

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.07.003

· 基础研究 ·

lncRNA MAFG-AS1 调控 miR-532-3p 表达对肺癌 A549 细胞糖酵解的影响

李瑞杰, 孙倩, 吕梦果, 刘娟(河南省胸科医院 肿瘤内科, 河南 郑州 450000)

[摘要] **目的:** 探讨 lncRNA MAFG 反义 RNA1 (MAFG-AS1) 调控 miR-532-3p 表达对肺癌 A549 细胞糖酵解的影响。**方法:** 用 qPCR 法检测人肺癌 A549 细胞和正常肺上皮细胞 BEAS-2B 中 MAFG-AS1 和 miR-532-3p 的表达水平。利用脂质体介导转染技术, 分别构建 MAFG-AS1 表达下调和 miR-532-3p 过表达的 A549 细胞, 用分光光度法检测细胞培养上清中葡萄糖消耗量与乳酸含量, qPCR 和 WB 法分别检测细胞中 M2 型丙酮酸激酶 (pyruvate kinase M2, PKM2)、己糖激酶 2 (hexokinase 2, HK2) mRNA 和蛋白的表达水平。用双荧光素酶报告基因实验验证 MAFG-AS1 与 miR-532-3p 的靶向关系, 观察 MAFG-AS1 和 miR-532-3p 同时低表达对 A549 细胞葡萄糖及乳酸含量和 PKM2、HK2 表达的影响。**结果:** 与 BEAS-2B 细胞比较, A549 细胞中 MAFG-AS1 表达上调而 miR-532-3p 表达下调 (均 $P < 0.01$)。下调 MAFG-AS1 或 miR-532-3p 过表达均可降低 A549 细胞葡萄糖消耗量及乳酸含量, 并抑制 PKM2、HK2 mRNA 和蛋白的表达 (均 $P < 0.01$)。miR-532-3p 可与 MAFG-AS1 靶向结合抑制野生型 MAFG-AS1 细胞的荧光素酶活性 ($P < 0.01$), 下调 MAFG-AS1 可使 A549 细胞中 miR-532-3p 表达升高 ($P < 0.01$)。miR-532-3p 低表达可逆转 MAFG-AS1 表达下调对细胞葡萄糖消耗量及乳酸含量和 PKM2、HK2 表达的影响 (均 $P < 0.01$)。**结论:** 下调 MAFG-AS1 可通过促进 miR-532-3p 表达而抑制肺癌 A549 细胞糖酵解。

[关键词] 肺癌; A549 细胞; lncRNA MAFG 反义 RNA1; miR-532-3p; 糖酵解; 葡萄糖; 乳酸

[中图分类号] R734.2; R730.43 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)07-0665-07

Effect of lncRNA MAFG-AS1 regulating miR-532-3p expression on glycolysis of lung cancer A549 cells

LI Ruijie, SUN Qian, LYU Mengguo, LIU Juan (Department of Oncology, Henan Provincial Thoracic Hospital, Zhengzhou 450000, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of lncRNA MAFG antisense RNA1 (lncRNA MAFG-AS1) regulating miR-532-3p on the glycolysis of lung cancer A549 cells. **Methods:** The expression levels of MAFG-AS1 and miR-532-3p in human lung cancer A549 cells and normal lung epithelial BEAS-2B cells were detected by qPCR. A549 cells with MAFG-AS1 downregulation or miR-532-3p overexpression were constructed by liposome transfection technique, respectively. The glucose consumption and lactate secretion in cell culture supernatant of A549 cells were detected by visible spectrophotometry, and the mRNA and protein expression levels of pyruvate kinase M2 (PKM2) and hexokinase 2 (HK2) in A549 cells were detected using qPCR and WB, respectively. The targeting relationship between MAFG-AS1 and miR-532-3p was verified by Dual luciferase reporter gene assay, and the effects of co-downregulation of MAFG-AS1 and miR-532-3p on glucose uptake, lactate secretion and expression of PKM2 and HK2 in A549 cells were observed. **Results:** Compared with BEAS-2B cells, the expression of MAFG-AS1 was upregulated while miR-532-3p expression was downregulated in A549 cells (all $P < 0.01$). Glucose consumption, lactate secretion and the protein and mRNA expressions of PKM2 and HK2 were inhibited by MAFG-AS1 downregulation or miR-532-3p overexpression (all $P < 0.01$). miR-532-3p could bind to MAFG-AS1 and inhibit the luciferase activity of wild-type MAFG-AS1 cells ($P < 0.01$). Downregulation of MAFG-AS1 could increase the expression of miR-532-3p ($P < 0.01$), while the co-downregulation of miR-532-3p could reverse the effect of MAFG-AS1 downregulation on glucose uptake, lactate secretion and the expression of PKM2 and HK2 in A549 cells (all $P < 0.01$). **Conclusion:** Downregulation of MAFG-AS1 can inhibit the glycolysis of A549 cells by promoting the expression of miR-532-3p.

