

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.12.012

· 临床研究 ·

非小细胞肺癌组织中高表达的 miR-1269 对肺癌细胞 A549 生物学行为的影响

戴素丽¹, 白函瑜¹, 王耀杰¹, 魏思思¹, 陈亮², 张璁¹, 赵连梅¹, 单保恩¹ (1. 河北医科大学 第四医院 科研中心, 河北 石家庄 050011; 2. 沧州市中心医院 乳腺甲状腺外科, 河北 沧州 061014)

[摘要] **目的:**探讨 miR-1269 在非小细胞肺癌 (non-small-cell lung cancer, NSCLC) 组织中的表达和对人 NSCLC A549 细胞生物学特性的影响及其作用机制。 **方法:**选取 2017 年 1 月至 2018 年 1 月在河北医科大学第四医院胸外科进行首次手术切除的 34 例新鲜 NSCLC 癌组织及相应的癌旁组织, 应用 qRT-PCR 检测 NSCLC 癌组织及相应的癌旁组织中 miR-1269 的表达水平。将 miR-1269 mimics 和 mimics NC 转染至 A549 细胞后, 应用 MTS 实验、细胞划痕实验和 Transwell 实验检测 A549 细胞增殖、迁移和侵袭能力, 流式细胞术检测其细胞周期的变化。生物信息学软件预测 miR-1269 的靶基因, 并通过 Western blotting 和双荧光素酶报告基因实验验证 miR-1269 对靶基因的调控作用。采用 Western blotting 检测已转染的 A549 细胞的细胞周期依赖性激酶抑制剂 p21、细胞周期蛋白 D2 以及上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 相关蛋白 ZEB2 和 E-cadherin 的表达情况。 **结果:**NSCLC 癌组织中 miR-1269 的表达水平显著高于对应的癌旁组织 (2.81 ± 2.27 vs 1.61 ± 1.36 , $P < 0.05$)。miR-1269 mimics 转染组 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭能力显著高于空白对照组和 mimics NC 转染组 (均 $P < 0.01$)。转染 miR-1269-mimics 的 A549 细胞 S 期细胞比例明显高于 mimics NC 转染组 [46.54 ± 1.57 % vs (23.32 ± 3.15)%, $P < 0.01$]。miR-1269 可与 *FOXO1* 基因 3' 端非翻译区的结合位点相结合, 且过表达 miR-1269 后, A549 细胞中 *FOXO1* 的表达水平及荧光素酶报告基因的活性均明显降低 (均 $P < 0.01$)。miR-1269 mimics 转染组 A549 细胞中 p21、E-cadherin 蛋白表达水平降低 (均 $P < 0.05$), 而 CyclinD2、ZEB2 蛋白表达水平升高 (均 $P < 0.05$)。 **结论:**miR-1269 在 NSCLC 组织中表达上调, 并且能够促进 A549 细胞的增殖、迁移、侵袭能力和影响细胞周期进程; 其作用机制可能与靶向调控抑癌基因 *FOXO1* 的表达有关。

[关键词] 非小细胞肺癌; A549 细胞; miR-1269; FOXO1; 增殖; 周期; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R730.51; R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)12-1282-08

Effect of high expression of miR-1269 in non-small cell lung cancer tissues on biological characteristics of lung cancer A549 cells

DAI Suli¹, BAI Hanyu¹, WANG Yaojie¹, WEI Sisi¹, CHEN Liang², ZHANG Cong¹, ZHAO Lianmei¹, SHAN Baoen¹ (1. Research Center, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. Department of Breast and Thyroid Surgery, Central Hospital of Cangzhou City, Cangzhou 061014, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of miR-1269 in non-small-cell lung cancer (NSCLC) tissues, and to explore its effect on the cellular biological characteristics of NSCLC A549 cells and the underlying mechanism. **Methods:** 34 pairs of NSCLC tissues and the corresponding adjacent para-cancerous tissues obtained from the patients, who underwent surgery in the Department of Breast Surgery, the Fourth Hospital of Hebei Medical University from Jan. 2017 to Jan. 2018, were collected for this study. The expression level of miR-1269 in above tissue specimens was examined by real-time fluorescent quantitative PCR. After transfection with miR-1269 mimics and mimics NC (negative control), the proliferation, migration and invasion of A549 cells were detected by MTS, Wound healing and Transwell assay, respectively; and the changes in cell cycle distribution of A549 cells were examined by flow cytometry. The bioinformatics tool was used to predict the possible target gene of miR-1269, and the regulation effect of miR-1269 on target gene was then validated by Western blotting and Dual-luciferase reporter assay. In the meanwhile, the protein expressions of cyclin depen-

[基金项目] 河北省科技计划基金资助项目 (No.162777138); 河北省财政支撑资助项目 (No. 20141257)。Project supported by the Science and Technology Project Foundation of Hebei Province (No. 162777138), and the Financial Foundation of Hebei Province (No.20141257)

