

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.23.007

miR-1204 表达对非小细胞肺癌细胞增殖凋亡、上皮间质转化和 MAPKs 信号通路的影响 *

闫 婧 张小平 张 新 武志宏 王秀华

(山西医科大学附属吕梁医院呼吸与危重症医学科 山西 吕梁 033000)

摘要 目的:探究微小 RNA-1204(miR-1204)表达对非小细胞肺癌细胞增殖凋亡、上皮间质转化(EMT)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)信号通路的影响。**方法:**将人非小细胞肺癌细胞 A549 随机分为 miR-1204 组(转染 miR-1204mimic 质粒)、NC 组(转染空载质粒)和对照组(仅加转染试剂)。采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞增殖情况,采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测细胞 E-钙黏蛋白(E-cad)、N-钙黏蛋白(N-cad)和波形蛋白(Vim)mRNA 的表达水平。采用 RT-qPCR 和蛋白免疫印迹(WB)法检测细胞 p-P38、P38、p-ERK、ERK、p-JNK、JNK mRNA 和蛋白的表达水平。**结果:**培养 12、24、48 h,miR-1204 组细胞增殖抑制率均高于对照组和 NC 组同期($P<0.05$),对照组与 NC 组同期的细胞增殖抑制率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。但三组细胞随着培养时间延长,细胞增殖抑制率均增加,两两时间点组内比较均有差异($P<0.05$)。miR-1204 组细胞凋亡率高于对照组和 NC 组($P<0.05$)。miR-1204 组 E-cad mRNA 的表达水平高于对照组和 NC 组($P<0.05$),N-cad、Vim mRNA 的表达水平低于对照组和 NC 组($P<0.05$)。miR-1204 组 p-P38、p-ERK、p-JNK mRNA 和蛋白的表达水平均低于对照组和 NC 组($P<0.05$)。**结论:**上调 miR-1204 的表达可以抑制非小细胞肺癌细胞的增殖,促进其凋亡,还可以抑制其 EMT,该作用可能是通过抑制 MAPKs 信号通路实现的。

关键词:非小细胞肺癌;miR-1204;细胞增殖;细胞凋亡;上皮间质转化

中图分类号:R-33;R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)23-4435-06

Effects of miR-1204 Expression on Proliferation and Apoptosis, Epithelial Mesenchymal Transition and MAPKs Signaling Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer Cells*

YAN Jing, ZHANG Xiao-ping, ZHANG Xin, WU Zhi-hong, WANG Xiu-hua

(Department of Respiratory and Critical Illness Medicine, Lvliang Hospital Affiliated to Shanxi Medical University,
Lüliang, Shanxi, 033000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of microRNA-1204 (miR-1204) expression on proliferation and apoptosis, epithelial mesenchymal transition (EMT) and mitogen activated protein kinases (MAPKs) signaling pathway in non-small cell lung cancer cells. **Methods:** Human non-small cell lung cancer A549 cells were randomly divided into miR-1204 group (transfected with miR-1204mimic plasmid), NC group (transfected with empty plasmid) and control group (only with transfection reagent). Cell proliferation was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Cell apoptosis was detected by flow cytometry, and the expression levels of E-cadherin (E-cad), N-cadherin (N-cad) and vimentin (Vim) mRNA were detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The expression levels of p-P38, P38, p-ERK, ERK, p-JNK and JNK mRNA and protein were detected by RT-qPCR and Western blot (WB). **Results:** 12, 24, and 48 h after culture, the cell proliferation inhibition rate in the miR-1204 group was higher than that in the control group and NC group at the same period ($P<0.05$). There was no significant difference in the cell proliferation inhibition rate between the control group and the NC group at the same period ($P>0.05$). However, with the prolongation of culture time, the cell proliferation inhibition rate in the three groups increased, and there were differences between the two time points in the groups ($P<0.05$). The cell apoptosis rate in the miR-1204 group was higher than that in the control group and NC group ($P<0.05$). The expression level of E-cad mRNA in the miR-1204 group was higher than that in the control group and NC group ($P<0.05$), the expression levels of N-cad and Vim mRNA in the miR-1204 group were lower than those in the control group and NC group ($P<0.05$). The expression levels of p-P38, p-ERK and p-JNK mRNA and protein in the miR-1204 group were lower than those in control group and NC group ($P<0.05$). **Conclusion:** Up regulating the expression of miR-1204 can inhibit the proliferation and promote the apoptosis of non-small cell lung cancer cells, and also inhibit their EMT, this effect may be achieved by inhibiting MAPKs signaling pathway.

