

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.01.001

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2021.01.001>

· 论著 ·

## MiR-551b-3p 靶向 USP9X 对人肺癌 A549 细胞凋亡和放射敏感性的影响

蒋可心, 何怡江, 张旭

(中国医科大学肿瘤医院, 辽宁省肿瘤医院消化淋巴放疗科, 沈阳 110042)

**[摘要]** 目的: 探讨miR-551b-3p对肺癌A549细胞凋亡和放射敏感性的影响及分子机制。方法: 将miR-NC, miR-551b-3p, anti-miR-NC, anti-miR-551b-3p, si-NC, si-USP9X 分别转染至A549中, 记为miR-NC组、miR-551b-3p组、anti-miR-NC组、anti-miR-551b-3p组、si-NC组、si-USP9X组; 将miR-551b-3p分别与pcDNA和pcDNA-USP9X共转染至A549中, 记为miR-551b-3p+pcDNA组、miR-551b-3p+pcDNA-USP9X组。采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测miR-551b-3p和USP9X的表达水平; 蛋白质印迹法检测X染色体连锁的泛素特定蛋白水解酶9(ubiquitin-specific peptidase 9 X-linked, USP9X)、B细胞淋巴瘤/白血病-2(B-cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 related X protein, Bax)的表达; 荧光素酶报告实验检测miR-551b-3p和USP9X的靶向关系; 流式细胞术检测细胞凋亡; 细胞克隆集落形成实验检测放射敏感性。结果: 肺癌组织和肺癌细胞A549中miR-551b-3p表达水平显著降低, USP9X mRNA和蛋白质表达水平显著升高(均 $P < 0.001$ )。miR-551b-3p靶向调控USP9X, 过表达miR-551b-3p和抑制USP9X表达, 细胞凋亡率显著升高, Bcl-2表达水平显著降低, Bax表达水平显著升高, 细胞的存活曲线明显下移(均 $P < 0.001$ )。USP9X过表达逆转了miR-551b-3p过表达对肺癌A549细胞凋亡和放射敏感性的作用。结论: 过表达miR-551b-3p促进肺癌A549细胞凋亡, 增强肺癌细胞放射敏感性, 其机制可能与USP9X有关。

**[关键词]** miR-551b-3p; USP9X; 肺癌; 凋亡; 放射敏感性

## Effect of miR-551b-3p targeting USP9X on apoptosis and radiosensitivity of human lung cancer A549 cells

JIANG Kexin, HE Yijiang, ZHANG Xu

(Department of Digestive Lymphatic Radiotherapy, Liaoning Cancer Hospital, China; Medical University Cancer Hospital, Shenyang 110042, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the effect of miR-551b-3p on apoptosis and radiosensitivity of human lung cancer A549 cells and its molecular mechanism. **Methods:** miR-NC, miR-551b-3p, anti-miR-NC, anti-miR-551b-3p, si-NC, and si-USP9X were transfected into A549, respectively, and recorded as miR-NC group, miR-551b-3p group, anti-miR-NC group, anti-miR-551b-3p group, si-NC group and si-USP9X group; miR-551b-3p was co-transfected

收稿日期 (Date of reception): 2019-11-22

通信作者 (Corresponding author): 张旭, Email: mhm76763484@163.com

with pcDNA and pcDNA-USP9X into A549, respectively, recorded as miR-551b-3p+pcDNA group and miR-551b-3p+pcDNA-USP9X group. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expressions of miR-551b-3p and USP9X; Western blotting was used to detect ubiquitin-specific peptidase 9 X-linked (USP9X), B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 related X protein (Bax) protein expression; luciferase reporter assay detects the targeting relationship of miR-551b-3p and USP9X; flow cytometry detects apoptosis; cell clone colony formation experiments detect radiosensitivity. **Results:** The expression of miR-551b-3p was significantly decreased in lung cancer tissues and lung cancer cell A549, and the expressions of USP9X mRNA and protein were significantly increased (all  $P < 0.001$ ). MiR-551b-3p targeted USP9X, overexpressed miR-551b-3p and inhibited USP9X expression, apoptosis rate was significantly increased, Bcl-2 expression was significantly decreased, Bax expression was significantly increased, and cell survival curve was significantly shifted down (all  $P < 0.05$ ). Overexpression of USP9X reversed the effect of miR-551b-3p overexpression on apoptosis and radiosensitivity of lung cancer A549 cells. **Conclusion:** Overexpression of miR-551b-3p promotes apoptosis of lung cancer A549 cells and enhances radiosensitivity of lung cancer cells. The mechanism may be related to the USP9X.

