

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002031

缺氧诱导 GLC-82、A549 肺癌细胞的
microRNAs 差异表达谱分析王莹¹, 唐春明², 李静林³, 邱丽娟⁴, 孙强明⁵

(1. 昆明医科大学海源学院基础教学部病理教研室, 昆明 650106; 2. 云南省第一人民医院肿瘤内科, 昆明 650101;
3. 昆明医科大学第一附属医院急诊医学科, 昆明 650000; 4. 昆明市儿童医院儿科疾病研究所, 昆明 650101;
5. 中国医学科学院医学生物学研究所分子流行病学联合实验室, 昆明 650118)

【摘要】目的:对比缺氧环境下不同肺腺癌细胞株表达差异的 microRNA, 为进一步研究缺氧环境中肺癌细胞 microRNA 的作用机制提供参考。**方法:**建立缺氧模型, 将培养于缺氧情况中及正常氧浓度下的 GLC-82、A549 细胞分别提取 RNA, 通过芯片检测及 PCR 验证, 筛选差异表达的 microRNA。利用 TargetScanHuman 7.2 数据库和 cytoscape 软件预测差异显著的 microRNA 分子调控的靶基因及可能参与的信号通路。**结果:**在缺氧条件下, A549 细胞中 3 个 microRNA 表达上调, 30 个 microRNA 表达下调; 而在 GLC-82 细胞中, 2 个 microRNA 表达上调, 31 个 microRNA 表达下调。两种细胞相比较, 除 miR-192-5p 变化趋势相反外, 其他 microRNAs 的表达变化趋势相同。通过 KOBAS 在线网站 KEGG 及 GO 预测分析, 差异表达 microRNA 主要参与了肿瘤相关信号通路、胰岛素信号通路、Ras 信号通路以及氧化代谢等生物学过程。**结论:**肺癌细胞株在缺氧环境下和正常氧状态下 microRNA 出现表达差异, 并且来源于不同遗传背景的细胞株之间也存在差异。差异表达的 microRNA 靶基因参与了多种细胞代谢相关通路, 具有氧化代谢、氧应答相关功能。

【关键词】肺癌; 肿瘤微环境; 缺氧; 微小核糖核酸

【中图分类号】R394.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-11-08

Hypoxia-induced differential expression profiles of microRNAs between
GLC-82 and A549 lung cancer cellsWang Ying¹, Tang Chunming², Li Jinglin³, Qiu Lijuan⁴, Sun Qiangming⁵

(1. Teaching and Research Section of Pathology, Basic Teaching Department, Haiyuan College,
Kunming Medical University; 2. Department of Oncology, The First People's Hospital of Yunnan Province;
3. Emergency Department, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University;
4. Institute of Pediatric Diseases, Kunming Children's Hospital; 5. Molecular Epidemiology Joint Laboratory,
Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College)

【Abstract】Objective: To investigate differentially expressed microRNAs between different lung cell lines under hypoxic conditions, and to provide a reference for further research on the mechanism of action of microRNAs in lung cancer cells under hypoxia. **Methods:** A model of hypoxia was established. RNA was extracted from GLC-82 and A549 cells cultured under a hypoxic or normal oxygen concentration, and microarray assay and PCR were used to screen out differentially expressed microRNAs. TargetScanHuman 7.2 and cytoscape software were used to predict the targeted genes regulated by differentially expressed microRNAs and the signaling pathways involving these target genes. **Results:** Under the hypoxic condition, 3 microRNAs were upregulated and 30 were downregulated in A549 cells, while 2 microRNAs were upregulated and 31 were downregulated in GLC-82 cells. miR-192-5p showed an opposite

作者介绍: 王莹, Email: yigeyangyu@126.com,

研究方向: 病理学。

通信作者: 孙强明, Email: msun08@yahoo.com。

基金项目: 云南省教育厅科研资助项目 (编号: 2015Y530)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190321.1631.014.html>

(2019-03-22)

change trend in these two cell lines, while the other microRNAs showed a similar change trend. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome and gene ontology analyses showed that the differentially expressed microRNAs were mainly involved in tumor-related signaling pathways, insulin signaling pathways, Ras sig-

naling pathways, and oxygen metabolism. **Conclusion:** Differentially expressed microRNAs are found in lung cancer cell lines cultured under hypoxic or normal oxygen conditions, and there are also differentially expressed microRNAs between cells with different genetic backgrounds. The target genes of differentially expressed microRNAs are involved in a variety of cellular metabolic pathways and have the functions of oxygen metabolism and oxygen response.