[作者简介] 戴素丽 (1989-) 女, 硕士, 研究实习员, 主要从事肿瘤分子生物学的基础研究, E-mail: dslfighting@163.com

[通信作者] 单保恩 (SHAN Baoen, corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤免疫学、基因诊断、抗肿瘤中药及肿瘤生物治疗的研究, E-mail: shanbaoen@163.com

dent kinase inhibitor p21, Cyclin D2, and EMT-related proteins (E-cadherin and ZEB2) in the transfected A549 cells were measured by Western blotting. **Results:** The expression level of miR-1269 in NSCLC tissues was significantly higher than that in paracancerous tissues (2.81 ± 2.27 vs 1.61 ± 1.36 , $P < 0.05$). The capacities of proliferation, migration and invasion of A549 cells in miR-1269 mimics transfection group were significantly higher than those in mimics NC group and blank control group (all $P < 0.01$). And the cell proportion at S-phase in miR-1269-mimics group was obviously higher than that in mimics NC group [$(46.54 \pm 1.57)\%$ vs $(23.32 \pm 3.15)\%$, $P < 0.01$]. Bioinformatics analysis showed that miR-1269 could combine with 3' UTR of *FOXO1* gene. After transfection with miR-1269 mimics, the expression level and luciferase activity of FOXO1 protein in A549 cells were significantly reduced (all $P < 0.01$). Moreover, the protein expressions of p21 and E-cadherin were significantly decreased after over-expression of miR-1269 (all $P < 0.05$), while the expressions of ZEB2 and Cyclin D2 were up-regulated (all $P < 0.05$). **Conclusion:** The expression level of miR-1269 in NSCLC tissues was significantly increased, and it could enhance the proliferation, cell cycle progression, migration and invasion of A549 cells. The possible mechanism may be related to its targeted regulation of *FOXO1*.

[Key words] non-small cell lung cancer (NSCLC); A549 cell; miR-1269; FOXO1; proliferation; cell cycle; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(12): 1282-1289. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.12.012]

肺癌是临床最常见的恶性肿瘤之一,在世界范围内,其发病率和病死率均居癌症首位^[1]。肺癌根据病理类型的不同可分为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)和小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC),其中NSCLC约占80%^[2]。由于肺癌发病隐匿,多数患者就诊时已是中晚期,错过最佳治疗时机。目前,尽管对肺癌的诊断、治疗和发病机制等方面的研究取得了较大进展,但肺癌患者的长期生存并不乐观,总体5年生存率不足15%^[3]。肺癌的发生发展是多基因改变共同作用的结果,基因调控网络中的microRNAs(miRNAs)通过直接降解靶mRNA或抑制其翻译,从而调控肿瘤细胞的增殖、迁移、血管形成等生物学过程^[4-5]。近年来,有关miRNA与肺癌特别是NSCLC发生发展、诊断治疗的关系备受关注^[6]。在临床肿瘤诊治中,miRNA可以辅助肺癌的病理分型^[7],同时也可以作为诊断标志物^[8-9],还可以作为判断肺癌患者的预后指标^[10-11]。BU等^[12]报道,在晚期结直肠癌组织中miR-1269呈过表达状态,与miR-1269低表达的患者相比,高表达miR-1269的中晚期结直肠癌患者有较高的复发率和术后转移率。进一步的荧光素酶报告基因实验证实,miR-1269通过靶向Smad7和HOXD10来促进结直肠癌细胞的迁移和侵袭能力。有研究^[13-14]报道,miR-1269的表达异常与肝癌的发生有关。高表达miR-1269与肝癌患者的远处转移、临床分期和肿瘤大小呈正相关。体外研究^[14-15]发现,miR-1269通过与抑癌基因FOXO1和SOX6的3'UTR区结合,从而促进肝癌细胞的增殖和克隆形成能力。FOXO1转录因子是FOX家族中FOXO亚家族的重要成员,作为一种肿瘤抑制因子,FOXO1的表达在多种癌症中均受到miRNA的调控^[16]。然而,在肺癌中miR-1269与FOXO1之间是否存在调控关系尚未见报道。本研究首先在NSCLC组织中检测了miR-1269的表达情况

及其对NSCLC A549细胞生物学特性的影响,并进一步探讨了miR-1269对FOXO1基因表达的调控作用,为NSCLC早诊早治和预后判定提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人肺癌细胞株A549来自于河北医科大学第四医院科研中心。RPMI 1640培养基、胰蛋白酶购自美国Gibco公司,胎牛血清购自Biological Industries(BI)公司,TRIzol购自美国Invitrogen公司,Platinum SYBR SuperMix试剂、MTS细胞增殖分析试剂盒均购自美国Promega公司,PCR引物和Lipofectamine™ 2000转染试剂均购自美国Invitrogen公司,逆转录试剂盒和BCA蛋白定量检测试剂盒购自美国Thermo公司,RIPA细胞裂解液购自北京索莱宝生物科技有限公司,miR-1269-mimics购自苏州吉玛基因公司,Transwell小室(孔径3.0 μm)购自美国Corning公司,Matrigel购自美国BD公司,结晶紫染液购自碧云天生物技术有限公司,细胞周期试剂盒购自联科生物技术股份有限公司,兔抗人FOXO1、Cyclin D2、p21、ZEB2、E-cadherin和GAPDH抗体购自美国Proteintech公司,DyLight™ 800标记的羊抗兔IgG荧光二抗购自美国Rockland公司。

1.2 组织标本的收集

收集2017年1月至2018年1月在河北医科大学第四医院胸外科进行首次手术切除的34例新鲜NSCLC组织(避开肿瘤出血和坏死部位)及其相应的癌旁组织(距癌组织边缘 ≥ 5 cm)。所有标本均经手术后病理检查确诊为NSCLC。于病案室收集患者姓名、性别、年龄、手术记录、病理号码、病理报告、吸烟史等临床资料。34例患者中,男性30例,女性4例;年龄(48~79)岁,中位年龄63岁;按照国际抗癌联盟推出的第八版肺癌TNM分期标准进行分期:I期3

