

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.05.002

· 基础研究 ·

miR-625通过负向调控 Resistin 的表达抑制非小细胞肺癌细胞的恶性生物学行为及其机制

张建庆, 章恒(新疆维吾尔自治区人民医院 放疗一科, 新疆 乌鲁木齐 830001)

[摘要] **目的:**探究 miR-625 和 Resistin 对 NSCLC 细胞增殖、侵袭、迁移及裸鼠移植瘤生长的影响及其可能的机制。**方法:**qPCR 实验检测 80 例 NSCLC 及癌旁组织(标本收集自 2018 年 3 月至 2019 年 10 月于新疆维吾尔自治区人民医院手术治疗的 NSCLC 患者)和 4 种细胞系中 miR-625 与 Resistin 的表达,生物信息学预测两者的靶向关系并用双荧光素酶基因报告实验进行验证;通过脂质体转染技术在 NSCLC 细胞中过表达或抑制 miR-625 及 Resistin 表达,实验分为 miR-625 mimic 组、miR-625 inhibitor 组、si-Resistin 组、miR-625 inhibitor+si-Resistin 组和 NC 组,利用 CCK-8、Transwell 及划痕实验检测 miR-625 与 Resistin 对 NSCLC 细胞增殖、侵袭及迁移的影响,Western blotting 实验检测两者对 NSCLC 细胞中 EMT 相关的 PI3K/AKT/Snail 通路蛋白表达的影响,裸鼠成瘤实验观察两者对 A549 细胞移植瘤生长的影响。**结果:**miR-625 在 NSCLC 组织和 4 种细胞系中呈低表达、Resistin 呈高表达(均 $P < 0.01$),两者表达水平呈负相关($r = -0.7183, P < 0.01$),且 Resistin 的表达与 NSCLC 分化程度、临床分期及淋巴结转移相关。Resistin 是 miR-625 的靶基因。在 NSCLC 细胞系 A549 和 H226 的增殖、侵袭、迁移能力及裸鼠移植瘤的生长方面,与 Blank 组和 NC 组相比,miR-625 mimic 组与 si-Resistin 组能力均显著降低(均 $P < 0.05$),miR-625 inhibitor 组显著提高(均 $P < 0.05$);miR-625 inhibitor+si-Resistin 组显著低于 miR-625 inhibitor 组(均 $P < 0.05$);NC 组与 miR-625 inhibitor+si-Resistin 组之间无显著差异(均 $P > 0.05$);p-AKT、p-PI3K、Snail、Twist1、Vimentin 等蛋白表达变化也有相同的趋势(均 $P < 0.05$),E-cadherin 蛋白表达则发生相反的改变($P < 0.05$)。**结论:**miR-625 在 NSCLC 组织和细胞中均呈低表达,其能负向调控 Resistin 表达从而抑制 NSCLC 细胞的增殖、侵袭和迁移及裸鼠移植瘤生长,其机制可能与 PI3K/AKT/Snail 信号通路有关。

[关键词] miR-625; Resistin; 非小细胞肺癌; A549 细胞; H226 细胞; 增殖; 侵袭; 迁移; PI3K/AKT/Snail

[中图分类号] R734.2; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)05-0477-10

miR-625 inhibits the malignant biological behavior of non-small cell lung cancer cells by negatively regulating Resistin expression and its mechanisms

ZHANG Jianqing, ZHANG Heng (The First Department of Radiotherapy, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001, Xinjiang, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of miR-625 and Resistin on the proliferation, invasion and migration of NSCLC cells as well as the growth of transplanted tumors in nude mice and their possible mechanisms. **Methods:** qPCR was used to detect the expression of miR-625 and Resistin in 80 pairs of NSCLC and corresponding para-cancerous tissues (specimens collected from NSCLC patients who were surgically treated in Xinjiang Uygur Autonomous Region People's Hospital from March 2018 to October 2019) and four cell lines. Bioinformatics was adopted to predict the targeting relationship between miR-625 and Resistin, which was then verified by Dual luciferase gene reporter experiment. Overexpression or inhibition of miR-625 and Resistin in NSCLC cells was achieved with lipofection transfection technology, and the experimental cells were divided into miR-625 mimic group, miR-625 inhibitor group, si-Resistin group, miR-625 inhibitor+si-Resistin group and NC group. The effects of miR-625 and Resistin on proliferation, invasion and migration of NSCLC cells were detected by CCK-8, Transwell and Scratch test, respectively. Western blotting was used to detect the effects of miR-625 and Resistin on the expressions of PI3K/AKT/Snail pathway proteins related with EMT in NSCLC cells. A549 cell transplanted tumor model was constructed in nude mice to observe the effect of miR-625 and Resistin on the growth of xenografts. **Results:** Compared with para-cancerous tissues, miR-625 showed low expression while Resistin showed high expression in NSCLC tissues and four cell lines (both $P < 0.01$), and the two were negatively correlated ($r = -0.7183$,

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(No. 2019D01C108)。Project supported by the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (No. 2019D01C108)

[作者简介] 张建庆(1974-),男,硕士,副主任医师,主要从事肿瘤放疗及生物治疗相关的基础和临床研究,E-mail:germanywork@163.com

[通信作者] 张建庆(ZHANG Jianqing, corresponding author),E-mail:germanywork@163.com

$P < 0.01$). The expression of Resistin was related to the degree of NSCLC differentiation, clinical stage and lymph node metastasis. Resistin was a target gene of miR-625. Compared with the Blank group and NC group, the proliferation, invasion and migration of NSCLC cell lines A549 and H226, as well as the growth of transplanted tumors in nude mice in the miR-625 mimic group and the si-Resistin group were significantly reduced (all $P < 0.05$), while those indicators in the miR-625 inhibitor group were significantly improved (all $P < 0.05$); However, co-transfection of miR-625 inhibitor and si-Resistin significantly reversed the effect of miR-625 inhibitor on above indicators (all $P < 0.05$); And there was no significant difference between NC group and miR-625 inhibitor+si-Resistin group (all $P > 0.05$). The protein expressions of p-AKT, p-PI3K, Snail, Twist1 and Vimentin also showed the same trend (all $P < 0.05$), while the expression of E-cadherin protein changed in the opposite direction ($P < 0.05$). **Conclusion:** miR-625 is lowly expressed in NSCLC tissues and cell lines, which can negatively regulate Resistin expression to inhibit the proliferation, invasion and migration of NSCLC cells and the growth of transplanted tumors in nude mice. The mechanism may be related to the PI3K/AKT/Snail signaling pathway.

