

• 论 著 •

lncRNA GAS5 靶向 miR-21 通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制肺癌细胞的上皮-间质转化和自噬*

张 茜¹, 刘 杰², 马红霞^{1△}

1. 新疆医科大学附属中医医院呼吸与危重症医学科, 新疆乌鲁木齐 830002; 2. 新疆医科大学第六附属医院康复科, 新疆乌鲁木齐 830002

摘 要:**目的** 探讨长链非编码 RNA(lncRNA)GAS5 靶向微小 RNA-21(miR-21)通过磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路抑制肺癌细胞的上皮-间质转化和自噬。**方法** 实时定量聚合酶链反应(qPCR)检测 lncRNA GAS5 在 5 例非小细胞肺癌(NSCLC)组及癌旁组中的表达。用双荧光素酶报告基因实验检测 lncRNA GAS5 对 miR-21 的靶向作用。另将 A549 细胞分为 5 组,包括 pcDNA-null 组、pcDNA-GAS5 组、pcDNA-GAS5 + mimic-NC 组、pcDNA-GAS5 + mimic 组、pcDNA-GAS5 + mimic + BEZ235 组。用 qPCR 检测 lncRNA GAS5 和 miR-21 表达。用蛋白质印迹法检测 PI3K、磷酸化 Akt(p-Akt)、磷酸化 mTOR (p-mTOR)、贝克兰蛋白 1(Beclin1)、微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)-Ⅱ、LC3-Ⅰ、上皮钙黏蛋白(E-cadherin)、神经钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、扭转蛋白 1(Twist1)、核增殖相关抗原(Ki67)和增殖细胞核抗原(PCNA)表达。采用 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物法检测细胞增殖活力。**结果** NSCLC 组 lncRNA GAS5 表达明显高于癌旁组,差异有统计学意义($P<0.05$)。双荧光素酶报告基因实验确定 A549 细胞中 lncRNA GAS5 对 miR-21 有直接靶向作用。与 pcDNA-null 组比较,pcDNA-GAS5 组细胞增殖活力减少,lncRNA GAS5、PI3K、p-Akt、p-mTOR、Beclin1、LC3-Ⅱ、N-cadherin、Vimentin、Twist1、Ki67、PCNA 表达下调,miR-21、LC3-Ⅰ、E-cadherin 表达上调,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 pcDNA-GAS5 + mimic-NC 组比较,pcDNA-GAS5 + mimic 组细胞增殖活力上调,PI3K、p-Akt、p-mTOR、Beclin1、LC3-Ⅱ、N-cadherin、Vimentin、Twist1、Ki67、PCNA 表达上调,miR-21、LC3-Ⅰ、E-cadherin 表达下调,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 pcDNA-GAS5 + mimic 组比较,pcDNA-GAS5 + mimic + BEZ235 组细胞增殖活力下调,PI3K、p-Akt、p-mTOR、Beclin1、LC3-Ⅱ、N-cadherin、Vimentin、Twist1、Ki67、PCNA 表达下调,LC3-Ⅰ和 E-cadherin 表达上调,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** lncRNA GAS5 通过 miR-21 抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,从而抑制肺癌细胞的上皮-间质转化和自噬,减少细胞增殖活力。

关键词:长链非编码 RNA GAS5; 微小 RNA-21; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路; 肺癌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2025.05.012 中图法分类号:R734.2
文章编号:1673-4130(2025)05-0568-07 文献标志码:A

lncRNA GAS5 targets miR-21 to inhibit epithelial-mesenchymal transformation and autophagy in lung cancer cells through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway*

ZHANG Qian¹, LIU Jie², MA Hongxia^{1△}

1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830002, China;
2. Department of Rehabilitation, the Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830002, China

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of long non-coding RNA (lncRNA) GAS5 on microRNA-21 (miR-21) in lung cancer cells through phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway on epithelium-mesenchymal transformation and autophagy. **Methods** Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to detect the expression of lncRNA GAS5 in 5 patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) and adjacent groups.

* 基金项目:“天山英才”——青年科技拔尖人才项目(2022TSYCCX0028);新疆维吾尔自治区天山创新团队计划项目(2023D14004)。
作者简介:张茜,女,副主任医师,主要从事呼吸疾病研究方向研究。△ 通信作者,E-mail:jasmine0991@163.com。

