

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.09.004

miR-101 通过靶向 FGF2 抑制非小细胞肺癌的迁移和侵袭

郭雪茹, 张其程, 曹丽敏, 徐克(天津医科大学总医院, 天津市肺癌研究所, 天津市肺癌转移与肿瘤微环境重点实验室, 天津 300052)

[摘要] **目的:** 探究 microRNA-101 (miR-101) 通过靶向成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor 2, FGF2) 抑制非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 细胞迁移和侵袭的分子机制。 **方法:** 采用 qPCR 法检测人正常肺上皮细胞 BEAS-2B 和 NSCLC 细胞系 A549、H661 和 SK-MES-1, 以及转染后 A549 细胞 miR-101 和 FGF2 的表达水平。分别将 miR-NC、miR-101 mimics、miR-IN-NC、miR-101 inhibitor 或 pcDNA-3.1 空质粒、pcDNA-FGF2 转染至 A549 细胞, 运用划痕愈合实验和 Transwell 小室实验, 检测 A549 细胞中过表达 miR-101 和 FGF2 对 NSCLC 细胞迁移和侵袭能力的影响, 采用 Western blotting (WB) 法检测各组 A549 细胞中 FGF2、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、ERK1/2 和 p-ERK1/2 的表达水平。 **结果:** miR-101 在 NSCLC 细胞系中的表达水平明显低于正常肺上皮细胞 (均 $P < 0.05$), 而以 A549 细胞中表达水平为最低。过表达 miR-101 可明显抑制 A549 细胞的迁移 ($P < 0.05$) 和侵袭 ($P < 0.01$), 且使细胞中 E-cadherin 的表达增多 ($P < 0.05$) 而 Vimentin ($P < 0.05$)、N-cadherin ($P < 0.01$) 和 p-ERK1/2 ($P < 0.05$) 的表达水平降低。抑制 miR-101 表达后, 可以显著增强 A549 细胞的迁移和侵袭能力 (均 $P < 0.05$), 引起细胞中 E-cadherin 表达明显降低而 Vimentin、N-cadherin 和 p-ERK1/2 表达水平增高 (均 $P < 0.05$)。采用 WB 法和双荧光素酶报告基因实验验证了 FGF2 是 miR-101 的直接靶基因, 且过表达 FGF2 后显著增强 A549 细胞的迁移和侵袭能力 (均 $P < 0.01$), 以及减少细胞中 E-cadherin 的表达 ($P < 0.01$) 而增加 Vimentin ($P < 0.01$)、N-cadherin ($P < 0.05$) 和 p-ERK1/2 ($P < 0.05$) 表达水平。与单独过表达 FGF2 组相比, 共同过表达 miR-101 和 FGF2 组 A549 细胞迁移和侵袭能力明显减弱 (均 $P < 0.01$), 其 E-cadherin 的表达增多 ($P < 0.01$) 而 Vimentin ($P < 0.01$)、N-cadherin ($P < 0.05$) 和 p-ERK1/2 表达水平下降 ($P < 0.01$)。 **结论:** miR-101 通过调控靶基因 FGF2 抑制 NSCLC A549 细胞的上皮间质转化 (EMT) 过程及 ERK 信号通路, 进而抑制 NSCLC 细胞的迁移和侵袭。

[关键词] miR-101; 非小细胞肺癌; A549 细胞; 迁移; 侵袭; 成纤维细胞生长因子 2; 上皮间质转化; ERK 信号通路
[中图分类号] R734.2; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)09-0984-08

miR-101 inhibits migration and invasion of non-small cell lung cancer by targeting fibroblast growth factor 2

GUO Xueru, ZHANG Qicheng, CAO Limin, XU Ke (Tianjin Key Laboratory of Lung Cancer Metastasis and Tumor Microenvironment, Tianjin Lung Cancer Institute, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the molecular mechanism of microRNA-101 (miR-101) inhibiting the migration and invasion of non-small cell lung cancer (NSCLC) via targeting fibroblast growth factor 2 (FGF2). **Methods:** qPCR was used to detect the expression levels of miR-101 and FGF2 in human normal lung epithelial BEAS-2B cells and NSCLC cell lines (A549, H661 and SK-MES-1) as well as A549 cells after transfection. MiR-NC, miR-101 mimics, miR-IN-NC, miR-101 inhibitor or pcDNA-3.1 empty plasmid, pcDNA-FGF2 were respectively transfected into A549 cells. Wound healing assay and Transwell assay were used to examine the effects of overexpression of miR-101 and FGF2 on the migration and invasion of A549 cells. Western blotting (WB) was used to detect the expression levels of FGF2, E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, ERK1/2 and p-ERK1/2 in A549 cells in each group. **Results:** The expression level of miR-101 in NSCLC cell lines were significantly lower than that in normal lung epithelial cells (all $P < 0.05$), while the expression level in A549 cells was the lowest. Overexpression of miR-101 significantly inhibited the migration ($P < 0.05$) and invasion ($P < 0.01$) of A549 cells, increased the expression level of E-cadherin but decreased the expression level of Vimentin ($P < 0.05$), N-cadherin ($P < 0.01$) and p-ERK1/2 ($P < 0.05$). Inhibition of miR-101 significantly enhanced the invasion and migration of A549 cells

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81372519); 教育部博士点基金资助项目 (No. 20131202110005); 天津市自然科学基金重点资助项目 (No. 18JCZDJC98500)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81372519), the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Educational Institutions of China (No. 20131202110005), and the Key Project of Natural Science Foundation of Tianjin (No. 18JCZDJC98500)

[作者简介] 郭雪茹 (1994-), 女, 硕士生, 主要从事分子肿瘤学相关研究, E-mail: g13002216615@163.com

[通信作者] 徐克 (XU Ke, corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事细胞分子生物学研究, E-mail: ke_xu@hotmail.com

