doi:10.11659/jjssx.08E020098

·基础研究·

miR-100-5p 通过靶向 FGFR3 抑制非小细胞肺癌细胞迁移、侵袭和糖酵解

李晓君[1],江 娟[2],冯红刚[3],冯 丽[3],江 明[3] (1.襄阳市第一人民医院/湖北医药学院附属医院健康体检科,湖北 襄阳 441002;2.襄阳市中心医院/湖北文理学院附属医院心胸外科,湖北 襄阳 441002;3.武汉科技大学附属医院肿瘤科,湖北 武汉 430064)

[摘 要] **目的** 探究 miR-100-5p 对非小细胞肺癌(NSCLC)细胞迁移、侵袭和糖酵解的影响及作用机制。**方法** 收集 NSCLC 患者手术切除的癌组织和癌旁组织 60 对,RT-qPCR 检测组织和细胞中 miR-100-5p 的表达,利用 Lipofectamine 2000 将 miR-NC、miR-100-5p mimic、miR-100-5p inhibitor、pc-NC、pc-FGFR3 质粒分别或联合转染入 H1650 细胞,划痕实验检测细胞迁移,Transwell实验检测细胞侵袭,相应试剂盒检测细胞葡萄糖摄取、乳酸生成和 ATP 含量,Seahorse XF 糖酵解应激测试试剂盒和 Seahorse XF 细胞线粒体应激测试试剂盒检测细胞外酸化率(ECAR)和细胞耗氧率(OCR),双荧光素酶实验检测靶向关系,蛋白印迹法检测 FGFR3 蛋白表达水平。**结果** miR-100-5p 表达与 NSCLC 患者的性别、年龄和病理类型无关($P>0.05$),而与吸烟史、肿瘤大小、TNM 分期、淋巴结转移和分化程度有关($P<0.05$)。miR-100-5p 在 NSCLC 组织和细胞中低表达。与对照组相比,miR-100-5p mimic 组划痕闭合率显著较低,侵袭细胞数目显著较少,葡萄糖摄取量、乳酸产生量、ATP 含量及 ECAR 显著较低,OCR 显著较高($P<0.01$),miR-100-5p inhibitor组划痕闭合率显著较高,侵袭细胞数目显著较多,葡萄糖摄取量、乳酸产生量、ATP 含量及 ECAR 显著较高,OCR 显著较低($P<0.01$)。miR-100-5p 靶向下调 FGFR3。共转染 pc-FGFR3 可逆转 miR-100-5p 过表达对 NSCLC 细胞迁移、侵袭和糖酵解的抑制作用($P<0.01$)。**结论** miR-100-5p 通过靶向 FGFR3 抑制 NSCLC 细胞迁移、侵袭和糖酵解。

[关键词] miR-100-5p;FGFR3 ;非小细胞肺癌;迁移;侵袭;糖酵解

[中图分类号] R734.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2020-08-28

miR-100-5p inhibiting non-small cell lung cancer cell migration, invasion and glycolysis by targeting FGFR3

LI Xiao-jun[1], JIANG Juan[2], FENG Hong-gang[3], FENG Li[3], JIANG Ming[3] (1. Department of Physical Examination, Xiangyang First People's Hospital/Affiliated Hospital of Hubei Medical College, Xiangyang Hubei 441002, China; 2. Department of Cardiothoracic Surgery, Xiangyang Central Hospital/Affiliated Hospital of Hubei University of Arts and Sciences, Xiangyang Hubei 441002, China; 3. Department of Oncology, Affiliated Hospital of Wuhan University of Science and Technology, Wuhan Hubei 430064, China)

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of miR-100-5p on migration, invasion and glycolysis of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. **Methods** A total of 60 pairs of cancer tissues and adjacent tissues surgically resected from NSCLC patients were collected, and the expression levels of miR-100-5p in tissues and cells were detected by RT-qPCR. miR-NC, miR-100-5p mimic, miR-100-5p inhibitor, pc-NC, and pc-FGFR3 plasmids were transfected into H1650 cells respectively or jointly by Lipofectamine 2000. Cell migration was detected by scratch assay; cell invasion was detected by Transwell assay; cell glucose uptake, lactate production, and ATP content were detected by the correspongding kit; extracellular acidification rate (ECAR) and cellular oxygen consumption rate (OCR) were detected by Seahorse XF glycolytic stress test kit and Seahorse XF cell mitochondrial stress test kit; targeting relationship was detected by dual-luciferase assay; and FGFR3 protein expression level was detected by Western blot. **Results** miR-100-5p expression was not associated with gender, age and pathological type of NSCLC patients ($P>0.05$), but it was associated with smoking history, tumor size, TNM stage, lymph node metastasis and differentiation degree ($P<0.05$). miR-100-5p was low expressed in NSCLC tissues and cells. Compared with the control group, the scratch closure rate was significantly decreased, the number of invasion cells was significantly reduced, the glucose uptake, lactate production, ATP content and the ECAR were significantly reduced, and the OCR was significantly increased in the miR-100-5p mimic group ($P<0.01$), and the scratch closure rate was significantly increased, the number of invasion cells was significantly increased, the glucose uptake, lactate production, ATP content and ECAR were significantly increased, and the OCR was significantly reduced in the miR-100-5p inhibitor group ($P<0.01$). miR-100-5p selectively downregulated FGFR3. Co-transfection of pc-FGFR3 could reverse the inhibitory effect of miR-100-5p overexpression on migration, invasion and glycolysis in NSCLC cells ($P<0.01$). **Conclusion** miR-100-5p inhibits migration, invasion and glycolysis of lung cancer cells by targeting FGFR3.

