

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.03.011

miR-199a-3p 负调控 CBX7 影响肺癌细胞 NCI-H460 的生物学行为研究*

孙党泽¹ 丁超^{1Δ} 朱昌生¹ 张潍² 刘士源² 马震川² 李宇²

(1 西安市胸科医院胸外科 陕西 西安 710100; 2 西安交通大学第二附属医院胸外科 陕西 西安 710004)

摘要 目的:探讨 miR-199a-3p 负调控 CBX7 影响肺癌细胞 NCI-H460 的生物学行为。方法:qRT-PCR 法检测并比较肺癌组织、癌旁正常组织、肺癌细胞、正常肺上皮细胞中的 miR-199a-3p mRNA 相对表达量。比较远处转移肺癌组织、未转移肺癌组织中 miR-199a-3p mRNA 相对表达量。qRT-PCR 法、Western Blot 法检测并比较肺癌组织、癌旁正常组织中的 CBX7 mRNA 及蛋白的表达水平。荧光素酶活性法检测 miR-199a-3p 与靶基因 CBX7 的结合。比较 miR-199a-3p 模拟物转染组与阴性对照组的肺癌细胞中的 CBX7 mRNA 相对表达量及 CBX7 蛋白表达水平。CCK8 实验检测 miR-199a-3p 对肺癌细胞增殖的促进作用。Tranwell 实验检测 miR-199a-3p 对肺癌细胞侵袭与迁移能力的影响。结果:肺癌组织中 miR-199a-3p 明显高于癌旁正常组织,发生远处转移的肺癌组织中 miR-199a-3p mRNA 的表达量明显高于未发生转移的肺癌组织,差异有统计学意义 ($P<0.001$)。肺癌组织中 CBX7 mRNA、CBX7 蛋白表达水平均明显低于癌旁正常组织,差异有统计学意义 ($P<0.001$)。荧光素酶活性法证实 miR-199a-3p 可与靶基因 CBX7 结合抑制 CBX7 的表达。肺癌细胞中 miR-199a-3p mRNA 的相对表达量明显高于正常肺上皮细胞,CBX7 mRNA 相对表达量明显低于正常肺上皮细胞 ($P<0.05$)。对于肺癌细胞,miR-199a-3p 模拟物转染组的 CBX7 mRNA 相对表达量及 CBX7 蛋白表达水平均明显低于阴性对照组 ($P<0.001$)。CCK8 实验证实 miR-199a-3p 能够促进肺癌细胞的增殖,Tranwell 实验证实 miR-199a-3p 对肺癌细胞侵袭与迁移具有积极的促进作用。结论:miR-199a-3p 在肺癌的发生发展过程中发挥重要作用,能够通过抑制 CBX7 基因的表达,促进肺癌细胞的增殖、侵袭和转移。

关键词: 肺癌;微小 RNA;miR-199a-3p;CBX7**中图分类号:** R-33;R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2020)03-455-05

Investigate the Effect of miR-199a-3p on the Biological Behavior of NCI-H460 Lung Cancer Cells by Negatively Regulating CBX7*

SUN Dang-ze¹, DING Chao^{1Δ}, ZHU Chang-sheng¹, ZHANG Wei², LIU Shi-yuan², MA Zhen-chuan², LI Yu²

(1 Department of thoracic surgery, Xi'an Chest Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710100, China;

2 Department of thoracic surgery, The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710004, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of miR-199a-3p on the biological behavior of NCI-H460 lung cancer cells by negatively regulating CBX7. **Methods:** The relative expressions of miR-199a-3p mRNA in lung cancer tissues, adjacent normal tissues, lung cancer cells and normal lung epithelial cells were detected and compared by qRT-PCR. The relative expression levels of miR-199a-3p mRNA in distant metastatic lung cancer tissues and non-metastatic lung cancer tissues were compared. The expression levels of CBX7 mRNA and protein in lung cancer tissues and adjacent normal tissues were detected by qRT-PCR and Western Blot. The binding of miR-199a-3p to target gene CBX7 was detected by luciferase activity. CBX7 mRNA expression levels and CBX7 protein expression levels in lung cancer cells transfected with miR-199a-3p mimics and the negative control group were compared. CCK8 assay detected the promoting effect of miR-199a-3p on the proliferation of lung cancer cells. Tranwell assay examined the effect of miR-199a-3p on invasion and migration of lung cancer cells. **Results:** miR-199a-3p in lung cancer tissues was significantly higher than that in adjacent normal tissues, and the expression level of miR-199a-3p mRNA in lung cancer tissues with distant metastasis was significantly higher than that in lung cancer tissues without metastasis, the difference was statistically significant ($P<0.001$). The expression levels of CBX7 mRNA and CBX7 protein in lung cancer tissues were significantly lower than those in adjacent normal tissues ($P<0.001$). Luciferase activity confirmed that miR-199a-3p could bind to target gene CBX7 and inhibit the expression of CBX7. The relative expression level of miR-199a-3p mRNA in lung cancer cells was significantly higher than that in normal lung epithelial cells, and the relative expression level of CBX7 mRNA was significantly lower than that in normal lung epithelial cells ($P<0.05$). For lung cancer cells, the relative mRNA expression level and CBX7 protein expression level of miR-199a-3p mimics transfected group were significantly lower than those of the negative control group ($P<0.001$). CCK8 assay confirmed that miR-199a-3p could promote the proliferation of lung cancer cells, and

* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81602023)

作者简介:孙党泽(1992-),男,本科、硕士研究生,主要研究方向:胸部恶性肿瘤发病机制,E-mail: sundangze_xb@yeah.net

Δ 通讯作者:丁超(1979-),男,副主任医师,主要研究方向:胸部恶性肿瘤发病机制

(收稿日期:2019-06-24 接受日期:2019-07-18)

Tranwell assay confirmed that miR-199a-3p had a positive promoting effect on the invasion and migration of lung cancer cells. **Conclusions:** miR-199a-3p plays an important role in the occurrence and development of lung cancer, and can promote the proliferation, invasion and metastasis of lung cancer cells by inhibiting the expression of CBX7 gene.

Key words: Lung cancer; miRNA; miR-199a-3p; CBX7

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)03-455-05

前言

肺癌的发生发展过程为多基因、多阶段形成的复杂病变过程,多种 miRNA 参与其中^[1]。miR-199a-5p 被证实在肝癌、胃癌、卵巢癌中存在过表达的现象,近年来其与肺癌的相关性研究也日益受到关注^[2]。CBX7 与多种肿瘤的发生发展存在密切的关系,其表达水平明显低于正常组织^[3]。本研究发现 miR-199a-5p 与 CBX7 存在结合位点,提示 miR-199a-5p 可能通过与 CBX7 上特异性位点相结合,调控肺癌的发生发展。

1 材料与方法

1.1 标本来源及主要试剂

肺病理组织标本:为 2015 年 10 月至 2017 年 10 月本院收治的接受手术治疗的 60 例肺癌患者,其中男 35 例,女 25 例;年龄 41-75 岁,平均(62.5±17.1)岁。均未接受化疗或放疗。60 例肺癌患者中,发生远处转移 35 例。每个病例术中分别取肺癌组织及癌旁正常组织标本,-80℃冰箱保存。

细胞株:肺癌细胞株 NCI-H60、正常人肺支气管上皮细胞株 BEAS-2B 均购于美国模式菌种收集中心(ATCC)。

主要试剂:Trizol 试剂盒、反转录试剂盒、qRT-PCR 检测试剂盒均购于美国 Invitrogen 公司。Western Blot 检测试剂盒购于日本 Takara 公司。荧光素酶检测试剂盒购于深圳华大基因。CCK8 试剂盒、购于美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及传代 将肺癌细胞株 NCI-H60、正常人肺支气管上皮细胞株 BEAS-2B 放入培养箱中(37℃)融化,加入 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清)中培养,当细胞融合 85%时开始传代。分别经磷酸盐缓冲液冲洗、胰蛋白酶消化后,置于培养箱(37℃,2 min),细胞突起消失可终止消化,经 1000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入培养液,吹打为单细胞悬液,计数,继续培养。

1.2.2 转染 NCI-H60 用 DMEM 完全培养基培养(10%胎牛血清)。转染前 1 d,用 0.25%胰酶消化生长状态良好的 NCI-H60,计数后加入 6 孔板,每孔加入 2 mL 的 DMEM 完全培养基,置于培养箱中培养(37℃、5% CO₂);细胞密度 70%时进行分组。分别滴入 miR-199a-3p 模拟物、miR-199a-3p 模拟物 + CBX7。加入聚凝胺,混匀,37℃、5% CO₂ 的培养箱中继续培养,8 h 后更换新鲜培养基。5-7 d 后,经 RT-PCR 法筛选高表达转染物的细胞。

