论著

文章编号:1000-5404(2014)04-0340-06

miR-4686对A549细胞球增殖的调控作用及其机制研究

胡欣春[1,2,3],魏益平[1],彭金华[1],喻东亮[1],徐建军[1] (330006 南昌,南昌大学第二附属医院心胸外科[1];330006 南昌,南昌大学医学院[2];330006 南昌,江西省胸科医院胸外科[3])

[摘要] **目的** 研究miR-4686对A549细胞球增殖的调控作用及其相关机制。**方法** 培养A549细胞,从中分选出$CD133^+CD44^+$A549细胞并置于无血清培养基中培养,形成细胞球后进行$CD133^+CD44^+$表达检测。Western blot检测A549细胞和A549细胞球中Wnt5a、Wnt2蛋白的表达;合成miR-4686抑制物和阴性对照,分别转染A549细胞球48 h后,应用Real-time PCR检测转染前后miR-4686的表达变化后,使用Real-time PCR和Western blot分析Wnt5a、Wnt2以及β-catenin mRNA和蛋白的表达变化,利用MTT检测12、24、48 h细胞的增殖能力。**结果** 流式细胞术检测A549细胞球$CD133^+CD44^+$表达为69.800%;A549细胞球分别转染miR-4686抑制物和阴性对照物后,miR-4686的表达以及Wnt5a、Wnt2和β-catenin mRNA和蛋白的表达较对照组和miR-4686阴性对照物组显著下调($P<0.05$);A549细胞球转染miR-4686抑制物后12、24、48 h,其OD值显著低于对照组和miR-4686对照物干预组($P<0.05$)。**结论** miR-4686介导Wnt信号通路发挥调控A549细胞球增殖的作用,其可成为治疗肺癌的潜在靶点。

[关键词] microRNA;抑制物;CD133;肺癌

[中图法分类号] R73-362;R730.23;R734.2 [文献标志码] A

Regulation of miR-4686 on proliferation in A549 spheres

Hu Xinchun[1,2,3], Wei Yiping[1], Peng Jinhua[1], Yu Dongliang[1], Xu Jianjun[1] ([1] Department of Cardiothoracic Surgery, Second Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi Province, 330006; [2] Medicine School of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi Province, 330006; [3]Department of Chest Surgery, Jiangxi Chest Hospital, Nanchang, Jiangxi Province, 330006, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the mechanism of miR-4686 regulating the proliferation of A549 spheres. **Methods** $CD133^+CD44^+$ A549 cells were sorted by FACS, and then cultured in serum-free medium. Positive rate of $CD133^+CD44^+$ A549 spheres were detected by FACS. Wnt5a and Wnt2 protein expression of A549 cells and A549 spheres were assayed by Western blotting. MiR-4686 inhibitors and negative control were synthesized. A549 spheres were treated with miR-4686 inhibitors and negative control separately for 48 h, and then the expression of miR-4686 were detected by real-time PCR. Wnt5a, Wnt2 and β-catenin mRNA and protein expression was assayed by RT-PCR and Western blotting, respectively. The proliferation of A549 spheres was detected by MTT assay at 12, 24 and 48 h. **Results** $CD133^+CD44^+$ A549 cells were sorted. The positive rate of $CD133^+CD44^+$ was 69.800% in A549 spheres. Wnt5a and Wnt2 protein expression was significant decreased in A549 cells, as compared to A549 spheres ($P<0.05$). After treatment with miR-4686 inhibitors, the expression of miR-4686 as well as the mRNA and protein expression of Wnt5a, Wnt2 and β-catenin were significant down-regulated, compared to the control group and miR-4686 negative control group ($P<0.05$). What's more, OD values at 12, 24 and 48 h were decreased after miR-4686 inhibitor treatment ($P<0.05$). **Conclusion** MiR-4686 plays an important role in regulation of A549 sphere proliferation through Wnt signal pathway, which may become a novel target for treatment of non-small-cell lung cancer.

