑制H460和A549-L细胞中miR-29b的表达。



图2-18 实时荧光定量PCR检测H460和A549-L细胞中miR-29b抑制后miR-29b的表达

Fig. 2-18 Expression folds of miR-29b knockdown cells detected by Real-time PCR

#### 2. miR-29b抑制后对H460和A549-L细胞体外增殖能力的影响

采用CCK-8法法检测miR-29b抑制后细胞体外增殖能力的变化，并绘制生长曲线。析因设计的方差分析结果显示，H460组、H460-miR-29b inhibitor组、H460-NC组三组细胞的增殖能力具有显著差异(F=86.935, *p* <0.001)（图2-19A, 表2-12），三组细胞生长时间水平具有显著差异（F=147.422, *p* <0.001），时间与分组之间交互效应显著(F=3.299, *p* =0.004)，H460-inhibitor组细胞较H460组、

H460-inhibitor NC组细胞增殖能力显著增强(*p* <0.001, *p* <0.001)。

A549-L组、A549-L- miR-29b inhibitor组、A549-L-NC组三组细胞的增殖能力具有显著差异(F=80.856, *p* <0.001) (图2-19B, 表2-13 )，三组细胞生长时间水平具有显著差异（F=428.013, *p* <0.001），时间与分组之间交互效应显著（F=4.134，*p*

=0.001），A549-L-inhibitor组细胞较A549-L组、A549-L-inhibito r NC组细胞增殖能力显著增强。说明抑制miR-29b能够增强癌细胞体外的增殖能力。

69





图2-19 MiR-29b inhiibitor处理后H460(A)及A549-L(B)细胞的体外增殖情况Fig. 2-19 Cell proliferation in vitro of H460(A) and A549-L(B) cell lines after inhibitor treatment of miR-29b inhibitor

#### 3. miR-29b抑制后H460和A549-L细胞体外迁移能力的变化

采用Transwell小室检测miR-29b抑制后细胞体外迁移运动能力的变化，结果发现H460组、H460-miR-29b inhibitor组、H460-NC组三组细胞迁移能力的差异具有显著性(F=44.107, *p* <0.001) (图2-20和表2-14 ). 与H460组、H460-NC组细胞相

比，H460-miR-29b inhibitor组细胞穿过膜的细胞数显著增多(*p* <0.001, *p* <0.001)，其迁移能力明显增强（图2-21）。

A549-L组、A549-L- miR-29b inhibitor组、A549-L-NC组三组细胞迁移能力的

70

差异具有显著性(F=463.750, *p* <0.001) (图2-20和表2-14 ). 两两比较发现，与A549-L组、A549-L-NC组细胞相比，A549-L -miR-29b inhibitor组细胞穿过膜的细胞数显著增多（*p* <0.001, *p* <0.001），其迁移能力明显增强（图2-21）。



图2-20 Transwell小室检测miR-29b抑制后H460和A549-L细胞迁移能力(放大倍数: X200(H460); X100(A549-L))

Fig. 2-20 Comparison of cell migration ability of H460 and A549-L cells transfected with miR-29b inhibitor cell lines with Transwell chamber(original magnification: X200(H460); X100(A549-L))



图2-21 miR-29b inhibitor处理后H460和A549-L细胞迁移能力

Fig. 2-21 migration ability of H460 and A549-L cells after transfected with miR-29b inhibitor

#### 4. miR-29b抑制后H460和A549-L细胞体外侵袭能力的变化

采用Boyden小室的方法分析miR-29b抑制后细胞体外侵袭能力的变化，结果

71

发现H460组、H460-miR-29b inhibitor组、H460-NC组三组细胞侵袭能力的差异具有显著性(F=30.898, *p* <0.001)(图2-22和表2-15 ). 与H460组、H460-NC组细胞相比，H460-miR-29b inhibitor组细胞穿过基质胶的细胞数显著增多（*p* <0.001, *p*

<0.001），其体外侵袭能力明显增强（图2-23）。

A549-L组、A549-L- miR-29b inhibitor组、A549-L-NC组组三组细胞侵袭能力的差异具有显著性(F=9.413, *p* <0.001) (图2-22和表2-15 ). 与A549-L组、

A549-L-NC组细胞相比，A549-L- miR-29b inhibitor组组细胞穿过基质胶的细胞数显著增多(*p* =0.002, *p* =0.004)，其体外侵袭能力明显增强（图2-23）。



图2-22 Boyden小室检测miR-29b抑制后H460和A549-L细胞侵袭能力(放大倍数: X200(H460); X100(A549-L))

Fig.2-22 Comparison of cell invasion ability of H460 and A549-L cells transfected with miR-29b inhibitor with Boyden chamber(original magnification: X200(H460); X100(A549-L))

72



图2-23 miR-29b inhibitor处理后H460和A549-L细胞迁移能力

Fig. 2-23 Invasion ability of H460 and A549-L cells after transfected with miR-29b inhibitor

#### 5. 抑制miR-29b慢病毒表达载体的鉴定和感染后H460细胞中miR-29b的表达鉴

定

将商品化的抑制miR-29b慢病毒表达载体质粒测序并同源比较，结果显示测序结果经Blast比对，与miR-29b互补序列完全一致（图2-24）。将miR-29b慢病毒与阴性对照病毒感染H460细胞，感染72小时后荧光显微镜下检测到H460细胞中均发绿色荧光（图2-25）。实时荧光定量PCR鉴定抑制miR-29b慢病毒表达载体感染

H460细胞中miR-29b的表达（表2-16）. 结果表明，与H460细胞和感染对照慢病毒LV-CON053后的H460细胞相比，感染LV-miR-29b-inhibitor后H460细胞中miR-29b表达均有显著降低（*p*=0.005, *p*=0.003）(图2-26)。



图2-24 抑制miR-29b慢病毒表达载体质粒测序结果图

Fig. 2-24 Partial sequencing map and blast results of miR-29b overexpressing lentiviral vector

73



图2-25 慢病毒感染目的细胞H460的荧光图（放大倍数：x100）

Fig. 2-25 Flurescent images of cell clones after lentivirus transfection(original magnification: X100)



图2-26 实时荧光定量PCR检测感染抑制miR-29b慢病毒表达载体后H460细胞中

miR-29b的表达倍数

Fig. 2-26 Expression folds of H460-miR-29b-inhibitor and NC detected by Real-time PCR

#### 6. miR-29b inhibitor对H460裸鼠移植瘤生长的影响

H460细胞、H460-NC细胞及H460-miR-29b细胞在裸鼠腋窝皮下接种后5天左右开始成瘤，20天后处死裸鼠摘除皮下肿瘤，测量肿瘤体积、重量。重复测量数据的方差分析结果显示：三组细胞在裸鼠皮下的成瘤能力具有显著差异

（F=17.267, *p*<0.001）(图2-17, 表2-10 )，三组细胞成瘤后的生长速度具有显著差异（F=41.778, *p*<0.001），时间与分组之间具有交互效应（F=2.057, *p*=0.036）；两两比较结果显示，H460-miR-29b-inhibitor细胞组较H460细胞组及H460-NC细胞组，瘤体重量与体积均显著增加（*p*=0.007, *p*=0.049; *p*<0.001, *p*<0.001）(表2-9, 表2-10 ). 说明抑制H460细胞中miR-29b表达后，能显著促进细胞在裸鼠体内的生长。

74





图2-17 MiR-29b inhibitor对裸鼠皮下成瘤的影响(A：裸鼠皮下肿瘤生成情况；B：肿瘤皮下生长曲线) (mean±SD)

Figure 2-17 Effects of miR-29b inhibitor on subcatenous tumor growth in vivo. A:Subcatenous tumor growth of nude mice . B: Growth curveof subcatenous tumor. The tumor diameter indicated as mean土SOof six mice (mean±SD)

75

# 讨 论

目前，对miRNA功能分析的方法包括体外或体内人为造成miRNA的上调或下调，以期发现相应的表型，揭示miRNA的功能。体外上调miRNA主要使用化学合成的miRNA前体或成熟体双链，体内则是通过构建转基因过表达载体实现。本研究中我们使用了成熟体双链miRNA模拟物(miRNA mimics)，它模拟生物体内内源的miRNAs，能直接进入内源miRNA 调节途径从而上调特定的

miRNA分子，增强内源性miRNA的功能，具有直接、高效和剂量容易控制等特性。同时我们还使用了慢病毒载体构建稳定过表达miR-29的非小细胞肺癌细胞株进行体内外实验。慢病毒载体(Lentiviral vector)是在HIV-1病毒基础上改造而成的病毒载体系统，它能高效的将目的基因（或RNAi）导入动物和人的原代细胞或细胞系[61]。慢病毒载体介导的基因表达作用持续且稳定，目的基因能整合到宿主细胞基因组中，并随细胞基因组的分裂而分裂。对miRNA基因沉默的方法包括对单个miRNA的敲除，及通过使用如morpholinos寡核苷酸，2’-甲氧修饰的寡核苷酸，LNA锚定核苷酸等反义核酸技术，miRNA海绵，siRNA的RNA干扰技术等实现下调miRNA。本研究中我们使用了miRNA inhibitor下调miR-29b的表达，获得loss-of-function表型，反向验证miR-29b的生物学功能。miRNA

inhibitor是一种与成熟miRNA配对互补的单链寡核苷酸，经化学修饰后（2’-甲氧修饰）可以阻止被核酸酶降解，专门抑制细胞中特异的靶miRNA。

第一部分我们鉴定了miR-29b在非小细胞肺癌中表达下调，但其表达下调是否影响非小细胞肺癌细胞的生物学特性尤其是非小细胞肺癌细胞的侵袭转移仍不明确。临床上肺腺癌的转移往往较肺鳞癌出现早，明确肺腺癌的转移机制尤为重要。然而至今缺乏一个良好的研究非小细胞肺癌转移的细胞模型，A549细胞是经典的人肺腺癌实验研究模型，因此，本研究中我们首先利用体外反复

transwell方法分离出高低转移能力的非小细胞肺癌细胞株A549-H和A549-L，作为后续试验的模型。这一方法已被研究者在多种肿瘤转移机制的研究中成功使用，建立的细胞株经体内外转移实验均显示它们的侵袭和转移能力有显著差异[62-68]。我们通过体外细胞迁移实验发现，A549-H和A549-L细胞穿过Transwell小室膜的细胞数目有显著差异(t=-32.220, *p*<0.001)，同样，细胞侵袭实验发现，A549-H和A549-L细胞穿过Boyden小室膜的细胞数目也有显著差异（t=-28.461，

76

*p*<0.001), A549-H细胞的迁移和侵袭能力显著高于A549-L细胞。利用实时荧光定量PCR检测A549-L和A549-H细胞中miR-29b的表达。结果显示，A549-L细胞中miR-29b的表达显著高于A549-H细胞(*p*=0.001)。

选取内源性低表达miR-29b的非小细胞肺癌细胞A549和A549-H以及内源性高表达miR-29b的非小细胞肺癌细胞H460和A549-L作为细胞学模型，从正反两方面检测miR-29b过表达或miR-29b抑制对非小细胞肺癌细胞的体内外侵袭转移的影响。首先，我们通过构建稳定过表达miR-29b的非小细胞肺癌细胞株A549-miR-29b-Clone2，以及在A549-H中转染miR-29b mimic，比较miR-29b过表达前后非小细胞肺癌细胞在增殖、迁移以及侵袭等方面的差异。结果显示：与

A549和A549-NC细胞组相比，A549-miR-29b-Clone2细胞组的增殖能力显著降低(F=124.596, *p*<0.001)；迁移运动能力显著降低（F=31.613, *p*<0.001）；体外侵袭能力显著降低（F=347.905, *p*<0.001）. 同样，与Blank和NC细胞组相比，A549-H细胞组在转染miR-29b mimic后增殖能力显著降低(F=10.343, *p*<0.001)；迁移运动能力显著降低(F=103.302, *p*<0.001)；侵袭能力显著降低(F=145.361, *p* <0.001). 说明过表达miR-29b抑制了非小细胞肺癌细胞的体外增殖、迁移和侵袭能力。接着，我们利用化学合成的miR-29b inhibitor，将内源性高表达miR-29b的非小细胞肺癌细胞H460和A549-L中的miR-29b下调或抑制，获得loss-of-function表型，反向验证miR-29b的生物学功能。结果显示：与Blank组与NC组比较，瞬时转染miR-29b inhibitor后H460和A549-L细胞组增殖速度显著加快(F=86.935, *p*<0.001; F=80.856, *p*<0.001)；迁移运动能力显著增强(F=44.107, *p*<0.001; F=463.750, *p* <0.001)；侵袭能力明显增强(F=30.898, *p* <0.001; F=9.413, *p*<0.001)。

说明miR-29b沉默能促进非小细胞肺癌细胞的体外增殖、迁移和侵袭能力。

通过构建稳定过表达miR-29b的非小细胞肺癌细胞株A549-miR-29b-Clone2和稳定抑制miR-29b表达的非小细胞肺癌细胞株H460-miR-29b inhibitor，比较miR-29b过表达或抑制前后非小细胞肺癌细胞在裸鼠体内成瘤的差异。裸鼠皮下接种后连续观察，20天后处死裸鼠摘除皮下肿瘤，称重并绘制皮下肿瘤生长曲线。结果表明，与A549和A549-NC细胞相比，A549-miR-29b-Clone2细胞裸鼠皮下成瘤重量显著减轻(Welch=24.125, *p*<0.001)，肿瘤生长速度显著减慢（F=29.782, *p* <0.001），体积也显著缩小(F=58.302, *p*<0.001)，miR-29b基因导入A549细胞后，能显著抑制细胞在裸鼠体内的生长。与H460和H460-NC细胞相

77

比，H460-miR-29b inhibitor细胞裸鼠皮下成瘤重量显著增加(Welch=16.773, *p*=0.002)，肿瘤生长速度显著减慢(F=41.778, *p*<0.001)，体积也显著缩小（F=17.267, *p*<0.001），抑制H460细胞中miR-29b表达后，能显著促进细胞在裸鼠体内的生长。说明miR-29b在体内可以抑制非小细胞肺癌细胞的增殖和成瘤能力。综上所述，我们从正反两个方面证明了miR-29b能抑制非小细胞肺癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力，它在非小细胞肺癌中可能扮演了抑癌基因的角色。

78

# 第三部分 **miR-29b**靶基因的鉴定

绝大多数的miRNAs通过碱基配对的方式结合到靶mRNA的3’UTR，抑制靶基因的翻译达到调控基因表达的目的，因此miRNA靶基因的鉴定是研究miRNA的生物学功能的关键。目前miRNA靶基因鉴定方法主要有：（1）生物信息学预测；（2）基因表达芯片筛选；（3）荧光素酶报告检测系统验证；（4）miRNA/mRNA间相互作用的功能学验证。

前期实验中，我们利用miRNA PCR芯片和肿瘤转移相关基因芯片相结合的方法，筛选出非小细胞肺癌差异表达的miRNAs谱和转移相关基因，综合生物信息学分析预测，转移相关基因PTEN、ETV4、COL4A2、MMP2等都是miR-29b的靶基因，鉴于PTEN、MMP2在肿瘤转移中的重要作用，因此我们对miR-29b是否调控PTEN和MMP2进行实验研究。

## 第一节 荧光素酶报告系统检测**MMP2**及**PTEN**与**miR-29b**

的相互作用

### 一、 材料

#### 1. 细胞、菌株、载体

人胚肾上皮细胞株HEK293A细胞引自广州医科大学中心实验室。大肠杆菌感受态DH-5α购自天根生物技术有限公司。双荧光素酶报告载体(psiCHECK™- 2, 如图3-1)由南方医科大学病理系梁莉副教授赠送。



图3-1 psiCHTEKC™-2质粒结构图

Fig. 3-1 The Map of psiCHIEKC™-2 Vector

79

#### **2.** 主要试剂

试剂名称品牌或生产厂家

RPMI 1640培养基Gibco公司

新生牛血清（NBS）Gibco公司

胰蛋白酶Gibco公司

青/链霉素Gibco公司

DNA聚合酶LA Taq大连TAKARA公司

胶回收试剂盒BioMIGA公司

质粒小提试剂盒TIANGEN公司

质粒中量提取试剂盒德国MN公司

核酸内切酶XhoⅠ、NotⅠ大连TAKARA公司

T4连接酶大连TAKARA公司

琼脂糖西班牙Biowest公司

DNA Marker大连TAKARA公司

胰蛋白酶膝和酵母提取物Gibco公司

定点突变试剂盒TOYOBO公司

Lipofectamine LTX Invitrogen公司

OPTI-MEM Invitrogen公司

RNA oligo上海吉玛公司

Dual-Luciferase Reporter Assay System Promega公司

#### **3.** 主要仪器

仪器名称品牌或生产厂家

微波炉格兰仕

制冰机星崎冷热机械有限公司

#### 4 ℃、-20℃低温冰箱西门子公司

-80℃低温冰箱Thermo公司

生化培养箱上海胜佳实验设备有限

公司

常温台式离心机Eppendorf公司

低温高速离心机Thermo公司

80

电子天平Sartorius公司

台式恒温水平摇床SHIPING公司

恒温循环水浴锅Eppendorf公司

隔水式恒温培养箱上海一恒科学仪器有限公司

Milli-Q纯水器美国Millipore公司

DNA水平电泳仪BioRad公司

PCR仪Biometra公司

凝胶成像系统BioRad公司

GloMax生物发光检测仪Promega公司

### 二、 方法

#### **1.** 目的基因MMP2-3’UTR和PTEN-3’UTR的扩增

1.1引物设计与合成

根据GeneBank登录的MMP2、PTENmRNA序列(NM-004530、NM-000314)，借助Primer5.0软件针对MMP2、PTEN基因的3’UTR序列设计引物，并分别在上、下游引物的5’端加上XhoⅠ、NotⅠ酶切位点和保护碱基，预计扩增产物长1200bp和1500bp，引物序列如下：

