

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.12.004

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.12.004>

MiR-101 靶向调控 CREB1 抑制肺癌的发展

李慧敏, 姜东亮, 张韧, 王妮妮

(濮阳市油田总医院呼吸科, 河南 濮阳 457001)

[摘要] 目的: 观察miR-101在肺癌细胞或组织中的表达变化情况, 分析miR-101通过靶向调控环磷腺苷反应元件结合蛋白1(cyclic adenosine monophosphate responsive element binding protein 1, CREB1)对肺癌发生发展的影响。方法: 实时聚合酶链反应检测肺癌组织, 癌旁正常组织, 直径 ≤ 5 cm, > 5 cm, 转移, 无转移肺癌组织中的miR-101表达量以及各株肺癌细胞中miR-101与mRNA的表达量。MicroRNA靶基因数据库与荧光素酶报告基因检验CREB1为miR-101的潜在靶基因。实时聚合酶链反应和蛋白质印迹法检测miR-101 mimics对CREB1 mRNA及蛋白表达的影响。实时聚合酶链反应检测肿瘤组织与癌旁正常组织CREB1 mRNA的表达量; 免疫组织化学检测肿瘤组织和癌旁正常组织中CREB1的表达量。CCK-8检测各转染组的光密度(optical density, OD)值; 流式细胞术检测细胞比值。Tranwell迁移实验和细胞划痕实验检测细胞迁移能力。观察21 d裸鼠肿瘤体积及质量; 检测miR-101在miR-101 mimics转染组裸鼠肿瘤组织中的表达量; 增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)染色检测裸鼠肿瘤细胞增殖情况。结果: 与癌旁正常组织相比, 肺癌组织中miR-101的表达量显著降低; 转移的肺癌组织中miR-101的表达量显著低于无转移肿瘤组织; 直径 ≤ 5 cm的肿瘤中miR-101的表达量显著高于直径 > 5 cm的肿瘤; 各株肺癌细胞的miR-101表达量均显著低于正常肺细胞, 而CREB1 mRNA表达量相反。miR-101可通过结合CREB1的3'-非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)抑制CREB1的表达。miR-101能够抑制CREB1的mRNA翻译及其蛋白表达。肺癌组织中CREB1 mRNA表达量显著升高。miR-101可抑制肺癌细胞A549的增殖, 迁移并使其细胞周期在S期聚集, CREB1补回该抑制作用。miR-101 mimics转染组裸鼠肿瘤体积及质量均显著低于对照组; miR-101过表达能够抑制A549细胞的增殖, 抑制肿瘤发展。结论: miR-101通过抑制CREB1表达抑制肺癌的发展, 可能成为肺癌诊断及治疗的新靶标。

[关键词] 肺癌; miR-101; 环磷腺苷反应元件结合蛋白1

MiR-101 targets CREB1 to inhibit the development of lung cancer

LI Huimin, JIANG Dongliang, ZHANG Ren, WANG Nini

(Department of Respiratory Disease, Puyang Oilfield General Hospital, Puyang Henan 457001, China)

Abstract Objective: To investigate the changes in the expression of miR-101 in lung cancer cells or tissues, and analyze

收稿日期 (Date of reception): 2019-03-18

通信作者 (Corresponding author): 李慧敏, Email: 250258221@qq.com

the impact of miR-101 on the development and progression of lung cancer by targeting cyclic adenosine monophosphate responsive element binding protein 1 (CREB1). **Methods:** Real-time PCR was used to detect the expression of miR-101 in lung cancer tumor tissues and adjacent normal tissues, tumors with diameters ≤ 5 or > 5 cm, metastatic and non-metastatic lung cancer tumor tissues. The expressions of miR-101 and CREB1 mRNA in each lung cancer cell line were detected. MicroRNA target gene database and luciferase reporter gene assay were used to test the potential targeting relationship between CREB1 and miR-101. The effect of miR-101 mimics on the mRNA and protein expression of CREB1 was detected by real-time PCR and Western blot. The expression of CREB1 in tumor and adjacent normal tissues was detected by immunohistochemical assay; the mRNA expression of CREB1 was detected by real-time PCR in tumor tissues and adjacent normal tissues. Optical density (OD) value of each transfection group was detected by CCK-8 assay. Cell ratio was detected by flow cytometry. Transwell migration assay and cell scratch assay were used to detect cell migration ability. The tumor volume and weight of nude mice at 21 d were observed. The expression level of miR-101 in tumor tissues of nude mice transfected with miR-101 mimics was detected. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) staining results were used to detect tumor cell proliferation in nude mice. **Results:** The expression level of miR-101 in lung cancer tissues was significantly lower than that in the adjacent normal tissues. The expression level of miR-101 in metastatic lung cancer tissues was significantly lower than that in non-metastatic tumor tissues. The expression level of miR-101 in tumors with diameter ≤ 5 cm was significantly higher than that in tumors with diameter > 5 cm. The expression level of miR-101 in all lung cancer cells was significantly lower than that in normal lung cells, while the expression level of CREB1 mRNA was opposite. miR-101 inhibited the expression of CREB1 via binding to the 3'-untranslated region (3'-UTR) of CREB1. miR-101 can inhibit the mRNA translation and protein expression of CREB1. The mRNA expression level of CREB1 was significantly increased in lung cancer tumor tissues. miR-101 inhibited the proliferation and migration of A549 cells, and caused the cell cycle to aggregate in S phase, CREB1 compensated for this inhibitory effect could antagonize this inhibitory effect. The tumor volume and weight of nude mice transfected with miR-101 mimics were significantly lower than those of the control group. Overexpression of miR-101 inhibited the proliferation of A549 cells and tumor development. **Conclusion:** MiR-101 may inhibit the development of lung cancer via downregulating the expression of CREB1 and may be a new target for the diagnosis and treatment of lung cancer.

