

网络出版时间: 2021-3-18 16:18 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210317.1520.007.html>

铁转运蛋白影响非小细胞肺癌增殖迁移的研究

张 灿, 徐美青, 吴显宁

摘要 **目的** 观察铁转运蛋白(FPN)在非小细胞肺癌(NSCLC)中差异表达及探讨 FPN 作用 NSCLC 细胞迁移与增殖的机制。**方法** 免疫组化(IHC)检测肺癌标本(60例)及正常肺组织标本(20例) FPN 表达水平。蛋白免疫印迹(Western blot)检测细胞系中 FPN 表达水平。分别构建 FPN 过表达体系(PCDH-FPN-F)和敲低体系(shFPN),通过 Western blot 和实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)验证。划痕实验检测 FPN 对肺癌细胞迁移的影响。生长曲线法检测 FPN 对肺癌细胞增殖能力的影响。**结果** 相比于正常肺组织,肺癌组织标本中 FPN 表达显著降低($P=0.000$);相比于正常肺细胞系,肺癌细胞系中 FPN 表达量显著降低($P<0.0001$)。与对照组比较,过表达组 FPN 表达量显著升高(Western blot: $P<0.01$, qRT-PCR: $P<0.0001$);与对照组比较,敲低组 FPN 表达量显著降低(Western blot: $P<0.001$, qRT-PCR: $P<0.001$)。过表达 FPN 后,细胞划痕间伤口愈合距离在 18 h 和 36 h 明显低于对照组;细胞数目在第 2 天和第 4 天明显低于对照组。而敲低 FPN 后,细胞划痕间伤口愈合距离在 18 h 和 36 h 明显高于对照组;细胞数目在第 2 天和第 4 天明显高于对照组。**结论** 低表达 FPN 后,肺癌细胞迁移及增殖能力增强,这可能是肺癌中 FPN 差异表达的原因。

关键词 肺肿瘤;铁转运蛋白;细胞迁移;细胞增殖

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)04-0539-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.04.007

铁转运蛋白(ferroportin, FPN)是目前唯一已知的位于细胞膜的细胞内铁离子输出体,在维持细胞铁输出和输入的平衡、优化细胞内铁离子的储存利用及协调铁离子之间的相互作用等方面起重要作用^[1]。当 FPN 调控体系破坏, FPN 表达水平异常,细胞内铁离子富集,为细胞的癌变提供有力条件^[2]。肺癌为全球发病率和病死率最高的恶性肿

瘤,其主要分为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)和小细胞肺癌两类,前者在原发性肺癌中占大多数^[3]。有研究^[4]表明, NSCLC 的发生及进展与肺癌细胞内铁代谢相关,而 FPN 是铁代谢途径的关键蛋白。因此,该研究推测 FPN 在 NSCLC 的发生发展中起着重要的作用,通过检测 FPN 在肺癌中的表达及探讨其在 NSCLC 细胞中的作用,深化对铁代谢与肺肿瘤关系的认知。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2018 年 2—10 月在该院胸外科进行了手术切除的 60 例肺癌患者和 20 例肺大疱患者的标本,其中实验组为肺癌标本 60 例,对照组为肺大疱患者手术切除的正常肺组织 20 例。男性 44 例,女性 36 例,年龄 44~80(62.74 ± 9.41)岁。实验组 60 例中,男性 32 例,女性 28 例;按病理类型:腺癌 39 例,鳞癌 19 例,其他 2 例;按 TNM 分期:Ⅰ期 2 例,Ⅱ期 19 例,Ⅲ期 24 例,Ⅳ期 15 例。对照组 20 例中,男性 12 例,女性 8 例。纳入标准:①影像学、病理学等临床资料完整;②经病理检查确诊为肺癌;③此次治疗前未进行手术治疗、放疗、化疗、靶向治疗等抗癌治疗。排除标准:①合并严重心功能障碍;②合并其他原发性恶性肿瘤;③合并严重代谢性疾病;④其他部位原发恶性肿瘤肺部转移者;⑤合并消化系统出血、肝功能异常等影响铁离子在体内流通者。该研究内容与流程设计符合该院医学伦理委员会相关规定并获得开展批准,受试者及家属对该研究充分知情,自愿签署知情同意书,并积极配合工作人员。根据《TNM 恶性肿瘤分类》第 8 版确定 TNM 分期。根据世界卫生组织第 4 版指南对肿瘤进行组织学亚型分类和分级。

1.2 免疫组化半定量分析 根据制造商的说明,使用通用 SP 检测试剂盒(Solarbio 公司,货号: P0041)对石蜡组织切片进行染色处理。对于免疫组化(immunohistochemistry, IHC)结果的评分 IRS 使用十三点法的半定量分析,即以阳性细胞的百分率与阳性细胞染色强度的乘积进行评分:①染色强度的评分标准:0 分,阴性染色;1 分,弱染色;2 分,中染色;3

