

不同临床病理特征非小细胞肺癌中 miR-1269 的表达 及其对细胞周期的靶向调控作用

詹莉琼^a, 卢晏民^a, 崔杰^b

作者单位: 商丘市第一人民医院, ^a呼吸与危重症医学科, ^b肿瘤三科, 河南 商丘 476000

摘要:目的 研究不同临床病理特征非小细胞肺癌(NSCLC)中 miR-1269 的表达及其对细胞周期的靶向调控作用。方法 收集 2015 年 3 月至 2018 年 12 月商丘市第一人民医院手术切除的 NSCLC 病灶和对应的癌旁病灶 58 例, 检测 miR-1269 及细胞周期蛋白的表达量; 培养肺癌 A549 细胞株, 转染 miR-1269 的模拟物和抑制物后检测细胞周期蛋白的表达量。结果 NSCLC 病灶中 miR-1269 的表达量明显高于癌旁病灶($P < 0.05$)且低未分化、有淋巴结转移、有脉管浸润、有胸膜侵犯的 NSCLC 病灶中 miR-1269 的表达量明显高于高中分化、无淋巴结转移、无脉管浸润、无胸膜侵犯的 NSCLC 病灶($P < 0.05$); NSCLC 病灶中 CyclinD1、CDK4、CDK6 的表达量明显高于癌旁病灶且与 miR-1269 呈正相关, p21^{Cip1}、p27^{Kip1} 的表达量明显低于癌旁病灶且与 miR-1269 呈负相关($P < 0.05$)。miR1269 模拟物组 A549 细胞中 CyclinD1、CDK4、CDK6 的表达量明显高于空白对照组、NC 模拟物组, p21^{Cip1}、p27^{Kip1} 的表达量明显低于空白对照组、NC 模拟物组($P < 0.05$); miR-1269 抑制物组 A549 细胞中 CyclinD1、CDK4、CDK6 的表达量明显低于空白对照组、NC 抑制物组, p21^{Cip1}、p27^{Kip1} 的表达量明显高于空白对照组、NC 抑制物组($P < 0.05$)。结论 miR-1269 的高表达与 NSCLC 病理特征的变化有关且 miR-1269 能够靶向调节细胞周期蛋白的表达。

关键词: 癌, 非小细胞肺; 细胞周期蛋白 D1; 细胞周期蛋白质依赖激酶类; miR-1269; 病理特征

Expression of miR-1269 in non-small cell lung cancer with different clinical pathological characteristics and its targeted regulation on cell cycle

ZHAN Liqiong^a, LU Yanmin^a, CUI Jie^b

Author Affiliation: ^aRespiratory and Critical Care Medicine, ^bThree tumors, Shangqiu First People's Hospital, Shangqiu, Henan 476000, China

Abstract: Objective To investigate the expression of miR-1269 in non-small cell lung cancer (NSCLC) with different clinical pathological characteristics and its targeted regulation on cell cycle. **Methods** NSCLC lesions and corresponding pericancerous lesions were collected from March 2015 to December 2018 in Shangqiu First People's Hospital, and the expression of miR-1269 and cell cycle protein was detected. The A549 cell line of lung cancer was cultured, and the expression of cell cycle protein was detected after transfection of mimic and inhibitor of miR-1269. **Results** The expression of miR-1269 in NSCLC lesions was significantly higher than that in adjacent lesions ($P < 0.05$), and the expression of miR-1269 in NSCLC lesions with low-undifferentiated, lymph node metastasis, vascular invasion and pleural invasion were significantly higher than that in NSCLC lesions with high-middle differentiation, no lymph node metastasis, no vascular invasion and no pleural invasion ($P < 0.05$). The expression of CyclinD1, CDK4, CDK6 in NSCLC lesions were significantly higher than those in adjacent lesions and positively correlated with miR-1269, the expression of p21^{Cip1} and p27^{Kip1} were significantly lower than those in adjacent lesions and negatively correlated with miR-1269 ($P < 0.05$). The expression of CyclinD1, CDK4, CDK6 in A549 cells of miR-1269 mimic group were significantly higher than those in blank control group and NC mimic group, the expression of p21^{Cip1} and p27^{Kip1} were significantly lower than those in blank control group and NC mimic group ($P < 0.05$). The expression of CyclinD1, CDK4, CDK6 in A549 cells of miR-1269 inhibitor group were significantly lower than those in blank control group and NC inhibitor group, the expression of p21^{Cip1} and p27^{Kip1} were significantly higher than those in blank control group and NC inhibitor group ($P < 0.05$). **Conclusion** The high expression of miR-1269 is related to the pathological changes of NSCLC, and miR-1269 can target the expression of cell cycle protein.

