

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.06.005

· 基础研究 ·

miR-323a-3p 通过靶向结合 TM4SF1 而调控 NSCLC A549 细胞的增殖、迁移和侵袭

金曼, 王彤辉, 任小飞, 李森(青海省第五人民医院 肿瘤内科, 青海 西宁 810000)

[摘要] **目的:** 探究 miR-323a-3p、四次穿膜蛋白超家族成员 1(TM4SF1) 在 NSCLC 组织和细胞中的表达及两者间的靶向调控关系, 观察两者表达对 A549 细胞增殖、迁移、侵袭和裸鼠移植瘤生长的影响。 **方法:** 收集 2014 年 1 月至 12 月间青海省人民医院手术切除的 20 例 NSCLC 组织及其相应的癌旁组织, qPCR 和 WB 法检测癌组织中 miR-323a-3p、TM4SF1 mRNA 和 TM4SF1 蛋白的表达。向 A549 细胞转染 miR-323a-3p mimic, 采用 MTT 法、Transwell 法、WB 法检测 miR-323a-3p 过表达对细胞的增殖、迁移和侵袭以及 TM4SF1、细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)、p21、MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响。采用生物信息学预测工具 StarBase 和双荧光素酶报告基因实验分析 miR-323a-3p 与 TM4SF1 靶向关系。将 si-TM4SF1 转染至 A549 细胞, 以及分别将 miR-323a-3p mimic 与 pcDNA 或 pcDNA-TM4SF1 共转染 A549 细胞, 评估细胞增殖、迁移和侵袭能力的变化; 同时建立各组细胞的 BALB/c 裸鼠移植瘤模型, 在 14、21 和 28 d 时测量并计算移植瘤体积。 **结果:** 与癌旁组织相比, NSCLC 组织中 miR-323a-3p 表达水平明显下调, TM4SF1 mRNA 和蛋白表达水平显著上调(均 $P < 0.01$)。miR-323a-3p 过表达或抑制 TM4SF1 表达都会降低 A549 细胞的增殖、迁移、侵袭能力及 cyclin D1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达而促进 p21 蛋白表达, 并且抑制 A549 细胞裸鼠移植瘤的生长(均 $P < 0.01$)。生物信息学 StarBase 工具预测和双荧光素酶基因报告实验结果显示 miR-323a-3p 能够靶向结合 TM4SF1 基因并调控 TM4SF1 的表达。上调 TM4SF1 表达后, miR-323a-3p 过表达对 A549 细胞恶性生物学行为及 cyclin D1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达、移植瘤生长的抑制作用均被部分逆转(均 $P < 0.01$), 对 p21 蛋白表达的促进作用也被逆转($P < 0.01$)。 **结论:** miR-323a-3p 通过靶向下调肺癌 A549 细胞中 TM4SF1 的表达抑制细胞的增殖、迁移、侵袭和裸鼠移植瘤生长。

[关键词] 非小细胞肺癌; A549 细胞; miR-323a-3p; 四次穿膜蛋白超家族成员 1; 增殖; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R734.2; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)06-0541-08

miR-323a-3p regulates the proliferation, migration and invasion of NSCLC A549 cells through targeting TM4SF1

JIN Man, WANG Tonghui, REN Xiaofei, LI Miao (Department of Oncology, the Fifth People's Hospital of Qinghai Province, Xining 810000, Qinghai, China)

[Abstract] Objective: To explore the expression of miR-323a-3p and transmembrane 4 super family member 1 (TM4SF1) in lung cancer tissues and cells, and the target regulatory relationship between them, and to observe their effects on the proliferation, migration and invasion of lung cancer A549 cells, as well as their effects on the growth of A549 cell transplanted tumors in nude mice. **Methods:** Twenty pairs of lung cancer tissues and their corresponding paracancerous tissues were collected from January 2014 to December 2014 in Qinghai Provincial People's Hospital. The expressions of miR-323a-3p, mRNA and TM4SF1 expression of TM4SF1 in lung cancer tissues were detected by qPCR and WB methods. A549 cells were transfected with miR-323a-3p mimic, and the effects of miR-323a-3p overexpression on cell proliferation, migration and invasion as well as protein expression of TM4SF1, cyclin D1, p21, MMP-2 and MMP-9 were detected by MTT method, Transwell method and WB method, respectively. The targeting relationship between miR-323a-3p and TM4SF1 was analyzed using the bioinformatics prediction tool StarBase and dual-luciferase reporter gene experiments. A549 cells were transfected with si-TM4SF1, miR-323a-3p+pcDNA or miR-323a-3p+pcDNA-TM4SF1, respectively, and the changes in proliferation, migration and invasion of A549 cells were evaluated. In the meanwhile, xenograft model was established in BALB/c nude mice by transplanting A549 cells with various treatment, and the xenograft volume was measured and calculated on day 14, 21 and 28. **Results:** Compared with paracancerous tissues, the expression levels of miR-323a-3p in lung cancer tissues were significantly down-regulated, while the mRNA and protein levels of TM4SF1 were significantly up-regulated (all $P < 0.01$). Overexpression of miR-323a-3p or inhibition of TM4SF1 expression reduced the proliferation, migration, and invasion of A549 cells, as well as the expression of cyclin

[基金项目] 青海省科技计划项目资助(No. 2017-ZJ-707)

[作者简介] 金曼(1988—), 女, 主治医师, 主要从事肿瘤相关的基础研究, E-mail: nyprq9@163.com

[通信作者] 李森, E-mail: 1034484899@qq.com

D1, MMP-2, and MMP-9 proteins, but promoted the expression of p21 protein (all $P < 0.01$). StarBase prediction and dual-luciferase gene reporter experiment showed that miR-323a-3p could complementarily bind with TM4SF1 and regulate its expression. After up-regulation of TM4SF1 expression, the inhibitory effects of miR-323a-3p overexpression on malignant biological behaviors of A549 cells and protein expression of cyclin D1, MMP-2 and MMP-9, as well as tumor growth in nude mice were reversed (all $P < 0.01$); moreover, the promotive effect of miR-323a-3p overexpression on the protein expression of p21 was also reversed ($P < 0.01$). **Conclusion:** miR-323a-3p inhibits proliferation, migration and invasion of A549 cells and suppresses xenograft growth in nude mice by downregulating TM4SF1 expression.

