

miR-144-3p 靶向 *E2F8* 抑制肺腺癌细胞的增殖和侵袭并阻滞细胞周期

宋世伟^a, 李景武^{b*}, 刘晓辉^c

(唐山市人民医院 a. 胸外科; b. 胃肠外科; c. 胸外二科, 中国河北 唐山 063000)

摘要: 为了探究 miR-144-3p 在肺腺癌(lung adenocarcinoma, LUAD)中的作用机制, 本研究基于多个数据库对 miR-144-3p 和其下游靶基因在肺腺癌组织中的表达水平进行了预测; 通过生物信息学方法和文献调研, 确定了 *E2F* 转录因子 8 (*E2F transcription factor 8*, *E2F8*) 为 miR-144-3p 的下游靶基因, 并通过双荧光素酶实验对 miR-144-3p 和 *E2F8* 的靶向结合关系进行了验证; 然后, 通过实时定量聚合酶链反应(real-time quantitative PCR, qRT-PCR)、免疫印迹分析(Western-blot)、细胞毒性检测(Cell Counting Kit-8 assay, CCK-8 assay)、克隆形成、侵袭能力测定和流式细胞术等实验, 对 miR-144-3p 和 *E2F8* 在肺腺癌中的调控机制进行了探究。结果显示, miR-144-3p 在肺腺癌组织和细胞中呈显著低表达, 而 *E2F8* 则显著高表达, 两者存在靶向关系; 过表达 miR-144-3p 或敲低 *E2F8* 能抑制肺腺癌细胞的增殖和侵袭并阻滞细胞周期于 G1 期。上述结果表明, miR-144-3p 通过负调控 *E2F8* 抑制肺腺癌细胞的增殖和侵袭能力, 并阻滞细胞周期于 G1 期, 从而抑制肺腺癌细胞的恶性进展。这为肺癌新检测、治疗手段的开发提供了参考依据。

关键词: miR-144-3p; *E2F* 转录因子 8 (*E2F8*); 肺腺癌(LUAD); 增殖; 侵袭

中图分类号: Q471, R734.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2023)06-0479-09

miR-144-3p Inhibits Proliferation and Invasion of Lung Adenocarcinoma Cells and Arrests Cell Cycle by Targeting *E2F8*

SONG Shiwei^a, LI Jingwu^{b*}, LIU Xiaohui^c

(a. Department of Thoracic Surgery; b. Department of Gastrointestinal Surgery; c. The Second Department of Thoracic Surgery, Tangshan People's Hospital, Tangshan 063000, Hebei, China)

Abstract: To investigate the mechanism of miR-144-3p in lung adenocarcinoma (LUAD), the expression levels of miR-144-3p and its downstream target gene in LUAD tissues were predicted based on multiple databases. Through bioinformatics methods and based on the related literature, *E2F transcription factor 8* (*E2F8*) was identified as the target gene of miR-144-3p, and the dual-luciferase reporter gene assay was conducted to verify the target binding relationship between miR-144-3p and *E2F8*. The regulatory mechanisms of miR-144-3p and *E2F8* in LUAD were explored by real-time quantitative PCR (qRT-PCR), Western-blot, Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay, colony formation assay, invasion assay and flow cytometry. The results showed that miR-144-3p expression was significantly low in LUAD tissues and cells, while *E2F8* expression was significantly high. There was a targeting relationship between miR-144-3p and *E2F8*. Overexpression of miR-144-3p or knockdown of *E2F8* inhibited the proliferation and invasion of LUAD cells and arrested the cell cycle at G1 phase. In summary, miR-144-3p could inhibit the proliferation and invasion of LUAD cells and arrest the cell cycle at G1 phase by negatively regulating *E2F8* expression, thereby inhibiting the malignant progression of LUAD cells. The results may be helpful for developing new methods in lung cancer detection and treatment.

收稿日期: 2022-09-19; 修回日期: 2023-01-11

作者简介: 宋世伟(1989-), 男, 河北唐山人, 硕士, 主治医师, 主要从事肺癌的研究, E-mail: ksahfnf_9821@163.com; * 通信作者: 李景武(1972-), 男, 河北唐山人, 博士, 主任医师, 主要从事肿瘤学的研究, Tel: 0315-2877653, E-mail: ksafgnf_9541@163.com。

Key words: miR-144-3p; E2F transcription factor 8 (E2F8); lung adenocarcinoma (LUAD); proliferation; invasion

(*Life Science Research*, 2023, 27(6): 479-487)

微 RNA (microRNA, miRNA) 作为非编码 RNA 的一种, 在多种癌细胞的增殖、发展、转移、凋亡和周期进程中发挥调控作用^[1-4]。miR-144-3p 已被确认在多种癌症进展中起到重要作用。例如: 在胃癌中, miR-144-3p 通过下调 *PBX3* (*PBX homeobox 3*) 抑制胃癌的上皮间质转化^[5]; 在胶质母细胞瘤中, miR-144-3p 通过调节原癌基因 *c-Met* 发挥肿瘤抑制因子的作用^[6]; 在肝细胞癌中, miR-144-3p 可作为肿瘤抑制因子调节癌症的进展^[7-8]; 在胰腺癌中, miR-144-3p 通过靶向 *FOSB* (*AP-1 transcription factor subunit*) 抑制胰腺癌细胞的恶性表型, 并通过靶向 *PRR11* (*proline-rich protein 11*), 促进细胞凋亡和细胞周期停滞^[9-10]。虽然在肺腺癌 (lung adenocarcinoma, LUAD) 中, miR-144-3p 已被报道能够通过分别靶向 *COL11A1* (*collagen type XI alpha 1 chain*) 和 *EZH2* (*enhancer of zeste homolog 2*) 影响癌症的进展^[11-12]。但是, miR-144-3p 在肺腺癌细胞中的具体调控机制尚不明确。

E2F 转录因子 8 (E2F transcription factor 8, E2F8) 作为 E2F 转录因子家族的成员, 可以影响细胞周期^[13]。文献报道, *E2F8* 的表达在卵巢癌^[14]、肝细胞癌^[15]、甲状腺乳头状癌^[13]和乳腺癌^[16]等多种癌症中显著上调, 影响癌症的恶性进展。Dou 等^[17]报道, miR-223-5p 通过靶向 *E2F8* 抑制非小细胞肺癌的生长和转移。关于 miR-144 和 *E2F8* 在癌细胞发生发展过程中的靶向调控关系也有研究报道, 例如: miR-144 能够通过靶向调控 *E2F8* 的表达, 在体内外抑制甲状腺乳头状癌细胞的增殖^[13]。然而, 在肺腺癌中 miR-144-3p 和 *E2F8* 是否存在靶向关系以及二者在肺腺癌细胞中的作用尚不清楚。本研究旨在通过生物信息学分析、分子实验和细胞功能实验阐明 miR-144-3p/*E2F8* 轴在肺腺癌恶性进展中的调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

miR-144-3p 模拟物 (miR-144-3p-mimic) 及其阴性对照 (NC-mimic)、靶向 *E2F8* 的干扰小 RNA (small interfering RNA, siRNA) si-E2F8 及其阴性对照 (si-NC)、*E2F8* 过表达质粒 (oe-E2F8) 及其阴

