

microRNA-155 在缺氧肺癌脑转移中的作用*

刘洋¹, 贾永森², 秦丽娟^{1,3△}

1. 华北理工大学基础医学院(唐山 063210); 2. 华北理工大学中医学院(唐山 063210);
3. 河北省慢性疾病重点实验室(唐山 063210)

【摘要】 目的 明确缺氧与肺癌细胞释放 microRNA-155 的关系,揭示肺癌脑转移的可能机制。方法 建立 A549 肺癌细胞缺氧模型,缺氧培养肺癌细胞 0.5、2、4、8、12 和 24 h(并设同期常氧对照组)后,免疫荧光法和 Western blot 法测定肺癌细胞内热休克蛋白 70 (hsp70)的表达水平;建立 hsp70 过表达的人肺癌细胞株 A549/hsp70,实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法测定缺氧各时间点 A549 细胞和 A549/hsp70 细胞培养液内 microRNA-155 含量。构建体外血脑屏障模型,给予缺氧不同时间点的 A549 肺癌细胞培养液后,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)检测体外血脑屏障模型的通透性变化;自动细胞计数仪计数 Transwell 下室培养液中的 A549 肺癌细胞数。将缺氧不同时间点的 A549 肺癌细胞培养液经尾静脉注入 Wistar 大鼠体内,Western blot 法测定紧密连接蛋白 occludin 在脑组织血脑屏障内皮细胞中的表达水平;伊文思兰检测动物血脑屏障通透性改变。结果 肺癌细胞缺氧 8 h 时,肺癌细胞内 hsp70 和培养液内 microRNA-155 的表达均达最高水平($P<0.05$)。与 A549 细胞相比,缺氧 2~24 h 时,A549/hsp70 细胞培养液内 microRNA-155 含量的增加更显著。缺氧 8 h,血脑屏障通透性最大,透过血脑屏障模型的肺癌细胞数最多。在动物水平,给予缺氧 8 h 的肺癌细胞培养液后,动物脑组织血脑屏障内皮细胞的 occludin 表达最低,且此时实验动物的血脑屏障通透性亦最大。结论 缺氧可引起肺癌细胞内 hsp70 生成增多,促进了 microRNA-155 的表达,进而导致血脑屏障 occludin 表达减少,血脑屏障通透性增大,最终引起肺癌细胞转移入脑。

【关键词】 肺癌脑转移 hsp70 microRNA-155 紧密连接蛋白

Role of microRNA-155 in Brain Metastasis of Hypoxic Lung Cancer LIU Yang¹, JIA Yong-sen², QIN Li-juan^{1,3△}.

1. School of Basic Medical Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China; 2. College of Traditional Chinese Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China; 3. Hebei Key Laboratory for Chronic Diseases, Tangshan 063210, China

△ Corresponding author, E-mail: qinlj20012003@163.com

【Abstract】 **Objective** To clarify the relationship between hypoxia stress and the microRNA-155 released from lung cancer cells, to reveal the possible mechanism of brain metastases of lung cancer. **Methods** The hypoxia model of A549 lung cancer cells was established. Lung cancer cells were cultured under the hypoxia condition or normal oxygen condition as control for 0.5, 2, 4, 8, 12 and 24 h immunofluorescence and Western blot methods were used to determine the expression level of heat shock protein 70 (hsp70) in lung cancer cells. Hsp70 overexpressed lung cancer cell line was established, the levels of microRNA-155 in A549 and hsp70 overexpressed A549 cell culture medium were determined by qRT-PCR. An *in vitro* blood-brain barrier model was established, and was treated with A549 cell culture medium collected at different hypoxia time points. Horseradish peroxidase (HRP) was used to detect the changes of permeability of the *in vitro* blood-brain barrier model, automatic cell technical instrument was used to count A549 lung cancer cells in the culture medium in under Transwell room. Culture mediums of A549 lung cancer cells collected at different hypoxia time points were injected into rats via tail vein, Western blot was used to analyze the expression of occludin in brain tissue, Evans blue was used to detect the change of blood-brain barrier permeability in animals. **Results** When lung cancer cells were hypoxic cultured for 8 h, both the expression level of hsp70 in lung cancer cells and microRNA-155 in culture medium reached the highest level ($P<0.05$). Compared with A549 cells, the enhancement of microRNA-155 level in culture medium of hsp70 overexpressed cell was more notably under hypoxia condition. At the same time, the permeability of blood-brain barrier was the highest, and the number of lung cancer cells crossed the blood-brain barrier model was the most. In animal experiment, after injection the lung cancer cell culture fluid with hypoxia 8 h, the tight junction protein occludin expression in blood-