Keywords lung cancer; miR-101; cyclic adenosine monophosphate responsive element binding protein 1

肺癌是一种涉及了基因和表观遗传改变的复杂疾病, 是世界范围内癌症死亡的主要原因^[1]。晚期肺癌患者的生存率和总体预后仍相对较低。cAMP反应元件结合蛋白1 (cAMP responsive element binding protein 1, CREB1)是碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)超家族的一种转录因子, 位于细胞核内, 参与调节众多生理过程, 对维持机体内环境的稳态起重要作用^[2]。bZIP超家族具有相似的结构, 包括C末端的bZIP结构域和N末端的超激活结构域(transcription activates domains, TAD), TAD又分为激酶诱导域(kinase induction domain, KID)和谷氨酰胺构成的激活域(Q2)。N末端KID133位的丝氨酸残基磷酸

化后, CREB1活化并以特征性的二聚体形式结合环磷腺苷反应元件(cyclic adenosine monophosphate responsive element, CRE)位点, 启动下游基因的转录和表达。CREB在多种肿瘤中均表达上调, 并且通过促进下游因子活化与细胞周期运转, 抑制凋亡及促进转移相关基因的表达来加速肿瘤的发生发展^[3]。随着分子生物学的飞速发展, 微小RNA(microRNA, miRNA)的发现为肺癌的基因治疗提供了有效的切入点和突破口。目前, miRNA已被证实广泛存在于动植物及人类细胞中^[4-5]。本研究探讨miR-101通过靶向调控CREB1在肺癌中扮演的角色, 旨在为肺癌的未来研究提供新的方向。

1 对象与方法

1.1 对象

选取2015年12月至2018年6月濮阳市油田总医院病理科93例肺癌患者的肺癌组织及匹配癌旁组织, 其中男77例, 女16例, 年龄(64.13±12.72)岁, 均经组织病理学检查证实, 未接受化学治疗和/或放射治疗。所有组织标本采集时先切成小块, 迅速置于冻存管中液氮保存, 6 h后移至-80 °C冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 试剂

TRIzol试剂盒、反转录试剂盒、real-time PCR试剂盒、DMEM培养基、CCK-8试剂盒和Lipofectamine 2000转染试剂购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 胎牛血清购自美国Gibico公司; DAB显色试剂盒购自博士德生物工程有限公司。

1.2.2 外周血采集

所有纳入研究的肺癌患者均于清晨空腹状态下抽取外周静脉血, 具体操作如下: 采用一次性血清分离胶管, 抽取外周静脉血约3 mL; 待血清析出后以1 000 r/min离心10 min, 取上层血清保存至-80 °C冰箱待检测。

1.2.3 Real-time PCR 检测

按照TRIzol试剂盒说明书中步骤提取总RNA, 按照反转录试剂盒的说明书将总RNA进行RNA反转录, 合成cDNA。按照real-time PCR试剂盒说明书进行PCR反应。

1.2.4 细胞培养

用含10%胎牛血清的DMEM培养基在37 °C, 5% CO₂条件下培养A549细胞。

1.2.5 细胞转染

取对数生长期细胞以 $1.0 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ 个/孔接种于6孔板中, 置于37 °C, 5% CO₂培养箱中至细胞密度60%~70%之后, 将细胞分为2组: miRNA阴性对照转染组以及miR-101过表达miRNA转染组, 并换成无血清无双抗的培养基, 1 mL/孔。miRNA及转染试剂Lipofectamine 2000分别用100 μL MEM稀释后, 依照公司说明书所需比例混匀后静置20 min后, 逐滴加入并且轻晃混匀, 培养6 h后, 更换为完全培养基, 48 h后收集细胞进行下一步分析。

1.2.6 荧光素酶报告基因法检测 miR-101 与靶基因 CREB1 的结合

利用microRNA靶基因数据库预测miR-101与CREB1可能的作用位点。构建CREB1野生型3'非翻

译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)荧光素酶质粒pMIR-WT和突变型质粒pMIR-Mut。将pMIR-WT和pMIR-Mut与miR-101模拟物(mimics)和miRNA mimics阴性对照(miR-NC)对A549细胞进行共转染, 荧光素酶检测实验检测各组荧光素酶活性。

1.2.7 蛋白质印迹法

将miR-101 mimics和miR-NC分别转染进A549细胞中, 36 h后用IP裂解液收集细胞。按照蛋白质印迹法操作流程检测CREB1蛋白的表达量。

1.2.8 免疫组织化学

将组织标本置于4%多聚甲醛固定液中固定48 h后进行常规脱水, 透明及浸蜡处理; 使用莱卡包埋机进行包埋石蜡块, RM2016切片机进行连续切片, 厚度5 μm。石蜡切片置于65 °C烤箱中过夜, 而后梯度脱蜡、水化。水化后的组织切片上滴加3%过氧化氢溶液以阻断内源性过氧化物酶; 而后将切片置于预先配置好的柠檬酸盐缓冲液中, 采用微波加热法对切片进行酸性修复。修复结束后予以1% BSA室温封闭30 min, 加入一抗于4 °C过夜。加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(1:200)于组织切片, 室温孵育1 h。采用DAB显色后, 苏木精染核1 min, 而后进行脱水和中性树脂封片。采用正置显微镜观察切片阳性信号, 并进行计数统计。

