

文章编号 1006-8147(2022)01-0145-07

论 著

miR-152 通过靶向 FGF2 抑制肺癌 A549 细胞系的增殖侵袭

何磊¹, 杜佳辉², 李娜¹

(1. 郑州人民医院急诊科, 郑州 450000; 2. 河南省胸科医院胸外科, 郑州 450000)

摘要 目的:探讨 miR-152 通过靶向成纤维细胞生长因子 2(FGF2)对肺癌 A549 细胞系的增殖和侵袭的作用机制。方法:通过实时荧光定量 PCR(qPCR)检测正常上皮细胞 BEAS-2B 和肺癌 A549 细胞中 miR-152 和 FGF2 的表达情况;采用转染技术,分别特异性表达肺癌 A549 细胞系中 miR-152 和 FGF2 基因的表达。将肺癌 A549 细胞系分为 6 组:miRNA 空转组(miR-NC 组)、miR-152 过表达组(miR-152 mimics 组)、miR-152 抑制组(miR-152 inhibitor 组)、FGF2 过表达空转组(pcDNA3.1-NC 组)、FGF2 过表达组(pcDNA3.1-FGF2 组)和 miR-152 过表达+FGF2 过表达组(miR-152+ pcDNA3.1-FGF2 组)。通过 qPCR 检测 A549 细胞系中 miR-152 和 FGF2 的表达水平;细胞克隆和 Transwell 小室实验分别检测 A549 细胞系的增殖和侵袭能力;采用双荧光报告基因法验证 miR-152 与 FGF2 结合情况;Western 印迹法检测 A549 细胞系中 FGF2、自噬标志蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3B(LC3B) II/I、beclin1 和 p62 的表达量。结果:qPCR 结果显示,与正常上皮细胞 BEAS-2B 比较,肺癌 A549 细胞中 miR-152 的表达量显著降低($P<0.01$),而 FGF2 的表达量显著增加($P<0.01$)。TargetScan 生物信息学软件预测显示 miR-152 与 FGF2 的 3' UTR 结合,双荧光报告基因检测结果显示,miR-152 与 FGF2 直接结合。细胞克隆和 Transwell 小室实验结果显示,与 miR-NC 组比较,miR-152 mimics 组中的 A549 细胞系的增殖和侵袭能力显著减低($P<0.05$),miR-152 inhibitor 组的增殖和侵袭能力显著增加($P<0.05$)。与 pcDNA3.1-NC 组比较,pcDNA3.1-FGF2 组中的 A549 细胞系的增殖和侵袭能力显著增加($P<0.05$)。与 miR-152 mimics 组比较,miR-152+ pcDNA3.1-FGF2 组中 A549 细胞系的增殖和侵袭能力显著增加($P<0.05$)。Western 印迹结果显示,与 miR-NC 组比较,miR-152 mimic 组 FGF2 和 p62 蛋白表达显著降低($P<0.05$),但 LC3B II/I 和 beclin1 的表达量显著增加($P<0.05$),而 miR-152 inhibitor 组结果与之相反。与 pcDNA3.1-NC 组比较,pcDNA3.1-FGF2 组 FGF2 和 p62 蛋白表达显著增加($P<0.05$),而 LC3B II/I 和 beclin1 的表达量显著降低($P<0.05$)。与 miR-152 mimics 组比较,miR-152+ pcDNA3.1-FGF2 组 FGF2 和 p62 蛋白表达显著增加($P<0.05$),LC3B II/I 和 beclin1 蛋白表达量显著降低($P<0.05$)。结论:miR-152 靶向 FGF2 抑制肺癌 A549 细胞系自噬,从而降低增殖侵袭能力,可成为肺癌临床治疗的新靶点。

关键词 肺癌;miR-152;成纤维细胞生长因子 2;自噬;细胞增殖;细胞侵袭

中图分类号 R734.2

文献标志码 A

The effect of miR-152 on the proliferation and invasion of lung cancer A549 cell line regulated by FGF2

HE Lei¹, DU Jia-hui², LI Na¹

(1. Department of Emergency, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450000, China; 2. Department of Thoracic Surgery, Henan Thoracic Hospital, Zhengzhou 450000, China)

Abstract Objective: To investigate the mechanism of miR-152 targeting fibroblast growth factor 2(FGF2) on the proliferation and invasion of lung cancer A549 cell line. **Methods:** Real-time fluorescence quantitative PCR(qPCR) was used to detect the expression of miR-152 and FGF2 in normal epithelial cells BEAS-2B and lung cancer A549 cells. Transfection technology was used to specifically overexpress miR-152 and FGF2 in lung cancer A549 cell lines, respectively. The experiment divided the lung cancer A549 cell lines into 6 groups: miRNA idling group(miR-NC), miR-152 overexpression group(miR-152 mimics), miR-152 inhibitor group(miR-152 inhibitor), FGF2 overexpression idling group(pcDNA3.1-NC), FGF2 overexpression group(pcDNA3.1-FGF2) and miR-152 overexpression+FGF2 overexpression group(miR-152+ pcDNA3.1-FGF2). qPCR was used to detect the expression levels of miR-152 and FGF2 in A549 cell line. Cell cloning and Transwell cell experiment were used to detect the proliferation and invasion ability of A549 cell line. Dual fluorescence reporter gene method was used to verify the binding of miR-152 and FGF2. Western blotting was used to detect the protein expression of FGF2, autophagy marker protein microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3B) II/I, beclin1 and p62 in A549 cell line. **Results:** The qPCR results showed that compared with normal epithelial cells BEAS-2B, the expression of miR-152 in lung cancer A549 cells was significantly reduced ($P<0.01$), while the expression of FGF2 was significantly increased ($P<0.01$). TargetScan bioinformatics software predicted that miR-152 was bound to the 3' UTR of FGF2, and dual-fluorescence reporter gene test results showed that miR-152 was

