

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.12.006

· 临床研究 ·

miR-9 通过靶向 E 盒结合锌指蛋白 2 调控小细胞肺癌的恶性生物学行为及其可能的机制

刘荣凤, 张玲玲, 徐志宏, 崔彦芝(河北医科大学第四医院 肿瘤内科, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:** 探讨 miR-9 通过靶向 E 盒结合锌指蛋白 2(zinc finger E-box binding homeobox 2, ZEB2) 对小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC) 细胞生物学行为的调控作用, 分析 miR-9 在 SCLC 中的作用及其工作机制。**方法:** 采用 qPCR、WB 和免疫组化方法检测于 2018 年 2 月至 2019 年 11 月于河北医科大学第四医院肿瘤内科接受手术治疗的 67 例 SCLC 患者癌组织及癌旁组织中 ZEB2 的表达。采用 TargetScan 预测 miR-9 的潜在靶基因并通过双荧光素酶报告基因试验、qPCR 和 WB 法进行验证。CCK-8 法、流式细胞术和 Transwell 实验检测 miR-9 和 ZEB2 过表达对 NCI-H446 的生物学行为影响, WB 法检测对细胞中 E-cadherin, N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达的影响。利用 miR-9 过表达 NCI-H446 细胞构建 SCLC 裸鼠移植瘤模型, 观察 miR-9 对裸鼠移植瘤生长的影响。**结果:** SCLC 组织中 ZEB2 的 mRNA 和蛋白表达水平明显高于癌旁正常组织($P < 0.01$)。miR-9 在 ZEB2 的 3' UTR 上具有潜在的结合位点, 与对照组相比, miR-9 过表达组 NCI-H446 细胞中 ZEB2 的 mRNA 和蛋白表达水平明显降低($P < 0.01$), 细胞增殖、迁移和侵袭能力均显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 促 EMT 蛋白表达减少, 而同时过表达 ZEB2 能够逆转上述影响。体内实验中, miR-9 过表达组移植瘤体积、重量均明显低于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。miR-9 组裸鼠肿瘤组织中和 ZEB2 蛋白的表达均较对照组明显降低($P < 0.01$)。**结论:** miR-9 通过靶向调控 ZEB2 从而抑制 SCLC 细胞的生物学行为以及 NCI-H446 裸鼠移植瘤的生长。

[关键词] 小细胞肺癌; miR-9; 结合锌指蛋白 2

[中图分类号] R734.2; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)12-1351-07

miR-9 regulates the malignant biological behaviors of small cell lung cancer by targeting zinc finger E-box binding homeobox 2 and its possible mechanism

LIU Rongfeng, ZHANG Lingling, XU Zhihong, CUI Yanzhi (Department of Oncology Medicine, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the regulatory effect of miR-9 on biological behaviors of small cell lung cancer (SCLC) cells by targeting zinc finger E-box binding homeobox 2 (ZEB2), and to analyze the role of miR-9 in SCLC and its possible mechanism. **Methods:** qPCR, WB and immunohistochemistry methods were used to detect the mRNA and protein expressions of ZEB2 in cancer tissues and corresponding adjacent tissues of 67 SCLC patients who received surgical treatment at the Department of Oncology, Fourth Hospital of Hebei Medical University from February 2018 to November 2019. TargetScan was used to predict the potential target gene of miR-9, which was later verified by Dual luciferase reporter gene assay, qPCR and WB methods. CCK-8 method, Flow cytometry and Transwell experiment were used to detect the effect of miR-9 and ZEB2 over-expression on the biological behaviors of NCI-H446 cells, and WB was used to detect the protein expressions of E-cadherin, N-cadherin and Vimentin in cells. NCI-H446 cells overexpressing miR-9 were used to construct SCLC nude mouse xenograft model, and the effect of miR-9 on the growth of xenografts was observed. **Results:** The mRNA and protein expression levels of ZEB2 in SCLC tissues were significantly higher than those in adjacent tissues ($P < 0.01$). There is a potential binding site on the 3' UTR of ZEB2 to bind with miR-9. Compared with the control group, the mRNA and protein expression levels of ZEB2 in NCI-H446 cells of the miR-9 over-expression group were significantly reduced ($P < 0.01$); the proliferation, migration and invasion abilities of NCI-H446 cells were significantly suppressed ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the expression

[基金项目] 河北省 2018 年度医学科学研究重点课题资助项目(No. 20180576)。Project supported by the Key Project of Medical Science Research of Hebei Province in 2018 (No. 20180576)

[作者简介] 刘荣凤(1982-), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事肺癌、食管癌等恶性肿瘤的化疗、靶向及免疫治疗的临床与基础研究, E-mail: liurongfeng9021@126.com

[通信作者] 崔彦芝(CUI Yanzhi, corresponding author), 博士, 副主任医师, 副教授, 研究生导师, 主要从事恶性肿瘤化疗与生物治疗的研究, E-mail: 957781941@qq.com

of EMT protein was reduced; However, simultaneous over-expression of ZEB2 could reverse above effects. In *in vivo* experiments, the size and weight of transplanted tumors in the miR-9 over-expression group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The expression of ZEB2 protein in the tumor tissues of nude mice in the miR-9 overexpression group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.01$). **Conclusion:** miR-9 can inhibit the biological behaviors of SCLC cells and the growth of NCI-H446 transplanted tumors in nude mice by targeting and regulating ZEB2.