[Key words] lung cancer; A549 cell; lncRNA MAFG-AS1; miR-532-3p; glycolysis; glucose; lactic acid

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(7): 665-671. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.07.003]

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划联合共建项目资助 (No.2018020557)。Project supported by the Joint Construction Project of Medical Science and Technology Project of Henan Province (No.2018020557)

[作者简介] 李瑞杰 (1982—), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事肺癌的临床研究, E-mail: 77080323@qq.com

[通信作者] 孙倩 (SUN Qian, corresponding author), 硕士, 主任医师, 主要从事肺癌的综合治疗研究, E-mail: sunqian_sun123@163.com

肺癌的发病率和病死率近年来呈上升趋势^[1]。目前手术、放化疗等疗法因个体差异、耐药和放疗抵抗等原因疗效并不十分理想^[2]。糖酵解是肿瘤细胞代谢的重要特征之一,可以为肿瘤细胞增殖、侵袭和转移等提供 ATP,从而促进肿瘤的恶性进展,故靶向糖酵解途径是肺癌治疗的重要策略^[3]。研究^[4]认为,部分 lncRNA 通过调控 miRNA 表达影响肿瘤细胞糖酵解过程。MAFG 反义 RNA1 (MAFG antisense 1, MAFG-AS1) 是一种新发现的 lncRNA,可通过靶向 miR-765 促进食管鳞状细胞癌细胞糖酵解^[5];miR-532-3p 是一种与糖酵解有关的 miRNA,可通过调控己糖激酶 2 (hexokinase 2, HK2) 参与口腔鳞状细胞癌糖酵解过程^[6]。MAFG-AS1 在肺癌中表达上调,可通过调控癌细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移等发挥致癌作用^[7-8];miR-532-3p 在肺癌中表达下调,可通过调控 FOXP3 表达抑制癌细胞增殖和转移^[9]。目前 MAFG-AS1 和 miR-532-3p 在肺癌糖酵解中的作用以及两者的关系尚不清楚。本研究以肺癌 A549 细胞为研究对象,探讨 MAFG-AS1 和 miR-532-3p 两者的关系以及两者对 A549 细胞糖酵解的影响,为肺癌糖酵解的发生机制和防治提供新线索。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

人肺癌细胞 A549 和正常肺上皮细胞 BEAS-2B 购自北京北纳创联生物技术研究院。RPMI 1640 和 BEGM 培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司, Lipofectamine™ 2000 试剂购自北京索莱宝生物科技有限公司, si-MAFG-AS1 购自上海吉玛制药技术有限公司, miR-532-3p mimic、miR-532-3p inhibitor 购自广州锐博生物技术有限公司, SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司, 乳酸含量检测试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司, M2 型丙酮酸激酶 (pyruvate kinase M2, PKM2)、HK2、 β -actin 兔抗人多克隆抗体购自英国 Abcam 公司, HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗购自武汉三鹰生物科技有限公司。

1.2 细胞培养、转染与分组

将肺癌 A549 细胞和 BEAS-2B 细胞置于 RPMI 1640 和 BEGM 培养基中, 37 °C、5%CO₂ 培养箱内常规培养。将对数生长期的 A549 细胞接种至 6 孔板 (1×10⁶ 个/孔), 培养至汇合度达 70%~80% 时, 参照 Lipofectamine™ 2000 试剂说明书的方法进行转染。分别将 si-MAFG-AS1、miR-532-3p mimic、miR-532-3p inhibitor 及其相应阴性对照质粒转染至 A549 细胞中。实验分组: si-MAFG-AS1 组、si-NC 组、miR-532-3p mimic 组、miR-NC 组、si-MAFG-AS1+anti-miR-532-3p 组、si-MAFG-AS1+anti-miR-NC 组和空白对照 (Blank) 组。转染 6 h 后换液, 继

续培养 48 h。引物序列: si-MAFG-AS1 为 5'-CGA GAGAGGCCACAGGUUTT-3', miR-532-3p mimic 为 5'-CCUCCCACACCCAAGGCUUGCA-3', miR-532-3p inhibitor 为 5'-UGCAAGCCUUGGGUGUGGGAGG-3'。1.3 qPCR 法检测 A549 细胞中 MAFG-AS1、miR-532-3p、PKM2 和 HK2 mRNA 的表达水平

用 TRIzol 试剂裂解提取各组转染 A549 细胞或 BEAS-2B 细胞总 RNA, 逆转录合成 cDNA; 再以 cDNA 为模板, 参照 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒说明书的方法进行扩增。实验所用引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。MAFG-AS1 引物序列: 上游为 5'-ATGACGACCCCCAATAAAGGA-3', 下游为 5'-CAC CGACATGGTTACCAGC-3'; miR-532-3p 引物序列: 上游为 5'-GAATATTCCCTCCCACACCCA-3', 下游为 5'-TATGGTTTTGACGACTGTGTGAT-3'; PKM2 引物序列: 上游为 5'-ATGGCTGACACATTCCTGGAGC-3', 下游为 5'-CCTTCAACGTCTCCACTGATCG-3'; HK2 引物序列: 上游为 5'-GAGTTTGACCTGGATGTGGTTGC-3', 下游为 5'-CCTCCATGTAGCAGGCATTGCT-3'; β -actin 引物序列: 上游为 5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3', 下游为 5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'; U6 引物序列: 上游为 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 下游为 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。PCR 反应条件: 预变性 94 °C 3 min; 退火 94 °C 15 s, 延伸 62 °C 40 s, 共 40 个循环。以 β -actin 或 U6 为内参, 以 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算目的基因的相对表达量。

