

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.22.003

miR-182 靶向抑制 FBXW7 表达影响非小细胞肺癌细胞增殖研究 *

梁喜鹏 常 浩[△] 曲峻峰 王 巨 王胜发

(哈尔滨医科大学第一临床医学院 胸外科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:研究 microRNA-182(miR-182)在非小细胞肺癌(NSCLC)组织中的表达,并探讨其对 NSCLC 细胞增殖的影响及作用机制。**方法:**采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 miR-182 在 11 例 NSCLC 及相应癌旁组织中的表达情况;Western blot 检测 FBXW7, c-Jun, c-Myc 及 cyclin D 蛋白的表达;将 miR-182 模拟物、抑制物及相应空白对照瞬时转染 H460 细胞后,以细胞增殖与活性检测和克隆形成实验检测细胞系的增殖情况;流式细胞术检测细胞周期和凋亡变化;荧光素酶报告基因实验证实 miR-182 对 FBXW7 的靶向性作用。**结果:**NSCLC 组织中 miR-182 的相对表达水平显著高于癌旁组织 ($P<0.05$)。转染组与对照组相比, H460 细胞生长、克隆形成能力显著增强,细胞周期进程加快,细胞凋亡受到抑制($P<0.05$)。在 NSCLC 组织中, FBXW7 蛋白的表达水平明显低于癌旁组织 ($P<0.05$)。miR-182 mimics 显著降低野生型 FBXW7 质粒荧光素酶的活性, 然而将结合位点突变后, miR-182 mimics 则不再影响荧光素酶的活性。**结论:**miR-182 在 NSCLC 组织中高表达,与 FBXW7 之间存在靶向关系,通过下调 FBXW7 蛋白表达促进 NSCLC 细胞的增殖,参与肿瘤的发生发展,预示其可能成为一种潜在的生物标志和治疗靶点。

关键词:miR-182; FBXW7; 非小细胞肺癌**中图分类号:**R-33; R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)22-4213-07

MiR-182 Promotes Cell Proliferation of Non-small Cell Lung Cancer by Suppressing FBXW7*

LIANG Xi-peng, CHANG Hao[△], QU Jun-feng, WANG Ju, WANG Sheng-fa

(Department of Thoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of microRNA-182 (miR-182) in the non-small cell lung cancer (NSCLC) tissues and its effect and mechanism on the proliferation of NSCLC cells. **Methods:** The expression of miR-182 in the malignant NSCLC tissue and adjacent normal tissue was estimated by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). The Levels of FBXW7 and corresponding substrates were detected by western blot. Cell growth was detected by counting kit (CCK)-8 reagent and colony formation experiment. Cell cycle progression and cell apoptosis were determined through flow cytometry. The effect of miR-182 on the FBXW7 was determined using the Dual-Luciferase Reporter Assay System. **Results:** Compared with the adjacent normal tissues, the expression of miR-182 was significantly upregulated in the NSCLC tissues ($P<0.05$). Compared with the control group, the capacity of cell growth, colony formation capacity and cell cycle progression were dramatically increased, the apoptosis was decreased in the transfection group ($P<0.05$). In addition, the expression of FBXW7 protein was downregulated in the NSCLC tissues ($P<0.05$). The activity of luciferase in wild-type FBXW7 plasmid was significantly decreased by miRNA-182 mimics. However, the activity of luciferase hadn't been affected by miRNA-182 mimics after mutation of binding site. **Conclusions:** The expression of miR-182 was up-regulated in the NSCLC tissues, which can promote the proliferation of NSCLC cells and participates in the occurrence and development of tumors by down-regulating the expression of FBXW7.

Key words: miR-182; FBXW7; NSCLC**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R734.2 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2019)22-4213-07

前言

日前肺癌已成为全球范围内癌症相关死亡的主要原因,报道称世界各地平均每年约有 180 万例新诊断病例和 160 万例死亡病例^[1],其死亡率更是超过 15%^[2]。在肺癌的诸多分类中,非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占所有类

型的 85%,对于确诊 NSCLC 的早期患者,接受外科手术的五年生存率可高达 70%^[3]。然而,由于绝大多数肺癌患者是在肿瘤晚期阶段才得到确切诊断,因此只有少数患者才能行手术治疗达到完全治愈。因此,寻找一种灵敏度高,检测便捷,能够帮助对肺癌患者做出早期诊断,并可提供针对性治疗方案的生物标志,已成为提高 NSCLC 患者生存率的关键。

* 基金项目:黑龙江省教育厅海外学人科研资助项目(1152hq30)

作者简介:梁喜鹏(1994-),男,硕士研究生,主要研究方向:胸外科, E-mail: 839250015@qq.com

[△] 通讯作者:常浩(1974-),男,硕士生导师,教授,主要研究方向:胸外科, E-mail: 1595615345@qq.com, 电话: 0451-85555248

(收稿日期:2019-04-15 接受日期:2019-05-10)

微小 RNA(microRNAs, miRNAs)是一类小序列(约由 22 个核苷酸构成) 非编码 RNA, 能够识别并结合到靶 mRNA 的 3' 端非翻译区(3'UTR)的特定位点, 最终导致靶 mRNA 的降解或翻译抑制。近年来, 大量研究已证实 miRNAs 在细胞的多种生物学过程中都起着关键作用, 包括参与调控细胞内约 30% 基因的表达, 影响细胞的增殖、发育、分化和凋亡等等^[4-5], 其中某些调控癌基因或抑癌基因的 miRNA 在肿瘤组织中异常表达^[6]。另有数据表明, miRNA 与 NSCLC 的发生、发展存在着密切联系^[7,8]。由于血清中 miRNA 含量相对容易检测^[9], 这就使得其对 NSCLC 的诊断及预后存在着较高的辅助参考价值。因此, 我们试图寻找一种 NSCLC 特异性 miRNA 并探讨其作用靶点, 这将有助于非小细胞肺癌的临床早期诊断, 制定更加完善的分级标准, 同样更有助于 NSCLC 新型药物的发现。