(all $P < 0.05$), decreased the expression level of E-cadherin but increased the expression levels of Vimentin, N-cadherin and p-ERK1/2 (all $P < 0.05$). The results of WB and Dual-luciferase reporter gene assay verified that FGF2 is a direct target gene of miR-101, and over-expression of FGF2 significantly enhanced the invasion and migration of A549 cells (all $P < 0.01$), decreased the expression of E-cadherin ($P < 0.01$) but increased the expressions of Vimentin ($P < 0.01$), N-cadherin ($P < 0.05$) and p-ERK1/2 ($P < 0.01$). Compared with the FGF2 overexpression alone group, co-overexpression of miR-101 and FGF2 significantly reduced the invasion and migration of A549 cells (all $P < 0.01$), increased the expression of E-cadherin ($P < 0.01$), and decreased the expressions of Vimentin ($P < 0.01$), N-cadherin ($P < 0.05$) and p-ERK1/2 ($P < 0.01$). **Conclusion:** By targeting FGF2, miR-101 inhibits the invasion and migration of NSCLC cells through suppressing the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and ERK signaling pathway.

[Key words] miR-101; non-small cell lung cancer (NSCLC); A549 cell; migration; invasion; fibroblasts growth factor 2 (FGF2); epithelial-mesenchymal transition (EMT); ERK signaling pathway

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(9): 984-991. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.09.004]

肺癌是我国发病率和病死率最高的恶性肿瘤^[1], 根据组织学特征, 肺癌分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC), 其中 NSCLC 约占肺癌总数的 80%~85%^[2]。大约有 90% 的肺癌患者死于远端转移, 因此研究其迁移和侵袭的机制显得尤为重要。

微小 RNA-101 (microRNA-101, miR-101) 在多种肿瘤组织中表达下调, 包括胃癌^[3]、乳腺癌^[4]、肝细胞癌^[5]和肺癌^[6]等, 并影响其增殖、迁移侵袭、血管生成及耐药等过程^[5-8]。成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor 2, FGF2) 是 FGF 家族中的一员, 参与肿瘤的血管生成、细胞外基质调节、细胞分化和上皮间质转化 (EMT) 等病理过程^[9-12], 且与迁移侵袭密切相关, 但与 miRNAs 之间的关系知之甚少。本研究旨在探究 miR-101 与 FGF2 之间的关系及其它们对肺癌细胞迁移和侵袭的影响, 为今后肺癌的治疗提供新的思路与生物标志物。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

人肺癌细胞系 A549 和人肾上皮细胞系 293T 均购自美国模式培养物集存库。胎牛血清 (FBS) 和普通 DMEM 培养基均购自美国 Gibco 公司, TRIzol 试剂购自中国 Invitrogen 公司, cDNA 逆转录试剂盒购自北京宝日医生物技术北京有限公司, SYBR™ Select Master Mix 购自美国赛默飞世尔科技公司, miR-101 mimics、miR-101 inhibitor、miR-101 及 U6 引物购自上海吉玛基因, 一抗 GAPDH、 β -actin、FGF2、N-cadherin、Vimentin、ERK 和 p-ERK 购自美国 CST 公司, E-cadherin 购自美国 BD 公司 (均按 1:1 000 稀释使用), 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗兔和羊抗鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司 (均按 1:5 000 稀释使用), ECL 化学发光液购自新赛美生物科技有限公司, Transwell 小室购自美国康宁公司, Lipofectamine™ 2000 购自

Invitrogen 公司, 双荧光报告基因试剂盒购自 Promega 公司。

1.2 细胞培养

将 A549 细胞和 293T 细胞置于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中常规培养。

1.3 质粒构建与细胞转染实验

扩增人 FGF2 基因的 CDS 区并克隆至 pcDNA-3.1 质粒中构建 FGF2 过表达质粒 (pcDNA-FGF2)。将 A549 细胞铺在 6 孔板中 (2×10^5 个/孔), 待细胞生长至 70%~80% 时, 按照 lipofectamine™ 2000 使用说明将 miR-NC、miR-101 mimics、miR-IN-NC、miR-101 inhibitor 或 pcDNA-3.1 空质粒、pcDNA-FGF2 转染至 A549 细胞, 6 h 后换成完全培养基, 然后进行细胞划痕愈合或 Transwell 小室实验等后续细胞实验。实验分为 8 组: miR-NC、miR-101、miR-IN-NC、miR-101-IN、miR-NC+pcDNA-3.1、miR-NC+pcDNA-FGF2、miR-101+pcDNA-3.1 和 miR-101+pcDNA-FGF2 组。

1.4 qPCR 法检测 A549 细胞中 miR-101 和 FGF2 的表达水平

向 6 孔板中加入 1 ml TRIzol 试剂提取各细胞系和各组转染后 A549 细胞的总 RNA, 使用反转录试剂盒按照使用手册逆转录 1 μ g RNA 为 cDNA, 然后使用 Power SYBR Green Master Mix 试剂盒进行扩增。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 15 s; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 34 s, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 A549 细胞转染前后 miR-101 和 FGF2 的相对表达量。PCR 引物序列见表 1。

1.5 划痕愈合实验检测 A549 细胞的迁移能力

将适量转染后各组 A549 细胞铺于 6 孔板中, 调整细胞密度为 2×10^5 个/孔, 当细胞生长至 90% 时用 1 ml 枪头划“井”字型划痕, 用 PBS 将细胞碎片洗净后加入完全培养基, 倒置显微镜 ($\times 40$) 下拍摄 0、24 和 48 h 的划痕愈合情况。通过公式计算细胞迁移率: 细胞迁移率 = (0 h 划痕面积 - 培养后各时间点的划痕面

