doi:10.11659/jjssx.05E022072

·基础研究·

miR-146b-3p通过靶向结合LCN1抑制肺鳞癌生物学行为

丁晓霞,刘亚群,于小纬,杨 楠,张悦琪 (河北北方学院附属第一医院呼吸与危重症监护室,河北 张家口 075000)

[摘 要] **目的** 探讨miR-146b-3p通过靶向结合脂质运载蛋白1(LCN1)抑制肺鳞癌生物学行为的效果。**方法** 构建稳定过表达miR-146b-3p和稳定敲低LCN1的NCI-H2170和NCI-H226细胞系,CCK-8法和克隆实验检测细胞增殖能力,流式细胞仪检测细胞周期和凋亡情况。生物信息学分析miR-146b-3p和LCN1与肺鳞癌临床病理特征的关系,并预测两者之间的靶向关系。双荧光素酶报告实验验证miR-146b-3p和LCN1的靶向关系。RT-PCR检测miR-146b-3p在肺鳞癌细胞中的表达。裸鼠成瘤实验检测肿瘤体质量、体积和肺鳞癌组织中miR-146b-3p的表达 。Western blot检测细胞蛋白表达。**结果** miR-146b-3p在肺鳞癌组织中低表达,肺鳞癌细胞miR-146b-3p过表达后,细胞增殖能力降低,克隆数减少,细胞周期受到阻滞,细胞凋亡率增加,裸鼠移植瘤生长受到抑制,BCL2、CCNB1和CDK2蛋白减少,BAX蛋白增加,差异均有统计学意义($P<0.05$)。LCN1在肺鳞癌组织中高表达,敲低LCN1表达可抑制肺鳞癌细胞增殖,影响细胞周期,促进细胞凋亡,差异均有统计学意义($P<0.05$)。生物信息学分析显示,LCN1是miR-146b-3p的靶基因;双荧光素酶报告实验显示miR-146b-3p mimic与LCN1-WT共转染使荧光素酶活性降低($P<0.05$)。肺鳞癌细胞共转染miR-146b-3p和LCN1后,可以逆转miR-146b-3p抑制细胞增殖和克隆、促凋亡的作用。**结论** miR-146b-3p可能是通过下调LCN1表达抑制肺鳞癌细胞增殖,影响细胞周期,促进细胞凋亡。

[关键词] miR-146b-3p;肺鳞癌;增殖;脂质运载蛋白1
[中图分类号] R734.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-05-16

miR-146b-3p inhibiting the biological behavior of lung squamous cell carcinoma through targeted binding to LCN1

DING Xiao-xia, LIU Ya-qun, YU Xiao-wei, YANG Nan, ZHANG Yue-qi (Department of Respiratory and Critical Care Unit, First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou Hebei 075000, China)

Abstract: Objective To explore the effect of miR-146b-3p in inhibiting the biological behavior of lung squamous cell carcinoma by targeted binding to lipocalin-1 (LCN1). **Methods** NCI-H2170 and NCI-H226 cell lines with stable overexpression of miR-146b-3p and stable knockdown of LCN1 were constructed. The cell proliferation was detected by CCK-8 assay and clone formation assay. The cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry. Bioinformatics analysis was used to analyze the relationships of miR-146b-3p and LCN1 with clinicopathological features of lung squamous cell carcinoma, and predict the targeted relationship of miR-146b-3p and LCN1. The targeted relationship between miR-146b-3p and LCN1 was verified by dual-luciferase reporter assay. The expression of miR-146b-3p in lung squamous cell carcinoma cells was detected by RT-PCR. The mass and volume of tumors and expression of miR-146b-3p in lung squamous cell carcinoma tissues were detected by the tumor formation assay in nude mice. The expression of different proteins were detected by Western blot. **Results** The expression of miR-146b-3p was down-regulated in lung squamous cell carcinoma tissues. After overexpression of miR-146b-3p in lung squamous cell carcinoma cells, the cell proliferation ability decreased, the number of clones reduced, the cell cycle was blocked, the apoptosis rate increased, the growths of transplanted tumor in nude mice was inhibited, the protein expression of BCL2, CCNB1 and CDK2 decreased, and the protein expression of BAX increased, with statistically significant differences ($P<0.05$). The expression of LCN1 was up-regulated in lung squamous cell carcinoma tissues, knockdown LCN1 could inhibit the proliferation of lung squamous cell carcinoma cells, affect cells cycle and promote cell apoptosis, with statistically significant differences ($P<0.05$). Bioinformatics analysis showed that LCN1 was the targeted gene of miR-146b-3p. Dual-luciferase reporter assay showed that the luciferase activity was decreased after the co-transfection of miR-146b-3p mimic and LCN1-WT ($P<0.05$). After co-transfection of miR-146b-3p and LCN1, lung squamous cell carcinoma cells could reverse the effect of miR-146b-3p in inhibiting cell proliferation, cloning, and pro-apoptosis. **Conclusion** miR-146b-3p can inhibit the proliferation of lung squamous cell carcinoma cells, affect cells cycle and promote apoptosis by down-regulating the expression of LCN1.