例, II期 11 例, III期 18 例, IV期 2 例; 高分化者 25 例, 低分化者 9 例; 肿瘤直径 < 5 cm 者 19 例, 肿瘤直径 ≥ 5 cm 者 15 例; 有淋巴结转移者 23 例, 无淋巴结转移者 11 例; 有吸烟史者 26 例, 无吸烟史者 8 例。所有患者均无其他重大基础疾病史, 手术前均未进行放、化疗和免疫治疗。本研究获得医院伦理委员会的批准, 所用的标本均得到患者的知情同意。

1.3 细胞培养及转染

将 A549 细胞置于含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养基, 在 37 °C、CO₂ 体积分数为 5% 的培养箱中培养。取对数生长期的细胞进行实验, 转染前 1 d 将 A549 细胞接种到 6 孔板中, 待细胞汇合度为 60%~70% 时按 Lipofectamine 2000 转染试剂说明书操作。实验分为 3 组: 过表达阴性对照组(miR-1269-mimics NC)、过表达组(miR-1269-mimics)和空白对照组。转染时, 各组片段的终浓度均为 100 nmol/L。转染 6 h 后, 换为正常的完全培养液继续培养 24、48 h, 然后用于后续实验。

1.4 qRT-PCR 实验检测 NSCLC 癌组织及其癌旁组织中 miR-1269 的表达水平

用 TRIzol 试剂提取冰冻的 NSCLC 组织和相应癌旁组织的总 RNA, 紫外分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度。取 2 μg 总 RNA 利用逆转录试剂盒合成 cDNA(逆转录条件: 42 °C 60 min, 72 °C 15 min)。以此 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 扩增。qRT-PCR 反应条件: 95 °C 5 min, 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 40 个循环。以 2^{-ΔΔCt} 值表示 miR-1269 的相对表达水平, 其值 > 1 表示 miR-1269 的表达水平上调, 其值 ≤ 1 表示 miR-1269 的表达水平下调。以 U6 为内参, 引物序列 miR-1269 为 F: 5'-GCTGGACTGAGCCGTGC-3', R: 5'-CAGTGCGTGTCTGGAGT-3'; U6 为 F: 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3', R: 5'-GGCTGAGAACTGAATTCCA-3'。实验重复 3 次。

1.5 MTS 实验检测 miR-1269 对 A549 细胞增殖能力的影响

接种转染后的各组细胞于 96 孔板中(2×10³/孔), 每组设 6 个复孔。细胞继续培养 24、48、72 和 96 h, 加入 MTS 试剂(500 μg/ml、10 μl/孔), 置于 37 °C 反应 2.5 h, 采用酶联免疫检测仪检测 492 nm 波长处各孔的光密度(D)值。以时间为横坐标, D 值为纵坐标绘制细胞生长曲线。实验重复 3 次。

1.6 流式细胞术检测 miR-1269 对 A549 细胞周期的影响

用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化转染 24 h 后的各

组细胞, 离心弃上清。用 PBS 洗涤 1 次, DNA staining solution 和 10 μl Permeabilization solution, 涡旋震荡 5~10 s 混匀。室温避光孵育 30 min 后上机检测。实验重复 3 次。

1.7 划痕实验检测 miR-1269 对 A549 细胞平面迁移能力的影响

细胞转染 24 h 后, 用 200 μl 无菌的加样枪头在每孔单层细胞上轻轻划痕, 建立细胞划痕模型。沿划痕边缘等距离间隔做上标记, 以便后续检测。划痕后用 PBS 轻轻冲洗细胞 3 次, 更换为无牛血清的 RPMI 1640 培养基继续培养。于划痕 0、12、24 h 后在倒置显微镜下观察划痕愈合程度并拍照。测量划痕中间的距离, 并与 0 h 的划痕距离相比, 计算划痕间距缩小的百分率, 以此反映细胞的平面迁移能力。实验重复 3 次。

1.8 Transwell 小室实验检测 miR-1269 对 A549 细胞迁移和侵袭能力的影响

收集转染后的各组细胞, 悬浮于无血清的 RPMI 1640 培养液中, 计数细胞。将 Transwell 小室置于无菌 24 孔板中, 将各组细胞分别加入 Transwell 小室的上室(1.5×10⁵ 个/小室), 下室加入 600 μl 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 继续培养细胞 24 h。取出 Transwell 小室, 用棉签小心擦净上室面的细胞, 用 4% 多聚甲醛溶液于常温下固定 30 min, 风干后结晶紫染色 20 min, 自来水清洗后于倒置相差显微镜下观察并拍照(×200), 随机观察 5 个视野, 计数穿膜细胞数。将置于 4 °C 溶解过夜的 Matrigel 用无血清 RPMI 1640 培养液按 1:7 的体积比例进行稀释。Transwell 小室置于无菌 24 孔板中, 向小室中加入 20 μl Matrigel, 快速晃动, 使其均匀铺满小室底面。待 Matrigel 凝固后, 其他操作按细胞迁移实验进行。检测继续培养 48 h 后的细胞的侵袭能力。实验重复 3 次。

1.9 Western blotting 检测 miR-1269 靶基因的表达水平

收集转染后的各组细胞, 应用 RIPA 裂解液提取各组细胞的总蛋白质。BCA 法进行蛋白质定量。取 60 μg/孔进行 12% SDS-PAGE, 将电泳分离后的蛋白转移到 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的封闭液在室温下封闭 1 h, 加入兔抗人 FOXO1(体积稀释比例为 1:1 000)和兔抗人 GAPDH 抗体(内参照, 体积稀释比例为 1:5 000), 4 °C 反应过夜; 加入 DyLightTM 800 标记的羊抗兔 IgG 荧光二抗(体积稀释比例为 1:100 000), 室温反应 1 h。用 Odyssey 红外荧光成像仪进行扫描, 以目的蛋白条带的灰度值/内参照蛋白条带的灰度值作为目的蛋白的相对表达水平。实验重复 3 次。

