

王振华, 陈金亮, 邢媛媛, 等. 法尼醇受体通过下调 miR-21 水平抑制非小细胞肺癌细胞增殖及侵袭能力 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 43-50.

Wang ZH, Chen JL, Xing YY, et al. Farnesoid X receptor inhibits the proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells by downregulating miR-21 [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 43-50.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 007

法尼醇受体通过下调 miR-21 水平抑制非小细胞肺癌细胞增殖及侵袭能力

王振华^{1*}, 陈金亮², 邢媛媛², 郭喜喜¹, 李东飞¹

(1. 新乡市中心医院胸瘤二科, 河南 新乡 453000; 2. 南通市第一医院呼吸科, 江苏 南通 226006)

【摘要】 目的 观察法尼醇受体(FXR)在非小细胞肺癌(NSCLC)组织和细胞系中的表达水平,探讨了 FXR 在 NSCLC 细胞增殖和侵袭中的作用是否与调控 miR-21 水平相关。**方法** 在 2010 年至 2012 年间,取本院手术切除的 80 例 NSCLC 组织及配对的正常组织。通过免疫组化或 Western blot 分析 NSCLC 组织和细胞系中 FXR 表达。以 NSCLC 细胞 A549 为研究对象,通过 CCK-8 法、Transwell 法和 qRT-PCR 法评估不同浓度的 GW3965(1~5 μmol/L)对细胞活力、侵袭和 miR-21 水平影响。通过转染技术来过表达或敲低 miR-21 表达,并评估其对细胞活力、侵袭的影响。采用双荧光素酶报告分析 FXR 与 miR-21 之间的关系。**结果** 与邻近的非肿瘤正常组织相比,FXR 在 NSCLC 组织中的表达显著降低($P<0.001$)。Kaplan-Meier 分析显示 FXR 低表达预示 NSCLC 患者预后较差($\chi^2=4.496, P=0.033$)。FXR 高、低表达的 NSCLC 在临床分期、肿瘤大小、T 分期和淋巴结转移(N 分期)上有显著性差异($P<0.05$)。GW3965 以剂量依赖方式促进了 A549 细胞中 FXR 蛋白表达,抑制了细胞的增殖和侵袭,并降低了 miR-21 表达。miR-21 过表达显著逆转了 FXR 对 NSCLC 细胞生长和侵袭的抑制作用($P<0.05$),并且 miR-21 沉默显著增强 FXR 对 NSCLC 细胞生长和侵袭的抑制作用($P<0.05$)。双荧光素酶报告证实 FXR 通过靶向 miR-21 来抑制 NSCLC 细胞增殖和侵袭。Spearman 分析显示,NSCLC 标本中 FXR 与 miR-21 的表达呈强负相关($P<0.001$)。Kaplan-Meier 分析显示,“FXR 低表达”和“miR-21 高表达”共存模式预测了 NSCLC 患者最差的预后($\chi^2=8.201, P=0.004$)。**结论** FXR 通过下调 miR-21 抑制 NSCLC 细胞的生长,提示调控 FXR/miR-21 可能是治疗 NSCLC 的潜在策略。

【关键词】 法尼醇受体;miR-21;非小细胞肺癌;增殖;侵袭

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0043-08

Farnesoid X receptor inhibits the proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells by downregulating miR-21

WANG Zhenhua^{1*}, CHEN Jinliang², XING Yuanyuan², GUO Xixi¹, LI Dongfei¹

(1. the Second Department of Thoracic Oncology, Xinxiang Central Hospital, Xinxiang 453000, China.
2. Department of Respiratory Medicine, Nantong First Hospital, Nantong 226006)

【Abstract】 Objective To observe the expression levels of Farnesoid X receptor (FXR) in non-small cell lung cancer (NSCLC) tissue and cell lines, and to explore whether the role of FXR in the proliferation and invasion of NSCLC cells is related to the regulation of miR-21. **Methods** From 2010 to 2012, 80 cases of NSCLC tissue and matched normal tissue were collected. The expression of FXR in the NSCLC tissue and cell lines was analyzed using immunohistochemistry

[基金项目] 江苏省科技项目(BK20191207)。
[作者简介] 王振华(1982—),男,硕士,研究方向:胸外科。E-mail: bxt4396@163.com

or Western blot. The effects of GW3965 ($1 \sim 5 \mu\text{mol/L}$) on cell viability and invasion and miR-21 levels were evaluated using CCK-8, transwell and qRT-PCR. MiR-21 was overexpressed or knocked down using transfection technology, and the effects on cell viability and invasion were evaluated. Moreover, the relationship between FXR and miR-21 was analyzed by double luciferase assay. **Results** Compared with the adjacent non-tumor normal tissue, the expression of FXR was significantly lower in NSCLC tissue ($P < 0.001$). Kaplan-Meier analysis revealed that low FXR expression predicted a worse prognosis for NSCLC patients ($\chi^2 = 4.496$, $P = 0.033$). There were significant differences in clinical stage, tumor size, T stage and lymph node metastasis (N stage) between high- and low-FXR tumors ($P < 0.05$). GW3965 promoted FXR protein expression in A549 cells in a dose-dependent manner, inhibited cell proliferation and invasion and decreased miR-21 expression. Overexpression of miR-21 significantly reversed the inhibitory effects of FXR on the growth and invasion of NSCLC cells ($P < 0.05$), and miR-21 silencing significantly enhanced the inhibitory effects of FXR on the growth and invasion of NSCLC cells ($P < 0.05$). The double luciferase assay confirmed that FXR inhibited the proliferation and invasion of NSCLC cells by targeting miR-21. Spearman's test revealed a strong negative correlation between FXR and miR-21 expression in NSCLC specimens ($P < 0.001$). Furthermore, Kaplan-Meier analysis revealed that a coexistence pattern of "FXR low" and "miR-21 high" predicted the worst prognosis in NSCLC patients ($\chi^2 = 8.201$, $P = 0.004$). **Conclusions** FXR inhibits the growth of NSCLC cells by downregulating miR-21, suggesting that regulation of FXR/miR-21 may be a potential strategy for the treatment of NSCLC.

