

敲降 MIR210HG 通过调控 miR-6838-5p/AIP5 轴抑制裸鼠肺癌移植瘤生长并改善肺血管栓塞特征*

贾依登·肯加别克¹ 曹国磊² 叶斯波力·塔斯恒³ 罗琴²

(新疆医科大学附属肿瘤医院 1. 肺内科; 2. 呼吸神经内科; 3. 肿瘤科, 新疆乌鲁木齐 830011)

【摘要】目的 探讨长链非编码 RNA MIR210HG 对肺癌移植瘤裸鼠肿瘤生长和肺血管栓塞的影响和机制。**方法** 用癌症基因组图谱(TCGA)数据库分析 MIR210HG 在肺癌中的表达。用短发夹 RNA(shRNA)构建敲降 MIR210HG (shMIR210HG)的肺癌细胞系 MDA-MB-231,体外 CCK-8 实验检测敲降 MIR210HG 对 MDA-MB-231 细胞的增殖能力的影响。生物信息学分析 MIR210HG 与 miR-6838-5p 的结合关系。荧光素酶报告基因分析微小 RNA(miR)-6838-5p 与萎缩素相互作用蛋白 5(AIP5)的直接作用。动物实验评估敲降 MIR210HG 对移植瘤裸鼠体内肿瘤生长和裸鼠肺血管栓塞特征的影响。功能回复实验和蛋白免疫印迹实验分析 MIR210HG 通过 miR-6838-5p/AIP5 轴调控裸鼠体内肿瘤生长和裸鼠肺血管栓塞。**结果** MIR210HG 在肺癌组织中高表达($P<0.05$),并与低存活率呈正相关($P<0.05$)。敲降 MIR210HG 抑制体外肺癌细胞增殖和裸鼠体内肿瘤的生长(均 $P<0.05$),敲降 MIR210HG 改善裸鼠肺动脉炎性浸润,明显减少肺评分、降低裸鼠的右心室收缩压(RVSP)、血清 TNF- α 和 IL-6 的水平(均 $P<0.05$)。生信分析预测 MIR210HG 与 miR-6838-5p 具有多个结合位点,且 shMIR210HG 促进 miR-6838-5p 的表达(均 $P<0.05$)。AIP5 被鉴定为 miR-6838-5p 的靶基因。此外,shMIR210HG 可以明显抑制 AIP5 的 mRNA 和蛋白表达(均 $P<0.05$),而 miR-6838-5p inhibitor 促进 AIP5 的 mRNA 和蛋白表达(均 $P<0.05$)。另外,在裸鼠体内敲降 MIR210HG 基础上用 miR-6838-5p inhibitor 治疗或者 AIP5 的过表达质粒(AIP5-OE)治疗后裸鼠体内肿瘤的生长增加,裸鼠肺评分、RVSP、及血清 TNF- α 和 IL-6 的水平均明显增加(均 $P<0.05$)。**结论** 敲降 MIR210HG 通过调控 miR-6838-5p/AIP5 轴能抑制肺移植瘤裸鼠肿瘤生长并改善肺血管栓塞特征。

【关键词】 MIR210HG; AIP5; miR-6838-5p; 肺癌; 肿瘤生长; 肺血管栓塞

【中图分类号】 R734.2 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2023. 05. 007

Knockdown MIR210HG inhibits tumor growth and improves pulmonary embolism in lung cancer transplanted tumor mice by regulating Mir-6838-5P /AIP5 axis

JIAYIDEN Kengjiabieke¹, CAO Guolei², YESIBOLI Tasihen³, LUO Qin²

(1. Department of Pulmonary Medicine, Cancer Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

2. Department of Respiratory Neurology, Cancer Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumq 830011, China;

3. Department of Oncology, Cancer Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of long non-coding RNA MIR210HG on tumor growth and pulmonary vascular embolism in mice with lung cancer transplanted tumor. **Methods** The expression of MIR210HG in lung cancer was analyzed by cancer Genome Atlas (TCGA) database. Short hairpin RNA (shRNA) was used to construct MIR210HG (shMIR210HG) knockdown lung cancer cell line MDA-MB-231. The effect of MIR210HG knockdown on the proliferation of MDA-MB-231 cells was detected by CCK-8 assay in vitro. The binding relationship between MIR210HG and Mir-6838-5p was analyzed by bioinformatics. Luciferase reporter gene analysis of microRNA (Mir-6838-5P) directly interacting with atrophy protein 5 (AIP5). Animal experiments were conducted to evaluate the

基金项目:国家自然科学基金项目(81760014)

通讯作者:罗琴,博士,主任医师,E-mail:1046258997@qq.com

引用本文:贾依登·肯加别克,曹国磊,叶斯波力·塔斯恒,等.敲降 MIR210HG 通过调控 miR-6838-5p/AIP5 轴抑制裸鼠肺癌移植瘤生长并改善肺血管栓塞特征[J].西部医学,2023,35(5):670-678. DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2023. 05. 007

effects of knockdown MIR210HG on tumor growth and pulmonary embolism characteristics in transplanted tumor mice. Functional recovery assay and western blot analysis showed that MIR210HG regulates tumor growth and pulmonary embolism in mice through Mir-6838-5P /AIP5 axis. **Results** MIR210HG was highly expressed in lung cancer tissues ($P<0.05$) and positively correlated with low survival rate ($P<0.05$). Knockdown of MIR210HG inhibited lung cancer cell proliferation in vitro and tumor growth in nude mice (all $P<0.05$). Knockdown of MIR210HG improved pulmonary inflammatory infiltration in nude mice, significantly reduced lung score, right ventricular systolic pressure (RVSP), serum TNF- α and IL-6 levels (all $P<0.05$). Bioassay predicted that MIR210HG had multiple binding sites with miR-6838-5p, and shMIR210HG promoted the expression of miR-6838-5p (all $P<0.05$). AIP5 was identified as the target gene of miR-6838-5p. In addition, shMIR210HG significantly inhibited the mRNA and protein expression of AIP5 (all $P<0.05$), while miR-6838-5p inhibitor promoted the mRNA and protein expression of AIP5 (all $P<0.05$). In addition, in vivo the tumor volume and weight and the level of lung score, RVSP, and serum TNF- α and IL-6 levels were all increased in nude mice after treating with miR-6838-5p inhibitor or AIP5 overexpressed plasmid (AIP5-OE) on the basis of knockdown MIR210HG (all $P<0.05$). **Conclusion** Knockdown MIR210HG inhibits tumor growth and improves pulmonary embolism in lung cancer transplanted tumor mice by regulating miR-6838-5P /AIP5 axis.

