

hsa - let - 7e - 5p 对肺腺癌细胞迁移的影响

冯笑¹ 李云¹, 卜凡² 王峰松³ 伍权¹

摘要 目的 筛选肺腺癌中差异表达的环状非编码 RNA (miRNA) 并分析其对肺腺癌 (LUAD) 迁移的影响及潜在机制。方法 通过 miRNA 芯片筛选出 LUAD 组织和正常肺组织中差异表达的 miRNA 并预测其潜在的生物学功能和信号通路; 通过荧光定量逆转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 和癌症基因组图谱 (TCGA) 分析验证 hsa-let-7e-5p 在 LUAD 组织和细胞系中的表达水平; 通过划痕试验检测 hsa-let-7e-5p 对 LUAD 细胞迁移的影响; 通过生物信息学分析和 qRT-PCR 验证 hsa-let-7e-5p 与基因 DTX2、NME6、C8orf58、GATM 和 DHX57 之间的靶向关系。结果 miRNA 芯片结果显示肺腺癌组织中 347 个 miRNA 下调而 229 个 miRNA 上调。hsa-let-7e-5p 在 LUAD 组织和细胞系中下调, 过表达 hsa-let-7e-5p 可以抑制肺腺癌细胞迁移。结论 hsa-let-7e-5p 在肺腺癌中低表达并抑制肺腺癌细胞的迁移, DTX2、NME6、C8orf58、GATM 和 DHX57 是 hsa-let-7e-5p 的潜在靶基因。

关键词 hsa-let-7e-5p; 肺腺癌; miRNA 芯片; 肿瘤细胞迁移

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2022)12 - 1964 - 08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2022.12.020

肺癌仍是全球发病率和病死率最高的恶性肿瘤之一^[1]。约 85% 的新发肺癌病例为非小细胞肺癌^[2] (non-small-cell lung cancer, NSCLC), 其中超过 50% 的 NSCLC 患者确诊时已发生远处转移^[3]。迄今为止, 抗癌药物的干预治疗得到了广泛应用, 但 NSCLC 患者的 5 年生存率仍不足 20%。因此, 寻找调控肺癌发生发展的新靶标以及研发新型靶向药物对改善肺癌患者预后生存率至关重要。

环状非编码 RNA (MicroRNA, miRNA) 是一种长度为 18 ~ 25 个核苷酸的内源性非编码 RNA, 它可以通过结合 mRNA 的 3' 非翻译区来调控靶基因 mRNA 稳定性和翻译效率^[4]。越来越多的研究^[5] 表明, miRNA 可以参与调控多种肿瘤的生物学过程, 并且与 NSCLC 细胞的恶性增殖和侵袭相关。hsa-let-7e-5p 是 miRNA-let-7 家族中的一员, 根据文献^[6-7] 报道其可以在头颈部鳞状细胞癌中发挥抑癌作用, 可以促进直肠癌细胞的迁移, 而 hsa-let-7e-5p 在肺腺癌 (lung adenocarcinoma, LUAD) 中的表达水平和生物学功能尚不清楚。该研究评估了 LUAD 组

2022 - 08 - 17 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81972184)

作者单位: ¹安徽医科大学附属省立医院中心实验室, 合肥 230001

²中国科学技术大学生命科学与医学院, 合肥 230027

³安徽医科大学生命科学院, 合肥 230032

作者简介: 冯笑, 女, 硕士研究生;

伍权, 男, 博士生导师, 研究员, 责任作者, E-mail: pow-erwoo01@ahmu.edu.cn

sepsis by inhibiting oxidative stress and activating the Xc - /GPX4 signaling pathway in ferroptosis. **Methods** Lipopolysaccharide (LPS) induced H9c2 in rat cardiomyocytes to form an *in vitro* model of myocardial injury in sepsis, which was divided into Control group, LPS group and LPS + NaHS group. The kits were applied to detect the changes of cardiomyocyte viability, Fe²⁺, LDH and CK-MB, determine the levels of oxidative stress indexes GSH and MDA, detect the changes of cellular ROS and mitochondrial membrane potential levels by fluorescent probes, and detect the expression levels of ferroptosis regulatory proteins SLC7A11 and GPX4 by Western blot. **Results** Compared with the Control group, H9c2 cell viability decreased, Fe²⁺ concentration increased, GSH, MDA and ROS levels increased, mitochondrial JC-1 monomer increased, expression levels of ferroptosis regulatory proteins SLC7A11 and GPX4 decreased, and cell damage increased after LPS stimulation (P < 0.05). Compared with the LPS group, NaHS attenuated LPS-induced H9c2 cell injury and elevated Fe²⁺ concentration, decreased the level of LPS-induced oxidative stress in H9c2 cells, and increased the expression levels of ferroptosis regulatory proteins SLC7A11 and GPX4 (P < 0.05). **Conclusion** The mechanism by which NaHS attenuates myocardial injury in sepsis may be related to the inhibition of oxidative stress and activation of the Xc - /GPX4 signaling pathway in ferroptosis.