[Key words] non-small cell lung cancer (NSCLC); A549 cell; miR-323a-3p; transmembrane 4 super family member 1 (TM4SF1); proliferation; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(7): 541-548. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.06.005]

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,是全世界癌症相关死亡的主要癌种之一^[1-2]。对于早期患者来说,最有效的治疗方法是手术切除,但是手术后的复发率很高,晚期肺癌患者的生存期较短^[3]。NSCLC是最常见的肺癌形式,约占所有病例的80%~85%^[4]。研究^[5]表明,miRNA在肺癌的进程中具有至关重要的作用,可能成为肿瘤的生物标志物或治疗靶点。资料^[6]显示,miR-323a-3p在骨肉瘤组织和细胞中被下调,miR-323a-3p具有诱导骨肉瘤细胞凋亡和抗增殖的作用。miR-323a-3p在膀胱癌组织和细胞中表达下调,过表达miR-323a-3p抑制膀胱癌细胞的迁移和侵袭^[7]。然而miR-323a-3p在NSCLC发展进程中的功能和机制尚未阐明。本研究采用生物信息学方法预测到四次穿膜蛋白超家族成员1(transmembrane 4 super family number 1, TM4SF1)是miR-323a-3p的潜在靶标之一, TM4SF1被报道在NSCLC组织和细胞中表达上调,可促进NSCLC细胞的增殖、迁移和侵袭,抑制细胞凋亡^[8]。基于此,本研究的目的是阐明miR-323a-3p在NSCLC组织中的表达水平及其与A549细胞增殖、迁移、侵袭的关系及潜在的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

NSCLC细胞A549购自美国ATCC公司,54只清洁级雌性BALB/c裸鼠购自北京华阜康公司[许可证号:SCXK(京)2019-0008],DMEM培养基购自美国Gibco公司,miR-323a-3p mimic/inhibitor及各自阴性对照miR-NC、anti-miR-NC和TM4SF1小干扰RNA(si-TM4SF1)、小干扰RNA阴性对照(si-NC)、TM4SF1过表达质粒(pcDNA-TM4SF1)、过表达阴性对照质粒pcDNA均购自广州RiboBio公司,GAPDH兔单克隆抗体购自Beyotime生物技术研究,细胞周期蛋白D1(cyclin D1)兔单克隆抗体、p21兔单克隆抗体、MMP-2兔单克隆抗体、MMP-9兔单克隆抗体均购自美国Abcam公司, TM4SF1兔多克隆抗体、辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔二抗均购自美国

Santa Cruz公司, MTT购自Sigma-Aldrich公司, TaqMan PCR检测试剂盒购自北京天根生化公司, Lipofectamine™ 2000试剂购自美国Invitrogen公司。

本研究在2014年1月至2014年12月之间,共纳入于青海省第五人民医院就诊的20例NSCLC患者,手术过程中收集癌组织和匹配的癌旁组织标本(距离肿瘤边缘大于3 cm),均由病理学专家确认后保存在-80℃冰箱中。研究设计与程序得到本医院伦理委员会的批准(审批编号:201311-20),获取患者的知情同意并签署知情同意书。组织标本用于qPCR和WB法检测。

1.2 qPCR检测NSCLC组织与细胞中miR-323a-3p和TM4SF1 mRNA的表达

使用TRIzol试剂提取总RNA,包括NSCLC组织、癌旁组织和细胞A549,通过NanoDrop 2000分光光度计测量RNA浓度。然后按照制造商设定的规程,使用反转录试剂盒进行反转录、TaqMan PCR检测试剂盒进行PCR。将U48和GAPDH用作内源对照,以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法分析miR-323a-3p和TM4SF1 mRNA的表达水平。U48正向引物为5'-TGACCCCAGTAACTCTGAGTGTGT-3',反向引物为5'-AAC TCAAGTTCTTCCAGTCACG-3'; GAPDH正向引物为5'-GGAGTCAACGGATTGTTGGT-3',反向引物为5'-GTGATGGGATTTCCATTGAT-3'; miR-323a-3p正向引物为5'-CACATTACACGGTTCGACCT-3',反向引物为5'-AACTCAAGGTTCTTCCAGTCACG-3'; TM4SF1正向引物为5'-GGTTCTTTTCTGGCATCGTAGGAGGTG-3',反向引物为5'-CTGGCCGAGGGAATCAAGACATAGTG-3'。

1.3 细胞培养与转染分组

A549细胞用DMEM培养基于37℃、5% CO₂的培养箱内培养。A549细胞转染时,以 1×10^5 个/孔的密度接种于6孔板,将细胞分为miR-NC组(转染miR-NC)、miR-323a-3p组(转染miR-323a-3p mimic)、anti-miR-323a-3p组(转染miR-323a-3p inhibitor)、anti-miR-NC组(转染anti-miR-NC)、si-NC