1.4 分光光度法检测 A549 细胞培养上清中葡萄糖消耗量与乳酸含量

1.4.1 葡萄糖消耗量检测 收集转染 48 h 后各组 A549 细胞培养上清液, 参照葡萄糖含量检测试剂盒说明书的方法加入相应试剂混匀后, 在 37 °C 水浴中孵育 10~15 min, 用酶标仪在 505 nm 波长处检测光密度 (*D*) 值, 经空白孔调零后, 以公式“葡萄糖含量 (μ mol/ml)=0.5 μ mol/ml×(测定孔 *D* 值-空白孔 *D* 值)/(标准孔 *D* 值-空白孔 *D* 值)”计算培养基中葡萄糖的含量。葡萄糖消耗量=原培养液中葡萄糖含量-实验组所测葡萄糖含量; 葡萄糖相对消耗量=实验组葡萄糖消耗量/Blank 组葡萄糖消耗量。

1.4.2 乳酸含量检测 参照乳酸含量检测试剂盒说明书的方法制备标准品以绘制标准曲线。收集细胞上清液后, 先后加入乳酸缓冲液、乳酸酶混合剂和乳酸底物混合剂, 充分混匀后避光孵育 30 min; 采用酶标仪检测波长在 450 nm 处每孔的 *D* 值后, 以标准溶液浓度为 *X* 轴, 以对应的 *D* 值为 *Y* 轴绘制标准曲线并得到标准曲线方程, 然后代入各组细胞 *D* 值即可计算出乳酸的含量 (μ mol/ml)。将 Blank 组为标准, 以实验组与 Blank 组

比值表示细胞上清液中乳酸的相对含量。

1.5 WB法检测 A549 细胞中 PKM2 和 HK2 蛋白的表达

收集转染 48 h 后的 A549 细胞,加入裂解液提取细胞总蛋白;将定量后的蛋白样品进行电泳、转膜和封闭处理后,加入均以 1:1 000 稀释的 PKM2、HK2 和 β -actin 的多克隆抗体,在 4 °C 下孵育过夜。次日,加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:2 000),在室温下孵育 2 h 后加入 ECL 发光液显影曝光后,以 β -actin 为内参,用 ImageJ 软件分析 A549 细胞中 PKM2 和 HK2 蛋白的表达水平。

1.6 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-532-3p 与 MAFG-AS1 的靶向关系

将含有 miR-532-3p 和 MAFG-AS1 结合位点及突变位点的序列片段克隆重组到 pmirGLO 载体上,构建 MAFG-AS1 野生型(WT)和突变型(MUT)载体质粒。将对数生长期的 A549 细胞接种至 6 孔板上,待细胞汇合度达 70% 时,参照 Lipofectamine™ 2000 试剂说明书方法将 MAFG-AS1-WT、MAFG-AS1-MUT 分别与 miR-532-3p mimic 及 miR-NC 共转染至 A549 细胞中,记为 MAFG-AS1-WT+miR-532-3p 组、MAFG-AS1-WT+miR-NC 组、MAFG-AS1-MUT+miR-532-3p 组、MAFG-AS1-MUT+miR-NC 组。转染 48 h 后,收集各组细胞,参照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书的方法检测各组转染细胞的荧光素酶活性。

1.7 统计学处理

以上实验均重复 3 次。采用 SPSS20.0 软件进行统计学分析,呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以独立样本 t 检验对两组间数据进行比较,以单因素方差分析对多组间数据进行比较,多组中进一步两组间比较采用 SNK- q 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 A549 细胞中 MAFG-AS1 表达上调而 miR-532-3p 表达下调

qPCR 法检测结果(图 1)显示,与 BEAS-2B 细胞相比,A549 细胞中 MAFG-AS1 表达水平显著升高($t=14.624$, $P < 0.01$),miR-532-3p 表达水平显著降低($t=7.668$, $P < 0.01$)。

2.2 下调 MAFG-AS1 表达可抑制 A549 细胞的糖酵解过程

转染 si-MAFG-AS1 后,与 Blank 组和 si-NC 组比较,si-MAFG-AS1 组 A549 细胞中 MAFG-AS1 表达水平显著降低($t=20.068$ 、 16.327 ,均 $P < 0.01$;图 2A)。与 si-NC 组比较,si-MAFG-AS1 组细胞培养上清中葡萄糖消耗量和乳酸含量($t=13.535$ 、 13.479 ,均 $P < 0.01$;

图 2 B、2C)、细胞中 PKM2 和 HK2 mRNA($t=22.452$ 、 16.007 ,均 $P < 0.01$;图 2D)及蛋白($t=10.817$ 、 22.808 ,均 $P < 0.01$;图 2E)的表达均显著降低。结果表明,下调 MAFG-AS1 表达后可降低细胞培养上清中葡萄糖消耗量、乳酸含量及糖酵解相关蛋白的表达,抑制 A549 细胞的糖酵解过程。