【Key words】 MIR210HG; AIP5; miR-6838-5 p; Lung cancer; Tumor growth; Pulmonary vascular embolism

肺癌相关性死亡的主要原因是癌细胞的转移性扩散^[1],肺栓塞是肺癌常见的潜在致命性并发症,肺癌可以让肺栓塞的发病率增加数倍,并使肺癌患者的预后更差^[2]。因此,寻找新的肺癌及肺栓塞的诊断标志物和有效的治疗靶点势在必行。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类长度超过 200 个核苷酸的不编码蛋白质的转录本,在整个基因组中转录,参与几乎所有的生理和病理过程。lncRNA 与多种类型的恶性肿瘤有关,并在肺癌中异常表达,包括非小细胞肺癌(肺鳞癌、肺腺癌、大细胞癌)和小细胞肺癌^[3-4]。而且目前越来越多的也研究证明 lncRNA 是非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC)的潜在治疗靶点^[3]。这些研究强调 lncRNA 在 NSCLC 进展中的关键作用,以及新的生物标志物鉴定在改善 NSCLC 诊断中的重要性^[5]。最近研究认为,lncRNA 可作为 microRNA (miRNA) 的竞争性内源 RNA (ceRNA) 发挥作用,以转录后调节 mRNA 的表达^[6]。研究证明检测 lncRNA MIR210HG 表达水平有助于肿瘤组织与肿瘤相邻的正常组织的分化,这一发现表明 MIR210HG 可能被用作胶质瘤诊断的生物标志物^[7]。研究报道,MIR210HG 还可以作为 miR-503 的分子海绵,促进骨肉瘤细胞的侵袭和转移,揭示了 MIR210HG 在骨肉瘤中的致癌作用^[8]。另外,MIR210HG 是 miR-210 的宿主基因,两者均为低氧诱导激活的非编码 RNA,miR-210 已被多项研究证实具有促进动脉血栓和肺动脉高压的作用^[9],而且低氧环境中 miR-210 具有促进肺动脉平滑肌细胞增殖和抗细胞凋亡的作用^[10]。但是,MIR210HG 对肺癌生长以及肺癌中肺动脉血栓的调控作用并不清楚。因此,本研究旨在调查 MIR210HG

对肺癌生长和肺栓塞标志物的影响并探讨其潜在机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 人 NSCLC 细胞系(MDA-MB-231)购于中科院细胞库;10%胎牛血清购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司;TaqMan human miRNA 检测试剂盒、TRIzol 购于美国 Invitrogen 公司;Power SYBR Green 购于日本 Takara 公司;萎缩素相互作用蛋白 5 (Atrophy interacting protein 5, AIP5) 的过表达载体 pLenti-GIIICMV-Puro 以及 miR-6838-5p inhibitor 和 mimic 购于上海 Genepharma 公司;IL-6 检测试剂盒和 TNF- α 检测试剂盒、结晶紫、MTT 测定试剂盒购于上海 Beyotime 公司;细胞裂解缓冲液购于美国 Sigma 公司;PVDF 膜购于美国 Millipore 公司;AIP5 的一抗购于美国 Abcam 公司;BALB/c 无胸腺裸鼠(4~5 周)由新疆医科大学提供。

1.2 细胞培养 人 NSCLC 细胞系在 37 °C 和 5% CO₂ 环境下的加湿培养箱中培养。MDA-MB-231 细胞在 Eagle's 培养基(EMEM)中培养,培养基中含 10% 胎牛血清和青霉素(100 U/mL)-链霉素(0.1 mg/mL)。

1.3 RNA 提取和 qRT-PCR 检测 用 TRIzol 试剂提取总 RNA 并按制造商的方案逆转录成 cDNA。用 Power SYBR Green 试剂按照试剂盒厂家提供的操作步骤进行 qRT-PCR。将 GAPDH 作为内参基因进行数据处理。根据厂家提供的操作步骤,miR-6838-5p 的表达水平使用 TaqMan 人 miRNA 检测试剂盒进行检测,内参基因为 U6 基因。PCR 引物见表 1,相对表达量采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算。

1.4 质粒构建和转染 AIP5 的 cDNA 克隆至上海吉玛公司提供的哺乳动物表达载体 pLenti-GIIICMV-

Puro 载体中,获得重组载体。将重组载体和 lipofectamine-3000 加入 MDA-MB-231 细胞以建立瞬时过表达 AIP5 的 MDA-MB-231 细胞系。MDA-MB-231 细胞进一步使用 qPT-PCR 和蛋白免疫印迹法进行过表达效果验证。miR-6838-5p inhibitor 和 mimic 购自上海吉玛公司。为构建荧光素酶报告载体,通过 PCR 扩增 AIP5 3'-非翻译区 (UTR) 和含有预测的潜在 miR-6838-5p 结合位点的片段。根据制造商的说明,将 MDA-MB-231 细胞接种在 6 孔板中并使用 lipofectamine-3000 进行转染。转染后 72 h 收集细胞用于实时 PCR 或蛋白免疫印迹检测。MIR210HG 的 shRNA (shMIR210HG) 序列,见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Sequence of primers

基因	序列(5'-3')
AIP5	F- CCTACCATCCTATGAGCGAGTAC R-GCTGGGTTTGTGTAAGAGAGGC
MIR210HG	F-GCTTGGTAGAGTGTCACGCC R-CATTTCGACCGAGCCAGTTTG
miR-6838-5p	F-CCCCTGCGTGTTTATGAAG R- CCTGTACTGGGGGAAGTTCA
MIR210HG (knockdown)	sh-miR210HG-1 * GGAGGGAATTAGAAGC GTT sh-miR210HG-2 * GCATTTACAGGCCAGCCTA
U6	F-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAT R- CGCTTCACGAATTTGCGTGTCTAT
GAPDH	F-CCATGTTTCGTCATGGGTGTG R- GGTGCTAAGCAGTTGGTGGTG

1.5 TCGA 数据预测和分析 MIR210HG 的肺癌临床样本表达数据从 TCGA 数据库 <https://starbase.sysu.edu.cn/> 收集。根据数据分析 MIR210HG 在肺癌中的表达水平和生存期的相关性并获取 MIR210HG 与 miR-6838-5p 的肺癌中相关性分析结果。

1.6 细胞增殖实验 通过 MTT 测定试剂盒检测细胞的增殖率(在转染后 72 h 检测)。将细胞接种到 96 孔板中(每孔 1×10^3 个细胞)。在指定的培养时间后,去除培养基。每孔加入 MTT 试剂。37 °C 下孵育 3 h 后,将 MTT 溶剂添加到每个孔中。使用酶标仪在 520 nm 处检测吸光度,计算存活率。

1.7 荧光素酶报告基因检测 使用 lipofectamine-3000 试剂,将 24 孔板中 70%~80% 融合度的 MDA-MB-231 细胞在指定的荧光素酶报告载体(200 ng)和 miR-6838-5p mimic(50 nM)共转染。转染后 72 h,洗涤细胞并用裂解缓冲液裂解。使用双荧光素酶测定法分析荧光素酶活性。通过对海肾荧光素酶活性作为内参指标获得相对荧光素酶活性。