[Key words] miR-625; Resistin; non-small cell lung cancer (NSCLC); A549 cell; H226 cell; proliferation; invasion; migration; PI3K/AKT/Snail

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(5): 477-486. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.05.002]

肺癌是人类最常见的恶性肿瘤之一,其发病率与死亡率均居人类恶性肿瘤前列^[1]。近85%的肺癌为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),其中又可细分为腺癌、鳞癌、大细胞癌等类型^[2]。NSCLC的恶性化进程是一个多阶段的复杂过程,涉及到基因、蛋白及多种病理学改变,积极探索这些因素有助于早期判断肿瘤的发生并对其预后的改善有着重要的意义。微小RNA(microRNA, miR)是一类能够与目标靶mRNA的3'端非翻译区(UTR)以完全或不完全互补方式结合并引起后者降解或抑制其翻译的内源性单链非编码小RNA^[3]。miR-625在肝癌^[4]、乳腺癌^[5]、胃癌^[6]、结直肠癌^[7]等多种实体恶性肿瘤中存在异常表达。研究^[8]发现,miR-625在NSCLC患者血清中的表达明显低于良性肺病患者与健康对照者,且与患者的临床分期相关,但未进一步研究其相关作用机制,且miR-625在NSCLC组织中表达的相关研究也鲜见报道,因此miR-625在NSCLC的作用还有待进一步深入探索。Resistin是抵抗素样分子(resistin-like molecule, RELM)家族中的一员,因其与肺部炎症时分泌的一种细胞因子FIZZI具有同源性,故又称为FIZZI^[9]。Resistin作为一个炎症调节因子参与人类多种疾病的发生发展,如风湿性疾病、慢性肾病及恶性肿瘤等^[11-12]。在肺腺癌组织中Resistin的表达显著升高,其可能通过TLR4/Src/EGFR/PI3K/NF- κ B途径提高癌细胞的转移能力^[13]。为了研究miR-625和Resistin是否对NSCLC的发生发展存在影响,本研究通过生物信息学及细胞功能实验进行探究,旨在进一步阐明NSCLC发生发展的分子机制,并为NSCLC的早期临床诊断及靶向治疗提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 组织样本

收集2018年3月至2019年10年于新疆维吾尔自治区人民医院行手术治疗并经病理学证实的80例NSCLC患者的癌组织及配对癌旁组织(距肿瘤>5 cm)。

本研究获得本院伦理委员会审查批准,所有研究对象均签署知情同意书。纳入患者术前均未接受任何放、化疗及免疫调剂治疗,术中组织标本经病理诊断证实。排除临床资料不完整及未获得患者及家属知情同意者。术中获得标本立即在4℃预冷的PBS溶液冲洗数遍以除去血污后迅速置于液氮中冻存,以供后续实验使用。

1.2 细胞系及主要试剂

人正常支气管上皮细胞系BEAS-2B及人NSCLC细胞系A549、H322、GLC-82、H226均购自中国科学院上海细胞库,用含有10%FBS的RPMI 1640培养基置于37℃、5% CO₂恒温培养箱中常规培养。RPMI 1640、含EDTA的0.25%胰蛋白酶购自美国Hyclone公司,嘌呤霉素购自美国Sigma公司,胎牛血清(FBS)、Opti-MEM均购自英国Gibco公司,TRIzol、逆转录试剂盒均购自美国Thermo公司,SYBR Green Real-time PCR试剂盒购自广州瑞博生物公司,转染试剂脂质体Lipofectamine3000购自美国Invitrogen公司,miR-625 mimic、miR-625 inhibitor及si-Resistin、miR-625 inhibitor+si-Resistin慢病毒和阴性对照(negative control, NC)均购自上海吉玛生物科技公司,小鼠抗Resistin、上皮-钙黏蛋白(E-cadherin)和波形蛋白(Vimentin)抗体和大鼠抗p-AKT、p-PI3K、Snail、Twist1、 β -actin抗体均购自美国Abcam公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗小鼠、兔抗大鼠IgG抗体购自广州晶彩生物公司,Resistin野生型(Wt)及突变型(Mut)的荧光素酶报告基因质粒、荧光酶检测试剂盒均购自美国Promega公司,PCR引物由上海生物工程有限公司合成,免疫组化EnVision二步法试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物公司,BALB/c裸鼠购自新疆医科大学动物实验中心[实验动物合格证号:SCXK(新)2019-0002]。

1.3 细胞转染与分组

取处于对数生长期的A549、H226细胞,用Opti-MEM培养基调整细胞密度,以 2×10^5 个/孔接种至

6孔板中培养过夜。参照转染试剂 Lipofectamine3000 说明书,将 100 nmol/L 的 miR-625 mimic、miR-625 inhibitor、NC 及 50 ng 的 si-Resistin、miR-625 inhibitor+si-Resistin 质粒分别转染入 A549、H226 细胞内,未经任何处理的细胞设为 Blank 组,按转染质粒的不同将细胞分为 miR-625 mimic 组、miR-625 inhibitor 组、NC 组、si-Resistin 组和 miR-625 inhibitor+si-Resistin 组。转染 6 h 后将培养基更换为含 10%FBS 的 RPMI 1640 完全培养基后继续进行培养,取转染 48 h 后细胞进行后续实验。

1.4 免疫组织化学法检测 Resistin 在 NSCLC 组织中的表达

按照免疫组织化学染色试剂盒说明书进行操作,NSCLC 组织或癌旁组织经 4% 甲醛溶液固定 15 min,梯度酒精进行脱水,石蜡包埋,制成约 4 μm 的石蜡切片,采用 EnVison 二步法检测 NSCLC 及癌旁组织中 Resistin 的表达。Resistin 抗体稀释比例为 1:500,其余操作参照说明书进行。染色结果判定采用 Sini-crope 改良法^[14]。按肿瘤细胞染色强度进行评分:0 分为无色;1 分为淡黄色;2 分为棕黄色;3 分为棕褐色。按肿瘤细胞染色阳性百分比评分:阴性为 0 分, $\geq 1\%$ 且 $< 10\%$ 为 1 分, $\geq 10\%$ 且 $< 50\%$ 为 2 分, $\geq 50\%$ 且 $< 75\%$ 为 3 分, $\geq 75\%$ 为 4 分。最后取染色强度和阳性细胞百分比的和决定最终染色结果:其中 0~3 分为阴性,4 分以上为阳性。所有标本均经 3 位高级职称的病理医师通过双盲法独立评估。

1.5 qPCR 检测 miR-625 和 Resistin 在 NSCLC 组织及细胞中的表达

按照 TRIzol 法提取 NSCLC 组织与癌旁组织及 BEAS-2B、A549、H322、GLC-82、H226 及转染后的各组 A549、H226 细胞中总 RNA,分光光度计检测 RNA 纯度与浓度。利用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。根据 SYBR Green Real-time PCR 试剂盒说明书及预实验确定的反应时间与温度进行 qPCR,反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ (30 s) 预变性后,变性 95 $^{\circ}\text{C}$ (7 s) \rightarrow 退火 60 $^{\circ}\text{C}$ (30 s) \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ (15 s),共 40 个循环。qPCR 的引物序列:miR-625-F 为 5'-GGCTAGTTCACCTCTCCTCC-3',miR-625-R 为 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'; Resistin-F 为 5'-CCAGCCATCAGCCATGAGGGT-3'; Resistin-R 为 5'-GGAGCCCTTTCTGAATCCGCA-3'; U6-F 为 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3',U6-R 为 5'-CGCTTACGAATTTGCGTGTTCAT-3'; GAPDH-F 为 5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3',GAPDH-R 为 5'-AGGGCCATCCACAGTCTTC-3'。以 U6/GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算目的基因表达量。

1.6 CCK-8 实验检测 miR-625 和 Resistin 对 NSCLC

细胞增殖的影响

取转染后的各组 A549、H226 细胞,进行消化后调整细胞密度至 2×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中进行培养过夜后,分别于 24、36、48 h 向每孔加入 10 μl CCK-8,置于酶标仪中检测 570 nm 波长处每孔的光密度(D)值,以 D 值代表细胞增殖水平。每个时间点每组设置 5 个复孔,绘制各组细胞的生长曲线。