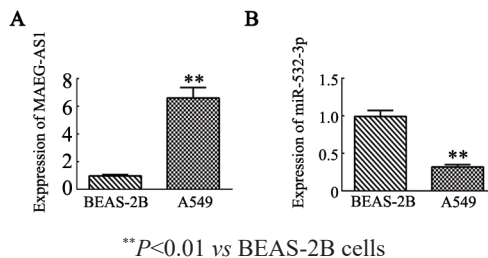


图 1 MAFG-AS1(A)和 miR-532-3p(B)在 A549 细胞中的表达
Fig.1 Expressions of MAFG-AS1 (A) and miR-532-3p (B) in A549 cells

2.3 上调 miR-532-3p 表达可抑制 A549 细胞的糖酵解过程

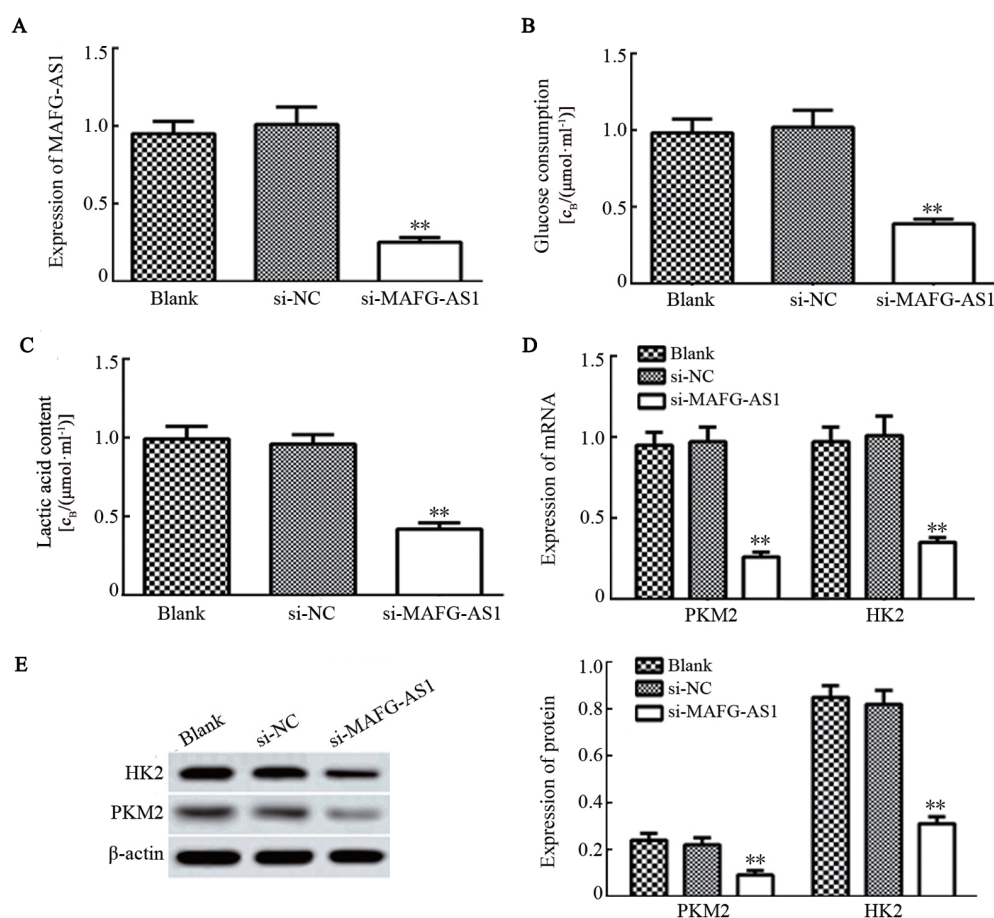
转染 miR-532-3p mimic 后,与 Blank 组和 miR-NC 组比较,miR-532-3p mimic 组细胞中 miR-532-3p 表达水平显著升高($t=18.048$ 、 18.218 ,均 $P < 0.01$;图 3A)。与 miR-NC 组比较,miR-532-3p mimic 组细胞培养上清中葡萄糖相对消耗量和乳酸相对含量($t=13.841$ 、 12.096 ,均 $P < 0.01$;图 3B、3C)、细胞中 PKM2 和 HK2 mRNA($t=24.029$ 、 16.091 ,均 $P < 0.01$;图 3D)及蛋白($t=10.817$ 、 23.702 ,均 $P < 0.01$;图 3E)表达水平均显著降低。结果表明,上调 miR-532-3p 表达可抑制 A549 细胞的糖酵解进程。

2.4 MAFG-AS1 可与 miR-532-3p 靶向结合

利用生物信息学软件 LncBase Predicted v.2 对 MAFG-AS1 的潜在靶基因进行预测,结果显示 MAFG-AS1 与 miR-532-3p 之间存在互补的结合位点(图 4A)。双荧光素酶报告基因实验结果(图 4B)显示,与 MAFG-AS1-WT+miR-NC 组比较,MAFG-AS1-WT+miR-532-3p 组细胞的荧光素酶活性明显降低($t=28.622$, $P < 0.01$),而 MAFG-AS1-MUT+miR-NC 组和 MAFG-AS1-MUT+miR-532-3p 组细胞的荧光素酶活性差异比较无统计学意义($t=0.900$, $P > 0.05$)。

