

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.04.007

· 基础研究 ·

lncRNA HCG18/miR-17-5p/HMGA2 分子轴调控非小细胞肺癌细胞增殖及迁移

曲宝亮^{1a}, 穆怀博^{1a}, 勾建强^{1a}, 杨宇^{1a}, 马胜辉^{1b}, 杜春阳²(1. 承德市中心医院 a.呼吸内科; b.肿瘤外科, 河北承德 067000; 2. 河北医科大学 病理学教研室, 河北 石家庄 050017)

[摘要] **目的:** 探讨 lncRNA HCG18/miR-17-5p/HMGA2 分子轴调控非小细胞肺癌(NSCLC)细胞增殖及迁移的分子机制。**方法:** 收集2017年6月至2018年6月承德市中心医院62例NSCLC组织及对应的癌旁组织标本,以及NSCLC细胞系A549、NCI-H1299、H1650、NCI-H460和人肺上皮细胞BEAS-B,用qPCR法检测NSCLC组织及细胞系中HCG18、miR-17-5p及高迁移率族蛋白A2(HMGA2)的表达水平。分别用Si-HCG18、miR-17-5p、miR-17-5p+HCG18或pcDNA3.1-HMGA2转染A549和NCI-H460细胞,用CCK-8法、Transwell实验、Wb检测转染细胞的增殖、迁移、侵袭和HMGA2及EMT相关蛋白的表达。用双荧光素酶报告基因验证HCG18对miR-17-5p或miR-17-5p对HMGA2的靶向调控作用。构建敲降HCG18的A549细胞小鼠移植瘤模型,观察对移植瘤的影响。**结果:** lncRNA HCG18在NSCLC组织和细胞中均高表达(均 $P<0.01$),发生淋巴结转移及晚期NSCLC患者中HCG18的表达显著提高,且HCG18高表达的NSCLC患者预后较差、生存率较低(均 $P<0.01$)。转染Si-HCG18显著抑制NSCLC细胞的增殖、迁移及侵袭能力(均 $P<0.01$),上调上皮钙黏蛋白的表达($P<0.01$)、下调神经钙黏蛋白和波形蛋白的表达(均 $P<0.01$),小鼠移植瘤体积显著减小($P<0.05$)。双荧光素酶报告基因验证了HCG18与miR-17-5p靶向结合,以及miR-17-5p与HMGA2靶向结合。转染miR-17-5p后NSCLC细胞的增殖、迁移及侵袭受到抑制(均 $P<0.01$),促进上皮钙黏蛋白的表达($P<0.01$)、抑制神经钙黏蛋白和波形蛋白的表达(均 $P<0.01$),而转染miR-17-5p+HCG18后可抑制miR-17-5p的作用。**结论:** HCG18通过调控miR-17-5p/HMGA2分子轴促进NSCLC细胞的增殖及迁移。

[关键词] 非小细胞肺癌; A549细胞; NCI-H460细胞; lncRNA HCG18; miR-17-5p; 高迁移率族蛋白A2; 增殖; 迁移
[中图分类号] R734.2; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)04-0409-08

lncRNA HCG18 regulates the proliferation and metastasis of non-small cell lung cancer cells through targeting miR-17-5p/HMGA2 axis

QU Baoliang^{1a}, MU Huaibo^{1a}, GOU Jianqiang^{1a}, YANG Yu^{1a}, MA Shenghui^{1b}, DU Chunyang² (1a. Respiratory Medicine; 1b. Tumor Surgery, Central Hospital of Chengde City, Chengde 067000, Hebei, China; 2. Pathology Department of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of lncRNA HCG18/miR-17-5p/HMGA2 axis regulating the proliferation and metastasis of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. **Methods:** Sixty-two pairs of NSCLC tissues and corresponding para-cancerous tissues collected at Central Hospital of Chengde City from June 2017 to June 2018 were used for this study; in addition, NSCLC cell lines (A549, NCI-H1299, H1650, NCI-H460) and human lung epithelial BEAS-B cells were also collected. mRNA expression levels of HCG18, miR-17-5p and high-mobility group AT-hook 2 (HMGA2) in NSCLC tissues and cell lines were measured by quantitative Real-time polymerase chain reaction (qPCR). Si-HCG18, miR-17-5p, miR-17-5p+HCG18 or pcDNA3.1-HMGA2 were transfected into A549 cells and NCI-H460 cells; CCK-8 assay was used to detect the proliferation of transfected cells, Transwell assay was used to detect the migration and invasion ability of cells, and Wb was used to analyze the expressions of HMGA2 and EMT associated proteins (E-cadherin, N-cadherin and vimentin). The target relationships between HCG18 and miR-17-5p, or between miR-17-5p and HMGA2 were confirmed by dual luciferase reporter gene assay. Mice A549 cell xenograft model with HCG18 knockdown was constructed, and the growth of transplanted tumor was observed. **Results:** lncRNA HCG18 was highly expressed in NSCLC tissues and cells (all

[基金项目] 河北省科技计划资助项目(No.18277748D)。Project supported by the Science and Technology Project of Hebei Province (No. 18277748D)

[作者简介] 曲宝亮(1981-),男,硕士,主治医师,主要从事呼吸内科肿瘤的临床研究,E-mail:cde68920@sohu.com

[通信作者] 杜春阳(DU Chunyang, corresponding author),博士,副教授,主要从事纤维化疾病的研究,E-mail:duchunyang55@163.com

