

# LncRNA H19 通过海绵 miR-675 和上调 CDH13 的表达促进肺癌的增殖、侵袭和上皮-间质转化\*

杜伟<sup>1</sup> 王山水<sup>2</sup> 张焕焕<sup>3</sup>

(1. 青岛大学附属医院呼吸内科, 山东 青岛 266071; 2. 济宁医学院附属高唐县人民医院 ICU, 山东 聊城 252800;

3. 济宁医学院附属高唐县人民医院呼吸内科, 山东 聊城 252800)

**【摘要】目的** 探讨 LncRNA H19 对肺癌 SPC-A1 细胞增殖、侵袭和上皮-间质转化(EMT)的影响及其作用机制。**方法** 实时荧光定量 PCR 检测 LncRNA H19、miR-675 和 CDH13 在 SPC-A1 细胞、BEAS-2B 细胞中的差异表达; siRNA H19 转染 SPC-A1 细胞, 通过 MTT、Transwell 及 Western blot 检测 SPC-A1 细胞的增殖、侵袭和 EMT 能力。miRanda 软件和双荧光素酶报告基因实验分析 LncRNA H19 和 miR-675 之间的作用靶点和相关性。miR-675 inhibitor 转染 SPC-A1 细胞, 检测 SPC-A1 细胞的增殖、侵袭和 EMT 能力。检测上调 LncRNA H19 通过 miR-675 对 SPC-A1 细胞增殖、侵袭和 EMT 的影响。TargetScan 软件和双荧光素酶报告基因实验分析 miR-675 和 CDH13 之间的作用靶点和相关性。siRNA CDH13 转染 SPC-A1 细胞, 检测 SPC-A1 细胞的增殖、侵袭和 EMT 能力。RT-qPCR 和 Western blot 检测 LncRNA H19 通过 miR-675 对 CDH13 表达的影响。**结果** 与 BEAS-2B 细胞相比, SPC-A1 细胞中 LncRNA H19 和 CDH13 表达上调, miR-675 表达下调( $P < 0.05$ )。siRNA H19 转染 SPC-A1 细胞明显抑制了细胞的增殖、侵袭与 EMT; LncRNA H19 靶向且负调控 miR-675; 上调 LncRNA H19 通过 miR-675 表达促进 SPC-A1 细胞恶性发展。miR-675 靶向且负调控 CDH13。siRNA CDH13 转染 SPC-A1 细胞明显抑制了细胞的增殖、侵袭与 EMT。LncRNA H19 通过 miR-675 上调 CDH13 表达。**结论** LncRNA H19 通过海绵 miR-675 和上调 CDH13 表达促进了 SPC-A1 细胞增殖、侵袭和 EMT。

**【关键词】** Lnc RNA H19; miR-675; CDH13; SPC-A1 细胞; 增殖; 侵袭

**【中图分类号】** R329.2<sup>+</sup>5; R734.2 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2022.08.006

## LncRNA H19 promoted the proliferation, invasion and EMT of lung cancer through sponge miR-675 and up-regulation of CDH13 expression

DU Wei<sup>1</sup>, WANG Shanshui<sup>2</sup>, ZHANG Huanhuan<sup>3</sup>

(1. Department of Respiratory Medicine, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong, China;

2. Department of ICU, Gaotang People's Hospital Affiliated to Jining Medical College, Liaocheng 252800, Shandong, China;

3. Department of Respiratory Medicine, Gaotang People's Hospital Affiliated to Jining Medical College, Liaocheng 252800, Shandong, China)

**【Abstract】Objective** To investigate the effects of lncRNA H19 on proliferation, invasion and EMT of lung cancer SPC-A1 cells and its mechanism. **Methods** The differential expressions of LncRNA H19, miR-675 and CDH13 in SPC-A1 cells and BEAS-2B cells were detected by real-time quantitative PCR. SPC-A1 cells were transfected with siRNA H19, and the proliferation, invasion and EMT ability of SPC-A1 cells were detected by MTT, Transwell and Western blot assay. The target and correlation between LncRNA H19 and miR-675 were analyzed by miRanda and dual luciferase reporter gene assay. SPC-A1 cells were transfected with miR-675 inhibitor to detect the proliferation, invasion and EMT ability of SPC-A1 cells. The effects of upregulated LncRNA H19 on proliferation, invasion and EMT of SPC-A1 cells via miR-675 were detected. TargetScan and dual luciferase reporter assay were used to analyze the target and correlation between miR-675 and CDH13. SPC-A1 cells were transfected with siRNA CDH13 to detect the proliferation, invasion and EMT ability of SPC-A1 cells. The effect of LncRNA H19 on CDH13 expression through miR-675 was detected by

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81703033); 山东省医药卫生科技发展计划项目(2018WS008)

**引用本文:** 杜伟, 王山水, 张焕焕. LncRNA H19 通过海绵 miR-675 和上调 CDH13 的表达促进肺癌的增殖、侵袭和上皮-间质转化[J]. 西部医学, 2022, 34(8): 1121-1127, 1132. DOI:10.3969/j.issn.1672-3511.2022.08.006

RT-qPCR and Western blot. **Results** Compared to BEAS-2B cells, the expressions of LncRNA H19 and CDH13 were up-regulated ( $P < 0.01$ ), the expression of miR-675 was down-regulated ( $P < 0.01$ ) in SPC-A1 cells. The proliferation, invasion and EMT of SPC-A1 cells were significantly inhibited by siRNA H19 transfection. LncRNA H19 targeted and negatively regulated miR-675. Upregulation of LncRNA H19 through miR-675 or down-regulation of miR-675 expression promoted the malignant development of SPC-A1 cells. miR-675 targeted and negatively regulated CDH13. The proliferation, invasion and EMT of SPC-A1 cells were significantly inhibited by siRNA CDH13 transfection. LncRNA H19 up-regulated the expression of CDH13 by miR-675. **Conclusion** LncRNA H19 promoted proliferation, invasion and EMT of SPC-A1 cells through spongy miR-675 and up-regulation of CDH13 expression.