Keywords: miR-146b-3p; lung squamous cell carcinoma; proliferation; lipocalin-1

[基金项目] 张家口市重点研发计划项目(2121062D)
[通信作者] 丁晓霞,E-mail:dingxiaoxia1992@163.com

肺癌是导致癌症患者死亡的重要原因，肺鳞癌是常见的肺癌亚型之一，其化疗和放疗敏感性较低[1-2]。由于肺鳞癌容易发生转移，并且目前缺乏有效的诊断性生物标志物，确诊时患者往往已处于中晚期，导致患者预后较差[3-4]。因此，积极寻找用于肺鳞癌诊断和预后预测的生物标志物至关重要。微小RNA（microRNA，miRNA）是一类不具有编码能力的小分子RNA，在基因转录中发挥重要作用，参与细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡等生物行为学过程[5-6]。脂质运载蛋白1（lipocalin-1，LCN1）能够间接导致肺组织基质降解增加，造成肺组织结构重塑，使病情加重。miRNA可长期稳定存在，且其异常表达会影响肿瘤的发生发展[7-8]。miRNA既可以发挥抑癌作用，也可以发挥促癌作用，并且在多数人类恶性肿瘤中异常表达[9-10]。有研究显示，miR-146b-3p可作为诊断非小细胞肺癌的重要标志物[11]。还有研究显示，miR-146a在肺鳞癌组织中表达下调，其异常表达能抑制肺鳞癌细胞的迁移和侵袭[12]。基于这些研究结果，我们推测miR-146b-3p可能在肺癌中发挥重要作用。本研究探讨miR-146b-3p差异表达对肺鳞癌细胞生物学行为的影响，并初步分析其可能的作用机制，以期为肺鳞癌的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂与仪器

NCI-H226、NCI-H2170细胞株购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心；RPMI 1640培养基、AnnexinV-FITC凋亡检测试剂盒购于上海经科化学科技有限公司；胎牛血清购于爱必信(上海)生物科技有限公司；细胞计数仪购于Invitrogen有限公司；RNA提取试剂TRIzol及转染试剂Lipofectamine 2000均购自南京森贝伽生物科技有限公司；逆转录试剂盒PrimeScript™ RT Master Mix购自上海妍琦生物科技有限公司，PCR试剂盒Quanti Fast SYBR Green PCR Kit购自武汉极捷生物科技有限公司；BCA蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒购自北京伊塔生物科技有限公司；CCK-8试剂盒购自上海吉至生化科技有限公司；BCL2、BAX、CCNB1、CDK2多克隆抗体、LCN1多克隆抗体以及HRP标记的羊抗兔免疫球蛋白G(H+L)二抗购自上海科敏生物科技有限公司；双荧光素酶报告基因系统试剂盒购自成都安森盛源科技有限公司；ST-360型酶标仪购自上海晚成医疗器械有限公司；细胞周期试剂盒购于杭州联科生物技术股份有限公司；ELx808酶标仪购自北京泽平科技有限责任公司；FACS Vantage™流式细胞仪购自南京华奥生物医药技术有限公司。

1.2 生物信息学分析

通过TCGA在线数据库下载肺鳞癌临床样本数据，比较miR-146b-3p、LCN1在癌旁组织与肺鳞癌组织中的表达情况，并分析LCN1与肺鳞癌患者临床表型的关系。使用Kaplan-Meier Plotter数据库评估LCN1 mRNA水平对肺鳞癌患者总生存期的影响。利用StarBase数据库在线预测靶基因数据库预测miR-146b-3p的靶基因。

1.3 细胞培养

将NCI-H226、NCI-H2170细胞接种至含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基，在37 ℃、5%CO_2饱和湿度条件下培养，待细胞贴壁生长，胰酶消化液消化后传代培养，实验取对数生长期细胞。

1.4 RT-PCR检测miR-146b-3p表达

采用TRIzol法提取细胞或组织中的总RNA，采用紫外分光光度计法测定RNA的浓度。按TaqMan© MicroRNA Reverse Transcription kit逆转录试剂盒说明书以RNA为模板进行逆转录获得cDNA并置于4 ℃保存，进行荧光定量PCR扩增，反应条件：95 ℃预变性10 min；95 ℃变性15 s，60 ℃退火45 s，65 ℃延伸1 min，4 ℃ 10 min，扩增40个循环。以β-actin为内参，miR-146b-3p上游引物序列：5′-CCTGGCACTGAGAACTGAAT-3′，下游序列：5′-GCACCAGAACTGAGTCCACA-3′；β-actin上游引物序列：5′-CATCCCTTCTCCCCACACAC-3′，下游序列：5′-AGTCCCAGGGCTTTGATTTG-3′。以$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算miR-146b-3p的相对表达水平。

1.5 构建miR-146b-3p过表达细胞模型

将对数生长期的NCI-H2170和NCI-H226细胞分为miR-NC组和miR-146b-3p组，根据Lipofectamine 2000说明书分别转染miR-146b-3p NC和miR-146b-3p质粒，24 h后更换完全培养基。采用G418筛选出能够稳定过表达miR-146b-3p的NCI-H2170和NCI-H226细胞系。采用RT-PCR检测miR-146b-3p水平以评估转染效率。

1.6 构建LCN1敲低细胞模型

将对数生长期的NCI-H2170和NCI-H226细胞分为shNC组、shLCN1 1#组、shLCN1 2#组和miR-146b-3p+LCN1组，并根据Lipofectamine 2000说明书分别转染shNC、shLCN1 1#、shLCN1 2#质粒，24 h后更换完全培养基。用嘌呤霉素筛选出稳定敲低LCN1的NCI-H2170和NCI-H226细胞系。采用Western blot检

测LCN1蛋白水平以评估转染效率,筛选稳定质粒构建miR-146b-3p+LCN1组(共转染miR-146b-3p+LCN1 2#质粒)。

1.7 细胞增殖实验

将miR-NC组、miR-146b-3p组、shNC组、shLCN1 1#组、shLCN1 2#组和miR-146b-3p+LCN1组细胞置于CO_2培养箱中培养24 h,分别于0、1、2、3、4、5 d时对细胞增殖活性进行检测。每孔加入CKK-8 10 μL,在37 ℃、5%CO_2的培养箱中继续培养1 h,随后用酶标仪测定450 nm波长处的光密度(optical density,OD)值。