Keywords: miR-100-5p; FGFR3; non-small cell lung cancer; migration; invasion; glycolysis

[基金项目] 湖北省自然科学基金(2018CFB703)

肺癌是世界上常见的致命性恶性肿瘤之一。每年新发病例超过20万,死亡率非常高[1]。大多数肺癌是非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC),其特征是发展迅速、转移风险高以及对治疗的抵抗力强[2]。尽管临床在外科切除、化学疗法和放射疗法方面已经取得了持续的进展,但晚期NSCLC患者的5年生存率仅为5%~20%,这与高复发和高转移有关[3]。癌细胞的常见代谢特征是有氧糖酵解,即使在富氧条件下,癌细胞也倾向于通过糖酵解而不是氧化磷酸化来消耗更多的葡萄糖以产生乳酸,这种现象会很大程度上加速肿瘤生长[4]。因此,肿瘤糖酵解被认为是癌症治疗的潜在靶标。microRNA(miRNA)是内源的非编码RNA,大约有22个核苷酸。miRNA通过与mRNA的3'非翻译区(3'-UTR)结合来调节基因表达,从而抑制mRNA切割的翻译或诱导。miRNA参与细胞分化、细胞周期、细胞凋亡和炎症反应[5]。已有研究表明,miR-100-5p在多种癌症细胞中异常表达,在口腔鳞状细胞癌[6]、前列腺癌[7]等肿瘤中具有促进癌细胞增殖的作用,在胃癌[8]、脊索瘤[9]等肿瘤中具有抑制癌细胞增殖的作用。低miR-100可能是NSCLC患者的不良预后因素,其通过转录后调节PLK1的表达抑制NSCLC的生长[10],但是miR-100-5p对NSCLC细胞迁移、侵袭和糖酵解的影响尚不清楚,因此,本研究主要探究miR-100-5p对NSCLC细胞迁移、侵袭和糖酵解的影响及作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及仪器 miR-NC、miR-100-5p mimic、miR-100-5p inhibitor、pc-NC、pc-FGFR3质粒和实验所用各种引物由北京奥科生物科技有限公司设计并合成,Lipofectamine 2000转染试剂购自上海少辛生物科技有限公司(批号:11668-019),RPMI-1640培养基购自上海慧颖生物科技有限公司(批号:C11875500BT),胎牛血清购自北京百奥莱博科技有限公司(批号:QS071),青霉素和链霉素双抗溶液购自北京沃比森科技有限公司(批号:C0160-611),miRcute miRNA分离试剂盒和miRcute miRNA第一链cDNA合成试剂盒购自北京天根生物科技有限公司(批号:DP501、KR201),SYBR-Green PCR试剂盒购自嘉兴蓝诺盛生物科技有限公司(批号:RT0411-03),Transwell小室购自北京明阳科华生物科技有限公司(批号:254480),葡萄糖摄取比色测定试剂盒和乳酸测定试剂盒Ⅱ购自广州伟伯生物科技有限公司(批号:3091336、3104233),ATP比色测定试剂盒购自武汉艾美捷科技有限公司(批号:K354-100),BCA试剂盒购自西安浩特生物科技有限公司(批号:WB027),Seahorse XF糖酵解应激测试试剂盒和Seahorse XF细胞线粒体应激测试试剂盒购自美国Seahorse公司(批号:103325-100、103275-100),辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗、FGFR3兔来源的单克隆抗体购自上海艾博抗生物科技有限公司(批号:ab36151、ab180906),双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自北京威格斯生物技术有限公司(批号:T002),FluorChem HD2凝胶成像系统购自美国Proteinsimple公司,Seahorse XF-96分析仪购自美国Seahorse公司,ThermoFisherbrand数码生物显微镜购自上海睿安生物科技有限公司。

1.1.2 组织样品 收集襄阳市第一人民医院2016年1月至2018年12月经病理确诊的NSCLC患者手术切除的癌组织和癌旁组织60对,其中男47例,女13例,年龄3~78岁,中位年龄为57岁。患者手术前均未接受放疗、化疗及其他辅助治疗。本研究经我院医学伦理学委员会批准,所有研究对象均签署知情同意书。

1.1.3 细胞及培养 正常肺上皮细胞BEAS-2B和NSCLC细胞系(H1703、A549、H1299、L78、PGCL3、H1650)均购自上海素冉生物科技有限公司。在37℃、5% CO_2条件下,所有细胞于含10%胎牛血清、100 U/mL的青霉素和链霉素双抗溶液的RPMI-1640培养基中培养。

1.2 方法

1.2.1 RT-qPCR检测miR-100-5p的表达 采用miRcute miRNA分离试剂盒从研磨的NSCLC组织或培养的正常肺上皮细胞BEAS-2B和NSCLC细胞系(H1703、A549、H1299、L78、PGCL3、H1650)中提取总RNA,并通过miRcute miRNA第一链cDNA合成试剂盒将靶miRNA逆转录为cDNA。以cDNA为模板,通过SYBR Green PCR试剂盒进行RT-qPCR,并在CFX96系统测定miRNA的表达水平。miR-100-5p的循环条件为:96℃、10 s,55℃、10 s,72℃、90 s,35个循环,用U6标准化,使用$2^{-\Delta\Delta ct}$方法计算。miR-100-5p上游引物:5'-ATCATTAAACCCGTAGATCCGAA-3';下游引物:5'-AATGGTTGTTCTCCACACTCTCTC-3'。U6上游引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3';U6下游引物:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

1.2.2 细胞转染 取对数期NSCLC H1650细胞接种于12孔板(1×10^6/孔),达到85%融合时,根据Lipofectamine 2000说明书将miR-NC、miR-100-5p mimic、miR-100-5p inhibitor、pc-NC、pc-FGFR3质粒分别或联合转染入H1650细胞,分为:对照组、miR-NC组、miR-100-5p mimic组、miR-100-5p inhibitor组、

miR-100-5p mimic + pc-NC 组、miR-100-5p mimic + pc-FGFR3 组。

1.2.3 划痕实验检测细胞迁移 将按 1.2.2 项转染后的 NSCLC H1650 细胞接种于 12 孔板(1×10^6/孔),铺满单层后,用小号枪头垂直在孔中间划痕,然后用 PBS 清洗 2 次。在 CO_2 体积分数为 5%、37 ℃恒温的培养箱中培养 24 h 后,使用 Image J 评估细胞迁移能力。于划痕 0 h 和 24 h 拍摄图像,划痕闭合率 = (0 h 时的划痕面积 − 24 h 时的划痕面积)/0 h 的划痕面积 ×100%。

1.2.4 Transwell 实验检测细胞侵袭 在基底胶包埋的 Transwell 小室上室接种按 1.2.2 项下转染后的 NSCLC H1650 悬浮液和不含血清的培养基,并在 Transwell 小室下室加入含血清的培养基,培养 24 h 后,取出 Transwell 小室,侵袭细胞用 4% 多聚甲醛固定,0.5% 结晶紫染色 30 min,并在显微镜下观察分析。

