

肺癌细胞中miR-182启动子甲基化状态研究

李永文 孙永林 任凡 李颖 刘明辉 刘红雨 陈军

【摘要】背景与目的 已有的研究证明MiR-182的异常调控与恶性肿瘤的发生发展密切相关，本研究旨在探讨肺癌细胞中miR-182启动子的甲基化状态对miR-182表达的影响。方法 荧光定量PCR检测肺癌细胞中miR-182表达水平，甲基化特异性PCR检测各细胞株中miR-182启动子区的甲基化状态，并通过测序进行验证。DNA甲基转移酶抑制剂5'-Aza-dC处理后检测各肺癌细胞株中miR-182表达变化。结果 MiR-182在不同肺癌细胞株的表达水平不同，其中，在高转移性肺癌细胞株如A549和L9981中相对呈低表达；而在低转移性细胞株95C则相对呈高表达。MSP及测序分析显示多株肺癌细胞株中miR-182启动子区域存在DNA甲基化，其中A549细胞甲基化程度最高。在5'-氮杂-脱氧胞苷酸（5'-Aza-dC）作用下，A549细胞及其他肺癌细胞中miR-182表达水平均明显升高。结论 在肺癌细胞中miR-182启动子区域存在异常甲基化，miR-182的表达受DNA甲基化的调控。MiR-182的甲基化在肺癌中的作用尚需进一步研究。

【关键词】 DNA甲基化；miR-182；肺肿瘤

Methylation Status of miR-182 Promoter in Lung Cancer Cell Lines

Yongwen LI¹, Yonglin SUN², Fan REN², Ying LI¹, Minghui LIU², Hongyu LIU¹, Jun CHEN^{1,2}

¹Tianjin Lung Cancer Institute; ²Department of Lung Cancer Surgery, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Corresponding author: Jun CHEN, E-mail: huntercj2004@yahoo.com;

Hongyu LIU, E-mail: liuhongyu123@hotmail.com

【Abstract】 Background and objective It has been proven that the abnormal expression of miR-182 was related to the occurrence and development of tumors. The aim of this study is to explore the relationship between the methylation of miR-182 promoter and its expression in lung cancer cell lines. **Methods** Real-time quantitative PCR and methylation-specific PCR were used to detect the expression level of miR-182 and its promoter methylation status in five lung cancer cell lines (A549, L9981, NL9980, 95C and 95D). DNA sequencing was used to confirm the methylation results. **Results** The level of miR-182 expression significantly differs among these lung cancer cell lines. The highly metastatic human lung cancer cell lines, namely, A549 and L9981, demonstrate a relatively lower expression level of miR-182 compared with the lowly metastatic human lung cancer cell line 95C. Methylation-specific PCR and DNA sequencing assay results indicate that these lung cancer cell lines present different levels of miR-182 promoter methylation, and the highest methylation level is observed in A549 cells. Furthermore, the expression of miR-182 in these cell lines significantly increases when treated with 10 μM 5'-Aza-dC. **Conclusion** DNA methylation occurs in the miR-182 promoter region in lung cancer cell lines. This methylation can regulate the expression level of miR-182. Further study must be conducted to explore the function of miR-182 promoter methylation in lung cancer occurrence and development.

【Key words】 DNA methylation; miR-182; Lung neoplasms

This study was supported by the grants from National Natural Science Foundation of China (to Jun CHEN)(No.81172233) and (to Hongyu LIU)(No.81372306) and Tianjin key project of Natural Science Foundation (to Jun CHEN)(No.12JCZDJC24400), Tianjin Natural Science Foundation (to Hongyu LIU)(No.13JCYBJC22600), Tianjin Science and Technology Support Program (to Jun CHEN)(No.12ZCDZSY16100) and Ph.D. Programs Foundation from Ministry of Education of China (to Jun CHEN)(No.20131202110004).