1.2.3 qRT-PCR 检测 miR-199a-3p、CBX7 mRNA 的相对表达量 按照 Trizol 试剂盒说明书进行 RNA 的提取,按反转录试剂盒说明书中步骤进行 cDNA 的合成。按照 qRT-PCR 试剂盒说明书进行 PCR 反应,每个样本重复 3 次。检测肺癌组织、癌旁正

常组织、肺癌细胞 NCI-H460、正常肺上皮细胞 BEAS-2B 中 miR-199a-3p、CBX7 mRNA 的相对表达量。

1.2.4 Western Blot 法检测 CBX7 蛋白表达水平 采用 Western Blot 法检测肺癌组织、癌旁正常组织、肺癌细胞 NCI-H460 (转染 48 h 后)中 CBX7 蛋白表达水平。将组织和细胞中提取出的蛋白加入 SDS-PAGE 孔槽中,转膜,脱脂,1 抗孵育,荧光现象,检测蛋白条带灰度值。

1.2.5 荧光素酶报告基因法 预测 miR-199a-3p 与 CBX7 的可能结合位点,构建 CBX7 野生型和突变型质粒。将 miR-199a-3p 模拟物分别与 CBX7 野生型、CBX7 突变型质粒共转染肺癌细胞 NCI-H460,24 小时后去除培养基,磷酸盐缓冲液冲洗,被动裂解液裂解,经超级酶标仪检测和分析相对荧光素酶活性。

1.2.6 CCK8 法 应用 CCK8 法检测肺癌细胞增殖情况。分别将 miR-199a-3p 模拟物、miR-199a-3p 模拟物 + CBX7 转染肺癌细胞 NCI-H460。单细胞悬液进行接种,培养,加入 CCK8 溶液后继续孵育,终止培养后,采用酶标仪检测 495 nm 波长处的吸光值(OD)。并与阴性对照组比较。

1.2.7 Tranwell 实验 应用 Tranwell 实验检测 miR-199a-3p 对肺癌细胞侵袭与迁移能力。分别将 miR-199a-3p 模拟物、miR-199a-3p 模拟物 + CBX7 转染肺癌细胞 NCI-H460。应用无血清培养基包被 Tranwell 小室底部膜的上室面,风干、培育。制备细胞悬液,调整细胞密度,加入 Tranwell 小室,加入含胎牛血清的培养基,常规培养 12 h,接种细胞,1 h 后进行伊红染色(0.1%)。高倍视野下观察并计算各组肺癌细胞穿过 Tranwell 小室基底膜的细胞数。

1.3 统计学分析

实验数据应用 SPSS 22.0 软件分析,计量资料用表示,两样本均数比较采用独立样本 t 检验。计数资料用率表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺癌组织中 miR-199a-3p 的表达

qRT-PCR 检测结果显示,肺癌组织中 miR-199a-3p 明显高于癌旁正常组织,差异有统计学意义($P < 0.001$)。发生远处转移的肺癌组织中 miR-199a-3p mRNA 的表达量明显高于未发生转移的肺癌组织,差异有统计学意义($P < 0.001$)。见表 1。

2.2 肺癌组织中 CBX7 的表达

肺癌组织中 CBX7 mRNA 的相对表达量、western blot 条带灰度值均明显低于癌旁正常组织,差异有统计学意义($P < 0.001$)。见表 2,图 1。

2.3 荧光素酶活性检测结果

对于 CBX7 野生型报告基因质粒,miR-199a-3p 模拟物转

染组的荧光素酶活性明显低于阴性对照组,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。对于 CBX7 突变型报告基因质粒,两组的荧光素酶活性无明显统计学差异 ($P>0.05$)。见表 3。

表 1 肺癌组织、癌旁正常组织中 miR-199a-3p 的表达($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Expression of miR-199a-3p in lung cancer tissues and adjacent normal tissues($\bar{x} \pm s$)

Groups	Amount(n)	Relative expression of miR-199a-3p mRNA
Normal tissues adjacent to cancer	60	1.00± 0.02
Lung cancer tissues	60	1.53± 0.14
Distant metastasis	35	1.65± 0.20
Without metastasis	25	1.34± 0.12
Lung cancer tissues vs Adjacent normal tissues <i>t/P</i>	-	23.124/<0.001
Distant metastasis vs Without metastasis <i>t/P</i>	-	6.903/<0.001

表 2 肺癌组织、癌旁正常组织中 CBX7 的表达($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Expression of CBX7 in lung cancer tissues and adjacent normal tissues($\bar{x} \pm s$)

