

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.04.003

· 基础研究 ·

miR-21 靶向 PDCD4 调控非小细胞肺癌 A549 细胞的增殖与迁移

李明¹, 裴晓宁¹, 岳恺¹, 木亚林¹, 张成辉¹, 赵艳秋² (1. 南阳市中心医院 肿瘤科, 河南 南阳 473000; 2. 河南省肿瘤医院 肿瘤内科, 河南 郑州 450000)

[摘要] **目的:** 探讨 miR-21 靶向程序性细胞死亡因子 4 (programmed cell death factor 4, PDCD4) 对非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) A549 细胞增殖和迁移的影响及其作用机制。 **方法:** 采用脂质体转染技术分别将 miR-21 mimics、miR-21 inhibitors、miR-NC 质粒转染到对数生长期的 A549 细胞, 转染 48 h 后在荧光显微镜下观察转染效率, 用 qPCR 法检测 A549 细胞中 miR-21、PDCD4 mRNA 的表达水平。用双荧光素酶报告基因验证 miR-21 与 PDCD4 的靶向关系, 用 MTT 法检测细胞的增殖能力, 用 Transwell 小室法检测细胞的迁移能力, 用 ELISA 法检测各组细胞培养液中 TNF- α 水平, 用 WB 法检测细胞中 PDCD4、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白的表达水平。 **结果:** 成功构建 miR-21 过表达和沉默的 A549 细胞系。双荧光素酶报告基因实验证实 miR-21 靶向抑制 PDCD4 表达。过表达 miR-21 可明显抑制 A549 细胞中 PDCD4 mRNA 表达 ($P < 0.01$), 促进细胞的增殖与迁移能力 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 提高 TNF- α 分泌水平 ($P < 0.01$), 下调 PDCD4 蛋白的表达 ($P < 0.01$), 上调 p-NF- κ B p65 蛋白的表达 ($P < 0.05$)。沉默 miR-21 对细胞的影响则与过表达 miR-21 的作用相反。 **结论:** 过表达 miR-21 可促进 A549 细胞增殖和迁移能力, 该作用可能与其靶向抑制 PDCD4、激活 NF- κ B/TNF- α 通路有关。

[关键词] 程序性细胞死亡因子 4; miRNA-21; 非小细胞肺癌; A549 细胞; 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(2021)04-0332-07

miR-21 regulates the proliferation and migration of non-small cell lung cancer A549 cells by targeting PDCD4 gene

LI Ming¹, PEI Xiaoning¹, YUE Kai¹, MU Yalin¹, ZHANG Chenghui¹, ZHAO Yanqiu² (1. Department of Oncology, Nanyang Central Hospital, Nanyang 473000, Henan, China; 2. Department of Oncology, Henan Cancer Hospital, Zhengzhou 450000, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of miR-21 targeting PDCD4 (programmed cell death factor 4) on proliferation and migration of non-small cell lung cancer (NSCLC) A549 cells and the possible mechanism. **Methods:** The miR-21 mimics, miR-21 inhibitors and miR-NC plasmids were transfected into A549 cells in logarithmic growth phase by liposome transfection technology. Forty-eight hours after transfection, the transfection efficiency was observed under a fluorescence microscope, and the mRNA expression levels of miR-21 and PDCD4 in A549 cells were detected by qPCR. Dual luciferase reporter gene experiment was used to detect the targeting relationship between miR-21 and PDCD4, MTT method was used to detect cell proliferation, Transwell chamber method was used to detect cell migration ability, and ELISA was used to detect the content of TNF- α in each group of cell culture fluids. WB was used to detect the protein expression levels of PDCD4, NF- κ B p65 and p-NF- κ B p65 in cells. **Results:** The A549 cell line with miR-21 over-expression or knockdown was successfully constructed. Dual luciferase reporter gene assay confirmed that miR-21 targetedly inhibited PDCD4 expression. Over-expression of miR-21 could significantly inhibit the mRNA expression of PDCD4 in A549 cells ($P < 0.01$), promote cell proliferation and migration ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), increase the secretion level of TNF- α ($P < 0.01$), down-regulate the expression of PDCD4 protein ($P < 0.01$), and up-regulate p-NF- κ B p65 protein level ($P < 0.05$). The effect of silencing miR-21 on cells was opposite to the effect of miR-21 over-expression. **Conclusion:** Over-expression of miR-21 can promote the proliferation and migration ability of A549 cells, which may be related to its targeted inhibition of PDCD4 and activating the NF- κ B/TNF- α pathway.