Key words: Carcinoma, non-small-cell lung; Cyclin D1; Cyclin-dependent kinases; miR-1269; Pathological features

肺癌的发病率和死亡率在世界范围内位居首位, 其中非小细胞肺癌(NSCLC)是肺癌最常见的病

理类型, 我国 NSCLC 的发病率也呈成年升高的趋势, 但早期诊断率并不高、多数病人就诊时已达中

晚期并错过了最佳治疗时机^[1-2]。虽然近年来分子靶向药物的不断问世使NSCLC病人的生存情况得到改善,但病人的长期生存率仍较低,亟需探寻新的治疗靶点。miR-1269是具有促癌特性的miR,已经在肝癌细胞和肺癌细胞中被证实能够靶向抑癌基因FOXO1的表达,进而促进癌细胞的增殖、迁移、侵袭^[3-4]。FOXO1在NSCLC的发生发展过程中起到抑癌作用,能够靶向抑制细胞周期蛋白(Cyclin)D1的表达、增加细胞周期负性调控分子p21^{Cip1}、p27^{Kip1}的表达,进而使细胞周期发生停滞^[5-7]。但是,miR-1269在NSCLC病灶内的变化及其与细胞周期的调控作用均未明确。为此,本研究具体分析了不同病理特征非小细胞肺癌中miR-1269的表达及其对细胞周期的靶向调控作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2015年3月至2018年12月商丘市第一人民医院手术切除的NSCLC病灶和对应的癌旁病灶58例,其中男性32例、女性26例,年龄(51.31±8.42)岁,年龄范围为41~64岁。入组标准:(1)经术后病理诊断为NSCLC;(2)临床资料完整;(3)术前未接受过放化疗。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。病人或近亲属对研究方案签署知情同意书。

1.2 细胞及试剂 miRNA提取试剂盒、miRNA cDNA第一链合成试剂盒、miRNA荧光定量PCR检测试剂盒购自北京天根公司,肺癌A549细胞株购自中科院上海细胞资源中心,miR-1269的模拟物和抑制物购自上海吉玛公司,蛋白裂解液及BCA蛋白定量试剂盒购自上海碧云天公司,CyclinD1、CDK4、CDK6、p21^{Cip1}、p27^{Kip1}的单克隆抗体购自Abcam公司。

1.3 仪器 光定量PCR仪购自Bio-rad公司,细胞培养箱和高速离心机购自Thermo公司,倒置显微镜购自Nikon公司,凝胶成像仪购自上海天能公司。

1.4 miR-1269表达量的检测 取NSCLC病灶和癌旁病灶,采用miRNA提取试剂盒进行操作、提取组织中的miRNA,采用miRNA cDNA第一链合成试剂盒进行操作、将miRNA反转录为cDNA;采用miRNA荧光定量PCR检测试剂盒配置应该定量PCR反应体系,对cDNA中的miR-1269及U6进行扩增,根据扩增循环曲线及循环阈值、以U6为内参、计算miR-1269的表达量。

1.5 细胞培养及分组 A549细胞用含有10%胎牛血清的DMEM在培养瓶中贴壁培养,细胞铺满底面90%后用0.125%的胰蛋白酶进行消化传代,得到足够数量的细胞后接种在培养板中并进行分组处理。空白对照组用DMEM处理,NC模拟物组转染NC模

