

论著·临床研究

miR-451 及靶基因在非小细胞肺癌中的
表达与调控研究*余欢成, 娄丽华, 龚沿玲, 王圆美, 吴跃武, 郝丽琴[△]

(抚州市第一人民医院, 江西 抚州 344000)

[摘要] **目的** 探讨 miR-451 及靶基因 PSMB8 在非小细胞肺癌中的表达及其与相关细胞周期蛋白的相关性, 为非小细胞肺癌的治疗提供新的靶点。**方法** 选取 2020 年 1 月至 2022 年 12 月该院胸外科行肺癌根治术的 6 例肺癌患者组织标本, 将其按癌组织和癌旁组织进行分组, 各 6 份。比较 2 组 miR-451、蛋白酶体 β 亚单位 8 (PSMB8)、细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1)、Cyclin E1、细胞周期素依赖激酶 4 (CDK4)、CDK2 蛋白相对表达水平, 分析 miR-451 与相关细胞周期蛋白的相关性。**结果** 肺癌组织组 miR-451 的 CT 值高于癌旁组织组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。肺癌组织组 miR-451 的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为 0.53, 癌旁组织组 miR-451 相对表达量是肺癌组织组的 1.87 倍。肺癌组织组 PSMB8 相对表达水平为 (1.55 ± 0.23) , 明显高于癌旁组织组的 (0.98 ± 0.15) , 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。肺癌组织组 Cyclin D1、Cyclin E1、CDK4、CDK2 蛋白相对表达水平明显高于癌旁组织组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。miR-451 相对表达水平与 Cyclin D1、Cyclin E1、CDK4、CDK2 蛋白相对表达水平呈负相关 ($r = -0.93, -0.89, -0.86, -0.84, P < 0.05$)。**结论** 肺癌组织中 miR-451 低表达, 可减少对靶基因 PSMB8 表达的抑制作用, 进而干扰细胞周期相关蛋白的表达, 影响细胞增殖和凋亡, 从而间接调控肺癌的发生发展。

[关键词] 细胞周期蛋白; 靶基因; 非小细胞肺癌

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2024.15.005

中图法分类号: R734.2

文章编号: 1009-5519(2024)15-2544-04

文献标识码: A

Expression and regulation of miR-451 and target genes in
non-small cell lung cancer*YU Huancheng, LOU Lihua, GONG Yanling, WANG Yuanmei, WU Yuewu, QIE Liqin[△]

(First People's Hospital of Fuzhou, Fuzhou, Jiangxi 344000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expression of miR-451 and target gene PSMB8 in non-small cell lung cancer and their correlation with related cell cycle proteins, so as to provide new targets for the treatment of non-small cell lung cancer. **Methods** The tissue specimens from six lung cancer patients who underwent radical lung cancer surgery in the thoracic surgery department of the hospital from January 2020 to December 2022 were selected, and divided into two groups based on cancer tissue and adjacent tissue, with six samples in each group. The relative expression levels of miR-451, proteasome subunit beta 8 (PSMB8), Cyclin D1, Cyclin E1, cyclin dependent kinase 4 (CDK4), and CDK2 proteins between the two groups were compared, and the correlation between miR-451 and related cyclin proteins was analyzed. **Results** The CT value of miR-451 in the lung cancer tissue group was higher than that in the adjacent tissue group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The $2^{-\Delta\Delta CT}$ value of miR-451 in the lung cancer tissue group was 0.53, and the relative expression level of miR-451 in the adjacent tissue group was 1.87 times higher than that in the lung cancer tissue group. The relative expression level of PSMB8 in the lung cancer tissue group was (1.55 ± 0.23) , significantly higher than that in the adjacent tissue group (0.98 ± 0.15) , and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The relative expression levels of Cyclin D1, Cyclin E1, CDK4, and CDK2 proteins in the lung cancer tissue group were significantly higher than those in the adjacent tissue group, with statistical significance ($P < 0.05$). The relative expression level of miR-451 was negatively correlated with the relative expression levels of Cyclin D1, Cyclin E1, CDK4, and CDK2 proteins ($r = -0.93, -0.89, -0.86, -0.84, P <$

* 基金项目: 江西省卫生健康委员会科技计划项目 (SKJP220210971)。

作者简介: 余欢成 (1979—), 本科, 副主任医师, 主要从事呼吸系统疾病研究工作。 [△] 通信作者, E-mail: 1669273054@qq.com。

0.05)。Conclusion Low expression of miR-451 in lung cancer tissue can reduce the inhibitory effect on the expression of target gene PSMB8, thereby interfering with the expression of cell cycle related proteins, affecting cell proliferation and apoptosis, and indirectly regulating the occurrence and development of non-small cell lung cancer.