1.2.9 Transwell 细胞迁移实验

取处于对数生长期的细胞, 胰蛋白酶消化, 使用含10% BSA的培养基重悬细胞, 调整细胞密度为 1×10^6 个/mL。将滤膜孔径为8 μm的Transwell小室放置于24孔板中; 在小室外加入600 μL含10%血清的培养基; 在小室内加入100 μL细胞悬液; 将培养板放入培养箱, 常规培养24~48 h。取出小室, PBS淋洗3次; 将小室置于95%乙醇中固定5 min; 在0.5%结晶紫染色液中染色10 min后, 用PBS漂洗去除未结合细胞的染色液。用棉签轻拭去小室滤膜上层细胞, 在显微镜下观察滤膜下层细胞, 每个样本随机选取10个视野拍照并计数。

1.2.10 CCK-8 检测细胞增殖

参照CCK-8试剂盒说明书步骤进行, 各组转染24 h后, 接种于96孔培养板, 每孔加10 μL CCK-8, 37 °C培养2 h, 酶标仪480 nm波长处测定光密度(optical density, OD)值。

1.2.11 细胞划痕实验检测细胞迁移

各组转染48 h后, 将单细胞悬液接种于12孔细胞培养板。待细胞长成单层弃去培养液, 在每孔中央划出一个划痕, 洗去死亡细胞, 显微镜下拍照。利用软件测量并计算24 h细胞迁移距离。

1.2.12 流式细胞术检测细胞周期

悬浮并收集不同时间点细胞, 生理盐水冲洗细胞两遍, 70%乙醇固定细胞。加入碘化丙啶(50 mg/L, 1% Triton X-100)DNA荧光染色, 4℃冰箱避光染色30 min, 铜网过滤, 使样本成为合格的单细胞悬液, 流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.13 构建肺癌异种移植裸鼠模型

取分别转染miR-101 mimics和miR-NC的A549细胞, 调整细胞密度至 2×10^8 个/mL。取0.1 mL细胞悬液注射于每只裸鼠左前肢腋窝皮下, 将裸鼠随机分为2组, 分别注射转染了miR-101 mimics的A549细胞和转染了miR-NC的A549细胞。之后每日观察裸鼠皮下肿瘤生长情况, 21 d后将肿瘤从裸鼠身上分离, 增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)染色分析细胞增殖情况。

1.3 统计学处理

采用SPSS 22.0统计软件进行t检验和 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 检测肺癌组织中miRNA的表达量

Real-time PCR检测miR-101在肺癌与癌旁正常组织中的表达量, 发现肺癌组织中miR-101的表达量显著低于癌旁正常组织(图1A)。而转移的肺癌组织中miR-101表达量显著低于无转移肿瘤组织(图1B)。直径 ≤ 5 cm的肿瘤中miR-101表达量显著高于直径 > 5 cm的肿瘤(图1C)。

2.2 各株肺癌细胞中miRNA与CREB1 mRNA表达量

检测肺癌细胞株NCI-H460, NCL-H1975, 95D, HCL-H358, A549和NCL-H1299中miR-101的表达量发现: 各株肺癌细胞中miR-101的表达量均显著低于正常肺细胞BESA-2B(图2A)。同时还检测各肺癌细胞株中CREB1 mRNA表达量, 结果显示: NCI-H460, NCL-H1975, 95D, HCL-H358, A549和NCL-H1299中CREB1 mRNA的表达量均显著高于正常肺细胞BEAS-2B(图2B)。

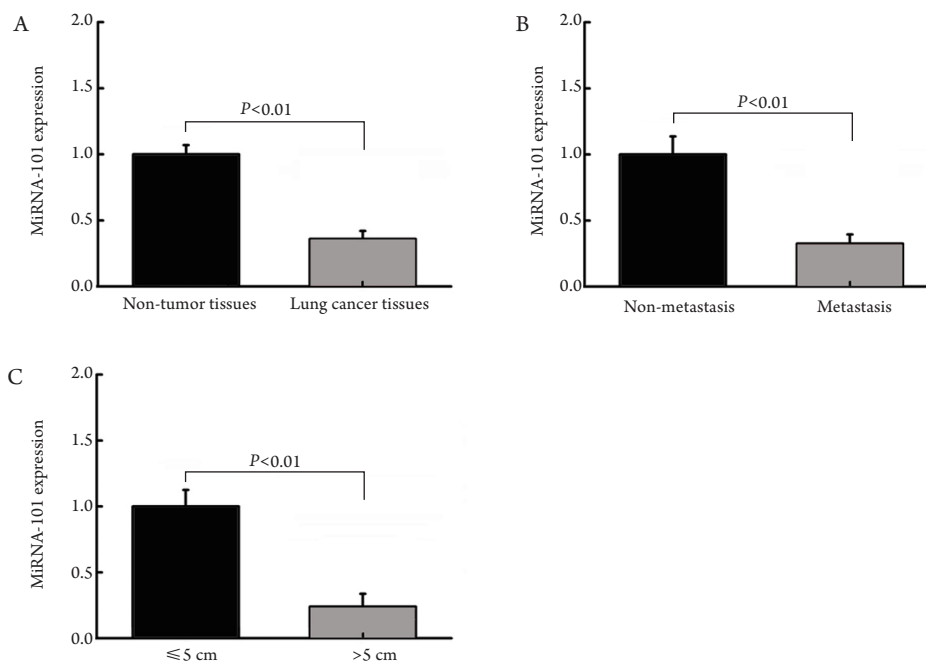


图1 肺癌组织中miRNA表达量检测

Figure 1 Detection of miRNA expression in lung cancer tissues

(A) Real-time PCR检测肺癌与癌旁正常组织中miR-101的表达量; (B) Real-time PCR检测转移和无转移肿瘤组织中miR-101的表达量; (C) qRT-PCR检测直径 ≤ 5 cm和直径 > 5 cm的肿瘤中miR-101的表达量。