MMP2-3'UTR上游引物P1: 5'-AGTCTCGAGTCCACTGCCTTCGATACAC-3'

下游引物P2: 5'-AGTGCGGCCGCTTCAACTAATAATGGCCTTTT-3' PTEN-3'UTR上游引物P1: 5'-GTCTCGAGCAACTGAAGTGGCTAAAGAG-3'

下游引物P2: 5'-AGTGCGGCCGCTGAAGTTCTGCCTAATCTA-3

引物由上海invitrogen公司合成，参照说明书用灭菌ddH2O将引物稀释成

10µmol/L，分装后，-20℃保存备用。

1.2 PCR反应

以人基因组DNA为模板，用P1和P2引物扩增MMP2和PTEN基因的3’UTR序列，PCR反应体系如下：

Component Volume

TaKaRa LA Taq

10×LA PCR Buffer(Mg2+ free) MgCL2(25mM)

0.5µL

5µL

5µL

81

DNTP Mixture

模板DNA上游引物P1下游引物P2 ddH2O Total

8µL

2µL

1µL

1µL

27.5µL

50µL

反应条件：94℃预变性1min，循环参数：94℃30s，58℃(MMP2) 56℃(PTEN) 30s，72℃90s，共循环30次。

1.3 PCR产物的回收与纯化

按BioMIGA公司的胶回收试剂盒说明书操作，具体步骤如下：

1.3.1将PCR产物全部加入1%琼脂糖凝胶的加样孔中，电泳20min；

1.3.2在紫外灯下切下含目的DNA的琼脂糖凝胶；

1.3.3称量胶块的重量，加一倍体积的溶胶液GC Buffer（如100mg胶块对应100µL

溶胶液），60℃金属浴融化胶块8min，期间每隔2min震荡混匀一次；

1.3.4将DNA/GC Buffer溶液转移至离心柱中，12000rpm/min离心1min，弃去收集管中液体；

1.3.5加入500µL DNA Wash Buffer洗柱，12000rpm/min离心1min，弃去收集管中液体，再重复该步骤一次；

1.3.6 12000rpm/min再离心2min，以去除残留的乙醇，弃收集管；

1.3.7将离心柱放入一干净的1.5ml EP管中，加入30µL溶解液Elution buffer，室温静置2min，使DNA充分溶解，12000rpm/min离心1min；

1.3.8将含有目的DNA的1.5ml EP管置-20℃保存备用。

1.4 PCR产物的T克隆

1.4.1 MMP2和PTEN基因的3’UTR片段与pMD18-T Simple载体连接，连接反应体系如下：

Component Volume

pMD18-T Simple载体0.5µL

基因3’UTR片段4.5µL

ddH2O 0µL

Total 5µL

82

插入片段和载体DNA的摩尔比为2～10∶1；

1.4.2加入5µL含DNA连接酶的Solution I溶液，置PCR仪中，16℃反应过夜；

1.4.3全量（10µL）连接产物加至100µL JM109感受态细胞中，冰中放置30min；

1.4.4 42℃加热90s后，立即在冰中放置3min；

1.4.5加入890µL SOC培养基，37℃振荡培养60min，使细菌恢复生长状态，并表达抗性；

1.4.6 4000rpm/min将上述菌液离心5min；

1.4.7弃去多余上清，留取100µL，轻轻吹打混匀后，均匀涂布于

LB/Amp/IPTG/X-gal平板培养基上，37℃培养16h，形成单菌落。

1.5重组质粒pMD18-T simple-MMP2或PTEN基因的3’UTR的制备

按TIANGEN公司的质粒小提试剂盒说明书操作，具体步骤如下：

1.5.1依据蓝白斑实验原理筛选阳性菌落，未插入目的基因的细菌由于α互补作用，X-gal在IPTG诱导下分解LacZ基因产物，产生蓝色菌落，而重组菌由于目的基因的插入生成无α互补能力的氨基酸片断，形成白色菌落。从上述LB平板上随机挑取5个白色菌落，分别接种到含50µg/ml Amp的5ml LB液体培养基中，样品编号分别为pMD18-T simple-MMP2或PTEN基因的3’UTR 1～5, 37℃ ，

300rpm/min震荡培养15h；

1.5.2将装有菌液的2ml离心管置离心机中，12000 rpm /min离心1min，弃上清；

1.5.3加入250µL P1，重悬沉淀；

1.5.4加入250µL P2，温和颠倒混匀6～8次（反应不可超过5min）；

1.5.5加入350µL P3，立即温和颠倒混匀6～8次，14000rpm/min离心10min；

1.5.6将上清转移至吸附柱CP3中，12000rpm/min离心1min，弃收集管中的液体；

1.5.7加入600µl PW洗柱，12000rpm/min离心1min，弃收集管中的液体；

1.5.8加入600µL PE洗柱，12000rpm/min离心1min，弃收集管中的液体；

1.5.9 12000rpm/min再离心2min，以去除残留的乙醇，弃收集管；

1.5.10将离心柱放入一干净的1.5ml EP管中，加入50µL 37℃预热的溶解液Elution

buffer，室温放置3min，使DNA充分溶解；

1.5.11 12000rpm/min离心1min，收集洗脱液，标记后置-20℃保存。

1.6重组质粒pMD18-T simple- MMP2或PTEN基因的3’UTR的酶切及测序鉴定

1.6.1 XhoⅠ、NotⅠ双酶切反应体系为：

83

Component Volume

重组质粒pMD18-T simple-MMP2或PTEN基因的3’UTR 5µL 10×Quickcut Green Buffer 2µL

XhoⅠ1µL

NotⅠ1µL

ddH2O 11µL

Total 20µL

置PCR仪中，37℃反应30min；

1.6.2酶切产物经1%琼脂糖凝胶电泳20min后，在凝胶成像系统中观察并记录结果。

1.6.3选择双酶切鉴定为阳性的重组质粒送Invitrogen公司进行测序分析，以进一步验证序列的准确性。

#### **2.** 表达载体psiCHECK-2-MMP2或PTEN基因的3’UTR的构建

2.1重组质粒pMD18-T simple-MMP2或PTEN基因的3’UTR及空质粒psiCHECK-2

双酶切

2.1.1重组质粒pMD18-T simple-MMP2或PTEN基因的3’UTR双酶切反应体系：Component Volume

重组质粒pMD19-T simple-MMP2或PTEN基因的3’UTR 12µL

10×Quickcut Green Buffer 4µL

XhoⅠ2µL

NotⅠ2µL

ddH2O 20µL

Total 40µL

2.1.2质粒psiCHECK-2双酶切反应体系：

Component Volume

质粒psiCHECK-2(158.3ng/µL) 5µL 10×Quickcut Green Buffer 4µL

XhoⅠ2µL

NotⅠ2µL

ddH2O 27µL

Total 40µL

2.1.3将上述两管双酶切反应体系置PCR仪中，37℃反应30min。

84

2.2双酶切产物的回收与纯化

将两管双酶切产物分别加入1%琼脂糖凝胶的加样孔中，恒压100V，电泳20min后，使用BioMIGA公司的胶回收试剂盒分别回收并纯化MMP2或PTEN基因

3'UTR片段及线性化的质粒psiCHECK-2（方法同1.3）。

2.3 MMP2或PTEN基因3’UTR片段与质粒psiCHECK-2的连接连接反应体系如下：

Component Volume

MMP2或PTEN基因3’UTR片段（20ng/µl）8µL psiCHECK-2(68.3ng/µL) 2µL

T4 DNA连接酶2µL

10×T4 DNA Ligase Buffer 2µL

ddH2O 6µL

Total 20µL

置PCR仪中，16℃反应过夜。

2.4转化

2.4.1取10µL连接产物加至100µL DH5α感受态细胞中，冰中放置30min；

2.4.2 42℃加热90s后，立即在冰中放置3min；

2.4.3加入890µL SOC培养基，37℃振荡60min，使细菌恢复生长状态，并表达抗性；

2.4.4将上述菌液以4000rpm/min离心5min；

2.4.5弃去多余上清，留取100µL，轻轻吹打混匀后，均匀涂布于含Amp的LB平板培养基上培养16h，形成单菌落。

2.5重组质粒psiCHECK-2-MMP2或PTEN基因3’UTR的制备

2.5.1从LB平板上随机挑取4个菌落，分别接种到含50µg/ml Amp的5ml LB液体培养基中，样品编号分别为psiCHECK-2-MMP2或PTEN基因3’UTR1～4, 37℃，

300rpm/min震荡培养15h；

收集菌液，提取质粒（方法同1.5）。

2.6 重组质粒psiCHECK-2-MMP2或PTEN基因3’UTR的酶切鉴定（方法同1.6）。

#### 3. 表达载体突变型psiCHECK-2-MMP2或PTEN基因3’UTR的构建

3.1引物序列

85

突变引物的设计：

MutMMP2-3'UTR F: 5'-TAATATTGCCACACTTCAGGCTCTTCTCCTTT-3' mutMMP2-3'UTR R: 5'-GGGCAGCCCAAAGCAGGGCTGCGTTGAA-3' mutPTEN-1 F:

5'-CATTTTTTTTTAAAGCATATACCACGAAGAAAAGGCAGCTAAAGGAA -3' mutPTEN-1 R:

5'-TTCCTTTAGCTGCCTTTTCTTCGTGGTATATGCTTTAAAAAAAAATG-3' mutPTEN-2 F:

5'-TTCCATTTTCAATAACTTATACCACGAGAAATTGTTCACTAGCTGTG-3' mutPTEN-2 R:

5'-CACAGCTAGTGAACAATTTCTCGTGGTATAAGTTATTGAAAATGGAA-3'

3.2基因突变PCR

在0.2mL PCR反应管中配置以下两个体系，将引物都稀释为10pmol/ul，模板质粒DNA（重组质粒PsiCHECK-2-MMP2-3'UTR、PsiCHECK-2-PTEN-3'UTR）浓

度调整至50ng/ul. 构建重组质粒mutPsiCHECK-2-PTEN-3-3'UTR用突变成功的mutPTEN-1质粒作为模板，mutPTEN-2的引物作进行突变PCR. 反应体系如下: Component Volume

##### 2mM dNTP mixture 10×buffer for iPCR模板

引物引物

KOD plus ddH2O

2.5µL

2.5µL

0.5µL

0.75µL

0.75µL

1µL

17.5µL

混匀后，置于PCR扩增仪扩增。扩增条件如下：

94 °C 5 min

98 °C 30 sec

68°C 7min 30 sec

##### 4°C保存

8Cycles

3.3 PCR产物用DpnI酶切（以消化掉含甲基化的模板DNA）,在PCR管中加入 1

µL DpnI酶，在37°C消化2h。

86

3.4 PCR产物自身环化

3.4.1取出T4 Polynucleotide Kinase和Ligation high，冰浴融解。融解后，将Ligation

high轻轻搅拌均匀，spin down。

3.4.2取一个新的PCR管，如下配制反应液：

Component Volume

Dpn I处理后PCR产物

Ligation high

T4 Polynucleotide Kinase

灭菌蒸馏水

3.4.3轻轻搅拌均匀，spin down。

3.4.4 16℃反应1小时。

3.5转化，步骤同2.4

2Ul 5ul 1ul 7ul

3.6挑1个菌落提取质粒，步骤同2.5，部分质粒送Invitrogen公司进行测序分析。

#### 4. miRNA与质粒共转染细胞

采用阳离子脂质体法进行细胞转染，细胞转染试验组设置（每组数据设3个复孔）

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Group | microRNA | Plasmid | Liposome |
| MMP2 | ---- | 0.25µg | 1uL |
| Mut MMP2 | ---- | 0.25µg | 1uL |
| MiR29b mimic+ MMP2 | 50nM | 0.25µg | 1uL |
| MiR29b mimic+Mut MMP2 | 50nM | 0.25µg | 1uL |
| Mimic NC+ MMP2 | 50nM | 0.25µg | 1uL |
| Mimic NC+Mut MMP2 | 50nM | 0.25µg | 1uL |
| PTEN | ---- | 0.25µg | 1uL |
| Mut PTEN-1 | ---- | 0.25µg | 1uL |
| Mut PTEN-2 | ---- | 0.25µg | 1uL |
| Mut PTEN-3 | ---- | 0.25µg | 1uL |
| MiR-29b mimic + PTEN | 50nM | 0.25µg | 1uL |
| MiR-29b mimic +Mut PTEN-1 | 50nM | 0.25µg | 1uL |
| MiR-29b mimic +Mut PTEN-2 | 50nM | 0.25µg | 1uL |
| MiR-29b mimic +Mut PTEN-3 | 50nM | 0.25µg | 1uL |

87

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Mimic NC+ PTEN | 50nM | 0.25µg | 1uL |
| Mimic NC+Mut PTEN-1 | 50nM | 0.25µg | 1uL |
| Mimic NC+Mut PTEN-2 | 50nM | 0.25µg | 1uL |
| Mimic NC+Mut PTEN-3 | 50nM | 0.25µg | 1uL |

按照按照Lipofectamine LTX(invitrogen)说明书进行，具体实验步骤如下：

4.1转染前一天，细胞按2×104个/孔接种于48孔板上，培养基为含10%FBS 的

DMEM-高糖培养基；

4.2转染当天，细胞汇合度约为50-60%，吸去旧的培养基，用PBS洗涤两次，然后每孔加入100µL OPTI-MEM（Invitrogen公司）培养基，置于5% CO2、37℃培养箱中；

4.3每个孔用OPTI-MEM培养基稀释Lipofectamine LTX 1µL，终体积为50µL，室温下静置5min；

4.4每个孔用加入20uM浓度的miRNA0.5uL和0.25ug质粒，再加入OPTI-MEM

至总体积50µL，室温下静置5min；（最终孵育液中为50nM miRNA）

4.5复合（3）和（4）中的稀释液，室温下静置20min；

4.6每孔加入100µL转染复合液，轻轻晃动孔板稍加混匀；

4.7在5% CO2、37℃培养箱中孵育5hr，用新鲜的完全培养基（含血清）替换含有转染复合物的培养基。

#### 5. Lucifersae检测

用Promega公司的Dual-Luciferase Reporter Assay System（E1910）进行样品

Luciferase活性检测。

5.1转染48h后，吸去旧的培养基，用PBS清洗洗两次，每孔细胞加入65µL

的PLB（Passive Lysis Buffer），室温轻微振摇15分钟，收集细胞裂解液。

5.2使用手动的双萤光检测仪（Promega，GloMax生物发光检测仪）

5.2.1将20µl细胞裂解液加入发光板后，用GloMax生物发光检测仪读取背景值2s。

5.2.2每样品加入100µl LAR II工作液，快速混匀，读值2s。

5.2.3读值完毕后，每样品再加入100µl Stop & Glo®Reagent，快速混匀后，放入发光检测仪中，读值2s。

5.2.4保存数据。检测结果分析：活性倍数=(R/F)样品/(R/F)对照（F-萤火虫

88

萤光素酶，R-海肾萤光素酶）

#### 6. 统计分析

运用医学统计学软件SPSS 13.0进行统计分析，萤光素酶报告基因实验数据以mean±SD表示，多组间的均数比较采用单因素方差分析，方差分析前进行方差齐性检验，方差齐采用oneway Anova，多重比较采用LSD法；方差不齐采用近似F检验的Welch法，多重比较采用Dunett's T3法，取α＝0.05为检验标准。

### 三、 结果

#### 1. MMP2及PTEN基因的3'UTR区载体的构建

PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳，结果在1200bp和1500bp处出现清晰的条带（图3-2A），与预期的目的片段大小相符，说明MMP2 3'UTR和PTEN 3'UTR目的基因已成功扩增出来。酶切鉴定pMD18-T-MMP2 3'UTR载体和pMD18-T-

-PTEN 3'UTR载体，结果显示在1.2 kb与2.7kb、1.5kb与2.7kb处出现清晰的条带，分别对应MMP2及PTEN的3'UTR片段及T载体片段，片段大小正确（图3-2B）。挑取阳性克隆进行测序，测序结果BLAST分析：与NCBI上已知序列进行BLAST 100%一致，基因MMP2 3'UTR已成功克隆至T载体中（图3-3）；

PTEN的3'UTR区存在4处点突变，其中1处经SNP分析为SNP位点，另3处不在与miR-29b的结合位点上，因此不影响本实验的后期结果（图3-4）。酶切鉴定psiCHECK-2-MMP2 3'UTR与psiCHECK-2-PTEN 3'UTR载体，结果显示在

1.2 kb与6.7kb、1.5kb与6.7kb处出现清晰的条带，分别对应MMP2及PTEN 的

3'UTR片段及psiCHECK-2载体片段，片段大小正确（图3-5）。由此，我们成功构建了MMP2及PTEN基因的3'UTR载体。



图3-2 MMP2及PTEN 3'UTR区扩增(A)及连接产物酶切鉴定图(B)

89

Fig. 3-2 Gel electrophoresis PCR amplication(A) and Identification of enzyme digestion(B) of 3'UTR fragment of MMP2 and PTEN





图3-3 pMD18-T-MMP 3'UTR阳性克隆质粒测序图

Fig. 3-3 Sequencing map of pMD18-T-MMP2 3'UTR plasmid

90



91



图3-4 pMD18-T-PTEN 3'UTR阳性克隆质粒测序图

Fig. 3-4 Sequencing map of pMD18-T-PTEN 3'UTR plasmid



图3-5 重组质粒psiCHECK-2-MMP2或PTEN 3’UTR的酶切鉴定

Fig 3-5 Identification of psiCHECK-2-MMP2 3'UTR and psiCHECK-2-PTEN 3'UTR by restriction analysis. M: DNA marker DL 15,000; 1,2: psiCHECK-2-MMP2 3'UTR; 3,4: psiCHECK-2-PTEN 3'UTR