2.5 敲减 miR-532-3p 可逆转下调 MAFG-AS1 对 A549 细胞糖酵解的抑制作用

转染 si-MAFG-AS1 或 si-MAFG-AS1+miR-532-3p inhibitor 后,与 Blank 组比较,si-MAFG-AS1 组和 si-MAFG-AS1+anti-miR-NC 组 A549 细胞中 miR-325-3p 表达水平均显著升高($t=41.824$ 、 35.182 ,均 $P < 0.01$),si-MAFG-AS1+anti-miR-532-3p 组中 miR-325-3p 表达水平显著低于 si-MAFG-AS1 组和 si-MAFG-AS1+anti-miR-NC 组($t=53.126$ 、 44.001 ,均 $P < 0.01$;图 5A)。

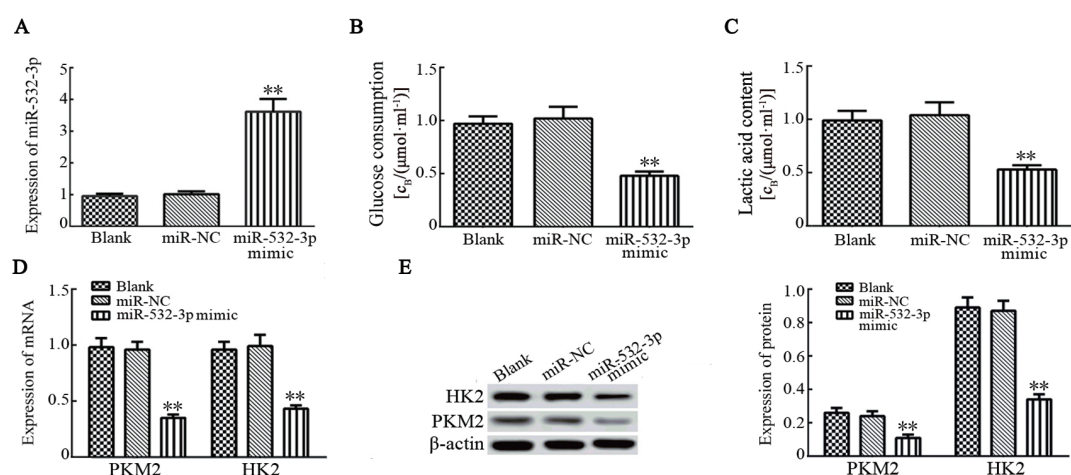


** $P < 0.01$ vs Blank or si-NC group

A: The expression of MAFG-AS1 was detected by qPCR; B: The relative glucose consumption was detected by visible spectrophotometry; C: The relative lactic acid content was detected by visible spectrophotometry; D: The mRNA expressions of PKM2 and HK2 were detected by qPCR; E: The protein expressions of PKM2 and HK2 were detected by WB

图2 下调MAFG-AS1表达对A549细胞糖酵解的影响

Fig.2 Effect of MAFG-AS1 downregulation on glycolysis of A549 cells



** $P < 0.01$ vs Blank or miR-NC group

A: The expression of miR-532-3p was detected by qPCR; B: The relative glucose consumption was detected by visible spectrophotometry; C: The relative lactic acid content was detected by visible spectrophotometry; D: The mRNA expressions of PKM2 and HK2 were detected by qPCR; E: The protein expressions of PKM2 and HK2 were detected by WB

图3 miR-532-3p过表达对A549细胞糖酵解的影响

Fig.3 Effect of miR-532-3p overexpression on glycolysis of A549 cells

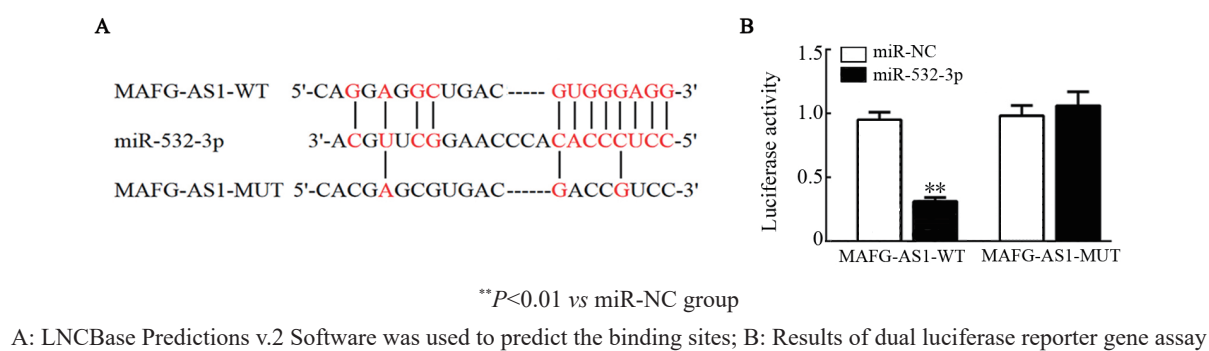
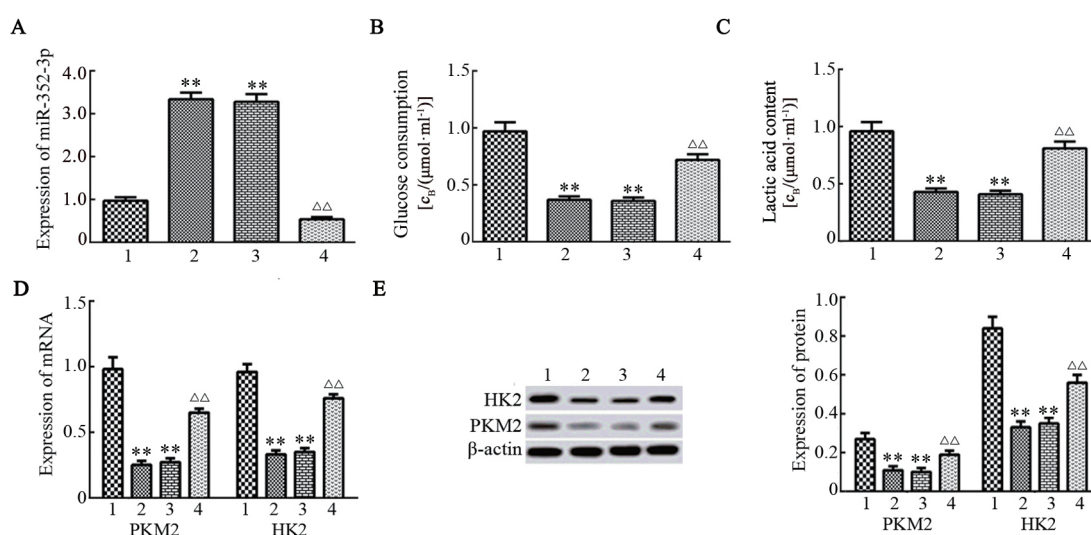