1.7 Transwell 实验检测 miR-625 和 Resistin 对 NSCLC 细胞侵袭能力的影响

Matrigel 基质胶 4 $^{\circ}\text{C}$ 溶解后,采用不含 FBS 的 RPMI 1640 培养基以 1:5 进行稀释,取 40 μl 稀释后的基质胶包被 Transwell 上室,于细胞培养箱中静置 4 h,待胶凝固后备用。常规消化转染后的各组 A549、H226 细胞后,用不含 FBS 的 RPMI 1640 培养液进行重悬,接种至含 200 μl 无血清培养基的 12 孔板的 Transwell 上室中并调整密度至 4×10^4 个/孔,Transwell 下室加入 600 μl 含 10%FBS 的 RPMI 1640 培养液,每组设 3 个复孔。培养 48 h 后取出上室,PBS 冲洗 2 次,并用湿棉签轻轻擦拭上室未穿出细胞,无水酒精固定 15 min,室温下晾干,0.1% 的结晶紫于室温下染色 30 min,PBS 冲洗 2 次后于倒置显微镜下观察穿出细胞,每组随机选取 5 个视野进行计数。

1.8 细胞划痕实验检测 miR-625 和 Resistin 对 NSCLC 细胞迁移能力的影响

预先在 6 孔板每个孔的底部用笔划 2 条间隔为 5 mm 的横线,将转染后的各组 A549、H226 细胞分别接种于 6 孔板中,每孔加入 2 ml 含 10%FBS 的 RPMI 1640 培养液,并使每孔细胞达 2×10^5 个,培养至细胞 80% 左右汇合时使用 200 μl 移液器枪头在细胞培养面垂直划线,PBS 冲洗细胞 3 次以去除刮除掉的细胞。再向每孔加入含 2%FBS 的 RPMI 1640 培养液,继续培养 24 h 后倒置显微镜下拍摄,使用 Image J 软件测量细胞迁移距离。

1.9 双荧光素酶基因报告实验检测 miR-625 与 Resistin 间的靶向关系

采用 miRNA 靶基因在线数据库 TargetScan 预测显示 miR-625 与 Resistin 的 3' UTR 区具有结合位点,利用双荧光素酶基因报告实验进行验证。取处于对数生长期的 A549、H226 细胞,调整细胞密度至 2×10^4 个/孔,接种于 96 孔板中,培养过夜后,利用 Lipofectamine3000 将 100 ng 的 Resistin 野生型(Wt)或突变型(Mut)荧光素酶报告基因质粒与 50 ng 的 miR-625 mimic 共转染入 A549、H226 细胞中。实验分为 Resistin Wt+miR-625 mimic 组、Resistin Mut+miR-625 mimic 组、Resistin Wt+NC 对照组和 Resistin

Mut+NC 对照组, 每组设 5 个复孔。转染 48 h 后, 按双荧光素酶检测试剂盒说明书操作, 利用化学发光仪检测各组细胞 Resistin 3'UTR 的荧光强度。

1.10 裸鼠皮下成瘤实验检测 miR-625 和 Resistin 对 A549 细胞移植瘤生长的影响

取处于对数生长期的 A549 细胞接种至直径为 5 cm 的细胞培养皿中, 待细胞生长汇合至 80% 时消化细胞, 调整细胞密度至 2×10^5 个/孔并接种于 6 孔板中, 加入 Opti-MEM 稀释的 miR-625 mimic、miR-625 inhibitor 及 NC、si-Resistin 及 miR-625 inhibitor+si-Resistin 的病毒液 (MOI=50), 培养 24 h 后更换为 10%FBS 的 RPMI 1640 培养液。取感染后的 A549 细胞, 常规消化, 用无血清 RPMI 1640 培养基重悬细胞并将其调整至 4×10^7 个/ml 的细胞悬液。48 只 4 周龄的 BALB/c 裸鼠随机分为 6 组 (每组 8 只), 取 200 μ l 的细胞悬液分别接种于裸鼠的右上肢腋下, 并将裸鼠分为 miR-625 mimic 组、miR-625 inhibitor 组、si-Resistin 组及 miR-625 inhibitor+si-Resistin 组、NC 组, 接种无特殊处理的 A549 细胞的裸鼠设为 Blank 组。接种后每隔 2 d 测量并计算肿瘤体积 (肿瘤体积=肿瘤最短径²×肿瘤最长径/2), 接种 2 周后脱颈处死荷瘤小鼠, 称取移植瘤质量。本部分实验通过我院动物伦理委员会审批。

1.11 WB 实验检测 miR-625 和 Resistin 对 NSCLC 细胞中 PI3K/AKT/Snail 通路相关蛋白表达的影响

取 NSCLC 及癌旁对照组织或转染后的各组 A549、H226 细胞, 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 洗涤组织或细胞 3 次后, 加入 RIPA 细胞裂解液及蛋白酶抑制剂, 提取组织或细胞中总蛋白。BCA 法进行蛋白定量, 按照 1:4 向上清液中加入 5×蛋白上样缓冲液, 并于沸水中加热变性 10 min。取 30 μ g 的蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行蛋白分离, 采用湿转法将分离的蛋白转至 PVDF 膜上, 5% 的脱脂牛奶于室温下封闭 2 h 后, 分别加入 Resistin (1:500)、Vimentin (1:300)、E-cadherin (1:500)、p-AKT (1:500)、p-PI3K (1:800)、Snail (1:800)、Twist1 (1:800)、 β -actin (1:1000) 一抗, 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜。TBST 溶液清洗 3 次, 5 min/次, 加入 HRP 标记的二抗 (1:5000) 室温孵育 1 h, 以 TBST 溶液清洗 3 次、5 min/次。最后均匀滴加 ECL 发光液后于凝胶成像仪进行曝光拍照。Image J 软件测定条带灰度值, 以目标蛋白与内参 β -actin 的比值作为其相对含量。以上实验重复 3 次。

1.12 统计学处理

采用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 5.0 进行统计分析, 所有实验独立重复 3 次。正态分布的计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采

用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 的 Dunnett's/Bonferroni's 多重比较进行分析, 利用 Pearson's χ^2 检验分析样本中 Resistin 的表达与临床病理特征的关系, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC 组织和癌旁组织中 miR-625 与 Resistin 的表达及相关性

qPCR 检测 80 例 NSCLC 及癌旁组织中 miR-625 的表达, 结果显示, 与癌旁组织相比, NSCLC 组织中 miR-625 呈低表达 ($P < 0.01$; 图 1A、B), Resistin mRNA 呈高表达 ($P < 0.01$; 图 1C), 相关性分析显示, 在 80 对 NSCLC 与癌旁组织中, miR-625 与 Resistin mRNA 的表达呈明显负相关 ($r = -0.7183$, $P < 0.01$; 图 1D)。WB 与免疫组织化学法检测结果显示, Resistin 在 NSCLC 组织中的表达显著高于癌旁组织 (图 1E、F)。统计学分析结果 (表 1) 提示, Resistin 在 NSCLC 组织中的表达与 NSCLC 细胞的分化程度、临床 TNM 分期及淋巴结转移相关, 且 Resistin 阳性表达率在 NSCLC 细胞分化程度高级别组 (中、高级) 中高于低级别组 (低级)、TNM 分期晚期组 (II 期、III 期) 高于早期组 (I 期)、淋巴结转移组高于未发生淋巴结转移组 (均 $P < 0.05$)。

qPCR 检测人支气管上皮细胞系 BEAS-2B 及非小细胞肺癌细胞系 A549、H322、GLC-82、H226 中 miR-625、Resistin 的表达, 结果显示, 与 BEAS-2B 细胞相比, miR-625 在 A549、H322、GLC-82、H226 中呈低表达, 而 Resistin 呈高表达 (均 $P < 0.01$; 图 1G、H)。WB 检测结果显示, 与 BEAS-2B 相比, Resistin 蛋白在 A549、H322、GLC-82、H226 中呈高表达 ($P < 0.05$; 图 1I)。选取在 NSCLC 细胞系中 miR-625 表达水平最高的 A549 细胞和最低的 H226 细胞进行后续实验。