1.8 细胞克隆实验

将miR-NC组、miR-146b-3p组、shNC组、shLCN1 1#组、shLCN1 2#组和miR-146b-3p+LCN1组细胞分别接种到6孔板中,并轻轻转动,使细胞分散均匀。用PBS清洗3次,再用40 g/L多聚甲醛固定20 min。结晶紫染色液染色,光学显微镜下观察细胞集落。

1.9 细胞周期实验

将miR-NC组、miR-146b-3p组、shNC组、shLCN1 1#组、shLCN1 2#组和miR-146b-3p+LCN1组细胞以1×10^5个/孔的密度接种于6孔板,消化离心,弃去上清液,收集细胞团块,PBS重悬细胞,离心,清洗1次,振荡,使细胞沉淀充分分散,先加入300 μL、4 ℃预冷PBS,再将上样管置于涡旋振荡器上振荡,加700 μL、4 ℃预冷的纯乙醇沉悬,4 ℃固定过夜。第2天,离心弃去上清液,PBS洗1次,加500 μL PI染液,室温避光孵育15 min,上流式细胞仪检测,用Flowjo软件分析细胞周期时相分布。

1.10 细胞凋亡实验

取miR-NC组、miR-146b-3p组、shNC组、shLCN1 1#组、shLCN1 2#组和miR-146b-3p+LCN1组细胞进行消化、离心、重悬。将细胞接种于6孔板内并置于37 ℃、5%CO_2的培养箱中培养24 h。以1 500 r/min离心10 min去除上清液。加入5 μL AnnexinV-FITC混匀,再加入5 μL PI混匀,随后室温下避光孵育15 min。采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.11 双荧光素酶报告实验

构建野生型报告基因载体LCN1-WT与突变型报告基因载体LCN1-MT,将载体分别与miR-NC或miR-146b-3p共转染到肺鳞癌细胞中。置于37 ℃、5%CO_2培养箱继续培养48 h,用双荧光素酶检测试剂盒测量各组细胞中的荧光素酶活性。

1.12 裸鼠移植瘤实验

16只裸鼠购自成都达硕实验动物有限公司,动物生产许可证号:SCXK(川)2020-030,在标准环境中饲养,自由采食饮水。将小鼠分为对照组和观察组,每组8只,对照组裸鼠于右侧腹股沟皮下注射0.2 mL(1×10^7/mL)转染miR-NC的NCI-H2170细胞悬液,观察组裸鼠于右侧腹股沟皮下注射0.2 mL(1×10^7/mL)已转染miR-146b-3的NCI-H2170细胞悬液。待成瘤后,每2 d用微米卡尺测量肿瘤体积,于第2周末处死小鼠,剥离移植瘤并称重,RT-PCP检测移植瘤组织中miR-146b-3p的表达。

1.13 Western blot检测

收集miR-NC组、miR-146b-3p组、shNC组、shLCN1 1#组、shLCN1 2#组、miR-146b-3p+LCN1组对数生长期的NCI-H2170和NCI-H226细胞,加入SDS Loading buffer,沸水浴中煮沸10 min,电泳后转至PVDF膜,用5%脱脂牛奶室温封闭1 h。加入用封闭液稀释的抗体(1∶5 000),4 ℃孵育过夜。次日PBS洗涤6 min,重复3次,然后加入封闭液稀释的HRP标记的羊抗兔二抗(1∶1 000),室温孵育60 min,PBS洗涤6 min,重复3次,ECL化学发光液进行显影,以β-actin作为内参,利用BCA蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度,具体操作遵照试剂盒说明书进行。

