

LncRNA IGFL2-AS1调节miR-138-5p/FOXP4轴 对肺癌细胞恶性生物学行为的影响

陈海洋 王春梅* 石金升 代贺阳
(沧州市人民医院肿瘤内科, 沧州 061000)

摘要 该研究探讨长链非编码RNA(LncRNA)胰岛素样生长因子家族成员2反义RNA 1(IGFL2-AS1)调节miR-138-5p/叉头蛋白4(FOXP4)轴对肺癌细胞恶性生物学行为的影响。该研究收集沧州市人民医院2023年6月至2024年12月手术切除的肺癌组织及癌旁组织标本各55例。该研究培养人正常上皮肺细胞(BEAS-2B)和肺癌细胞系(A549、NCI-H1975、PC-9), 将A549细胞随机分为Control组、sh-NC组、sh-IGFL2-AS1组、sh-IGFL2-AS1+anti-NC组、sh-IGFL2-AS1+anti-miR-138-5p组。该研究采用qRT-PCR检测细胞中LncRNA IGFL2-AS1、miR-138-5p、FOXP4 mRNA表达水平, 双荧光素酶实验检测LncRNA IGFL2-AS1与miR-138-5p、miR-138-5p与FOXP4之间关系, CCK8和克隆形成实验测定细胞增殖水平, Transwell分析细胞迁移和侵袭能力, 流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况, Western blot检测E-cadherin、Vimentin、Bcl-2、Bax、FOXP4蛋白表达情况。将裸鼠分为对照组(皮下注射 10^6 个sh-NC组细胞)和实验组(皮下注射 10^6 个sh-IGFL2-AS1组细胞), 荷瘤裸鼠实验验证敲除LncRNA IGFL2-AS1对肺癌肿瘤生长及LncRNA IGFL2-AS1、miR-138-5p、FOXP4 mRNA表达的影响。qRT-PCR结果显示, 相比癌旁组织, 肺癌组织中LncRNA IGFL2-AS1及FOXP4 mRNA表达水平升高, miR-138-5p表达水平下降($P<0.05$)。相比正常上皮肺细胞, 肺癌细胞系(A549、NCI-H1975、PC-9)中LncRNA IGFL2-AS1及FOXP4 mRNA相对表达水平升高、miR-138-5p相对表达水平降低, 且A549细胞中LncRNA IGFL2-AS1、miR-138-5p、FOXP4 mRNA表达变化最为明显($P<0.05$), 因此选用该细胞开展进一步研究。双荧光素酶实验结果显示, 转染WT-IGFL2-AS1、WT-FOXP4后, 相比mimic-NC组, miR-138-5p mimic组荧光素酶活性下降($P<0.05$)。相比sh-NC、Control组, sh-IGFL2-AS1组存活率、迁移数、克隆数、侵袭数、FOXP4 mRNA水平以及Vimentin、Bcl-2、FOXP4蛋白水平下降, 细胞凋亡率、miR-138-5p、E-cadherin和Bax水平上升($P<0.05$); 相比sh-IGFL2-AS1组、sh-IGFL2-AS1+anti-NC组, sh-IGFL2-AS1+anti-miR-138-5p组存活率、迁移数、克隆数、侵袭数、FOXP4 mRNA水平以及Vimentin、Bcl-2、FOXP4蛋白水平上升, 细胞凋亡率、miR-138-5p、E-cadherin和Bax水平下降($P<0.05$)。实验组肿瘤质量和体积及LncRNA IGFL2-AS1、FOXP4 mRNA表达水平均低于对照组, miR-138-5p表达水平高于对照组($P<0.05$)。总之, 干扰LncRNA IGFL2-AS1可能通过影响miR-138-5p/FOXP4轴, 进而诱导肺癌细胞凋亡, 并阻滞肺癌细胞迁移、增殖和侵袭, 最终逆转其恶性表型。

关键词 肺癌; 胰岛素样生长因子家族成员2反义RNA 1; miR-138-5p; 叉头蛋白4; 增殖; 迁移; 侵袭

Effect of LncRNA IGFL2-AS1 on the Malignant Biological Behavior of Lung Cancer Cells by Regulating the miR-138-5p/FOXP4 Axis

收稿日期: 2024-12-16

接受日期: 2025-05-27

*通信作者: Tel: 18131798386, E-mail: xux3um@163.com

Received: December 16, 2024

Accepted: May 27, 2025

*Corresponding author. Tel: +86-18131798386, E-mail: xux3um@163.com

CHEN Haiyang, WANG Chunmei*, SHI Jinsheng, DAI Heyang
(Oncology Department of Cangzhou People's Hospital, Cangzhou 061000, China)

Abstract This research was to investigate the effect of LncRNA (long non coding RNA) IGFL2-AS1 (insulin-like growth factor family member 2 antisense RNA 1) on the malignant biological behavior of lung cancer cells by regulating the miR-138-5p/FOXP4 (forkhead protein 4) axis. This research adopted a total of 55 lung cancer tissues and paracancer tissue specimens collected from June 2023 to December 2024 in Cangzhou People's Hospital. This research adopted human normal epithelial lung cells (BEAS-2B) and lung cancer cell lines (A549, NCI-H1975, PC-9). A549 cells were assigned into Control group, sh-NC group, sh-IGFL2-AS1 group, sh-IGFL2-AS1+anti-NC group, and sh-IGFL2-AS1+anti-miR-138-5p group randomly. qRT-PCR was applied to detect the expression levels of LncRNA IGFL2-AS1, miR-138-5p, and *FOXP4* mRNA in cells. The relationship between LncRNA IGFL2-AS1 and miR-138-5p, between miR-138-5p and *FOXP4* were detected by dual luciferase assay. Cell proliferation in each group was detected by CCK8 and clone formation assays. Transwell was applied to detect cell migration and invasion in each group. Flow cytometry was applied to detect apoptosis in each group. Western blot was applied to detect the expression levels of E-cadherin, Vimentin, Bcl-2, Bax, and FOXP4 proteins in each group. Nude mice were divided into control group (subcutaneous injection of 10^6 sh-NC group cells) and experimental group (subcutaneous injection of 10^6 sh-IGFL2-AS1 group cells). The effect of LncRNA IGFL2-AS1 deletion on the growth of lung cancer and the expression of LncRNA IGFL2-AS1, miR-138-5p and *FOXP4* mRNA were verified in nude mice. This research concluded that qRT-PCR results showed that compared with the paracancer tissue, the expression of LncRNA IGFL2-AS1 and *FOXP4* mRNA in lung cancer tissues were increased, while the expression of miR-138-5p was decreased ($P<0.05$). Compared with normal epithelial lung cells, the relative expression levels of LncRNA IGFL2-AS1 and *FOXP4* mRNA in lung cancer cell lines (A549, NCI-H1975, PC-9) increased, while the relative expression level of miR-138-5p decreased. The expression levels of LncRNA IGFL2-AS1, miR-138-5p, and *FOXP4* mRNA in A549 cells showed the most great differences ($P<0.05$), therefore A549 cells were selected for subsequent experiments. Dual luciferase assay showed that after transfection with WT-IGFL2-AS1 and WT-FOXP4, compared with the mimic-NC group, the luciferase activity of the miR-138-3p mimic group decreased ($P<0.05$). Compared with the sh-NC and Control groups, the survival rate, clone number, migration number, invasion number, *FOXP4* mRNA level, and the protein expression levels of Vimentin, Bcl-2, FOXP4 of A549 cells in the sh-IGFL2-AS1 group decreased, while the apoptosis rate, miR-138-5p, the levels of E-cadherin, and Bax protein increased ($P<0.05$). Compared with the sh-IGFL2-AS1 group and sh-IGFL2-AS1+anti-NC group, the survival rate, clone number, migration number, invasion number, *FOXP4* mRNA level, and Vimentin, Bcl-2, FOXP4 protein expression levels of A549 cells in the sh-IGFL2-AS1+anti miR-138-5p group increased, while the apoptosis rate, miR-138-5p, E-cadherin, and Bax protein expression levels decreased ($P<0.05$). The tumor mass and volume, LncRNA IGFL2-AS1 and *FOXP4* mRNA expressions in the experimental group were lower than those of the control group, and miR-138-5p expression was higher than that in control group ($P<0.05$). In summary, interfering with LncRNA IGFL2-AS1 may affect the miR-138-5p/FOXP4 axis, thereby inducing apoptosis of lung cancer cells, blocking the migration, proliferation and invasion of lung cancer cells, and ultimately reversing their malignant phenotype.