1.2.5 细胞葡萄糖摄取、乳酸生成和 ATP 含量检测 分别按照葡萄糖摄取比色测定试剂盒、乳酸测定试剂盒Ⅱ和 ATP 比色测定试剂盒说明书检测细胞葡萄糖摄取、乳酸生成和 ATP 含量。对于葡萄糖摄取比色法,将细胞以每孔 1 500 个的密度接种于 96 孔板中。通过用含 2% BSA 的 100 mL KRPH 缓冲液预孵育 40 min,使细胞处于葡萄糖饥饿状态,随后加入 10 mL 10 mmol/L 2-DG 孵育细胞 20 min。对于乳酸和 ATP 测定,收集 1×10^6 细胞于 100 mL 相应试剂盒提供的检测缓冲液中匀浆,离心样品,测定可溶性组分含量。

1.2.6 细胞外酸化率(extracellular acidification rate,ECAR)和细胞耗氧率(cellular oxygen consumption rate,OCR)检测 根据试剂盒说明书,使用 Seahorse XF 96 细胞外通量分析仪确定细胞 ECAR 和 OCR。以 1×10^4/L 将细胞接种到 Seahorse XF 96 细胞培养微孔板中。在进行基线测量后,对于 ECAR,在指定的时间点依次将葡萄糖、氧化磷酸化抑制剂寡霉素和糖酵解抑制剂 2-DG 分别注入每个孔中;对于 OCR,依次注射寡霉素、可逆性氧化磷酸化抑制剂对三氟甲氧羰基氰化物苯腙(p-trifluoromethoxycarbonyl cyanide phenylhydrazone,FCCP)和线粒体复合物Ⅰ抑制剂鱼藤酮加线粒体复合物Ⅲ抑制剂抗霉素 A(Rote/AA)。数据通过 Seahorse XF-96 Wave 软件进行评估。OCR 以 pmols/min 显示,ECAR 以 mpH/min 显示。

1.2.7 双荧光素酶实验检测靶向关系 收集生长至对数期的 H1650 细胞,接种于 24 孔板中,培养24 h。然后将 1 mg PGL3- FGFR3-WT(FGFR3 野生型)或 PGL3-FGFR3-MUT(FGFR3 突变型)以及 miR-NC 或 miR-100-5p mimic 和 PRL-CMV 质粒共转染入 H1650 细胞,分为 miR-NC 组、miR-100-5p mimic 组、pc-NC 组、pc-FGFR3 组。转染 48 h 后,裂解 H1650 细胞 15 min,采用双荧光素酶检测系统测量荧光素酶的相对活性。

1.2.8 蛋白印迹法检测 FGFR3 蛋白表达水平 收集按 1.2.2 项转染后的 NSCLC H1650 细胞,用 RIPA 裂解液提取总蛋白,然后用 BCA 试剂盒定量蛋白的浓度。将蛋白样品用 SDS-PAGE 分离后,再用半干转膜仪转移到聚偏二氟乙烯膜,室温下于脱脂牛奶中封闭蛋白 2 h。随后加入对应的兔来源的单克隆一抗(FGFR3 1∶800、GAPDH 1∶1 000),4 ℃封闭过夜。然后,加入对应辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔单克隆二抗(1∶2 000)室温封闭 1 h,最后滴电化学反应液曝光。以 GAPDH 为内参,使用软件 Image-Pro plus 6.0 分析蛋白条带灰度,蛋白相对表达量 = 目标蛋白吸光度值/内参蛋白 GAPDH 吸光度值。

1.3 统计学方法

数据采用 SPSS 19.0 进行统计学分析,计量数据经 *shapiro-wilk* 检验符合呈正态分布,以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组比较进行单因素方差分析,两两比较使用 *SNK* 检验;计数资料以率(%)表示,采用 χ^2 检验。校验标准 $\alpha=0.05$(双侧),$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC miR-100-5p 表达与临床病理特征的关系

在 NSCLC 中,miR-100-5p 表达与性别、年龄和病理类型无关($P>0.05$),而与吸烟史、肿瘤大小、TNM 分期、淋巴结转移和分化程度有关($P<0.05$),见表 1。

表 1 NSCLC 患者的 miR-100-5p 表达水平与临床病理特征的关系[例(%)]

病理特征		miR-100-5p 低表达	miR-100-5p 高表达	χ^2	P
性别	男	38(80.5)	9(19.5)	0.186	0.667
	女	11(84.6)	2(15.4)		
年龄	<60 岁	17(85.0)	3(15.0)	0.013	0.975
	≥60 岁	32(80.0)	8(20.0)		
吸烟史	无	9(81.8)	2(18.2)	4.125	0.036
	有	40(81.6)	9(18.4)		
肿瘤大小	<3 cm	21(77.8)	6(22.2)	5.724	0.015
	≥3 cm	28(84.8)	5(15.2)		
TNM 分期	Ⅰ~Ⅱ	31(79.5)	8(20.5)	8.643	0.004
	Ⅲ	18(85.7)	3(14.3)		
淋巴结转移	无	28(80.0)	7(20.0)	10.266	0.001
	有	21(84.0)	4(16.0)		
分化程度	高、中	19(82.6)	4(17.4)	6.228	0.012
	低	30(81.1)	7(18.9)		
病理类型	鳞状癌	21(80.8)	5(19.2)	0.196	0.905
	腺癌	22(84.6)	4(15.4)		
	其他	6(75.0)	2(25.0)		