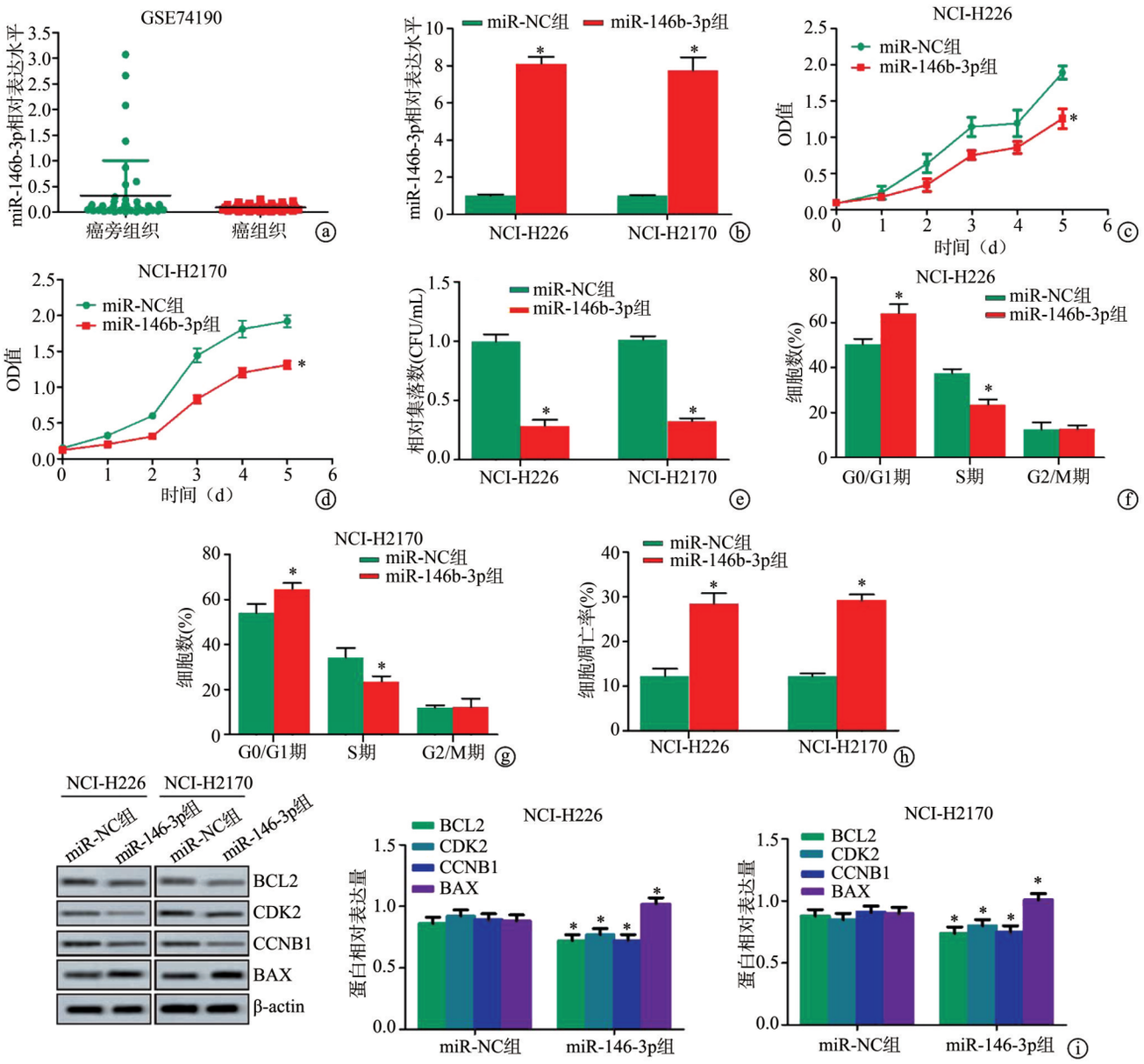
1.14 统计学处理

数据采用SPSS 17.0软件进行统计学处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2组间的表达差异采用t检验分析,多组间比较采用单因素方差分析。*Kaplan-Meier*生存曲线分析患者总生存期。P<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-146b-3p过表达抑制肺鳞癌细胞增殖、促进凋亡

GEO数据库分析显示,肺鳞癌组织中miR-146b-3p表达水平明显低于癌旁组织(P<0.05)。RT-PCR实验结果显示,miR-146b-3p组中miR-146b-3p表达明显高于miR-NC组(P<0.05)。细胞增殖实验结果显示,与miR-NC组相比,miR-146b-3p组增殖能力明显降低(P<0.05)。细胞克隆实验结果显示,与miR-NC组相比,miR-146b-3p组克隆细胞数明显减少(P<0.05)。细胞周期实验结果显示,与miR-NC组相比,miR-146b-3p组G0/G1期细胞数明显增加(P<0.05),S期细胞数明显减少(P<0.05)。细胞凋亡实验结果显示,与miR-NC组相比,miR-146b-3p组细胞凋亡率明显增高(P<0.05)。Western blot结果显示,与miR-NC组相比,miR-146b-3p组细胞BCL2、CCNB1和CDK2蛋白减少(P<0.05),BAX蛋白增加(P<0.05),见图1。

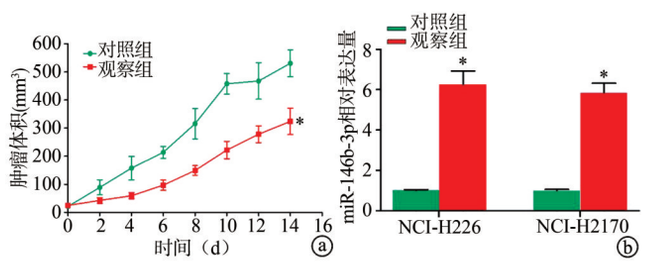


a:miR-146b-3p在肺鳞癌组织和癌旁组织中的表达情况;b:miR-146b-3p在NCI-H226和NCI-H2170细胞中的表达情况;c、d:NCI-H226和NCI-H2170细胞增殖情况;e:NCI-H226和NCI-H2170细胞克隆实验结果;f、g:NCI-H226和NCI-H2170细胞周期实验结果;h:NCI-H226和NCI-H2170细胞凋亡率;i:NCI-H226和NCI-H2170细胞中的蛋白表达情况　*:与miR-NC组相比,$P<0.05$

图1　miR-146b-3p抑制肺鳞癌细胞增殖并促进其凋亡

2.2　miR-146b-3p过表达抑制移植瘤生长

裸鼠移植瘤实验结果显示,观察组移植瘤体积(468.57±50.63)mm^3和体质量(0.38±0.04)g明显小于对照组的体积(287.91±50.63)mm^3和体质量(0.19±0.02)g($P<0.05$)。随着时间的推移,移植瘤体积不断增大,但是观察组的增长速度明显慢于对照组($P<0.05$)。RT-PCR结果显示,在裸鼠移植瘤组织中,观察组中miR-146b-3p mRNA相对表达量明显高于对照组($P<0.05$),见图2。