* 国家自然科学基金(No. 81101912)和华北理工大学大学生创新创业计划项目(No. X2017153)资助

△ 通信作者, E-mail: qinlj20012003@163.com

brain barrier was lowest, and the permeability of blood-brain barrier was the largest. **Conclusion** Hypoxia can cause the increase of hsp70 production in lung cancer cells. Increased hsp70 promotes the synthesis and release of microRNA-155, which in turn leads to reduced expression of occludin protein in the blood-brain barrier, resulting in increased permeability of the blood-brain barrier and eventually causing lung cancer cells to metastasize into the brain.

【Key words】 Brain metastasis of lung cancer Hsp70 microRNA-155 Tight junction protein

肺癌是一种常见的呼吸系统肿瘤,肺癌患者发生脑转移率约占 10%,有些肺癌患者甚至以脑转移瘤为首诊^[1]。发生了脑转移的肺癌患者往往预后差,致死致残率高^[2]。因此,明确肺癌脑转移发生的机制,防治肺癌脑转移的发生,具有重要的临床意义。肺癌脑转移发生的关键是必须突破血脑屏障。血脑屏障是机体的一种保护性屏障,可以阻止机体绝大部分有害的大分子物质入脑,从而维持内环境稳态^[3]。microRNAs 广泛存在于植物、动物及病毒等真核生物中,参与细胞增殖、分化、凋亡和代谢等重要生物学过程。microRNA-155 属于 microRNAs 中的一种,是一个典型的多功能基因^[4-5]。已有报道指出,microRNA-155 可以增加肺癌细胞的增殖^[6],亦有研究表明,microRNA-155 可提高血脑屏障的通透性^[7]。我们据此推测,肺癌脑转移的发生可能与 microRNA-155 有关,microRNA-155 可能是通过某种机制增加了血脑屏障的通透性进而引起了肺癌脑转移。Hsp70 作为最常见的分子伴侣,能够通过帮助蛋白质折叠等方式促进其他蛋白质的合成^[8]。本研究拟探讨缺氧与肺癌细胞释放 microRNA-155 的关系,揭示肺癌脑转移的可能机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株、主要试剂与仪器

人 A549 细胞株(北京协和细胞资源中心);人脑微血管内皮细胞株(美国 ATCC);兔抗人多克隆 hsp70 抗体[联世生物科技(上海)有限公司];异硫氰酸荧光素(FITC)标记山羊抗兔 IgG(北京鼎国生物技术有限责任公司);RNA 提取试剂 TRI ReagentBD(美国 MRC Gene 公司);RT 反转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司);辣根过氧化物酶(HRP)(鼎国生物有限公司);microRNA-155 引物试剂盒(广州锐博生物科技有限公司);occludin 大鼠多克隆抗体(美国 Sigma 公司);Transwell 小室(美国 Millipore 公司);Wister 健康雄性大鼠购自华北理工大学实验动物中心,实

验动物生产许可证号[SYXK(冀)2015-0038]。

1.2 A549 肺癌细胞缺氧模型制备及分组

取对数生长期的 A549 肺癌细胞移至通以体积分数 2%O₂、93%N₂、5%CO₂ 混合气体的培养箱内分别继续培养 0.5、2、4、8、12 和 24 h,构建 A549 肺癌细胞缺氧模型(缺氧组)。另设同期对照组 A549 肺癌细胞,常氧培养处理。取两组细胞进行后续实验。