**【Key words】** LncRNA H19; miR-675; CDH13; SPC-A1 cells; Proliferation; Invasion

肺癌是世界上最主要的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。尽管肺癌治疗技术的不断发展,但患者 5 年生存率仍然很低<sup>[2]</sup>。此外,肺癌患者在治疗后经常复发,甚至出现在早期。因此,深入了解肺癌发生发展的分子机制,对于寻找新的治疗靶点和开发新的治疗方法具有重要意义。长链非编码 RNA(Long non-coding RNAs, LncRNA)是一种有 200 多个核苷酸且缺乏开放阅读框架的 RNA<sup>[3]</sup>。LncRNA 参与多种生物学过程,包括细胞生长、肿瘤发生和肿瘤转移<sup>[4-5]</sup>。印迹基因 H19 是 1990 年首次发现的 LncRNA。H19 在多种癌症中异常表达,包括胃癌、肺癌、结肠癌和肝癌<sup>[6-7]</sup>。研究表明, H19 调控上皮间质转化(Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT),促进癌细胞增殖和转移<sup>[8]</sup>。另外研究表明 LncRNA 通过海绵吸附微小 RNA(miRNA)来发挥其生物学功能<sup>[9]</sup>。例如, H19 海绵 miR-138 提高 HMG1 的表达,从而促进结肠癌的迁移和侵袭<sup>[10]</sup>。LncRNA H19 通过靶向 miR-675/EH22 调控结肠癌细胞的增殖<sup>[11]</sup>。miR-141 通过调控 LncRNA H19 和 LncRNA H19 衍生的 miR-675 的靶基因调控成骨细胞增殖<sup>[12]</sup>。有报道称 H19 在肺癌中过表达,并与细胞增殖相关,但目前尚不清楚 H19 在肺癌中是否还有其他功能及作用机制。有研究发现在胰腺癌细胞、前列腺癌细胞转移进程和头颈部鳞状细胞癌的发生过程中 LncRNA H19 与 miR-675 具有靶向作用<sup>[13-15]</sup>,然而在肺癌 SPC-A1 细胞发展中二者是否具有同样的靶向作用仍不明确。因此,本实验主要通过探讨 LncRNA H19 对肺癌 SPC-A1 细胞发展的影响,进一步阐明肺癌的发病机制。

## 1 材料与方 法

1.1 细胞及实验试剂 肺癌 SPC-A1 细胞、A549 细胞、HCC827 细胞和人正常肺上皮 BEAS-2B 细胞购自中国科学院上海细胞库。DMEM 培养基选购自山东致圣生物科技有限公司。Trizol 购自北京百奥莱博科技有限公司。MTT 检测试剂盒购自上海碧云天生物科技有限公司。H19 siRNA、pcDNA-H19、CDH13 siRNA 等质粒由上海生物工程有限公司合成。Tran-

swell 小室购自 Corning 公司。miR-675 抑制剂和 miR-675 模拟物来自 Genepharma 公司。E-钙粘蛋白(E-cadherin)、N-钙粘蛋白(N-cadherin)、GAPDH 及其 CDH13 抗体购自 Cell Signaling 公司。

### 1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 将肺癌 SPC-A1 细胞、A549 细胞、HCC827 细胞和人正常肺上皮 BEAS-2B 细胞用含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM,在 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养。培养基中添加 100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素,细胞汇合至 95% 时消化传代。

1.2.2 细胞转染 培养 SPC-A1 细胞至生长密度为 90% 左右时加入胰蛋白酶消化,用含 10% FBS 的 DMEM 重悬细胞并接种至 12 孔板,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱过夜孵育,观察细胞密度达 70% 时,PBS 清洗 1 次,用 Turbofect 试剂将质粒转染 SPC-A1 细胞,持续在标准培养箱中培养。

1.2.3 细胞活力测定 以  $1.5 \times 10^3$ /孔的密度将 SPC-A1 细胞接种于 96 孔板,每组设 3 个复孔,用 Turbofect 试剂将质粒转染 SPC-A1 细胞,48 h 后检测细胞增殖能力。检测时每孔细胞加入 20  $\mu$ L 浓度为 5 mg/mL 的噻唑蓝(MTT),孵育 4 h,每孔细胞加入 150  $\mu$ L 二甲基亚砜(DMSO),10 min 后在酶联免疫检测仪 570 nm 处测量各孔细胞吸光度值,重复 3 次后取平均值。

1.2.4 双荧光素酶报告基因活性检测 先进行 LncRNA H19 及其 miR-675 靶基因的预测,接着构建 H19 野生型、H19 突变型、CDH13 野生型、CDH13 突变型载体,再分别与 Genepharma 公司合成的 miR-675 模拟物、模拟物对照共转染至细胞,分析 48 h 后的荧光素酶活性。

1.2.5 细胞侵袭实验 将已铺好 Matrigel 基质的 Transwell 上室静置 12 h。将转染 48 h 的 SPC-A1 细胞常规消化,用无 FBS 的培养基稀释细胞密度为  $1.0 \times 10^5$ /mL,将稀释后的 200  $\mu$ L 细胞悬液加入小室上层,Transwell 下层加入 500  $\mu$ L 含 10% FBS 的 DMEM,

培养箱孵育 24 h, 4% 多聚甲醛固定 SPC-A1 细胞, 0.1% 结晶紫染色浸染 20 min, 置于显微镜下观察 SPC-A1 细胞侵袭情况。

1.2.6 实时定量 PCR 利用 Trizol 法分别提取转染成功的 SPC-A1 细胞总 RNA 并逆转录为 cDNA。采用 SYBR Green RT-PCR 试剂盒按照说明书的方案进行实时定量 PCR 检测, 以 GAPDH 为内参, 计算  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  值作为相对表达量, 实验重复 3 次以上。反应如下: 95℃ 预变性 20 s, 95℃ 10 s, 60℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 10 s, 共 40 个循环。RT-qPCR 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')
LncRNA H19-F	TACAACCACTGCACTACCTG
LncRNA H19-R	TGGAATGCTTGAAGGCTGCT
miR-675-F	ACACTCCAGCTGGGTGTATGCCCTAAC
miR-675-R	CTCAACTGGTGTCTGTGGAGT
CDH13-F	TTCAGCAGAAAAGTGTTCATAT
CDH13-R	GTGCATGGACGAACAGAGT
GAPDH-F	CAAGGACCTCTACGCCAACAC
GAPDH-R	TGGAGCGCGATGATCTT

1.2.7 Western blot 检测转染成功后的 SPC-A1 细胞总蛋白 提取转染成功后的 SPC-A1 细胞总蛋白, 取 50  $\mu$ g 蛋白进行蛋白质样品在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳上分离, 转移到聚偏二氟乙烯膜上。用 5% 脱脂牛奶在室温下封闭膜 2 h, 与特异性一