Key words sepsis-induced cardiomyopathy; H₂S; ferroptosis; oxidative stress

织中差异表达的 miRNA ,并进一步研究了 hsa-let-7e-5p 对 LUAD 细胞迁移的影响和潜在机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 miRNA 芯片购自上海康成生物工程有限公司; DMEM 高糖培养基、无血清培养基和 Gibco 胎牛血清均购自美国 Invitrogen 公司; LUAD 细胞系和正常人支气管上皮细胞购自美国模式培养物集存库(ATCC); hsa-let-7e-5p 模拟物(mimic)、抑制剂(inhibitor)和 Hairpin-itTM microRNA 试剂盒均购自上海吉玛公司; miRNA 转染试剂盒购自广州锐博公司; 逆转录和荧光定量 PCR 试剂盒购自上海翌圣公司; 引物购自南京擎科公司。

1.2 生物信息学分析

1.2.1 miRNA 芯片分析 TRIzol 法提取组织中总 RNA ,并按照 QIAGEN 试剂盒对 RNA 进行纯化。使用 miRCURYTM Power 试剂盒(Exiqon)将每个样品总 RNA 扩增并转录为荧光 miRNA ,之后将其在 miRCURYTM LNA Array 上进行杂交。在使用 Gene-Pix 4000B 微阵列扫描仪(Affymetrix)扫描芯片之后,通过 miRCURYTM LNA 系统(Vedbaek)检测肺癌组织中差异表达的 miRNA。采用中位数标准化法对表达的原始数据进行标准化,并根据倍数变化和 P 值筛选出两组间差异表达的 miRNA(DEM)。

1.2.2 差异基因的 GO 功能分析 基因本体论(gene ontology, GO)是一种通用的生物信息学方法,用于统一基因和基因产物的表示。注释基因组针对以下领域:生物过程(biological process, BP)、细胞成分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)3个部分,GO 分析描述了基因产物可能行使的分子功能,所处的细胞环境以及参与的生物学过程。采用 Fisher 精确检验分析差异表达基因的富集。

1.2.3 差异基因的 KEGG 功能分析 KEGG 具有发挥连接多样性分子之间相互信息的能力,包括通路(通路数据库)、基因组产生的信息(化合物和反应数据库)项目(基因数据库)、生化化合物和反应产生的信息。使用 KEGG 在线服务工具(KAAS)用于标注基因,而 KEGG 在线服务工具(KEGG mapper)用于将标注结果映射到通路数据库上。采用 Fisher 精确检验分析差异表达基因的富集情况,并根据 KEGG 网站分为不同的通路类别。

1.2.4 miRNA 靶基因预测与互作网络分析 使用 3 个在线网站 targetScanSites、microcosmSites、miRan-

daSites 对 miRNA 的靶基因进行初步分析,选取 3 个网站预测结果的交集作为靶基因的预测集合。从综合性预测数据库 miRNet 中检索不同比较组的差异 miRNA,将筛选的 DEM 通过 cytoscape 软件工具绘制差异 miRNA-靶基因相互作用网络图。

1.3 细胞培养和转染 LUAD 细胞系(H1299、A549、Calu-3、H358、H460、H827)和正常人支气管上皮细胞 BEAS-2B 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基(包含青-链霉素)中,于 37 °C 含 5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞密度达 40% ~ 60% 时进行转染,用 riboFECTTM CP 转染 hsa-let-7e-5p 模拟物(mimic)或抑制剂(inhibitor)。

1.4 总 RNA 提取及实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)实验 TRIzol 法提取细胞 RNA,使用超微量分光光度计检测 RNA 浓度及纯度。用 Hairpin-itTM microRNA 和 U6 snRNART-PCR 定量试剂盒检测样品中 miRNA 的表达水平。使用 qRT-PCR 试剂盒检测样品中 mRNA 表达水平,根据 StepOneplus Real-Time PCR System(ABI)操作指南进行程序设定和扩增产物检测。具体 PCR 反应条件为:95 °C 预变性 5 min 95 °C 变性 10 s 60 °C 退火延伸 30 s,共进行 40 个循环反应。以 GAPDH 和 U6 为内参基因,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算相关基因相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')
hsa-let-7e-5p	F: CATTCTCTCAGAGGAGGTAGGAGG R: TATGGTTTTGAGACTGTGTGAT
hsa-miR-214-3p	F: GACAGCAGGCACAGACA R: TGCCTGTCCTGGAGTC
hsa-miR-150-5p	F: GCTCTCCCAACCCTTGT R: TGCCTGTCCTGGAGTC
hsa-miR-125a-5p	F: GCTCCCTGAGACCCITTA R: CAGTCCGTGTCCTGGAGT
hsa-miR-150-5p	F: GCTCTCCCAACCCTTGT R: TGCCTGTCCTGGAGTC
DTX2	F: TGGCTCTGGACTGCCTAT R: GGGTGCTGTAGTTGACAGTGTA
NME6	F: ATTGCCAGAGTTTTACCGAG R: CCGAAACTCCCAGGATAGAAT
C8orf58	F: TTACCGTCCCGTTACACAC R: GCAAGTGGTACGTTGGCTC
DHX57	F: GAGTCACGCCAAAATGGAAA R: GTTACAGCAATCAGGCTCATCA
GATM	F: CACTACATCGGATCTCGGCTT R: CTAAGGGGTCCCATTCGTTGT
GAPDH	F: ACAACTTTGGTATCGTGGAAGG R: GCCATCACGCCACAGTTTC
U6	F: CAGCACATATACTAAAATTGGAACG R: ACGAATTTGCGTGTCTATCC

1.5 划痕实验 将 H1299 细胞和 A549 细胞铺展于细胞培养板中(12 孔),待细胞密度达 50% ~ 70% 时进行转染。当细胞均匀铺满时,用无菌枪头垂直画线,将漂浮细胞用 PBS 清洗干净后换用无血清培养基继续培养。由于 A549 细胞生长速度较为缓慢,在进行划痕实验中,采用含 2% 的胎牛血清的 DMEM 培养基进行饥饿处理。于 0、24 h 对同一位置进行拍摄。划痕愈合率(%) = (0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度) / 10 h 划痕宽度 × 100%。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 16.0 和 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析和绘图。所有实验独立重复 3 次,正态分布的计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。根据不同分组特征,采用 *t* 检验和方差分析(ANOVA) 进行统计分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 差异表达的 miRNA(DEM) 的筛选和靶基因