1.8 蛋白免疫印迹 用 RIPA 缓冲液提取。确定蛋

白质浓度后,按照每条泳道 45 μ g 的总蛋白在 SDS-PAGE 电泳上进行分离,随后转移到 PVDF 膜上。膜用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 缓冲液封闭,然后与抗 AIP5 抗体在 4 °C 下孵育过夜。洗涤后,使用辣根过氧化物酶偶联的二抗进行蛋白质检测。GAPDH 用作内参蛋白。

1.9 动物实验 雄性 BALB/c 无胸腺裸鼠(4~5 周)用于荷瘤实验,在无病原体条件下进行饲养。分为 baseline 组、shNC 组、shMIR210HG 组、shMIR210HG+NC inhibitor 组、shMIR210HG+miR-6838-5p inhibitor 组、shMIR210HG+EV 组及 shMIR210HG+AIP5-OE 组,每组各 6 只。其中 baseline 组为空白对照,即不进行任何处理的 BALB/c 无胸腺裸鼠。而 shNC 组、shMIR210HG 组、shMIR210HG+NC inhibitor 组、shMIR210HG+miR-6838-5p inhibitor 组、shMIR210HG+EV 组以及 shMIR210HG+AIP5-OE 组均用于体内荷瘤实验,分别将转染了 shMIR210HG、shMIR210HG+NC inhibitor、shMIR210HG+miR-6838-5p inhibitor、shMIR210HG+EV、shMIR210HG+AIP5-OE 质粒的 MDA-MB-231 细胞(1.5×10^6 个细胞/裸鼠)皮下接种于裸鼠右下肢下。3 周后研究结束,通过吸入乙醚对裸鼠实施安乐死,收集血清样本,且将肿瘤和肺组织被切除并固定在福尔马林中用于其他实验。肿瘤体积的计算公式为:肿瘤体积(mm^3) = $L(\text{length}) \times W^2(\text{width}) \times 0.5$ 。本研究涉及的动物实验均获得我院伦理委员会审批的通过(批号:DW210158)。

1.10 右心室收缩压(RVSP)检测 分别用动物血压计检测 baseline 组、shNC 组、shMIR210HG 组、shMIR210HG+NC inhibitor 组、shMIR210HG+miR-6838-5p inhibitor 组、shMIR210HG+EV 组以及 shMIR210HG+AIP5-OE 组的 RVSP。接种肿瘤细胞后 3 周穿刺测右心室收缩压(Right ventricular systolic blood pressure, RVSP)。每组随机选择 3 只裸鼠使用水合氯醛(10 mg/kg)麻醉后,将 Millar 超微压力导管(SRP 型)插入到右心室,导管另一端连接气血信号采集处理器,根据血压波形移动变化准确插入到右心室,测量裸鼠的 RVSP。

1.11 肺系数测定 动物麻醉后处死,迅速分离全肺组织,吸水自轻轻吸干肺表面,电子天平称量肺组织湿重,肺系数 = (肺湿重/体重) $\times 100$ 。

1.12 肺小动脉 H&E 染色 肺系数测定完成后,迅速分离右肺下叶近肺门组织块,制作 5 μ m 厚的石蜡切片后,根据 H&E 染色试剂盒提供的步骤进行染色。

1.13 酶联免疫吸附实验(ELISA) 按 IL-6 检测试剂盒和 TNF- α 检测试剂盒提供的 ELISA 实验操作分析收集到的血清样本中 IL-6 和 TNF- α 的水平。

1.14 统计学分析 采用 GraphPad PRISM 5.01 进行数据录入和统计学分析,正态分布的数据以($\bar{x} \pm s$)表示。用单因素方差分析(ANOVA)评估平均值之间的差异,并进行 LSD- t 的多重比较,以评估两组之间的统计差异。检验水准为 $\alpha=0.05$ 。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MIR210HG 在肺癌组织中高表达 为研究 MIR210HG 在肺癌中的表达,本研究通过 TCGA 数据库(<https://starbase.sysu.edu.cn/panGeneDiffExp.php#>)比较了肺腺癌(LUAD)和肺鳞癌(LUSC)组织与各自配对的正常组织(Normal)中 MIR210HG 的表达差异。通过 TCGA 数据分析,发现与 Normal 组比,LUAD 和 LUSC 中 MIR210HG 显著性上调($P=2.3 \times 10^{-10}$, 1.4×10^{-28}),见图 1。

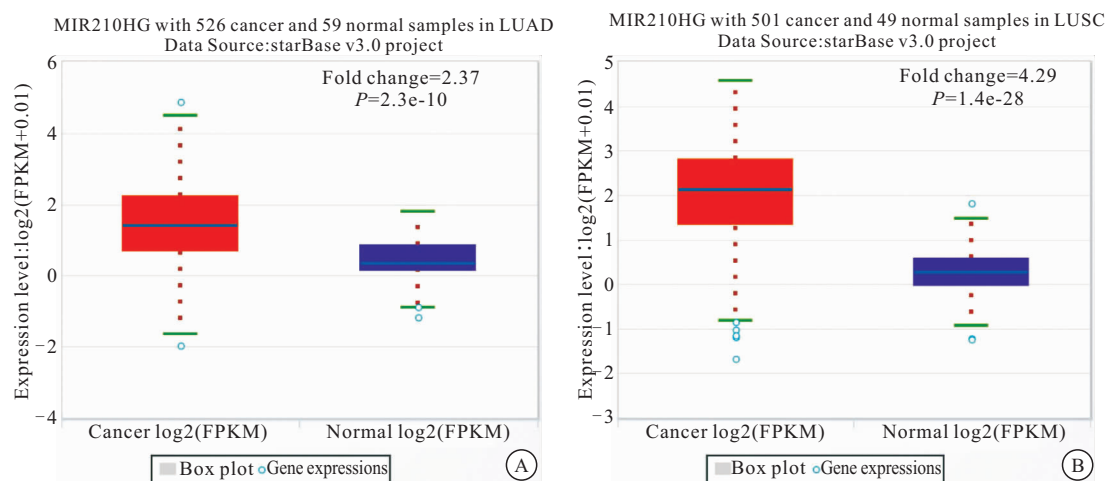


图 1 通过 TCGA 数据库比较肺癌组织与正常组织中 MIR210HG 的表达水平

Figure 1 The expression level of MIR210HG in lung cancer tissues and normal tissues was compared by TCGA database