a:移植瘤体积比较;b:RT-PCR检测细胞中miR-146b-3p的相对表达量　*:与对照组相比,$P<0.05$

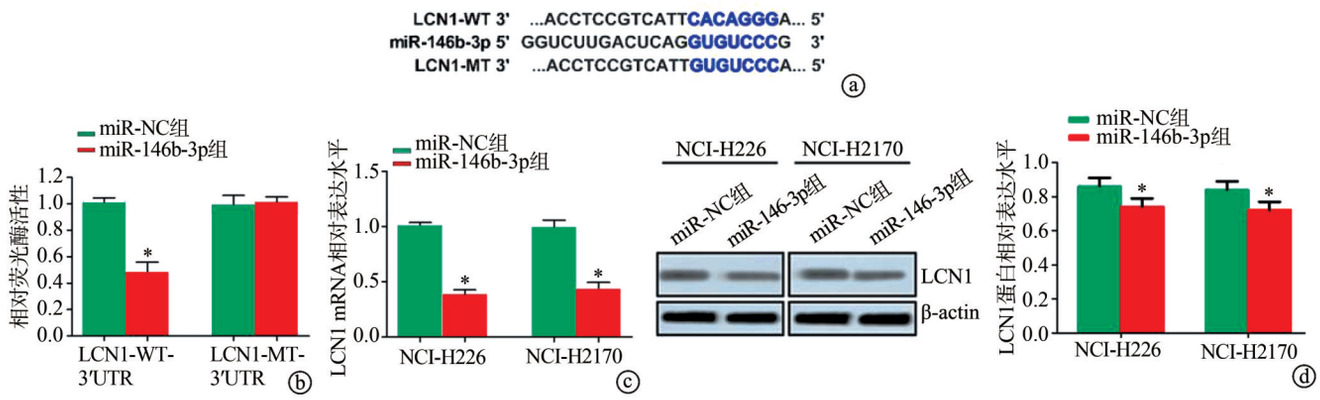
图2　miR-146b-3p过表达抑制移植瘤生长

2.3 miR-146b-3p与LCN1的靶向关系

生物信息学分析结果表明，miR-146b-3p序列3′-UTR区与LCN1存在结合位点。双荧光素酶报告实验显示，miR-146b-3p mimic与LCN1-WT共转染致荧光素酶活性降低（$P<0.05$）。Western blot和RT-PCR实验结果显示，与miR-NC组相比，miR-146b-3p组中LCN1 mRNA和蛋白表达水平明显降低（$P<0.05$），见图3。

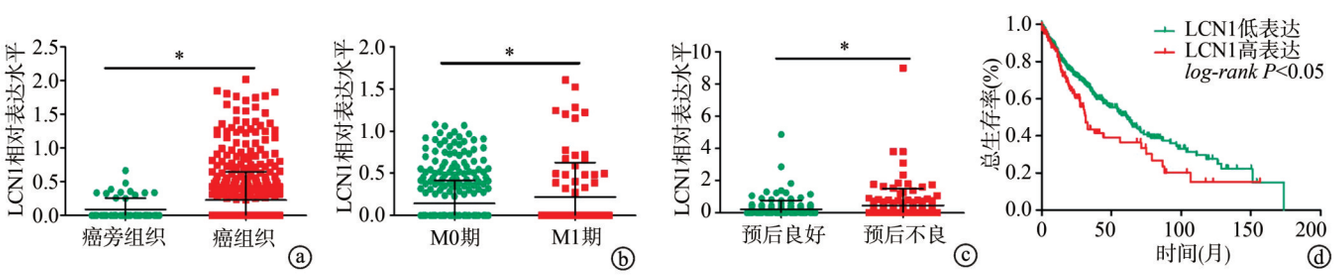
2.4 LCN1在肺鳞癌不同临床特征患者癌组织中的表达水平

TCGA数据库分析显示，肺鳞癌组织中LCN1表达高于癌旁组织（$P<0.05$），M1期患者LCN1表达高于M0期患者（$P<0.05$），预后不良患者LCN1表达高于预后良好患者（$P<0.05$），LCN1高表达患者总生存率明显低于LCN1低表达患者（$P<0.05$），见图4。



a：miR-146b-3p与LCN1的靶向关系预测；b：双荧光素酶报告实验验证miR-146b-3p与LCN1的关系；c：LCN1 mRNA相对表达情况；d：LCN1蛋白相对表达情况 *：与miR-NC组相比，$P<0.05$

图3 miR-146b-3p与LCN1的靶向关系



a：LCN1在癌旁组织和肺鳞癌组织中的表达；b：LCN1在M1期和M0期患者癌组织中的表达水平；c：LCN1在预后良好患者和预后不良患者癌组织中的表达水平；d：LCN1高表达患者和LCN1低表达患者的总生存率 *：$P<0.05$