抗(GAPDH、E-cadherin、N-cadherin 和 CDH13)在 4℃ 孵育过夜; TBST 清洗膜 5 次, PVDF 膜与二抗 37℃ 孵育 1 h; TBST 洗膜 5 次, 根据蛋白大小分析条带。

1.3 统计学分析 通过 Graphpad prism 5.0 软件分析, 符合正态分布的数据用  $(\bar{x} \pm s)$  表示。分析两两比较采用 *t* 检验。  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 H19 siRNA 转染 SPC-A1 细胞后分析敲低 H19 表达对细胞增殖、侵袭及 EMT 的影响 首先利用 RT-qPCR 技术分析了 SPC-A1、A549、HCC827 细胞和 BEAS-2B 细胞中 H19 的差异表达, 结果显示 SPC-A1 (2.98  $\pm$  0.25)、A549 (2.47  $\pm$  0.75)、HCC827 (2.06  $\pm$  0.51) 细胞中 LncRNA H19 表达量明显高于 BEAS-2B 细胞 (1.25  $\pm$  0.16) ( $P < 0.05$ ), 且 LncRNA H19 在 SPC-A1 细胞中的表达量最高, 因此后续实验选择 SPC-A1 细胞用于研究。培养 SPC-A1 细胞, 分别转染 H19 siRNA 及其对照 siRNA NC 质粒, 48 h 后分析细胞活性, 分析 MTT 结果发现 siRNA 敲低 H19 在 SPC-A1 细胞中的表达后显著下调细胞活力 ( $P < 0.05$ ), 见图 1A; 进一步分析 Western blot 及其 Transwell 结果可知, siRNA 能敲降 H19 在 SPC-A1 细胞中的表达后明显降低了 N-cadherin/GAPDH 值 ( $P < 0.05$ ), 并减少了细胞侵袭数目 ( $P < 0.05$ ), 却上调了 E-cadherin/GAPDH 值 ( $P < 0.05$ ), 见图 1B~E。

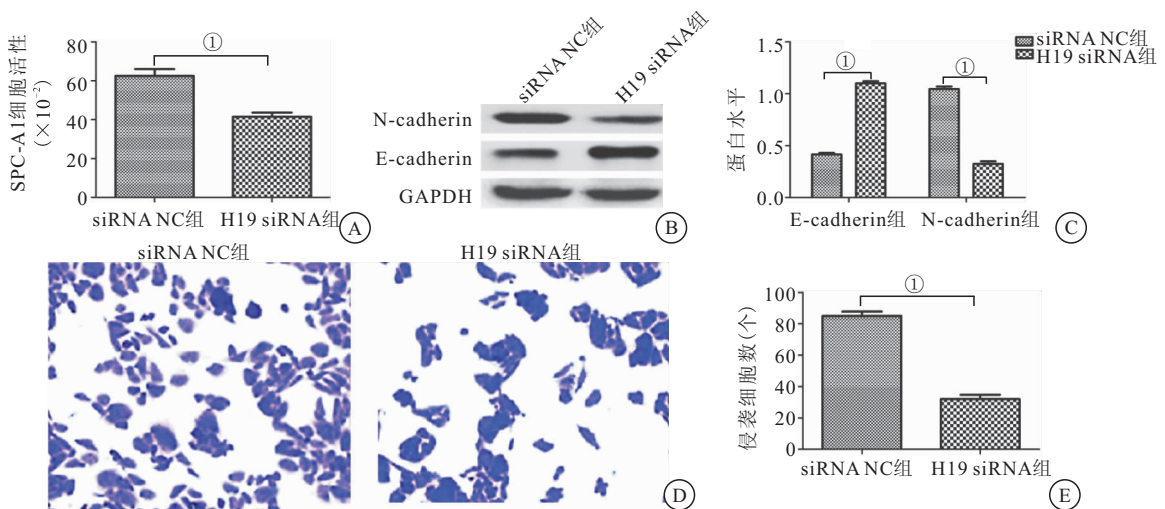


图 1 下调 LncRNA H19 抑制 SPC-A1 细胞的增殖、侵袭及 EMT

Figure 1 Downregulation of LncRNA H19 inhibited proliferation, invasion and EMT of SPC-A1 cells

注: A、B 分别通过 MTT、Western blot 检测敲低 LncRNA H19 对 SPC-A1 细胞增殖和 EMT 的影响; C. EMT 相关蛋白相对表达量; D. Transwell 检测敲低 LncRNA H19 对 SPC-A1 细胞侵袭的影响; E. SPC-A1 细胞侵袭数目。与 H19 siRNA 组比较, ①  $P < 0.05$

2.2 LncRNA H19 直接靶向结合 miR-675 先通过 miRanda 分析预测 LncRNA H19 3'UTR 与其潜在作用靶点 miR-675 的结合位点(图 2A)。后续研究结果

表明转染 H19 wt 的双荧光素酶报告实验中, miR-675 mimics 组 SPC-A1 细胞荧光素酶活性明显低于 mimics NC 组 ( $P < 0.05$ ), 转染 H19 mut 的双荧光素

酶报告实验中,和 mimics NC 组对比,miR-675 mimics组 SPC-A1 细胞荧光素酶活性比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见图 2B。RT-qPCR 结果显示,

LncRNA H19 siRNA 组 SPC-A1 细胞内 miR-675 表达量( $1.83\pm 0.98$ )明显高于 siRNA NC 组( $0.92\pm 0.27$ )( $P<0.05$ )。

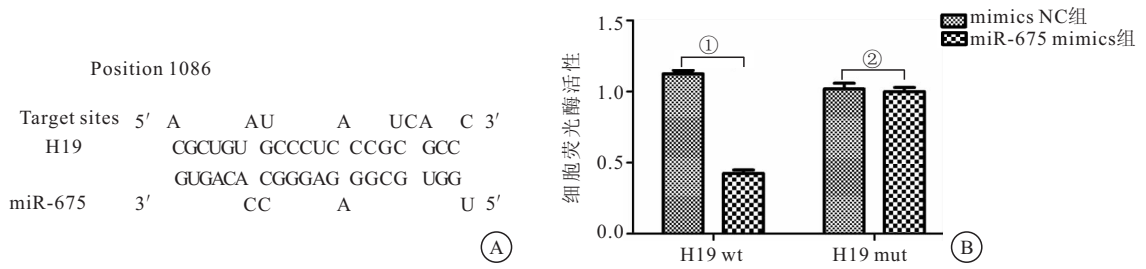


图 2 miRanda 及其双荧光素酶报告法验证 LncRNA H19 与 miR-675 之间的靶向关系

Figure 2 miRanda and dual-luciferase reporting method verified the targeting relationship between LncRNA H19 and miR-675