[Key words] Cell cycle protein; Target genes; Non-small cell lung cancer

肺癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,已成为我国城市人口恶性肿瘤死亡原因的第 1 位^[1]。非小细胞肺癌约占所有肺癌的 80%,约 75%的患者发现时已处于中晚期,其 5 年生存率很低^[2-4]。虽然,大量针对非小细胞肺癌的靶向药及免疫抑制剂被批准应用于临床,但很多患者在使用过程出现耐药现象。近年来,随着对非编码 RNA 研究的深入,miRNA 在机体中所构建的调控网络及其对靶基因的调控机制被逐渐探明,但其在肿瘤发病中的作用有待进一步验证。因此,探讨 miRNA 在非小细胞肺癌发病机制中的作用,寻求新的治疗靶点成为研究者关注的热点。本研究以 miR-451 为研究靶点,通过分析 miR-451 在癌组织和癌旁组织中的相对表达量,探讨其对靶基因 PSMB8 表达抑制作用的强弱,并以细胞周期相关蛋白的表达水平评价其对细胞增殖和凋亡的影响,为进一步揭示 miRNA 在非小细胞肺癌发生发展中的作用奠定基础。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 一般资料 选取 2020 年 1 月至 2022 年 12 月本院胸外科行肺癌根治术的 6 例肺癌患者组织标本,将其按癌组织和癌旁组织进行分组,各 6 份。患者年龄 45~68 岁,均为原发性肺癌,未出现多种肿瘤并发现象。本研究经医院医学伦理委员会审核批准。

1.1.2 主要试剂与仪器 7500 型实时定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司,Trizol、逆转录试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,聚偏氟乙烯电转膜购自美国 Millipore 公司,琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自美国 OMEGA 公司,丙烯酰胺购自美国 Amresco 公司,UVP-GDS8000 凝胶成像系统购自美国 UVP 公司,电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司,移液器购自德国 Eppendorf 公司,聚合酶链反应(PCR)扩增仪购自日本 Thermo 公司,实时荧光定量 PCR(RT-PCR)试剂盒购自日本 TaKaRa 公司,免疫印迹法(Western blot)实验仪购自上海天能科技有限公司,曝光用显影粉/定影粉购自天津市鑫洋医疗器械有限公司,生物安全柜购自江苏苏净安泰公司。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 检测 检测肺癌组织及癌旁组织 miR-451、蛋白酶体 β 亚单位 8(PSMB8)的相对表达水平。采用 Trizol 法提取总 RNA,在逆转录反应体系下进行逆转录,体系条件设定如下:16 °C 10 min,

37 °C 30 min,65 °C 15 min,4 °C 左右保存。将 miR-451 反转录为第一链 cDNA,再以其为模板,在 PCR 扩增仪中进行扩增,条件设置如下:引物 10 pmol/L;95 °C 变性 10 min,95 °C 15 s,60 °C 1 min,40 个循环。选定 U6 为内参,以目的基因与内参基因之间相对表达水平作为目的基因表达量,并采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对表达量。