【Key words】lung cancer; tumor microenvironment; hypoxia; microRNA

缺氧是癌细胞增生过程中一个重要微环境因素,这是由于癌细胞增殖能力较强,当肿瘤生长到一定程度时会出现需氧与供氧之间的不平衡,癌细胞容易生长在缺氧环境中^[1]。在包括乳腺癌、肠癌、肝癌等多种恶性肿瘤的发展过程中,缺氧都发挥了重要的作用^[2-4]。以往的研究中发现,细胞缺氧情况下缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1) α 的积累,通过调节靶基因参与细胞生长,例如 HIF-1 α 能调节血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达,参与肿瘤内皮细胞的迁移和血管新生^[5]。所以缺氧是对于癌细胞而言非常特殊且重要的影响因素,但癌细胞缺氧时的分子机制尚未明了。

另一方面,有研究表明肿瘤中 VEGF 分子的转录受 microRNA 分子的调控,其中 miR-134 能负调控 VEGF/血管内皮细胞生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)信号^[6]。在肿瘤细胞中, microRNAs 水平存在变化,并通过调控靶基因对细胞生长产生影响,所以筛查并研究肿瘤相关的 microRNAs 分子能为肿瘤的诊断、治疗提供新诊断思路和新治疗策略^[7-8]。对于肺癌,有研究人员已尝试将 microRNAs 作为诊断分子在临床中进行验证,发现目标 microRNAs 在肺腺癌和肺鳞癌中的表达存在明显差异,具有高度特异性^[9]。经过临床样本的验证, miR-25 和 miR-223 是非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)区别于小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)、肺腺癌、肺鳞癌的特异性 microRNAs^[10]。另外, miR-21、miR-16、miR-181a 的抑制可以导致人肺癌 A549 细胞生长受到抑制, miR-17-5p、miR-20a 的抑制可引起肺癌细胞的凋亡^[11]。在 NSCLC 中, miR-93、miR-98、miR-179 的过表达可抑制人 RNA 结合蛋白 Fus(fused in sarcoma/translocated in liposarcoma, Fus) 蛋白表达,致 SCLC 肿瘤抑制基因功能减弱甚至丧失^[12]。总的来说, microRNAs 在肺癌的诊断、病例研究、预后指导中都发挥了重要作用,对 microRNAs 的研究具有重要意

义。另外,结合缺氧微环境这一特殊的肿瘤生长因素,本研究旨在探索肺癌细胞中 microRNAs 的差异表达,筛选其中与缺氧相关的 microRNAs 分子,为揭示肺癌细胞在缺氧环境下的 microRNAs 分子调控机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 研究材料

低分化肺腺癌细胞系(GLC-82)及人非小细胞肺癌细胞系(A549)由中国医学科学院医学生物学研究所保存, GLC-82 培养于 DMEM 培养基+100 mL/L 胎牛血清+100 μ g/mL 青霉素+50 μ g/mL 链霉素, 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂; A549 培养于 RPMI-1640 培养基+100 mL/L 胎牛血清+100 μ g/mL 青霉素+50 μ g/mL 链霉素, 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂。基因芯片购买于 GeneCopoeia 生物公司(QM010, GeneCopoeia), -20 $^{\circ}$ C 保存,使用时置室外放至室温使用。

1.2 方法

1.2.1 建立缺氧模型 将生长状态良好的 GLC-82、A549 细胞置 950 mL/L N₂, 40 mL/L CO₂, 10 mL/L O₂ 环境下培养 62 h, 观察细胞生长状态, 快速收获细胞并通过 Western blot 实验检测 HIF-1 α 的蛋白水平。

1.2.2 microRNAs 芯片检测 将生长状态良好的 GLC-82 细胞和 A549 细胞分别在正常氧浓度和低氧浓度环境下培养, 72 h 提取细胞 RNA, 检测 RNA 提取纯度, 根据芯片说明, 共检测 180 个肺癌细胞相关 microRNAs, 每个实验样本重复 3 次。QM010 基因芯片中, has-miR-98 包括 has-miR-98-3p/has-miR-98-5p, has-miR-21b 包括 has-miR-98-3p/has-miR-98-3p, has-miR-152 包括 has-miR-98-3p/has-miR-98-3p。