$P < 0.01$); HCG18 level was significantly increased in patients at late stage or with lymphnode metastasis; and high HCG18 level was correlated with poor prognosis and low survival rates of NSCLC patients (all $P < 0.01$). Knockdown of HCG18 significantly inhibited NSCLC cell proliferation, migration and invasion (all $P < 0.01$), up-regulated E-cadherin expression but suppressed N-cadherin and vimentin expression (all $P < 0.01$), and the volume of xenograft was obviously decreased ($P < 0.05$). Dual luciferase reporter gene assay confirmed the relationship between HCG18 and miR-17-5p as well as miR-17-5p and HMGA2. miR-17-5p transfection significantly inhibited NSCLC cell proliferation, migration and invasion (all $P < 0.01$), and up-regulated E-cadherin expression, reversely suppressed N-cadherin and vimentin expression (all $P < 0.01$); however, miR-17-5p + HCG18 transfection reversed the effect of miR-17-5p on NSCLC cells. **Conclusion:** HCG18 promotes the proliferation and migration of NSCLC cells through regulating miR-17-5p/HMGA2 axis.

[Key words] non-small cell lung cancer; A549 cell; CI-H460 cell; lncRNAHCG18; miR-17-5p; HMGA2; proliferation; migration

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(4): 409-416. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.04.007]

肺癌是目前世界上病死率最高的癌症之一,非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)发病率占肺癌总数的4/5^[1-2],预后不容乐观,生存率超过5年的患者不到15%^[3-4]。非编码RNA在NSCLC的发生发展中起重要作用。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)在转录或转录后水平调控基因表达,抑制或沉默蛋白表达,如在胶质细胞瘤^[5-7]、NSCLC^[8]、乳突状甲状腺癌^[9]、椎间盘退变^[10]中发挥重要作用。HCG18是一种免疫相关基因,在间变性胶质瘤中高表达,可作为预后标志物^[11]。然而,HCG18在NSCLC中的研究未见报道。微小RNA(miRNA)通过与下游靶基因3'-UTR靶向结合抑制其表达,参与调控生物功能。miR-17等可作为NSCLC预后标志物^[12-16]。miR-17-5p在NSCLC中通过抑制细胞增殖或促进其凋亡发挥抑癌基因作用^[17-18]。高迁移率族蛋白A2(high-mobility group protein A2, HMGA2)在细胞增殖、分化、胚胎发育、基因表达中发挥作用,参与细胞恶性转化、凋亡、侵袭、迁移及EMT过程^[19-20]。本研究通过检测NSCLC组织及细胞系中HCG18、miR-17-5p及HMGA2水平,探讨HCG18/miR-17-5p/HMGA2分子轴调控NSCLC细胞增殖及迁移的机制,为NSCLC特异性靶向诊断及治疗提供新的解决思路。

1 材料与方法

1.1 组织样本、细胞系、实验动物及主要试剂

收集2017年6月至2018年6月承德市中心医院未接受化疗或者放疗的62例NSCLC患者手术切除的癌组织及对应的癌旁组织标本。患者年龄40~60岁,其平均(51.50±5.08)岁,男性32例、女性30例;临床TNM分期:I期7例、II期12例、III期20例、IV期23例;发生淋巴结转移的为41例,未发生转移的为21例。组织标本获取前告知患者并签署知情同意书,研究方案获得所在医院伦理委员会批准。

人正常肺上皮细胞BEAS-2B及人NSCLC细胞系A549、NCI-H1299、H1650和NCI-H460均购于美

国ATCC公司。4周龄雌性BALB/c裸鼠(体质量16~20g)购买于中国科学院昆明动物研究所[实验动物使用许可证号:SYXK(滇)K2017-0009],于SPF级动物实验室适应饲养1周后用于实验。

DMEM培养基、RPMI 1640培养基、胰蛋白酶和胎牛血清均购于美国Gibco公司,RIPA细胞裂解液及BCA试剂盒购于北京碧云天公司,TRIzol提取试剂、一步法cDNA逆转录试剂盒及SYBR Green Real-Time PCR MasterMix购于美国Invitrogen公司,HMGA2、上皮钙黏蛋白(E-cadherin)、神经钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(vimentin)和GAPDH一抗购于美国Abcam公司,HRP标记的山羊抗兔血清(二抗)购于北京碧云天公司,ECL化学发光液购于美国Bio-Rad公司,CCK-8试剂购于北京索莱宝公司,Lipofectamine™ 2000购于美国Invitrogen公司,双荧光素报告基因试剂盒购于美国Promega公司。qPCR引物由上海生工公司设计并合成,miR-17-5p模拟物、抑制剂及阴性对照寡核苷酸由上海吉玛基因设计并合成。

1.2 细胞培养及转染

BEAS-2B细胞培养于含有10%胎牛血清、100 U/ml青霉素及100 mg/ml链霉素的DMEM培养基中,A549、NCI-H1299、H1650和NCI-H460细胞培养于含有10%胎牛血清、100 U/ml青霉素及100 mg/ml链霉素的RPMI 1640培养基中。待细胞生长至70%~80%汇合度时,用胰酶进行消化,重悬后将 1×10^6 /ml的细胞接种于6孔板,实验设置3个复孔,分别用miR-17-5p模拟物、抑制剂及阴性对照寡核苷酸与Lipofectamine™ 2000(终浓度为50 nmol/L)混合转染A549和NCI-H460细胞,或用pcDNA3.1-HMGA2表达载体及Lipofectamine™ 2000混合转染A549和NCI-H460细胞48 h后进行后续实验检测。