组(转染 si-NC)、si-TM4SF1 组(转染 si-TM4SF1)、miR-323a-3p+pcDNA 组(共转染 miR-323a-3p mimic 和 pcDNA)、miR-323a-3p+pcDNA-TM4SF1 组(共转染 miR-323a-3p mimic 和 pcDNA-TM4SF1)。每组设 3 平行孔。培养细胞至 60% 汇合时,使用 Lipofectamine™ 2000 试剂进行转染,转染时间为 48 h。

1.4 MTT 法检测调控 miR-323a-3p 与 TM4SF1 基因的表达对 A549 细胞增殖能力的影响

将转染后 A549 细胞接种于 96 孔板中, 5×10^3 个/孔, 分别在培养 24、48 和 72 h 时, 每孔加入 100 μ L MTT 溶液(5 mg/mL), 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h, 加入 200 μ L 二甲基亚砷(DMSO)溶解结晶, 10 min 后用酶标仪检测各孔细胞 450 nm 波长处的光密度(D)值, 以 D 值表示细胞增殖能力。

1.5 Transwell 法检测 A549 细胞的迁移和侵袭能力

进行侵袭实验时, Transwell 上室预铺人工基膜; 进行迁移实验时, Transwell 上室不涂人工基膜。将 200 μ L 悬浮于无血清 DMEM 培养基中的 5×10^4 个 A549 细胞接种在上室中, 下室添加含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 中培养 24 h 后, 将穿膜的细胞在室温下用 10% 甲醇固定 20 min, 在室温下用 0.5% 结晶紫染色 10 min, 在光学显微镜下计数。

1.6 WB 检测调控 miR-323a-3p 与 TM4SF1 基因的表达对 NSCLC 组织和 A549 细胞中 TM4SF1、cyclin D1、p21、MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响

使用 RIPA 裂解缓冲液提取 NSCLC 组织或 A549 细胞的总蛋白, 并使用 BCA 蛋白质定量试剂盒测定蛋白质含量。取等量蛋白(50 μ g/泳道)进行 SDS-PAGE(10% 凝胶), 然后将蛋白条带转移到聚偏二氟乙烯膜上, 在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 60 min, 加 TM4SF1、cyclin D1、p21、MMP-2、MMP-9 和 GAPDH 抗体(1:1 000 稀释), 在 4 $^{\circ}$ C 下放置过夜。过夜后将膜与辣根过氧化物酶偶联的二抗(1:5 000 稀释)一起在室温下放置 60 min。通过增强的化学发光检测仪检测目标蛋白。最后, 使用 ImageJ 软件分析蛋白条带的灰度值, 以 GAPDH 为内参计算目的蛋白的相对表达量。

1.7 生物信息学预测和双荧光素酶报告基因实验分析 miR-323a-3p 与 TM4SF1 之间的靶向调控关系

利用 StarBase (<http://starbase.sysu.edu.cn/>) 在线工具预测出 miR-323a-3p 与 TM4SF1 的 3' 非翻译区(UTR)具有互补配对的序列。将含有 miR-323a-3p 结合位点的野生型(WT)或突变型(MUT) TM4SF1-3' UTR 插入 pGL3 荧光素酶载体中, 分别命名为 TM4SF1-WT、TM4SF1-MUT。使用

Lipofectamine™ 2000 试剂将 TM4SF1-WT 或 TM4SF1-MUT 和 50 nmol/L miR-323a-3p mimic 或 50 nmol/L miR-NC 共转染至 A549 细胞, 转染 48 h 后, 根据试剂盒使用说明书, 通过双荧光素酶报告系统进行荧光素酶活性分析。

1.8 裸鼠移植瘤实验调控 miR-323a-3p 与 TM4SF1 基因的表达对检测 A549 细胞移植瘤生长能力的影响

BALB/c 裸鼠移植瘤的建立参照文献[9-10]进行。A549 细胞被转染后, 将 5×10^6 个细胞注射到裸鼠的右侧腋下皮下。分为 miR-NC 组、miR-323a-3p 组、si-NC 组、si-TM4SF1 组、miR-323a-3p+pcDNA 组和 miR-323a-3p+pcDNA-TM4SF1 组, 每组 9 只裸鼠。分别在第 14、21 和 28 天使用游标卡尺测量肿瘤长、短径, 计算移植瘤体积, 计算公式为 $V = \text{长径} \times \text{短径}^2 / 2$ 。

1.9 统计学处理

数据采用 SPSS22.0 软件进行统计处理, 结果表示为 $\bar{x} \pm s$ 。采用 t 检验进行两组间数据比较, 采用单因素方差分析进行多组数据间比较, 采用 SNK- q 检验进行多组间两两比较, 以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-323a-3p 和 TM4SF1 在 NSCLC 组织中表达状态