2.2 miR-100-5p mRNA 在 NSCLC 组织和细胞中低表达

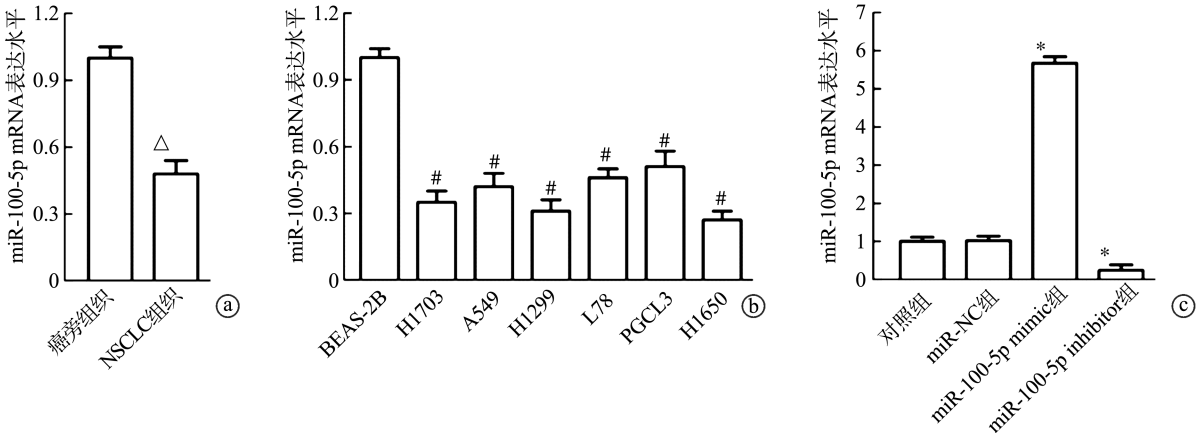
与癌旁组织相比，NSCLC 组织中 miR-100-5p mRNA表达显著下调($P<0.01$)，见图 1a；与正常肺上皮细胞 BEAS-2B 相比，NSCLC 细胞系 H1703、A549、H1299、L78、PGCL3、H1650 中 miR-100-5p mRNA 表达显著下调($P<0.01$)，见图 1b，选取 H1650 细胞做后续实验。与对照组相比，miR-NC 组 H1650 细胞中 miR-100-5p mRNA 表达无明显变化，miR-100-5p mimic 组 H1650 细胞中 miR-100-5p mRNA 表达显著上调($P<0.01$)，miR-100-5p inhibitor 组 H1650 细胞中 miR-100-5p mRNA 表达显著下调($P<0.01$)，表明转染成功，见图 1c。

2.3 miR-100-5p 抑制 NSCLC 细胞迁移和侵袭

与对照组相比，miR-NC 组划痕闭合率和侵袭细胞数目无明显变化($P>0.05$)，miR-100-5p mimic 组划痕闭合率显著较低($P<0.01$)，侵袭细胞数目显著较少($P<0.01$)，miR-100-5p inhibitor 组划痕闭合率显著较高($P<0.01$)，侵袭细胞数目显著较多($P<0.01$)，见图 2。

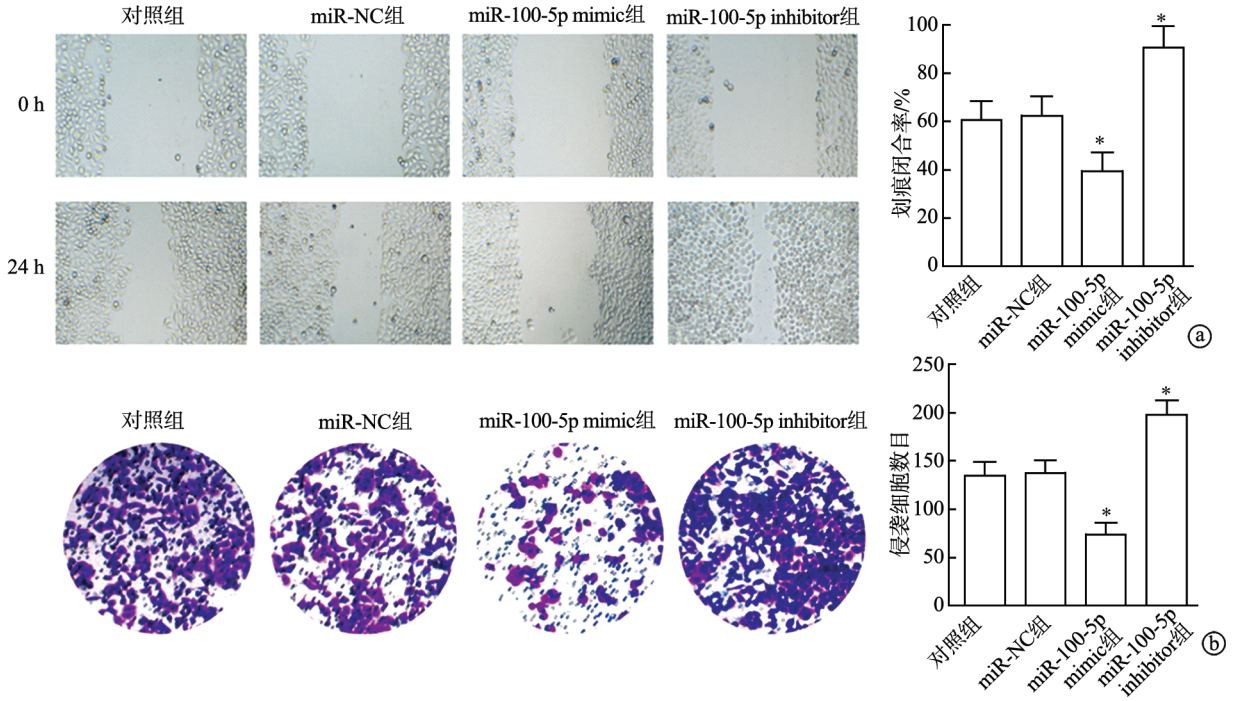
2.4 miR-100-5p 抑制 NSCLC 细胞糖酵解

与对照组相比，miR-NC 组 H1650 细胞中葡萄糖摄取量、乳酸产生量、ATP 含量、ECAR、OCR 均无明显变化($P>0.05$)，miR-100-5p mimic 组 H1650 细胞中葡萄糖



a：RT-qPCR 检测 NSCLC 组织中 miR-100-5p mRNA 的表达；b：RT-qPCR 检测 NSCLC 细胞中 miR-100-5p mRNA 的表达；c：RT-qPCR 检测转染后 NSCLC 中 miR-100-5p mRNA 的表达 △：与癌旁组织相比，$P<0.01$；#：与 BEAS-2B 相比，$P<0.01$；*：与对照组相比，$P<0.01$