人体组织细胞内存在多种蛋白质降解途径, 其中研究最多的就是溶酶体降解途径和泛素 - 蛋白酶体降解途径。泛素 - 蛋白酶体降解系统(Ubiquitin-proteasome system, UPS)是维持高等真核细胞生命进程中一系列生理活动的重要调节方式, 一方面可以降解细胞内的蛋白, 另一方面可以通过非降解作用调节细胞内不同蛋白的活性和定位, 与包括肿瘤在内多种疾病的发生

发展密切相关^[10]。F 框 /WD-40 域蛋白 7(F-box and WD repeat domain containing 7, FBXW7) 是 UPS 中一个重要组成成员, 多项研究表明, FBXW7 作为抑癌基因可以靶向降解包括 Cyclin-E、c-myc、c-jun 和 Notch-1 等在内的多种癌蛋白, 从而影响细胞的增殖、侵袭和存活能力^[11]。目前已证实多种 miRNA 可以在生物体内通过靶向调控 FBXW7 的表达影响肿瘤的进展和转移^[12-14]。但 FBXW7 在非小细胞肺癌中的作用及其与 miR-182 的相互关系尚未明确, 因此本研究旨在探讨 miR-182 对非小细胞肺癌细胞增殖的影响及其作用机制, 为 NSCLC 的早期诊断及治疗新靶点提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

收集在哈尔滨医科大学附属第一医院胸外科接受手术治疗的非小细胞肺癌组织及相应的癌旁组织(距肿瘤组织边界 >3 厘米处)11 例(患者临床病理特征见表 1), 所有患者术前均未接受过放化疗及靶向治疗, 研究经过医院伦理委员会同意, 所有患者或家属术前签署知情同意书, 术中所获取标本存储于 -80℃ 液氮中。

表 1 本研究中患者的相关资料
Table 1 Related data of patients in the study

	Gender	Age	Pathological Stage	Pathological Type
1	Female	51	T1N0M0	Adenocarcinoma
2	Male	55	T1N0M0	Squamous cell carcinoma
3	Male	55	T1N2M0	Adenocarcinoma
4	Female	57	T1N0M0	Adenocarcinoma
5	Female	54	T2N0M0	Adenocarcinoma
6	Male	61	T2N0M0	Adenocarcinoma
7	Male	63	T2N1M0	Adenocarcinoma
8	Female	65	T2N2M0	Adenocarcinoma
9	Female	64	T2N0M0	Adenocarcinoma
10	Male	61	T1N0M0	Squamous cell carcinoma
11	Male	55	T1N2M0	Squamous cell carcinoma

1.2 材料和试剂

miR-182 模拟物、miR-182 阴性对照(miR-NC)、miR-182 抑制剂和 miR-182 抑制剂阴性对照(anti-miR-NC) 购自中国 RiboBio 生物公司, miRNA 提取试剂盒、TaqMan miRNA 逆转录试剂盒、细胞周期测定试剂盒、Annexin V-FITC PI 细胞凋亡检测试剂盒购自中国 HaiGene 公司, β -Actin 抗体、过氧化物酶二级偶联抗体购自 Santa Cruz 生物技术公司, 苯甲磺酰氟(PMSF)、多聚甲醛溶液、结晶紫染液、RNaseA 溶液、荧光染料 PI 购自中国 Sigma-Aldrich 上海分公司, RPMI 1640 培养基、RIPA 缓冲液、化学发光试剂、Lipofectamine® 2000 转染试剂购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 10%胎牛血清购自美国 BiologicalIndus 公司, 硝酸纤维素膜购自美国 PALL 公司, 细胞计数试剂盒 -8(CCK-8)试剂购自中国 Beyotime 生物公司, 荧光

素酶报告基因载体 pmirGLO 购自美国 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 非小细胞肺癌细胞系 H460 以含 10%胎牛血清, 青霉素和链霉素 (100IU/mL) 的 RPMI 1640 培养液, 于 37℃, 体积分数 5%CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 qRT-PCR 检测 标本组织及细胞经胰酶消化后收集细胞沉淀, 应用 miRNA 提取试剂盒分离提取 miRNA, 根据 TaqMan miRNA 逆转录试剂盒说明书获取 cDNA, 以 cDNA 为模板, 根据 TaqMan miRNA 试剂盒操作步骤在 Opticon 2 系统 (Bio-Rad, 美国)下进行扩增, 检测目的基因的表达水平。其中, 以 snRNA U6b 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因相对表达量。实验重复 3 次。由于涉及商业信息, 扩增的 PCR 引物序列未公开。

1.2.3 蛋白质印迹检测 用加蛋白酶抑制剂的裂解液冰上超声裂解组织或细胞,震荡裂解 30 min,4℃,13 000 r/min 离心 15 min 后取上清,BCA 试剂盒检测蛋白浓度,变性后,每孔 50 μg 蛋白于 12%SDS-PAGE 电泳,蛋白经湿转至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶室温封闭 1 h,加入一抗(FBXW7, 1:4, 000, Abcam; c-Myc, 1:1, 000, CST; cdc25A, 1:500, CST; c-Jun, 1:1, 000),4℃孵育过夜,TBST 洗 3 次后,二抗(IgG-HRP, 1:5000, Santa Cruz Biotech-nology)室温孵育 2h,ECL 化学发光法曝光条带,显影定影。采用 ImagePro Plus 6.0 软件进行蛋白条带灰度值的分析,实验重复三次。

1.2.4 细胞转染 按照 Lipofectamine 2000 说明书的方法将 miR-182mimics、miR-NC、miR-182 inhibitors 和 anti-miR-NC(购于 RiboBio 公司)分别瞬时转染入 H460 细胞内。细胞转染 48h 后提取细胞总 RNA 行 qRT-PCR 检测转染后细胞内 miR-182 的表达变化,提取蛋白以蛋白质印迹法检测目的蛋白表达变化。miR-182 mimics 序列:5'-UUUGGCAAUGGUAGAACU-CACACU-3';miR-NC 序列:5'-ACAUCUGCGUAAGAUUC-GAGUCUA-3';miR182 inhibitors 序列:5'-AGUGUGAGUU-CUACCAUUGCCAAA-3';anti-miR-NC 序列:5'-GCGTAAC-TAATACATCGGATTCGT-3'。