【Keywords】 FXR; miR-21; NSCLC; proliferation; invasion

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 是肺癌的主要类型, 死亡率高^[1]。目前, NSCLC 根治性切除术后 5 年的总生存率仍低于 15%^[2]。因此, 有必要探索 NSCLC 的分子机制, 寻找新的治疗靶点。法尼醇受体 (Farnesoid X receptor, FXR) 是核受体超家族的成员, 能对管腔胆汁酸水平进行严格调控^[3]。由于大约 70% 的胆汁酸被人体重新吸收, FXR 可以在血浆中达到微摩尔浓度, 这可能是许多其他组织中表达 FXR 的基础^[4]。先前的研究显示, 与癌周非肿瘤组织相比, 人类结直肠癌组织中的 FXR 表达较低, 并且 FXR 低表达与不良预后之间存在关联^[5]。最近的研究报告了 FXR 可作为肿瘤抑制因子, 在体内、体外激活可抑制多种细胞生长^[4-5]。然而, 其潜在机制并不完全清楚。MicroRNAs (miRNAs) 是一种单链非编码 RNA 分子, 其通过调节癌基因或抑癌基因在抑制或促进肿瘤生长中发挥关键作用^[6]。研究发现, miR-21 在几种恶性肿瘤中加速癌症进展, 包括胃癌和结直肠癌^[7]。此外, miR-21 在肺癌中被观察到上调, 并与肺癌侵袭能力增加有关^[8]。先前的研究发现, FXR 激动剂可以通过抑制 miR-21 改善非酒精性脂肪性肝炎小鼠的脂肪变性、炎症、氧化应激和胆固醇积累^[9]。然而, 关于 FXR 激动剂能否通过下调 miR-21 水平抑制 NSCLC 细胞增殖及侵袭能力尚不清楚。因此, 本研究旨在观察 FXR 在 NSCLC 组织和细胞系中的表达水平, 探讨 FXR 在 NSCLC 细胞增殖和

侵袭中的作用是否与调控 miR-21 水平相关。

1 材料和方法

1.1 实验组织与细胞系

在 2010 年至 2012 年间, 取本院手术切除的 80 例 NSCLC 组织及配对的正常组织。所用患者经病理证实为 NSCLC。术前无局部或全身治疗。所有组织样本在液氮中新鲜冷冻, 然后转移到 -80°C 保存, 直到使用。所有患者至少持续随访 60 个月, 并收集相关临床病理特征和生存统计数据。

人 NSCLC 系 (A549、NCI-H1299、H460) 和正常细胞系 (16HBE) 购自美国 ATCC。细胞培养在含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 RPMI-1640 培养基中 (美国 Invitrogen 公司)。

1.2 主要试剂与仪器

抗人 FXR 的初级抗体购自武汉 Proteintech 公司; TRIpure 试剂、Super M-MLV 逆转录酶、 $2\times$ Power Taq PCR MasterMix 购自北京 BioTeke 公司; SYBR green、RIPA 缓冲液购自北京 Solarbio 公司; GW3965 (FXR 激动剂) 购自美国 Sigma 公司 (批号: NP1524), 细胞计数试剂盒-8 购自日本 Dojindo 公司; PVDF 膜购自美国 Invitrogen 公司; PVDF 膜、lipofectamine 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司; β -actin 一抗购自英国 Abcam 公司; 双荧光素酶报告系统购自美国 Promega 公司; miR-21 过表达物或对照质粒 pcDNA3.1 和 miR-21 抑制剂或阴性对

照 siRNA 均购自上海吉玛制药技术有限公司。

Exicycler™96 荧光定量分析仪购自韩国 Bioneer 公司;BX51 显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 肿瘤组织中 FXR 表达的免疫组化分析

手术标本(NSCLC 组织及配对的正常组织)用 10%福尔马林固定,石蜡包埋。将载玻片与抗人 FXR 的初级抗体在 4℃ 下孵育过夜,后在 25℃ 下与二级抗体孵育 1 h。根据染色强度和阳性细胞百分率对每个切片进行评分。染色强度评分如下:0(阴性)、1(弱染色)、2(中度染色)、3(强染色)。阳性细胞百分率评分如下:0(0%)、1(0%~10%)、2(10%~50%)、3(50%~80%)、4(>80%)。IHC 评分通过强度和百分率相乘得到。取 FXR 组织评分中位数作为低表达和高表达判断:<6,低表达;≥6,高表达。