[Key words] programmed cell death factor 4 (PDCD4); microRNA-21 (miR-21); non-small cell lung cancer (NSCLC); A549 cell; proliferation; migration

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(4): 332-338. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2021.04.003]

[基金项目] 河南省科技研发专项基金资助项目 (No.172102310051)。Project supported by the Henan Science and Technology Research and Development Special Fund (No.172102310051)

[作者简介] 李明(1977-),男,硕士,副主任医师,主要从事肿瘤的综合治疗研究

[通信作者] 李明(LI Ming, corresponding author), E-mail: mjk_88@tom.com

肺癌是临床最常见的恶性肿瘤之一,其发病率不断上升,全球每年死于肺癌的患者超过 100 万例,是多数国家恶性肿瘤病死的首要原因^[1]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占肺癌发病数的 80% 左右^[2]。随着手术、放疗、化疗等多种治疗手段的不断发展,肺癌在临床治疗上取得了长足进步,但预后极差,5 年生存率仅为 10%~15%^[3]。因此,探讨肺癌发生发展相关的分子机制,对于防治具有十分重要的意义。研究^[4]显示,miR-21 与肿瘤关系密切,参与调控多种肿瘤的发生发展及转移过程。程序性细胞死亡因子 4(programmed cell death factor 4, PDCD4)是一种抑癌基因,在人体多种组织中广泛表达,对肿瘤的发生发展起重要作用^[5]。miR-21 通过 PDCD4 调控肿瘤细胞的增殖、侵袭及迁移能力^[6],但其在 NSCLC 中作用机制的研究报道较少。本研究通过观察 miR-21 对人 NSCLC 细胞 A549 增殖、迁移的影响及其对 PDCD4 的调控作用,探讨其作用机制,旨在为临床 NSCLC 的诊断与治疗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

人 NSCLC 细胞 A549 购自美国 ATCC 公司。RPMI 1640 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国 Gibco 公司,miR-21 模拟物(mimics)、miR-21 抑制剂(inhibitors)、miR-阴性对照(miR-NC)质粒由上海吉玛制药技术有限公司设计,Lipofectamine™ 2000 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,MTT 试剂盒购自美国 Sigma 公司,Transwell 小室购自美国 Corning 公司,肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)ELISA 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,兔抗人 PDCD4、核转录因子 κ B(nuclear transcription factor κ B, NF- κ B)p65、磷酸化(p)-NF- κ B p65 一抗、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔二抗均购自美国 Abcam 公司,双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国 Promega 公司。

1.2 细胞培养、分组与转染

将 A549 细胞复苏后转入含 10% FBS、100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养基中,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内培养,每 2~3 d 传代一次,取对数生长期细胞用于实验。

将 A549 细胞随机分为空白对照组、阴性对照组、过表达组和沉默组。转染前 1 d 将 A549 细胞接种于 6 孔板(2 \times 10⁵ 个/孔),置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养,待细胞贴壁良好,汇合度达 70% 时进行转染。按照 Lipofectamine™ 2000 转染试剂说明书的方法分别

将 miR-21 mimics、miR-21 inhibitors、miR-NC 转染至 A549 细胞中,空白对照组不转染。培养 48 h 后,于荧光显微镜下(\times 100)观察转染效率。随机选取 20 个视野进行计数、计算转染效率(转染效率=发出绿色荧光细胞数/细胞总数 \times 100%)。

1.3 qPCR 法检测 A549 细胞中 miR-21 及 PDCD4 mRNA 的表达水平

收集各组转染细胞,按照 TRIzol 试剂盒说明书的方法提取细胞总 RNA,测定 RNA 的浓度和纯度,并将总 RNA 逆转录成 cDNA,进行 qPCR 扩增。每组设置 5 个复孔。反应体系 20 μ l:cDNA 模板 2 μ l、上下游引物各 1 μ l、2 \times SYBR Green qPCR Master Mix 10 μ l、双蒸水 6 μ l。反应条件:预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min;变性 94 $^{\circ}$ C 30 s,退火 50 $^{\circ}$ C 30 s,70 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,共 40 个循环。反应结束后确认熔解曲线,分析 Ct 值。引物序列由上海吉玛公司设计合成(表 1)。miR-21 以 U6 为内参,PDCD4 以 β -actin 为内参,按照 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算 miR-21 和 PDCD4 miRNA 的相对表达量。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

Gene	Sequence
miR-21	F:5'-ATTAGCACTAGTAGCCTAGGA-3' R:5'-ACGTCCCACAATTGCCGGATC-3'
U6	F:5'-AGGCATCTACCGCAGCTAA-3' R:5'-CGCATTAGCATGCCATAGA-3'
PDCD4	F:5'-ATCAATCGACGGATGACATC-3' R:5'-CATGGATGCTAGCTACGATA-3'
β -actin	F:5'-ACCGTATTAGCTAGCTACAGTA-3' R:5'-ACTCGATCGAGATACGTAGCAA-3'