1.2.2 Western blot 检测 取出待测标本组织,在低温条件下充分碾磨后按常规方法提取总蛋白。每管加入 10%的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液,充分混匀后沸水浴加热 3~5 min,使目的蛋白变性。目的蛋白冷却到室温后,上样至 SDS-PAGE 胶加样孔内。经聚丙烯酰胺凝胶电泳处理后,转移至聚偏二氟乙烯膜上,放置到预先准备好的 Western 洗涤液中,漂洗 1~2 min,以洗去膜上的转膜液。滴管吸尽洗涤液,加入 Western 封闭液,在摇床上缓慢摇动,室温封闭 60 min。吸尽封闭液,立即加入稀释好的一抗,4 °C 缓慢摇动孵育过夜。结合一抗过夜后,用缓冲液清洗 3 次,每次 5 min,加入二抗室温孵育 2 h,用缓冲液清洗 3 次,每次 5 min,加入增强化学发光显色剂,压片曝光、显影。选取稳定表达于癌旁组织和肺癌组织中的 β -Actin 蛋白作为内参,以目标蛋白和内参蛋白条带灰度值的比值作为目标蛋白表达的相对含量,经蛋白灰度分析软件 Quantity one 扫描,计算细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)、Cyclin E1、细胞周期素依赖激酶 4(CDK4)、CDK2 蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理 RNA 及蛋白质相对表达量原始数据统一录入 SPSS20.1 软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对样本 t 检验,miR-451 与细胞周期蛋白表达量的相关性采用 Pearson 相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组 miR-451 基因扩增结果比较 肺癌组织组 miR-451 的 CT 值高于癌旁组织组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。肺癌组织组 miR-451 的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值为 0.53,癌旁组织组 miR-451 相对表达量是肺癌组织组的 1.87 倍。肺癌组织组 PSMB8 相对表达水平为 (1.55 ± 0.23) ,明显高于癌旁组织组的 (0.98 ± 0.15) ,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 2 组 Cyclin D1、Cyclin E1、CDK4、CDK2 蛋白相

对表达水平比较 肺癌组织组 Cyclin D1、Cyclin E1、CDK4、CDK2 蛋白相对表达水平明显高于癌旁组织组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 2 组 miR-451 基因扩增结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CT 值		Δ CT	$\Delta\Delta$ CT
		miR-451	内参		
癌旁组织组	6	27.82±0.19	21.33±0.17	6.49±0.18	0.00±0.18
肺癌组织组	6	29.56±0.18	22.15±0.14	7.41±0.16	0.92±0.17
t	—	-46.44	-23.21	-22.40	-13.13
P	—	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:—表示无此项。

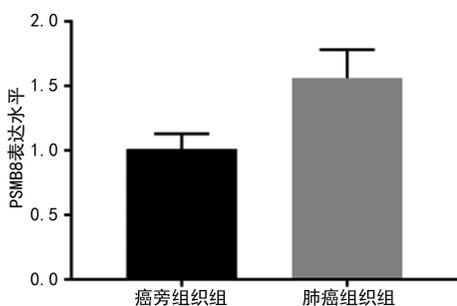


图 1 2 组 PSMB8 表达情况

表 2 2 组 Cyclin D1、Cyclin E1、CDK4、CDK2 蛋白相对表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Cyclin D1	Cyclin E1	CDK4	CDK2
癌旁组织组	6	0.41±0.03	0.22±0.03	0.35±0.16	0.24±0.11
肺癌组织组	6	1.56±0.41	1.73±0.42	2.12±0.22	1.85±0.72
t	—	-7.38	-9.27	-58.96	-6.50
P	—	0.001	<0.001	<0.001	0.001

注:—表示无此项。

2.3 相关性分析 miR-451 相对表达水平与 Cyclin D1、Cyclin E1、CDK4、CDK2 蛋白相对表达水平呈负相关($r = -0.93, -0.89, -0.86, -0.84, P < 0.05$)。

3 讨论

肺癌是发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,已位列恶性肿瘤致死原因第 1 位,其中非小细胞肺癌发病率为 80%~85%^[5]。非小细胞肺癌癌细胞裂变速度慢,扩散转移相较于小细胞肺癌晚,且早期非小细胞肺癌一般无明显临床症状,但发病确诊时多为中晚期,患者预后较差^[6]。因此,对非小细胞肺癌发病机制进行研究,寻找新的靶点具有重大意义。

miRNA 是一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,其不直接参与基因的表达。目前,研究者共鉴定超过 1 000 种 miRNA。在对大量真核细胞 miRNA 分析中,研究者发现在不同组织或同一组织不同发育阶段,miRNA 的水平具有明显差异性。该特征与其他参与靶基因调控的生物大分子表达具有一致的特性。因此,研究