1.3.2 qRT-PCR 分析

使用 TRIpure 试剂从组织或培养的细胞中提取总 RNA。使用 Super M-MLV 逆转录酶将总 RNA 逆转录为 cDNA。使用 2×Power Taq PCR MasterMix 和 SYBR green 在 Exicycler™96 荧光定量分析仪上进行 Quantitative Real-time PCR(qRT-PCR)。使用 U6 小核 RNA(U6 snRNA)作为内源性对照。依据 NCBI 上登录的靶基因序列并通过 primer 5.0 引物设计软件设计特异性引物序列如下:miR-21,正向 5'-GCGGCAGGGGAAAGTTCTA-3',反向 5'-GTG CAGGGTCCGAGGTATTC-3';U6,正向 5'-TGGAGT TGATCCTAGTCTGG-3',反向 5'-GTGCAGGGTCCG AGGTATTC-3'。经过 qRT-PCR 后,使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算目的基因的表达变化。

1.3.3 CCK-8 法

将 A549 细胞(5×10^3)接种到 96 孔板中,分为:对照组和不同浓度的 GW3965 处理组。不同浓度的 GW3965 组加入不同浓度的 GW3965($1 \sim 5 \mu\text{mol/L}$)或对照组加入相同体积的二甲基亚砜处理 48 h。然后,使用细胞计数试剂盒-8 检测细胞增殖情况。

1.3.4 细胞侵袭试验

使用 Transwell 方法进行细胞侵袭分析。将 1.3.3 项下经不同分组处理的 A549 细胞以每孔 4×10^5 的密度接种到 24 孔 Transwell 小室中,并在上室中加入 200 μL 无 FBS 的培养基。使用 500 μL 含 30%胎牛血清培养基填充底部孔。培养 24 h 后,用 70%乙醇处理和 0.5%结晶紫染色。在 BX51 显

镜下量化侵袭细胞的数量。随机选择五个区域,并在每个区域中统计细胞数。

1.3.5 Western blot 分析

用 RIPA 缓冲液裂解细胞提取总蛋白。通过 BCA 试剂盒评估蛋白质含量。采用 10% SDS-PAGE 电泳将蛋白质转移到 PVDF 膜上。将膜用 5%脱脂牛奶封闭 1 h,然后在 4℃ 下用以下一抗封闭过夜:FXR(1:1000)和 β -actin(1:1000)。将 PVDF 膜与二抗在室温下孵育 1 h。使用蛋白质印迹检测化学发光试剂盒观察目标条带。

1.3.6 细胞转染

取 A549 细胞,以每孔 5×10^4 个细胞接种于 24 孔板。然后用 lipofectamine 2000 转染试剂,分别将 miR-21 过表达物(pcDNA-miR-21, 50 nmol/L)或对照质粒 pcDNA3.1(pcDNA)和 miR-21 抑制剂(si-miR-21, 100 nmol/L)或阴性对照 siRNA(si-NC)转染入细胞。转染 24 h 后,收集细胞并分为 8 组:pcDNA+DMSO 组、pcDNA+GW3965 组、pcDNA-miR-21+DMSO 组、pcDNA-miR-21+GW3965 组、si-NC+DMSO 组、si-NC+GW3965 组、si-miR-21+DMSO 组、si-miR-21+GW3965 组。将细胞用 5 $\mu\text{mol/L}$ GW3965 或 DMSO 处理 0、24、48 和 72 h,收集细胞进行 CCK-8 法、Transwell 法分析。

1.3.7 双荧光素酶报告分析

合成含有 miR-21 靶点的 FXR 野生型(WT)或突变型(MUT),然后克隆到 pmir-GLO 载体中。将 1.5 μg pmirGLO-FXR-WT 或 pmirGLO-FXR-MUT 分别与 pcDNA-miR-21 和/或 si-miR-21 共转染 A549 细胞,孵育 24 h 后,用双荧光素酶报告系统测定荧光素酶活性。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 软件 17.0 进行统计分析。结果表示为平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)。使用 *t* 检验或 Mann-Whitney U 检验评估组之间的差异。使用卡方检验、Fisher's 精确检验和 Kaplan-Meier 方法(对数秩检验)进行相关分析和生存数据分析。NSCLC 组织中 FXR 与 miR-21 表达之间相关性采用 Spearman 相关分析。 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 FXR 低表达与 NSCLC 患者预后不良相关

FXR 蛋白位于细胞膜上(图 1A)。与邻近的非肿瘤正常组织相比,FXR 在 NSCLC 组织中的表达显

著降低 ($P<0.001$, 图 1B)。80 例患者中, 有 27 例 FXR 高表达, 53 例 FXR 低表达。Kaplan-Meier 分析显示 FXR 低表达预示 NSCLC 患者预后较差 ($\chi^2=4.496, P=0.033$, 图 1C), 提示 FXR 可能作为一种致癌因子参与 NSCLC 的发生和发展。研究进一步分析了 FXR 的表达与 NSCLC 患者临床病理特征的相关性。结果显示, FXR 高、低表达的 NSCLC 在临床分期、肿瘤大小、T 分期和淋巴结转移(N 分期)上有显著性差异 ($P<0.05$) (表 1)。

