

王江波,梁皓,陆允平. miR-218-5p 靶向 EGLN3 抑制肺腺癌增殖、迁移和侵袭 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 57-67.
Wang JB, Liang H, Lu YP. miR-218-5p inhibits proliferation migration and invasion by lung adenocarcinoma cells by targeting EGLN3 [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 57-67.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.008

miR-218-5p 靶向 EGLN3 抑制肺腺癌增殖、迁移和侵袭

王江波¹, 梁皓^{1*}, 陆允平²

(1.濮阳市人民医院心胸外科,河南 濮阳 457001;2.金华市中心医院心胸外科,浙江 金华 321000)

【摘要】 目的 微小 RNA (microRNAs, miRNA) 参与了多种癌症的发生发展,有研究证明微小 RNA-218-5p (microRNA-218-5p, miR-218-5p) 在癌症的发展中发挥着重要作用。然而, miR-218-5p 影响肺腺癌 (lung adenocarcinoma, LUAD) 发展的具体机制尚未明确。**方法** 通过癌症基因组图谱 (the cancer genome atlas, TCGA) 数据分析肺腺癌组织中 miR-218-5p 的表达情况,实时荧光定量 PCR (quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 miR-218-5p 和 EGLN3 在人肺正常细胞系和人肺腺癌细胞系中的表达。蛋白质印迹法 (Western blot) 检测 miR-218-5p 对 AKT/mTOR 信号通路关键蛋白表达的影响以及细胞中 EGLN3 的蛋白表达。使用生物信息学方法预测并通过荧光素酶报告基因检测证实 miR-218-5p 与 EGLN3 的靶向关系。细胞活力和细胞毒性检测 (cell counting kit-8, CCK-8)、细胞克隆形成、细胞划痕、Transwell 实验检测 miR-218-5p 与 EGLN3 对肺腺癌细胞功能的影响。**结果** miR-218-5p 在肺腺癌中低表达,过表达 miR-218-5p 可抑制肺腺癌细胞的增殖、迁移与侵袭,并抑制 AKT/mTOR 信号通路的激活。miR-218-5p 的下游靶基因 EGLN3 在肺腺癌中高表达。过表达 EGLN3 减弱了 miR-218-5p 过表达对肺腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用。**结论** miR-218-5p 靶向下调 EGLN3 抑制肺腺癌细胞的增殖、迁移与侵袭,这些结果为肺腺癌的新治疗方法和检测手段的开发提供了新的参考依据。

【关键词】 miR-218-5p;EGLN3;肺腺癌;增殖;迁移;侵袭

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 11-0057-11

miR-218-5p inhibits proliferation, migration and invasion by lung adenocarcinoma cells by targeting EGLN3

WANG Jiangbo¹, LIANG Hao^{1*}, LU Yunping²

(1. Department of Cardiothoracic Surgery, Puyang People's Hospital, Puyang 457001, China.

2. Department of Cardiothoracic Surgery, Jinhua Central Hospital, Jinhua 321000)

【Abstract】 Objective MicroRNAs are involved in the occurrence and development of many cancers, and microRNA-218-5p (miR-218-5p) has been proven to play an important role in cancer development. However, the specific mechanism of miR-218-5p's effect on the development of lung adenocarcinoma (LUAD) has not been clarified. **Methods** The expression of miR-218-5p in LUAD tissues was analyzed in TCGA data, and the mRNA expression of miR-218-5p and EGLN3 in human lung normal and human LUAD cell lines was detected by qRT-PCR. Western blot was used to detect the protein expression levels of key AKT/mTOR signaling pathway proteins and EGLN3 in tumor cells. The microRNA-target relationship between miR-218-5p and EGLN3 was predicted by bioinformatics method and confirmed by luciferase reporter gene detection. The roles of miR-218-5p and EGLN3 in LUAD were measured by CCK-8, colony formation, scratch

[基金项目] 金华市科学技术局(2021-3-042)。

[作者简介] 王江波(1976—),男,本科,副主任医师,研究方向:肺腺癌的临床治疗。E-mail:wjb7148@163.com

[通信作者] 梁皓(1973—),男,硕士,副主任医师,研究方向:肺腺癌的临床治疗。E-mail:kjajfj_9824@163.com

healing, and Transwell assays. **Results** miR-218-5p was underexpressed in LUAD. Overexpression of miR-218-5p inhibited the proliferation, migration and invasion of LUAD cells and the activation of the AKT/mTOR signaling pathway. EGLN3 was the downstream target gene of miR-218-5p, which was highly expressed in LUAD. Overexpression of EGLN3 weakened the inhibitory effect of miR-218-5p on proliferation, migration and invasion by LUAD cells. **Conclusions** miR-218-5p inhibited proliferation, migration, and invasion in LUAD cells by negatively affecting EGLN3 expression.

【Keywords】 miR-218-5p; EGLN3; lung adenocarcinoma; proliferation; migration; invasion

在世界范围内,肺癌(lung cancer)是致死率最高的实体瘤之一,其中大约 95% 的肺癌病例可以被分为非小细胞肺癌(non-small-cell lung carcinoma, NSCLC)和小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)^[1]。NSCLC 又进一步分为鳞状细胞癌、腺癌和大细胞癌三种类型^[2],其中肺腺癌是最常见的类型,大约占肺癌的 40%^[2]。对早期肺腺癌患者来说,手术配合放化疗能显著提高患者的 5 年存活率(依据临床 stage 分期,IA 期、IB 期、IIA 阶段和 IIB 阶段患者的 5 年生存率分别为 83%、68%、60%、53%)^[3]。但是晚期肺腺癌患者几乎难以以同种手段治疗,其 5 年生存率大约仅 10%^[4],因此近年来肺癌的免疫治疗、靶向治疗等手段成为研究热点。目前研究的重中之重在于找到安全高效的治疗方法,研究肺癌的发生和发展机制,以提供合适的治疗靶标。

微小 RNA(microRNAs, miRNAs)是一种短的非编码单链 RNA 分子,长度约为 22 个核苷酸序列,miRNAs 通过与转录本中的互补位点结合来调节靶基因的表达,从而导致翻译抑制或转录降解^[5]。大量研究证明 miRNA 参与了细胞的增殖、发育、凋亡、代谢和形态发生,并且与多种癌症的发生相关^[6]。例如,miR-216b 被证实通过沉默 KRAS 抑制胰腺癌细胞进展和促进胰腺癌细胞凋亡^[7];miR-518 通过靶向 MDM2 基因促进胃癌细胞凋亡和抑制胃癌细胞发展^[8];miR-451a 通过靶向 ATF2 抑制非小细胞肺癌的细胞迁移和侵袭^[9]。miR-218-5p 作为一种抑制肿瘤恶性进展的 miRNA,在多种肿瘤中低表达,miR-218-5p 在前列腺癌组织中低表达并且能够通过同时靶向 TRAF1、TRAF2 和 TRAF5 削弱前列腺癌细胞的侵袭和融合能力^[10];miR-218-5p 通过靶向结合 Cx43 参与乳腺癌细胞的细胞增殖和迁移过程^[11];miR-218-5p 可以抑制胶质瘤的发病机制和发展,降低细胞的增殖和侵袭能力以及阻碍 EMT(epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[12];miR-218-5p 抑制人类视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB)细胞的生存能力,以及抑制 AKT/mTOR 信号通