1.4 双荧光素酶报告基因验证 miR-21 与 PDCD4 的靶向关系

根据生物信息学 TargetScan、miRwalk 软件预测 miR-21 与 PDCD4 之间的结合位点。将 PDCD4-3'UTR 插入荧光素酶报告基因载体 pMIR-REPORT,构建野生型重组质粒 pMIR-PDCD4 WT;将位点突变的 PDCD4-3'UTR 插入 pMIR-REPORT,构建突变型重组质粒 pMIR-PDCD4 MUT。将 miR-NC/miR-21 mimics 与 pMIR-PDCD4-MT/pMIR-PDCD4-MUT 质粒利用 Lipofectamine™ 2000 转染试剂共转染 A549 细胞,培养 48 h 后检测荧光素酶活性,相对荧光素酶活性以萤火虫荧光素酶/海肾荧光素酶表示。

1.5 MTT 法检测 A549 细胞的增殖能力

转染 48 h 后收集各组细胞,用 RPMI 1640 培养基悬浮细胞,以 1.0 \times 10⁵ 个/孔接种于 96 孔板,每组设

置5个复孔。分别培养24、48 h,在每个时间点结束前4 h,每孔加入20 μ l MTT溶液,继续培养4 h后吸去上清,每孔加入150 μ l DMSO,充分震荡10 min溶解结晶,用酶标仪检测450 nm波长处各孔的光密度(D)值,绘制细胞生长曲线图。

1.6 Transwell小室法检测A549细胞的迁移能力

收集各组转染细胞,以不含FBS的RPMI 1640培养基悬浮细胞,按 4×10^4 个/孔接种于Transwell上室,下室加入500 μ l含10% FBS的RPMI 1640培养基,每组设3个复孔。置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养24 h,取出小室,擦去上室未迁移的细胞,每孔加入1 ml 4%多聚甲醛溶液固定30 min,后用0.1%结晶紫染色20 min,于光学显微镜下($\times 400$)随机选取10个视野进行观察、计数迁移细胞数,并拍照。

1.7 ELISA法检测A549细胞培养液中TNF- α 水平

收集各组转染细胞培养液,采用ELISA法检测培养液中TNF- α 水平。绘制标准曲线,根据标准曲线计算培养液中TNF- α 浓度。

1.8 WB法检测A549细胞中PDCD4、NF- κ B p65和p-NF- κ B p65蛋白的表达水平

提取各组细胞总蛋白,应用BCA试剂盒测定蛋白浓度,取50 μ g蛋白样品,进行SDS-PAGE、转膜, TBST洗膜3次(10 min/次)后,5%脱脂奶粉孵育

1 h。加入PDCD4、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65一抗(1:1 000),内参 β -actin一抗(1:1 000),4 $^{\circ}$ C摇床孵育过夜。TBST洗膜3次,加入HRP标记的山羊抗兔二抗(1:4 000),室温下摇床孵育2 h, TBST洗膜3次后,加入ECL化学发光剂,暗室曝光、显影。用ImageJ图像软件分析PDCD4、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65蛋白条带的灰度值。

1.9 统计学处理

qPCR法、MTT法、Transwell小室法、ELISA法和WB等实验均重复3次。用SPSS 24.0统计学软件分析所有实验数据。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用SNK-*q*检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建miR-21过表达和沉默的A549细胞

转染48 h后,在荧光显微镜下均可以观察到各组A549细胞中绿色荧光表达(图1)。miR-NC、miR-21-mimics和miR-21-inhibitors各组细胞的转染效率分别为88.46%、89.53%和86.25%。结果表明,成功构建miR-21过表达和沉默的A549细胞,可用于后续实验。