Key words: Non-small cell lung cancer; miR-1204; Cell proliferation; Cell apoptosis; Epithelial mesenchymal transition

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)23-4435-06

* 基金项目:山西省基础研究计划项目(20150211068)

作者简介:闫婧(1982-),女,本科,主治医师,研究方向:呼吸系统疾病,E-mail: yanjing121314@163.com

(收稿日期:2022-05-31 接受日期:2022-06-27)

前言

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率位居所有癌症之首,其中超过 80%的肺癌都属于非小细胞肺癌,大部分患者在发现时已处于中晚期^[1,2]。尽管目前治疗技术已经取得了一定进展,但治疗结果仍不理想,患者 5 年内生存率仍较低^[2]。靶向治疗是近年来的研究热点,越来越多的学者将非小细胞肺癌的治疗重点转移到靶向治疗上来^[3]。MicroRNAs (miRNAs)是一类高度保守的、内源性表达的小非编码 RNA,它们通过与相应靶信使 RNA(mRNA)的 3'-非翻译区(3'-UTR)直接相互作用以及通过 miRNA 切割在转录后基因表达中发挥主要作用^[4]。多项研究表明^[5,6],miRNA 是肿瘤的启动子或抑制子,在某些癌症的转移中起关键作用,其中包括胃癌、乳腺癌、肝细胞癌、胰腺癌等^[7,8]。miR-1204 是一种新的癌症相关 miRNA,在多种癌症中表达异常^[9,10]。Jiang 等研究中显示^[11],高 miR-1204 表达与非小细胞肺癌淋巴结转移、TNM 分期高度相关,且对裸鼠成瘤及非小细胞肺癌细胞的增殖存在关系。丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)信号通路在非小细胞肺癌的发生发展中具有重要作用,并呈现异常激活状态^[12]。上皮间质转化(EMT)是肿瘤发生的重要过程,与肿瘤细胞的转移和入侵紧密相关。但目前为止,关于 miR-1204 表达对非小细胞肺癌细胞增殖凋亡、EMT 和 MAPKs 信号通路的影响等的研究鲜有报道,因此本研究将人非小细胞肺癌 A549 细胞中的 miR-1204 进行过表达,探究其对非小细胞肺癌细胞增殖、凋亡、EMT 和 MAPKs 信号通路的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂与仪器

人非小细胞肺癌 A549 细胞购于武汉普诺赛生命科技有限公司。10%胎牛血清购自广州赛业生物科技有限公司。链霉素和青霉素标准品均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。二甲基亚砜购自北京伊诺凯科技有限公司。Lipofectamine™2000 转染试剂购于美国 Invitrogen 公司。MTT Assay Kit 试剂盒(MTT)购于北京索莱宝科技有限公司。Trizol 试剂盒购自上海爱必信生物科技有限公司。Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司。实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)试剂盒(SYBR Green)购于上海联迈生物工程有限公司。兔抗小鼠 p-P38、P38、p-ERK、ERK、p-JNK、JNK 一抗购自美国 Abcam 公司。辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗均购于爱必信(上海)生物科技有限公司。

CO₂ 培养箱购于深圳市瑞沃德生命科技有限公司。BSF-58 荧光显微镜购于上海巴拓仪器有限公司。ST-360 型生物酶标

仪购于上海科华生物工程股份有限公司。Cyttek NL-CLC 全光谱流式细胞仪购于上海聚慕医疗器械有限公司。LF50 倒置荧光显微镜购于广州市莱特光电技术有限公司。BK-CW16 型 RT-qPCR 仪购于山东博科科学仪器有限公司。Qubit4.0 核酸定量仪荧光计购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司。Invitrogen iBright 成像系统购于美国赛默飞世尔科技有限公司。

1.2 细胞培养分组及转染

人非小细胞肺癌 A549 细胞常规复苏后接种于与含 10%胎牛血清、100 μg/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素的 RPMI-1640 培养基中,在 CO₂ 培养箱(37℃、95%湿度、5%CO₂)中培养,隔天换液,待细胞生长至对数生长期时,随机分为 miR-1204 组、NC 组和对照组,每组设置 3 个复孔。以 miR-1204mimic 质粒转染 miR-1204 组细胞,空载质粒转染 NC 组细胞,对照组中加入等量转染试剂,操作过程严格按照转染试剂盒进行。转染后继续培养 48h,并在 BSF-58 荧光显微镜下观察转染情况,细胞转染率 = 视野中转染细胞数 / 视野中全部细胞数 × 100%。