2021-02-25 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1808085QH270);2019 年度科大新医学联合基金(编号:WK9110000121)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院胸外科,合肥 230001

作者简介:张 灿,男,硕士研究生;

徐美青,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: xmqahslyy@163.com;

吴显宁,男,副教授,副主任医师,责任作者, E-mail: xianning_wu@fsyy.ustc.edu.cn

分,强染色。② 阳性染色细胞百分比:0 分,无阳性染色细胞;1 分,阳性染色细胞百分比 < 10%;2 分,阳性染色细胞百分比 ≥ 10% 且 < 50%;3 分,阳性染色细胞百分比 ≥ 50% 且 < 80%;4 分,阳性染色细胞百分比 ≥ 80%。最终的 IRS 是染色强度评分与阳性染色细胞百分比得分的乘积。

1.3 细胞与质粒 人支气管上皮样细胞系(human bronchial epithelioid cells, HBE)、肺癌细胞系(A549、H1299)由中科大生命科学院梅一德教授实验室惠赠。慢病毒载体(PCDH-CMV-MCS-EF1-Puro, PCDH)、过表达对照组质粒(PCDH-Flag, PCDH-F)和敲低组对照质粒 SCR(scrambled shFPN)均由实验室惠赠。

1.4 主要试剂 Polybrene 购自美国 Sigma 公司(货号: TR-4003-G);嘌呤霉素购自上海碧云天公司(货号: ST551-250mg);F12K、DMEM、Opti-MEM 培养基购自美国 Invitrogen 公司;BCA 蛋白质测定试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司(货号: 23252);兔抗人 FPN 多克隆抗体购自美国 NOVUS 公司(货号: NBP1-88872);鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,(货号: sc-166545);鼠抗兔及鼠抗鼠 IgG-二抗购自美国 Proteintech 公司(货号: SA00001-1);TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司;PrimeScript™ RT 试剂盒(货号: DRR037A)及 TB Green Premix Ex Taq II(货号: RR820A)均购自美国 Takara 公司。

1.5 构建 PCDH-FPN-F 过表达体系 查询 NCBI 基因库人 FPN 的基因序列,设计正义引物 FPN-f。为了在 FPN 的 N 末端加载 Flag 标签,将 Flag 的反义序加入反义引物中 FPN-r-flag。见表 1。从文库中扩增出完整的人 FPN + Flag 编码序列,并将其插入到空载体 PCDH 的 EcoR 1 + Not 1 位点间。通过质粒 DNA 测序确认所有构建体 PCDH-FPN-F 无异常。将 2 μg PCDH-FPN-F 和对照载体 PCDH-F 及慢病毒包装质粒转染至 6 cm 培养皿上生长的 HEK293T 细胞。转染后 12 h,将细胞用含有 20% FBS 的 DMEM 培养基再培养 24 h。收集含有慢病毒颗粒的培养基备用。其中,对照组为表达空载体质粒 PCDH-F 的细胞,高表达实验组为表达质粒 PCDH-FPN-F 的细胞。

1.6 构建 shFPN 敲低体系 查询 shRNA 基因库,选定 5 条针对人 FPN 的靶序列,从中国科技大学菌种库中提取相应的菌种(shFPN8-12),在含 5% CO₂ 的 37 °C 摇床培育至对数生长期后,提取质粒。为了

构建表达相应 shFPN 的慢病毒,将 2 μg shFPN8-12、对照载体 SCR 以及慢病毒包装质粒共转染至 6 cm 培养皿上生长的 HEK293T 细胞。转染后 12 h,将细胞用含有 20% FBS 的 DMEM 培养基再培养 24 h。收集含有慢病毒颗粒的培养基,并与补充了 8 μg/ml Polybrene 的 A549 或 H1299 细胞孵育 24 h,然后用 2 μg/ml 嘌呤霉素进行筛选 24 h,最后通过 Western blot 和 qRT-PCR 评估敲低效率。该研究中转染 SCR 质粒的细胞为敲低对照组,敲低效率最高的 shFPN-8 和 shFPN-9 作为实验组 1 和 2。见表 1。

表 1 目的基因的引物序列

目的基因	引物序列(5'-3')
FPN-flag	F: CGGAATTCATGACAGGGCGGAGAT R: AATGCGGCGGCTCACTTGTTCATCGTCGCTTGTAGTCAACAACAGATGATTTGCTT
SCR	CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCG
shFPN-8	CCGGGCAATCACAATCCAAAGGATCTCGAGATCCCTTTGATTGCTGCTTTTTC
shFPN-9	CCGGGCCACATTATGATTTCCGATCTCGAGATCGGAATACATAATGTGCTTTTTC
qRT-FPN	F: GATCCTTGGCCGACTACCTG R: CACATCCGATCTCCCAAGT
qRT-GAPDH	F: CCATGGGGAAGGTGAAGGTC R: GAAGGGCTCATGATGGCAAC