注:与 mimics NC 组比较,① $P<0.05$ ;与 mimics NC 组比较,② $P>0.05$

2.3 下调 miR-675 促进 SPC-A1 细胞的增殖、侵袭及 EMT 首先利用 RT-qPCR 技术分析了 SPC-A1 和 BEAS-2B 细胞中 miR-675 的差异表达,结果显示 SPC-A1 细胞中 miR-675 表达量( $0.27\pm 0.83$ )明显低于 BEAS-2B 细胞( $1.09\pm 0.53$ )( $P<0.05$ )。培养 SPC-A1 细胞,分别转染 miR-675 inhibitor 及其对照 inhibitor NC 质粒,48 h 后分析细胞活性,分析 MTT

结果发现敲降 miR-675 在 SPC-A1 细胞中的表达后显著上调细胞活力( $P<0.05$ ),见图 3A;进一步分析 Western blot 及其 Transwell 结果可知,敲降 miR-675 在 SPC-A1 细胞中的表达后明显降低了 E-cadherin/GAPDH 值( $P<0.05$ ),并上调了细胞侵袭数目( $P<0.05$ )和 N-cadherin/GAPDH 值( $P<0.05$ ),见图 3B~E。

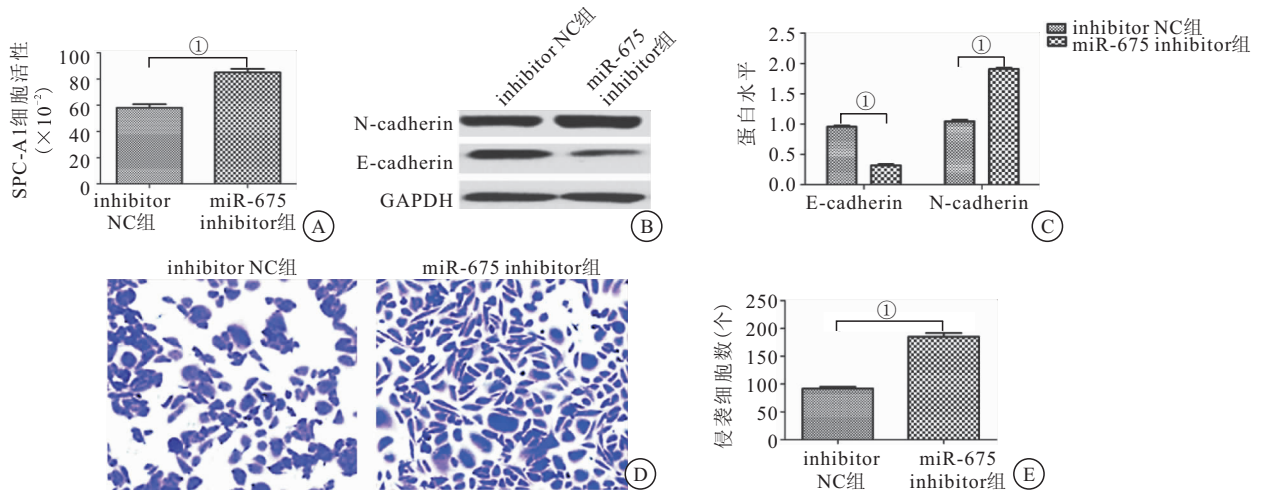


图 3 下调 miR-675 促进 SPC-A1 细胞的增殖、侵袭及 EMT

Figure 3 Down-regulation of miR-675 promoted proliferation, invasion and EMT of SPC-A1 cells

注:A、B 分别通过 MTT、Western blot 和 Transwell 检测敲减 miR-675 对 SPC-A1 细胞增殖、EMT 的影响;C: EMT 相关蛋白相对表达量;D: 通过 Transwell 检测敲减 miR-675 对 SPC-A1 细胞侵袭的影响;E: SPC-A1 细胞侵袭数目。与 miR-675 inhibitor 组比较,① $P<0.05$

2.4 过表达 LncRNA H19 与 miR-675 后进一步分析 SPC-A1 细胞的增殖、侵袭及 EMT 情况 过表达 H19 后显著上调了 SPC-A1 细胞活力、细胞侵袭数目与 N-cadherin 表达( $P<0.05$ ),却下调了 E-cadherin 表达( $P<0.05$ ),而过表达 miR-675 显著下调了细胞活力、细胞侵袭数目与 N-cadherin 表达( $P<0.05$ ),却上调了 E-cadherin 表达( $P<0.05$ )。与过表达 miR-675 组对比,过表达 H19 及 miR-675 上调了 SPC-A1 细胞活力、细胞侵袭数目与 N-cadherin 表达( $P<$

$0.05$ ),却下调了 E-cadherin 表达( $P<0.05$ )。见图 4。

2.5 miR-675 与 CDH13 之间的靶向和负调控关系

TargetScan 预测的 miR-675 与 CDH13 的结合位点(图 5A)。转染 CDH13 wt 的双荧光素酶报告实验中,miR-675 mimics 组 SPC-A1 细胞荧光素酶活性明显低于 mimics NC 组( $P<0.05$ ),转染 CDH13 mut 的双荧光素酶报告实验中,和 mimics NC 组对比,miR-675 mimics 组 SPC-A1 细胞荧光素酶活性无显著差异( $P>0.05$ ),见图 5B。RT-qPCR 结果显示,miR-675

