doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.22.004

miR-204 通过抑制 OGT 的表达调控非小细胞肺癌细胞的增殖和迁移 *

景鹏宇 [1] 赵 楠 [2] 朱喜明 [1] 党海舟 [1] 王晓东 [1△]

(1 空军军医大学第二附属医院胸外科 陕西 西安 710038;2 西安医学院公共卫生系 陕西 西安 710021)

摘要 目的: 探究 miR-204 和 O- 连接 N- 乙酰氨基葡萄糖转移酶 (O link N-acetylglucosamine transferase,OGT) 对非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer,NSCLC)细胞增殖和转移的影响,并深入分析其可能机制。**方法:** 采用 Oncomine 及 KM-Ploter 数据库分析 OGT 在肺癌组织中的表达及与肺癌患者预后的关系;采用慢病毒转染人非小细胞肺癌 A549 及永生化人肺支气管上皮细胞 BEAS-2B,分别构建 OGT 稳定下调和过表达的细胞系,利用 CCK-8、平板克隆和裸鼠皮下成瘤实验检测细胞增殖的情况,划痕实验、Transwell 实验和裸鼠尾静脉注射肺转移模型检测细胞转移的情况。利用数据库分析可能参与 OGT 调控的 microRNA,并用双荧光素酶报告基因验证。利用 TCGA 数据库分析 miR-204 在肺癌中的表达情况, 并在 30 例肺癌组织及其对应癌旁组织中分析 miR-204 与 OGT 之间的相关性。**结果:** OGT 在肺癌组织中呈高表达,且与患者的不良预后相关(HR=1.22,$P < 0.01$);OGT 的表达上调肺癌细胞的增殖和转移;miR-204 可以负向调控 OGT 的表达,且 miR-204 在肺癌组织中表达水平显著低于癌旁组织,在肺癌组织中 miR-204 的水平与 OGT 的表达水平呈负相关($R^2 = -0.4729$,$P < 0.01$)。**结论:** 在非小细胞肺癌中,miR-204 的降低通过上调 OGT 的表达促进肺癌的增殖和转移。

关键词: 非小细胞肺癌;增殖;转移;miR-204;OGT

中图分类号: R-33;R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)22-4220-08

miR-204 Regulates the Proliferation and Metastasis of NSCLC Via Inhibiting OGT Expression*

JING Peng-yu [1], ZHAO Nan [2], ZHU Xi-ming [1], DANG Hai-zhou [1], WANG Xiao-dong [1△]

(1 Department of Thoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China; 2 Department of Public Health, Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710021, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of miR-204 and O-GlcNAc transferase (OGT) on the proliferation and metastasis of non-small cell lung cancer (NSCLC), and explore the possible mechanism. **Methods:** Oncomine and KM-Ploter databases were used to analyze the expression of OGT in the lung cancer and their relationship with the prognosis of lung cancer patients. The OGT expression in NSCLC cell line A549 or immortalized human lung bronchial epithelial cells BEAS-2B were stably down-regulated or up-regulated by lentivirus transfection. CCK-8 and Cloning formation assays were used to detect the cell proliferation ability. Wound healing and Transwell assays were used to detect the cell migration ability. Bioinformatics analysis were used to found the microRNAs that may be involved in the OGT expression and to be verified by Dual luciferase reporter gene assay. The expression of miR-204 in lung cancer was analyzed using TCGA database, and the correlation between miR-204 and OGT levels was analyzed in 30 lung cancer tissues and their corresponding adjacent tissues. **Results:** OGT was highly expressed and was associated with the poor prognosis of NSCLC(HR=1.22, $P < 0.01$). The high expression of OGT promoted the proliferation and metastasis of NSCLC cells; miR-204 negatively regulated the expression of OGT, and the expression level of miR-204 was lower in lung cancer tissues. The level of miR-204 in lung cancer tissues was negatively correlated with the expression level of OGT ($R^2 = -0.4729$, $P<0.01$). **Conclusion:** OGT expression is regulated by miR-204 and promotes the proliferation and metastasis of lung cancer.

Key words: Non-small cell lung cancer; Proliferation; Metastasis; miR-204; OGT

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R734.2 Document code: A

Article ID:1673-6273(2019)22-4220-08

前言

肺癌是呼吸系统的常见恶性肿瘤 [1-3]。非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer,NSCLC)占所有肺癌病例的 85%以上,发病率高达 80-90%[3]。尽管 NSCLC 的治疗方法已经取得了很大进展,但 5 年生存率仅 15%。目前,与肺癌化疗相比,靶向药物不仅提高了肺癌的生存率,而且大大减少了邻近正常组织的病变和不良事件的发生率 [3,4]。随着分子生物学技术的发

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81372510)

作者简介:景鹏宇(1985-),男,医学博士,主治医师,研究方向:肺癌的发生发展机制,电话:13080902721,E-mail:jingpengyu163@163.com

△ 通讯作者:王晓东,男,硕士,主治医师,研究方向:肺癌的临床靶向治疗,E-mail:wangxiaodongtyxx@163.com

(收稿日期:2019-06-12 接受日期:2019-06-30)

展，靶向药物治疗已成为近年来研究的热点之一[5]。有研究表明，NSCLC 是由遗传和环境因素之间的长期相互作用引起的，失控的增殖，凋亡和分化都会导致肿瘤发生 [6]。因此，阐明 NSCLC 发生的具体机制，对提高肺癌治疗的临床效果具有重要意义。

在目的蛋白丝氨酸或苏氨酸残基的羟基氧原子上连接 N-乙酰葡萄糖胺(N-acetylglucosamine，GlcNAc)的作用称之为 O 乙酰葡萄糖胺糖基化修饰(O-GlcNAcylation)。O-GlcNAcylation 是一种诱导性和动态的翻译后修饰，其中乙酰葡萄糖胺(N-acetyl-D-glucosamine，GlcNAc)与细胞核或细胞质中蛋白的丝氨酸或苏氨酸残基相连。与磷酸化相似，O-GlcNAcylation 可以通过对多种蛋白质的修饰调节其功能，进而调节众多的细胞生理过程，包括基因表达、信号传导和营养代谢等[7-10]。在哺乳动物细胞中，细胞 O-GlcNAcylation 修饰的稳态由 O- 连接 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 (O-GlcNAc transferase，OGT) 和 O-GlcNAc 酶(O-GlcNAcase，OGA)调控[11,12]。OGT 负责将底物 UDP-GlcNAc 转移到靶蛋白丝氨酸或苏氨酸上，而 OGA 负责将其水解去除。O-GlcNAc 稳态的破坏可能通过修饰肿瘤发生发展中的几个关键分子来促进肿瘤的进展，例如 p53、c-Myc、Snail 等[13, 14]。O-GlcNAcylation 在肺癌中的作用目前只有少数研究提供了相关证据，而肺癌组织中 O-GlcNAc 糖基化及 OGT 升高的原因仍不清楚，亟待进一步研究。