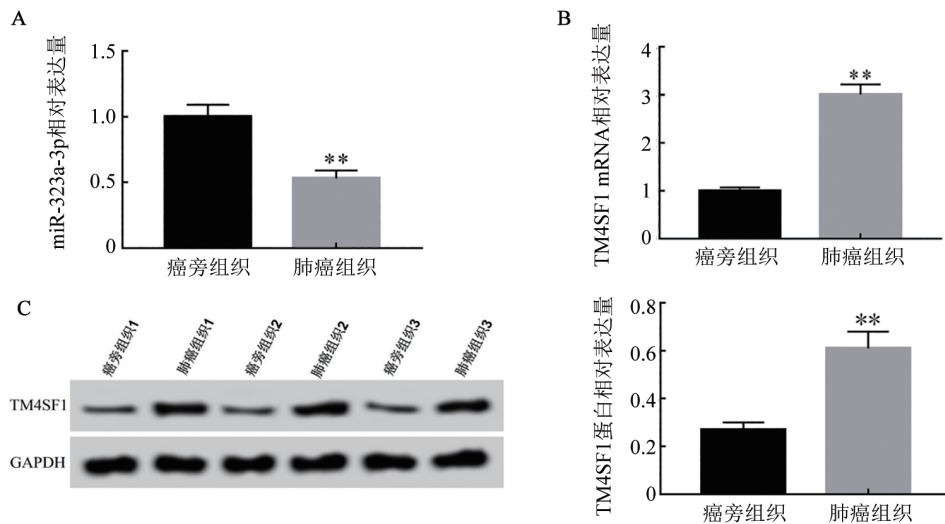
qPCR 检测结果显示, 与癌旁组织比较, 肺癌组织中 miR-323a-3p 表达水平明显降低, TM4SF1 mRNA 表达水平显著升高(图 1A、B, 均 $P < 0.01$)。WB 检测结果表明, 与癌旁组织比较, 肺癌组织中 TM4SF1 蛋白表达水平明显升高(图 1C, $P < 0.01$)。

2.2 miR-323a-3p 过表达使 A549 细胞的增殖能力减弱

qPCR 检测结果显示, A549 细胞中转染 miR-323a-3p mimic 后, 与 miR-NC 组比较, miR-323a-3p 组 miR-323a-3p 表达水平明显升高(图 2A, $P < 0.01$)。MTT 检测数据显示, 与 miR-NC 组比较, miR-323a-3p 组 48 和 72 h 时的细胞增殖能力明显减弱(图 2B, 均 $P < 0.01$)。WB 检测结果表明, miR-323a-3p 组 cyclin D1 蛋白表达水平比 miR-NC 组降低(图 2C, $P < 0.01$), p21 蛋白表达水平比 miR-NC 组升高(图 2C, $P < 0.01$)。

2.3 miR-323a-3p 过表达使 A549 细胞的迁移与侵袭能力减弱

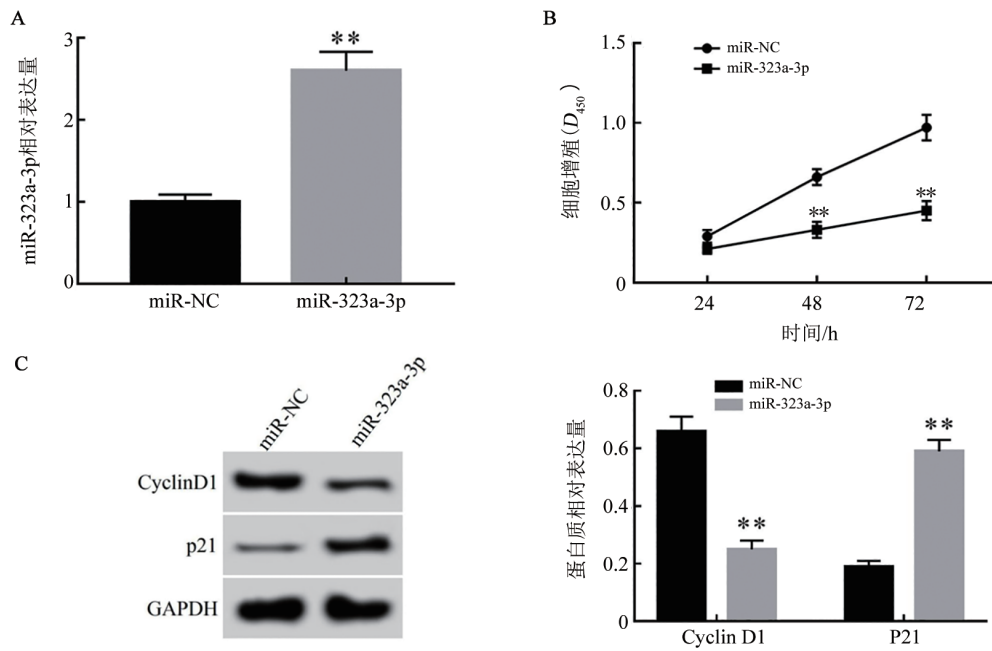
Transwell 实验检测结果显示, miR-323a-3p 组 A549 细胞的迁移细胞数和侵袭细胞数明显低于 miR-NC 组(图 3A, 均 $P < 0.01$)。WB 法检测结果表明, 与 miR-NC 组比较, miR-323a-3p 组细胞中 MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平明显降低(图 3B, 均 $P < 0.01$)。



与癌旁组织比较, ** $P < 0.01$

A: miR-323a-3p 在 NSCLC 组织中的表达; B: TM4SF1 mRNA 在 NSCLC 组织中的表达; C: TM4SF1 蛋白在 NSCLC 组织中的表达

图1 miR-323a-3p 和 TM4SF1 在 NSCLC 组织中的表达

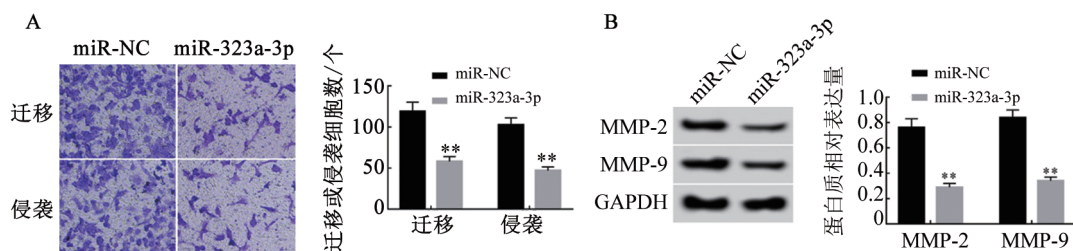


与 miR-NC 组比较, ** $P < 0.01$

A: 转染后的 A549 细胞中 miR-323a-3p 相对表达量; B: miR-323a-3p 过表达对 A549 细胞增殖的影响;

