

基于TCGA数据库生物学信息分析FEN1与肺腺癌相关性并敲低FEN1基因抑制小鼠Lewis肺癌细胞生长及其分子机制的实验研究

沈志勇^{1,2}, 王玲^{1,2}, 朱正安^{1,2}, 林秀华³, 傅志超^{1,2}, 陈忠华^{1,2}

(1. 福建医科大学福总临床医学院放射治疗科, 福州 350025; 2. 中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院放射治疗科, 福州 350025; 3. 福建医科大学孟超肝胆医院呼吸内科, 福州 350028)

摘要: 目的 基于癌症基因组图谱(TCGA)数据库分析瓣状核酸内切酶1(FEN1)在肺腺癌(LUAD)中的表达及预后价值,并阐明其调控LUAD细胞生物学行为的分子机制。方法 分析TCGA数据库598例样本(539例LUAD组织、59例正常组织)转录组数据,评估FEN1表达与患者预后关系。构建FEN1敲低的小鼠Lewis肺癌细胞(LLC),按转染情况分为LLC组、shRNA-NC组和FEN1-shRNA组。采用细胞计数试剂盒-8(CCK8)法、流式细胞术(FCM)、Transwell法分别检测细胞增殖、凋亡、周期及迁移、侵袭能力。实时荧光定量PCR(RT-qPCR)和蛋白印迹(Western blot)检测上皮-间充质转化(EMT)标志物[上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)、神经型钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)]及细胞周期蛋白(Cyclin) D1、B细胞淋巴瘤/白血病-2基因(Bcl-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达。结果 FEN1在LUAD组织中高表达,与不良预后显著相关(Log-rank检验, $Z=2.81$, $P=0.005$)。成功构建FEN1稳定敲低细胞株,敲低效率83.8%。与LLC组相比,FEN1-shRNA组24、48h存活率降低($62.31\% \pm 2.84\%$ vs $100\% \pm 0.93\%$ 、 $81.58\% \pm 2.35\%$ vs $100.00\% \pm 4.88\%$),凋亡率增高($25.82\% \pm 0.30\%$ vs $3.19\% \pm 0.46\%$),差异具有统计学意义($t=30.892$ 、 8.336 、 -70.889 , 均 $P<0.001$);细胞周期阻滞于S期,S期比例升高($71.07\% \pm 3.27\%$ vs $47.85\% \pm 4.15\%$),差异具有统计学意义($F=43.688$, $P<0.001$)。迁移细胞数(118.556 ± 12.738 vs 192.222 ± 14.986)、侵袭细胞数(92.667 ± 3.000 vs 129.000 ± 9.042)均显著降低,差异具有统计学意义($t=6.487$ 、 6.606 , 均 $P<0.01$)。分子机制显示,FEN1敲低逆转EMT进程:E-cadherin蛋白和mRNA上调($t=-10.478$ 、 -4.235),N-cadherin、Vimentin、Cyclin D1、Bcl-2、MMP-9 mRNA和蛋白均下调($t=-20.825 \sim 33.396$),差异具有统计学意义(均 $P<0.05$)。结论 FEN1在LUAD中高表达且与不良预后相关,通过调控EMT通路促进LUAD细胞恶性表型。FEN1敲低抑制细胞增殖、迁移侵袭并促进凋亡,可作为LUAD预后评估的生物学标志物和潜在治疗靶点。

关键词: 瓣状核酸内切酶1; 肺腺癌; 路易斯肺癌细胞; 上皮-间充质转化; 细胞凋亡

中图分类号: R-332 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2026)02-174-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2026.02.029

TCGA-Based Analysis of FEN1 in Lung Adenocarcinoma and the Molecular Mechanism of FEN1 Knockdown Inhibiting the Growth of Lewis Lung Cancer Cells in Mice

SHEN Zhiyong^{1,2}, WANG Ling^{1,2}, ZHU Zheng'an^{1,2}, LIN Xiuhua³, FU Zhichao^{1,2}, CHEN Zhonghua^{1,2}

(1. Department of Radiotherapy, Fuzong School of Clinical Medicine College of Fujian Medical University, Fuzhou 350025, China; 2. Department of Radiotherapy, 900th Hospital of PLA Joint Logistic Support Force, Fuzhou 350025, China; 3. Respiratory Medicine, Mengchao Hepatobiliary Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350028, China)

Abstract: Objective To analyze the expression characteristics and prognostic value of Flap Endonuclease 1(FEN1) in lung adenocarcinoma based on The Cancer Genome Atlas (TCGA) database and elucidate the molecular mechanisms by which FEN1 regulates the biological behavior of lung cancer cells. **Methods** Transcriptomic data from 598 samples (539 lung adenocarcinoma tissues and 59 normal tissues) in the TCGA database were analyzed to evaluate the relationship between FEN1 expression and patient prognosis. Lewis lung carcinoma (LLC) cells with FEN1 knockdown were established and divided into LLC group, shRNA-NC group, and FEN1-shRNA group based on transfection status. Cell proliferation, apoptosis, cell cycle progression, migration and invasion abilities were detected using CCK-8 assay, flow cytometry and Transwell assay, respectively. The expression