路^[13];miR-218-5p 在 LUAD 组织中低表达并且可能通过雌激素信号通路影响 LUAD 进程^[14]。我们还发现 miR-218-5p 通过调控 EGFR 在非小细胞肺癌中发挥抑制肺癌细胞增殖和迁移的作用^[15]。在非小细胞肺癌中 miR-218-5p 是一种潜在的肿瘤抑制因子^[16],但 miR-218-5p 影响 LUAD 进展的确切分子机制仍然需要进一步的研究。

在本研究中我们发现 miR-218-5p 在肺腺癌组织和细胞中低表达。结合前人在其他癌种的研究,我们推测 miR-218-5p 可能在肺腺癌的发生发展中也发挥着重要的抑癌作用,并且很有可能与 AKT/mTOR 信号通路相关。随后,我们进一步筛选了 miR-218-5p 下游靶基因并通过体外实验验证了 miR-218-5p 对其靶基因的调控机制。本研究为寻找肺腺癌的靶向诊断和治疗的新方法提供一定的依据。

1 材料和方法

1.1 细胞

研究所用的人肺上皮细胞系 BEAS-2B 细胞(BNCC254518)和人肺腺癌细胞 A549 细胞(BNCC290808)、A-427 细胞(BNCC263315)、Calu-3 细胞(BNCC294106)、PC-9(BNCC341852)均购自北纳生物(中国)。

1.2 主要试剂与仪器

10% 胎牛血清(16140089,美国 Gibco 公司);1% 的青霉素/链霉素(15140163,美国 Gibco 公司);BEGM(CC-3170,瑞士 Lonza 公司);F-12K(11765054,美国 Gibco 公司);EMEM(30-2003,美国 Model Culture Institute 公司);RPMI-1640(11875093,美国 Gibco 公司);TRIzol(15596026,美国 Thermo Fisher Scientific 公司);MiRNA 逆转录 PCR 试剂盒(RR047A,中国宝日医生物技术公司);SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒(RR820A,中国宝日医生物技术公司);CCK-8 试剂(C0038,中国生物技术有限公司);基质胶(356234,美国 Becton Dickinson 公司);RIPA 缓冲液(89900,美国 Thermo

Fisher Scientific 公司); BCA 蛋白检测试剂盒 (23225, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 超敏化学发光试剂 (WB7106, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 海肾荧光素酶表达载体 pRL-TK (VT1568, 中国友宝生物公司); Lipofectamine 2000 (11668019, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 双荧光素酶检测试剂盒 (HY-K1013, 美国 MCE 公司); EGLN3、AKT、P-AKT、MTOR、P-mTOR、GAPDH 及羊抗兔 IgG 均购于英国 Abcam 公司, 货号 ab184714、ab8805、ab81283、ab134903、ab109268、ab9485、ab6721。恒温培养箱、Nanodrop 2000 分光光度计、ABI 7500 实时 PCR 仪, 酶标仪均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 显微镜购自日本 Olympus 公司; 化学发光仪购自美国 General Electric 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

人肺上皮细胞系 BEAS-2B 细胞在添加了 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 BEGM 中培养; A549 细胞在添加了 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 F-12K 中培养, A-427 细胞系和 Calu-3 细胞系在添加了 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 EMEM 中培养; PC-9 细胞系在添加了 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 RPMI-1640 中培养, 细胞均在 37℃, 5% CO₂ 的恒温培养箱中培养。

1.3.2 生信分析

从 TCGA 数据库下载 TCGA-LUAD 的 miRNA 成熟体 (癌旁样本 46 个, 癌变样本 521 个) 和 mRNA (癌旁样本 59 个, 癌变样本 535 个) 的表达量数据, 从 GEO 数据库下载 LUAD 的 miRNA (数据集编号: GSE36681, 癌旁样本 103 个, 癌变样本 103 个) 的表达量数据。科研人员基于下载数据对 miR-218-5p 进行表达量分析。利用 EdgeR 对 mRNA 进行差异分析 ($|\log_{2}FC| > 3.0$, $padj < 0.01$) 获得异常表达基因 (differentially expressed genes, DEGs)。利用 TargetScan、starBase、miRDIP 和 miRDB 数据库对目标 miR-218-5p 进行靶向预测并与上调 DEGs 取交集。将得到的候选基因与 miR-218-5p 进行 Pearson 相关性分析, 选取负相关性最高的 mRNA 作为研究对象。同时, 对靶标 mRNA 进行预后分析。

1.3.3 RNA 提取和实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

使用 TRIzol 试剂从培养的细胞中提取总 RNA。使用 Nanodrop 2000 分光光度计对总 RNA 进行质量评估和定量。使用 miRNA 逆转录 PCR 试剂盒和

mRNA 逆转录 PCR 试剂盒分别合成 DNA。使用 SYBR-Green PCR Master Mix 试剂盒分析不同基因的相对表达。qRT-PCR 反应使用 ABI 7500 Real-time PCR 系统。miRNA 以 U6 作为内参基因, mRNA 以 GAPDH 作为内参基因, 结果使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值进行归一化处理。引物序列如下表 1 所示。

1.3.4 CCK-8 分析

将制备好的肺腺癌单细胞悬液接种到 96 孔板中, 每个孔接种 2000 个细胞, 培养液体积 100 μ L。放置在培养箱中培养, 分别在培养 0、24、48、72、96 h 时加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液并在 37℃ 和 5% CO₂ 的培养箱中孵育 2 h, 使用酶标仪在 450 nm 波长下分别检测各时间点的吸光度。

1.3.5 细胞克隆

转染后将细胞 (每毫升 500 个) 接种到 12 孔板中。培养 10~14 d 后, 使用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 结晶紫染色 15 min, 显微镜下观察。统计每个孔的细胞数量, 进一步统计分析。

1.3.6 划痕愈合实验

将制备好的肺腺癌单细胞悬液接种到 6 孔板中, 每孔接种细胞悬液 2 mL (每毫升 5×10^5 个)。细胞生长到铺满孔底后, 用 200 μ L 的枪头划出一条经过孔底中心的直线痕迹, 用 PBS 洗去刮擦下来的细胞, 拍照并记录划痕的宽度 (μ m), 弃掉 PBS 并加入不含 FBS 的基础培养基, 然后将 6 孔板放置在细胞培养箱中 24 h。弃掉培养基加入 PBS 清洗。然后拍照记录 24 h 的划痕宽度 (μ m)。统计 0 h 和 24 h 的划痕宽度并计算划痕愈合率。计算公式: 划痕愈合率 (%) = (0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度。

1.3.7 Transwell 侵袭实验

将胰蛋白酶消化下来的细胞经过 PBS 洗涤后, 用无血清培养基重悬。在底部涂有基质胶的小室中接种 1×10^4 个细胞, 含有 10% FBS 的培养基添加到下室中。24 h 后, 用棉签轻轻将未侵袭的细胞从

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of qRT-PCR

基因 Genes	引物序列 (5' → 3') Primer sequence (5' → 3')
miR-218-5p	F: CGCAGTTGTGCTTGATCT
	R: TCCAGTTTTTTTTTTTTTTTACATGCT
U6	F: CTCGCTTCGGCAGCACA
	R: AACGCTTCACGAATTTGCGT
EGLN3	F: TCAAGGAGAGGCTAAGGCAA
	R: ATGCAGGTGATGCAGCGA
GAPDH	F: CCCCTTCATTGACCTCAACTACAT
	R: CGCTCCTGGAAGATGCTGA