[基金项目] 国家自然科学基金重大项目(2011YQ170067);国家自然科学基金(81160293);江西省教育厅青年科学基金(GJJ10067)

[通信作者] 徐建军,E-mail:17344296@qq.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131121.1734.019.html(2013-11-21)

[**Key words**] microRNA; inhibitors; CD133; lung cancer

Supported by the Major Program of National Natural Science Foundation of China (2011YQ170067), the National Natural Science Foundation of China (81160293) and the Science Foundation for Young Scholar of Education Department of Jiangxi Province (GJJ10067). Corresponding author: Xu Jianjun, E-mail: 17344296@qq.com

成熟的微小 RNA(microRNAs,miRNAs)是一种内源性的、含有 20 ~ 23 个核苷酸的单链非蛋白编码 RNA,其主要通过与特定靶 mRNA 的 3′端 UTR 的互补(包括完全性和非完全性)结合,抑制靶 mRNA 的翻译或促进靶 mRNA 的降解,导致靶基因转录后沉默,从而发挥调控作用[1]。近十几年对 miRNA 的表达和功能的研究取得了长足的进展,发现 miRNA 对细胞的增殖、凋亡、分化等发挥着关键的作用[2]。当 miRNA 出现异常表达时可导致肿瘤的发生及发展[3-4]。进一步的研究发现,多种 miRNA 在调控干细胞的分化中发挥着重要作用[5]。我们前期实验通过芯片技术发现在肿瘤组织中 miR-4686 的表达较癌旁正常组织中显著上调,利用 qPCR 发现 miR-4686 在 A549 细胞球中的表达比正常 A549 细胞中显著上调,同时 A549 细胞球具有比 A549 细胞更强的增殖能力[6],推测 miR-4686 可能与 A549 细胞球的增殖有关。Wnt 家族蛋白是一种分泌型富含半胱氨酸的糖蛋白,包括 19 种高度保守的蛋白。其在细胞发育以及调控细胞生理功能,如细胞增殖、分化、凋亡、黏附、迁移和极性等方面发挥着关键作用。近年的研究证实,Wnt 信号通路在肿瘤的生长、侵袭中发挥着重要作用。本研究旨在探明是否 miR-4686 具有调控 A549 细胞球增殖的作用以及其是否通过 Wnt 信号通路发挥调控 A549 细胞球增殖的作用,以期找到一个治疗肺癌的潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 主要材料

DMEM 培养基、DMEM/F12 培养基、胎牛血清购自 HyClone 公司;表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF),碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和 opti-Mem 购自 Gibcol 公司;B27、胰岛素购自 Sigma 公司;APC 标记抗人 CD133/1(AC133)抗体购自 Miltenyi Biotec 公司;FITC 标记抗人 CD44 抗体购自 BD 公司;TRIzol 购自 Invirogen 公司;无血清培养基(serum free medium, SFM):DMEM/F12 + 胰岛素(4 U/L) + B27(1 ×) + EGF(20 μg/L) + bFGF(20 μg/L),总 RNA 提取试剂盒购自东洋纺公司,Hairpin-it™miRNAs 定量 PCR 试剂盒购自吉玛公司。M-PER 细胞裂解液购自赛默飞世尔公司。Wnt5a、Wnt2 和 β-catenin 单克隆抗体均购自 Abcam 公司,β-actin 购自北京天德悦公司。ribo FECT™ CP 转染试剂、miR-4686 抑制物、miR-4686 阴性对照物均购自广州锐博公司。MTT 试剂盒购自江苏碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 非小细胞肺癌细胞 A549 的培养 A549 细胞培养于含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中,细胞置于 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度下的培养箱中传代培养,取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 流式细胞术检测细胞 $CD133^+$、$CD44^+$ 的分选以及表达情况 收集 10^7 个细胞后用含有 2% FBS 的 PBS(buffer)重悬,300 × *g* 离心 10 min 后弃去上清,加入 80 μL Buffer 后,加入 10 μL CD133/1(AC133)抗体和 20 μL CD44 抗体,充分混匀后置于 4 ℃避光孵育 15 ~ 20 min。加入 1 mL Buffer 后 300 × *g* 离心 10 min 后弃去上清,加入 200 μL Buffer 重悬细胞后,上机分选或检测。

1.2.3 A549 细胞球的培养 将分选后的 $CD133^+$ $CD44^+$ A549 细胞加入含有适量的 SFM 的超低黏附培养瓶中,置于 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度下的培养箱中培养。具体方法详见文献[7]。