1.3 MTT 法检测细胞增殖情况

取 1.2 中各组稳点转染 A549 细胞,分别接种于 96 孔板中,每孔 0.2 mL,细胞密度为 1 × 10⁵ 个 / 孔,分别孵育 12 h、24 h、48 h,每组设置 3 个复孔。孵育结束后各孔中加入 5 g/L MTT 溶液 10 μL,避光孵育 4 h,再加入二甲基亚砜 150 μL,震荡混匀,采用 ST-360 型生物酶标仪检测各孔于 490nm 处的光密度值(OD),计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率 = (1 - 实验孔 OD 值) / 对照组 OD 值 × 100%。

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡情况

取 1.2 中各组稳点转染 A549 细胞,采用 0.25%胰酶消化后短暂离心,弃上清,用磷酸盐缓冲液(PBS)吹散细胞,分别取各组细胞悬液 0.3 mL,加入 5 μL Annexin V-FITC 和碘化丙啶(PI)溶液,轻摇混匀,静置 15 min,采用 Cyttek NL-CLC 全光谱流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。

1.5 RT-qPCR 检测细胞 E-钙黏蛋白(E-cad)、N-钙黏蛋白(N-cad)和波形蛋白(Vim)mRNA 的表达水平

取 1.2 中各组稳点转染 A549 细胞,采用 0.25%胰酶消化后收集于 1.5 mL 离心管中,用 Trizol 试剂盒提取细胞中总 mRNA,采用 Qubit4.0 核酸定量仪荧光计检测提取出的 mRNA 浓度,用一步法 RT-qPCR 试剂盒先进行逆转录,再以互补脱氧核糖核酸(cDNA)为模板进行 qRT-PCR 扩增,引物序列见表 1。反应条件如下:42℃ 30 min (1 ×),94℃ 5 min (1 ×),95℃ 15 s + 60℃ 1 min(35 ×)。以 GAPDH 为内参基因,采用 2^{-ΔΔCt} 计算目的基因的相对表达量。

表 1 目标基因引物序列
Table 1 Target gene primer sequence

Target gene	Upstream primer	Downstream primer	Fragment length(bp)
E-cad	GCAGGCATTAGCAGGTAG	TGACCTAGCATTGACA	458
N-cad	TAGACATAGCATTGACA	TTGACATTGCAACAG	362
Vim	GCATAGACATAGACAAA	TAGACACATAGCACA	481
GAPDH	GCATAGCACACGAATA	GACATAGACATGCACA	225

1.6 RT-qPCR 检测细胞 p-P38、P38、p-ERK、ERK、p-JNK、JNK mRNA 的表达水平

取 1.2 中各组稳点转染 A549 细胞,采用 0.25%胰酶消化后收集于 1.5 mL 离心管中,用 Trizol 试剂盒提取细胞中总 mRNA,

采用 Qubit4.0 核酸定量仪荧光计检测提取出的 mRNA 浓度,用一步法 RT-qPCR 试剂盒先进行逆转录,再以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 扩增,引物序列见表 2。反应条件同 1.5,以 GAPDH 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算目的基因的相对表达量。

表 2 目标基因引物序列

Table 2 Target gene primer sequence

Target gene	Upstream primer	Downstream primer	Primer length(bp)
p-P38	TGACCAGTACATTGACA	CATGCACCTAGCAGGAT	336
P38	TAGCCATGACCATGCACCA	TAGCCATTAGCACATAGAA	336
p-ERK	CCGATAGCCAGATGACA	TTGCATGCCATAGCACA	425
ERK	AACTAGCATAGCCACCA	CGTTGCAGTAGCAAGA	425
p-JNK	TGCAGCAGTTAGCACACG	TAGCCCACATGACCAGA	631
JNK	TGCAGTGACAGTAGACAA	TAGACGATTAGACGTAGA	631
GAPDH	GCATAGCACACGAATA	GACATAGACATGCACA	225