(A) Real-time PCR was used to detect the expression of miR-101 in lung cancer tissues and adjacent normal tissues; (B) Real-time PCR was used to detect the expression of miR-101 in metastatic and non-metastatic tumor tissues; (C) Real-time PCR was used to detect the expression of miR-101 in tumors with diameters ≤ 5 and > 5 cm.

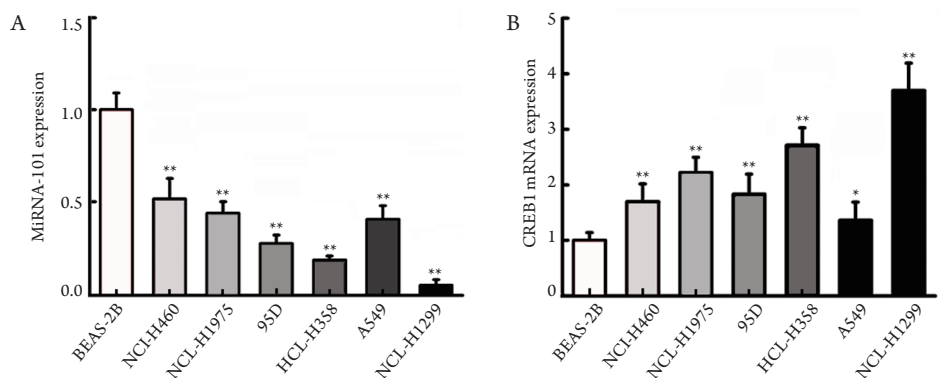


图2 各肺癌细胞株中miR-101与CREB1 mRNA表达量检测

Figure 2 Detection of expression of miR-101 and CREB1 mRNA in each lung cancer cell line

(A) Real-time PCR检测各肺癌细胞株和正常肺细胞中miR-101的表达量; (B) Real-time PCR检测各肺癌细胞株和正常肺细胞中CREB1 mRNA的表达量。与正常肺细胞BEAS-2B相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

(A) The expression of miR-101 in each lung cancer cell line and normal lung cells was detected by Real-time PCR; (B) The expression of CREB1 mRNA in each lung cancer cell line and normal lung cells was detected by Real-time PCR. Compared with normal lung cell BEAS-2B, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

2.3 MiR-101 通过与 CREB1 mRNA 的 3'-UTR 结合抑制 CREB1 的表达

通过microRNA靶基因数据库进行筛选, 预测CREB1为miR-101的潜在靶基因(图3A)。我们构建了CREB1野生型3'-UTR荧光素酶报告基因质粒pMIR-CREB1-wt及突变型报告基因质粒pMIR-CREB1-Mut。将miR-101 mimics, miR-NC, 内参海肾荧光素酶以及pMIR-CREB1-wt和pMIR-CREB1-Mut报告基因质粒共转染进A549细胞中, 双荧光素酶检测结果显示: miR-101 mimics可显著抑制pMIR-CREB1-wt质粒荧光素酶活性, 而对pMIR-CREB1-Mut荧光素酶活性无显著影响(图3B), 表明miR-101可以通过结合CREB1 mRNA的3'-UTR进而抑制CREB1的表达。

2.4 MiR-101 对 CREB1 的调控作用

检验miR-101对CREB1的调控作用, real-time PCR结果显示: miR-101 mimics转染组中CREB1 mRNA表达量显著低于对照组(图4A); 蛋白质印迹法检测结果显示: 与对照组相比, miR-101 mimics转染组中CREB1蛋白表达量显著降低(图4B), 表明miR-101能够抑制CREB1的mRNA翻译及蛋白表达。

2.5 CREB1 mRNA 在肺癌组织中的表达量

免疫组织化学结果表明: 肺癌组织中CREB1的表达量显著高于癌旁正常组织(图5A)。Real-time PCR结果同样显示: 与癌旁正常组织相比, 肿瘤组织中CREB1 mRNA表达量显著升高(图5B)。

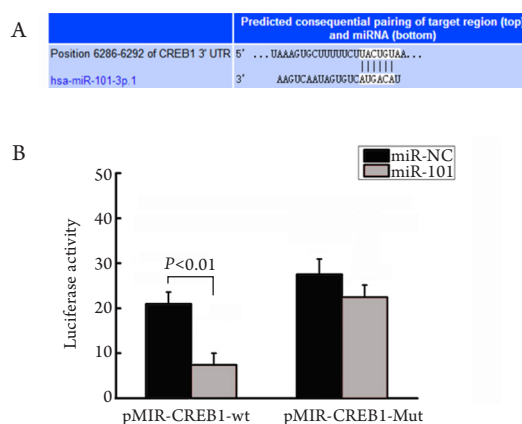


图3 CREB1是miR-101的靶基因

Figure 3 CREB1 is the target gene of miR-101

(A) 软件预测CREB1为miR-101的潜在靶基因; (B) 荧光素酶报告基因法检测各组荧光素酶活性。

(A) The software predicted that CREB1 was the potential target gene of miR-101; (B) Luciferase reporter gene assay was used to detect the luciferase activity in each group.