miRNAs 是一类长度约为 22 个核苷酸组成的非编码单链小 RNA 分子，在细胞内主要参与基因的转录后调控过程，扮演着转录负性调控因子的角色。miRNAs 对靶基因 mRNA 的调控方式主要有两种：① 与靶基因 mRNA 完全互补结合，并通过切割靶基因 mRNA 的方式促进 mRNA 降解；② 与靶基因 mRNA 不完全互补结合，不影响靶基因 mRNA 的稳定性，但可阻遏靶基因的翻译。miRNAs 通常作为一类负性转录调控因子，参与肿瘤细胞的增殖与生长、侵袭和转移、分化、凋亡、代谢等过程的调控。miR-204 与 OGT 之间的相互关系及二者在肺癌发生发展中的作用机制尚未完全阐明。本研究主要探究 miR-204 和 OGT 对 NSCLC 细胞增殖和转移的影响，并深入分析其可能机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

细胞系来源于美国模式培养物集存库 (American type culture collection, ATCC)和上海细胞库。按照说明使用含 10% 胎牛血清和 5%青霉素 + 链霉素的 DMEM 或 1640 培养基。培养条件为 37℃含 5%CO_2 恒温培养。

1.2 慢病毒包装及稳转细胞系构建

使用目的基因 OGT 和包装载体共转染 293T 细胞来产生慢病毒。随后通过超速离心进行纯化。将 BEAS-2B 和 A549 细胞接种在 10 mm^2 培养皿中并用慢病毒感染，分别构建 OGT 过表达 BEAS-2B 细胞 (BEAS-2B OE) 及其对照细胞 (BEAS-2B NC)，OGT 下调的 A549 细胞(A549 Sh)及其对照细胞(A549 NC)。

1.3 Transwell 实验

使用具有 8 μm 孔膜的 Transwell 小室(Corning)测定细胞迁移和侵袭。检测细胞侵袭时将膜的上表面覆盖 60 μL 基质胶 (1 mg/mL，Biosciences)。将细胞 (2×10^4 个细胞 / 孔) 悬浮于 200 μL 无血清培养基中并加入上层小室。将含有 10% FBS 的 800 μL 培养基加入下层小室。48 小时后，固定并染色细胞，拭去内室面细胞，随机观察并计数五个视野中聚碳酸酯膜下表面上的结晶紫染色细胞。

1.4 平板克隆和 CCK-8 实验

接种细胞至 6 孔板中(1×10^3 细胞 / 孔)常规培养 14 天，将所得细胞用 70%乙醇固定，用 5%结晶紫染色，拍照比较。将细胞接种在 96 孔板(1×10^4 细胞 / 孔)中培养 24 小时，向每个孔中加入 10 μL Cell Counting Kit-8 溶液(Dojindo)，继续孵育 2h。测量 450 nm 吸光度，绘制增殖曲线。

1.5 RNA 提取和 qRT-PCR

使用 TaKaRa MiniBEST 通用 RNA 提取试剂盒(TaKaRa)从样品中提取 RNA。按照说明采用逆转录试剂盒(TaKaRa)逆转录获取 cDNA。使用 Bio-Rad CFX96 软件 (Bio-Rad，) 和 SYBR Green Master Mix(Qiagen)的实时荧光定量 PCR 仪器进行 mRNA 水平的检测，以 β-actin 作为内参。

1.6 miRNA 的提取及 qRT-PCR

使用 miRNeasy Mini 试剂盒 (Qiagen) 从样品中提取总 RNA。对于 miRNA 表达分析，使用 Mir-X TM miRNA First-Strand Synthesis 试剂盒(TaKaRa)进行逆转录，定量实时 PCR 的循环参数如下：95℃，30 秒；然后进行 45 个循环，95℃，5 秒和 60℃，30 秒。然后进行熔解曲线分析，U6 作为内参。

1.7 双荧光素酶报告基因实验

将 293T 细胞接种至 24 孔板，待细胞密度约 60%时使用转染试剂 X-tremegene HP (Roche)分别转染 Firefly 荧光素酶报告基因质粒(0.1 μg)、miR-204 质粒(0.4 μg)以及 Renilla 荧光素酶质粒(0.02 μg)。48h 后按照说明书使用双荧光素酶报告基因实验系统(Dual-Luciferase Reporter Assay System，Promega)检测荧光值。

1.8 动物实验

使用 6 周龄 BALB/C 裸鼠。对于体内增殖实验，将含有 2×10^6 个细胞的 100 μL PBS 溶液注射到小鼠背部的右侧以建立皮下异种移植肿瘤模型，每组小鼠 6 只。每周测量小鼠体重和肿瘤大小，在 6 周后深度麻醉并处死所有小鼠。记录每个肿瘤的最终体积和重量。使用以下公式计算肿瘤体积：肿瘤体积(mm^3)= [长度(mm)× 宽度$(mm)^2$]π/ 6。对于肺癌细胞体内转移实验，通过尾静脉注射含有 2×10^6 个 A549 细胞的 100 μL PBS 溶液，每组小鼠 6 只。将小鼠在注射后 8 周麻醉处死，取出肺脏，并通过 H&E 染色进行肺转移灶的组织学评估。所有动物程序均在伦理委员会的批准下按照 NIH 动物操作指南进行。

1.9 统计学分析

采用 Prism 5.01 和 SPSS 18.0 进行数据统计分析。计量资料均以均数± 标准差表示，两组之间的比较采用 Student's t 检验，两个变量相关程度的统计采用 Pearson 相关性分析。$P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。* 代表 $P < 0.05$，** 代表 $P < 0.01$，ns 代表 $P > 0.05$。

2 结果

2.1 肺癌组织中 OGT 的表达升高

首先，我们利用 Oncomine 数据库分析了 OGT 与 OGA 在肺癌组织中的表达情况，结果显示与正常肺组织相比，肺癌组织中 OGT 的表达升高 (图 1a)，而肺癌组织与正常肺组织 OGA 的表达无显著差异(图 1b)。我们进一步采用 KM-Plotter 数据库分别评估 OGT 和 OGA 的表达与 1926 例肺癌患者预后的关系，结果显示过表达 OGT 的肺癌患者预后较差 (HR=1.22，$P = 0.002$)(图 1c)，而 OGA 的表达与肺癌患者的预后无显著相关性 (图 1d)。以上结果提示肺癌组织中 O-GlcNAcylation 糖基化表达升高可能是由于 OGT 的过表达导致的，而不是 OGA 的低表达。