基金项目 河南省医学科技攻关计划(联合共建)项目(LHGJ20190743)

作者简介 何磊(1982-),男,主治医师,学士,研究方向:心胸外科;E-mail:nyg123987@163.com。

directly bound to FGF2. The results of cell cloning and Transwell chamber experiments showed that compared with the miR-NC group, the proliferation and invasion ability of the A549 cell line in the miR-152 mimics group was significantly reduced ($P < 0.05$), and the proliferation and invasion of miR-152 inhibitor group increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the pcDNA3.1-NC group, the proliferation and invasion ability of the A549 cell line in the pcDNA3.1-FGF2 group increased significantly ($P < 0.05$). Compared with miR-152 mimics group, the proliferation and invasion ability of A549 cell line in miR-152+pcDNA3.1-FGF2 group increased significantly ($P < 0.05$). Western blotting results showed that, compared with the miR-NC group, the expression of FGF2 and p62 protein in the miR-152 mimic group was significantly reduced ($P < 0.05$), but the expression of LC3B II/I and beclin1 was significantly increased ($P < 0.05$), while the miR-152 inhibitor group result was the opposite. Compared with the pcDNA3.1-NC group, the expression of FGF2 and p62 protein in the pcDNA3.1-FGF2 group increased significantly ($P < 0.05$), while the expression of LC3B II/I and beclin1 decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with the miR-152 mimics group, the expression of FGF2 and p62 protein in the miR-152+pcDNA3.1-FGF2 group was significantly increased ($P < 0.05$), and the protein expression of LC3B II/I and beclin1 was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** MiR-152 targeting FGF2 can inhibit autophagy of lung cancer A549 cell line, and may become a new target for clinical treatment of lung cancer.

Key words lung cancer; miR-152; fibroblast growth factor 2; autophagy; cell proliferation; cell invasion

肺癌是一种呼吸系统恶性肿瘤疾病,其病死率位居恶性肿瘤之首^[1]。目前,关于诊断肺癌的方案主要检测肿瘤标志物、支气管镜检查、痰脱落细胞学检测、胸腔积液检测以及胸部计算机断层扫描等^[2]。由于肺癌发病前期不明显,大部分患者确诊时已处于中晚期,所以 5 年生存率比较低^[3]。因此,寻找用于肺癌的诊断和治疗的新靶点至关重要。近年来自噬作为抗肿瘤研究的热点,在肿瘤的发生发展中扮演重要的角色,一方面其通过降解聚集的蛋白质和功能性障碍的细胞器,减少细胞内氧化应激反应。另一方面,自噬调控肺癌细胞增殖、侵袭和凋亡等过程^[4]。

微小 RNA(miRNA)是长度在 20~24 个碱基的单链非编码小 RNA^[5]。研究表明,miRNA 与信使 RNA(mRNA)碱基互补配对,从而降解靶 mRNA 或抑制其翻译,进而参与转录后的调控^[6]。越来越多研究发现,miRNA 参与肿瘤发生和发展,主要调控肿瘤细胞的自噬、增殖、迁徙和侵袭等过程^[7-8]。研究发现,miR-21 和 miR-23a 可成为肺癌早期诊断的标志物^[9]。并且 miRNA-31 和 let-7a 在肺癌患者中的异常表达,为肺癌早期诊断提供参考意义^[10]。研究发现,miR-144 表达增加后,肺癌细胞中自噬激活后,从而抑制细胞的增殖和迁移^[11]。因此,特异性表达的 miRNA 可成为肺癌诊断和治疗的标志物。

miR-152 参与多种肿瘤的发生、发展过程,研究表明,在肺癌患者血清中检测 miR-152 异常表达,并且显著性低于正常人群^[12]。在早期非小细胞肺癌诊断中,血清外泌体中的 miR-152 可以作为辅助诊断标志物^[13]。但 miR-152 影响肺癌 A549 细胞的作用及机制仍不明确。成纤维细胞生长因子-2(FGF2)是一种广泛存在人体各组织中的肽类丝裂源^[14]。由于 FGF2 常参与细胞自噬过程^[15],对肿瘤细胞增殖、迁

移和侵袭具有重要作用^[16]。本研究通过脂质体转染技术构建 miR-152 过表达以及 FGF2 过表达的肺癌 A549 细胞,检测 miR-152 与 FGF2 互作关系,探究 miR-152 和 FGF2 对肺癌 A549 细胞的自噬、增殖和侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 正常上皮细胞 BEAS-2B 和肺癌 A549 细胞系均购自中科院上海细胞库。