1.3 免疫荧光法和 Western blot 法测定肺癌细胞内 hsp70 的表达

取两组 A549 肺癌细胞爬片,PBS 漂洗,甲醛固定,Triton X-100 处理,小牛血清白蛋白封闭后加入用 FITC 标记的单克隆抗 hsp70 免疫荧光抗体,37℃孵育 1 h 后甘油封片。采用共聚焦激光扫描显微镜观察 hsp70 表达的变化,仪器自动读取荧光强度。

另取细胞,采用常规 Western blot 法,定性检测(观察条带显影浓度)缺氧组 and 对照组细胞内 hsp70 [一抗为兔抗人多克隆 hsp70 抗体(1:50)]的表达水平,内参采用 GADPH。

1.4 hsp70 高表达的 A549/hsp70 细胞的构建

取对数生长期的 A549 肺癌细胞,脂质体基因转染法转染载体 PBK-RSV-hsp70 (Invitrogen 公司)至 A549 肺癌细胞上,至 A549/hsp70 细胞传代 5 次 hsp70 蛋白仍高表达,视为成功建立了稳定表达 hsp70 基因的 A549/hsp70 细胞株。A549/hsp70 细胞分别于缺氧培养 0.5、2、4、8、12 和 24 h 后(条件同 1.2),用于后续实验。

1.5 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法测定 A549 细胞和 A549/hsp70 细胞培养液内 microRNA-155 的表达

取缺氧不同时间的 A549 细胞和 A549/hsp70 细胞及常氧培养的对照组 A549 细胞,采用 qRT-PCR 法测定缺氧不同时间点肺癌细胞培养液内 microRNA-155 的含量,具体操作按试剂盒说明书进行。引物序列(上海生物工程公司设计并合成),F: 5'-ACGCTCAGTTAATGCTAATCGTGATA-

3', R: 5'-ATTCCATGTTGTCCACTGTCTCTG-3',扩增产物长度 84 bp。*GAPDH* 为内参。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 microRNA-155 的相对表达量。

1.6 肺癌细胞在体外血脑屏障模型的通透性检测

按照文献方法制备血脑屏障模型^[9]。取传代的脑微血管内皮细胞悬液 0.5 mL 种植于 Transwell 膜下侧,在培养池外侧 12 孔培养板内加入完全培养基 0.5 mL,每 3 d 换一次液,直至细胞在 Transwell 膜下侧呈单层生长。

将缺氧组或对照组 A549 肺癌细胞悬液加入体外血脑屏障模型上室,将辣根过氧化物酶 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 加入 Transwell 小室的上室中,分别于缺氧培养不同时间点(0.5、2、4、8、12 和 24 h)后收集下室的培养基,ELISA 法测量辣根过氧化物酶(HRP)的通过率。HRP 通过率(以光密度值表征)越高则表明血脑屏障通透性越大。

血脑屏障模型 Transwell 小室上层加入缺氧组或对照组 A549 肺癌细胞悬液($5\times 10^5\text{ mL}^{-1}$),缺氧不同时间点后收集 Transwell 下室的细胞,自动细胞计数仪计数肺癌细胞数。

1.7 Western blot 法定性检测大鼠脑组织血脑屏障内皮细胞 occludin 的表达水平

取 Wister 健康雄性大鼠(体质量 200~220 g)分成 6 组,每组 8 只动物,分别经尾静脉注射缺氧不同时间点(0.5、2、4、8、12 和 24 h)的缺氧组或对照组 A549 肺癌细胞培养液 5 mL,2 h 后断头取脑。采用 Western blot 法,定性检测(观察条带显影浓度)动物脑组织血脑屏障内皮细胞中 occludin 蛋白[一抗为 occludin 大鼠多克隆抗体(1:50)]的表达水平,内参采用 *GADPH*。