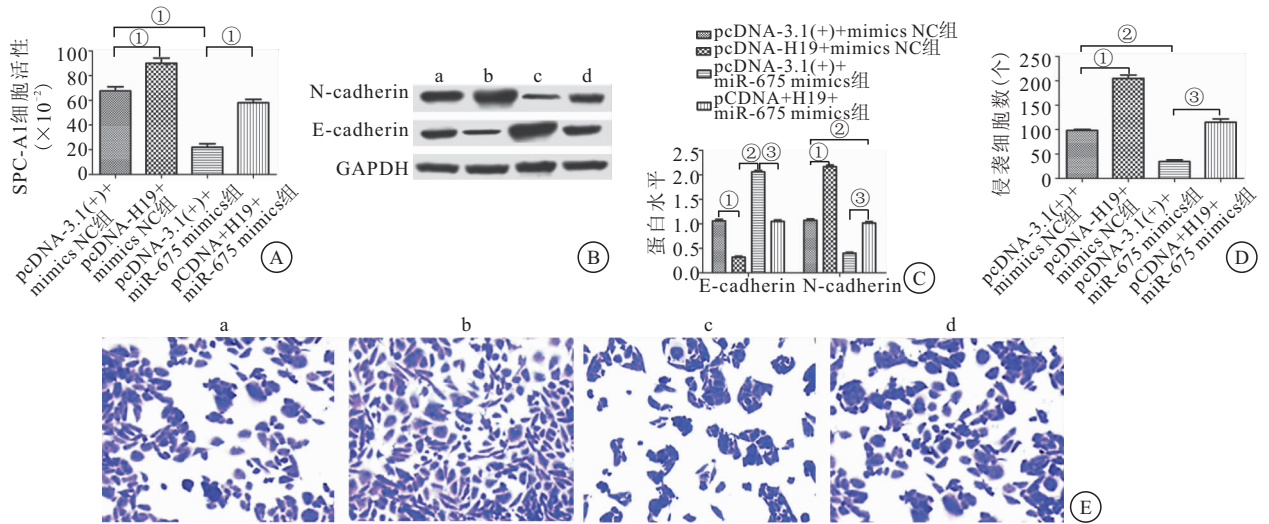


图 4 上调 Lnc RNA H19 通过 miR-675 促进 SPC-A1 细胞的增殖、侵袭及 EMT

Figure 4 Upregulation of LncRNA H19 promoted proliferation, invasion and EMT of SPC-A1 cells through miR-675

注: A、B 分别通过 MTT、Western blot 检测上调 LncRNA H19 通过 miR-675 对 SPC-A1 细胞增殖、EMT 的影响; C. EMT 相关蛋白相对表达量; D. SPC-A1 细胞侵袭数目; E. 通过 Transwell 法检测上调 LncRNA H19 通过 miR-675 对 SPC-A1 细胞侵袭的影响。a. pcDNA-3.1(+)+mimics NC 组; b. pcDNA-H19+mimics NC 组; c. pcDNA-3.1(+)+miR-675 mimics 组; d. pcDNA-H19+miR-675 mimics 组。与 pcDNA-H19+mimics NC 组比较, ① $P < 0.05$ ; 与 pcDNA-3.1(+)+miR-675 mimics 组比较, ② $P < 0.05$ ; 与 pcDNA-H19+miR-675 mimics 组比较, ③ $P < 0.05$

inhibitor 组 SPC-A1 细胞内 CDH13 表达量( $2.03 \pm 0.45$ )明显高于 inhibitor NC 组( $1.03 \pm 0.54$ ) ( $P < 0.01$ )。

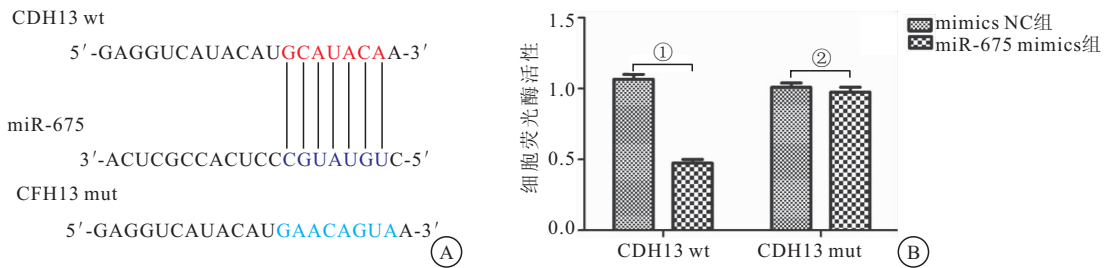


图 5 TargetScan 及其双荧光素酶报告法验证 miR-675 与 CDH13 的关系

Figure 5 TargetScan and dual luciferase reporting method verified the relationship between miR-675 and CDH13

注: 与 mimics NC 组比较, ① $P < 0.05$ ; 与 mimics NC 组比较, ② $P > 0.05$

2.6 CDH13 siRNA 转染 SPC-A1 细胞后分析敲低 CDH13 表达对细胞增殖、侵袭及 EMT 的影响 首先利用 RT-qPCR 技术分析了 SPC-A1 和 BEAS-2B 细胞中 CDH13 的差异表达, 结果显示 SPC-A1 细胞中 CDH13 表达量( $2.21 \pm 0.52$ )明显高于 BEAS-2B 细胞( $1.13 \pm 0.45$ ) ( $P < 0.05$ )。培养 SPC-A1 细胞, 分别转染 CDH13 siRNA 及其对照 siRNA NC 质粒, 48 h 后分析细胞活性, 分析 MTT 结果发现 siRNA 能敲降 CDH13 在 SPC-A1 细胞中的表达后显著下调细胞活力( $P < 0.05$ ), 见图 6A; 进一步分析 Western blot 及其 Transwell 结果可知, siRNA 技能敲降 CDH13 在 SPC-A1 细胞中的表达后明显降低了 N-cadherin/GAPDH 值( $P < 0.05$ ), 并减少了细胞侵袭数目( $P <$

$0.05$ ), 却上调了 E-cadherin/GAPDH 值( $P < 0.05$ ), 见图 6B~E。

2.7 LncRNA H19、miR-675 与 CDH13 之间的调控关系 pcDNA-H19+mimics NC 组 CDH13 mRNA 和蛋白表达量明显高于 pcDNA-3.1(+)+mimics NC 组, pcDNA-3.1(+)+miR-675 mimics 组 CDH13 mRNA 及蛋白表达量明显低于 pcDNA-3.1(+)+mimics NC 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。pcDNA-H19+miR-675 mimics 组 CDH13 mRNA 及蛋白表达量明显高于 pcDNA-3.1(+)+miR-675 mimics 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 7。以上结果表明 LncRNA H19 与 CDH13 存在正调控关系, miR-675 与 CDH13 存在负调控关系, LncRNA H19 可能通过 miR-675 调控 CDH13 表达。