1.1.2 试剂及试剂盒 FBS 胎牛血清、MEM 培养基和 0.25% 的胰蛋白酶(Gibco, Waltham, MA); miRNA 空转化合物、FGF2 过表达空转质粒、miR-152 mimic 和 miR-152 shRNA 以及 FGF2 过表达质粒(广州市锐博生物科技有限公司); opti-medium 培养基、lip3 000、Trizol 试剂和 BCA 试剂(Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc); Dual Luciferase Reporter Assay System 试剂盒(psiCHECK-2 vector; Promega, Madison, WI, USA); 0.25% 甲紫溶液(索莱宝科技有限公司); Transwell 小室(密理博科技有限公司); PrimeScript TM RT 试剂盒(Takara Biotechnology); SYBR Green I[宝日医生物技术(北京)有限公司]; RIPA 缓冲液、SDS-PAGE 和 PVDF 膜(Sigma-Aldrich 中国); 牛血清白蛋白(盐城赛宝生物科技有限公司); PMSF 抑制蛋白降解液(北京索莱宝科技有限公司); 兔抗人 FGF2、LC3B II/I、beclin1、p62 和 GAPDH 单克隆抗体(Cell Signaling Technology, Inc.); 羊抗兔二抗[艾博抗(上海)贸易有限公司]; 一抗稀释液和二抗稀释液(北京百奥莱博科技有限公司); 超敏发光液 ECL(上海翊圣生物科技有限公司)。

1.2 细胞培养 正常上皮细胞 BEAS-2B 和 A549 细胞通过快速升温复苏后, 10% FBS 的 MEM 培养液分别制成细胞混悬液, 放入培养皿后, 于 37℃ 恒温,

5%CO₂的培养箱中。隔天进行传代1次,实验使用的细胞为对数生长期的细胞。

1.3 细胞转染及分组 将正常上皮细胞 BEAS-2B (正常上皮细胞组)和 A549 细胞(肺癌 A549 细胞组)接种于6孔板,待其长至密度80%~90%后,为下一步实验做准备。再将 A549 细胞分为 miR-NC 组、pcDNA3.1-NC 组、miR-152 mimics 组、miR-152 inhibitor 组、pcDNA3.1-FGF2 组和 miR-152+pcDNA3.1-FGF2 组。miR-NC 组是 miRNA 空转物干扰 A549 细胞,pcDNA3.1-NC 组是 FGF2 过表达的乱序质粒干扰 A549 细胞,miR-152 mimics 组是 miR-152 过表达质粒干扰 A549 细胞,miR-152 inhibitor 组是 miR-152 沉默质粒干扰 A549 细胞,pcDNA3.1-FGF2 组是 FGF2 过表达质粒干扰 A549 细胞,miR-152+pcDNA3.1-FGF2 组是 miR-152 过表达质粒和 FGF2 过表达质粒同时干扰 A549 细胞。转染步骤:将对数生长的 A549 细胞种于6孔板内,待其长至密度40%~50%。用 opti-medium 培养基稀释对应的质粒后,再与 lip3000 混匀孵育15 min 后,加入孔内。待转染8 h 后,弃去转染液。添加正常培养基进行培养,当细胞长至80%~90%,放在荧光倒置显微镜观察转染效率。转染率超过80%,可进行下一步实验。

1.4 双荧光素酶报告实验 双重荧光素酶报告基因检测使用 Dual Luciferase Reporter Assay System 试剂盒。将 FGF2 非翻译区(UTR),包含 miR-152 预测结合位点的3'UTR,所有各自结合位点突变型(Mut)3'UTR 的片段插入 psiCHECK-2 载体,再通过 DNA 测序验证所有构建体。将含有野生型(Wt)或 Mut 的 psiCHECK-2 载体转染到有或没有合成 miR-152 模拟物细胞中。转染36 h 后,使用双重荧光素酶报告基因检测系统检测荧光素酶活性,以海肾活性标准化。

1.5 细胞克隆检测细胞增殖能力 取 miR-NC 组、pcDNA3.1-NC 组、miR-152 mimics 组、miR-152 inhibitor 组、pcDNA3.1-FGF2 组和 miR-152+pcDNA3.1-FGF2 组对数生长时的细胞,0.25%的胰蛋白酶消化后,1 000×g 离心10 min 收集细胞后,用10% FBS 的 MEM 培养基混匀制成单细胞混悬液。每组将1 000 个细胞接种于6孔板内,培养10~14 d,当观察孔内有肉眼可见的克隆,就终止培养。用 PBS 洗涤2~3 次后,甲醇固定15 min,加入适量的0.25%甲紫溶液染色。在倒置显微镜计算大于50 个细胞的克隆数,最后统计分析每个孔的克隆数,该实验每组需要设立3 个复孔,并且独立重复操作3 次。

1.6 Transwell 小室检测细胞侵袭能力 Transwell 小室上层添加100 μL 的 Matrigel 生物胶,在培养箱中培养40 min 后,再分别加入100 μL MEM 混合1×10⁴ 个 miR-NC 组、pcDNA3.1-NC 组、miR-152 mimics 组、miR-152 inhibitor 组、pcDNA3.1-FGF2 组和 miR-152+pcDNA3.1-FGF2 组的细胞。而 Transwell 小室下室加100 μL 10% FBS 的 MEM 培养基,再置于培养箱培养12 h。弃去上清液,PBS 洗涤3 次,再用甲醇固定15 min 后,0.25%甲紫溶液染色1 h。将小室放在倒置显微镜下随机选取5 个视野(200×),拍照记录迁移下室的细胞总数。该实验每组需要设立3 个复孔,并且独立重复操作3 次。