1.2.5 细胞增殖与活性检测 收集转染 24、48 和 72 小时后三个时间点下的 H460 细胞,加入 10 μL CCK-8 试剂于 37℃下孵育 2 小时,酶标仪(450 nm 波长)检测各组细胞的吸光值(optical density,OD 值)。其中,每组实验设 3 个复孔,实验重复三次。

1.2.6 克隆形成试验 将 H460 细胞转染 48 h 后用胰酶消化,接种于 6 孔板中,种板密度为 500 个/孔,置入 37℃,5% CO₂ 细胞培养箱中培养 14 d,去除培养基,用 4%多聚甲醛固定 20 min,PBS 冲洗后用 0.2%结晶紫染色 5 min。实验重复三次。

1.2.7 细胞周期分析 将 H460 细胞转染 48 h 后用胰酶消化,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗涤细胞 2 次,将细胞悬液缓慢加入预冷的 75%乙醇中固定,4℃过夜后离心收集细胞,使用 PBS 悬浮细胞后调整细胞密度为 3 × 10⁵/mL,按照细胞周期测定试剂盒说明书加入 RNaseA 溶液,室温下孵育 20 分钟,再加入 PI 避光孵育 15 min,应用流式细胞仪(Guava® EasyCype)GuasoFFT 2.5 (MiLople,美国)软件检测细胞周期。实验重复三次。

1.2.8 细胞凋亡分析 按照 Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC)/PI 试剂盒(HaiGene, Harbin, China)说明书,取转染后的 H460 细胞,采用胰酶消化,1 × binding buffer 重悬细胞后调整细胞密度为 1 × 10⁵/mL,加入 5 μL AnnexinV-FITC 及 5 μL PI 染色,室温避光孵育 15 min,采用流式细胞仪检测细胞凋亡水平。实验重复三次。

1.2.9 荧光素酶报告基因实验 利用 Targetscan 生物信息学软件预测 miR-182 在 FBXW7 mRNA 上的结合位点,构建 miR-182 结合位点的 FBXW7 野生型和突变型荧光素酶报告载体。将 H460 细胞接种在 24 孔板中,按照 Lipofectamine 2000 转染试剂盒说明书将 FBXW7 野生型质粒和突变型质粒分别与 miR-182 模拟物、抑制物及相应阴性对照共转染。48h 后收集细胞,根据 Dual-Luciferase Reporter System (Promega, WI, USA)操作手册对细胞荧光素酶活性进行分析。实验重复三次。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用完全随机设计的单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-182 在非小细胞肺癌组织及细胞系中高表达,且与 FBXW7 表达水平呈负性相关

通过前期查阅大量的文献数据,利用 TargetScan 和 microRNA.org 等预测算法,我们初步筛选出 12 种可能靶向 FBXW7 的 miRNA。为确认这些 miRNA 是否真正参与 NSCLC 的生物进程,我们利用 qRT-PCR 法检测了它们在 11 对 NSCLC 肿瘤组织和相应癌旁组织中的表达水平。实验结果表明与相应癌旁组织相比在 NSCLC 组织中 4 种 miRNA 表达显著上调,3 种 miRNA 表达则显著下调(表 2),而其他 miRNA 无明显差异(图 1A)。在上述四种上调的 miRNA 中,miR-182 的表达水平差异最大(约 2.27 倍)(图 1A)。因此,我们选取 miR-182 进行后续实验研究。

表 2 可能调控 FBXW7 的 miRNA 在恶性和正常组织中的相对比值
Table 2 Ratio of miRNAs probably regulating FBXW7 between malignant and normal tissues

miRNA	倍数变化	P 值
miR-182	2.27	0.0010
miR-429	1.89	0.0389
miR-141	1.67	0.0036
miR-211	1.62	0.0209
miR-200a	-1.35	0.0125
miR-200b	-1.37	0.0086
miR-144	-1.37	0.0101

Note: Positive number means overexpression malignant tissues and negative number means overexpression normal tissues on opposite. P-value means the level for miRNAs were analyzed through paired t-test.

为探讨 miR-182 与 FBXW7 的相关性,采用 qRT-PCR 分析 miR-182 在 NSCLC 组织及相应癌旁组织中的表达情况,蛋白质印迹法检测 FBXW7 在二者中的表达差异。结果显示,miR-182 在 NSCLC 组织中表达显著上调,而 FBXW7 表达则显著下调(图 1B),提示 miR-182 与 FBXW7 水平可能呈负性相关(图 1C)。

2.2 miR-182 促进 NSCLC 细胞增殖

为研究 miR-182 在 NSCLC 肿瘤发生发展中的作用,我们通过将 miR-182 模拟物、miR-182 抑制剂和相应的阴性对照分别转染 H460 细胞,分别检测 miR-182 高、低表达对 H460 细胞增殖的影响。结果显示转染 miR-182 mimics 组 H460 细胞 miR-182 表达明显增高(图 2a)。