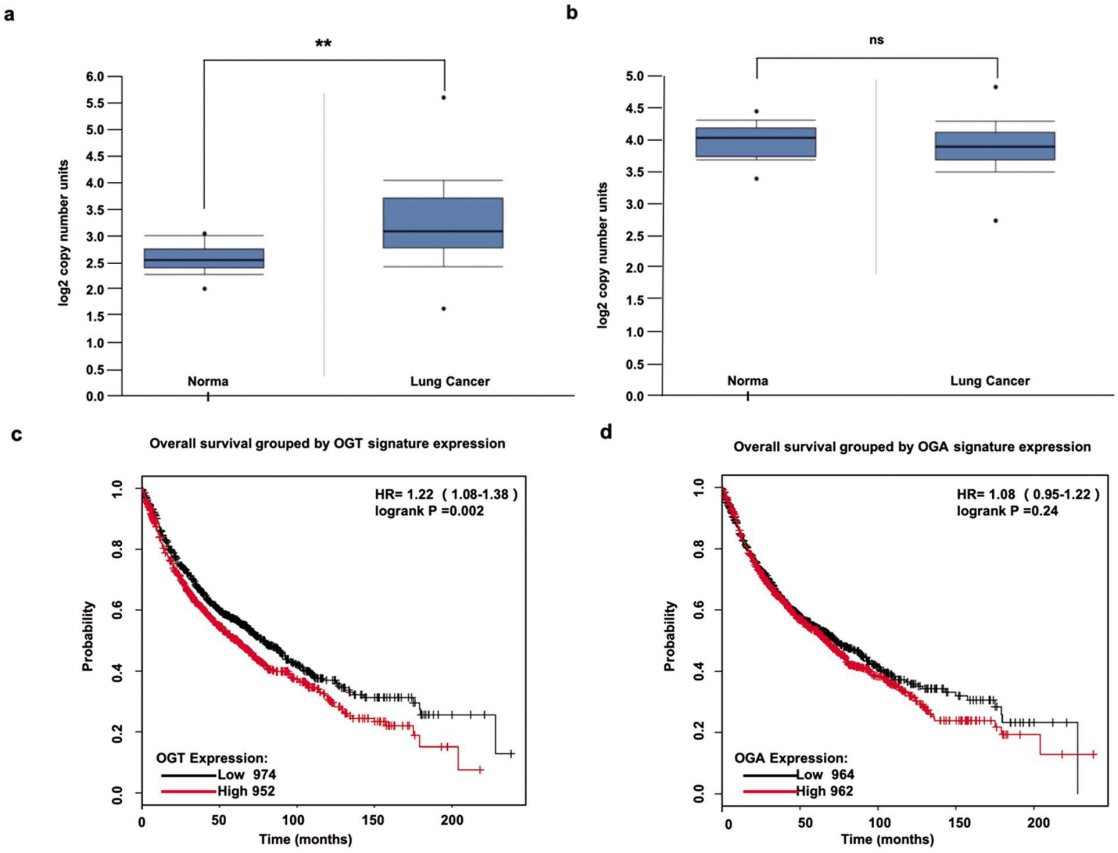

图 1 OGT 在肺癌组织中呈高表达

Fig. 1 OGT was overexpressed in the lung cancer

注：a：利用 Oncomine 数据库分析 OGT 在肺癌中的表达；b：利用 Oncomine 数据库分析 OGA 在肺癌中的表达；c：利用 KM-Plotter 数据库分析 OGT 与肺癌患者全因死亡率之间的关系；d: 利用 KM-Plotter 数据库分析 OGA 与肺癌患者全因死亡率之间的关系。

Note: a. OGT expression in lung cancer was analyzed by Oncomine database; b. OGA expression in lung cancer was analyzed by Oncomine database; c. The relationship between OGT and mortality of lung cancer patients was analyzed by KM-Plotter database; d. The relationship between OGA and mortality of lung cancer patients was analyzed by KM-Plotter database.

2.2 OGT 过表达促进肺癌细胞的增殖

为了进一步验证 OGT 在肺癌进展中的作用，我们利用肺癌细胞系进行了进一步的细胞学实验。采用慢病毒转染下调肺癌 A549 细胞中 OGT 的表达，上调 BEAS-2B 中 OGT 的表达。CCK8 细胞增殖曲线表明下调 OGT 表达的肺癌 A549 细胞增殖明显减缓 (图 2a)。相反，在正常的肺支气管上皮细胞 BEAS-2B 中，过表达 OGT 后细胞增殖速度增加(图 2b)。同样地，平板克隆实验也证实了我们的结论，即 OGT 过表达可以促进肺癌细胞的增殖 (图 2c 和 d)。为了进一步验证在体内 OGT 是否也可以调节肺肿瘤生长，我们采用下调 OGT 的 A549 细胞及其对照细胞构建裸鼠皮下荷瘤实验(n = 6)。皮下注射后每 4 天测量肿瘤，并在第 42 天处死所有小鼠，取出皮下的肿瘤组织。虽然 OGT 下调组和对照组肿瘤发生率相似(5 / 5, 100%)，但两组间肿瘤体积存在显著差异。OGT 下调组肿瘤生长较慢，最终肿瘤体积小于对照组(图 2e)。此外，与对照组相比，移植了 OGT 下调 A549 细胞的小鼠肿瘤重量显著降低(670.1 ± 137.5 mg vs. 323.9 ± 70.1 mg，$P < 0.05$)(图 2f)。

2.3 OGT 过表达促进肺癌细胞的迁移和侵袭

为了进一步验证 OGT 表达与肺癌细胞迁移侵袭的关系，我们利用上述转染细胞进行了划痕试验和 Transwell 实验。如图 3a 和 b 所示，在 A549 细胞中下调 OGT 后，其迁移至划痕中心的效率远低于对照组细胞；在正常的肺支气管上皮细胞 BEAS-2B 中过表达 OGT 后，细胞的迁移能力显著增强。此外，Transwell 实验结果显示在 A549 细胞中下调 OGT 的表达显著减低细胞迁移及侵袭的能力(图 3c)，在正常的肺支气管上皮细胞 BEAS-2B 中过表达 OGT 后，细胞迁移及侵袭能力显著增强(图 3d)。鉴于 OGT 在体外抑制细胞的迁移和侵袭，我们假设 OGT 可以参与调控肺癌细胞的体内转移。为了测试这一推测，