1.10 双荧光素酶报告基因实验检测 miR-1269 对 FOXO1 基因的靶向作用

由上海捷瑞生物工程有限公司合成 FOXO1 基因的 3' UTR, 并插入 pGL3-Promoter 质粒载体中, 将该重组质粒命名为 pGL3-FOXO1-3' UTR WT。此外, 利用定点突变将 FOXO1 基因的 3' UTR 的 miR-1269 的潜在结合部位 5'-CAGUCCA-3' 序列突变为 5'-AG-GCAAG-3', 并将该重组质粒命名为 pGL3-FOXO1-3' UTR MUT。

将 293T 细胞悬液计数后均匀接种于 24 孔板中, 待细胞汇合度达 60%~70% 时分别将 miR-1269-mimics、mimics-NC、pGL3-FOXO1-3' UTR WT 或 pGL3-FOXO1-3' UTR MUT 质粒与 pRL-TK 质粒共转染至每孔细胞中 (实验共分 4 组, pGL3-FOXO1-3' UTR WT+mimics-NC 组、pGL3-FOXO1-3' UTR WT+miR-1269-mimics 组、pGL3-FOXO1-3' UTR MUT+mimics-NC 组和 pGL3-FOXO1-3' UTR MUT+miR-1269-mimics 组), 转染 6 h 后更换为新鲜的含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 继续培养 36 h。之后按照 Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega) 试剂盒说明书进行操作, 检测各孔的荧光素酶活性。相对荧光素酶活性 = 萤火虫荧光素酶活性值/海肾荧光素酶活性值。实验重复 3 次。

1.11 Western blotting 检测 miR-1269 对 p21、Cyclin D2、ZEB2 和 E-cadherin 蛋白表达的影响

实验分为未转染组、NC 转染组和 miR-1269 mimics 转染组, 收集转染 60 h 后的各组细胞应用 RIPA 裂解液提取各组细胞的总蛋白质。BCA 法进行蛋白质定量。取 60 μ g/孔进行 10% SDS-PAGE, 将电泳分离后的蛋白转移到 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的封闭液在室温下封闭 1 h, 加入兔抗人 p21 (1:500)、Cyclin D2 (1:500)、E-cadherin (1:1000)、ZEB2 (1:1000) 抗体和 GAPDH (1:5000) 抗体, 4 $^{\circ}$ C 反应过夜; 加入 DyLight[™] 800 标记的羊抗兔 IgG 荧光二抗 (体积稀释比例为 1:100000), 室温反应 1 h。用 Odyssey 红外荧光成像仪进行扫描, 以目的蛋白条带的灰度值/内参照蛋白条带的灰度值作为目的蛋白的相对表达水平。实验重复 3 次。

1.12 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计学软件, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-1269 在 NSCLC 癌组织中的表达水平明显

上调

qRT-PCR 检测结果 (图 1) 显示, NSCLC 癌组织 miR-1269 的表达水平明显高于对应的癌旁组织 (2.81 ± 2.27 vs 1.61 ± 1.36 , $P<0.05$)。

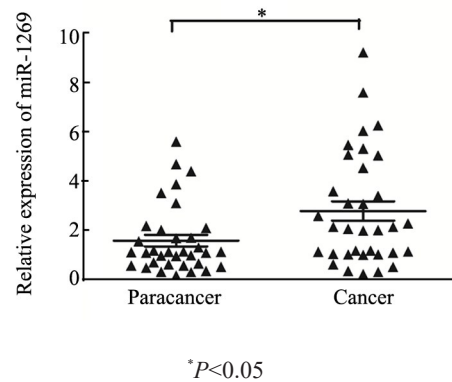


图 1 NSCLC 癌组织及对应癌旁组织中 miR-1269 的表达水平
Fig.1 Expression level of miR-1269 in NSCLC tissues and corresponding adjacent tissues

2.2 转染 miR-1269-mimics 后 A549 细胞中 miR-1269 的表达水平升高

转染 miR-1269-mimics 和 miR-1269-mimics NC 后, qRT-PCR 法检测结果 (图 2) 显示, miR-1269-mimics 转染组 A549 细胞中 miR-1269 的表达水平明显高于空白对照组和 NC 转染组 (238.60 ± 10.36 vs 1.00 ± 0.11 、 0.93 ± 0.08 , 均 $P<0.01$); 而空白对照组表达水平与 NC 组比较无明显差异 ($P>0.05$)。

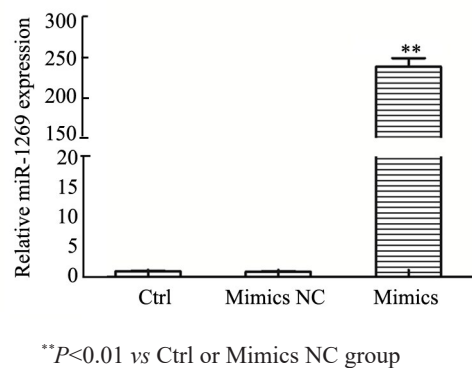


图 2 qRT-PCR 法检测 miR-1269-mimics 的转染效率
Fig.2 The transfection efficiency of miR-1269-mimics was detected by qRT-PCR