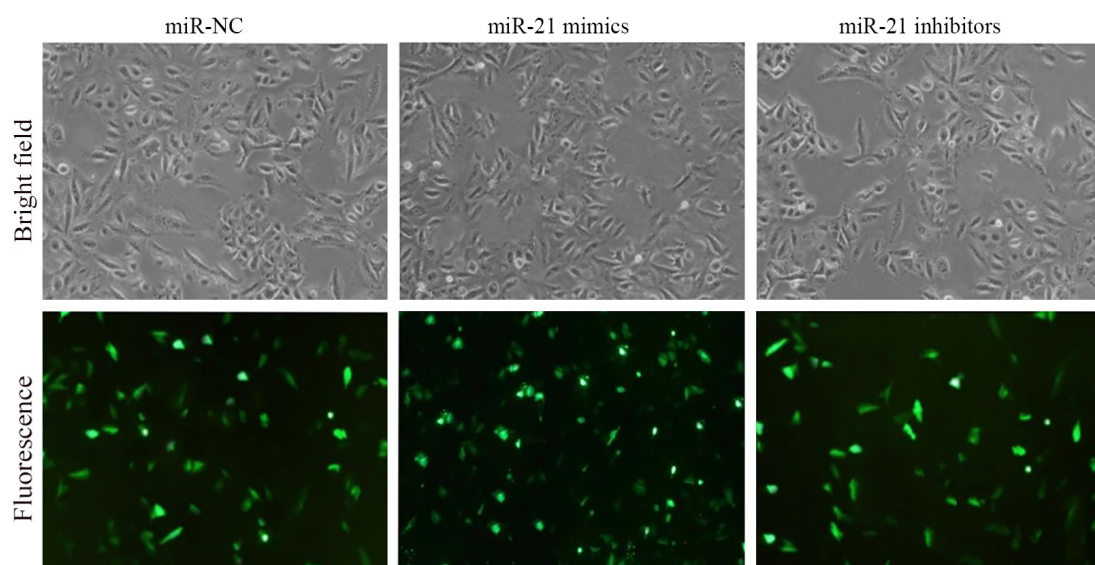


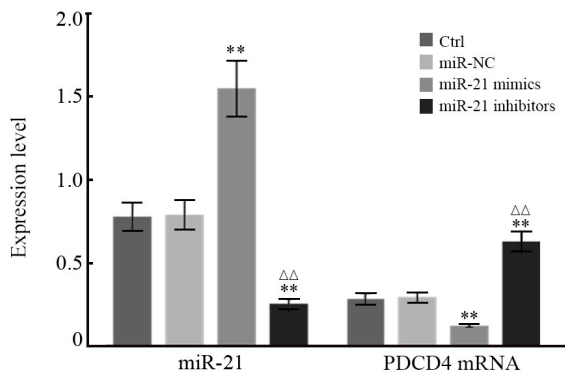
图1 A549细胞转染后的明场及荧光图($\times 100$)

Fig.1 The bright filed and fluorescence pictures of A549 cells after transfection ($\times 100$)

2.2 过表达或沉默miR-21对A549细胞中miR-21、PDCD4 mRNA表达的影响

qPCR法检测结果(图2)显示,与Ctrl组和miR-NC组比较,miR-21 mimics组A549细胞中miR-21 mRNA表达水平显著升高(均 $P < 0.01$), PDCD4 mRNA表达

水平显著降低(均 $P < 0.01$);miR-21 inhibitors组细胞中miR-21 mRNA表达显著降低(均 $P < 0.01$), PDCD4 mRNA表达显著升高(均 $P < 0.01$)。结果表明,过表达miR-21下调PDCD4 mRNA表达,沉默miR-21表达上调PDCD4 mRNA表达,miR-21参与调控PDCD4表达。



** $P < 0.01$ vs Ctrl or miR-NC group;

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs miR-21 mimics group

图2 过表达或沉默 miR-21 对 A549 细胞中 miR-21 和 PDCD4 mRNA 表达的影响

Fig.2 Effect of over-expression or silence of miR-21 on the expression of miR-21 and PDCD4 mRNA in A549 cells

2.3 miR-21 靶向调控 PDCD4

生物信息学 TargetScan、miRwalk 软件预测结果 (图 3A) 显示, miR-21 与 PDCD4 有直接作用的可能性, 存在连续的结合位点。

双荧光素酶报告基因实验结果 (图 3B) 显示, miR-21-mimics 转染 A549 细胞后, 显著抑制了同时转染 pMIR-PDCD4 WT 质粒细胞的荧光素酶活性 ($P < 0.01$), 而对同时转染 pMIR-PDCD4 MUT 质粒细胞的荧光素酶活性无影响 ($P > 0.05$)。结果表明, miR-21 靶向调控 PDCD4 表达。

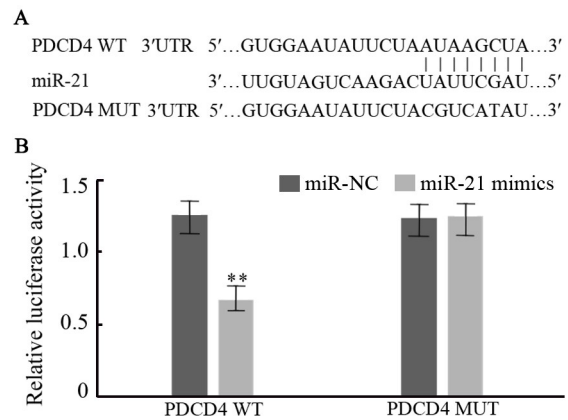
2.4 过表达或沉默 miR-21 可提高或降低 A549 细胞的增殖能力

MTT 实验结果 (图 4) 显示, 与 miR-NC 组比较, miR-21 mimics 组 A549 细胞 24、48 h 增殖活力显著升高 (均 $P < 0.05$), miR-21 inhibitors 组细胞增殖活力显著降低 (均 $P < 0.01$)。结果表明, 过表达 miR-21 表达提高 A549 细胞的增殖能力, 沉默 miR-21 表达降低 A549 细胞的增殖能力。