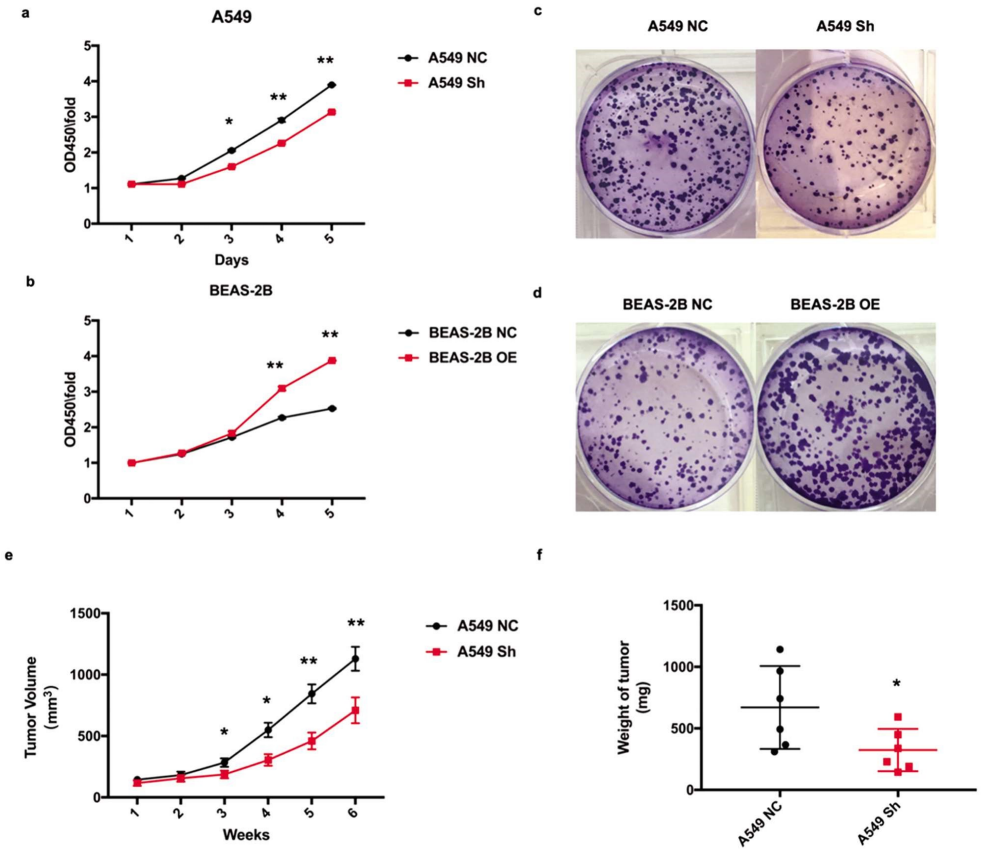

图 2 OGT 过表达促进肺癌细胞的增殖和生长

Fig. 2 Overexpression of OGT promoted proliferation and growth of lung cancer cells

注:a:CCK8 实验表明,下调 OGT 显著降低 A549 细胞的增殖速率;b:CCK8 实验表明,过表达 OGT 显著增加了 BEAS-2B 细胞的增殖速率;c:平板克隆实验表明,下调 OGT 显著降低 A549 细胞的克隆形成能力;d:平板克隆实验表明,过表达 OGT 显著增加 BEAS-2B 细胞的克隆形成能力;e:通过裸鼠皮下荷瘤实验绘制肿瘤生长曲线表明,下调 OGT 显著降低了肺癌细胞的体内成瘤速率;f:测量裸鼠皮下荷瘤实验瘤体重量表明,下调 OGT 显著降低了肺癌细胞的体内成瘤能力。

Note: a: CCK8 assays indicated that down-regulation of OGT significantly reduced the proliferation of A549 cells; b: CCK8 assays indicated that up-regulation of OGT significantly increased the proliferation of BEAS-2B cells; c: Plate cloning assays indicated that down-regulation of OGT significantly reduced the colony-formation ability of A549 cells; d: Plate cloning assays indicated that up-regulation of OGT significantly increased the colony-formation ability of BEAS-2B cells; e: Tumor growth curves were plotted via subcutaneous xenograft experiments in nude mice. It showed that down-regulation of OGT significantly reduced the tumorigenesis rate of lung cancer cells in vivo; f: Down-regulation of OGT significantly reduced the tumorigenic ability of lung cancer cells in vivo.

我们构建了尾静脉注射肺转移模型。在细胞注射后 8 周处死并解剖小鼠肺组织。肺组织 H&E 染色结果显示,与注射对照组细胞的小鼠中发现的肺转移结节数相比,注射 OGT 下调细胞的小鼠肺部结节较少,病变区域较小 (图 3e 和 f),表明下调 OGT 降低了肺癌细胞的体内转移能力。

2.4 miR-204 负向调控 OGT 的表达

那么,是什么因素导致 OGT 在肺癌组织中表达升高呢?最近研究显示 miRNA 通过其作为转录后调节者的作用在肿瘤进展中发挥重要作用。我们推测 miRNA 的转录后调控可能是导致OGT 在肺癌中表达升高的上游调节机制。为了探索这种可能性,我们采用多个数据库(TargetScanS,miRanda,pictar 和 PITA)分析和预测可能潜在靶向 OGT 的 miRNAs。4 个数据库同时预测到 miR-204 可能负性调控 OGT (图 4a)。miR-204 与 OGT 3'UTR 区域的结合位点在多个物种中均较为保守(图 4b),这进一步提示 miR-204 对 OGT 具有潜在的调控作用。

接下来,我们在细胞中验证 miR-204 能否负向调控 OGT。qPCR 结果显示转染 miR-204 mimic 的 A549 细胞中 miR-204 上调,而 OGT mRNA 的水平相应地下调 (图 4c);而转染 miR-204 inhibitor 的 BEAS-2B 细胞中 miR-204 下调,OGT mRNA 的水平相应地上调(图 4d)。进一步利用双荧光素酶报告基因实验证实 miR-204 可以与 OGT 3'UTR 区域相结合,并负性调节 OGT 的表达(图 4e)。由此可见,OGT 在肺癌细胞中的表达失调可能是由 miR-204 的表达紊乱引起的。

2.5 miR-204 在肺癌中的低表达与 OGT 的表达呈负相关

接下来,我们在肺癌组织及相应的正常肺组织中分析了 miR-204 和 OGT 之间的相互关系。首先,通过 TCGA 数据库分析发现 miR-204 在肺癌组织中的表达较正常肺组织显著降低,明确了在肺癌中 miR-204 表达失调 (图 5a)。紧接着,使用 qRT-PCR 评估了 miR-204 和 OGT 在 30 例 NSCLC 患者癌组织和对应正常肺组织中的表达情况。实验结果显示 OGT 在肺癌组织中的表达显著高于正常肺组织 ($P<0.01$)(图 5b)。相反,miR-204 主要在正常组织中表达,而在肺癌组织中表达降低(P