1.7 Western blot 检测细胞 p-P38、P38、p-ERK、ERK、p-JNK、JNK 蛋白的表达水平

取 1.2 中各组稳点转染 A549 细胞,弃去培养液,采用 RIPA 裂解液将细胞裂解以提取总蛋白。将提取好的蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,结束后将目的蛋白转移至聚偏氟乙烯膜上,依次进行封闭、一抗孵育(1:500 稀释)、二抗孵育(1:2000 稀释),最后使用 ELC 化学发光试剂显色,用 Image J1.9.1 软件分析,以 GAPDH 为内参蛋白计算目的蛋白的相对表达量。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件分析数据,GraphPad prism 绘制柱状图,符合正态分布的计量资料均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多样本计量资料比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验;不同时间点测量资料比较采用重复测量方差分析,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 细胞转染情况

miR-1204 转染 48 h 后转染率 $\geq 80\%$,转染成功。见图 1。

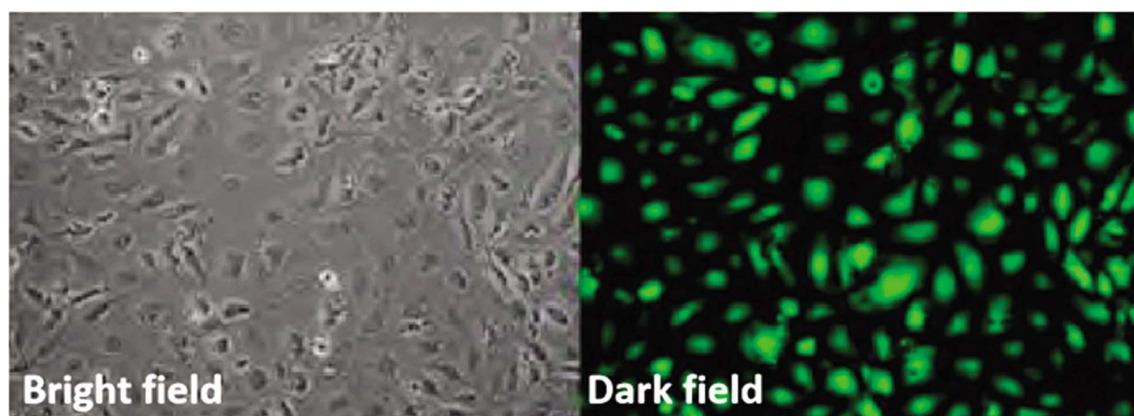


图 1 转染荧光图片($\times 200$)

Fig.1 Transfection fluorescence picture($\times 200$)

2.2 各组细胞增殖抑制率的比较

培养 12、24、48 h,miR-1204 组细胞增殖抑制率均高于对照组和 NC 组同期($P<0.05$),对照组与 NC 组同期的细胞增殖抑制率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。三组细胞随着培养时间延长,细胞增殖抑制率均增加($P<0.05$)。见表 3。

2.3 各组细胞凋亡率的比较

对照组、NC 组和 miR-1204 组细胞凋亡率分别为($28.31\pm$

3.52% 、($27.05\pm 3.17\%$ 、($55.06\pm 4.11\%$),差异有统计学意义($F=57.271, P=0.000$);miR-1204 组细胞凋亡率高于对照组和 NC 组($P<0.05$)。见图 2。

2.4 各组细胞 E-cad、N-cad、Vim mRNA 的表达水平的比较

miR-1204 组 E-cad mRNA 的表达水平高于对照组和 NC 组($P<0.05$),N-cad、Vim mRNA 的表达水平低于对照组和 NC 组($P<0.05$)。对照组和 NC 组中 E-cad、N-cad 和 Vim mRNA

的表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

表 3 各组细胞增殖抑制率的比较($\bar{x} \pm s, \%, n=3$)

Table 3 Comparison of cell proliferation inhibition rate in each group($\bar{x} \pm s, \%, n=3$)

Groups	12 h	24 h	48 h
NC group	15.33 $\pm$ 1.02	20.31 $\pm$ 1.61 [@]	25.14 $\pm$ 2.08 ^{@&}
Control group	14.91 $\pm$ 1.13	19.88 $\pm$ 1.45 [@]	25.06 $\pm$ 1.97 ^{@&}
miR-1204 group	20.31 $\pm$ 1.54 ^{*#}	36.85 $\pm$ 2.42 ^{*#&}	58.36 $\pm$ 3.02 ^{*#&}
F	F between groups=17.319, F time=191.526, F interaction=79.860		
P	P between groups=0.003, P time=0.000, P interaction=0.000		

Note: compared with control group, * $P<0.05$. Compared with NC group, # $P<0.05$. Compared with 12 h, @ $P<0.05$. Compared with 24 h, & $P<0.05$.