2.6 MiR-101 和 CREB1 与细胞增殖和周期的相关性

将miR-NC, miR-101 mimics和CREB1转染进A549细胞, CCK-8法检测细胞增殖, 结果显示: miR-101 mimics转染组的OD值显著低于对照组, 而miR-101 mimics+CREB1转染组的OD值显著高于miR-101 mimics转染组(图6A)。流式细胞术结果显示: miR-101 mimics转染组S期细胞比值显著低于对照组, miR-101 mimics+CREB1转染组S期细胞比值显著高于miR-101 mimics转染组(图6B)。

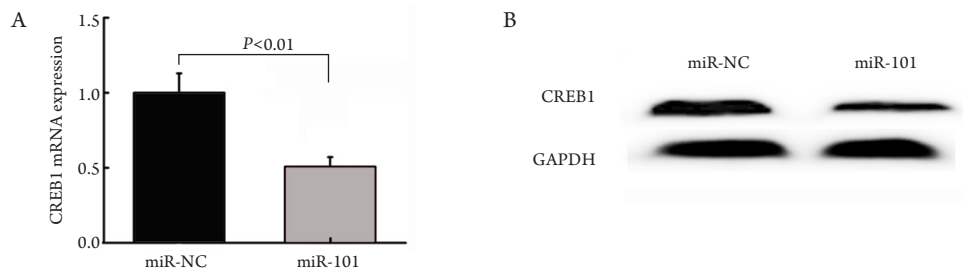


图4 MiR-101对CREB1的调控作用

Figure 4 Regulatory effect of miR-101 on CREB1

(A) Real-time PCR检测miR-101 mimics转染组和对照组中CREB1 mRNA表达量; (B)蛋白质印迹法检测miR-101 mimics转染组和对照组中CREB1蛋白表达量。

(A) Expression of CREB1 mRNA in the miR-101 mimics transfection group and the control group was detected by Real-time PCR; (B) Expression of CREB1 protein in the miR-101 mimics transfection group and the control group was detected by Western blot.

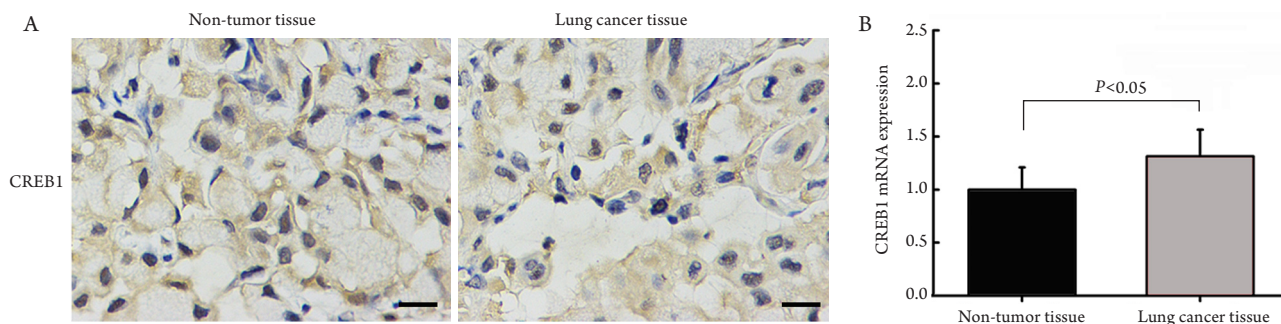


图5 肺癌和癌旁正常组织中CREB1 mRNA与蛋白表达检测

Figure 5 Detection of expression of CREB1 mRNA and protein in lung cancer and adjacent normal tissues

(A)免疫组织化学检测肺癌和癌旁正常组织中CREB1的表达量(比例尺: 20 μ m); (B)Real-time PCR检测肿瘤组织和癌旁正常组织中CREB1 mRNA表达量。

(A) Expression of CREB1 in lung cancer and adjacent normal tissues was detected by immunohistochemistry (scale bar: 20 μ m); (B) Expression of CREB1 mRNA in tumor and adjacent normal tissues was detected by Real-time PCR.

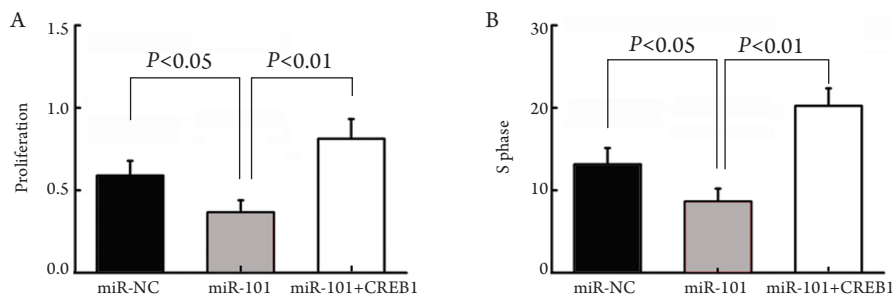


图6 MiR-101和CREB1与细胞增殖和周期的相关性

Figure 6 Correlation between miR-101 and CREB1 and cell proliferation and cycle

(A)CCK-8实验检测各转染组的OD值; (B)流式细胞术检测细胞比值。

(A) OD value of each transfection group was detected by CCK-8 assay; (B) Cell fraction was detected by flow cytometry.