C: miR-323a-3p 过表达对 A549 细胞增殖相关蛋白表达的影响

图2 miR-323a-3p 过表达对 A549 细胞增殖的影响



与 miR-NC 组比较, ** $P < 0.01$

A: miR-323a-3p 过表达对 A549 细胞迁移、侵袭的影响 ($\times 200$);

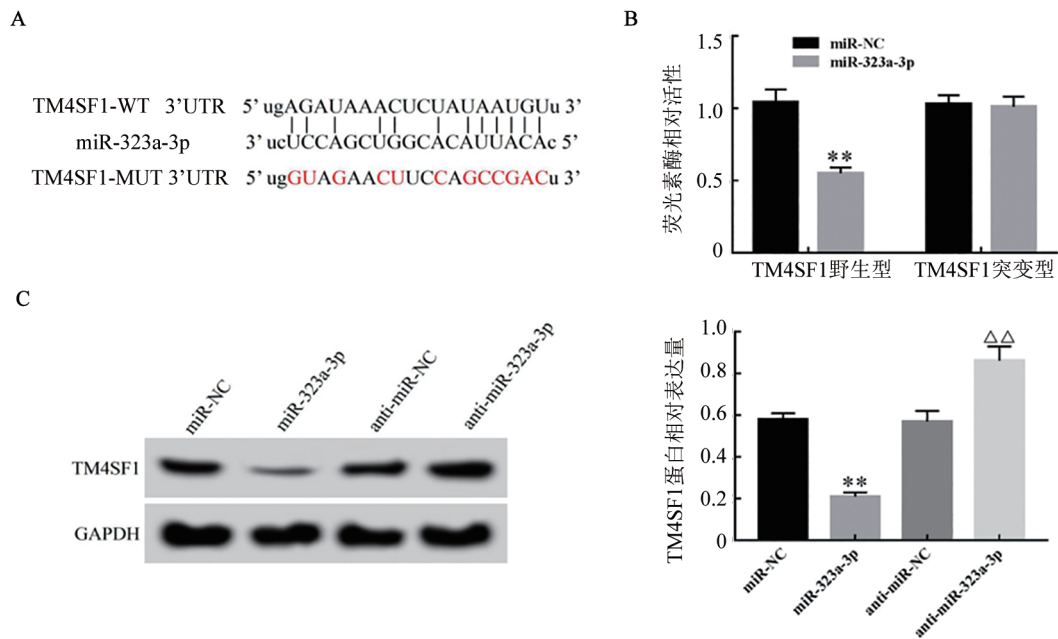
B: miR-323a-3p 过表达对 A549 细胞迁移、侵袭相关蛋白表达的影响

图3 miR-323a-3p 过表达对 A549 细胞迁移、侵袭的影响

2.4 miR-323a-3p 靶向调控 TM4SF1 的表达

为了确定 miR-323a-3p 在 NSCLC 进展中的分子机制,使用 StarBase 工具预测了 miR-323a-3p 的潜在靶基因,分析结果(图4A)表明, TM4SF1 的 3' UTR 含有 miR-323a-3p 的预测结合位点。双荧光素酶报告基因实验结果显示,与 miR-NC 组比较,转染 miR-323a-3p mimic 的细胞

荧光素酶活性在 TM4SF1-WT 组中明显降低(图4B, $P < 0.01$),而在 TM4SF1-MUT 组中没有显著差异。WB 法检测 miR-323a-3p 对 TM4SF1 蛋白表达的调控(图4C),发现转染 miR-323a-3p mimic 明显降低 TM4SF1 蛋白的表达水平($P < 0.01$),转染 miR-323a-3p inhibitor 后 TM4SF1 蛋白的表达水平显著升高($P < 0.01$)。



与 miR-NC 组比较, ** $P < 0.01$; 与 anti-miR-NC 组比较, △△ $P < 0.01$

A: TM4SF1 的 3' UTR 中含有与 miR-323a-3p 互补的核苷酸序列;

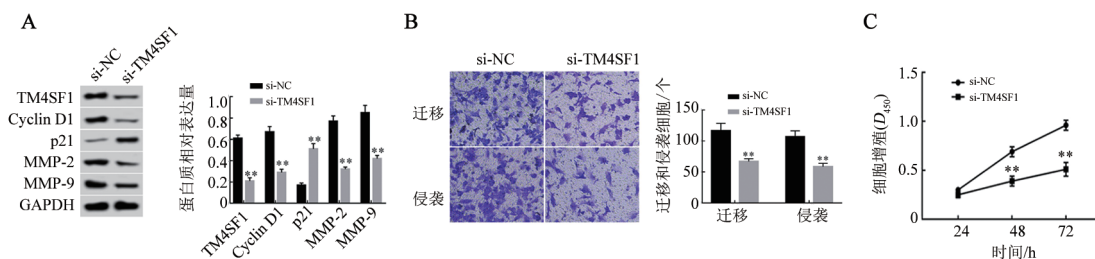
B: 双荧光素酶报告基因实验; C: miR-323a-3p 调控 TM4SF1 蛋白的表达