1.3 qPCR法检测NSCLC组织和细胞中HCG18、miR-17-5p及HMGA2的表达

用TRIzol试剂提取组织或细胞中总RNA,Nano-

Drop 检测 RNA 的浓度及纯度,进行逆转录合成 cDNA,反应条件为 40 °C 变性 60 min、25 °C 5 min、85 °C 5 min。按照 SYBR Green 试剂盒说明对 HCG18、miR-17-5p 及 HMGA2 表达水平进行检测,反应条件为 95 °C 变性 15 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 10 s,进行 30 个循环扩增,以 GAPDH 及 U6 作为内参对照。实验设置 3 个重复,根据每孔荧光信号达到阈值时所经历的循环数为 Ct 值,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达水平, $\Delta\Delta Ct = [Ct(\text{实验组目的基因}) - Ct(\text{实验组内参基因})] - [Ct(\text{对照组目的基因}) - Ct(\text{对照组内参基因})]$ 。HCG18 上游引物为 5'-TTG-GCTTCAGTCTGTTTCATCAG-3',下游引物为 5'-ACCTTGACACTGTCTCTTG-3'; miR-17-5p 上游引物为 5'-TGTCAAAGTGCTTACAGTG-3',下游引物为 5'-CCATAATGCTACAAGTGCC-3'; HMGA2 上游引物为 5'-CGAAAGGTGCTGGGCAGCTCCGG-3',下游引物为 5'-CCATTTCCTAGGTCTGCCTCTTG-3'; GAPDH 上游引物为 5'-GCAAGTTCAACGGCAGCAG-3',下游引物为 5'-GCCAGTAGACTCCACGACAT-3'; U6 上游引物为 5'-CTCGCTTCGGCAGCATATACT-3',下游引物为 5'-ACGCTTCACGAATTTGCGTGTC-3'。

1.4 Wb 检测 NSCLC 组织中上皮钙黏蛋白、神经钙黏蛋白和波形蛋白的表达

将组织样本剪碎放入 2 ml 离心管中,加入 RIPA 细胞裂解液处理提取总蛋白,用 PBS 清洗细胞后转移至 2 ml 离心管中,加入 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,BCA 试剂盒检测蛋白浓度及纯度,10% SDS-PAGE 分离蛋白,用半干转移法将蛋白转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后,加入一抗(HMGA2, 1:1 000; E-cadherin, 1:2 000; N-cadherin, 1:1 000; vimentin, 1:1 000; GAPDH, 1:1 000) 4 °C 过夜孵育。次日,去除一抗, TBST 清洗 3 次后,加入相应的 HRP 标记的山羊抗兔二抗(1:1 000) 室温封闭 1 h,最后加入 ECL 化学发光液置于凝胶成像系统中采集图像,用 Image J 对蛋白条带进行定量分析。

1.5 双荧光素酶报告基因检测 miR-17-5p 的靶基因

使用 PCR 分别扩增包含 miR-17-5p 与 HCG18 及 HMGA2 3'-UTR 区结合位点的序列片段,并导入 pmirGLO luciferase 表达载体中,获得 HCG18/HMGA2 野生型载体(pmirGLO-HCG18-WT/pmirGLO-HMGA2-WT),同样的方法获得 HCG18/HMGA2 突变型载体(pmirGLO-HCG18-MUT/pmirGLO-HMGA2-MUT)。将 pmirGLO、HCG18/HMGA2 野生型载体、HCG11/HMGA2 突变型载体、miR-17-5p 模拟物及阴性对照组分别与 Lipofectamine™ 2000 混合后

转染 A549 细胞。转染 48 h 后,根据双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明检测荧光素酶活性。

1.6 CCK-8 法检测敲降 HCG18 对 A549 和 NCI-H460 细胞增殖的影响

细胞转染后,按照 1×10^3 /孔的细胞量将细胞种于 96 孔板中,设置 3 个复孔,置于 37 °C 培养箱中培养 24 h,每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液,37 °C 培养箱孵育 2 h,然后使用酶标仪检测波长在 450 nm 处的光密度(D)值,计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率(%)=(对照组 D 值-敲降组 D 值)/(对照组 D 值-空白组 D 值) $\times 100\%$ 。

1.7 Transwell 实验检测敲降 HCG18 对 A549 和 NCI-H460 细胞迁移及侵袭的影响

用孔径为 3 μ m 的聚碳酸酯膜的 Transwell 小室进行实验。用 50 mg/L 基质胶 1:8 稀释包被 Transwell 小室底部膜的上室面,37 °C 放置 30 min。细胞无血清饥饿培养 12~24 h 时用胰酶消化细胞,终止消化后离心弃去培养液,PBS 洗 1~2 次,用含 BSA 的无血清培养基重悬,调整细胞密度为 1×10^5 /100 μ l 制备细胞悬液。取 100 μ l 细胞悬液加入 Transwell 小室,下室加入含 20% FBS 的 RPMI-1640 培养基,常规培养于 37 °C、5% CO₂ 培养箱 12 h 后,用棉签擦去基质胶和上室内细胞,用 1% 结晶紫染色 20 min,并在显微镜下取 3~5 个视野进行观察、计数穿膜细胞数。

1.8 敲降 HCG18 的 A549 细胞小鼠移植瘤模型的建立及观察

取 5 周龄雌性 BALB/c 裸鼠分为 2 组,A549 细胞移植前分别导入 Si-HCG18 敲降载体(HCG18 敲降组)和 Si-NC 空载体(Si-NC 组),按照 1×10^6 /只的细胞量接种至小鼠右背皮下,每周观察小鼠肿瘤生长情况并测量其大小。35 d 后处死小鼠,测量小鼠肿瘤大小(移植瘤体积计算公式: $V = \text{最短直径}^2 \times \text{最长直径} \times 0.5$)。