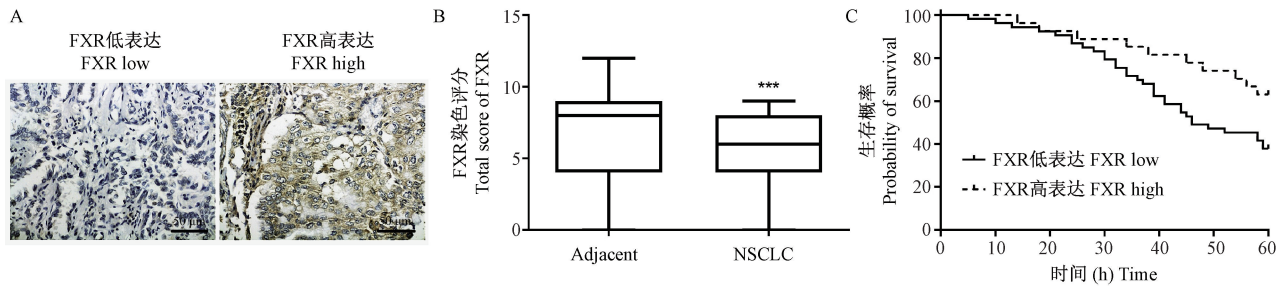
2.2 FXR 抑制 NSCLC 细胞增殖和侵袭

使用 Western blot 方法检测了 3 种 NSCLC 细胞系中的 FXR 蛋白, 发现 FXR 在 A549 细胞中的表达最低(图 2A), 因此, 研究选择 A549 细胞用于以下实验。Western blot 显示, GW3965 以剂量依赖方式促进了 A549 细胞中 FXR 的表达(图 2B)。功能实验表明, GW3965 以剂量依赖方式显著抑制了 A549

细胞的增殖和侵袭(图 2C、D)。所有这些结果表明 FXR 受体对细胞增殖和侵袭具有很强的抑制作用。

2.3 FXR 的激活通过下调 miR-21 抑制 NSCLC 细胞增殖和侵袭

使用 PCR 方法检测了 3 种 NSCLC 细胞系中的 miR-21, 发现 miR-21 在 A549 细胞中的表达最高(图 3A)。利用 GW3965 激活 FXR 可剂量依赖性地降低 miR-21(图 3B)。功能实验表明, miR-21 过表达显著逆转了 FXR 对 NSCLC 细胞生长和侵袭的抑制作用 ($P<0.05$), 并且 miR-21 沉默显著增强 FXR 对 NSCLC 细胞生长和侵袭的抑制作用 ($P<0.05$) (图 3C~H)。为了证实 FXR 与 miR-21 之间的关系, 研究进行了双重荧光素酶报告基因检测。图 4A 显示了分别包含预测的 miR-21 野生型和突变体结合位点的 FXR mRNA 的 3'-UTR (FXR 3'-UTR WT 和 FXR 3'-UTR MUT) (带突变的碱基标有下划线)。



注:A:FXR 高表达和低表达的代表性 IHC 染色图像;B:80 例患者 NSCLC 组织中 FXR 的染色评分与配对相邻组织的比较;C:Kaplan-Meier 生存分析比较 FXR 高表达和低表达 5 年生存率。与邻近组织相比, *** $P<0.001$ 。

图 1 FXR 低表达与 NSCLC 患者预后不良相关

Note. A, Typical IHC staining images with high and low FXR expression. B, Staining score of FXR in 80 patients with NSCLC was compared with that of paired adjacent tissues. C, Kaplan Meier survival analysis was used to compare the 5-year survival rate between FXR overexpression and low FXR expression. Compared with adjacent tissues, *** $P<0.001$.

Figure 1 Low FXR expression is associated with poor prognosis in NSCLC patients

表 1 根据 NSCLC 中 FXR 蛋白表达的临床病理特征

Table 1 Clinicopathologic characteristics according to FXR protein expression in NSCLC

组别	性别 Gender		年龄(岁) Age		分期 Stage		大小(cm) Size		T 分期 T stage		N 分期 N stage		M 分期 M stage	
	男 Male	女 Female	≤60	>60	I-II a	II b-IV	≥3	<3	T1	T2-T4	N0	N1-N3	M0	M1
FXR 低表达														
FXR low (n=53)	41(70.7)	12(54.5)	22(62.9)	31(68.9)	18(50.0)	35(79.5)	41(75.9)	12(46.2)	6(40.0)	47(72.3)	20(51.3)	33(80.5)	52(65.8)	1(100)
FXR 高表达														
FXR high (n=27)	17(29.3)	10(45.5)	13(37.1)	14(31.1)	18(50.0)	9(20.5)	13(24.1)	14(53.8)	9(60.0)	18(27.7)	19(48.7)	8(19.5)	27(34.2)	0
统计值														
Statistical value	1.859		0.320		7.730		6.957		5.689		7.625		-	
P 值														
P value	0.173		0.571		0.005		0.008		0.017		0.006		0.538	