本研究受国家自然科学基金项目 (No.81172233, No.81372306)、天津自然科学基金重点项目 (No.12JCZDJC24400)、天津自然科学基金项目 (No.13JCYBJC22600)、天津市科委抗癌重大专项攻关计划 (No.12ZCDZSY16100)、教育部博士点基金 (No.20131202110004) 资助
作者单位: 300052 天津, 天津市肺癌研究所 (李永文, 李颖, 刘红雨, 陈军); 天津医科大学总医院肺部肿瘤外科 (孙永林, 任凡, 刘明辉, 陈军) (通讯作者: 陈军, E-mail: huntercj2004@yahoo.com; 刘红雨, E-mail: liuhongyu123@hotmail.com)

肺癌是呼吸系统最常见的恶性肿瘤，其发病率和死亡率在世界范围内居高不下，特别是在我国大中城市呈现逐年上升的趋势。肺癌的发生发展是一个多步骤的复杂过程，涉及多个基因的异常调控^[1]。近年来，随着肿瘤研究的深入，表观遗传学异常修饰在肺癌发生过程中的作用越来越受到重视，众多的证据显示，DNA异常甲基化与miRNA的异常调控对肿瘤发生发展起重要的作用^[2]。

MiRNAs是一类保守的、非编码蛋白的单链小分子，在转录后水平调控靶基因表达，具有广泛的基因调节功能，可调节基因活动各个层面，如生长、分化、凋亡等^[3]。研究^[4]证明miRNAs参与生命过程中一系列重要进程，包括早期胚胎发育、细胞增殖、细胞凋亡、细胞死亡以及肿瘤发生、发展和侵袭转移等。据估计，人类中存在1,000余种miRNAs，约1/3基因表达受miRNAs调控。MiRNAs大多与其靶mRNA的3'非翻译区（untranslated region, UTR）一定程度地互补配对，如果互补配对程度高（大多数植物中），则可导致靶基因mRNA降解；如果互补配对程度低（大多数动物中），则可抑制靶基因mRNA的翻译。目前已研究证实，miRNAs在肿瘤发生发展过程中起着相当重要的作用，而成为近年来研究的热点。如研究发现miRNA-200家族^[5]、miR-155^[6]等多种miRNAs参与调控肿瘤的发生发展过程。此外，目前的研究还表明，许多miRNAs基因内部或邻近的CpG岛发生异常甲基化修饰导致的miRNAs异常表达，有可能对肿瘤的发生发展起重要的调控作用。

MiR-182是miR-183家族（包括miR-183、miR-182、miR-96三种miRNA）的成员之一。miR-182位于人染色体7q31-34区，与人*c-Met*、*BRAF*等癌基因相邻^[7]。研究^[8-12]发现，miR-182是一种肿瘤特异性表达miRNA，其异常表达与肺癌、乳腺癌、肝癌、结直肠癌的发病机制相关。Segura等^[7]报道miRNA-182可以促进黑色素瘤侵袭转移。他们的实验证实高表达miRNA-182在体内外均可促进黑色素瘤细胞侵袭转移，而下调miR-182可阻止细胞侵袭转移并引发细胞凋亡。进一步研究还证实miR-182通过直接抑制FOXO3和小眼畸形相关转录因子而促进侵袭转移，而增加FOXO3和小眼畸形相关转录因子（microphthalmia-associated transcription factor, MiTF）的表达，还可抑制miR-182的促侵袭转移效果。Zhang等^[13]发现，在人肺癌细胞株A549中，miR-182通过抑制人的皮肤动蛋白（cortactin, *CTN*）基因，而抑制细胞的增殖和侵袭。

多项研究表明，肿瘤细胞中miR-182启动子区存在着异常甲基化修饰。如Liu等^[14]报道在黑色素瘤细胞

中miR-182启动子区的DNA存在异常甲基化。Xu等^[15]也报道，miR-182启动子上游8 kb-10 kb区域存在CpG岛，5'-Aza-dC处理可提高肿瘤细胞中miR-182的表达，从而促进miR-182在肿瘤细胞中的作用。而miR-182在肺癌细胞中的甲基化情况尚未有报道。本研究首先在不同肺癌细胞系中初步研究miR-182启动子调控区的甲基化状态，为进一步阐明miR-182在肺癌发生发展过程中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 人肺癌细胞系A549（购自美国ATCC）、95C、95D（由军事医学科学院陆应麟教授惠赠）、NL9980和L9981（由周清华教授构建）。以上细胞系由天津市肺癌研究所保存。RPMI 1640和DMEM培养基、胎牛血清及Trizol试剂购自Life Technologies公司（Carlsbad, CA, USA）；实时荧光定量PCR试剂盒、Premix Ex Taq Hotstart Version购自Takara公司（Dalian, China）；反转录试剂盒购自Promega公司（Madison, WI, USA）；Bulge-LoopTM miRNA qRT-PCR Primer Set购自广州锐博生物科技有限公司（Guangzhou, China）；QIAamp DNA Mini Kit和EpiTect Bisulfite Kit购自Qiagen公司（Hilden, Germany）；甲基转移酶抑制剂5'-氮杂-2'-脱氧胞苷（5'-Aza-dC）购自Sigma-Aldrich公司（Kansas, Missouri, USA）；青霉素-链霉素溶液购于碧云天生物技术研究所（Haimen, China）。