**Keywords** miR-551b-3p; USP9X; lung cancer; apoptosis; radiosensitivity

肺癌是我国常见的恶性肿瘤，放射治疗(以下简称放疗)是其主要治疗方式，且已取得一定进展。放疗疗效与放疗敏感性密切相关，因此对于放疗敏感性的研究成为近年来的研究热点<sup>[1]</sup>。研究<sup>[2]</sup>发现：miRNA与肺癌放疗敏感性相关，通过其靶点及相关信号通路影响治疗效果，研究miRNA与放疗敏感性之间的关系，有助于预测放疗疗效以及发现新的放疗增敏靶点。miR-551b-3p在胰腺癌组织中低表达，与胰腺癌的分化程度、淋巴结转移以及TNM分期相关<sup>[3]</sup>。miR-551b-3p在胃癌组织中低表达，过表达miR-551b-3p抑制胃癌细胞系HGC-27的增殖、迁移和侵袭<sup>[4]</sup>。然而miR-551b-3p对肺癌细胞凋亡和放射敏感性的影响及其机制尚未清楚。研究<sup>[5]</sup>发现：X染色体连锁的泛素特定蛋白水解酶9(ubiquitin-specific peptidase 9 X-linked, USP9X)在非小细胞肺癌组织中高表达，与患者预后呈负相关。抑制USP9X促进辐射诱导的非小细胞肺癌细胞凋亡<sup>[6]</sup>。USP9X低表达，胶质瘤细胞放射后细胞凋亡增加<sup>[7]</sup>。USP9X通过调节髓样细胞白血病1(myeloid cell leukemia-1, MCL-1)影响前列腺癌细胞的放射敏感性<sup>[8]</sup>。本研究旨在研究miR-551b-3p对肺癌细胞凋亡和放射敏感性的影响及其机制与USP9X的相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试剂与仪器

正常肺上皮细胞BEAS-2B和肺癌细胞A549购

自深圳百恩维生物科技有限公司；胎牛血清、RPMI-1640培养基均购自美国Gibco公司；TRIzol试剂、反转录试剂盒、荧光定量试剂盒购自美国Progema公司；双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自北京Solarbio公司；Lipofectamine™ 2000转染试剂购自美国Invitrogen公司；蛋白质提取试剂盒、二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒、RIPA蛋白裂解液、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)试剂盒、膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)和碘化丙锭(PI)试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司；抗体购自上海基屹生物科技有限公司；Thermo FC酶标仪购自美国Thermo公司；FACSCanto II流式细胞仪购自美国Bio-Rad公司。

#### 1.1.2 癌组织和癌旁组织来源

选取辽宁省肿瘤医院2017年1月至2019年1月经病理确诊为非小细胞肺癌且具有完整临床病理资料的患者20例，肺癌患者经手术切除癌组织，肺癌患者手术前未进行过手术及放疗和化学药物治疗(以下简称化疗)，距离癌组织边缘2~5 cm处切除的为癌旁组织。本研究经辽宁省肿瘤医院医学伦理委员会审核批准，患者均签署知情同意书。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细胞培养

用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液在37℃, 5% CO<sub>2</sub>条件下培养肺癌细胞A549, 2 d换液1次, 待细胞融和至90%左右时, 进行消化传代,

取对数生长期细胞进行实验。

### 1.2.2 细胞处理与分组

取对数生长期细胞A549, 将miR-NC, miR-551b-3p, anti-miR-NC, anti-miR-551b-3p, si-NC, si-USP9X分别转染至A549中, 记为miR-NC组、miR-551b-3p组、anti-miR-NC组、anti-miR-551b-3p组、si-NC组、si-USP9X组; 将miR-551b-3p分别与pcDNA和pcDNA-USP9X共转染至A549中, 记为miR-551b-3p+pcDNA组、miR-551b-3p+pcDNA-USP9X组。

### 1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测 miR-551b-3p 和 USP9X 的表达水平

miR-NC组、miR-551b-3p组细胞培养48 h后提取总RNA, 肺癌组织和癌旁组织也提取RNA, 将RNA反转录成cDNA, 按照荧光定量试剂盒使用说明进行PCR, 每个样品设3个重复, 循环条件为95 ℃ 5 min, 95 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s; 72 ℃ 30 s, 共40个循环; 60 ℃延长5 min。相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。miR-551b-3p和USP9X分别以U6和GAPDH为内参, miR-551b-3p正向引物序列为5'-CTGAGCGACCCATAGTTGG-3', 反向引物序列为5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'; U6正向引物序列为5'-CTCGCTTCGGCAGCACATATACT-3', 反向引物序列为5'-ACGCTTCACGAATTTGCGTGTC-3'; USP9X正向引物序列为5'-GTAATCCTG-AGGAGGAAGAG-3', 反向引物序列为5'-AGCACAGGC-AGGGAAACATG-3'; GAPDH正向引物序列为5'-GACATCAAGAAGGTGGTGAA-3', 反向引物序列为5'-TGTCATACCAGGAAATGAGC-3'。引物由上海生工生物工程公司合成。

### 1.2.4 蛋白质印迹法检测 USP9X, Bcl-2, Bax 蛋白表达

从各组细胞及肺癌组织、癌旁组织中提取总蛋白, 用BCA试剂盒进行蛋白定量。各组蛋白上样量60  $\mu$ g, 经SDS-PAGE将蛋白转移至PVDF上。用5%脱脂牛奶室温封闭90 min, 分别加入相应的一抗, 4 ℃孵育过夜, PBS洗涤3次, 每次5 min; 再加入二抗室温孵育2 h, PBS洗涤3次, 每次10 min, 后在暗室中曝光显影, 再浸入定影液, 最后洗去残液, 晾干, 将胶片用Quantity One凝胶分析软件处理, 测定各组蛋白条带的灰度值, 以目的条带和GAPDH条带的比值作为蛋白表达水平。

### 1.2.5 荧光素酶报告实验检测 miR-551b-3p 对 USP9X 的靶向调控

构建野生型和突变型基因靶点USP9X的荧

光素酶表达载体WT-USP9X和MUT-USP9X, 用Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000将WT-USP9X和MUT-USP9X分别与miR-NC和miR-551b-3p共转染至细胞A549中。按照说明书检测荧光素酶活性, 实验重复3次。