预测 该研究将 5 对 LUAD 组织样品和 5 对正常肺组织样品的 miRNA 微阵列分析结果进行比对,散点图显示 miRNA 大多聚集在对角线,表明样品间具有良好的重复性(图 1A);对组织样品和 DEM 进行聚类分析,得到 DEM 聚类图(图 1B);以 *P* < 0.05, $|\log_2^{\text{Fold Change}}| > 1$ 为标准筛选 DEM,LUAD 标本中共检测到 576 个差异表达 miRNA,其中 347 个 miRNA 下调 229 个 miRNA 上调(图 1C);通过查阅文献,共筛选出 5 个与肿瘤密切相关的 DEM: hsa-miR-501-5p、hsa-miR-214-3p、hsa-miR-150-5p、hsa-miR-125a-5p 和 hsa-let-7e-5p(表 2);使用靶基因预测网站对上述 5 个 DEM 的靶基因进行可视化分析,得到 miRNA-靶基因互作网络图(图 1D)。

2.2 DEM 相关靶基因的 GO、KEGG 功能分析及实验验证 对上述 5 个 DEM 的靶基因进行 GO 功能分析,并将其分为以下 3 类:生物过程(biology process, BP) 细胞组分(cellular component, CC) 和

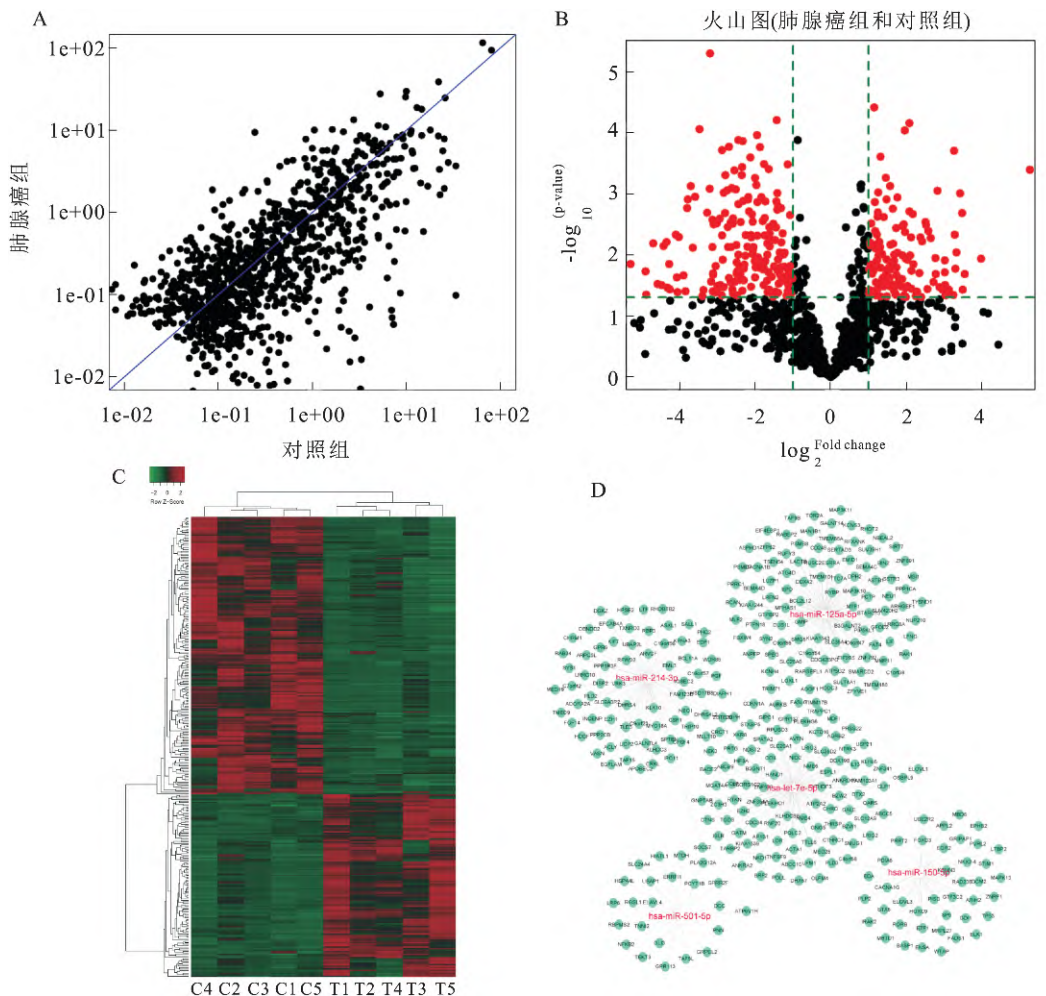


图 1 miRNA 基因芯片分析结果

A: 差异表达 miRNA 的散点图; B: 差异表达 miRNA 的聚类分析图,红色代表上调的 miRNA,绿色代表下调的 miRNA; C: 差异表达 miRNA 火山图; D: 5 个差异表达 miRNA 的靶基因互作网络图

表 2 差异表达 miRNA

miRNA	差异倍数	P 值
hsa-miR-501-5p	2.28	0.070
hsa-miR-125a-5p	0.50	0.001
hsa-miR-150-5p	0.12	0.001
hsa-miR-214-3p	0.52	0.013
hsa-let-7e-5p	0.27	0.019

分子功能 (molecular function ,MF)。在生物过程 (BP) 组中: 靶基因参与与负向调控轴突生成、细胞发育、神经生成和细胞分化等 (图 2A) ; 在细胞组分 (CC) 组中: 靶基因主要在染色体、细胞器内膜富集 (图 2B) ; 而在在分子功能 (MF) 组中: 靶基因可结合转录因子 , 转录辅助因子和多种蛋白质复合物 (图 2C) 。DEM 相关靶基因 KEGG 通路分析结果提示靶基因主要涉及以下生物学功能: mRNA 监测、脂类代谢、肿瘤中蛋白聚糖代谢 (图 2D) 。检测组织中上述 DEM 的表达水平 , 结果显示与正常肺组织相