#### 2． MMP2 3’UTR区和PTEN 3’UTR区突变载体的构建

首先以野生型的MMP2 3'UTR片段为模版，用与miR-29b结合位点的突变引物进行定点突变，挑选阳性克隆（图3-6A）测序，BLAST比对结果显示miR-29b与MMP2 3'UTR结合位点序列由UGGUGCU成功突变为UAAUAUU（图3-7A）。载体命名为psiCHECK-2- Mut-MMP2 3'UTR。

Targetscan 预测miR-29b与PTEN 3'UTR有两个结合位点，位置分别在676～

683bp和1741～1747bp处。首先以野生型的psiCHECK-2-PTEN 3'UTR为模版，用miR-29b第一个结合位点突变引物进行定点突变，载体命名为psiCHECK-2- Mut-1-PTEN 3'UTR. 然后以野生型的psiCHECK-2-PTEN 3'UTR为模版，用miR-29b第二个结合位点突变引物进行定点突变，载体命名为psiCHECK-2- Mut-2-PTEN 3'UTR. 最后以psiCHECK-2- Mut-1-PTEN 3'UTR为模版，用miR-29b 第二个结合位点突变引物进行二次突变，突变后载体为psiCHECK-2-

92

Mut-3-PTEN 3'UTR。双酶切结果挑选到阳性克隆（图3-6B），对阳性克隆质粒进行测序，BLAST比对结果显示miR-29b与PTEN 3'UTR两个结合位点均已完全突变，这三个载体可以用于后续荧光素酶检测实验（图3-7B, C, D）。



图3-6 突变型重组质粒psiCHECK-2-MMP2 3’UTR(A)或psiCHECK-2-PTEN

#### 3 ’UTR(B)的酶切鉴定

Fig. 3-6 Identification of psiCHECK-2-MMP2 3'UTR(A) and psiCHECK-2-PTEN 3'UTR(B) by restriction analysis. (A: M: DNA marker DL 10,000; 1: psiCHECK-2- Mut-MMP2 3'UTR) (B: M: DNA marker DL 10,000; 1: psiCHECK-2- Mut-1-PTEN 3'UTR;2: psiCHECK-2- Mut-2-PTEN 3'UTR; 3: psiCHECK-2- Mut-3-PTEN 3'UTR





93





图3-7 突变质粒psiCHECK-2-MMP2 3’UTR(A) and psiCHECK-2-PTEN

3'UTR(B, C, D)测序与miR-29b的结合位点（绿色）

Fig. 3-7 Partial sequencing map containing the binding site of psiCHECK-2- Mut-MMP2 3’UTR(A) and psiCHECK-2- Mut-1-PTEN 3’UTR(B), psiCHECK-2-

Mut-2-PTEN 3'UTR(C), psiCHECK-2- Mut-3-PTEN 3'UTR(D) with miR-29b

3．荧光素酶报告系统检测miR-29b与MMP2 3'UTR、PTEN 3'UTR区的结合情况

在转染MMP2基因3’UTR载体实验组中，两两比较显示：miR-29b mimic

组与Blank组、NC组相比荧光素酶活性均显著降低(*p* =0.023, *p* =0.018)，说明

mi29b能与MM2基因3’UTR结合，从而抑制了荧光素酶的活性。在转染MMP2

基因3’UTR突变载体的实验组中，两两比较显示：miR-29b mimic组与blank组、

NC组相比荧光素酶活性无显著差异(*p* =0.166, *p* =0.111)，说明miR-29b不能与突变的MMP2 3'UTR结合，无法抑制荧光素酶的活性（图3-8A, 表3-1）。

94

在转染克隆有PTEN基因3’UTR质粒的实验中，结果进行单因素方差分析两两比较发现：miR-29b mimic组与空白组、NC组相比，荧光素酶活性均显著降低(*p*=0.000, *p*=0.031)，证明hsa-miR-29b能与PTEN基因3’UTR结合，从而抑制萤光素酶的活性。转染psiCHECK-2- Mut-1-PTEN 3'UTR质粒的实验中，miR-29b组与空白组、NC组相比，荧光素酶活性均显著降低(*p*=0.000, *p*=0.000)，证明hsa-miR-29b能与结合，从而抑制萤光素酶的活性。转染psiCHECK-2- Mut-2-PTEN 3'UTR质粒的实验中，miR-29b组与空白组、NC组相比，荧光素酶活性均显著降低(*p*=0.000, *p*=0.000)，证明hsa-miR-29b能与psiCHECK-2- Mut-2-PTEN 3'UTR结合，从而抑制萤光素酶的活性。转染psiCHECK-3- Mut-2-PTEN 3'UTR质粒，miR-29b组与空白组和NC组相比较，*p*=0.540，*p*=0.238，无统计学意义，说明结合位点突变完全，hsa-miR-29b不能通过结合PTEN突变体3影响其荧光活性改变（图3-8B, 表3-2）。



95



图3-8 荧光素酶报告基因活性检测miR-29b与MMP2 3’UTR(A)或PTEN 3’UTR(B)

的结合情况(mean±SD, \*miR-29b组与NC组及Blank组相比，*p*<0.05)

Fig 3-8 The binding ability of miR-29b with MMP2 3’UTR(A) or PTEN 3’UTR(B) detected by luciferase activity(mean±SD, \* *p*<0.05)

96

## 第二节 **miR-29b**靶向调控基因**MMP2**的表达

### 一、 材料

#### **1.** 细胞

人非小细胞肺癌细胞株A549细胞引自广州医科大学中心实验室，人非小细胞肺癌细胞株A549-H和A549-L细胞为本教研室自存，人非小细胞肺癌细胞株

H460细胞引自南方医科大学中心肿瘤研究所。

#### **2.** 主要试剂

试剂名称品牌或生产厂家

DMEM basic培养基Gibco公司

TRIzol Invitrogen公司

TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit ABI公司 TaqMan® MicroRNA Assays ABI公司 TaqMan® Universal Master Mix, No AmpErase® UNG ABI 公司 Lipofectamine RNAiMAX Invitrogen 公司

PrimeScript®RT reagent Kit大连Takara公司

SYBR® Premix Ex TaqTM II 大连 Takara 公司

DEPC Sigma 公司

蛋白裂解液RIPA上海碧云天

蛋白酶抑制剂PMSF上海碧云天

BCA蛋白含量检测试剂盒南京凯基

30%丙烯酰胺上海碧云天

1.5M Tris PH8.8上海碧云天

1.0M Tris PH6.8上海碧云天

蛋白预染Marker Fermentas公司

6×Loading Buffer上海碧云天

一抗稀释液上海碧云天

MMP2 抗体 美国 CST 公司

PTEN 抗体 美国 CST 公司

GAPHD 抗体 美国 CST 公司

97

HRP标记的羊抗兔二抗美国CST公司

NC膜Merck-Milipore公司

ECL化学发光液Pierce公司

其余试剂同第三部分第一节

#### **3.** 主要仪器

仪器名称品牌或生产厂家

倒置相差显微镜Olympus公司

光学显微镜Olympus公司

超净工作台苏州安泰公司

Casy全自动细胞分析仪Roche公司

微量紫外分光光度计NanoDrop®ND-2000

荧光定量PCR仪ABI 7500

精密数显PH计Mettler-Toledo公司

垂直电泳装置美国Bio-Rad公司

转移电泳装置美国Bio-Rad公司

DYY 6C稳压稳流电泳仪美国Bio-Rad公司

TS-1型脱色摇床苏州培英公司

化学发光成像系统

其余仪器同第三部分第一节

### 二、 方法

1. 细胞培养

同第一部分第二节方法1。。

2. 瞬时转染

同第二部分第一节方法6。与第二节方法2。。转染后48h检测目的基因mRNA

水平，72h检测目的基因蛋白水平。

**3.** 实时荧光定量**PCR**

3.1培养细胞总RNA提取及质量检测

实验步骤同第一部分第二节方法4。。

3.2 cDNA合成

Small RNA 的反转录方法同第一部分的第二节；mRNA 的反转录按照

98

PrimeScript®RT reagent Kit（Takara）说明书进行，具体操作如下：

3.2.1按下列组份配制RT反应液（反应液配制请在冰上进行）。

Component Volume

5×PrimeScript® Buffer(for Real Time) 2 µl PrimeScript® RT Enzyme Mix I 0.5 µl

Oligo dT Primer(50 µM) 0.5 µl

Random 6 mers(100 µM) 0.5 µl

Total RNA up to 500ng

RNase Free dH2O up to 10 µl

3.2.2反转录反应条件如下：37℃15 min（反转录反应）

85℃5 sec（反转录酶的失活反应）

3.3 PCR 扩增

MMP2和PTEN实时荧光定量PCR引物如下：ID Sequence(5'-3')

MMP2-F CTCATCGCAGATGCCTGGAA

MMP2-R TTCAGGTAATAGGCACCCTTGAAGA PTEN-F TAGAGCGTGCAGATAATGACAAGGA PTEN-R TGAACTGCTAGCCTCTGGATTTGA

Small RNA的反转录方法同第一部分的第二节；mRNA的反转录合成cDNA按照SYBR®Premix Ex TaqTM II（Takara）说明书进行，具体操作如下：

3.3.1按下列组份配制PCR反应液（反应液配制请在冰上进行）。

Component Volume

SYBR®Premix Ex TaqTM II（2×）10µl PCR Forward Primer(10µM) 0.8µl PCR Reverse Primer(10 µM) 0.8µl ROX Reference Dye or Dye II(50×) 0.4µl RT 反应液（cDNA 溶液） 2µl

dH2O（灭菌蒸馏水）6µl

Total 20µl

3.3.2进行Real Time PCR 反应。

99

两步法PCR扩增标准程序：

Stage 1: 预变性Reps: 1

95℃30 秒

Stage 2: PCR反应

Reps: 40 95℃5 秒

60℃34 秒\*

**4. Western blot**

4.1培养细胞蛋白提取

按照南京凯基公司的总蛋白提取试剂盒说明书进行，步骤如下：

4.1.1在每1mL冷Lysis Buffer加入10µL磷酸酶抑制剂，1µL蛋白酶抑制剂和5µL 100mMPMSF，混匀。冰上保存数分钟待用。

4.1.2吸去培养基后，加入5mL/60mm培养板的冷PBS洗贴壁培养的细胞两次，每次振摇数次后尽量去除培养液。

4.1.3细胞洗涤后，加入上述配制好的冷Lysis Buffer，加入量0.2mL～

0.5mL/5×106个。

4.1.4置于4℃摇床平台上，温和振荡15 min；

4.1.5细胞刮子刮下的贴壁细胞，将细胞及裂解液移至离心管中，12, 000g，

4℃离心15min，取上清为全蛋白提取物。

4.1.6加入适量体积的6×SDS-PAGE loading buffer,煮沸变性10min。

4.1.7分装保存于-70℃，避免反复冻融。

4.2蛋白定量

蛋白质定量采用BCA法，根据南京凯基公司的BCA法蛋白质定量试剂盒说明书进行操作，步骤如下：

4.2.1标准曲线的绘制：取一块酶标板，按照下表加入试剂

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 孔号 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 蛋白标准溶液（µL） | 0 | 1 | 2 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 |
| 去离子水（µL） | 20 | 19 | 18 | 16 | 12 | 8 | 4 | 0 |
| 对应蛋白含量（µg） | 0 | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 4.0 | 6.0 | 8.0 | 10.0 |

100

4.2.2根据样品数量，按50体积BCA试剂A加1体积BCA试剂B（50:1）配制适量BCA工作液，充分混匀；

4.2.3各孔加入200µL BCA工作液；

4.2.4把酶标板放在振荡器上振荡30sec，37℃放置30分钟，然后在562nm

下比色测定。以蛋白含量（µg）为横坐标，吸光值为纵坐标，绘出标准曲线；

4.2.5稀释待测样品至合适浓度，使样品稀释液总体积为20µL，加入BCA

工作液200µL，充分混匀，37℃放置30分钟后，以标准曲线0号管做参比，在

562nm波长下比色，记录吸光值；

4.2.6根据所测样品的吸光值，在标准曲线上即可查得相应的蛋白含量（µg），除以样品稀释液总体积（20µL），乘以样品稀释倍数即为样品实际浓度（单位：

µg/µL）。

4.3免疫印迹

4.3.1安装好凝胶装置，配制10%分离胶，迅速充分混匀各组分，小心灌注入玻璃板夹层中（避免形成气泡），上端预留3cm空间以备灌注积层胶，并用ddH2O封顶；在分离胶与水之间出现明显界线说明凝胶完全凝固（约45min）,凝固后吸净上层水；

4.3.2配制5%浓缩胶，小心灌注于分离胶之上直至灌满，插入梳子，室温下放置待凝固（约35min）。

4.3.3 SDS-PAGE电泳：将凝胶模具置电泳槽中，加入适量1×电泳缓冲液，小心拔出梳子，按顺序在加样孔中分别加入25µg已变性的待测样品总蛋白及预染蛋白Marker；连接电源，恒压70V，电泳30min后，溴酚蓝染料从浓缩胶进入分离胶时，改为恒压110V，电泳约1h， 溴酚蓝染料到达凝胶底部时，停止电泳。

4.3.4转膜：电泳结束前准备好转膜缓冲液，同时根据凝胶大小准备1张NC膜和2张加厚滤纸，将膜和滤纸均放入转膜缓冲液中浸泡；电泳结束后将凝胶取下，做好标记，按“纤维垫-1张厚滤纸-NC膜-凝胶-1张厚滤纸-纤维垫”的顺序依次叠放，制备转膜“三文治”，每一层均确保对齐且没有气泡；将“三文治”置转膜装置中，凝胶的一边靠近负极，而NC膜的一边靠近正极，加满1×转膜缓冲液，连接电源，恒流300mA，转膜1h；转膜结束后，取出NC膜标记正面，置于TBS缓冲液中。

4.3.5免疫反应：将上述NC膜置于3%BSA封闭液中，置摇床上，室温封闭

101

#### 2 h；弃封闭液，加入用3%BSA封闭液分别按1∶1000稀释的兔抗人MMP2、PTEN、

GAPDH抗体，4℃孵育过夜；TBST缓冲液洗膜3次，每次10min；加入用3%BSA

封闭液分别按1∶1000稀释的羊抗兔HRP标记的二抗，置摇床上，室温孵育1h；

TBST缓冲液洗膜3次，每次10min；

4.3.6化学发光及曝光：按A液、B液体积比1∶1配制化学发光液（注意避光），将其平铺于NC膜上，避光反应2min；将NC膜置化学发光成像系统中曝光

#### 1 min，并拍照记录。

4.3.7蛋白条带分析：用凝胶扫描成像系统进行半定量分析：以GAPDH为内参照，观察各组样品中目的蛋白的表达情况；用图像分析系统测定各蛋白条带的灰度值V值（Volume=平均光密度值×条带面积）；计算同一样品中目的蛋白和

GAPDH条带V值之比，反应出该样品中目的蛋白的表达水平。

5. 统计学分析

所有数据采用SPSS13.0统计软件包进行统计处理，实时荧光定量PCR结果进行方差齐性检验和单因素的方差分析；miR-29b表达经正态性检验不服从正态分布，MMP2与miR-29b表达相关性分析采用Spearman相关分析；Western blot实验数据以mean±SD表示，多组间的均数比较采用单因素方差分析，方差分析前进行方差齐性检验，方差齐采用oneway Anova，多重比较采用LSD法；方差不齐采用近似F检验的Welch法，多重比较采用Dunett's T3法，取α＝0.05为检验标准。

### 三、 结果

1. miR-29b负调控MMP2的表达

检测稳定表达miR-29b的A549-miR-29b-clone2细胞及其阴性对照A549-NC

细胞、A549细胞中MMP2 mRNA和蛋白的表达，结果显示，三组细胞之间MMP2

mRNA和蛋白的表达均有显著差异(F=19.372, *p*=0.002; F=146.189, *p*<0.001)，两两比较发现，与A549-NC细胞、A549细胞相比，A549-miR-29b-clone2细胞中MMP2 mRNA 和蛋白的表达均显著降低（*p*=0.001, *p*=0.008; *p*<0.001 ，

*p*<0.001)(图3-19A, 图3-10AB). 将miR-29b mimic转染至内源性低表达miR-29b的A549-H细胞中，结果发现，与NC组相比，转染48h后，A549-H细胞中miR-29b表达显著升高（*p*<0.001）(图2-8, 表2-4), MMP2 mRNA表达显著下调(*p*=0.048)(图

102

3-9A，图3-10AB), 72h后，MMP2蛋白表达也显著降低(*p*<0.001) (图3-9A，图

3-10AB). 说明miR-29b可负调控MMP2的表达。

将miR-29b inhibitor转染至内源性高表达miR-29b的H460和A549-L细胞中，转染48h后，H460和A549-L细胞中miR-29b表达显著降低(F=10.176, *p*=0.012; F=7.321, *p*=0.025) (图2-16, 表2-11). 实时荧光定量PCR检测H460细胞转染后MMP2 mRNA的表达，结果显示，三组细胞之间MMP2 mRNA的表达均有显著差异(F=48.327, *p*=0.001)，两两比较发现，与Blank组和NC组相比，miR-29b抑制后的H460细胞中MMP2 mRNA表达显著上调(*p*=0.017, *p*=0.014)，

72h后，Western blot检测MMP2 蛋白表达也显著增强(*p*<0.001, *p*<0.001) (图

3-9B，图3-10CD）。检测A549-L细胞miR-29b抑制后MMP2 mRNA和蛋白的表达，结果显示，三组细胞之间MMP2 mRNA 和蛋白的表达均有显著差异

（F=59.997, *p*=0.001; F=25.384, *p*=0.018），两两比较发现，与Blank组和NC组相比，miR-29b抑制后的细胞中MMP2 mRNA表达显著上调(*p*<0.001, *p*=0.001)，

72h后，MMP2蛋白表达也显著增强(*p*=0.037, *p*=0.033) (图3-9B, 图3-10CD). 这说明miR-29b可负调控MMP2的表达。



图3-9 实时荧光定量PCR检测转染miR-29b oligo后非小细胞肺癌细胞中MMP2

mRNA 的表达(mean±SD, *p*<0.05)

Fig.3-9 Expression folds of MMP2 mRNA of NSCLC cells after transfected with miR-29b oligo detected by Real-time PCR(mean±SD, *p*<0.05)

103





图3-10 Western blot检测转染miR-29b oligo后非小细胞肺癌细胞中MMP2蛋白的表达。A: Western blot图; B: 各组细胞MMP2蛋白的表达倍数

Fig. 3-10 Western blot analysis showed the expression of MMP2 protein in NSCLC cells after transfected with miR-29b oligo. A: Image of Western blot. B: MMP2 expression folds of NSCLC cells.