### 1.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡

取转染48 h后生长状态良好的细胞, 吸弃上清液, PBS漂洗细胞2次, 吸弃PBS液, 分别加Annexin V-FITC和PI各5  $\mu$ L, 轻摇混匀, 再加入结合缓冲液400  $\mu$ L, 混匀, 常温避光孵育15 min, 流式细胞仪检测。每组设3个复孔, 实验重复3次。

### 1.2.7 细胞克隆集落形成实验

将miR-NC组、miR-551b-3p组、si-NC组、si-USP9X组、miR-551b-3p+pcDNA组、miR-551b-3p+pcDNA-USP9X组细胞以合适密度接种于直径为60 mm的培养皿中, 按照剂量大小分别以 $0.3 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^3$ 的细胞密度接种于60 mm的培养皿中, 细胞融合达到约80%, 分别给予0, 2, 4, 6, 8 Gy的射线照射。照射后, 继续培养10~14 d。PBS清洗2遍后甲醇固定15 min, 吉姆萨染色30 min, 在低倍光学显微镜下计数>50个细胞的集落。克隆形成率(planting efficiency, PE)=克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ , 存活分数(survival fraction, SF<sub>2</sub>)=照射剂量组的集落数/(该组细胞接种数 $\times$ 未照射组PE)。采用单击多靶模型拟合细胞存活曲线,  $SF=1-(1-e^{-D/D_0})^N$ ,  $D_q=D_0 \times \ln N$ 。其中D为照射剂量(Gy),  $D_0$ 为平均致死剂量,  $D_q$ 为准阈剂量(代表存活的宽肩度), N为外推值。放射增敏比(sensitization enhancement ratio, SER)=单纯照射组 $D_0$ /联合照射组 $D_0$ 。

## 1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0统计学软件进行数据分析, 计量资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 两组比较行t检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用LSD-t检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MiR-551b-3p 和 USP9X 在肺癌组织中的表达

与癌旁组织相比, 肺癌组织中miR-551b-3p表达水平显著降低, USP9X mRNA和蛋白表达水平显著升高( $P < 0.05$ ; 图1, 表1)。

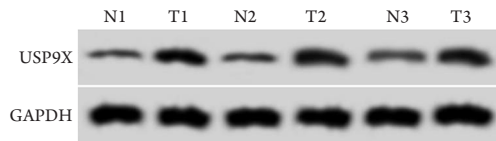


图1 USP9X蛋白表达

Figure 1 Expression of USP9X protein

N1, N2, N3分别为不同的癌旁组织, T1, T2, T3为相对应的癌组织。

N1, N2, and N3 are different adjacent tissues, and T1, T2, and T3 are corresponding cancerous tissues.

表1 MiR-551b-3p和USP9X在肺癌组织中的表达( $n=20$ )

Table 1 Expression of miR-551b-3p and USP9X in lung cancer tissues ( $n=20$ )

分组	miR-551b-3p	USP9X mRNA	USP9X蛋白
癌旁组织	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.08	0.23 ± 0.03
肺癌组织	0.54 ± 0.05	2.44 ± 0.24	0.64 ± 0.06
<i>t</i>	19.981	25.455	27.333
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

## 2.2 MiR-551b-3p 和 USP9X 在肺癌 A549 细胞和正常肺上皮细胞 BEAS-2B 中的表达

与正常肺上皮细胞BEAS-2B相比, 肺癌A549细胞中miR-551b-3p表达水平显著降低, USP9X mRNA和蛋白质表达水平显著升高(均 $P<0.001$ ; 图2, 表2)。

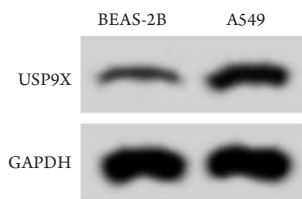


图2 USP9X蛋白在肺癌A549细胞和正常肺上皮细胞BEAS-2B中的表达

Figure 2 Expression of USP9X protein in lung cancer A549 cells and normal lung epithelial cells BEAS-2B

表2 MiR-551b-3p和USP9X在肺癌A549细胞和正常肺上皮细胞BEAS-2B中的表达( $n=9$ )

Table 2 Expression of miR-551b-3p and USP9X in lung cancer A549 cells and normal lung epithelial cells BEAS-2B ( $n=9$ )

分组	miR-551b-3p	USP9X mRNA	USP9X 蛋白
BEAS-2B	1.01 ± 0.08	1.02 ± 0.09	0.21 ± 0.03
A549	0.39 ± 0.04	3.14 ± 0.29	0.59 ± 0.05
<i>t</i>	20.795	20.946	19.551
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

## 2.3 MiR-551b-3p 靶向调控 USP9X 的表达

检索TargetScan数据库显示USP9X与miR-551b-3p存在结合位点(图3A)。荧光素酶报告实验显示: 与miR-NC组相比, miR-551b-3p组中转染野生型表达载体WT-USP9X的A549细胞荧光素酶活性显著降低( $P<0.001$ ); 而转染突变型表达载体MUT-USP9X的A549细胞荧光素酶活性差异无统计学意义(表3)。与miR-NC组相比, miR-551b-3p组miR-551b-3p表达水平升高, USP9X表达水平显著降低( $P<0.001$ ), 与anti-miR-NC组相比, anti-miR-551b-3p组miR-551b-3p表达水平降低, USP9X表达水平显著升高( $P<0.001$ ; 图3B, 表4)。



图3 MiR-551b-3p靶向调控USP9X的表达

Figure 3 miR-551b-3p targeted regulation of USP9X expression

(A) USP9X的3'UTR中含有与miR-551-3p互补的核苷酸序列; (B) USP9X蛋白表达。

(A) 3'UTR of USP9X contains a nucleotide sequence complementary to miR-551-3p; (B) USP9X protein expression.