积)/0 h划痕面积×100%。

表1 PCR引物序列
Tab.1 Primer sequences of PCR

Primer	Sequence(5'-3')
U6	F CGCTTCGGCAGCACATATAC
	R TTCACGAATTTGCGTGTGCATC
hsa-miR-101	F CATCGCACGTACAGTACTGTGATA
	R CTCTGTCTCTCGTCTTGGTTGGTAT
FGF2	F AGAAGAGCGACCCTCACATCA
	R CGGTTAGCACACACTCCTTTG
GAPDH	F TGCACCACCAACTGCTTAGC
	R GGCA TGGACTGTGGTCA TGAG

1.6 Transwell实验检测A549细胞的侵袭能力

取转染后A549细胞,分组同上。用100 μl不含血清的DMEM重悬(细胞密度为4×10⁵个/ml)后加在预铺matrigel基质胶的上室中,下室加入700 μl完全培养基。在5% CO₂、37 °C的培养箱中培养48或72 h后取出,用PBS将上室细胞和培养基洗净,用0.1%结晶紫染色15 min后,用棉签轻轻擦拭除去未侵袭的细胞。自然晾干后,在100倍倒置显微镜下随机计数5个视野的细胞,计算平均值为每组侵袭的细胞数。

1.7 Western blotting(WB)法检测A549细胞中EMT相关蛋白、ERK通路相关蛋白及FGF2蛋白的表达水平

在冰上用含有1%蛋白酶抑制剂的RIPA蛋白裂解液裂解各组细胞15 min,期间5 min拍打一次,使裂解充分。进行SDS-PAGE,转硝酸纤维素膜,用5%脱脂蛋白封闭1 h后,加入相应一抗:E-cadherin(1:1 000)、N-cadherin(1:1 000)、Vimentin(1:1 000)、ERK(1:1 000)、p-ERK(1:1 000)和FGF2(1:1 000),并4 °C孵育过夜,TBST洗涤3次,每次5 min后,加入对应的二抗(1:5 000)室温孵育1 h。TBST洗涤3次后曝光处理。使用Image J软件分析蛋白条带的灰度值,以β-actin或GAPDH为内参,计算各目的蛋白相对表达量。

1.8 双荧光素酶报告基因检测miR-101和FGF2之间的靶向关系

扩增人FGF2的3'非翻译区(3'UTR)片段,并将其克隆到pGL3-control荧光素酶载体中构建野生型报告质粒(WT)。通过点突变获得突变型3'UTR片段并插入pGL3-control载体中构建突变型报告质粒(MT)。293T细胞以2×10⁵个/孔的细胞密度接种于12孔板,待细胞生长至70%~80%时,100 nmol/L miR-NC或miR-101 mimics和400 ng野生型(WT)或突变型(MT)FGF2 3'UTR质粒用lipofectamine™ 2000转染至293T细胞中,且40 ng pRL-SV40作为内参。转染24 h后,应用双荧光素酶报告基因系统进

行检测。

1.9 统计学处理

上述实验均重复3次,采用SPSS 21.0软件进行统计学分析。正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用t检验,多组均数间比较先行方差齐性检验后再行单因素方差分析,以P<0.05或P<0.01表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-101在NSCLC细胞系中低表达

qPCR检测结果(图1)显示,与人正常肺上皮细胞BEAS-2B比较,miR-101在NSCLC细胞系A549、H661、SK-MES-1中均呈现低水平表达(P<0.05)。本研究选取表达水平最低的A549细胞系开展后续研究。

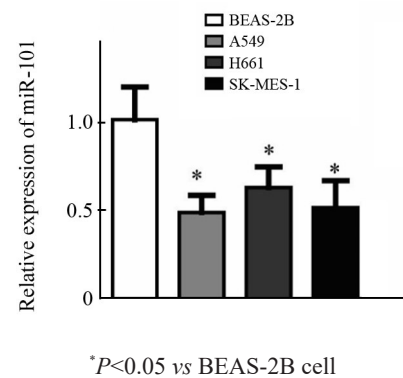


图1 miR-101在NSCLC细胞系中的表达水平

Fig.1 The expression level of miR-101 in NSCLC cell lines

2.2 A549细胞转染前后miR-101、FGF2表达量的变化

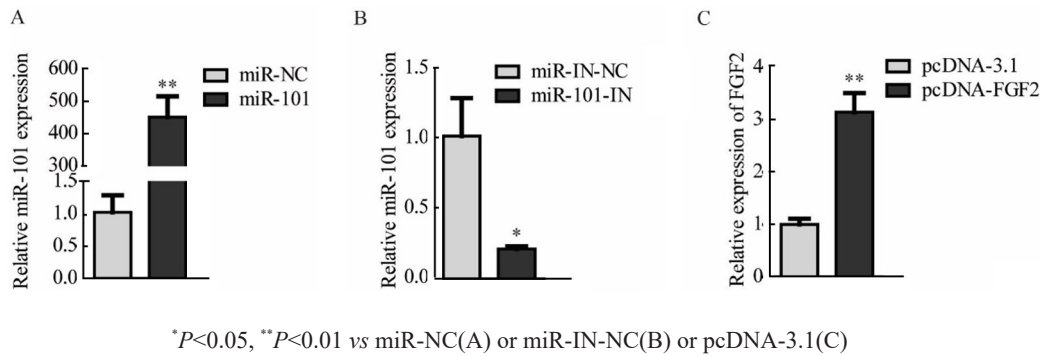
qPCR法检测结果显示,与miR-NC组相比,过表达miR-101后(图2A),A549细胞中的miR-101表达量显著增高(451.25±64.33 vs 1.03±0.26, P<0.01),而转染miR-101 inhibitor后(图2B),其表达量则显著降低(0.22±0.02 vs 1.02±0.27, P<0.05)。与对照组相比,转染过表达FGF2质粒后(图2C),FGF2的表达量显著增高(3.15±0.362 vs 1.00±0.11, P<0.01)。