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2023J011360)。

作者简介: 沈志勇(1981-),男,医学硕士,副主任医师,研究方向:肺癌的发病机制及肺癌的精准靶向治疗与放疗, E-mail: shlinxiu123@126.com。

通讯作者: 陈忠华(1970-),男,医学硕士,主任医师,研究方向:恶性肿瘤精准放疗, E-mail: zyczhonghua@163.com。

of epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers (E-cadherin, N-cadherin, Vimentin) and cell cycle protein Cyclin D1, Bcl-2 and MMP9 were measured by RT-qPCR and Western blot. **Results** FEN1 was highly expressed in lung adenocarcinoma tissues and significantly correlated with poor prognosis (Log-rank test, $Z=2.81$, $P=0.005$). A stable FEN1 knockdown cell lines were successfully constructed with a knockdown efficiency of 83.8%. Compared with LLC groups, the survival rates of FEN1-shRNA group at 24h and 48h decreased [(62.31 ± 2.84)% vs (100.00 ± 0.93)% and [(81.58 ± 2.35)% vs (100.00 ± 4.88)%], while the apoptosis rate increased to [(25.82 ± 0.30)% vs (3.19 ± 0.46)%], and the differences were statistically significant ($t=30.892$, 8.336, -70.889, all $P<0.001$). Cell cycle was arrested at S phase with the S phase proportion increased to [(71.07 ± 3.27)% vs (47.85 ± 4.15)%] ($F=43.688$, $P<0.001$). The number of migrated cells (118.556 ± 12.738 vs 192.222 ± 14.986) and invaded cells (92.667 ± 3.000 vs 129.000 ± 9.042) were significantly decreased, and the differences were statistically significant ($t=6.487$, 6.606, all $P<0.001$). Molecular mechanism analysis revealed that FEN1 knockdown reversed the EMT process: E-cadherin protein and mRNA were upregulated ($t=-10.478$, -4.235), while N-cadherin, Vimentin, Cyclin D1, Bcl-2, and MMP9 protein and mRNA were all downregulated ($t=-20.825$ ~33.396), and the differences were statistically significant (all $P<0.05$). **Conclusions** FEN1 is highly expressed in lung adenocarcinoma and associates with poor prognosis. FEN1 promotes the malignant phenotypes of lung cancer cells by regulating the EMT pathway. FEN1 knockdown inhibits cell proliferation, migration and invasion while promoting apoptosis, suggesting that FEN1 can serve as an important biomarker for prognostic assessment and a potential therapeutic target for lung adenocarcinoma.

Keywords: flap endonuclease 1; lung adenocarcinoma; Lewis lung cancer cells; epithelial-mesenchymal transition; apoptosis

肺癌是全球恶性肿瘤致死的首要原因,其中肺腺癌(lung adenocarcinoma, LUAD)作为非小细胞肺癌(NSCLC)最主要的病理类型,具有恶性程度高、预后不良等特点,晚期患者的5年生存率仍不足15%^[1-2],亟需发现新的治疗靶点和预后标志物。瓣状核酸内切酶1(flap endonuclease 1, FEN1)作为关键的DNA修复酶,在DNA复制过程中负责移除冈崎片段的RNA引物,对维持基因组稳定性具有重要作用^[3],近年来研究表明其在多种恶性肿瘤中异常表达并促进肿瘤进展。在肺癌中,FEN1高表达,抑制FEN1可显著抑制肺癌细胞增殖^[4]。但FEN1是否通过调节上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)这一恶性肿瘤侵袭转移的关键步骤,来影响LUAD进展尚不清楚。虽然已有研究发现FEN1可通过调控EMT进程促进肝癌等肿瘤的侵袭转移^[5],然而其在LUAD EMT调控中的具体作用机制仍未明确^[6]。因此,本研究基于癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库生物信息学分析系统评估FEN1在LUAD中的表达特征及其与患者预后的关系,构建FEN1稳定敲低的小鼠Lewis肺癌细胞(lewis lung cancer cells, LLC)模型,从细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭等维度评估FEN1对肺癌细胞恶性表型的影响,并通过检测EMT相关标志物的表达变化,阐明FEN1调控LUAD进展的分子机制,为LUAD的预后评估和靶向治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 TCGA数据库样本:从TCGA数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)获取LUAD转录组测序数据

及相应的临床随访信息,包括539例LUAD肿瘤组织样本和59例正常肺组织样本。所有数据均为公开共享资源,用于分析FEN1在LUAD中的表达模式及其与患者临床病理特征和预后的关系。