[Key words] small cell lung cancer(SCLC); miR-9; zinc finger E-box Binding homeobox 2 (ZEB2)

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(12): 1351-1357. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.12.006]

肺癌是当前世界各国常见的肿瘤之一,小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)约占原发性肺癌的15%~20%,此型肺癌虽对化疗及放疗敏感,但随着耐药性的产生,后期的治疗难以奏效。因此探究SCLC发病机制,寻求新的治疗方法和标志物尤为重要^[1-2]。E盒结合锌指蛋白2(zinc finger E-box binding homeobox 2, ZEB2)被发现在肿瘤的EMT过程中起关键的调控作用^[3]。近年来,大量研究^[4-6]表明miRNA作为癌基因或抑癌基因参与包括肺癌在内的多种组织肿瘤的细胞生长、凋亡、肿瘤新生血管形成等过程。本课题组通过TargetScann筛选发现ZEB2是miR-9的潜在靶基因,但miR-9在SCLC中的作用尚不明确。因此本研究旨在观察miR-9和ZEB2对SCLC细胞的增殖、周期、迁移、侵袭以及EMT的影响,阐明miR-9在SCLC中的作用及其工作机制,为SCLC靶向治疗提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集2018年2月至2019年11月期间于河北医科大学第四医院肿瘤内科就诊的67例SCLC患者的癌组织及癌旁组织标本。纳入患者术前均未进行化学治疗且术后病理确诊为SCLC,同时排除临床资料不完整和未获得知情同意书签字的患者。所有新鲜标本离体后,均迅速置入液氮中冷冻保存,并经术后病理确诊。所有研究对象均签署知情同意书,本研究方案经所在医院伦理委员会审查批准,操作符合临床试验伦理规范。

1.2 主要材料与试剂

SCLC细胞株NCI-H446购自中国科学院上海细胞库,Lipofectamine™ 2000和逆转录试剂盒均购自日本TaKaRa公司,ECL试剂盒购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司,SDS-PAGE凝胶快速制备试剂盒购自美国Bio-Rad公司,WB实验所用ZEB2、GAPDH一抗和二抗购自美国CST公司,Transwell小室购自美国Corning公司,双荧光素酶报告基因检测试剂盒和载体购自Promega公司,miR-9模拟物、阴性对照购买自吉玛公司。BALB/c小鼠由河北医科大学第四医院动物实验中心提供,动物许可证号:SYXK(冀)

2018-001。

1.3 细胞培养与转染

将NCI-H446细胞按 5×10^5 个/孔接种于6孔板中,加入含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基,置于含5%CO₂、37℃的恒温箱中培养。将NCI-H446细胞分为miR-NC(对照)组、miR-9组以及miR-9+ZEB2组,待细胞生长至60%汇合时,按照转染试剂Lipofectamine™ 2000试剂盒说明书分别转染miR-NC、miR-9模拟物和ZEB2过表达质粒。

1.4 qPCR检测miR-9、ZEB2在SCLC组织和细胞中的表达

使用TRIzol从细胞系或组织中提取总RNA,紫外分光光度法测定RNA的含量,琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。采用逆转录试剂盒将提取的总RNA逆转录为cDNA,按照qPCR试剂盒说明书进行PCR反应,反应体系(20 μl)含2 μl逆转录产物、10 μl SYBR Green Mix、上下游引物各10 μmol/L。PCR反应条件为95℃预变性5 min,94℃变性30 s、60℃退火30 s,进行45个循环。引物序列见表1。miR-9的表达水平以U6为内参,ZEB2的mRNA表达水平以GAPDH为内参,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因相对表达量。

表1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

Target	Primer sequences (5'-3')
miR-9	F: CAAGAGGCGCAAACAAGCC R: GGTTGGCAATACCGTCATCC
ZEB2	F: GTATCCTCGAAGGACAACCCT R: GACATCGGTCAGTGTGATCGT
U6	F: CTCGCTTCGGCAGCACATATACT R: ACGCT-TCACGAATTTGCGTGTC
GAPDH	F: TGTGGGCATCAATGGATTGG R: ACACCATGTATTCCGGGTCAAT