注: A. 肺腺癌; B. 肺鳞癌。

2.2 MIR210HG 表达与肺癌生存的相关性 进一步分析发现 MIR210HG 的高表达与肺癌预后差密切相关,

其中 LUSC 生存率较差与 MIR210HG 表达量呈正相关($P=0.048$),见图 2。

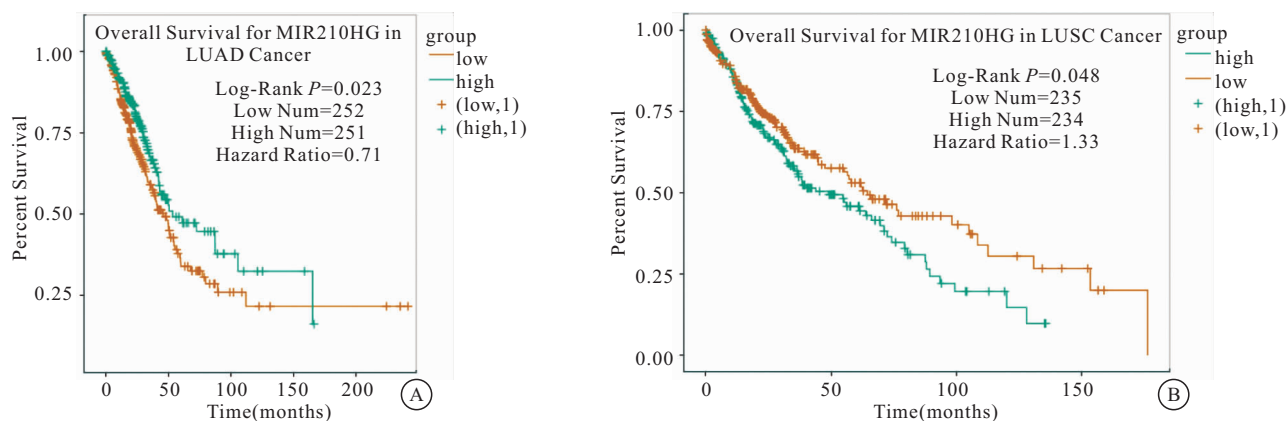


图 2 通过 TCGA 数据库分析肺癌组织中 MIR210HG 的表达水平与患者生存率的关系

Figure 2 The relationship between the expression level of MIR210HG and the survival rate of patients in lung cancer tissues was analyzed by TCGA database

注: A. 肺腺癌; B. 肺鳞癌。

2.3 敲降 MIR210HG 抑制 NSCLC 的生长 用 shMIR210HG 敲降肺癌细胞系 MDA-MB-231 中的 MIR210HG,与 shNC 组比较,shMIR210HG 组的 MIR210HG 的表达水平明显降低($P<0.05$)。MTT 实验结果显示 shMIR210HG 组明显较 shNC 组 MDA-MB-231 的增殖率显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。为

研究 MIR210HG 在体内的生物学作用,本研究在裸鼠中建立了异种移植肿瘤模型。将用 shMIR210HG 或 shNC 转染的 MDA-MB-231 细胞皮下注射到裸鼠中。与用 shNC 转染的细胞相比,转染 sh-MIR210HG 细胞的小裸鼠肿瘤体积更小,重量更轻($P<0.05$),表明敲降 MIR210HG 抑制 NSCLC 的生长,见图 3。

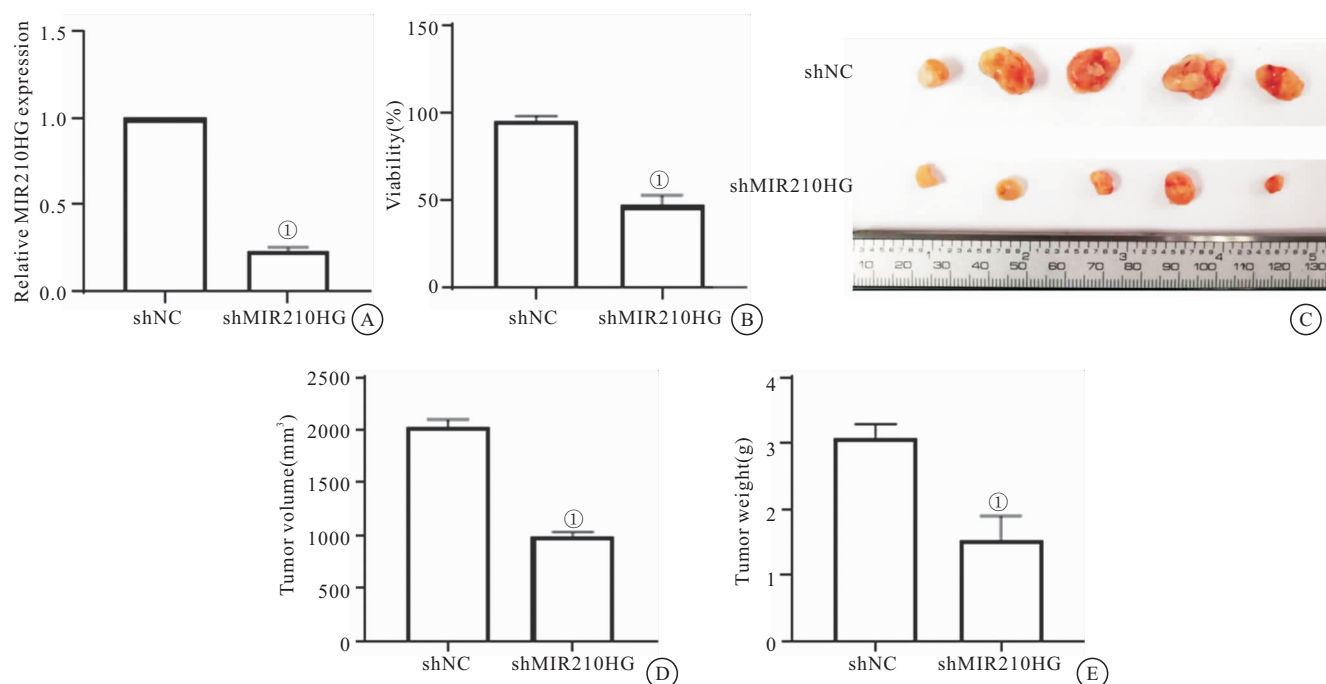


图 3 敲降 MIR210HG 抑制 NSCLC 的生长

Figure 3 Knocking down MIR210HG inhibits the growth of NSCLC

注:A. 敲降 MIR210HG 后,qRT-PCR 法检测 MIR210HG 在肺癌细胞系 MDA-MB-231 中的表达;B. CCK-8 检测敲低 MIR210HG 对细胞增殖的抑制作用;C. 裸鼠体内种植 MDA-MB-231 细胞和敲低 MIR210HG 的 MDA-MB-231 细胞 3 周后肿瘤的生长情况;D. 瘤体积;E. 肿瘤质量。与 shNC 组比较,① $P<0.05$ 。