2.3 miR-101抑制A549细胞的迁移和侵袭

通过转染miR-101 mimics或inhibitor过表达或抑制A549细胞中的miR-101,然后采用划痕愈合实验和transwell小室实验对A549的迁移和侵袭能力进行评价。划痕愈合实验结果显示,过表达miR-101后,A549的迁移率明显下降(P<0.05)(图3A、B),而抑制miR-101后,A549的迁移率明显增加(P<0.05)(图3C、D)。Transwell小室实验结果显示,过表达miR-101后,A549细胞的侵袭数量减少为对照组的0.484倍(P<0.01)(图3E、F),而抑制miR-101的表达

后, A549细胞的侵袭数量增多至对照组的1.61倍 ($P<0.05$) (图3G,H)。上述结果表明, NSCLC细胞中

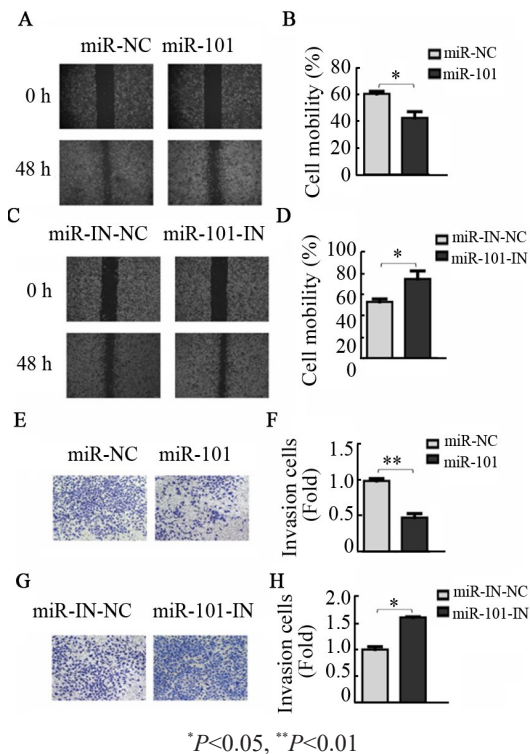
的miR-101对其迁移与侵袭有显著的抑制作用。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs miR-NC(A) or miR-IN-NC(B) or pcDNA-3.1(C)
A, B: The expression level of miR-101 in A549 cells was measured by qPCR; C: The expression level of FGF2 in A549 cells was measured by qPCR

图2 A549细胞中转染miR-101、FGF2的效率检测

Fig.2 Detection of transfection efficiency of miR-101 and FGF2 in A549 cells



* $P<0.05$, ** $P<0.01$
A-D: Migration of A549 cells was measured by Wound healing assays ($\times 40$); E-H: Invasion of A549 cells was detected by Transwell assays ($\times 100$)

图3 miR-101抑制A549细胞的迁移和侵袭
Fig.3 miR-101 inhibited the migration and invasion of A549 cells

2.4 miR-101显著影响EMT及ERK信号通路相关蛋白的表达

WB法检测结果显示, 与miR-NC组相比, 过表达miR-101组的E-cadherin表达上调($P<0.05$), 而Vimentin($P<0.05$)和N-cadherin($P<0.01$)表达下调

(图4A); 抑制miR-101组的E-cadherin表达下调, 而Vimentin和N-cadherin表达上调(均 $P<0.05$) (图4B)。同时p-ERK的表达水平也发生相同趋势的变化, 过表达miR-101组的p-ERK的水平减少($P<0.05$) (图4C), 而抑制miR-101组的p-ERK的水平增多($P<0.05$) (图4D)。以上结果说明, miR-101可抑制A549细胞EMT和ERK信号通路。

2.5 FGF2是miR-101的直接靶基因

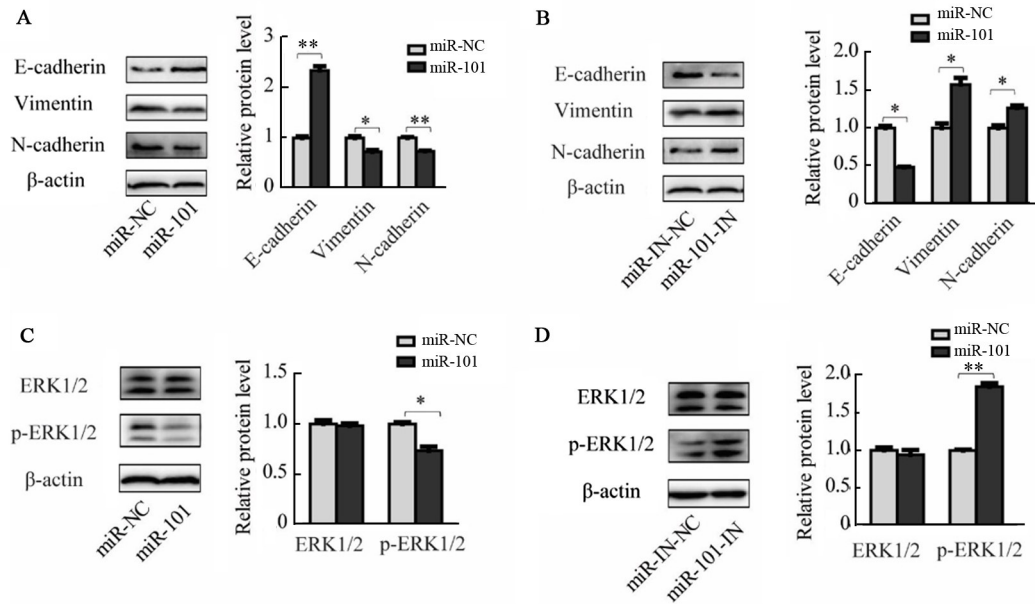
首先通过TargetScan网站预测分析FGF2是miR-101的直接靶基因, 结合位置见图5A。然后采用qPCR法检测结果(图5B)显示, FGF2在NSCLC细胞系A549、H661和SK-MES-1中转录水平高于BEAS-2B ($P<0.05$, $P<0.01$); 进一步对NSCLC中miR-101对FGF2的调控作用进行分析, WB和qPCR法检测结果(图5C、D)显示, A549中过表达miR-101后, FGF2的转录和翻译水平均明显下调, 其中转录水平较对照组下降了66.4% ($P<0.01$)。双荧光素酶基因报告检测结果(图5E)显示, FGF2的野生型报告质粒的荧光素酶活性被miR-101显著抑制了对照组的61.9% ($P<0.01$), 而突变型变化差异则无统计学意义 ($P>0.05$)。综合以上实验结果表明, FGF2是miR-101在A549细胞中的直接靶基因。