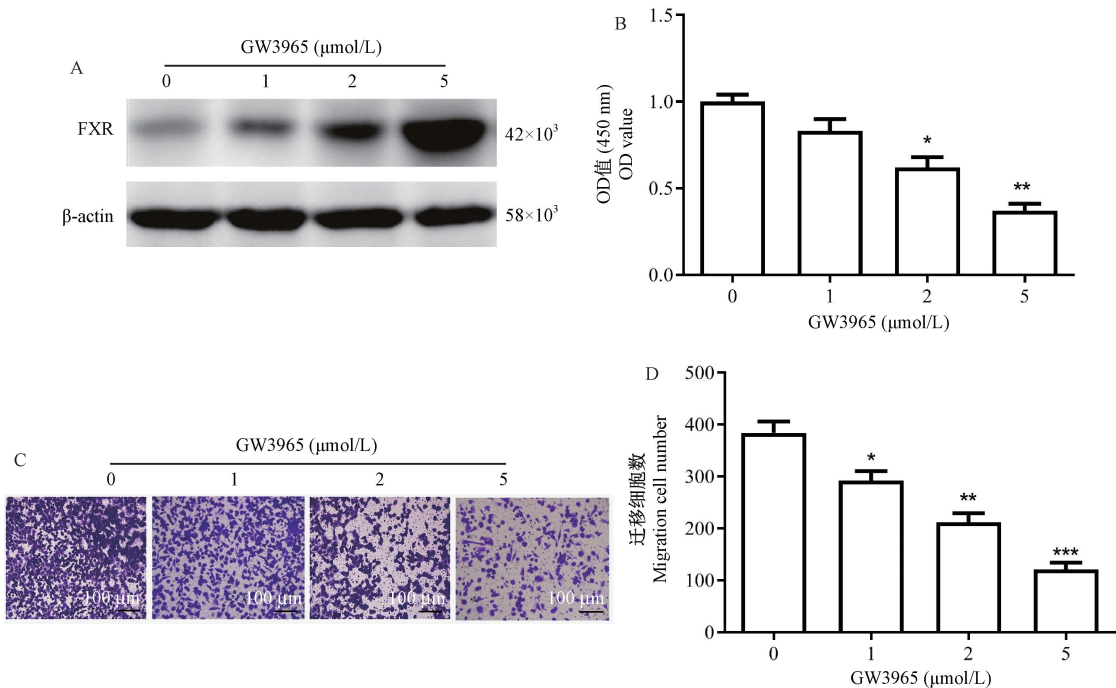
在 FXR 3' UTR WT 组中,与阴性对照转染细胞相比,pcDNA-miR-21 显著抑制 FXR 3' UTR WT 的荧光素酶活性($P<0.001$),si-miR-21 可显著减轻该抑制作用($P<0.01$)(图 4B)。这些结果表明,FXR 通过靶向 miR-21 来抑制 NSCLC 细胞增殖和侵袭。

2.4 FXR 过表达与 NSCLC 中 miR-21 呈反相关

研究进一步利用 qRFP-PCR 分析了 miR-21 在同一标本中的表达,以阐明 FXR 和 miR-21 在 NSCLC 中的关系。结果显示,NSCLC 组织中 miR-21 的水平显著高于邻近组织($P<0.01$,图 5)。将 80 例 NSCLC 组织分为两组:miR-21 高表达组(高于 miR-21 表达中位数, $n=40$)和低表达组(低于 miR-21 表达中位数, $n=40$)。Spearman 分析显示,NSCLC 标本中 FXR 与 miR-21 的表达呈强负相关($P<0.001$,表 2)。Kaplan-Meier 分析显示,“FXR 低表达”和“miR-21”高表达共存模式预测了 NSCLC 患者最差的预后($\chi^2=8.201$, $P=0.004$,图 6)。

3 讨论

NSCLC 约占肺癌的 85%,预后差,5 年总生存率低^[1]。因此,迫切需提高 NSCLC 的早期诊断水平。FXR 是核受体超家族的成员,在胆汁酸、胆固醇、脂质和葡萄糖代谢中起着关键作用^[10]。最近,人们发现 FXR 的功能超出了新陈代谢,包括炎症和致癌作用^[11];如 Hotta 等^[5]发现 FXR 在体外和体内对包括结肠直肠癌在内的多种癌症具有重要的抗癌作用;Alasmael 等^[4]发现 FXR 的激活会导致四种不同表型乳腺癌细胞系的细胞死亡:MCF-10A(正常)、MCF-7(受体阳性)、MDA-MB-231 和 MDA-MB-468(三重阴性)。本研究发现 FXR 在多个 NSCLC 细胞系中的表达低于 16HBE 正常细胞,在 NSCLC 组织中的表达较邻近组织下调,并且 FXR 低表达与 NSCLC 临床分期、肿瘤大小、T 分期和淋巴结转移(N 分期)显著相关。先前研究报道,FXR 激动剂