表3 双荧光素酶报告实验( $n=9$ )

Table 3 Dual luciferase reporting experiment ( $n=9$ )

分组	WT-USP9X	MUT-USP9X
miR-NC	1.04 ± 0.09	1.01 ± 0.08
miR-551-3p	0.48 ± 0.05	1.00 ± 0.09
<i>t</i>	16.317	0.249
<i>P</i>	<0.001	0.806

表4 MiR-551b-3p调控USP9X蛋白的表达( $n=9$ )Table 4 MiR-551b-3p regulates the expression of USP9X protein ( $n=9$ )

分组	miR-551b-3p	USP9X蛋白
miR-NC	1.01 ± 0.08	0.62 ± 0.06
miR-551b-3p	2.81 ± 0.27*	0.24 ± 0.03*
anti-miR-NC	1.00 ± 0.09	0.59 ± 0.05
anti-miR-551b-3p	0.44 ± 0.04 <sup>#</sup>	0.96 ± 0.08 <sup>#</sup>
F	430.503	77.514
P	<0.001	<0.001

与miR-NC组比较, \* $P<0.05$ ; 与anti-miR-NC组比较, <sup>#</sup> $P<0.05$ 。

Compared with miR-NC group, \* $P<0.05$ ; compared with anti-miR-NC group, <sup>#</sup> $P<0.05$ .

## 2.4 MiR-551b-3p 过表达对肺癌 A549 细胞凋亡和放射敏感性的影响

与miR-NC组相比, miR-551b-3p组A549细胞中

miR-551b-3p表达水平显著升高, 细胞凋亡率显著升高, Bcl-2表达水平显著降低, Bax表达水平显著升高( $P<0.05$ ; 图4A, 4B, 表5)。细胞克隆形成实验后, 通过单击多靶模型拟合计算得出(表6), 在A549细胞中miR-551b-3p组的SER为2.222。细胞的存活拟合曲线(图4C)显示: 在同一剂量照射下, miR-551b-3p照射组细胞的存活分数明显小于miR-NC照射组, 随着照射剂量增多, 细胞的存活曲线明显下移。

## 2.5 抑制 USP9X 表达对肺癌 A549 细胞凋亡和放射敏感性的影响

与si-NC组相比, si-USP9X组A549细胞中USP9X表达水平显著降低, 细胞凋亡率显著升高, Bcl-2表达水平显著降低, Bax表达水平显著升高( $P<0.05$ ; 图5A, 5B, 表7)。单击多靶模型拟合计算得出(表8), 在A549细胞中si-USP9X组的放射增敏比(SER)为1.719。细胞的存活拟合曲线(图5C)显示: 在同一剂量照射下, si-USP9X照射组细胞的存活分数明显小于si-NC照射组, 细胞的存活曲线明显下移; 同一组中不同剂量的射线照射的细胞存活分数也明显降低。

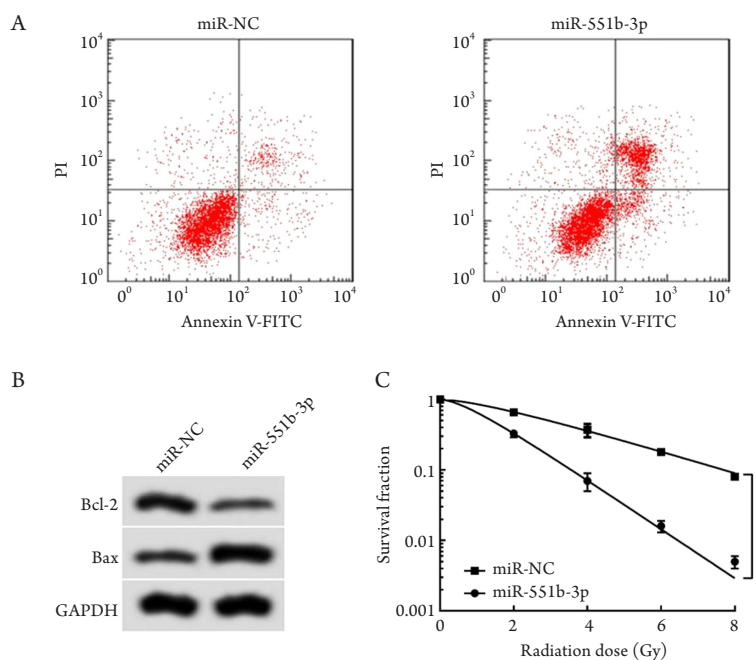


图4 MiR-551b-3p过表达对肺癌A549细胞凋亡和放射敏感性的影响

Figure 4 Effect of miR-551b-3p overexpression on apoptosis and radiosensitivity of lung cancer A549 cells

(A)细胞凋亡流式图; (B)凋亡相关蛋白质表达; (C)miR-551b-3p过表达对肺癌A549细胞放射敏感性的影响。\* $P<0.05$ 。

(A) Apoptotic flow pattern; (B) Apoptosis-related protein expression; (C) Effect of miR-551b-3p overexpression on radiosensitivity of lung cancer A549 cells. \* $P<0.05$ .