1.1.2 细胞系:小鼠LLC细胞(武汉普诺赛生物技术有限公司,货号:CL-0107)用于实验。细胞培养于10ml/dl胎牛血清(foetal bovine serum, FBS)的DMEM培养液中,37℃,5 ml/dl CO₂条件下培养。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 主要试剂:实时荧光定量PCR(RT-qPCR)相关试剂(北京全式金生物技术有限公司);FEN1敲低慢病毒及对照慢病毒(福州载基生物科技公司);细胞培养试剂[生工生物工程(上海)股份有限公司];抗FEN1、上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)、神经型钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、B细胞淋巴瘤/白血病-2基因(Bcl-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、细胞周期蛋白(Cyclin)D1及β-肌动蛋白(β-actin)兔单克隆抗体(成都正能生物技术公司);细胞计数试剂盒-8(CCK-8)细胞增殖检测试剂盒、Annexin V-APC/PI细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒(碧云天生物技术公司);ECL化学发光试剂(美国Pierce公司)。

1.2.2 主要仪器:QuantStudio 3实时荧光定量PCR仪(Applied Biosystems公司,美国);Mini Protean 3 Cell电泳槽和Trans-Blot转印槽(Bio-Rad公司,美国);SPECTRO Star酶标仪(BMG LABTECH公司,德国);流式细胞仪(BD公司,美国);JY92-IIDN超声细胞破碎仪(上海净信实业发展有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 生物信息学分析:从TCGA数据库获取539例

LUAD肿瘤组织和59例癌旁正常组织的转录组数据及临床信息。使用limma包筛选差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), 标准为 $|\log_2FC| \geq 1$ 且校正 $P < 0.05$ 。采用clusterProfiler包进行基因本体论(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析($P < 0.05, q < 0.2$)。DEGs导入STRING数据库(置信度 ≥ 0.4)构建蛋白互作网络(protein-protein interaction, PPI), 用Cytoscape软件cytoHubba插件Degree算法(节点连接度算法)筛选前20个核心基因。结合文献分析确定FEN1为目标基因。对502例有完整生存信息的LUAD患者, 使用survminer包确定FEN1最佳截断值, Kaplan-Meier法分析总生存期差异($P < 0.05$)。

1.3.2 细胞培养与转染: LLC细胞培养于含10g/dl胎牛血清的DMEM培养液, 置于37℃, 5ml/dl CO₂培养箱中培养, 细胞融合率达85%进行传代。用携带不同干扰序列的慢病毒感染LLC细胞, 通过筛选培养后获得shRNA-NC细胞株(转染对照慢病毒)及FEN1-shRNA株(转染FEN1-shRNA)。通过蛋白印迹(Western blot)和RT-qPCR实验验证敲低效率, 选择效果最佳的短发夹RNA(shRNA)序列用于后续实验。实验分为三组: LLC组、shRNA-NC组和FEN1-shRNA组。

1.3.3 CCK-8细胞增殖检测: 每孔按照2 000个细胞接种于96孔板内, 每组设6个复孔。分别培养24、48h后, 将原培养液更换成含有10g/dl CCK-8溶液的新鲜培养液, 37℃避光孵育2h。用酶标仪检测450nm处吸光度(A)值, 以空白对照调零。细胞存活率(%) = $(A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

1.3.4 流式细胞术检测细胞凋亡: 采用胰蛋白酶消化收集各组细胞, 1 200r/min离心5min, PBS洗涤两次后重悬细胞并计数。取细胞悬液(1×10^5 个细胞), 1 200 r/min离心5min弃去上清液, 加入500 μ l Annexin V结合缓冲液重悬细胞, 依次加入5 μ l Annexin V-APC试

剂和5 μ l PI试剂(50 μ g/ml), 轻柔涡旋混匀后室温避光孵育15~20min, 1h内完成流式细胞仪检测。

1.3.5 流式细胞术检测细胞周期: 采用胰蛋白酶消化各组细胞, 1 200r/min离心5min, PBS洗涤后重悬并计数。取细胞悬液(1×10^5 个细胞), 离心弃上清后加入PBS重悬, 缓慢加入预冷70ml/dl乙醇(-20℃保存)充分混匀, -20℃固定过夜。离心弃上清, PBS重悬细胞并室温静置15min。再次离心弃上清, 加入RNase A试剂重悬细胞, 37℃水浴30min。最后加入PI试剂(50 μ g/ml)充分混匀, 2~8℃避光孵育30min, 立即用流式细胞仪检测DNA含量分布, 分析各细胞周期比例。

1.3.6 Transwell迁移实验: 胰蛋白酶消化各组细胞, 无血清DMEM洗涤两次后计数, 以 1×10^5 个细胞、200 μ l的无血清培养液混匀后接种于Transwell上室中(孔径8 μ m, Corning公司), 下室加入600 μ l含10g/dl胎牛血清的DMEM培养液。37℃, 5ml/dl CO₂孵育24h后, 棉签擦除上室未迁移细胞, 4g/dl多聚甲醛固定下表面迁移细胞20min。PBS洗涤两次后0.5g/dl结晶紫染色15min, 风干。倒置显微镜随机选取5个视野计数迁移细胞数, 每组设3个重复孔, 实验重复3次。