Keywords lung cancer; insulin-like growth factor family member 2 antisense RNA 1; miR-138-5p; forkhead protein 4; proliferation; migration; invasion

肺癌是世界范围内常见的恶性肿瘤,目前,肺癌的发病率呈逐年上升趋势,传统的手术、放疗和化疗治疗方法,对晚期肺癌患者往往无效^[1]。尽管当前在疾病诊断、分型及治疗策略方面已有显著进步,但患者的总体生存情况仍不容乐观^[2]。肺癌的治疗仍然面临诸多挑战。因此,阐明肺癌进展的分子机制,寻找新的有效治疗靶点,提高肺癌患者的生存率至关重要。研究发现,长链非编码RNA(long non coding RNA, LncRNA)/miRNA/mRNA轴在肺癌诊断和预后方面具有巨大潜力,可能是肺癌诊疗的潜在靶点^[3]。LncRNA在多种疾病中发挥着转录调控、核域组织、蛋白质相互作用和RNA分子调节等关键作用^[4]。其中,胰岛素样生长因子家族成员2反义RNA 1(insulin-like growth factor family member 2 antisense RNA 1, IGFL2-AS1)在结直肠癌、胃癌等中表达上调,促进癌细胞增殖、迁移、侵袭,进而促进癌症的发展^[5-6],且抑制LncRNA IGFL2-AS1表达可促进miR-138-5p产生,抑制卵巢癌恶性生物学行为^[7]。miRNA可以通过结合靶mRNA的3'非翻译区(3' untranslated region, 3'UTR)调控多种基因的表达,并参与肿瘤增殖、周期进程、分化、凋亡及信号转导等多种生物学过程^[8]。有报道称,miR-138-5p在肺癌组织与细胞中表达水平降低,并在肾癌中与叉头蛋白4(forkhead protein 4, FOXP4)相互作用,参与癌症的发展^[9-10]。FOXP4属于人类叉头盒基因家族,在细胞周期调控和肿瘤发生中起关键作用,且其下调显著抑制肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[11]。生物信息学预测FOXP4的3'UTR区域与miR-138-5p存在互补序列,LncRNA IGFL2-AS1可能与miR-138-5p存在靶向关系。同时推测LncRNA IGFL2-AS1可能通过调控miR-138-5p/FOXP4参与肺癌进展,但还需研究证实。本研究以肺癌细胞A549为研究对象,探讨LncRNA IGFL2-AS1能否通过调控miR-138-5p/FOXP4轴影响肺癌恶性生物学行为及癌症进展。

1 材料与方法

1.1 组织来源

收集沧州市人民医院(下称本院)2023年6月至2024年12月手术切除的肺癌及癌旁组织标本,两类标本各55例。本研究经本院伦理委员会审批通过(K2025-104-01),且获得所有患者的知情同意。

1.2 主要试剂与仪器

人正常上皮肺细胞(BEAS-2B)和肺癌细胞系(A549、NCI-H1975、PC-9)购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库;PCR试剂盒(货号:RR420A)购自TaKaRa公司;RPMI 1640培养基(货号:11875093)、DMEM培养基(货号:11965092)、胎牛血清(货号:A5669701)、胰蛋白酶(货号:15400054)购自Gibco公司;逆转录试剂盒(货号:4366597)、RNA分离试剂盒(货号:AM1561)购自Invitrogen公司;CCK8试剂盒(货号:C0038)、RIPA裂解液(货号:P0013B)、超敏ECL化学发光试剂盒(货号:P0018M)购自上海碧云天生物技术股份有限公司;双荧光素酶检测试剂盒(货号:16186)购自ThermoFisher Scientific公司;Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(货号:BL107B)购自合肥白鲨生物科技有限公司;BCA蛋白定量试剂盒(货号:CW0014S)、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(货号:CW0022S)购自江苏康为世纪科技股份有限公司;抗体E-cadherin(货号:ab40772)、Vimentin(货号:ab92547)、Bcl-2(货号:ab32124)、Bax(货号:ab32503)、FOXP4(货号:ab242127)、GAPDH(货号:ab8245)及HRP标记羊抗兔(货号:ab205718)或羊抗鼠(货号:ab205719)二抗购自Abcam公司。

NovoCyte Advanteon流式细胞仪购自Agilent公司;Spectra Max M5多功能酶标仪购自美谷分子仪器(上海)有限公司;BioSpectrum 810 Imaging System凝胶成像系统购自ThermoFisher Scientific公司。

1.3 方法

1.3.1 qRT-PCR检测肺癌细胞中LncRNA IGFL2-AS1、miR-138-5p、FOXP4 mRNA的表达水平将细胞BEAS-2B使用DMEM完全培养基,A549、NCI-H1975、PC-9使用RPMI 1640完全培养基,于37 °C、饱和湿度、5%二氧化碳环境下培养。当细胞融合至80%~90%时,用RNA分离试剂盒分离组织和细胞总RNA,并测定RNA的纯度及浓度。使用逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA。此外,以GAPDH、U6为内参,进行qRT-PCR。反应条件:95 °C预变性5 min;95 °C变性30 s,60 °C退火30 s,72 °C延伸50 s,共40个循环。通过2^{-ΔΔCt}法分析LncRNA IGFL2-AS1、miR-138-5p、FOXP4 mRNA表达水平。引物序列如表1所示。