2.3 过表达 miR-1269 提高 A549 细胞的体外增殖能力

MTS 实验检测结果 (图 3) 显示, 转染 miR-1269-mimics 组 A549 细胞的增殖能力明显高于 miR-1269-mimics NC 组和空白对照组 (均 $P<0.01$), 而空白对照组与 NC 组 A549 细胞增殖能力无明显差异 ($P>0.05$)。

2.4 过表达 miR-1269 影响 A549 细胞周期进程

流式细胞术检测结果(图4)显示,转染 miR-1269-mimics 组 S 期细胞比例明显高于 mimics NC 转染组[(46.54±1.57)% vs (23.32±3.15)%], G0/G1 期细胞百分比明显低于 mimics NC 转染组 [(28.72±3.15)% vs (51.59±3.03)%], 而 G2/M 期细胞比例没有明显变化。

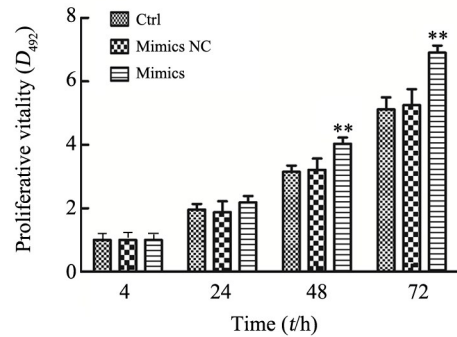
2.5 过表达 miR-1269 提高 A549 细胞划痕愈合能力

细胞划痕实验结果(图5)显示,转染 miR-1269-mimics 组 A549 细胞的划痕愈合能力明显高于空白对照组和 mimics NC 转染组 [(62.17±3.19)% vs (37.17±1.74)%、(42.62±2.72)%], 均 $P < 0.01$, 而空白对照组与 mimics NC 转染组比较无明显差异($P > 0.05$)。

2.6 过表达 miR-1269 提高 A549 细胞迁移和侵袭能力

Transwell 细胞迁移实验结果(图6)显示,转染 miR-1269-mimics 组 A549 细胞穿过 Transwell 小室基底膜的细胞数明显高于空白对照组和 mimics NC 转染组 [(217.67±14.15) vs (83.33±12.50)、(80.67±5.50)

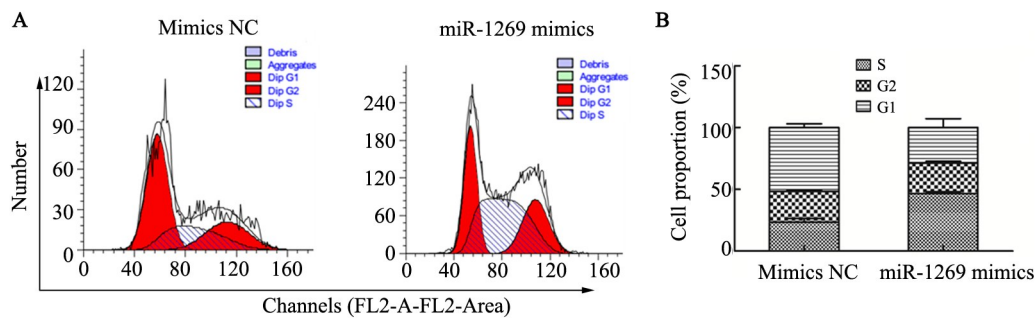
个,均 $P < 0.01$], 而空白对照组与 mimics NC 组比较无明显差异($P > 0.05$)。Transwell 细胞侵袭实验结果显示,转染 miR-1269-mimics 组 A549 细胞的侵袭能力明显高于空白对照组和 mimics NC 转染组 [(178.67±3.79) vs (60.00±6.24)、(58.00±5.57)个,均 $P < 0.01$]。



** $P < 0.01$ vs Ctrl or Mimics NC group

图3 过表达 miR-1269 对 A549 细胞增殖能力的影响

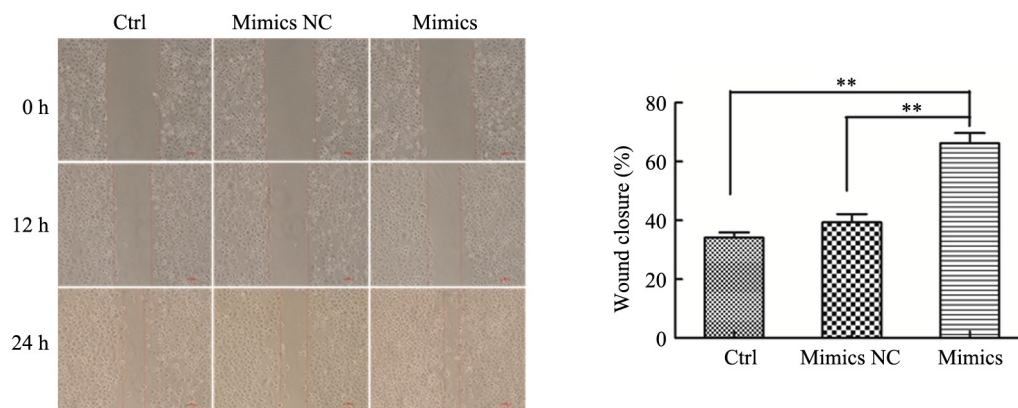
Fig.3 Effect of miR-1269 over-expression on proliferation of A549 cells



A: Effect of miR-1269 mimics transfection on cell cycle of A549 cells; B: Statistical histograms of cell cycle