1.8 伊文思蓝检测大鼠血脑屏障通透性

另取大鼠,处理同 1.7,每组每时点 8 只。经尾静脉给予缺氧不同时间点的肺癌细胞培养液 2 h 后再经尾静脉注射伊文思兰(20 mg/kg)后断头取脑。分光光度计测定 OD 值,根据标准曲线计算出伊文思兰含量,结果以 $\mu\text{g/g}$ 表示。

1.9 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两样本均数间比较采用配对 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺癌细胞内 hsp70 的表达

缺氧组和对照组的肺癌细胞相比,缺氧组肺癌

细胞内 hsp70 的表达高于对照组,且于缺氧 4 h 时表达升高($P<0.05$),至缺氧 8 h 时达最高水平($P<0.01$),其后开始减少。见图 1。

2.2 A549 细胞和 A549/hsp70 细胞培养液内 microRNA-155 的表达

缺氧处理后,两组肺癌细胞培养液内的 microRNA-155 的表达开始增加,至缺氧 8 h 时达高峰,然后减少。与对照组 A549 细胞相比,4~24 h 缺氧处理的 A549 细胞培养液内 microRNA-155 的增加差异有统计学意义($P<0.05$),2~24 h 缺氧处理的 A549/hsp70 细胞培养液内 microRNA-155 表达增加($P<0.05$),且较缺氧处理的 A549 组更显著($P<0.05$)。见图 2。

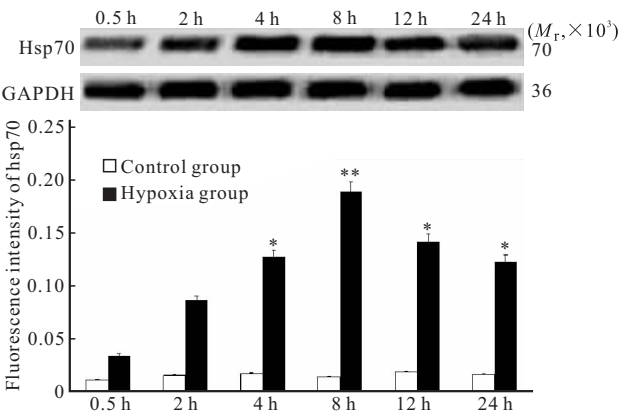


图 1 Western blot(A)和免疫荧光(B)检测肺癌细胞内 hsp70 的表达
Fig 1 Expression of hsp70 in lung cancer cells by Western blot (A) and immunofluorescence (B) methods

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, vs. control group at the same time point

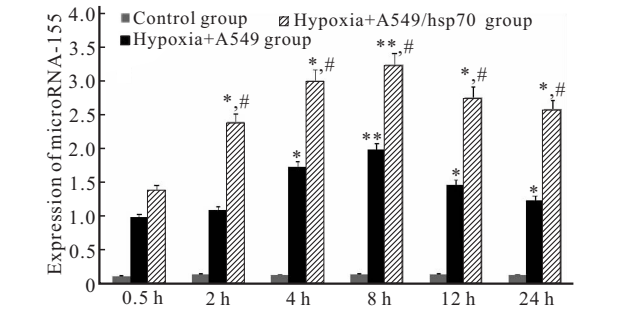


图 2 肺癌细胞内 microRNA-155 表达量的变化
Fig 2 Changes of microRNA-155 expression in lung cancer cells

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, vs. control group at the same time point; # $P<0.05$, vs. hypoxia+A549 group at the same time point

2.3 缺氧肺癌细胞培养液对 HRP 通过率的影响

缺氧肺癌细胞培养液作用于体外血脑屏障模型后,HRP 通过率先增加后降低,与对照组相比,4~12 h 的差异有统计学意义($P<0.05$),其中缺氧 8 h

组为最高($P<0.01$)。见图 3。

2.4 Transwell 下室的肺癌细胞数

血脑屏障模型 Transwell 上室加入 A549 肺癌细胞悬液,结果发现,随缺氧时间延长,下室的肺癌细胞数先增加后降低,缺氧 8 h 的肺癌细胞透过 Transwell 的数量最多。缺氧 8 h、12 h,两组细胞数差异有统计学意义($P<0.05$)。对照组细胞各时点间细胞数差异无统计学意义。见图 4。