图4 MAFG-AS1与miR-532-3p的靶向结合关系

Fig.4 The targeted binding relationship between MAFG-AS1 and miR-532-3p



1: Blank group; 2: si-MAFG-AS1 group; 3: si-MAFG-AS1+anti-miR-NC group; 4: si-MAFG-AS1+anti-miR-532-3p group

** $P < 0.01$ vs 1 (Blank) group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs 2 (si-MAFG-AS1) or 3 (si-MAFG-AS1+anti-miR-NC) group

A: The expression of miR-532-3p was detected by qPCR; B: The relative glucose consumption was detected by visible spectrophotometry; C: The relative lactic acid content was detected by visible spectrophotometry; D: The mRNA expressions of PKM2 and HK2 were detected by qPCR; E: The protein expressions of PKM2 and HK2 were detected by WB

图5 敲减 miR-532-3p 可逆转 MAFG-AS1 表达下调对 A549 细胞糖酵解的抑制作用

Fig.5 Knockdown of miR-532-3p could reverse the inhibitory effect of MAFG-AS1 downregulation on glycolysis in A549 cells

进一步观察结果显示,与 Blank 组比较, si-MAFG-AS1 组和 si-MAFG-AS1+anti-miR-NC 组细胞培养上清中葡萄糖相对消耗量和乳酸相对含量 ($t=21.067, 21.419, 18.610, 19.312$, 均 $P < 0.01$)、细胞中 PKM2 和 HK2 mRNA 与蛋白表达水平均显著降低 ($t=23.085, 22.452, 28.174, 27.280$, 均 $P < 0.01$), 而 si-MAFG-AS1+anti-miR-532-3p 组葡萄糖相对消耗量和乳酸相对含量、PKM2 和 HK2 mRNA 与蛋白表达水平均回升,且明显高于 si-MAFG-AS1+anti-miR-NC 组 ($t=18.522, 20.580, 19.551, 28.991, 9.546, 12.600$, 均 $P < 0.01$; 图 5B~5E)。实验结果表明,敲减 miR-532-3p 表达可逆转下调 MAFG-AS1 对 A549 细胞糖酵解的抑制作用。

3 讨论

正常细胞在氧气充足时主要以氧化磷酸化途径产生 ATP, 缺氧时主要以糖酵解途径产生 ATP; 但肿瘤细胞在氧气充足时也以糖酵解方式提供 ATP, 被称为 Warburg 效应^[10]。肿瘤细胞糖酵解后可产生乳酸造成酸性环境, 引起细胞基质的不稳定与降解, 进而促进肿瘤细胞恶性侵袭和转移^[11]。可见, 糖酵解代谢方式是肿瘤细胞的重要特征之一, 是促进肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭等恶性行为的营养基础, 其异常活跃也是包括肺癌在内的多种恶性肿瘤发展的重要机制。因此, 深入研究肺癌糖酵解发生的分子机制, 寻找有效的作用靶点阻断糖酵解代谢是肺癌治疗研究