1.9 统计学处理

qPCR、Wb 和细胞增殖、迁移、侵袭等实验均重复 3 次。用 SPSS13.0 统计学软件对数据进行统计分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 Kaplan-Meier 制作生存曲线,通过 Log-Rank 检验进行分析,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素 ANOVA 分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

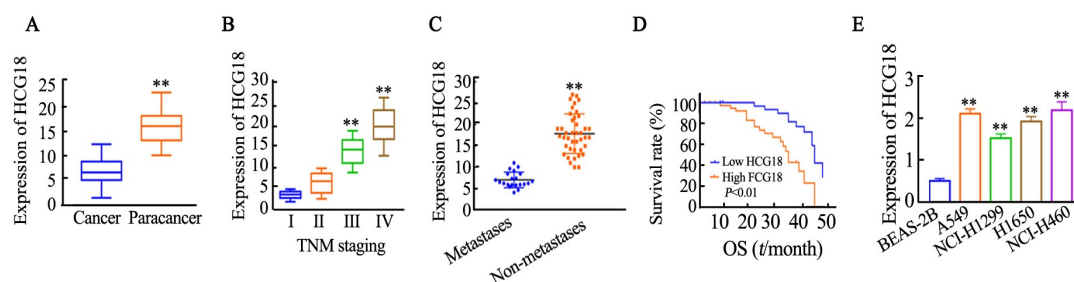
2 结果

2.1 HCG18 在 NSCLC 组织和细胞系中高表达

qPCR 法检测结果显示,与癌旁组织比较,HCG18 在癌组织中的表达水平显著升高($P < 0.01$,图 1A);在 III/IV 期患者中的表达水平显著升高($P < 0.01$,图 1B),在发生淋巴结转移的患者中 HCG18

表达水平显著高于未发生淋巴结转移患者($P < 0.01$, 图 1C)。Kaplan-Meier 生存曲线分析发现, HCG18 表达上调的患者预后较差, 其生存率显著低于 HCG18 低表达患者($P < 0.01$, 图 1D)。在 NSCLC

细胞系中 HCG18 的表达水平显著高于 BEAS-2B 细胞($P < 0.01$, 图 1E)。上述结果表明, HCG18 在 NSCLC 组织和细胞中高表达, 其表达水平与 NSCLC 发展进程密切相关。



** $P < 0.01$ vs Paracancer or Stage I/II or Metastases or BEAS-2B group

A, B, C: Expression of HCG18 in NSCLC tissues was detected by qPCR; D: Kaplan-Meier survival curves and Log-Rank tests were used to compare the OS between the two groups; E: Expression of HCG18 in NSCLC cells was detected by qPCR

图 1 HCG18 在 NSCLC 组织和细胞系中高表达

Fig.1 HCG18 was highly expressed in NSCLC tissues and cells

2.2 敲降 HCG18 抑制 NSCLC 细胞的增殖和迁移

qPCR 法检测结果(图 2A、B)显示, 转染 Si-HCG18 后, 与阴性对照组比较, (1)A549 及 NCI-H460 细胞中 HCG18 表达水平显著降低(均 $P < 0.01$); (2) CCK-8 实验检测结果(图 2C、D)显示, A549 及 NCI-H460 细胞的增殖能力显著下降(均 $P < 0.01$); (3) Transwell 实验结果(图 2E、F)也显示, A549 及 NCI-H460 细胞的迁移及侵袭能力明显受到抑制(均 $P < 0.01$); (4) Wb 实验结果(图 2G)显示, 上皮钙黏蛋白的表达水平显著上调($P < 0.01$), 神经钙黏蛋白及波形蛋白的表达水平则显著下调(均 $P < 0.01$)。

此外, 小鼠皮下移植瘤模型实验结果(图 2H、I)显示, 与 Si-NC 组比较, HCG18 敲降组小鼠移植瘤的体积显著减小($P < 0.05$); Wb 法结果(图 2J)显示, HCG18 敲降组移植瘤组织中上皮钙黏蛋白的表达水平显著上调($P < 0.01$), 神经钙黏蛋白及波形蛋白的表达水平显著下调(均 $P < 0.01$)。结果表明, HCG18 表达对 NSCLC 细胞的表型具有调控作用。

2.3 HCG18 与 miR-17-5p 直接靶向结合

通过 Statbase 及 DIANA-lncBase 软件预测的候选基因中发现, miR-17-5p 在 NSCLC 中发挥抑癌基因作用, HCG18 序列及与下游候选基因 miR-17-5p 的靶向结合位点结构如图 3A 所示。

双荧光素酶报告基因法检测结果(图 3B、C)显示, miR-17-5p 模拟物转染 A549 及 NCI-H460 细胞后, 显著地抑制了同时转染 pmirGLO-HCG18-

WT 载体的细胞荧光素酶活性(均 $P < 0.01$), 而对转染 miR-17-5p 模拟物同时转染 pmirGLO-HCG18-MUT 载体的细胞荧光素酶活性无影响($P > 0.05$)。敲降 HCG18 后, miR-17-5p 的表达显著上调(均 $P < 0.01$, 图 3D), 且 miR-17-5p 在 NSCLC 癌组织中表达水平显著下调($P < 0.01$, 图 3E), HCG18 与 miR-17-5p 的表达呈负相关($P < 0.01$, 图 3F)。上述结果表明, HCG18 与 miR-17-5p 直接靶向结合。