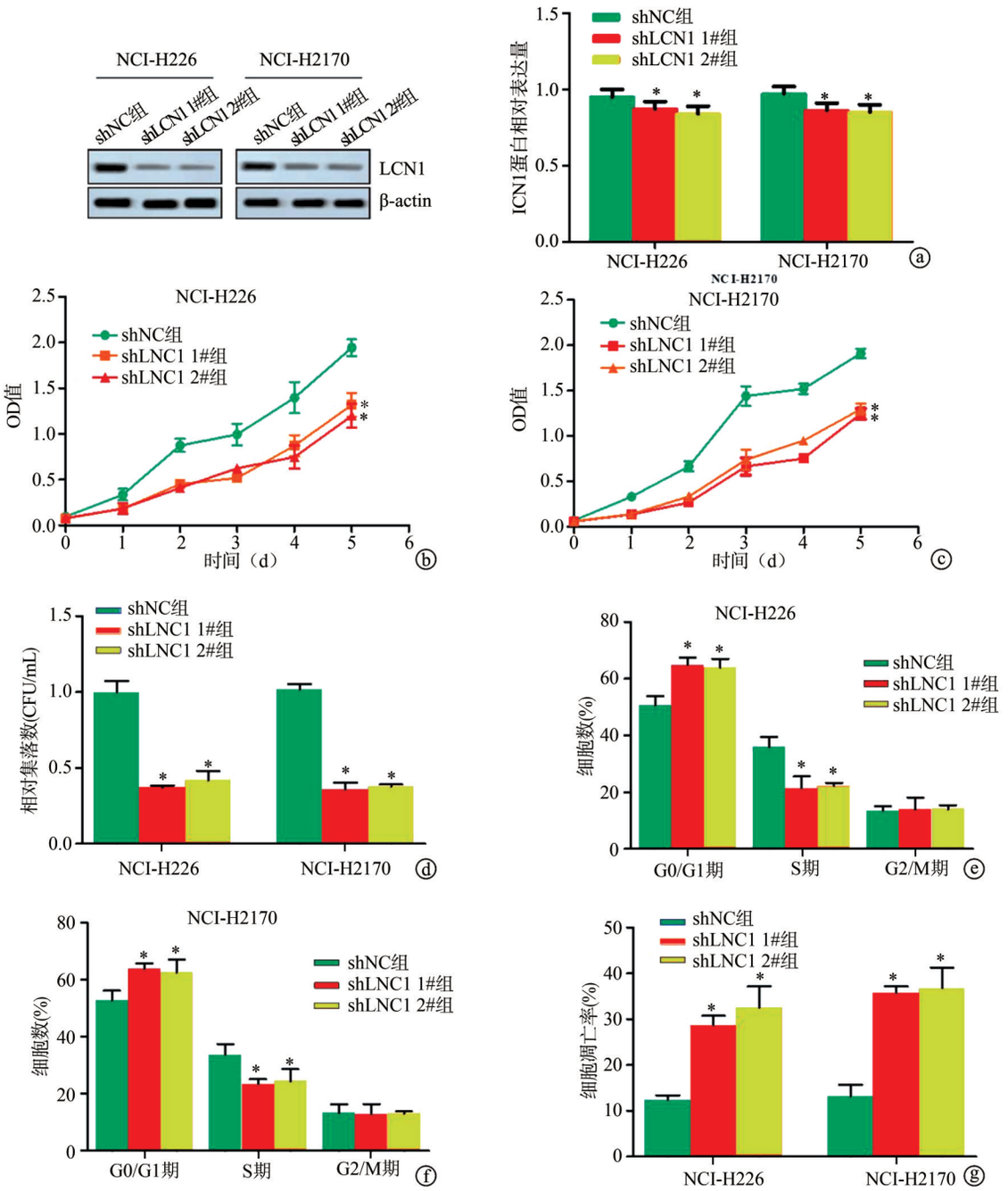
图4 LCN1在肺鳞癌不同临床特征患者癌组织中的表达水平

2.5 敲低LCN1表达抑制肺鳞癌细胞增殖并促进其凋亡

Western blot实验结果显示，与shNC组相比，shLCN1 1#组和shLCN1 2#组中LCN1蛋白表达明显降低（$P<0.05$）。细胞增殖实验结果显示，与shNC组相比，shLCN1 1#组和shLCN1 2#组中细胞增殖能力降低（$P<0.05$）。细胞克隆实验结果显示，与shNC组相比，shLCN1 1#组和shLCN1 2#组中克隆细胞数明显减少（$P<0.05$）。细胞周期实验结果显示，与shNC组相比，shLCN1 1#组和shLCN1 2#组G0/G1期细胞数明显增加，S期细胞数明显减少（$P<0.05$）。细胞凋亡实验结果显示，与shNC组相比，shLCN1 1#组和shLCN1 2#组中凋亡率明显增高（$P<0.05$），见图5。

2.6 miR-146b-3p靶向LCN1抑制肺鳞癌增殖并促进其凋亡

Western blot实验结果显示，与miR-NC组及miR-146b-3p+LCN1组相比，miR-146b-3p组中LCN1蛋白相对表达水平下降（$P<0.05$）。细胞增殖实验结果表明，与miR-NC组及miR-146b-3p+LCN1组相比，miR-146b-3p组中增殖能力降低（$P<0.05$）。细胞克隆实验结果显示，与miR-NC组及miR-146b-3p+LCN1组相比，miR-146b-3p组中克隆细胞数明显减少（$P<0.05$）。细胞周期实验结果显示，与miR-NC组及miR-146b-3p+LCN1组相比，miR-146-3p组中G0/G1期细胞数量明显增加，S期细胞数量明显减少（$P<0.05$）。细胞凋



a:各组中LCN1蛋白表达;b、c:NCI-H226和NCI-H2170细胞增殖实验结果;d:NCI-H226和NCI-H2170细胞克隆实验结果;e、f:NCI-H226和NCI-H2170细胞周期实验结果;g:NCI-H226和NCI-H2170细胞凋亡实验结果　*:与shNC组相比,$P<0.05$