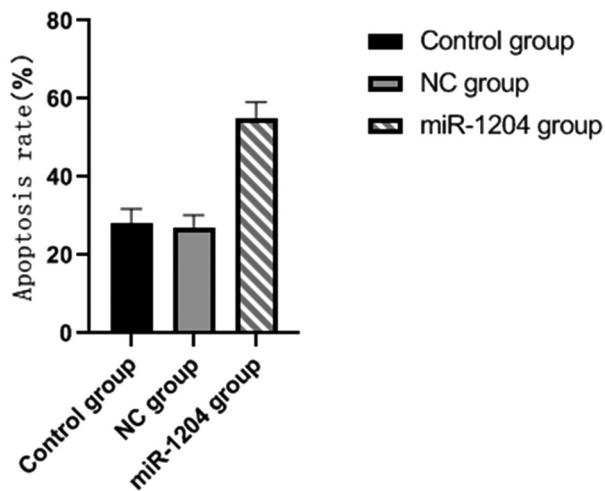


图 2 各组细胞凋亡率的比较

Fig.2 Comparison of cell apoptosis rate of each group

2.5 细胞 p-P38、P38、p-ERK、ERK、p-JNK、JNK mRNA 的表达水平的比较

对照组、NC 组和 miR-1204 组细胞 P38、ERK、JNK mRNA 的表达水平组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。miR-1204 组 p-P38、p-ERK、p-JNK mRNA 的表达水平低于对照组和 NC 组 ($P<0.05$)。对照组和 NC 组中细胞 p-P38、p-ERK、p-JNK mRNA 的表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 5。

2.6 细胞 p-P38、P38、p-ERK、ERK、p-JNK、JNK 蛋白的表达水平的比较

对照组、NC 组和 miR-1204 组细胞 P38、ERK、JNK 蛋白的表达水平组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。miR-1204 组 p-P38、p-ERK、p-JNK 蛋白的表达水平低于对照组和 NC 组 ($P<0.05$)。对照组和 NC 组中细胞 p-P38、p-ERK、p-JNK 蛋白的表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 6、图 3。

表 4 各组细胞 E-cad、N-cad、Vim mRNA 的表达水平的比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Comparison of expression levels of E-cad, N-cad and Vim mRNA in cells of each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

Groups	E-cad mRNA	N-cad mRNA	Vim mRNA
NC group	0.18 $\pm$ 0.05	0.51 $\pm$ 0.04	0.64 $\pm$ 0.01
Control group	0.18 $\pm$ 0.04	0.50 $\pm$ 0.05	0.65 $\pm$ 0.02
miR-1204 group	0.46 $\pm$ 0.02 ^{*#}	0.23 $\pm$ 0.02 ^{*#}	0.27 $\pm$ 0.06 ^{*#}
F	52.267	50.467	102.951
P	0.000	0.000	0.000

Note: compared with control group, * $P<0.05$. Compared with NC group, # $P<0.05$.

表 5 各组细胞 p-P38、P38、p-ERK、ERK、p-JNK、JNK mRNA 的表达水平的比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Comparison of expression levels of p-P38, P38, p-ERK, ERK, p-JNK and JNK mRNA in cells of each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

Groups	P38 mRNA	p-P38 mRNA	ERK mRNA	p-ERK mRNA	JNK mRNA	p-JNK mRNA
NC group	0.71 $\pm$ 0.11	0.73 $\pm$ 0.12	0.66 $\pm$ 0.07	0.63 $\pm$ 0.09	0.79 $\pm$ 0.14	0.75 $\pm$ 0.13
Control group	0.72 $\pm$ 0.10	0.72 $\pm$ 0.11	0.67 $\pm$ 0.12	0.65 $\pm$ 0.07	0.79 $\pm$ 0.15	0.76 $\pm$ 0.12
miR-1204 group	0.71 $\pm$ 0.09	0.31 $\pm$ 0.05 ^{*#}	0.65 $\pm$ 0.10	0.25 $\pm$ 0.06 ^{*#}	0.77 $\pm$ 0.13	0.27 $\pm$ 0.04 ^{*#}
F	0.010	17.824	0.031	27.542	0.020	21.456
P	0.990	0.003	0.970	0.001	0.980	0.002

Note: compared with control group, * $P<0.05$. Compared with NC group, # $P<0.05$.