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 qRT-PCR primers sequence

基因 Gene	上游引物(5'→3') Upstream primers (5'→3')	下游引物(5'→3') Downstream primer (5'→3')
LncRNA IGFL2-AS1	AGC CTA TTT CCA GAC AAC T	AGA ATC AAC GAC CTC TAC AT
miR-138-5p	GCG AGC TGG TGT TGT GAA TC	AGT GCA GGG TCC GAG GTA TT
FOXP4	AGG ACA CGG AGG GTT CAG	TGT GGG GAG AGC TGG TG
U6	CTC GCT TCG GCA GCA CAT ATA CT	ACG CTT CAC GAA TTT GCG TGT C
GAPDH	CCT TCC GTG TCC CCA CT	GCC TGC TTC ACC ACC TTC

1.3.2 细胞转染及分组 取 3×10^5 个对数生长期的A549细胞接种于6孔板中, 将其分为Control组(常规培养)、sh-NC组(转染sh-NC)、sh-IGFL2-AS1组(转染sh-IGFL2-AS1)、sh-IGFL2-AS1+anti-NC组(共转染sh-IGFL2-AS1和anti-NC)、sh-IGFL2-AS1+anti-miR-138-5p组(共转染sh-IGFL2-AS1和anti-miR-138-5p), 利用Lipofectamine 2000转染48 h。通过qRT-PCR测定LncRNA IGFL2-AS1、miR-138-5p、FOXP4 mRNA表达水平, 具体步骤见1.3.1。

1.3.3 双荧光素酶实验分析LncRNA IGFL2-AS1与miR-138-5p、miR-138-5p与FOXP4之间关系 取 5×10^3 对数生长期的A549细胞, 将其接种于6孔板。当细胞融合比例达到约60%时, 将LncRNA IGFL2-AS1/FOXP4野生型(WT-IGFL2-AS1/FOXP4)或突变型(MUT-IGFL2-AS1/FOXP4)报告基因载体与miR-138-5p mimic或mimic-NC分别转染至细胞。48 h后, 通过双荧光素酶检测试剂盒测量荧光素酶活性。

1.3.4 CCK8和克隆形成实验测定细胞增殖能力 CCK8: 取转染后的细胞, 将其接种于96孔板, 培养24 h。每孔添加CCK8溶液10 μ L, 37 $^{\circ}$ C孵育1 h, 利用多功能酶标仪记录波长450 nm处吸光度值。

克隆形成实验: 取转染后的细胞, 将其接种于12孔板, 每日观察细胞生长情况, 当细胞形成肉眼可辨的克隆后, 采用4%多聚甲醛固定液室温固定细胞30 min, 0.1%结晶紫室温染色20 min, 观察并统计细胞克隆数。

1.3.5 Transwell实验测定细胞迁移、侵袭能力 迁移实验: 转染后的细胞, 在Transwell的上室使用不含血清的RPMI 1640培养基, 下室添加RPMI 1640培养基(含10%血清), 24 h后, 添加4%多聚甲醛固定液室温固定15 min, 接着用0.1%结晶紫室温染色20 min, 通过显微镜计数细胞迁移数。

侵袭实验: 实验前先在Transwell上室铺设一层

基质胶, 置于培养箱使其干燥。基质胶干燥后, 向该上室添加细胞悬液, 其余实验操作与均按照上述迁移实验的方法进行, 最后计算细胞侵袭数。

1.3.6 流式细胞术分析细胞凋亡水平 取转染后的细胞(细胞密度为800/孔), 将其接种于6孔板中, 培养24 h。按照Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒说明书上的步骤进行检测, 并用40 μ m细胞筛过滤后, 置于流式细胞仪中检测、分析细胞凋亡情况。

1.3.7 Western blot测量Vimentin、E-cadherin、Bcl-2、FOXP4、Bax蛋白表达水平 使用RIPA裂解液收集细胞裂解物, 并用SDS-PAGE进行分离。将蛋白质转移到PVDF膜上, 用5%脱脂牛奶室温封闭1 h。再用E-cadherin(1:8 000)、Vimentin(1:2 500)、Bcl-2(1:1 000)、Bax(1:5 000)、FOXP4(1:1 000)、GAPDH(1:8 000)一抗在4 $^{\circ}$ C下过夜处理。随后, 将膜与二抗(1:5 000)在室温下孵育1 h。最后, 采用超敏ECL化学发光试剂盒、凝胶成像系统曝光、拍照。统计、分析蛋白表达水平。

1.3.8 动物实验 雄性BALB/c裸鼠12只[山东艾茂达康生命科学有限公司, 许可证号: SCXK(鲁) 2023 0010], 4~5周龄, 15~18 g, 皮下注射 10^6 个sh-NC组(对照组)、sh-IGFL2-AS1组(实验组)细胞, 每组6只。小鼠自由饮食饮水, 培养28天, 处死裸鼠, 取肿瘤组织, 测量体积和质量, qRT-PCR法检测组织中LncRNA IGFL2-AS1、miR-138-5p和FOXP4 mRNA的表达水平。本研究经本院动物伦理委员会批准(批号2023024)。

1.4 统计与分析

采用SPSS 26.0软件对数据进行统计分析, 结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用独立样本 t 检验进行两组间比较; 单因素方差分析用于多组间比较, 并采用SNK- q 检验进行组间两两相比。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺癌组织中LncRNA IGFL2-AS1、miR-138-5p和FOXP4 mRNA的表达水平

肺癌组织中 LncRNA IGFL2-AS1 及 *FOXP4* mRNA 表达水平高于癌旁组织, miR-138-5p 表达水平低于癌旁组织($P<0.05$)。见表2。

2.2 肺癌细胞中LncRNA IGFL2-AS1、miR-138-5p和FOXP4 mRNA的表达水平

如表3所示,与正常上皮肺细胞 BEAS-2B 相比,肺癌细胞 A549、NCI-H1975、PC-9 中 LncRNA IGFL2-AS1、*FOXP4* mRNA 表达水平升高, miR-138-5p 表达水平下降($P<0.05$),其中 A549 细胞中 LncRNA

IGFL2-AS1、miR-138-5p、*FOXP4* mRNA 变化最为明显,故选用该细胞开展下一步研究。

2.3 qRT-PCR检测转染后细胞中LncRNA IGFL2-AS1、miR-138-5p、FOXP4 mRNA表达水平

与 Control 组、sh-NC 组相比, sh-IGFL2-AS1 组 A549 细胞中 LncRNA IGFL2-AS1、*FOXP4* mRNA 表达水平降低,而 miR-138-5p 表达水平升高($P<0.05$);与 sh-IGFL2-AS1 组、sh-IGFL2-AS1+anti-NC 组相比, sh-IGFL2-AS1+anti-miR-138-5p 组 A549 细胞中 LncRNA IGFL2-AS1 表达水平没有明显变化, *FOXP4* mRNA 表达水平升高,而 miR-138-5p 表达水平降低($P<0.05$)。见表4。

表2 肺癌组织中LncRNA IGFL2-AS1、miR-138-5p和FOXP4 mRNA的表达情况
Table 2 Expression of LncRNA IGFL2-AS1, miR-138-5p and FOXP4 mRNA in lung cancer tissues

分组 Group	LncRNA IGFL2-AS1 表达 Expression of LncRNA IGFL2-AS1	miR-138-5p 表达 Expression of miR-138-5p	FOXP4 mRNA 表达 Expression of FOXP4 mRNA
Paracancer tissue	0.98±0.06	1.01±0.07	1.01±0.05
Lung cancer tissue	1.71±0.25*	0.56±0.05*	1.79±0.16*

* $P<0.05$,与癌旁组织相比。 $n=55$, $\bar{x}\pm s$ 。

* $P<0.05$ compared with the paracancer tissue. $n=55$, $\bar{x}\pm s$.