比: hsa-miR-150-5p ($t = 2.941, P < 0.0001$) , hsa-miR-214-3p ($t = 3.158, P = 0.0134$) , hsa-miR-125a-5p ($t = 4.895, P = 0.0012$) 和 hsa-let-7e-5p ($t = 3.005, P = 0.0187$) 表达水平在 LUAD 中显著下调; 而 hsa-miR-501-5p 表达水平在 LUAD 中显著上调 ($t = 3.600, P = 0.007$) 。qRT-PCR 检测结果与 miRNA 芯片分析结果一致 , 差异有统计学意义 (图 2E) 。

2.3 hsa-let-7e-5p 对 LUAD 细胞的迁移的影响

TCGA 数据库结果显示 hsa-let-7e-5p 在 LUAD 中下调 ($P < 0.05$) , 其差异有统计学意义 (图 3A) 。与 BEAS-2B 细胞相比 , hsa-let-7e-5p 在 Calu-3、H358、A549、H299、H460、H827 细胞系中均显著下调 ($F = 109.8, t = 5.337, 13.350, 18.150, 8.314, 2.404, 2.615, P < 0.001$) (图 3B) 。图 3C 结果显示: 与 mimic NC 组相比 , H1299 和 A549 细胞 mimic 组 hsa-let-7e-5p mRNA 水平升高 ($t = 66.70, 53.54, P <$

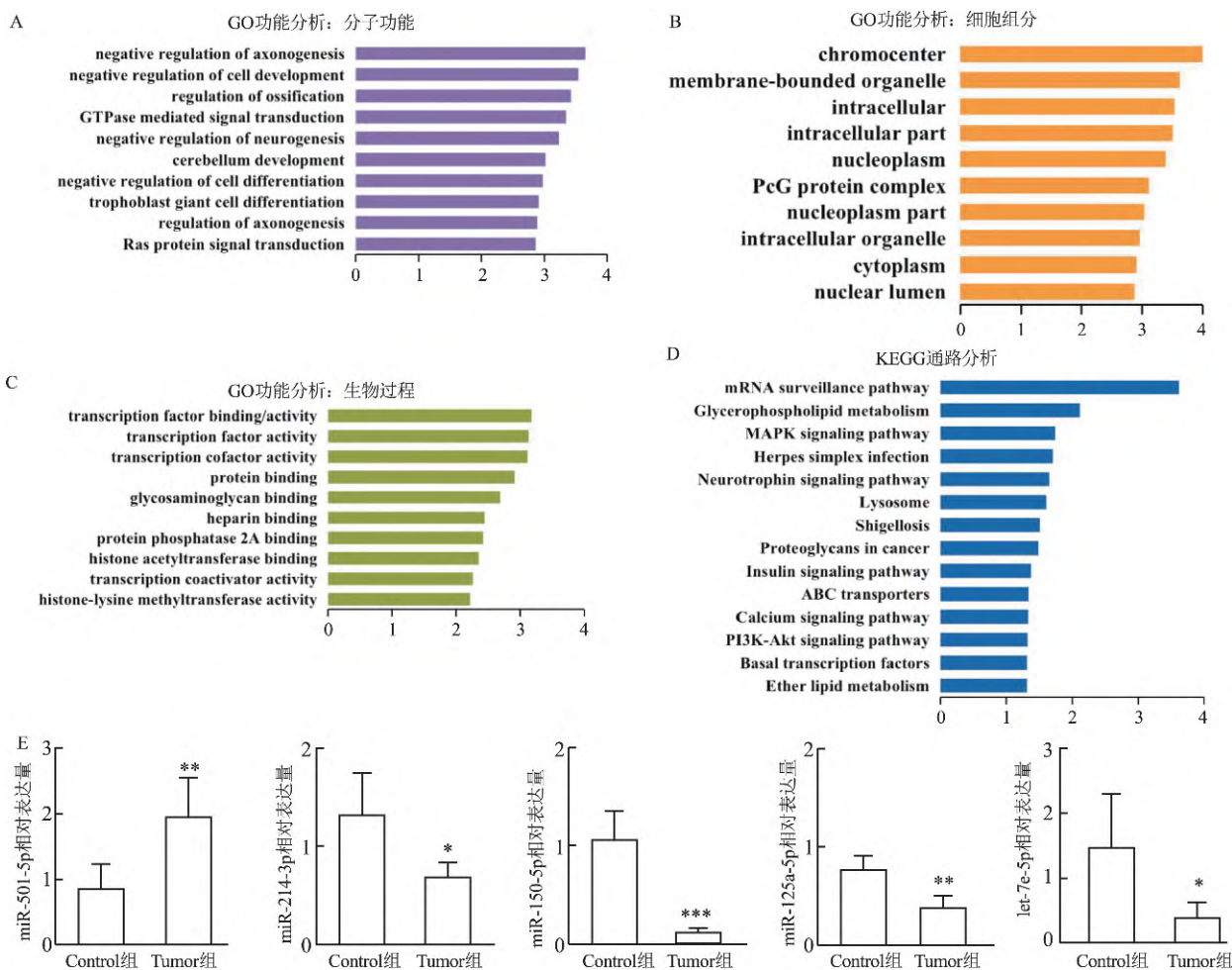


图 2 差异表达 miRNA 功能富集及验证

A: GO 功能分析(分子功能) ; B: GO 功能分析(细胞组分) ; C: GO 功能分析(生物过程) ; D: 差异表达 miRNA KEGG 通路分析; E: qRT-PCR 验证 5 个差异表达 miRNA; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