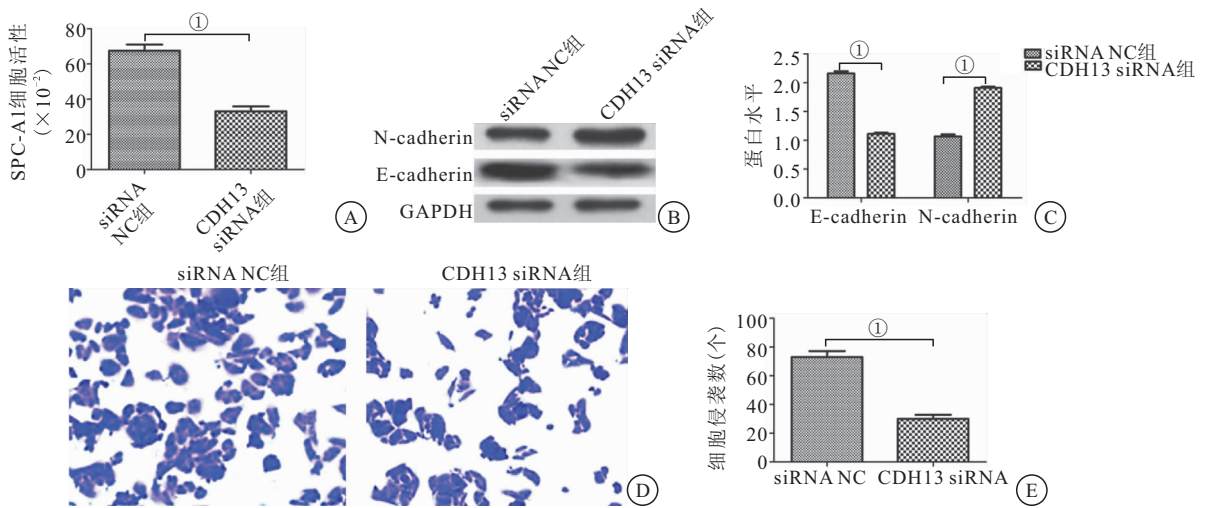


图 6 下调 CDH13 抑制 SPC-A1 细胞的增殖、侵袭及 EMT

Figure 6 Down-regulation of CDH13 inhibited proliferation, invasion and EMT of SPC-A1 cells

注: A、B 分别通过 MTT、Western blot 检测敲减 CDH13 对 SPC-A1 细胞增殖、EMT 的影响; C. EMT 相关蛋白相对表达量; D. Transwell 检测敲减 CDH13 对 SPC-A1 侵袭的影响; E. SPC-A1 细胞侵袭数目。与 CDH13 siRNA 组比较, ① $P < 0.05$

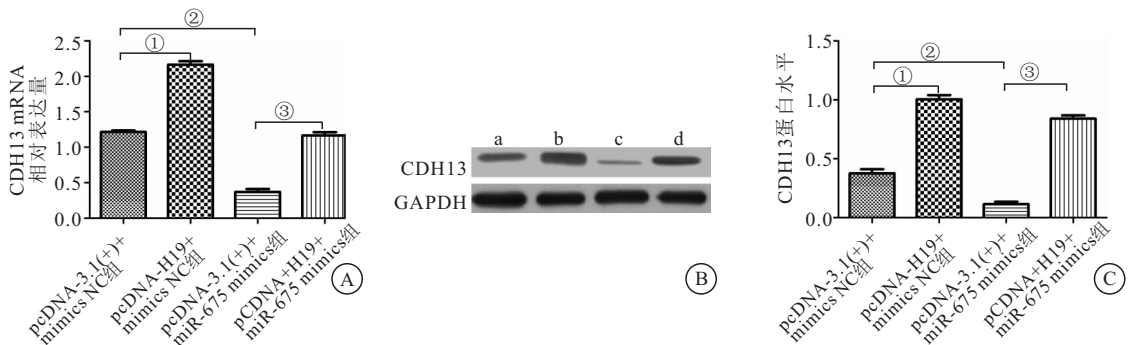


图 7 LncRNA H19、miR-675 与 CDH13 之间的调控关系

Figure 7 Regulatory relationship of LncRNA H19, miR-675 and CDH13

注: A、B、C 分别为 RT-qPCR 及其 Western blot 检测 LncRNA H19 通过 miR-675 上调 CDH13 表达。a. pcDNA-3.1(+)+mimics NC 组; b. pcDNA-H19+mimics NC 组; c. pcDNA-3.1(+)+miR-675 mimics 组; d. pcDNA-H19+miR-675 mimics 组。与 pcDNA-H19+mimics NC 组比较, ① $P < 0.05$ ; 与 pcDNA-3.1(+)+miR-675 mimics 组比较, ② $P < 0.05$ ; 与 pcDNA-H19+miR-675 mimics 组比较, ③ $P < 0.05$

### 3 讨论

近年来, 尽管肺癌发病机制的研究有了突破性的进展, 但晚期肺癌患者的预后仍然不理想。因此, 揭示控制这种恶性表型的分子开关, 阐明肺癌转移进化的潜在机制具有重要意义。大多数人类恶性肿瘤起源于上皮组织, EMT 的研究不仅有利于肺癌, 也有利于大部分实体恶性肿瘤。然而, 目前对于 LncRNA 和其他 RNA 转录本在调控 EMT 中的功能作用知之甚少。近年来, 长度超过 200 个核苷酸的长链非编码 RNA 作为一类新的调控基因表达的功能调控元件出现, 许多 LncRNA 与多种人类疾病有关<sup>[16-17]</sup>。近些年研究发现 LncRNA H19 参与调控各种癌症的发展<sup>[18]</sup>。有文献报道 LncRNA H19 的下调可通过调控 miR-18b/IGF1 轴使顺铂致敏黑色素瘤细胞<sup>[19]</sup>。高水平的 LncRNA H19 表达与食管鳞癌患者更短的生存

期相关<sup>[20]</sup>。此外, 抑制 LncRNA H19 在非小细胞肺癌体内具有抗肿瘤和增强对吉非替尼和化疗敏感性的作用<sup>[21]</sup>。以上研究充分说明了 LncRNA H19 在肿瘤细胞发展进程中发挥了重要作用, 而且我们还发现 LncRNA H19 在癌细胞中异常表达后会行使生物学功能。因此我们在本研究中首先检测了 LncRNA H19 是否在肺癌细胞中有差异表达, 结果发现 LncRNA H19 在肺癌 SPC-A1 细胞、A549 细胞、HCC827 细胞中表达上调, 且在 SPC-A1 细胞中表达量最高。后续功能研究发现 LncRNA H19 是调节 EMT 进展的新参与者, 过表达 H19 可以显著促进 SPC-A1 细胞的增殖和侵袭<sup>[22]</sup>。我们的研究结果也表明 H19 在肺癌进展中具有关键作用, 值得进一步深入探讨。