表3 qRT-PCR测定肺癌细胞中LncRNA IGFL2-AS1、miR-138-5p和FOXP4 mRNA表达情况
Table 3 Expression of LncRNA IGFL2-AS1, miR-138-5p and FOXP4 mRNA in lung cancer cells detected by qRT-PCR

组别 Group	LncRNA IGFL2-AS1	miR-138-5p	FOXP4
BEAS-2B	0.99±0.10	1.02±0.11	1.00±0.09
A549	2.09±0.21*	0.45±0.05*	2.11±0.21*
NCI-H1975	1.44±0.14*	0.52±0.05*	1.51±0.15*
PC-9	1.68±0.17*	0.60±0.06*	1.76±0.17*

* $P<0.05$,与BEAS-2B组相比。 $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。

* $P<0.05$ compared with the BEAS-2B group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$.

表4 qRT-PCR检测转染后细胞中LncRNA IGFL2-AS1、miR-138-5p、FOXP4 mRNA的表达情况
Table 4 qRT-PCR was used to detect the expression levels of LncRNA IGFL2-AS1, miR-138-5p and FOXP4 mRNA in the cells after transfection

分组 Group	LncRNA IGFL2-AS1	miR-138-5p	FOXP4 mRNA
Control	1.01±0.11	0.98±0.10	0.99±0.10
sh-NC	1.03±0.10	0.96±0.08	1.01±0.11
sh-IGFL2-AS1	0.46±0.05**	1.97±0.19**	0.47±0.05**
sh-IGFL2-AS1+anti-NC	0.44±0.04	1.98±0.20	0.49±0.06
sh-IGFL2-AS1+anti-miR-138-5p	0.45±0.05	1.33±0.13 ^{△▲}	0.70±0.08 ^{△▲}

* $P<0.05$,与Control组相比; ** $P<0.05$,与sh-NC组相比; [△] $P<0.05$,与sh-IGFL2-AS1组相比; [▲] $P<0.05$,与sh-IGFL2-AS1+anti-NC组相比。 $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。

* $P<0.05$ compared with the Control group; ** $P<0.05$ compared with the sh-NC group; [△] $P<0.05$ compared with the sh-IGFL2-AS1 group; [▲] $P<0.05$ compared with the sh-IGFL2-AS1+anti-NC group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$.

2.4 双荧光素酶实验检测LncRNA IGFL2-AS1与miR-138-5p、miR-138-5p与FOXP4之间的靶向关系

使用Starbase预测发现, miR-138-5p与LncRNA IGFL2-AS1或FOXP4 3'UTR均存在结合位点, 见图1和图2。表5显示, 相比mimic-NC组, miR-141-3p mimic组转染WT-IGFL2-AS1、WT-FOXP4后, 荧光素酶活性下降($P<0.05$)。

2.5 敲低LncRNA IGFL2-AS1对A549细胞增殖的影响

相比sh-NC、Control组, sh-IGFL2-AS1组存活

率、克隆数下降($P<0.05$); 相比sh-IGFL2-AS1组、sh-IGFL2-AS1+anti-NC组, sh-IGFL2-AS1+anti-miR-138-5p组存活率、克隆数上升($P<0.05$)。见表6和图3。

2.6 敲低LncRNA IGFL2-AS1对A549细胞迁移、侵袭的影响

与sh-NC、Control组相比, sh-IGFL2-AS1组A549细胞的迁移数、侵袭数降低($P<0.05$); 与sh-IGFL2-AS1组、sh-IGFL2-AS1+anti-NC组相比, sh-IGFL2-AS1+anti-miR-138-5p组A549细胞的迁移数、侵袭数升高($P<0.05$)。见表7和图4。

表5 miR-138-5p对LncRNA IGFL2-AS1、FOXP4荧光素酶活性的影响

Table 5 The effect of miR-138-5p on the luciferase activity of LncRNA IGFL2-AS1 and FOXP4

组别 Group	WT-IGFL2-AS1	MUT-IGFL2-AS1	WT-FOXP4	MUT-FOXP4
mimic-NC	1.00±0.11	0.99±0.10	0.98±0.09	1.02±0.11
miR-138-5p mimic	0.45±0.05*	0.97±0.09	0.42±0.04*	0.99±0.10

* $P<0.05$, 与mimic-NC组相比。 $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。

* $P<0.05$ compared with the mimic-NC group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$.



图1 LncRNA IGFL2-AS1与miR-138-5p的结合位点

Fig.1 The binding sites of LncRNA IGFL2-AS1 and miR-138-5p

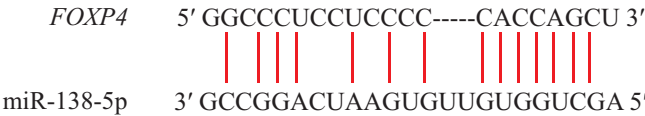


图2 miR-138-5p与FOXP4的结合位点

Fig.2 The binding sites of miR-138-5p and FOXP4

表6 敲低LncRNA IGFL2-AS1对A549细胞增殖的影响

Table 6 The effect of down-regulating LncRNA IGFL2-AS1 on the proliferation of A549 cells

分组 Group	存活率/% Survival rate /%	克隆数 Number of clones
Control	98.97±1.03	134.75±11.48
sh-NC	97.01±2.99	132.34±11.23
sh-IGFL2-AS1	47.52±3.75* [#]	65.61±5.56* [#]
sh-IGFL2-AS1+anti-NC	45.23±3.52	66.72±5.67
sh-IGFL2-AS1+anti-miR-138-5p	71.64±6.16 [△] [▲]	98.05±8.91 [△] [▲]

* $P<0.05$, 与Control组相比; [#] $P<0.05$, 与sh-NC组相比; [△] $P<0.05$, 与sh-IGFL2-AS1组相比; [▲] $P<0.05$, 与sh-IGFL2-AS1+anti-NC组相比。 $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。

* $P<0.05$ compared with the Control group; [#] $P<0.05$ compared with the sh-NC group; [△] $P<0.05$ compared with the sh-IGFL2-AS1 group; [▲] $P<0.05$ compared with the sh-IGFL2-AS1+anti-NC group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$.