1.5 双荧光素酶报告基因实验验证miR-9与ZEB2基因的靶向关系

采用TargetScan (<http://www.targetscan.org>)进行筛选并发现miR-9在ZEB2的3' UTR上具有潜在的结合位点。构建ZEB2野生型3' UTR荧光素酶报告基因质粒pMIR-ZEB2-WT及其突变型报告基因质粒

pMIR-ZEB2-MUT。将 pMIR-ZEB2-WT 或 pMIR-ZEB2-MUT 质粒与 miR-NC 或 miR-9 模拟物共转染进 NCI-H446 细胞。转染 24 h 后,使用双荧光素酶检测试剂盒检测荧光素酶活性,以萤火虫荧光素酶与海肾荧光素酶活性的比值作为相对荧光素酶活性。

1.6 WB 实验检测蛋白质的表达

采用 RIPA 裂解液提取细胞或组织蛋白,遵照 BCA 法测定蛋白浓度,加入缓冲液后变性蛋白。每泳道加入 30 μg 蛋白,用 12% SDS-PAGE 电泳分离蛋白并将蛋白转到 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h。加入一抗 ZEB2 抗体(1:500),E-cadherin 抗体(1:500),N-cadherin 抗体(1:500),Vimentin 抗体(1:500)和 GAPDH 抗体(1:1 000),GAPDH 为内参。4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。加入辣根过氧化物酶标记的兔二抗(1:1 000),室温孵育 1 h。加 ECL 液暗室发光显影,采集图像并分析。

1.7 免疫组化法检测 ZEB2 在 SCLC 组织中的表达

将 SCLC 患者的癌及癌旁组织石蜡切片置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱中过夜,而后梯度脱蜡、水化。加入 3% H_2O_2 溶液室温孵育 15 min 以阻断内源性过氧化物酶活性。切片置于柠檬酸盐缓冲液并采用微波加热法以修复抗原。加入 5% 的正常羊血清封闭,室温孵育 15 min。加入一抗 ZEB2 抗体(1:100),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。加入辣根过氧化物酶标记的兔二抗(1:200),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。DAB 显色,苏木精室温染色 2 min,脱水和中性树脂封片,正置显微镜观察切片。

1.8 CCK-8 实验检测 miR-9 和 ZEB2 表达对 NCI-H446 细胞增殖的影响

各组 NCI-H446 细胞按 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板,每孔 200 μl 细胞悬液,常规培养 24、48 h 后,参照 CCK-8 试剂盒操作说明书操作向每孔加入 10 μl CCK-8 溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1~2 h 后用酶标仪测定各孔在 450 nm 波长处的光密度(D)值,以 D 值代表细胞增殖水平。

1.9 流式细胞术检测 miR-9 和 ZEB2 表达对 NCI-H446 细胞周期的影响

各组 NCI-H446 细胞重悬后置预冷的 70% 乙醇中固定,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,去除乙醇后用 PBS 洗涤 2 次并加入 100 μl RNase A 液,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,添加 400 μl PI 染色并混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光放置 30 min,用流式细胞仪检测细胞周期。

1.10 Transwell 实验检测 miR-9 和 ZEB2 表达对 NCI-H446 细胞迁移和侵袭的影响

迁移实验:调整各组 NCI-H446 细胞密度为 1×10^6 个/ml,上室加入 100 μl 细胞悬液,下室加入 600 μl 含

10% 胎牛血清的培养基;置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h,取出小室后用 PBS 淋洗 3 次,将小室置于 95% 乙醇中固定 5 min,在 0.5% 结晶紫染色液中染色 10 min 后用 PBS 漂洗去除未结合细胞的染色液,用棉签轻拭去小室滤膜上层的细胞,在显微镜下观察滤膜下层细胞并计数。

侵袭实验:加入 50 μl Matrigel 稀释液到上室以包被滤膜后置于孵箱中 4 h 令包被液晾干,剩余步骤同迁移实验。

1.11 建立动物模型检测 miR-9 对 SCLC 裸鼠移植瘤生长的影响

选用 BALB/c 裸鼠 12 只,4~5 周龄左右,体重 16~19 g。所有裸鼠随机分为对照组($n=6$)和 miR-9 组($n=6$)。两组裸鼠左前上肢腋下处皮下分别接种 0.2 ml 转染 miR-NC 或 miR-9 模拟物的 NCI-H446 细胞单细胞悬液。接种后每 3 d 用游标卡尺测量每只裸鼠移植瘤的最大直径 a 和最小径 b ,计算瘤体积,计算公式为 $V=1/2 \times a \times b^2$,3 周后采用颈椎脱臼法处死全部裸鼠,剥离瘤体,称取瘤质量,拍照,甲醛固定。

1.12 统计学处理

采用 SPSS Statistics 22.0 软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据间的比较采用 t 检验,3 组或 3 组以上的比较采用 one-way ANOVA,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