研究表明 LncRNA 可以调控 miRNA 在癌症发

展中的功能<sup>[23]</sup>。有报道称, H19 作为分子海绵拮抗 let-7 家族, 从而调控各种生物学过程<sup>[24]</sup>。H19 也可抑制喉鳞癌中的 miR-148a-3p<sup>[21]</sup>。另外发现 LncRNA H19 通过 miR-29b-3p 作为竞争性内源性 RNA 调控膀胱癌上皮-间质转化和转移<sup>[25]</sup>。此外, LncRNA H19 过表达通过 miR-29b-3p 靶向 MCL-1 诱导多发性骨髓瘤硼替佐米耐药<sup>[26]</sup>。本研究发现 H19 靶向且负调控了 SPC-A1 细胞中 miR-675 的表达。这些发现可以推断 miR-675 在 H19 下游发挥作用。我们查阅相关文献发现 miR-675 在肿瘤细胞恶性发展进程中具有明显的抑癌作用, 在癌细胞中表达量显著下调<sup>[27]</sup>。因此我们继续研究了 miR-675 的生物学功能, 研究结果表明 miR-675 在 SPC-A1 细胞中表达量明显下降, 下调 miR-675 促进 SPC-A1 细胞的增殖、侵袭及 EMT, 而上调 LncRNA H19 通过 miR-675 促进 SPC-A1 细胞的增殖、侵袭及 EMT, 这表明在肺癌中 H19 调控的 SPC-A1 细胞增殖和侵袭可能受 miR-675 表达的调控。此外, TargetScan 预测和双荧光素酶实验结果提示我们 miR-675 和 CDH13 具有靶向关系, 我们发现 CDH13 在 SPC-A1 细胞中发挥了明显的促癌作用, 这与 CDH13 在结直肠癌、食管癌及乳腺癌等肿瘤中发挥的作用一致<sup>[28]</sup>。我们还发现 LncRNA H19 不仅能海绵 miR-675, 还能够上调 CDH13 表达, 表明 LncRNA H19 对 SPC-A1 细胞增殖、侵袭和 EMT 的影响是通过海绵 miR-675 和上调 CDH13 表达实现的。

#### 4 结论与启示

本研究发现 LncRNA H19 作为一种致癌基因, 通过海绵 miR-675 和上调 CDH13 促进了肺癌 SPC-A1 细胞的发展, 其可能是治疗肺癌的一个新的潜在靶点, 可进一步深入研究。

#### 【参考文献】

- [1] 莫靓, 韦兵, 梁任技, 等. 不同病理分期肺腺癌患者血清代谢组学研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(2):350-356.
- [2] 方文峰, 张力. 将至已至, 未来可期—2019 年肺癌免疫治疗年终盘点[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2020, 6(1):53-58.
- [3] ZHOU X, LU H, LI F, *et al.* LncRNA cancer susceptibility candidate (CASC7) upregulates phosphatase and tensin homolog by downregulating miR-10a to inhibit neuroblastoma cell proliferation[J]. *Neuroreport*, 2020, 31(5):381-386.
- [4] SUN K X, WU D D, CHEN S, *et al.* LncRNA MEG3 inhibit endometrial carcinoma tumorigenesis and progression through PI3K pathway[J]. *Apoptosis*, 2017, 22(12):1543-1552.
- [5] 葛蒋, 李文坤, 李倩, 等. 肿瘤相关巨噬细胞与长链非编码 RNA 在肿瘤发展中的研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2020, 47(20):46-49.
- [6] PAN R, ZHOU H. Exosomal Transfer of lncRNA H19 Promotes Erlotinib Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer via miR-615-3p/ATG7 Axis[J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 8(12):4283-4297.
- [7] LI H, YU B, LI J, *et al.* Overexpression of lncRNA H19 enhances carcinogenesis and metastasis of gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(8):2318-2329.
- [8] WU Y, ZHOU Y, HE J, *et al.* Long non-coding RNA H19 mediates ovarian cancer cell cisplatin-resistance and migration during EMT [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(7):2506-2515.
- [9] 胡珊, 黄奔, 姜扬, 等. 基于 lncRNA-miRNA-mRNA 调节网络胃癌关键基因筛选与分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2020, (7):511-518.
- [10] YANG Q, WANG X, TANG C, *et al.* H19 promotes the migration and invasion of colon cancer by sponging miR-138 to up-regulate the expression of HMGA1 [J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(5):1801-1809.
- [11] 程勇, 韩广森, 顾焱晖, 等. 长链非编码 RNA H19 靶向微小 RNA-675 对结肠癌细胞增殖的影响及其机制[J]. 中华实验外科杂志, 2020, 37(2):224-227.
- [12] HE P, ZHANG Z, HUANG G, *et al.* miR-141 modulates osteoblastic cell proliferation by regulating the target gene of lncRNA H19 and lncRNA H19-derived miR-675[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(4):1780-1788.
- [13] WANG F, RONG L, ZHANG Z, *et al.* LncRNA H19-Derived miR-675-3p Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Stemness in Human Pancreatic Cancer Cells by targeting the STAT3 Pathway[J]. *J Cancer*, 2020, 11(16):4771-4782.
- [14] ZHU M, CHEN Q, LIU X, *et al.* lncRNA H19/miR-675 axis represses prostate cancer metastasis by targeting TGFBI [J]. *FEBS J*, 2014, 281(16):3766-3775.
- [15] GUAN G F, ZHANG D J, WEN L J, *et al.* Overexpression of lncRNA H19/miR-675 promotes tumorigenesis in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Int J Med Sci*, 2016, 13(12):914-922.
- [16] LEI S, PENG F, LI M L, *et al.* LncRNA-SMILR modulates RhoA/ROCK signaling by targeting miR-141 to regulate vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2020, 319(2):H377-H391.
- [17] 吴爽, 黄晶, 胡汪来. 长链非编码 RNA 调控自噬的研究进展 [J]. 生命科学, 2019, 031(003):261-269.
- [18] SUN H, WANG G, PENG Y, *et al.* H19 lncRNA mediates 17 $\beta$ -estradiol-induced cell proliferation in MCF-7 breast cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(6):3045-3052.
- [19] XU Y, LIN J, JIN Y, *et al.* The miRNA hsa-miR-6515-3p potentially contributes to lncRNA H19-mediated-lung cancer metastasis[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(10):17413-17421.
- [20] AN L F, HUANG J W, HAN X, *et al.* Downregulation of lncRNA H19 sensitizes melanoma cells to cisplatin by regulating the miR-18b/IGF1 axis[J]. *Anticancer Drugs*, 2020, 31(5):473-482.

colon cancer: timing of initiation and optimal duration[J]. J BUON, 2018, 23(3):568-573.