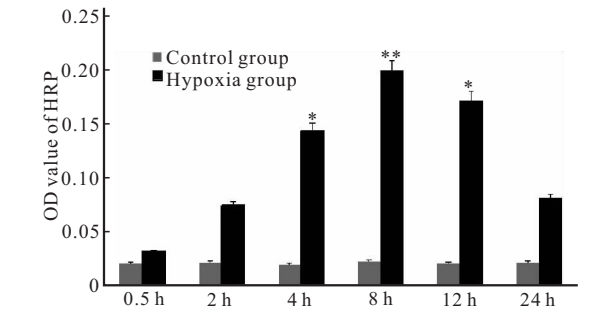


图 3 缺氧肺癌细胞培养液对 HRP 通过率的影响
Fig 3 Effect of hypoxic lung cancer cell culture medium on HRP passage rate

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, vs. control group at the same time point

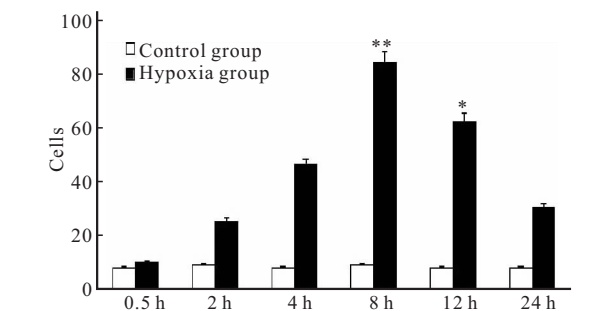


图 4 迁移细胞数
Fig 4 Migration cell number

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. control group at the same time point

2.5 大鼠脑组织 occludin 的定性表达

缺氧组 A549 肺癌细胞培养液可引起大鼠脑组织血脑屏障内皮细胞紧密连接蛋白 occludin 表达减少,且缺氧 8 h 时间点的培养液降低 occludin 的作用最为明显($P<0.01$)。见图 5。

2.6 大鼠血脑屏障的通透性变化

缺氧肺癌细胞培养液可增加大鼠血脑屏障的通透性,4~12 h 与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$),且缺氧 8 h 时间点的缺氧肺癌细胞培养液增加血脑屏障通透性的作用最大($P<0.01$)。见图 6。

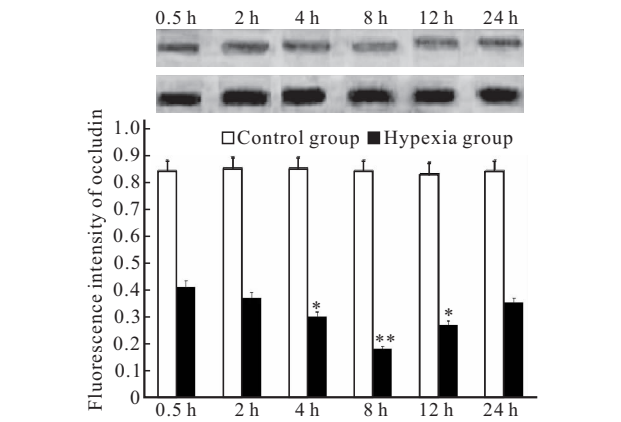


图 5 动物脑组织内 occludin 的表达水平
Fig 5 The expression level of occludin in animal brain tissue

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, vs. control group at the same time point

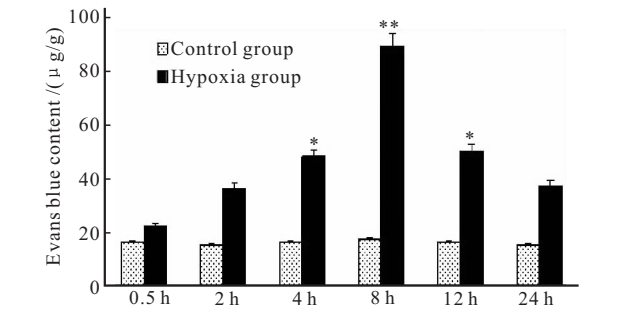


图 6 血脑屏障通透性变化
Fig 6 Changes in blood-brain barrier permeability

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, vs. control group at the same time point