1.2.3 差异表达 microRNAs 筛选及验证 采用美国 Gene Copoeia 公司提供的在线软件(<http://www.fulengen.com/product/mirna-solutions/mirna-qpcr-arrays/>)进行统计分析。将正常氧浓度下细胞内 microRNAs 表达水平设为对照, 基于倍数法筛选 2 组样本中的差异表达 microRNAs, 计算两两之间差异倍数, 筛选差异表达 microRNAs。针对可能存在差异表达的 microRNAs, 设计引物, 重复检测 3 次其 RNA 含量。

1.2.4 生物信息学分析 使用 TargetScanHuman 7.2 数据库, 检索差异表达 microRNAs 参与调控的基因(仅选择

Cumulative weighted context++ score 值大于-0.4 的基因),利用 cytoscape 软件绘制调控网络图。

利用 KOBAS 在线网站,进行 GO 功能和 KEGG 通路富集的预测分析。KEGG 的 Pathway 显著性富集性分析应用超几何检验,找出与整个基因组背景相比,在特殊基因中的显著性富集的 Pathway,分析计算公式为:

$$p=1-\sum_{i=0}^{m-1} \frac{\binom{M}{i} \times \binom{N-M}{n-i}}{\binom{N}{n}}$$

其中, N 为所有基因中具有 pathway 注释的基因数目; n 为 N 中候选基因的数目; M 为注释为某特定 pathway 的基因数目; m 为注释为某特定 pathway 的候选基因数目。 $FDR \leq 0.05$ 定义为在差异表达基因中显著富集的 pathway。

GO 富集分析通过超几何检验进行,计算公式为:

$$p(k)=P(X=k)=\frac{\binom{M}{k} \times \binom{N-M}{n-k}}{\binom{N}{n}}$$

其中, N 为 GO 注释数据库中的总基因数; M 为数据库中属于某个 GO 子类的基因数; n 为得到的需要进行 GO 富集分析的基因总数目; k 为 n 中属于 M 的数目。

2 结果

2.1 细胞缺氧培养模型的建立

Western blot 实验结果显示,与正常氧浓度下培养的细胞相比,HIF-1 α 蛋白水平在低氧浓度培养的 A549 及 GLC-82 细胞中均明显升高(图 1),表明细胞缺氧模型建模成功。

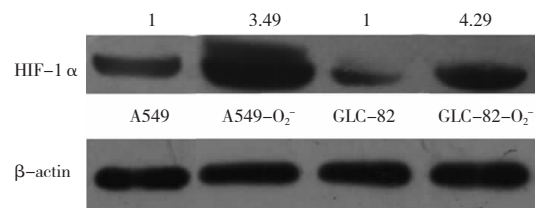


图 1 HIF 在 2 种肺癌细胞系中的表达水平

2.2 芯片检测差异表达的 microRNAs

根据筛选判定标准,对比 GLC-82 细胞和 A549 细胞正常氧浓度和低氧浓度下的差异 microRNAs,在 A549 细胞中,包含 4 个上调 microRNAs,26 个下调 microRNAs。而在 GLC-82 细胞中,有 5 个 microRNAs 表达水平上调,25 个 microRNAs 表达水平下调(图 2)。