1.7 蛋白质印迹法检测相关蛋白表达水平 将 miR-NC 组、pcDNA3.1-NC 组、miR-152 mimics 组、miR-152 inhibitor 组、pcDNA3.1-FGF2 组和 miR-152+pcDNA3.1-FGF2 组细胞长至80%~90%通过胰酶消化,1 000×g 离心收起细胞后用蛋白裂解液(RIPA 缓冲液:PMSF 抑制蛋白降解液=100:1)裂解后提取总蛋白。BCA 试剂测得各组的总蛋白浓度后,都调成一致浓度,再100℃变性后保存于-20℃。总蛋白电泳分离后,将其转膜至 PVDF 膜。用3%牛血清白蛋白液封闭2 h 后,TBST 洗涤3 次,每次10 min。将其放入对应的一抗混合液(一抗1:1 000)(FGF2、LC3B II/I、beclin1、p62 和 GAPDH),在4℃孵育过夜。用 TBST 洗涤3 次,每10 min 1 次,放入二抗和3%牛血清白蛋白液(1:4 000)混悬液中,室温孵育2 h。TBST 洗涤3 次,每次10 min,将超敏发光液 ECL 滴在膜上,放入化学发光成像仪(Invitrogen, USA)进行蛋白显影。通过 Image J 软件进行分析结果,相对蛋白表达以 GAPDH 标准化。

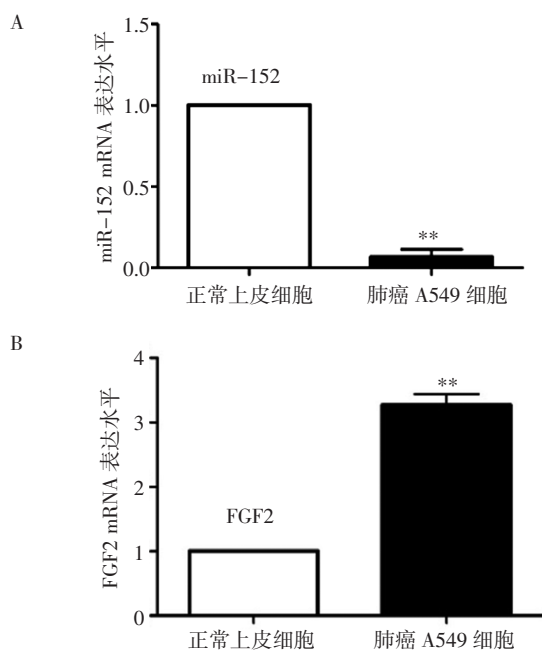
1.8 统计学处理 应用 SPSS19.0 软件进行数据处理,所有实验数据为重复3 次实验结果。计量资料中符合正态分布资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,软件采用 One way ANOVA 单因素分析,多组间的两两比较采用 SNK-Q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-152 在正常上皮细胞 BEAS-2B 和肺癌 A549 细胞中的表达情况 qPCR 结果如图 1A 和 1B 所示,与正常上皮细胞 BEAS-2B 比较,肺癌 A549 细胞中的 miR-152 表达量显著降低($P < 0.01$),而 FGF2 的 mRNA 表达量显著增加($P < 0.01$)。

2.2 FGF2 是 miR-152 的靶点 根据 TargetScan 的预测,miR-152 3' -UTR 中的靶向位点与 FGF2 部分互补(图 2A)。假设 FGF2 与 miR-152 基因的 3' -UTR 结合,从而抑制了 miR-152 的基因表达。双重

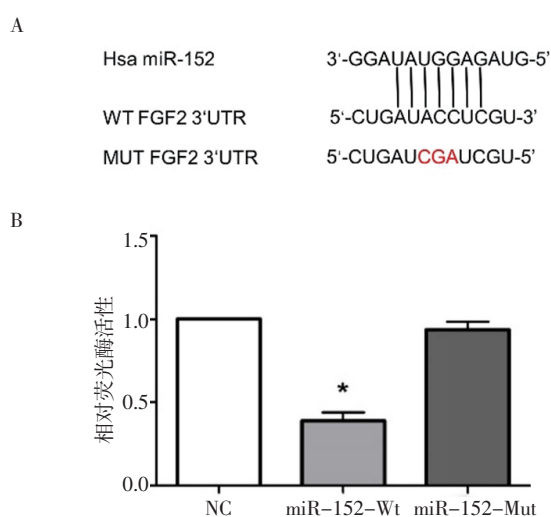
萤光素酶活性测定结果如图 2B 所示,miR-152-Wt 组的相对萤光素酶活性显著少于 NC 组($P<0.05$),但 miR-152-Mut 组在萤光素酶活性方面与 NC 组比较,无统计学差异。这表明 miR-152 是 FGF2 的直接靶标。



注:A;qPCR 检测 miR-152 在正常上皮细胞和 A549 细胞的表达(与正常上皮细胞比较,** $P<0.01$);B;qPCR 检测 FGF2 在正常上皮细胞和 A549 细胞的表达(与正常上皮细胞比较,** $P<0.01$);FGF2:成纤维细胞生长因子 2

图 1 qPCR 检测正常上皮细胞和 A549 细胞中 miR-152 和 FGF2 的表达情况

Fig 1 The expression of miR-152 and FGF2 in normal epithelial cells and A549 cells detected by qPCR