拟物、miR-1269模拟物组转染miR-1269模拟物、NC抑制物组转染NC抑制物、miR-1269抑制物组转染miR-1269抑制物。

1.6 细胞周期蛋白表达的检测 采用蛋白裂解液提取NSCLC病灶、癌旁病灶、转染后A549细胞中的蛋白,经BCA试剂盒测定总蛋白含量后取30~50 μg总蛋白进行检测,将蛋白样本加入预先配置好的聚丙烯酰胺凝胶中,电泳后将凝胶中的蛋白样本电转移至NC膜,用5%脱脂牛奶在室温封闭NC膜2 h,洗膜3遍后用CyclinD1、CDK4、CDK6、p21^{Cip1}、p27^{Kip1}的单克隆抗体在4℃孵育NC膜过夜;第二天,洗膜3遍后用第二抗体在室温孵育NC膜2 h,最后在凝胶成像仪中曝光得到蛋白条带,根据条带灰度值计算蛋白表达量。

1.7 统计学方法 采用SPSS20.0软件录入数据。两组间计量资料的比较采用t检验,配对组间比较行配对t检验,多组间比较行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同病理特征非小细胞肺癌中miR-1269表达的变化 NSCLC病灶中miR-1269的表达量明显高于癌旁病灶($P < 0.05$);低未分化NSCLC病灶中miR-1269的表达量明显高于高中分化NSCLC病灶($P < 0.05$);有淋巴结转移的NSCLC病灶中miR-1269的表达量明显高于无淋巴结转移的NSCLC病灶($P < 0.05$);有脉管浸润的NSCLC病灶中miR-1269的表达量明显高于无脉管浸润的NSCLC病灶($P < 0.05$);有胸膜侵犯的NSCLC病灶中miR-1269的表达量明显高于无胸膜侵犯的NSCLC病灶($P < 0.05$)。见表1。

表1 不同病理特征非小细胞肺癌(NSCLC)中miR-1269表达的变化

类别	例数	miR-1269表达量/ $\bar{x} \pm s$	t值	P值
组织来源				
NSCLC	58	1.93±0.45	13.384 [*]	0.000
癌旁	58	1.03±0.18		
分化程度				
高中分化	35	1.48±0.31	6.882	0.000
低未分化	23	2.44±0.62		
淋巴结转移				
是	20	2.51±0.68	7.015	0.000
否	38	1.40±0.27		
脉管浸润				
是	25	2.35±0.60	6.093	0.000
否	33	1.53±0.35		
胸膜侵犯				
是	19	2.60±0.74	7.296	0.000
否	39	1.33±0.24		

注:^{*}配对t检验

2.2 肺癌中细胞周期蛋白表达的变化及其与 miR-1269 的相关性 NSCLC 病灶中 CyclinD1、CDK4、CDK6 的表达量明显高于癌旁病灶, p21^{Cip1}、p27^{Kip1} 的表达量明显低于癌旁病灶 ($P < 0.05$); NSCLC 病灶中 miR-1269 的表达量与 CyclinD1、CDK4、CDK6 的表达量呈正相关, 与 p21^{Cip1}、p27^{Kip1} 的表达量呈负相关。见图 1、表 2。

表 2 非小细胞肺癌(NSCLC)病灶及癌旁病灶内细胞周期蛋白表达的比较/ $\bar{x} \pm s$

组织来源	例数	CyclinD1	CDK4	CDK6	p21 ^{Cip1}	p27 ^{Kip1}
癌旁	58	0.58±0.10	1.09±0.22	0.73±0.16	0.52±0.08	0.58±0.09
NSCLC	58	0.31±0.07	0.52±0.07	0.25±0.05	0.70±0.13	0.85±0.15
<i>t</i> 值		15.527	17.037	22.318	8.282	6.895
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 配对 *t* 检验, CyclinD1 为细胞周期蛋白 D1