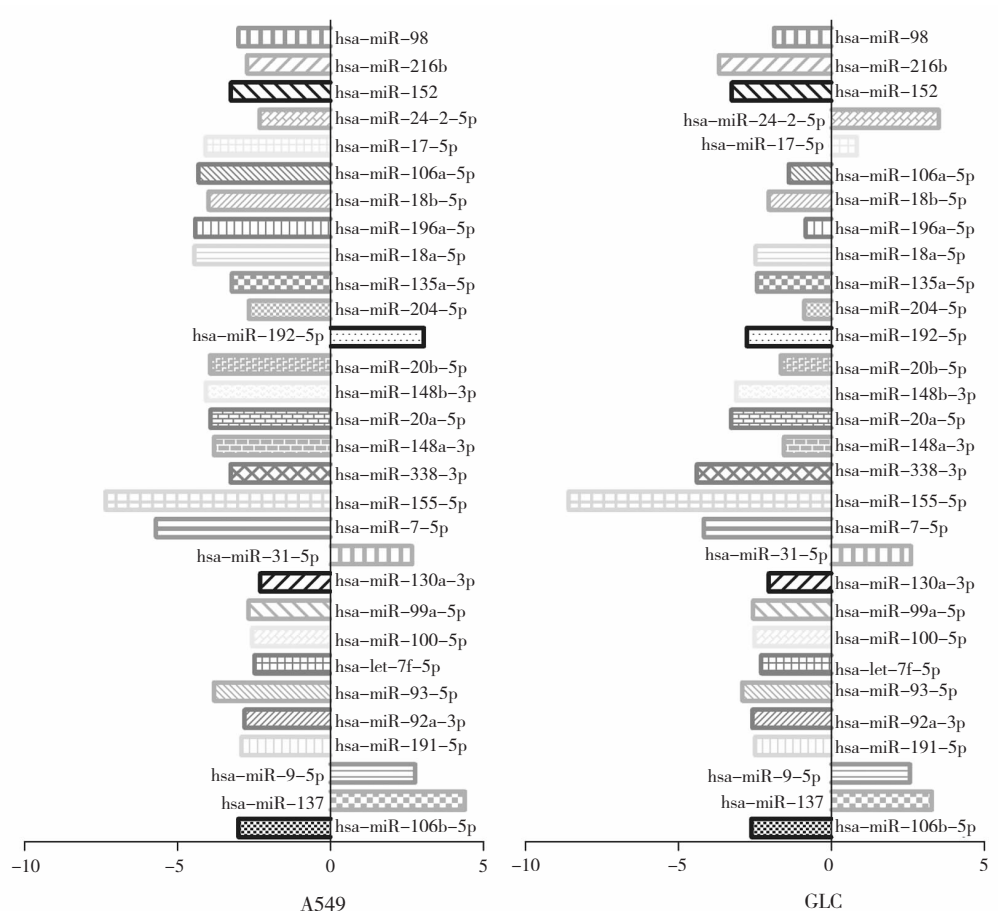


图 2 芯片检测肺癌细胞缺氧导致的差异表达 microRNA

2.3 差异表达 microRNAs 的验证

设计特异引物并通过 PCR 进行检测验证,结果显示在 A549 细胞中,3 个 microRNAs 水平上升,30 个 microRNAs 水平降低,其中 has-miR-9-5p 上调倍数最大,has-miR-216b-5b 及 has-miR-18a-5p,has-miR-18b-5p 下调比例较大。在 GLC-82 细胞中,只有 hsa-miR-9-5p 和 has-miR-106b-5p 上调,其他 microRNAs 均下调(图 3,表 1)。

2.4 靶基因及功能预测分析

采取 PCR 方法验证芯片结果,显示芯片检查出变化差异的 33 个 microRNAs 均在细胞缺氧微环境中出现差异表达,其中 has-miR-9-5p 及 has-miR-137 在 2 种肺癌细胞中都呈上升趋势,其他 microRNAs 几乎为下降趋势。值得注意的是,has-miR-192-5p 在 A549 细胞中为升高,但在 GLC-82

细胞中为下降。不同 microRNAs 分子调控的不同靶基因,在细胞生长中发挥重要作用。利用 TargetScanHuman 7.2 数据库预测相关靶基因,选取 Total context score 小于-0.4 的靶基因(图 4)。随后,通过 KOBAS 在线网站的 KEGG 通路富集功能及 GO 富集功能,对差异表达的 microRNA 分子调控的靶基因展开分析,KEGG 通路富集结果显示,主要富集到的信号通路为肿瘤、胰岛素信号、Ras、肿瘤胆碱代谢、代谢相关通路(表 2)。

GO 功能分析结果表明,差异表达的 microRNA 分子所调控的靶基因主要涉及的生物功能为细胞、细胞结构、胞内、细胞过程、结合等(表 3)。筛选与氧相关的生物功能,结果可能涉及的生物功能达 10 种(检验校正后的 $P < 0.05$),均与氧的结合、氧水平变化的应答、氧代谢相关酶有关(表 4)。