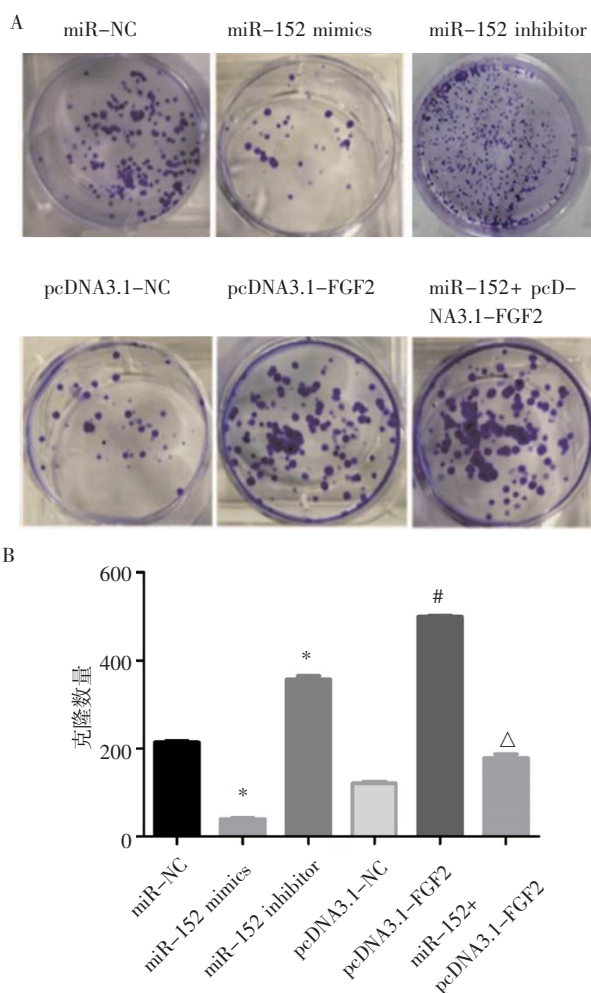


注:A: FGF2 的 3'-UTR 和 miR-152D 序列;B: 双重萤光素酶检测 miR-152 野生型和突变型对萤光吸收影响(与 NC 组比较,* $P<0.05$); FGF2:成纤维细胞生长因子 2

图 2 双萤光素酶检测 FGF 与 miR-152 关系

Fig 2 Relationship between FGF and miR-152 detected by dual luciferase

2.3 miR-152 靶向 FGF2 对肺癌 A549 细胞增殖的影响 二维克隆实验结果如图 3A 和 3B 所示,miR-152 mimics 组细胞形成的克隆数(42 ± 3.21)显著低于 miR-NC 组(214 ± 10.23)($t=-48.88$, $P<0.05$),而 miR-152 inhibitor 组克隆数(352 ± 4.23)显著高于 miR-NC 组($t=-27.68$, $P<0.05$)。pcDNA3.1-FGF2 组细胞形成的克隆数(501 ± 6.12)显著高于 pcDNA3.1-NC 组(124 ± 11.43)($t=-42.18$, $P<0.05$)。miR-152+pcDNA3.1-FGF2 组细胞形成的克隆数(187 ± 6.21)显著高于 miR-152 mimics 组(42 ± 3.21)($t=-32.25$, $P<0.05$)。



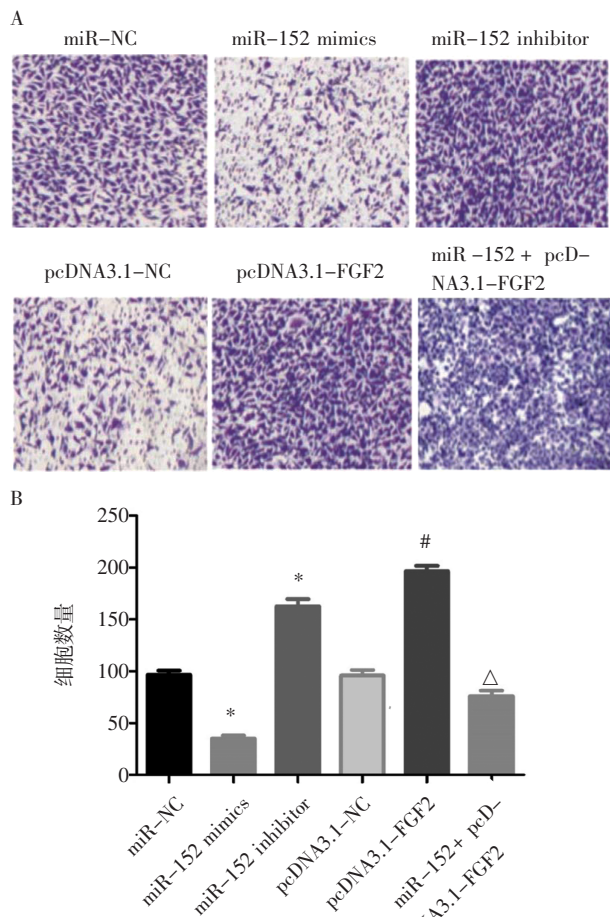
注:A:6 组肺癌 A549 细胞克隆水平;B:各组克隆数统计图(与 miR-NC 组比较,* $P<0.05$;与 pcDNA3.1-NC 组比较,# $P<0.05$;与 miR-152 组比较,Δ $P<0.05$)

图 3 二维克隆法检测肺癌 A549 细胞克隆能力

Fig 3 The clonal ability of lung cancer A549 cells detected by two-dimensional cloning method

2.4 miR-152 靶向 FGF2 对肺癌 A549 细胞侵袭的影响 Transwell 实验结果如图 4A 和 4B 所示,miR-152 mimics 组穿过基质胶膜的细胞数为(35 ± 4)个,显著低于 miR-NC 组(101 ± 5)个($t=-19.82$, $P<0.05$),

而 miR-152 inhibitor 组 (162 ± 5.03) 个, 显著高于 miR-NC 组 ($t = -22.33, P < 0.05$)。pcDNA3.1-FGF2 组穿过基质胶膜的细胞数为 (199 ± 6) 个, 显著高于 pcDNA3.1-NC 组 (98 ± 4) 个 ($t = -10.64, P < 0.05$)。miR-152+pcDNA3.1-FGF2 组穿过基质胶膜的细胞数为 (78 ± 3) 个, 显著高于 miR-152 mimics 组 ($t = -8.19, P < 0.05$)。