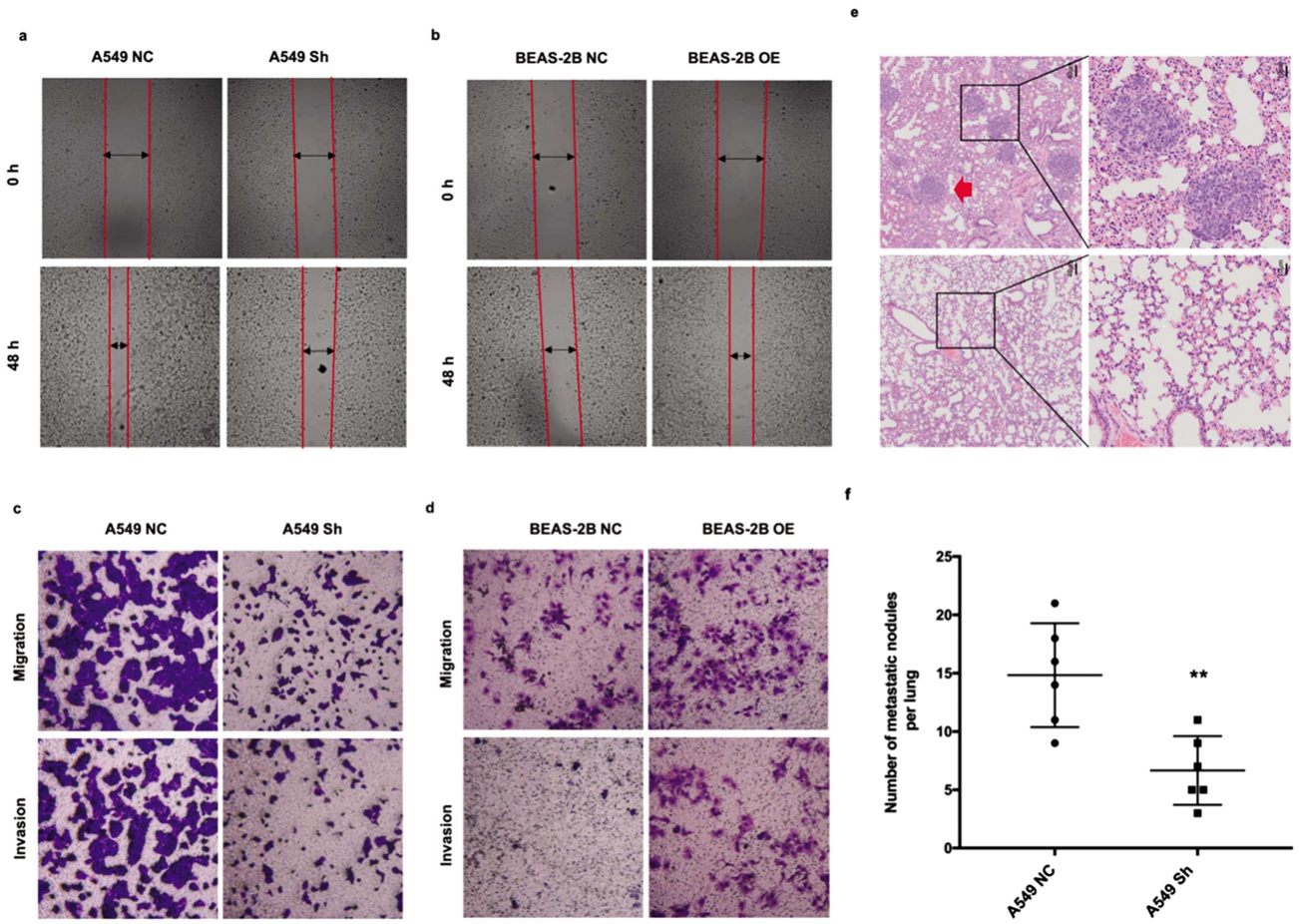

图 3 OGT 过表达促进肺癌细胞的迁移和侵袭

Fig. 3 Overexpression of OGT promoted the migration and invasion of lung cancer cells

注：a:A549 细胞中下调 OGT (A549 Sh) 和对照细胞 (A549 NC) 的划痕实验结果；b:BEAS-2B 细胞中过表达 OGT (BEAS-2B OE) 和对照细胞(BEAS-2B NC)的划痕实验结果；c:A549 细胞中下调 OGT(A549 Sh)和对照细胞(A549 NC)的 Transwell 迁移(Migration)和侵袭(Invasion)实验结果(40×)；d:BEAS-2B 细胞中过表达 OGT(BEAS-2B OE)和对照细胞(BEAS-2B NC)的 Transwell 迁移(Migration)和侵袭(Invasion)实验结果(40×)；e:尾静脉注射肺转移模型中肺组织 H&E 染色结果(左图比例尺 40 μm，右图比例尺 10 μm)；f:尾静脉注射肺转移模型中肺内转移结节数比较。

Note: a: Results of the scratch tests in A549 cells with OGT down-expression and in its control cells; b: Results of the scratch tests in BEAS-2B cells with OGT up-expression and in its control cells; c: Results of transwell assays in A549 cells with OGT down-expression and in its control cells (40×); d: Results of transwell assays in BEAS-2B cells with OGT up-expression and in its control cells (40×); e: Results of H&E staining of lung tissue in tail vein-lung metastasis tumor models (left scale: 40 μm; right scale: 10 μm); f: Comparison of the number of lung metastatic nodules in tail vein-lung metastasis tumor models.

<0.01)(图 5c)。在肿瘤组织中，OGT 的表达与 miR-204 的表达呈现出负相关 (R^2 = -0.4729，$P < 0.01$)(图 5d)。进一步在 A549 和 BEAS-2B 细胞中评估了 OGT 和 miR-204 表达。与肺癌组织的研究结果一致，与 BEAS-2B 相比，肺癌细胞 A549 中 OGT mRNA 水平显著升高，而 miR-204 表达在肺癌细胞中显著降低(图 5e)。这些研究结果表明 OGT 在肺癌细胞中过表达，而 miR-204 在肺癌细胞中低表达，且二者间存在显著负相关。

3 讨论

尽管在肺癌诊断和治疗方面取得了令人瞩目的进展，但肺癌患者的 5 年生存率仍然没有实质性的提升。因此，阐明 NSCLC 发生发展的分子机制对肺癌临床诊治具有重要意义。虽然已有文献报道 OGT 及 O-GlcNAcylation 在肺癌中呈高表达 [15, 16]，同时 miR-204 在肺癌组织中呈中低表达[17, 18]，但这些分子表达失调对于肺癌发生发展的作用以及这些分子之间的联系仍然不清楚。在本研究中，我们发现在肺癌中 O-GlcNAcylation 的升高主要是由于 OGT 表达的升高所导致，且细胞学实验及动物实验均表明 OGT 的升高可以促进肺癌细胞的增殖和转移。同时，OGT 是 miR-204 的靶分子。在肺癌组织中，OGT 的表达与 miR-204 的表达呈负相关。miR-204 的下调可以导致 OGT 表达升高，进而促进肺癌的发生发展。虽然先前的研究已经确定了 OGT 在肺癌中呈高表达，但是我们的研究结果将 miR-204 的表达下调与 OGT 及 O-GlcNAcylation 在肺癌中高表达相联系，从机制上部分解释了 OGT 在肺癌中表达升高的原因，并突出了 miR-204/OGT/O-GlcNAcylation 轴作为肺癌靶向治疗可能的新型分子途径。

miRNA 是下游靶基因表达的内源性抑制因素和大多数细胞生理病理过程的关键调节因子，如细胞生长、迁移和分化[19, 20]。目前研究显示 microRNA 的表达模式与多种癌症分期和进展相关[21, 22]，因此被作为探索癌症诊断的生物标志物。其