Groups	Amount(n)	Relative expression of CBX7	
		mRNA	Straps gray-scale value of CBX7 WB
Normal tissues adjacent to cancer	60	1.00± 0.05	0.85± 0.16
Lung cancer tissues	60	0.47± 0.07	0.21± 0.06
<i>t/P</i>	-	22.301/<0.001	29.665/<0.001

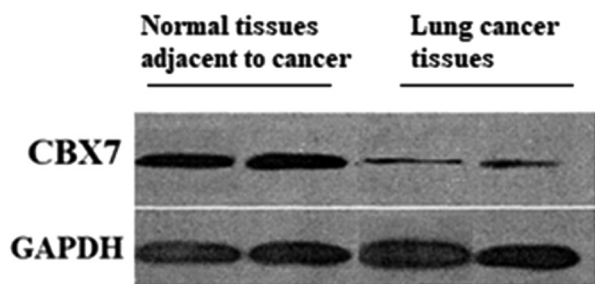


图 1 Western blot 检测 CBX7 蛋白在癌旁正常组织及肺癌组织中的表达
Fig.1 The expression of CBX7 protein in normal tissues and lung cancer tissues was detected by Western blot

2.4 肺癌细胞 NCI-H460、正常肺上皮细胞 BEAS-2B 中 miR-199a-3p、CBX7 的表达

由表 4 可见,肺癌细胞 NCI-H460 的 miR-199a-3p mRNA 相对表达量明显高于正常肺上皮细胞 BEAS-2B,而 CBX7 mRNA 相对表达量明显低于正常肺上皮细胞 BEAS-2B,差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。对于肺癌细胞 NCI-H460,miR-199a-3p 模拟物转染组的 CBX7 mRNA 相对表达量及 CBX7 WB 条带灰度值均明显低于阴性对照组,差异均有统计学意义 ($P<0.001$)。见表 5,图 2。

表 3 各组荧光素酶活性检测结果($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Results of luciferase activity in each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	Amount(n)	Luciferase activity
CBX7 Wild Reporter Gene Plasmid		
miR-199a-3p mimics transfected group	3	21.36± 2.35
Negative control group	3	29.45± 3.06
<i>t/P</i>	-	4.321/0.012
CBX7 Mutant Reporter Gene Plasmid		
miR-199a-3p mimics transfected group	3	32.33± 2.11
Negative control group	3	32.14± 3.14
<i>t/P</i>	-	0.054/0.960

2.5 CCK8 实验检测 miR-199a-3p 对肺癌细胞增殖的促进作用

miR-199a-3p 模拟物转染组的 OD 值明显高于阴性对照组,差异有统计学意义 ($P<0.001$)。miR-199a-3p 模拟物 + CBX7 转染组的 OD 值明显低于阴性对照组及 miR-199a-3p 模拟物

转染组,差异均有统计学意义 ($P<0.001$)。见表 6。

2.6 Tranwell 实验检测 miR-199a-3p 对肺癌细胞侵袭与迁移能力的影响

在侵袭和迁移实验中,每个高倍视野下 miR-199a-3p 模拟

物转染组肺癌细胞穿过 Tranwell 小室基底膜的细胞数均明显高于阴性对照组, 每个高倍视野下 miR-199a-3p 模拟物 + CBX7 转染组肺癌细胞穿过 Tranwell 小室基底膜的细胞数均

明显低于 miR-199a-3p 模拟物转染组和阴性对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.001$)。见表 7。

表 4 肺癌细胞与正常肺上皮细胞中 miR-199a-3p、CBX7 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 The relative expression levels of miR-199a-3p and CBX7 mRNA in lung cancer cells and normal lung epithelial cells were compared ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Amount(n)	Relative expression of miR-199a-3p mRNA	Relative expression of CBX7 mRNA
BEAS-2B	3	1.00± 0.02	1.00± 0.03
NCI-H460	3	1.54± 0.12	0.71± 0.11
<i>t/P</i>	-	7.688/0.002	4.405/0.012

表 5 肺癌细胞 NCI-H460 中 CBX7 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Expression of CBX7 in NCI-H460 lung cancer cells ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Amount(n)	Relative expression of CBX7 mRNA	Straps gray-scale value of CBX7 WB
miR-199a-3p mimics transfected group	3	0.64± 0.11	0.23± 0.02
Negative control group	3	1.00± 0.03	0.87± 0.10
<i>t/P</i>	-	14.332/<0.001	15.216/<0.001