性对照 (oe-NC) 均购自锐博生物技术有限公司。pmirGLO 载体购自美国 Promega 公司。实验所用的细胞 (BEAS-2B、PC-9、HCC-78、Calu-3、A549)、培养基 (DMEM、RPMI 1640、Ham's F-12K) 以及胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 均购自北京北纳创联生物技术研究院。

其他主要的试剂或仪器包括: Lipofectamine[®] 3000、Lipofectamine[®] 2000、SuperScript[®] II 反转录酶 (Invitrogen 公司, 美国); TRIzol 溶液、SYBR[®] Primer Script[™] RT-PCR 试剂盒、BCA 试剂盒 (Takara 公司, 日本); 增强型超敏化学发光检测试剂 (FUJIFILM Wako Pure Chemical 公司, 日本); 山羊抗兔 IgG H&L (HRP) 抗体 (Proteintech Group 公司, 美国); *E2F8* 兔单克隆抗体、 β -actin 兔单克隆抗体 (Abcam 公司, 英国); CCK-8 (Cell Counting Kit-8)、SDS-PAGE 凝胶、双荧光素酶报告基因检测试剂盒、结晶紫 (碧云天生物技术公司); pH 7.4 的磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) (ThermoFisher Scientific 公司, 美国); 多聚甲醛 (白鲨生物); 流式细胞仪 (BD Biosciences 公司, 美国); 显微镜 (37XF-PC, 上海光学仪器厂); 倒置显微镜 (Eclipse Ci, 日本 Nikon 公司); 酶标仪 (HBS-1096C, 南京德铁实验设备有限公司); 24 孔板 (Corning 公司, 美国)。

1.2 溶液的配制

细胞周期染色液: 称取 100 μ g 碘化丙啶和 125 mg RNase A 并加入 PBS 溶液 (pH 7.4) 中溶解完全, 混合均匀后转移到 10 mL 容量瓶中, 用 PBS 溶液 (pH 7.4) 定容, 于 4 $^{\circ}$ C 环境中避光保存, 备用。

结晶紫 (0.1%): 称取 0.1 g 结晶紫并加入冰乙酸溶解完全, 摇匀后转移至 100 mL 容量瓶中, 用冰乙酸定容, 于 4 $^{\circ}$ C 环境中避光保存, 备用。

1.3 生物信息学分析

从 TCGA (The Cancer Genome Atlas) 数据库^[18] 下载 TCGA-LUAD 的 mRNA 表达量数据和 miRNA 成熟体表达量数据 ($N_{\text{normal}}=44$, $N_{\text{tumor}}=447$), 根据下载得到的表达量数据对 miR-144-3p 进行表达量和生存分析^[19], 对 mRNA 进行差异表达分析^[20]。通过 miRDB^[21] 数据库和 TargetScan^[22] 数据库对 miRNA 进行下游靶基因预测, 并与上调的差异表

达 mRNA (different expression mRNA, DEmRNA) 取交集, 最后结合文献确定要探究的 miRNA 的下游靶基因。

1.4 细胞培养

BEAS-2B、Calu-3 和 PC-9 细胞用 DMEM 培养基进行培养, HCC-78 细胞用 RPMI 1640 培养基进行培养, A549 细胞用 F-12K 培养基进行培养。所有细胞均在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养, 待细胞生长至 80%~90% 融合度时进行传代。

1.5 细胞转染

实验操作按照 Lipofectamine® 3000 试剂盒制造商提供的说明书进行, 分别将 miR-144-3p-mimic、NC-mimic、si-E2F8、si-NC、oe-E2F8 及 oe-NC 以 50 nmol/L 的终浓度转染到 A549 细胞和 HCC-78 细胞中, 6 h 后对细胞培养液进行更换, 随后继续培养 48 h。

1.6 实时定量聚合酶链反应

使用 TRIzol 溶液对细胞进行裂解, 提取 RNA, 随后使用 SuperScript™ II 反转录酶试剂盒反转录合成 cDNA。然后, 使用两步法 SYBR® Primer Script™ RT-PCR 试剂盒进行实时定量聚合酶链反应(real-time quantitative PCR, qRT-PCR)。U6 和 β -actin 分别用作 miR-144-3p 和 E2F8 的内参。实验重复 3 次。使用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法进行表达量的分析。引物序列见表 1。

1.7 免疫印迹分析

用 RIPA (radio-immunoprecipitation assay) 裂解缓冲液裂解肺腺癌细胞和人支气管上皮细胞以获得总蛋白质, 并使用 BCA 试剂盒对蛋白质浓度进行定量。采用 SDS-PAGE 凝胶电泳法分离所获蛋白质样品后, 将之转于聚偏氟乙烯[poly(vinylidene fluoride), PVDF]膜。室温下用牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭 2 h 后, 将膜与一抗于 4 °C 恒温条件下孵育过夜; 随后, 使用山羊

抗兔 IgG H&L (HRP) (ab6721, 1 : 2 000) 抗体与一抗偶联, 并在室温条件下继续孵育 50 min; 最后, 使用增强型超敏化学发光检测试剂对蛋白质进行显影。一抗包括: E2F8 兔单克隆抗体(ab185727, 1 : 1 000) 和 β -actin 兔单克隆抗体(ab124964, 1 : 10 000)。

1.8 流式细胞术

将转染后的细胞在预冷的 70% 乙醇中重悬, 并在 4 °C 下避光孵育过夜。用 PBS 溶液洗涤后, 加入 500 μ L 含碘化丙啶(10 μ g/mL)和 RNase A (5 U/mL) 的染色液, 在 37 °C 下避光孵育 30 min。使用流式细胞仪分析细胞周期。

1.9 克隆形成实验

将转染的细胞接种到 6 孔板(每孔 6 \times 10² 个细胞)中并维持在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中。细胞克隆肉眼可见时, 用甲醇固定, 20 min 后用结晶紫(0.1%)染色。在显微镜下计数克隆数量, 并用相机拍照。