1.3.7 Transwell侵袭实验: Matrigel基质胶1:8稀释于预冷无血清DMEM中, 100 μ l稀释胶液加入Transwell上室, 37℃孵育1h形成人工基底膜。后续步骤同迁移实验(1.3.6)。

1.3.8 RT-qPCR检测: 采用胰蛋白酶消化收集各组细胞, 使用RNA提取试剂盒提取总RNA, 分光光度计检测浓度和纯度。取1 μ g总RNA用反转录试剂盒合成cDNA。以cDNA为模板, 采用染料法荧光定量预混试剂盒在QuantStudio 3实时荧光定量PCR仪上进行RT-qPCR。以 β -actin为内参, 引物序列见表1。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对表达量, 每组设3个重复孔, 实验重复3次。

表1 PCR引物序列

引物名称	上游引物	下游引物	片段长度(bp)
Vimentin	5'-GCTTCTCTGGCACGTCTTGA-3'	5'-TGAGGTCAGGCTTGGAACG-3'	160
E-cadherin	5'-CGATTACGAGGGCAGTGGTT-3'	5'-TGTCCGCCAGCTTCTTGAAT-3'	125
MMP9	5'-ATGTCACCTTCCCTTACCTTC-3'	5'-TGCCGTCCTATCGTAGTCA-3'	113
Cyclin D1	5'-GACACCAATCTCCTCAACGA-3'	5'-GGAAGCGGTCCAGGTAGTTC-3'	211
N-cadherin	5'-CTCCAACGGGCATCTTCATTAT-3'	5'-CAAGTGAAACCGGGTATCAG-3'	92
Bcl-2	5'-AGCCTGAGAGCAACCAATG	5'-GACGGTAGCGACGAGAGAAG-3'	165
FEN1	5'-AGCTGCCATCCAAGAGTTC	5'-CAGTAGTCGCTACCCAGCAG-3'	103
β -actin	5'-TGTCCACCTCCAGCAGATGT	5'-AGCTCAGTAACAGTCCGCCTAG-3'	101

1.3.9 Western blot检测: 收集各组细胞, RIPA裂解液提取蛋白, 4℃超声裂解后离心取上清。BCA法测定蛋白浓度, 所有样品(30 μ g/泳道)进行10g/dl十二

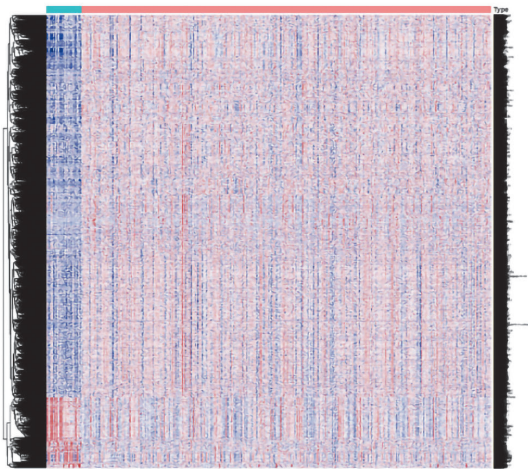
烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 转移至PVDF膜。5g/dl脱脂奶粉封闭后, 分别与一抗4℃孵育过夜(稀释比例1:800~1:2 000)、二抗室温孵

育1h。ECL发光检测,Image J软件分析条带灰度值,以β-actin为内参计算相对表达量。

1.4 统计学分析 采用SPSS 19.0和R软件进行统计分析。定量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析后行LSD法两两比较,两组间比较采用*t*检验,非正态分布数据采用非参数检验。生存分析采用Kaplan-Meier法和Log-rank检验。多重比较采用Benjamini-Hochberg法校正。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

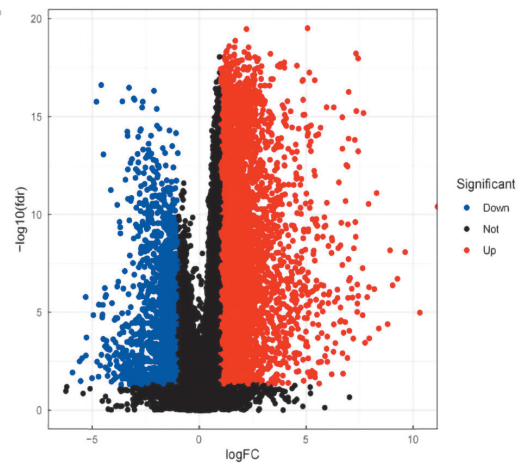
2.1 生物信息学分析FEN1基因在TCGA数据库



TCGA中LUAD基因表达热图

LUAD中的表达水平及对临床预后影响

2.1.1 LUAD DEGs筛选及其生物学功能分析:见图1。从TCGA数据库获取539例LUAD和59例正常肺组织的转录组数据,经标准化和批次效应校正后,利用“limma”R包进行差异表达分析,共筛选出8959个DEGs,其中上调7569个,下调1390个,并用热图和火山图展示。临床随访资料完整的502例LUAD样本用于生存及预后分析。DEGs的GO和KEGG富集分析显示,这些基因主要涉及核分裂、染色体分离、细胞周期、DNA复制、细胞因子-受体相互作用等生物过程和信号通路(校正后 $P < 0.05$)。