细胞增殖与活性实验结果显示,miR-182 mimics 组于 48 和 72h 明显促进 H460 细胞的增殖,而 miR-182 inhibitor 组则

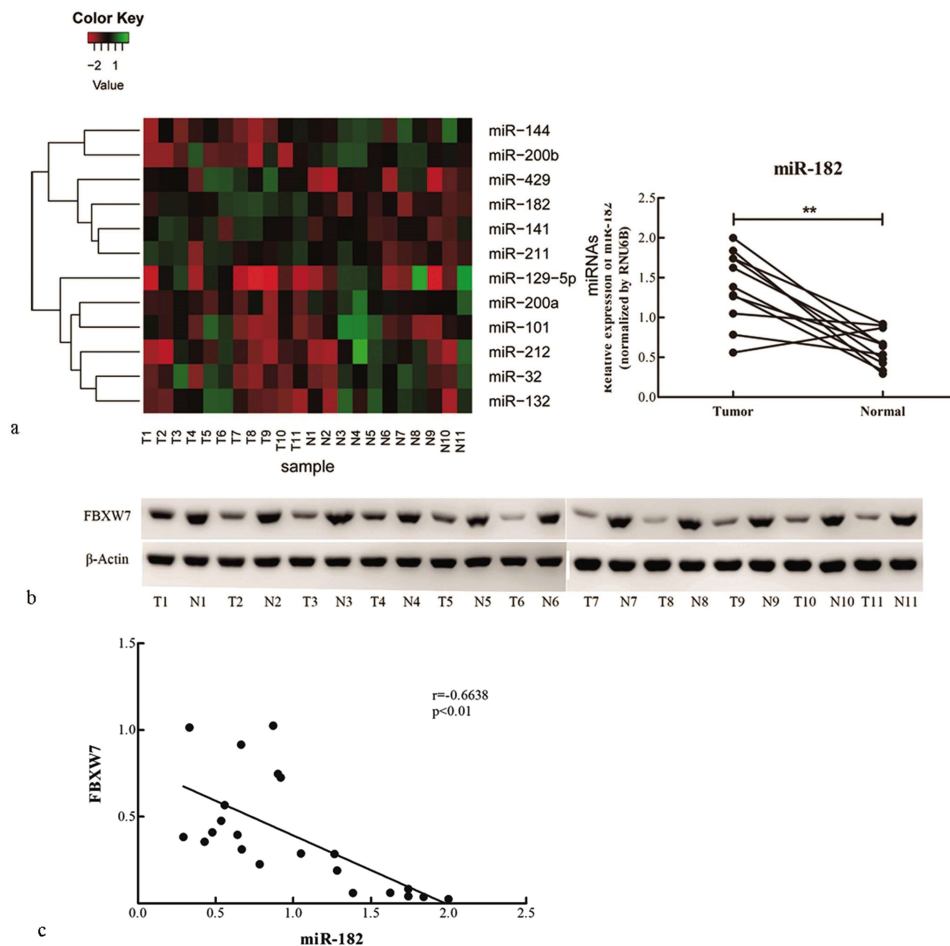


图1 在恶性和正常组织中 FBXW7 与 miR-182 的表达情况

Fig.1 Expression of FBXW7 and miR-182 in malignant and normal tissues

Note: A. The heat map drawn through analysis of predicted miRNAs potentially targeting FBXW7 in malignant tissues using TaqMan quantitative RT-PCR. Expression of miR-182 in malignant and normal tissues was compared in the photo on right. B. The protein levels of FBXW7 in malignant tissues were shown by Western blot using β -Actin for normalization. C. The relevance between miR182 and the protein levels of FBXW7 was contrary in malignant tissues. Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$. ** $P < 0.01$.

明显抑制 H460 细胞的增殖(图 2b)。为进一步确认 miR-182 对 H460 细胞增殖的影响,我们进行了克隆形成试验,实验结果显示,miR-182 过表达的 H460 细胞组克隆形成数增加,而 miR-182 低表达的 H460 细胞组克隆形成能力显著下降(图 2c-2d)。由于癌细胞的增殖速率与细胞周期进程密切相关,我们还研究了各转染组 H460 细胞周期的变化情况。如图 3d 所示,与阴性对照组相比,miR-182 过表达的转染细胞组中 G1/G0 期细胞百分比(12.5%)显著降低,S 期细胞百分比(11.3%)显著升高;而转染 miR-182 抑制剂的细胞组中 G1/G0 期细胞百分比(8.6%)显著增加,S 期细胞百分比(7.6%)显著降低。这些实验结果表明,上调 miR-182 表达可促进 H460 细胞的增殖及细胞周期进展。

2.3 miR-182 抑制 NSCLC 细胞凋亡

为进一步确认 miR-182 在 NSCLC 细胞中的致癌作用,我们检测了其在细胞凋亡中的作用。如图 3 所示,经 miR-182 模拟物转染的细胞,其凋亡率明显低于阴性对照(3.3%vs7.9%),而转染 miR-182 抑制剂的细胞,其凋亡率则远高于阴性对照(12.05%vs8.03%)。以上结果提示,miR-182 的过度表达可以抑制 NSCLC 细胞的凋亡。

2.4 miR-182 调控 FBXW7 及其底物蛋白的表达水平

上述实验已证明 miR-182 在 11 例配对 NSCLC 组织中与 FBXW7 水平呈负性相关。在此基础上,我们进一步探讨 miR-182 是否会影响 FBXW7 的表达。如图 4 所示,与阴性对照组相比,转染 miR-182 的细胞其 FBXW7 表达水平显著下调,而转染 miR-182 抑制剂的细胞其蛋白表达水平则明显上调。此外,对已知的 FBXW7(c-jun、c-myc 和 cyclin D)底物蛋白的测定发现 miR-182 过度表达的细胞中,上述底物蛋白表达显著增加,而 miR-182 抑制组中相关蛋白表达水平则显著降低(图 4)。上述结果提示 miR-182 可能通过负性调控 FBXW7 的表达来抑制底物的降解,从而起到癌基因的作用。

2.5 FBXW7 是 miR-182 的直接作用靶点

我们通过荧光素酶报告基因实验进一步确定 miR-182 与 FBXW7 的靶向关系,结果显示 miR-182 mimic 显著降低野生型 FBXW7 质粒荧光素酶的活性(图 5b);将结合位点突变后 miR-182 mimic 不再影响荧光素酶的活性,表明 FBXW7 mRNA 上存在 miR-182 的结合位点,FBXW7 是 miR-182 在 NSCLC 中的直接作用靶点(图 5)。