1.10 CCK-8 实验

将转染的细胞接种到 96 孔板中, 每孔 2 \times 10³ 个细胞。将 10 μ L CCK-8 溶液和 100 μ L 培养基混合均匀后加入到培养板中, 时间梯度为 0 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h。在 37 °C 条件下孵育 2 h 后, 使用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度。

1.11 侵袭实验

使用无血清培养基制备细胞悬液并稀释至 10⁵ mL⁻¹。将 200 μ L 细胞悬液加入到 24 孔板的上室中; 同时, 于下室中加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基或 F-12K 培养基, 以备细胞侵袭。孵育 24 h 后, 将细胞用多聚甲醛固定, 在室温下进行结晶紫染色 30 min, 并使用倒置显微镜成像。实验重复 3 次。

1.12 双荧光素酶实验

将野生型(wild type, WT)和突变型(mutant type,

表 1 引物序列表
Table 1 Primer sequence list

Primer name	Primer sequence
miR-144-3p	Forward primer: 5'-GCCGCTACAGTATAGATGATG-3' Reverse primer: 5'-GCTGTCAACGATACGCTACG-3'
U6	Forward primer: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3' Reverse primer: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCCGT-3'
E2F8	Forward primer: 5'-CCAAACCCTGCTGTGAATA-3' Reverse primer: 5'-TTTCTGGCTCATTACCCT-3'
β -Actin	Forward primer: 5'-AATCGTCCGTGACATTAAGGAG-3' Reverse primer: 5'-ACTGTGTTCGGCTACAGGTCTT-3'

MUT) E2F8 3'非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)分别插入到 pmirGLO 载体,以分别构建 WT-E2F8 和 MUT-E2F8 重组质粒。用 Lipofectamine 2000 试剂将 WT-E2F8 和 MUT-E2F8 载体与 NC-mimic 或 miR-144-3p-mimic 在 A549 细胞中共转染,培养 48 h 后,通过双荧光素酶报告基因检测试剂盒对荧光素酶活性进行测定。

1.13 统计分析

所有实验均至少进行 3 个生物学重复。数据由 Prism 8.0 统计软件处理,测量数据显示为平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)。采用非配对学生 *t* 检验(两组)或单向方差分析(多组)对数据差异进行显著性分析。 $P<0.05$ 代表数据差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-144-3p 在肺腺癌组织中表达下调

为了探究 miR-144-3p 在肺腺癌中的表达情况,我们分析了 TCGA 数据库中的肺腺癌数据集,发现 miR-144-3p 在肺腺癌组织中的表达量比正常组织中的表达量显著降低(图 1A)。为了验证以上结果,本研究使用 qRT-PCR 检测了人支气管上皮细胞系(BEAS-2B)和人肺腺癌细胞系(A549、Calu-3、HCC-78、PC-9)中 miR-144-3p 的表达,结果显示,与 BEAS-2B 细胞相比,A549、Calu-3、HCC-78、PC-9 细胞中 miR-144-3p 显著低表达,其中 A549 和 HCC-78 细胞的低表达结果更为显著(图 1B),故选取这两株细胞系进行后续实验。从

上述的数据可知,miR-144-3p 在肺腺癌中呈显著低表达。

2.2 过表达 miR-144-3p 能抑制肺腺癌细胞的增殖和侵袭并阻滞细胞周期

为了探究 miR-144-3p 对肺腺癌细胞的生物学效应,我们将 NC-mimic 和 miR-144-3p-mimic 分别转染到 A549 细胞和 HCC-78 细胞中,qRT-PCR 检测结果显示,在 miR-144-3p-mimic 组癌细胞中 miR-144-3p 的表达量显著上调(图 2A);流式细胞术检测结果显示,miR-144-3p-mimic 组处在 G1 期的肺腺癌细胞比例显著增加,S 期占比显著降低(图 2B);CCK-8 实验结果显示,miR-144-3p-mimic 组细胞在 450 nm 处的吸光度显著降低(图 2C);克隆形成实验的结果表明,miR-144-3p-mimic 组细胞的克隆形成数量显著少于 NC-mimic 组(图 2D),结合细胞周期结果我们认为 miR-144-3p-mimic 组肺腺癌细胞发生了 G1 期阻滞。此外,侵袭实验的结果表明,miR-144-3p-mimic 能够使肺腺癌细胞的侵袭能力显著下调(图 2E)。以上结果表明,miR-144-3p 能抑制肺腺癌细胞的增殖和侵袭并使得细胞周期阻滞于 G1 期。

2.3 E2F8 是 miR-144-3p 的直接靶标

我们进一步探索了 miR-144-3p 影响肺腺癌生物学功能的可能分子机制。首先,通过 TargetScan、miRDB 数据库对 miR-144-3p 的下游靶基因进行了预测,和上调的 DE mRNA 取交集后获得了 42 个潜在靶基因(图 3A)。然后,通过文献

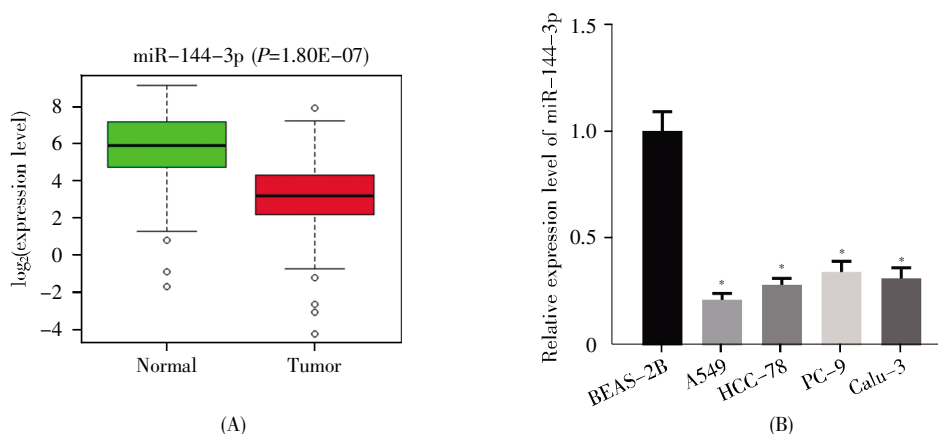


图 1 miR-144-3p 在肺腺癌组织和细胞中的表达分析

(A) 正常组织(绿色)和肿瘤组织(红色)中 miR-144-3p 的表达箱线图;(B) qRT-PCR 检测人支气管上皮细胞系 BEAS-2B 和人肺腺癌细胞系 A549、Calu-3、HCC-78、PC-9 中 miR-144-3p 的表达情况。与 BEAS-2B 相比,*: $P<0.05$ 。

Fig.1 Expression levels of miR-144-3p in LUAD tissues and cells

(A) Boxplot of miR-144-3p expression in normal tissues (green) and tumor tissues (red); (B) The expression of miR-144-3p in the human bronchial epithelial cell line BEAS-2B and human LUAD cell lines A549, Calu-3, HCC-78 and PC-9 detected by qRT-PCR. Compared with BEAS-2B, *: $P<0.05$.