表 6 各组细胞 p-P38、P38、p-ERK、ERK、p-JNK、JNK 蛋白的表达水平的比较($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 6 Comparison of expression levels of p-P38, P38, p-ERK, ERK, p-JNK and JNK proteins in cells of each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Groups	P38	p-P38	ERK	p-ERK	JNK	p-JNK
NC group	0.54± 0.08	0.52± 0.07	0.48± 0.07	0.25± 0.06	0.58± 0.09	0.52± 0.08
Control group	0.51± 0.06	0.53± 0.08	0.49± 0.05	0.26± 0.05	0.57± 0.08	0.50± 0.05
miR-1204 group	0.50± 0.07	0.21± 0.03**	0.49± 0.06	0.09± 0.01**	0.57± 0.08	0.20± 0.03**
F	0.262	24.418	0.027	13.210	0.014	29.510
P	0.778	0.001	0.973	0.006	0.986	0.001

Note: compared with control group, * $P<0.05$. Compared with NC group, ** $P<0.05$.

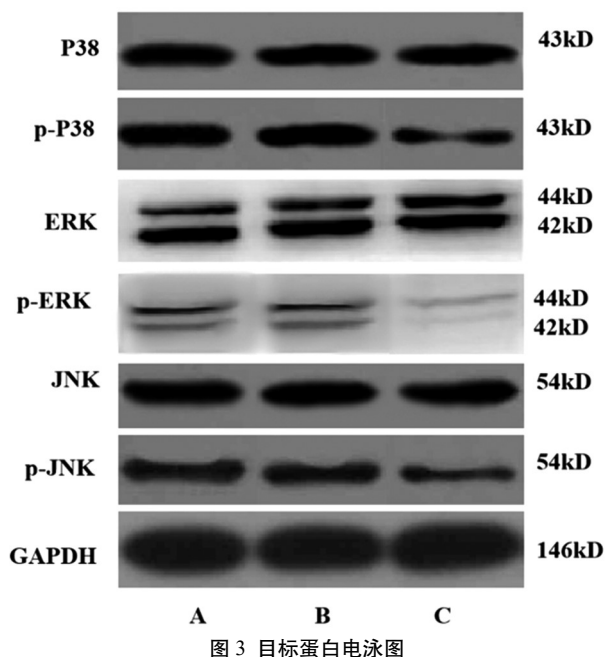


图 3 目标蛋白电泳图

Fig.3 Electropherogram of target protein

Note: A: NC group. B: control group. C: miR-1204 group.

3 讨论

非小细胞肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,具有高发病率和死亡率的特点^[13]。由于多数患者发现时已经处于中晚期,因此化疗和放疗常作为临床主要治疗手段,但治疗效果往往欠佳^[14,15]。肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移是阻碍其疗效的主要原因。多项研究表明,非编码区 miRNA 的异常表达在癌症的发生和进展中发挥着关键作用,其可以靶向作用于编码区基因的转录、翻译过程,调节细胞的增殖与凋亡等多种生物学过程^[16,17]。近年来,一些 miRNA 在肺癌的诊断、治疗和预后标志物的研究中获得重要进展,miRNA 已成为预测肺癌治疗药物反应性等精准医学研究的热点^[18]。MAPKs 信号通路在非小细胞肺癌等多种肿瘤细胞中呈现活化状态,在细胞内可由苏氨酸和酪氨酸激活,一旦活化则由细胞浆进入细胞核,将细胞外信号传递至细胞核内靶基因,参与细胞凋亡与增殖等细胞生物学过程。但目前关于 miR-1204 和 MAPKs 信号通路在非小细胞肺癌中的关系尚不明确,因此本文对其进行探究。

本研究结果显示,miR-1204 组细胞增殖抑制率和细胞凋亡率均高于对照组和 NC 组,说明上调非小细胞肺癌细胞中 miR-1204 可以抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。miR-1204 参与多

种复杂的生物学过程,在肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡、侵袭中具有重要作用^[19]。Qian 等研究显示^[20],过表达 miR-1204 可以促进非小细胞肺癌细胞的凋亡,这与本研究结果一致,提示非小细胞肺癌细胞中 miR-1204 表达水平可以调控细胞增殖和细胞凋亡。EMT 与癌症的多种恶性行为有关,包括增殖、侵袭和转移^[21]。EMT 过程会导致上皮细胞失去极性而获得较高的侵袭能力,同时 EMT 关键基因的转录、翻译过程受到非编码区 miRNAs 调控,因此 miRNAs 与肿瘤细胞的发生发展密切相关。本研究结果显示,miR-1204 组 E-cad mRNA 的表达水平高于对照组和 NC 组,N-cad、Vim mRNA 的表达水平低于对照组和 NC 组,说明上调 miR-1204 可以抑制非小细胞肺癌细胞发生 EMT。N-cad 和 Vim 是肿瘤细胞间充质转化的标志物,E-cad 是上皮间质转化的标志物,三者是从分子水平检测 EMT 的常用标志物^[22,23]。在发生 EMT 的肿瘤细胞中,N-cad 和 Vim 的表达上调,E-cad 的表达下降^[24]。Peng 等研究显示^[25],miR-1204 在紫杉醇抗性鼻咽癌细胞中低表达,高表达 miR-1204 后癌细胞对紫杉醇敏感性增加,证实 miR-1204 过表达抑制了癌细胞恶性行为学。因此,上调 miR-1204 可以抑制非小细胞肺癌细胞发生 EMT。