2.3 miR-1269 模拟物和抑制物对 A549 细胞中细胞周期蛋白表达的调节 miR1269 模拟物组 A549

细胞中 CyclinD1、CDK4、CDK6 的表达量明显高于空白对照组、NC 模拟物组, p21^{Cip1}、p27^{Kip1} 的表达量明显低于空白对照组、NC 模拟物组 ($P < 0.05$); miR1269 抑制物组 A549 细胞中 CyclinD1、CDK4、CDK6 的表达量明显低于空白对照组、NC 抑制物组, p21^{Cip1}、p27^{Kip1} 的表达量明显高于空白对照组、NC 抑制物组 ($P < 0.05$)。见图 2, 3; 表 3, 4。

3 讨论

miR-1269 是具有促癌特性的 miR-1269, 已经被证实实在肝癌病人外周血及肝癌病灶内均呈高表达的趋势^[8-9]; 另有细胞实验证实, miR-1269 对肺癌细胞的增殖、迁移、侵袭具有促进作用^[4]。在本研究中, NSCLC 病灶内 miR-1269 的表达量明显升高, 结合 miR-1269 在体外促进癌细胞增殖、迁移、侵袭的活性分析认为, miR-1269 的高表达与 NSCLC 的发生有关且病灶内高表达的 miR-1269 能够通过改变癌细胞的生物学行为来促进肿瘤病理进程的发展。本研究进一步对不同病理特征 NSCLC 病灶内 miR-1269 表

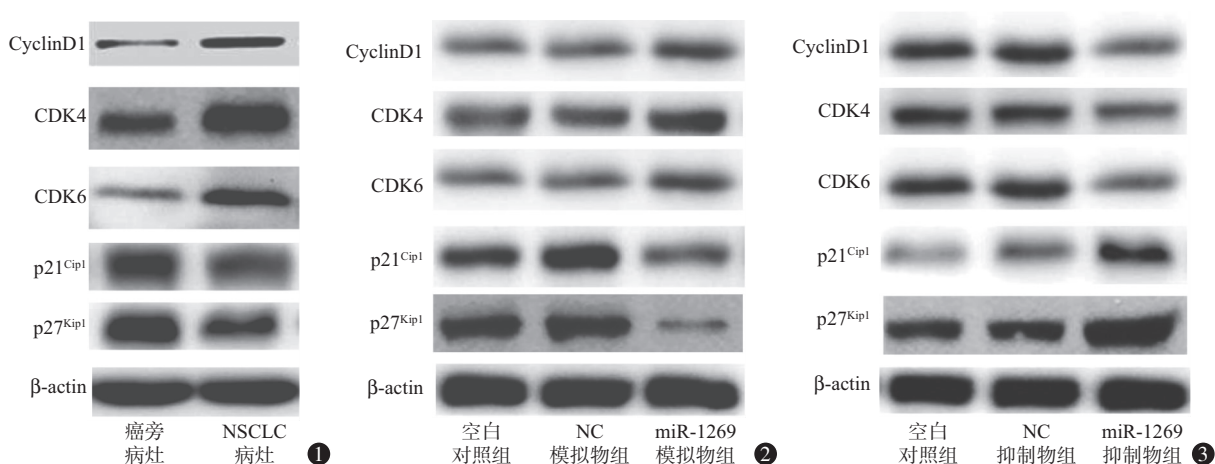


图 1 非小细胞肺癌(NSCLC)病灶及癌旁病灶内细胞周期蛋白的条带图 **图 2** 空白对照组、NC 模拟物、miR-1269 模拟物组细胞周期蛋白的条带图 **图 3** 空白对照组、NC 抑制物组、miR-1269 抑制物组细胞周期蛋白的条带图

表 3 miR-1269 模拟物对 A549 细胞中细胞周期蛋白表达的调节 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	CyclinD1	CDK4	CDK6	p21 ^{Cip1}	p27 ^{Kip1}
空白对照组	0.48±0.06	0.85±0.14	0.50±0.07	0.73±0.14	0.66±0.13
NC 模拟物组	0.51±0.07	0.89±0.15	0.48±0.05	0.77±0.08	0.71±0.12
miR-1269 模拟物组	0.77±0.15 ^{ab}	1.21±0.19 ^{ab}	0.71±0.09 ^{ab}	0.45±0.05 ^{ab}	0.32±0.05 ^{ab}
<i>F</i> 值	12.306	8.157	15.710	16.000	19.985
<i>P</i> 值	0.001	0.006	0.001	0.000	0.000