2.5 过表达或沉默 miR-21 可增强或减弱 A549 细胞的迁移能力

Tranwell 小室法检测结果 (图 5) 显示, 与 Ctrl 组和 miR-NC 组比较, miR-21 mimics 组的迁移细胞数显著

增多 [(92.20±10.25) vs (66.10±7.02)、(63.40±7.41) 个, 均 $P < 0.01$]; miR-21 inhibitors 组迁移细胞数显著减少 [(35.80±4.06) vs (66.10±7.02)、(63.40±7.41) 个, 均 $P < 0.01$]。结果表明, 过表达 miR-21 增强 A549 细胞的迁移能力, 沉默 miR-21 表达可降低 A549 细胞的迁移能力。



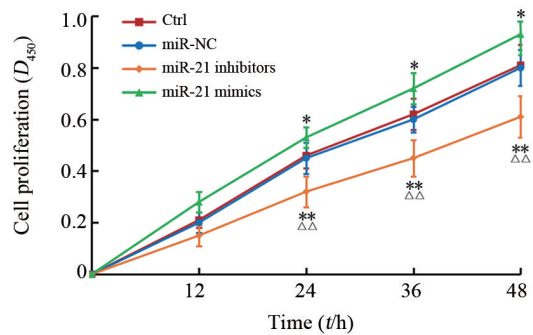
** $P < 0.01$ vs miR-NC group

A: miR-21 and PDCD4 have continuous binding sites;

B: Relative luciferase activity in A549 cells

图3 miR-21 靶向调控 PDCD4 的表达

Fig.3 miR-21 targetedly regulated the expression of PDCD4



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Ctrl or miR-NC group;

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs miR-21 mimics group

图4 过表达或沉默 miR-21 对 A549 细胞增殖的影响

Fig.4 Effect of over-expression or silence of miR-21 on proliferation of A549 cells

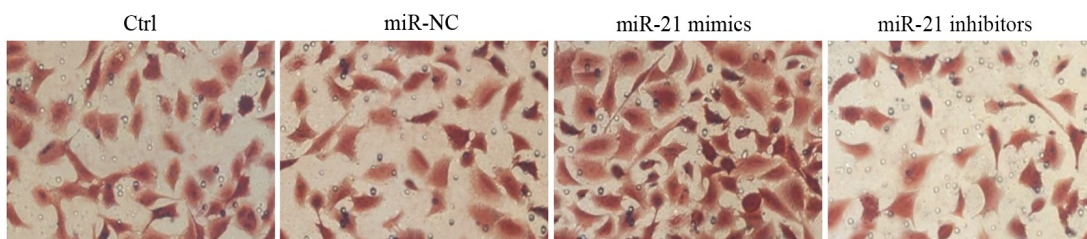


图5 过表达或沉默 miR-21 对 A549 细胞迁移的影响 (结晶紫染色, ×400)

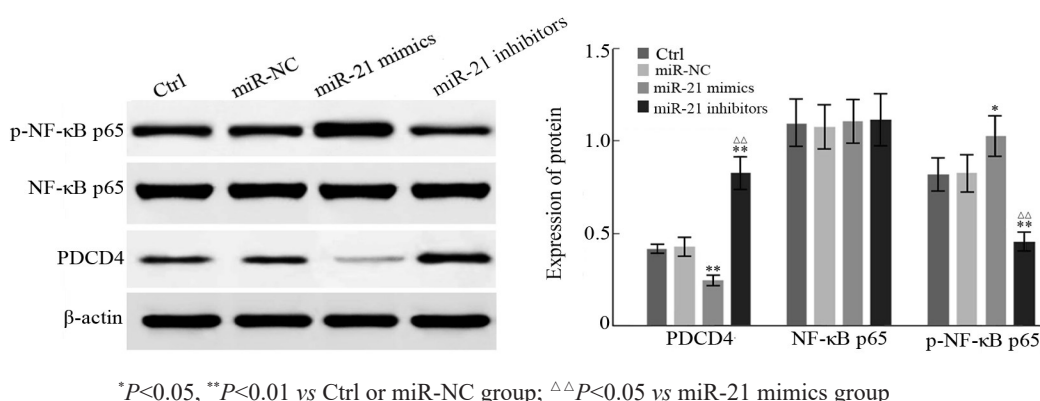
Fig.5 Effect of over-expression or silence of miR-21 on the migration of A549 cells (crystal violet staining, ×400)