的方向之一。目前,关于肿瘤组织糖酵解的发生机制并不完全清楚,但其与包括 lncRNA 和 miRNA 在内的多种非编码 RNA 的作用密不可分。lncRNA 是一类长度在 200 nt 以上的非编码 RNA,miRNA 是一类长度在 22 nt 左右的非编码 RNA,两者存在着相互调控的作用关系,lncRNA 可以通过与 miRNA 竞争性结合间接调控下游的 mRNA,从而在包括糖酵解在内的肿瘤发生及进展过程中发挥重要的作用。lncRNA CRYBG3 是肺癌细胞糖酵解的重要调节因子,其过表达可通过影响乳酸脱氢酶 A 促进肺癌细胞葡萄糖的摄取和乳酸的生成^[12];lncRNA NORAD 在肺癌中高表达,可通过调控 miR-136-5p 促进癌细胞糖酵解^[13];miR-206 可通过靶向调控 HK2 表达发挥抑制肺癌细胞糖酵解的作用^[14]。尽管对肺癌细胞糖酵解的研究越来越深入,但仍有部分 lncRNA 和 miRNA 的作用未被发现和认识,还有待深入探讨。MAFG-AS1 是一种与肿瘤糖酵解发生密切相关的 lncRNA。QIAN 等^[15]研究发现,在胃癌中,MAFG-AS1 可通过调控 miR-11181-3p/GLG1 轴促进癌细胞的糖酵解;CUI 等^[16]研究发现,在结直肠癌中高表达的 MAFG-AS1 可通过调控 miR-147b 和 NDUFA4 促进糖酵解的发生;另外,在食管鳞状细胞癌中 MAFG-AS1 也同样发挥着促进肿瘤细胞糖酵解的作用^[5]。有学者^[7-8]指出,MAFG-AS1 在肺癌中高表达且在癌细胞增殖、侵袭和迁移等过程中发挥重要的作用,但其是否参与肺癌细胞的糖酵解过程并不明确。本研究结果显示,下调 MAFG-AS1 表达后肺癌 A549 细胞中葡萄糖消耗和乳酸生成能力明显减弱;同时 A549 细胞中糖酵解相关基因 HK2、PKM2 mRNA 和蛋白表达水平均明显降低,提示 MAFG-AS1 可能通过调控 HK2 和 PKM2 等糖代谢相关基因的表达参与肺癌细胞的糖酵解过程。

lncRNA 绝大部分是通过调控 miRNA 或与 miRNA 竞争性结合从而调控下游编码蛋白的基因发挥作用。目前已有许多 miRNA 被报道接受 MAFG-AS1 的调控^[17-18]。miR-532-3p 也是常见的肿瘤相关 miRNA 之一,不仅具有抑制结直肠癌和前列腺癌细胞增殖、侵袭和迁移的作用^[19-20],也被证实可通过调控 HK2 和 PKM2 表达抑制口腔鳞状细胞癌和卵巢癌的糖酵解^[6,21]。目前关于 miR-532-3p 和肺癌的研究已有报道,但多集中在肿瘤细胞增殖、侵袭和迁移等方面^[22],而 miR-532-3p 在肺癌细胞糖酵解中的作用尚未见报道。本研究结果发现,上调 miR-532-3p 后,肺癌 A549 细胞葡萄糖消耗和乳酸生成能力明显减弱;同时 A549 细胞中糖酵解相关基因 HK2、PKM2 mRNA 和蛋白表达水平均明显降低,与下调 MAFG-AS1 效果

相似。进一步利用生物信息学软件分析发现,MAFG-AS1 与 miR-532-3p 间存在靶向结合区域,miR-532-3p 过表达可降低携带野生型 MAFG-AS1 细胞的荧光素酶活性,而下调 MAFG-AS1 可使 A549 细胞中 miR-532-3p 表达升高。进一步抑制 miR-532-3p 后发现,下调 MAFG-AS1 对 A549 细胞糖酵解的抑制作用有一定程度的逆转。因此可以说明,MAFG-AS1 可靶向调控 miR-532-3p 表达,且该调控作用是 MAFG-AS1 影响肺癌 A549 细胞糖酵解的机制之一。

综上所述,MAFG-AS1 可通过抑制 miR-532-3p 表达促进肺癌 A549 细胞的糖酵解进程。本研究初步揭示了 MAFG-AS1 和 miR-532-3p 在肺癌 A549 细胞糖酵解中的作用,同时也首次证实了两者在肺癌中的作用关系,这为肺癌发生发展机制与靶向治疗提供了新线索。

[参 考 文 献]

- [1] CHEN W, ZHENG R, ZENG H, et al. Epidemiology of lung cancer in China[J]. *Thorac Cancer*, 2015, 6(2): 209-215. DOI: 10.1111/1759-7714.12169.
- [2] WAKABAYASHI Y, MASUDA T, FUJITAKA K, et al. Clinical significance of BIM deletion polymorphism in chemoradiotherapy for non-small cell lung cancer[J/OL]. *Cancer Sci*, 2021, 112(1): 369-379[2020-12-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7780054/>. DOI:10.1111/cas.14711.
- [3] GAO X, HAN H. Jolkinolide B inhibits glycolysis by downregulating hexokinase 2 expression through inactivating the Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer cells[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(6): 4967-4974. DOI:10.1002/jcb.26742.
- [4] SUN H, HUANG Z H, SHENG W Q, et al. Emerging roles of long non-coding RNAs in tumor metabolism[J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 106[2020-12-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6104013/>. DOI:10.1186/s13045-018-0648-7.
- [5] QIAN C J, XU Z R, CHEN L Y, et al. LncRNA MAFG-AS1 accelerates cell migration, invasion and aerobic glycolysis of esophageal squamous cell carcinoma cells via miR-765/PDX1 axis[J/OL]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 6895-6908[2020-12-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7415466/>. DOI:10.2147/CMAR.S262075.
- [6] ZHENG Z, MA X Z, LI H F. Circular RNA circMDM2 accelerates the glycolysis of oral squamous cell carcinoma by targeting miR-532-3p/HK2[J/OL]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(13): 7531-7537[2020-12-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7339225/>. DOI: 10.1111/jcmm.15380.
- [7] JIA Y C, WANG J Y, LIU Y Y, et al. LncRNA MAFG-AS1 facilitates the migration and invasion of NSCLC cell via sponging miR-339-5p from MMP15[J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(4): 384-393. DOI:10.1002/cbin.11092.
- [8] SUI Y, LIN G Y, ZHENG Y S, et al. LncRNA MAFG-AS1 boosts the proliferation of lung adenocarcinoma cells via regulating miR-