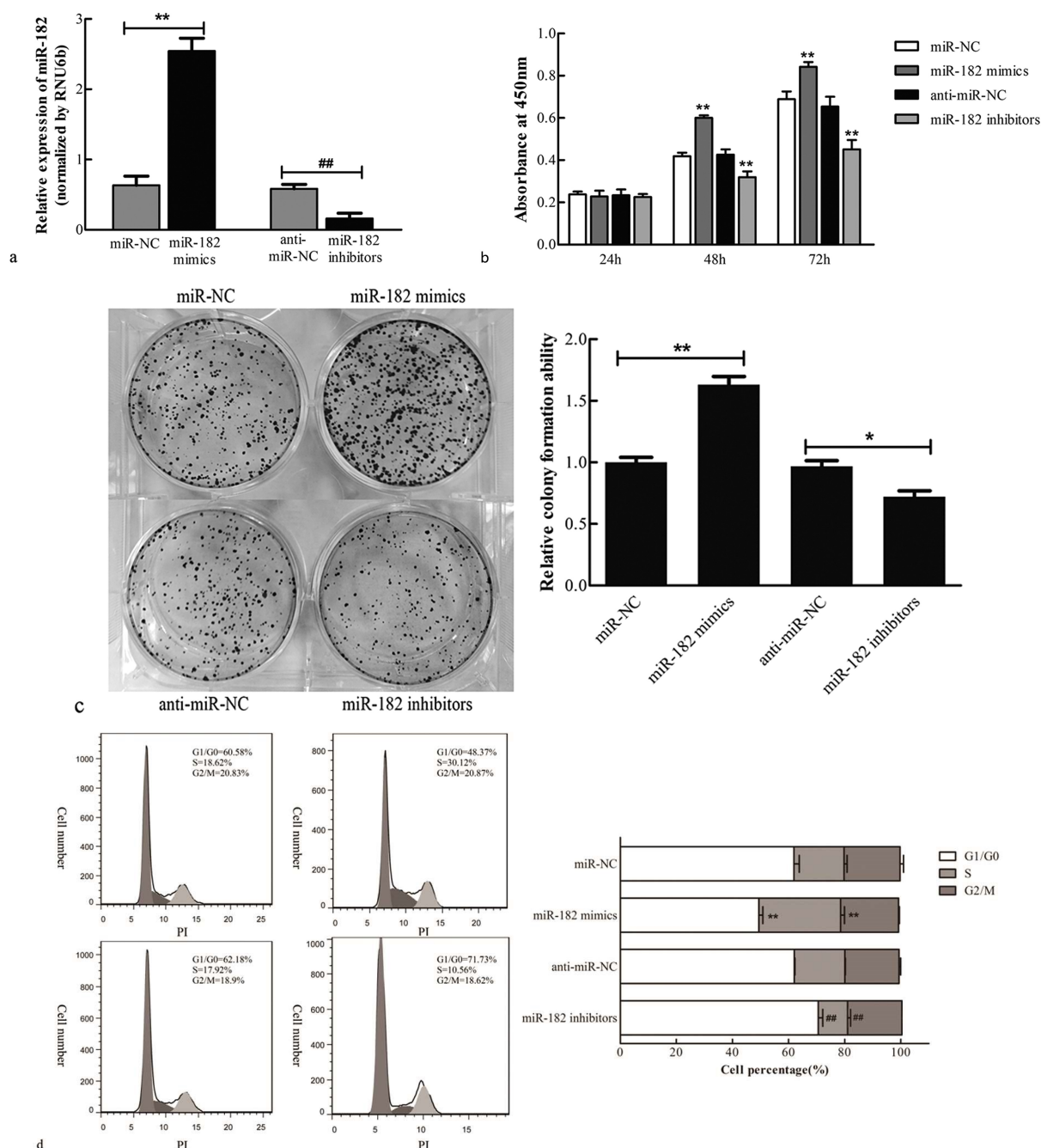


图2 经转染后各组癌细胞的增殖情况及细胞周期分布的比较

Fig.2 Comparison of proliferation and cell cycle progression of cancerous cells after transfection

Note: A. Levels of miR-182 were detected 48h after transfection by qRT-PCR. B. Cell proliferation was detected at 24h, 48h and 72h after transfection by CCK-8 reagent. C. Colony formation of four groups after transfection. D. Cell cycle progression of each group was estimated by flow cytometry and quantification. Percentage of G0-G1, S, and G2/M phase in each group was shown on the right panel. Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$. ** $P < 0.01$, compared with miR-NC. ## $P < 0.01$, compared with anti-miR-NC.

3 讨论

miR-182 最初被发现是作为调节感觉器官发育的视网膜特异 miRNA^[15]。近年来,越来越多的实验表明 miR-182 在肿瘤的发生和发展中存在多种调控作用^[16-21]。本研究结果表明,与正常组织相比,miR-182 在非小细胞肺癌组织中表达明显上调。此外,miR-182 的过度表达可以显著增强 NSCLC 细胞的增殖和集落形成能力,促进细胞周期进展,同时抑制细胞的凋亡;相反,抑制 miR-182 的表达则明显减弱了这些肿瘤特性。然而,

Sun 等研究报道 miR-182 可作为肿瘤抑制因子,通过靶向 RGS17 抑制细胞增殖^[22],Zhu 等也发现 miR-182 可以抑制凋亡相关基因 RASA1,支持其作为抑癌基因的观点^[23]。事实上,由于 miR-182 可以对细胞内的多种基因进行调控,通过级联反应发挥不同的调节作用,且相关分子途径也较易受到环境的影响,所以 miR-182 在非小细胞肺癌中的作用也存在争议,但多数研究还是支持 miR-182 作为致癌因子在肺癌中发挥作用。