1.7 细胞培养 A549 细胞系使用 F12K 培养基培养;H1299、HBE 和 HEK293T 细胞系使用 DMEM 培养基培养。所有培养基包含 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素。所有细胞孵育在 5% CO₂ 浓度、温度 37 °C、饱和湿度 95% 的细胞培养箱中。取支原体检测阴性、对数生长期细胞进行试验。

1.8 Western blot 实验 收集培养细胞用预冷 PBS 洗涤 2 次,2 × SDS loading 中煮沸 7 min。通过 BCA 蛋白质测定试剂盒确定蛋白质浓度。将等量的总蛋白上样至 10% 浓度的 SDS-PAGE 凝胶,120 V 恒压电泳 1.5 h。然后湿转至 PVDF 膜上,4 °C 下 300 mA 恒流转移 1.5 h。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,一抗孵育 1.5 h,二抗孵育 30 min,其间均用 TBST 洗涤 3 次。用增强化学发光底物反应液孵育 2 min,采用蛋白分析仪器拍摄后进行结果分析。

1.9 实时荧光定量 PCR 按照操作说明使用 TRIzol 提取细胞中的总 RNA;按操作说明使用 PrimeScript™ RT 试剂盒取 1 μg RNA 合成 cDNA;按操作说明使用 TB Green Premix Ex Taq II 在 StepOne-Plus™(96 孔)实时 PCR 扩增仪(美国 Applied Biosystems 公司)中运行检测 FPN 的表达,GAPDH 作为内参对照基因,引物序列见表 1。通过 3 次独立实验使用 2^{-ΔΔCt} 方法进行数据分析。

1.10 划痕实验 感染慢病毒的细胞长满 24 孔后,

用 10 μ l 移液器枪头在培养板底部划“一”字形划痕, PBS 漂洗贴壁细胞, 弃去漂浮细胞后加入培养液继续培养, 并于此后 0、18、36 h 在倒置显微镜下观察细胞划痕相对宽度并拍照, 多个视野进行记录。

1.11 生长曲线 感染慢病毒的细胞长满 24 孔后, 分别取 2×10^4 细胞各传 2 个组(2 d 组、4 d 组) 继续培养, 并于此 2、4 d 后取各组细胞计数, 记录结果进行分析。

1.12 统计学处理 应用 GraphPad Prism 8.0 软件处理和分析数据, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组均数间的差异比较用 t 检验, 多组均数间的差异比较采用 One-way Anova 检验数据。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FPN 在 NSCLC 和正常肺组织中的表达 通过 IHC 分析 FPN 在实验组和对照组中的表达情况。结果显示, FPN 在正常肺组织细胞膜中显示出明显的棕黄色染色。见图 1A; 在部分 NSCLC 组织中未观察到 FPN 阳性染色。见图 1B; 在其余 NSCLC 组织中显示少许棕黄色染色。见图 1C。进行半定量分析后, 实验组的 IRS 较对照组降低($t = 7.391, P < 0.005$), 两组间差异有统计学意义。见表 2。Western blot 检测 HBE 和 A549 中 FPN 的表达显示, 与 HBE 组相比, A549 组中 FPN 的表达量也明显降低。见图 2。

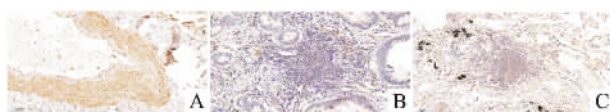


图1 FPN 的表达 HE $\times 400$

A: 正常肺组织; B: NSCLC 组织; C: NSCLC 组织

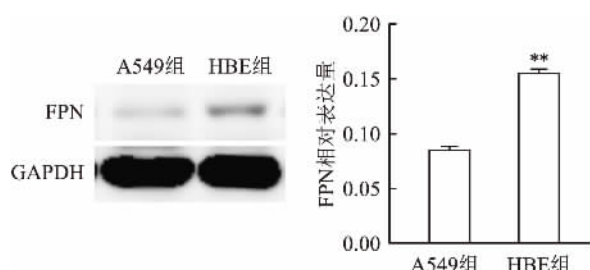


图2 A549 与 HBE 中 FPN 蛋白的表达情况

与对照组 A549 比较: ** $P < 0.01$

2.2 FPN 表达与 NSCLC 临床特征的关系 在 60 例 NSCLC 癌组织中, 鳞癌(squamous-cell carcinoma, SCC) 19 例、腺癌(adenocarcinoma, ADC) 39 例, 其

IRS 分别为(2.58 ± 0.16) 分和(2.36 ± 1.50) 分, $t = 0.935, P = 0.354$, 差异无统计学意义。见表 2。在 60 例 NSCLC 癌组织中, I 期 2 例、II 期 19 例、III 期 24 例、IV 期 15 例, FPN 的 IRS 在 I 期、II 期、III 期、IV 期, 差异均无统计学意义($F = 1.092, P = 0.360$)。见表 2。