小室底膜的上表面去除, PBS 洗去残留的培养基后用 0.5% 结晶紫染色, PBS 洗涤。在显微镜下随机选取 5 个视野观察并拍照, 计数穿膜细胞数。

1.3.8 蛋白免疫印迹

向 RIPA 缓冲液中加入蛋白酶抑制剂, 进而裂解肺腺癌细胞。使用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。将等量的蛋白用 10% SDS-PAGE 分离, 蛋白质电泳后转移到 PVDF 膜上; 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h; 在 4℃ 条件下兔抗 EGLN3 (1 : 2000)、AKT (1 : 500)、p-AKT (1 : 5000)、mTOR (1 : 10000)、p-mTOR (1 : 1000) 和 GAPDH (1 : 2500) 孵育过夜; TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 5 min; 加入加辣根过氧化物酶标记的二抗 IgG H&L (1 : 2000) 室温孵育 1 h; TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 5 min, 在 PVDF 膜表面添加超敏化学发光试剂并在化学发光仪扫描显影。

1.3.9 双荧光素酶检测

由广州复能基因有限公司合成了含有野生型 (WT) EGLN3-3'-UTR 序列 (EGLN3-WT) 和突变型 (MUT) EGLN3-3'-UTR 序列 (EGLN3-Mut) 的质粒。海肾荧光素酶表达载体 pRL-TK 作为内参。将构建的质粒分别与 miR-218-5p mimic 或 mimic NC 共同转染到 PC-9 细胞中, 转染试剂为 Lipofectamine 2000。转染 36 h 后, 使用双荧光素酶检测试剂盒在化学发光仪上进行荧光素酶活性检测。

1.4 统计学方法

使用 GraphPad Prism 8.0 分析所有数据, 并将每个实验重复 3 次。结果以平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$)

的形式表示, 两组间的方差显著性采用 *t* 检验, 多组间的方差显著性采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

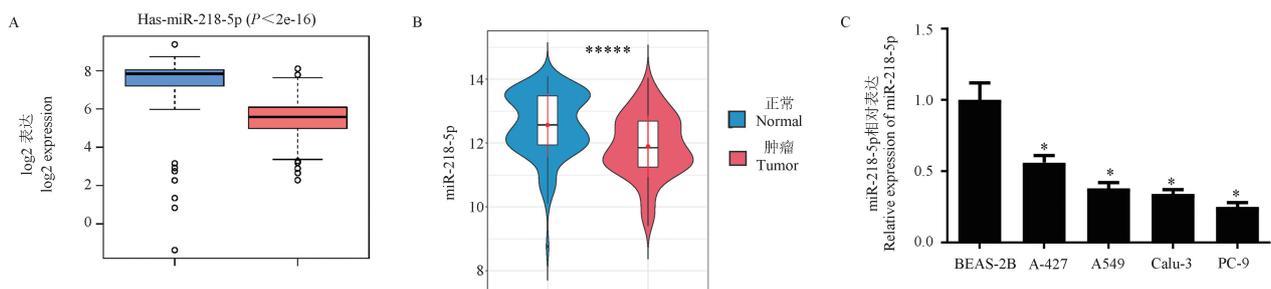
2 结果

2.1 miR-218-5p 在肺腺癌中显著低表达

从 TCGA 数据库和 GEO 数据库 (GSE36681) 下载 LUAD 的 miRNA 成熟体, 基于下载数据对 miR-218-5p 进行表达量的分析, 结果显示 miR-218-5p 在肺腺癌组织中显著低表达 (图 1A、图 1B)。随后我们研究了 miR-218-5p 在正常人肺上皮细胞系和肺腺癌细胞系中的表达情况, 结果显示相比于正常人肺上皮细胞系, 肺腺癌细胞系中的 miR-218-5p 的表达明显下降 ($P < 0.05$) (图 1C)。这些结果表明 miR-218-5p 在肺腺癌中低表达, 同时在后续实验中我们将选择 miR-218-5p 表达相对较低的 PC-9 细胞系进行体外细胞实验的验证。

2.2 过表达 miR-218-5p 抑制肺腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭

前面已经证实了 miR-218-5p 在肺腺癌中低表达, 随后为了进一步验证 miR-218-5p 对肺腺癌细胞功能的影响, 我们设计了一系列细胞功能实验。首先在肺腺癌 PC-9 细胞中分别转染 mimic NC 和 miR-218-5p mimic, 并用 qRT-PCR 检测转染效率, 结果显示相比于 mimic NC 组, miR-218-5p mimic 组细胞 miR-218-5p 表达明显上升 ($P < 0.05$) (图 2A), 这说明 miR-218-5p mimic 可用于之后的实验。使用



注: A: miR-218-5p 在 TCGA 数据库癌旁组织和癌变组织中的表达情况, 蓝色代表癌旁组织, 红色代表癌变组织; B: miR-218-5p 在 GEO 数据库癌旁组织和癌变组织中的表达情况, 蓝色代表癌旁组织, 红色代表癌变组织; C: qRT-PCR 检测人肺上皮细胞系 BEAS-2B 和肺腺癌细胞 A-427、A549、Calu-3、PC-9 中 miR-218-5p 表达水平。与 BEAS-2B 组相比, * $P < 0.05$; 与正常组相比, **** $P < 0.001$ 。