注:A:6 组肺癌 A549 细胞侵袭水平;B: 各组侵袭细胞数统计图

(与 miR-NC 组比较, $*P < 0.05$; 与 pcDNA3.1-NC 组比较, $*P < 0.05$; 与 miR-152 组比较, $\Delta P < 0.05$); FGF2: 成纤维细胞生长因子 2

图 4 Transwell 小室检测肺癌 A549 细胞侵袭能力 (200 \times)

Fig 4 The invasiveness of lung cancer A549 cells detected by Transwell chamber (200 \times)

2.5 miR-152 靶向 FGF2 对肺癌 A549 细胞自噬相关蛋白的影响 Western 印迹实验结果如图 5A 和 5B 所示, 与 miR-NC 组比较, miR-152 mimics 组 FGF2 和 p62 蛋白表达量显著减少 ($P < 0.05$), LC3B II/I 和 beclin1 蛋白表达量显著增加 ($P < 0.05$), 而 miR-152 inhibitor 组 FGF2 和 p62 蛋白表达量显著增加 ($P < 0.05$), LC3B II/I 和 beclin1 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.05$)。与 pcDNA3.1-NC 组比较, pcDNA3.1-FGF2 组 FGF2 和 p62 显著增加 ($P < 0.05$), LC3B II/I 和 beclin1 蛋白表达量显著减低 ($P < 0.05$)。与 miR-

152 mimics 组比较, miR-152+ pcDNA3.1-FGF2 组 FGF2 和 p62 显著增加 ($P < 0.05$), LC3B II/I 和 beclin1 蛋白表达量显著增加 ($P < 0.05$)。

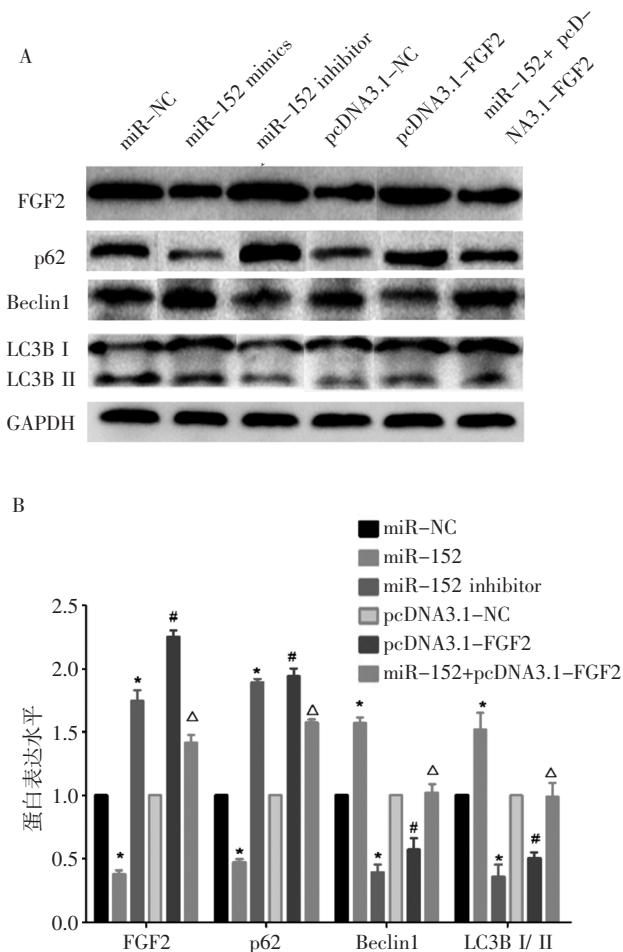


图 5 Western 印迹检测 A549 细胞内 FGF2、LC3B II/I 和 beclin1 和 p62 蛋白表达情况

Fig 5 The expression of FGF2, LC3B II/I, beclin1 and p62 proteins in A549 cells detected by Western blotting

3 讨论

肺癌是我国发病率最高的恶性肿瘤之一, 恶性程度高且临床预后较差^[17]。肺癌容易复发和转移, 大部分患者确诊时已经处于中晚期^[18]。目前, 对于肺癌治疗的手段主要是手术和化疗等综合治疗方案, 在一定程度上能缓解病情, 但是生存期仍不乐观^[19]。研究表明, 细胞自噬是机体的一种自我保护机制, 其在应激条件下降解癌细胞产生的损伤细胞器和有害的蛋白质物质, 可以阻止癌症的发生和发展^[4]。LC3B II/I、beclin1 和 p62 是主自噬标志物, LC3B II/I 和 beclin1 蛋白表达量随着自噬水平升高而升高。自噬降解受到抑制时, p62 的表达量增加^[20]。越来越多研究表明, 非编码 RNA 通过参与自噬调控网络, 介导自噬相关基因的表达, 从而参与癌细胞的增殖和侵袭过程^[21]。因此, 深入了解肺癌的发病