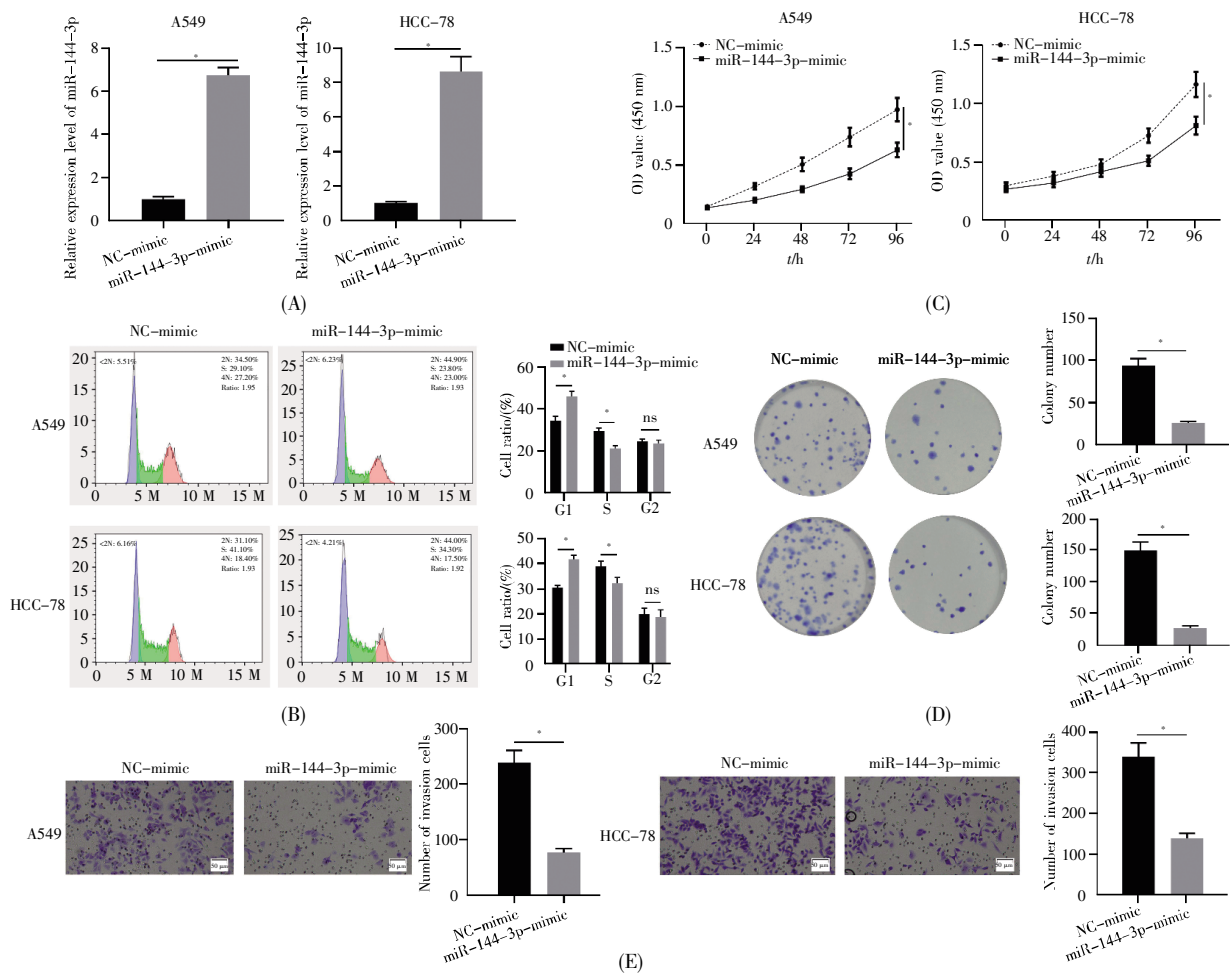


图 2 miR-144-3p 抑制肺腺癌细胞的增殖和侵袭并阻滞细胞周期

(A) 转染 NC-mimic 或 miR-144-3p-mimic 后肺腺癌细胞中 miR-144-3p 的表达分析; (B) 转染 NC-mimic 或 miR-144-3p-mimic 后肺腺癌细胞的周期分布; (C) 转染 NC-mimic 或 miR-144-3p-mimic 后肺腺癌细胞的活力; (D) 转染 NC-mimic 或 miR-144-3p-mimic 后肺腺癌细胞的克隆形成情况; (E) 转染 NC-mimic 或 miR-144-3p-mimic 后肺腺癌细胞的侵袭能力。
*: $P < 0.05$; ns: 无统计学差异。

Fig.2 miR-144-3p inhibits the proliferation and invasion of LUAD cells and arrests the cell cycle

(A) Expression of miR-144-3p in LUAD cells transfected with NC-mimic or miR-144-3p-mimic; (B) Cell cycle distribution of LUAD cells transfected with NC-mimic or miR-144-3p-mimic; (C) Cell viability of LUAD cells transfected with NC-mimic or miR-144-3p-mimic; (D) Cloning of LUAD cells transfected with NC-mimic or miR-144-3p-mimic; (E) Invasion ability of LUAD cells transfected with NC-mimic or miR-144-3p-mimic. *: $P < 0.05$; ns: No significant differences.

检索发现, 预测基因中的 *E2F8* 能够促进肺癌的增殖、迁移和侵袭, 是潜在的肺癌治疗靶点^[23], 并且 *E2F8* 在肺癌中的研究较少, 因此, 在后续实验中选择了 *E2F8* 作为预测靶标进行相关的研究。TCGA 数据库分析结果表明, 与正常组织相比, *E2F8* 在肺癌组织中表达上调(图 3B)。生存分析的结果显示, *E2F8* 高表达患者的总生存时间较短(图 3C)。利用 qRT-PCR 和免疫印迹分析(Western-blot)检测人支气管上皮细胞系 BEAS-2B 和入肺腺癌细胞系(A549 和 HCC-78)中 *E2F8* 的 mRNA 和蛋白质表达量, 结果显示, *E2F8* 在肺腺癌细胞中呈现显著的高表达(图 3D-E)。进一步通过

qRT-PCR 检测肺腺癌细胞转染 miR-144-3p-mimic 后 *E2F8* 的表达情况, 结果显示 miR-144-3p-mimic 会抑制 *E2F8* 的表达(图 3F)。此外, 双荧光素酶实验结果表明, 过表达 miR-144-3p 会显著抑制 *E2F8* 野生型的荧光素酶活性, 但对 *E2F8* 突变型的荧光素酶活性没有明显影响(图 3G)。综上所述, *E2F8* 是 miR-144-3p 的直接靶标。