表2 FPN 不同肺组织中表达情况比较($n = 80, \bar{x} \pm s$)

项目	n	FPN 表达(n)		IRS 分值 (分)	t/F 值	P 值
		阴性表达	阳性表达			
组织类型					7.391	0.000
正常肺组织	20	3	17	4.60 ± 1.23		
NSCLC	60	55	5	2.42 ± 0.83		
病理					0.935	0.354
SCC	19	17	2	2.58 ± 0.16		
ADC	39	36	3	2.36 ± 1.50		
其他	2	2	0	2.00		
分期					1.092	0.360
I	2	1	1	3.00 ± 1.41		
II	19	16	3	2.53 ± 1.07		
III	24	23	1	2.21 ± 0.72		
IV	15	15	0	2.53 ± 0.52		

2.3 FPN 的表达水平上调后, NSCLC 细胞迁移及增殖功能变化 肺癌细胞系转染 PCDH-FPN-F 表达载体后, 与对照组转染 PCDH-F 进行表达验证。qRT-PCR 结果显示, 过表达组 FPN 的 mRNA 表达水平较对照组亦明显上升。进一步采用 Western blot 检测 FPN 蛋白质水平, 结果与 qRT-PCR 一致, 过表达组 FPN 蛋白水平也明显增加, 成功获得了 FPN 高表达的稳定细胞株(A549、H1299)。见图 3。稳定高表达 FPN 的细胞株进一步功能实验表明, 相对于正常表达的对照组来说, 过表达 FPN 后, 实验组的肺癌细胞向划痕迁移的速度减慢。见图 4。同样与对照组比较, 细胞在过表达 FPN 后, 生长 2、4 d 后的细胞数目少于对照组。见图 5。

2.4 下调 FPN 的表达水平能够有效促进 NSCLC 细胞增殖生长 肺癌细胞中转染 shFPN 慢病毒培养基后, 与对照组 SCR 进行表达验证。qRT-PCR 结果显示, 敲低组 FPN 的 mRNA 表达水平较对照组下降。进一步采用 Western blot 检测 FPN 蛋白质水平, 结果与 qRT-PCR 一致, 敲低组 FPN 蛋白水平也明显下调, 成功获得了 FPN 低表达的稳定细胞株(A549、H1299)。见图 6。稳定低表达 FPN 的细胞株进一步细胞实验显示, 相对于正常表达的对照组来说, 低表达 FPN 后, 肺癌细胞向划痕空白处迁移速度加快, 见图 7; 细胞生长速度加快, 见图 5。

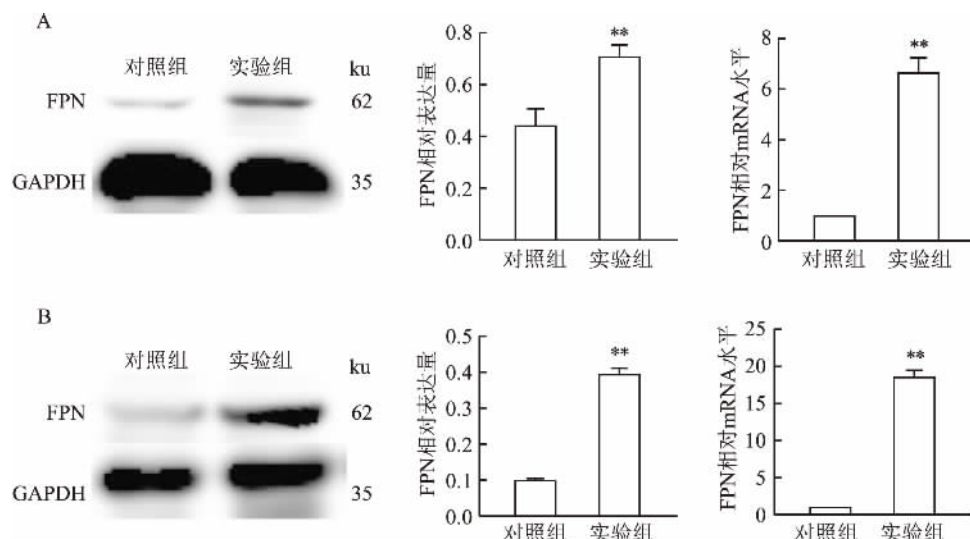


图3 稳定高表达 FPN 的 A549 与 H1299

A: A549 细胞中对照组与实验组 FPN 蛋白及 mRNA 水平表达的差异; B: H1299 细胞中对照组与实验组 FPN 蛋白及 mRNA 水平表达的差异; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