注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 NC 模拟物组比较, ^b $P < 0.05$, CyclinD1 为细胞周期蛋白 D1

表 4 miR-1269 抑制物对 A549 细胞中细胞周期蛋白表达的调节 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	CyclinD1	CDK4	CDK6	p21 ^{Cip1}	p27 ^{Kip1}
空白对照组	0.71±0.12	0.80±0.12	0.73±0.12	0.33±0.05	0.71±0.13
NC 抑制物组	0.77±0.11	0.83±0.14	0.79±0.13	0.36±0.07	0.73±0.11
miR-1269 抑制物组	0.32±0.05 ^{ab}	0.33±0.07 ^{ab}	0.41±0.08 ^{ab}	0.84±0.14 ^{ab}	1.13±0.18 ^{ab}
<i>F</i> 值	30.879	30.321	16.605	45.500	13.713
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001

注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 NC 模拟物组比较, ^b $P < 0.05$, CyclinD1 为细胞周期蛋白 D1

达量的变化进行了分析,低未分化、有淋巴结转移、有脉管浸润、有胸膜侵犯的NSCLC病灶中miR-1269的表达量明显升高,说明NSCLC病灶内高表达的miR-1269能够使肿瘤病理特征发生恶化,分化程度明显降低且发生淋巴结转移、脉管浸润、胸膜侵犯。

miRs是一类不具备编码蛋白质功能的小分子RNA,通过结合靶基因mRNA来使mRNA降解或阻碍mRNA翻译,进而改变靶基因表达水平并产生相应的生物学效应^[10-11]。FOXO1是miR-1269的靶基因之一,该基因参与细胞周期的调控,一方面通过抑制cyclinD1的表达并阻碍cyclinD1与CDK4、CDK6的结合来使细胞周期停滞^[12-13],另一方面增加p21^{Cip1}、p27^{Kip1}的表达并增强两种分子对细胞周期的阻碍作用,两方面共同起效并实现对细胞周期的抑制^[14-15]。在本研究中,细胞周期正性调控分子cyclinD1、CDK4、CDK6在NSCLC病灶内表达增多且与miR-1269呈负相关,而细胞周期负性调控分子p21^{Cip1}、p27^{Kip1}在NSCLC病灶内表达减少且与miR-1269呈正相关,说明细胞周期蛋白在NSCLC病灶内发生显著变化且这一变化可能受到miR-1269的调控,miR-1269通过靶向抑制FOXO1的表达来削弱FOXO1对细胞周期蛋白的调控作用,进而使NSCLC病灶内细胞周期蛋白的表达发生变化。

为了进一步验证miR-1269在NSCLC病灶内对cyclinD1、CDK4、CDK6及p21^{Cip1}、p27^{Kip1}等细胞周期蛋白的调控作用,本研究在以上临床样本研究的基础上设计了细胞实验,在培养肺癌细胞A549后将miR-1269的模拟物和抑制物转染进入细胞,分别实现miR-1269生物学效应的增强及抑制,通过分析模拟物和抑制物对细胞周期蛋白表达的影响来反应miR-1269对细胞周期表达的调控作用。在转染miR-1269模拟物后,A549细胞中cyclinD1、CDK4、CDK6的表达明显增多,而p21^{Cip1}、p27^{Kip1}的表达明显减少;在转染miR-1269抑制物后,A549细胞中cyclinD1、CDK4、CDK6的表达明显减少,而p21^{Cip1}、p27^{Kip1}的表达明显增多。以上细胞实验的研究表明,miR-1269能够靶向调控肺癌细胞中多种细胞周期蛋白的表达,使细胞周期正性调控分子cyclinD1、CDK4、CDK6的表达增多,而细胞周期负性调控分子p21^{Cip1}、p27^{Kip1}的表达减少。