FBXW7 可以通过靶向调节多种癌蛋白(包括 Cyclin-E、c-myc、c-jun 和 Notch-1)从而在细胞周期进程、细胞凋亡中起到

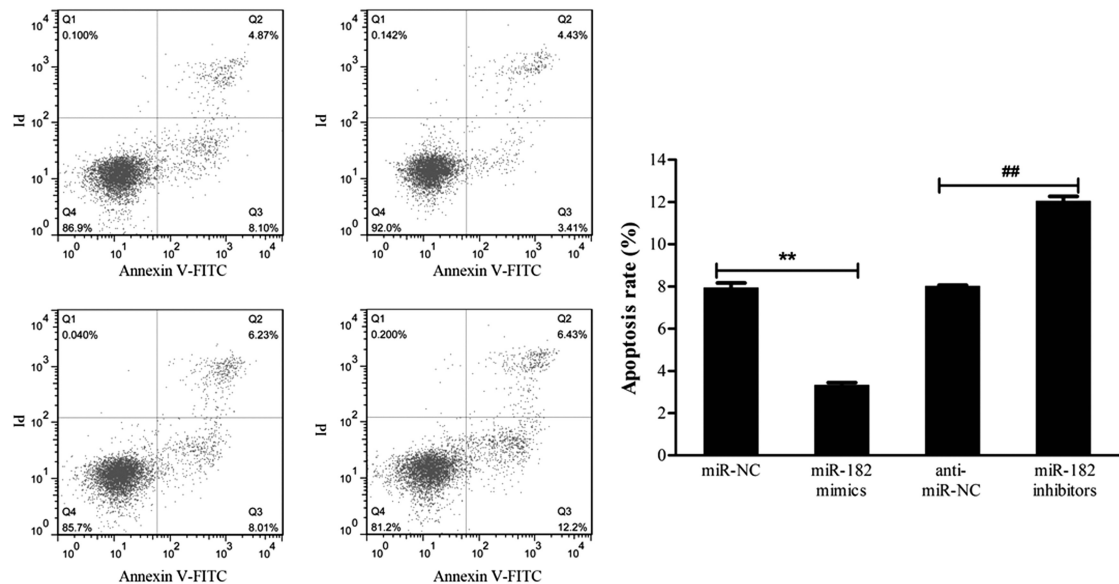


图3 经转染后各组癌细胞的凋亡情况的比较

Fig.3 Comparison of apoptosis of cancerous cells after transfection

Note: Cell apoptosis was determined 48h after transfection using flow cytometry. Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$. ** $P < 0.01$, compared with miR-NC.

$P < 0.01$, compared with anti-miR-NC.

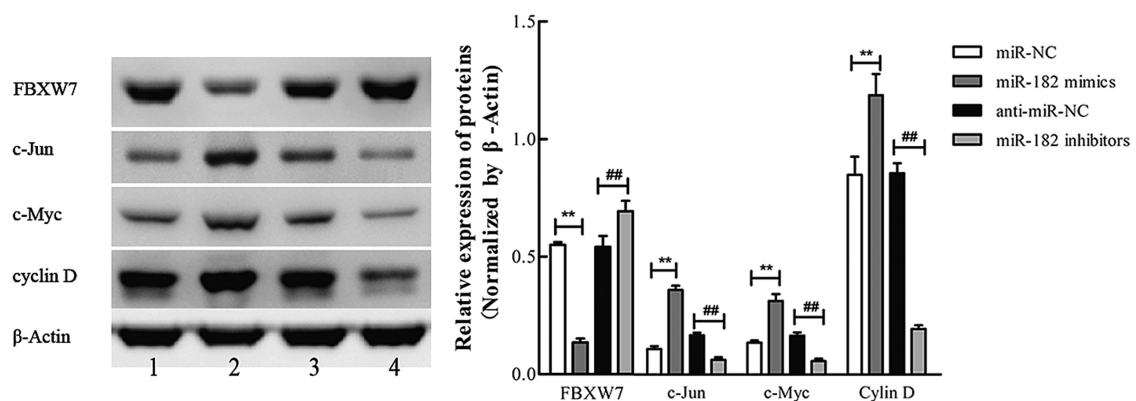


图4 经转染后各组癌细胞内 FBXW7 及其作用底物蛋白的表达情况的比较

Fig.4 Comparison of expression of FBXW7 and corresponding substrates in cancerous cells after transfection

Note: The protein levels of FBXW7 and corresponding substrates were detected 48h after transfection by Western blot. The relative band intensities were estimated by Image-Pro Plus 6.0. β -Actin was used for normalization. Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$. ** $P < 0.01$, compared with miR-NC. ## $P < 0.01$, compared with anti-miR-NC.

重要作用^[11,24,25], FBXW7 作为抑癌基因已被证实多种肿瘤组织中存在突变, 包括乳腺癌、结肠癌和白血病等^[26]。Ibusuki 发现在乳腺癌组织内 FBXW7 表达减少, 并且与预后显著相关^[27]。Tu 发现在肝细胞癌组织中 FBXW7 表达也明显降低, 且与肝细胞癌的临床病理特征相关, 包括肿瘤体积大、病理分级高、TNM 分期等^[28]。多项研究表明多种 miRNA 可以靶向 FBXW7 表达而在肿瘤发展进程中发挥调节作用, 包括 miR-25、miR-155 和 miR-27a^[29-31]。在本实验中, 我们证实 miR-182 通过靶向抑制 FBXW7 表达从而引起 NSCLC 细胞增殖分化等进程中的一系列变化, 该结果与二者在其他癌症中的相关作用相一致。

由于肺癌是全世界癌症死亡的主要原因, 且绝大部分肺癌患者确诊晚, 预后差, 因此, 临床上迫切需要寻找一种能够有效预测和诊断非小细胞肺癌的生物标志从而改善肺癌患者的预后。作为科研前景广泛的生物标志, miRNA 在肺癌中的作用已

得到相关研究, 有文献报道联合检测 miR-98 和 miR-205 二者表达的水平可以鉴别癌性肺组织和正常组织, 且两者的特异性和敏感性均为 100%^[32]。本实验发现 miR-182 在 NSCLC 肿瘤组织中显著上调, 并强化了 NSCLC 细胞的肿瘤相关特性, 其在调节肿瘤发生、发展中起到一定作用。值得注意的是, miR-182 与 miR-126 和 miR-182 与 miR-205 的联合检测已被证实是鉴别健康对照中恶性肿瘤的可靠手段, 且准确率为 84.49%, 敏感性和特异性分别为 91.40% 和 77.14%^[32]。此外, miRNA 与蛋白质等生物标志的联合检测也有助于更好地评估远期疗效。因此我们认为, 联合检测 miR-182 和 FBXW7 水平将有助于评判和改善 NSCLC 患者的预后。

综上所述, 在 NSCLC 细胞中, miR-182 可通过靶向抑制 FBXW7 蛋白表达, 起到促进肿瘤细胞增殖、改变细胞周期、抑制细胞凋亡的作用, 通过抑制 miR-182 或增强 FBXW7 表达有