1.2 细胞培养及DNA甲基转移酶抑制剂5'-Aza-dC处理 A549、95C、95D、NL9980和L9981细胞培养于10 cm培养皿，37 °C、5%CO₂饱和湿度的培养箱中，培养基为含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基或DMEM培养基。0.25%胰酶-EDTA消化传代，所有实验均采用对数生长期细胞。DNA甲基转移酶抑制剂5'-Aza-dC溶于DMSO溶液中，用10 μmol/L浓度处理6孔板中细胞（每孔2×10⁵细胞），3个复孔，连续处理72 h，每24 h更换新鲜培养液。

1.3 MiR-182基因表达的real-time PCR检测 Trizol法常规提取细胞总RNA，根据广州锐博生物科技有限公司Bulge-LoopTM miRNA qRT-PCR Primer Set产品说明书将2 μg RNA进行逆转录，合成cDNA，并置于实时荧光定量PCR仪Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System instrument and software（Applied Biosystems, USA）进行real-time PCR反应。反应条件：95 °C 20 s；40个PCR循环（95

°C 10 s; 60 °C 20 s; 72 °C 10 s)。以U6作为内参照, A549作为校正因子, 数据采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行分析, $\Delta CT = CT(\text{miR-182}) - CT(\text{U6})$, $\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{其他细胞}) - \Delta CT(\text{A549})$ 。

1.4 基因组DNA提取 收集细胞沉淀, 按QIAamp DNA Mini Kit说明书步骤进行DNA提取, DNA提取后琼脂糖电泳检测DNA纯度, 并用紫外分光光度计进行定量。

1.5 MiR-182启动子查找及甲基化特异性PCR (methylation-specific PCR, MSP) 引物设计 运用UCSC数据库预测人miR-182启动子序列, 提取启动子上游8 kb-10 kb区域。分别利用MethPrimer在线分析网站和Methyl Primer Express v1.0软件分析并预测人miR-182启动子甲基化CpG岛, 并通过Methyl Primer Express v1.0软件设计甲基化特异性引物和非甲基化引物。

1.6 甲基化特异性PCR (methylation-specific PCR, MSP) 检测 基因组DNA亚硫酸盐修饰: 每个样本取800 ng为模板进行重亚硫酸盐处理。DNA的重亚硫酸盐修饰按照EpiTect Bisulfite Kit (QINGEN)的说明书, 在PCR仪上进行, 修饰条件: 99 °C 5 min, 60 °C 25 min, 99 °C 5 min, 60 °C 85 min, 99 °C 5 min, 60 °C 175 min, 最后置20 °C不超过24 h。修饰完成后按照试剂盒附带的纯化试剂说明书对DNA进行纯化, 纯化后-20 °C保存备用。修饰后目的片段PCR扩增和产物的凝胶纯化: 基因组DNA重亚硫酸盐处理并纯化后, 取1 μL DNA为模板进行扩增。MSP引物: M-forward: 5'-TAGGGGTCGTTCGATTTTAC-3', M-reverse: 5'-CTACCCCGACGAATATTA-3', 目的条带为103 bp; 非甲基化引物: U-forward: 5'-GTTAGGGGTGTTTATTTAT-3', M-reverse: 5'-CCTACCCCAACAAATATTA-3', 目的条带为103 bp, 使用Takara热启动酶进行扩增。PCR循环条件为: 95 °C预变性3 min, 98 °C

10 s, 48 °C 30 s, 72 °C 30 s, 5个循环; 95 °C 15 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s, 5个循环; 95 °C 15 s, 52 °C 30 s, 72 °C 30 s, 10个循环; 95 °C 15 s, 54 °C 30 s, 72 °C 30 s, 20个循环; 72 °C延伸5 min, 4 °C保存。扩增产物经2%琼脂糖电泳进行鉴定, 阴性对照采用双蒸水为模板。上述PCR产物直接交由北京六合华大基因公司测序, 经NCBI Blast判定结果。