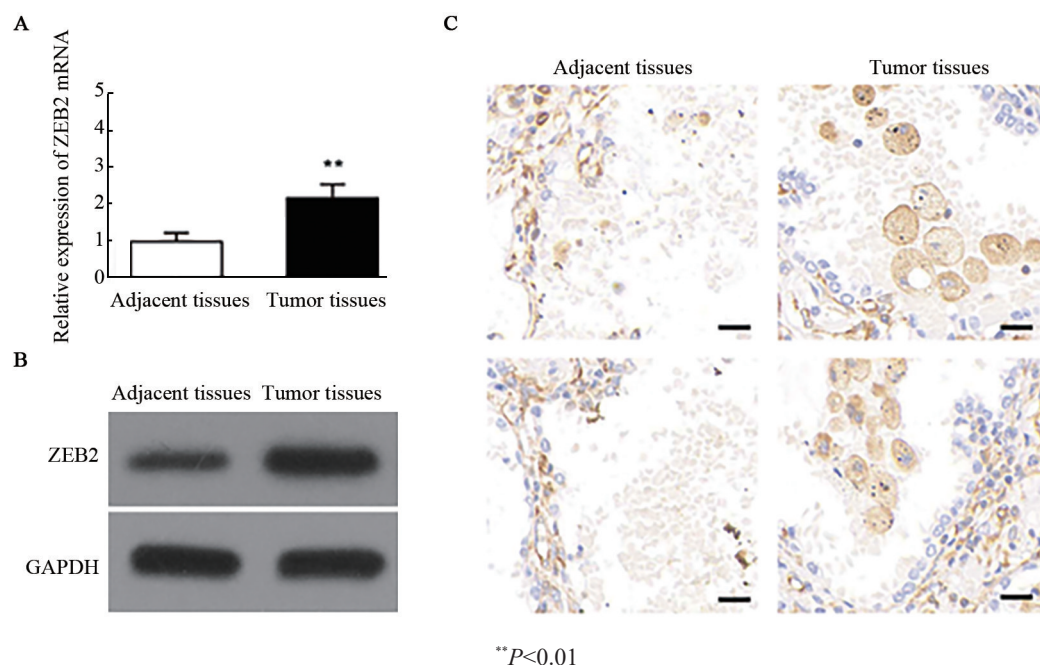
2 结果

2.1 ZEB2 在 SCLC 组织中高表达

qPCR 检测结果(图 1A)显示,SCLC 组织中 ZEB2 的 mRNA 表达水平明显高于癌旁正常组织($P < 0.01$)。WB 和免疫组化检测结果显示,SCLC 组织中 ZEB2 蛋白的表达也明显升高(图 1B、C)。

2.2 ZEB2 是 miR-9 潜在靶基因

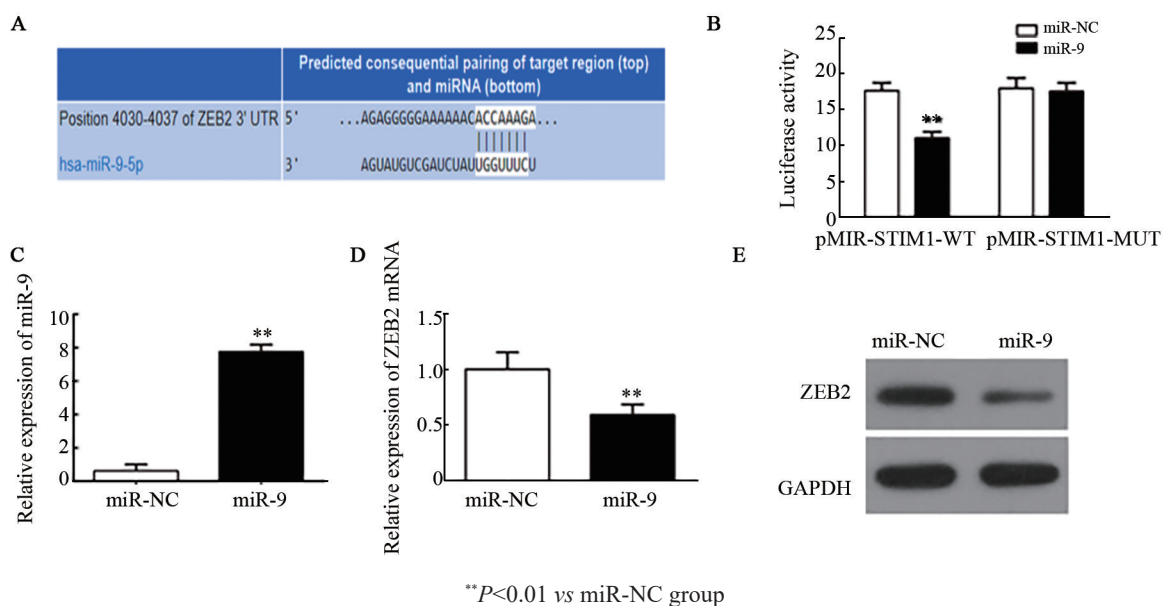
TargetScan 对 miR-9 靶基因的预测结果显示,ZEB2 的 3' UTR 具有潜在的结合位点与 miR-9 形成互补(图 2A)。将 pMIR-ZEB2-WT 质粒或 pMIR-ZEB2-MUT 质粒以及 miR-NC 或 miR-9 模拟物共转染进 NCI-H446 细胞,然后进行双荧光素酶报告基因试验,结果(图 2B)显示,与 miR-NC 组相比,miR-9 组细胞中 pMIR-ZEB2-WT 的荧光素酶活性显著降低($P < 0.01$),而对 pMIR-ZEB2-MUT 的荧光素酶活性无明显影响。qPCR 检测结果(图 2C)显示,miR-9 组 NCI-H446 细胞中 miR-9 的表达水平较 miR-NC 组明显升高($P < 0.01$),说明 miR-9 模拟物转染成功。qPCR 和 WB 检测结果(图 2D、E)显示,miR-9 组 NCI-H446 细胞中 ZEB2 的 mRNA 和蛋白表达较 miR-NC 组均明显降低($P < 0.01$)。