2.2 Resistin 与 miR-625 的靶向关系

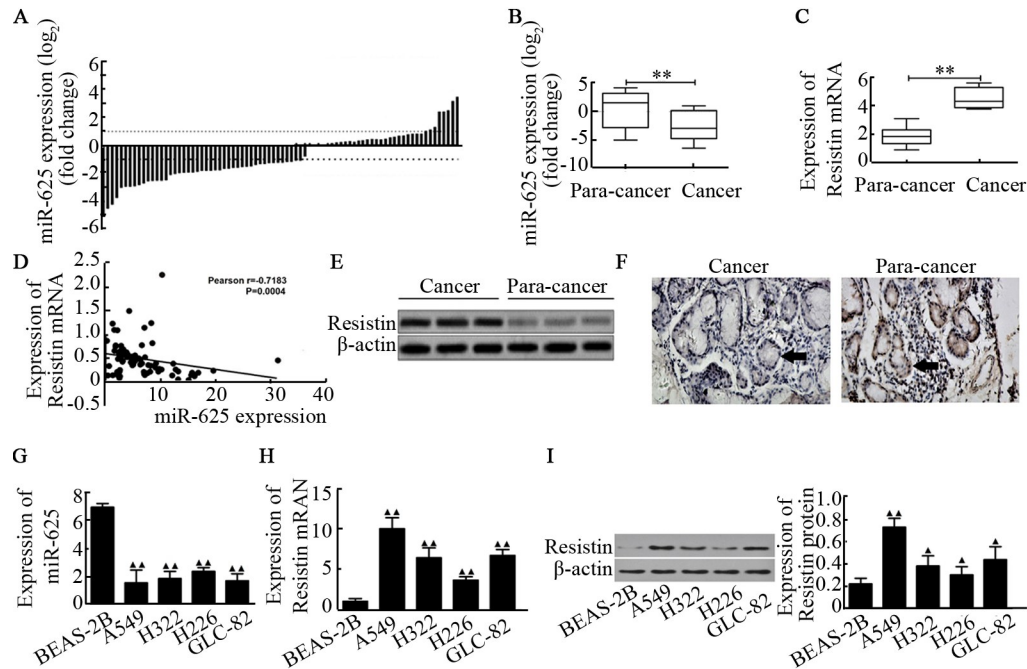
TargetScan 在线数据库预测结果 (图 2A) 表明, Resistin 基因的 3'-UTR 存在能与 miR-625 互补的区域, 这提示 Resistin 可能为 miR-625 的作用靶基因。双荧光素酶基因报告实验结果 (图 2B、C) 显示, 与 Resistin Wt+NC 对照组相比, Resistin Wt+miR-625 mimic 组 A549 与 H226 细胞中荧光素酶活性受到明显抑制 ($P < 0.01$), 而 Resistin Wt+miR-625 mimic 组、Resistin Wt+NC 对照组和 Resistin MUT+NC 对照组之间细胞荧光素酶活性无显著差异。这表明 Resistin 是 miR-625 的靶基因, 后者可负向调控其表达。

2.3 miR-625 负向调控 Resistin 表达影响 NSCLC 细胞系的增殖、侵袭与迁移

2.3.1 miR-625 负向调控 Resistin 表达 qPCR 检测结果 (图 3) 显示, 与 Blank 和 NC 组相比, miR-625

mimic 组和 si-Resistin 组细胞中 miR-625 的表达显著增加 ($P < 0.05$), Resistin mRNA 的表达明显降低 ($P < 0.05$); miR-625 inhibitor 组 miR-625 表达显著降低 ($P < 0.05$),

Resistin mRNA 表达显著升高 ($P < 0.05$); NC 组与 Blank 组、miR-625 inhibitor+si-Resistin 组细胞中 miR-625 与 Resistin mRNA 表达水平无显著差异 ($P > 0.05$)。



** $P < 0.01$ vs Para-cancer group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs BEAS-2B cell group

A: Proportion of NSCLC and para-cancerous tissues with positive miR-625 expression ($n=80$); B, C: mRNA expression of miR-625 and Resistin in 80 pairs of NSCLC and para-cancerous tissues ($n=80$); D: Spearman correlation analysis of miR-625 and Resistin mRNA expression levels; E: Immunoblot showing Resistin protein levels in NSCLC and para-cancerous tissues; F: Representative immunohistochemistry (IHC) images showing in situ Resistin expression (black arrows) in NSCLC and para-cancerous tissues ($\times 400$);

G: qPCR analysis of miR-625 expression in cell lines BEAS-2B, A549, H322, GLC-82, H226; H, I: mRNA and protein expressions of Resistin in cell lines BEAS-2B, A549, H322, GLC-82, H226

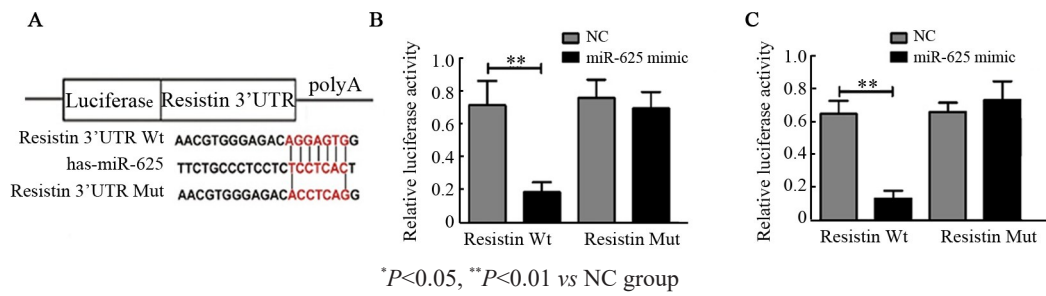
图1 miR-625 与 Resistin 在 NSCLC 组织及癌旁组织和细胞系中的表达

Fig.1 Expression of miR-625 and Resistin in NSCLC and para-cancerous tissues and cell lines

表1 80例 NSCLC 组织中 Resistin 表达与临床病理特征间的关系

Tab.1 Relationship between Resistin expression and clinicopathological features in 80 NSCLC patients