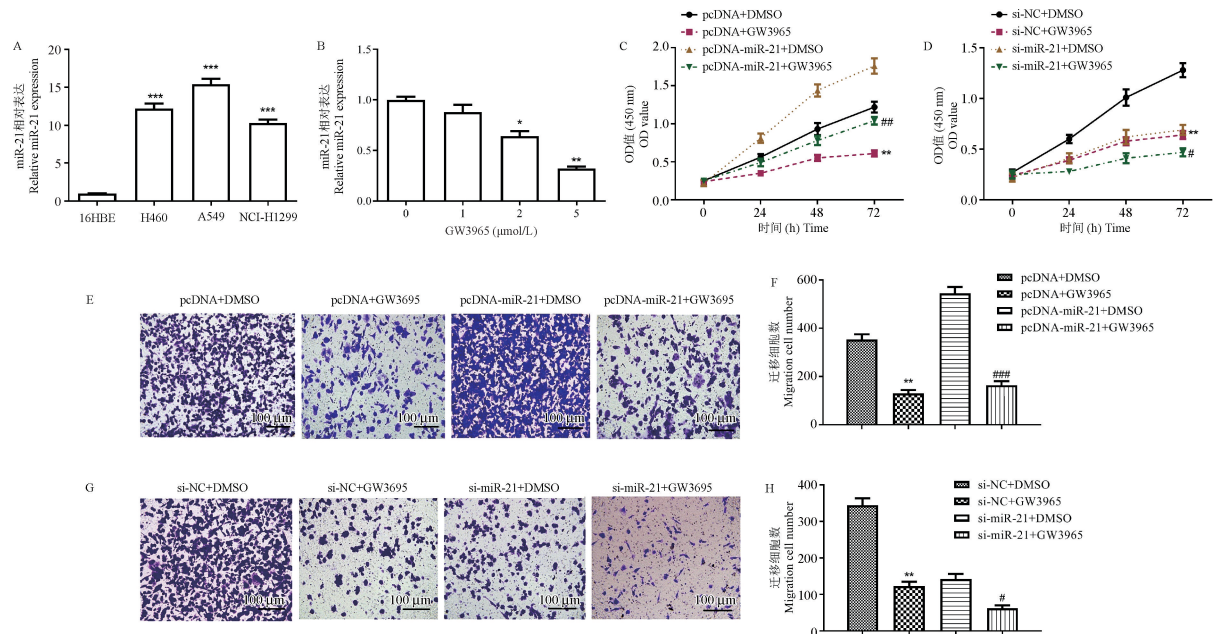


注:A:FXR 蛋白在不同类型 NSCLC 细胞系中的表达;B:不同浓度 GW3965 对 A549 细胞中 FXR 表达的影响;C:CCK-8 法检测不同浓度 GW3965 处理对 A549 细胞增殖的影响;D:Transwell 法检测不同浓度 GW3965 处理对 A549 细胞侵袭的影响。与 GW3965 0 μmol/L 相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图 2 FXR 抑制 NSCLC 细胞体外增殖

Note. A, Expression of FXR protein in different types of NSCLC cell lines. B, Effects of different concentrations of GW3965 on FXR expression in A549 cells. C, Proliferation of A549 cells was detected by CCK-8 method. D, Transwell assay was used to detect the effect of GW3965 on the invasion of A549 cells. Compared with GW3965 0 μmol/L, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 2 FXR inhibited the proliferation of NSCLC cells in vitro

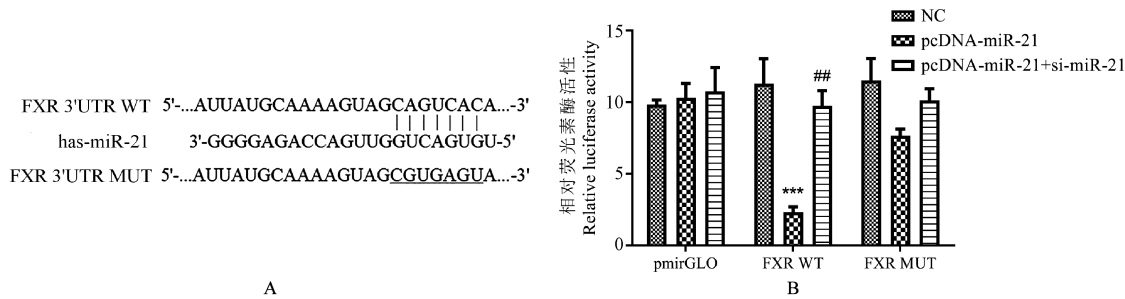


注:A:miR-21 在不同类型 NSCLC 细胞系中的表达;与 16HBE 相比,*** $P<0.001$;B:不同浓度 GW3965 对 A549 细胞中 miR-21 表达的影响;与 GW3965 0 $\mu\text{mol/L}$ 相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;C:转染对照质粒 pcDNA3.1 (pcDNA) 或 miR-21 表达质粒 (pcDNA-miR-21) 24 h 后,用 DMSO 或 5 $\mu\text{mol/L}$ GW3965 处理 A549 细胞的存活率;D:转染 miR-21 siRNA (si-miR-21) 或阴性对照 siRNA (si-NC) 24 h 后,用 DMSO 或 5 $\mu\text{mol/L}$ GW3965 处理 A549 细胞的存活率;E~F:Transwell 法检测 pcDNA-miR-21 转染对 GW3965 处理的 A549 细胞侵袭影响;G~H:Transwell 法检测 si-miR-21 转染对 GW3965 处理的 A549 细胞侵袭影响。与 pcDNA+DMSO 组或 si-NC+DMSO 组相比,** $P<0.01$;与 pcDNA-miR-21+DMSO 组或 si-miR-21+DMSO 组相比,# $P<0.05$,### $P<0.01$,#### $P<0.001$ 。

图 3 FXR 通过下调 miR-21 抑制 NSCLC 细胞的增殖和侵袭

Note. A, Expression of miR-21 in different types of NSCLC cell lines. Compared with 16HBE, *** $P<0.001$. B, Effect of different concentrations of GW3965 on the expression of miR-21 in A549 cells. Compared with GW3965 0 $\mu\text{mol/L}$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. C, Survival rate of A549 cells treated with DMSO or 5 $\mu\text{mol/L}$ GW3965 after 24 h transfection of the control plasmid pcDNA3.1 (pcDNA) or miR-21 expression plasmid (pcDNA-miR-21). D, Survival rate of A549 cells treated with DMSO or 5 $\mu\text{mol/L}$ GW3965 after 24 h transfection with miR-21 siRNA (si-miR-21) or negative control siRNA (si-NC). E~F, Transwell method was used to detect the effect of pcDNA-miR-21 transfection on the invasion of A549 cells treated with GW3965. G~H, Transwell method was used to detect the effect of si-miR-21 transfection on the invasion of A549 cells treated with GW3965. Compared with pcDNA + DMSO group or si-NC + DMSO group, ** $P<0.01$. Compared with pcDNA + miR-21+DMSO group or si-miR-21+DMSO group, # $P<0.05$, ### $P<0.01$, #### $P<0.001$.