A: qPCR was used to detect ZEB2 expression in SCLC tissues and adjacent tissues; B: WB was used to detect the expression of ZEB2 protein; C: Immunohistochemistry (IHC) was used to detect ZEB2 protein expression, scale bar=20 μm

图1 ZEB2在SCLC组织中的表达(×50)

Fig.1 Expression of ZEB2 in SCLC tissues (×50)



A: TargetScan predicted the potential target genes of miR-9; B: miR-9 overexpression inhibited the luciferase activity in cells transfected with pMIR-ZEB2-WT plasmid; C: The transfection of miR-9 mimics in NCI-H446 cells was successful; D, E: miR-9 overexpression inhibited the mRNA(D) and protein expression of ZEB2 (E) in NCI-H446 cells

图2 miR-9靶向调控ZEB2

Fig. 2 miR-9 targetedly regulated ZEB2

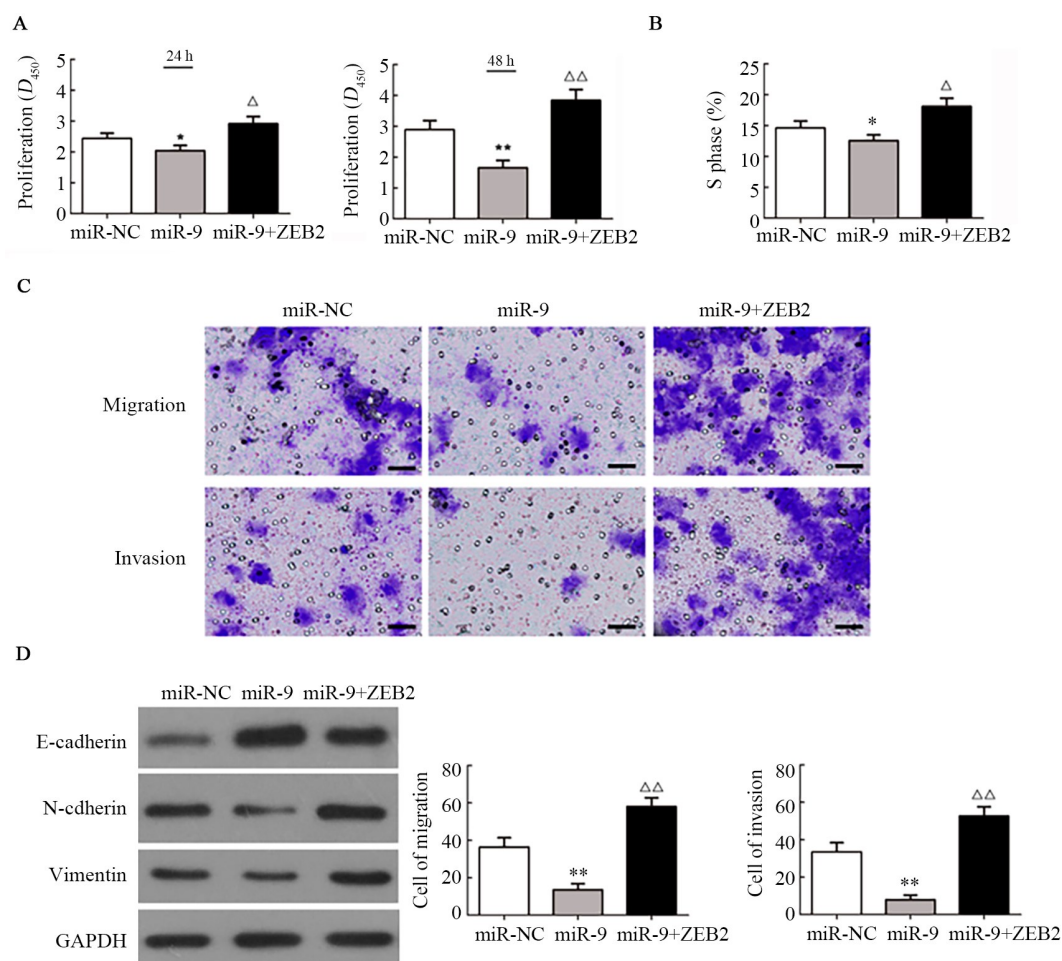
2.3 miR-9和ZEB2对SCLC细胞增殖、周期、迁移、侵袭和EMT的影响

CCK-8法检测结果(图3A)显示,miR-9组NCI-H446细胞的增殖能力明显低于miR-NC组($P < 0.05$),miR-9+ZEB2组的增殖能力较miR-9组明显升高($P < 0.05$)。流式细胞术检测结果(图3B)显