者推测其在细胞内具有多种重要的调节作用。随着对 miRNA 研究的深入,其在生物体内成熟过程逐渐被认知。从原始 pri-miRNA 到 miRNA 前体即 pre-miRNA,最终在 Dicer 酶酶切后形成具有发夹结构的成熟 miRNA。每个成熟 miRNA 参与 1 个或多个靶基因调控,同时不同 miRNA 也可共同靶向调控同一基因,从而在机体中构建完善的 miRNA 调控网络。miRNA 完成对靶基因的调控主要通过 2 种机制实现:一是通过与 mRNA 互补结合,诱导 mRNA 被切割,破坏靶基因的稳定性;二是与 mRNA 不完全结合,在不破坏 mRNA 前提下抑制蛋白质表达。大量基础研究结果证实,miRNA 通过与 mRNA 结合,影响靶向基因的稳定性或抑制靶向基因的蛋白翻译表达,从而间接参与细胞代谢、增殖、分化、凋亡等过程^[7-8]。

ALTUVIA 等^[9]在 2005 年于人脑垂体 RNA 中提取 miR-451,其位于染色体 17q11.2。近年来,研究者发现 miR-451 的生成不依赖 Dicer 切割,而与 Argonaute 催化酶活性密切相关^[10]。这种特殊生成途径在生物发育过程中必然发挥重要作用。大量研究发现,miR-451 在胶质瘤^[11]、胃肠肿瘤^[12-13]、肺癌^[14-15]等肿瘤组织中呈低表达。体外实验上调 miR-451 表达可显著抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭。因此,有理由相信,miR-451 在非小细胞肺癌中的异常表达,可能通过影响细胞周期相关蛋白的表达,进而逃逸细胞周期的限制,最终导致细胞恶性增殖,诱发肿瘤形成。本研究以 miR-451 为导向,探讨其对肺癌细胞中 Cyclin D1、Cyclin E1、CDK4、CDK2 蛋白的影响,为更好地了解肺癌发病机制提供了参考和依据。本研究结果显示,癌旁组织中 miR-451 表达量是肺癌组织的 1.87 倍,而肺癌组织中 PSMB8 表达量显著增加。肺癌组织中 Cyclin D1、Cyclin E1、CDK4、CDK2 蛋白相对表达水平明显高于癌旁组织。高表达的细胞周期调控因子 Cyclin D1 能和 CDK4 形成复合物,进而使 Rb 蛋白磷酸化,释放 E2F 转录因子 1,驱动肿瘤细胞从 G₁ 期进入 S 期。同样,肺癌细胞中 Cyclin E1 高表达,通过激活 CDK2 并与之形成复合物,促进细胞通过细胞周期 G₁/S 期限制点。Cyclin D1、Cyclin E1 的过度表达可引起细胞增殖失控,从而造成细胞异常增殖,最终诱发正常细胞癌变^[16-17]。癌旁组织中 miR-451 可通过与 PSMB8 互补结合,破坏 PSMB8 稳定性而降低 PSMB8 表达水平。肺癌组织中 miR-451 低表达,导致对靶基因表达的抑制作用减弱,以及 PSMB8 表达水平显著增加,进而间接影响细胞周期相关蛋白的表达,干扰细胞增殖与凋亡。miR-451、PSMB8 与细胞周期相关蛋白表达的关联性在本研究的相关性分析中得到了进一步验证。

综上所述,miR-451 可能通过调控 PSMB8 的表

达进而调控细胞周期调控因子 Cyclin D1、Cyclin E1 表达,从而促进肿瘤细胞通过细胞周期 G₁/S 期限制点,诱导非小细胞肺癌的发生发展。为进一步证实上述调控机制,本课题组拟在体外培养非小细胞肺癌细胞株 NCI-H1975 细胞,通过上调和下调 miR-451 表达,检测细胞周期蛋白表达量及 NCI-H1975 细胞凋亡和迁移情况,进而在细胞层面探讨 miR-451 对非小细胞肺癌细胞形态和功能的影响。