2.4 HCG18 通过抑制 miR-17-5p 上调 HMGA2 表达促进 NSCLC 细胞的增殖及迁移

通过 TargetScan 预测软件分析发现, miR-17-5p 的候选靶基因中 HMGA2 与肺癌的发生及转移密切相关。qPCR 法检测结果(图 4A)发现, HMGA2 在 NSCLC 中高表达($P < 0.01$), 因此对 HMGA2 进行深入研究, 靶向结合位点结构显示如图 4B。

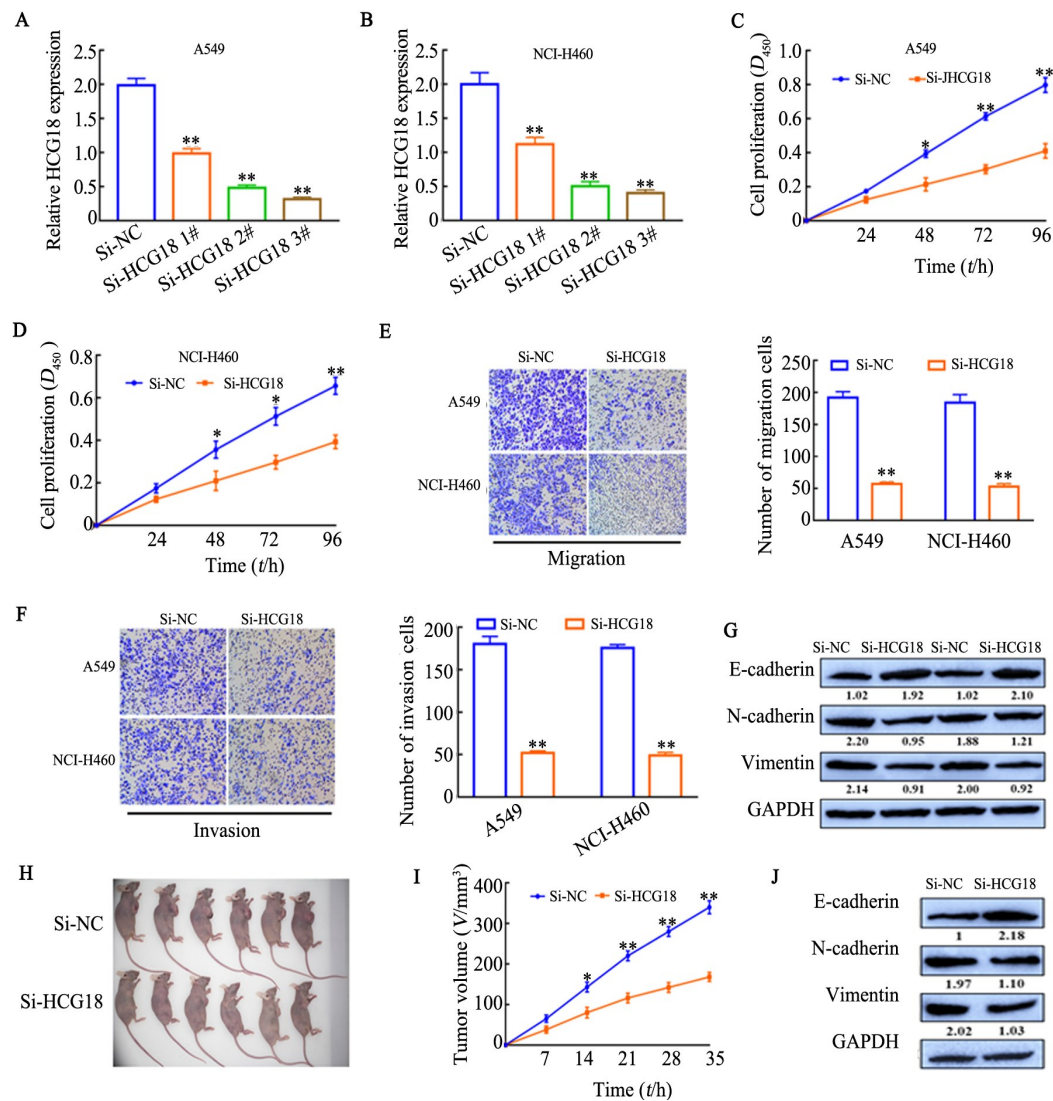
双荧光素酶报告基因法检测结果(图 4C)发现, 过表达 miR-17-5p 显著抑制转染 pmirGLO-HMGA2-WT 载体的细胞荧光素酶活性($P < 0.01$), 对转染 pmirGLO-HMGA2-MUT 载体的细胞荧光素酶活性无影响($P > 0.05$); 敲降 miR-17-5p 后, 转染 pmirGLO-HMGA2-WT 载体的细胞荧光素酶活性显著增加($P < 0.01$), 而对转染 pmirGLO-HMGA2-MUT 载体的细胞荧光素酶活性无影响($P > 0.05$)。

qPCR 法检测结果(图 4D)显示, 过表达 miR-17-5p 显著抑制 A549 细胞 HMGA2 的表达($P < 0.01$), 而同时过表达 HCG18 则上调 A549 细胞 HMGA2

的表达 ($P < 0.05$)。CCK-8 法检测结果 (图 4E) 显示, 过表达 miR-17-5p 显著抑制 A549 细胞的增殖 ($P < 0.01$), 同时过表达 HCG18 则显著增加 A549 细胞的增殖 ($P < 0.05$)。Transwell 实验结果 (图 4F、G) 显示, 过表达 miR-17-5p 显著抑制 A549 细胞的迁移及侵袭 (均 $P < 0.01$), 同时过表达 HCG18 显著增加 A549 细胞的迁移及侵袭 (均 $P < 0.05$)。Wb 实验结果 (图 4H) 也显示, 过表达 miR-17-5p