2.4 敲低 *E2F8* 能抑制肺腺癌细胞的增殖和侵袭并阻滞细胞周期

以上结果已经证明了 *E2F8* 和 miR-144-3p 的靶向关系, 接下来我们以 *E2F8* 为目的基因探究其对肺腺癌细胞生物学表型的影响。构建转染

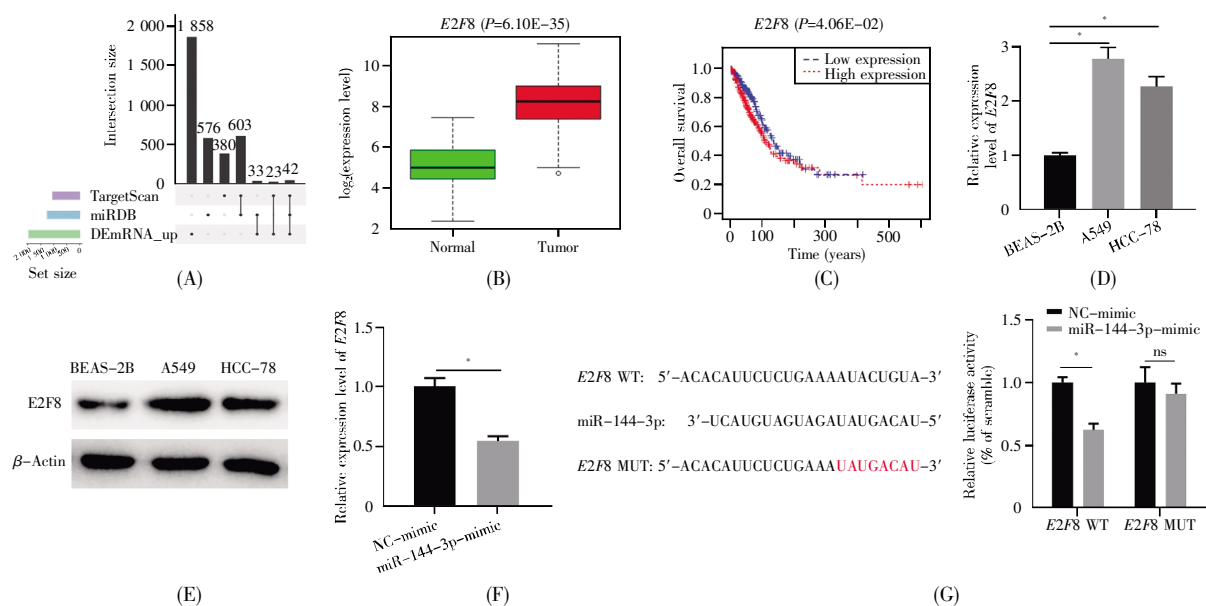


图3 *E2F8* 是 miR-144-3p 的直接靶标

(A) miR-144-3p 下游的预测靶基因和差异表达基因的 UpSet 图; (B) 正常组织(绿色)和肿瘤组织(红色)中 *E2F8* 表达的箱线图; (C) *E2F8* 表达水平高(红线)或低(蓝线)的肺腺癌患者的生存时间; (D~E) 人支气管上皮细胞系和人肺腺癌细胞系中 *E2F8* 的 mRNA 和蛋白质表达分析; (F) 转染 miR-144-3p 后肺腺癌细胞中 *E2F8* 的表达分析; (G) miR-144-3p 和 *E2F8* 的结合位点及双荧光素酶实验检测结果。*: $P < 0.05$; ns: 无统计学差异。

Fig.3 *E2F8* is a direct target gene of miR-144-3p

(A) UpSet plot of predicted target genes and differentially expressed genes downstream from miR-144-3p; (B) Boxplots of *E2F8* expression in normal tissues (green) and tumor tissues (red); (C) Survival time of LUAD patients with high (red line) or low (blue line) *E2F8* levels; (D~E) The mRNA and protein expression of *E2F8* in human bronchial epithelial and LUAD cell lines; (F) The expression level of *E2F8* in LUAD cells after transfection with miR-144-3p-mimic; (G) The binding site of miR-144-3p with WT or MUT *E2F8* genes and the result of dual-luciferase reporter assay. *: $P < 0.05$; ns: No significant differences.

细胞系(si-NC 和 si-E2F8)后, 首先通过 qRT-PCR 实验检测转染效果, 结果显示, 敲低 *E2F8* 后 *E2F8* mRNA 的表达水平显著降低(图 4A)。随后, 通过流式细胞术对细胞周期进程进行分析, 结果显示, 敲低 *E2F8* 会使肺腺癌细胞在 G1 期发生阻滞(图 4B)。CCK-8 和克隆形成实验的结果显示, *E2F8* 敲低组细胞的增殖能力显著低于对照组(图 4C~D)。侵袭实验的结果表明, 敲低 *E2F8* 能够使肺腺癌细胞的侵袭能力显著下调(图 4E)。综上所述, 敲低 *E2F8* 能抑制肺腺癌细胞的增殖和侵袭并阻滞细胞周期。

2.5 miR-144-3p 靶向 *E2F8* 抑制肺腺癌细胞的增殖、侵袭并阻滞细胞周期

将 NC-mimic+oe-NC、NC-mimic+oe-E2F8、miR-144-3p-mimic+oe-NC、miR-144-3p-mimic+oe-E2F8 分别转染 A549 细胞和 HCC-78 细胞, 检测 *E2F8* 蛋白表达水平, 以验证肺腺癌细胞中 miR-144-3p 和 *E2F8* 的相互作用。Western-blot 结果显示, 相较于 miR-144-3p-mimic+oe-NC 组, 同时过表达 miR-144-3p 和 *E2F8* 后 *E2F8* 蛋白的表达水平得到显著提升(图 5A)。接着, 我们通

过克隆形成实验、CCK-8 检测、流式细胞术和侵袭实验对 4 组 A549 细胞的生物学功能进行了观察。流式细胞术实验结果表明, 过表达 *E2F8* 后, 处在 G1 期的肺腺癌细胞比例有所下降, 且过表达 *E2F8* 可以抵消过表达 miR-144-3p 对 A549 细胞产生的 G1 期阻滞作用(图 5B)。CCK-8 检测、克隆形成实验以及侵袭实验结果证明, 过表达 *E2F8* 不仅能够促进 A549 细胞的增殖和侵袭能力, 也可以逆转 miR-144-3p 对 A549 细胞增殖和侵袭能力的抑制作用(图 5C~E)。综上所述, miR-144-3p 能够靶向 *E2F8* 抑制 A549 细胞的增殖和侵袭能力, 并阻滞细胞周期。