图4 过表达 miR-1269 对 A549 细胞周期的影响

Fig.4 Effect of miR-1269 over-expression on A549 cells cycle



** $P < 0.01$

图5 过表达 miR-1269 对 A549 细胞划痕愈合能力的影响

Fig. 5 Effect of miR-1269 over-expression on A549 cells wound closure ability

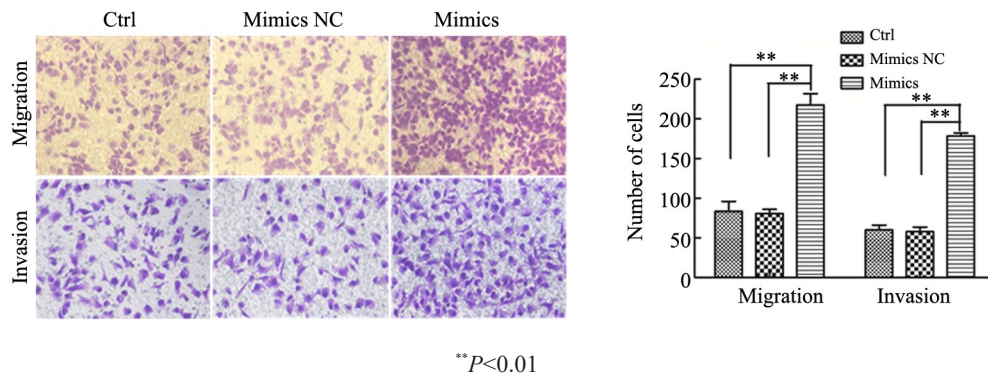
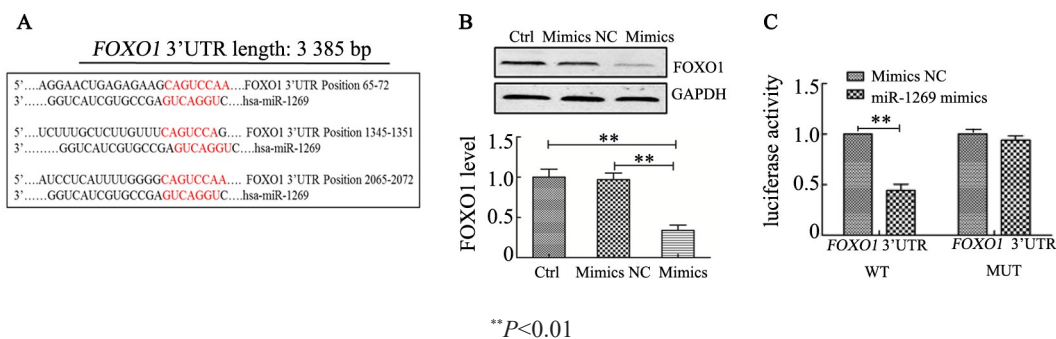


图6 过表达 miR-1269 对 A549 细胞迁移和侵袭能力的影响($\times 200$)
Fig.6 Effect of miR-1269 over-expression on migration and invasion of A549 cells ($\times 200$)

2.7 miR-1269 靶向作用于 FOXO1 基因

生物信息学网站 (TargetScan: http://www.targetscan.org/vert_72/; miRDB: <http://mirdb.org/>; PicTar: <https://pictar.mdc-berlin.de/>) 预测 miR-1269 靶基因, 最后选取 FOXO1 基因为研究对象。生物信息学分析软件结果 (图 7A) 显示, FOXO1 基因 3' UTR 上存在 miR-1269 的潜在结合位点。在 A549 细胞中转染 miR-1269-mimics 后, Western blotting 检测结果 (图 7B) 显示, 转染 miR-1269-mimics 组 A549 细胞

FOXO1 蛋白的表达水平明显低于空白对照组和 mimics NC 转染组 (0.34 ± 0.06 vs 1.00 ± 0.10 、 0.97 ± 0.08 , 均 $P < 0.01$)。双荧光素酶报告基因分析结果 (图 7C) 显示, miR-1269 转染组 FOXO1 的相对荧光强度显著低于 mimics NC 转染组 ($P < 0.01$), 而 FOXO1 3' UTR 中的 miR-1269 结合位点发生突变后, miR-1269 转染组和 mimics NC 转染组的相对荧光强度无明显差异 ($P > 0.05$), 表明 miR-1269 过表达对报告基因的抑制作用消除。



A: The wild FOXO1 binding sequence with miR-1269; B: Expression level of FOXO1 protein after transfection with miR-1269 mimics; C: Relative fluorescence activity by dual-luciferase reporter assay

图7 生物信息学预测并验证 FOXO1 是 miR-1269 的作用靶点

Fig.7 Prediction and validation of FOXO1 as the target gene of miR-1269 by the bioinformatics

2.8 过表达 miR-1269 影响 A549 细胞中 p21、CyclinD2、E-cadherin 和 ZEB2 蛋白的表达水平

Western blotting 检测细胞周期依赖性激酶抑制剂 p21、细胞周期蛋白 D2 以及上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 相关蛋白 ZEB2 和 E-cadherin 的表达情况, 结果 (图 8) 显示, 转染 miR-1269-mimics 组 A549 细胞中 p21 和 E-cadherin 蛋白表达水平低于空白对照组和 mimics NC 转染组, 而 Cyclin D2 和 ZEB2 蛋白表达水平高于空白对照组和

mimics NC 转染组 (均 $P < 0.05$)。

3 讨论

肺癌是全世界癌症相关死亡的最常见原因, 因此探究肺癌的详细发病机制, 并寻找有效的治疗靶点依然是当务之急^[16]。近年来, miRNA 在癌症发生发展过程中的重要作用引起了广泛关注。有证据^[17]表明, 越来越多的 miRNA 参与了肺癌的进展过程。但关于 miR-1269 在 NSCLC 发生发展中的作用研究