1.7 统计学方法 应用SPSS 21.0统计软件进行分析, 高低转移细胞系中miR-182的表达水平比较、同一细胞系处理组与对照组间的miR-182的表达比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同肺癌细胞系中miR-182的表达 采用real-time PCR方法, 检测不同肺癌细胞系中miR-182的表达。结果如图1所示, 不同肺癌细胞系中miR-182的表达不同, 其中, 在人高转移大细胞肺癌细胞L9981的表达明显低于人低转移大细胞肺癌细胞NL9980 ($P < 0.05$), 在人高转移肺腺癌细胞95D的表达明显低于人低转移肺腺癌细胞95C ($P < 0.01$), 而miR-182在高转移细胞系A549中的表达最低。

2.2 miR-182启动子区CpG岛的查找及MSP引物设计 应用UCSC数据库预测出人miR-182 DNA启动子序列, 并获取启动子上游8 kb-10 kb区域共2,400 bp, 再通过MethPrimer在线分析网站和Methyl Primer Express v1.0软件分析这段序列的CpG岛, 采用标准: 碱基对 > 300 , GC% $> 50.0\%$, 观察值/预测值 > 0.6 。结果显示, miR-182 DNA启动子的CpG岛长度1,989 bp, 位于miR-182上游148 bp-2,138 bp (图2)。通过Methyl Primer Express v1.0软件设计出7对MSP-

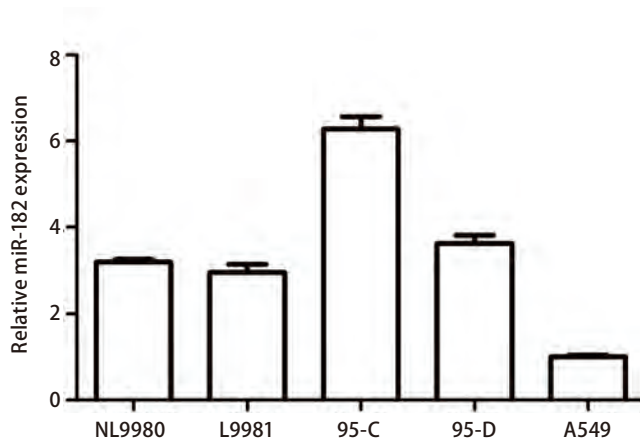


图1 不同肺癌细胞株中miR-182表达水平
Fig 1 The expression level of miR-182 in different lung cancer cell lines by real-time PCR