1.2.4 miR-4686 抑制物和阴性对照物的转染 miR-4686 抑制物的序列为:5′-GAGGACGACCCGGGUCCCACAG-3′,为化学修饰的成熟 miR-4686 互补单链。抑制物阴性对照物的序列为:5′-UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG-3′。将抑制物和阴性对照物干粉用 RNase-free H_2O 配制成 20 μmol/L 的储存液后,分装、冻存备用。miR-4686 抑制物转染悬浮细胞的方法按照广州锐博公司 riboFECT™ CP 转染试剂说明书进行操作:①将 A549 细胞球用胰酶消化,并将细胞球体吹散成为单个细胞,离心洗涤后用 SFM 重悬,在每孔含有 440 μL SFM 培养基的 24 孔板中接种约 2×10^5 个/孔的细胞;②将 5 μL 浓度为 20 μmol/L 的 miR-4686 抑制物加入到 50 μL 1 × ribo FECTTM CP Buffer 中,轻轻混匀,室温孵育 5 min;③在上述混合液中加入 5 μL 转染试剂 ribo FECT™ CP Reagent,轻轻吹打混匀,室温孵育15 min;④将 60 μL 转染试剂-抑制物混合试剂加入含有细胞的孔板中,轻轻混匀,miR-4686 抑制物的转染终浓度为 200 nmol/L;⑤将培养板置于 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度下的培养箱中培养 48 h 后进行 PCR 和 Western blot 检测(MTT 检测的时间点为 12、24、48 h)。miR-4686 阴性对照物组的转染:取 50 μL 1 × ribo FECT™ CP Buffer 稀释 1.25 μL 20 μmol/L miRNA 阴性对照物贮存液,余步骤同 miR-4686 抑制物的转染步骤。

1.2.5 miR-4686 的检测 按照 TRIzol 提取总 RNA 试剂盒说明书提取细胞的总 RNA。逆转录条件为 25 ℃ 30 min, 42 ℃ 30 min,85 ℃ 10 min,逆转录试剂由吉玛公司提供。cDNA采用 SYBR Select Master Mix 系统进行实时荧光定量 PCR 检测 miR-4686 的表达,以 U6 作为内参(表 1)。每个待测基因设 4 个复孔。数据通过 Sequence detection software 1.3 系统进行处理,按照公式 $RQ = 2^{-\triangle\triangle Ct}$ 计算各组间的倍数关系。

表1 基因序列及扩增片段长度

基因名称	序列(5′→3′)	扩增片段长度(bp)
U6	上游:ATTGGAACGATACAGAGAAGATT	70
	下游:GGAACGCTTCACGAATTTG	
hsa-miR-4686	上游:CAACCTATCTGCTGGGCTTTC	76
	下游:TATGCTTGTTCTCGTCTCTGTGTC	
Wnt5a	上游:TGGCTTTGGCCATATTTTTC	199
	下游:CCGATGTACTGCATGTGGTC	
Wnt2	上游:GCTGGAATTGCAACACCCTG	186
	下游:TGGCGCTTCCCATCTTCTTT	
β-catenin	上游:GCCTGACACACTAACCAAGC	174
	下游:AGCAAGGCTAGGGTTTGCTA	
β-actin	上游:GGACTTCGAGCAAGAGATGG	234
	下游:AGCACTGTGTTGGCGTACAG	

1.2.6 Real-time PCR检测Wnt5a、Wnt2、β-catenin、β-actin的mRNA表达 按照TRIzol提取总RNA试剂盒说明书提取A549细胞球的总RNA。取1 μg总RNA按照逆转录试剂盒说明书以37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s将总RNA逆转录为cDNA。cDNA采用SYBR Select Master Mix系统进行实时荧光定量PCR检测Wnt5a、Wnt2、β-catenin的表达,以β-actin作为内参。每个待测基因设4个复孔。数据通过Sequence detection software 1.3系统进行处理,按照公式 $RQ = 2^{-\triangle\triangle Ct}$ 计算各组间的倍数关系。

1.2.7 Western blot检测Wnt5a、Wnt2和β-catenin蛋白的表达

收集细胞,加入300 μL M-PER细胞裂解液,置于冰上20 min,期间吹打多,经4 ℃、12 000 r/min离心20 min,取上清液。测浓度后,蛋白煮沸变性。制备SDS-PAGE凝胶,每孔加样40 μg进行电泳。300 mA湿转86 min,将PVDF膜放入5%脱脂奶粉中室温封闭2 h后分别加入抗人Wnt5a、Wnt2、β-catenin(1∶1 000)及兔抗β-actin抗体(1∶10 000)的抗体稀释液中4 ℃过夜,用TBST洗涤3次,每次5min,后放入二抗(辣根酶标记山羊抗兔,1∶5 000)室温孵育1 h,TBST洗涤3次,每次5 min,用ECL化学发光法检测Wnt5a、Wnt2、β-catenin、β-actin蛋白的表达水平。所得蛋白条带图片,使用Image-Pro Plus 10.0对图像进行分析,以同一标本β-actin的产物光密度值作为内参,校正各自目的蛋白的积分光密度值。