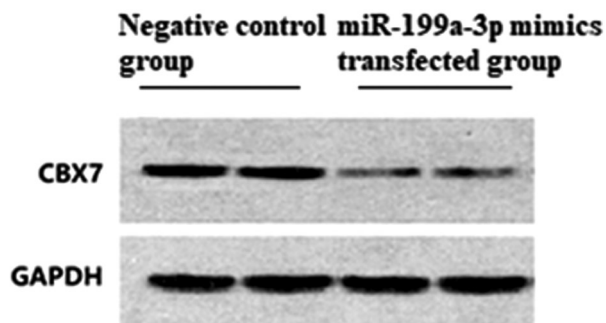


图 2 Western blot 检测 CBX7 蛋白在肺癌细胞 NCI-H460 中的表达
Fig.2 The expression of CBX7 protein in NCI-H460 lung cancer cells was detected by Western blot

3 讨论

肺癌的发病率较高, 其发生发展过程为多基因、多阶段的复杂病变过程。随着分子生物学的飞速发展, 近年来关于肺癌发生发展过程中发挥重要作用的癌基因、抑癌基因、相关蛋白

的研究为学者们关注的热点, 也成为当今肺癌发病机制的研究方向^[4], 分子病理学贯穿了肺癌发生及癌变的全过程。

miRNA 为一种小分子, 是长度约为 21-22 个核苷酸的非编码单链 RNA, 能够通过和靶基因 mRNA 的碱基配对, 从而对基因进行转录后表达的调控。在癌症中, 过表达的 miRNA 可能作为癌基因, 而表达降低的 miRNA 可能作为抑癌基因。总之, miRNA 能够作为进行性肿瘤和转移性肿瘤的调节者, 进而影响肿瘤细胞的转移和侵袭^[5]。有学者对各种肿瘤的 miRNA 表达谱进行了分析, 发现不同肿瘤的 miRNA 表达有其自身的特性^[6]。已证实, 与正常组织相比较, 肺癌组织中有十余种 miRNA 发生了变化, 如 miR-205, miR-203, miR-27a, miR-146a, miR-23a, miR-150 等^[7-12], 而被证实存在肝癌、胃癌、卵巢癌存在过表达现象的 miR-199a-5p, 其与肺癌的相关性研究近年来也日益受到关注^[13-15]。Ahmadi 等^[16] 在研究中证实, 通过检测 miR-199a-5p 能很好的区分肺癌组织与正常肺组织, 可作为肺癌早期诊断的标记物。

表 6 CCK8 实验检测各组肺癌细胞 NCI-H460 增殖情况 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 CCK8 assay was used to detect the proliferation of NCI-H460 lung cancer cells in each group ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Amount(n)	OD value
miR-199a-3p mimics transfected group	3	2.47± 0.32
miR-199a-3p mimics + CBX7 transfected group	3	1.41± 0.11
Negative control group	3	1.77± 0.12
<i>t₁/P₁</i>	-	16.321/<0.001
<i>t₂/P₂</i>	-	20.314/<0.001
<i>t₃/P₃</i>	-	12.303/<0.001

Note: *t₁/P₁*, miR-199a-3p mimics transfected group vs Negative control group; *t₂/P₂*, miR-199a-3p mimics + CBX7 transfected group vs miR-199a-3p mimics transfected group, *t₃/P₃*, miR-199a-3p mimics+ CBX7 transfected group vs Negative control group.

表 7 各组肺癌细胞的侵袭与迁移细胞数($\bar{x} \pm s$)Table 7 Invasion and migration of lung cancer cells in each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	Amount(n)	Number of invasive cells(a/HP)	Number of migrating cells(a/HP)
miR-199a-3p mimics transfected group	3	198.40± 20.30	210.30± 25.33
miR-199a-3p mimics + CBX7 transfected group	3	88.60± 15.40	53.20± 10.64
Negative control group	3	123.50± 10.66	95.60± 13.67
t1/P1	-	22.347/<0.001	25.038/<0.001
t2/P2	-	27.654/<0.001	29.022/<0.001
t3/P3	-	18.332/<0.001	20.306/<0.001

Note: t_1/P_1 , miR-199a-3p mimics transfected group vs Negative control group; t_2/P_2 , miR-199a-3p mimics + CBX7 transfected group vs miR-199a-3p mimics transfected group, t_3/P_3 , miR-199a-3p mimics+ CBX7 transfected group vs Negative control group.