2.4 敲降 MIR210HG 改善裸鼠的肺栓塞特征 为了研究 MIR210HG 对荷瘤裸鼠肺栓塞特征的影响,本研究分别检测了空白对照组,shNC 组,shMIR210HG 组裸鼠的 RVSP、肺组织病理变化和血清 TNF- α 和 IL-6 的相对水平。首先,与基础值(baseline 组)(19.58 ± 4.25) mmHg 相比,shNC 组中 RVSP(28.63 ± 3.98) mmHg 明显增高,但 shMIR210HG 组裸鼠的 RVSP(22.53 ± 2.06)较 shNC 组又明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。其次,与 baseline 组比,shNC 组的肺组织发生病理性改变,H&E 染色观察到肺动脉内出现明显血栓,而肺泡壁和间质增厚。而 shMIR210HG 组血栓明显减少,肺泡壁和间质明显变薄。且与 shNC 组(0.92 ± 0.04)比,shMIR210HG 组的肺系数(0.79 ± 0.03)明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。另外,本研究还观察到 shNC 组血清的 TNF- α 和 IL-6 相对水平均较空白对照组明显增加,差异均有统计学意义($P<0.05$),而 shMIR210HG 组血清的 TNF- α 和 IL-6 相对水平均较 shNC 组降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 4。

2.5 MIR210HG 调控 miR-6838-5p/AIP5 轴 探索 MIR210HG 调控肿瘤生长和肺栓塞作用的潜在机制。使用 starBase V3.0 (<http://starbase.sysu.edu.cn/index.php>) 预测发现关键的抑癌微小 RNA(miR)-

6838-5p 和 MIR210HG 共享互补序列(图 5A),且在肺癌中表达量呈负相关($r=-0.052$, $P=2.57e-1$),见图 5B。另外,通过分析发现 miR-6838-5p 与 AIP5 也共享互补序列(图 5C),因此本研究专注于 miR-6838-5p 与 AIP5 的相互作用。荧光素酶基因报告实验结果显示 miR-6838-5p mimic 转染后抑制了 MDA-MB-231 细胞中 AIP-3'UTR-WT 报告基因的荧光素酶活性($P<0.05$),然而 MDA-MB-231 细胞中 AIP-3'UTR-MUT 报告基因的荧光素酶活性无明显变化($P>0.05$),见图 5D,表明 miR-6838-5p 与 AIP5 具有直接靶向关系。进一步通过 qRT-PCR 和蛋白免疫印迹实验研究发现,shMIR210HG 可以促进 miR-6838-5p 的表达并抑制 AIP5 的表达,差异均有统计学意义($P<0.05$)。miR-6838-5p mimic 也可以靶向抑制 AIP5,差异均有统计学意义($P<0.05$),而 miR-6838-5p inhibitor 可以明显促进 AIP5 的蛋白水平,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 5E~5J。

2.6 MIR210HG 通过调控 miR-6838-5p/AIP5 轴抑制肺癌细胞的增殖和裸鼠肿瘤生长及肺栓塞特征 为进一步研究 miR-6838-5p 调节肺癌肿瘤进展的机制,本研究在裸鼠体内敲降 MIR210HG 基础上用 miR-6838-5p inhibitor 或 AIP5 的过表达质粒(AIP5-OE)治疗裸鼠。与 shMIR210HG + NC inhibitor 组比,

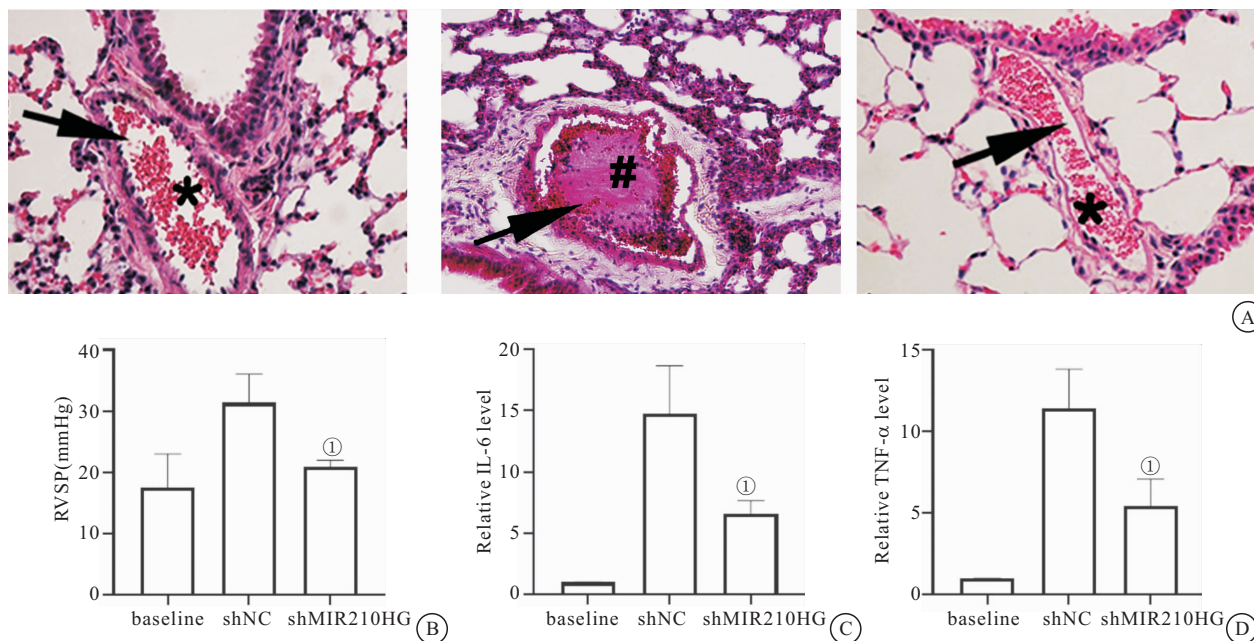


图 4 敲降 MIR210HG 对裸鼠肺栓塞特征的影响

Figure 4 Effect of MIR210HG knockdown on characteristics of pulmonary embolism in nude mice

注: A. 肺动脉组织 H&E 染色(40×), 黑色箭头标记炎性细胞浸润, * 为无栓塞, # 为肺动脉栓塞; B. 右心室收缩压(RVSP)变化; C 和 D. ELISA 法检测裸鼠血清中 IL-6 和 TNF- α 的水平。①与 shNC 比较, $P < 0.05$ 。

shMIR210HG+miR-6838-5p inhibitor 组的肿瘤体积和肿瘤质量明显增加, 且裸鼠肺系数、RVSP、血清 TNF- α 和 IL-6 的水平明显增加, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与 shMIR210HG + EV 组比, shMIR210HG+AIP5-OE 组的肿瘤体积和肿瘤质量明显增加, 而且裸鼠的肺系数、RVSP、及血清 TNF- α 和 IL-6 的水平亦明显增加, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图 6。