1.2.8 MTT检测细胞增殖 取生长良好的A549细胞球消化成细胞悬液,计数并将细胞浓度调整到3×10^3/孔,接种于96孔板后加入SFM培养液。培养48 h后换液,每孔加入10 μL(5 mg/mL)的MTT溶液,孵育4 h后,每孔加入100 μL Formanzan溶液,继续孵育直至显微镜下观察到Formanzan全部溶解。用酶标仪在570 nm处检测各孔光密度值(OD),空白孔调零。

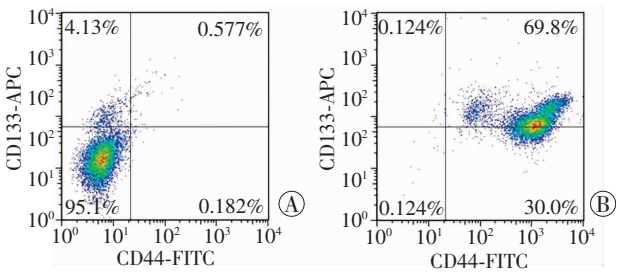
1.3 统计学处理

各实验至少重复3次,使用SPSS 13.0对数据进行分析,组间进行t检验。

2 结果

2.1 A549细胞球中CD133$^+$CD44$^+$的表达

流式细胞术检测示A549细胞球CD133$^+$CD44$^+$的表达率为69.800%。A549细胞CD133$^+$CD44$^+$的表达率为0.577%。见图1。

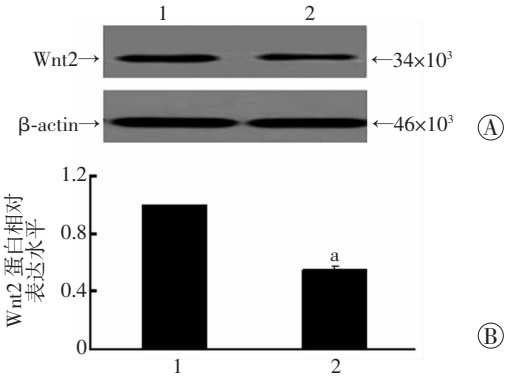


A:A549细胞;B:A549细胞球

图1 流式细胞术检测CD133$^+$CD44$^+$细胞阳性率

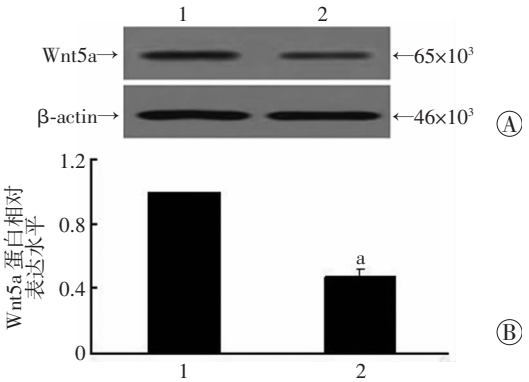
2.2 Wnt2和Wnt5a蛋白在A549细胞及A549细胞球中的表达

Wnt2和Wnt5a蛋白在A549细胞中的表达显著低于在A549细胞球中的表达($P<0.05$)。见图2、3。



A:Western blot检测结果;B:半定量分析结果 1:A549细胞球;2:A549细胞;a:$P<0.05$,与A549细胞球比较

图2 Western blot检测Wnt2蛋白在A549细胞和A549细胞球中的表达

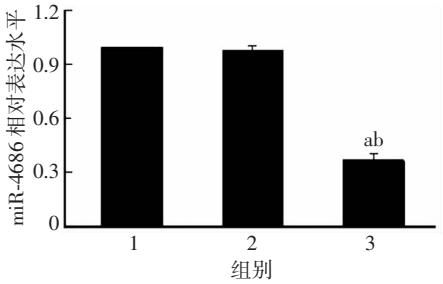


A:Western blot检测结果;B:半定量分析结果 1:A549细胞球;2:A549细胞;a:$P<0.05$,与A549细胞球比较

图3 Western blot检测Wnt5a蛋白在A549细胞和A549细胞球中的表达

2.3 miR-4686 在不同处理条件下 A549 细胞球中的表达

应用 miR-4686 抑制物进行干预 A549 细胞球后，miR-4686 的表达显著低于对照组和 miR-4686 对照物转染组（$P<0.05$）。见图 4。