2.7 MiR-101 和 CREB1 与细胞迁移能力的相关性

Transwell迁移实验结果显示: miR-101 mimics转染组细胞迁移能力显著低于对照组, 而miR-101 mimics+CREB1转染组细胞迁移能力显著高于miR-101 mimics转染组(图7A)。与Transwell结果一致, 细胞划痕实验结果显示: miR-101抑制A549细胞迁移, CREB1补回该抑制作用(图7B)。

2.8 裸鼠肿瘤体积及质量检测

将miR-NC和miR-101 mimics转染进A549细胞

并注射到裸鼠皮下, 21 d后观察结果显示: miR-101 mimics转染组裸鼠肿瘤体积及质量均显著低于对照组(图8A, B)。

2.9 MiR-101 抑制裸鼠肿瘤发展

MiR-101 mimics转染组裸鼠肿瘤组织中miR-101表达量显著高于对照组(图9A)。PCNA染色结果显示: 与对照组相比, miR-101 mimics转染组裸鼠肿瘤细胞增殖显著降低(图9B)。

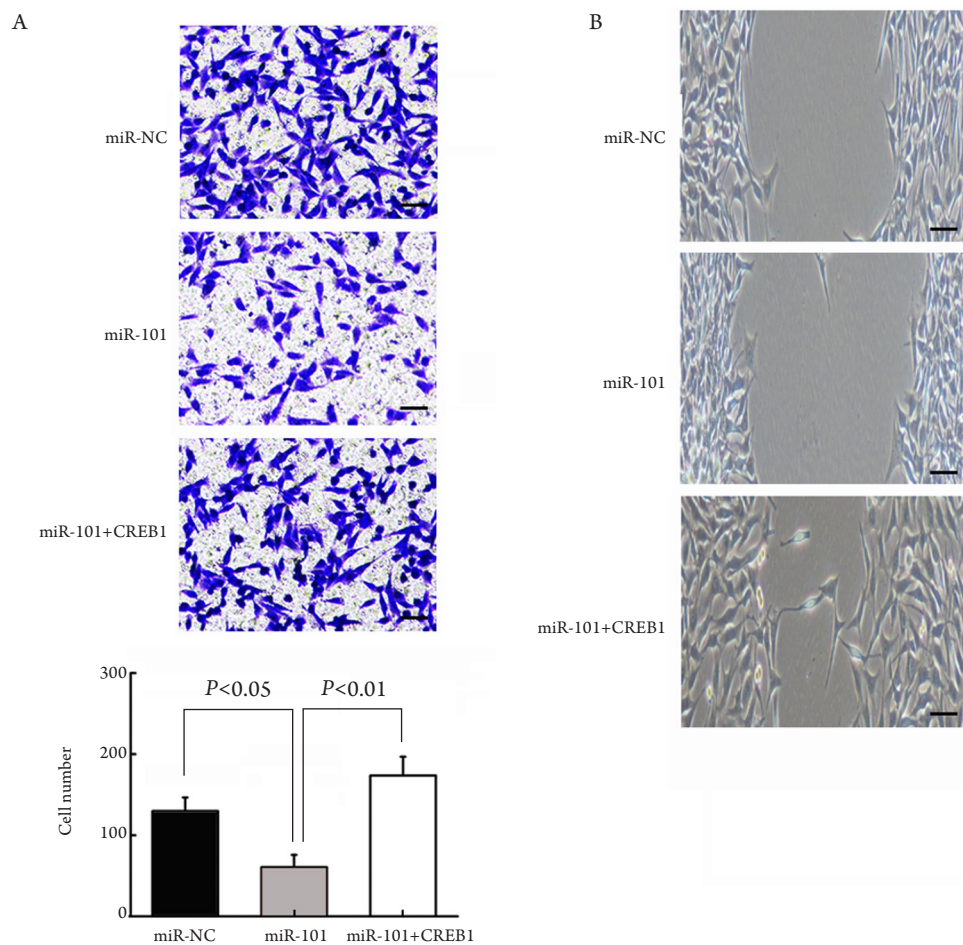


图7 MiR-101和CREB1与细胞迁移能力的相关性(比例尺: 20 μm)

Figure 7 Correlation between miR-101 and CREB1 and cell migration ability (scale bar: 20 μm)

(A)Transwell细胞迁移实验效果; (B)细胞划痕实验检测细胞迁移能力。

Transwell migration assay (A) and cell scratch assay (B) were used to detect the ability of cell migration.

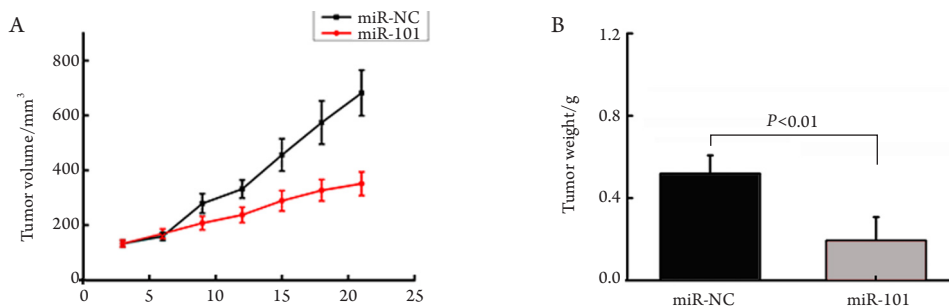


图8 裸鼠体内肿瘤体积及质量检测

Figure 8 Tumor volume and weight of nude mice were measured

(A)肿瘤体积; (B)肿瘤质量。

(A) Tumor volume; (B) Tumor weight.