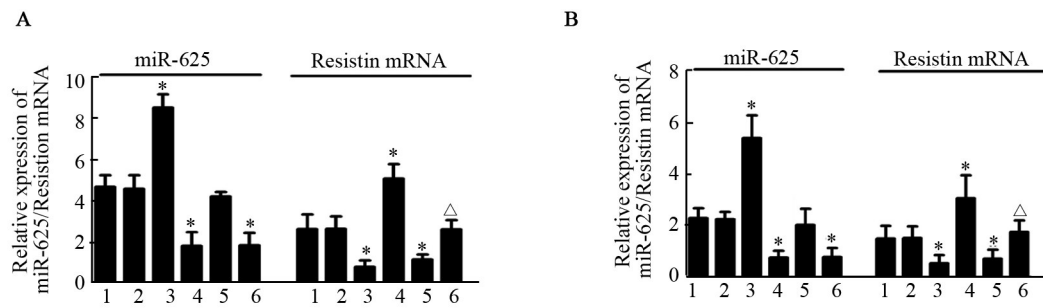
Clinical characteristics	N	Expression of Resistin			χ^2	P
		Positive (n)	Negative (n)	Positive rate (%)		
Gender						
Male	43	27	16	62.8	2.172	0.175
Female	37	25	12	37.2		
Age						
>60	39	26	13	66.7	0.986	0.271
≤60	41	26	15	63.4		
Histological type						
Adenocarcinoma	46	28	18	60.9	2.194	0.085
Squamous cell carcinoma	34	24	10	70.6		
Differentiation						
Low	14	4	10	28.6	10.112	0.003
Medium and high	66	48	18	52.7		
Lymph node metastasis						
Yes	58	46	12	79.3	11.267	0.001
No	22	6	16	27.3		
TNM staging						
I	19	4	15	21.1	11.185	0.001
II+III	61	48	13	78.7		



A: Schematic representation of Resistin-3'UTR showed a putative miR-625 binding site; B, C: Dual luciferase reporter assay validated that Resistin was the target gene of miR-625 in A549 and H226 cells

图2 miR-625靶向调控Resistin表达

Fig.2 miR-625 targeting regulation for Resistin expression



1: Blank; 2: NC; 3: miR-625 mimic; 4: miR-625 inhibitor; 5: si-Resistin; 6: miR-625 inhibitor+si-Resistin

图3 A549细胞(A)和H226细胞(B)中miR-625负向调控Resistin表达

Fig.3 miR-625 negatively regulated Resistin expression in A549 cells (A) and H226 cells (B)

2.3.2 miR-625 负向调控 Resistin 表达抑制 NSCLC 细胞的增殖 CCK-8 实验检测结果(图4)显示,与 Blank 组和 NC 组的 A549 与 H226 细胞相比,miR-625 mimic 组与 si-Resistin 组细胞的增殖能力均显著下降 ($P < 0.05$),miR-625 inhibitor 组细胞增殖能力显著提

高 ($P < 0.05$); miR-625 inhibitor+si-Resistin 组细胞的增殖能力显著低于 miR-625 inhibitor 组 ($P > 0.05$); NC 组与 Blank 组、miR-625 inhibitor+si-Resistin 组细胞增殖水平之间无显著差异 ($P > 0.05$)。

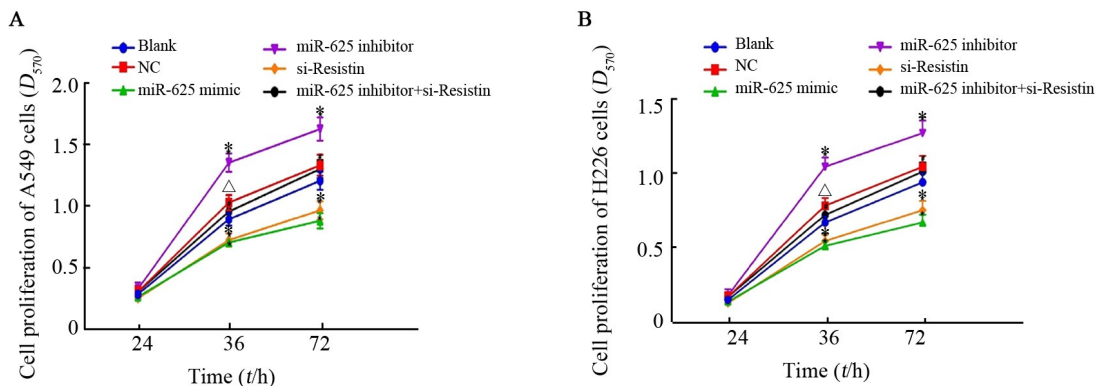


图4 miR-625通过负向调控Resistin表达抑制NSCLC A549细胞(A)和H226细胞(B)的增殖

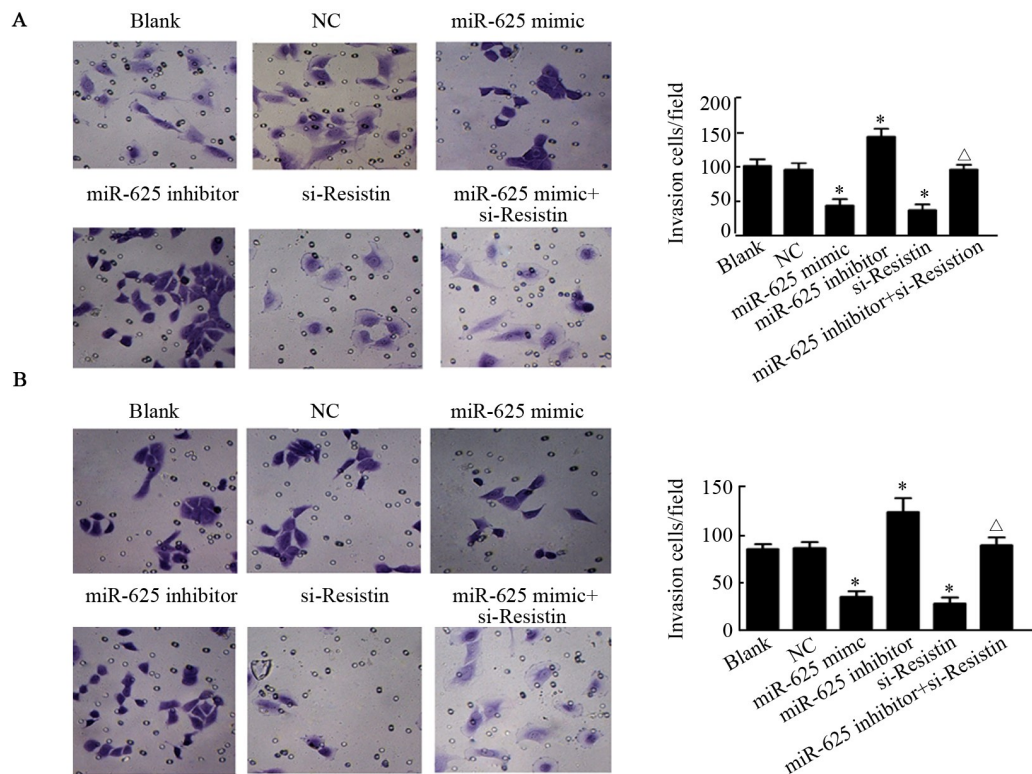
Fig.4 miR-625 inhibited the proliferation of NSCLC A549 (A) and H226 (B) cell lines by negatively regulating Resistin expression

2.3.3 miR-625 负向调控 Resistin 表达抑制 NSCLC 细胞的侵袭 Transwell 细胞侵袭实验结果(图5)显示,与 Blank 组和 NC 组的 A549 与 H226 细胞相比,

miR-625 mimic 组与 si-Resistin 组细胞的穿膜细胞数均显著减少 ($P < 0.05$),而 miR-625 inhibitor 组细胞穿膜细胞数显著增加 ($P < 0.05$); miR-625 inhibitor+

si-Resistin 组细胞的穿膜细胞数显著低于 miR-625 inhibitor 组 ($P < 0.05$); NC 组与 Blank 组, 以及 miR-