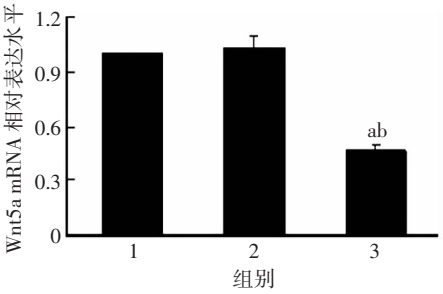


1：对照组；2：miR-4686 阴性对照物转染 A549 细胞球组；3：miR-4686 抑制物转染 A549 细胞球组；a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与 miR-4686 阴性对照物转染 A549 细胞球组比较

图 4　miR-4686 在不同处理条件下 A549 细胞球中的表达

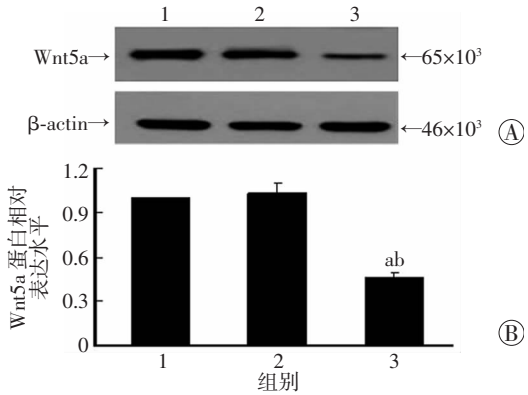
2.4 Wnt5a mRNA 和蛋白在不同处理条件下 A549 细胞球中的表达

应用 miR-4686 抑制物转染 A549 细胞球后，Wnt5a mRNA 和蛋白表达显著低于对照组和 miR-4686 对照物转染组（$P<0.05$）。见图 5、6。



1：对照组；2：miR-4686 阴性对照物转染 A549 细胞球组；3：miR-4686 抑制物转染 A549 细胞球组；a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与 miR-4686 阴性对照物转染 A549 细胞球组比较

图 5　Real-time PCR 检测 Wnt5a mRNA 在不同处理条件下 A549 细胞球中的表达

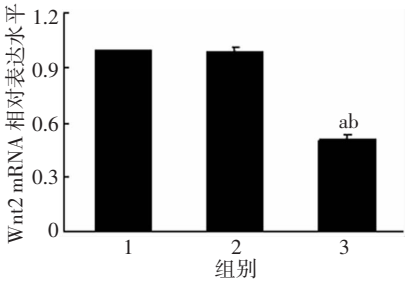


A：Western blot 检测结果；B：半定量分析结果　1：对照组；2：miR-4686 阴性对照物转染 A549 细胞球组；3：miR-4686 抑制物转染 A549 细胞球组；a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与 miR-4686 阴性对照物转染 A549 细胞球组比较

图 6　Western blot 检测 Wnt5a 和蛋白在不同处理条件下 A549 细胞球中的表达

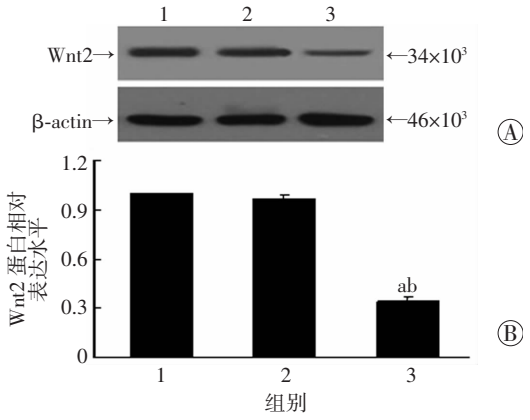
2.5 Wnt2 mRNA 和蛋白在不同处理条件下 A549 细胞球中的表达

应用 miR-4686 抑制物转染 A549 细胞球后，Wnt2 mRNA和蛋白表达显著低于对照组和 miR-4686 对照物转染组（$P<0.05$）。见图 7、8。



1：对照组；2：miR-4686 阴性对照物转染 A549 细胞球组；3：miR-4686 抑制物转染 A549 细胞球组；a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与 miR-4686 阴性对照物转染 A549 细胞球组比较

图 7　Real-time PCR 检测 Wnt2 mRNA 在不同处理条件下 A549 细胞球中的表达



A：Western blot 检测结果；B：半定量分析结果　1：对照组；2：miR-4686 阴性对照物转染 A549 细胞球组；3：miR-4686 抑制物转染 A549 细胞球组；a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与 miR-4686 阴性对照物转染 A549 细胞球组比较