较少。本研究通过对NSCLC患者的临床样本进行检测和分析,发现NSCLC癌组织中miR-1269的表达水平高于配对的癌旁组织,提示miR-1269可能参与了NSCLC的发生发展。

近年来,大量的研究表明,miRNA参与了肿瘤细胞的增殖、分化、转移、代谢和凋亡等生物学过程。在肝细胞癌中,过表达miR-1269可以促进肝癌细胞的增殖能力和促进肝癌细胞由G0/G1期向S期转变^[13]。本研究发现,转染miR-1269-mimics后,A549细胞的增殖活力明显增强。流式细胞术检测结果显示,过表达miR-1269能够促进A549细胞周期进程,使S期细胞比例明显升高,而G0/G1期细胞比例下

降。在结直肠癌中,miR-1269的表达与患者的远处转移有关,高表达miR-1269的患者有较差的预后;在裸鼠的体内转移实验中,miR-1269过表达组的结肠癌细胞通过盲肠注射的肝转移率为87.5%,通过尾静脉注射的肺转移率为100%,而对照组两种注射方式均未出现转移^[15],说明miR-1269在结直肠癌的转移中发挥着重要作用。本研究通过Transwell实验与细胞划痕愈合实验探究了miR-1269与肺癌细胞的迁移和侵袭之间的关系,结果显示,过表达miR-1269后,A549细胞的划痕愈合能力和侵袭能力明显升高。上述结果显示,在NSCLC中miR-1269可能通过促进细胞增殖和转移来促进肺癌的恶性进展。

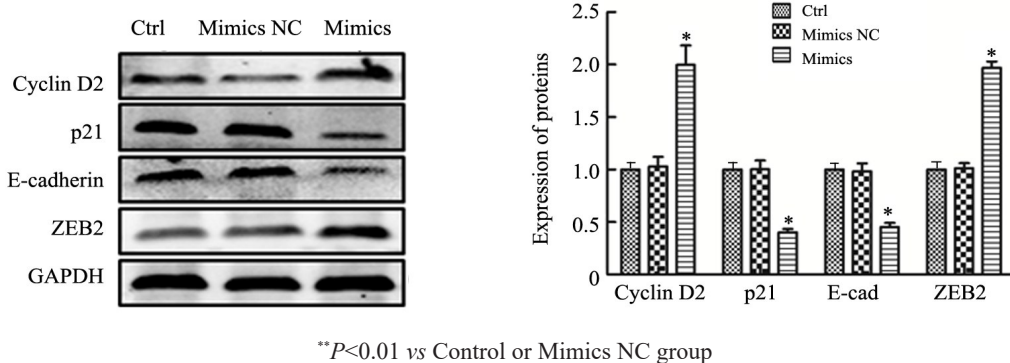


图8 过表达miR-1269对A549细胞p21、CyclinD2、E-cadherin和ZEB2蛋白表达水平的影响

Fig.8 Effect of miR-1269 over-expression on the protein expressions of p21, CyclinD2, E-cadherin and ZEB2 in A549 cells

miRNA发挥作用通常是通过调控其靶基因来实现的,本研究通过对miR-1269的潜在靶基因进行预测发现FOXO1为其直接靶基因。生物信息学软件分析显示,FOXO1基因3'UTR上存在3个miR-1269的潜在结合位点。FOXO1转录因子是FOX家族中FOXO亚家族的重要成员,FOXO1的表达在多种癌症中均受到miRNA的调控^[16]。在乳腺癌细胞MCF-7中,miR-27a、miR-96和miR-182共同靶向FOXO1,从而促进乳腺癌细胞的生长^[19]。在前列腺癌细胞中,过表达miR-370能够下调FOXO1的表达,从而促进癌细胞的增殖^[20]。本研究发现,NSCLC癌细胞中过表达miR-1269后,Western blotting检测结果显示,FOXO1的表达水平明显降低。进一步通过双荧光素酶报告基因实验证明miR-1269能够直接与FOXO1的3'UTR结合而抑制其表达。因此,推测在肺癌中miR-1269可能通过靶向抑癌因子FOXO1来发挥促进癌细胞增殖和转移的作用。

作为转录因子,FOXO1主要通过调控下游靶基因发挥抑制细胞生长和转移、调控细胞周期等抑癌基因的作用。在细胞核中,FOXO1通过与靶基因的DNA结合区域相互作用,进而促进CDKN1A和

CCND2等基因的转录,从而诱导癌细胞发生周期阻滞,抑制细胞生长^[21-22]。G1期到S期转换是细胞周期中的重要转折点,CCND2及CDKN1A在该过程中发挥至关重要的作用。EMT在肿瘤的转移中发挥重要作用。FOXO1能够参与EMT相关的信号通路和转录因子的表达调控,从而调控EMT过程^[23]。在肝细胞癌中,FOXO1通过抑制ZEB2的表达来阻止EMT的发生,从而抑制肝癌细胞的侵袭和转移^[24]。ZEB2主要是通过抑制上皮性标志物E-cadherin的表达来促进EMT的发生^[25]。本研究发现,过表达miR-1269能够加快细胞由G1期向S期进展,并促进A549细胞的迁移能力。Western blotting检测细胞周期及转移相关蛋白结果显示,过表达miR-1269后A549细胞中p21、E-cadherin的表达均降低,而ZEB2和Cyclin D2的表达升高,表明miR-1269可能通过下调FOXO1的表达,进而影响其靶基因的表达,从而发挥促进细胞增殖和转移的作用。