Dual luciferase reporter gene assay was used to detect the targeting effect of lncRNA GAS5 on miR-21. A549 cells were divided into 5 groups, including pcDNA-null group, pcDNA-GAS5 group, pcDNA-GAS5 + mimic group, pcDNA-GAS5 + mimic group and pcDNA-GAS5 + mimic + BEZ235 group. lncRNA GAS5 and miR-21 expression were detected by qPCR. PI3K, phosphorylated Akt (p-Akt), phosphorylated mTOR (p-mTOR), Beclin1, microtubule-associated protein light chain 3 (LC3)-II, LC3-I, E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, Twist1, proliferation associated nuclear antigen (Ki67) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression. The cell proliferation activity was measured by 3-(4, 5-dimethylthiazole-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide method. **Results** lncRNA GAS5 expression in NSCLC group was significantly higher than that in adjacent group, with statistical significance ($P < 0.05$). Dual luciferase reporter gene assay determined that lncRNA GAS5 in A549 cells had a direct targeting effect on miR-21. Compared with pcDNA-null group, cell proliferation activity decreased in pcDNA-GAS5 group. lncRNA GAS5, PI3K, p-Akt, p-mTOR, Beclin1, LC3-II, N-cadherin, Vimentin, Twist1, Ki67 and PCNA were down-regulated, while miR-21, LC3-I and E-cadherin were up-regulated, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with pcDNA-GAS5 + mimic group, the cell proliferation activity of pcDNA-GAS5 + mimic group was up-regulated. The expressions of PI3K, p-Akt, p-mTOR, Beclin1, LC3-II, N-cadherin, Vimentin, Twist1, Ki67, and PCNA were up-regulated, while the expressions of miR-21, LC3-I, and E-cadherin were down-regulated, with statistical significance ($P < 0.05$). Compared with pcDNA-GAS5 + mimic + BEZ235 group, the cell proliferation activity of pcDNA-GAS5 + mimic + BEZ235 group was down-regulated. The expressions of PI3K, p-Akt, p-mTOR, Beclin1, LC3-II, N-cadherin, Vimentin, Twist1, Ki67 and PCNA were down-regulated, while the expressions of LC3-I and E-cadherin were up-regulated, with statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** lncRNA GAS5 inhibits PI3K/Akt/mTOR signaling pathway through miR-21, thereby inhibiting epithelial-mesenchymal transformation and autophagy of lung cancer cells, and reducing cell proliferation activity.

Key words: long non-coding RNA GAS5; microRNA-21; phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin signaling pathway; lung cancer

我国肺癌发病率在各类癌症中居首位,肺癌分为非小细胞肺癌(NSCLC)和小细胞肺癌(SCLC),NSCLC占85%~90%^[1-2]。肺癌受多种遗传和环境因素的调控,如吸烟、空气污染、家族遗传、放射线暴露和职业暴露^[3]。已确认表观遗传学改变、信号通路异常和非编码核糖核酸(RNA)等分子变化影响肺癌发展和预后,但对发病机制和生物学过程的了解仍有限^[4-5]。长链非编码RNA(lncRNA)是长度超过200个核苷酸的转录RNA,具有重要调控作用^[6]。lncRNA GAS5在多种恶性肿瘤中表达,并参与抑制肿瘤发生和转移^[7],并在肺癌、肝癌、结直肠癌、胃肠道间质瘤、胰腺癌、胃癌和宫颈癌等的不良预后中起关键作用^[8]。磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路是调控发育和干细胞特性的重要信号通路,与癌症密切相关^[9]。最近的研究显示,该信号通路参与了肺癌的上皮-间质转化(EMT)和自噬^[10-11]。然而,针对lncRNA GAS5与PI3K/Akt/mTOR信号通路在NSCLC中的关系,以及对人A549细胞中自噬和EMT的影响,目前研究较少。另外,微小RNA-21(miR-21)是一种常见的癌症相关miRNA,并且参与调控癌症的多种生物过程,如细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭。这使得miR-21成为研究癌症机制的重要靶

点^[12]。研究发现,结直肠癌、破骨细胞、膜间皮细胞中lncRNA GAS5均对miR-21有调控作用^[13-15]。然而,目前仍然缺乏在NSCLC细胞中lncRNA GAS5对miR-21的调控研究。因此,本研究探讨lncRNA GAS5靶向miR-21通过PI3K/Akt/mTOR信号通路抑制肺癌细胞的EMT和自噬,旨在揭示lncRNA GAS5在肺癌发生发展中的分子机制。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2022年1月至2023年6月在新疆医科大学附属中医医院接受手术的5例NSCLC患者作为研究对象。年龄42~74岁,平均(54±9)岁,排除有其他恶性肿瘤患者。其中鳞状细胞癌3例,腺癌2例;肿瘤最大径≤4 cm 2例,肿瘤最大径>4 cm 3例;分化差3例,中高度分化2例;有淋巴结转移3例,无淋巴结转移2例。将NSCLC患者癌组织(NSCLC组)和癌旁组织(距肿瘤边缘超过5 cm,癌旁组)采集并保存在液氮中,所有标本经病理学确认,患者在手术前未接受放疗和化疗。本研究遵循自愿原则,经过患者及家属的知情同意,以及通过新疆医科大学附属中医医院伦理委员会的批准。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肺癌细胞系A549细胞(NSCLC细胞)和BEAS-2B细胞(健康人肺上皮细

胞)均购于武汉普诺赛生物科技有限公司,并由本实验室培养和传代。这些细胞系都用含有 10% 胎牛血清(FBS)和抗菌药物(100 U/mL 青霉素和链霉素)的 DMEM 培养基培养,培养箱环境为 37 ℃,5% CO₂,湿润且无菌。每 2~3 天进行消化和传代,选择处于对数生长期的细胞进一步实验。