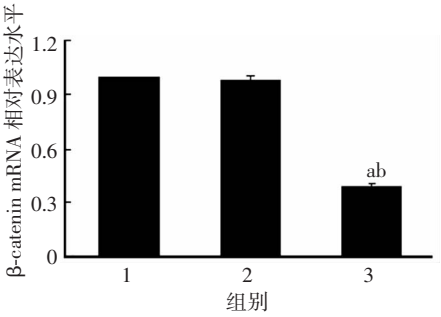
图 8　Western blot 检测 Wnt2 蛋白在不同处理条件下 A549 细胞球中的表达

2.6 β-catenin mRNA 和蛋白在不同处理条件下 A549 细胞球中的表达

应用 miR-4686 抑制物进行转染 A549 细胞球后，β-catenin mRNA 和蛋白表达显著低于对照组和 miR-4686 对照物转染组（$P<0.05$）。见图 9、10。

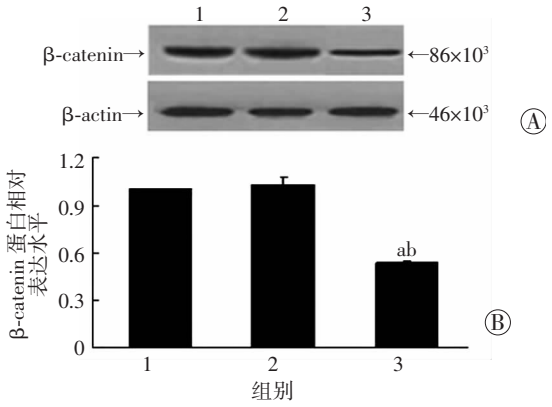
2.7 不同处理条件下 A549 细胞球增殖情况

应用 miR-4686 抑制物转染 A549 细胞球细胞后 0 h 和8 h 时，检测其 OD 值较对照组和 miR-4686 对照物转染组无显著差异（$P>0.05$），在 12、24、48 h 时，其 OD 值显著低于对照组和 miR-4686 对照物转染组（$P<0.05$），提示转染 miR-4686 抑制物后，显著抑制了细胞的增殖。在 48 h 时，miR-4686 对照物干预组的 OD 值显著低于 A549 细胞球未干预组（$P<0.05$）。见图 11。



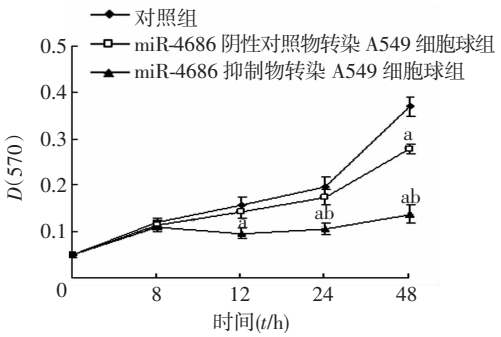
1:对照组;2:miR-4686 阴性对照物转染 A549 细胞球组;3:miR-4686 抑制物转染 A549 细胞球组;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 miR-4686 阴性对照物转染 A549 细胞球组比较

图9 Real-time PCR 检测 β-catenin mRNA 在不同处理条件下 A549 细胞球中的表达



1:对照组;2:miR-4686 阴性对照物转染 A549 细胞球组;3:miR-4686 抑制物转染 A549 细胞球组;A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 miR-4686 阴性对照物转染 A549 细胞球组比较

图10 Western blot 检测 β-catenin 蛋白在不同处理条件下 A549 细胞球中的表达



1:对照组;2:miR-4686 阴性对照物转染 A549 细胞球组;3:miR-4686 抑制物转染 A549 细胞球组;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 miR-4686 阴性对照物转染 A549 细胞球组比较

图11 MTT 法检测 A549 细胞球增殖变化

3 讨论

肺癌的发病率和病死率在各种恶性肿瘤中位居榜首。尽管近年来化疗、放疗、生物免疫治疗等治疗技术迅猛发展,但肺癌患者5年后生存率仍低于30%。肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)是肿瘤复发、耐药、侵袭及转移的关键因素,因此有效抑制肺癌干细胞的增殖已成为治疗肿瘤的重要靶点。本研究通过无血清培养,培养出富含 $CD133^+CD44^+$ 细胞、具有干细胞特性的 A549 细胞球[8],并在此基础上研究 miR-4686 对 A549 细胞球增殖的影响及其机制。