2.6 miR-101通过FGF2抑制NSCLC细胞的迁移和侵袭

为验证miR-101是否通过FGF2影响NSCLC细胞的侵袭迁移, 采用划痕愈合和transwell小室实验检测A549细胞单独转染pcDNA-FGF2过表达质粒或与miR-101 mimics共转染后的迁移与侵袭能力变化。结果(图6A)显示, 单独转染pcDNA-FGF2使A549细胞中的FGF2表达水平显著升高($P<0.01$), 仅

过表达 miR-101 使 FGF2 蛋白减少 ($P<0.05$), 而同时共过表达 miR-101 和 pcDNA-FGF2 使 FGF2 蛋白表达水平显著低于仅转染 pcDNA-FGF2 组 ($P<0.01$)。划痕实验结果(图 6B)显示, 过表达 FGF2 后, A549 细胞的迁移率明显增加 ($P<0.01$), 仅过表达 miR-101 组的 A549 细胞迁移率明显下降 ($P<0.01$), 而共转染组 A549 的迁移率显著低于仅转染 FGF2 组 ($P<0.01$)。

Transwell 小室实验(图 6C)结果与划痕结果趋势相同, 即仅过表达 FGF2 的可显著增强 A549 细胞的侵袭能力 ($P<0.01$), 仅过表达 miR-101 显著抑制 A549 细胞的侵袭能力 ($P<0.01$), 而共过表达组的侵袭能力低于单独过表达 FGF2 组 ($P<0.01$)。上述结果表明, FGF2 促进 A549 细胞的侵袭迁移, miR-101 通过减少 FGF2 的表达抑制侵袭迁移。

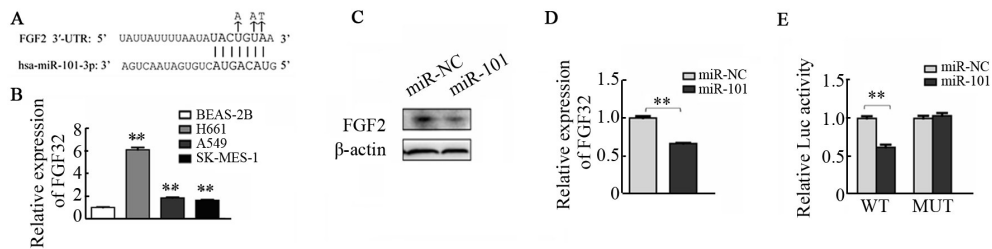


* $P<0.05$, ** $P<0.01$

A and B: The expressions of E-cadherin, Vimentin and N-cadherin of A549 cells were detected by WB assay; C and D: The expressions of ERK1/2 and p-ERK1/2 of A549 cells were measured by WB assay

图4 miR-101 影响 A549 细胞 EMT 和 ERK 信号通路相关蛋白的表达

Fig.4 miR-101 affected the expression EMT and ERK pathway related proteins in A549 cells



* $P<0.05$, ** $P<0.01$

A: The binding site between FGF2 3'UTR and miR-101 was predicted by TargetScan; B: The expression of FGF2 in BEAS-2B, H661, A549 and SK-MES-1 cells was detected by qPCR; C: The expression of FGF2 in A549 cells was detected by WB assay; D: The mRNA expression of FGF2 was measured by qPCR; E: The luciferase activity was detected by Dual-luciferase reporter gene assay

图5 FGF2 是 miR-101 的直接靶基因

Fig.5 FGF2 is the direct target gene of miR-101

WB 法检测结果(图 6D)显示, 只过表达 FGF2 组, A549 细胞中的 E-cadherin 的表达显著减少, 为对照组的 0.764 倍 ($P<0.01$), 而 Vimentin 和 N-cadherin 的表达显著增多, 是对照组 1.18 倍和 1.22 倍 (均 $P<0.01$);