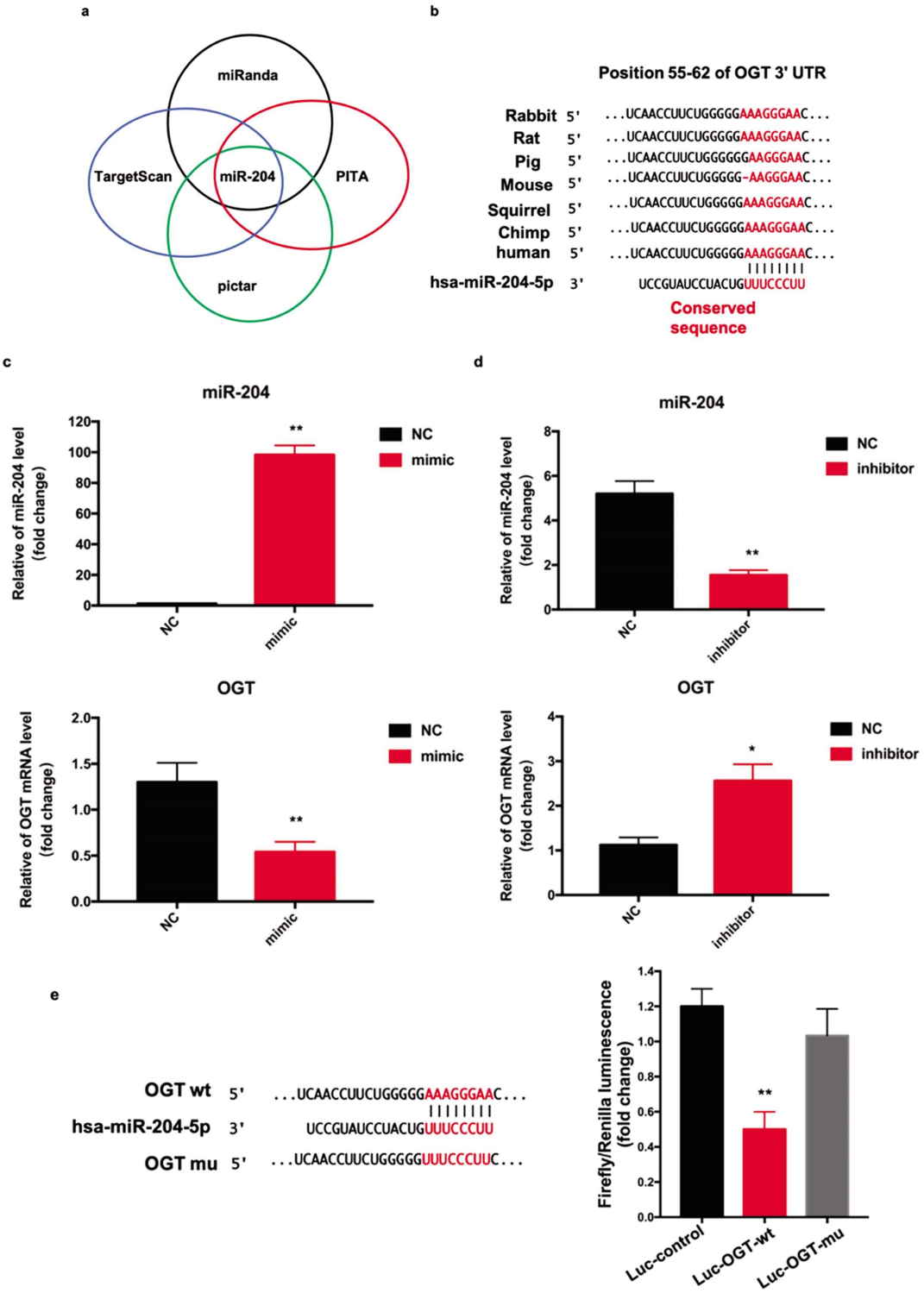

图 4 miR-204 负向调控 OGT 的表达

Fig. 4 miR-204 negatively regulated the expression of OGT

注:a: 利用 TargetScan,miRanda,pictar 和 PITA 数据库同时预测到 miR-204 可以调控 OGT 表达;b:miR-204 与 OGT 基因 3' UTR 区域的结合位点;c:在 A549 细胞中转染 miR-204 mimics 后,miR-204 表达升高(上),OGT mRNA 表达降低(下);d:在 BEAS-2B 细胞中转染 miR-204 inhibitor,后,miR-204 表达降低(上),OGT mRNA 表达升高(下);e:左图为 miR-204 与 OGT 3'UTR 野生型(wt)核苷酸序列的结合位点及其突变序列(mu)。右图为对照组(Luc-control)、OGT 野生组(Luc-OGT-wt)和 OGT 突变组(Luc-OGT-mu)双荧光素酶报告基因实验结果。

Note: a: The databases of TargetScan,miRanda,pictar and PITA predicted that miR-204 could regulate OGT expression; b: Binding sites between miR-204 and OGT 3' UTR; c: After transfection with miR-204 mimics in A549 cells, miR-204 expression was increased (upper) and OGT mRNA expression was decreased (lower); d: After transfection with miR-204 inhibitor in BEAS-2B cells, miR-204 expression was decreased (upper) and OGT mRNA expression was increased (lower); e: The binding sites between miR-204 and OGT 3' UTR wild-type (wt) sequences and their mutated sequences (mu) are shown on the left. The results of dual-luciferase reporter gene experiments on the control group (Luc-control), OGT wild-type group (Luc-OGT-wt) and OGT mutant group (Luc-OGT-mu) are shown on the right.