#### 2. miR-29b可与PTEN 3’UTR直接结合影响PTEN蛋白的表达

检测稳定表达miR-29b的A549-miR-29b细胞及其阴性对照A549-NC细胞、

A549细胞中PTEN mRNA和蛋白的表达，结果显示，三组细胞之间PTEN mRNA和蛋白的表达均无显著差异(F=4.835, *p*=0.056; F=1.041, *p*=0.409)(图3-11A, 图3-12AB). 将miR-29b mimic转染至内源性低表达miR-29b的A549-H细胞中，结果发现，Blank组、NC组、A549-H-miR-29b mimic组三组细胞中PTEN mRNA和蛋白表达均没有显著改变(F=0.320, *p*=0.738; F=3.599, *p*=0.173) (图3-11A, 图3-12AB). PTEN蛋白表达水平改变虽没有显著差异，但过表达miR-29b后可见A549和A549-H细胞中PTEN蛋白表达出现下调趋势（表3-5）。

将miR-29b inhibitor转染至内源性高表达miR-29b的H460和A549-L细胞中，实时荧光定量PCR检测H460和A549-L细胞转染后PTEN2 mRNA的表达，结果显示，Blank组、NC组、miR-29b inhibitor组三组处理的H460和A549-L细胞之间PTEN mRNA的表达均没有显著差异(F=0.541, *p*=0.608; F=1.142, *p*=0.380) (图3-11B, 表3-5)；转染72h后，Western blot检测各组细胞中PTEN蛋白的表达，结果显示，H460和A549-L细胞的Blank组、NC组、miR-29b inhibitor组三组细胞之间PTEN蛋白的表达没有显著差异(F=1.179，*p*=0.370；F=3.040，

104

*p*=0.196）(图3-12CD). PTEN蛋白表达水平改变虽没有显著差异，但抑制内源性miR-29b表达后可见H460和A549-L细胞中PTEN蛋白表达出现上调趋势（表3-5）。



图3-11 实时荧光定量PCR检测转染miR-29b oligo后非小细胞肺癌细胞中PTEN

mRNA的表达

Fig. 3-11 Expression folds of PTEN mRNA of NSCLC cells after transfected with miR-29b oligo detected by Real-time PCR





图3-12 Western blot检测转染miR-29b oligo后非小细胞肺癌细胞中PTEN蛋白的表达。A: Western blot图; B: 各组细胞PTEN蛋白的表达倍数

Fig. 3-12 Western blot analysis showed the expression of PTEN protein in NSCLC cells after transfected with miR-29b oligo. A: Image of Western blot. B: PTEN expression folds of NSCLC cells.

105

3. miR-29b与MMP2在4种非小细胞肺癌细胞株中表达的相关性分析

利用实时荧光定量PCR检测miR-29b在4种非小细胞肺癌细胞株中的表达，结果显示miR-29b在A549-L、A549、H460和A549-H 4种非小细胞肺癌细胞株中的表达有显著差异(F=5.293, *p* =0.0,27), miR-29b在H460细胞中的表达最高，在A549-L、A549、H460细胞中的表达逐渐降低（图3-13, 表3-7）。

利用Western blot检测MMP2在4种非小细胞肺癌细胞株中的表达，结果显示MMP2在A549-H细胞中的表达最高，在A549-L、A549、H460细胞中的表达逐渐降低(（图3-14, 表3-8）)。

利用Quantity One灰度软件将MMP2蛋白的Western blot结果进行条带灰度分析，然后与miR-29b实时荧光定量PCR结果进行Spearman相关性分析，结果显示二者存在显著的负相关关系(r=-0.902, *p* =0.000)。



图3-13 实时荧光定量PCR检测非小细胞肺癌细胞株中miR-29b的表达(mean±SD) Fig.3-131 Expression of miR-29b in 4 NSCLC cells by Real-time PCR(mean±SD)



图3-14 Western Blot检测MMP2在4种非小细胞肺癌细胞株中的表达。A: Western

blot图；B: 各细胞中MMP2蛋白的表达倍数

Fig. 3-14 Expression of MMP2 in 4 NSCLC cell lines by Western blot. A: Image of Western blot. B: MMP2 expression folds of 4 cell lines

106

# 讨 论

荧光素酶报告检测系统是目前常用的验证miRNA与靶基因间直接相互作用的方法，是一种快速的、可重复的消除生物信息学预测结果假阳性的有效工具。其判定标准是miRNA与其特异靶基因结合位点结合后，将抑制报告基因的表达。本研究中，我们利用该系统分别检测了miR-29b与MMP2和PTEN 3'UTR区的结合情况，结果发现miR-29b与MMP2 3'UTR有一个结合位点，miR-29b可直接与野生型MMP2 3'UTR结合从而抑制海肾荧光素酶活性，而在定点突变MMP2

#### 3 ’UTR中miR-29b结合位点后，这种抑制作用消失。说明miR-29b可直接与MMP2

3'UTR结合。miR-29b与PTEN 3'UTR有两个结合位点，miR-29b可以和野生型PTEN 3'UTR直接结合从而抑制荧光素酶活性，突变任何一个miR-29b的结合位点都不能完全逆转其抑制荧光素酶活性，只有将miR-29b和PTEN相结合的两个位点均进行定点突变后，则miR-29b不能与PTEN的3’UTR区结合，不能抑制荧光素酶的活性。说明miR-29b通过两个结合位点和PTEN 3'UTR直接结合。MMP-2是MMPs超家族成员之一，它能特异性降解细胞外基质和基底膜中

的主要成分IV型胶原，在肿瘤侵袭和血管新生过程中发挥重要作用[69]。研究表明，MMP2在非小细胞肺癌中高表达，且与临床分期、病理分级、淋巴结转移及预后密切相关，是判断患者预后不良的一个独立因子[70, 71]。Fang等[72]发现miR-29b在肝癌组织和细胞中表达下调，其可通过负调控靶基因MMP2影响细胞的侵袭能力。由于同一个miRNA在不同的微环境中发挥着不同的调控机制。在造血系统肿瘤、肝癌、胃癌、前列腺癌中，miR-29b是抑癌miRNA，而在乳腺癌中miR-29b是促癌miRNA. miR-29b在乳腺癌组织中表达上调，且在有淋巴结转移的乳腺癌中的表达高于无淋巴结转移的乳腺癌，发挥类似癌基因的作用[73, 74]。我们前期发现miR-29b在非小细胞肺癌组织中扮演了抑癌基因的角色，本研究中，我们观察了过表达和沉默miR-29b对非小细胞肺癌细胞中MMP2的表达的影响，结果发现，与NC组和Blank组相比，不管是将miR-29b基因稳定导入A549细胞后，还是A549-H细胞瞬时转染miR-29b mimic后，细胞中MMP2

mRNA表达显著下调，MMP2蛋白表达也明显减弱。将miR-29b inhibitor转染至内源性高表达miR-29b的H460和A549-L细胞中，结果发现，与NC组和Blank组相比，转染后H460和A549-L细胞中miR-29b表达显著降低，MMP2 mRNA

107

表达显著上调，MMP2蛋白表达也明显增强。这说明miR-29b可负调控MMP2的表达。这一负性调控关系与miRNA介导的转录后水平调控相符。我们推测，在非小细胞肺癌中，miR-29b下调导致了MMP2蛋白表达增强，后者促进细胞外基质和基底膜发生降解，从而促进了肿瘤侵袭转移。

PTEN是1997年发现的第一个具有双重特异性磷酸酶活性的抑癌基因，通过负调控PIP3/Akt、FAK、MAPK等多种信号传导途径来调节肿瘤细胞生长、细胞周期、细胞凋亡、迁移和侵袭[75]。研究表明，PTEN功能缺失与人类多种肿瘤包括肺癌的发生、发展、转移和预后存在密切的联系[76]。Wang等[74]研究发现miR-29b可抑制PTEN蛋白表达影响乳腺癌细胞侵袭和迁移，但没有验证PTEN是否是miR-29b的靶点。我们通过荧光素酶检测系统验证miR-29b可以和PTEN

3'UTR两个结合位点直接结合。进一步检测过表达或抑制miR-29b对非小细胞肺癌细胞中PTEN基因表达的影响，结果显示，与NC组和Blank组相比，过表达miR-29b的A549和A549-H细胞和抑制miR-29b的H460和A549-L细胞中PTEN mRNA表达没有明显变化，PTEN蛋白表达水平改变也没有显著差异。对这种miRNA与靶基因相互作用的结构学验证和功能学验证结果不一致的现象，我们分析有两种可能：一、荧光素酶检测系统只能初步证明miRNA对靶基因3'

UTR存在相互作用，但不能最终确定该miRNA是否能够对靶基因存在内源性的调控，这种报告检测系统也存在“假阳性”的可能性。Zhao Y等[77]用荧光素酶检测系统证实miR-1对融合胸腺素β4基因3' UTR的报告基因具有显著的抑制作用，但是过表达miR-1的转基因小鼠中并没有发现胸腺素β4蛋白表达的变化。二、由于miRNA与其调控的mRNA并非一对一的关系，一个miRNA可以调控多个靶基因，一个靶基因受到多个miRNA 的调控。我们推测可能有其他一些

miRNA也可直接与PTEN 3'UTR结合，与miR-29b一起参与PTEN基因表达的调控。已报道PTEN还是miR-21[78]，miR-216a，miR-217[79]，miR-222/221[80]，miR-26a[81]，miR-214[82]，miR-494[83]，miR-144[84]，miR-153[85]的靶基因，而且miR-21, miR-214，miR-222/221, miR-494在非小细胞肺癌中表达上调。然而，

Li等[86]在非小细胞肺癌细胞H358中发现过表达miR-29b可引起细胞PTEN蛋白表达增强，认为miR-29b通过直接抑制DNA甲基化转移酶，继而使PTEN启动子去甲基化，间接调控PTEN表达。这与我们发现的过表达miR-29b对PTEN蛋白表达有下调趋势的结果相反。这种现象可能与miRNA所处的细胞微环境有关。

108

H358细胞是一个p53完全缺失的非小细胞肺癌细胞，在H358中miR-29b对PTEN的调控机制是不依赖p53活性的[86]。但A549和H460细胞均有p53表达，研究表明miR-29b可通过直接靶向p85a（PI3K的一个调节亚基）和CDC42（一个

Rho家族的GTPase）这两个负向调控p53的分子，进而激活p53的表达[87]。p53是PTEN转录的激活子，它直接结合PTEN启动子，转录激活PTEN的表达[88]。因此，PTEN基因不仅受到miR-29b-p53-PTEN间接的正向调控，还受到miR-29b直接的负向调控，这也可能是本研究中过表达或抑制miR-29b后，非小细胞肺癌细胞中PTEN基因的蛋白表达没有显著改变的原因。

为了进一步证实MMP2基因是miR-29b的一个靶基因，我们用实时荧光定量PCR检测miR-29b在4种非小细胞肺癌细胞株中的表达，用Western Blot检测相应细胞的MMP2蛋白的表达，并进行spearman相关性分析。研究发现，miR-29b的表达量从高到低依次是：H460、A549-L、A549、A549-H，MMP2表达量从高到低依次是：A549-H、A549、A549-L、H460，在这4种非小细胞肺癌细胞株中，miR-29b和MMP2的表达之间存在显著的负相关关系。迄今为止，己知miR-29b的靶基因包括Tcl1[50]、Bcl-2[89]、Mcl-1[90-92]、p85a和CDC42[93]、

Ppm1d[94]、B-Myb[95]、SP1[52]、DMNT3A、DNMT3B[53]、CDK6[96]、PDPN[97]等，

miR-29b在肿瘤中的作用有：（1）通过靶向抗凋亡蛋白如Bcl-2, Mcl-1等调控细胞凋亡；（2）通过靶向Ppm1d、B-Myb等调控细胞衰老与分化；（3）通过靶向DNMT和SP1等调节基因的表观遗传修饰；（4）通过抑制靶基因CDK6的表达调节细胞周期，从而调控癌细胞的增殖；（5）通过靶基因PDPN调控癌细胞的迁移和侵袭能力。

综上所述，本研究通过检测荧光素酶报告基因、miRNA对靶基因蛋白表达的影响及两者相关性分析三方面强有力的证明了MMP2在非小细胞肺癌细胞中是miR-29b的靶基因。本研究的发现不仅丰富了miR-29b在肿瘤中的作用机制，而且为miR-29b作为非小细胞肺癌转移的分子标记物和治疗靶点奠定了坚实的实验基础。

109

# 第四部分 **miR-29b**上游转录因子的预测和鉴定

miRNAs参与了一个复杂的调控网络，它们不仅下调靶基因的表达广泛参与肿瘤发生发展过程，而且还受到上游基因、转录因子及表观遗传学的调控[23]。前期实验，我们己经证实了miR-29b通过MMP2参与非小细胞肺癌侵袭和转移的作用，但miR-29b在非小细胞肺癌中的抑癌作用究竟受到哪些因子的调控还不清楚。为全面揭示miR-29b在非小细胞肺癌中的表达机制，探索miR-29b的调节机制，寻找其上游的可能调控因子，也是本课题的一个重要内容。

在这一部分，我们将对miR-29b的上游调控序列及其调控因子进预测，利用荧光素酶报告检测系统对调控miR-29b的转录因子进行鉴定，并对转录因子对非小细胞肺癌细胞中的miR-29b及其靶基因MMP2的调控作用进行定量检测。

### 一、 材料

#### **1.** 细胞、菌株、质粒

人胚肾上皮细胞株HEK293A细胞，人非小细胞肺癌细胞株A549引自广州医科大学中心实验室，人非小细胞肺癌细胞株H460引自南方医科大学肿瘤研究所。大肠杆菌感受态DH-5α购自天根生物技术有限公司。荧光报告载体(PGL3-Basic, pRL-TK)购买自Promega公司。真核表达载体pEGFP-N1为本教研室自存，含有CMV启动子，具有卡那霉素和新霉素抗性。



图4-1 PGL3-Basic(A)和pEGFP-Nl(B)质粒图谱

Fig. 4-1 picture of PGL3-Basic(A) and pEGFP-Nl(B) vector

110

#### 2. 主要试剂

试剂名称品牌或生产厂家

质粒小提取试剂盒TIANGEN公司

DNA聚合酶LA Taq大连TAKARA公司

质粒中量提取试剂盒德国MN公司

DNA凝胶回收试剂盒Biomiga公司

双荧光报告系统检测试剂盒Promega公司

T4连接酶大连TAKARA公司

琼脂糖西班牙Biowest公司

胰蛋白酶膝和酵母提取物Gibco公司

XhoI内切酶、KpnI内切酶TaKaRa公司

DNA Ladder Marker TaKaRa公司

Lipofectamine LTX Invitrogen公司

OPTI-MEM Invitrogen公司

PrimeScript®RT reagent Kit大连Takara公司

SYBR®Premix Ex TaqTM II大连Takara公司

多克隆抗体人SRF抗体CST公司其余试剂同第三章

#### 3. 主要仪器

试剂名称品牌或生产厂家

PCR仪Biometra公司

DNA电泳仪BioRad公司

多功能凝胶成像仪系统BioRad公司

荧光定量PCR仪ABI 7500

台式高速离心机Eppendorf公司

低温高速离心机Thermo公司

荧光报告系统检测仪(GloMaxTM 20/20) Promega公司其余仪器同第三章

111

4. miRNA 基本信息数据库MiRBase 数据库: http: / /[www. mirbase. org](http://www.mirbase.org/) Ensembl数据库：[http: //asia. ensembl. org/Homo](http://asia.ensembl.org/Homo) sapiens/Info/Index

#### 5. 转录因子相关预测信息库

Proscan: [http: //www-bimas. cit. nih. gov/molbio/proscan/](http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/) Consite: http: //asp. ii. uib. no:8090/cgi-bin/CONSITE/consite TFSEARCH: [http: //www. cbrc. jp/research/db/TFSEARCH. html](http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html)

TRED: [http: //rulai. cshl. edu/cgi-bin/TRED/tred. cgiprocess=analysisMatrixForm](http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/TRED/tred.cgi?process=analysisMatrixForm)

### 二、 方法

1. miR-29b上游调控因子的预测

1. 1通过Ensembl数据库([http: //asia. ensembl. org/Homo](http://asia.ensembl.org/Homo) sapiens/Info/Index)，在线获得编码miR-29b前体mir-29b-1序列所在基因的上游2kb作为mir-29b-1的启动子序列。

1.2利用三种在线软件(Proscan, Consit及TFSEARCH)预测及分析可能与mir-29b-1启动子结合的转录因子。利用TRED预测转录因子与其靶基因的结合位点。

2. SRF-pEGFP-N 1重组质粒构建

2. l 引物设计及合成

根据GeneBank中的人类SRF mRNA序列设计ORF的上下游PCR物，并分别在上、下游引物的5’端加上酶切位点XhoI (ctcgag)和KpnI(ggtacc)和保护碱基，预计扩增产物长1200bp，引物由上海invitrogen公司合成，参照说明书用灭菌

ddH2O将引物稀释成10µmol/L，分装后，-20℃保存备用。引物序列如下：ID Sequence(5'-3')

SRF-F TCCGCTCGAGATGTTACCGACCCAAGCTGG SRF-R ATGGGGTACCGTTTCACTCTTGGTGCTGTGG

2.2 PCR 反应扩增SRF 序列及PCR 产物回收，实验步骤同第三部分第一节

1.2-1.3.