3 讨论

肺癌是最常见的肺原发性恶性肿瘤,其发病率和死亡率均占恶性肿瘤的前列,肺癌的脑转移率亦非常高。在脑组织中存在血脑屏障,其可限制各种大分子和小分子非脂溶性药物通过血脑屏障到达脑组织^[10-14],因此在一定程度上可以阻止致病因子等对脑的侵害,从而保护机体作用。而小细胞肺癌在发生器官转移时却表现出了对脑的“亲嗜性”,这一病理特点很可能与其可以增加血脑屏障的通透性有关^[1]。microRNA-155 在非小细胞肺癌组织中的表达水平明显升高^[6],推测肺癌细胞内 microRNA-155 的高表达可能通过增加血脑屏障通透性引起肺癌脑转移。

microRNA-155 可以将血脑屏障的上皮细胞分开从而产生细微间隙来促进物质通过,即血脑屏障在炎性状况下可以变得“漏洞百出”。随后研究者构

建了缺失 microRNA-155 的小鼠,结果显示,相比正常小鼠而言,不表达 microRNA-155 的小鼠机体中血脑屏障的通透性降低,并发现 microRNA-155 可以通过影响内皮细胞之间紧密连接而增加血脑屏障的通透性^[7]。

本研究首先对肺癌细胞进行缺氧培养,并于肺癌细胞缺氧培养的不同时间点检测了肺癌细胞内 hsp70 表达的变化,结果发现,肺癌细胞进行缺氧培养后,细胞内的 hsp70 表达开始增多,至缺氧 8 h 时 hsp70 表达达到最高峰,而与此同时,缺氧肺癌细胞培养液内 microRNA-155 的表达水平亦呈现相同的变化趋势。究其原因,可能与 hsp70 有关。Hsp70 作为一种分子伴侣蛋白,其作用就在于通过影响蛋白质的折叠、伸展、转运、寡聚体的形成等来促进其他蛋白质的合成^[15]。由此提示缺氧可能首先引起了肺癌细胞内 hsp70 的表达增加,进而又通过 hsp70 促进了 microRNA-155 的合成与释放。

在肺癌脑转移发生的过程中,血脑屏障是关键突破点^[16]。为此,本研究检测了缺氧不同时间点的肺癌细胞培养液对动物血脑屏障通透性的影响,结果发现,缺氧肺癌细胞培养液可引起动物血脑屏障通透性增加,且其增加程度与缺氧肺癌细胞培养液内 microRNA-155 的含量在时间上呈现相同的变化趋势,这亦与缺氧肺癌细胞通过体外血脑屏障模型的结果相一致,也与其他研究者得出的 microRNA-155 可以增加血脑屏障的通透性这一结果^[7]一致。因此我们有理由相信,缺氧引起肺癌细胞培养液内 microRNA-155 的增加是导致血脑屏障开放的原因之一。

本研究在动物水平进一步检测了缺氧肺癌细胞培养液对血脑屏障紧密连接蛋白的影响,结果发现,缺氧 8 h 肺癌细胞培养液的血脑屏障内皮细胞紧密连接蛋白 occludin 表达最少,同一时点肺癌细胞培养液内 microRNA-155 的含量最多,提示 occludin 表达减少可能与 microRNA-155 直接相关,且此时实验动物的血脑屏障通透性亦达到最大。我们推测出现此研究结果的原因是,肺癌细胞释放的 microRNA-155 引起了实验动物血脑屏障 occludin 表达减少,紧密连接开放导致血脑屏障通透性增加。

上述研究结果证实了我们的设想,即肺癌细胞缺氧可引起 hsp70 表达增加,增加的 hsp70 又促进了 microRNA-155 的表达和释放,进而降低血脑屏障紧密连接蛋白 occludin 的表达,增加血脑屏障通透性,最终引起肺癌细胞透过血脑屏障转移入脑。