1.2.2 A549 细胞的处理和分组 将研究中的细胞分成以下 5 组。pcDNA-null 组(用 pcDNA-3.1 空质粒对照转染 A549 细胞)、pcDNA-GAS5 组(用 pcDNA-3.1 过表达 A549 细胞中的 lncRNA GAS5)、pcDNA-GAS5+mimic 的阴性对照(mimic-NC)组[用 pcDNA-GAS5 和 mimic-NC(上海吉玛公司)转染 A549 细胞]、pcDNA-GAS5+miR-21 模拟物(mimic)组[用 pcDNA-GAS5 和 mimic(上海吉玛公司)转染 A549 细胞]、pcDNA-GAS5+mimic+BEZ235 组(用 pcDNA-GAS5 和 miR-21 模拟物及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制剂 BEZ235 孵育 A549 细胞)。将对数生长期的细胞以 2×10^5 个/孔接种至 6 孔板中。当培养 12 h 待细胞贴壁后,进行转染前弃原培养基,并用不含青霉素-链霉素的培养基替换。然后,在含有 10 μ L 的脂质体(上海碧云天生物科技有限公司)的 250 μ L OPTI-MEM 培养基(美国 Gibco 公司)中分别加入 pcDNA-null(终浓度 100 μ mol/L)、pcDNA-GAS5(终浓度 100 μ mol/L)、pcDNA-GAS5(终浓度 100 μ mol/L)联合 mimic-NC(终浓度 200 μ mol/L)、pcDNA-GAS5(终浓度 100 μ mol/L)联合 mimic(终浓度 200 μ mol/L)、pcDNA-GAS5(终浓度 100 μ mol/L)联合 mimic(终浓度 200 μ mol/L)及 BEZ235(终浓度 2.5 mg/L)。在 37 ℃ 下的 5% CO₂ 培养箱中用上述各培养基孵育细胞 24 h,随后用完整培养基取代原培养基,用于后续实验。

1.2.3 实时定量聚合酶链反应(qPCR) 用癌症基因组图谱(TCGA)公共数据库预测肺癌组织中 lncRNA GAS5 的表达情况。随后使用 Trizol 试剂盒(日本 Takara 公司)提取细胞和组织中的总 RNA,或提取 A549 细胞的总 miRNA,并测定 RNA 的浓度和纯度。根据 RNA 逆转录试剂盒(日本 Takara 公司)的说明,选择 RNA 进行逆转录,得到总体积为 10 μ L 的互补 DNA(cDNA)。所得到的 cDNA 用 65 μ L 二乙氧基甲烷水稀释并混匀。根据以下分组准备 qPCR 的反应体系:5 μ L SsoFast EvaGreen 超级混合物(美国 BIO-RAD 公司),0.5 μ L 正向引物(10 μ mol/L),0.5 μ L 反向引物(10 μ mol/L),和 4 μ L cDNA。qPCR 扩增条件:95 ℃ 预变性 1 min,95 ℃ 变性 30 s,58 ℃ 退火 5 s,共 30 个循环,最后在 72 ℃ 延伸 5 s。lncRNA GAS5 使用磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参基因,miR-21 使用 U6 作为内参基因,每个样品中的每个基因均重复 3 次。熔解曲线测试 qPCR

结果的可靠性。 $\Delta Ct = Ct(\text{目标基因}) - Ct(\text{内部参考})$ 。目标基因的表达通过 $2^{-\Delta Ct}$ 进行分析^[16]。qPCR 引物序列(5'-3')如下,lncRNA GAS5 正向引物为 CAGTGGGGAAGTCTGACTCG,反向引物为 GTGCCTGGTGCTCTCTTACC;GAPDH 正向引物为 AACGGATTTGGTCGTATTGGG,反向引物为 TCGCTCCTGGAAGATGGTGAT;miR-21 正向引物为 GGCTATGTCTACGCGTTC,反向引物为 AACTGGCATCGCGGTGA;U6 正向引物为 CTCGCTTCGGCAGCACA,反向引物为 AACGCTTCACGAATTTGCGT。

1.2.4 双荧光素酶报告基因实验 利用 starBase v2.0 或 TargetScan Human 7.2 预测了 lncRNA GAS5 与 miR-21 之间的潜在靶向序列。根据 psi-CHECK2 载体(美国 Promega 公司),构建了含有 miR-21 潜在结合序列的突变型荧光素酶报告重组质粒(lncRNA GAS5 MUT)和野生型荧光素酶报告重组质粒(lncRNA GAS5 WT,上海吉玛公司)。将 A549 细胞培养在 96 孔板中,并转染构建的载体和 mimic 或 mimic-NC。转染 48 h 后,采集细胞裂解液,并使用双荧光素酶报告基因系统(美国 Promega 公司)检测细胞裂解液中的荧光素酶活性。

1.2.5 蛋白质印迹法(Western blot) 使用放射免疫沉淀测试缓冲液提取 1.2.2 中各组细胞中的总蛋白,并使用二辛可宁酸测定试剂盒进行鉴定。然后将平均蛋白用 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转移到聚偏二氟乙烯膜上。然后在室温下将膜在 5% 脱脂牛奶中封闭 2 h,并在 4 ℃ 下孵育兔抗-PI3K、磷酸化 Akt(p-Akt)、磷酸化 mTOR(p-mTOR)、贝克兰蛋白 1(Beclin1)、微管相关蛋白 1 轻链 3-II(LC3-II)、微管相关蛋白 1 轻链 3-I(LC3-I)、上皮钙黏蛋白(E-cadherin)、神经钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、扭转蛋白 1(Twist1)、核增殖相关抗原(Ki67)和增殖细胞核抗原(PCNA)、GAPDH 的特异性抗体过夜。随后,将膜在二抗(1:1 000)中孵育 1 h。最后,由电化学发光试剂检测系统试剂进行蛋白条带的显色,并根据 ImageJ 软件分析条带的灰度值。