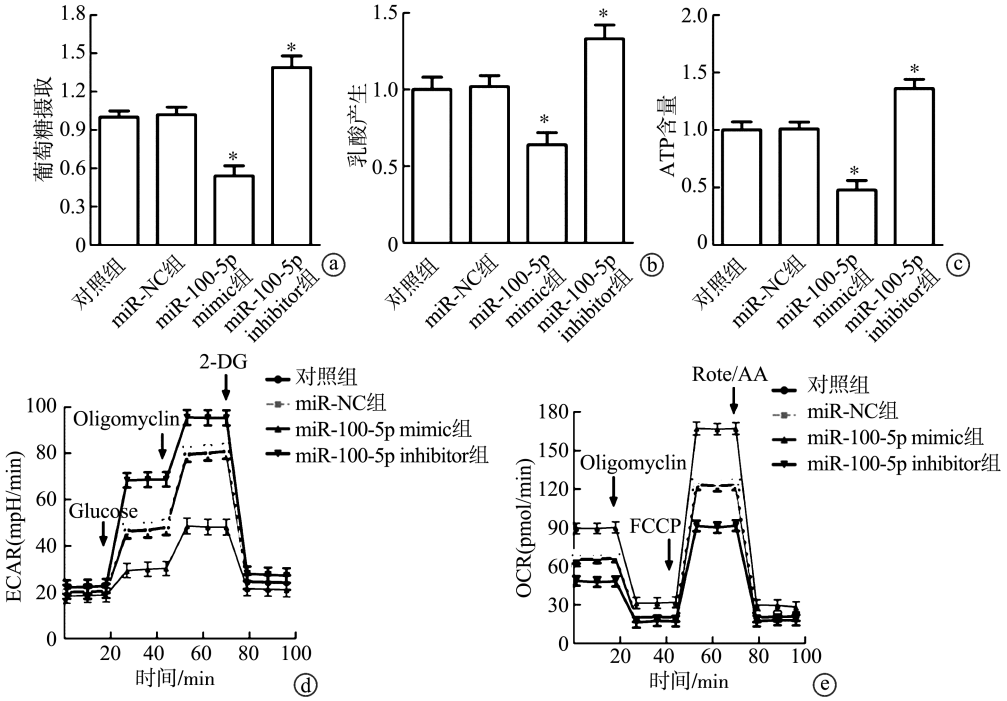
图 1 miR-100-5p 在 NSCLC 组织和细胞中的表达水平



a：划痕实验检测细胞迁移(×100)；b：Transwell 实验检测细胞侵袭(结晶紫×200)；*：与对照组比较，$P<0.01$

图 2 miR-100-5p 对 NSCLC 细胞迁移和侵袭的影响

摄取量、乳酸产生量、ATP 含量及 ECAR 显著较低($P<0.01$),OCR 显著较高($P<0.01$),miR-100-5p inhibitor组 H1650 细胞中葡萄糖摄取量、乳酸产生量、ATP 含量及 ECAR 显著较高($P<0.01$),OCR 显著较低($P<0.01$),见图3。



a:葡萄糖摄取比色测定试剂盒检测葡萄糖摄取;b:乳酸测定试剂盒Ⅱ检测乳酸生成;c:ATP 比色测定试剂盒检测 ATP 含量;d:Seahorse XF 糖酵解应激测试试剂盒检测 ECAR;e:Seahorse XF 细胞线粒体应激测试试剂盒检测 OCR ＊:与对照组相比,$P<0.01$

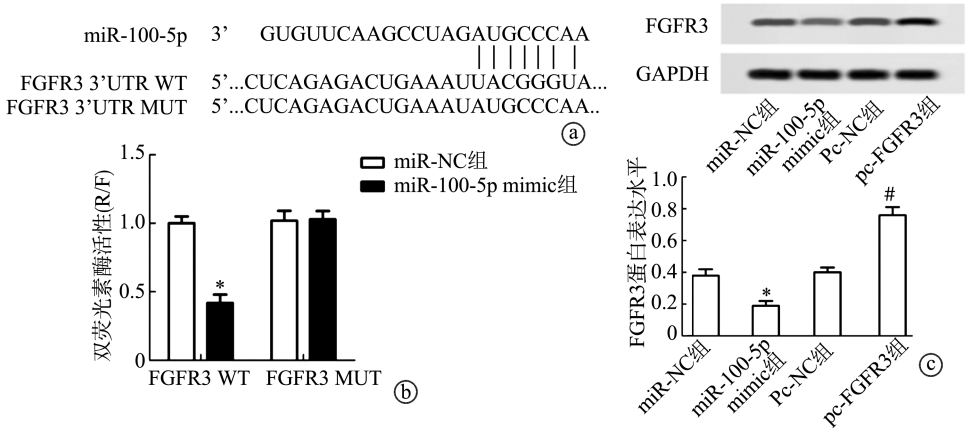
图3 miR-100-5p 对 NSCLC 细胞糖酵解的影响

2.5 miR-100-5p 靶向下调 FGFR3

通过 Targetscan 软件预测发现,miR-100-5p 与 FGFR3具有靶向关系,在 3' UTR 区存在结合位点(图4a);通过双荧光素酶发现,miR-100-5p 与 FGFR3-WT 共转染显著降低了荧光素酶活性($P<0.01$),见图4b。与 miR-NC 组相比,miR-100-5p mimic 组 FGFR3 蛋白表达水平显著下调($P<0.01$),说明 miR-100-5p 靶向下调 FGFR3;与 pc-NC 组相比,pc-FGFR3 组 FGFR3 蛋白表达显著上调($P<0.01$),表明转染成功,见图4c。