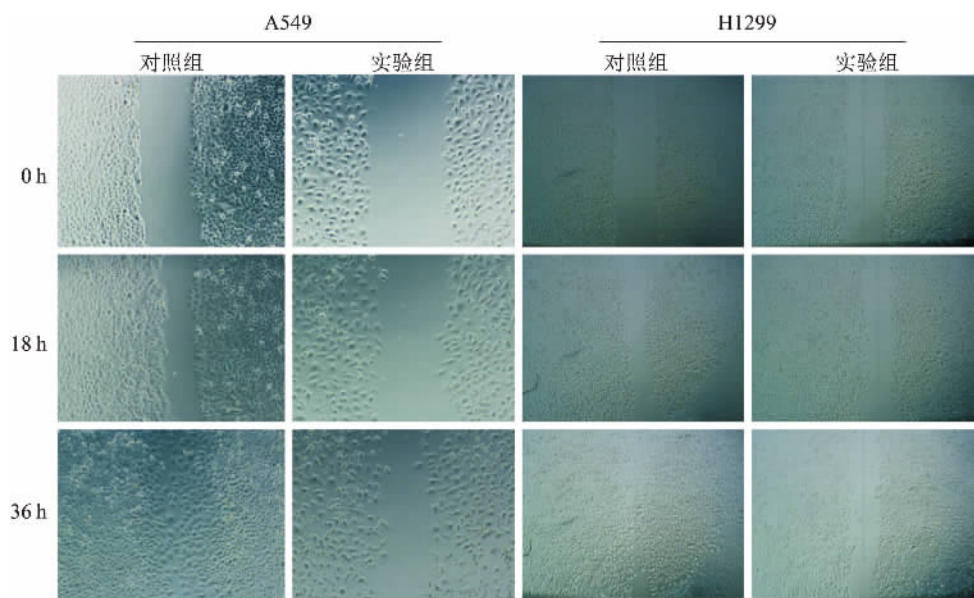


图4 细胞划痕 ×400

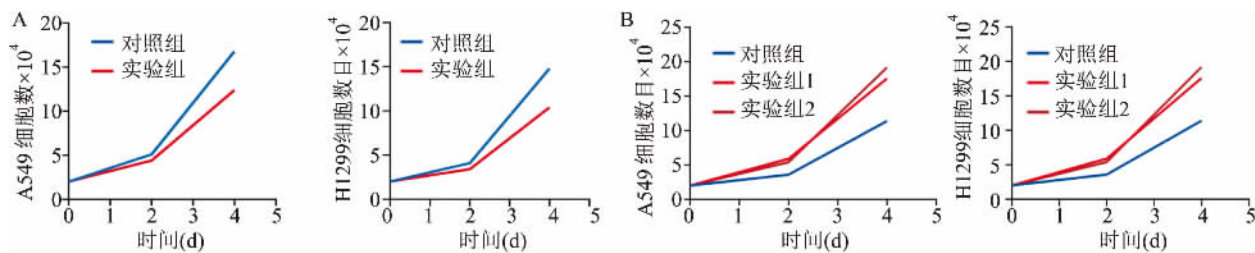


图5 生长曲线

A: A549 和 H1299 细胞中高表达对照组与实验组分别在生长 0、2 和 4 d 后的数目; B: A549 和 H1299 细胞中敲低对照组与实验组 1、2 分别在生长 0、2 和 4 d 后的数目

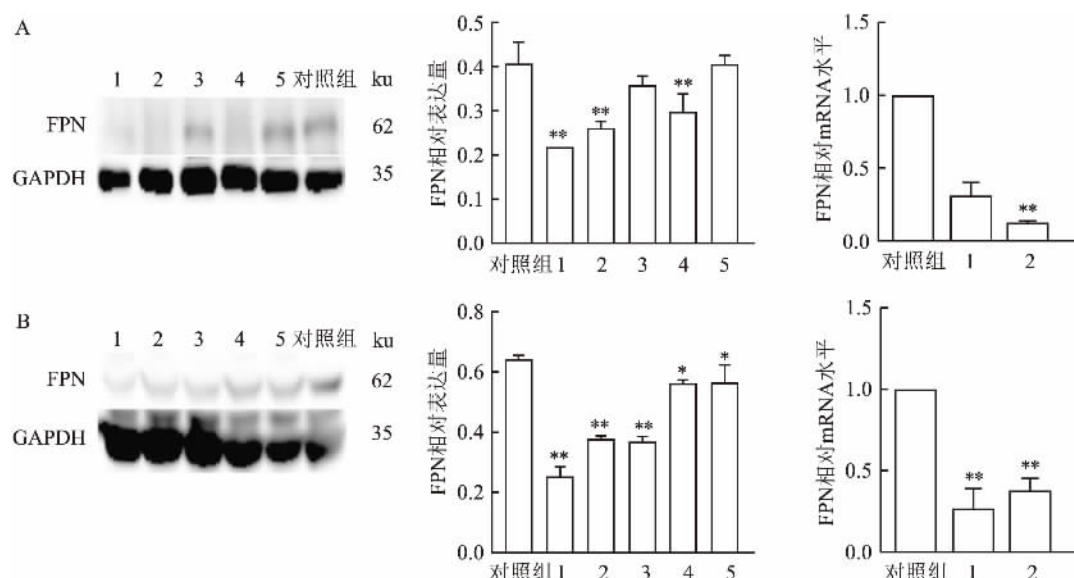


图6 稳定低表达 FPN 的 A549 与 H1299

A: A549 细胞中敲低对照组与实验 1~5 组 FPN 蛋白及 1~2 组 mRNA 水平表达的差异; B: H1299 细胞中敲低对照组与实验 1~5 组 FPN 蛋白及 1~2 组 mRNA 表达水平的差异; 与对照组比较: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