1.2.6 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物(MTT)实验检测细胞增殖活力 在 1.2.2 中的各组细胞中添加 20 μ L MTT 溶液(质量浓度为 5 mg/mL),继续在 37 ℃ 下孵育 4 h。之后,停止培养,丢弃 MTT 溶液。向每个孔位添加二甲亚砜(150 μ L),并在离心浓缩机上振荡 10 min,以溶解晶体。之后,在振荡后使用 Thermo 全波长微板分光光度计测量 490 nm 处的吸光度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较行 *t* 检

验,多组间的比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

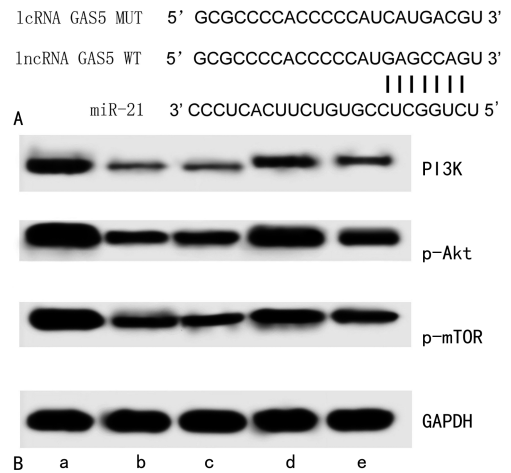
2 结 果

2.1 肺癌组织和 A549 细胞中 lncRNA GAS5 表达

NSCLC 组 TCGA 公共数据库中肺腺癌和肺鳞状细胞癌组织中 lncRNA GAS5 表达(依次为 5.82 ± 1.82 、 5.46 ± 1.75)均高于癌旁组(依次为 4.66 ± 0.51 、 4.40 ± 0.48),差异有统计学意义($P<0.05$)。NSCLC 组 lncRNA GAS5 表达(4.39 ± 0.51)明显高于癌旁组(1.00 ± 0.13),差异有统计学意义($P<0.05$)。与 BEAS-2B 细胞(1.00 ± 0.04)比较,人肺癌细胞系 A549 细胞中的 lncRNA GAS5 表达(5.92 ± 0.39)显著上调,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 lncRNA GAS5 通过靶向 miR-21 调控 A549 细胞中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路 starBase 在线数据库预测发现 lncRNA GAS5 具有多个靶向结合 miR-21 序列位点。在 lncRNA GAS5-WT 转染的细胞中,与 mimic-NC 组(0.20 ± 0.01)比较,mimic 组荧光素酶活性升高(1.00 ± 0.12),差异有统计学意义($P<0.05$)。在 lncRNA GAS5-MUT 转染的细胞中,mimic 组荧光素酶活性(1.00 ± 0.08)与 mimic-NC 组比较(1.00 ± 0.06),差异无统计学意义($P>0.05$)。在 A549 细胞中过表达 lncRNA GAS5,与 pcDNA-null 组(lncRNA GAS5 为 1.00 ± 0.06 、miR-21 为 1.00 ± 0.08 、PI3K 为 1.00 ± 0.11 、p-Akt 为 1.00 ± 0.09 、p-mTOR 为 1.00 ± 0.12)比较,pcDNA-GAS5 组 lncRNA GAS5 表达上调(6.38 ± 0.76),miR-21 表达下调(0.08 ± 0.01),PI3K、p-Akt 及 p-mTOR 表达均下调(PI3K 为 0.19 ± 0.04 、p-Akt 为 0.22 ± 0.02 、p-mTOR 为 0.23 ± 0.03)。pcDNA-GAS5+mimic 组 GAS5 表达(6.37 ± 0.69)与 pcDNA-GAS5+mimic-NC 组(6.39 ± 0.82)比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。与 pcDNA-GAS5+mimic-NC 组(miR-21 为 0.07 ± 0.02 、PI3K 为 0.20 ± 0.03 、p-Akt 为 0.23 ± 0.04 、p-mTOR 为 0.19 ± 0.02)比较,pcDNA-GAS5+mimic 组 miR-21、PI3K、p-Akt 及 p-mTOR 表达(miR-21 为 5.22 ± 0.64 、PI3K 为 0.73 ± 0.08 、p-Akt 为 0.81 ± 0.12 、p-mTOR 为 0.65 ± 0.08)均上调,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 pcDNA-GAS5+mimic 组(PI3K 为 0.73 ± 0.08 、p-Akt 为 0.81 ± 0.12 、p-mTOR 为 0.65 ± 0.08)比较,pcDNA-GAS5+mimic+BEZ235 组 PI3K、p-Akt 及 p-mTOR 表达均下调(PI3K 为 0.26 ± 0.04 、p-Akt 为 0.27 ± 0.03 、p-mTOR 为 0.35 ± 0.05),差异有统计学意义($P<0.05$);pcDNA-GAS5+mimic 组 lncRNA GAS5 和 miR-21 表达(lncRNA GAS5 为 6.40 ± 0.79 、miR-21 为 5.22 ± 0.64)与 pcDNA-GAS5+mimic+BEZ235 组(lncRNA GAS5 为

6.41 ± 0.66 、miR-21 为 5.24 ± 0.74)比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 1。