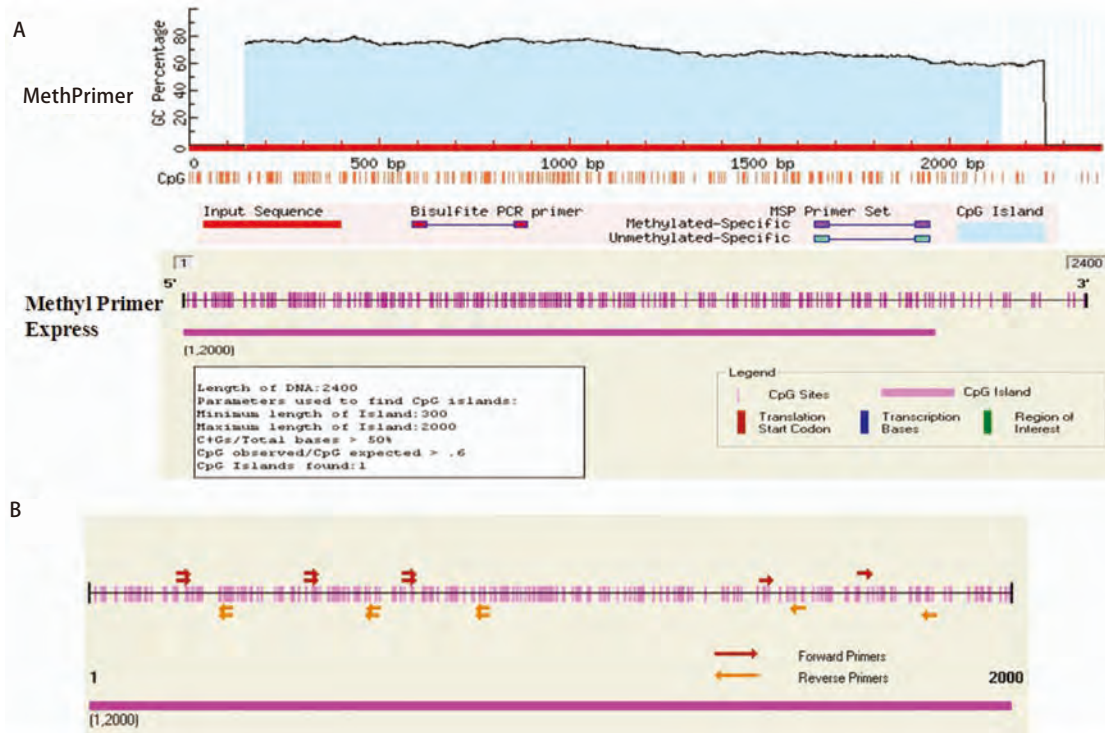


图2 miR-182启动子CpG岛的预测及MSP引物设计。A: MethPrimer数据库和MethylPrimer Express软件预测的miR-182CpG岛; B: MSP引物设计示意图。
Fig 2 The prediction of miR-182 promoter CpG island and MSP primers design. A: Prediction of miR-182 CPG island using MethPrimer database and MethylPrimer Express software; B: Schematic diagram of MSP primer design. MSP: methylation-specific PCR.

PCR引物，并筛选出合适的引物。

2.3 不同肺癌细胞株中miR-182启动子甲基化状态的检测
提取不同肺癌细胞系的DNA，应用重亚硫酸盐处理，未甲基化的胞嘧啶（C）将转变为尿嘧啶（U），而甲基化的胞嘧啶（C）不变。然后将重亚硫酸盐处理后的DNA运用MSP-PCR来检测这些肺癌细胞系中miR-182启动子的甲基化情况。如图3所示：MSP结果显示5种肺癌细胞系中均存在不同程度的甲基化，其中，A549细胞中miR-182启动子区域甲基化程度最高，其余4株细胞系中miR-182也都存在不同程度的甲基化。PCR产物经DNA测序分析，证实扩增产物为存在甲基化的miR-182启动子区（图4）。

2.4 5'-Aza-dC处理后不同肺癌细胞株中miR-182表达变化
为了进一步探讨DNA甲基化对miR-182表达的影响，我们应用甲基转移酶抑制剂5'-Aza-dC处理细胞72 h后，real-time PCR检测miR-182的表达水平，以DMSO处理作为对照组。结果显示：与对照组相比，在10 μM 5'-Aza-dC处理72 h后，A549、95C、95D、L9981和NL9980肺癌细胞株中miR-182的表达均提高（分别为 $P < 0.001$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ 和 $P < 0.001$ ），其中A549细胞中miR-182的

表达提高了406倍，最为明显（图5）。这些结果表明，启动子区的DNA甲基化可能抑制miR-182的表达，而DNA甲基转移酶抑制剂5'-Aza-dC处理则能提高miR-182的表达。

3 讨论

DNA甲基化是指生物体在DNA甲基转移酶（DNA methyltransferase, DNMT）的催化下，以S-腺苷甲硫氨酸（S-adenosyl methionine, SAM）为甲基供体，将甲基转移到特定的碱基上的过程，是哺乳动物遗传外修饰的重要的调控方式。研究^[16]表明，DNA异常甲基化与肿瘤的发生、发展、细胞癌变有着密切的联系。启动子区域CpG岛的高甲基化是抑癌基因沉默、促凋亡基因失活的主要方式之一。因此，改变DNA甲基化状态，可以诱导因甲基化失活的基因重新表达^[17]。5'-Aza-dC是一种DNA甲基转移酶1（DNA methyltransferase 1, DNMT1）的抑制剂，通过与DNA甲基转移酶的共价结合，抑制DNA甲基转移酶的活性，从而实现去甲基化功能。应用5-Aza-dC可以使部分沉默的重要基因去甲基化而再激活，恢复其正常功