示,与miR-NC组相比,miR-9组中S期NCI-H446细胞比例明显降低($P < 0.05$),但miR-9模拟物+ZEB2组的S期比值明显高于miR-9组($P < 0.05$)。Transwell实验检测结果(图3C)显示,miR-9组NCI-H446细胞的迁移和侵袭能力均较miR-NC组显著降低(均 $P < 0.01$),但miR-9+ZEB2组中这种抑制效果被逆

转(均 $P<0.01$)。WB检测各组细胞中EMT相关蛋白的表达,结果(图3D)显示,相比于miR-NC组,miR-9组中上皮细胞标志物E-cadherin蛋白的表达明显升

高,间质细胞标志物N-cadherin和Vimentin蛋白的表达明显降低。而过表达ZEB2能逆转miR-9模拟物对细胞EMT的抑制效果。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs miR-NC group; [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$ vs miR-9 group

A: Effects of miR-9 and ZEB2 expression on the proliferation of NCI-H446 cells detected by CCK-8 assay; B: Effects of miR-9 and ZEB2 expression on the proportion of NCI-H446 cells at S-phase detected by Flow cytometry; C: Effects of miR-9 and ZEB2 expression on the migration and invasion ability of NCI-H446 cells detected by Transwell assay, scale bar=25 μm (×40); D: Effects of miR-9 and ZEB2 expression on the expression of EMT-related proteins in NCI-H446 cells detected by WB assay

图3 miR-9和ZEB2对SCLC细胞增殖、周期、迁移、侵袭和EMT相关蛋白表达的影响

Fig.3 Effects of miR-9 and ZEB2 on proliferation, cell cycle, migration, invasion and expression of EMT-related proteins in SCLC cells

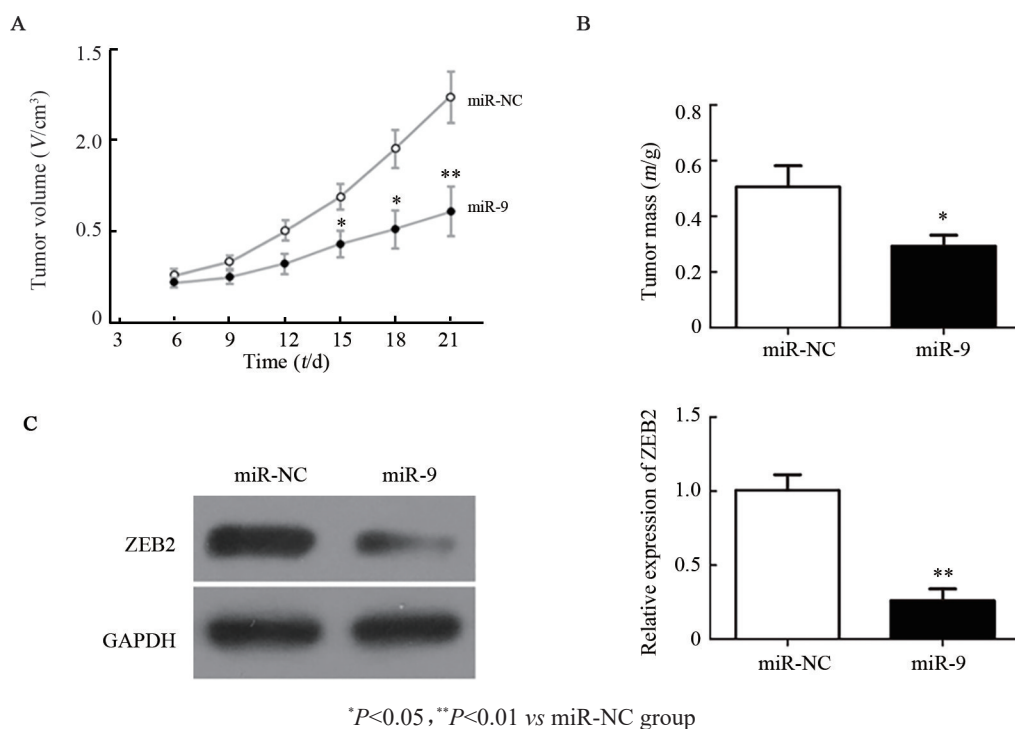
2.4 miR-9和ZEB2在SCLC裸鼠移植瘤模型中的作用

转染miR-NC或miR-9模拟物的NCI-H446细胞单细胞悬液接种于裸鼠皮下构建SCLC裸鼠移植瘤模型,21 d后检测结果显示,miR-9组裸鼠的移植瘤体积明显低于miR-NC组($P<0.01$,图4A),瘤体质量也明显降低($P<0.05$,图4B)。WB检测结果(图4C)显示,miR-9组中裸鼠肿瘤组织中ZEB2蛋白表达较miR-NC组显著降低($P<0.01$)。