625 inhibitor+si-Resistin 组细胞的穿膜细胞数之间无显著差异 ($P > 0.05$)。



* $P < 0.05$ vs Blank or NC group, [△] $P < 0.05$ vs miR-625 inhibitor group

A: Effects of miR-625 and Resistin on the invasion of A549 cells; B: Effects of miR-625 and Resistin on the invasion of H226 cells

图5 miR-625通过负向调控Resistin表达抑制NSCLC细胞的侵袭(×400)

Fig.5 miR-625 inhibited the invasion of NSCLC cells by negatively regulating Resistin expression (×400)

2.3.4 miR-625 负向调控 Resistin 表达抑制 NSCLC 细胞的迁移 划痕实验结果(图6)显示,与 Blank 组和 NC 组的 A549 与 H226 细胞相比,miR-625 mimic 组与 si-Resistin 组细胞的迁移距离均显著下降 ($P < 0.05$),而 miR-625 inhibitor 细胞迁移距离显著升高 ($P < 0.05$); miR-625 inhibitor+si-Resistin 组细胞的迁移距离显著低于 miR-625 inhibitor 组 ($P < 0.05$); NC 组与 Blank 组、miR-625 inhibitor+si-Resistin 组细胞的迁移距离无显著差异 ($P > 0.05$)。

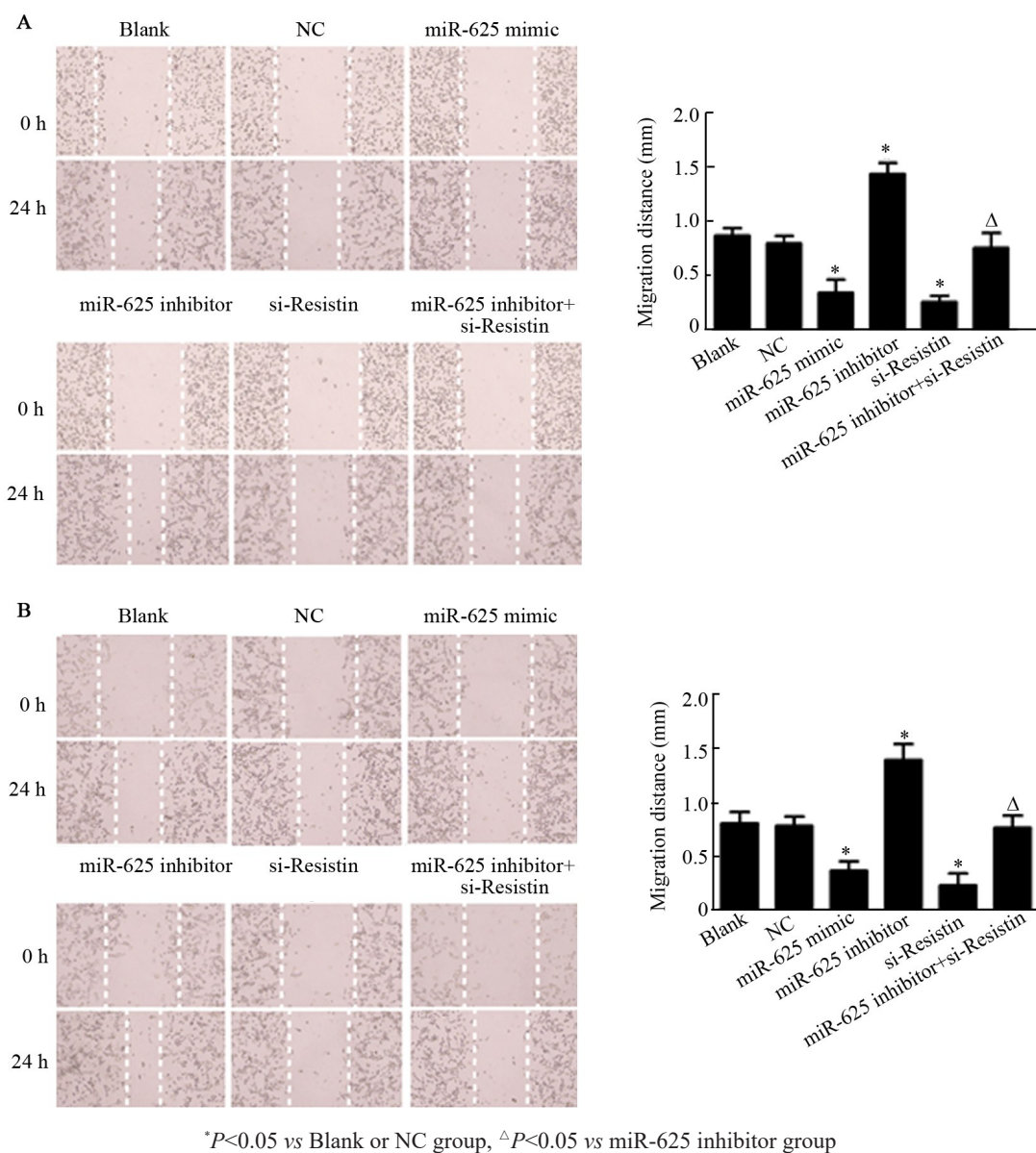
2.4 miR-625 和 Resistin 对 NSCLC 细胞中 PI3K/AKT/Snail 通路相关蛋白表达的影响

WB 结果(图7)显示,与 Blank 和 NC 组相比,miR-625 mimic 与 si-Resistin 组细胞中 Resistin、p-AKT、p-PI3K、Snail、Twist1、Vimentin 的表达均显著降低 ($P < 0.05$) 而 E-cadherin 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$),miR-625 inhibitor 组 Resistin、p-AKT、p-PI3K、Snail、Twist1、Vimentin 的表达均显著增加 ($P < 0.05$),而 E-cadherin 表达显著降低 ($P < 0.05$); 与 miR-625 inhibitor 组相比,miR-625 inhibitor+si-Resistin 组细胞中 Resistin、p-AKT、p-PI3K、Snail、

Twist1、Vimentin 的表达均显著降低 ($P < 0.05$),而 E-cadherin 表达显著升高 ($P < 0.05$); NC 组与 Blank 组、miR-625 inhibitor+si-Resistin 组中各蛋白表达无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.5 miR-625 通过负向调控 Resistin 蛋白抑制 NSCLC 细胞裸鼠移植瘤的生长

裸鼠成瘤实验结果(图8A)显示,从第4天起,miR-625 mimic 组及 si-Resistin 组移植瘤体积即显著小于 Blank 和 NC 组 ($P < 0.05$),miR-625 inhibitor 组体积显著大于 Blank 组 ($P < 0.05$),miR-625 inhibitor+si-Resistin 组体积显著小于 miR-625 inhibitor 组 ($P < 0.05$),NC 组与 miR-625 inhibitor+si-Resistin 组移植瘤体积无显著差异 ($P > 0.05$)。2 周后称取移植瘤质量,结果(图8B)显示,miR-625 mimic 组、si-Resistin 组瘤质量显著小于 Blank 组 ($P < 0.05$),miR-625 inhibitor 组瘤质量显著大于 Blank 组 ($P < 0.05$),miR-625 inhibitor+si-Resistin 组瘤质量显著小于 miR-625 inhibitor 组 ($P < 0.05$),NC 组与 Blank 组、miR-625 inhibitor+si-Resistin 组瘤质量无显著差异(均 $P > 0.05$)。