机制,寻找与其自噬、增殖和侵袭相关的信号分子,可进一步提高肺癌的生存率,改善临床预后。

研究表明,miRNA 表达和功能异常常与肿瘤的发生、发展有密切关系^[22]。研究表明,miR-152 抑制胃癌细胞、膀胱癌细胞和卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力^[23-25]。因此,miRNA 有可能参与肺癌 A549 细胞的增殖和侵袭调控。本研究发现,与正常上皮细胞比较,miR-152 在肺癌 A549 细胞中的表达显著降低。这说明 miR-152 可能对肺癌 A549 细胞有影响作用。笔者进一步构建 miR-152 过表达和沉默的肺癌 A549 细胞。qPCR 结果显示,与 miR-NC 组比较,miR-152 mimics 组的 miR-152 表达量显著增加,miR-152 inhibitor 组表达量明显减少。这说明 miR-152 过表达和沉默的肺癌 A549 细胞模型构建成功。细胞克隆和 Transwell 小室实验结果显示,肺癌 A549 细胞中 miR-152 过表达后,其增殖和侵袭能力显著降低,而 miR-152 沉默后,其增殖和侵袭能力明显增加。与 miR-NC 组比较,miR-152 mimics 组的自噬标志蛋白 LC3B II/I 和 beclin1 增加,而 p62 表达量受到抑制,但 miR-152 inhibitor 组的结果与之相反。这说明 miR-152 能激活肺癌 A549 细胞的自噬,从而降低其增殖和侵袭能力。

FGF2 属于一种重要的神经营养因子和血管生成因子,能促进细胞的增殖和基因表达等^[14]。FGF2 通过调控肿瘤血管生成,从而参与肿瘤的生长、侵袭和转移过程^[16]。本研究发现,与正常上皮细胞比较,肺癌 A549 细胞中的 FGF2 的表达显著增加。进一步通过过表达肺癌 A549 细胞中的 FGF2,观察 FGF2 对肺癌 A549 细胞的影响。qPCR 结果显示,与 pcDNA3.1-NC 组比较,pcDNA3.1-FGF2 组中的 FGF2 表达量增加,说明肺癌 A549 细胞过表达 FGF2 模型构建成功。细胞克隆和 Transwell 小室实验结果显示,肺癌 A549 细胞中 FGF2 过表达后,其增殖和侵袭能力显著增加。这说明 FGF2 的过表达激活肺癌 A549 细胞的增殖和侵袭能力。本研究进一步证实,过表达 FGF2 后,肺癌 A549 细胞中的 FGF2 和 p62 明显增加,LC3B II/I 和 beclin1 表达受到抑制。这提示 FGF2 抑制自噬,从而激活肺癌 A549 细胞的增殖和侵袭。

越来越多研究发现,miRNA 与 mRNA 相互竞争,从而影响靶基因的转录^[6]。研究表明,miR-152 通过与神经纤维网蛋白 1 相互竞争,从而抑制非小细胞肺癌细胞的增殖和侵袭能力^[12]。本研究通过 TargetScan 预测 miR-152 与 FGF2 具有特异性结合,双荧光报告基因实验进一步验证 miR-152 通过

与 FGF2 的 3' UTR 区域直接结合从而负调控 FGF2 的表达。为了进一步验证 miR-152 靶向 FGF2 对肺癌 A549 细胞的影响,本研究在过表达 miR-152 的基础上过表达 FGF2 基因,与 miR-152 过表达组比较,其细胞自噬能力明显抑制,而增殖和侵袭能力显著增加。这也提示,过表达 FGF2 基因可逆转过表达 miR-152 对肺癌 A549 细胞增殖和侵袭的抑制作用,进一步证实 FGF2 是 miR-152 的靶基因。

综上所述,miR-152 可靶向 FGF2 调控肺癌 A549 细胞自噬,从而影响 A549 细胞增殖和侵袭能力,为肺癌的靶向治疗和诊断提供潜在靶点。

参考文献:

- [1] GANDHI L, RODRÍGUEZ-ABREU D, GADGEEL S, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy in metastatic non-small-cell lung cancer[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(22):2078-2092.
- [2] CARBONE D P, RECK M, PAZ-ARES L, et al. First-line nivolumab in stage IV or recurrent non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(25):2415-2426.
- [3] HELLMANN M D, CIULEANU T E, PLUZANSKI A, et al. Nivolumab plus ipilimumab in lung cancer with a high tumor mutational burden[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(22):2093-2104.
- [4] YUN C W, LEE S H. The roles of autophagy in cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11):3466.
- [5] CUI Z, LIU G, KONG D. miRNA-27a promotes the proliferation and inhibits apoptosis of human pancreatic cancer cells by Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(2):755-763.
- [6] LEE E, ITO K, ZHAO Y, et al. Inferred miRNA activity identifies miRNA-mediated regulatory networks underlying multiple cancers [J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(1):96-105.
- [7] RUPAIMOOLE R, SLACK F J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(3):203-222.
- [8] MOLLAEI H, SAFARALIZADEH R, ROSTAMI Z. MicroRNA replacement therapy in cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8):12369-12384.
- [9] HETTA H F, ZAHRAN A M, SHAFIK E A, et al. Circulating miRNA-21 and miRNA-23a expression signature as potential biomarkers for early detection of non-small-cell lung cancer[J]. *Microna*, 2019, 8(3):206-215.
- [10] WANG S, WANG Z, WANG Q, et al. Clinical significance of the expression of miRNA-21, miRNA-31 and miRNA-let7 in patients with lung cancer[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2019, 26(4):777-781.
- [11] CHEN S, LI P, LI J, et al. MiR-144 inhibits proliferation and induces apoptosis and autophagy in lung cancer cells by targeting TIGAR[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(3):997-1107.
- [12] ZHANG Y J, LIU X C, DU J, et al. MiR-152 regulates metastases of non-small cell lung cancer cells by targeting neuropilin-1[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(11):14235-14240.
- [13] LI N, HAO W, YANG J, et al. Long non-coding RNA colon cancer-associated transcript-1 regulates tumor cell proliferation and inva-