3 讨论

ZEB2是E盒结合锌指蛋白家族成员之一,是通

过与靶基因启动子区的E-box结合^[7-8],从而抑制上皮性标志物等靶基因的转录,导致细胞极性丧失和细胞间连接减少。同时,ZEB2的高表达可以促进间质性标志物如vimentin、fibronectin、MMP家族蛋白的表达,诱导EMT的发生^[9-10]。ZEB2和肺癌的发生发展相关^[11]。ZHAO等^[11]研究发现,H19可吸附miR-200a抑制ZEB1和ZEB2的表达,从而促进肺癌的增殖和转移。与以往研究结果类似,本研究发现,SCLC组织中ZEB2的mRNA和蛋白表达水平明显高于癌旁组织,提示ZEB2的高表达可能与SCLC密切相关。



A, B: Overexpression of miR-9 inhibited the growth of transplanted tumors in nude mice; C: Over-expression of miR-9 inhibited ZEB2 expression in transplanted tumor tissues in nude mice

图4 miR-9和ZEB2在SCLC裸鼠移植瘤模型中的作用

Fig.4 Role of miR-9 and ZEB2 in SCLC xenograft model of nude mice

研究^[12]表明,miRNA几乎参与肺癌癌变过程中的所有阶段,是肺癌发生发展中的关键调控分子。如miR-126、miR-206等在肺癌中可能发挥抑癌作用^[14-15],miR-221、miR-21等具有肿瘤促进作用^[16-17]。miRNA的调控是一个复杂的网络,在网络中一个miRNA可调控多个靶基因mRNA,而某个特定的mRNA也可能受到多个miRNA的调控。因此,研究miRNA的工作机制首先需确定其靶基因。已有研究^[18-19]证实miR-9与多种癌症发生有关。SONG等^[20]发现,miR-9-5p可通过靶向SOCS4促进肾癌细胞的增殖和迁移;WANG等^[21]发现,在胰腺癌中,miR-9-5p通过靶向GOT1抑制肿瘤生长。但是miR-9在SCLC中的机制研究鲜有报道。本研究通过TargetScan预测出ZEB2是miR-9的潜在靶基因,并经细胞实验验证miR-9能够特异性结合ZEB2的3'UTR区域并抑制其mRNA和蛋白的表达。提示miR-9可能与SCLC发病机制相关。

为了探究miR-9和ZEB2在SCLC作用机制,本研究进一步通过体外细胞实验观察miR-9和ZEB2对SCLC细胞生物学行为的调控作用。实验结果显示,转染miR-9模拟物能明显抑制细胞的增殖、迁移和侵袭能力,并且提高E-cadherin蛋白的表达、抑制N-cadherin和Vimentin蛋白的表达。但过表达ZEB2能逆转miR-9模拟物的调控效果。表明miR-9是通

过抑制ZEB2的表达从而抑制SCLC细胞生物学行为及EMT。

随后本研究用miR-9过表达NCI-H446细胞构建了SCLC裸鼠移植瘤模型,通过体内实验观察发现,过表达miR-9的裸鼠肿瘤体积和质量以及ZEB2蛋白的表达水平明显低于对照组,说明上调miR-9的表达可能具有抑制SCLC肿瘤生长的作用,并且ZEB2受miR-9的靶向调控。

综上,本研究发现miR-9在SCLC裸鼠移植瘤模型中发挥抑制肿瘤生长的作用,并且能通过靶向调控ZEB2抑制SCLC细胞的增殖、迁移、侵袭以及EMT,表明miR-9可能具有抑制SCLC的作用。

[参考文献]