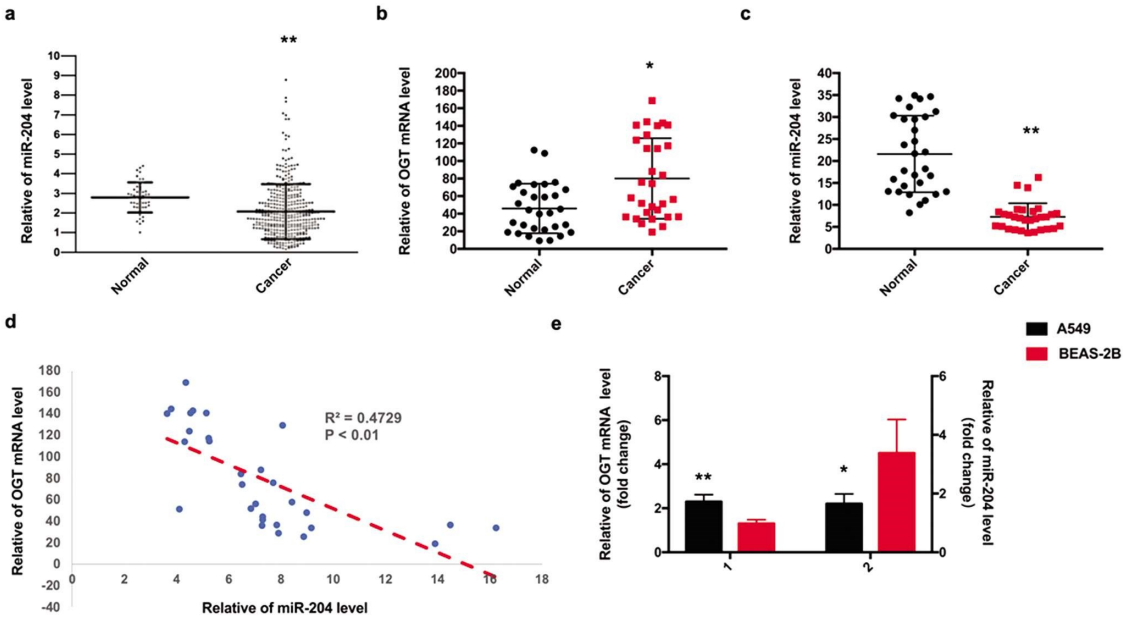

图 5 在肺癌中 miR-204 表达与 OGT 呈负相关

Fig. 5 The expression of miR-204 were negatively correlated with OGT in lung cancer

注:a:利用 TCGA 数据库分析 miR-204 在肺癌及正常肺组织的表达;b:利用 qRT-PCR 检测肺癌组织和对应正常肺组织中 OGT 的表达情况;c:利用 qRT-PCR 检测肺癌组织和对应正常肺组织中 miR-204 的表达情况;d: 肺癌组织中 OGT mRNA 与 miR-204 表达水平呈负相关;e: 利用 qRT-PCR 分别检测 A549 和 BEAS-2B 细胞中 OGT 及 miR-204 的含量。

Note: a: The expression of miR-204 in lung cancer and normal lung tissues were analyzed via TCGA database; b: The expression of OGT in lung cancer and normal lung tissues were detected by qRT-PCR; c: The expression of miR-204 in lung cancer and normal lung tissues were detected by qRT-PCR; d: The expression of miR-204 were negatively correlated with OGT in lung cancer; e: The expression of OGT and miR-204 in A549 and BEAS-2B cells were detected by qRT-PCR.

中,miR-204 在多种类型肿瘤中呈低表达,且 miR-204 过表达会抑制肿瘤细胞的增殖和转移。我们的数据也显示 miR-204 在肺癌细胞和肺癌组织中的表达均显著降低。多个数据库(TargetScan,miRanda,pictar 和 PITA) 同时预测到 miR-204 可能潜在靶向调控 OGT 转录和表达。

miRNA 的表达失调可能是多种肿瘤发生发展的因素之一[23-25]。研究显示 miR-204 通常在多种癌症中低表达，包括 NSCLC。miR-204 通常在癌症中起肿瘤抑制因子的作用。例如，miR-204 靶向 RAB22A 可抑制结肠直肠癌细胞的增殖和侵袭。miR-204 的表达降低与乳腺癌患者的不良预后正相关[26, 27]。在 NSCLC 中,已发现 miR-204 通过抑制 NUAK1 抑制 NSCLC 的转移[28]。此外,有报道显示 miR-204 可调控血管生成因子进而影响肿瘤血管生成。例如，miR-204 的下调与视网膜上皮细胞和多种癌细胞中 PDGF 的表达增强有关[28],提示 miR-204 在肺肿瘤血管生成中可能也发挥一定的作用。因此,miR-204 的过表达可能代表治疗 NSCLC 的潜在策略。

本研究中,虽然我们证实了 OGT 是 miR-204 的直接靶标,但 OGT 同时也是其他 miRNAs 的靶标，包括 miR-101 [29]和 miR-7 [30]。因此,OGT 及 O-GlcNAcylation 也可能是受这些 miRNAs 甚至其他未鉴定的 miRNAs 的协同调节。这就可以解释为什么一种 miRNA 的过表达,例如 miR-204,在肺癌细胞中不能完全逆转 OGT 及 O-GlcNAcylation 的升高。总之,本研究结果提示肺癌中 miR-204 表达失调与 OGT 及 O-GlcNAcylation 异常升高之间的分子机制和功能联系,为利用 miR-204 下调和 OGT 过表达预测肺癌患者预后不良提供了理论基础。

参 考 文 献(References)

[1] M. Mateu-Jimenez, V. Curull, L. Pijuan, et al. Systemic and Tumor Th1 and Th2 Inflammatory Profile and Macrophages in Lung Cancer: Influence of Underlying Chronic Respiratory Disease [J]. J Thorac Oncol, 2017, 12(2): 235-248

[2] S. Schmid, A. Csanadi, N. Kozhuharov, et al. CC-Chemokine Ligand 18 Is an Independent Prognostic Marker in Lymph Node-positive Non-small Cell Lung Cancer[J]. Anticancer Res, 2018, 38(7): 3913-3918

[3] G. Fasola, E. De Carlo, F. Grossi. Checkpoint inhibitors in the decision-making algorithm of advanced non-small-cell lung cancer[J]. Recenti Prog Med, 2018, 109(6): 328-332

[4] K. Domvri, P. Zarogoulidis, K. Darwiche, et al. Molecular Targeted Drugs and Biomarkers in NSCLC, the Evolving Role of Individualized Therapy[J]. J Cancer, 2013, 4(9): 736-754

[5] I.S. Florian, C. Tomuleasa, O. Soritau, et al. Cancer stem cells and malignant gliomas. From pathophysiology to targeted molecular therapy[J]. J buon, 2011, 16(1): 16-23

[6] H. Oliveres, C. Caglevic, F. Passiglia, et al. Vaccine and immune cell therapy in non-small cell lung cancer [J]. J Thorac Dis, 2018, 10 (Suppl 13): s1602-s1614