0.001); 与 inhibitorNC 组相比, H1299 和 A549 细胞 inhibitor 组 hsa-let-7e-5p mRNA 水平降低 ($t = 10.54, P = 0.0005; t = 5.842, P = 0.0043$)。图 3D 的结果显示: H1299 细胞 mimic-NC 组平均划痕愈合百分比为 (51.17 ± 5.99), 高于 H1299 细胞 mimic 组 (31.77 ± 4.12), 差异有统计学意义 ($t = 3.372, P = 0.0196$); A549 细胞 mimic-NC 组平均划痕愈合百分比为 (36.47 ± 4.77), 高于 A549 细胞 mimic 组 (20.58 ± 2.15), 差异有统计学意义 ($t = 4.294, P = 0.0127$)。图 3E 的结果显示: H1299 细胞 inhibitor-NC 组平均迁移面积百分比为 (21.67 ± 1.70), 低于

H1299 细胞 inhibitor 组 (39.33 ± 2.05), 差异有统计学意义 ($t = 9.369, P = 0.0007$); A549 细胞 inhibitor-NC 组平均划痕愈合百分比为 (18.89 ± 3.78), 低于 A549 细胞 inhibitor 组 (33.57 ± 4.60), 差异有统计学意义 ($t = 3.487, P = 0.0252$)。

2.4 hsa-let-7e-5p 靶基因的筛选及验证 通过生物信息学分析预测了 hsa-let-7e-5p 的潜在靶标(图 4A), 并通过 3 个在线靶基因预测网站筛选出 96 个潜在靶基因。qRT-PCR 结果显示共 12 个基因下调(图 4B), 其中 5 个基因显著下调, 差异有统计学意义 ($F = 6.528, P < 0.01$), 分别是: DTX2 ($t = 12.90$,

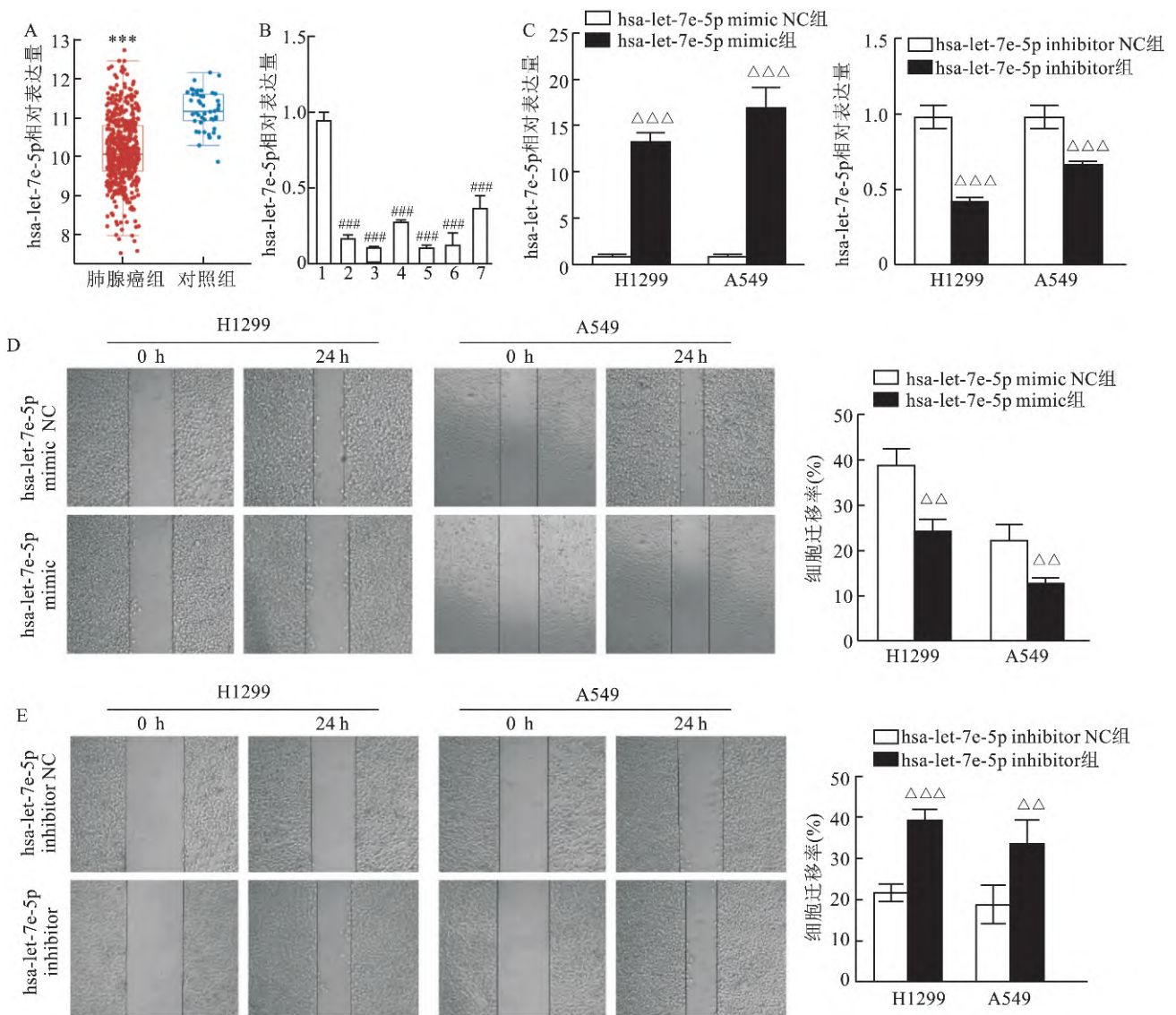


图 3 hsa-let-7e-5p 在 LUAD 细胞和组织标本中下调并抑制 LUAD 细胞的迁移

A: TCGA 数据库中 hsa-let-7e-5p 在 LUAD 组织中下调; B: hsa-let-7e-5p 在各 LUAD 细胞系中下调; C: qRT-PCR 检测 LUAD 细胞过表达 let-7e-5p 模拟物 (mimic) 和抑制剂 (inhibitor) 时 hsa-let-7e-5p 水平; D: 过表达 hsa-let-7e-5p mimic 抑制 LUAD 细胞迁移; E: 过表达 let-7e-5p inhibitor 促进 LUAD 细胞迁移; 1: BEAS-2B 组; 2: Calu-3 组; 3: H358 组; 4: A549 组; 5: H1299 组; 6: H460 组; 7: H827 组; 与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与 BEAS-2B 组比较: ### $P < 0.001$; 与 NC 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01, \Delta\Delta\Delta P < 0.001$