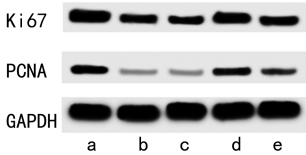
注:A表示生物信息学预测 lncRNA GAS5 与 miR-21 的靶向结合;B表示 Western blot 法检测细胞中 PI3K、p-Akt 及 p-mTOR 表达,a 为 pcDNA-null 组,b 为 pcDNA-GAS5 组,c 为 pcDNA-GAS5+mimic-NC 组,d 为 pcDNA-GAS5+mimic 组,e 为 pcDNA-GAS5+mimic+BEZ235 组。

图 1 lncRNA GAS5 与 miR-21 的靶向结合及各组 PI3K/Akt/mTOR 信号通路中蛋白表达

2.3 lncRNA GAS5 通过下调 miR-21 抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路减少细胞增殖活力 与 pcDNA-null 组(细胞增殖活力为 $97.23\% \pm 12.03\%$ 、Ki67 为 1.03 ± 0.25 、PCNA 为 1.00 ± 0.08)比较,pcDNA-GAS5 组细胞增殖活力($48.59\% \pm 4.59\%$)和 Ki67、PCNA 表达均降低(Ki67 为 0.43 ± 0.05 、PCNA 为 0.15 ± 0.02),差异有统计学意义($P<0.05$)。与 pcDNA-GAS5+mimic-NC 组(细胞增殖活力为 $48.67\% \pm 4.82\%$ 、Ki67 为 0.41 ± 0.06 、PCNA 为 0.14 ± 0.01)比较,pcDNA-GAS5+mimic 组细胞增殖活力和 Ki67、PCNA 表达均上调(细胞增殖活力为 $77.81\% \pm 8.33\%$ 、Ki67 为 0.76 ± 0.09 、PCNA 为 0.78 ± 0.07),差异有统计学意义($P<0.05$)。与 pcDNA-GAS5+mimic 组(细胞增殖活力为 $77.81\% \pm 8.33\%$ 、Ki67 为 0.76 ± 0.09 、PCNA 为 0.78 ± 0.07)比较,pcDNA-GAS5+mimic+BEZ235 组细胞增殖活力和 Ki67、PCNA 表达均下调(细胞增殖活力为 $56.80\% \pm 6.18\%$ 、Ki67 为 0.57 ± 0.05 、PCNA 为 0.28 ± 0.03),差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 2。

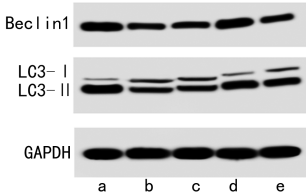
2.4 lncRNA GAS5 通过下调 miR-21 抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路减少自噬 与 pcDNA-null 组(Beclin1 为 1.00 ± 0.04 、LC3-II/LC3-I 为 1.00 ± 0.09)比较,pcDNA-GAS5 组 Beclin1 和 LC3-II/LC3-I 表达均下调(Beclin1 为 0.23 ± 0.09 、LC3-II/LC3-I 为 0.25 ± 0.04),差异有统计学意义($P<0.05$)。与 pcDNA-GAS5+mimic-NC 组(Beclin1 为 0.23 ± 0.02 、LC3-II/LC3-I 为 0.25 ± 0.02)比较,pcDNA-

GAS5+mimic 组 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 表达均上调 (Beclin1 为 0.61 ± 0.07 、LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 为 0.72 ± 0.08)，差异有统计学意义 ($P<0.05$)。与 pcDNA-GAS5+mimic 组 (Beclin1 为 0.61 ± 0.07 、LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 为 0.72 ± 0.08) 比较，pcDNA-GAS5+mimic+BEZ235 组 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 表达均下调 (Beclin1 为 0.39 ± 0.01 、LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 为 0.48 ± 0.03)，差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 3。



注:a 为 pcDNA-null 组,b 为 pcDNA-GAS5 组,c 为 pcDNA-GAS5+mimic-NC 组,d 为 pcDNA-GAS5+mimic 组,e 为 pcDNA-GAS5+mimic+BEZ235 组。

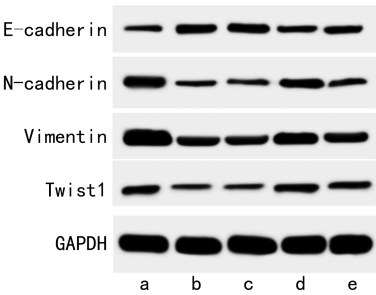
图 2 各组细胞中 Ki67、PCNA 的表达



注:a 为 pcDNA-null 组,b 为 pcDNA-GAS5 组,c 为 pcDNA-GAS5+mimic-NC 组,d 为 pcDNA-GAS5+mimic 组,e 为 pcDNA-GAS5+mimic+BEZ235 组。