3 结论

肺癌是发病率和死亡率均较高的恶性肿瘤之一^[24], 其治疗仍是一大难题^[25], 而肺腺癌是最常见的肺癌类型, 因此探索和确定用于肺腺癌诊断与治疗的新生物标志物意义重大。近年来, miRNA 及相关调控轴的深入研究为肺癌的诊治提供了新的方向^[26-27]。miR-144-3p 被报道作为 miRNA 肿瘤

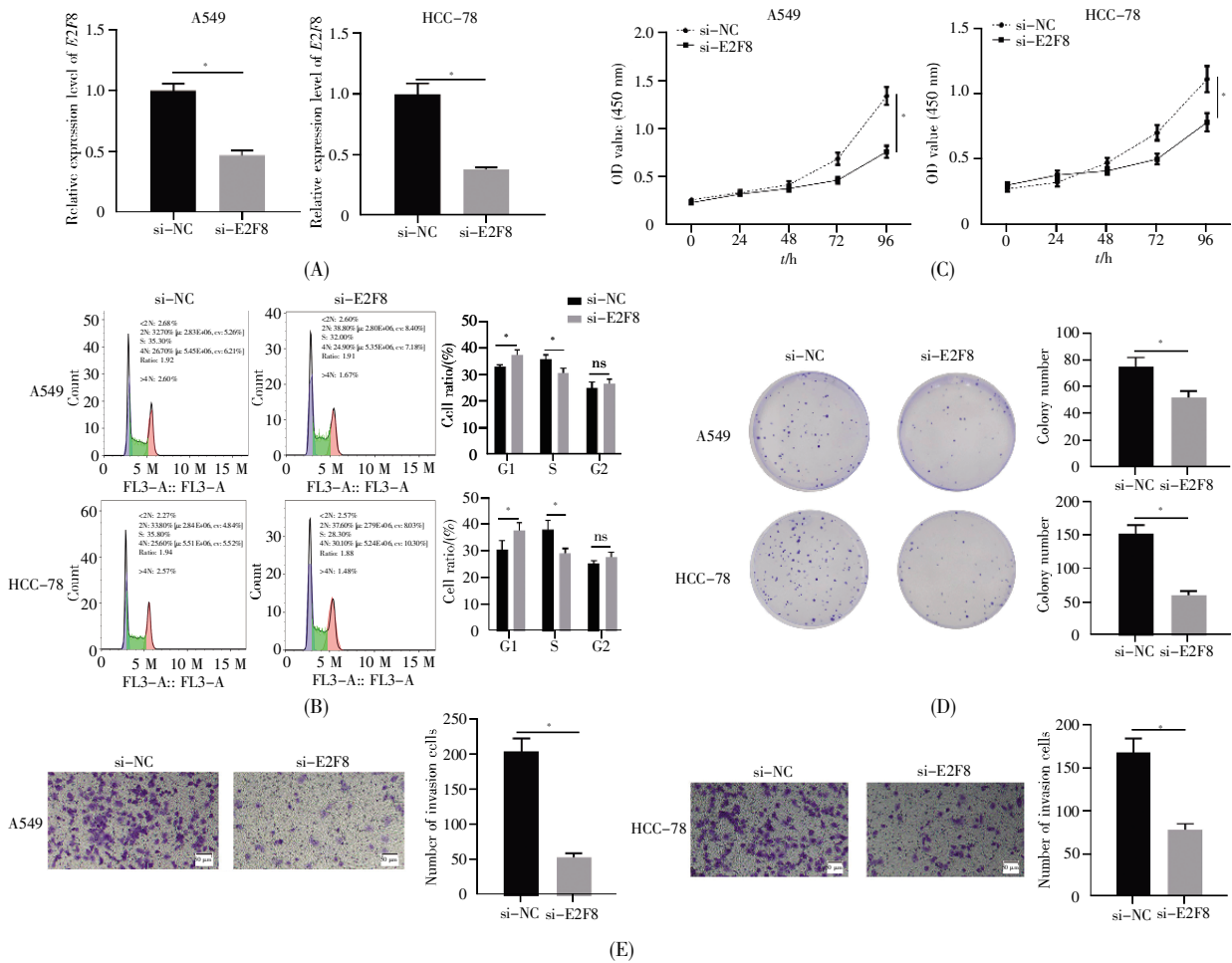


图 4 敲低 *E2F8* 能抑制肺腺癌细胞的增殖和侵袭并阻滞细胞周期

(A) 转染 si-NC 或 si-E2F8 后肺腺癌细胞中 *E2F8* 的表达分析; (B) 转染 si-NC 或 si-E2F8 后肺腺癌细胞的周期分布; (C) 转染 si-NC 或 si-E2F8 后肺腺癌细胞的活力; (D) 转染 si-NC 或 si-E2F8 后肺腺癌细胞的克隆形成情况; (E) 转染 si-NC 或 si-E2F8 后肺腺癌细胞的侵袭能力。*: $P < 0.05$; ns: 无统计学差异。

Fig.4 *E2F8* knockdown inhibits the proliferation and invasion of LUAD cells and blocks the cell cycle

(A) Expression of *E2F8* in LUAD cells transfected with si-NC or si-E2F8; (B) Cell cycle distribution of LUAD cells transfected with si-NC or si-E2F8; (C) Cell viability of LUAD cells transfected with si-NC or si-E2F8; (D) Cloning of LUAD cells transfected with si-NC or si-E2F8; (E) Invasion ability of LUAD cells transfected with si-NC or si-E2F8. *: $P < 0.05$; ns: No significant differences.