显著抑制 A549 细胞 HMGA2、神经钙黏蛋白、波形蛋白的表达 (均 $P < 0.01$), 并上调上皮钙黏蛋白的表达 (均 $P < 0.01$); 同时过表达 HCG18, 则上调 A549 细胞 HMGA2、神经钙黏蛋白、波形蛋白的表达 (均 $P < 0.01$), 并抑制上皮钙黏蛋白的表达 ($P < 0.01$)。

上述结果表明, HCG18 通过抑制 miR-17-5p 上调 HMGA2 表达促进 NSCLC 细胞的增殖及迁移。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Si-NC group

A and B: Expression of HCG18 in cells was detected by qPCR; C and D: Cell proliferation was detected by CCK-8 assay;

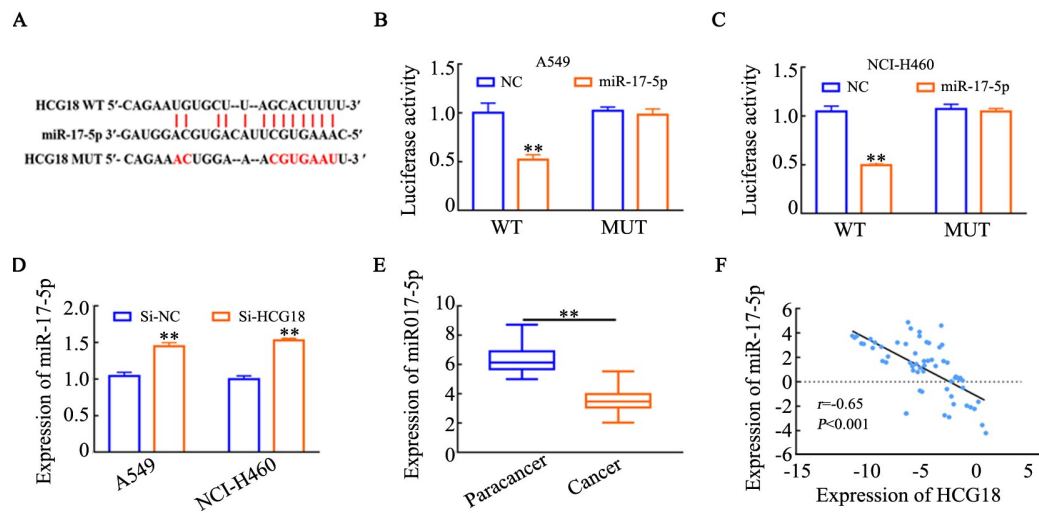
E and F: Cell invasion and migration were detected by Transwell assay (crystal violet staining, $\times 100$);

G: EMT related proteins were detected by Wb; H: The image of xenograft tumor in nude mice;

I: Volume of xenograft tumor in nude mice; J: EMT-associated protein in xenograft tumor tissue of nude mice

图2 敲降HCG18抑制NSCLC细胞的增殖和迁移

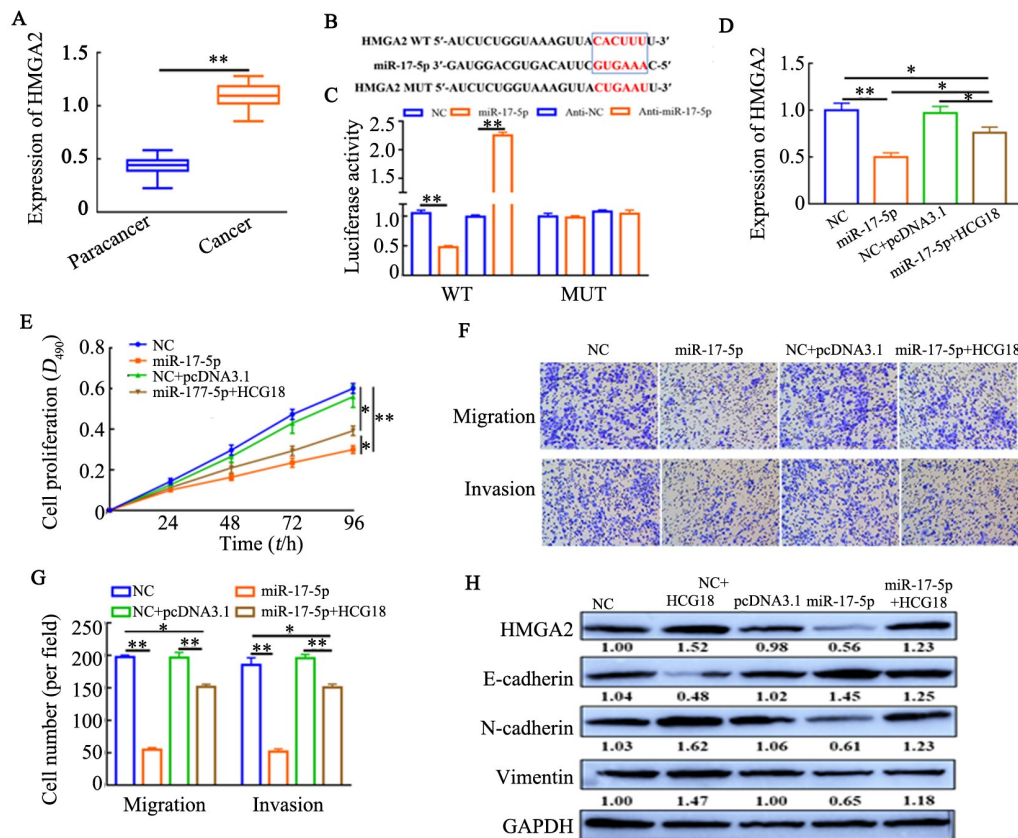
Fig.2 Knockdown of HCG18 suppressed the proliferation and migration of NSCLC cells