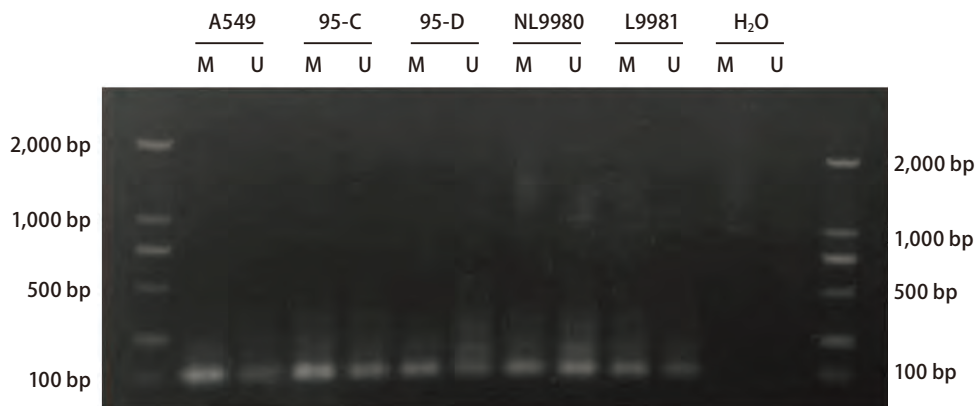


图3 不同肺癌细胞中miR-182启动子区甲基化的MSP检测
Fig 3 MSP assay for miR-182 promoter in different lung cancer cell lines

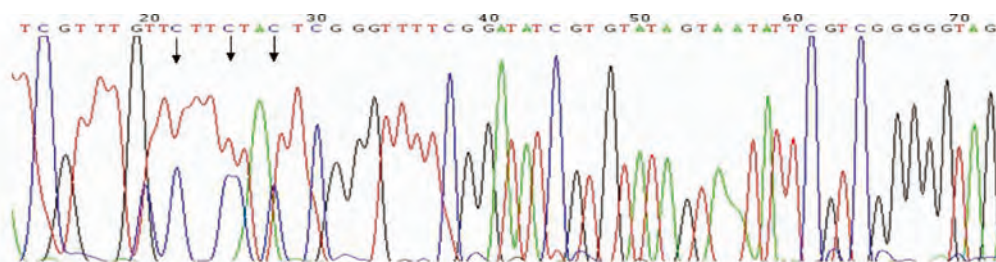


图4 A549细胞中miR-182启动子MSP产物测序分析
Fig 4 The MSP result analysis of miR-182 promoter by DNA sequencing in A549 cells

A549 TCGTTTGTITTTTAAATTCGGGTTTTCGGATATCGTGTATAGTAATATTCGTCGGGGGTAG
Methylation TCGTTTGTITTTTAAATTCGGGTTTTCGGATATCGTGTATAGTAATATTCGTCGGGGGTAG
No methylation TTGTTTGTITTTTAAATTTGGGTTTTGGATATTGTGTATAGTAATATTTGTTGGGGGTAG

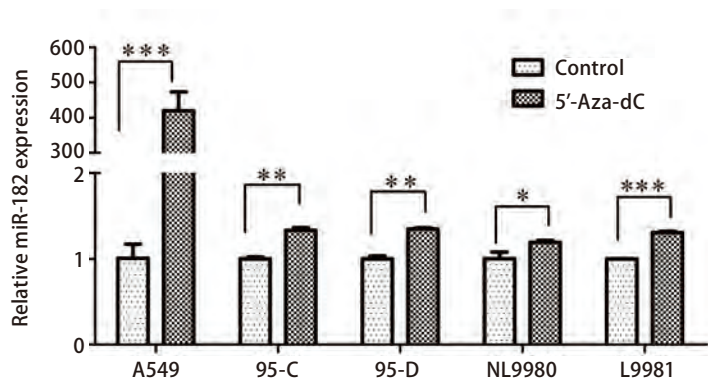


图5 5'-Aza-dC影响肺癌细胞中miR-182表达
Fig 5 The analysis of miR-182 expression by real-time PCR in human lung cancer cell lines after 5'-Aza-dC treatment. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

能。因此，5'-Aza-dC已被用于III期临床试验，用于早期非小细胞肺癌及晚期三阴乳腺癌的临床治疗。

我们的研究结果证实，miR-182启动子区在肺癌细胞株中普遍存在异常的甲基化，特别是在高转移性肺癌细胞株A549中，存在高甲基化状态，经DNA甲基转移酶抑制剂5'-Aza-dC处理后，A549及其它肺癌细胞中miR-182的表达水平均提高，MSP及基因测序分析亦进一步证实

这些细胞中存在异常甲基化修饰。因此，在肺癌细胞中，miR-182的表达受异常甲基化调控。

MiR-182在肿瘤的发生发展中起着重要作用，比如，在黑色素瘤细胞中，miR-182可能通过抑制FOXO3和MiTF，促进肿瘤细胞的侵袭和转移^[5]，而我们的研究发现，在高度转移性的肺癌细胞株A549中，miR-182为高度甲基化，从而提示在肺癌细胞中miR-182的功能可能有别