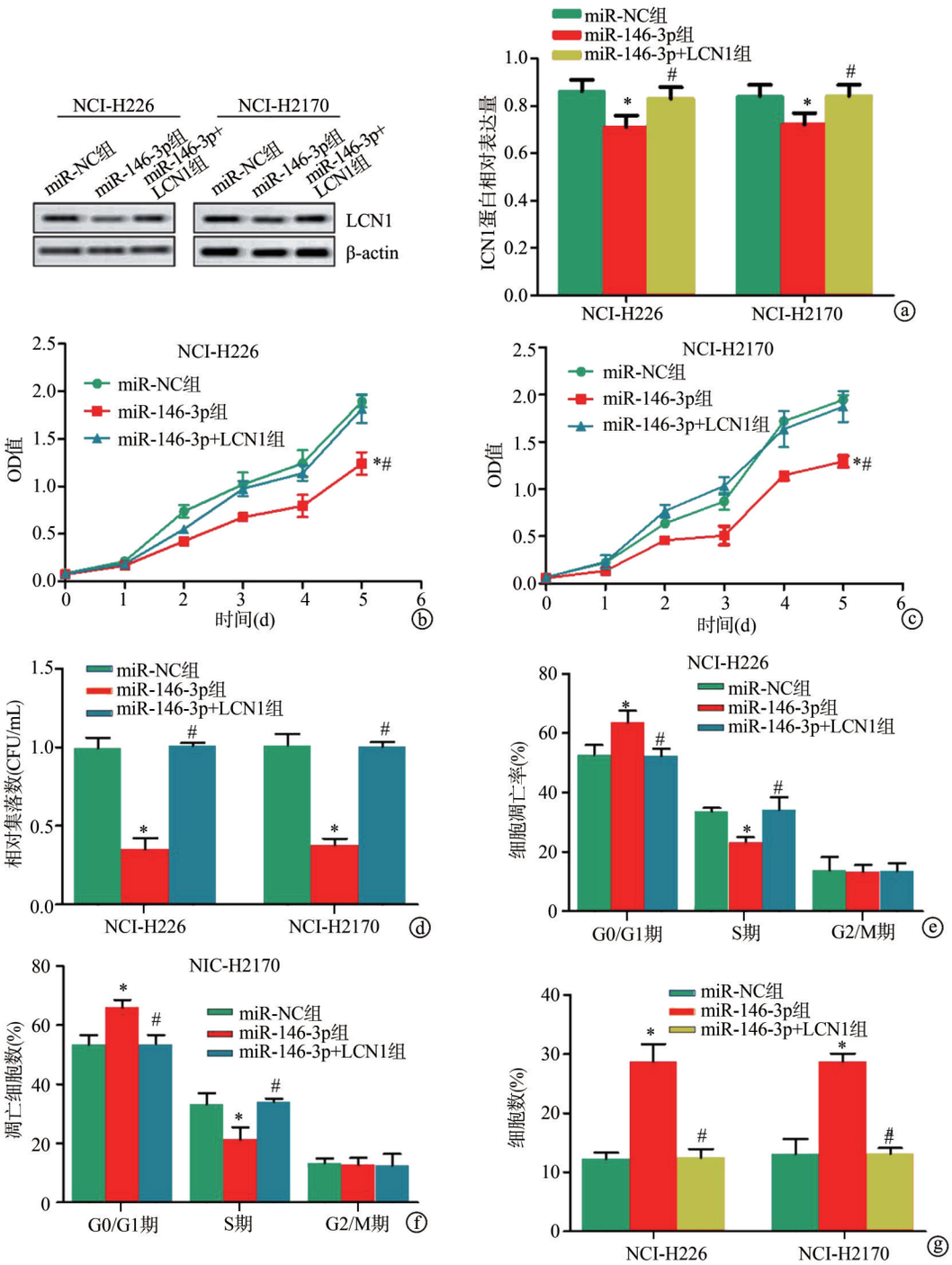
图5　敲低LCN1表达抑制肺鳞癌细胞增殖并促进其凋亡

亡实验结果显示,与miR-NC组及miR-146b-3p+LCN1组相比,miR-146b-3p组中凋亡细胞数明显增加($P<0.05$),见图6。

3　讨论

肺鳞癌是非小细胞肺癌的常见类型,早期并无明显特异性,确诊时大多已处于中晚期,错过了最佳手术时机,因而通常采取化疗等保守治疗,但长期使用各种类型的抗癌药物会导致机体出现耐药性,从而影响治疗效果[13-17]。随着肿瘤精准治疗的快速发展,对肿瘤生物学行为和基因的调控成为了研究重点。其中miRNA在肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭、分化、凋亡、化疗耐药等多种生理过程中起到关键作用[18-19]。本研究旨在寻找影响肺鳞癌生物学行为的潜在标志物,为临床治疗提供理论依据。

本研究通过生物信息学分析发现,miR-146b-3p



a:各组中LCN1蛋白表达;b、c:NCI-H226和NCI-H2170细胞增殖实验结果;d:NCI-H226和NCI-H2170细胞克隆实验结果;e、f:NCI-H226和NCI-H2170细胞周期实验结果;g:NCI-H226和NCI-H2170细胞凋亡实验结果 *:与miR-NC组相比,$P<0.05$;#:与miR-146b-3p组相比,$P<0.05$

图6 miR-146b-3p靶向LCN1抑制肺鳞癌细胞增殖并促进其凋亡

在肺鳞癌组织中低表达;LCN1在肺鳞癌组织中高表达,且LCN1差异表达与肺鳞癌临床预后不良及M分期有关。构建miR-146b-3p过表达细胞模型进行一系列体外功能试验,结果显示,肺鳞癌细胞过表达miR-146b-3p后,miR-146b-3p表达水平增加,细胞增殖和克隆能力降低,细胞周期受到阻滞,细胞凋亡明显增加,提示miR-146b-3p过表达可抑制肺鳞癌细胞增殖,阻滞细胞周期,并诱导肿瘤细胞凋亡。进一步行Western blot分析显示,肺鳞癌细胞过表达miR-146b-3p后,细胞BCL2、CCNB1和CDK2蛋白减少,BAX蛋白增加,表

明过表达miR-146b-3p可调节肺鳞癌细胞凋亡相关蛋白表达。促凋亡蛋白BAX和抗凋亡蛋白BCL2在凋亡信号介导的凋亡过程中起关键作用,BAX过表达可拮抗BCL2表达,促进细胞凋亡。因此,上调BCL2表达、下调BAX表达可抑制细胞凋亡。众所周知,miRNA通过抑制或降解靶基因mRNA发挥生物学功能[14]。既往研究显示,miR-146b-5p可通过靶向调节ZNRF2表达诱导乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭[20]。因此,结合本研究结果推测miR-146b-3p可抑制肺鳞癌细胞增殖,调节细胞周期相关蛋白,进而阻滞细胞周期,并通过上调BAX和下调BCL2蛋白表达诱导细胞凋亡。本研究通过裸鼠移植瘤实验进一步发现,miR-146b-3p过表达可抑制裸鼠移植瘤的生长,证实了miR-146b-3p过表达在肺鳞癌中发挥抑制作用。