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NC or Si-NC or Paracancer tissues

A: Schematic diagram between miR-17-5p and binding sites with HCG18; B and C: Luciferase reporter assay was used to measure luciferase activity of A549 and NCI-H460 cells transfected with wild-type or mutated HCG18 reporters plus miR-17-5p; D: Expression of miR-17-5p in NSCLC cells was detected by qPCR; E: Expression of miR-17-5p in NSCLC tissues was detected by qPCR; F: Correlation analysis of HCG18 and miR-17-5p

图3 HCG18与miR-17-5p直接靶向结合
Fig.3 HCG18 directly targets miR-17-5p



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A: Expression of HMGA2 in NSCLC tissues was detected by qPCR; B: A schematic diagram of the binding sites between miR-17-5p and HMGA2; C: Luciferase reporter assay was used to measure luciferase activity of A549 and NCI-H460 cells transfected with wild-type or mutated HMGA2 reporters plus miR-17-5p; D: Expression of HMGA2 in NSCLC cells was detected by qPCR; E: Cell proliferation was detected by CC-8 assay; F and G: Cell invasion and migration were detected by Transwell assay (Crystal violet staining, $\times 100$); H: EMT related proteins were detected by Wb

图4 HCG18通过抑制miR-17-5p上调HMGA2表达促进NSCLC细胞的增殖及迁移

Fig.4 HCG18 upregulated HMGA2 to promote NSCLC cell proliferation and migration by suppressing miR-17-5p

3 讨论

肺癌是世界上发病率及病死率较高的癌症之一,在过去的几十年中,NSCLC的癌变和病理生理学已被广泛研究,然而其发生及发展的分子机制尚未明了。因此,探究NSCLC的发病机制将有助于开发新的治疗靶点和治疗策略。在NSCLC机制的研究过程中,发现大量的lncRNA参与调控NSCLC的发展进程,如PCAT6^[4]、AFAP1-AS1^[21]、SNHG16^[22]等通过调控NSCLC细胞的自噬、增殖、凋亡、侵袭、迁移或EMT进而影响NSCLC的发生及发展。尽管已发现了大量的lncRNA参与NSCLC的发生发展,然而仍有大量的lncRNA未被发现及报道。

在本研究中,对62例临床NSCLC组织标本进行检测发现,lncRNA HCG18在NSCLC组织中高表达,且在发生淋巴结转移及晚期患者中表达水平显著升高;通过生存曲线分析发现,HCG18高表达的患者预后较差,生存率也明显低于HCG18低表达的患者。进一步通过细胞实验结果显示,HCG18在人NSCLC细胞株中的表达水平显著高于正常人肺上皮细胞。此外,并对HCG18在NSCLC中的表型及机制的研究结果显示,敲降HCG18显著抑制A549及NCI-H460细胞的增殖、迁移及侵袭。通过生物学软件分析发现,HCG18下游靶向调控的miRNA中,miR-17-5p在NSCLC中扮演抑癌基因作用^[17],且发现miR-17-5p在NSCLC组织本中表达水平显著下调。双荧光素酶报告基因检测结果验证,HCG18与miR-17-5p靶向结合,且两者在NSCLC中的表达呈负相关。研究^[23]发现,miR-17-5p与HMGA2靶向结合,HMGA2的表达与细胞的增殖、迁移、侵袭及EMT等密切相关,并通过双荧光素酶报告基因、qPCR及Wb实验验证,本研究结果与已报道结果一致。此外,本研究结果表明,过表达miR-17-5p显著抑制NSCLC细胞的增殖、迁移及侵袭,而同时过表达HCG18则抑制了miR-17-5p的这种作用。由此可知,HCG18通过调控miR-17-5p及下游靶基因HMGA2的表达调控NSCLC的发生发展进程。

综上所述,本研究初步探讨了HCG18/miR-17-5p/HMGA2分子轴调控NSCLC细胞增殖及迁移的分子机制,提示HCG18及其分子轴可为NSCLC治疗提供新的思路。

[参考文献]