2. 3 PCR回收产物及质粒双酶切，酶切体系如下：

component volume

10XBuffer 1 5 uL

112

100X BSA 0.5 uL

回收产物或质粒（1 ug/uL） 2 uL

37℃酶切2h 。

Xho I Kpn I ddH20 Total

1 uL

1 uL

40.5 uL 50 uL

2. 4 双酶切产物回收，实验步骤同第三部分第一节2.2。

2. 5 目段片段与载体连接

向0.2mLEP管中加入以下试剂：

component volume

酶切回收的PCR产物

酶切回收的pEGFP-N1载体

10×Ligase Buffer T4 DNA Ligase ddH20

Total 22℃连接2 h。

6 uL 3uL

1.5 uL 1 uL

3.5 uL 15 uL

2. 6 连接产物的转化，实验步骤同第三部分第一节2.4。

2. 7菌液PCR鉴定阳性克隆，步骤如下：

2.7.1引物F: 5’-GTGGGGAGACCAAGGACA-3' R: CTGGTCGAGCTGGACGGCGACG-3'

扩增片段为859bp。

2.7.2 PCR反应体系：

component volume

5×Taq buffer dNTPs (2.5mM)

Primer(F)(10µM)

Primer(R)(10µM) Template

Taq polymerase

4 uL

1.6 uL

0.4 uL

0.4 uL 1 uL

0.2 uL

113

DdH2O Total

PCR反应条件：

94℃ 3 min

94℃ 30 sec

60℃ 30 sec 30 cycle

72℃ 40 sec

72℃ 5 min 4℃ ∞

12.4 uL 20 uL

2.7.3将PCR产物部分加入1%琼脂糖凝胶的加样孔中，电泳20min，在凝胶成像系统中观察并记录结果。

2.7.4选择菌液PCR鉴定为阳性的重组质粒送Invitrogen公司进行测序分析，以进一步验证序列的准确性。

2.8 质粒小提，实验步骤同第三部分第一节1.5。

3. miR-29b启动子-PGL3-Basic重组质粒的构建

3. 1化学合成miR-29b启动子序列，启动子序列两端引入酶切位点KpnI (ggtacc)

和XhoI (ctcgag) 。

3.2启动子片段及质粒双酶切，实验步骤见前2.3。

3.3双酶切产物回收，实验步骤同第三部分第一节2.2。

3.4目段片段与载体连接，实验步骤见2.5。

3.5连接产物的转化，实验步骤同第三部分第一节2.4。

3.6双酶切鉴定阳性克隆，实验步骤见前2.3。阳性克隆质粒送Invitrogen公司测序。

3.7质粒小提，实验步骤同第三部分第一节1.5。

4. SRF过表达质粒和miR-29b启动子-PGL3-Basic重组质粒共转染

采用阳离子脂质体法进行细胞转染，实验步骤同第三部分第一节4。，细胞转染试验组设置如下（每组数据设3个复孔）：

114

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Group | PGL3-Basic | miR-29b 启动  子-PGL3-Basic | SRF-pEGFP  -N 1 | pRL-TK |
| PGL3-Basic | 0.2µg | ---- | ---- | 0.01µg |
| miR-29b 启动子 | ---- | 0.2µg | ---- | 0.01µg |
| SRF+miR-29b 启动子 |  | 0.2µg | 0.2µg | 0.01µg |

5. 双荧光素酶报告基因检测

实验步骤同第三部分第一节5。。

6. SRF过表达质粒的瞬时转染

采用阳离子脂质体法进行细胞转染，选用人非小细胞肺癌细胞株A549 和

H460，实验分两组：空白对照组、SRF-pEGFP-N 1重组载体组，实验步骤同第三部分第一节4。。

7. 实时荧光定量PCR

检测转染SRF过表达质粒48h后，A549和H460细胞中SRF、MMP2 mRNA和miR-29b的表达变化。实验方法同第三部分第二节3.和第一部分第二节4-6. SRF的实时荧光定量PCR引物如下：

ID Sequence(5'-3')

SRF-F CGCTACACGACCTTCAGCAAGA SRF-R CAGCAACAGCACCTGTGTCC

8. Wstern blot

检测转染SRF过表达质粒72h后，A549和H460细胞中MMP2蛋白的表达变化。实验方法同第三部分第二节4。。

9. 统计分析

采用SPSS13.0统计软件包进行处理，实验数据以mean±SD表示，萤光素酶报告基因多组间的均数比较采用单因素方差分析，立了差分析前进行方差齐性检验，方差齐采用oneway Anova，多重比较采用LSD法；方差不齐采用近似F检验的Welch法，多重比较采用Dunnett's T3法；实时荧光定量PCR和Wstern blot组间的均数比较独立样本T检验，取α= 0.05 为检验标准。

### 三、 结果

1. 通过Ensembl数据库([http: //asia. ensembl. Org/Homo](http://asia.ensembl.Org/Homo) sapiens/lnfo/lndex), 在线获

115

得编码miR-29b前体序列所在基因的上游2kb作为miR-29b的启动子序列，序列如下：



图4-1 miR-29b启动子基因组序列

Fig. 4-1 Gene sequence of miR-29b Promoter

2. 利用四种在线软件(Proscan, Consite、TFSEARCH及TRED)预测及分析可能与miR-29b启动于结合的转录因子，Proscan预测核心启动子区域，结果显示，在上游2kb中，可能存在两段核心启动子区域，分别是746bp-996bp和143-393bp，同时Proscan软件显示了多个转录因子，其中SRF的分值最高（图4-2）。利用Consite软件预测与这两段核心启动子区域结合的转录因子，在选择

85%的TF scoreoutoff时，预测到了多个转录因子，其中SRF的分值最高（图

4-3）。利用TFSEARCH软件预测与启动子区域结合的转录因子，在选择90的Threshold score时，预测到了多个转录因子，其中SRF的分值较高（图4-4）。利用TRED对SRF与miR-29b的结合部位进行分析，结果显示两者之间存在5个结合区域（分别为miR-29b上游78-89bp, 753-764, 126-135bp, 226-235坤, 388-397bp; 395-404bp, 401-41Obp区域）(图4-4)。结合四个软件的预测结果，挑选分值较高，且四个软件均有交集的转录因子SRF作为我们的研究对象。

116



图4-2 Proscan软件预测miR-29b转录园子

Fig. 4-2 Transcription factor ofmiR-29b predicted by Proscan software



117



图4-3 Consite软件预测míR-29b转录因子

Fíg.4-3 Transcription factor of míR-29b predicted by consite software



图4-4 TFSEARCH软件预测míR-29b转录因子

Fíg.4-4 Transcription factor of míR-29b predicted by TFSEARCH software

118



图4-5 TRED分析miR-29b启动字与SRF的结合位点

Fig. 4-5 Combining Sites between the miR-29b and SRF Predicted by the TRED software

119

3. SRF-pEGFP-N1重组质粒的构建

PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳，结果在1500bp处出现清晰的条带（图4-6A），与预期的SRF目的片段1546bp大小相符，说明SRF目的基因已成功扩增出来。菌液PCR鉴定SRF-pEGFP-N1重组载体，结果显示在预期片段的859bp处出现条带（图4-6B）。挑取阳性克隆进行测序，测序结果BLAST分析：与NCBI上已知序列进行BLAST 100%一致（图4-7）。由此，我们成功构建了SRF基因的过表达载体。





图4-6 SRF CDS区扩增(A)及阳性克隆菌液PCR鉴定图(B)

Fig.4-6 Gel electrophoresis PCR amplication of CDS fragment of SRF (A) and clones(B)

120



图4-7 SRF-pEGFP-N1阳性克隆质粒测序图

Fig. 4-7 Sequencing map of SRF-pEGFP-N1 plasmid

121

4. miR-29b启动子-PGL3-Basic重组质粒的构建

酶切鉴定PGL3-Basic载体和miR-29b启动子-PGL3-Basic载体，结果显示在5kb左右、2kb与5kb左右分别对应miR-29b启动子片段及PGL3-Basic载体片段，片段大小正确（图4-8）。挑取阳性克隆进行测序，测序结果BLAST分析：与已知序列进行BLAST 100%一致，miR-29b启动子片段已成功克隆至PGL3-Basic载体中（图4-9）由此，我们成功构建了miR-29b启动子-PGL3-Basic载体。





图 4-8 PGL3-Basic载体(A)和miR-29b启动子-PGL3-Basic载体(B)的酶切鉴定Fig 4-8 Identification of PGL3-Basic vector(A) and miR-29b promoter-PGL3-Basic(B)

122



123



图4-9 miR-29b启动子-PGL3-Basic阳性克隆质粒测序图

Fig. 4-9 Sequencing map of miR-29b promoter-PGL3-Basic plasmid

5. miR-29b转录因子与启动子活性检测

将miR-29b启动子-PGL3-Basic转染至HEK293A细胞后，荧光素酶活性较对照组明显增强(*p*=0.014)，提示miR-29b启动子序列具有转录活性。共同转染miR-29b启动子-PGL3-Basic和SRF-pEGFP-N1至HEK293A细胞后，荧光素酶活性较miR-29b启动子-PGL3-Basic组显著降低(*p*=0.024)，表明转录因子SRF能抑制miR-29b启动子的转录活性（图4-10, 表4-1）。



图4-10 荧光素酶报告基因活性检测miR-29b启动子与SRF的结合情况(mean±SD,

*p*<0.05)

Fig.4-10 The binding ability of miR-29b promoter with SRF detected by luciferase activity(mean±SD, *p*<0.05)

124

6. 实时荧光定量PCR检测SRF对miR-29b和MMP2 mRNA表达的影响

利用实时荧光定量PCR检测SRF过表达对A549及H460细胞中miR-29b的表达影响，结果显示转染SRF过表达质粒48h后，两种细胞SRF mRNA的表达显著升高(t=-4.326, *p*=0.012; t=-7.774, *p*=0.001)，证实转染成功。转染SRF后，两种细胞中miR-29b的表达较对照组显著降低(t=13.492, *p*<0.001; t=3.790, *p*=0.019), MMP2 mRNA的表达较对照组显著升高（t=-3.440, *p*=0.026; t=-5.931, *p*=0.004）(图4-11, 表4-2)，提示SRF能抑制miR-29b的表达。



图4 -11 实时荧光定量PCR检测转染SRF后非小细胞肺癌细胞SRF、miR-29b

和MMP2 mRNA的表达(mean±SD)

Fig. 4-10 Expression folds of SRF mRNA, miR-29b and MMP2 mRNA of NSCLC cells after transfected with SRF detected by Real-time PCR(mean±SD)

3.2 Westem blot检测SRF对MMP2的表达影响

利用Western blot检测转染SRF对A549及H460细胞MMP2蛋白表达的影响，结果显示在转染SRF 72h后，与对照组比较，A549和H460细胞中MMP2蛋白表达显著上调(t=-8.794, *p* =0.001; t=-10.502, *p* =0.001)（图4-12, 表4-3），提示SRF能促进MMP2蛋白的表达。

125



图4 -12 SRF对A549及H460细胞中蛋白表达的影响

Fig. 4-12 The Effect of SRF on the Expression of MMP2 protein in A549 and H460 cell lines

126

# 讨 论

miRNAs 在肿瘤细胞中的表达受多种机制调节：1、核型异常（Genomic

abnormality）: miRNAs基因在染色体上的分布位置是不均一的，通常多位于脆弱区域，容易被扩增、丢失或转位。2、表观遗传模式改变：通过对位于miRNAs基因启动子区中CpG岛的过甲基化，引发该区域组蛋白的去乙酰化反应，改变

miRNAs基因表观遗传模式，从而miRNAs基因表达受到抑制。3、转录因子调节：转录因子如p53, c-Myc, E2F等可以调节pri-miRNAs的转录过程。4、miRNAs成熟过程中的调节：在成熟过程中起重要作用的Drosha, Dicer和Agog等酶可调节miRNAs的表达水平。其中，对于miRNA初始产物pri-miRNAs的转录调控研究是目前肿瘤研究的一大热点，miRNA基因被RNA聚合酶II转录形成最初产物pri-miRNA，该过程受许多已知转录因子的调控。

人类miR-29分别由两个cluster转录出来，进而被Dorsha和Dicer酶加工成熟。经数据库分析，miR-29a, miR-29b-1由mir-29b-1-mir-29a cluster转录而来，miR-29b-2, miR-29c由mir-29b-2-mir-29c cluster转录而来。这两个cluster均由反义链转录而来，其中mir-29b-1-mir-29a cluster位于人第7号染色体；mir-29b-2-mir-29c cluster位于人第1号染色体。至今，对于miR-29b的转录调控也有一些文献报道，主要分为四类：1、NF-κB[99-101]、c-Myc[102]等转录因子介导的调控；2、TGF-β[103]、IFN-γ[98]等细胞因子下游信号的调控；3、p53[104]、

Rb[105]等抑癌基因的调控；4、表观遗传调控[106]。其中转录因子介导的调控较为常见，在本课题中，我们试图通过对miR-29b转录因子的预测与验证来研究miR-29b在肿瘤中表达的调控机制。

miRNA基因根据位置分布分为基因间miRNA和基因内miRNA，前者位于基因间的非编码区，拥有自己独立的启动子，如果miRNAs在染色体上是成簇分布的，它们通过一个共同的启动子转录成为pri-miRNA[107, 108]。而人类大约有80%的miRNA基因位于内含子之中，他们与其宿主基因一样，共同受到宿主基因启动子的调控[109, 110]。通常miRNA基因与内含子的转录方向是一致的，能够与宿主蛋白基因共转录，然后再从这些蛋白质基因的内含子中剪切出来，这也是

miRNA在进化过程中能够与其邻近的蛋白保守地保留下来的原因。由于miR-29b

位于非编码基因AC0016831.7-001中的第二个内含子中，因此，miR-29b与其宿

127

主基因AC0016831.7-001一样，共同受到宿主基因启动子的调控，我们将编码其宿主基因的上游2000bp序列为启动序列。首先通过在线软件Ensembl寻找miR-29b上游2000bp序列，随后利用四种在线软件(Proscan, Consite, TFSEARCH及TRED)预测及分析可能与miR-29b启动子序列结合的转录因子，Proscan预测核心启动子区域，结果显示，在上游2kb中，可能存在两段核心启动子区域，分别是746bp-996bp和143-393bp，同时Proscan软件显示了多个转录因子，其中SRF的分值最高。利用Consite软件预测与这两段核心启动子区域结合的转录因子，在选择85%的TF scoreoutoff时，预测到了多个转录因子，其中SRF的分值最高。利用TFSEARCH软件预测与启动子区域结合的转录因子，在选择90的Threshold score 时，预测到了多个转录因子，其中SRF 的分值较高。利用

TRED对SRF与miR-29b的结合部位进行分析，结果显示两者之间存在5个结合区域。结合四个软件的预测结果，挑选分值较高，且四个软件均有交集的转录因子SRF作为我们的研究对象。

血清反应因子(serum response factor, SRF)是高度保守的磷酸化DNA结合蛋白，是重要的细胞转录调控因子。属MADS box家族，由508个氨基酸组成，含三个主要的结构域：血清反应元件SRE的DNA结合域、转录激活结构域和几个磷酸化位点[111]。SRF 发挥作用的关键是与血清反应元件SRE 结合，SRE

DNA序列称为CArG框(CC(A/T) 6GG)。研究发现，SRF除了调控即刻早期基因如c-fos、c-jun和Egr外，可调节与细胞增殖、迁移、分化、血管生成及凋亡有关的许多重要基因[112, 113]。因此，SRF在肿瘤的发生发展中有重要作用。有报道认为同源基因HOPX可通过抑制SRF来抑制子宫内膜癌的增殖[114]。SRF可调控细胞骨架形成的细胞增殖，在雄激素依赖的前列腺癌细胞存活过程中起重要的作用[115, 116]。SRF还可调节RhoA通路相关分子来控制肿瘤细胞的形态及侵袭能力[117, 118]。另外，SRF在结肠癌转移灶中高表达，上调的SRF可能通过E- cadherin/β-catenin促进癌细胞的运动性和侵袭力，在结肠肝转移过程中发挥重要的作用[119]。SRF在肝细胞癌的细胞核中高表达[120]，过表达SRF不仅可促进肝癌细胞增殖[121]，还通过作用于间充质细胞MMP2促进肝细胞的迁移和侵袭

[122]. 至今，SRF调控miRNAs的报道较少，在心肌细胞中，SRF直接调控miR-1、miR-133a和miR-21的表达，miR-1的启动子区域含有三个CArG反应元件[122]。在血管受损时，SRF可以通过调控miR-143/miR-145来促进平滑肌细胞收缩[123]。

128

SRF还可调控miR-210的表达介入Sonic hedgehog通路抑制心肌细胞分化[124]。本研究中，我们试图通过验证SRF/miR-29b/MMP2通路，阐明SRF在非小细胞肺癌发生和转移中的新机制。

我们通过荧光素酶报告检测系统验证miR-29b与SRF的直接结合关系，结果显示，当共同转染miR-29b-PGL3-Basic和SRF-pEGFP时，萤火虫荧光素酶的活性比单转染miR-29b-PGL3-Basic明显下降(*p*=0.024)，说明SRF能够显著抑制miR-29b启动子的转录活性。接着，我们检测了过表达SRF对非小细胞肺癌细胞中miR-29b及MMP2表达的影响，结果显示，在非小细胞肺癌细胞株A549及H460中过表达SRF转录因子后，miR-29b的表达水平明显降低(t=13.492, *p*<0.001; t=3.790, *p*=0.019)，而Westen blot检测MMP2蛋白的的表达水平明显升高（t=-3.440, *p*=0.026; t=-5.931, *p*=0.004）。由此可见，在非小细胞肺癌肿瘤中，SRF极有可能为miR-29b的上游调控因子，抑制miR-29b在非小细胞肺癌细胞中的转录，miR-29b下调后消减了对其靶基因MMP2的负调控作用。

综上所述，本部分主要对调控miR-29b表达的上游转录因子进行了预测与鉴定，SRF是上游调控miR-29b表达的转录因子，SRF通过与miR-29b的启动子结合，抑制miR-29b的转录，进而增强了miR-29b下游的靶基因MMP2的表达，因此，SRF/miR-29b/MMP2通路极有可能是非小细胞肺癌转移的新机制。

129

参考文献

[1] Zhang X, Azhar G, Helms S A, et al. Regulation of cardiac microRNAs by serum response factor[J]. J Biomed Sci, 2011, 18: 15.