本研究结果显示,miR-1204 组 p-P38、p-ERK、p-JNK mRNA 和蛋白的表达水平低于对照组和 NC 组,提示上调 miR-1204 会抑制非小细胞肺癌细胞 MAPKs 信号通路的活化。肿瘤的发生和发展与细胞的信号传递密切相关,MAPKs 信号通路是细胞内重要的信号传导系统之一,参与细胞的增殖、凋亡与侵袭^[26,27]。MAPKs 信号通路包含 3 条信号通路,其中 ERK 信号通路是 MAPKs 的经典信号通路^[28],活化的 ERK 可以进入细胞核激活激酶与转录因子,有研究显示其在多种肿瘤细胞中被激活,可以促进肿瘤细胞的增殖与侵袭^[29]。另两条是 JNK/SAPK 信号通路和 P38-MAPK 信号通路,已有研究显示这两条信号通路与肺癌细胞的生长紧密相关^[30]。多种细胞因子均可激活 JNK,活化的 JNK 可以与转录因子结合,促进细胞增殖^[31];活化的 P38-MAPK 可以调节下游凋亡基因转录,抑制细胞凋亡的蛋白。过表达 miR-1204 后,MAPKs 的 3 条信号通路中的蛋白磷酸化均被抑制,其下游相关基因的转录和翻译过程被抑制,非小细胞肺癌细胞恶性行为学减弱,进而抑制非小细胞肺癌细胞增殖^[32]。

综上所述,上调 miR-1204 的表达可以通过抑制 MAPKs 信号通路发挥抑制非小细胞肺癌细胞增殖、促进其凋亡、抑制其 EMT 的作用。但 miR-1204 能否通过其他信号通路调控非小细胞肺癌增殖、凋亡及 EMT 过程尚不明确,仍需开展更深一步

的研究探讨,为靶向治疗非小细胞肺癌提供实验依据。

参考文献(References)