综上,miR-1269在NSCLC中高表达,并且能够促进NSCLC癌细胞的增殖、细胞周期进程、迁移及侵袭能力,其作用机制可能是通过靶向转录因子FOXO1来实现的,提示miR-1269通过靶向抑制

FOXO1 的表达来促进 NSCLC 的恶性进展, 本研究为进一步探索 miR-1269 在 NSCLC 进展过程中的作用机制提供了实验基础。

[参 考 文 献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 29(7): 685-697. DOI: 10.3322/caac.21492.
- [2] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90. DOI: 10.3322/caac.20107.
- [3] BERGHMANS T, PASLEAU F, PAESMANS M, et al. Surrogate markers predicting overall survival for lung cancer: ELCWP recommendations[J]. *Eur Respir J*, 2012, 39(1): 9-28. DOI: 10.1183/09031936.00190310.
- [4] BARTEL D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. *Cell*, 2009, 136(2): 215-233. DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
- [5] PASQUINELLI A E. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship[J]. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(4): 271-282. DOI: 10.1038/nrg3162.
- [6] ZHANG Y, YANG Q, WANG S. MicroRNAs: a new key in lung cancer[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2014, 74(6): 1105-1111. DOI: 10.1007/s00280-014-2559-9.
- [7] DEL VESCOVO V, CANTALONI C, CUCINO A, et al. miR-205 expression levels in nonsmall cell lung cancer do not always distinguish adenocarcinomas from squamous cell carcinomas[J]. *Am J Surg Pathol*, 2011, 35(2): 268-275. DOI: 10.1097/PAS.0b013e3182068171.
- [8] DEL VESCOVO V, GRASSO M, BARBARESCHI M, et al. MicroRNAs as lung cancer biomarkers[J]. *World J Clin Oncol*, 2014, 5(4): 604-620. DOI: 10.5306/wjco.v5.i4.604.
- [9] SOLOMIDES C C, EVANS B J, NAVENOT J M, et al. MicroRNA profiling in lung cancer reveals new molecular markers for diagnosis[J]. *Acta Cytol*, 2012, 56(6): 645-654. DOI: 10.1159/000343473.
- [10] CHEN G, UMELO I A, LV S, et al. miR-146a inhibits cell growth, cell migration and induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e60317[2018-09-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3608584/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0060317.
- [11] RANADE A R, CHERBA D, SRIDHAR S, et al. MicroRNA 92a-2: a biomarker predictive for chemoresistance and prognostic for survival in patients with small cell lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2010, 5(8): 1273-1278. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3181de6be.
- [12] BU P, WANG L, CHEN K Y, et al. miR-1269 promotes metastasis and forms a positive feedback loop with TGF- β [J/OL]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6879[2018-09-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4399006/>. DOI: 10.1038/ncomms7879.
- [13] GAN T Q, TANG R X, HE R Q, et al. Upregulated miR-1269 in hepatocellular carcinoma and its clinical significance[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(1): 714-721.
- [14] XIONG G, WANG Y, DING Q, et al. Hsa-mir-1269 genetic variant contributes to hepatocellular carcinoma susceptibility through affecting SOX6[J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(10): 2091-2098.
- [15] YANG X W, SHEN G Z, CAO L Q, et al. MicroRNA-1269 promotes proliferation in human hepatocellular carcinoma via down-regulation of FOXO1[J/OL]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 909[2018-09-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4265494/>. DOI: 10.1186/1471-2407-14-909.
- [16] LI C, ZHANG K, CHEN J, et al. MicroRNAs as regulators and mediators of forkhead box transcription factors function in human cancers[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(7): 12433-12450. DOI: 10.18632/oncotarget.14015.
- [17] WONG M S, LAO X Q, HO K F, et al. Incidence and mortality of lung cancer: global trends and association with socioeconomic status[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1430-1436. DOI: 10.1038/s41598-017-14513-7.
- [18] UDDIN A, CHAKRABORTY S. Role of miRNAs in lung cancer [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 9(2): 773-776. DOI: 10.1002/jcp.26607.
- [19] GUTTILLA I K, WHITE B A. Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(35): 23204-23216. DOI: 10.1074/jbc.M109.031427.
- [20] WU Z, SUN H, ZENG W, et al. Upregulation of MicroRNA-370 induces proliferation in human prostate cancer cells by downregulating the transcription factor FOXO1[J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45825[2018-09-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3445500/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0045825.
- [21] KATO H, IGARASHI M, FUKUDA H, et al. Cancer genetics and genomics of human FOX family genes[J]. *Cancer Lett*, 2013, 328(2): 198-206. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.09.017.
- [22] 周欣亮, 吴昊, 李丹, 等. miR-133a-3p 在胃癌组织和血浆中的表达及其对胃癌细胞增殖的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(6): 613-619. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.06.011.
- [23] MA Z, XIN Z, HU W, et al. Forkhead BOX-O proteins: Crucial regulators of cancer EMT[J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 50(1): 21-31. DOI: 10.1016/j.semcancer.2018.02.004.
- [24] DONG T, ZHANG Y, CHEN Y, et al. FOXO1 inhibits the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by reversing ZEB2-induced epithelial-mesenchymal transition[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(1): 1703-1713. DOI: 10.18632/oncotarget.13786.
- [25] SÁNCHEZ-TILLÓ E, LIU Y, DE BARRIOS O, et al. EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(20): 3429-3456. DOI: 10.1007/s00018-012-1122-2.

[收稿日期] 2018-09-05

[修回日期] 2018-10-30

[本文编辑] 王映红