最新的研究指出 miRNA 在调节肿瘤干细胞的增殖、自我更新等方面同样发挥着重要的作用[9]。miR-130b 通过靶点 TP53INP1 促进肝癌干细胞的增殖和自我更新[10]。miR-34a 通过直接抑制 CD44 而达到抑制前列腺癌侵袭的作用[11]。Let-7 过表达可抑制乳腺癌干细胞的增殖、微球体的形成、减少未分化状态细胞的数量以及肿瘤的形成和侵袭[12]。miR-125b 通过使细胞周期阻滞在 G_1 期,抑制胶质瘤干细胞的增殖[13]。Hsieh 等[14]研究指出 miR-320 通过下调 Wnt/β-catenin 信号通路从而抑制前列腺癌祖细胞的干细胞特性。本研究发现在转染 miR-4686 抑制物后,A549 细胞球的增殖能力显著降低,说明 miR-4686 可调控 A549 细胞球的增殖。

目前认为 Wnt 信号通路在肿瘤细胞、肿瘤干/祖细胞的增殖中发挥着重要作用。研究表明 Wnt2/β-catenin促进 A549 细胞的增殖[15],当抑制 Wnt2 在 A549 细胞中的表达时,导致 A549 细胞增殖受到抑制,凋亡明显增加[16]。其他研究表明 Wnt5a 过表达可促进 A549 细胞的增殖[17]。本研究发现 Wnt5a 和 Wnt2 蛋白在 A549 细胞球中的表达较 A549 细胞中显著增高,当 A549 细胞球转染 miR-4686 抑制物后,Wnt5a、Wnt2 以及 β-catenin mRNA 和蛋白表达表达较对照组和 miR-4686 对照物组显著降低,A549 细胞球增殖能力也明显下降,提示 Wnt5a、Wnt2 以及 β-catenin 在 A549 细胞球增殖中发挥着重要作用,并且 miR-4686 通过调控 Wnt5a、Wnt2 以及 β-catenin 从而影响 A549 细胞球的增殖。但 miR-4686 如何调控 Wnt5a、Wnt2、β-catenin 尚不清楚。Law 等[18]研究指出 miR-145 作用于靶基因 IRS-1 和2,导致 β-catenin 表达降低并且抑制 Wnt 信号通路的激活。乳腺癌细胞中 miR-145 作用于其靶基因 mucin-1,促进 E-cadherin/β-catenin 复合物的形成,从而抑制 β-catenin 的表达[19]。提示 miR-4686 可能通过其靶基因实现对 Wnt 信号通路的调控。我们通过 miRNA 预测软件 DIANA-MICROT、targets can 以及 MIRDB 进行分析,推测 HOXC8 为 miR-4686 的靶基因。研究指出 HOXC8 在肿瘤的增

殖、侵袭中发挥着重要[20]。在肿瘤细胞 PDAC 中下调 HOXC8 基因可促进细胞的增殖和迁移[21]。其他研究表明 HOXC8 的过表达使 Wnt5a 表达下降[22]。HAIYAN 等[23]的研究指出 HOXC8 可直接抑制 mNkd2,从而抑制 Wnt/β-catenin 的激活。故推测 A549 细胞球转染 miR-4686 后,其靶基因 HOXC8 表达增加,抑制 Wnt 信号通路的激活,从而抑制了 A549 细胞球的增殖。进 145ke 增殖能力增强的结果相反。

本研究仅证实 miR-4686 具有调控 A549 细胞球短期增殖的能力,尚未对调控长期增殖的能力进行验证。虽然观察到 miR-4686 抑制物转染抑制 A549 细胞球后,Wnt5a、Wnt2 以及 β-catenin 蛋白的表达降低,但其具体机制尚不清楚。我们推测的 miR-4686 通过其靶基因 HOXC8 介导的 Wnt 通路调节细胞的增殖的假设仍需进一步研究。同时 Wnt5a 调控细胞增殖的分子机制尚不清楚,以及 Wnt5a 和 Wnt2 两者之间存在何种关系以及在 A549 细胞球增殖中发挥作用的机制仍需进一步研究。

综上所述, miR-4686 介导 Wnt 信号通路从而发挥调控 A549 细胞球增殖的作用,其可成为治疗肺癌的潜在靶点。

参考文献:

[1] Baek D, Villen J, Shin C, *et al*. The impact of microRNAs on protein output[J]. Nature, 2008, 455(7209): 64 – 71.