3 讨论

本研究表明 MIR210HG 可以通过抑制 miR-6838-5p 表达促进肺癌细胞的体内和体外生长, MIR210HG 高表达与肺癌生存期差有关。研究首先检测 MIR210HG 在肺癌患者的肿瘤组织以及 NSCLC 细胞系中的表达。功能研究表明, MIR210HG 促进 MDA-MB-231 细胞的增殖和体内成瘤, 并具有促进肺组织动脉血栓的潜力。此外, 敲降 MIR210HG 通过高表达 miR-6838-5p 抑制 AIP5 蛋白, 明显抑制了细胞的增殖和肿瘤的生长并抑制肺动脉血栓的形成和炎症。因此, 本研究表明 MIR210HG 可以作为治疗 NSCLC 的有前景的潜在治疗靶点。

MIR210HG 编码的 lncRNA MIR210HG 和 miR-210 均被报道为低氧诱导的宿主基因, 而且 MIR210HG 的内含子中含有 miR-210^[11-12]。miR-210 均通常具有致癌特性, 因为它经常在多种癌症中升高, 包括肺癌、肝癌和前列腺癌, 而且 miR-210 已被多次证明

调控动脉血管栓塞的发展^[13-15], 但是 MIR210HG 在肺癌和肺栓塞中的作用并不清楚。

Voellenkle 等^[16]发现 MIR210HG 是由内皮细胞和后肢缺血裸鼠模型中的缺氧诱导的, 表明在缺氧中具有调节功能。而且一个共表达网络研究揭示包含 lncRNA MIR210HG、SNHG1 和 LOC729970 网络介导胰腺癌的耐药性^[17]。这些信息可能说明了 MIR210HG 在肿瘤生物学中的功能^[18]。与之前研究结果一致, 本研究首先利用 TCGA 数据确定与邻近的正常组织相比, MIR210HG 在肺癌组织中高表达, 并且表达的增加与患者生存较差呈正相关。功能缺失实验表明, MIR210HG 的下调抑制了非小细胞肺癌细胞的体外增殖。此外, 与对照组相比, MIR210HG 的下调抑制体内肿瘤的生长、肺评分, 肺动脉栓塞特征以及炎症标志物 IL-6 和 TNF- α 。因此, 本研究结果揭示 MIR210HG 敲低对肺癌肿瘤生长和肺栓塞特征具有抑制作用。因此, MIR210HG 可以作为非小细胞肺癌治疗的关键靶点。

MIR210HG 作为 miRNA 的“分子海绵”在多种癌症中发挥关键作用^[8,19]。而且 MIR210HG 已被证实其他类型肿瘤中影响 miR-503 的表达^[8]。基于生物信息学预测结果, 本研究发现 miR-6838-5p 是 MIR210HG 的潜在靶点。通过 qRT-PCR 分析发现敲降 MIR210HG 可以显著性上调 miR-6838-5p。而且 miR-6838-3pinhibitor 可以明显恢复因敲降 MIR210