2.6 过表达或沉默 miR-21 可提高或降低 A549 细胞培养液中 TNF-α 水平

ELISA 法检测结果显示,与 Ctrl 组和 miR-NC 组比较,miR-21 mimics 组 A549 细胞培养液中 TNF-α 水平显著升高[(65.49±4.12) vs (28.02±3.03)、(27.15±3.65)pg/ml,均 $P<0.01$],miR-21 inhibitors 组 TNF-α 水平显著降低[(16.02±2.86) vs (28.02±3.03)、(27.15±3.65)pg/ml,均 $P<0.01$]。结果表明,过表达 miR-21 可提高 A549 细胞的 TNF-α 分泌水平,沉默 miR-21 表达可降低 TNF-α 水平。

2.7 过表达或沉默 miR-21 后 A549 细胞中 PDCD4、NF-κB p65、p-NF-κB p65 蛋白表达的变化

WB 法检测结果(图6)显示,与 Ctrl 组和 miR-NC 组比较,miR-21 mimics 组 A549 细胞中 PDCD4 蛋白的表达水平显著降低(均 $P<0.01$),p-NF-κB p65 蛋白的表达水平显著升高(均 $P<0.05$);miR-21 inhibitors 组 PDCD4 蛋白的表达水平显著升高(均 $P<0.01$),p-NF-κB p65 蛋白的表达水平显著降低(均 $P<0.01$)。结果表明,过表达 miR-21 靶向下调 PDCD4 蛋白的表达,激活 NF-κB p65/TNF-α 通路,促进 A549 细胞增殖和迁移。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Ctrl or miR-NC group; ^{△△} $P<0.05$ vs miR-21 mimics group
 图6 过表达或沉默 miR-21 对 A549 细胞中 PDCD4、NF-κB p65、p-NF-κB p65 蛋白表达的影响
 Fig.6 Effect of over-expression or silence of miR-21 on the protein expressions of PDCD4, NF-κB p65 and p-NF-κB p65 in A549 cells

3 讨论

NSCLC 发病时早期症状不明显,70%~80% 患者确诊时已属疾病中晚期,失去根治性治疗的机会^[7]。NSCLC 临床治疗以手术为主,配合放疗、化疗等手段辅助治疗,仅常规化疗可以改善患者的临床症状,但无法获得长期疗效,严重影响患者的身体健康和生活质量。NSCLC 发生发展过程涉及多个基因及多条信号通路的改变,通过寻找与之相关的基因,探索其恶性生物学行为影响的分子机制,有利于揭示 NSCLC 的发病机制,对于 NSCLC 的防治具有重要的意义。miR-21 是一种原癌基因,参与肿瘤细胞增殖、侵袭和迁移过程。研究^[8-9]证明,miR-21 在胰腺癌、大肠癌等多种肿瘤细胞中异常表达。PDCD4 是一种细胞凋亡相关基因,通过抑制蛋白转录和翻译过程,调控肿瘤细胞程序性死亡,抑制肿瘤细胞增殖^[10]。miR-21 可通过调控 PDCD4 表达,进而影响肿瘤进展与转移。NSCLC 患者肿瘤组织中 miR-21 表达较癌旁组织明显上调,PDCD4 表达明显下调,两者呈负相关,且 miR-21 高表达患者生存期明显缩短,与 NSCLC 转移和侵袭密切相关^[11]。探讨 NSCLC 中 miR-21 调控 PDCD4 的分子机制,有助于为临床治疗

NSCLC 提供新的靶点和依据。

失控性和无限性是肿瘤细胞增殖的显著特点,肿瘤细胞通过各种途径进行无限增殖,从而侵袭机体其他器官,造成全身转移,最终导致患者死亡。miR-21 在前列腺癌组织中异常高表达,参与肿瘤细胞的增殖和侵袭,沉默 miR-21 表达可以显著抑制肿瘤细胞的侵袭能力^[12]。miR-21 在体外培养的口腔鳞癌 SCC-15 细胞中高表达,促进肿瘤细胞增殖^[13]。本研究 miR-21 过表达组 A549 细胞增殖活力显著升高,细胞迁移能力显著升高;沉默组细胞增殖活力显著降低,细胞迁移能力显著降低。实验结果提示,过表达 miR-21 可以促进 A549 细胞增殖,提高细胞迁移能力;沉默 miR-21 表达可以抑制 A549 细胞的增殖能力,降低细胞的迁移能力。