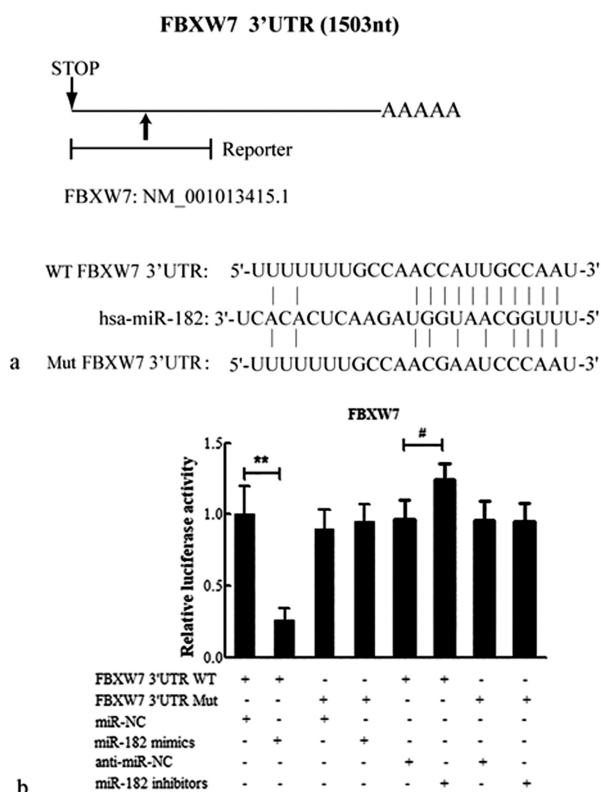


图 5 miR-182 与 FBXW7 mRNA 的结合位点及经转染后各组荧光素酶活性的比较

Fig.5 Binding site between miR-182 and FBXW7 mRNA and comparison of relative luciferase activity after transfection

Note: miR-182 direct targets FBXW7 and FBXW11 in NSCLC cells. A. Predicted and mutated miR-182 binding sites in 3'-UTR of FBXW7 mRNA. B. Relative luciferase activity was determined 48h after transfection. Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$. ** $P < 0.01$, compared with group miR-NC. # $P < 0.05$, compared with group anti-miR-NC. ## $P < 0.01$, compared with group anti-miR-NC.

望成为治疗 NSCLC 的有效策略,miR-182 可为非小细胞肺癌早期诊断的生物标志物。

参考文献(References)

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. International Journal of Cancer, 2015, 136(5): E359-E386
- [2] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64: 9-29
- [3] Knight SB, Crosbie PA, Balata H, et al. Progress and prospects of early detection in lung cancer[J]. Open Biology, 2017, 7(9): 170070
- [4] Yue Q, Tao L, Hou Y, et al. Assay of miRNA in cell samples using enhanced resonance light scattering technique based on self aggregation of magnetic nanoparticles [J]. Nanomedicine (Lond), 2018, 13(18): 2301-2310
- [5] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. Cell, 2009, 136: 215-233
- [6] Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer [J]. Annu Rev Med, 2009, 60: 167-179
- [7] Liu S, Dong H, Dai H, et al. MicroRNA-216b regulated proliferation

- and invasion of non-small cell lung cancer by targeting SOX9 [J]. Oncol Lett, 2018, 15(6): 10077-10083
- [8] Lihong F, Jie S, Junliang T, et al. Evaluation of Serum Paired MicroRNA Ratios for Differential Diagnosis of Non-Small Cell Lung Cancer and Benign Pulmonary Diseases [J]. Molecular Diagnosis & Therapy, 2018, 22(4): 493-502
- [9] He Y, Ren S, Wang Y, et al. Serum microRNAs improving the diagnostic accuracy in lung cancer presenting with pulmonary nodules[J]. Journal of thoracic disease, 2018, 10(8): 5080-5085
- [10] Lau AW, Fukushima H and Wei W. The Fbw7 and betaTRCP E3 ubiquitin ligases and their roles in tumorigenesis [J]. Frontiers in Bioscience, 2012, 17: 2197-2212
- [11] Cao J, Ge MH. Fbxw7 Tumor Suppressor: A Vital Regulator Contributes to Human Tumorigenesis [J]. Medicine, 2016, 95 (7): e2496
- [12] Xiao G, Gao X, Sun X, et al. MiR-367 promotes tumor growth by inhibiting FBXW7 in NSCLC [J]. Oncology reports, 2017, 38 (2): 1190-1198
- [13] Zhao J, Hu C, Chi J, et al. MiR-24 promotes the proliferation, migration and invasion in human tongue squamous cell carcinoma by targeting FBXW7[J]. Oncolol reports, 2016, 36(2): 1143-1149
- [14] Xiang J, Hang JB, Che JM. MiR-25 is up-regulated in non-small cell lung cancer and promotes cell proliferation and motility by targeting FBXW7 [J]. International journal of clinical and experimental pathology, 2015, 8(8): 9147-9153
- [15] Xu S, Witmer PD, Lumayag S, et al. MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster[J]. J Biol Chem, 2007, 282: 25053-25066
- [16] Wei Q, Lei R, Hu G. Roles of miR-182 in sensory organ development and cancer[J]. Thorac Cancer, 2015, 6(1): 2-9
- [17] Lei R, Tang J, Zhuang X, Deng R, et al. Sup-pression of MIM by microRNA-182 activates RhoA and promotes breast cancer metastasis [J]. Oncogene, 2014, 33: 1287-1296
- [18] Liu H, Du L, Wen Z, Yang Y, et al. Up-regulation of miR-182 expression in colo- rectal cancer tissues and its prognostic value[J]. Int J Colorectal Dis, 2013, 28: 697-703
- [19] Rapti SM, Kontos CK, Papadopoulos IN, et al. Enhanced miR-182 transcription is a predictor of poor overall survival in colorectal adenocarcinoma patients[J]. Clin Chem Lab Med, 2014, 52: 1217-1227
- [20] Liu Z, Liu J, Segura MF, et al. MiR-182 overexpression in tumourigenesis of high-grade serous ovarian carcinoma [J]. J Pathol, 2012, 228: 204-215
- [21] Hirata H, Ueno K, Shahryari V, et al. MicroRNA-182-5p promotes cell invasion and proliferation by down regulating FOXF2, RECK and MTSS1 genes in human prostate cancer [J]. PLoS One, 2013, 8: e55502
- [22] Sun Y, Fang R, Li C, et al. Hsa-mir-182 suppresses lung tumorigenesis through down regulation of RGS17 expression in vitro [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 396: 501-507
- [23] Zhu YJ, Xu B, Xia W. Hsa-mir-182 downregulates RASA1 and suppresses lung squamous cell carcinoma cell proliferation [J]. Clin Lab, 2014, 60: 155-159