Figure 3 FXR inhibits the proliferation and invasion of NSCLC cells by down-regulating miR-21

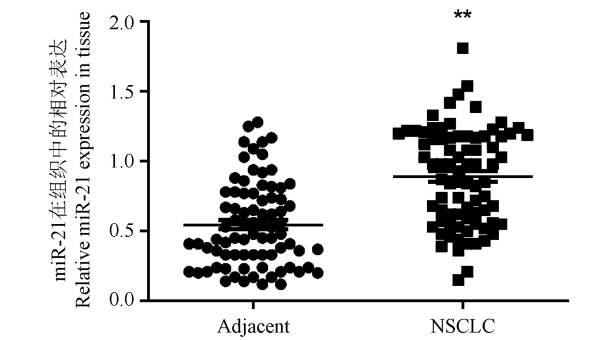


注:A:miR-21 在 FXR 的 WT 3' UTR 和 MUT 3' UTR 中的预测结合位点(突变碱基被划线);B:在 pcDNA-miR-21 和 si-miR-21 联合存在下,将荧光素酶报告质粒 pmirGLO-FXR-WT 或 pmirGLO-FXR-MUT 转染 A549 细胞 24 h,然后测定荧光素酶活性。与 NC 组相比,*** $P<0.001$;与 pcDNA+miR-21 相比,### $P<0.01$ 。

图 4 FXR 直接与 miR-21 相互作用

Note. A, Predicted binding sites of miR-21 in the WT 3' UTR and MUT 3' UTR of FXR (mutated bases were underlined). B, In the combined presence of pcDNA-miR-21 and si-miR-21, the luciferase reporter plasmid pmirGLO-FXR-WT or pmirGLO-FXR-MUT was transfected into A549 cells for 24 h, and then the luciferase activity was measured. Compared with NC group, *** $P<0.001$. Compared with pcDNA+miR-21, ### $P<0.01$.

Figure 4 FXR directly interacted with miR-21



注:与邻近组织相比,** $P<0.01$ 。

图 5 80 例患者 NSCLC 组织中 miR-21 表达与配对相邻组织的比较

Note. Compared with adjacent tissues, ** $P<0.01$.

Figure 5 Comparison of miR-21 expression in NSCLC tissues of 80 patients with paired adjacent tissues

表 2 NSCLC 中 FXR 与 miR-21 表达的相关性分析

Table 2 Correlation analysis of FXR and miR-21 expression in NSCLC

NSCLC 组织 NSCLC tissue	miR-21		合计 Total	r	P
	低表达 Low	高表达 High			
	expression	expression			
FXR 高表达 FXR high	11	16	27	-0.454	<0.001
FXR 低表达 FXR low	29	24	53		
合计 Total	40	40	80		

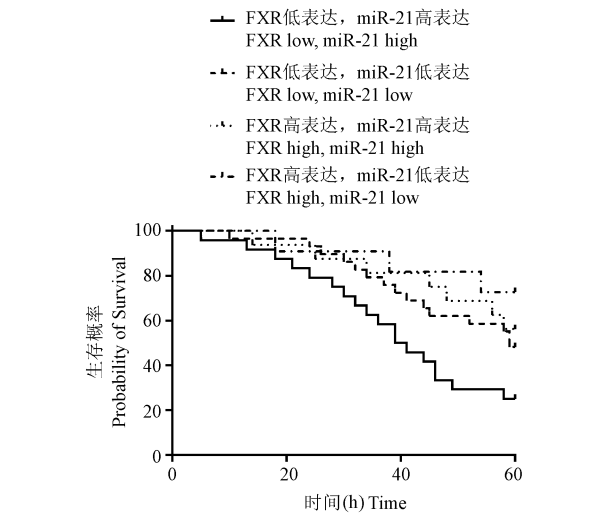


图 6 Kaplan-Meier 分析显示 FXR 低表达和 miR-21 高表达患者的预后最差

Figure 6 Kaplan Meier analysis showed that patients with low FXR expression and high miR-21 expression had the worst prognosis

GW3965 治疗通过激活不同荷瘤小鼠 MDSCs 表面的 ApoE-LRP8 受体引起 MDSCs 凋亡,从而降低 MDSCs 对 T 细胞的抑制作用,发挥抗肿瘤作用^[12]。本研究功能分析表明,利用 GW3965 上调 NSCLC 细胞中 FXR 的表达抑制了 A549 细胞的增殖和侵袭,提示 FXR 可能参与了 NSCLC 的发生发展,并可作为治疗 NSCLC 的一种新的临床分子标记物。