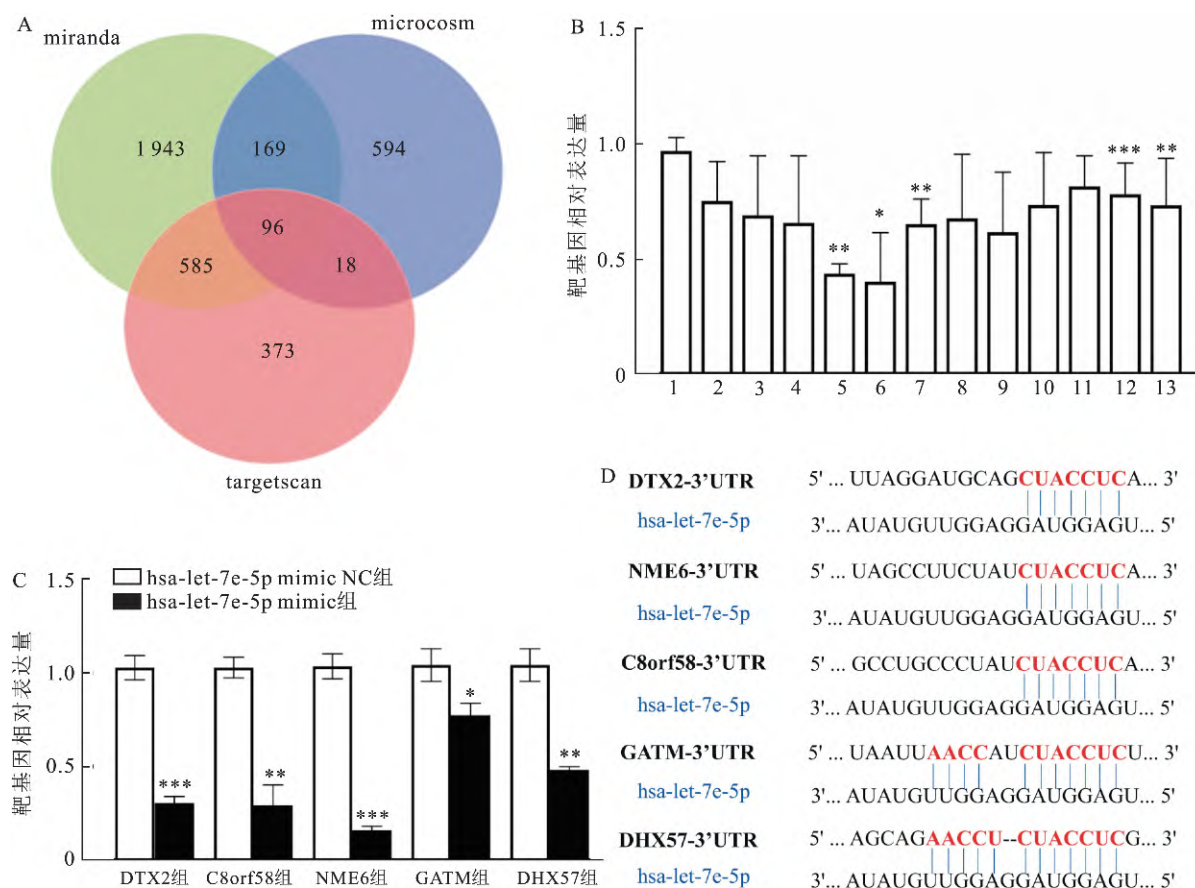


图4 hsa-let-7e-5p 靶基因的筛选和验证

A: 生物信息学分析预测 hsa-let-7e-5p 的靶基因; B: qRT-PCR 筛选 hsa-let-7e-5p 的潜在靶基因; C: hsa-let-7e-5p 的过表达降低 A549 细胞 DTX2、NME6、C8orf58、GATM 和 DHX57 mRNA 表达水平; D: DTX2、NME6、C8orf58、GATM 和 DHX57 的 3'UTR 与 hsa-let-7e-5p 靶向结合; 1: NC 组; 2: ABCB9 组; 3: ABCC5 组; 4: GPR137 组; 5: DTX2 组; 6: C8orf58 组; 7: NME6 组; 8: AVEN 组; 9: BZW1 组; 10: NME4 组; 11: COIL 组; 12: GATM 组; 13: DHX57 组; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

$P = 0.0002$), NME6 ($t = 4.473$, $P = 0.0011$)、C8orf58 ($t = 4.412$, $P = 0.0069$)、GATM ($t = 2.208$, $P = 0.0017$) 和 DHX57 ($t = 1.905$, $P = 0.0019$)。此外图 4C 结果显示在 A549 细胞中检测到过表达 hsa-let-7e-5p 可以显著下调 DTX2 ($t = 10.51$, $P = 0.0005$)、NME6 ($t = 13.07$, $P = 0.0002$)、C8orf58 ($t = 8.003$, $P = 0.0013$)、GATM ($t = 3.176$, $P = 0.0336$) 和 DHX57 ($t = 8.064$, $P = 0.0013$) 显著下调, 多组间差异有统计学意义 ($F = 61.73$, $P < 0.05$), 与 H1299 细胞的验证结果相一致。通过 TargetScan 预测网站检索到 DTX2、NME6、C8orf58、GATM 和 DHX57 的 3'UTR 区域均与 hsa-let-7e-5p 存在靶向结合位点, 其中 GATM 的 3'UTR 区域可与 hsa-let-7e-5p 的两处碱基位点靶向结合(图 4D)。