虽然已有研究者证实 microRNA-155 可以增加

血脑屏障的通透性,但是关于缺氧肺癌细胞释放的 microRNA-155 对血脑屏障通透性影响的研究尚未见报道。本研究可以为肺癌脑转移过程中肺癌细胞穿过血脑屏障机制方面提供理论依据,并可为临床肺癌脑转移防治提供新思路。

参 考 文 献

- [1] SATOH H, ISHIKAWA H, YAMASHITA Y T, *et al.* Patterns of brain metastasis in lung cancer. *Oncol Rep*, 2001, 8 (4): 781-783.
- [2] LEE H W, LEE J I, LEE S J, *et al.* Patient-derived xenografts from non-small cell lung cancer brain metastases are valuable translational platforms for the development of personalized targeted therapy. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(5): 1172-1182.
- [3] SETIADI A, KORIM W S, ELSAFAFIEN K, *et al.* The role of the blood-brain barrier in hypertension. *Exp Physiol*, 2018, 103(3): 337-342.
- [4] FARAONI I, ANTONETTI F R, CARDONE J, *et al.* miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792(6): 497-505.
- [5] PASQUINELLI A E. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(4): 271-282.
- [6] LOPEZ-RAMIREZ M A, WU D, PRYCE G, *et al.* MicroRNA-155 negatively affects blood-brain barrier function during neuroinflammation. *FASEB J*, 2014, 28 (6): 2551-2565.
- [7] HOU L, CHEN J, ZHENG Y, *et al.* Critical role of miR-155/FoxO1/ROS axis in the regulation of non-small cell lung carcinomas. *Tumor Biol*, 2016, 37(4): 5185-5192.
- [8] COTO A L S, SERAPHIM T V, BATISTA F A H, *et al.* Structural and functional studies of the Leishmania braziliensis, SGT co-chaperone indicate that it shares structural features with HIP and can interact with both Hsp90 and Hsp70 with similar affinities. *Int J Biol Macromol*, 2018, 118: 693-706.
- [9] WILHELM I, KRIZBAI I A. *In vitro* models of the blood-brain barrier for the study of drug delivery to the brain. *Mol Pharm*, 2014, 11(7): 1949-1963.
- [10] HARFORD-WRIGHT E, LEWIS K M, ROBERT V I N K. Towards drug discovery for brain tumours: interaction of kinins and tumours at the blood brain barrier interface. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 2011, 6(1): 31-40.
- [11] THOMPSON E M, FRENKEL E P, NEUWELT E A. The paradoxical effect of bevacizumab in the therapy of malignant gliomas. *Neurology*, 2011, 76(1): 87-93.
- [12] LEMASSON B, SERDUC R, MAISIN C, *et al.* Monitoring blood-brain barrier status in a rat model of glioma receiving therapy: dual injection of low-molecular-weight and macromolecular MR contrast media. *Radiology*, 2010, 257 (2): 342-352.
- [13] PANG Z, FENG L, HUA R, *et al.* Lactoferrin-conjugated biodegradable polymersome holding doxorubicin and tetrandrine for chemotherapy of glioma rats. *Mol Pharm*, 2010, 7(6): 1995-2005.
- [14] BLACK K L, YIN D, ONG J M, *et al.* PDE5 inhibitors enhance tumor permeability and efficacy of chemotherapy in a rat brain tumor model. *Brain Res*, 2008, 1230: 290-302.
- [15] CONNARN J N, ASSIMON V A, REED R A, *et al.* The molecular chaperone Hsp70 activates protein phosphatase 5 (PP5) by binding the tetratricopeptide repeat (TPR) domain. *J Biol Chem*, 2014, 289(5): 2908-2917.
- [16] AHMAD O, CHAN M, SAVAGE P, *et al.* Biology and treatment of metastasis of sarcoma to the brain. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2016, 8: 233-244.

(2019-03-25 收稿, 2019-06-17 修回)

编辑 吕 熙