表 1 PCR 检测 microRNA 的表达

microRNA	A549变化倍数	Glc-82变化倍数	引物
hsa-miR-191-5p	-6.26	-33.12	caacggaatc caaaagcag ctg
hsa-miR-155-5p	-4.40	-25.91	ttaatgctaa tcgtgatagg ggt
hsa-miR-192-5p	1.63	-15.98	ctgacctatg aattgacagc c
hsa-miR-135a-5p	-8.03	-15.07	tatggctttt tatctctatg tga
hsa-miR-130a-3p	-12.63	-13.96	cagtgcaatg ttaaaagggc at
hsa-miR-196a-5p	-6.46	-13.48	taggtagttt catgtgttg gg
hsa-miR-99a-5p	-8.61	-13.35	aacctctaga tccgatcttg tg
hsa-miR-92a-3p	-6.03	-13.21	tattgcactt gtcccgccgt gt
hsa-miR-98-5p	-12.28	-12.93	tgaggtagt aagttgtatt gtt
hsa-miR-216b-3p	-9.58	-12.05	ac acacttaccctagagattc ta
hsa-miR-148b-3p	-8.97	-11.66	tcagtgcatc acagaacttt gt
hsa-miR-24-2-5p	-9.29	-11.57	tgccctactga gctgaaacac ag
hsa-let-7f-5p	-4.30	-11.45	tgaggtagta gattgtatag tt
hsa-miR-204-5p	-7.23	-10.9	tccctttgt catctatgc ct
hsa-miR-152-3p	-8.74	-10.22	tcagtgcatgacagaacttgg
hsa-miR-338-3p	-13.58	-9.55	tcagcatca gtgatttttg tg
hsa-miR-17-5p	-13.37	-9.53	caaagtgtt acagtgagg tag
hsa-miR-93-5p	-9.53	-9.52	caaagtgtg ttcgtgagg tag
hsa-miR-20a-5p	-7.51	-9.47	taaagtgtt atagtgagg tag
hsa-miR-106a-5p	-13.30	-9.36	aaaagtgtt acagtgagg tag
hsa-miR-216b-5p	-16.42	-8.95	aaatctctgc aggcgaatgt ga
hsa-miR-18b-5p	-14.56	-8.93	taaggtgcat ctagtgcagt tag
hsa-miR-20b-5p	-10.35	-8.66	caaagtgtc atagtgagg tag
hsa-miR-152-5p	-18.20	-5.69	aggtttctgtgataactccgact
hsa-miR-18a-5p	-19.07	-4.71	taaggtgcat ctagtgcaga tag
hsa-miR-7-5p	-14.09	-2.77	tgaagactagtgattttgtgt
hsa-miR-148a-3p	-6.14	-2.71	tcagtgcatc acagaacttt gt
hsa-miR-106b-5p	-9.58	-2.62	taaagtgtgacagtgagat
hsa-miR-100-5p	-3.55	-2.05	aacctctaga tccgaacttg tg
hsa-miR-98-3p	-8.84	-1.89	c tatacaactt actacttccc
hsa-miR-9-5p	2.25	2.19	tccttgggtatctagctgtatga
hsa-miR-137	1.24	5.73	ttattgcttaagaatacgcgtag
hsa-miR-31-5p	-5.03	-21.01	aggcaagatg ctggcatagc t