于黑色素瘤细胞,可能与抑制肺癌侵袭和转移有关,这与Zhang等^[13]的研究报道相一致。这些现象提示miR-182在不同肿瘤或细胞类型中由于其靶基因不同,其作用也不尽相同。miR-182在肺癌细胞株中的异常表达受到DNA甲基化的调控,其作用机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Wen J, Fu J, Zhang W, *et al.* Genetic and epigenetic changes in lung carcinoma and their clinical implications. *Mod Pathol*, 2011, 24(7): 932-943.
- 2 Brzezińska E, Dutkowska A, Antczak A. The significance of epigenetic alterations in lung carcinogenesis. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(1): 309-325.
- 3 Joshi P, Middleton J, Jeon YJ. *et al.* MicroRNAs in lung cancer. *World J Methodol*, 2014, 4(2): 59-72.
- 4 Ranganathan K, Sivasankar V. MicroRNAs-Biology and clinical applications. *J Oral Maxillofac Pathol*, 2014, 18(2): 229-234.
- 5 Feng X, Wang Z, Fillmore R, *et al.* MiR-200, a new star miRNA in human cancer. *Cancer Lett*, 2014, 344(2): 166-173.
- 6 Poltronieri P, D'Urso PI, Mezzolla V, *et al.* Potential of anti-cancer therapy based on anti-miR-155 oligonucleotides in glioma and brain tumors. *Chem Biol Drug Des*, 2013, 81(1): 79-84.
- 7 Segura MF, Hanniford D, Menendez S, *et al.* Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(6): 1814-1819.
- 8 Yang WB, Chen PH, Hsu T, *et al.* Sp1-mediated microRNA-182 expression regulates lung cancer progression. *Oncotarget*, 2014, 5(3): 740-753.
- 9 Zhu W, Liu X, He J, *et al.* Overexpression of members of the microRNA-183 family is a risk factor for lung cancer: a case control study. *BMC Cancer*, 2011, 11: 393.
- 10 Lei R, Tang J, Zhuang X, *et al.* Suppression of MIM by microRNA-182 activates RhoA and promotes breast cancer metastasis. *Oncogene*, 2014, 33(10): 1287-1296.
- 11 Huynh C, Segura MF, Gaziel-Sovran A, *et al.* Efficient *in vivo* microRNA targeting of liver metastasis. *Oncogene*, 2010, 30(12): 1481-1488.
- 12 Liu H, Du L, Wen Z, *et al.* Up-regulation of miR-182 expression in colorectal cancer tissues and its prognostic value. *Int J Colorectal Dis*, 2013, 28(5): 697-703.
- 13 Zhang L, Liu T, Huang Y, *et al.* microRNA-182 inhibits the proliferation and invasion of human lung adenocarcinoma cells through its effect on human cortical actin-associated protein. *Int J Mol Med*, 2011, 28(3): 381-388.
- 14 Liu S, Howell PM, Riker AI. Up-regulation of miR-182 expression after epigenetic modulation of human melanoma cells. *Ann Surg Oncol*, 2013, 20(5): 1745-1752.
- 15 Xu X, Wu J, Li S, *et al.* Downregulation of microRNA-182-5p contributes to renal cell carcinoma proliferation via activating the AKT/FOXO3a signaling pathway. *Mol Cancer*, 2014, 13: 109.
- 16 Wang H, Chen X. Advances of DNA methylation in lung cancer. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2010, 13(11): 1074-1078. [王海兵,陈晓峰. DNA甲基化在肺癌中的研究进展. *中国肺癌杂志*, 2010, 13(11): 1074-1078.]
- 17 Luczak MW, Jagodziński PP. The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem Cytobiol*, 2006, 44(3): 143-154.

(收稿: 2014-11-10 修回: 2014-12-05)

(本文编辑 丁燕)



Cite this article as: Li YW, Sun YL, Ren F, *et al.* Methylation Status of miR-182 Promoter in Lung Cancer Cell Lines. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2015, 18(5): 260-265. [李永文, 孙永林, 任凡, 等. 肺癌细胞中miR-182启动子甲基化状态研究. *中国肺癌杂志*, 2015, 18(5): 260-265.] doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2015.05.02