研究^[14-15]显示,PDCD4 在多种肿瘤组织中表达下调或缺失,有望成为肿瘤基因治疗的新靶点。本研究双荧光素酶报告基因实验结果显示,miR-21 与 PDCD4 存在靶向结合位点,提示 miR-21 对 A549 细胞增殖与迁移的影响可能是通过调控 PDCD4 表达而发挥作用的。CHANG 等^[16]研究表明,在口腔鳞癌细胞中 miR-21 与 PDCD4 表达呈负相关,通过调控 miR-21/PDCD4/AP-1 负反馈信号通路可以促进肿瘤

细胞的增殖;食管癌组织中 miR-21 与 PDCD4 表达也呈显著负相关,miR-21 表达上调和 PDCD4 表达下调与 II 期食管癌的侵袭性进展和不良预后有关。本研究结果与在其他肿瘤中的研究结果一致,miR-21 与 PDCD4 表达呈负相关,过表达 miR-21 促进 A549 细胞增殖,并提高其迁移能力,可能是通过靶向抑制 PDCD4 表达发挥调控作用。

NF- κ B 具有广泛的生物学功能,是调控免疫应答和炎症反应的中心枢纽,并参与肿瘤细胞的分化、增殖、凋亡过程,多种肿瘤的发生发展、浸润、转移及治疗、预后均与 NF- κ B 通路密切相关^[18-19]。各种因素刺激后,NF- κ B 进入细胞核结合靶基因,磷酸化活化 NF- κ B p65,促进 TNF- α 等的表达,TNF- α 表达增加又可以反过来激活 NF- κ B,进一步放大和延续信号通路之间的级联反应,形成一个复杂的调节环路^[20]。过表达 PDCD4 通过阻断 NF- κ B/TNF- α 信号通路,抑制肿瘤细胞增殖、侵袭和迁移^[21]。LI 等^[22] 研究显示,PDCD4 通过抑制自噬和阻断 NF- κ B 信号通路抑制子宫内膜细胞增殖、迁移和侵袭。MAO 等^[23] 研究表明,miR-21 可激活 NF- κ B 信号通路,抑制 PDCD4 表达,促进人黑色素瘤 A375 细胞增殖、迁移并抑制其凋亡。本研究结果显示,miR-21 过表达组 TNF- α 水平明显升高,PDCD4 表达降低,p-NF- κ B p65 表达升高,提示 NF- κ B 通路被激活,过表达 miR-21 可能通过靶向抑制 PDCD4 而激活 NF- κ B/TNF- α 信号通路,进而促进 A549 细胞增殖和迁移。