表5 miR-551b-3p过表达对肺癌A549细胞凋亡的影响( $n=9$ )Table 5 Effect of miR-551b-3p overexpression on apoptosis of lung cancer A549 cells ( $n=9$ )

分组	miR-551b-3p	凋亡率/%	Bcl-2蛋白	Bax蛋白
miR-NC	1.00 ± 0.08	6.35 ± 0.64	0.65 ± 0.06	0.33 ± 0.03
miR-551b-3p	2.51 ± 0.25	21.36 ± 2.11	0.24 ± 0.03	0.79 ± 0.07
<i>t</i>	17.257	20.422	18.335	18.120
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表6 单击多靶模型参数

Table 6 Click on multi-target model parameters

分组	$D_0$ (Gy)	$D_q$ (Gy)	N	$SF_2$	k	SER
miR-NC	2.771	1.383	1.647	0.666	0.361	—
miR-551b-3p	1.247	0.721	1.783	0.330	0.802	2.222

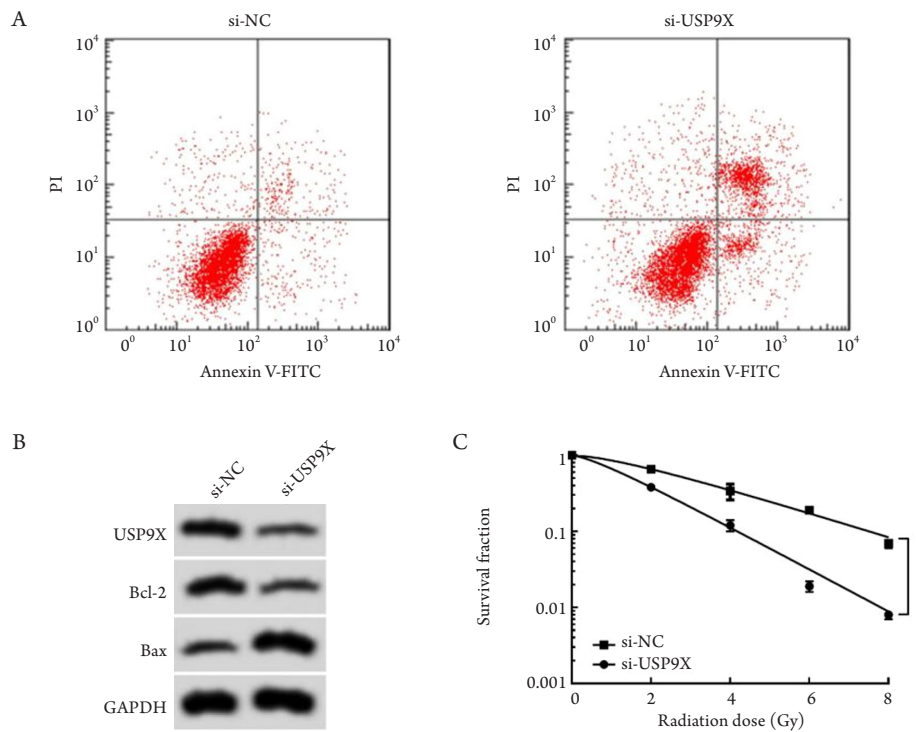


图5 抑制USP9X表达对肺癌A549细胞凋亡和放射敏感性的影响

Figure 5 Effect of inhibition of USP9X expression on apoptosis and radiosensitivity of lung cancer A549 cells

(A) 细胞凋亡流式图; (B) USP9X和凋亡相关蛋白质表达; (C) miR-551b-3p过表达对肺癌A549细胞放射敏感性的影响。

\* $P < 0.05$ 。

(A) Apoptotic flow pattern; (B) USP9X and apoptosis-related protein expression; (C) Effect of miR-551b-3p overexpression on radiosensitivity of lung cancer A549 cells. \* $P < 0.05$ .

表7 抑制USP9X表达对肺癌A549细胞凋亡的影响( $n=9$ )Table 7 Effect of inhibition of USP9X expression on apoptosis of lung cancer A549 cells ( $n=9$ )

分组	USP9X蛋白	凋亡率/%	Bcl-2蛋白	Bax蛋白
si-NC	0.63 ± 0.06	7.25 ± 0.73	0.64 ± 0.06	0.31 ± 0.03
si-USP9X	0.25 ± 0.03	18.55 ± 1.84	0.29 ± 0.03	0.73 ± 0.07
<i>t</i>	16.994	17.125	15.652	16.544
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表8 单击多靶模型参数

Table 8 Parameters of single-hit, multi-target model

分组	$D_0$ /Gy	$D_q$ /Gy	N	$SF_2$	k	SER
si-NC	2.691	1.372	1.665	0.659	0.372	—
si-USP9X	1.565	0.604	1.471	0.382	0.639	1.719

## 2.6 USP9X 过表达逆转了 miR-551b-3p 过表达对肺癌 A549 细胞凋亡和放射敏感性的作用

与 miR-551b-3p+pcDNA 组相比, miR-551b-3p+pcDNA-USP9X 组 USP9X 表达水平显著升高, 细胞凋亡率显著降低, Bcl-2 表达水平显著升高, Bax 表达水平显著降低 ( $P < 0.001$ ; 表 9, 图 6A, 6B)。细胞克隆形成实验后, 通过单击