抑制因子参与包括肺癌^[28]、肝细胞癌^[29]、胃癌^[30]、卵巢癌^[31]等多种癌症的发展。本研究对 miR-144-3p 在肺腺癌组织中的表达水平进行了分析,发现 miR-144-3p 表达下调,猜测 miR-144-3p 可能是肺腺癌治疗的潜在靶点。进一步的研究发现,miR-144-3p 过表达能够抑制肺腺癌细胞的增殖和侵袭并使细胞周期发生阻滞,提示它可能作为肺腺癌的抑制因子发挥作用。

E2F8 位于染色体 11p15 上,能够编码细胞周期发育调节所需的蛋白质^[32]。*E2F8* 在不同种类的癌症中也得到了广泛的研究,被认为可以通过影响细胞周期导致细胞癌变,比如: *E2F8* 过表达可以调节 G1/S 期转变,并促进乳腺癌细胞增殖^[16];

E2F8 可以通过调节细胞周期促进甲状腺乳头状癌的进展^[13]。此外, Jin 等^[33]发现,二甲双胍通过抑制肺癌细胞中的 *E2F8* 诱导 G1 期细胞周期停滞。然而,目前关于 *E2F8* 在肺腺癌中的研究仍然较少,作用机制仍不清晰。本研究通过分析发现 *E2F8* 在肺腺癌细胞中高表达,并确定了 *E2F8* 是 miR-144-3p 的下游靶基因,二者表达呈负相关,过表达 miR-144-3p 或敲低 *E2F8* 能抑制肺腺癌细胞的增殖和侵袭并阻滞细胞周期。此外,进一步的验证实验表明,miR-144-3p 对肺腺癌细胞增殖和侵袭的抑制作用及对细胞周期的阻滞作用是通过靶向下调 *E2F8* 的表达水平来实现的。

总之,本研究揭示了 miR-144-3p/*E2F8* 轴在

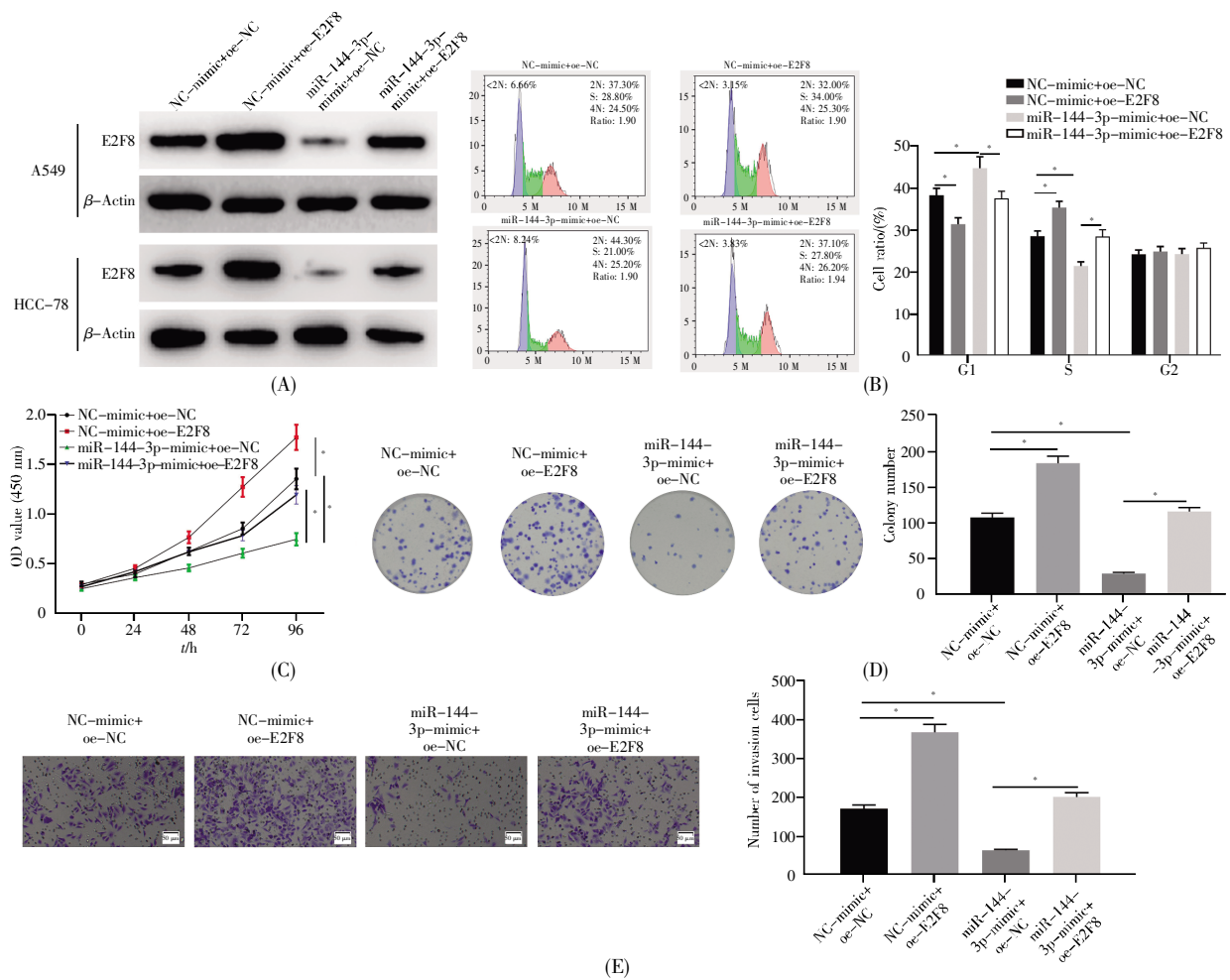


图5 miR-144-3p 靶向 *E2F8* 抑制肺腺癌细胞的增殖和侵袭并阻滞细胞周期

(A) 各转染组肺腺癌细胞中 *E2F8* 蛋白的表达水平; (B) 各转染组 A549 细胞的周期分布; (C) 各转染组 A549 细胞的活力; (D) 各转染组 A549 细胞的克隆情况; (E) 各转染组 A549 细胞的侵袭能力。*: $P < 0.05$ 。

Fig.5 miR-144-3p targeting *E2F8* inhibits the proliferation and invasion of LUAD cells and arrests the cell cycle

(A) *E2F8* expression levels in LUAD cells in each transfection group; (B) Cell cycle distribution of A549 cells in each transfection group; (C) Cell viability of A549 cells in each group after transfection; (D) Cloning of A549 cells in each transfection group; (E) Invasion ability of A549 cells in each group. *: $P < 0.05$.

肺腺癌中发挥调控作用的具体机制, 即 miR-144-3p 能够通过靶向 *E2F8* 抑制肺腺癌细胞的增殖、侵袭并使细胞周期阻滞于 G1 期。这些结果有利于开发肺腺癌临床诊治的新方法。

参考文献(References):

[1] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
 [2] SUN K L, LAI E C. Adult-specific functions of animal microRNAs[J]. Nature Reviews Genetics, 2013, 14(8): 535-548.
 [3] SU Y H, LI X Y, JI W D, et al. Small molecule with big role: microRNAs in cancer metastatic microenvironments[J]. Cancer Letters, 2014, 344(2): 147-156.
 [4] HE L, HANNON G J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation[J]. Nature Reviews Genetics, 2004, 5(7): 522-531.
 [5] LI B T, ZHANG S P, SHEN H, et al. MicroRNA-144-3p sup-

presses gastric cancer progression by inhibiting epithelial-to-mesenchymal transition through targeting PBX3[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 484(2): 241-247.