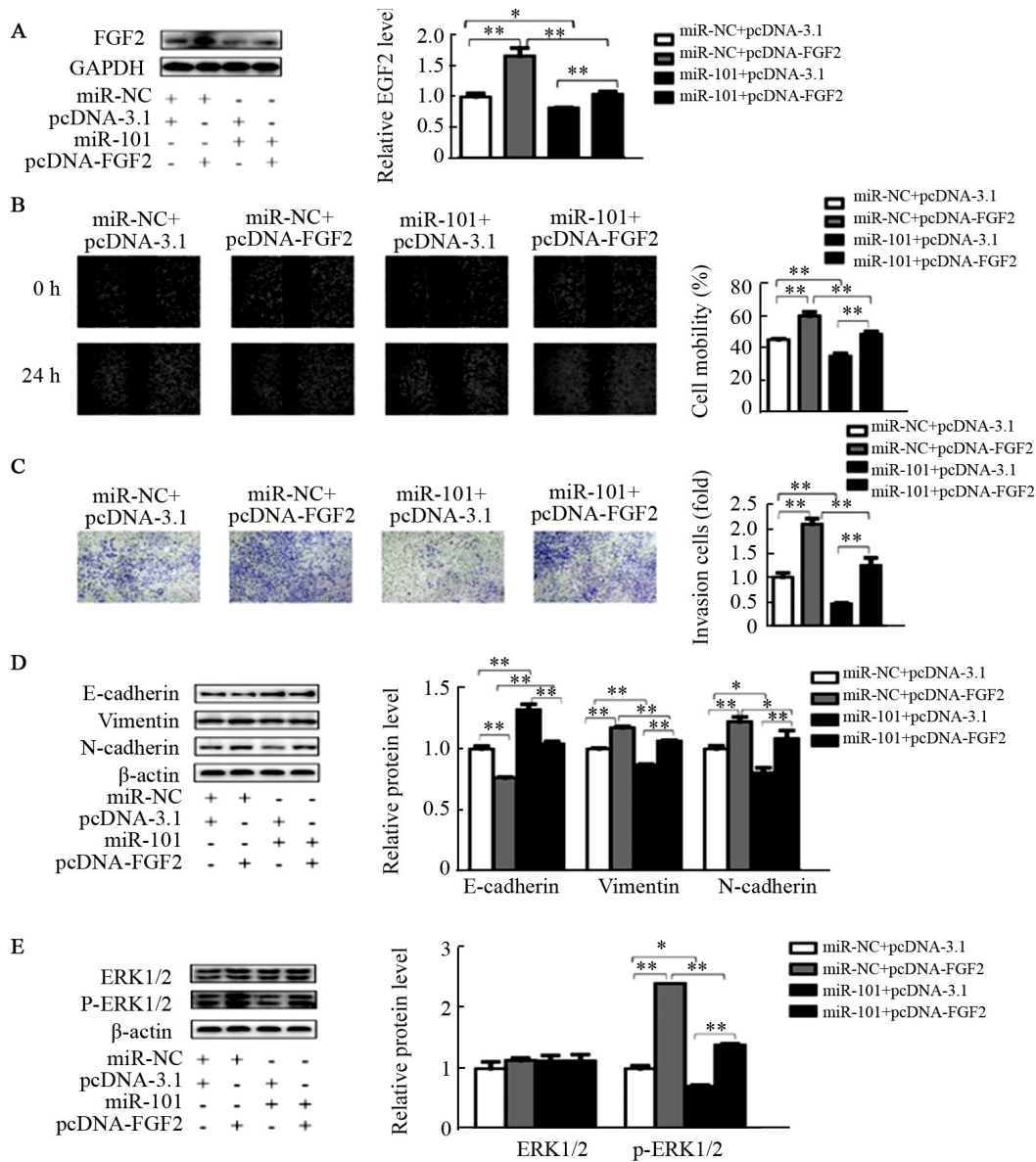
只过表达 miR-101 组 A549 细胞的 E-cadherin 表达量显著升高, 是对照组的 1.32 倍 ($P<0.01$), 而 Vimentin 和 N-cadherin 表达量明显降低, 分别是对照组的 87% ($P<0.01$) 和 84% (均 $P<0.05$); 共过表达 miR-101

和 FGF2 后, E-cadherin 表达量多于单独过表达 FGF2 组 ($P<0.01$), Vimentin ($P<0.01$) 和 N-cadherin ($P<0.05$) 低于单独过表达 FGF2 组。以上结果表明, FGF2 促进 A549 细胞发生 EMT, miR-101 可通过减少 FGF2 的表达抑制 A549 细胞发生 EMT。

本实验还研究了 FGF2 对 NSCLC 细胞 ERK 信号通路的影响。WB 法检测结果(图 6E)显示, 只过表达 FGF2 的 A549 细胞中 p-ERK1/2 水平升高 ($P<0.01$), 只转染 miR-101 的 A549 细胞中 p-ERK1/2 水平减少

($P<0.01$), 共过表达 miR-101 和 FGF2 组的 p-ERK1/2 水平少于仅转染 FGF2 组 ($P<0.01$), 多于仅转染 miR-101 组 ($P<0.01$), 而 ERK1/2 水平的变化则无统计学意义 ($P>0.05$)。以上结果表明过表达 FGF2 可激活 ERK 信号通路, miR-101 可通过下调 FGF2 抑制 ERK 信号通路的激活。

综上所述表明, A549 细胞中的 miR-101 可通过下调其靶基因 FGF2 而抑制 EMT 和 ERK 信号通路, 导致减弱 A549 细胞的迁移和侵袭的能力。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$

A: The expression of FGF2 in A549 cells was detected by WB assay; B: Migration of A549 cells was measured by Wound healing assays ($\times 40$); C: Invasion of A549 cells was detected by Transwell assays ($\times 100$); D: The expression levels of E-cadherin, Vimentin, N-cadherin were detected by WB assay; E: The expression levels of ERK1/2 and p-ERK1/2 were detected by WB assay.