多靶模型拟合计算得出(表 10), 在 A549 细胞中 miR-551b-3p+pcDNA-USP9X 组的 SER 为 0.586。细胞的存活拟合曲线(图 6C)示: 在同一剂量照射下, miR-551b-3p+pcDNA-USP9X 照射组细胞的存活分数明显高于 miR-551b-3p+pcDNA 照射组, 细胞的存活曲线明显上移; 同一组中不同剂量的射线照射的细胞存活分数也明显降低。

表9 USP9X过表达逆转了miR-551b-3p过表达对肺癌A549细胞凋亡的作用( $n=9$ )Table 9 USP9X overexpression reverses the effect of miR-551b-3p overexpression on apoptosis of lung cancer A549 cells ( $n=9$ )

分组	USP9X蛋白	凋亡率/%	Bcl-2蛋白	Bax蛋白
miR-NC	0.61 ± 0.06	7.54 ± 0.71	0.66 ± 0.06	0.32 ± 0.03
miR-551b-3p	0.23 ± 0.03*	22.65 ± 2.27*	0.27 ± 0.03*	0.77 ± 0.07*
miR-551b-3p+pcDNA	0.22 ± 0.03	23.47 ± 2.33	0.25 ± 0.03	0.78 ± 0.06
miR-551b-3p+pcDNA-USP9X	0.51 ± 0.05 <sup>#</sup>	12.48 ± 1.36 <sup>#</sup>	0.56 ± 0.05 <sup>#</sup>	0.43 ± 0.04 <sup>#</sup>
<i>F</i>	59.379	56.539	64.658	60.400
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与 miR-NC 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 miR-551b-3p+pcDNA 组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

Compared with miR-NC group, \* $P < 0.05$ ; compared with miR-551b-3p+pcDNA group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ .

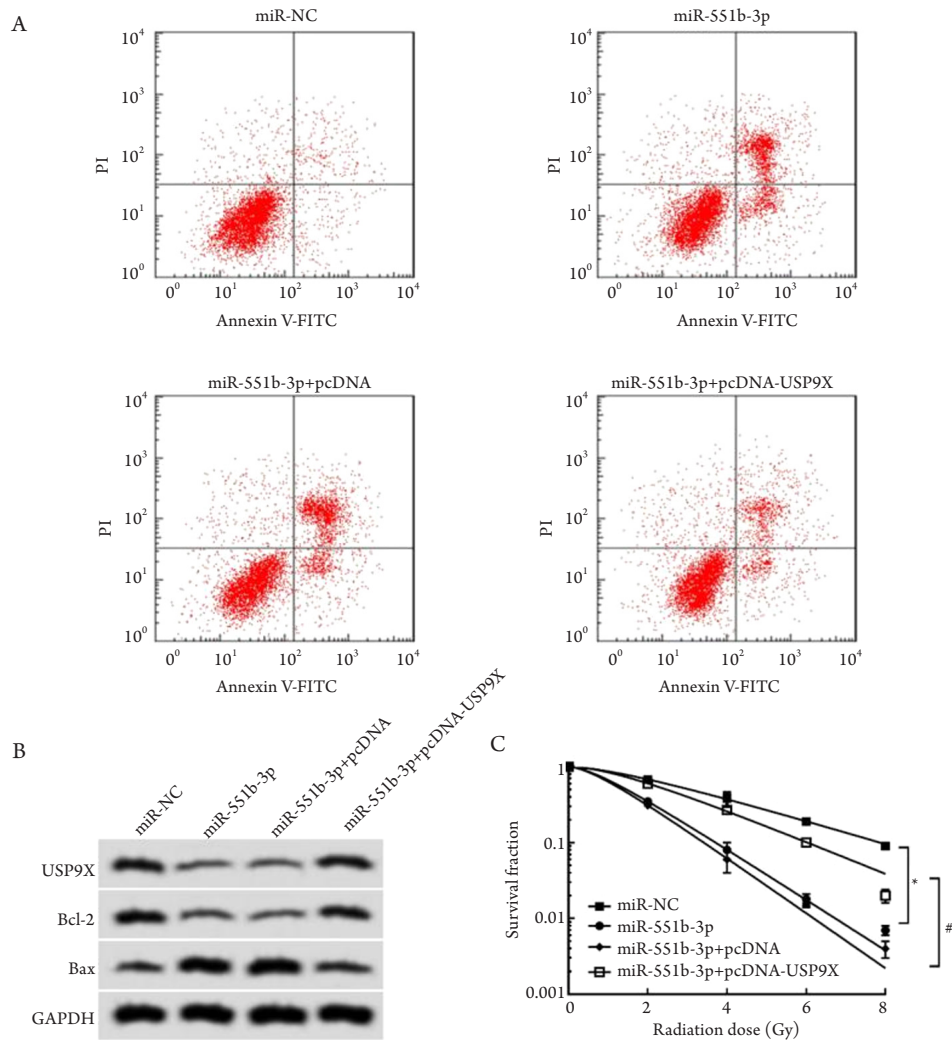


图6 USP9X过表达逆转了miR-551b-3p过表达对肺癌A549细胞凋亡和放射敏感性的作用

**Figure 6 Overexpression of USP9X reverses the effect of miR-551b-3p overexpression on apoptosis and radiosensitivity of lung cancer A549 cells**

(A)细胞凋亡流式图; (B)USP9X和凋亡相关蛋白表达; (C)miR-551b-3p过表达对肺癌A549细胞放射敏感性的影响。与miR-NC组比较, \* $P<0.05$ ; 与miR-551b-3p+pcDNA组比较, # $P<0.05$ 。

(A) Apoptotic flow pattern; (B) USP9X and apoptosis-related protein expression; (C) Effect of miR-551b-3p overexpression on radiosensitivity of lung cancer A549 cells. Compared with miR-NC group, \* $P<0.05$ ; compared with miR-551b-3p+pcDNA group, # $P<0.05$ .