3 讨论

LUAD 是一种恶性呼吸道肿瘤, 起源于支气管

黏膜上皮, 占所有肺原发肿瘤的 55%。由于缺乏早期诊断标志, 且肺癌易通过血液、淋巴等转移扩散, 80% 肺癌患者在中晚期阶段才被确诊, 目前仍缺乏有效的诊断和预测标志物。miRNA 是一种生物调节分子, 在肺癌的发生发展和转移过程中发挥重要作用, 寻找 miRNA 的有效靶标是 LUAD 靶向基因治疗的新热点。目前, 许多研究报道了肺癌中差异表达的 miRNA, 王洁等^[8]利用 miRNA 芯片筛选肺癌间质表型亚系 A3 细胞的 DEM, 并研究了 miR-194-5p 对肺癌 EMT 进程的影响; 蔡睿等^[9]通过 miRNA 芯片筛选非小细胞肺癌患者血浆外泌体中的 DEM, 以评估 miRNA 对早期肺癌转移的提示作用; Zhou et al^[10]通过 miRNA 芯片筛选肺癌组织中的 DEM, 并检测了 miRNA-520 对肺癌增殖和迁移的作用。而该研究不仅使用 3 个靶基因网站预测了 hsa-let-7e-5p 的靶基因, 并同时通过 qRT-PCR 方法进一步验证了 5 个潜在的靶基因, 为后续的研究提供了实

验基础。

hsa-let-7e-5p 属于 let-7 家族,其可通过靶向趋化因子受体 7 (CCR7) 抑制头颈癌细胞的迁移和增殖。然而据报道 hsa-let-7e-5p 在直肠癌中高表达并发挥促癌作用。统计学数据显示印度肺癌患者外周血中 hsa-let-7e-5p 显著下调,但其与患者的预后无相关性^[11]。以上研究表明,hsa-let-7e-5p 在肿瘤中具有双重作用,这可能与其在不同肿瘤中的靶基因功能存在相关性。DTX2 属于 deltex 家族,是一种 E3 泛素连接酶,可特异识别蛋白底物并介导其泛素化。DTX3 通过泛素化降解 Notch2 蛋白,抑制了人食管癌细胞的增殖和迁移^[12]。另一项研究^[13]表明,DTX3 通过促进 XRCC5 泛素化调节 AKT 信号通路,抑制甲状腺乳头状癌上皮间质转化。NME 家族参与了核苷二磷酸的磷酸化(NDPK/NME/Nm23),调控胚胎发育、癌症转化和转移等过程。NME6 是 NME 家族的一员,在核苷酸稳态、信号转导、膜重塑和转移抑制等方面发挥重要作用^[14]。C8orf58 是位于 8 号染色体 58 位开放阅读框的编码蛋白,研究^[15]表明 C8orf58 是卵巢透明细胞癌的候选基因。DHX57 具有核酸结合和解旋酶活性的编码蛋白,DHX57 甲基化水平可作为小脑衰老的表观遗传生物标志物;GATM 可以抑制肥胖引起的乳腺癌的发生进程;敲低 GATM 还可以下调 Snail 和 Slug 基因表达,抑制结直肠癌的转移。目前,DTX2、NME6、C8orf58、GATM 和 DHX57 与 LUAD 的相关性未得到证实。因此,这项研究对拓展 LUAD 的发生发展和分子机制具有一定意义。

该研究首先对收集的 LUAD 组织和正常肺组织进行 miRNA 芯片分析,筛选出差异常表达的 miRNA,并调出 5 个与肿瘤密切相关的 DEM,最终选择 hsa-let-7e-5p 作为后续研究目标。hsa-let-7e-5p 在 TCGA 数据库和 LUAD 细胞水平均下调,这与该研究的 miRNA 组织芯片结果一致。qRT-PCR 和划痕结果表明 hsa-let-7e-5p 在 LUAD 中下调并抑制 LUAD 细胞迁移。此外,该研究表明 DTX2、NME6、C8orf58、GATM 和 DHX57 是 hsa-let-7e-5p 的潜在靶基因。

参考文献

[1] Vardell E. Global health observatory data repository [J]. *Med Ref Serv Q* 2020, 39(1): 67-74.