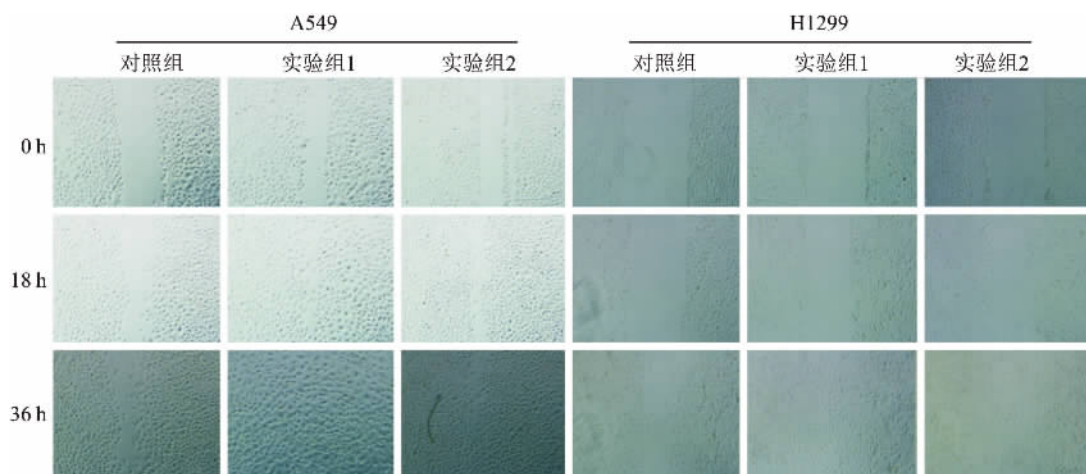


图7 A549 和 H1299 细胞中对照组与实验组 1、2 分别在 0、18 和 36 h 的迁移情况 ×400

3 讨论

正常人支气管肺泡上皮细胞内铁离子的稳态对人体健康至关重要,而 FPN 作为细胞内唯一的铁输出蛋白在铁离子稳态过程中起着重要作用。之前的研究^[5-6]表明,铁离子代谢紊乱,主要是铁过载,是促进细胞恶变并最终发展为恶性肿瘤的重要原因之一。FPN 对 NSCLC 细胞的增殖、侵袭、分化、凋亡及相关信号途径有重要的影响,值得更加深入的研究。能够为预防、诊断或治疗 NSCLC 提供新的参考方向。

该研究通过 IHC 检测肺癌标本及正常肺组织标本中 FPN 的表达,表明 FPN 在肺癌标本中表达下调。可能是正常肺组织细胞在病变过程中,通过 miRNA 调控 FPN 的表达,影响 FPN 的生成。FPN 的缺失导致细胞内铁离子蓄积,进而激活细胞癌变

过程。该研究后续的细胞实验中,肺癌细胞系 A549 中 FPN 的表达量同样低于 HBE 中的表达,符合前期实验结果。

此外,该研究也表明,高表达 FPN 后,细胞会抑制其迁移及增殖能力。而敲低 FPN 后,这种抑制效应会被消除。由于 FPN 在铁代谢中的关键作用及铁离子在细胞代谢中的重要地位,高表达 FPN 会导致细胞内铁离子水平迅速出胞,造成细胞铁饥饿,无法为肿瘤细胞旺盛的代谢活动提供支持。肿瘤细胞的增殖速率和迁移能力都会因为缺乏必要的铁支持而无以为继,从而达成一种抑癌效果。而相反的是,敲低 FPN 会造成细胞内铁过载,铁离子水平不再是肺癌细胞代谢和增殖活动的枷锁,从而造成肿瘤细胞大量迁移增殖,形成一种致癌效应。

此前相关研究支持铁离子在细胞癌变中的关键

作用。而 FPN 作为唯一一个已知的哺乳动物细胞铁输出蛋白,它在这个过程中极其重要。该实验也证实了 FPN 低表达是高铁水平和肺癌进展之间的重要枢纽。具体机制考虑与 ROS 有关。当 FPN 表达调控体系失衡时,机体铁稳态紊乱,细胞内生物活性铁增多,催化 Fenton 反应产生具有极高活性的活性氧成分——羟基自由基($\cdot\text{OH}$)。活性氧在诱导 DNA 突变、修饰基因表达、促进肿瘤细胞增殖、减少细胞凋亡、增加肿瘤侵袭和抑制抗肿瘤免疫力等方面至关重要^[7]。除此之外,也有研究^[8]表明铁在 WNT 信号传导、DNA 合成和 P53 调节中均起着至关重要的作用,目前仍需要更进一步的研究。