[6] LAN F M, YU H M, HU M, et al. miR-144-3p exerts anti-tumor effects in glioblastoma by targeting c-Met[J]. Journal of Neurochemistry, 2015, 135(2): 274-286.
 [7] WU M Y, HUANG C Y, HUANG X P, et al. MicroRNA-144-3p suppresses tumor growth and angiogenesis by targeting SGK3 in hepatocellular carcinoma[J]. Oncology Reports, 2017, 38(4): 2173-2181.
 [8] LIANG H W, YE Z H, YIN S Y, et al. A comprehensive insight into the clinicopathologic significance of miR-144-3p in hepatocellular carcinoma[J]. OncoTargets and Therapy, 2017, 10: 3405-3419.
 [9] LIU S D, LUAN J X, DING Y. miR-144-3p targets FosB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit (FOSB) to suppress proliferation, migration, and invasion of PANC-1 pancreatic cancer cells[J]. Oncology Research, 2018, 26(5): 683-690.

- [10] LI J, SUN P S, YUE Z Y, *et al.* miR-144-3p induces cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer cells by targeting proline-rich protein 11 expression via the mitogen-activated protein kinase signaling pathway[J]. *DNA and Cell Biology*, 2017, 36(8): 619-626.
- [11] SUN Y H, LIU Z H, HUANG L F, *et al.* miR-144-3p inhibits the proliferation, migration and invasion of lung adenocarcinoma cells by targeting COL11A1[J]. *Journal of Chemotherapy*, 2021, 33(6): 409-419.
- [12] LIU C, YANG Z Z, DENG Z Y, *et al.* Downregulated miR-144-3p contributes to progression of lung adenocarcinoma through elevating the expression of EZH2[J]. *Cancer Medicine*, 2018, 7(11): 5554-5566.
- [13] SUN J, SHI R, ZHAO S, *et al.* E2F8, a direct target of miR-144, promotes papillary thyroid cancer progression via regulating cell cycle[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2017, 36: 40.
- [14] REIMER D, SADR S, WIEDEMAIR A, *et al.* Expression of the E2F family of transcription factors and its clinical relevance in ovarian cancer[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2006, 1091: 270-281.
- [15] DENG Q, WANG Q, ZONG W Y, *et al.* E2F8 contributes to human hepatocellular carcinoma via regulating cell proliferation[J]. *Cancer Research*, 2010, 70(2): 782-791.
- [16] YE L P, GUO L, HE Z Y, *et al.* Upregulation of E2F8 promotes cell proliferation and tumorigenicity in breast cancer by modulating G1/S phase transition[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(17): 23757-23771.
- [17] DOU L Y, HAN K Y, XIAO M C, *et al.* miR-223-5p suppresses tumor growth and metastasis in non-small cell lung cancer by targeting E2F8[J]. *Oncology Research*, 2019, 27(2): 261-268.
- [18] JIANG X L, YUAN Y X, TANG L, *et al.* Identification and validation prognostic impact of miRNA-30a-5p in lung adenocarcinoma[J]. *Frontiers in Oncology*, 2022, 12: 831997.
- [19] JIANG N, ZOU C, ZHU Y, *et al.* HIF-1 α -regulated miR-1275 maintains stem cell-like phenotypes and promotes the progression of LUAD by simultaneously activating Wnt/ β -catenin and Notch signaling[J]. *Theranostics*, 2020, 10(6): 2553-2570.
- [20] ZHU G S, HUANG H, XU S L, *et al.* Prognostic value of ferroptosis-related genes in patients with lung adenocarcinoma[J]. *Thoracic Cancer*, 2021, 12(12): 1890-1899.
- [21] LIU J F, FENG Y H, ZENG X Y, *et al.* lncRNA VPS9D1-AS1 promotes malignant progression of lung adenocarcinoma by targeting miRNA-30a-5p/KIF11 axis[J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 807628.
- [22] WU X X, SUI Z L, ZHANG H D, *et al.* Integrated analysis of lncRNA-mediated ceRNA network in lung adenocarcinoma[J]. *Frontiers in Oncology*, 2020, 10: 554759.
- [23] PARK S A, PLATT J, LEE J W, *et al.* E2F8 as a novel therapeutic target for lung cancer[J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 2015, 107(9): djv151.
- [24] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, *et al.* Global cancer statistics, 2012[J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2015, 65(2): 87-108.
- [25] DURUISSEAU M, MARTÍNEZ-CARDÚS A, CALLEJA-CE-RVANTES M E, *et al.* Epigenetic prediction of response to anti-PD-1 treatment in non-small-cell lung cancer: a multicentre, retrospective analysis[J]. *The Lancet Respiratory Medicine*, 2018, 6(10): 771-781.
- [26] DENG J, DENG H, LIU C F, *et al.* Long non-coding RNA OIP5-AS1 functions as an oncogene in lung adenocarcinoma through targeting miR-448/Bcl-2[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 98: 102-110.
- [27] VALENTINO F, BORRA G, ALLIONE P, *et al.* Emerging targets in advanced non-small-cell lung cancer[J]. *Future Oncology*, 2018, 14(13s): 61-72.
- [28] QU D H, YAN B D, XIN R, *et al.* A novel circular RNA hsa_circ_0020123 exerts oncogenic properties through suppression of miR-144 in non-small cell lung cancer[J]. *American Journal of Cancer Research*, 2018, 8(8): 1387-1402.
- [29] LI S S, SHAO J J, LOU G H, *et al.* miR-144-3p-mediated dysregulation of EIF4G2 contributes to the development of hepatocellular carcinoma through the ERK pathway[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2021, 40: 53.
- [30] YANG Z X, OUYANG X, ZHENG L, *et al.* Long intergenic non-coding RNA00265 promotes proliferation of gastric cancer via the microRNA-144-3p/Chromobox 4 axis[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 1012-1025.
- [31] LI X F, HU D M, ZHAO Y X, *et al.* Knockdown of lncRNA HCG11 suppresses cell progression in ovarian cancer by modulating miR-144-3p/PBX3[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2020, 24(21): 11032-11040.
- [32] CHRISTENSEN J, CLOOS P, TOFTEGAARD U, *et al.* Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(17): 5458-5470.
- [33] JIN D H, KIM Y, LEE B B, *et al.* Metformin induces cell cycle arrest at the G1 phase through E2F8 suppression in lung cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(60): 101509-101519.