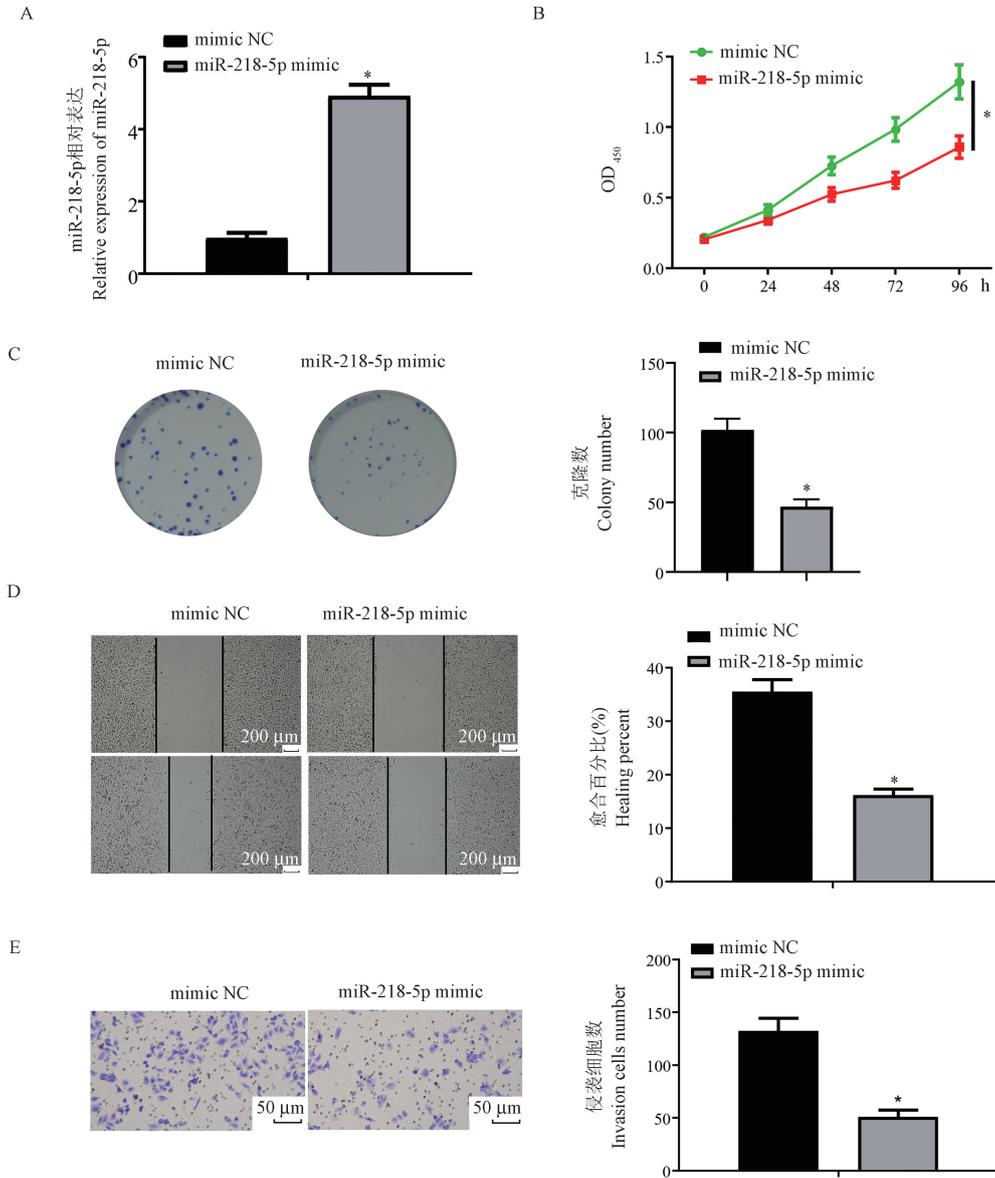
图 1 肺腺癌中 miR-218-5p 显著低表达

Note. A, Expression of miR-218-5p in adjacent and cancerous tissues in TCGA database, blue represented adjacent tissues, and red represented cancerous tissues. B, Expression of miR-218-5p in adjacent and cancerous tissues in GEO database, blue represented adjacent tissues, and red represented cancerous tissues. C, Expression levels of miR-218-5p in human lung epithelial cell line BEAS-2B and lung adenocarcinoma cells A-427, A549, Calu-3 and PC-9 were detected by qRT-PCR. Compared with BEAS-2B group, * $P < 0.05$. Compared with the normal group, **** $P < 0.001$.

Figure 1 miR-218-5p was significantly low expression in lung adenocarcinoma

CCK8 实验和细胞克隆形成实验检测细胞的增殖能力,结果显示过表达 miR-218-5p 后细胞增殖能力被显著抑制($P<0.05$) (图 2B、图 2C)。细胞划痕实验和 Transwell 实验分别检测了过表达 miR-218-5p 对

细胞迁移和侵袭的影响,结果显示过表达 miR-218-5p 后细胞的迁移和侵袭能力显著减弱($P<0.05$) (图 2D、图 2E)。由此,我们认为 miR-218-5p 在肺腺癌细胞 PC-9 的增殖和转移过程发挥抑制作用。



注:A:qRT-PCR 检测转染后各组肺腺癌细胞中 miR-218-5p 的表达量;B、C,CCK-8 增殖实验和克隆形成实验检测 PC-9 细胞转染 mimic NC/miR-218-5p mimic 后增殖能力的变化;D:划痕实验检测 PC-9 细胞转染 mimic NC/miR-218-5p mimic 后细胞迁移能力的变化;E: Transwell 实验检测 PC-9 细胞转染 mimic NC/miR-218-5p mimic 后细胞侵袭能力的变化。与 mimic NC 组相比, * $P<0.05$ 。

图 2 过表达 miR-218-5p 抑制肺腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭

Note. A, qRT-PCR was used to detect the expression of miR-218-5p in each group of lung adenocarcinoma cells after transfection. B/C, CCK-8 proliferation assay and colony formation assay were used to detect the proliferation of PC-9 cells after transfection with mimic NC/miR-218-5p mimic. D, Changes of migration ability of PC-9 cells after transfection with mimic NC/miR-218-5p mimic was detected by scratch assay. E, Changes of invasion ability of PC-9 cells after transfection with mimic NC/miR-218-5p mimic was detected by Transwell assay. Compared with mimic NC group, * $P<0.05$.

Figure 2 Overexpression miR-218-5p inhibited the proliferation, migration and invasion of lung adenocarcinoma cells

2.3 miR-218-5p 抑制肺腺癌细胞的 AKT/mTOR 通路的激活

已有的研究表明,miR-218-5p 通过调控 AKT/mTOR 信号通路调控多种疾病发展如肾细胞癌^[17]、视网膜神经胶质瘤^[13]等。为了确定在肺腺癌中 miR-218-5p 对 AKT/mTOR 信号通路的影响,我们用 Western blot 检测了 AKT/mTOR 信号通路的关键蛋白的表达。结果显示 miR-218-5p mimic 显著降低了 AKT、mTOR 的磷酸化水平,miR-218-5p inhibitor 则发挥出相反的效果(图 3A、图 3B)。结果见图 5, miR-218-5p 抑制肺癌细胞中 AKT/mTOR 信号通路的激活。

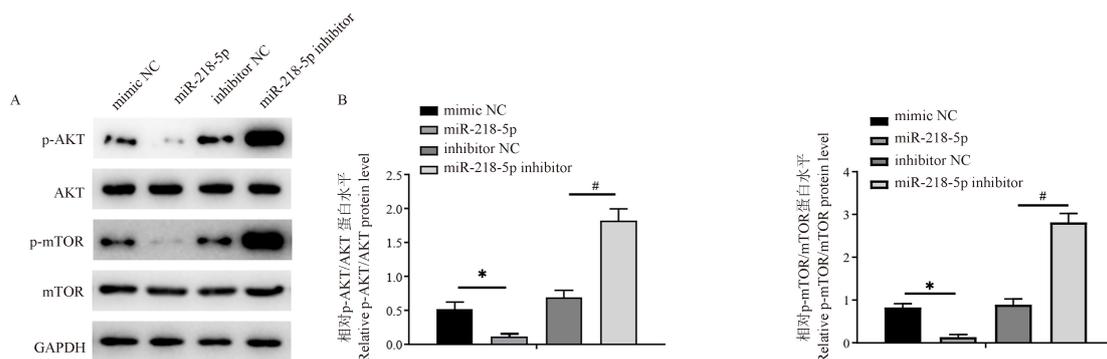
2.4 EGLN3 在肺腺癌细胞中显著高表达

为进一步研究 miR-218-5p 的功能机制,我们对其下游调控基因进行挖掘。首先利用 EdgeR 对 mRNA 进行差异分析,共获得 1217 个 DEGs,其中包括 1104 个上调基因,113 个下调基因(图 4A);然后利用 TargetScan、starBase、miRDIP 和 miRDB 共 4 个数据库预测 miR-218-5p 的靶基因,获得 ONECUT2、EGLN3、LHX1、SLCO5A1 和 CASKIN1 共 5 个候选基因(图 4B);再通过 Pearson 分析,最终选取负相关性最强的 EGLN3 作为靶标(图 4C、图 4D)。TCGA 数据库数据显示与癌旁组织相比,EGLN3 在肺腺癌癌变组织中显著高表达($P < 0.05$)(图 4E),且高表达 EGLN3 的肺腺癌患者总生存期相对较低(图 4F)。有报道证实 EGLN3 在肾细胞癌^[18]、胰腺