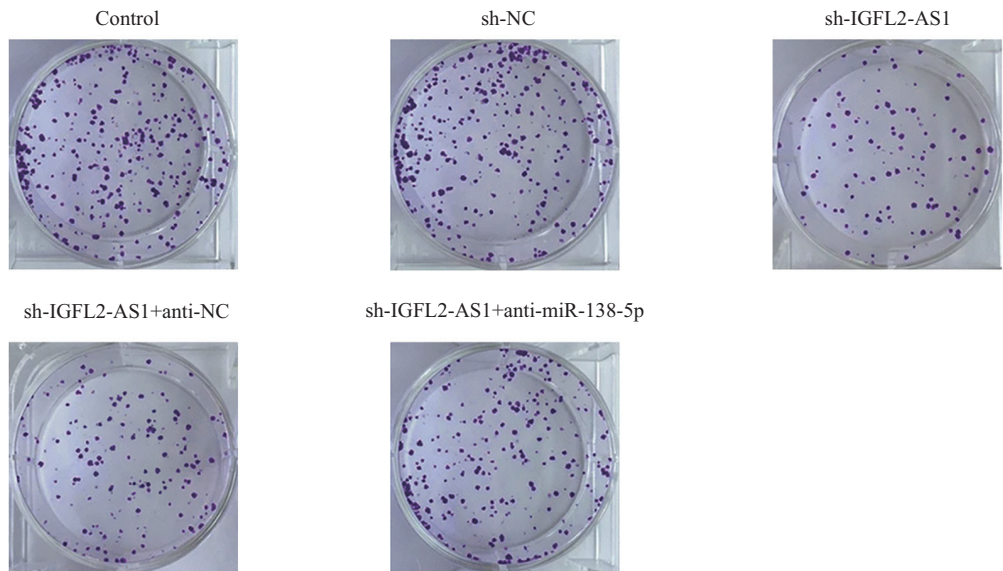


图3 克隆形成实验检测A549细胞的增殖情况

Fig.3 The clone formation experiment was used to detect the proliferation of A549 cells

表7 敲低LncRNA IGFL2-AS1对A549细胞迁移、侵袭的影响		
Table 7 The effect of down-regulating LncRNA IGFL2-AS1 on the migration and invasion of A549 cells		
分组 Group	迁移数 Number of migrations	侵袭数 Number of invasions
Control	110.46±9.05	101.13±9.11
sh-NC	109.35±8.94	102.01±9.20
sh-IGFL2-AS1	54.03±5.40* [#]	50.49±4.05* [#]
sh-IGFL2-AS1+anti-NC	53.54±5.35	51.32±4.13
sh-IGFL2-AS1+anti-miR-138-5p	82.24±8.22 [△] [▲]	75.67±6.57 [△] [▲]

**P*<0.05, 与Control组相比; [#]*P*<0.05, 与sh-NC组相比; [△]*P*<0.05, 与sh-IGFL2-AS1组相比; [▲]*P*<0.05, 与sh-IGFL2-AS1+anti-NC组相比。 *n*=6, $\bar{x}\pm s$ 。
**P*<0.05 compared with the Control group; [#]*P*<0.05 compared with the sh-NC group; [△]*P*<0.05 compared with the sh-IGFL2-AS1 group; [▲]*P*<0.05 compared with the sh-IGFL2-AS1+anti-NC group. *n*=6, $\bar{x}\pm s$.

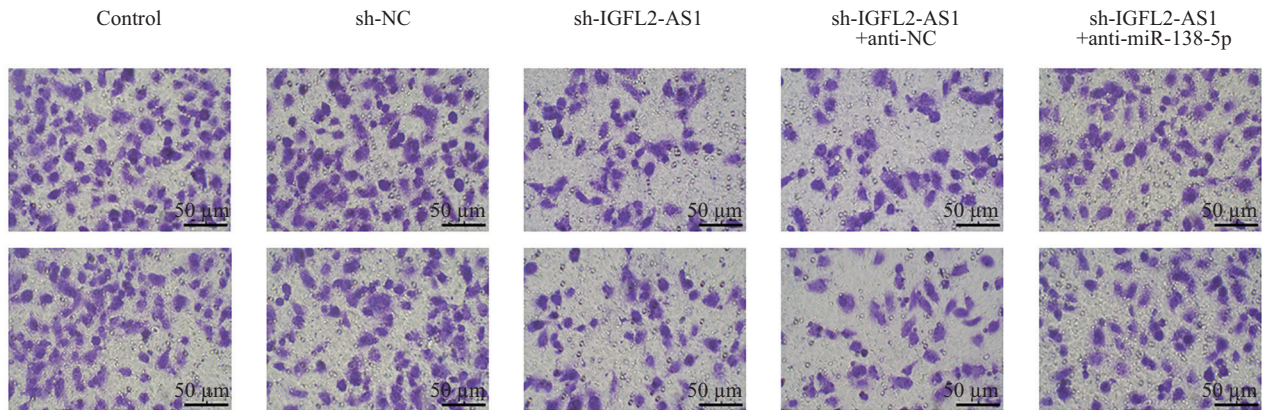


图4 Transwell实验检测A549细胞的迁移、侵袭情况

Fig.4 The Transwell assay was used to detect the migration and invasion abilities of A549 cells

2.7 敲低 LncRNA IGFL2-AS1对 A549细胞凋亡的影响

相比 sh-NC、Control组, sh-IGFL2-AS1组凋亡

率上升(*P*<0.05); 相比 sh-IGFL2-AS1组、sh-IGFL2-AS1+anti-NC组, sh-IGFL2-AS1+anti-miR-138-5p组凋亡率下降(*P*<0.05)。见表8和图5。

表8 敲低LncRNA IGFL2-AS1对A549细胞凋亡的影响

Table 8 The effect of down-regulating LncRNA IGFL2-AS1 on apoptosis of A549 cells

分组 Group	凋亡率/% Apoptosis rate /%
Control	2.54±0.25
sh-NC	2.69±0.27
sh-IGFL2-AS1	50.02±5.00*#
sh-IGFL2-AS1+anti-NC	49.43±4.94
sh-IGFL2-AS1+anti-miR-138-5p	25.61±2.56 [△] ▲

* $P<0.05$, 与Control组相比; # $P<0.05$, 与sh-NC组相比; $^{\Delta}P<0.05$, 与sh-IGFL2-AS1组相比; $^{\Delta}P<0.05$, 与sh-IGFL2-AS1+anti-NC组相比。 $n=6, \bar{x}\pm s$ 。
* $P<0.05$ compared with the Control group; # $P<0.05$ compared with the sh-NC group; $^{\Delta}P<0.05$ compared with the sh-IGFL2-AS1 group; $^{\Delta}P<0.05$ compared with the sh-IGFL2-AS1+anti-NC group. $n=6, \bar{x}\pm s$.