综上所述,过表达 miR-21 可促进 NSCLC 细胞系 A549 增殖和迁移,沉默 miR-21 表达可显著抑制 A549 细胞增殖和迁移,其机制可能是通过靶向调控 PDCD4,从而调控 NF- κ B/TNF- α 信号通路,影响细胞增殖和迁移,此结果为临床诊治 NSCLC 提供了理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] ZHANG Y, REN J S, HUANG H Y, et al. International trends in lung cancer incidence from 1973 to 2007[J/OL]. *Cancer Med*, 2018, 7(4): 1479-1489[2010-07-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5911623/>. DOI:10.1002/cam4.1359.
- [2] 冯原,陈斯宁,江颖,等. 补肺化痰汤辅助治疗非小细胞肺癌的临床疗效及其对血清一氧化氮和血管内皮生长因子水平的影响研究[J]. *中国全科医学*, 2019, 22(18): 2223-2229. DOI:10.12114/j.issn.1007-9572.2018.00.414.
- [3] 孙翠翠,张斯萌,温侗,等. 晚期非小细胞肺癌肿瘤生长速率与临床病理特征及预后的相关性[J]. *中国医科大学学报*, 2019, 48(8): 673-677. DOI:10.12007/j.issn.0258-4646.2019.08.001.
- [4] LI L H, WANG X J, LI W, et al. miR-21 modulates prostaglandin signaling and promotes gastric tumorigenesis by targeting 15-PGDH [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 928-934. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.09.137.
- [5] HWANG S K, JEONG Y J, CHANG Y C. PDCD4 inhibits lung tumorigenesis by the suppressing p62-Nrf2 signaling pathway and upregulating Keap1 expression[J/OL]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(2): 424-439[2010-07-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7061761/>.
- [6] ZHAO M Y, WANG L M, LIU J, et al. MiR-21 suppresses anoikis through targeting PDCD4 and PTEN in human esophageal adenocarcinoma[J]. *Curr Med Sci*, 2018, 38(2): 245-251. DOI: 10.1007/s11596-018-1872-7.
- [7] KOH H, AN H, JUNG J, et al. The prognostic significance of CD63 expression in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Pol J Pathol*, 2019, 70(3):183-188. DOI:10.5114/pjp.2019.90394.
- [8] ZHAO Q Y, CHEN S M, ZHU Z L, et al. miR-21 promotes EGF-induced pancreatic cancer cell proliferation by targeting Spry2 [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(12): 1157[2010-07-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6249286/>. DOI:10.1038/s41419-018-1182-9.
- [9] WU Y, SONG Y, XIONG Y, et al. MicroRNA-21 (miR-21) promotes cell growth and invasion by repressing tumor suppressor PTEN in colorectal cancer[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(3): 945-958. DOI:10.1159/000481648.
- [10] HAO Y J, HUANG J W, MA Y, et al. Asiatic acid inhibits proliferation, migration and induces apoptosis by regulating Pdc4 via the PI3K/Akt/mTOR/p70S6K signaling pathway in human colon carcinoma cells [J/OL]. *Oncol Lett*, 2018, 15(6): 8223-8230[2010-07-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5950025/>. DOI: 10.3892/ol.2018.8417.
- [11] 卢锐,洗磊,莫俊贤,等. miR-21 及 PDCD4 在非小细胞肺癌的表达及其临床意义[J]. *广西医科大学学报*, 2017, 34(12): 1710-1712. DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2017.12.008.
- [12] ARISAN E D, RENCUZOGULLARI O, FREITAS I L, et al. Upregulated Wnt-11 and miR-21 expression trigger epithelial mesenchymal transition in aggressive prostate cancer cells[J/OL]. *Biology (Basel)*, 2020, 9(3): E52[2010-07-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7150874/>. DOI:10.3390/biology9030052.
- [13] QIU Y F, WANG M X, MENG L N, et al. MiR-21 regulates proliferation and apoptosis of oral cancer cells through TNF- α [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(22): 7735-7741. DOI: 10.26355/eurev_201811_16395.
- [14] WU Y, ZHU X, SHEN R, et al. miR-182 contributes to cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma via targeting PDCD4[J]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(11): 152603. DOI: 10.1016/j.prp.2019.152603.
- [15] CHEN C Y, ZHENG Q, KANG W B, et al. Long non-coding RNA LINC00472 suppresses hepatocellular carcinoma cell proliferation, migration and invasion through miR-93-5p/PDCD4 pathway[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2019, 43(4): 436-445. DOI: 10.1016/j.clinre.2018.11.008.
- [16] CHANG C R, WANG H Y, LIU J C, et al. *Porphyromonas gingivalis* infection promoted the proliferation of oral squamous cell carcinoma cells through the miR-21/PDCD4/AP-1 negative signaling pathway[J]. *ACS Infect Dis*, 2019, 5(8): 1336-1347. DOI: 10.1021/acsinfecdis.9b00032.
- [17] ZHANG J D, MA L, SHI D M, et al. Prognostic significance of miR-21 and PDCD4 in patients with stage II esophageal carcinoma

- after surgical resection[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(6): 4783-4791. DOI:10.1002/jcb.26672.
- [18] LI L, ZHENG Y, ZHANG W H, et al. Scutellarin circumvents chemoresistance, promotes apoptosis, and represses tumor growth by HDAC/miR-34a-mediated down-modulation of Akt/mTOR and NF- κ B-orchestrated signaling pathways in multiple myeloma[J/OL]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13(2): 212-219[2010-07-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7061792/>.
- [19] 郑凯威, 周焯, 李振洋, 等. CARD10通过活化NF- κ B信号进而促进肝癌细胞凋亡抵抗[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(3): 289-294. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2020.03.012.
- [20] WANG Z, LI M Y, MI C, et al. Mollugin has an anti-cancer therapeutic effect by inhibiting TNF- α -induced NF- κ B activation [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(8): 1619. DOI:10.3390/ijms18081619.
- [21] HWANG S K, BAKER A R, YOUNG M R, et al. Tumor suppressor PDCD4 inhibits NF- κ B-dependent transcription in human glioblastoma cells by direct interaction with p65[J/OL]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(7): 1469-1480[2010-07-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4076808/>. DOI:10.1093/carcin/bgu008.
- [22] LI Y, WANG X, WANG X, et al. PDCD4 suppresses proliferation, migration, and invasion of endometrial cells by inhibiting autophagy and NF- κ B/MMP2/MMP9 signal pathway[J]. *Biol Reprod*, 2018, 99(2): 360-372. DOI:10.1093/biolre/i0y052.
- [23] MAO X H, CHEN M, WANG Y, et al. MicroRNA-21 regulates the ERK/NF- κ B signaling pathway to affect the proliferation, migration, and apoptosis of human melanoma A375 cells by targeting SPRY1, PDCD4, and PTEN[J]. *Mol Carcinog*, 2017, 56(3): 886-894. DOI: 10.1002/mc.22542.

[收稿日期] 2020-10-11

[修回日期] 2020-12-16

[本文编辑] 党瑞山