- [5] KOZOMARA A, GRIFFITHS-JONES S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(Database issue): D68-D73.
- [6] HA M, KIM V N. Regulation of microRNA biogenesis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(8): 509-524.
- [7] MATSUZAKI K, FUJITA K, TOMIYAMA E, et al. MiR-30b-3p and miR-126-3p of urinary extracellular vesicles could be new biomarkers for prostate cancer [J]. *Transl Androl Urol*, 2021, 10(4): 1918-1927.
- [8] SHIN S, PARK Y H, JUNG S H, et al. Urinary exosome microRNA signatures as a noninvasive prognostic biomarker for prostate cancer [J]. *NPJ Genom Med*, 2021, 6(1): 45.
- [9] FABRIS L, CEDER Y, CHINNAIYAN A M, et al. The potential of micrornas as prostate cancer biomarkers [J]. *Eur Urol*, 2016, 70(2): 312-322.
- [10] FREDSE J, RASMUSSEN A K I, THOMSEN A R, et al. Diagnostic and prognostic microRNA biomarkers for prostate cancer in cell-free urine [J]. *Eur Urol Focus*, 2018, 4(6): 825-833.
- [11] LIU R S C, OLKHOV-MITSEL E, JEYAPALA R, et al. Assessment of serum microrna biomarkers to predict reclassification of prostate cancer in patients on active surveillance [J]. *J Urol*, 2018, 199(6): 1475-1481.
- [12] SUN Y, CHEN G, HE J, et al. Clinical significance and potential molecular mechanism of miRNA-222-3p in metastatic prostate cancer [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 325-340.
- [13] ANDERSEN C L, JENSEN J L, ORNTOF T F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(15): 5245-5250.
- [14] FREDSE J, RASMUSSEN A K I, MOURITZEN P, et al. A five-microRNA model (pCaP) for predicting prostate cancer aggressiveness using cell-free urine [J]. *Int J Cancer*, 2019, 145(9): 2558-2567.
- [15] ZHANG S, LIU C, ZOU X, et al. MicroRNA panel in serum reveals novel diagnostic biomarkers for prostate cancer [J]. *PeerJ*, 2021, 9: e11441.
- [16] LIN Y, CAO H, TIAN Y, et al. MiR-24-3p stimulates migration, invasion and proliferation of prostate cancer cells by targeting suppressor of cytokine signaling 6 [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(3): 1803-1810.
- [17] LI X, HAN X, WEI P, et al. Knockdown of lncRNA CCAT1 enhances sensitivity of paclitaxel in prostate cancer via regulating miR-24-3p and FSCN1 [J]. *Cancer Biol Ther*, 2020, 21(5): 452-462.
- [18] KREBS M, SOLIMANDO A G, KALOGIROU C, et al. MiR-221-3p regulates VEGFR2 expression in high-risk prostate cancer and represents an escape mechanism from sunitinib *in vitro* [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(3): 670-677.

(2021-08-05 收稿)

(上接第 150 页)

- sion of non-small-cell lung cancer through suppressing miR-152 [J]. *Geriatr Gerontol Int*, 2020, 20(6): 629-636.
- [14] SAHORES A, FIGUEROA V, MAY M, et al. Increased high molecular weight FGF2 in Endocrine-Resistant breast cancer [J]. *Horm Cancer*, 2018, 9(5): 338-348.
- [15] YUAN H, LI Z M, SHAO J, et al. FGF2/FGFR1 regulates autophagy in FGFR1-amplified non-small cell lung cancer cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 72.
- [16] CHEN Y, ZHU G D, WU K J, et al. FGF2-mediated reciprocal tumor cell-endothelial cell interplay contributes to the growth of chemoresistant cells: a potential mechanism for superficial bladder cancer recurrence [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(4): 4313-4321.
- [17] SUGARBAKER D J, DASILVA M C. Diagnostic workup of lung cancer [J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2011, 20(4): 667-679.
- [18] PLANCHARD D, POPAT S, KERR K, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [J]. *Ann Oncol*, 2018, 29 (Suppl 4): iv192-iv237.
- [19] HIRSCH F R, SCAGLIOTTI G V, MULSHINE J L, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments [J]. *Lancet*, 2017, 389(1006): 299-311.
- [20] LANGER R, NEPL C, KELLER M D, et al. Expression analysis of autophagy related markers LC3B, p62 and HMGB1 indicate an Autophagy-independent negative prognostic impact of high p62 expression in pulmonary squamous cell carcinomas [J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10(9): 281.
- [21] GOZUACIK D, AKKOC Y, OZTURK D G, et al. Autophagy-regulating microRNAs and cancer [J]. *Front Oncol*, 2017, 7: 65.
- [22] KANEKURA K, NISHI H, ISAKA K, et al. MicroRNA and gynecologic cancers [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2016, 42(6): 612-617.
- [23] YOU W, ZHANG X, JI M, et al. MiR-152-5p as a microRNA passenger strand special functions in human gastric cancer cells [J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(6): 644-653.
- [24] ZHOU J, ZHANG Y, QI Y, et al. MicroRNA-152 inhibits tumor cell growth by directly targeting RTKN in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(2): 1227-1234.
- [25] LI L W, XIAO H Q, MA R, et al. miR-152 is involved in the proliferation and metastasis of ovarian cancer through repression of ERBB3 [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(3): 1529-1535.

(2021-06-15 收稿)