CBX7 与多种肿瘤的发生发展存在密切的关系,已证实在膀胱癌和甲状腺肿瘤中 CBX7 的表达水平明显低于正常组织^[17-19]。本研究通过生物信息软件预测发现,miR-199a-5p 与 CBX7 存在结合位点,提示 miR-199a-5p 可能通过与 CBX7 上特异性位点相结合,调控肺癌的发生发展。

经研究发现,肺癌组织中 miR-199a-5p mRNA 的相对表达量明显高于癌旁正常组织,发生远处转移的肺癌组织中 miR-199a-5p mRNA 的相对表达量明显高于未转移组织;肺癌细胞 NCI-H460 的 miR-199a-3p mRNA 相对表达量明显高于正常肺上皮细胞 BEAS-2B;肺癌组织中 CBX7 mRNA 的相对表达量、CBX7 蛋白的表达水平明显低于癌旁正常组织。均说明 miR-199a-5p、CBX7 与肺癌的发生发展密切相关。荧光素酶活性检测结果显示,miR-199a-3p 与 CBX7 存在互补结合位点,提示 CBX7 可能为 miR-199a-3p 作用的靶基因。进一步分析发现,对于 CBX7 野生型报告基因质粒,miR-199a-3p 模拟物转染组的荧光素酶活性明显低于阴性对照组;对于 CBX7 突变型报告基因质粒,两组的荧光素酶活性无明显统计学差异。提示 miR-199a-3p 与 CBX7 结合后可能发挥抑制 CBX7 表达的生物学作用。本研究还发现,对于肺癌细胞 NCI-H460,miR-199a-3p 模拟物转染组的 CBX7 mRNA 相对表达量及 CBX7 WB 条带灰度值均明显低于阴性对照组,进一步证实了上述观点。

Su 等^[20]的研究结果显示,转染了 miR-199a-3p 的肿瘤细胞的体外增殖能力显著增强,提示 miR-199a-3p 对于肿瘤细胞的增殖能力具有促进作用。本研究通过 CCK8 实验检测 miR-199a-3p 对肺癌细胞增殖的促进作用,统计结果显示,miR-199a-3p 模拟物转染组的 OD 值明显高于阴性对照组,说明 miR-199a-3p 能够促进肺癌细胞的增殖。miR-199a-3p 模拟物 + CBX7 转染组的 OD 值明显低于 miR-199a-3p 模拟物转染组,说明 CBX7 抑制了这种促进效应。也提示,肺癌发生发展过程中,miR-199a-3p 的高表达能够明显抑制 CBX7 的表达,从而提高了肺癌细胞的增殖能力。我们应用 Tranwell 实验检测了 miR-199a-3p 对肺癌细胞侵袭与迁移能力的影响。结果发现,在侵袭和迁移实验中,每个高倍视野下 miR-199a-3p 模拟物转染组肺癌细胞穿过 Tranwell 小室基底膜的细胞数均明显高于阴性对照组,每个高倍视野下 miR-199a-3p 模拟物 + CBX7 转染组肺癌细胞穿过 Tranwell 小室基底膜的细胞数均明显低于 miR-199a-3p 模拟物转染组,说明 miR-199a-3p 能够通过抑制 CBX7 促进肺癌细胞侵袭与迁移。

综上所述,miR-199a-3p 在肺癌的发生发展过程中发挥重要作用,能够通过抑制 CBX7 基因的表达,促进肺癌细胞的增殖、侵袭和转移。提示 miR-199a-3p 可作为肺癌诊断的生物学标记和治疗药物作用的靶点,未来的分子生物学研究中,也可通过 miR-199a-3p 的敲除来研究 miR-199a-3p 在肺癌发生和发展中的作用。对 miR-199a-3p 与其他调节通路的交互作用而形成的网络调控机制在肺癌中的研究为我们未来研究的方向。

参考文献(References)