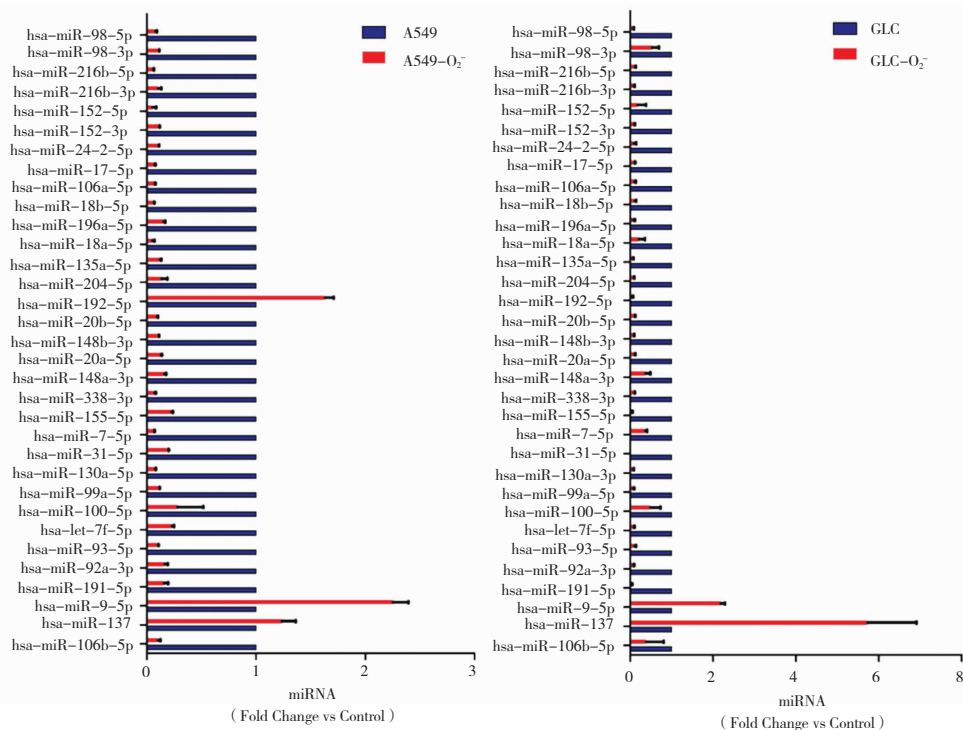


图3 PCR验证肺癌细胞缺氧相关的差异表达 microRNA

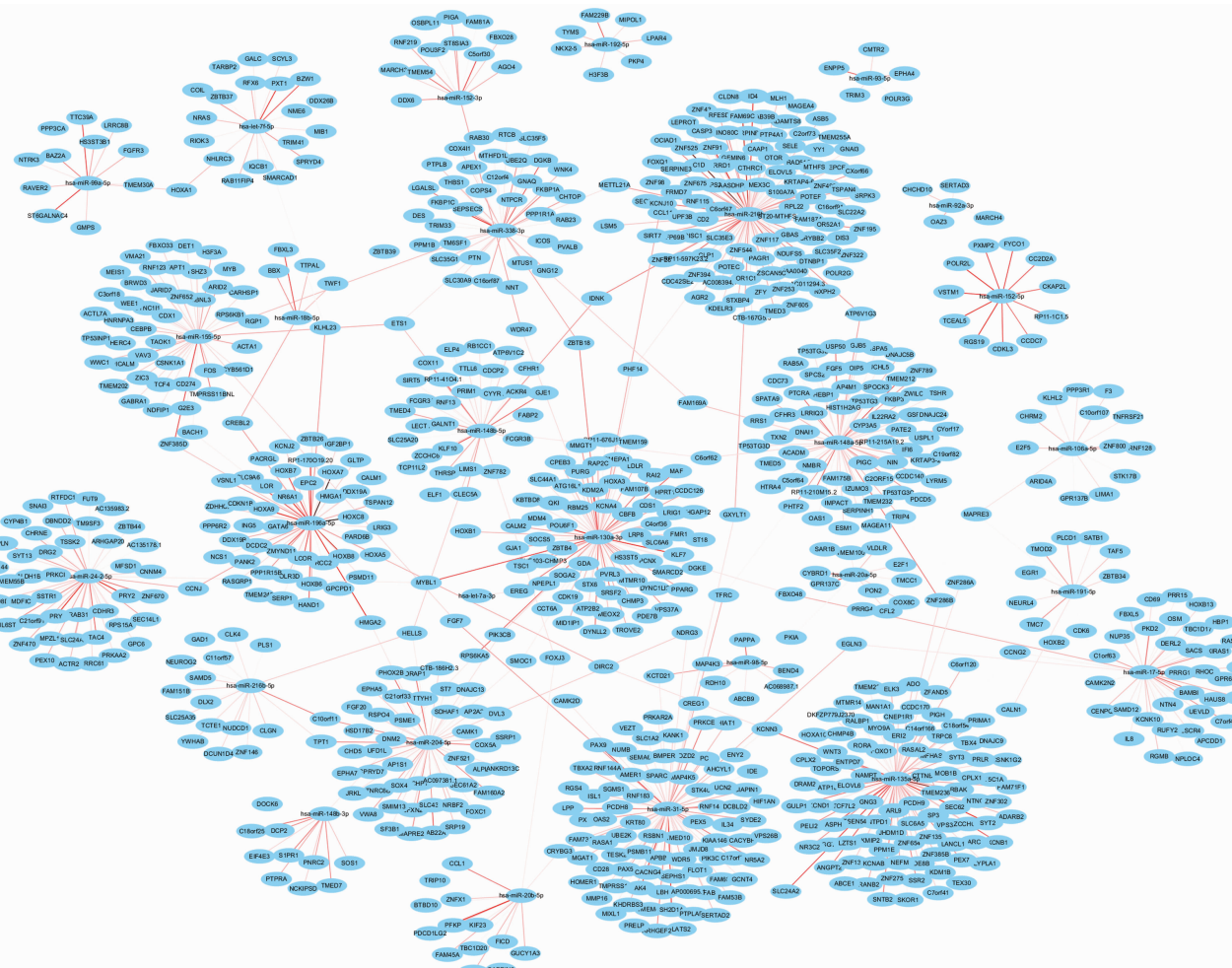


图4 microRNA 靶基因分析

表 2 KEGG 通路富集结果 (前 5)

通路	注释到该通路的差异表达蛋白数	该物种注释到该通路的蛋白数	富集分析的 <i>P</i> 值	检验校正后的 <i>P</i> 值
癌症相关通路	34	397	9.42E-09	2.53E-06
胰岛素信号通路	19	139	2.72E-08	3.64E-06
Ras 信号通路	24	228	4.33E-08	3.86E-06
肿瘤胆碱代谢	15	101	3.00E-07	2.00E-05
代谢相关通路	65	1 243	3.74E-07	2.00E-05

表 3 KOBAS-GO 富集分析 (前 5)

功能	输入基因个数	总有基因数量	<i>P</i> 值	检验校正后的 <i>P</i> 值
细胞	886	15 802	1.01E-193	7.78E-190
细胞结构	884	15 776	1.85E-192	7.16E-189
胞内	818	13 775	2.75E-178	7.09E-175
细胞过程	840	14 647	5.53E-178	1.07E-174
结合	815	13 918	7.34E-173	9.50E-170

表 4 KOBAS-GO 氧相关功能基因富集分析

功能	输入基因个数	总有基因数量	<i>P</i> 值	检验校正后的 <i>P</i> 值