[2] Juergens R A, Brahmer J R. Adjuvant treatment in non-small cell lung cancer: Where are we now[J]. JNatlComprCancNetw, 2006, 4(6): 595-600.

[3] 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, 5(13): 488-493

[4] Shao C, Lu C, Chen L, et al. p53-Dependent anticancer effects of leptomycin B on lung adenocarcinoma[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2011, 67(6): 1369-1380.

[5] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10-29.

[6] Steeg P S. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(1): 55-63.

[7] Geiger T R, Peeper D S. Metastasis mechanisms[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1796(2): 293-308.

[8] Hedley B D, Chambers A F. Tumor dormancy and metastasis[J]. Adv Cancer Res, 2009, 102: 67-101.

[9] Perlikos F, Harrington K J, Syrigos K N. Key molecular mechanisms in lung cancer invasion and metastasis: a comprehensive review[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2013, 87(1): 1-11.

[10] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. Cell, 1993, 75(5): 843-854.

[11] Hutvagner G, Mclachlan J, Pasquinelli A E, et al. A cellular function for the RNA- interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA[J]. Science, 2001, 293(5531): 834-838.

[12] Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing[J]. Nature, 2003, 425(6956): 415-419.

[13] Bernstein E, Caudy A A, Hammond S M, et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference[J]. Nature, 2001, 409(6818): 363-366.

[14] Lund E, Guttinger S, Calado A, et al. Nuclear export of microRNA precursors[J]. Science, 2004, 303(5654): 95-98.

[15] Henke J I, Goergen D, Zheng J, et al. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA[J]. EMBO J, 2008, 27(24): 3300-3310.

[16] Orom U A, Nielsen F C, Lund A H. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation[J]. Mol Cell, 2008, 30(4): 460-471.

[17] Tsai N P, Lin Y L, Wei L N. MicroRNA mir-346 targets the 5'-untranslated region of

130

Receptor-interacting protein 140 (RIP140) mRNA and up-regulates its protein expression[J]. Biochem J,2009,424(3):411-418.

[18] Lee I, Ajay S S, Yook J I, et al. New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites[J]. Genome Res, 2009, 19(7): 1175-1183.

[19] Friedman R C, Farh K K, Burge C B, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs[J]. Genome Res, 2009, 19(1): 92-105.

[20] John B, Enright A J, Aravin A, et al. Human MicroRNA targets[J]. PLoS Biol, 2004, 2(11): e363.

[21] Calin G A, Sevignani C, Dumitru C D, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(9): 2999-3004.

[22] Johnson S M, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family[J]. Cell, 2005, 120(5): 635-647.

[23] He L, He X, Lim L P, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network[J]. Nature, 2007, 447(7148): 1130-1134.

[24] Sampson V B, Rong N H, Han J, et al. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells[J]. Cancer Res, 2007, 67(20): 9762-9770.

[25] Cimmino A, Calin G A, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(39): 13944-13949.

[26] Chen C Z. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors[J]. N Engl J Med, 2005, 353(17): 1768-1771.

[27] Foss K, Sima C, Ugolini D, et al. miR-1254 and miR-574-5p: serum-based microRNA biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer[J]. 2011, 6, 482-488.

[28] Nh H, Aj S, Ja W, et al. Circulating microRNA Expression Profiles in Early Stage Non-Small Cell Lung Cancer[J]. Int J Cancer, 2012, 130(6): 1378-1386.

[29] Pc B, Sk L, M P, et al. Prognostic gene signatures for non-small-cell lung cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(8): 2824-2828.

[30] P R, J J, Ef S, et al. An Immune Response Enriched 72-Gene Prognostic Profile for Early-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(1): 284-290.

[31] Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg R A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer[J]. Nature, 2007, 449(7163): 682-688.

[32] Martello G, Rosato A, Ferrari F, et al. A MicroRNA targeting dicer for metastasis control[J]. Cell, 2010, 141(7): 1195-1207.

[33] Varambally S, Cao Q, Mani R S, et al. Genomic loss of microRNA-101 leads to over-expression of histone methyltransferase EZH2 in cancer[J]. Science, 2008, 322(5908): 1695-1699.

[34] Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, et al. A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis[J]. cell, 2009, 137(6): 1032-1046.

[35] Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, et al. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by

131

Targeting matrix metalloproteinase regulators[J]. Mol Cell Biol,2008,28(17):5369-5380.

[36] Zhu S, Wu H, Wu F, et al. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis[J]. Cell Res, 2008, 18(3): 350-359.

[37] Asangani I A, Rasheed S A, Nikolova D A, et al. MicroRNA-21(miR-21) post- transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer[J]. Oncogene, 2008, 27(15): 2128-2136.

[38] Korpal M, Lee E S, Hu G, et al. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2[J]. J Biol Chem, 2008, 283(22): 14910-14914.

[39] Bracken C P, Gregory P A, Kolesnikoff N, et al. A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition[J]. Cancer Res, 2008, 68(19): 7846-7854.

[40] Burk U, Schubert J, Wellner U, et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells[J]. EMBO Rep, 2008, 9(6): 582-589.

[41] Xia H, Ng S S, Jiang S, et al. miR-200a-mediated downregulation of ZEB2 and CTNNB1 differentially inhibits nasopharyngeal carcinoma cell growth, migration and invasion[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 391(1): 535-541.

[42] Choi Y C, Yoon S, Jeong Y, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor signaling by miR-200b[J]. Mol Cells, 2011, 32(1): 77-82.

[43] Howe E N, Cochrane D R, Richer J K. Targets of miR-200c mediate suppression of cell motility and anoikis resistance[J]. Breast Cancer Res, 2011, 13(2): R45.

[44] Lee Y S, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene[J]. Genes Dev, 2007, 21(9): 1025-1030.

[45] Garofalo M, Di Leva G, Romano G, et al. miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation. [J]. Cancer Cell, 2009, 16(6): 498-509.

[46] Gibbons D L, Lin W, Creighton C J, et al. Contextual extracellular cues promote tumor cell EMT and metastasis by regulating miR-200 family expression[J]. Genes Dev, 2009, 23(18): 2140-2151.

[47] Wang G, Mao W, Zheng S. MicroRNA-183 regulates Ezrin expression in lung cancer cells[J]. FEBS Lett, 2008, 582(25-26): 3663-3668.

[48] Iorio M V, Ferracin M, Liu C G, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer[J]. Cancer Res, 2005, 65(16): 7065-7070.

[49] Tavazoie S F, Alarcon C, Oskarsson T, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis[J]. Nature, 2008, 451(7175): 147-152.

[50] Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, et al. Tcl1 expression in chronic lymphocytic lukemia is regulated by miR-29 and miR-181[J]. Cancer Res, 2006, 66(24): 11590-11593.132

[51] Garzon R, Heaphy C E, Havelange V, et al. MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2009, 114(26): 5331-5341.

[52] Garzon R, Liu S, Fabbri M, et al. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1[J]. Blood, 2009, 113(25): 6411-6418.

[53] Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(40): 15805-15810.

[54] Rothschild S I, Tschan M P, Federzoni E A, et al. MicroRNA-29b is involved in the Src-ID1 signaling pathway and is dysregulated in human lung adenocarcinoma[J]. Oncogene, 2012, 31(38): 4221-4232.

[55] Fang J H, Zhou H C, Zeng C, et al. MicroRNA-29b suppresses tumor angiogenesis, invasion, and metastasis by regulating matrix metalloproteinase 2 expression[J]. Hepatology, 2011, 54(5): 1729-1740.

[56] Lang N, Liu M, Tang Q L, et al. Effects of microRNA-29 family members on proliferation and invasion of gastric cancer cell lines[J]. Chin J Cancer, 2010, 29(6): 603-610.

[57] Ru P, Steele R, Newhall P, et al. miRNA-29b suppresses prostate cancer metastasis by regulating epithelial-mesenchymal transition signaling[J]. Mol Cancer Ther, 2012, 11(5): 1166-1173.

[58] Wang C, Bian Z, Wei D, et al. miR-29b regulates migration of human breast cancer cells[J]. Mol Cell Biochem, 2011, 352(1-2): 197-207.

[59] Starlard-Davenport A, Kutanzi K, Tryndyak V, et al. Restoration of the methylation status of hypermethylated gene promoters by microRNA-29b in human breast cancer: A novel epigenetic therapeutic approach[J]. J Carcinog, 2013, 12: 15.

[60] Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis[J]. Cancer Cell, 2006, 9(3): 189-198.

[61] Blomer U, Naldini L, Kafri T, et al. Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector[J]. J Virol, 1997, 71(9): 6641-6649.

[62] Chu Y W, Yang P C, Yang S C, et al. Selection of invasive and metastatic subpopulations from a human lung adenocarcinoma cell line[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997, 17(3): 353-360.

[63] Wang C C, Tsai M F, Dai T H, et al. Synergistic activation of the tumor suppressor, HLJ1, by the transcription factors YY1 and activator protein 1[J]. Cancer Res, 2007, 67(10): 4816-4826.

[64] Torng P L, Lee Y C, Huang C Y, et al. Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) acts as an invasion-metastasis suppressor in ovarian endometrioid carcinoma[J]. Oncogene, 2008, 27(15): 2137-2147.

[65] Tseng R C, Lin R K, Wen C K, et al. Epigenetic silencing of AXIN2/betaTrCP and deregulation of p53-mediated control lead to wild-type beta-catenin nuclear accumulation in lung tumorigenesis[J]. Oncogene, 2008, 27(32): 4488-4496.133

[66] Yu S L, Chen H Y, Chang G C, et al. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer[J]. Cancer Cell, 2008, 13(1): 48-57.

[67] Chang D K, Lin C T, Wu C H, et al. A novel peptide enhances therapeutic efficacy of liposomal anti-cancer drugs in mice models of human lung cancer[J]. PLoS One, 2009, 4(1): e4171.

[68] Tie J, Pan Y, Zhao L, et al. MiR-218 inhibits invasion and metastasis of gastric cancer by targeting the Robo1 receptor[J]. PLoS Genet, 2010, 6(3): e1000879.

[69] Curran S, Murray G. matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis[J]. J. Pathol, 1999, 189(3): 300-308.

[70] Leinonen T, Pirinen R, Bohm J, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) predicts tumour recurrence and unfavourable outcome in non-small cell lung cancer[J]. Histol Histopathol, 2008, 23(6): 693-700.

[71] Qian Q, Wang Q, Zhan P. The role of matrix metalloproteinase 2 on the survival of patients with non-small cell lung cancer: a systematic review with meta-analysis[J]. Cancer Investigation, 2010, 28, 661-669.

[72] Fang J H, Zhou H C, Zeng C, et al. MicroRNA-29b suppresses tumor angiogenesis, invasion, and metastasis by regulating matrix metalloproteinase 2 expression[J]. Hepatology, 2011, 54(5): 1729-1740.

[73] Gebeshuber C, Zatloukal K, Martinez J. miR-29a suppresses tristetraprolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis[J]. EMBO reports, 2009, 10(4): 400-405.

[74] Wang C, Bian Z, Wei D, et al. miR-29b regulates migration of human breast cancer cells[J]. Mol Cell Biochem, 2011, 352(1-2): 197-207.

[75] Song M S, Salmena L, Pandolfi P P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(5): 283-296.

[76] Shih M C, Chen J Y, Wu Y C, et al. TOPK/PBK promotes cell migration via modulation of the PI3K/PTEN/AKT pathway and is associated with poor prognosis in lung cancer[J]. Oncogene, 2012, 31(19): 2389-2400.

[77] Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis[J]. Nature, 2005, 436(7048): 214-220.

[78] Zhang J G, Wang J J, Zhao F, et al. MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. Clin Chim Acta, 2010, 411(11-12): 846-852.

[79] Kato M, Putta S, Wang M. F-beta activates Akt kinase through a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN[J]. Nat Cell Biol, 2009, 11(7): 881-889.

[80] Garofalo M, Di Leva G, Romano G, et al. MiR-221&222 regulate TRAIL-resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 down-regulation[J]. Cancer Cell, 2009, 16(6): 498-509.

[81] Liu B, Wu X, Liu B, et al. MiR-26a enhances metastasis potential of lung cancer cells via AKT pathway by targeting PTEN[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1822(11): 1692-1704.134

[82] Wang Y S, Wang Y H, Xia H P, et al. MicroRNA-214 regulates the acquired resistance to gefitinib via the PTEN/AKT pathway in EGFR-mutant cell lines[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(1): 255-260.

[83] Liu Y, Lai L, Chen Q. MicroRNA-494 is required for the accumulation and functions of tumor-expanded myeloid-derived suppressor cells via targeting of PTEN[J]. 2012, 188, 5500-5510.

[84] Zhang L, Ho-Fun L V, Wong A, et al. MicroRNA-144 promotes cell proliferation, migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma through repression of PTEN[J]. 2012, 34, 454-463.

[85] Wu Z, He B, He J, et al. Upregulation of miR-153 promotes cell proliferation via downregulation of the PTEN tumor suppressor gene in human prostate cancer[J]. 2013, 73, 596-604.

[86] Li G, Zhao J, Peng X, et al. The mechanism involved in the loss of PTEN expression in NSCLC tumor cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012: 547-552.

[87] Park S Y, Lee J H, Ha M, et al. miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42[J]. Nat Struct Mol Biol, 2009, 16(1): 23-29.

[88] Poon J S, Eves R, Mak A S. Both lipid- and protein-phosphatase activities of PTEN contribute to the p53-PTEN anti-invasion pathway[J]. Cell Cycle, 2010, 9(22): 4450-4454.

[89] Xiong Y, Fang J H, Yun J P, et al. Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2010, 51(3): 836-845.

[90] Garzon R, Heaphy C E, Havelange V, et al. MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2009, 114(26): 5331-5341.

[91] Zhang Y K, Wang H, Leng Y, et al. Overexpression of microRNA-29b induces apoptosis of multiple myeloma cells through down regulating Mcl-1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 414(1): 233-239.

[92] Steele R, Mott J L, Ray R B. MBP-1 upregulates miR-29b that represses Mcl-1, collagens, and matrix-metalloproteinase-2 in prostate cancer cells[J]. Genes Cancer, 2010, 1(4): 381-387.

[93] Park S Y, Lee J H, Ha M, et al. miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42[J]. Nat Struct Mol Biol, 2009, 16(1): 23-29.

[94] Ugalde A P, Ramsay A J, De La Rosa J, et al. Aging and chronic DNA damage response activate a regulatory pathway involving miR-29 and p53[J]. EMBO J, 2011, 30(11): 2219-2232.

[95] Martinez I, Cazalla D, Almstead L L, et al. miR-29 and miR-30 regulate B-Myb expression during cellular senescence[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(2): 522-527.

[96] Zhao J J, Lin J, Lwin T, et al. microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma[J]. Blood, 2010, 115(13): 2630-2639.

[97] Cortez M A, Nicoloso M S, Shimizu M, et al. miR-29b and miR-125a regulate podoplanin and suppress invasion in glioblastoma[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2010, 49(11): 981-990.

[98] Schmitt M J, Philippidou D, Reinsbach S E, et al. Interferon-gamma-induced activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) up-regulates the tumor suppressing

135

MicroRNA-29 family in melanoma cells[J]. Cell Commun Signal,2012,10(1):41.

[99] Wang H, Garzon R, Sun H, et al. NF-kappaB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma[J]. Cancer Cell, 2008, 14(5): 369-381.

[100] Mott J L, Kurita S, Cazanave S C, et al. Transcriptional suppression of mir-29b-1/mir-29a promoter by c-Myc, hedgehog, and NF-kappaB[J]. J Cell Biochem, 2010, 110(5): 1155-1164.

[101] Liu S, Wu L C, Pang J, et al. Sp1/NFkappaB/HDAC/miR-29b regulatory network in KIT-driven myeloid leukemia[J]. Cancer Cell, 2010, 17(4): 333-347.

[102] Chang T C, Yu D, Lee Y S, et al. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis[J]. Nat Genet, 2008, 40(1): 43-50.

[103] Roderburg C, Urban G W, Bettermann K, et al. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis[J]. Hepatology, 2011, 53(1): 209-218.

[104] Ugalde A P, Ramsay A J, De La Rosa J, et al. Aging and chronic DNA damage response activate a regulatory pathway involving miR-29 and p53[J]. EMBO J, 2011, 30(11): 2219-2232.

[105] Martinez I, Cazalla D, Almstead L L, et al. miR-29 and miR-30 regulate B-Myb expression during cellular senescence[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(2): 522-527.

[106] Cacchiarelli D, Martone J, Girardi E, et al. MicroRNAs involved in molecular circuitries relevant for the Duchenne muscular dystrophy pathogenesis are controlled by the dystrophin/nNOS pathway[J]. Cell Metab, 2010, 12(4): 341-351.

[107] Saini H K, Griffiths-Jones S, Enright A J. Genomic analysis of human microRNA transcripts[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(45): 17719-17724.