TCGA中LUAD基因表达火山图

图1 TCGA中LUAD差异基因表达筛选

2.1.2 DEGs的PPI网络分析结果:见图2。通过STRING数据库对上述鉴定出的DEGs进行PPI分析,通过Cytoscape软件的CytoHubba插件(v0.1)并基于Degree算法,对PPI网络中的关键枢纽基因进行排名,并筛选出连接度排名前20位的基因,依次为:UHRF1、FEN1、CDC25A、KIF15、EZH2、TK1、CLSPN、E2F8、PKMYT1、PDGFRB、ANGPT2、CLDN5、DNA2、SPC25、UBE2T、ANGPT1、DCN、CRP、CAV1和RBBP8,提示这些枢纽基因可能在LUAD发病机制中发挥重要调控作用。

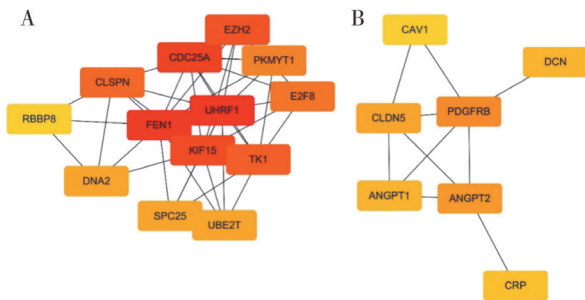


图2 DEGs蛋白质相互作用网络分析及中心基因筛选

2.1.3 FEN1表达水平与LUAD患者预后的关系:见

图3。基于502例具备完整临床随访信息的LUAD患者,采用最大分层对数秩统计量(maximally selected log-rank statistics)方法确定FEN1基因表达水平的最佳截断值,将患者分为高表达组($n=127$)和低中表达组($n=375$)。Kaplan-Meier生存分析显示,高表达组患者的总体生存时间(1190天)显著短于低中表达组(1618天),差异具有统计学意义(Log-rank检验, $Z=2.81, P=0.005$),提示FEN1高表达可能与LUAD的不良预后密切相关。

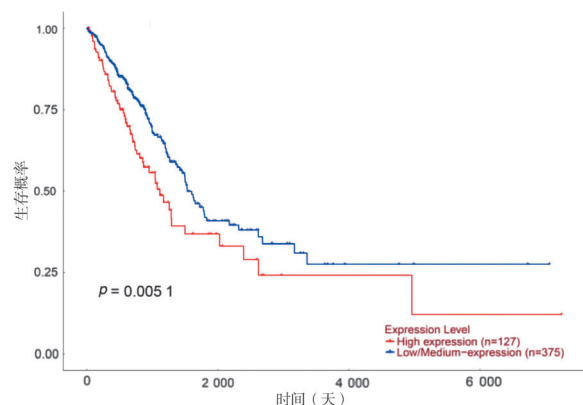


图3 FEN1表达水平对肺腺癌患者生存的影响

2.2 FEN1敲低效果验证 见表2。Western blot和RT-qPCR检测结果显示:不同处理组间FEN1 mRNA和蛋白表达水平差异具有统计学意义(均 $P<0.001$)。与LLC组、shRNA-NC组相比,shRNA 1组FEN1 mRNA表达水平显著降低,敲低效率约为83.8%;shRNA 3组FEN1 mRNA表达也有所下降,而shRNA

2组FEN1 mRNA表达水平与对照组相比无明显变化。蛋白水平检测结果与mRNA趋势基本一致,综合mRNA和蛋白检测结果,shRNA 1组对FEN1具有最佳的敲低效果,因此选择shRNA 1组用于后续实验。实验分为三组:LLC组、shRNA-NC组、FEN1-shRNA组。

表2 Western blot和RT-qPCR验证LLC细胞中FEN1的敲低效果($n=3, \bar{x} \pm s$)

项目	LLC组	shRNA-NC组	shRNA 1组	shRNA 2组	shRNA 3组	F	P
FEN1 mRNA	1.003 ± 0.097	0.959 ± 0.078	0.163 ± 0.099	1.100 ± 0.012	0.615 ± 0.011	87.047	<0.001
FEN1 蛋白	1.101 ± 1.079	1.159 ± 1.137	0.473 ± 0.432	0.989 ± 0.877	0.893 ± 0.950	87.897	<0.001