LCN1是脂质运载蛋白家族的成员,是泪液中重要的脂质结合蛋白,分布在多种组织和腺体中,并与多种疾病的发生有关[21-22]。既往研究显示,LCN1在乳腺癌中高表达,且其异常表达与临床病理特征和生存率较低有关[23]。本研究通过miRNA靶基因数据库预测miR-146b-3p调控肺鳞癌细胞的靶基因,结果显示,miR-146b-3p存在与LCN1靶向结合的位点,LCN1是miR-146b-3p的靶基因。Western blot结果显示,miR-146b-3p组中LCN1蛋白表达水平明显低于miR-NC组,推测miR146b-3p可以调控LCN1蛋白表达。本研究发现,肺鳞癌组织中LCN1表达高于癌旁组织,且与肺鳞癌患者M分期存在一定关联。为进一步分析LCN1在肺鳞癌中发挥的生物学功能,本研究通过构建LCN1敲低细胞模型进行体外功能实验,结果显示,LCN1敲低可以抑制肺鳞癌细胞生长、增殖,阻滞细胞周期,并诱导细胞凋亡。提示LCN1在肺鳞癌中高表达,敲低LCN1表达可影响肺鳞癌生物学行为。

本研究结果显示,miR-146b-3p过表达降低了肺鳞癌细胞增殖能力,减少了克隆细胞数,阻滞了细胞生长周期,增加了凋亡细胞数量;而miR-146b-3p和LCN1共转染后,逆转了miR-146b-3p对肺鳞癌的抑制作用。故我们推测,miR-146b-3p在肺鳞癌中发挥促癌作用,其可能通过靶向抑制LCN1表达调控肺鳞癌生物学行为。

综上,本研究发现miR-146b-3p在肺鳞癌细胞中低表达,LCN1在肺鳞癌细胞中高表达,且miR-146b-3p与LCN1存在靶向结合位点。上调miR-146b-3p可以抑制肺鳞癌细胞增殖,诱导细胞凋亡,并影响细胞生长周期。而miR-146b-3p过表达可以抑制移植瘤生长,其作用机制可能是通过靶向LCN1实现的。

[参考文献]

[1] Schabath MB, Cote ML. Cancer progress and priorities: lung cancer [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2019, 28(10): 1563-1579. doi:10.1158/1055-9965.EPI-19-0221.

[2] 张明光,徐海军,施联善,等. 基于Logistic回归模型构建联合检测因子对非小细胞肺癌EGFR突变状态的预测价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(2): 259-262. doi: 10.3969/j.issn.1674-6929.2021.02.023.

[3] Wang BY, Huang JY, Chen HC, et al. The comparison between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in lung cancer patients[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2020, 146(1): 43-52. doi: 10.1007/s00432-019-03079-8.

[4] 张兰兰,李向敏,毛志远,等. 2例肺腺癌EGFR-TKIs耐药后转化小细胞肺癌的病例报道及文献回顾[J]. 空军医学杂志, 2021, 37(3): 262-265. doi:10.3969/j.issn.2095-3402.2021.03.021.

[5] Chen L, Heikkinen L, Wang C, et al. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools[J]. Brief Bioinform, 2019, 20(5): 1836-1852. doi: 10.1093/bib/bby054.

[6] 田莲莲,朱 军,马 骞,等. 胃癌VEGF通路相关基因的预后模型的构建[J]. 空军医学杂志, 2021, 37(3): 227-231. doi:10.3969/j.issn.2095-3402.2021.03.012.

[7] 彭俊付,王振彪,彭继升,等. miR-142-3p靶向Wnt/β-链蛋白通路对结直肠癌细胞增殖的影响[J]. 临床误诊误治, 2021, 34(4): 81-86. doi:10.3969/j.issn.1002-3429.2021.04.017.

[8] 刘倩峰,庞 超,李庆星,等. miR-365-3p抑制CDK-10表达对口腔鳞癌细胞增殖、凋亡和周期的影响[J]. 中南医学科学杂志, 2021, 49(1): 35-40. doi:10.15972/j.cnki.43-1509/r.2021.01.007.

[9] 付明刚,迪丽米娜·伊拉木,郭丽英. miR-146a在早期乳腺浸润性导管癌组织中的表达及临床意义[J]. 新疆医科大学学报, 2018, 41(6): 715-717. doi:10.3969/j.issn.1009-5551.2018.06.013.

[10] Yin Z, Cui Z, Ren Y, et al. MiR-146a polymorphism correlates with lung cancer risk in Chinese nonsmoking females[J]. Oncotarget, 2017, 8(2): 2275-2283. doi: 10.18632/oncotarget.13722.

[11] 沙 杰,范理宏. miRNA-146b-3p在早期非小细胞肺癌中的诊断价值[J]. 同济大学学报(医学版), 2018, 39(2): 73-78. doi: 10.16118/j.1008-0392.2018.02.014.

[12] Yoshimatsu Y, Ebi N, Ooi R, et al. Osimertinib for lung squamous cell carcinoma: a case report and literature review[J]. Intern Med, 2021, 60(7): 1067-1071. doi: 10.2169/internalmedicine.5463-20.

[13] Pathak G, Singh S, Kumari P, et al. Cirsimaritin, a lung squamous carcinoma cells (NCIH-520) proliferation inhibitor[J]. J Biomol Struct Dyn, 2021, 39(9): 3312-3323. doi: 10.1080/07391102.2020.1763198.

[14] Swarbrick S, Wragg N, Ghosh S, et al. Systematic review of miRNA as biomarkers in Alzheimer's disease[J]. Mol Neurobiol, 2019, 56(9): 6156-6167. doi: 10.1007/s12035-019-1500-y.

[15] 张玲玲,张 莹,热依娜·乌甫里. 质量管理模式对肿瘤患者护理质量的影响[J]. 解放军医院管理杂志, 2021, 28(10): 981-983. doi:10.16770/J.cnki.1008-9985.2021.10.030.

[16] 章必成,许 斌,姚 颐,等. 综合性大学开设肿瘤学通识课的实践研究[J]. 中华医学教育探索杂志, 2021, 20(2): 150-152. doi: 10.3760/cma.j.cn116021-20191227-00389.