[108] Shi X B, Tepper C G, Devere W R. Cancerous miRNAs and their regulation[J]. Cell Cycle, 2008, 7(11): 1529-1538.

[109] Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst J L, et al. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units[J]. Genome Res, 2004, 14(10A): 1902-1910.

[110] Lin S L, Miller J D, Ying S Y. Intronic microRNA (miRNA)[J]. J Biomed Biotechnol, 2006, 2006(4): 26818.

[111] Modak C, Chai J. Serum response factor: look into the gut[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(18): 2195-2201.

[112] Park M Y, Kim K R, Park H S, et al. Expression of the serum response factor in hepatocellular carcinoma: implications for epithelial-mesenchymal transition[J]. Int J Oncol, 2007, 31(6): 1309-1315.

[113] Lee H J, Yun C H, Lim S H, et al. SRF is a nuclear repressor of Smad3-mediated TGF-beta signaling[J]. Oncogene, 2007, 26(2): 173-185.

[114] Yamaguchi S, Asanoma K, Takao T, et al. Homeobox gene HOPX is epigenetically silenced in human uterine endometrial cancer and suppresses estrogen-stimulated proliferation of cancer cells by inhibiting serum response factor[J]. Int J Cancer, 2009, 124(11): 2577-2588.

[115] Yu W, Feng S, Dakhova O, et al. FGFR-4 Arg(3)(8)(8) enhances prostate cancer progression via extracellular signal-related kinase and serum response factor signaling[J]. Clin

136

Cancer Res,2011,17(13):4355-4366.

[116] Verone A R, Duncan K, Godoy A, et al. Androgen-responsive serum response factor target genes regulate prostate cancer cell migration[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(8): 1737-1746.

[117] Psichari E, Balmain A, Plows D, et al. High activity of serum response factor in the mesenchymal transition of epithelial tumor cells is regulated by RhoA signaling[J]. J Biol Chem, 2002, 277(33): 29490-29495.

[118] Hu Q, Guo C, Li Y, et al. LMO7 mediates cell-specific activation of the Rho-myocardin- related transcription factor-serum response factor pathway and plays an important role in breast cancer cell migration[J]. Mol Cell Biol, 2011, 31(16): 3223-3240.

[119] Choi H N, Kim K R, Lee J H, et al. Serum response factor enhances liver metastasis of colorectal carcinoma via alteration of the E-cadherin/beta-catenin complex[J]. Oncol Rep, 2009, 21(1): 57-63.

[120] Kwon C Y, Kim K R, Choi H N, et al. The role of serum response factor in hepatocellular carcinoma: implications for disease progression[J]. Int J Oncol, 2010, 37(4): 837-844.

[121] Farra R, Dapas B, Pozzato G, et al. Serum response factor depletion affects the proliferation of the hepatocellular carcinoma cells HepG2 and JHH6[J]. Biochimie, 2010, 92(5): 455-463.

[122] Kim K R, Bae J S, Choi H N, et al. The role of serum response factor in hepatocellular carcinoma: an association with matrix metalloproteinase[J]. Oncol Rep, 2011, 26(6): 1567-1572.

[123] Xin M, Small E M, Sutherland L B, et al. MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury[J]. Genes Dev, 2009, 23(18): 2166-2178.

[124] Zheng G, Tao Y, Yu W, et al. Brief report: SRF-dependent MiR-210 silences the sonic hedgehog signaling during cardiopoesis[J]. Stem Cells, 2013, 31(10): 2279-2285.

137

# 综述

**MicroRNA-29**在肿瘤中作用的研究进展

**摘要：**人类microRNA-29(miR-29)家族包括miR-29a、miR-29b和miR-29c，在多种肿瘤中异常表达。大量实验证实异常表达的miR-29与肿瘤的发生发展密切相关，miR-29在肿瘤中的作用研究也日渐详实。本文就miR-29基因在肿瘤细胞病理生理过程、表观遗传学修饰以及免疫调节等生物学功能作一综述。

关键词：miR-29；肿瘤；生物学功能

MicroRNA(miRNA)是一类长约22个核苷酸的内源性非编码单链小RNA，通过碱基互补配对方式结合到靶基因mRNA的3'UTR，对靶基因mRNA进行降解或者翻译抑制，实现对靶基因表达水平的转录后调控[1-3]。目前人类基因组中已确认的miRNA有2578个（Sanger Institution于2013年6月发布的数据库资料，

20.0版本，参见[http: //www. mirbase. org/](http://www.mirbase.org/) index. shtml)。

人类miR-29家族包含了miR-29a、miR-29b和miR-29c, miR-29b又包含了两个成员，即miR-29b-1与miR-29b-2. 在人、大鼠和小鼠中，miR-29家族的结构、功能和表达调控都十分相似。最早的miR-29a是Lagos-Quintana等[4]于2001年利用miRNA基因直接克隆策略在人HeLa细胞中克隆获得，后来相继得到miR-29b和miR-29c[5, 6]. miR-29a/b-1和miR-29b-2/c为非编码转录的单拷贝基因簇，miR-29a、miR-29b-1由mir-29b-l-mir-29a cluster转录而来，两者相隔652个碱基，位于染色体7q32.3负链，在普通型脆性位点FRA7H内[7]。miR-29b-2, miR-29c由mir-29b-2-mir-29c cluster转录而来，两者相隔507个碱基，位于染色体1q32.2负链[8, 9]。miR-29家族的三个成员之间的序列相似性很高，含有共同的

5’端“种子”序列——AGCACCA。其中miR-29a和miR-29c仅第10位核苷酸有差别，其余完全一致。miR-29b序列的3’端最后6个核苷酸稍有变化，但其余部分与另外两个miR-29家族成员基本一致。由于miR-29家族序列高度相似，因此miR-29家族调控的基因也基本相同。

众所周知，恶性肿瘤是人类位居首位的死亡原因。近年来，越来越多的研究发现，miRNAs参与各种各样病理生理过程的调节途径，包括发育、病毒防御、造血过程、器官形成、细胞增殖和凋亡、脂肪代谢等等，并在肿瘤的发生发展中

138

发挥重要作用。相关研究表明，miR-29在多种肿瘤中异常表达，它与肿瘤的关系及在肿瘤中的生物学效应也逐步被揭示，为人们认识miR-29作为治疗肿瘤的靶点提供了新视野。下面将重点介绍miR-29的表达调控机制及其在肿瘤中的功能。

1 **miR-29**表达及调控

与大多数miRNAs一样，miR-29b的表达具有时序特异性和组织特异性。miR-29在胚胎期组织不表达或低表达，但在生物体成熟组织细胞中广泛表达，其中肺、肾、心脏组织表达明显[10]。在肿瘤中，miR-29表达的具体调控机制尚不清楚。文献报道主要有：1、NF-κB、c-Myc等转录因子介导的调控；2、IFN-γ、TGF-β等细胞因子下游信号的调控；3、p53等抑癌基因的调控。当然，这几种信号间存在交叉调控，所以miR-29表达水平的上调和下调是多种信号共同作用的结果。Chang等[11]在B细胞淋巴瘤中通过芯片分析和RNA Blotting发现c-Myc可直接同miR-29b2/c启动子结合导致miR-29b2/c表达受抑。与Chang的发现一致，Mott等[12]发现miR-29b1/a启动子区具有两个E-box (Myc-binding) 结合位点，一个Gli结合位点以及四个NF-κB结合位点。他们通过萤光素酶报告基因活性检测发现，c-Myc和NF-κB能抑制该启动子的萤光素酶活性，此外，c-Myc高表达后能保护TRAIL诱导的胆管癌细胞的凋亡。说明c-Myc、hedgehog信号以及NF-κB等能抑制miR-29b1/a基因的转录，使miR-29b表达下调。此外，Eyholzer等[13]发现，在急性髓性白血病中，调控正常粒细胞生成的关键转录因子CEBPA表达失调，CEBPA可直接调控miR-29b1/a的表达。NF-κB信号通路在炎症相关的肿瘤中通常被激活，Mott等[12]发现在胆管癌细胞中NF-κB可通过TLRs直接抑制miR-29b1/a启动子活性，Wang等[14]发现NF-κB-YY1-miR-29调节环路在骨骼肌形成和横纹肌肉瘤发病过程中起着重要的作用。在骨骼肌形成过程中，NF-KB和YYI下调，导致miR-29去抑制，大量表达的miR-29反过来靶向调控其抑制分子YYI，从而促进肌肉分化。然而，在横纹肌肉瘤中，该调节环路被破坏，活化的NF-KB-YYI通路介导转录因子YY1直接与miR-29b2/c启动子结合抑制miR-29b2/c表达。此外，研究者们还发现在心脏纤维母细胞[10]、肝星状细胞[15]及肺纤维母细胞[16]中，TGF-β能下调miR-29表达。van Rooij等发现心脏成纤维细胞的miR-29a/b/c表达量明显高于心肌细胞。Roderburg等发现在肝脏细胞中，miR-29b在星状细胞中表达最高，肝星状细胞是肝脏中分泌细胞外基质蛋白

139

最主要的细胞。TGF-β能抑制肝脏星状细胞中miR-29的表达，从而上调miR-29的靶基因如胞外基质基因而导致肝脏纤维化。Maurer等[17]发现miR-29在系统性硬化症病人成纤维细胞中的表达水平显著低于正常人的皮肤组织，TGF-β能抑制人正常成纤维细胞miR-29a的表达，参与系统性硬化症的发病过程。最近Luna等[18]发现在小梁网细胞中TGF-β2能抑制miR-29a/b/c的表达，反之，miR-29b能抑制TGF-β1和细胞外基质基因的表达，构成TGF-β-miR-29正反馈调节环。Qin W等[19]研究发现，TGF-β/Smad3是导致肾脏纤维化的一个信号通路，TGF-β/Smad3信号通路负性调控miR-29b的表达，而miR-29b则是作为TGF-β/Smad3信号通路下游的抑制剂而发挥作用的。由于TGF-β/Smad3通路在肿瘤转移早期事件EMT中有重要作用，因此miR-29与肿瘤转移EMT过程可能有着密切联系。p53是一个非常重要的抑癌基因，称为基因组的守卫者，当细胞中DNA受到损伤时，激活的p53可上调miR-29的表达[20]。

2 **miR-29**与肿瘤

大部分miRNA可以同时作用于多个靶基因，如果一些靶基因的功能相近，则miRNA在这些基因所处的信号通路中发挥强大效应。miR-29在多种肿瘤中异常表达，它的靶基因含有多个信号通路相关蛋白。miR-29通过抑制这些蛋白表达参与多条信号通路的调控，在肿瘤发生发展中发挥了关键作用。

2.1细胞增殖与细胞周期

细胞增殖依赖于细胞周期的调控，细胞周期的紊乱可以导致细胞死亡或异常增殖，从而影响肿瘤的发生发展。Harbour等[21]发现miR-29可直接靶向CDK6的表达，CDK6是一个重要的细胞周期依赖性激酶，负责Rb蛋白磷酸化。而且，

Garzon等[8, 9]发现在急性髓性白血病细胞中过表达miR-29后CDK6蛋白表达下调，Rb磷酸化蛋白也表达下调。同时，在急性髓性白血病患者血液样本中也存在同样现象，说明miR-29至少部分通过抑制CDK6来影响Rb蛋白磷酸化。Zhao[22]等发现在套细胞淋巴瘤(mantle cell lymphoma, MCL)的B细胞中，CDK6是miR-29的靶基因，miR-29表达显著下调，而且CDK6表达显著上调，两者呈明显负相关。上调的CDK6促进周期蛋白D1 (cyclinDl)表达显著升高，从而导致加速细胞周期从G1期向S期演进，促进肿瘤细胞增殖。同时，对正常人的B细胞和30个MCL病人的B细胞的miRNA的表达谱分析表明，与miR-29表达水

140

平相对较高的患者相比，那些miR-29表达显著下调的患者生存期明显缩短，因此miR-29或可作为判断MCL预后的一个生物学指标。有趣的是，Li等[23]研究发现，在宫颈癌中，与人乳头状病毒相关的CDK6也是miR-29的靶基因，提示miR-29在宫颈癌发生过程中与人乳头状病毒具有协同作用。不过，Han等[24]持有相反的观点，他们发现，miR-29a在造血干细胞中高表达，在造血干细胞前体中表达下调。通过骨髓重建技术高表达miR-29a会使髓系前体细胞具有更强的自我更新能力，偏向于髓系分化，发展为髓系增生性疾病，随后进展为AML, miR-29a通过加快Gl到S/G2的细胞周期转换促进前体细胞增殖。此研究说明miR-29a调控了早期血细胞生成，通过促进髓系前体细胞转化为自我更新的白血病干细胞而启动AML。因此，miR-29介导的细胞周期调控机制仍不清楚，可能与其所处的肿瘤微环境相关。

2.2细胞衰老和分化

细胞衰老是一个不可逆的生长阻滞过程，也是一种主要的肿瘤抑制机制。

Ugalde等[25]发现，在郝-吉二氏综合征的小鼠模型中，miR-29表达显著上调，过表达的miR-29可通过抑制Ppm1d蛋白磷酸化激活P53，从而促进细胞衰老，减慢DNA损伤所致的细胞增殖。此外，Martinez等[26]在诱导细胞死亡过程中发现，miR-29可通过Rb信号通路的活化而上调表达，通过靶向B-Myb这个癌基因抑制其表达进而抑制细胞DNA的合成，这些研究结果表明miR-29受抑癌基因调控并在Rb驱动的细胞老化过程中起着重要的作用。

MiR-29还参与另一种肿瘤抑制机制，即细胞分化。Kapinas等[27]研究发现，在成骨细胞分化过程中Wnt/β-catenin信号通路的活化伴随着miR-29a/c表达上调，miR-29a/c与骨粘连蛋白3’UTR直接结合抑制骨粘连蛋白表达从而促进成骨细胞分化。Li等[28]发现miR-29b可通过靶向抑制HDAC4、TGFβ3、ACVR2A、

CTNNBIP1和DUSP2等抗成骨因子促进成骨细胞分化。NF-KB-YYI-miR-29调节环路在成肌细胞分化过程中起着重要的作用。当该调节环路被破坏，上调的NF-KB抑制miR-29表达，从而使miR-29的靶基因YY1表达上调，导致成肌细胞分化受阻和横纹肌肉瘤等疾病[14]。

2.3细胞凋亡

肿瘤细胞的凋亡受阻是肿瘤形成的关键机制。越来越多的研究显示miR-29

通过靶向多个凋亡相关的基因参与细胞凋亡。Mcl-1作为Bcl-2家族的抗凋亡因

141

子，在胆管癌KMCH细胞[8, 9]、急性髓性白血病K562细胞[29]和肝癌细胞株[30]中，miR-29是Mcl-1蛋白内源性的调控者。过表达miR-29b能抑制这些肿瘤细胞中Mcl-1的蛋白水平，并增强癌细胞对化疗药物的敏感性，促进TRAIL诱导的癌细胞凋亡。Tcl-1也被报道是miR-29的靶基因，Tcl-1是癌基因Akt的共活化物，在B和T淋巴细胞的抗凋亡信号传导中发挥关键作用[31]。癌Tcl-1表达异常上调是侵袭性B细胞慢性淋巴性白血病(B-CLL)的常见病理原因。通过比较惰性CLL、侵袭性CLL以及染色体11q缺失的侵袭性CLL的miRNAs表达谱发现[32]：miR-29a与Tcl-1的表达水平呈负相关。进一步的实验证实miR-29能靶向Tcl-1基因的3’UTR，从而调节Tcl-1的表达，诱导B细胞凋亡。这也提示miR-29可能可以成为高表达Tcl-1基因的CLL的治疗靶点。

MiR-29与凋亡的密切联系还被许多实验所证实。miR-29促凋亡的功能依赖于P53, Park等[33]研究发现宫颈癌HeLa细胞中miR-29表达同p53活性呈正相关。当HeLa细胞过表达miR-29a/b1时，p53表达上调导致p53依赖的细胞凋亡发生。进一步研究证实miR-29a/b1主要通过直接抑制负向调控p53的PI3激酶调节亚基p85α和Rho家族GTP酶CDC42蛋白表达，最终导致细胞p53活性上调。此外，miR-29不仅可直接抑制抗凋亡基因的表达，还可上调促凋亡基因的表达，如BCL2L11和PDCD4。通过靶向抑制抗凋亡基因Cdc42, P85, Mcl-1, Tcl-1和上调抑癌基因，增强了miR-29对肿瘤细胞存活的影响。

2.4肿瘤转移

已证实的miR-29家族的靶基因主要的是细胞外基质及迁移蛋白，因此miR-29在细胞外基质异常聚集所致纤维化中发挥着举足轻重的作用。miR-29的失调不仅促进了纤维化的发生，也促进了肿瘤细胞的侵袭和转移。Sengupta S等[34]通过基因芯片检测激光分选的鼻咽癌肿瘤细胞发现，miR-29c呈显著低表达。miR-29c能够抑制一系列编码细胞外基质组成蛋白以及T淋巴瘤侵袭转移基因1(T cell lymphoma invasion and metastasis1, TIAM1)的表达，进而影响鼻咽癌细胞旳侵袭性和肿瘤的转移。miR-29家族还可影响肿瘤转移早期事件上皮到间充质的转换(epithelial-to-mesenehyma transition, EMT). Castilla等[35]研究发现在子宫内膜癌中，miR-29c可通过抑制间叶组织的标记物的表达阻滞EMT。此外，TGF-β信号通路作为EMT发生的诱导因子，已证实miR-29与TGF-β信号通路呈负相关关系。Luna 等[18]发现在小梁网细胞中过表达miR-29 能抑制