综上所述,miR-1269在NSCLC中呈显著高表达趋势且高表达的miR-1269与NSCLC病理特征的变化、细胞周期蛋白表达的变化均密切相关;miR-1269能够在体外细胞中靶向调节多种细胞周期蛋白的表达。今后可进一步设计NSCLC荷瘤小鼠,抑

制miR-1269表达后观察肿瘤的生长情况,进而探究抑制miR-1269在NSCLC治疗中的潜在价值。

参考文献

- [1] 张思维,郑荣寿,杨之洵,等.2000—2014年中国肿瘤登记地区肺癌发病年龄变化趋势分析[J].中华预防医学杂志,2018,52(6):579-585.
- [2] 陈万青,李贺,孙可欣,等.2014年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J].中华肿瘤杂志,2018,40(1):5-13.
- [3] YANG XW, SHEN GZ, CAO LQ, et al. MicroRNA-1269 promotes proliferation in human hepatocellular carcinoma via downregulation of FOXO1[J]. BMC Cancer, 2014, 3(14):909.
- [4] 戴素丽,白函瑜,王耀杰,等.非小细胞肺癌组织中高表达的miR-1269对肺癌细胞A549生物学行为的影响[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2018,25(12):1282-1289.
- [5] GAO Z, LIU R, YE N, et al. FOXO1 inhibits tumor cell migration via regulating cell surface morphology in non-small cell lung cancer cells[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 48(1):138-148.
- [6] SHI F, LI T, LIU Z, et al. FOXO1: Another avenue for treating digestive malignancy?[J]. Semin Cancer Biol, 2018, 50:124-131.
- [7] DONG T, ZHANG Y, CHEN Y, et al. FOXO1 inhibits the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by reversing ZEB2-induced epithelial-mesenchymal transition[J]. Oncotarget, 2017, 8(1):1703-1713.
- [8] ELEMERY MN, BADR AN, MOHAMED MA, et al. Validation of a serum microRNA panel as biomarkers for early diagnosis of hepatocellular carcinoma post-hepatitis C infection in Egyptian patients[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(21):3864-3875.
- [9] GAN TQ, TANG RX, HE RQ, et al. Upregulated MiR-1269 in hepatocellular carcinoma and its clinical significance[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(1):714-721.
- [10] ZENG X, WANG W, DENG G, et al. Prediction of potential disease-associated micRNAs by using neural networks[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2019, 18(16):566-575.
- [11] LEE SS, CHEAH YK. The interplay between micRNAs and cellular components of tumour microenvironment (TME) on non-small-cell lung cancer (NSCLC) progression[J]. J Immunol Res, 2019, 2019:3046379. DOI: 10.1155/2019/3046379.
- [12] ŻURYŃ A, KRAJEWSKI A, KLIMASZEWSKA-WIŚNIEWSKA A, et al. Expression of cyclin B1, D1 and K in non small cell lung cancer H1299 cells following treatment with sulforaphane[J]. Oncol Rep, 2019, 41(2):1313-1323.
- [13] CAO J, ZHU Z, WANG H, et al. Combining CDK4/6 inhibition with taxanes enhances anti-tumor efficacy by sustained impairment of pRB-E2F pathways in squamous cell lung cancer[J]. Oncogene, 2019, 38(21):4125-4141.
- [14] ZHANG Y, WANG S, QIAN W, et al. uc.338 targets p21 and cyclin D1 via PI3K/AKT pathway activation to promote cell proliferation in colorectal cancer[J]. Oncol Rep, 2018, 40(2):1119-1128.
- [15] LI N, ZENG J, SUN F, et al. p27 inhibits CDK6/CCND1 complex formation resulting in cell cycle arrest and inhibition of cell proliferation[J]. Cell Cycle, 2018, 17(19/20):2335-2348.

(收稿日期:2019-06-11,修回日期:2019-08-08)