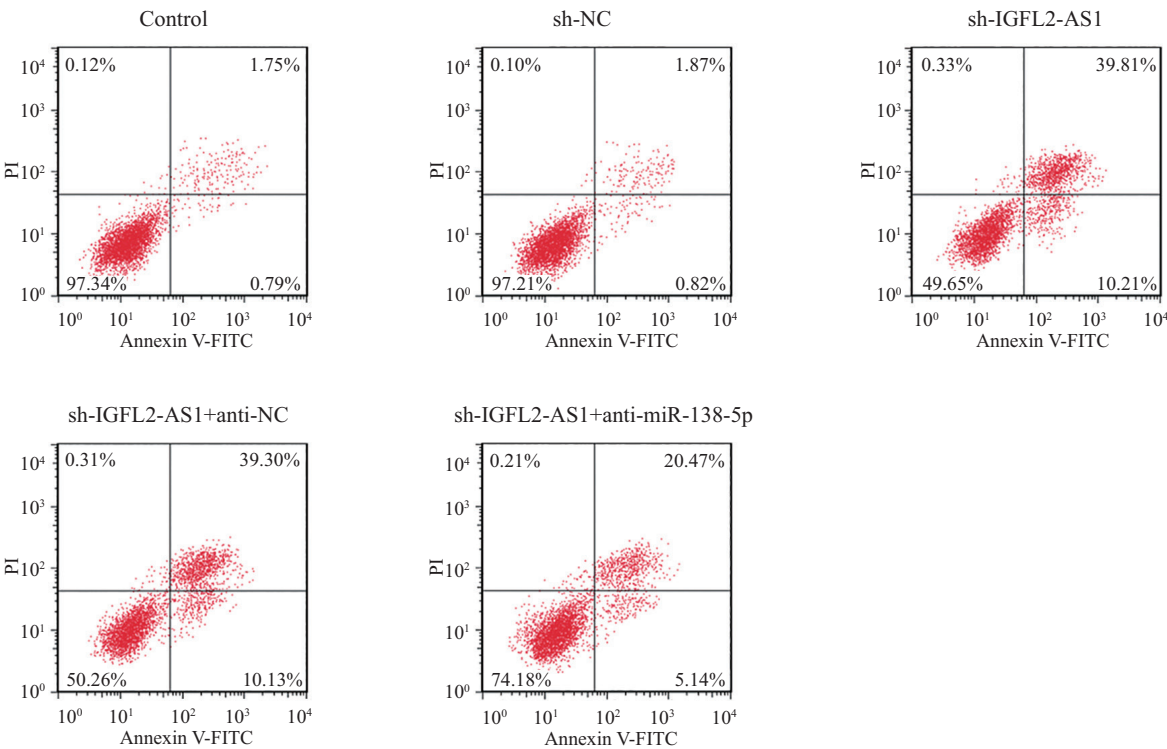


图5 流式细胞仪检测A549细胞凋亡

Fig.5 Apoptosis of A549 cells was detected by flow cytometry

2.8 敲低LncRNA IGFL2-AS1对A549细胞中E-cadherin、Vimentin、Bcl-2、Bax、FOXP4蛋白表达的影响

与sh-NC、Control组相比, sh-IGFL2-AS1组A549细胞中Vimentin、Bcl-2、FOXP4蛋白表达水平降低, 而E-cadherin、Bax蛋白表达水平升高($P<0.05$); 与sh-IGFL2-AS1组、sh-IGFL2-AS1+anti-NC组相比, sh-IGFL2-AS1+anti-miR-138-5p组A549细胞中Vimentin、Bcl-2、FOXP4蛋白表达水平升高, 而E-cadherin、Bax蛋白表达水平降低($P<0.05$)。见表9和图6。

2.9 敲除LncRNA IGFL2-AS1对荷瘤裸鼠肿瘤生长的影响

实验组肿瘤质量和体积及LncRNA IGFL2-AS1、FOXP4 mRNA表达水平均低于对照组, miR-138-5p表达水平高于对照组($P<0.05$)。见表10。

3 讨论

肺癌仍然是导致重大发病率和癌症相关死亡的严重疾病, 其预后改善与多学科在风险因素预防、筛查、靶向治疗和免疫治疗方面的深入研究密切相

表9 敲低LncRNA IGFL2-AS1对A549细胞中E-cadherin、Vimentin、Bcl-2、Bax、FOXP4蛋白表达的影响

Table 9 The impact of down-regulating LncRNA IGFL2-AS1 on the expression of E-cadherin, Vimentin, Bcl-2, Bax, and FOXP4 proteins in A549 cells

分组 Group	E-cadherin	Vimentin	Bcl-2	Bax	FOXP4
Control	0.62±0.06	1.10±0.11	1.41±0.14	0.43±0.04	2.02±0.20
sh-NC	0.63±0.07	1.08±0.10	1.43±0.13	0.42±0.03	1.99±0.19
sh-IGFL2-AS1	1.28±0.13*#	0.54±0.05*#	0.71±0.07*#	0.89±0.09*#	1.03±0.10*#
sh-IGFL2-AS1+anti-NC	1.27±0.12	0.56±0.06	0.69±0.07	0.92±0.09	1.02±0.11
sh-IGFL2-AS1+anti-miR-138-5p	0.95±0.10 [△] [▲]	0.75±0.07 [△] [▲]	1.06±0.11 [△] [▲]	0.65±0.06 [△] [▲]	1.50±0.15 [△] [▲]

**P*<0.05, 与Control组相比; #*P*<0.05, 与sh-NC组相比; [△]*P*<0.05, 与sh-IGFL2-AS1组相比; [▲]*P*<0.05, 与sh-IGFL2-AS1+anti-NC组相比。 *n*=6, $\bar{x}\pm s$ 。
**P*<0.05 compared with the Control group; #*P*<0.05 compared with the sh-NC group; [△]*P*<0.05 compared with the sh-IGFL2-AS1 group; [▲]*P*<0.05 compared with the sh-IGFL2-AS1+anti-NC group. *n*=6, $\bar{x}\pm s$.

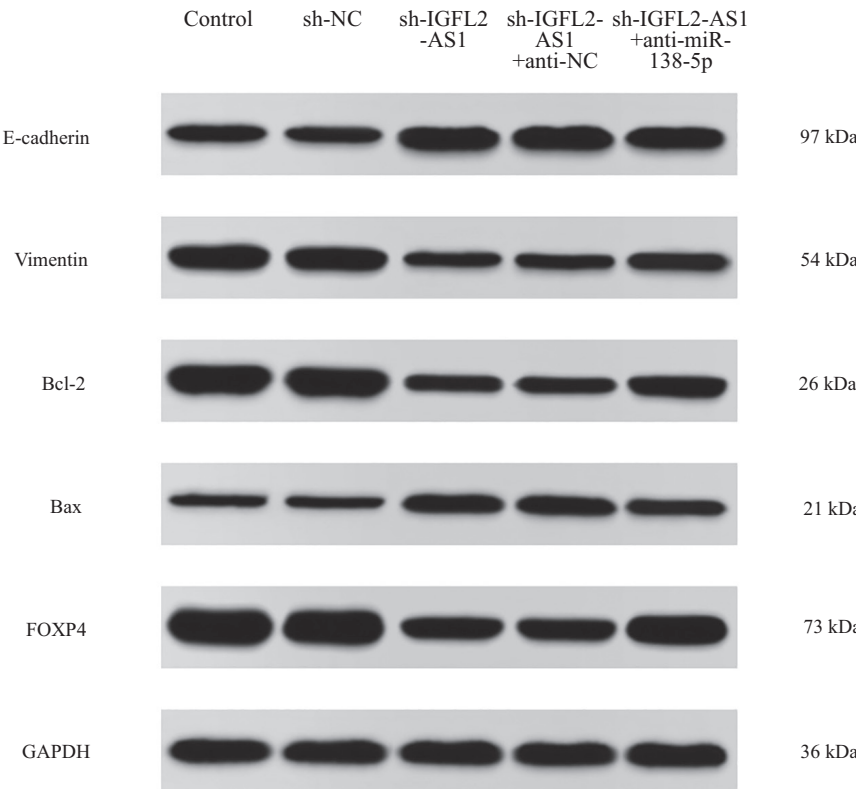


图6 Western blot检测A549细胞中E-cadherin、Vimentin、Bcl-2、Bax、FOXP4蛋白的表达情况

Fig.6 The expressions of E-cadherin, Vimentin, Bcl-2, Bax and FOXP4 proteins in A549 cells were detected by Western blot