- 744-5p/MAFG axis[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 859: 172465. DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.172465.
- [9] JIANG W H, ZHENG L D, YAN Q Q, et al. MiR-532-3p inhibits metastasis and proliferation of non-small cell lung cancer by targeting FOXP3[J]. *J BUON*, 2019, 24(6): 2287-2293.
- [10] CHEN Z, LIU M Q, LI L F, et al. Involvement of the Warburg effect in non-tumor diseases processes[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(4): 2839-2849. DOI:10.1002/jcp.25998.
- [11] 秦毅, 梁丁孔, 施思, 等. E-cadherin/ β -catenin 影响胰腺癌 PANC-1 细胞糖酵解效应的实验研究[J]. *中国癌症杂志*, 2015, 25(2): 81-86. DOI: 10.3969/j.issn.1007-3939.2015.02.001.
- [12] CHEN H Y, PEI H L, HU W T, et al. Long non-coding RNA CRYBG3 regulates glycolysis of lung cancer cells by interacting with lactate dehydrogenase A[J/OL]. *J Cancer*, 2018, 9(14): 2580-2588[2020-12-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6036897/>. DOI:10.7150/jca.24896.
- [13] GAO W, WENG T, WANG L F, et al. Long non-coding RNA NORAD promotes cell proliferation and glycolysis in non-small cell lung cancer by acting as a sponge for miR-136-5p[J/OL]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(6): 5397-5405[2020-12-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6522956/>. DOI:10.3892/mmr.2019.10210.
- [14] JIA K G, FENG G, TONG Y S, et al. miR-206 regulates non-small-cell lung cancer cell aerobic glycolysis by targeting hexokinase 2 [J]. *J Biochem*, 2020, 167(4): 365-370. DOI:10.1093/jb/mvz099.
- [15] 钱翠娟, 许朱镭, 陈璐彦, 等. lncRNA MAFG-AS1 通过调控 miR-11181-3p/GLG1 轴促进胃癌 AGS 细胞迁移、侵袭和有氧糖酵解 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(9): 992-998. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2020.09.005.
- [16] CUI S S, YANG X, ZHANG L H, et al. LncRNA MAFG-AS1 promotes the progression of colorectal cancer by sponging miR-147b and activation of NDUFA4[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 506(1): 251-258. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.10.112.
- [17] 钱翠娟, 许朱镭, 陈璐彦, 等. lncRNA MAFG-AS1 通过调控 miR-11181-3p/GLG1 轴促进胃癌 AGS 细胞迁移、侵袭和有氧糖酵解 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(9): 992-998. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2020.09.005.
- [18] 赵晨阳, 李琼. lncRNA MAFG-AS1 及 miR-143-3p 对宫颈癌细胞增殖、凋亡的影响及机制研究[J]. *中国癌症防治杂志*, 2019, 11(5): 375-381. DOI:10.3969/j.issn.1674-5671.2019.05.03.
- [19] GU C C, CAI J Q, XU Z J, et al. MiR-532-3p suppresses colorectal cancer progression by disrupting the ETS1/TGM2 axis-mediated Wnt/ β -catenin signaling[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(10): 739[2020-12-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6768886/>. DOI: 10.1038/s41419-019-1962-x.
- [20] WA Q D, ZOU C Y, LIN Z Y, et al. Ectopic expression of miR-532-3p suppresses bone metastasis of prostate cancer cells via inactivating NF- κ B signaling[J/OL]. *Mol Ther Oncolytics*, 2020, 17: 267-277[2020-12-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7191128/>. DOI: 10.1016/j.omto.2020.03.024.
- [21] ZHOU Y Y, ZHENG X, LU J J, et al. Ginsenoside 20(S)-Rg3 inhibits the Warburg effect via modulating DNMT3A/ MiR-532-3p/ HK2 pathway in ovarian cancer cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(6): 2548-2559. DOI:10.1159/000488273.
- [22] LIU D G, LIU H B, JIANG Z P, et al. Long non-coding RNA DARS-AS1 promotes tumorigenesis of non-small cell lung cancer via targeting miR-532-3p[J]. *Minerva Med*, 2021, 112(3): 408-409. DOI:10.23736/S0026-4806.19.06198-6.
- [收稿日期] 2021-02-25 [修回日期] 2021-05-08
[本文编辑] 党瑞山