图 3 各组细胞中 Beclin1、LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 的表达

2.5 lncRNA GAS5 通过下调 miR-21 抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制 EMT 与 pcDNA-null 组 (E-cadherin 为 1.00 ± 0.07 、N-cadherin 为 1.00 ± 0.08 、Vimentin 为 1.00 ± 0.04 、Twist1 为 1.00 ± 0.03) 比较，pcDNA-GAS5 组 E-cadherin 表达上调 (4.18 ± 0.79)，而 N-cadherin、Vimentin、Twist1 表达均下调 (N-cadherin 为 0.26 ± 0.03 、Vimentin 为 0.45 ± 0.05 、Twist1 为 0.33 ± 0.04)，差异有统计学意义 ($P<0.05$)。与 pcDNA-GAS5+mimic-NC 组 (E-cadherin 为 4.17 ± 0.58 、N-cadherin 为 0.27 ± 0.03 、Vimentin 为 0.45 ± 0.01 、Twist1 为 0.33 ± 0.06) 比较，pcDNA-GAS5+mimic 组 E-cadherin 表达下调 (1.91 ± 0.07)，而 N-cadherin、Vimentin、Twist1 表达均上调 (N-cadherin 为 0.73 ± 0.08 、Vimentin 为 0.76 ± 0.05 、Twist1 为 0.85 ± 0.07)，差异有统计学意义 ($P<0.05$)。与 pcDNA-GAS5+mimic 组 (E-cadherin 为 1.91 ± 0.07 、N-cadherin 为 0.73 ± 0.08 、Vimentin 为 0.76 ± 0.05 、Twist1 为 0.85 ± 0.07) 比较，pcDNA-GAS5+mimic+BEZ235 组 E-cadherin 表达上调 (3.58 ± 0.44)，而 N-cadherin、Vimentin、Twist1 表达均下调 (N-cadherin 为 0.45 ± 0.05 、Vimentin 为 0.49 ± 0.07 、Twist1 为 0.64 ± 0.08)，差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 4。



注:a 为 pcDNA-null 组,b 为 pcDNA-GAS5 组,c 为 pcDNA-GAS5+mimic-NC 组,d 为 pcDNA-GAS5+mimic 组,e 为 pcDNA-GAS5+mimic+BEZ235 组。

图 4 各组细胞中 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Twist1 的表达

3 讨论

基于 lncRNA 在肺部疾病中异常水平和多种因素的作用及 lncRNA 在人类癌症中的作用，lncRNA 被越来越多的研究证实是 NSCLC 的新治疗靶点^[17]。其中一个特殊的 lncRNA 是 lncRNA GAS5，它作为抑制肿瘤生长和抑制多种癌细胞类型的细胞迁移和侵袭的肿瘤抑制剂^[18-19]。本研究结果显示，NSCLC 组 lncRNA GAS5 表达明显高于癌旁组，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；TCGA 公共数据库中肺腺癌和肺鳞癌组织中 lncRNA GAS5 表达 (5.82 ± 1.82 、 5.46 ± 1.75) 均高于癌旁组 (4.66 ± 0.51 、 4.40 ± 0.48)，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；而且与 BEAS-2B 细胞 (1.00 ± 0.04) 比较，人肺癌细胞系 A549 细胞中的 lncRNA GAS5 表达 (5.92 ± 0.39) 显著上调，差异有统计学意义 ($P<0.05$)。本研究结果表明，lncRNA GAS5 的过表达可以通过靶向调节 miR-21 水平来抑制 NSCLC 细胞的 EMT 和自噬作用，进一步证实了 miR-21 是 lncRNA GAS5 的一个新的靶分子，可通过调节 PI3K/Akt/mTOR 信号通路来发挥作用。

lncRNA GAS5 在 NSCLC 细胞中表达，并发挥着重要的生物学作用。有研究表明，lncRNA GAS5 对 NSCLC 细胞系生长的抑制和凋亡的诱导至关重要^[20]。本研究结果显示，lncRNA GAS5 及其下游靶分子 miR-21 在 NSCLC 进展中也起重要作用。首先，与 pcDNA-null 组相比，lncRNA GAS5 过表达细胞中 miR-21 水平下降。在转染 mimic 后，lncRNA GAS5 的过表达对 A549 细胞的 EMT 和自噬的抑制功能被显著逆转；其次，双荧光素酶报告基因实验验证了 lncRNA GAS5 的下游靶标就是 miR-21。lncRNA GAS5 和 miR-21 之间的关联在许多生理和病理过程中都有报道，包括心脏纤维化、破骨分化、膜间皮细胞的 EMT 及癌症发展^[21-22]。因此，在 NSCLC 中 lncRNA GAS5 与 miR-21 存在相互作用，并对 EMT 和自噬发挥调控作用。

EMT 是上皮细胞通过特定过程转化为间质细胞的生物学过程，在癌转移过程中起着重要作用^[23]。

ZHU 等^[24]在 lncRNA GAS5 过表达肺癌细胞株中发现细胞的侵袭和迁移受到明显抑制,而且细胞周期结果显示,GAS5 过表达细胞系 S 期细胞比例增加,G2 期细胞比例减少。lncRNA GAS5 过表达后,肿瘤最大径明显受到抑制^[24]。lncRNA GAS5 还显著激活 E-cadherin 表达,抑制 N-cadherin 表达,从而抑制肺癌细胞增殖、迁移、侵袭及 EMT。已知 Vimentin 和 Twist1 均为癌细胞激活 EMT 的关键因子^[25]。本研究结果发现,在 lncRNA GAS5 过表达的 A549 细胞中细胞增殖活力降低,而且 N-cadherin、Vimentin、Twist1 表达均下调,E-cadherin 表达上调,这些结果均支持 lncRNA GAS5 过表达抑制 NSCLC 的 EMT,提示 lncRNA GAS5 可作为抑制癌转移的关键调节靶点。