表10 敲除LncRNA IGFL2-AS1对荷瘤裸鼠肿瘤生长的影响

Table 10 The effect of knocking out LncRNA IGFL2-AS1 on tumor growth in nude mice with tumors

分组 Group	肿瘤质量/g Tumor mass /g	肿瘤体积/mm ³ Tumor volume /mm ³	LncRNA IGFL2-AS1表达 Expression of LncRNA IGFL2-AS1	miR-138-5p表达 Expression of miR-138-5p	FOXP4 mRNA表达 Expression of FOXP4 mRNA
Control	2.08±0.35	1 415.28±150.26	1.01±0.11	0.98±0.07	1.02±0.15
Experimental	1.17±0.28*	826.56±110.23*	0.61±0.07*	1.59±0.10*	0.57±0.08*

**P*<0.05, 与对照组相比。 *n*=6, $\bar{x}\pm s$ 。
**P*<0.05 compared with the control group. *n*=6, $\bar{x}\pm s$.

关^[12]。近年来, 尽管人们对肺癌患者的分子生物学和临床特征的了解有所增加, 但仍面临巨大挑战, 有很大的进步空间^[13]。因此, 为了最大限度地为患者带来益处, 应更详细地认识肺癌发生、发展机制, 为精准治疗和个体化治疗提供依据。

LncRNA IGFL2-AS1是胰岛素样生长因子家族成员2的反义RNA, 位于第19号染色体上^[14]。在临床中, lncRNAs可作为早期诊断、预后和靶向治疗的生物标志物, 其中, LncRNA IGFL2-AS1被确定为透明细胞肾细胞癌的候选癌基因, 具有诊断和预后价值^[15]。LIU等^[16]证明, LncRNA IGFL2-AS1在结直肠癌组织和细胞中大量表达, 并作为竞争性内源RNA, 与miR433-3p结合, 促进*PAK4*转录, 从而促进结直肠癌HCT116细胞恶性增殖。ZHAO等^[17]指出, LncRNA IGFL2-AS1在人舌鳞状细胞癌组织及细胞中显著上调, 且作为竞争内源性RNA海绵化miR-1224-5p, 从而调节SATB同源盒1的表达, 进而激活Wnt/ β -catenin信号通路, 促进人舌鳞状细胞癌细胞的增殖、迁移、侵袭和上皮-间质转化。MA等^[6]在体内实验发现, LncRNA IGFL2-AS1在胃癌中高表达, 并作为miR-802的分子海绵, 在体外促进癌细胞增殖、迁移、侵袭和在体内促进肿瘤生长。在本研究中, 肺癌组织中的LncRNA IGFL2-AS1及*FOXP4* mRNA表达水平高于癌旁组织, miR-138-5p表达水平低于癌旁组织; LncRNA IGFL2-AS1在肺癌细胞中表达水平升高; 敲低LncRNA IGFL2-AS1, 抑制A549细胞增殖、迁移和侵袭, 并促进细胞凋亡, 最终抑制癌细胞恶性增殖。因此, LncRNA IGFL2-AS1有望成为肺癌治疗的新靶点, 但其作用机制需深入探索。

随着科学的进步, miRNA越来越被认为是早期发现和应用治疗策略的潜在癌症生物标志物, 其通过负性调节靶mRNA的表达而成为靶mRNA的主要调控因子^[18]。大部分miRNA以组织特异性为特征发挥作用, 其功能涵盖肿瘤抑制与癌基因调控两个方面, 而miRNA表达的紊乱状态, 与人类癌症的发生、发展过程存在密切的相关性^[19]。ZHANG等^[20]通过动物实验证明, 雾化吸入miR-138-5p和miR-200c miRNA模拟物可增加CD4⁺和CD8⁺ T细胞数, 下调程序性细胞死亡蛋白1和T调节细胞的表达, 进而非常有效地预防小鼠肺癌的发生和进展, 发挥肿瘤抑制功能。XIONG等^[21]进一步证明, LncRNA MIR9-3HG通过海绵化miR-138-5p和募集TAF15, 提高LIMK1

mRNA和蛋白水平, 参与肺鳞状细胞癌的发生, 这为肺鳞状细胞癌的机制提供了新的见解。生物信息学预测LncRNA IGFL2-AS1可能与miR-138-5p分子存在相互作用, 在本研究中, 双荧光素酶实验证明LncRNA IGFL2-AS1可以竞争性结合miR-138-5p, 且敲低LncRNA IGFL2-AS1, 促进miR-138-5p表达, 抑制细胞恶性增殖, 并促进细胞凋亡, 而抑制miR-138-5p可逆转敲低LncRNA IGFL2-AS1对A549细胞的作用。这提示, 敲低LncRNA IGFL2-AS1可以靶向升高miR-138-5p表达水平, 抑制肺癌细胞恶性生物学行为, 减缓癌症发展。这与许运巧等^[7]研究结果相似, 发现下调LncRNA IGFL2-AS1可上调miR-138-5p表达, 抑制卵巢癌细胞增殖和迁移。

E-cadherin、Vimentin是上皮-间质转化相关蛋白, 而上皮-间质转化与癌细胞侵袭、迁移和耐药性有关, Bcl-2、Bax与细胞凋亡密切相关^[22], 本研究发现, 敲低LncRNA IGFL2-AS1会下调A549细胞中Vimentin、Bcl-2蛋白表达, 增加E-cadherin、Bax蛋白表达水平, 提示敲低LncRNA IGFL2-AS1可能通过影响上皮-间质转化和细胞凋亡, 参与肺癌进展。FOXP4是翼螺旋转录因子FOX家族的成员, 其与多种信号通路之间的相互作用, 在胚胎发育、细胞周期调节和肿瘤发生中具有重要作用^[23]。WU等^[24]发现, 在肺癌组织和细胞系中*FOXP4* mRNA水平较高, *FOXP4*沉默后TGF- β 及其下游靶点MMP-2和MMP-9的表达水平较低, 导致A549细胞的增殖和迁移受到抑制。LI等^[25]发现, LncRNA RP11-116G8.5通过海绵化miR-3150b-3p/miR-6870-5p上调PHF12/FOXP4表达, 促进肺鳞状细胞癌的恶性行为的发生。生物信息学预测显示, miR-138-5p与*FOXP4*的3'UTR存在互补序列。XIONG等^[10]报道, miR-138-5p通过靶向负调控FOXP4, 参与肾癌进展。与本研究结果一致, 双荧光素酶实验表明miR-138-5p靶向并下调*FOXP4*的表达, 且在肺癌细胞中FOXP4表达量增多, 敲低LncRNA IGFL2-AS1后, FOXP4表达水平降低、miR-138-5p表达水平升高, 而抑制miR-138-5p可促进FOXP4表达。这揭示, LncRNA IGFL2-AS1可通过miR-138-5p/FOXP4轴调控肺癌细胞的恶性生物学行为。此外, 通过荷瘤小鼠实验发现, 敲低LncRNA IGFL2-AS1后小鼠肿瘤质量和体积及LncRNA IGFL2-AS1、*FOXP4* mRNA表达水平均降低, miR-138-5p表达水平升高, 进一步