癌^[19]等癌种中上调,能调控肿瘤细胞的多种生物学功能。为了探讨 EGLN3 在肺腺癌进展中的潜在作用,我们首先检测了 EGLN3 在 BEAS-2B 和 PC-9 中的 mRNA 和蛋白表达情况。qRT-PCR 和 Western blot 检测结果(图 4G、图 4H)显示,与人肺上皮细胞系(BEAS-2B)相比,PC-9 细胞中 EGLN3 的 mRNA 和蛋白表达水平显著上升($P < 0.05$)。这些结果表明 EGLN3 是 miR-218-5p 的潜在下游靶标,且其在肺腺癌中高表达。

2.5 肺腺癌细胞中 miR-218-5p 靶向结合 EGLN3

为了明确 miR-218-5p 与 EGLN3 之间的调控关系,首先我们利用 starBase 数据库中预测 miR-218-5p 与 EGLN3 的结合位点,结果表明 miR-218-5p 和 EGLN3 之间存在靶向结合位点(图 5A),随后通过双荧光素酶报告基因检测实验验证 miR-218-5p 和 EGLN3 之间是否存在靶向结合关系。结果显示,含有 EGLN3 3' UTR 的双荧光素酶报告载体(EGLN3-WT)和 miR-218-5p mimic 共转染组荧光素酶活性显著降低($P < 0.05$),而突变组的荧光素酶活性则无明显变化(图 5B)。接着我们还检测了 PC-9 细胞转染 mimic NC 和 miR-218-5p 后 EGLN3 的 mRNA 和蛋白表达水平。结果发现,与对照组相比,过表达 miR-218-5p 后 EGLN3 的 mRNA 和蛋白表达下降($P < 0.05$)(图 5C、图 5D)。因此,我们认为 EGLN3 是 miR-218-5p 的直接靶点,并受 miR-218-5p 的负调控。

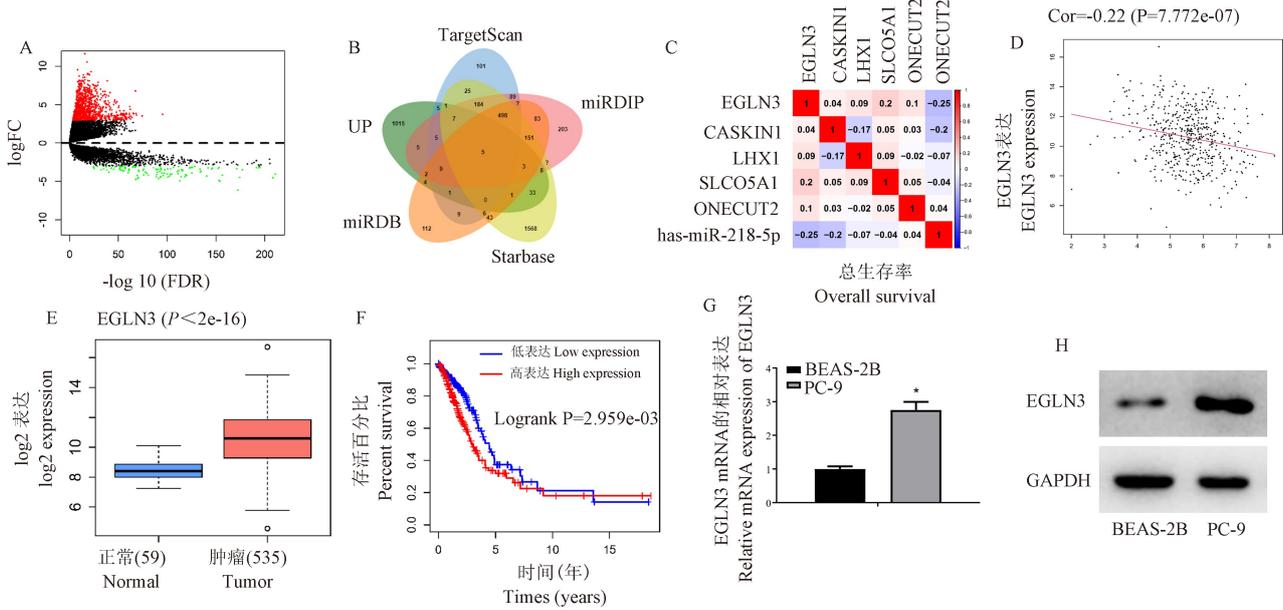


注:A:Western blot 检测 miR-218-5p 对 AKT/mTOR 信号通路相关蛋白(AKT、p-AKT、mTOR 和 p-mTOR)表达的影响;B:柱状图显示蛋白的相对表达水平,包括 p-AKT/AKT 和 p-mTOR/mTOR。mimic NC 组与 miR-218-5p mimic 组相比, * $P < 0.05$;inhibitor NC 组与 miR-218-5p inhibitor 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 3 miR-218-5p 抑制 AKT/mTOR 信号通路相关蛋白的表达

Note. A, Western blot analysis of the effects of miR-218-5p on the expression of AKT/mTOR signaling pathway related proteins (AKT, p-AKT, mTOR and p-mTOR). B, Histogram showed the relative expression levels of proteins, including p-AKT/AKT and p-mTOR/mTOR. Compared between mimic NC group and miR-218-5p mimic group, * $P < 0.05$. Compared between inhibitor NC group and miR-218-5p inhibitor group, # $P < 0.05$.

Figure 3 miR-218-5p suppressed the expression of AKT/mTOR signaling pathway related proteins

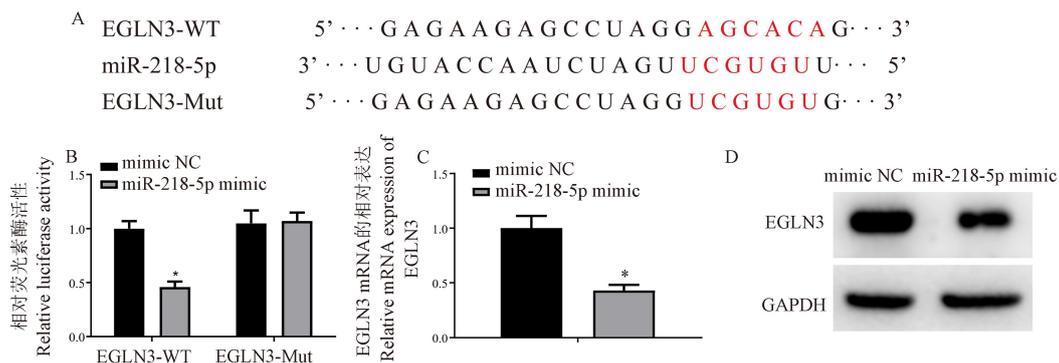


注:A:TCGA-LUAD的mRNA的差异基因火山图;B:利用TargetScan、miRDB、miDIP和starBase数据库预测miR-218-5p的靶基因与差异上调mRNA交集;C:miR-218-5p与5个预测基因Pearson相关性图;D:miR-218-5p与EGLN3基因Pearson相关性图;E:EGLN3在正常组织和癌症组织中的表达情况,蓝色代表癌旁组织,红色代表癌变组织;F:EGLN3基因的生存曲线,横坐标表示时间(年),纵坐标表示生存率,红色曲线表示高表达患者,蓝色曲线表示低表达患者;G:qRT-PCR检测人肺上皮细胞系BEAS-2B和肺腺癌细胞系PC-9中EGLN3的mRNA表达情况;H:Western blot检测人肺上皮细胞系BEAS-2B和肺腺癌细胞系PC-9中EGLN3蛋白表达情况。与BEAS-2B组相比,* $P < 0.05$ 。