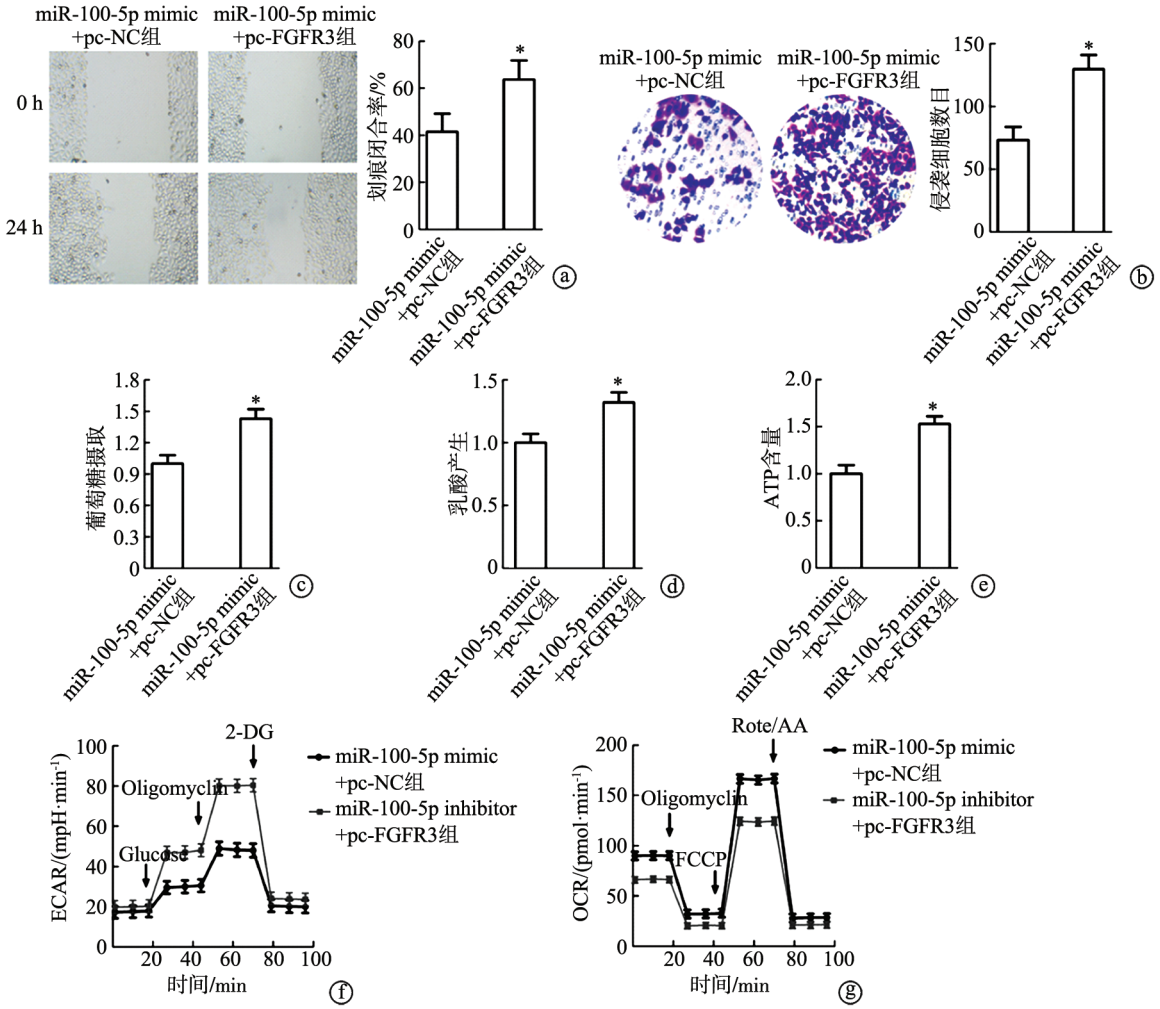
2.6 miR-100-5p 通过靶向 FGFR3 对 NSCLC 细胞迁移、侵袭和糖酵解起抑制作用

与 miR-100-5p mimic + pc-NC 组比较,miR-100-5p mimic + pc-FGFR3 组 H1650 细胞划痕闭合率较高,侵袭细胞数目较多,葡萄糖摄取量、乳酸产生量、ATP 含量及 ECAR 显著较高,OCR 显著较低,差异均具有统计学意义($P<0.01$),见图5。



a:Targetscan 软件预测 miR-100-5p 与 FGFR3 结合靶点;b:双荧光素酶实验验证 miR-100-5p 与 FGFR3 靶向关系;c:蛋白印迹法检测 FGFR3 蛋白表达水平 ＊:与 miR-NC 组相比,$P<0.01$;#:与 pc-NC 组相比,$P<0.01$

图4 miR-100-5p 与 FGFR3 的靶向关系



a:划痕实验检测细胞迁移(×100);b:Transwell 实验检测细胞侵袭(结晶紫×200);c:葡萄糖摄取比色测定试剂盒检测葡萄糖摄取;d:乳酸测定试剂盒Ⅱ检测乳酸生成;e:ATP 比色测定试剂盒检测 ATP 含量;f:Seahorse XF 糖酵解应激测试试剂盒检测 ECAR;g:Seahorse XF细胞线粒体应激测试试剂盒检测 OCR ＊:与 miR-100-5p mimic + pc-NC 组比较,$P<0.01$

图 5 miR-100-5p 通过靶向 FGFR3 对 NSCLC 细胞迁移、侵袭和糖酵解起抑制作用

3 讨论

NSCLC 病情发展迅速、转移风险高、病死率高,是恶性程度较高的肿瘤之一。现有治疗手段无法控制 NSCLC 导致的低生存率和高病死率,因此医学研究者将目光转向了生物治疗[10]。本研究主要探究 miR-100-5p 对 NSCLC 细胞迁移、侵袭和糖酵解的影响及作用机制。

miRNA 的失调是癌症的发病机制之一,某些 miRNA 在人类癌症的诊断和治疗中具有重要作用。本研究结果表明,miR-100-5p 表达与 NSCLC 患者的性别、年龄和病理类型无关,而与吸烟史、肿瘤大小、TNM 分期、淋巴结转移和分化成程度有关,miR-100-5p 在 NSCLC 组织和细胞中低表达,说明 miR-100-5p 与 NSCLC 的发展密切相关,这与已有研究结果 NSCLC 组织中 miR-100 相对低表达与患者的不良预后相关一致[11]。NSCLC 的高复发率和高病死率与该细胞具有较强转移能力密切相关,而肿瘤细胞的侵袭能力和迁移能力反映了癌症的转移能力。因此,寻找能够抑制 NSCLC 侵袭和迁移的新型分子或治疗靶标具有重要意义。本研究表明,miR-100-5p 过表达抑制 NSCLC 细胞迁移和侵袭,miR-100-5p 低表达促进 NSCLC 细胞迁移和侵袭,这与 miR-100 通过靶向 IGF1R 抑制鼻咽癌的迁移和侵袭[12]、miR-100 通过靶向 FZD-8 抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭[13]等结果相符。

癌细胞经常表现出高速率的有氧糖酵解,即 Warburg 效应。癌细胞葡萄糖代谢的发生率高于正常细胞[14]。从氧化磷酸化到有氧糖酵解的代谢重编程是癌症进展中的常见事件[15]。尽管就每个葡萄糖的 ATP 数量而言,糖酵解不如氧化磷酸化提供的能量有效,但其为合成代谢提供了多种糖酵解中间体,满足了快速增长的癌细胞对构件的需求[16]。此外,糖酵解的