有研究表明,lncRNA 可通过激活或失活多种信号通路,作为肿瘤发生和恶性进展的靶点^[26]。PI3K 可被各种癌基因和生长因子受体激活,随后包括 Akt 和 mTOR 在内的下游调节蛋白发生磷酸化^[27]。此外,PI3K/Akt/mTOR 信号通路在细胞增殖、凋亡和转移等广泛的生理过程中发挥重要作用^[28]。例如,JIANG 等^[28]报道 lncRNA HOXB-AS3 通过调控 PI3K/Akt 信号通路促进肺癌细胞增殖和转移。PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与了 lncRNA GAS5 过表达介导的喉癌肿瘤抑制^[27]。本研究结果显示,lncRNA GAS5 过表达下调了 PI3K 表达,抑制 p-Akt 和 p-mTOR 表达,还发现 lncRNA GAS5 过表达导致了 A549 细胞的 E-cadherin 表达上调,而 N-cadherin、Vimentin、Twist1 表达均下调,mimic 可以明显地抑制 E-cadherin 表达,增加 N-cadherin、Vimentin、Twist1 表达,并上调 PI3K、p-Akt 和 p-mTOR 表达。而 mimic 的上述效果可以进一步被 PI3K/Akt/mTOR 的抑制剂所逆转。这些结果证实,lncRNA GAS5 过表达通过靶向抑制 miR-21 使 PI3K/Akt/mTOR 信号通路失活从而抑制了 A549 细胞的 EMT。

PI3K/Akt/mTOR 信号通路是调控肿瘤细胞自噬的核心机制^[29]。本研究观察到 lncRNA GAS5 过表达可以抑制 A549 细胞中自噬的激活,包括 Beclin1 和 LC3-II/LC3-I 水平下调,而使用 mimic 后,Bec- lin1 和 LC3-II/LC3-I 水平被部分恢复,证实了 lncRNA GAS5 过表达通过抑制 miR-21 从而抑制了 A549 细胞中自噬的激活。ZENG 等^[30]在慢性阻塞性肺疾病中证实 miR-21 促进了人支气管上皮细胞的自噬。这表明 miR-21 可能具有促进自噬的作用。进一步还发现 miR-21 模拟物对自噬的促进效果可以进一步被 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的抑制剂所逆转,提示了 lncRNA GAS5 过表达通过靶向抑制 miR-21 使 PI3K/Akt/mTOR 信号通路失活从而抑制了

A549 细胞的自噬。

本研究存在一些局限,如主要集中在细胞系中进行实验研究,而没有进行体内动物实验。尽管细胞系是研究肿瘤生物学机制的重要模型,但细胞系可能无法完全反映体内复杂的生物环境和相互作用;其次,仅研究了一个特定的 lncRNA GAS5 及其下游靶点 miR-21 在 NSCLC 中的作用。然而,NSCLC 是一种高度复杂的疾病,可能涉及多个信号通路和调节网络。因此,本研究还不能涵盖所有可能的调控机制和靶点。

综上所述,本研究证明了 lncRNA GAS5 靶向 miR-21 通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制肺癌细胞的 EMT 和自噬。这为 lncRNA GAS5 及其靶向调控的 miR-21 作为肺癌治疗靶点的开发提供了参考。

参考文献

- [1] LIU S, CHEN Q, GUO L, et al. Incidence and mortality of lung cancer in China, 2008—2012[J]. Chin J Cancer Res, 2018, 30(6): 580-587.
- [2] ALDUAIS Y, ZHANG H, FAN F, et al. Non-small cell lung cancer (NSCLC): a review of risk factors, diagnosis, and treatment[J]. Medicine, 2023, 102(8): e32899.
- [3] ETTINGER D S, WOOD D E, AISNER D L, et al. NCCN guidelines[®] insights: non-small cell lung cancer, version 2, 2023[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2023, 21(4): 340-350.
- [4] PASSARO A, MOK T S K, ATTILI I, et al. Adjuvant treatments for surgically resected non-small cell lung cancer harboring EGFR mutations: a review[J]. JAMA Oncol, 2023, 9(8): 1124-1131.
- [5] ALAHDAL M, ELKORD E. Non-coding RNAs in cancer immunotherapy: predictive biomarkers and targets [J]. Clin Transl Med, 2023, 13(9): e1425.
- [6] LI Y, JIANG T, ZHOU W, et al. Pan-cancer characterization of immune-related lncRNAs identifies potential oncogenic biomarkers[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 1000.
- [7] YANG X, XIE Z, LEI X, et al. Long non-coding RNA GAS5 in human cancer[J]. Oncol Lett, 2020, 20(3): 2587-2594.
- [8] LAMBROU G I, HATZIAGAPIOU K, ZARAVINOS A. The non-coding RNA GAS5 and its role in tumor therapy-induced resistance[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(20): 7633.
- [9] TAN A C. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. Thorac Cancer, 2020, 11(3): 511-518.
- [10] YUAN R, FAN Q, LIANG X, et al. Cucurbitacin B inhibits TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in NSCLC through regulating ROS and PI3K/Akt/mTOR pathways[J]. Chin Med, 2022, 17(1): 24.
- [11] XU H, WANG J, AL-NUSAIF M, et al. CCL2 promotes

metastasis and epithelial-mesenchymal transition of non-small cell lung cancer via PI3K/Akt/mTOR and autophagy pathways[J]. *Cell Prolif*, 2024, 57(3):e13560.