391

- [9] Z.A. Bacigalupa, C.H. Bhadiadra, M.J. Reginato. O-GlcNAcylation: key regulator of glycolytic pathways[J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2018, 50(3): 189-198
- [10] S. Sugahara, S. Kume, M. Chin-Kanasaki, et al. Protein O-GlcNAcylation Is Essential for the Maintenance of Renal Energy Homeostasis and Function via Lipolysis during Fasting and Diabetes [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2019, 30(6): 962-978
- [11] Y. Li, M. Xie, L. Men, et al. O-GlcNAcylation in immunity and inflammation: An intricate system (Review)[J]. *Int J Mol Med*, 2019, [Epub ahead of print]
- [12] H. Nie, W. Yi. O-GlcNAcylation, a sweet link to the pathology of diseases[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2019, 20(5): 437-448
- [13] Z. Ma, K. Vosseller. O-GlcNAc in cancer biology [J]. *Amino Acids*, 2013, 45(4): 719-733
- [14] Z. Ma, K. Vosseller. Cancer metabolism and elevated O-GlcNAc in oncogenic signaling[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(50): 34457-34465
- [15] W. Mi, Y. Gu, C. Han, et al. O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812 (4): 514-519
- [16] Y.C. Lin, C.H. Lin, Y.C. Yeh, et al. High O-linked N-acetylglucosamine transferase expression predicts poor survival in patients with early stage lung adenocarcinoma[J]. *Oncotarget*, 2018, 9 (57): 31032-31044
- [17] W. Guo, Y. Zhang, Y. Zhang, et al. Decreased expression of miR-204 in plasma is associated with a poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36 (6): 1720-1726
- [18] G. Huang, T. Lou, J. Pan, et al. MiR-204 reduces cisplatin resistance in non-small cell lung cancer through suppression of the caveolin-1/AKT/Bad pathway[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11 (7): 2138-2150
- [19] G. Li, J. Fang, Y. Wang, et al. MiRNA-based therapeutic strategy in lung cancer[J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(39): 6011-6018
- [20] M.V. Iorio, C.M. Croce. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review[J]. *EMBO Mol Med*, 2012, 4(3): 143-159
- [21] S. Fittipaldi, F. Vasuri, S. Bonora, et al. miRNA Signature of Hepatocellular Carcinoma Vascularization: How the Controls Can Influence the Signature[J]. *Dig Dis Sci*, 2017, 62(9): 2397-2407
- [22] X. Du, J. Zhang, J. Wang, et al. Role of miRNA in lung cancer-potential biomarkers and therapies[J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(39): 5997-6010
- [23] K. Van Roosbroeck, G.A. Calin. Cancer Hallmarks and MicroRNAs: The Therapeutic Connection[J]. *Adv Cancer Res*, 2017, 135: 119-149
- [24] R. Rupaimoole, F.J. Slack. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(3): 203-222
- [25] B. Mansoori, A. Mohammadi, S. Shirjang, et al. MicroRNAs in the Diagnosis and Treatment of Cancer[J]. *Immunol Invest*, 2017, 46 (8): 880-897
- [26] Y. Yin, B. Zhang, W. Wang, et al. miR-204-5p inhibits proliferation and invasion and enhances chemotherapeutic sensitivity of colorectal cancer cells by downregulating RAB22A [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(23): 6187-6199
- [27] J. Zeng, M. Wei, R. Shi, et al. MiR-204-5p/Six1 feedback loop promotes epithelial-mesenchymal transition in breast cancer [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(2): 2729-2735
- [28] L. Shi, B. Zhang, X. Sun, et al. MiR-204 inhibits human NSCLC metastasis through suppression of NIAK1[J]. *Br J Cancer*, 2014, 111 (12): 2316-2327
- [29] M. Jiang, B. Xu, X. Li, et al. O-GlcNAcylation promotes colorectal cancer metastasis via the miR-101-O-GlcNAc/EZH2 regulatory feedback circuit[J]. *Oncogene*, 2019, 38(3): 301-316
- [30] N. Babae, M. Bourajjaj, Y. Liu, et al. Systemic miRNA-7 delivery inhibits tumor angiogenesis and growth in murine xenograft glioblastoma[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(16): 6687-6700
- (上接第 4219 页)
- [24] Xiao G, Li Y, Wang M, et al. FBXW7 suppresses epithelial-mesenchymal transition and chemo-resistance of non-small-cell lung cancer cells by targeting snail for ubiquitin-dependent degradation[J]. *Cell proliferation*, 2018, 51(5): e12473
- [25] Yeh CH, Bellon M. FBXW7: a critical tumor suppressor of human cancers[J]. *Molecular cancer*, 2018, 17(1): 115
- [26] Akhoondi S. FBXW7/hCDC4 is a general tumor suppressor in human cancer[J]. *Cancer Res*, 2007, 67
- [27] Ibusuki M, Yamamoto Y, Shinriki S, et al. Reduced expression of ubiquitin ligase FBXW7 mRNA is associated with poor prognosis in breast cancer patients[J]. *Cancer Science*, 2011, 102: 439-445
- [28] Tu K, Yang W, Li C, et al. Fbxw7 is an independent prognostic marker and induces apoptosis and growth arrest by regulating YAP abundance in hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2014, 13: 110
- [29] Gong J, Cui Z, Li L, et al. MicroRNA-25 promotes gastric cancer proliferation, invasion, and migration by directly targeting F-box and WD-40 Domain protein 7, FBXW7[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36: 7831-7840
- [30] Tang B, Lei B, Qi G, et al. MicroRNA-155-3p promotes hepatocellular carcinoma formation by suppressing FBXW7 expression [J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2016, 35(1): 93
- [31] Lerner M, Lundgren J, Akhoondi S, et al. MiRNA-27a controls FBW7/hCDC4-dependent cyclin E degradation and cell cycle progression[J]. *Cell Cycle*, 2011, 10: 2172-2183
- [32] Song R, Liu Q, Hutvagner G, et al. Rule discovery and distance separation to detect reliable miRNA biomarkers for the diagnosis of lung squamous cell carcinoma[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(9): S16