图 6 miR-101 通过下调 FGF2 的表达抑制 EMT 和 ERK 通路从而抑制 A549 细胞的迁移和侵袭

Fig.6 miR-101 inhibited the migration and invasion of A549 cells by down-regulating the expression of FGF2 and inhibiting the EMT and ERK pathway

3 讨论

近年来,针对 miRNAs 的研究越来越多,大量研究显示 miRNAs 在很多肿瘤中表达失调^[13-14],miRNAs 在调控肿瘤发生发展中的作用及其分子机制已成为一大研究热点。MiR-101 在多种肿瘤中表达下调,且参与调节肿瘤细胞的增殖、侵袭与化疗耐药等过程。ZHANG 等^[15]发现 miR-101 在子宫内腺癌中表达下调,通过调控 PI3K/Akt/mTOR 增强肿瘤细胞的增殖和侵袭迁移,并抑制肿瘤细胞的凋亡;LIU 等^[16]发现 miR-101-3p 在肝细胞癌中表达下调,使肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)表达水平上调,从而增强肿瘤细胞的增殖和迁移;BAO 等^[17]发现 miR-101 在胃癌组织和耐药胃癌细胞中表达下调,过表达 miR-101 后,膜连蛋白 A2(annexin A2, ANXA2)减少,并增强胃癌细胞对顺铂(cisplatin, DDP)和长春新碱(vincristine, VCR)的敏感性;也有研究^[18-20]发现,miR-101 在肺癌细胞中表达下调,且与肿瘤细胞的增殖活力、侵袭迁移和有丝分裂等有关。以上研究证明,miR-101 具有肿瘤抑制作用。总之,miR-101 在 NSCLC 细胞系 A549、H661 和 SK-MES-1 中的表达水平比正常的肺上皮细胞 BEAS-2B 低,且过表达 miR-101 可以抑制 A549 细胞的 EMT 和侵袭迁移。

大量研究证明,FGF2 参与肿瘤发生发展的多个方面,包括增强肿瘤细胞的增殖和化疗耐药能力^[21-22]、调控肿瘤细胞的自噬^[23]、EMT 和侵袭迁移^[24-25]、调节肿瘤微环境、促进血管形成^[26]、调控肿瘤干细胞的形成^[27]等。已发现多种 miRNAs 可以调节 FGF2 的表达并抑制肿瘤细胞的增殖或侵袭转移。SUN 等^[25]发现,miR-646 可通过下调 FGF2 的表达抑制骨肉瘤细胞的增殖和侵袭迁移;XU 等^[28]发现在鼻咽癌细胞中过表达 miR-29 可减少 FGF2 的表达,进而抑制 PI3K/Akt 信号通路,诱导肿瘤细胞凋亡和自噬,进而抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭迁移;LI 等^[29]发现在上皮性卵巢癌中,miR-936 在体内体外都可以通过抑制 FGF2 的表达调控 PI3K/Akt 信号通路,进而抑制肿瘤细胞的侵袭和转移。本研究预测并验证了 FGF2 是 miR-101 的靶基因,且在 NSCLC 细胞中,FGF2 表达水平明显高于正常肺上皮细胞,过表达 FGF2 可激活 A549 细胞中的 ERK 信号通路、促进 EMT 及侵袭迁移;研究还进一步证明了 miR-101 可以通过下调 FGF2 的表达进而抑制 A549 细胞中 ERK 通路的激活、减弱 EMT 迁移和侵袭能力。

综上所述,miR-101 在 NSCLC 细胞系中表达下调。过表达 miR-101 可抑制其靶基因 FGF2 的表达,抑制 NSCLC 细胞的 EMT 及 ERK 信号通路,进而减

弱 NSCLC 细胞的侵袭迁移能力。本项研究为以 miR-101 为靶标的 NSCLC 的靶向治疗提供了新的思路和实验依据。

[参考文献]

- [1] 郑荣寿,孙可欣,张思维,等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(1): 19-28. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2019.01.005.
- [2] OSMANI L, ASKIN F, GABRIELSON E, et al. Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy[J/OL]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 52(Pt1): 103-109[2020-05-5]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29183778>. DOI:10.1016/j.semcancer.2017.11.019.
- [3] CARVALHO J, VAN GRIEKEN N C, PEREIRA P M, et al. Lack of microRNA-101 causes E-cadherin functional deregulation through EZH2 up-regulation in intestinal gastric cancer[J]. *J Pathol*, 2012, 228(1):31-44. DOI:10.1002/path.4032.
- [4] LI J T, JIA L T, LIU N N, et al. MiRNA-101 inhibits breast cancer growth and metastasis by targeting CX chemokine receptor 7[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(31): 30818-30830. DOI: 10.18632/oncotarget.5067.
- [5] CAO K, LI J, ZHAO Y, et al. miR-101 Inhibiting cell proliferation, migration and invasion in hepatocellular carcinoma through down-regulating girdin[J]. *Mol Cells*, 2016,39(2):96-102. DOI:10.14348/molcells.2016.2161.
- [6] TANG X R, WEN X, HE Q M, et al. MicroRNA-101 inhibits invasion and angiogenesis through targeting ITGA3 and its systemic delivery inhibits lung metastasis in nasopharyngeal carcinoma[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(1): e2566[2020-05-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28102841>. DOI: 10.1038/cddis.2016.486.
- [7] CHEN L, LONG Y, HAN Z, et al. MicroRNA-101 inhibits cell migration and invasion in bladder cancer via targeting FZD4[J]. *Exp Ther Med*, 2019,17(2):1476-1485. DOI:10.3892/etm.2018.7084.
- [8] YE Z, YIN S, SU Z, et al. Downregulation of miR-101 contributes to epithelial-mesenchymal transition in cisplatin resistance of NSCLC cells by targeting ROCK2[J]. *Oncotarget*, 2016,7(25):37524-37535. DOI:10.18632/oncotarget.6852.
- [9] MOFFETT J, KRATZ E, FLORKIEWICZ R, et al. Promoter regions involved in density-dependent regulation of basic fibroblast growth factor gene expression in human astrocytic cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996,93(6):2470-2475. DOI:10.1073/pnas.93.6.2470.
- [10] CHEN X, ZHAO H, CHEN C, et al. The HPA/SDC1 axis promotes invasion and metastasis of pancreatic cancer cells by activating EMT via FGF2 upregulation[J]. *Oncology Letters*, 2019, DOI: 10.3892/ol.2019.11121.
- [11] COLEMAN S J, CHIONI A M, GHALLAB M, et al. Nuclear translocation of FGFR1 and FGF2 in pancreatic stellate cells facilitates pancreatic cancer cell invasion[J]. *EMBO Mol Med*, 2014,6(4):467-481. DOI:10.1002/emmm.201302698.
- [12] REN T, QING Y, DAI N, et al. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 induced upregulation of fibroblast growth factor 2 and its receptor 3 induces angiogenesis in human osteosarcoma cells[J/OL]. *Cancer Sci*, 2014, 105(2): 186-194[2020-05-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24111121>.