图4 肺腺癌细胞中EGLN3高表达

Note. A, Volcano map of differential genes of TCGA-LUAD mRNA. B, Using TargetScan, miRDB, miDIP and starBase databases to predict the intersection of miR-218-5p target genes and different upregulated mRNAs. C, Pearson correlation diagram between miR-218-5p and five predicted genes. D, Pearson correlation diagram between miR-218-5p and EGLN3 gene. E, EGLN3 expression in normal and cancer tissues, blue represents adjacent tissues and red represents cancerous tissues. F, Survival curve of EGLN3 gene, the abscissa represents time (years), the ordinate represents survival rate, the red curve represents patients with high expression and the blue curve represents patients with low expression. G, qRT-PCR was used to detect mRNA expression of EGLN3 in human lung epithelial cell line BEAS-2B and lung adenocarcinoma cell line PC-9. H, Western blot analysis of EGLN3 protein expression in human lung epithelial cell line BEAS-2B and lung adenocarcinoma cell line PC-9. Compared with BEAS-2B group, * $P < 0.05$.

Figure 4 EGLN3 was highly-expressed in lung adenocarcinoma cells



注:A:starBase数据库预测miR-218-5p与EGLN3的靶向结合位点;B:双荧光素酶实验检测不同转染组PC-9细胞的荧光素酶活性;C:qRT-PCR检测肺腺癌细胞PC-9不同转染组中EGLN3的mRNA表达水平;D:Western blot检测肺腺癌细胞PC-9不同转染组中EGLN3蛋白的表达情况。与mimic NC组相比,* $P < 0.05$ 。

图5 肺腺癌中miR-218-5p靶向结合EGLN3

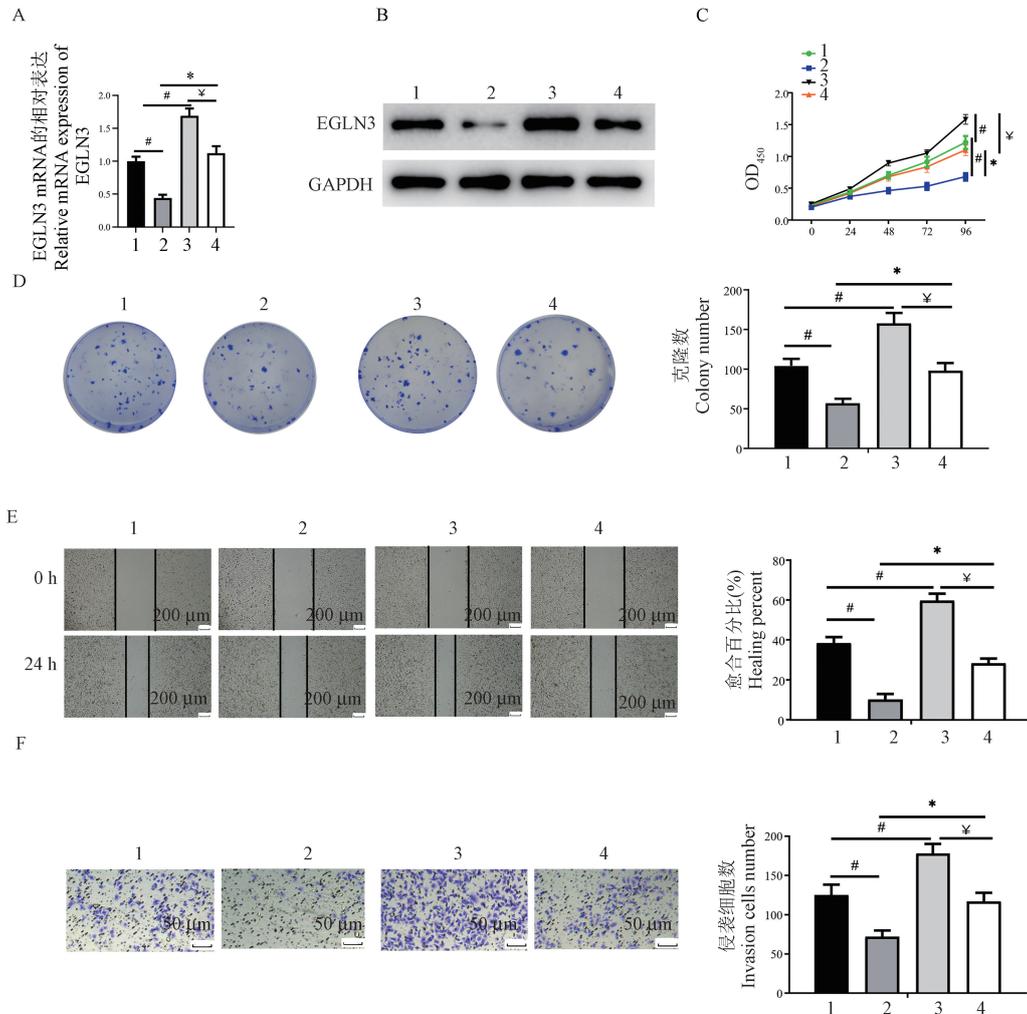
Note. A, starBase database predicted the targeted binding sites of miR-218-5p and EGLN3. B, Double luciferase assay was used to detect the luciferase activity of PC-9 cells in different transfection groups. C, qRT-PCR was used to detect the mRNA expression level of EGLN3 in PC-9 transfected groups. D, Western blot was used to detect the protein expression of EGLN3 in PC-9 transfected groups. Compared with mimic NC, * $P < 0.05$.

Figure 5 miR-218-5p targeted binding to EGLN3 in lung adenocarcinoma

2.6 miR-218-5p 通过靶向 EGLN3 抑制肺腺癌细胞增殖、迁移和侵袭

为了进一步探究 miR-218-5p 靶向 EGLN3 在肺腺癌发生发展中的作用,我们进行了后续实验。首先,在肺腺癌细胞系 PC-9 中分别共转染 mimic NC+oe-NC、miR-218-5p mimic + oe-NC、mimic NC + oe-

EGLN3 和 miR-218-5p mimic+oe-EGLN3,并用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 EGLN3 的表达效率。结果见图 6,与对照组相比,单独过表达 miR-218-5p 后 EGLN3 的 mRNA 和蛋白表达显著下调,单独过表达 EGLN3 后 EGLN3 的 mRNA 和蛋白表达显著上调($P < 0.05$),同时过表达 miR-218-5p 和 EGLN3 后细胞



注:A:qRT-PCR 实验检测不同转染组 PC-9 细胞中 EGLN3 mRNA 的表达水平;B:Western blot 实验检测不同转染组 PC-9 细胞中 EGLN3 蛋白的表达;C:CCK-8 实验检测不同转染组 PC-9 细胞的增殖能力;D:细胞克隆形成实验检测不同转染组 PC-9 细胞的克隆形成情况;E:划痕愈合实验检测不同转染组 PC-9 细胞的迁移能力;F:Transwell 实验检测不同转染组 PC-9 细胞的侵袭能力。1:mimic-NC+oe-NC;2:miR-218-5p mimic+oe-NC;3:mimic NC+oe-EGLN3;4:miR-218-5p mimic+oe-EGLN3。与 miR-218-5p mimic+oe-NC 组相比, * $P < 0.05$;与 mimic NC+oe-NC 组相比, # $P < 0.05$;与 mimic-NC+oe-EGLN3 组相比, ¥ $P < 0.05$ 。