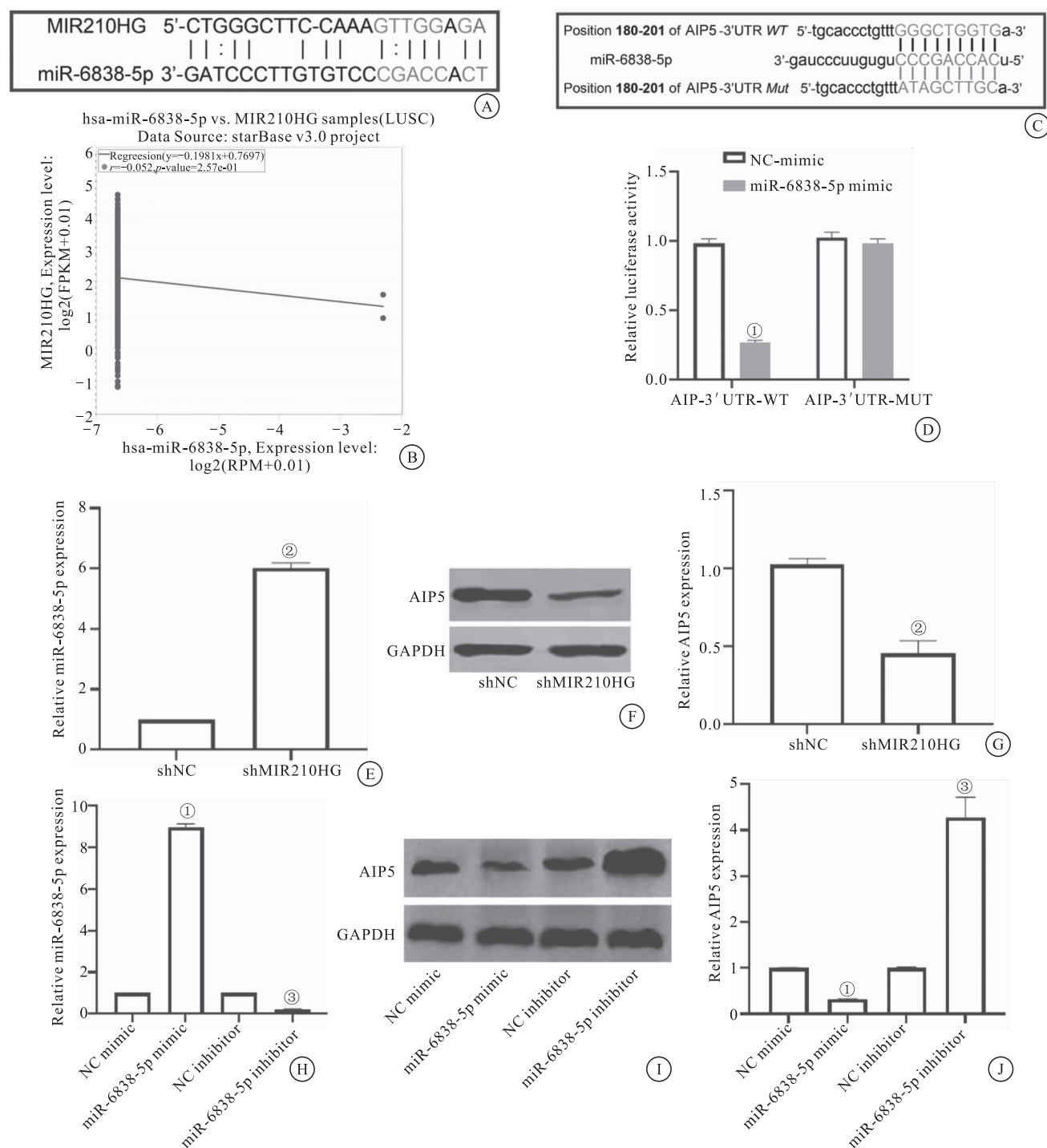


图 5 MIR210HG 调控 miR-6838-5p/AIP5 轴

Figure 5 MIR210HG regulating miR-6838-5p/AIP5 axis

注: A. MIR210HG 和 miR-6838-5p 的序列碱基的结合; B. TCGA 数据库分析 LUSC 中 MIR210HG 和 miR-6838-5p 的表达呈负相关; C. AIP5 和 miR-6838-5p 的序列碱基的结合; D. 野生型 (WT) 和突变型 (Mut) AIP5 报告基因和 miR-6838-5p mimic 共转染的人 MDA-MB-231 细胞中的荧光素酶报告基因检测结果, 与 NC mimic 比较, ① $P < 0.05$; E. qRT-PCR 结果显示 miR-6838-5p 在 MDA-MB-231 细胞中被 shMIR210HG 上调, 与 shNC 比较, ② $P < 0.05$; F, G. 蛋白免疫印迹结果显示 AIP5 在 MDA-MB-231 细胞中被 shMIR210HG 下调, 与 shNC 比较, ② $P < 0.05$; H. qRT-PCR 结果表明 miR-6838-5p 在 MDA-MB-231 细胞中被 miR-6838-5p mimic 和 inhibitor 调控, 与 NC mimic 比较, ③ $P < 0.05$; 与 NC inhibitor 比较, ③ $P < 0.05$; I, J. 蛋白免疫印迹结果显示 AIP5 在 MDA-MB-231 细胞中被 miR-6838-5p mimic 和 inhibitor 调控。与 NC mimic 比较, ① $P < 0.05$; 与 NC inhibitor 比较, ③ $P < 0.05$ 。

HG 导致的肿瘤生长降低和肺栓塞特征的增加。

有研究表明, 与健康对照相比, miR-6838-5p 在乳

腺癌和胃癌的表达降低, 而且其过表达可以明显抑制肿瘤细胞的生长^[20-21]。而本研究表明 miR-6838-5p 被

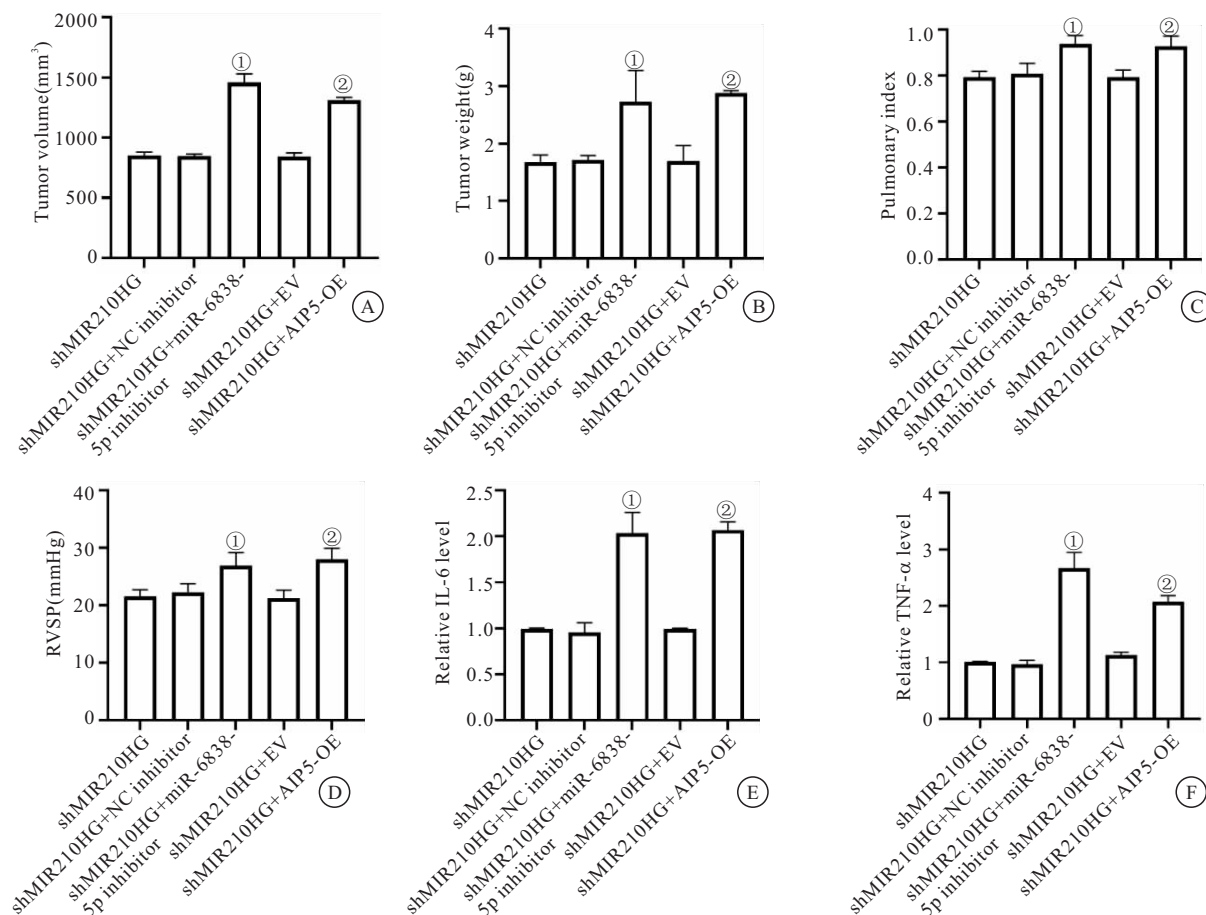


图6 MIR210HG通过调控miR-6838-5p/AIP5轴抑制肺癌细胞的增殖和裸鼠肿瘤生长及肺栓塞特征

Figure 6 MIR210HG through regulating miR-6838-5p/AIP5 axis to inhibition the lung cancer cell proliferation and nude mice growth and the characteristics of pulmonary embolism

注:在敲降 MIR210HG 基础上用 miR-6838-5p inhibitor 或者 AIP5 的过表达质粒(AIP5-OE)治疗裸鼠。A. 肿瘤体积;B. 肿瘤质量;C. 肺评分;D. 右心室收缩压;E. 血清中 IL-6 的相对水平;F. 血清中 TNF- α 的相对水平。与 shMIR210HG+NC inhibitor 组比较,① $P < 0.05$;与 shMIR210HG+EV 组比较,② $P < 0.05$ 。

其 inhibitor 抑制后可以明显促进肿瘤的生长和肺部评分以及炎症因子表达。而且既往研究表明,AIP5 又称含 WW 结构域的 E3 泛素蛋白连接酶 1(WW domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 1, WWP1),是一种可以通过稳固 NSCLC 干细胞特征从而促进肺癌进展的关键基因^[22-23]。在多种肿瘤中可被 miRNA 上调从而促进肿瘤的进展^[24-25]。本研究中观察到 NSCLC 细胞中 AIP5 的水平可以被 miR-6838-3p 的负调控,通过荧光素酶基因报告实验,证实了 miR-6838-3p 对 AIP5 的靶向调控关系。另外,MIR210HG 的沉默抑制了肿瘤的生长,而 AIP5 的过表达逆转了这一趋势,表明 MIR210HG 负向调控 miR-6838-3p 的表达,从而促进了 AIP5 表达,并因此参与肺癌的发展。本研究还发现,过表达 AIP5 可逆转下调 MIR210HG 对肺栓塞的抑制作用。miR-6838-3p inhibitor 和过表达 AIP5 的作用效果都一致,MIR210HG 敲降的作用可以被 miR-6838-3p inhibitor 所逆