此前研究^[9-10]表明,FPN 受精密的调控系统控制,包括 microRNA、铁响应元件-铁调节蛋白(IRE-IRP)系统^[11]和铁调素-铁转运蛋白轴^[12]等。通过对 FPN 调控体系的深入研究,可将其作为预防、诊断及治疗肺癌新靶点研究方向。目前已有研究^[13]表明包括铁耗尽和铁代谢靶向治疗等已显示出有效和广泛的抗肿瘤作用,这使其成为癌症药物治疗的潜在且基本上未开发的治疗靶标,其中铁螯合剂和氧化铁纳米颗粒(IONPs)已经投入临床用于治疗血液系统恶性肿瘤和其他类型癌症。

综上所述,目前研究表明细胞中 FPN 低表达,在正常肺支气管上皮细胞恶性进程中起重要作用。其机制可能与活性铁、活性氧等相关。通过上调 FPN 表达可有效抑制肺癌细胞增殖及生长能力。这是诊治肺癌的潜在方向之一。该研究尚未完全揭开 FPN 影响 NSCLC 的具体机制,仍需进一步研究。

参考文献

[1] Drakesmith H, Nemeth E, Ganz T. Ironing out ferroportin [J].

Cell Metab, 2015,22(5):777-87.

[2] Vela D, Vela-Gaxha Z. Differential regulation of hepcidin in cancer and non-cancer tissues and its clinical implications [J]. Exp Mol Med, 2018,50(2):e436.

[3] Neves J, Leitz D, Kraut S, et al. Disruption of the hepcidin/Ferroportin regulatory system causes pulmonary iron overload and restrictive lung disease [J]. EBioMedicine, 2017,20:9.

[4] Zhao S, Jiang T, Zhang L, et al. Clinicopathological and prognostic significance of regulatory T cells in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review with meta-analysis [J]. Oncotarget, 2016,7(24):36065-73.

[5] Torti S V, Torti F M. Iron and cancer: more ore to be mined [J]. Nat Rev Cancer, 2013,13(5):342-55.

[6] Manz D H, Blanchette N L, Paul B T, et al. Iron and cancer: recent insights [J]. Ann N Y Acad Sci, 2016,1368(1):149-61.

[7] Dixon S J, Stockwell B R. The role of iron and reactive oxygen species in cell death [J]. Nat Chem Biol, 2014,10(1):9-17.

[8] Shen J, Sheng X, Chang Z, et al. Iron metabolism regulates p53 signaling through direct heme-p53 interaction and modulation of p53 localization, stability, and function [J]. Cell Rep, 2014,7(1):180-93.

[9] Babu K R, Muckenthaler M U. miR-20a regulates expression of the iron exporter ferroportin in lung cancer [J]. J Mol Med (Berl), 2016,94(3):347-59.

[10] Sangokoya C, Doss J F, Chi J T. Iron-responsive miR-485-3p regulates cellular iron homeostasis by targeting ferroportin [J]. PLoS Genet, 2013,9(4):e1003408.

[11] Hornblow R D, Bedford M, Hollingworth R, et al. BRAF mutations are associated with increased iron regulatory protein-2 expression in colorectal tumorigenesis [J]. Cancer Sci, 2017,108(6):1135-43.

[12] Du F, Qian Z M, Gong Q, et al. The iron regulatory hormone hepcidin inhibits expression of iron release as well as iron uptake proteins in J774 cells [J]. J Nutr Biochem, 2012,23(12):1694-700.

[13] Martinkova P, Brtnicky M, Kynicky J, et al. Iron oxide nanoparticles: innovative tool in cancer diagnosis and therapy [J]. Adv Healthc Mater, 2018,7(5).

Effect of ferroportin on the proliferation and migration of NSCLC cells

Zhang Can, Xu Meiqing, Wu Xianning

(Dept of Thoracic Surgery, Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To observe the differential expression of ferroportin (FPN) in non-small cell lung cancer (NSCLC) and to explore the mechanism of FPN effect on NSCLC cell migration and proliferation. **Methods** Immunohistochemistry (IHC) was used to detect the expression level of FPN in 60 cases of lung cancer and 20 cases of normal lung tissue. Western blot was used to detect the expression level of FPN in cell lines. FPN overexpression system (PCDH-FPN-F) and knockdown system (shFPN) were constructed respectively, and verified by Western blot and qRT-PCR. The effect of FPN on lung cancer cell migration was detected by scratch test. Growth curve method was used to detect the effect of FPN on proliferation of lung cancer cells. **Results** Compared with normal lung tissue, the expression of FPN in lung cancer tissues significantly decreased ($P=0.000$). Compared with normal lung cell lines, the expression of FPN in lung cancer cell lines significantly decreased ($P<0.0001$). Compared with the control group, the expression of FPN in the overexpressed group significantly increased (Western