接下来,本研究试图揭示 FXR 在 NSCLC 发生发展中的调控机制。大量研究表明,miRNA 在癌症发展中起着关键作用^[2]。miRNA 作为小的非编码 RNA,可以通过靶向 mRNAs 来调节基因的表达^[13]。因此,miRNAs 通过参与多种与癌症相关的生物学过程,如细胞增殖和凋亡,被证明是肿瘤的癌基因和抑制因子^[14]。先前在 NSCLC 的 miRNA 研究表明,miRNA 具有独特的致癌作用,如 miRNA-615-3p 通过抑制 IGF2 抑制 NSCLC 的肿瘤生长和转移^[15]; miR-129 通过靶向 SOX4 抑制 A549 细胞的迁移和侵袭^[16]。最近,FXR 被报道通过与 3' UTR 结合来调节 miR-21 的表达^[9]。miR-21 在调节癌细胞行为和恶性肿瘤中起着重要作用,并且还可以促进肝癌细胞生长,诱导胶质母细胞瘤细胞抗凋亡特性^[17]。此外,miR-21 在 NSCLC 细胞的生长、侵袭和凋亡中起重要作用^[2]。为了解释 FXR 的异常表达,预测 miR-21 可能是 FXR 的候选调控因子。结果表明,miR-21 在人 NSCLC 中过度表达,而利用 GW3965 激活 FXR 可降低 miR-21,并且 miR-21 过表达逆转了 FXR 对 NSCLC 细胞生长和侵袭的抑制作用。进一步通过荧光素酶报告显示 miR-21 与 FXR 的 3' UTR 结合位点相结合,证实了本研究发现。以上证据表明,miR-21 是一种致癌的 miRNA,FXR 通过靶向 miR-21 来抑制 NSCLC 细胞增殖和侵袭。本研究还发现 NSCLC 标本中 FXR 和 miR-21 的表达呈强负相关,并且“FXR 低表达”和“miR-21 高表达”共存模式预测了 NSCLC 患者最差的预后。基于这些研究结果,FXR 激动剂 GW3965 在 miR-21 过度表达的 NSCLC 患者中具有潜在的临床应用价值,以减轻 miR-21 的有害影响。需要进一步的临床前和临床研究证实这一观点。

综上所述,本研究揭示了 FXR 通过下调 miR-21 抑制 NSCLC 细胞的生长,提示调控 FXR/miR-21 可能是治疗 NSCLC 的潜在策略。本研究为 FXR 参与 NSCLC 的发生发展提供了一个新的视角。

参考文献:

- [1] 李伟婷, 李永文, 张洪兵, 等. 基于 TCGA 数据库的中央型与周围型肺鳞癌基因表达差异性研究 [J]. 中国肺癌杂志, 2019, 22(5): 280-288.
- [2] 李军, 刘庆云, 辛江泽. miR-21 高表达对非小细胞肺癌患者整体生存率影响的 Meta 分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(11): 5193-5197.
- [3] 刘维伊, 孙建国, 曹伟灵, 等. 法尼醇 X 受体拮抗剂及药理活性研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2020, 25(7): 764-774.
- [4] Alasmael N, Mohan R, Meira LB, et al. Activation of the Farnesoid X-receptor in breast cancer cell lines results in cytotoxicity but not increased migration potential [J]. Cancer Lett, 2016, 370(2): 250-259.
- [5] Hotta M, Sakatani T, Ishino K, et al. Farnesoid X receptor induces cell death and sensitizes to TRAIL-induced inhibition of growth in colorectal cancer cells through the up-regulation of death receptor 5 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 519(4): 824-831.
- [6] 林先勇. microRNAs 与肺癌患者放疗敏感性的研究进展 [J]. 肿瘤学杂志, 2019, 25(5): 394-397.
- [7] Moller T, James JP, Holmström K, et al. Co-detection of miR-21 and TNF- α mRNA in budding cancer cells in colorectal cancer [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(8): 1907.
- [8] Bica-Pop C, Cojocneanu-Petric R, Magdo L, et al. Overview upon miR-21 in lung cancer: focus on NSCLC [J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(19): 3539-3551.
- [9] Rodrigues PM, Afonso MB, Simão AL, et al. miR-21 ablation and obeticholic acid ameliorate nonalcoholic steatohepatitis in mice [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(4): e2748.
- [10] 曲超, 石岩, 杨宇峰. 基于知识图谱的法尼醇 X 受体在糖尿病领域国际研究现状分析 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(9): 2290-2294, 2320-2321.
- [11] 赵明亮, 赵爱华, 郑晓皎, 等. 肠道法尼醇 X 受体对糖脂代谢调节作用的研究进展 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2019, 39(6): 672-677, 671.
- [12] Tavazoie MF, Pollack I, Tanqueco R, et al. LXR/ApoE activation restricts innate immune suppression in cancer [J]. Cell, 2018, 172(4): 825-840.
- [13] 朱登彦, 余畅, 杨洋, 等. 长链非编码 RNA 结直肠癌差异表达基因靶向微小 RNA-384 对肺癌 SPC-A1 细胞侵袭和迁移的影响 [J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36(7): 1221-1224.
- [14] 许有忠, 田作春, 李才. MicroRNA-204 在非小细胞肺癌患者组织中的表达及对癌细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(4): 57-61.
- [15] Liu J, Jia Y, Jia L, et al. MicroRNA 615-3p inhibits the tumor growth and metastasis of NSCLC via inhibiting IGF2 [J]. Oncol Res, 2019, 27(2): 269-279.
- [16] Cao B, He XF, Xu WZ, et al. The effect of microRNA-129 on the migration and invasion in NSCLC cells and its mechanism [J]. Exp Lung Res, 2018, 44(6): 280-287.
- [17] Liu H, Cheng L, Cao D, et al. Suppression of miR-21 expression inhibits cell proliferation and migration of liver cancer cells by targeting phosphatase and tensin homolog (PTEN) [J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 3571-3577.

[收稿日期]2020-08-28