图 6 miR-218-5p 通过靶向 EGLN3 抑制肺腺癌细胞增殖、迁移和侵袭

Note. A, qRT-PCR assay was used to detect EGLN3 mRNA expression levels in PC-9 cells of different transfection groups. B, Western blot assay was performed to detect the expression of EGLN3 protein in PC-9 cells of different transfection groups. C, CCK-8 assay was used to detect the proliferation ability of PC-9 cells in different transfection groups. D, Cell colony assay was used to detect the clonogenesis of PC-9 cells in different transfection groups. E, The migration ability of PC-9 cells in different transfection groups was detected by scratch healing assay. F, Transwell assay detected the invasion ability of PC-9 cells in different transfection groups. 1, mimic-NC+oe-NC. 2, miR-218-5p mimic+oe-NC. 3, mimic NC+oe-EGLN3. 4, miR-218-5p mimic+oe-EGLN3. Compared with miR-218-5p mimic+oe-NC group, * $P < 0.05$. Compared with mimic NC+oe-NC group, # $P < 0.05$. Compared with mimic-NC+oe-EGLN3 group, ¥ $P < 0.05$.

Figure 6 miR-218-5p inhibited proliferation, migration and invasion of lung adenocarcinoma cells by targeting EGLN3

中 EGLN3 的表达水平回复至 mimic NC+oe-NC 组水平(图 6A、图 6B)。CCK-8 和细胞克隆形成实验的结果显示转染 miR-218-5p mimic 的 PC-9 细胞增殖能力显著下降,转染 oe-EGLN3 的 PC-9 细胞增殖能力显著增强($P < 0.05$),同时过表达 miR-218-5p 和 EGLN3 后癌细胞的增殖能力回复至 mimic NC+oe-NC 组水平(图 6C、图 6D)。划痕和侵袭实验结果显示,与对照组相比 miR-218-5p 过表达组细胞的迁移与侵袭能力显著降低,EGLN3 过表达组细胞的迁移与侵袭能力显著升高($P < 0.05$),同时过表达 miR-218-5p 和 EGLN3 后癌细胞的迁移与侵袭能力回复至 mimic NC+oe-NC 组水平(图 6E、图 6F)。这些实验结果说明,miR-218-5p 通过靶向 EGLN3 抑制肺腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

3 讨论

本研究的目的是探讨 miR-218-5p 在肺腺癌发展中的具体调控机制。在本研究中,我们发现 miR-218-5p 在 LUAD 组织和细胞中表达下调。细胞学研究表明,过表达 miR-218-5p 可以抑制 LUAD 细胞的增殖、迁移和侵袭,并抑制 AKT/mTOR 通路的激活。机制研究表明,EGLN3 是 miR-218-5p 的直接靶点,miR-218-5p 靶向调控 EGLN3 表达抑制 LUAD 细胞的增殖、迁移和侵袭。

miRNAs 作为一种重要的非编码小 RNA,已被证实广泛参与多种生物学功能的调控,包括细胞周期、细胞增殖、细胞凋亡等^[20-23]。关于 miR-218-5p,研究显示其在前列腺癌、肝细胞癌等^[24]多个癌种中表达下调,且能够抑制多种癌症的发生,有作为预后标志物的潜力。在本研究中,我们基于 TCGA 数据库分析发现 miR-218-5p 在肺腺癌组织中显著低表达,qRT-PCR 验证得到 miR-218-5p 在肺腺癌细胞系中低表达,这与其在前列腺癌、肝细胞癌等^[24]肿瘤中的研究结果一致。细胞功能实验表明过表达 miR-218-5p 抑制肺腺癌细胞的增殖、迁移与侵袭能力。这与以前在肺癌中的研究结论相似^[25]。

AKT/mTOR 信号通路作为维持细胞基本功能的主要信号通路之一,已被证明在肿瘤发生和发育中发挥重要作用,能够促进肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移^[26-27]。目前这一途径的组成基因已被广泛研究,发现在人类癌症中普遍被激活^[28]。而 miR-218-5p 已被证明能在多种癌症中如视网膜母细胞

瘤、结肠癌、口腔癌^[13,29-30]等通过影响 AKT/mTOR 信号通路调控细胞活力。为了阐明 miR-218-5p 抑制肿瘤进展的机制,我们检测了 AKT/mTOR 信号通路关键蛋白的表达水平,结果表明过表达 miR-218-5p 可以抑制 AKT 和 mTOR 的磷酸化,这说明 miR-218-5p 抑制肺腺癌细胞中 AKT/mTOR 信号通路的激活。而我们的研究中,miR-218-5p 对 AKT/mTOR 通路的抑制表现,从某种程度上能说明其与肿瘤发展的相关性,这与前人的研究结果相一致。

miRNAs 可以通过靶向癌基因或抑癌基因来影响肿瘤的发生发展。目前已发现 miR-218-5p 具有多个靶基因,分布在不同的信号通路中^[13,31-32]。通过靶基因预测软件 starBase 的分析,我们发现 EGLN3 可能是 miR-218-5p 的下游靶点。双荧光素酶报告基因实验和分子实验结果进一步验证 miR-218-5p 能够靶向下调 EGLN3 的表达。EGLN3 也称 PHD3,是脯氨酸羟化酶的一种亚型,与癌症的发展密切相关。研究发现 EGLN3 在透明细胞肾细胞癌、乳腺癌^[11,33-34]中高表达,在胰腺癌低表达。在本研究中我们发现 EGLN3 在肺腺癌细胞系中高表达,回复实验进一步证明了过表达 EGLN3 可以减弱过表达 miR-218-5p 对肺腺癌细胞增殖、迁移、侵袭能力的影响。

综上所述,我们的结果表明 miR-218-5p 作为肺腺癌的肿瘤抑制因子,能够抑制 AKT/mTOR 信号通路激活。EGLN3 是 miR-218-5p 的下游靶点,miR-218-5p 靶向下调 EGLN3 抑制肺腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭。本研究为 LUAD 的分子靶向治疗提供了新的理论基础。

参考文献:

- [1] Thai AA, Solomon BJ, Sequist LV, et al. Lung cancer [J]. Lancet, 2021, 398(10299): 535-554.
- [2] Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances [J]. Transl Lung Cancer Res, 2016, 5(3): 288-300.
- [3] Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, et al. The IASLC lung cancer staging project: proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM classification for lung cancer [J]. J Thorac Oncol, 2016, 11(1): 39-51.
- [4] Gelsomino F, Lamberti G, Parisi C, et al. The evolving landscape of immunotherapy in small-cell lung cancer: A focus on predictive biomarkers [J]. Cancer Treat Rev, 2019,