- [2] Siegel R L, Miller K D, Fuchs H E, et al. Cancer statistics, 2021 [J]. *CA Cancer J Clin* 2021, 71(1): 7-33.
- [3] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin* 2021, 71(3): 209-49.
- [4] Zhu L, Shu Z, Sun X. Bioinformatic analysis of four miRNAs relevant to metastasis-regulated processes in endometrial carcinoma [J]. *Cancer Manag Res* 2018, 10: 2337-46.
- [5] 李纪远, 马新, 张灿斌, 等. 基因干扰 miR-105 抑制非小细胞肺癌细胞的干细胞样特性、恶性增殖和侵袭 [J]. *安徽医科大学学报* 2021, 56(1): 33-7.
- [6] Wang S, Jin S, Liu M D, et al. Hsa-let-7e-5p inhibits the proliferation and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma cells by targeting chemokine receptor 7 [J]. *J Cancer* 2019, 10(8): 1941-8.
- [7] Chen W, Lin G, Yao Y, et al. MicroRNA hsa-let-7e-5p as a potential prognosis marker for rectal carcinoma with liver metastases [J]. *Oncol Lett* 2018, 15(5): 6913-24.
- [8] 王洁, 于敏, 方瑾. miR-194-5p 在微流控芯片筛选的肺癌间质表型亚系的作用 [J]. *解剖科学进展*, 2019, 25(4): 442-5.
- [9] 蔡睿, 王振兴, 安南, 等. 血清中 microRNA 对非小细胞肺癌早期转移潜在的诊断价值 [J]. *长春中医药大学学报* 2021, 37(4): 780-3.
- [10] Zhou W, Wu Y, Pan M, et al. Proliferation and migration of lung cancer could be inhibited by oxymatrine through the regulation for miR-520/VEGF [J]. *Am J Chin Med* 2019, 47(4): 865-78.
- [11] Kumar S, Sharawat S K, Ali A, et al. Identification of differentially expressed circulating serum microRNA for the diagnosis and prognosis of Indian non-small cell lung cancer patients [J]. *Curr Probl Cancer* 2020, 44(4): 100540.
- [12] Ding X Y, Hu H Y, Huang K N, et al. Ubiquitination of NOTCH2 by DTX3 suppresses the proliferation and migration of human esophageal carcinoma [J]. *Cancer Sci* 2020, 111(2): 489-501.
- [13] Wang L, Huang Y, Liu C, et al. Deltex3 inhibits epithelial mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma via promoting ubiquitination of XRCC5 to regulate the AKT signal pathway [J]. *J Cancer* 2021, 12(3): 860-73.
- [14] Proust B, Radić M, Vidaček N Č, et al. NME6 is a phosphotransfer-inactive, monomeric NME/NDPK family member and functions in complexes at the interface of mitochondrial inner membrane and matrix [J]. *Cell Biosci* 2021, 11(1): 195.
- [15] Kim J, Chung J Y, Hwang J R, et al. Identification of candidate genes associated with susceptibility to ovarian clear cell adenocarcinoma using cis-eQTL analysis [J]. *J Clin Med* 2020, 9(4): 1137.

(下转第 1978 页)

pare the cell invasion and migration ability of normal control group , S100A8/A9 protein added group , DKK-1 added group , and DKK-1 added and S100A8/A9 protein recovery group; Western blot was used to detect the expression of c-Myc and cyclinD1. **Results** S100A8 and S100A9 could activate the Wnt/ β -catenin pathway. Compared with S100A8 and S100A9 cultured separately , the expression of β -catenin in CAL-27 and SCC-25 cells was up-regulated with time when co-cultured , and the qPCR results were consistent with them; in the immunofluorescence experiment , changes in the expression of β -catenin were observed in the cytoplasm and nucleus of SCC-25 and CAL-27 cells , and the expression of β -catenin protein in SCC-25 and CAL-27 cells increased at 48 h ($P < 0.05$) . Adding DKK-1 , Western blot and qPCR showed that the expression of β -catenin decreased ($P < 0.001$) ; the number of cell migration and invasion in the S100A8/A9 group was more than that in the blank group ($P < 0.001$) , the number of cells invading and migrating decreased in the DKK-1 inhibitor group , and the number of cells in the DKK-1 and S100A8/A9 protein recovery group decreased , suggesting that DKK-1 could inhibit the promoting effect of exogenous S100A8/A9 protein on the invasion and migration ability of SCC-25 and CAL-27 cells , and the difference was statistically significant ($P < 0.001$) ; adding Wnt/ β -catenin pathway inhibitor DKK-1 , Western blot experiments showed that the expressions of key molecules c-Myc and cyclinD1 in the Wnt/ β -catenin pathway decreased ($P < 0.001$) . **Conclusion** Exogenous S100A8/A9 can promote the invasion and migration of SCC-25 and CAL-27 cells by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words S100A8/A9; Wnt/ β -catenin; DKK-1; invasion; migration

(上接第 1970 页)

hsa - let - 7e - 5p inhibits the migration of lung adenocarcinoma cells

Feng Xiao¹ , Li Yun¹ , Bu Fan² , Wang Fengsong³ , Wu Quan¹

(¹ Dept of Clinical Laboratory , Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University , Hefei 230001;

² School of Life Sciences , USTC Life Sciences and Medicine , Hefei 230027;

³ Dept of Biology , School of Life Sciences , Anhui Medical University , Hefei 230032)

Abstract Objective To screen differentially expressed miRNAs and explore its effect and mechanism on cell migration in lung adenocarcinoma (LUAD) . **Methods** Differentially expressed miRNAs in LUAD tissues and normal lung tissues were screened by miRNA microarrays , and then bioinformatics analysis was used to predict their potential biological functions and signaling pathways. The cancer genome atlas (TCGA) analysis and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) verified the expression level of hsa-let-7e-5p in LUAD tissues and cell lines. The effect of hsa-let-7e-5p cell migration in LUAD was examined by wound healing experiment. After screening the underlying target genes by bioinformatics analysis , the targeting relationship between hsa-let-7e-5p and DTX2 , NME6 , C8orf58 , GATM and DHX57 were verified by qRT-PCR. **Results** The miRNA microarray results showed that 347 miRNAs were down-regulated while 229 miRNAs were up-regulated in lung adenocarcinoma tissues. Compared with normal lung tissue and cells , the expression level of hsa-let-7e-5p was significantly down-regulated. Besides , over-expression of hsa-let-7e-5p inhibited LUAD cell migration. **Conclusion** Non-coding RNA hsa-let-7e-5p is down-regulated in LUAD and inhibits the migration of lung adenocarcinoma cells. DTX2 , NME6 , C8orf58 , GATM and DHX57 are the potential target genes of hsa-let-7e-5p.

Key words hsa-let-7e-5p; lung adenocarcinoma; miRNA microarray; tumor cell migration