- [1] YASUKAWA M, SAWABATA N, KAWAGUCHI T, et al. Histological grade: analysis of prognosis of non-small cell lung cancer after complete resection[J]. *In Vivo*, 2018, 32(6): 1505-1512. DOI: 10.21873/invivo.11407.
- [2] MUÑOZ-UNCETA N, BURGUEÑO I, JIMÉNEZ E, et al. Durvalumab in NSCLC: latest evidence and clinical potential[J/OL]. *Ther Adv Med Oncol*, 2018, 10: 1758835918804151[2018-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6187424/>. DOI: 10.1177/1758835918804151.
- [3] HE M Y, ZHU J L, YU N, et al. The superior antitumor effect of self-assembled paclitaxel nanofilaments for lung cancer cells[J]. *Curr Drug Deliv*, 2019, 16(2): 171-178. DOI: 10.2174/1567201815666181017094003.
- [4] SHI X F, LIU Z L, LIU Z C, et al. Long noncoding RNA PCAT6 functions as an oncogene by binding to EZH2 and suppressing LATS2 in non-small-cell lung cancer[J/OL]. *EBioMedicine*, 2018, 37: 177-187[2018-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6286630/>. DOI:10.1016/j.ebiom.2018.10.004.
- [5] ZHOU K, ZHANG C, YAO H, et al. Knockdown of long non-coding RNA NEAT1 inhibits glioma cell migration and invasion via modulation of SOX2 targeted by miR-132[J/OL]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 105[2018-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6064054/>. DOI:10.1186/s12943-018-0849-2.
- [6] LU S N, JIANG X M, SU Z L, et al. The role of the long non-coding RNA HOXA11-AS in promoting proliferation and metastasis of malignant tumors[J]. *Cell Biol Int*, 2018, 42(12): 1596-1601. DOI: 10.1002/cbin.11045.
- [7] XIONG Z, WANG L, WANG Q. lncRNA MALAT1/miR-129 axis promotes glioma tumorigenesis by targeting SOX2[J/OL]. *J Cell Mol Med*, 2018, 2018: Epub ahead of print[2018-10-18]. [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1582-4934](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1582-4934). DOI: 10.1111/jcmm.13667.
- [8] SUN W, ZU Y K, FU X N, et al. Knockdown of lncRNA-XIST enhances the chemosensitivity of NSCLC cells via suppression of autophagy[J/OL]. *Oncol Rep*, 2017, 38(6): 3347-3354[2018-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5783579/>. DOI: 10.3892/or.2017.6056.
- [9] FU X M, GOU W, LI N, et al. The expression and function of long noncoding RNA lncRNA-ATB in papillary thyroid cancer[J/OL]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(14): 3239-3246[2018-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=28770959>.
- [10] XI Y H, JIANG T W, WANG W H, et al. Long non-coding HCG18 promotes intervertebral disc degeneration by sponging miR-146a-5p and regulating TRAF6 expression[J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 13234[2018-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5643303/>. DOI:10.1038/s41598-017-13364-6.
- [11] WANG W, ZHAO Z, YANG F, et al. An immune-related lncRNA signature for patients with anaplastic gliomas[J]. *J Neurooncol*, 2018, 136(2): 263-271. DOI: 10.1007/s11060-017-2667-6.
- [12] RUSSO V, PACIOCCO A, AFFINITO A, et al. Aptamer-mir-34c conjugate affects cell proliferation of non-small-cell lung cancer cells[J/OL]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 13: 334-346[2018-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6197774/>. DOI:10.1016/j.omtn.2018.09.016.
- [13] CHEN W, HUANG Y Y, ZHANG S F, et al. MicroRNA-212 suppresses nonsmall lung cancer invasion and migration by regulating ubiquitin-specific protease-9[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(4): 6482-6489. DOI:10.1002/jcb.27939.
- [14] GUO N N, ZHAO Y N, ZHANG W, et al. MicroRNA-133a down-

- regulated EGFR expression in human non-small cell lung cancer cells via AKT/ERK signaling[J/OL]. *Oncol Lett*, 2018, 16(5): 6045-6050[2018-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6176458/>. DOI:10.3892/ol.2018.9399.
- [15] JING C W, CAO H X, QIN X B, et al. Exosome-mediated gefitinib resistance in lung cancer HCC827 cells via delivery of miR-21[J/OL]. *Oncol Lett*, 2018, 15(6): 9811-9817[2018-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6004702/>. DOI: 10.3892/ol.2018.8604.
- [16] ZHAO J, FU W F, LIAO H Y, et al. The regulatory and predictive functions of miR-17 and miR-92 families on cisplatin resistance of non-small cell lung cancer[J/OL]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 731[2018-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4617718/>. DOI:10.1186/s12885-015-1713-z.
- [17] LI H, ZHOU H, LUO J S, et al. MicroRNA-17-5p inhibits proliferation and triggers apoptosis in non-small cell lung cancer by targeting transforming growth factor β receptor 2[J/OL]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(6): 2715-2722[2018-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5450772/>. DOI:10.3892/etm.2017.4347.
- [18] ZHANG G Y, AN X K, ZHAO H Y, et al. Long non-coding RNA HNF1A-AS1 promotes cell proliferation and invasion via regulating miR-17-5p in non-small cell lung cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 98: 594-599. DOI:10.1016/j.biopha.2017.12.080.
- [19] NAGHIZADEH S, MANSOORI B, MOHAMMADI A, et al. Effects of HMGA2 gene downregulation by siRNA on lung carcinoma cell migration in A549 cell lines[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(4): 5024-5032. DOI:10.1002/jcb.27778.
- [20] TIAN Y H, ZHANG N L, CHEN S W, et al. The long non-coding RNA LSINCT5 promotes malignancy in non-small cell lung cancer by stabilizing HMGA2[J/OL]. *Cell Cycle*, 2018, 17(10): 1188-1198[2018-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6110604/>. DOI:10.1080/15384101.2018.1467675.
- [21] HE J, WU K, GUO C L, et al. Long non-coding RNA AFAP1-AS1 plays an oncogenic role in promoting cell migration in non-small cell lung cancer[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(24): 4667-4681. DOI:10.1007/s00018-018-2923-8.
- [22] HAN W, DU X M, LIU M, et al. Increased expression of long non-coding RNA SNHG16 correlates with tumor progression and poor prognosis in non-small cell lung cancer[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 121: 270-278. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.10.004.
- [23] HAWSAWI O, HENDERSON V, BURTON L J, et al. High mobility group A2 (HMGA2) promotes EMT via MAPK pathway in prostate cancer[J/OL]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 504(1): 196-202[2018-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6245948/>. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.08.155.

[收稿日期] 2018-10-20

[修回日期] 2019-02-26

[本文编辑] 党瑞山