- [1] Pavel AB, Campbell JD, Liu G, et al. Alterations in Bronchial Airway miRNA Expression for Lung Cancer Detection [J]. Cancer Prev Res (Phila), 2017, 10(11): 651-659
- [2] Chen J, Shin VY, Siu MT, et al. miR-199a-5p confers tumor-suppressive role in triple-negative breast cancer [J]. BMC Cancer, 2016, 16(1): 887
- [3] Ni SJ, Zhao LQ, Wang XF, et al. CBX7 regulates stem cell-like properties of gastric cancer cells via p16 and AKT-NF- κ B-miR-21 pathways[J]. J Hematol Oncol, 2018, 11(1): 17
- [4] Szczyrek M, Kuźnar-Kamińska B, Grenda A, et al. Diagnostic value of plasma expression of microRNAs complementary to Drosha and Dicer in lung cancer patients [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(9): 3857-3866
- [5] 孙长杰, 邱长春, 刘吉成. miRNA-SNP 可作为肿瘤的生物标志物[J]. 基础医学与临床, 2016, 36(7): 1017-1020
- [6] 霍佳宁, 马晓欣. circRNA-miRNA 轴在肿瘤中的研究进展[J]. 癌症进展, 2018, 16(10): 1195-1198
- [7] Shimojo M, Kasahara Y, Inoue M, et al. A gapmer antisense oligonucleotide targeting SRRM4 is a novel therapeutic medicine for lung cancer[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 7618
- [8] Jiang L, Wang R, Fang L, et al. HCP5 is a SMAD3-responsive long non-coding RNA that promotes lung adenocarcinoma metastasis via miR-203/SNAI axis[J]. Theranostics, 2019, 9(9): 2460-2474
- [9] Yu N, Yong S, Kim HK, et al. Identification of tumor suppressor miRNAs by integrative miRNA and mRNA sequencing of matched tumor-normal samples in lung adenocarcinoma[J]. Mol Oncol, 2019, 13(6): 1356-1368
- [10] Qi P, Li Y, Liu X, et al. Cryptotanshinone Suppresses Non-Small Cell Lung Cancer via microRNA-146a-5p/EGFR Axis [J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(5): 1072-1079
- [11] Han Z, Zhou X, Li S, et al. Inhibition of miR-23a increases the sensitivity of lung cancer stem cells to erlotinib through PTEN/PI3K/Akt pathway[J]. Oncol Rep, 2017, 38(5): 3064-3070 (下转第 496 页)

- [10] Gehrie EA, Frank SM, Visagie M, et al. One-unit compared to two-unit platelet transfusions for adult oncology outpatients [J]. *Vox Sang*, 2019, 114(5): 517-522
- [11] Gill M. Platelet Refractoriness in a Pediatric ECMO Patient: A Case Report[J]. *J Extra Corpor Technol*, 2019, 51(2): 83-87
- [12] Davoren A, Curtis B R, Aster R H, et al. Human platelet antigen-specific alloantibodies implicated in 1162 cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia[J]. *Transfusion*, 2010, 44(8): 1220-1225
- [13] 陈语嫣, 樊祖康, 林文珍. 中国地区汉族人类血小板抗原基因多态性研究[J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(2): 433-444
- [14] Hagino T, Tsuno NH, Azuma F, et al. Multiple HLA-matched platelet transfusions for a single patient with broad anti-HLA antibodies: a case report[J]. *Platelets*, 2019, 30(6): 799-801
- [15] Karakatsanis S J, Papadatos S S, Syrigos K N. Hypoplastic thrombocytopenia and platelet transfusion: therapeutic goals [J]. *Hosp Pract (1995)*, 2019, 47(1): 16-23
- [16] Karlstrom C, Linjama T, Edgren G, et al. HLA-selected platelets for platelet refractory patients with HLA antibodies: a single-center experience[J]. *Transfusion*, 2019, 59(3): 945-952
- [17] Pena J RA, Makar RS. Routine Solid Phase Multiplex Anti-HLA Antibody Tests Predict Platelet Refractoriness [J]. *Am J Clin Pathol*, 2019, 152(2): 146-154
- [18] Revelli N, Villa MA, Olivero B, et al. A real-life evaluation of two platelet cross-matching programmes for the treatment of patients refractory to platelet transfusions[J]. *Vox Sang*, 2019, 114(1): 73-78
- [19] Rijkers M, Schmidt D, Lu N, et al. Anti-HLA antibodies with complementary and synergistic interaction geometries promote classical complement activation on platelets [J]. *Haematologica*, 2019, 104(2): 403-416
- [20] Roeker LE, Kim HT, Glotzbecker B, et al. Early Clinical Predictors of Hepatic Venous Occlusive Disease/Sinusoidal Obstruction Syndrome after Myeloablative Stem Cell Transplantation[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2019, 25(1): 137-144
- [21] Saris A, Kerkhoffs JL, Norris PJ, et al. The role of pathogen-reduced platelet transfusions on HLA alloimmunization in hemato-oncological patients[J]. *Transfusion*, 2019, 59(2): 470-481
- [22] Sim J, Tsoi WC, Lee CK, et al. Transfusion of pathogen-reduced platelet components without leukoreduction[J]. *Transfusion*, 2019, 59(6): 1953-1961
- [23] Takami A. Guidelines based on scientific evidence for the application of platelet transfusion concentrates[J]. *Rinsho Ketsueki*, 2018, 59(10): 2349-2353
- [24] Tran JQ, Muench MO, Heitman JW, et al. Allogeneic major histocompatibility complex antigens are necessary and sufficient for partial tolerance induced by transfusion of pathogen reduced platelets in mice[J]. *Vox Sang*, 2019, 114(3): 207-215
- [25] Zandi S, Kanfar S, Cserti-Gazdewich C, et al. Resolution of celiac disease, IgA deficiency and platelet refractoriness after allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia [J]. *Haematologica*, 2019, 104(3): e121-e123
- [26] Pandey S, Rosenbaum E, Cottler-Fox M, et al. Percent cPRA (Calculated Panel Reactive Antibody) Value Predicts Percent of Positive Platelet Crossmatches[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2017, 47(3): 315-318
- [27] Pena JR, Sudhof L, O'Brien B. Peripartum management of HLA alloimmune platelet refractoriness [J]. *Transfusion*, 2018, 58(7): 1583-1587
- [28] Saito Y, Kiba T, Takahashi T, et al. A Case of Merkel Cell Carcinoma Complicated with Severe Thrombocytopenia Treated with Carboplatin/Etoposide Regimen after Surgery [J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2017, 44(8): 685-687
- [29] Saris A, Kerkhoffs JL, Norris PJ, et al. The role of pathogen-reduced platelet transfusions on HLA alloimmunization in hemato-oncological patients[J]. *Transfusion*, 2019, 59(2): 470-481
- [30] Slichter SJ, Pellham E, Bailey SL, et al. Leukofiltration plus pathogen reduction prevents alloimmune platelet refractoriness in a dog transfusion model[J]. *Blood*, 2017, 130(8): 1052-1061
- [31] Thuku NW, Shikuku K, Mbugua A. Determination in vivo viability of a transfused platelet product by corrected count increment and percentage platelet response[J]. *Pan Afr Med J*, 2017, 27: 226-236
- [32] Wang J, Xia W, Deng J, et al. Analysis of platelet-reactive alloantibodies and evaluation of cross-match-compatible platelets for the management of patients with transfusion refractoriness [J]. *Transfus Med*, 2018, 28(1): 40-46