- gov/pubmed/24329908. DOI:10.1111/cas.12334.
- [13] RUPAIMOOLE R, CALIN G A, LOPEZ-BERESTEIN G, et al. miRNA deregulation in cancer cells and the tumor microenvironment[J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(3): 235-246. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-0893.
- [14] 郭雪茹, 徐克. MicroRNAs 在肿瘤相关成纤维细胞促进肿瘤发展进程中的作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(11): 1181-1188. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.11.001.
- [15] ZHANG S, WANG M, LI Q, et al. MiR-101 reduces cell proliferation and invasion and enhances apoptosis in endometrial cancer via regulating PI3K/Akt/mTOR[J/OL]. *Cancer Biomark*, 2017, 21(1): 179-186[2020-05-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29081412>. DOI:10.3233/CBM-170620.
- [16] LIU Y, TAN J, OU S, et al. MicroRNA-101-3p suppresses proliferation and migration in hepatocellular carcinoma by targeting the HGF/c-Met pathway[J/OL]. *Invest New Drugs*, 2019, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30929159>. DOI: 10.1007/s10637-019-00766-8.
- [17] BAO J, XU Y, WANG Q, et al. miR-101 alleviates chemoresistance of gastric cancer cells by targeting ANXA2[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 92: 1030-1037[2020-05-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28609840>. DOI:10.1016/j.biopha.2017.06.011.
- [18] CHEN Q, LIU D, HU Z, et al. miRNA-101-5p inhibits the growth and aggressiveness of NSCLC cells through targeting CXCL6[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12:835-848. DOI:10.2147/OTT.S184235.
- [19] ZHANG X, HE X, LIU Y, et al. MiR-101-3p inhibits the growth and metastasis of non-small cell lung cancer through blocking PI3K/AKT signal pathway by targeting MALAT-1[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93: 1065-1073[2020-05-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28738500>. DOI:10.1016/j.biopha.2017.07.005.
- [20] HOU Y, LI L, JU Y, et al. MiR-101-3p Regulates the viability of lung squamous carcinoma cells via targeting EZH2[J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(10): 3142-3149. DOI:10.1002/jcb.25836.
- [21] LI S, PAYNE S, WANG F, et al. Nuclear basic fibroblast growth factor regulates triple-negative breast cancer chemo-resistance[J/OL]. *Breast Cancer Res*, 2015, 17: 91[2020-05-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26141457>. DOI:10.1186/s13058-015-0590-3.
- [22] HE L, MENG Y, ZHANG Z, et al. Downregulation of basic fibroblast growth factor increases cisplatin sensitivity in A549 non-small cell lung cancer cells[J]. *J Cancer Res Ther*, 2018, 14(7): 1519-1524. DOI:10.4103/jert.JCRT_481_18.
- [23] YUAN H, LI Z M, SHAO J, et al. FGF2/FGFR1 regulates autophagy in FGFR1-amplified non-small cell lung cancer cells[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 72[2020-05-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28558758>. DOI:10.1186/s13046-017-0534-0.
- [24] SCHELCH K, WAGNER C, HAGER S, et al. FGF2 and EGF induce epithelial-mesenchymal transition in malignant pleural mesothelioma cells via a MAPKinase/MMP1 signal[J]. *Carcinogenesis*, 2018, 39(4): 534-545. DOI:10.1093/carcin/bgy018.
- [25] SUN X H, GENG X L, ZHANG J, et al. miRNA-646 suppresses osteosarcoma cell metastasis by downregulating fibroblast growth factor 2 (FGF2) [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(3): 2127-2134. DOI: 10.1007/s13277-014-2822-z.
- [26] LORUSSO G, RUEGG C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis[J]. *Histochem Cell Biol*, 2008, 130(6): 1091-1103. DOI:10.1007/s00418-008-0530-8.
- [27] MAEHARA O, SUDA G, NATSUIZAKA M, et al. Fibroblast growth factor-2-mediated FGFR/Erk signaling supports maintenance of cancer stem-like cells in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Carcinogenesis*, 2017, 38(11): 1073-1083. DOI: 10.1093/carcin/bgx095.
- [28] XU M, TIAN G L, HAO C C, et al. MicroRNA-29 targets FGF2 and inhibits the proliferation, migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells via PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(12): 5215-5222. DOI: 10.26355/eur-rev_201906_18186.
- [29] LI C, YU S, WU S, et al. MicroRNA-936 targets FGF2 to inhibit epithelial ovarian cancer aggressiveness by deactivating the PI3K/Akt pathway[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 5311-5322. DOI: 10.2147/OTT.S213231.

[收稿日期] 2020-06-10

[修回日期] 2020-08-30

[本文编辑] 阮芳铭