2.3 FEN1敲低对LLC细胞存活率的影响 见表3。CCK-8检测结果显示,在细胞培养24、48h时,各组间细胞存活率差异具有统计学意义($F=759.87, 38.17, 均P<0.001$)。进一步的多重比较分析显示,与LLC组和shRNA-NC组相比,FEN1-shRNA组的细胞存活率在24、48h时显著降低,差异具有统计学意义($t_{24h}=30.892、28.797; t_{48h}=8.336、8.340, 均P<0.001$)。结果表明FEN1敲低能够显著抑制LLC细胞的存活率。

与LLC组、shRNA-NC组相比,FEN1-shRNA组凋亡率显著升高,差异具有统计学意义($t=-70.889、-79.657, 均P<0.001$)。同时,细胞周期分布发生显著改变:G1期比例明显降低,S期比例显著升高,G2期比例显著下降。结果表明FEN1敲低能够促进LLC细胞凋亡并阻滞细胞周期进程于S期。

2.4 FEN1敲低对LLC细胞凋亡和细胞周期的影响 见表4。Annexin V-APC/PI双染检测显示,各组间细胞凋亡率及细胞周期各时相比例,差异具有统

表3 FEN1敲低对LLC细胞存活率的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	存活率(%)	
	24h	48h
LLC组	100.00±0.93	100.00±4.88
shRNA-NC组	100.31±1.54	102.39±5.64
FEN1-shRNA组	62.31±2.84	81.58±2.35

表4 各组细胞凋亡率和细胞周期占比 [$n=3, \bar{x} \pm s, \%$]

项目	LLC组	shRNA-NC组	FEN1-shRNA组	F	P
凋亡率	3.19±0.46	3.63±0.38	25.82±0.30	3 365.477	<0.001
G1期	39.54±1.74	34.95±0.57	17.14±0.73	323.756	<0.001
S期	47.85±4.15	56.46±0.71	71.07±3.27	43.688	<0.001
G2期	8.20±1.65	5.25±1.06	3.10±1.78	8.417	<0.05

2.5 FEN1敲低对LLC细胞迁移和侵袭的影响 见表5。Transwell实验结果显示,FEN1-shRNA组的迁移细胞数显著低于LLC组和shRNA-NC组($t=6.487、8.885, 均P<0.001$);同样,FEN1-shRNA组的侵袭细

胞数亦显著低于LLC组和shRNA-NC组,差异具有统计学意义($t=6.606、8.764, 均P<0.01$)。结果表明,敲低FEN1可显著抑制LLC细胞的迁移和侵袭能力。

表5 FEN1敲低对LLC细胞迁移和侵袭的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

项目	LLC组	shRNA-NC组	FEN1-shRNA组	F	P
迁移	192.222±14.986	200.444±9.623	118.556±12.738	38.17	<0.001
侵袭	129.000±9.042	135.333±7.881	92.667±3.000	31.21	<0.01

2.6 FEN1敲低对EMT相关蛋白及其他关键分子表达的影响 见表6。Western blot和RT-qPCR检测显示,FEN1敲低显著改变EMT相关分子表达。与LLC组、ShRNA-NC组相比,FEN1-shRNA组上皮标志物E-cadherin在蛋白和mRNA水平均显著上调($t_{蛋白}=-10.478、-10.303, t_{mRNA}=-4.235、-3.380, 均P<0.05$),

而间质标志物Vimentin和N-cadherin显著下调($t_{蛋白}=-20.825、-17.514; 2.945、3.216, t_{mRNA}=33.396、11.773; 5.715、3.786, 均P<0.05$)。同时,Bcl-2、MMP9和Cyclin D1在蛋白和mRNA水平均显著降低($t_{蛋白}=7.602、6.567; 10.375、13.738; 6.623、7.746, t_{mRNA}=6.062、3.286; 22.485、9.565; 12.699、6.233, 均P<0.05$)。结果表明

FEN1敲低能够逆转EMT进程,抑制细胞增殖、侵袭并促进凋亡。

3 讨论

本研究围绕FEN1在LUAD中的表达特征、预后相关性及细胞学功能进行了系统评价。生物信息学分析提示FEN1在LUAD组织中显著高表达,并位于差异基因PPI网络的关键枢纽位点;临床随访数据表

明,高FEN1表达与总体生存劣化显著相关。体外实验证实,FEN1敲低显著抑制LLC细胞的存活、迁移与侵袭,诱导凋亡并阻滞细胞周期进程于S期。机制层面,FEN1下调伴随EMT逆转(Vimentin,N-cadherin下降,E-cadherin上调)、Bcl-2降低,MMP9与Cyclin D1表达减少,提示其通过共同调控增殖-凋亡轴与侵袭-转移相关通路发挥促癌作用。