图4 miR-323a-3p 靶向调控 TM4SF1 的表达

2.5 抑制 TM4SF1 表达使 A549 细胞增殖、迁移与侵袭能力减弱

向 A549 细胞中转染 si-TM4SF1, WB 法检测结果显示,与 si-NC 组比较, si-TM4SF1 组的 TM4SF1 蛋白表达水平明显降低(图5A, $P < 0.01$), 迁移细胞数和侵

袭细胞数明显减少(图5B, $P < 0.01$), 在转染后 48 和 72 h 细胞的增殖能力明显减弱(图5C, 均 $P < 0.01$), cyclin D1 蛋白、MMP-2/9 蛋白表达水平显著降低(图5A, 均 $P < 0.01$), 而 p21 蛋白表达水平大幅增加(图5A, $P < 0.01$)。



与 si-NC 组比较, ** $P < 0.01$

A: 转染 si-TM4SF1 后 A549 细胞中 TM4SF1 和增殖、迁移和侵袭相关蛋白表达; B: 抑制 TM4SF1 表达对 A549 细胞迁移、侵袭的影响($\times 200$); C: 抑制 TM4SF1 表达对 A549 细胞增殖的影响

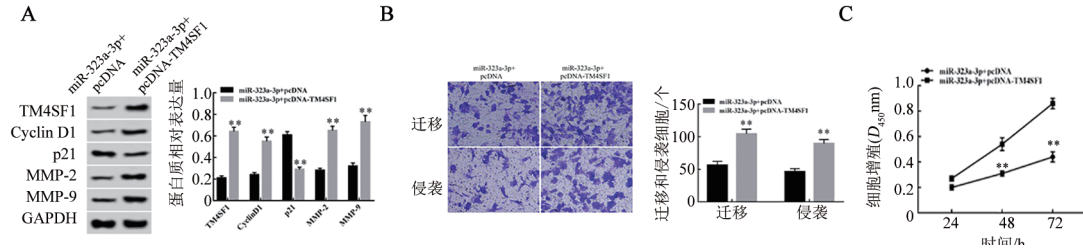
图5 抑制 TM4SF1 表达对 A549 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

2.6 miR-323a-3p 通过 TM4SF1 调控 A549 细胞的增殖、迁移与侵袭

将 miR-323a-3p mimic 和 pcDNA-TM4SF1 共转染至肺癌 A549 细胞, WB 法检测结果显示,与 miR-

323a-3p mimic+pcDNA 组比较, miR-323a-3p+pcDNA-TM4SF1 组细胞中 TM4SF1 蛋白表达水平明显降低(图 6A, $P<0.01$), 迁移细胞数和侵袭细胞数明显增加(图 6B, 均 $P<0.01$), 细胞 48 h 和 72 h 的增殖能

力明显增强(图 6C, 均 $P<0.01$), cyclin D1、MMP-2/9 蛋白表达水平显著升高(图 6A, 均 $P<0.01$), 而 p21 蛋白表达水平明显降低(图 6A, $P<0.01$)。



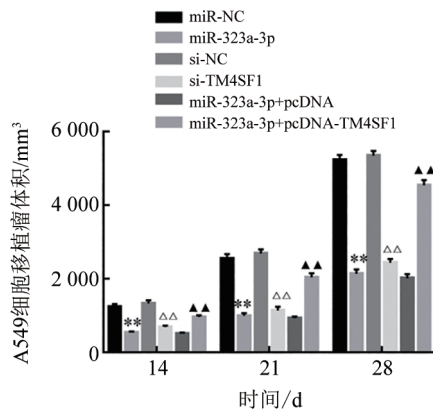
与 miR-323a-3p+pcDNA 组比较, ** $P<0.01$

A: TM4SF1 和增殖、迁移和侵袭相关蛋白表达; B: TM4SF1 表达的上调逆转了 miR-323a-3p 对 A549 细胞迁移侵袭的影响($\times 200$); C: TM4SF1 表达的上调逆转了 miR-323a-3p 对 A549 细胞增殖的影响

图 6 TM4SF1 表达的上调逆转了 miR-323a-3p 对 A549 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

2.7 同时转染 miR-323a-3p 与 pcDNA-TM4SF1 可部分逆转前者单独转染对 A549 细胞裸鼠移植瘤生长的抑制作用

检测结果(图 7)显示, 在荷瘤裸鼠观察的 14、21 和 28 d, miR-323a-3p 组 A549 细胞裸鼠移植瘤体积显著低于 miR-NC 组, si-TM4SF1 组裸鼠移植瘤体积显著低于 si-NC 组(均 $P<0.01$), 而 miR-323a-3p+pcDNA-TM4SF1 组较 miR-323a-3p+pcDNA 组 A549 细胞裸鼠移植瘤体积显著增加(均 $P<0.01$)。



与 miR-NC 组比较, ** $P<0.01$; 与 si-NC 组比较, $\Delta\Delta P<0.01$; 与 miR-323a-3p+pcDNA 组比较, $\Delta\Delta P<0.01$

图 7 调控 miR-323a-3p 与 TM4SF1 基因的表达对 A549 细胞裸鼠移植瘤体积的影响

3 讨论

尽管近年来在 NSCLC 的诊断和靶向治疗方面已经取得了实质性进展, 但是患者的 5 年总生存率仍然很低^[1]。为 NSCLC 的早期诊断、预后和治疗寻找有效的生物标志物仍然至关重要。在多种病理事件的

病因中, miRNA 充当转录后基因调节剂^[12-14]。主流观点认为 miRNA 的异常表达会影响癌症的进展, 因此, 对基于 miRNA 的 NSCLC 发生发展分子机制的深入研究可能为鉴定生物标志物和开发 NSCLC 新型治疗策略提供思路。