[3] DANIELE B, SECONDULFO M, VIVO R D, *et al.* Effect of chemotherapy with 5-fluorouracil on intestinal permeability and absorption in patients with advanced colorectal cancer[J]. Journal of Clinical Gastroenterology, 2001, 32(3):228-230.

[4] 宋杰丽, 陈建国, 陈次滨, 等. 丹皮酚的心血管系统药理作用研究及临床应用[J]. 中国现代药物应用, 2013, 7(10):181.

[5] 计春燕, 谭诗云, 刘长青. 丹皮酚抑制人大肠癌细胞增殖及其与化疗药物的协同作用[J]. 中国肿瘤临床, 2005, 32(9):513-515.

[6] 张春虎, 胡随瑜, 李云辉, 等. 丹皮酚对人肝癌 Bel-7404 的抑瘤效应及其机制[J]. 中南大学学报(医学版), 2006, 31(5):682-686.

[7] 张婷, 陆山红, 杨兴鑫, 等. 砂仁水提物对 5-FU 致大鼠肠黏膜屏障损伤的保护作用[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(3):30-35.

[8] 郭齐, 李贻奎, 王志国, 等. 丹皮酚药理研究进展[J]. 中医药信息, 2009, 26(1):20-22.

[9] 宋彩霞, 马强. 小肠疾病的临床特点及研究现状[J]. 中国临床研究, 2018, 31(3):424-426.

[10] 席兴宇, 孙寅玮. 小肠的天然性免疫系统[J]. 生物学通报, 2018, 53(4):12-14.

[11] 邹立军, 熊霞, 王小城, 等. 肠道隐窝-绒毛轴上皮细胞更新及调控机制研究进展[J]. 中国科学:生命科学, 2017, (2):34-44.

[12] 缪明永, 高云. 乳糖不耐症与结肠代谢[J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志, 2016, 3(4):216-219.

[13] ESIN E, TELLI T A, YUCE D, *et al.* A correlation study of fluorouracil pharmacodynamics with clinical efficacy and toxicity[J]. Tumori, 2018, 104(3):157-164.

[14] MORE L A, LANE S, ASNANI A. 5-FU Cardiotoxicity; Vasospasm, Myocarditis, and Sudden Death[J]. Curr Cardiol Rep, 2021, 23(3):17.

[15] 满银玉, 周国华. 潘氏细胞与炎症性肠病研究进展[J]. 蛇志, 2017, 29(1):87-88.

[16] ZHANG S, LIU Y, XIANG D, *et al.* Assessment of dose-response relationship of 5-fluorouracil to murine intestinal injury[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106:910-916.

[17] CHEN N, LIU D, SOROMOU L W, *et al.* Paeonol suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokines in macrophage cells and protects mice from lethal endotoxin shock[J]. Fundam Clin Pharmacol, 2014, 28(3):268-276.

[18] WANG X J, LIU J L, WANG J K. Synthesis and anti-tumor activity of paeonol and its derivatives[J]. Yao Xue Xue Bao, 2012, 47(1):72-76.

[19] YIN J, WU N, ZENG F, *et al.* Paeonol induces apoptosis in human ovarian cancer cells[J]. Acta Histochem, 2013, 115(8):835-839.

[20] SAAHENE R O, WANG J, WANG M L, *et al.* The Antitumor Mechanism of Paeonol on CXCL4/CXCR3-B Signals in Breast Cancer Through Induction of Tumor Cell Apoptosis[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2018, 33(6):233-240.

[21] CAI M, SHAO W, YU H, *et al.* Paeonol Inhibits Cell Proliferation, Migration and Invasion and Induces Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma by Regulating miR-21-5p/KLF6 Axis[J]. Cancer Manag Res, 2020, 12:5931-5943.

[22] ZHANG J J, CAI L J, PANG K, *et al.* Paeonol inhibits proliferation and induces cell apoptosis of human T24 and 5637 bladder cancer cells in vitro and in vivo[J]. Clin Transl Oncol, 2021, 23(3):601-611.

[23] 高立民, 满其倩. 丹皮酚抗肿瘤作用及作用机制研究进展[J]. 药物评价研究, 2016, 39(2):300-303.

(收稿日期:2021-06-07;修回日期:2022-07-20;编辑:黎仕娟)

(上接第 1127 页)

[21] LI X, YANG H, WANG J, *et al.* High level of lncRNA H19 expression is associated with shorter survival in esophageal squamous cell cancer patients[J]. Pathol Res Pract, 2019, 215(11):152638-152648.

[22] ZHOU Y, ZHANG Y. Inhibition of lncRNAH19 has the effect of anti-tumour and enhancing sensitivity to Gefitinib and Chemotherapy in Non-small-cell lung cancer in vivo[J]. J Cell Mol Med. 2020, 24(10):5811-5816.

[23] 孟祥鹏, 马佳, 王宝胜. lncRNA/miRNA 在胰腺癌发生发展中的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28(22):3999-4002.

[24] YAN J, ZHANG Y, SHE Q, *et al.* Long Noncoding RNA H19/miR-675 Axis Promotes Gastric Cancer via FADD/Caspase 8/Caspase 3 Signaling Pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(6):2364-2376.

[25] 马敬, 唐丹, 张燕, 等. H19 介导 miR-let-7 的分子机制及其在妊娠期糖尿病中的作用研究[J]. 中国全科医学, 2019, 10(8):942-946.

[26] REN J, FU J, MA T, *et al.* lncRNA H19-elevated LIN28B promotes lung cancer progression through sequestering miR-196b[J]. Cell Cycle, 2018, 17(11):1372-1380.

[27] LV M, ZHONG Z, HUANG M, *et al.* lncRNA H19 regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis of bladder cancer by miR-29b-3p as competing endogenous RNA[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2017, 1864(10):1887-1899.

[28] PAN Y, ZHANG Y, LIU W, *et al.* lncRNA H19 overexpression induces bortezomib resistance in multiple myeloma by targeting MCL-1 via miR-29b-3p[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(2):106-118.

(收稿日期:2021-08-05;修回日期:2022-06-09;编辑:黎仕娟)