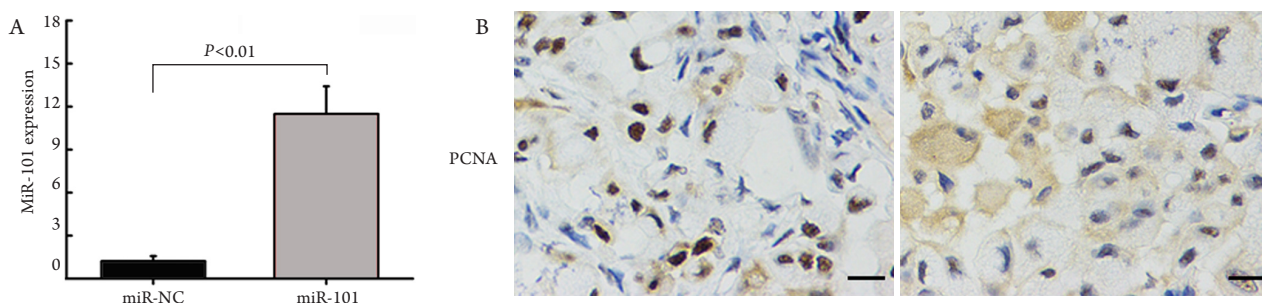


图9 MiR-101抑制裸鼠肿瘤发展

Figure 9 MiR-101 inhibited tumor development in nude mice

(A)检测miR-101在miR-101 mimics转染组裸鼠肿瘤组织中的表达量; (B)PCNA染色检测裸鼠肿瘤细胞增殖情况(比例尺: 20 μm)。

(A) The expression of miR-101 in tumor tissues of nude mice transfected with mir-101 mimics was detected; (B) PCNA staining was used to detect tumor cell proliferation in nude mice (scale bar: 20 μm).

3 讨论

肺癌在我国发病率极高。据报道^[6], 近十几年肺癌分别占在我国男性和女性恶性肿瘤发病率的第1和第2位, 并且发病年龄也出现了下降的趋势。其中非小细胞肺癌作为肺癌的一个大类发病率也逐年增高。近年来肺癌相关领域基础医学研究及临床诊断治疗方法逐渐进步, 越来越多的肺癌患者得到了规范治疗, 使得肺癌的诊治率有了很大的提升^[7-8], 然而由于肺癌侵袭性较强, 一旦发生转移, 患者将面临极大的死亡威胁。对肺癌的转移情况进行控制仍然是肺癌领域需要解决的关键问题^[9]。

MiRNA被证实广泛存在于动植物及人类细胞中, 目前已经在果蝇, 线虫, 植物和动物中发现了1万5 000多个miRNA, 其中在人类细胞中发现了1 048个^[10]。miRNA是指长度18~25 nt, 在动

植物中普遍存在的小型非编码RNA家族, 能够识别特定的目标mRNA, 通过与mRNA的3'-UTR完全或不完全互补配对促进靶mRNA的降解和/或抑制翻译过程, 从而实现在转录后水平负调控基因表达。据统计, 人类基因组中miRNA的种类有1 000多种, 近30%的人类基因受到miRNA的调控^[11-12]。

本研究通过real-time PCR实验检测miR-101在肺癌与癌旁正常组织中的表达量, 发现肺癌组织中miR-101表达量显著低于癌旁正常组织, 转移的肺癌组织中miR-101表达量显著低于无转移肿瘤组织, 直径 ≤ 5 cm的肿瘤中miR-101表达量显著高于直径 > 5 cm的肿瘤。检测肺癌细胞株BEAS-2B, NCI-H460, NCL-H1975, 95D, HCL-H358, A549及NCL-H1299中miR-101的表达量, 结果显示: 各株肺癌细胞中miR-101表达量均显著低于正常肺细胞。miR-101 mimics转染组裸鼠肿瘤组织中miR-101表达量显著高于对照组。PCNA染色结果

显示: 与对照组相比, miR-101 mimics转染组裸鼠肿瘤细胞增殖显著降低。上述结果表明: miR-101与肺癌存在相关性。

Yamamoto等^[13]在研究基因转录调解时发现一种核蛋白, 其表观分子质量为43 000。该蛋白质特异性地与CRE结合, 从而刺激基因转录, 被视为一种转录增强因子, 于是将其命名为CREB, 其主要作用是参与调节基因转录, 大大提高下游基因的转录活性。同时, CREB在肿瘤细胞的增殖, 存活及转移等生物学过程中也发挥重要作用^[14-15]。