表6 EMT相关蛋白及关键分子蛋白/mRNA表达比较 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

项目	LLC组	shRNA-NC组	FEN1-shRNA组	F	P	
Vimentin	蛋白	0.61±0.05	0.57±0.05	0.02±0.01	189.25	<0.001
	mRNA	1.04±0.39	1.34±0.55	0.32±0.16	5.477	<0.05
E-cadherin	蛋白	0.03±0.02	0.04±0.02	0.25±0.03	92.34	<0.001
	mRNA	1.046±0.36	1.48±0.36	2.95±0.70	12.411	<0.01
N-cadherin	蛋白	0.62±0.01	0.58±0.05	0.22±0.02	150.01	<0.001
	mRNA	1.00±0.07	1.01±0.15	0.62±0.10	12.411	<0.01
Bcl-2	蛋白	0.50±0.04	0.55±0.06	0.32±0.02	25.62	<0.01
	mRNA	1.00±0.02	1.06±0.16	0.73±0.08	9.138	<0.05
MMP9	蛋白	0.50±0.04	0.52±0.03	0.23±0.02	77.692	<0.001
	mRNA	1.00±0.02	1.04±0.10	0.43±0.04	82.592	<0.001
Cyclin D1	蛋白	0.69±0.07	0.66±0.06	0.40±0.01	25.548	<0.01
	mRNA	1.00±0.03	1.01±0.16	0.39±0.08	37.150	<0.001

FEN1作为DNA复制与碱基切除修复关键核酸内切酶^[7],常在高压复制压力的肿瘤中上调,被报道与乳腺癌^[8]、肝癌^[5]、肺癌^[9]、脑肿瘤^[10]等不良结局相关。本研究在TCGA-LUAD中观察到FEN1显著上调,且高表达患者的生存显著缩短,与既往文献中FEN1在NSCLC提示高危分层的结论相一致^[3]。研究表明在NSCLC癌组织中证实FEN1高表达与肿瘤分期、淋巴结转移及较差生存显著相关^[11],支持我们在LUAD中观察到的“高表达-差预后”关联。

肺癌预后评估中,多种分子标志物发挥重要作用。马彦娥等^[12]研究发现,CD73高表达为NSCLC患者预后不良的独立危险因素,其1年累积生存率为58.82%,明显低于低表达组(92.31%)。这与本研究中FEN1高表达导致不良预后的结果具有相似性,进一步印证了分子标志物在肺癌预后评估中的重要价值。结合既往磷酸化53(p53)、表皮生长因子受体(EGFR)、kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(KRAS)等基因的研究,FEN1作为DNA修复关键酶为这一复杂的分子网络增添了重要组成部分。

肿瘤细胞的异常增殖与凋亡抵抗是癌症发生发

展的基础特征^[13]。Cyclin D1作为G1期关键调控因子,驱动G1期细胞向S期过渡^[14]。抗凋亡蛋白Bcl-2通过抑制线粒体途径阻碍程序性死亡^[15]。本研究发现敲低FEN1显著抑制LLC细胞的增殖与存活,诱导细胞凋亡,导致细胞周期在S期阻滞,并降低细胞迁移与侵袭能力,与ZHENG等^[7]关于抑制FEN1会干扰S期进程并触发损伤应答的报道一致。

EMT是肿瘤侵袭与转移的关键步骤^[16]。在EMT进程中,上皮细胞标记物E-cadherin下调,而间质细胞标记物Vimentin和N-cadherin上调^[17-19]。MMP9与癌细胞的侵袭、迁移密切相关^[20-21]。本研究发现,FEN1下调伴随EMT相关标志物反向调控(E-cadherin上调,N-cadherin与Vimentin下调),以及凋亡(Bcl-2)、侵袭(MMP9)与细胞周期相关蛋白的广泛改变,提示FEN1可能通过多层通路共同驱动LUAD的恶性表型。既往报道显示,敲低FEN1可阻断SMMC-7721细胞的EMT进程并减弱其侵袭能力^[5]。WANG等^[22, 11]研究表明“FEN1低表达抑癌细胞行为”,这与本研究中LLC细胞敲低FEN1后EMT逆转与MMP9下降的现象一致。多癌种证据显示FEN1在乳腺癌等肿瘤中

过度表达并与预后不良相关^[8],为我们在LUAD中的发现提供跨癌种支持。

尽管本研究整合了大样本生物信息学与体外实验以支持FEN1在LUAD中的作用,但仍存在若干局限。首先,功能实验采用小鼠来源的LLC细胞系,跨物种差异可能影响结论外推至人源LUAD细胞。其次,机制探索深度有限,未直接检测DNA损伤与复制应激的关键标志及检查点轴的活化状态。后续将在更多人源与体内模型中复现实验,并以多组学证据加深机制阐释。

参考文献:

- [1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA-A Cancer Journal for Clinicians*, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] HERBST R S, MORGENZTERN D, BOSHOFF C. The biology and management of non-small cell lung cancer [J]. *Nature*, 2018, 553(7689): 446-454.
- [3] YANG F, HU Z G, GUO Z G. Small-molecule inhibitors targeting FEN1 for cancer therapy[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(7): 1007.
- [4] HE L F, LUO L B, ZHU H, et al. FEN1 promotes tumor progression and confers cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer[J]. *Molecular Oncology*. 2017, 11(6):640-654.
- [5] 李传飞. TGF β 1-miR140-5p轴调控FEN1对肝癌上皮间质转化的作用及机制研究[D]. 重庆医科大学, 2020.
LI C F. TGF- β 1-miR140-5p axis-mediated up-regulation of flap endonuclease 1 promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma[D]. Chongqing Medical University, 2020.
- [6] HANAHAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.
- [7] ZHENG L, JIA J, FINGER L D, et al. Functional regulation of FEN1 nuclease and its link to cancer[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(3): 781-794.
- [8] SINGH P, YANG M, DAI H F, et al. Overexpression and hypomethylation of flap endonuclease 1 gene in breast and other cancers[J]. *Molecular Cancer Research*, 2008, 6(11): 1710-1717.
- [9] 李倩, 金凤, 何佳慧, 等. 肺鳞状细胞癌组织中Flap-核酸内切酶1和复制因子C2的表达及临床意义[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2023, 39(6): 655-660.
LI Q, JIN F, HE J H, et al. Expression and clinical significance of FEN1 and RFC2 in lung squamous cell carcinoma[J]. *Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2023, 39(6): 655-660.
- [10] NIKOLOVA T, CHRISTMANN M, KAINA B. FEN1 is overexpressed in testicular, lung and brain tumors[J]. *Anticancer Research*, 2009, 29(7):2453-2459.
- [11] ZHANG K Q, KEYMEULEN S, NELSON R, et al. Overexpression of flap endonuclease 1 correlates with enhanced proliferation and poor prognosis of non-small-cell lung cancer[J]. *The American Journal of Pathology*, 2018, 188(1):242-251.
- [12] 马彦娥, 苏虎艳, 王倩如, 等. 非小细胞肺癌组织中miR-30a和CD73的表达水平与预后相关性分析[J]. *现代检验医学杂志*, 2022, 37(3): 73-78.
MA Y E, SU H Y, WANG Q R, et al. Expression levels and prognostic correlation of miR-30a and CD73 in non-small cell lung cancer tissues[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2022, 37(3): 73-78.
- [13] HANAHAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.
- [14] ZHENG C L, XIAO Y, LI Y Q, et al. Knockdown of long noncoding RNA PVT1 inhibits the proliferation of Raji cells through cell cycle regulation[J]. *Oncol Letters*, 2019, 18(2): 1225-1234.
- [15] ASHKENAZI A, FAIRBROTHER W J, LEVERSON J D, et al. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2017, 16(4):273-284.
- [16] FEDELE M, SGARRA R, BATTISTA S, et al. The epithelial-mesenchymal transition at the crossroads between metabolism and tumor progression[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(2): 800.
- [17] SARI E, OZTAY F, TASCI A E. Vitamin D modulates E-cadherin turnover by regulating TGF- β and Wnt signalings during EMT-mediated myofibroblast differentiation in A459 cells[J]. *the Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2020, 202:105723.
- [18] 柏希慧, 刘诗雨, 孙媛媛. 拉罗替尼通过AMPK/mTOR信号通路调控结肠癌细胞自噬和抑制增殖与迁移的实验研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2024, 39(6): 29-36.
BAI X H, LIU S Y, SUN Y Y. Experimental study of larotrectinib regulating autophagy and inhibiting proliferation and migration of colon cancer cells through AMPK/mTOR signaling pathway[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2024, 39(6): 29-36.
- [19] HOSSEINI F, AHMADI A, HASSANZADE H, et al. Inhibition of melanoma cell migration and invasion by natural coumarin auraptene through regulating EMT markers and reducing MMP-2 and MMP-9 activity[J]. *European Journal of Pharmacology*. 2024, 971: 176517.
- [20] XIA Q X, DU Z P, CHEN M T, et al. A protein complex of LCN2, LOXL2 and MMP9 facilitates tumour metastasis in oesophageal cancer [J]. *Molecular Oncology*, 2023, 17(11): 2451-2471.
- [21] RASHID Z A, BARDAWEEL S K. Novel matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) inhibitors in cancer treatment [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(15):12133.
- [22] WANG S M, WANG X J, SUN J, et al. Down-regulation of DNA key protein-FEN1 inhibits OSCC growth by affecting immunosuppressive phenotypes via IFN- γ /JAK/STAT-1[J]. *International Journal of Oral Science* Volume, 2023,15(1):17.

收稿日期: 2025-07-14

修回日期: 2025-09-04