网络出版时间: 2021-3-18 16:32 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210317.1520.008.html>

miR-30a-5p/MTA1 轴与喉鳞状细胞癌细胞 Hep2 生物学特性的相关性研究

裴 婷, 张海利, 陈 英, 史 聪, 樊慧娟

摘要 **目的** 探讨 miR-30a-5p 通过靶向调控 MTA1 对喉鳞癌细胞增殖、迁移、周期和凋亡的影响。**方法** 通过生物信息技术预测 miR-30a-5p 靶基因 MTA1, 并采用实时荧光定量 PCR 和双荧光素酶报告实验验证。将 miR-30a-5p 模拟物 (mimics) 和对照组 (NC) 分别转染至对数期的喉鳞癌细胞株 Hep2 中。利用 CCK-8 实验检测细胞增殖情况, Transwell 实验检测细胞迁移情况, 流式细胞术检测细胞周期和凋亡情况。**结果** 实时荧光定量 PCR 实验结果显示, 实验组和对照组中转染后表达水平分别为 (12.62 ± 0.97) 和 (1.04 ± 0.32) , 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。双荧光素酶报告实验结果显示, miR-30a-5p 模拟物 + pGL4.10 和 + pGL4.73 分别与其野生型和突变型比较表达水平为 (0.41 ± 0.06) 和 (0.91 ± 0.01) , 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在 CCK-8 实验结果显示, 实验组比对照组 24、48、72 h 的吸光度值相对倍数低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Transwell 细胞迁移实验结果显示, 实验组和对照组细胞数目分别为 (207.67 ± 7.23) 个和 (369.00 ± 41.22) 个, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在流式细胞术检测细胞周期结果示, 实验组 G1 期、S 期和 G2 期均较 miR-NC 对照组小, 细胞周期阻滞; 细胞凋亡结果示, 实验组和对照组细胞凋亡率分别为 $(22.61 \pm$

$5.70)$ % 和 (4.52 ± 2.12) %, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

结论 miR-30a-5p/MTA1 轴可能对喉鳞状细胞癌的发生机制产生一定的阻碍作用。

关键词 喉鳞状细胞癌; miR-30a-5p; MTA1; 增殖; 迁移

中图分类号 R 767.19

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)04-0545-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.04.008

微小 RNA (miRNA) 是一类约 20 ~ 24 nt 所构成的内源性非编码单链小分子 RNA, 主要通过与互补靶系列结合干扰翻译发挥作用, 改变蛋白的表达, 影响细胞的生物功能^[1-2]。miR-30a-5p 是其中的一员, 据报道^[3-4], 调节 miR-30a-5p 可以影响多种恶性肿瘤细胞的进展, 但是在喉鳞状细胞癌 (laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC) 中未见报道。转移相关基因 1 (metastasis associated gene 1, MTA1) 主要通过脱去相应抑癌基因组蛋白的乙酰基而重塑染色质的结构, 使其结构紧密不易转录, 减弱表达, 增强癌细胞的转移^[5]。多数文献^[6]报道 MTA1 的过表达与人类恶性肿瘤的恶性程度及进展密切相关。前期研究^[7]表明过表达的 MTA1 可以促进 LSCC 细胞的增殖、迁移和侵袭, 但是其发生机制尚未阐明。该研究通过生物信息技术以及相应的细胞功能实验观察细胞增殖、迁移、周期和凋亡的情况, 表明 miR-30a-5p/MTA1 轴可能对 LSCC 的发生机制产生一定的作用, 为今后的诊断、治疗和愈后提供新思路。

2021-01-22 接收

基金项目: 山西省卫生和计划生育委员会科研基金 (编号: 2017036); 山西省自然科学基金 (编号: 201901D111359)

作者单位: 山西医科大学第一附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 太原 030001

作者简介: 裴 婷, 女, 硕士研究生;

张海利, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: ZHL197502@163.com

blot: $P < 0.01$, qRT-PCR: $P < 0.0001$)。Compared with the control group, FPN expression significantly decreased in the knockdown group (Western blot: $P < 0.001$, qRT-PCR: $P < 0.001$)。After overexpression of FPN, the wound healing distance between cell scratches was significantly lower than that of the control group at 18 h and 36 h. The number of cells in 2 d and 4 d was significantly lower than that in the control group. When FPN was knocked down, the wound healing distance between cell scratches at 18 h and 36 h was significantly higher than that of the control group. The number of cells in 2 d and 4 d was significantly higher than that in the control group. **Conclusion** After low expression of FPN, the migration and proliferation of lung cancer cells were enhanced, which may be the reason for the differential expression of FPN in lung cancer.

Key words lung neoplasms; ferroportin; cell movement; cell proliferation