本研究通过microRNA靶基因数据库进行筛选, 预测CREB1为miR-101的潜在靶基因, 并通过双荧光素酶报告基因检测发现: miR-101可以通过结合CREB1 mRNA的3'-UTR抑制CREB1的表达。通过real-time PCR和蛋白质印迹法检测发现: miR-101可以抑制CREB1的mRNA和蛋白表达。使用免疫组织化学和real-time PCR检测发现: 肺癌组织中CREB1的表达量显著高于癌旁正常组织, 与癌旁正常组织相比, 肿瘤组织CREB1 mRNA表达量显著升高。肺癌细胞株BEAS-2B, NCI-H460, NCL-H1975, 95D, HCL-H358, A549和NCL-H1299中CREB1 mRNA的表达量均显著高于正常肺细胞, 说明CREB1对肺癌具有调控功能。将miR-NC, miR-101 mimics和CREB1转染进A549细胞, 采用CCK-8法检测对照组, miR-101 mimics转染组和miR-101 mimics+CREB1转染组细胞增殖能力发现: miR-101 mimics转染组的OD值显著低于对照组, 而miR-101 mimics+CREB1转染组的OD值显著高于miR-101 mimics转染组。同时流式细胞术检测结果显示: miR-101 mimics转染组S期细胞比值显著低于对照组, 而miR-101 mimics+CREB1转染组S期细胞比值显著高于miR-101 mimics转染组。利用Transwell迁移实验和细胞划痕实验发现: miR-101 mimics转染组细胞迁移效果显著低于对照组, 而miR-101 mimics+CREB1转染组细胞迁移效果显著高于miR-101 mimics转染组。结果表明: miR-101可抑制A549细胞的增殖, 迁移并使其细胞周期在S期聚集, CREB1补回该抑制作用。裸鼠实验结果显示: miR-101 mimics转染组肿瘤体积及质量均显著低于对照组。miR-101 mimics转染组肿瘤组织中miR-101的表达量显著高于对照组。PCNA染色结果显示: 与对照组相比, miR-101 mimics转染组裸鼠肿瘤细胞增殖显著降低。以上结果提示: miR-101能够通过抑制CREB1表达抑制肺癌的发展, 可能成为肺癌诊断及治疗的新靶标。

综上所述, 本研究初步证实miR-101能够抑制

CREB1的表达量并抑制肺癌细胞的增殖, 对肺癌有抑制的调控效果, 可能成为肺癌诊断及治疗的新靶向。

参考文献

- Grenda TR, Revels SL, Yin H, et al. Lung cancer resection at hospitals with high vs low mortality rates[J]. *JAMA Surg*, 2015, 150(11): 1034-1040.
- Laag E, Majidi M, Cekanova M, et al. NNK activates ERK1/2 and CREB/ATF-1 via beta-1-AR and EGFR signaling in human lung adenocarcinoma and small airway epithelial cells[J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(7): 1547-1552.
- Hu XM, Zhang H, Xu H, et al. Chemokine receptor CXCR4 regulates CaMKII/CREB pathway in spinal neurons that underlies cancer-induced bone pain[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4005.
- Du X, Zhang J, Wang J, et al. Role of miRNA in lung cancer-potential biomarkers and therapies[J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 23(39): 5997-6010.
- Kang M, Shi J, Peng N, et al. MicroRNA-211 promotes non-small-cell lung cancer proliferation and invasion by targeting MxA[J]. *Oncotargets Ther*, 2017, 10: 5667-5675.
- 张思维, 郑荣寿, 杨之询, 等. 2000—2014年中国肿瘤登记地区肺癌发病年龄变化趋势分析[J]. *中华预防医学杂志*, 2018, 52(6): 579-585.
ZHANG Siwei, ZHENG Rongshou, YANG Zhixun, et al. Trend analysis on incidence and age at diagnosis for lung cancer in cancer registration areas of China, 2000—2014[J]. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2018, 52(6): 579-585.
- Pillai RN, Ramalingam SS. Advances in the diagnosis and treatment of non-small cell lung cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(3): 557-564.
- Tolozza EM. Thoracic inspirations: advances in the diagnosis, staging, and treatment of non-small-cell lung cancer[J]. *Cancer Control*, 2014, 21(1): 4-5.
- 徐燕, 孙伊多, 赵静, 等. 肺癌合并眼部转移: 单中心回顾性研究并文献综述[J]. *中国肺癌杂志*, 2017, 20(5): 326-333.
XU Yan, SUN Yiduo, ZHAO Jing, et al. Ocular metastasis in lung cancer: A retrospective analysis in a single Chinese hospital and literature review[J]. *Chinese Journal of Lung Cancer*, 2017, 20(5): 326-333.
- Chou J, Shahi P, Werb Z. microRNA-mediated regulation of the tumor microenvironment[J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(20): 3262-3271.
- Lu J, Clark AG. Impact of microRNA regulation on variation in human gene expression[J]. *Genome Res*, 2012, 22(7): 1243-1254.
- Wu X, Song Y. Preferential regulation of miRNA targets by

- environmental chemicals in the human genome[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 244.
13. Yamamoto KK, Gonzalez GA, Menzel P, et al. Characterization of a bipartite activator domain in transcription factor CREB[J]. *Cell*, 1990, 60(4): 611-617.
14. Li D, Jin L, Alesi GN, et al. The prometastatic ribosomal S6 kinase 2-cAMP response element-binding protein (RSK2-CREB) signaling pathway up-regulates the actin-binding protein fascin-1 to promote tumor metastasis[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(45): 32528-3238.
15. Pflum MK, Schneider TL, Hall D, et al. Hepatitis B virus X protein activates transcription by bypassing CREB phosphorylation, not by stabilizing bZIP-DNA complexes[J]. *Biochemistry*, 2001, 40(3): 693-703.

本文引用: 李慧敏, 姜东亮, 张韧, 王妮妮. MiR-101靶向调控 CREB1抑制肺癌的发展[J]. *临床与病理杂志*, 2019, 39(12): 2659-2668. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.12.004

Cite this article as: LI Huimin, JIANG Dongliang, ZHANG Ren, WANG Nini. MiR-101 targets CREB1 to inhibit the development of lung cancer[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(12): 2659-2668. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.12.004