[2] Bartel D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. Cell, 2009, 136(2): 215 – 233.

[3] Chang T C, Mendell J T. microRNAs in vertebrate physiology and human disease[J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2007, 8: 215 – 239.

[4] Garzon R, Calin G A, Croce C M. MicroRNAs in Cancer [J]. Annu Rev Med, 2009, 60: 167 – 179.

[5] Yi R, Fuchs E. MicroRNAs and their roles in mammalian stem cells [J]. J Cell Sci, 2011, 124(Pt 11): 1775 – 1783.

[6] Teng Y, Wang X, Wang Y, *et al*. Wnt/beta-catenin signaling regulates cancer stem cells in lung cancer A549 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 392(3): 373 – 379.

[7] 孙芬芬, 贺斌峰, 余时沧, 等. A549 肺癌细胞球抗凋亡能力及耐药蛋白表达分析[J]. 肿瘤, 2011, 31(2): 111 – 116.

[8] Eramo A, Lotti F, Sette G, *et al*. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population[J]. Cell Death Differ, 2008, 15(3): 504 – 514.

[9] Heinrich E M, Dimmeler S. MicroRNAs and stem cells: control of pluripotency, reprogramming, and lineage commitment [J]. Circ Res, 2012, 110(7): 1014 – 1022.

[10] Berezikov E, Guryev V, van-de-Belt J, *et al*. Phylogenetic shadowing and computational indentification of human microRNA genes [J]. Cell, 2005, 120(1): 21 – 24.

[11] Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst J L, *et al*. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units[J]. Genome Res, 2004, 14(10A): 1902 – 1910.

[12] Yu F, Yao H, Zhu P, *et al*. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells [J]. Cell, 2007, 131(6): 1109 – 1123.

[13] Shi L, Zhang J, Pan T, *et al*. MiR-125b is critical for the suppression of human U251 glioma stem cell proliferation[J]. Brain Res, 2010, 1312: 120 – 126.

[14] Hsieh I S, Chang K C, Tsai Y T, *et al*. MicroRNA-320 suppresses the stem cell-like characteristics of prostate cancer cells by downregulating the Wnt/beta-catenin signaling pathway[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(3): 530 – 538.

[15] Gong Y D, Dong M S, Lee S B, *et al*. A novel 3-arylethynyl-substituted pyrido[2, 3, -b]pyrazine derivatives and pharmacophore model as Wnt2/β-catenin pathway inhibitors in non-small-cell lung cancer cell lines[J]. Bioorg Med Chem, 2011, 19(18): 5639 – 5647.

[16] You L, He B, Xu Z, *et al*. Inhibition of Wnt-2-mediated signaling induces programmed cell death in non – small – cell lung cancer cells [J]. Oncogene, 2004, 23(36): 6170 – 6174.

[17] Huang Y, Liu G, Zhang B, *et al*. Wnt-5a regulates proliferation in lung cancer cells [J]. Oncol Rep, 2010, 23(1): 177 – 181.

[18] Law P T, Ching A K, Chan A W, *et al*. MiR – 145 modulates multiple components of the insulin-like growth factor pathway in hepatocellular carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2012, 33(6): 1134 – 1141.

[19] Sachdeva M, Mo Y Y. MicroRNA-145 suppresses cell invasion and metastasis by directly targeting mucin 1[J]. Cancer Res, 2010, 70(1): 378 – 387.

[20] Snyder C M, Rice A L, Estrella N L, *et al*. MEF2A regulates the Gtl2-Dio3 microRNA mega – cluster to modulate WNT signaling in skeletal muscle regeneration [J]. Development, 2013, 140(1): 31 – 42.

[21] Adwan H, Zhivkova-Galunska M, Georges R, *et al*. Expression of HOXC8 is inversely related to the progression and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Br J Cancer, 2011, 105(2): 288 – 295.

[22] Kruger C, Kappen C. Expression of cartilage developmental genes in Hoxc8- and Hoxd4-transgenic mice[J]. PLoS One, 2010, 5(2): e8978.

[23] Lei H, Juan A H, Kim M S, *et al*. Mouse naked cuticle 2 (mNkd2) as a direct transcriptional target of Hoxc8 *in vivo*[J]. J Exp Zool A Ecol Genet Physiol, 2007, 307(1): 1 – 6.

(**收稿**:2013-10-21;**修回**:2013-10-27)

(编辑 王 红)