表10 单击多靶模型参数

**Table 10 Parameters of single-hit, multi-target model**

分组	$D_0$ /Gy	$D_q$ /Gy	N	$SF_2$	k	SER
miR-NC	2.788	1.509	1.718	0.683	0.359	—
miR-551b-3p	1.300	0.750	1.780	0.350	0.769	2.144
miR-551b-3p+pcDNA	1.195	0.692	1.785	0.310	0.837	—
miR-551b-3p+pcDNA-USP9X	2.010	1.386	1.972	0.604	0.490	0.586



### 3 讨论

大量研究<sup>[9-10]</sup>表明: miRNA的异常表达与肺癌的发生、发展、预后及耐药和放疗敏感性密切相关, 可作为肺癌的诊断标志及治疗的特异性靶点。研究<sup>[11]</sup>显示: miR-551b-3p通过抑制细胞周期蛋白D1的表达可抑制胆管癌细胞增殖并诱导细胞凋亡。miR-551b-3p通过上调信号转导子和转录激活子3(signal transducer and activator of transcription3, STAT3)表达抑制卵巢癌的生长和转移<sup>[12]</sup>。LncRNA SMARCC2通过作用miR-551b-3p调控跨膜蛋白酶丝氨酸4(transmembrane protease serine 4, TMPRSS4)的表达进而抑制胃癌细胞增殖、迁移、侵袭<sup>[13]</sup>。本研究结果显示: 肺癌组织中miR-551b-3p低表达, 过表达miR-551b-3p后细胞凋亡率显著升高, B细胞淋巴瘤/白血病-2(B-cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)表达水平显著降低, Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 related X protein, Bax)表达水平显著升高, 说明过表达miR-551b-3p可促进肺癌细胞凋亡。且过表达miR-551b-3p后, 用不同剂量射线照射细胞, 细胞的存活分数降低, 细胞存活曲线下移, 说明miR-551b-3p可促进放射细胞凋亡, 具有放射增敏效果。

USP9X是去泛化酶家族成员, 在多种恶性肿瘤中表达异常, 参与其发生发展过程<sup>[14]</sup>。miR-132通过阻止USP9X诱导的上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)抑制肺癌细胞的迁移和侵袭<sup>[15]</sup>。过表达USP9X抑制人胰腺癌的细胞迁移, 侵袭并促进细胞凋亡<sup>[16]</sup>。本研究结果显示: 抑制USP9X表达细胞凋亡率显著升高, Bcl-2表达水平显著降低, Bax表达水平显著升高。说明抑制USP9X表达可促进肺癌细胞凋亡。还有研究<sup>[17]</sup>报道抑制USP9X表达可增强放射抗拒食管癌Ec9706-R细胞的放射敏感性。敲低USP9X增强胶质母细胞瘤细胞的放射敏感性<sup>[18]</sup>。本研究结果显示: 抑制USP9X表达后射线照射的细胞存活分数降低, 细胞存活曲线下移, 说明抑制USP9X表达可增强肺癌细胞放射敏感性。且本研究还发现: miR-551b-3p靶向调控USP9X, USP9X过表达逆转了miR-551b-3p过表达对肺癌A549细胞凋亡和放射敏感性的作用, 提示miR-551b-3p可能通过调控USP9X影响肺癌细胞凋亡和放射敏感性。

综上所述, 过表达miR-551b-3p促进肺癌A549细胞凋亡, 增强肺癌细胞放射敏感性, 其机制可能与下调USP9X有关。本研究将可为提高肺癌放疗效果提供新思路 and 理论参考依据。