A: Effects of miR-625 and Resistin on the migration of A549 cells ; B: Effects of miR-625 and Resistin on the migration of H226 cells

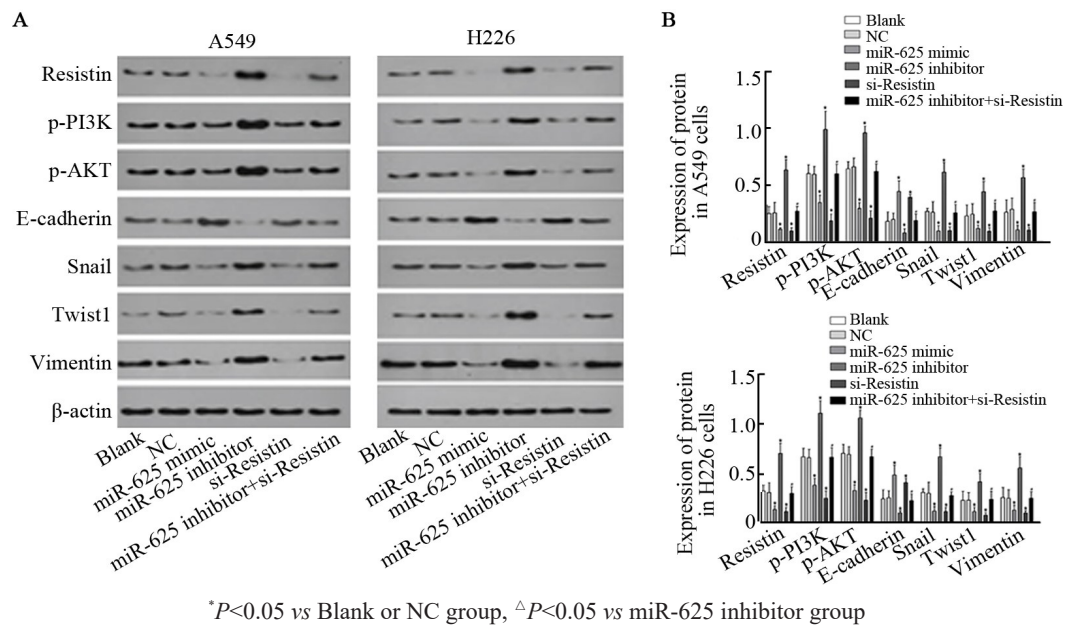
图6 miR-625通过负向调控Resistin表达抑制NSCLC细胞的迁移($\times 200$)

Fig.6 miR-625 inhibited the migration of NSCLC cell lines by negatively regulating Resistin expression ($\times 200$)

3 讨论

本研究发现,与癌旁组织相比,NSCLC组织中miR-625存在显著低表达,而Resistin明显高表达,两者的表达水平在NSCLC样本中存在负相关,且Resistin表达与NSCLC患者的肿瘤分化、临床分期及淋巴结转移具有相关性。Resistin是一种富含半胱氨酸的分子量为125 000的分泌型蛋白,其主要由巨噬细胞、树突状细胞及单核细胞合成^[11]。既往有学者研究^[14]发现,NSCLC患者血清中Resistin的表达水平显著升高,且与患者的体质量减轻密切相关;GONG等^[15]研究发现,在肺腺癌组织中Resistin表达

亦显著升高,Resitin可能通过与细胞膜表面的TLR4受体相互作用,磷酸化胞内Src蛋白,后者通过PI3K/Akt途径激活NF- κ B信号通路,从而上调MMP2及Twist1蛋白表达,促进肿瘤细胞的侵袭及转移。为进一步明确miR-625与Resistin的相互作用机制,本研究利用生物信息学手段进行预测,结果表明Resistin基因的3'-UTR存在能与miR-625的互补区域,并通过双荧光素酶基因报告实验结果证实Resistin是miR-625的靶基因,后者可负向调控其表达。在体外实验中发现,与正常支气管上皮细胞相比,miR-625在4种NSCLC细胞株中的表达显著降低,而Resistin的表达明显增加。

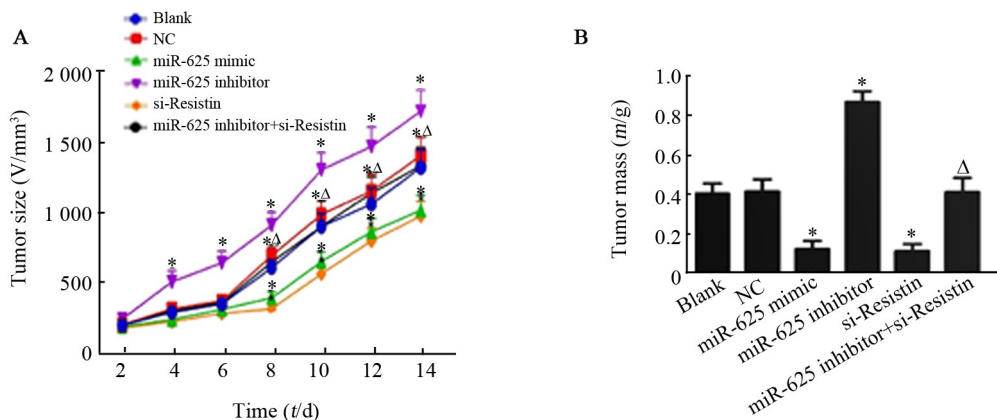


* $P < 0.05$ vs Blank or NC group, $\Delta P < 0.05$ vs miR-625 inhibitor group

A: Expression levels of Resistin, p-AKT, p-PI3K, E-cadherin, Snail, Twist1, and Vimentin in A549 and H226 cells transfected with miR-625 mimic/inhibitor and/or si-Resistin detected by Immunoblots; B: Data statistics

图7 miR-625 和 Resistin 对 NSCLC 细胞中 PI3K/AKT/Snail 通路相关蛋白表达的影响

Fig.7 Effects of miR-625 and Resistin on the expression of PI3K/AKT/Snail pathway-related proteins in NSCLC cells



* $P < 0.05$ vs Blank group, $\Delta P < 0.05$ vs miR-625 inhibitor group

A: Time-dependent tumor volume curves in Blank control, negative controls (NC), miR-625 mimic, miR-625 inhibitor, si-Resistin and miR-625 inhibitor + si-Resistin groups; B: Tumors mass in the above groups

图8 miR-625 通过负向调控 Resistin 蛋白抑制 A549 细胞裸鼠移植瘤的生长

Fig.8 miR-625 inhibited the growth of A549 cell transplanted tumors in nude mice by negatively regulating expression of Resistin

侵袭及转移是恶性肿瘤的重要的生物学特征, 而细胞增殖能力又是肿瘤细胞侵袭及转移的基础^[16]。本研究发现, 上调 miR-625 或抑制 Resistin 的表达可使 NSCLC 细胞的增殖、侵袭及浸润迁移能力明显下降, 而下调 miR-625 的表达可明显促进肿瘤细胞的增殖、侵袭及浸润迁移能力。恶性肿瘤的侵袭转移机制非常复杂, 其涉及血管形成、细胞间黏附能力的改变及上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 等多个过程^[17-18]。而 EMT 在肿瘤转移的早期过程中发挥着关键作用。上皮细胞在 EMT 进