参考文献

- [1] 马书梅,刘瑞娟,张影影. 肺癌的流行病学[J]. 世界最新医学信息文摘,2019,19(26):77-78.
- [2] 陈佳怡,梁宗安. 基于肺癌分类标准演变对肺炎类型肺癌的新认识[J]. 中国呼吸与危重监护杂志,2018,17(6):632-637.
- [3] 李丽,李敏. I A 期肺癌诊治进展[J]. 中国实用内科杂志,2019,39(5):420-424.
- [4] 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.
- [5] 王春梅,高艳丽,尹丽霞. 非小细胞肺癌放射治疗研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志,2017,24(10):720-724.
- [6] 刘小小,陈秀红,张中冕. 非小细胞肺癌脑膜转移治疗进展[J]. 现代肿瘤医学,2021,29(23):873-875.
- [7] 赵健志,李欢欢,刘柯欣,等. microRNA 与靶基因相互调控机制的研究进展[J]. 科学通报,2021,66(24):18.
- [8] 唐德平,邢梦洁,宋文涛,等. microRNA 治疗在癌症及其他疾病中的研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2021,41(11):64-73.
- [9] ALTUVIA Y, LANDGRAF P, LITHWICK G, et al. Clustering and conservation patterns of human microRNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005,33(8):2697-2706.
- [10] KRETOV D A, WALAWALKAR I A, MORA-MARTIN A, et al. Ago2-dependent processing allows miR-451 to evade the global microRNA turnover elicited during erythropoiesis[J]. *Mol Cell*, 2020,78(2):317-328.
- [11] 吴伟川,门东海,刘磊峰,等. SNHG15-lncRNA ceRNA 网络靶向 miR-451a 促进胶质瘤增殖[J]. 河北医学,2022,28(4):599-604.
- [12] 吕一峰,高文玉,李志红. miR-181a-5p 和 miR-451a 在胃癌诊断和预后评估中的临床价值[J]. 检验医学与临床,2021,18(8):1059-1063.
- [13] 吕铁升,王奇龙,许刚,等. miR-451 对结肠癌移植瘤模型肿瘤发生发展的抑制作用实验研究[J]. 医学分子生物学杂志,2020,17(3):194-199.
- [14] 王继鹏,李朋玲,陈胜. Pokemon, miR-451, IF-ITM1 在非小细胞肺癌组织中的表达及与病理特征的相关性[J]. 中国老年学杂志,2023,43(9):2079-2083.
- [15] 武天慧,彭睿,彭惠民,等. miR-451 对肺癌细胞的增殖抑制及其靶基因的初步鉴定[J]. 第三军医大学学报,2015,37(18):1823-1829.
- [16] 张帅,夏文佳,董高超,等. 环状 RNA 分子 circ_0007766 通过上调细胞周期相关蛋白 Cyclin D1/CyclinE1/CDK4 的表达促进肺腺癌细胞增殖[J]. 中国肺癌杂志,2019,22(5):271.
- [17] 孙浩然,李霄,李涛,等. 骨原发性朗格汉斯组织细胞增生症中 Cyclin D1 的表达及临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志,2020,36(8):916-919.

(收稿日期:2023-12-26 修回日期:2024-04-21)

(上接第 2543 页)

- tor(BAFF): Structure, functions, autoimmunity and clinical implications in systemic lupus erythematosus(SLE) [J]. *Autoimmun Rev*, 2021, 20(2):102736.
- [20] MATHUR M, BARRATT J, CHACKO B, et al. A phase 2 trial of sibeprenlimab in patients with IgA nephropathy [J]. *N Engl J Med*, 2024,390(1):20-31.
 - [21] TANG Y, SUN W, HE H, et al. Activation of

intestinal mucosal TLR4/NF- κ B pathway is associated with renal damage in mice with pseudo-sterile IgA nephropathy [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2023,39(10):865-871.

- [22] NIHEI Y, SUZUKI H, SUZUKI Y. Current understanding of IgA antibodies in the pathogenesis of IgA nephropathy [J]. *Front Immunol*, 2023,14:1165394.

(收稿日期:2023-11-30 修回日期:2024-03-29)