研究表明, miR-323a-3p 在各种类型的癌症中发挥重要作用, 包括膀胱癌^[5], 前列腺癌^[15], 神经胶质瘤^[16]。miR-323a-3p 在胶质母细胞瘤中过表达, 在体外能够抑制胶质母细胞瘤细胞的增殖和迁移^[17]。与非癌组织或人正常膀胱上皮细胞 SV-HUC-1 相比, 膀胱癌组织或细胞中的 miR-323a 水平显著降低, 敲降 miR-323a 表达显著增强了膀胱癌 T24 和 TCCSUP 细胞的迁移和侵袭能力^[18]。在本研究中发现, 与癌旁组织相比, miR-323a-3p 在 NSCLC 组织中表达下调, 与前人研究一致。此外, miR-323a-3p 过表达可显著抑制 A549 细胞的增殖、迁移、侵袭及抑制 A549 细胞裸鼠移植瘤的生长。该发现表明, miR-323a-3p 可能以肿瘤抑制因子的形式发挥作用。

迄今为止, 很少有实验验证 miR-323a-3p 对 TM4SF1 的靶向调控。在本研究中, 双荧光素酶报告基因实验分析和 WB 法检测结果表明 TM4SF1 是 miR-323a-3p 的直接靶标。TM4SF1 位于染色体区域 3q21-3q25 处, 是四次穿膜蛋白 L6 超家族成员之一。TM4SF1 是完整的膜糖蛋白, 可将细胞外信号传递至细胞质^[6]。既往研究^[19]表明, TM4SF1 在 NSCLC 细胞和组织中均上调, 抑制 TM4SF1 表达可抑制肿瘤细胞的生长、迁移和侵袭, 并增强了 A549 和 H1299 细胞对顺铂和紫杉醇的敏感性。此外, TM4SF1 沉默可导致 NSCLC 细胞凋亡和 G2/M 期停滞。TM4SF1 在 NSCLC 组织中呈高表达, 与肿瘤大小、分化程度、淋巴结转移、TNM 分期相关, 高表达 TM4SF 可促进

NSCLC 细胞迁移^[20]。TM4SF1 在人乳腺癌细胞中高表达,抑制 TM4SF1 可通过影响 EMT 来抑制乳腺癌细胞迁移和侵袭^[21]。本实验同样观察到, TM4SF1 在 NSCLC 组织中表达上调,抑制其表达可产生对 A549 细胞增殖、迁移、侵袭和裸鼠移植瘤生长的抑制作用。

miRNA 可通过结合其靶基因的 3' UTR 调节基因表达,并诱导靶 mRNA 降解或抑制靶 mRNA 翻译^[22]。TM4SF1 是 miR-30a/c 的直接靶标, miR-30a/c 通过靶向 TM4SF1 抑制 NSCLC 细胞的干细胞增殖^[23]。miR-323a-3p 通过靶向乳酸脱氢酶 A (lactate dehydrogenase A, LDHA) 抑制骨肉瘤细胞的生长并抑制骨肉瘤的糖酵解^[4]。但是,尚不清楚 miR-323a-3p 发挥作用的具体分子机制是否与 TM4SF1 表达有关。本研究中证实 miR-323a-3p 特异性靶向 A549 细胞中的 TM4SF1。与癌旁组织相比, TM4SF1 mRNA 和蛋白在 NSCLC 组织中呈高表达,并且其水平与 miR-323a-3p 在 NSCLC 组织中的表达相反。此外,在 miR-323a-3p 过表达的细胞中, TM4SF1 的蛋白表达显著降低,而抑制 miR-323a-3p 表达时, TM4SF1 的蛋白表达显著升高。并且上调 TM4SF1 表达逆转了 miR-323a-3p 过表达对肺癌 A549 细胞增殖、迁移、侵袭和裸鼠移植瘤生长的抑制作用。本研究提供了 miR-323a-3p 可通过抑制 TM4SF1 而抑制 NSCLC 细胞增殖、迁移和侵袭的证据。

综上所述,本研究结果表明, miR-323a-3p 在 NSCLC 组织中呈低表达,可通过直接靶向 TM4SF1 充当肿瘤抑制因子,抑制 NSCLC A549 细胞的增殖和迁移及抑制 A549 细胞裸鼠移植瘤的生长。此外,本项研究结果进一步阐明了 miR-323a-3p/TM4SF1 分子网络在 NSCLC 进展中的重要性。