中逐渐失去与基底膜的连接, 并通过改变细胞形态、破坏细胞间黏附力和增加细胞运动性来获得间充质细胞特性。E-cadherin 和 Vimentin 分别是 EMT 过程中上皮和间质表型的标志蛋白。肿瘤细胞通过 EMT 作用获得较高的迁移能力, 这进一步增强了肿瘤的侵袭与转移^[18]。EMT 是受 AKT 激酶调控的众多生物学过程中的一种, TGF- β 1 可通过 PI3K/AKT 与丝裂原活化激酶/细胞外信号调节激酶 1/2 途径诱导肺癌细胞发生 EMT 过程^[19]。而活化的 AKT 激酶能够通过上调间充质细胞特异性蛋白 Snail/Twist 并抑制上

皮特异性蛋白如 E-cadherin 的表达来促进 EMT 的进程。Snail/Twist 蛋白也可以直接与 E-cadherin 的启动子区域相结合抑制后者的表达,促进 EMT 的发生^[20]。本研究发现,上调 miR-625 或抑制 Resistin 的表达能够显著抑制蛋白 p-AKT、p-PI3K、Snail、Twist1、vimentin 表达并上调 E-cadherin 蛋白的表达,因此推测 miR-625/Resistin 可通过调控 PI3K/AKT/Snail 通路相关蛋白表达影响 NSCLC 细胞的 EMT。裸鼠体内成瘤实验同样表明上调 miR-625 或抑制 Resistin 的表达能够显著削弱 A549 细胞移植瘤的生长,下调 miR-625 的表达可产生相反的结果。

综上,本研究发现 miR-625 在 NSCLC 组织和细胞中呈低表达且能够负向调控 Resistin 的表达,从而影响 NSCLC 细胞的侵袭及迁移能力及 EMT,其可能通过 PI3K/AKT/Snail 信号通路发挥上述作用。

[参考文献]

- [1] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA: A Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [2] YANG S L, WANG X D, LIU J X, et al. Distinct expression pattern and prognostic values of pituitary tumor transforming gene family genes in non-small cell lung cancer[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(5): 4481-4494. DOI:10.3892/ol.2019.10844.
- [3] AVELINO C U R, CARDOSO R M, DE AGUIAR S S, et al. Assessment of quality of life in patients with advanced non-small cell lung carcinoma treated with a combination of carboplatin and paclitaxel [J]. *J Bras Pneumol*, 2015, 41(2): 133-142. DOI: 10.1590/s1806-37132015000004367.
- [4] ANDERSEN H H, DUROUX M, GAZERANI P. MicroRNAs as modulators and biomarkers of inflammatory and neuropathic pain conditions[J/OL]. *Neurobiol Dis*, 2014, 71: 159-168[2019-10-16]. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996114002320>. DOI: 10.1016/j.nbd.2014.08.003.
- [5] WANG M, LI C L, NIE H, et al. Down-regulated miR-625 suppresses invasion and metastasis of gastric cancer by targeting ILK[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(16): 2382-2388. DOI:10.1016/j.febslet.2012.05.050.
- [6] ZHOU W B, ZHONG C N, LUO X P, et al. miR-625 suppresses cell proliferation and migration by targeting HMGA1 in breast cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 470(4): 838-844. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.01.122.
- [7] ZHOU X, ZHANG C Z, LU S X, et al. miR-625 suppresses tumour migration and invasion by targeting IGF2BP1 in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogene*, 2015, 34(8): 965-977. DOI: 10.1038/ncr.2014.35.
- [8] LOU X L, QI X L, ZHANG Y, et al. Decreased expression of microRNA-625 is associated with tumor metastasis and poor prognosis in patients with colorectal cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2013, 108(4): 230-235. DOI:10.1002/jso.23380.
- [9] WANG Z Q, QIAO, CHEN M, et al. miR-625 down-regulation promotes proliferation and invasion in esophageal cancer by targeting Sox2[J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(6): 915-921. DOI:10.1016/j.febslet.2014.01.035.
- [10] ROTH C, STÜCKRATH I, PANTEL K, et al. Low levels of cell-free circulating miR-361-3p and miR-625* as blood-based markers for discriminating malignant from benign lung tumors[J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38248[2019-10-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3366929/>. DOI:10.1371/journal.pone.0038248.
- [11] KARBOWSKA A, BORATYŃSKA M, KLINGER M. Resistin: a pathogenic factor or a biomarker of metabolic disorders and inflammation?[J/OL]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2009, 63: 485-491 [2019-10-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19940327/>.
- [12] IBRAHIM D M, SHAABAN E S E, FOUAD T A. Circulating resistin is associated with plasma glucagon-like peptide-1 in cirrhotic patients with hepatitis C virus genotype-4 infection[J]. *Endocr Res*, 2020, 45(1): 17-23. DOI:10.1080/07435800.2019.1627551.
- [13] KIM H J, LEE Y S, WON E H, et al. Expression of resistin in the prostate and its stimulatory effect on prostate cancer cell proliferation[J/OL]. *BJU Int*, 2011, 108(2 Pt 2): E77-E83[2019-10-22]. <https://onlinelibrary.wiley.com/resolve/doi?DOI=10.1111/j.1464-410X.2010.09813.x>.
- [14] KARAPANAGIOTOU E M, TSOCHATZIS E A, DILANA K D, et al. The significance of leptin, adiponectin, and resistin serum levels in non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. *Lung Cancer*, 2008, 61(3): 391-397. DOI:10.1016/j.lungcan.2008.01.018.
- [15] GONG W J, LIU J Y, YIN J Y, et al. Resistin facilitates metastasis of lung adenocarcinoma through the TLR4/Src/EGFR/PI3K/NF- κ B pathway[J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(8): 2391-2400. DOI: 10.1111/cas.13704.
- [16] JIA Z J, ZHANG Y, XU Q F, et al. MiR-126 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis by targeting PI3K/AKT/Snail signaling of lung cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 7369-7375. DOI:10.3892/ol.2018.8207.
- [17] RAJA R, PANDEY A, KUMAR P. Epithelial to mesenchymal plasticity: role in cancer progression[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2020, 25: 838-873.
- [18] JOLLY M K, CELIÀ-TERRASSA T. Dynamics of phenotypic heterogeneity associated with EMT and stemness during cancer progression[J/OL]. *J Clin Med*, 2019, 8(10): E1542[2019-10-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6832750/>. DOI:10.3390/jcm8101542.
- [19] BARTIS D, MISE N, MAHIDA R Y, et al. Epithelial-mesenchymal transition in lung development and disease: does it exist and is it important?[J]. *Thorax*, 2014, 69(8): 760-765. DOI:10.1136/thoraxjnl-2013-204608.
- [20] WU J H, ZHANG Y H, CHENG R F, et al. Expression of epithelial-mesenchymal transition regulators TWIST, SLUG and SNAIL in follicular thyroid tumours may relate to widely invasive, poorly differentiated and distant metastasis[J]. *Histopathology*, 2019, 74(5): 780-791. DOI:10.1111/his.13778.

[收稿日期] 2019-12-22

[修回日期] 2020-04-17

[本文编辑] 黄静怡