### 参考文献

1. 全自强. 肺癌放射治疗的研究进展[J]. 中国卫生产业, 2014, 8(24): 189-190.  
TONG Ziqiang. Research progress on radiotherapy for lung cancer[J]. China Health Industry, 2014, 8(24): 189-190.
2. 林先勇, 张西志. microRNAs与肺癌患者放疗敏感性的研究进展[J]. 肿瘤学杂志, 2019, 25(5): 394-397.  
LIN Xianyong, ZHANG Xizhi. Research progress on association between microRNAs expression and radiosensitivity in patients with lung cancer[J]. Journal of Chinese Oncology, 2019, 25(5): 394-397.
3. 郭欣, 吕小慧, 吕行, 等. miR-551b-3p在胰腺癌细胞和组织中的表达及其临床意义[J]. 国际消化病杂志, 2016, 36(6): 360-363.  
GUO Xin, LÜ Xiaohui, LÜ Xing, et al. Expression of miR-551b-3p in pancreatic cancer cells and tissues and its role in progression of pancreatic cancer[J]. International Journal of Digestive Diseases, 2016, 36(6): 360-363.
4. 温馨, 翟嶂, 王芳, 等. miR-551b-3p在胃癌组织中低表达并抑制胃癌细胞系HGC-27的增殖、迁移和侵袭[J]. 基础医学与临床, 2016, 36(5): 610-614.  
WEN Xin, ZHAI Di, WANG Fang, et al. miR-551b-3p decreases in gastric cancer tissue and inhibits the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cell line HGC-27[J]. Basic & Clinical Medicine, 2016, 36(5): 610-614.
5. 吴畴斌, 方志明, 王伟, 等. 泛素特异性蛋白酶9X在非小细胞肺癌中的表达情况及与患者预后的关系[J]. 癌症进展, 2018, 16(12): 89-92.  
WU Choubin, FANG Zhiming, WANG Wei, et al. Expression of USP9X in non-small cell lung cancer and its relationship with the prognosis of patients[J]. Oncology Progress, 2018, 16(12): 89-92.
6. Kushwaha D, O'Leary C, Cron KR, et al. USP9X inhibition promotes radiation-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells expressing mid-to-high MCL1[J]. Cancer Biol Ther, 2015, 16(3): 392-401.
7. 胡静, 谢丛华. 去泛化酶USP9X对胶质瘤细胞U251放射敏感性的影响[J]. 武汉大学学报(医学版), 2013, 34(2): 62-65.  
HU Jing, XIE Conghua. Effect of deubiquitinating enzyme USP9X on the radiosensitivity of glioma U251 cells[J]. Medical Journal of Wuhan University, 2013, 34(2): 62-65.
8. Rudner J, Hogh-Binder SA, Wolfspurger F, et al. Importance of Mcl-1 and the Mcl-1-modulating enzyme USP9x for radiosensitivity in prostate cancer cells[J]. Eur J Cancer, 2014, 50(5): S225-S226.
9. 冯涛, 肖向茜, 盛望. miRNA在肺癌及肺癌耐药中的作用机制及治疗的研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(1): 67-71.  
FENG Tao, XIAO Xiangqian, SHENG Wang. Research progress on lung cancer therapy and the mechanism of microRNA in lung cancer and its drug resistance[J]. Medical Recapitulate, 2018, 24(1): 67-71.

10. 张雪彤, 顾鸣敏. miRNA与肺癌放疗敏感性的相关研究进展[J]. 国际遗传学杂志, 2018, 41(6): 483-489.  
ZHANG Xuotong, GU Mingmin. Progress on the relationship between miRNA and lung cancer in radiosensitivity[J]. International Journal of Genetics, 2018, 41(6): 483-489.
11. Chang W, Wang Y, Li W, et al. MicroRNA-551b-3p inhibits tumour growth of human cholangiocarcinoma by targeting Cyclin D1[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(8): 4945-4954.
12. Chaluvally-Raghavan P, Jeong KJ, Pradeep S, et al. Direct upregulation of STAT3 by microRNA-551b-3p deregulates growth and metastasis of ovarian cancer[J]. Cell Rep, 2016, 15(7): 1493-1504.
13. Yuan H, Chen Z, Bai S, et al. Molecular mechanisms of lncRNA SMARCC2/miR-551b-3p/ TMPRSS4 axis in gastric cancer[J]. Cancer Lett, 2018, 418(1): 84-96.
14. 周晓华, 张蓬波, 张秀忠, 等. 泛素特异肽酶9与肿瘤的研究进展[J]. 中国肿瘤外科杂志, 2017, 9(4): 261-263.  
ZHOU Xiaohua, ZHANG Pengbo, ZHANG Xiuzhong, et al. Research progress of ubiquitin-specific peptidase 9 and tumors[J]. Chinese Journal of Surgical Oncology, 2017, 9(4): 261-263.
15. Guo H, Zhang X, Chen Q, et al. miR-132 suppresses the migration and invasion of lung cancer cells by blocking USP9X-induced epithelial-mesenchymal transition[J]. Am J Transl Res, 2018, 10(1): 224-234.
16. Liu L, Yao D, Zhang P, et al. Deubiquitinase USP9X promotes cell migration, invasion and inhibits apoptosis of human pancreatic cancer[J]. Oncol Rep, 2017, 38(6): 3531-3537.
17. 晋瑞, 金迎迎, 王敏聪, 等. 抑制USP9x表达增强食管癌Ec9706-R细胞的放射敏感性[J]. 中国癌症杂志, 2019, 29(7): 486-493.  
JIN Rui, JIN Yingying, WANG Mincong, et al. Inhibition of USP9x expression enhances radiosensitivity of esophageal cancer Ec9706-R cells[J]. China Oncology, 2019, 29(7): 486-493.
18. Wolfsperger F, Hogh-Binder SA, Schittenhelm J, et al. Deubiquitylating enzyme USP9x regulates radiosensitivity in glioblastoma cells by Mcl-1-dependent and -independent mechanisms[J]. Cell Death Dis, 2016, 7(1): e2039.

本文引用: 蒋可心, 何怡江, 张旭. MiR-551b-3p靶向USP9X对人肺癌A549细胞凋亡和放射敏感性的影响[J]. 临床与病理杂志, 2021, 41(1): 1-10. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.01.001

**Cite this article as:** JIANG Kexin, HE Yijiang, ZHANG Xu. Effect of MiR-551b-3p targeting USP9X on apoptosis and radiosensitivity of human lung cancer A549 cells[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2021, 41(1): 1-10. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.01.001