【参考文献】

- [1] LI J W, ZHU Z B, LI S S, *et al.* Circ_0089823 reinforces malignant behaviors of non-small cell lung cancer by acting as a sponge for microRNAs targeting SOX4[J]. *Neoplasia*, 2021, 23(9): 887-897. DOI:10.1016/j.neo.2021.06.011.
- [2] ATCHLEY W T, ALVAREZ C, SAXENA-BEEM S, *et al.* Immune checkpoint inhibitor-related pneumonitis in lung cancer: real-world incidence, risk factors, and management practices across six health care centers in north Carolina[J]. *Chest*, 2021, 160(2): 731-742. DOI:10.1016/j.chest.2021.02.032.
- [3] PENG L, DENG H Y, WANG Y. Surgery should still remain the prior option for treating operable early-stage non-small-cell lung cancer[J/OL]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2022, 62(1): ezac327[2022-06-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35640114/>. DOI:10.1093/ejcts/ezac327.
- [4] REN M, XU W J, XU T. Salidroside represses proliferation, migration and invasion of human lung cancer cells through AKT and MEK/ERK signal pathway[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 1014-1021. DOI:10.1080/21691401.2019.1584566.
- [5] LI H, ZHAO S Y, CHEN X, *et al.* miR-145 modulates the radiosensitivity of non-small cell lung cancer cells by suppression of TMOD3[J]. *Carcinogenesis*, 2022, 43(3): 288-296. DOI:10.1093/carcin/bgab121.
- [6] CHEN H W, GAO S M, CHENG C. miR-323a-3p suppressed the glycolysis of osteosarcoma via targeting LDHA[J]. *Hum Cell*, 2018, 31(4): 300-309. DOI:10.1007/s13577-018-0215-0.
- [7] LI J F, XU X, MENG S, *et al.* MET/SMAD3/SNAIL circuit mediated by miR-323a-3p is involved in regulating epithelial-mesenchymal transition progression in bladder cancer[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(8): e3010[2022-06-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28837140/>. DOI:10.1038/cddis.2017.331.
- [8] FU X Y, ZHOU W B, XU J. TM4SF1 facilitates non-small cell lung cancer progression through regulating YAP-TEAD pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(4): 1829-1840. DOI:10.26355/eurrev_202002_20361.
- [9] 孟翠翠, 罗居东, 周希法, 等. miR-132/212 对肺癌裸鼠移植瘤生长的影响[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2015, 22(15): 1170-1175. DOI:10.16073/j.cnki.cjcp.2015.15.002.
- [10] 庄梦婕, 刘丹, 陈彦文, 等. 黄芪多糖联合顺铂对小鼠 Lewis 肺癌移植瘤 Caspase-3、Smac/Diablo 表达的影响[J]. *解剖学报*, 2018, 49(1): 63-69. DOI:10.16098/j.issn.0529-1356.2018.01.010.
- [11] CHOI Y J, KIM S Y, PARK M S, *et al.* Incidental lung cancer of explanted lungs from lung transplant recipients: incidence, characteristics, and 5-year survival[J]. *Yonsei Med J*, 2020, 61(11): 958-964. DOI:10.3349/ymj.2020.61.11.958.
- [12] ZHONG S, GOLPON H, ZARDO P, *et al.* miRNAs in lung cancer. A systematic review identifies predictive and prognostic miRNA candidates for precision medicine in lung cancer[J]. *Transl Res*, 2021, 230: 164-196. DOI:10.1016/j.trsl.2020.11.012.
- [13] ZHENG J N, ZHANG Y, CAI S, *et al.* microRNA-4651 targets bromodomain-containing protein 4 to inhibit non-small cell lung cancer cell progression[J]. *Cancer Lett*, 2020, 476: 129-139. DOI:10.1016/j.canlet.2020.02.018.
- [14] WU K L, TSAI Y M, LIEN C T, *et al.* The roles of microRNA in lung cancer[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(7): 1611[2022-06-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30935143/>. DOI:10.3390/ijms20071611.
- [15] YU Q, LI P, WENG M L, *et al.* Nano-vesicles are a potential tool to monitor therapeutic efficacy of carbon ion radiotherapy in prostate cancer[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2018, 14(1): 168-178. DOI:10.1166/jbn.2018.2503.
- [16] AMES H M, YUAN M, VIZCAÍNO M A, *et al.* microRNA profiling of low-grade glial and glioneuronal tumors shows an independent role for cluster 14q32.31 member miR-487b[J]. *Mod Pathol*, 2017, 30(2): 204-216. DOI:10.1038/modpathol.2016.177.
- [17] SHAHAR T, GRANIT A, ZRIHAN D, *et al.* Expression level of miRNAs on chromosome 14q32.31 region correlates with tumor aggressiveness and survival of glioblastoma patients[J]. *J Neurooncol*, 2016, 130(3): 413-422. DOI:10.1007/s11060-016-2248-0.
- [18] QIU J, ZENG F R, FANG Y, *et al.* Increased miR-323a induces

- bladder cancer cell apoptosis by suppressing c-Met[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2019, 35(9): 542-549. DOI:10.1002/kjm2.12091.
- [19] YE L, PU C Y, TANG J, *et al.* Transmembrane-4 L-six family member-1 (TM4SF1) promotes non-small cell lung cancer proliferation, invasion and chemo-resistance through regulating the DDR1/Akt/ERK-mTOR axis[J/OL]. *Respir Res*, 2019, 20(1): 106 [2022-06-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31142317/>. DOI: 10.1186/s12931-019-1071-5.
- [20] 牛雨萌, 洗磊, 邓海龙, 等. TM4SF1 与肺癌细胞 JAK2-STAT3 信号通路相互作用机制及其在 NSCLC 中的表达[J]. *重庆医科大学学报*, 2021, 46(1): 10-14. DOI:10.13406/j.cnki.cyx.002475.
- [21] 梁冰, 邓萌, 裴新红. TM4SF1 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞侵袭转移及 EMT 的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2021, 56(4): 530-534. DOI:10.13705/j.issn.1671-6825.2020.11.131.
- [22] LIU H T, ZHANG Q, LOU Q Q, *et al.* Differential analysis of lncRNA, miRNA and mRNA expression profiles and the prognostic value of lncRNA in esophageal cancer[J]. *Pathol Oncol Res*, 2020, 26(2): 1029-1039. DOI:10.1007/s12253-019-00655-8.
- [23] MA Y S, YU F, ZHONG X M, *et al.* miR-30 family reduction maintains self-renewal and promotes tumorigenesis in NSCLC-initiating cells by targeting oncogene TM4SF1[J]. *Mol Ther*, 2018, 26(12): 2751-2765. DOI:10.1016/j.ymthe.2018.09.006.
- [收稿日期] 2022-02-17 [修回日期] 2022-06-18
[本文编辑] 王润蓓, 黄静怡