增加会导致肿瘤微环境中葡萄糖的缺乏和乳酸的积累,从而抑制淋巴细胞浸润并降低抗免疫疗法效果[17]。靶向代谢途径已被证明是控制肿瘤生长和增强抗癌疗效的有效途径[18]。已有研究表明,HIF1A 通过 miR-100-5p 激活 lncRNA RAET1K 的转录调控低氧诱导的肝癌细胞糖酵解[19]。同样,本研究也显示,miR-100-5p 过表达抑制 NSCLC 细胞糖酵解,miR-100-5p 低表达促进 NSCLC 细胞糖酵解。

miRNA 通过与靶基因的 3'U 端结合,诱导基因或蛋白降解,在转录后抑制基因表达。已有研究表明,过表达 miR-100 通过 FGFR3 抑制骨肉瘤的生长[20],miR-100 在人类胶质母细胞瘤中通过 FGFR3 抑制细胞增殖、迁移和化学敏感性[21]。同理,本研究结果表明,miR-100-5p 可靶向下调 FGFR3。FGFR 由 1 个细胞配体结构域组成,该结构域由 3 个免疫球蛋白样结构域,1 个跨膜螺旋结构域和 1 个具有酪氨酸激酶活性的细胞内结构域组成[22]。FGFR3 在多种肿瘤细胞的增殖、侵袭、迁移和转移中起着至关重要的作用,具有成为肿瘤治疗靶标的潜力。siRNA 沉默 FGFR3 可抑制 NSCLC A549 细胞的侵袭[23]。FGFR3 对内皮糖酵解的调节是成年血管生长和发育的关键过程[24]。同样,本研究表明,miR-100-5p 过表达靶向下调 FGFR3 表达抑制 NSCLC 细胞迁移、侵袭和糖酵解。

综上所述,miR-100-5p 过表达靶向下调 FGFR3 表达抑制 NSCLC 细胞迁移、侵袭和糖酵解,这说明 miR-100-5p 和 FGFR3 可能为 NSCLC 的潜在治疗靶点。本研究仅是 miR-100-5p 对 NSCLC 细胞迁移、侵袭和糖酵解作用机制的初步探讨,更为深入的分子通路机制有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Kayawake H, Okumura N, Yamanashi K, et al. Non-small cell lung cancer with pathological complete response: predictive factors and surgical outcomes[J]. Gen Thorac Cardiovasc Surg, 2019, 67(9): 773 - 781. doi: 10.1007/s11748 - 019 - 01076 - 9.

[2] Bodor J, Boumber Y, Borghaei H. Biomarkers for immune checkpoint inhibition in non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. Cancer, 2020, 126(2): 260 - 270. doi: 10.1002/cncr.32468.

[3] Lee S, Yoo J, Ju S, et al. Quantitative severity of pulmonary emphysema as a prognostic factor for recurrence in patients with surgically resected non-small cell lung cancer[J]. Thorac Cancer, 2019, 10(3): 421 - 427. doi: 10.1111/1759 - 7714.12920.

[4] Li Y, Xu Q, Yang W, et al. Oleanolic acid reduces aerobic glycolysis-associated proliferation by inhibiting yes-associated protein in gastric cancer cells[J]. Gene, 2019, 712(14): 39 - 56. doi: 10.1016/j.gene.2019.143956.

[5] Hashemi A, Gorji-Bahri G. MicroRNA: promising roles in cancer therapy[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2020, 21: 1186 - 1203. doi: 10.2174/1389201021666200420101613.

[6] Jakob M, Mattes L, Küffer S, et al. Microrna expression patterns in oral squamous cell carcinoma: hsa-mir-99b-3p and hsa-mir-100-5p as novel prognostic markers for oral cancer[J]. Head Neck, 2019, 41(10): 3499 - 3515. doi: 10.1002/hed.25866.

[7] Nabavi N, Saidy NRN, Venalainen E, et al. MiR-100-5p inhibition induces apoptosis in dormant prostate cancer cells and prevents the emergence of castration-resistant prostate cancer[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 4079. doi: 10.1038/s41598 - 017 - 03731 - 8.

[8] Chen Z, Liu X, Hu Z, et al. Identification and characterization of tumor suppressor and oncogenic mirnas in gastric cancer[J]. Oncol Lett, 2015, 10(1): 329 - 336. doi: 10.3892/ol.2015.3179.

[9] Zhang H, Yang K, Ren T, et al. Mir-100-5p inhibits malignant behavior of chordoma cells by targeting IGF_1R[J]. Cancer Manag Res, 2020, 12(2): 4129 - 4137. doi: 10.2147/CMAR.S252185.

[10] Liu J, Lu KH, Liu ZL, et al. Microrna-100 is a potential molecular marker of non-small cell lung cancer and functions as a tumor suppressor by targeting polo-like kinase 1[J]. BMC Cancer, 2012, 12(1): 519. doi: 10.1186/1471 - 2407 - 12 - 519.

[11] 杨丰名,管 丹,章海燕. 非小细胞肺癌低表达 miR-100 与不良预后相关的临床研究[J]. 中国肿瘤外科杂志, 2016, 11(5): 301 - 304. doi: 10.3969/j.issn.1674 - 4136.2016.05.006.

[12] Sun X, Liu X, Wang Y, et al. Mir-100 inhibits the migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma by targeting IGF_1R[J]. Oncol Lett, 2018, 15(6): 8333 - 8338. doi: 10.3892/ol.2018.8420.

[13] Jiang Q, He M, Guan S, et al. Microrna-100 suppresses the migration and invasion of breast cancer cells by targeting FZD-8 and inhibiting wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Tumour Biol, 2016, 37(4): 5001 - 5011. doi: 10.1007/s13277 - 015 - 4342 - x.

[14] Orang A, Petersen J, McKinnon R, et al. Micromanaging aerobic respiration and glycolysis in cancer cells[J]. Mol Metab, 2019, 23(5): 98 - 126. doi: 10.1016/j.molmet.2019.01.014.

[15] Cui H, Gao Q, Zhang L, et al. Knockdown of FOXK1 suppresses liver cancer cell viability by inhibiting glycolysis[J]. Life Sci, 2018, 213(15): 66 - 73. doi: 10.1016/j.lfs.2018.10.018.

[16] Ganapathy-Kanniappan S. Molecular intricacies of aerobic glycolysis in cancer: current insights into the classic metabolic phenotype[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2018, 53(6): 667 - 682. doi: 10.1080/10409238.2018.1556578.

[17] Yu M, Chen S, Hong W, et al. Prognostic role of glycolysis for cancer outcome: evidence from 86 studies[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2019, 145(4): 967 - 999. doi: 10.1007/s00432 - 019 - 02847 - w.