142

TGF-β1和TGF-β2蛋白水平，并显著降低细胞外基质蛋白的表达。Winbanks等[36]发现miR-29还能靶向TGF-β信号通路的重要组分Smads，参与调控TGF-β信号通路，上调HDAC的蛋白表达。因此，miR-29为人们认识TGF-β/Smads信号通路介导的EMT相关的肿瘤转移分子机制提供了新视野。相反的是，Gebeshuber等[37]研究发现miR-29a在乳腺间质可转移细胞

RasXT中的表达比在上皮细胞EpRas高，过表达miR-29a能够抑制三重四脯氨酸(tristetraprolin, TTP)，从而导致EMT及肿瘤转移。进一步发现临床乳腺癌病人中，miR-29a表达水平比正常组织明显上调，而TTP表达降低，miR-29a与TTP表达水平呈反向关系，提示miR-29a与乳腺癌相关，且直接调控了乳腺癌细胞的转移。因此，miR-29在肿瘤转移中发挥的是促进还是抑制作用依赖于miR-29所处的微环境。

2.5表观遗传学修饰

基因表达的表观遗传学现象包括DNA甲基化，组氨酸乙酰化和RNA相关的基因沉默。DNA甲基化是指在DNA甲基化转移酶的作用下，在基因组CpG二核苷酸的胞嘧啶5'碳位共价键结合一个甲基基团。DNA甲基化可以关闭某些基因的活性，去甲基化则诱导了基因的重新活化和表达。近来发现，miR-29 与

DNA甲基化相关，miR-29通过靶向DNA甲基转移酶改变肿瘤相关基因的甲基化状态。Filkowski等[38]发现被紫外照射后的亲本以及后代基因组的低甲基化和不稳定性会导致miRNA表达异常。父本被照射后会导致男性种系中miR-29a与miR-29b表达上调，随后DNA甲基转移酶DNMT3A表达下调，导致LINE1和SINB2基因显著的低甲基化。男性种系的表观遗传的改变会进一步对后代体细胞产生有害作用。Fabbri等[39]发现在肺癌样品中miR-29s明显下调，miR-29能与DNA甲基化转移酶DNMT3A, DNMT3B的3’UTR区互补，在肺癌组织中，miR-29与DNMT3A, DNMT3B呈负相关的关系。肺癌细胞中，过表达miR-29s可显著降低DNMT3A和DNMT3B mRNA和蛋白表达水平，继而那些被甲基化沉默的抑癌基因如FHIT和wwox重新表达。Nguyen等[40]和Pass等[41]在皮肤黑色素瘤和上皮性间皮瘤中也得到了类似的结果，发现miR-29c可下调DNMT的表达，上调基因的去甲基化。miR-29c和DNMT3B在皮肤黑色素瘤转归及预后判断中具有重要价值。Garzo 等[8, 9]研究发现miR-29b 除了可直接靶向调节

DNMT3A和DNMT3B的表达，还可以通过靶向Sp1间接调节DNMT1的表达，

143

调控白血病细胞中抑癌基因p15INK4b和ESR1的甲基化状态从而调控肿瘤细胞的生存和凋亡。有趣的是，最近一项研究报道miRNA与lncRNA这两种非编码RNA分子通过表观遗传学修饰存在联系。Braconi等[42]研究发现MEG3这种lncRNA在肝癌组织中由于启动子甲基化其表达通常下调，过表达miR-29b可促进MEG3的表达，抑制肿瘤细胞生长和凋亡。综上所述，miRNA在肿瘤中和DNA甲基化密切相关，提示应用合成的miR-29寡核苷酸抑制DNA甲基化是一种有效的治疗肿瘤的方法。

2.6免疫调节

除了调节与肿瘤发生发展相关的多种细胞过程之外，miR-29家族对免疫细胞的增殖和辅助性T细胞分泌细胞因子（尤其是IFN-γ）有很大的影响。miR-29可直接同时靶向T-bet和Eomes基因，并影响辅助性T细胞的分化，使IFN-γ分泌减少，从而导致免疫系统功能失调，在多种病理过程如癌中发挥作用[43]。Ma等[44]设计了与miR-29序列完全互补的miRNA海绵GS29，成功的敲除内源性miR-29的表达，构建了GS29表达的转基因小鼠，发现GS29转基因小鼠能更有效地抵抗李斯特菌和分枝杆菌的感染，产生更强的先天性和TH1获得性免疫应答反应，这种效应主要原因是GS29转基因小鼠的NK细胞和T细胞活化后产生更多的IFN-γ。B7-H3是肿瘤细胞表面上的免疫调节糖蛋白，能够抑制NK细胞和T细胞的活性。miR-29能够直接靶向B7-H3的3’UTR区而抑制B7-H3的表达。miR-29在肿瘤中低表达从而使肿瘤细胞高表达B7-H3这个免疫抑制分子，从而使实体瘤逃过免疫监视而存活[45]。这项研究提示miR-29可以作为很多实体瘤的诊断指标和治疗靶点。

2.7纤维化与肿瘤

除了参与多种肿瘤发生之外，miR-29还与一些与肿瘤相关的疾病有密切联系。miR-29可调控细胞外基质基因的表达，影响多个与纤维化相关的信号传导通路，例如TGF-β/Smads， Wnt/β-cateninand和MAPK传导通路[18, 36]。miR-29还可通过抑制EMT阻止纤维化的发生。miR-29参与多器官的纤维化，例如肝、肺、心、肾、系统性硬化症、小梁网和骨组织的重塑[10, 15-17, 27]。大量研究证实肝

纤维化与肝癌的发生密切相关，一项回顾性研究显示，在4353例肝癌患者中，肝纤维化的发病率高达80%。在肝纤维化时，肝星形细胞被激活，miR-29b表达显著下调；导入miR-29b后，细胞中细胞外基质的表达水平大大降低。提示miR-29

144

可作为肝纤维化患者预后评估和治疗的生物标记物[15]。尽管没有确凿的证据说明肺纤维化与肺癌之间必然相关，但肯定的是，矽肺和石棉肺沉积所致的肺纤维化是肺癌发生的诱因。因此，miR-29可作为纤维化疾病的治疗靶点，减少肺癌的发病率。

3结论

MiRNA在疾病中的作用模式主要通过影响靶基因的表达水平，最终影响细胞生物学行为。miR-29作为一个重要的疾病相关miRNA，其本身表达的调控及其在疾病发生发展中的作用以及相关机制的研究已经成为热点之一。综上所述，miR-29与众多疾病相关编码基因形成了复杂的网络调控关系，通过影响DNA甲基化、细胞外基质蛋白、细胞周期蛋白以及细胞凋亡等途径参与肿瘤性疾病的发病机制。一方面miR-29可调控人体细胞中参与细胞增殖、分化、凋亡、迁移、免疫等过程的相关基因表达；另一方面多种肿瘤中存在miR-29的异常表达。但目前相关报道主要集中在miR-29下游靶基因，对其在不同组织细胞体系中表达的调控报道较少。因此，进一步研究miR-29在细胞中的表达调控方式及影响因素将有利于探明miR-29与疾病发生发展之间的因果关系和miR-29在疾病预防和治疗中的应用价值，为miR-29将来可能的临床应用提供理论依据。

参考文献

[1] Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing[J]. Nature, 2003, 425(6956): 415-419.

[2] Hutvagner G, Mclachlan J, Pasquinelli A E, et al. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA[J]. Science, 2001, 293(5531): 834-838.

[3] Bernstein E, Caudy A A, Hammond S M, et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference[J]. Nature, 2001, 409(6818): 363-366.

[4] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs[J]. Science, 2001, 294(5543): 853-858.

[5] Dostie J, Mourelatos Z, Yang M, et al. Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs[J]. RNA, 2003, 9(2): 180-186.

[6] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse[J]. Curr Biol, 2002, 12(9): 735-739.

[7] Schneider B, Nagel S, Kaufmann M, et al. T(3; 7)(q27; q32) fuses BCL6 to a non-coding region at FRA7H near miR-29[J]. Leukemia, 2008, 22(6): 1262-1266.145

[8] Garzon R, Heaphy C E, Havelange V, et al. MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2009, 114(26): 5331-5341.

[9] Garzon R, Liu S, Fabbri M, et al. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1[J]. Blood, 2009, 113(25): 6411-6418.

[10] van Rooij E, Sutherland L B, Thatcher J E, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(35): 13027-13032.

[11] Chang T C, Yu D, Lee Y S, et al. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis[J]. Nat Genet, 2008, 40(1): 43-50.

[12] Mott J L, Kurita S, Cazanave S C, et al. Transcriptional suppression of mir-29b-1/mir-29a promoter by c-Myc, hedgehog, and NF-kappaB[J]. J Cell Biochem, 2010, 110(5): 1155-1164.

[13] Eyholzer M, Schmid S, Wilkens L, et al. The tumour-suppressive miR-29a/b1 cluster is regulated by CEBPA and blocked in human AML[J]. Br J Cancer, 2010, 103(2): 275-284.

[14] Wang H, Garzon R, Sun H, et al. NF-kappaB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma[J]. Cancer Cell, 2008, 14(5): 369-381.

[15] Roderburg C, Urban G W, Bettermann K, et al. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis[J]. Hepatology, 2011, 53(1): 209-218.

[16] Cushing L, Kuang P P, Qian J, et al. miR-29 is a major regulator of genes associated with pulmonary fibrosis[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 45(2): 287-294.

[17] Maurer B, Stanczyk J, Jungel A, et al. MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis[J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(6): 1733-1743.

[18] Luna C, Li G, Qiu J, et al. Cross-talk between miR-29 and transforming growth factor-betas in trabecular meshwork cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(6): 3567-3572.

[19] Qin W, Chung A C, Huang X R, et al. TGF-beta/Smad3 signaling promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(8): 1462-1474.

[20] Ugalde A P, Ramsay A J, de la Rosa J, et al. Aging and chronic DNA damage response activate a regulatory pathway involving miR-29 and p53[J]. EMBO J, 2011, 30(11): 2219-2232.

[21] Harbour J W, Luo R X, Dei S A, et al. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1[J]. Cell, 1999, 98(6): 859-869.

[22] Zhao J J, Lin J, Lwin T, et al. microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma[J]. Blood, 2010, 115(13): 2630-2639.

[23] Li Y, Wang F, Xu J, et al. Progressive miRNA expression profiles in cervical carcinogenesis and identification of HPV-related target genes for miR-29[J]. J Pathol, 2011, 224(4): 484-495.

[24] Han Y C, Park C Y, Bhagat G, et al. microRNA-29a induces aberrant self-renewal capacity in hematopoietic progenitors, biased myeloid development, and acute myeloid leukemia[J]. J Exp

146

Med,2010,207(3):475-489.

[25] Ugalde A P, Ramsay A J, de la Rosa J, et al. Aging and chronic DNA damage response activate a regulatory pathway involving miR-29 and p53[J]. EMBO J, 2011, 30(11): 2219-2232.

[26] Martinez I, Cazalla D, Almstead L L, et al. miR-29 and miR-30 regulate B-Myb expression during cellular senescence[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(2): 522-527.

[27] Kapinas K, Kessler C B, Delany A M. miR-29 suppression of osteonectin in osteoblasts: regulation during differentiation and by canonical Wnt signaling[J]. J Cell Biochem, 2009, 108(1): 216-224.

[28] Li Z, Hassan M Q, Jafferji M, et al. Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation[J]. J Biol Chem, 2009, 284(23): 15676-15684.

[29] Mott J L, Kobayashi S, Bronk S F, et al. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis[J]. Oncogene, 2007, 26(42): 6133-6140.

[30] Xiong Y, Fang J H, Yun J P, et al. Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2010, 51(3): 836-845.

[31] Pekarsky Y, Koval A, Hallas C, et al. Tcl1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(7): 3028-3033.

[32] Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, et al. Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181[J]. Cancer Res, 2006, 66(24): 11590-11593.

[33] Park S Y, Lee J H, Ha M, et al. miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42[J]. Nat Struct Mol Biol, 2009, 16(1): 23-29.

[34] Sengupta S, den Boon J A, Chen I H, et al. MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(15): 5874-5878.

[35] Castilla M A, Moreno-Bueno G, Romero-Perez L, et al. Micro-RNA signature of the epithelial-mesenchymal transition in endometrial carcinosarcoma[J]. J Pathol, 2011, 223(1): 72-80.

[36] Winbanks C E, Wang B, Beyer C, et al. TGF-beta regulates miR-206 and miR-29 to control myogenic differentiation through regulation of HDAC4[J]. J Biol Chem, 2011, 286(16): 13805-13814.

[37] Gebeshuber C, Zatloukal K, Martinez J. miR-29a suppresses tristetraprolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis[J]. EMBO reports, 2009, 10(4): 400-405.

[38] Filkowski J N, Ilnytskyy Y, Tamminga J, et al. Hypomethylation and genome instability in the germline of exposed parents and their progeny is associated with altered miRNA expression[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(6): 1110-1115.

[39] Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(40): 15805-15810.

[40] Nguyen T, Kuo C, Nicholl M B, et al. Downregulation of microRNA-29c is associated with hypermethylation of tumor-related genes and disease outcome in cutaneous melanoma[J].

147

Epigenetics,2011,6(3):388-394.

[41] Pass H I, Goparaju C, Ivanov S, et al. hsa-miR-29c\* is linked to the prognosis of malignant pleural mesothelioma[J]. Cancer Res, 2010, 70(5): 1916-1924.

[42] Braconi C, Kogure T, Valeri N, et al. microRNA-29 can regulate expression of the long non-coding RNA gene MEG3 in hepatocellular cancer[J]. Oncogene, 2011, 30(47): 4750-4756.

[43] Steiner D F, Thomas M F, Hu J K, et al. MicroRNA-29 regulates T-box transcription factors and interferon-gamma production in helper T cells[J]. Immunity, 2011, 35(2): 169-181.

[44] Ma F, Xu S, Liu X, et al. The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon-gamma[J]. Nat Immunol, 2011, 12(9): 861-869.

[45] Xu H, Cheung I Y, Guo H F, et al. MicroRNA miR-29 modulates expression of immunoinhibitory molecule B7-H3: potential implications for immune based therapy of human solid tumors[J]. Cancer Res, 2009, 69(15): 6275-6281.

148

致谢

光阴荏苒，四年的博士学习生活即将结束，回首四年的求学生涯，太多的事历历在目，太多的人跃然纸上。人生有幸有这份宝贵的经历，要感谢身边许多人的关爱和帮助。在论文即将完稿之际，谨以此文表达我最诚挚的谢意。

首先衷心感谢导师张雅洁教授对我的悉心教导和培养。四年前，导师为我再一次开启生命科学研究的大门，引领我进入科学的圣殿。四年来，从课题设计、实验研究到论文撰写，导师每一步都陪伴和指导着我。导师对科研的敏锐思维，对治学的严谨态度，常常令我折服，激励着我不断奋发前进；导师孜孜不倦的教诲，及时为我答疑解惑，常常令我豁然开朗；导师忘我的敬业精神，锐意进取的工作作风，深深刻进我的脑海，使我受益匪浅。课题之外，导师在生活中也给予了无私的关怀，时常温暖我的心间。师恩难忘，谨借此机会，我向导师张雅洁教授致以深深敬意和感谢！

衷心感谢广州医科大学病理学教研室龙捷主任及各位同事在工作和学习中给予的帮助和大力支持，感谢谢晓斌高级实验师在实验中给予的技术支持。我科研工作中的点滴进步，都离不开科室每一位老师给予我的支持和鼓励，能置身于如此温暖的一个大集体，令我庆幸和感动，在此我深表谢意！

衷心感谢广州医科大学中心实验室刘启才教授在实验方面给予的帮助。衷心感谢广州医科大学形态教研室的张慧球实验师在实验中提供的无私

帮助。

感谢曾与我共同奋斗的李书华、刘晓蔼、付欣、杨磊、周晓明、亓翠玲博士以及陈贤亮、李龙光、彭妙茹、史文利、刘婉霞同学等在实验中对我的关心、鼓励和帮助，求学路上的一路相伴，值得终身铭记。

特别感谢我的先生涂永生，在生活及精神上给予的一切，实验中总有些许的坎坷，他不仅无怨无悔地承受了我的脾气，还让家庭生活不乏风趣和欢乐。感谢我可爱的儿子一直陪伴着我，他的笑脸让我充满信心战胜困难。感谢我的父母，正是他们无私的关爱和理解使我顺利完成学业。

感谢各位专家在百忙之中评阅论文、参加答辩并给予指导！

149

# 学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。文中依法引用他人的成果、对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中做出明确标注或得到许可。论文内容未包含法律意义上已属于他人的任何形式的研究成果，也不包含本人已用于其他学位申请的论文或成果。

本人如违反上述声明，愿意承担以下责任和后果：

1．交回学校授予的学位证书；

2．学校可在相关媒体上对作者本人的行为进行通报；

3．本人按照学校规定的方式，对因不当取得学位给学校造成的名誉损害，进行公开道歉。

4．本人负责因论文成果不实产生的法律纠纷。

论文作者签名：日期：年 月 日

# 学位论文知识产权权属声明

本人在导师指导下所完成的论文及相关的职务作品，知识产权归属广州医学院及附属单位。广州医学院及附属单位享有以任何方式发表、复制、公开阅览、借阅以及申请专利等权利。本人离校后发表或使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时，署名单位仍然为广州医学院及附属单位。任何其他收存和保管本论文的单位和个人，未经本论文作者、导师授权，不得将本论文转借他人、复制、抄录或以其他任何方式传播，否则，引起有碍作者的著作权益问题，将会追究相应的法律责任。

论文作者签名： 日期： 年 月 日导师签名： 日期： 年 月 日

# 关于学位论文使用授权的说明

1、学校可以保留本学位论文的原件及复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复印手段保存、汇编学位论文；

2、本人授权学校向国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。送交学位论文时间选择（请在下面相应栏内打“√”）：

①答辩后即可送：是否

②延迟一年后送：

③延迟二年后送：

④延迟三年后送：

论文作者签名： 日期： 年 月 日导师签名： 日期： 年 月 日

150