(上接第 459 页)

- [12] Yang X, Zhao H, Yang J, et al. MiR-150-5p regulates melanoma proliferation, invasion and metastasis via SIX1-mediated Warburg Effect [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 515(1): 85-91
- [13] Peng H, Dong JY, Zhao YN, et al. The Effect of Methylation Level of microRNA Promoter on the Expression of microRNAs and on the Proliferation, Migration and Invasion of Lung Cancer Cells [J]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2019, 50(2): 182-187
- [14] Wang F, Chan LW, Law HK, et al. Exploring microRNA-mediated alteration of EGFR signaling pathway in non-small cell lung cancer using an mRNA: miRNA regression model supported by target prediction databases[J]. *Genomics*, 2014, 104(6 Pt B): 504-511
- [15] Yi M, Liu B, Tang Y, et al. Irradiated Human Umbilical Vein Endothelial Cells Undergo Endothelial-Mesenchymal Transition via the Snail/miR-199a-5p Axis to Promote the Differentiation of Fibroblasts into Myofibroblasts[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 12(2018): 4135806
- [16] Ahmadi A, Khansarinejad B, Hosseinkhani S, et al. miR-199a-5p and miR-495 target GRP78 within UPR pathway of lung cancer[J]. *Gene*, 2017, 620: 15-22
- [17] Peng X, Guan L, Gao B. miRNA-19 promotes non-small-cell lung cancer cell proliferation via inhibiting CBX7 expression [J]. *Oncotargets Ther*, 2018, 11: 8865-8874
- [18] Hoffmann MJ, Dehn J, Droop J, et al. Truncated Isoforms of lncRNA ANRIL Are Overexpressed in Bladder Cancer, But Do Not Contribute to Repression of INK4 Tumor Suppressors[J]. *Noncoding RNA*, 2015, 1(3): 266-284
- [19] Ren C, Smith SG, Yap K, et al. Structure-Guided Discovery of Selective Antagonists for the Chromodomain of Polycomb Repressive Protein CBX7[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2016, 7(6): 601-615
- [20] Su WZ, Ren LF. MiRNA-199 inhibits malignant progression of lung cancer through mediating RGS17 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(8): 3390-3400