- 79: 101887.
- [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.
- [6] Hill M, Tran N. miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer [J]. *Dis Model Mech*, 2021, 14 (4): dmm047662.
- [7] Wu X, Chen W, Cai H, et al. MiR-216b inhibits pancreatic cancer cell progression and promotes apoptosis by down-regulating KRAS [J]. *Arch Med Sci*, 2018, 14(6) : 1321–1332.
- [8] Feng C, Xian Q, Liu S. MicroRNA-518 inhibits gastric cancer cell growth by inducing apoptosis via targeting MDM2 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 1595–1602.
- [9] Shen YY, Cui JY, Yuan J, et al. MiR-451a suppressed cell migration and invasion in non-small cell lung cancer through targeting ATF2 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22 (17): 5554–5561.
- [10] Peng P, Chen T, Wang Q, et al. Decreased miR-218-5p levels as a serum biomarker in bone metastasis of prostate cancer [J]. *Oncol Res Treat*, 2019, 42(4) : 165–185.
- [11] Xia C, Jiang H, Ye F, et al. The multifunction of miR-218-5p-Cx43 axis in breast cancer [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 8319–8328.
- [12] Li Z, Qian R, Zhang J, et al. MiR-218-5p targets LHFPL3 to regulate proliferation, migration, and epithelial-mesenchymal transitions of human glioma cells [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39 (3): BSR20180879.
- [13] Li L, Yu H, Ren Q. MiR-218-5p suppresses the progression of retinoblastoma through targeting NAC1 and inhibiting the AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 6959–6967.
- [14] Peng Z, Pan L, Niu Z, et al. Identification of microRNAs as potential biomarkers for lung adenocarcinoma using integrating genomics analysis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (38): 64143–64156.
- [15] Zhu K, Ding H, Wang W, et al. Tumor-suppressive miR-218-5p inhibits cancer cell proliferation and migration via EGFR in non-small cell lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (19): 28075–28085.
- [16] Zarogoulidis P, Petanidis S, Kioseoglou E, et al. MiR-205 and miR-218 expression is associated with carboplatin chemoresistance and regulation of apoptosis via Mcl-1 and Survivin in lung cancer cells [J]. *Cell Signal*, 2015, 27 (8): 1576–1588.
- [17] Mu L, Guan B, Tian J, et al. MicroRNA218 inhibits tumor angiogenesis of human renal cell carcinoma by targeting GAB2 [J]. *Oncol Rep*, 2020, 44(5) : 1961–1970.
- [18] Lin L, Cai J. Circular RNA circ-EGLN3 promotes renal cell carcinoma proliferation and aggressiveness via miR-1299-mediated IRF7 activation [J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121 (11): 4377–4385.
- [19] Chiba N, Sunamura M, Nakagawa M, et al. Overexpression of hydroxyproline via EGLN/HIF1A is associated with distant metastasis in pancreatic cancer [J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(8) : 2570–2581.
- [20] Ma J, Li N, Lin Y, et al. Circulating neutrophil MicroRNAs as biomarkers for the detection of lung cancer [J]. *Biomark Cancer*, 2016, 8: 1–7.
- [21] Xiao H, Yu L, Li F, et al. MiR-340 suppresses the metastasis by targeting EphA3 in cervical cancer [J]. *Cell Biol Int*, 2018, 42(9) : 1115–1123.
- [22] Jiang YC, Ma JX. The role of miR-324-3p in polycystic ovary syndrome (PCOS) via targeting WNT2B [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(11) : 3286–3293.
- [23] Zhu S, Song W, Sun Y, et al. MiR-342 attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibiting MAPK1 expression [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2020, 47 (8): 1448–1454.
- [24] Zhang G, He X, Ren C, et al. Long noncoding RNA PCA3 regulates prostate cancer through sponging miR-218-5p and modulating high mobility group box 1 [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8) : 13097–13109.
- [25] 陈平, 赵云龙, 李英杰. MiR-218 通过抑制 Robo1 的表达影响肺癌细胞迁移侵袭 [J]. *中国肺癌杂志*, 2017, 20 (7): 452–458.
- [26] Riquelme I, Tapia O, Espinoza JA, et al. The gene expression status of the PI3K/AKT/mTOR pathway in gastric cancer tissues and cell lines [J]. *Pathol Oncol Res*, 2016, 22(4) : 797–805.
- [27] Cheng TC, Din ZH, Su JH, et al. Sinulariolide suppresses cell migration and invasion by inhibiting matrix metalloproteinase-2/-9 and urokinase through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in human bladder cancer cells [J]. *Mar Drugs*, 2017, 15 (8): 238.
- [28] Alzahrani AS. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: At the bench and bedside [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 59: 125–132.
- [29] Meng X, Zhang Y, Hu Y, et al. LncRNA CCAT1 sponges miR-218-5p to promote EMT, cellular migration and invasion of retinoblastoma by targeting MTF2 [J]. *Cell Signal*, 2021, 86: 110088.
- [30] Zhao Y, Yao R. Long non-coding RNA HOXA-AS3 promotes cell proliferation of oral squamous cell carcinoma through sponging microRNA miR-218-5p [J]. *Bioengineered*, 2021, 12 (1): 8724–8737.
- [31] Wang H, Zhan M, Xu SW, et al. miR-218-5p restores sensitivity to gemcitabine through PRKCE/MDR1 axis in gallbladder cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(5) : e2770.
- [32] Gu J, Ge X, You A, et al. miR-218-5p inhibits the malignant progression of glioma via targeting TCF12 [J]. *Tumori*, 2022, 108(4) : 338–346.

- [33] Yue Y, Cui J, Zhao Y, et al. Circ_101341 deteriorates the progression of clear cell renal cell carcinoma through the miR-411/EGLN3 axis [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 13513-13525. upregulation promotes pancreatic cancer progression by mediating miR-218-5p/LASP1 signaling axis [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 347.
- [34] Wang A, Dai H, Gong Y, et al. ANLN-induced EZH2 [收稿日期]2022-02-21

COVID-19 动物模型的特点

严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 是 2019 年冠状病毒病 (COVID-19) 的病原体, 新冠疫情的全球大流行是当今世界最大的安全威胁。在历次传染病疫情流行时, 动物模型研究在阐明发病机制和传播机制、筛选有效疫苗和药物方面做出突出贡献。在 SARS-CoV 和 MERS-CoV 大流行期间开发的动物模型构建技术被迅速应用于 COVID-19 动物模型的建立中。

目前为止, 研究者建立了多物种 COVID-19 的动物模型, 包括小鼠、仓鼠、貂和非人灵长类动物等。感染性疾病根据病原体的特点和感染方式的不同而产生独特的表现形式。本文围绕 SARS-CoV-2 的感染途径对动物模型资源进行了分类, 汇总了通过经鼻、定位、模拟传播途径感染构建的动物模型的特点。根据动物的解剖结构及生理学特征, 为直接模拟新冠肺炎的疾病特征, 针对非人灵长类等大动物研究者一般使用气管感染的方式以制备肺炎模型。除此之外, 为探究 SARS-CoV-2 的传播机制, 研究者利用小鼠、水貂、猫、非人灵长类等动物资源建立了模拟传播方式的动物模型。

综上所述, 本文从感染途径方式入手, 汇总了目前建立的新冠动物模型特点, 并指出虽然目前没有 SARS-CoV-2 感染动物模型能够完全复制严重 COVID-19 的所有关键特征, 但人源化/基因敲除一体化以及病毒可持续复制但不诱发严重病理的动物模型的建立和探索, 有助于开展对 COVID-19 发病机制的多维分析, 并为新药开发及安全性评价提供支持。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2022, 8(5)401-409; <https://doi.org/10.1002/ame2.12278>)。