- [1] GUO L L, WEI T, ZHU W L, et al. miR-495 promotes chemoresistance of SCLC through epithelial-mesenchymal transition via etk/BMX[J]. J Thorac Oncol, 2017, 12(1): S711-S712. DOI: 10.1016/j.jtho.2016.11.937.
- [2] MEN Y, LUO Y, ZHAI Y, et al. The role of postoperative radiotherapy (PORT) in combined small cell lung cancer (C-SCLC)[J]. Oncotarget, 2017, 8(30): 48922-48929. DOI:10.18632/oncotarget.16885.
- [3] 朱志军, 薛亚军, 朱佳龙. miRNA-182通过调节EMT相关分子ZEB2而抑制肺癌细胞转移和侵袭[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(15): 4182-4184. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2015.15.032.
- [4] 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): 865-878. DOI: 10.1142/s0192415x19500459.
- [5] ZHANG X, LI Y, QI P, et al. Biology of miR-17-92 cluster and its progress in lung cancer[J]. *Int J Med Sci*, 2018, 15(13): 1443-1448. DOI:10.7150/ijms.27341.
- [6] ZAPOROZHCHENKO I A, MOROZKIN E S, PONOMARYOVA A A, et al. Profiling of 179 miRNA expression in blood plasma of lung cancer patients and cancer-free individuals[J/OL]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 6348 [2020-05-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29679068/>. DOI:10.1038/s41598-018-24769-2.
- [7] JIANG S B, HE X J, XIA Y J, et al. MicroRNA-145-5p inhibits gastric cancer invasiveness through targeting N-cadherin and ZEB2 to suppress epithelial-mesenchymal transition[J/OL]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 2305-2315 [2020-05-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27143926/>, DOI:10.2147/ott.s101853.
- [8] KUMAR P A, WELSH G I, RAGHU G, et al. Carboxymethyl lysine induces EMT in podocytes through transcription factor ZEB2: Implications for podocyte depletion and proteinuria in diabetes mellitus [J/OL]. *Arch Biochem Biophys*, 2016, 590: 10-19 [2020-05-26]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003986115300965?via%3Dihub>. DOI:10.1016/j.abb.2015.11.003.
- [9] GAUTAM S, FIORAVANTI J, ZHU W, et al. The transcription factor c-Myb regulates CD8⁺T cell stemness and antitumor immunity[J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(3): 337-349. DOI: 10.1038/s41590-018-0311-z.
- [10] ZHU G J, SONG P P, ZHOU H, et al. Role of epithelial-mesenchymal transition markers E-cadherin, N-cadherin, β -catenin and ZEB2 in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(3): 3472-3481. DOI:10.3892/ol.2018.7751.
- [11] ZHAO Y, FENG C, LI Y, et al. LncRNA H19 promotes lung cancer proliferation and metastasis by inhibiting miR-200a function[J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 460(1/2): 1-8. DOI: 10.1007/s11010-019-03564-1.
- [12] LIU C, HU W, LI L L, et al. Roles of miR-200 family members in lung cancer: more than tumor suppressors[J]. *Future Oncol*, 2018, 14(27): 2875-2886. DOI:10.2217/fo-2018-0155.
- [13] LI D J, SUN C C. Editorial: towards miRNA based therapeutics for lung cancer[J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 23(39): 5971-5972. DOI: 10.2174/138161282339180212095249.
- [14] CHEN Q Y, JIAO D M, WU Y Q, et al. MiR-206 inhibits HGF-induced epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in non-small cell lung cancer via c-Met /PI3k/Akt/mTOR pathway[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(14): 18247-18261. DOI:10.18632/oncotarget.7570.
- [15] 杨丽, 刘雪萍, 贺斌峰, 等. miR-126 调控肺鳞癌细胞增殖的作用及机制研究[J]. *中华肺部疾病杂志(电子版)*, 2018, 11(6): 664-669. DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-6902.2018.06.004.
- [16] 郑礼平, 张楠, 梁翠微, 等. miR-221 通过下调 PTEN 促进肺癌 A549 细胞增殖[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(12): 2208-2211. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2017.12.015.
- [17] 刘馨, 兰敏, 陈晓群, 等. miR-370 和 EGFR 在肺癌中的表达及其临床意义[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(1): 94-97. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.01.017.
- [18] SNEZHKINA A V, KRASNOV G S, ZHIKRIVETSKAYA S O, et al. Overexpression of microRNAs miR-9, -98, and -199 correlates with the downregulation of HK2 expression in colorectal cancer[J]. *Mol Biol*, 2018, 52(2): 190-199. DOI:10.1134/S0026893318020140.
- [19] BABION I, JASPERS A, SPLUNTER A P V, et al. miR-9-5p exerts a dual role in cervical cancer and targets transcription factor TWIST1[J/OL]. *Cells*, 2019, 9(1): 65 [2020-05-29]. <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/1/65>. DOI: 10.3390/cells9010065.
- [20] SONG W B, CHEN Y L, ZHU G D, et al. Exosome-mediated miR-9-5p promotes proliferation and migration of renal cancer cells both in vitro and in vivo by targeting SOCS4[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 529(4): 1216-1224. DOI:10.1016/j.bbrc.2020.06.114.
- [21] WANG J, WANG B, REN H, et al. miR-9-5p inhibits pancreatic cancer cell proliferation, invasion and glutamine metabolism by targeting GOT1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 509(1): 241-248. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.12.114.

[收稿日期] 2020-05-13

[修回日期] 2020-09-22

[本文编辑] 黄静怡