- [1] Wu F, Wang L, Zhou C. Lung cancer in China: current and prospect [J]. *Curr Opin Oncol*, 2021, 33(1): 40-46
- [2] 苏春霞, 周彩存. 晚期非小细胞肺癌免疫治疗现状及未来方向[J]. *中国癌症杂志*, 2022, 32(6): 478-486
- [3] Sankar K, Gadgil SM, Qin A. Molecular therapeutic targets in non-small cell lung cancer [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2020, 20(8): 647-661
- [4] Ali Syeda Z, Langden SSS, Munkhul C, et al. Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1723-1736
- [5] Alamoudi AA, Alnoury A, Gad H. miRNA in tumour metabolism and why could it be the preferred pathway for energy reprogramming [J]. *Brief Funct Genomics*, 2018, 17(3): 157-169
- [6] 庞明睿, 杜洋, 喻希, 等. 长链非编码 RNA-微小 RNA-mRNA 调控网络在晚期膀胱癌的发展中的作用 [J]. *中华实验外科杂志*, 2021, 38(6): 1018-1022
- [7] 张远, 熊莹, 喻冬柯. 亚洲人群肝细胞癌 mRNA-miRNA 表达谱整合分析挖掘疾病治疗靶点 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2020, 39(2): 120-124
- [8] Pan G, Liu Y, Shang L, et al. EMT-associated microRNAs and their roles in cancer stemness and drug resistance [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2021, 41(3): 199-217
- [9] Li Z, Chen Z, Feng Y, et al. CircMMP11 acts as a ce-circRNA in breast cancer progression by regulating miR-1204 [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(6): 2585-2599
- [10] Wang L, Sun L, Wang Y, et al. miR-1204 promotes hepatocellular carcinoma progression through activating MAPK and c-JNK/AP1 signaling by targeting ZNF418[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(7): 1514-1522
- [11] Jiang W, He Y, Shi Y, et al. MicroRNA-1204 promotes cell proliferation by regulating PITX1 in non-small-cell lung cancer [J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(3): 253-264
- [12] Tsai MH, Liu JF, Chiang YC, et al. Correction: Artocarpin, an isoprenyl flavonoid, induces p53-dependent or independent apoptosis via ROS-mediated MAPKs and Akt activation in non-small cell lung cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2019, 10(36): 3430-3445
- [13] 温少迪, 沈波. 非小细胞肺癌免疫治疗作用机制及临床研究现状 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(11): 1739-1746
- [14] Skřičková J, Kadlec B, Vencířek O. Nematobunčňý karcinom plic [Non-small cell lung cancer][J]. *Vnitr Lek*, 2018, 63(11): 861-874
- [15] 刘祺, 周政涛, 冯正富, 等. 适形调强放射治疗同步 TP 化疗对局部晚期非小细胞肺癌患者免疫功能、全身炎症反应指标和血清肿瘤标志物的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2021, 21(17): 3350-3354
- [16] Hill M, Tran N. miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer[J]. *Dis Model Mech*, 2021, 14(4): dmm047662
- [17] Semina EV, Rysenkova KD, Troyanovskiy KE, et al. MicroRNAs in Cancer: From Gene Expression Regulation to the Metastatic Niche Reprogramming[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2021, 86(7): 785-799
- [18] 吉丛, 喻长远, 陈志华. 肺癌诊治和预后判断分子标志物 miRNA [J]. *中国肿瘤临床*, 2014, 41(20): 1333-1336
- [19] Yi G, Wang D, Han J, et al. CircKLHL24 Blocks Breast Cancer Development by Regulating the miR-1204/ALX4 Network[J]. *Cancer Biother Radiopharm*. 2021, 30(1): 1758-1769
- [20] Qian Z, Yang J, Liu H, et al. The miR-1204 regulates apoptosis in NSCLC cells by targeting DEK [J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2019, 57(2): 64-73
- [21] 王奕婷, 刘玉婷, 白晓彦. EMT 在癌症转移中的作用: 内环境依赖的调控过程[J]. *生命的化学*, 2021, 12(1): 453-456
- [22] 陈龙飞, 李亚, 田燕歌, 等. 扶正通络消积三方对肺纤维化大鼠肺组织上皮间质转化的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(2): 741-747
- [23] 金文静, 杨华, 王林宣, 等. 长链非编码 RNA HOTTIP 对肺腺癌 A549 细胞侵袭转移能力及上皮间质转化的影响 [J]. *山东医药*, 2020, 60(2): 18-21
- [24] 潘晓燕, 范宜娟, 杨滢瑜, 等. 老年脑胶质瘤组织中骨膜蛋白及 EMT 标记物的表达及临床意义[J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(21): 4641-4643
- [25] Peng X, Cao P, Li J, et al. MiR-1204 sensitizes nasopharyngeal carcinoma cells to paclitaxel both in vitro and in vivo [J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(2): 261-267
- [26] Wei J, Ding Y, Liu X, et al. Eupafolin induces apoptosis and autophagy of breast cancer cells through PI3K/AKT, MAPKs and NF-κB signaling pathways[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 21478
- [27] Xu L, Huang G, Zhu Z, et al. LFZ-4-46, a tetrahydroisoquinoline derivative, induces apoptosis and cell cycle arrest via induction of DNA damage and activation of MAPKs pathway in cancer cells[J]. *Anticancer Drugs*, 2021, 32(8): 842-854
- [28] 唐钊, 吴春磊, 郭秀娟, 等. MLK4 低表达调控 ROS/MAPKs 信号通路诱导肾细胞癌细胞凋亡的机制研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2020, 28(19): 3311-3315
- [29] 吕冰洁, 安超, 郝东, 等. 鞘氨醇激酶 1 通过 ERK1/2 信号通路促进非小细胞肺癌细胞的侵袭和迁移[J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(7): 156-121
- [30] 邹俊勇, 陆国华, 周建英, 等. p38MAPK 与 ERK1/2 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. *浙江医学*, 2014, 36(10): 836-839
- [31] 李佳殷, 林丽珠, 杨秋晔. 益气除痰方调控 JNK/SAPK 信号通路干预 A549 细胞的试验研究[J]. *四川中医*, 2016, 34(9): 50-53
- [32] 杨全中, 张煜, 王亚娟, 等. 淫羊藿苷激活 CaMK II-JNK 通路抑制人非小细胞肺癌 A549 细胞存活和转移特性 [J]. *中国公共卫生*, 2020, 36(7): 1014-1019