[18] Xia M, Feng S, Chen Z, et al. Non-coding rnas: key regulators of aerobic glycolysis in breast cancer[J]. Life Sci, 2020, 250(11): 75 - 79. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117579.

[19] Zhou Y, Huang Y, Hu K, et al. HIF_1A activates the transcription of lncRNA $RAET_1K$ to modulate hypoxia-induced glycolysis in hepatocellular carcinoma cells via miR-100-5p[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(3): 176. doi: 10.1038/s41419 - 020 - 2366 - 7.

[20] Bi Y, Jing Y, Cao Y. Overexpression of miR-100 inhibits growth of osteosarcoma through $FGFR_3$[J]. Tumour Biol, 2015, 36(11): 8405 - 8411. doi: 10.1007/s13277 - 015 - 3581 - 1.

doi:10.11659/jjssx.12E020056

·基础研究·

踝关节周围皮神经应用解剖学研究及意义

王洪宾[1],李凤娟[2],刘 帅[1],张海东[1],张春菊[1],孙丰刚[1],顿爱社[3] (1.山东第一医科大学/山东省医学科学院基础医学院,山东 济南 250000;2.山东力明科技职业学院公共教学部,山东 泰安 271000;3.山东第一医科大学/山东省医学科学院口腔医学院,山东 泰安 271016)

[摘 要] **目的** 研究隐神经、腓浅神经、腓肠神经在踝关节周围的走行位置、毗邻关系,为临床踝关节周围皮神经阻滞麻醉提供解剖学依据。**方法** 采用局部解剖学实验教学用尸体标本15例,观察隐神经、腓浅神经、腓肠神经在踝关节周围的位置及毗邻关系,测量神经压扁径,在内外踝尖连线上测量神经至内外踝尖或跟腱边缘的距离。**结果** 隐神经在内外踝最高点的连线上,位于大隐静脉外侧,压扁径(0.342±0.14)cm,距内踝尖(1.857±0.17)cm,距外踝尖(6.838±0.32)cm;腓浅神经在内外踝最高点的连线上,压扁径(0.264±0.13)cm,距内踝尖(5.334±0.33)cm,距外踝尖(4.424±0.46)cm;腓肠神经在踝关节周围,位于外踝沟处、小隐静脉外侧,压扁径(0.250±0.12)cm,距跟腱边缘(2.745±0.21)cm,距外踝尖(2.660±0.16)cm。**结论** 依据隐神经、腓浅神经、腓肠神经在踝关节周围至内外踝尖或跟腱边缘的距离、压扁径、毗邻结构关系,可提高皮神经阻滞麻醉的精准度,减少对其他组织的损伤,具有一定的临床参考意义。

[关键词] 踝关节;隐神经;腓浅神经;腓肠神经;应用解剖

[中图分类号] R324 [文献标识码] A [收稿日期] 2020-12-12

Anatomy study on cutaneous nerves surrounding the ankle joint and its significance

WANG Hong-bin[1], LI Feng-juan[2], LIU Shuai[1], ZHANG Hai-dong[1], ZHANG Chun-ju[1], SUN Feng-gang[1], DUN Ai-she[3] (1. School of Basic Medical Science, Shandong First Medical University/Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan Shandong 250000, China; 2. Department of Public Teaching, Shandong Liming Vocational College of Science and Technology, Taian Shandong 271000, China; 3. College of Stomatology, Shandong First Medical University/Shandong Academy of Medical Sciences, Taian Shandong 271016, China)

Abstract: Objective To study the position and adjacent relationship of saphenous nerve, superficial peroneal nerve and sural nerve around the ankle joint, so as to provide anatomical basis for clinical cutaneous nerve block anesthesia around the ankle joint. **Methods** Totally 15 cadaver specimens for the experimental teaching of regional anatomy were used to observe the position and adjacent relationship of saphenous nerve, superficial peroneal nerve and sural nerve around the ankle joint. The flattening diameter of the nerve was measured and the distance from the nerve to the medial and lateral malleolus cusps or to the edge of the Achilles tendon on the connecting line of the medial and lateral malleolus cusps were measured. **Results** The saphenous nerve was located lateral to the great saphenous vein on the connecting line of the highest point of the medial and lateral malleolus, with the flattening diameter of (0.342±0.14) cm, and the distance to the medial malleolus cusp was (1.857±0.17) cm, and the distance to the lateral malleolus cusp was (6.838±0.32) cm; the superficial peroneal nerve was located on the connecting line of the highest point of the medial and lateral malleolus, with the flattening diameter of (0.264±0.13) cm, and the distance to the medial malleolus cusp was (5.334±0.33) cm, and the distance to the lateral malleolus cusp was (4.244±0.46) cm; the sural nerve was around the ankle joint, located in the lateral malleolar sulcus lateral to the small saphenous vein, with the flattening diameter of (0.250±0.12) cm, and the distance to the Achilles tendon was (2.745±0.21) cm, and the distance to the lateral malleolus cusp was

[基金项目] 山东省医药卫生科技发展计划项目(2018WS135,2018WS138);山东省自然科学基金(ZR2017LH052);泰安市科技发展计划项目(2018NS0119,2018NS0200)

[通信作者] 顿爱社,E-mail:das1977@163.com

[21] Luan Y, Zhang S, Zuo L, et al. Overexpression of miR-100 inhibits cell proliferation, migration, and chemosensitivity in human glioblastoma through $FGFR_3$[J]. Onco Targets Ther, 2015, 8(2): 3391-3400. doi:10.2147/OTT.S85677.

[22] Blick C, Ramachandran A, Wigfield S, et al. Hypoxia regulates $FGFR_3$ expression via HIF-1α and miR-100 and contributes to cell survival in non-muscle invasive bladder cancer[J]. Br J Cancer, 2013, 109(1): 50-59. doi:10.1038/bjc.2013.240.

[23] Li Y, Liu X, Zhang H, et al. $FGFR_3$ silencing by siRNA inhibits invasion of A549 cells[J]. Oncol Lett, 2016, 12(6): 4319-4326. doi:10.3892/ol.2016.5278.

[24] Yu P, Wilhelm K, Dubrac A, et al. FGF-dependent metabolic control of vascular development[J]. Nature, 2017, 545(7653): 224-228. doi:10.1038/nature22322.

(编辑:刘 艺)