[7] P. Jozwiak, E. Forma, M. Brys, et al. O-GlcNAcylation and Metabolic Reprograming in Cancer[J]. Front Endocrinol, 2014, 5: 145

[8] J.L. Tian, H. Qin. O-GlcNAcylation Regulates Primary Ciliary Length by Promoting Microtubule Disassembly [J]. iScience, 2019, 12: 379-

391

[9] Z.A. Bacigalupa, C.H. Bhadiadra, M.J. Reginato. O-GlcNAcylation: key regulator of glycolytic pathways[J]. J Bioenerg Biomembr, 2018, 50(3): 189-198

[10] S. Sugahara, S. Kume, M. Chin-Kanasaki, et al. Protein O-GlcNAcylation Is Essential for the Maintenance of Renal Energy Homeostasis and Function via Lipolysis during Fasting and Diabetes [J]. J Am Soc Nephrol, 2019, 30(6): 962-978

[11] Y. Li, M. Xie, L. Men, et al. O-GlcNAcylation in immunity and inflammation: An intricate system (Review)[J]. Int J Mol Med, 2019, [Epub ahead of print]

[12] H. Nie, W. Yi. O-GlcNAcylation, a sweet link to the pathology of diseases[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2019, 20(5): 437-448

[13] Z. Ma, K. Vosseller. O-GlcNAc in cancer biology [J]. Amino Acids, 2013, 45(4): 719-733

[14] Z. Ma, K. Vosseller. Cancer metabolism and elevated O-GlcNAc in oncogenic signaling[J]. J Biol Chem, 2014, 289(50): 34457-34465

[15] W. Mi, Y. Gu, C. Han, et al. O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1812 (4): 514-519

[16] Y.C. Lin, C.H. Lin, Y.C. Yeh, et al. High O-linked N-acetylglucosamine transferase expression predicts poor survival in patients with early stage lung adenocarcinoma[J]. Oncotarget, 2018, 9 (57): 31032-31044

[17] W. Guo, Y. Zhang, Y. Zhang, et al. Decreased expression of miR-204 in plasma is associated with a poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer[J]. Int J Mol Med, 2015, 36 (6): 1720-1726

[18] G. Huang, T. Lou, J. Pan, et al. MiR-204 reduces cisplatin resistance in non-small cell lung cancer through suppression of the caveolin-1/AKT/Bad pathway[J]. Aging (Albany NY), 2019, 11 (7): 2138-2150

[19] G. Li, J. Fang, Y. Wang, et al. MiRNA-based therapeutic strategy in lung cancer[J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(39): 6011-6018

[20] M.V. Iorio, C.M. Croce. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review[J]. EMBO Mol Med, 2012, 4(3): 143-159

[21] S. Fittipaldi, F. Vasuri, S. Bonora, et al. miRNA Signature of Hepatocellular Carcinoma Vascularization: How the Controls Can Influence the Signature[J]. Dig Dis Sci, 2017, 62(9): 2397-2407

[22] X. Du, J. Zhang, J. Wang, et al. Role of miRNA in lung cancer-potential biomarkers and therapies[J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(39): 5997-6010

[23] K. Van Roosbroeck, G.A. Calin. Cancer Hallmarks and MicroRNAs: The Therapeutic Connection[J]. Adv Cancer Res, 2017, 135: 119-149

[24] R. Rupaimoole, F.J. Slack. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(3): 203-222

[25] B. Mansoori, A. Mohammadi, S. Shirjang, et al. MicroRNAs in the Diagnosis and Treatment of Cancer[J]. Immunol Invest, 2017, 46 (8): 880-897

[26] Y. Yin, B. Zhang, W. Wang, et al. miR-204-5p inhibits proliferation and invasion and enhances chemotherapeutic sensitivity of colorectal cancer cells by downregulating RAB22A [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(23): 6187-6199

[27] J. Zeng, M. Wei, R. Shi, et al. MiR-204-5p/Six1 feedback loop promotes epithelial-mesenchymal transition in breast cancer [J]. Tumour Biol, 2016, 37(2): 2729-2735

[28] L. Shi, B. Zhang, X. Sun, et al. MiR-204 inhibits human NSCLC metastasis through suppression of NUAK1[J]. Br J Cancer, 2014, 111 (12): 2316-2327

[29] M. Jiang, B. Xu, X. Li, et al. O-GlcNAcylation promotes colorectal cancer metastasis via the miR-101-O-GlcNAc/EZH2 regulatory feedback circuit[J]. Oncogene, 2019, 38(3): 301-316

[30] N. Babae, M. Bourajjaj, Y. Liu, et al. Systemic miRNA-7 delivery inhibits tumor angiogenesis and growth in murine xenograft glioblastoma[J]. Oncotarget, 2014, 5(16): 6687-6700

(上接第 4219 页)

[24] Xiao G, Li Y, Wang M, et al. FBXW7 suppresses epithelial-mesenchymal transition and chemo-resistance of non-small-cell lung cancer cells by targeting snai1 for ubiquitin-dependent degradation[J]. Cell proliferation, 2018, 51(5): e12473

[25] Yeh CH, Bellon M. FBXW7: a critical tumor suppressor of human cancers[J]. Molecular cancer, 2018, 17(1): 115

[26] Akhoondi S. FBXW7/hCDC4 is a general tumor suppressor in human cancer[J]. Cancer Res, 2007, 67

[27] Ibusuki M, Yamamoto Y, Shinriki S, et al. Reduced expression of ubiquitin ligase FBXW7 mRNA is associated with poor prognosis in breast cancer patients[J]. Cancer Science, 2011, 102: 439-445

[28] Tu K, Yang W, Li C, et al. Fbxw7 is an independent prognostic marker and induces apoptosis and growth arrest by regulating YAP abundance in hepatocellular carcinoma[J]. Mol Cancer, 2014, 13: 110

[29] Gong J, Cui Z, Li L, et al. MicroRNA-25 promotes gastric cancer proliferation, invasion, and migration by directly targeting F-box and WD-40 Domain protein 7, FBXW7[J]. Tumour Biol, 2015, 36: 7831-7840

[30] Tang B, Lei B, Qi G, et al. MicroRNA-155-3p promotes hepatocellular carcinoma formation by suppressing FBXW7 expression [J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2016, 35(1): 93

[31] Lerner M, Lundgren J, Akhoondi S, et al. MiRNA-27a controls FBW7/hCDC4-dependent cyclin E degradation and cell cycle progression[J]. Cell Cycle, 2011, 10: 2172-2183

[32] Song R, Liu Q, Hutvagner G, et al. Rule discovery and distance separation to detect reliable miRNA biomarkers for the diagnosis of lung squamous cell carcinoma[J]. BMC Genomics, 2014, 15(9): S16