[12] ARGHIANI N, MATIN M M. miR-21: a key small molecule with great effects in combination cancer therapy[J]. *Nucleic Acid Ther*, 2021, 31(4):271-283.

[13] CONG C, TIAN J, GAO T, et al. lncRNA GAS5 is up-regulated in osteoporosis and downregulates miR-21 to promote apoptosis of osteoclasts[J]. *Clin Interv Aging*, 2020, 15(1):1163-1169.

[14] XIE J, WANG J J, LI Y J, et al. LncRNA GAS5 suppresses colorectal cancer progress by target miR-21/LIFR axis[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022:3298939.

[15] FAN Y, ZHAO X, MA J, et al. LncRNA GAS5 competitively combined with miR-21 regulates PTEN and influences EMT of peritoneal mesothelial cells via Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Front Physiol*, 2021, 12(1):654951.

[16] LUO J, LI Q, PAN J, et al. Expression level of long non-coding RNA H19 in plasma of patients with nonsmall cell lung cancer and its clinical significance[J]. *J Cancer Res Ther*, 2018, 14(4):860-863.

[17] DONG L, LI G, LI Y, et al. Upregulation of long noncoding RNA GAS5 inhibits lung cancer cell proliferation and metastasis via miR-205/PTEN axis[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25(1):2311-2319.

[18] KAUR J, SALEHEN N, NORAZIT A, et al. Tumor suppressive effects of GAS5 in cancer cells[J]. *Noncoding RNA*, 2022, 8(3):39.

[19] NI W, YAO S, ZHOU Y, et al. Long noncoding RNA GAS5 inhibits progression of colorectal cancer by interacting with and triggering YAP phosphorylation and degradation and is negatively regulated by the m⁶A reader YTH-DF3[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1):143.

[20] MA J, MIAO H, ZHANG H, et al. LncRNA GAS5 modulates the progression of non-small cell lung cancer through repressing miR-221-3p and up-regulating IRF2 [J]. *Diagn Pathol*, 2021, 16(1):46.

[21] TAO H, ZHANG J G, QIN R H, et al. LncRNA GAS5 controls cardiac fibroblast activation and fibrosis by targeting miR-21 via PTEN/MMP-2 signaling pathway[J]. *Toxicology*, 2017, 386(1):11-18.

[22] WANG C, KE S, LI M, et al. Downregulation of lncRNA GAS5 promotes liver cancer proliferation and drug resistance by decreasing PTEN expression[J]. *Mol Genet Genomics*, 2020, 295(1):251-260.

[23] XU H, DUN S, GAO Y, et al. TMEM107 inhibits EMT and invasion of NSCLC through regulating the hedgehog pathway[J]. *Thorac Cancer*, 2021, 12(1):79-89.

[24] ZHU L, ZHOU D, GUO T, et al. LncRNA GAS5 inhibits invasion and migration of lung cancer through influencing EMT process[J]. *J Cancer*, 2021, 12(11):3291-3298.

[25] MENG J, CHEN S, HAN J X, et al. Twist1 regulates vimentin through Cul2 circular RNA to promote EMT in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(15):4150-4162.

[26] LIU F, HU L, PEI Y, et al. Long non-coding RNA AFAP1-AS1 accelerates the progression of melanoma by targeting miR-653-5p/RAI14 axis[J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1):258.

[27] LIU W, ZHAN J, ZHONG R, et al. Upregulation of long noncoding RNA GAS5 suppresses cell proliferation and metastasis in laryngeal cancer via regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2021, 20(1):1533033821990074.

[28] JIANG W, KAI J, LI D, et al. lncRNA HOXB-AS3 exacerbates proliferation, migration, and invasion of lung cancer via activating the PI3K-AKT pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(10):7194-7203.

[29] XU Z, HAN X, OU D, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy for tumor therapy[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(2):575-587.

[30] ZENG Z, HE S, LU J, et al. MicroRNA-21 aggravates chronic obstructive pulmonary disease by promoting autophagy[J]. *Exp Lung Res*, 2018, 44(2):89-97.

(收稿日期:2024-06-26 修回日期:2024-10-17)

(上接第 567 页)

[15] LI H Z, XU X H, LIN N, et al. Overexpression of miR-10a-5p facilitates the progression of osteoarthritis [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(7):5948-5976.

[16] HU S, LI Z, LAN Y, et al. MiR-10a-5p-mediated syndecan 1 suppression restricts porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus replication [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11:105-106.

[17] 刘晓荣, 杨金艳. 乌司他丁联合生长抑素治疗重症急性胰腺炎的疗效及对患者血清 TNF- α 、IL-6、CRP 水平的影响 [J]. *海南医学*, 2023, 34(2):194-197.

[18] 吴绍锋. 多层螺旋 CT 及 TNF- α 、IL-6 在早期胰腺炎诊断中的价值[J]. *现代医院*, 2023, 23(7):1128-1131.

[19] 王宇鹏, 宋凯, 孙远松, 等. 血清 AGP2、LBP 及 PCT 对急性胰腺炎患者严重程度的预测价值[J]. *肝胆外科杂志*, 2023, 31(5):349-355.

(收稿日期:2024-08-12 修回日期:2024-10-22)