证实LncRNA IGFL2-AS1可通过miR-138-5p/FOXP4轴调控肺癌进展。

综上所述, LncRNA IGFL2-AS1在肺癌细胞中表达量显著增多, 敲低LncRNA IGFL2-AS1可能通过调控miR-138-5p/FOXP4轴, 抑制肺癌细胞增殖、迁移和侵袭, 并促进细胞凋亡, 最终抑制肺癌进展, 为肺癌的发展机制提供新的见解, LncRNA IGFL2-AS1可能作为临床肺癌治疗的潜在靶点。但本研究暂未对LncRNA IGFL2-AS1/miR-138-5p/FOXP4轴的上下游信号机制以及其他因子及其相关机制进行探索, 这是本研究的不足之处, 后续仍需进一步探讨。

参考文献 (References)

- [1] WADOWSKA K, BIL-LULA I, TREMBECKI Ł, et al. Genetic markers in lung cancer diagnosis: a review [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(13): 4569.
- [2] LI Y, YAN B, HE S. Advances and challenges in the treatment of lung cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 169: 115891.
- [3] WANG R, XU Y, TONG L, et al. Recent progress of exosomal lncRNA/circRNA-miRNA-mRNA axis in lung cancer: implication for clinical application [J]. *Front Mol Biosci*, 2024, 11: 1417306-14.
- [4] HERMAN A B, TSITSIPATIS D, GOROSPE M. Integrated lncRNA function upon genomic and epigenomic regulation [J]. *Mol Cell*, 2022, 82(12): 2252-66.
- [5] CEN X, HUANG Y, LU Z, et al. LncRNA IGFL2-AS1 promotes the proliferation, migration, and invasion of colon cancer cells and is associated with patient prognosis [J]. *Cancer Manag Res*, 2021, 13: 5957-68.
- [6] MA Y, LIU Y, PU Y S, et al. LncRNA IGFL2-AS1 functions as a ceRNA in regulating ARPP19 through competitive binding to miR-802 in gastric cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2020, 59(3): 311-22.
- [7] 许运巧, 刚小清, 李金锋. 地榆皂苷I调控IGFL2-AS1/miR-138-5p抑制卵巢癌细胞增殖、侵袭和迁移[J]. *中草药* (XU Y Q, GANG X C, LI J F. Ziyuglycoside I inhibits proliferation, invasion and migration of ovarian cancer cells by regulating IGFL2-AS1/miR-138-5p [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*), 2024, 55(4): 1248-54.
- [8] YANG H, LIU Y, CHEN L, et al. MiRNA-based therapies for lung cancer: opportunities and challenges [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(6): 877.
- [9] WU J, HAN X, YANG X, et al. MiR-138-5p suppresses the progression of lung cancer by targeting SNIP1 [J]. *Thorac Cancer*, 2023, 14(6): 612-23.
- [10] XIONG Y, ZHANG J, SONG C. CircRNA ZNF609 functions as a competitive endogenous RNA to regulate FOXP4 expression by sponging miR-138-5p in renal carcinoma [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 10646-54.
- [11] CHEN T, LIU Y, CHEN J, et al. Exosomal miR-3180-3p inhibits proliferation and metastasis of non-small cell lung cancer by downregulating FOXP4 [J]. *Thorac Cancer*, 2021, 12(3): 372-81.
- [12] CHEN P, LIU Y, WEN Y, et al. Non-small cell lung cancer in China [J]. *Cancer Commun*, 2022, 42(10): 937-70.
- [13] RUDIN C M, BRAMBILLA E, FAIVRE-FINN C, et al. Small-cell lung cancer [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7(1): 3.
- [14] QIN M, LIU Q, YANG W, et al. IGFL2-AS1-induced suppression of HIF-1 α degradation promotes cell proliferation and invasion in colorectal cancer by upregulating CA9 [J]. *Cancer Med*, 2023, 12(7): 8415-32.
- [15] CHENG G, LIU D, LIANG H, et al. A cluster of long non-coding RNAs exhibit diagnostic and prognostic values in renal cell carcinoma [J]. *Aging*, 2019, 11(21): 9597-615.
- [16] LIU S, WANG X, ZHANG J, et al. LncRNA IGFL2-AS1 as a ceRNA promotes HCT116 cell malignant proliferation via the miR-433-3p/PAK4 axis [J]. *Turk J Gastroenterol*, 2023, 34(5): 497-507.
- [17] ZHAO R, WANG S, TAN L, et al. IGFL2-AS1 facilitates tongue squamous cell carcinoma progression via Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Oral Dis*, 2023, 29(2): 469-82.
- [18] RAJAKUMAR S, JAMESPAULRAJ S, SHAH Y, et al. Long non-coding RNAs: an overview on miRNA sponging and its co-regulation in lung cancer [J]. *Mol Biol Rep*, 2023, 50(2): 1727-41.
- [19] LIANG G, MENG W, HUANG X, et al. miR-196b-5p-mediated downregulation of TSPAN12 and GATA6 promotes tumor progression in non-small cell lung cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(8): 4347-57.
- [20] ZHANG Q, PAN J, XIONG D, et al. Aerosolized miR-138-5p and miR-200c targets PD-L1 for lung cancer prevention [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1166951.
- [21] XIONG Y, YANG C, YANG X, et al. LncRNA MIR9-3HG enhances LIMK1 mRNA and protein levels to contribute to the carcinogenesis of lung squamous cell carcinoma via sponging miR-138-5p and recruiting TAF15 [J]. *Pathol Res Pract*, 2022, 237: 153941.
- [22] 第伍丹琪, 王虹, 陶红艳, 等. 鸦胆子素A通过EMT信号诱导非小细胞肺癌细胞凋亡[J]. *中国药理学通报* (DIWU D B, WANG H, TAO H Y, et al. Bruceine A induces apoptosis of non-small cell lung cancer cells by EMT signaling axis [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*), 2024, 40(8): 1474-81.
- [23] JI J, QIAN Q, CHENG W, et al. FOXP4-mediated induction of PTK7 activates the Wnt/ β -catenin pathway and promotes ovarian cancer development [J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(5): 332.
- [24] WU F, JI A, ZHANG Z, et al. miR-491-5p inhibits the proliferation and migration of A549 cells by FOXP4 [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(6): 622.
- [25] LI H, ZHAO Q, TANG Z. LncRNA RP11-116G8.5 promotes the progression of lung squamous cell carcinoma through sponging miR-3150b-3p/miR-6870-5p to upregulate PHF12/FOXP4 [J]. *Pathol Res Pract*, 2021, 226: 153566.