转。以上研究结果提示 MIR210HG 通过调 miR-6838-3p/AIP5 轴促进肺癌和肺栓塞的进展。

4 结论

本研究揭示了 MIR210HG 在肺癌中的致癌功能。MIR210HG 水平升高与肿瘤预后呈正相关。MIR210HG 可以负调控 miR-6838-5p,因此通过调控 miR-6838-5p 的靶基因 AIP5 促进肺癌和肺栓塞的进展。

【参考文献】

- [1] POPPER H H. Progression and metastasis of lung cancer[J]. Cancer and Metastasis Reviews, 2016, 35(1): 75-91.
- [2] LI Y, SHANG Y, WANG W, *et al.* Lung cancer and pulmonary embolism: what is the relationship? A review[J]. Journal of Cancer, 2018, 9(17): 3046-3047.
- [3] YANG J, LIN J, LIU T, *et al.* Analysis of lncRNA expression profiles in non-small cell lung cancers (NSCLC) and their clinical subtypes[J]. Lung cancer, 2014, 85(2): 110-115.

- [4] GONG W J, YIN J Y, LI X P, *et al.* Association of well-characterized lung cancer lncRNA polymorphisms with lung cancer susceptibility and platinum-based chemotherapy response[J]. *Tumor Biology*, 2016, 37(6): 8349-8358.
- [5] YANG J, LIN J, LIU T, *et al.* Analysis of lncRNA expression profiles in non-small cell lung cancers (NSCLC) and their clinical subtypes[J]. *Lung cancer*, 2014, 85(2): 110-115.
- [6] SEO D, KIM D, CHAE Y, *et al.* The ceRNA network of lncRNA and miRNA in lung cancer[J]. *Genomics & Informatics*, 2020, 18(4): 1-11.
- [7] MIN W, DAI D, WANG J, *et al.* Long noncoding RNA miR210HG as a potential biomarker for the diagnosis of glioma[J]. *PloS one*, 2016, 11(9): e0160451.
- [8] LI J, WU Q M, WANG X Q, *et al.* Long noncoding RNA miR210HG sponges miR-503 to facilitate osteosarcoma cell invasion and metastasis[J]. *DNA and cell biology*, 2017, 36(12): 1117-1125.
- [9] RAITOHARJU E, LYYTIKÄINEN L P, LEVULA M, *et al.* miR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 219(1): 211-217.
- [10] BAO Q, JIA H, RONG A, *et al.* MiR-210 inhibits hypoxia-induced apoptosis of smooth muscle cells via targeting MEF2C[J]. *International journal of clinical and experimental pathology*, 2019, 12(5): 1846.
- [11] LI Z Y, XIE Y, DENG M, *et al.* c-Myc-activated intronic miR-210 and lncRNA MIR210HG synergistically promote the metastasis of gastric cancer[J]. *Cancer letters*, 2022, 526(1): 322-334.
- [12] SHI W, TANG Y, LU J, *et al.* MIR210HG promotes breast cancer progression by IGF2BP1 mediated m6A modification[J]. *Cell & Bioscience*, 2022, 12(1): 1-15.
- [13] LIN J, ZHANG X, XUE C, *et al.* The long noncoding RNA landscape in hypoxic and inflammatory renal epithelial injury[J]. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2015, 309(11): F901-F913.
- [14] EILERTSEN M, ANDERSEN S, AL-SAAD S, *et al.* Positive prognostic impact of miR-210 in non-small cell lung cancer[J]. *Lung cancer*, 2014, 83(2): 272-278.
- [15] GROSSO S, DOYEN J, PARKS S K, *et al.* MiR-210 promotes a hypoxic phenotype and increases radioresistance in human lung cancer cell lines[J]. *Cell death & disease*, 2013, 4(3): e544-e544.
- [16] VOELLENKLE C, GARCIA-MANTEIGA J M, PEDROTTI S, *et al.* Implication of Long noncoding RNAs in the endothelial cell response to hypoxia revealed by RNA-sequencing[J]. *Scientific reports*, 2016, 6(1): 1-13.
- [17] LI D, QIAN X, XU P, *et al.* Identification of lncRNAs and their functional network associated with chemoresistance in SW1990/GZ pancreatic cancer cells by RNA sequencing[J]. *DNA and cell biology*, 2018, 37(10): 839-849.
- [18] KANG X, KONG F, HUANG K, *et al.* LncRNA MIR210HG promotes proliferation and invasion of non-small cell lung cancer by upregulating methylation of CACNA2D2 promoter via binding to DNMT1[J]. *OncoTargets and therapy*, 2019, 12: 3779.
- [19] WANG A H, JIN C H, CUI G Y, *et al.* MIR210HG promotes cell proliferation and invasion by regulating miR-503-5p/TRAF4 axis in cervical cancer[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(4): 3205-3212.
- [20] LIU G, WANG P, ZHANG H. MiR-6838-5p suppresses cell metastasis and the EMT process in triple-negative breast cancer by targeting WNT3A to inhibit the Wnt pathway[J]. *The journal of gene medicine*, 2019, 21(12): e3129.
- [21] ZHOU W, DING X, JIN P, *et al.* miR-6838-5p Affects Cell Growth, Migration, and Invasion by Targeting GPRIN3 via the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Gastric Cancer[J]. *Pathobiology*, 2020, 87(6): 327-337.
- [22] YU J, ZHOU D, YANG X, *et al.* TRIB3-EGFR interaction promotes lung cancer progression and defines a therapeutic target[J]. *Nature communications*, 2020, 11(1): 1-16.
- [23] TUNG C H, HUANG M F, LIANG C H, *et al.* α -Catulin promotes cancer stemness by antagonizing WWP1-mediated KLF5 degradation in lung cancer[J]. *Theranostics*, 2022, 12(3): 1173-1185.
- [24] ZHAO P, WANG M M, AN J, *et al.* A positive feedback loop of miR-30a-5p-WWP1-NF- κ B in the regulation of glioma development[J]. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2019, 112: 39-49.
- [25] GOTO Y, KOJIMA S, KUROZUMI A, *et al.* Regulation of E3 ubiquitin ligase-1 (WWP1) by microRNA-452 inhibits cancer cell migration and invasion in prostate cancer[J]. *British journal of cancer*, 2016, 114(10): 1135-1144.

(收稿日期: 2022-03-22; 修回日期: 2022-09-24; 编辑: 张翰林)