应答含氧化物	104	1 474	1.73E-18	5.59E-17
胞内含氧化物对氧的应答	73	909	6.59E-16	1.76E-14
对氧水平的反应	30	325	1.49E-08	2.17E-07
应答氧水平的降低	28	306	5.28E-08	7.30E-07
细胞对氧的应答	19	151	8.89E-08	1.18E-06
细胞对氧降低时的应答	17	143	8.60E-07	9.82E-06
对活性氧的应答	14	215	0.002 509	0.011 512
调节单加氧酶活性	6	59	0.006 365	0.024 690
氧化还原酶活性,作用于血红素供体组,氧为受体	4	27	0.007 762	0.028 863
细胞对活性氧的反应	9	127	0.008 533	0.031 351

3 讨 论

缺氧是肺癌生长过程中的特殊且重要的环境因素,肿瘤细胞会通过一系列信号通路的变化以适应这一特殊时期,参与肺癌细胞生长^[13-14]。反之,受缺氧影响的信号分子可能成为肿瘤生长的特殊指针分子^[15-16]。本研究探索了缺氧情况下肿瘤细胞中 microRNAs 发生的变化,针对肺癌的 2 株不同遗传背景的细胞株,分别检测其缺氧状态下的 microRNAs 的差异表达。实验结果显示,芯片结果与进一步的 PCR 验证结果相比,出现 2/30~3/30 差异。针对 A549 细胞,有 2 个 microRNAs 变化趋势相反,对于 GLC-82 细胞,同样有 3 个 microRNAs 芯片结果与验证结果不一致。另外, A549 和 GLC-82 均为肺癌细胞, microRNAs 检测结果基本一致,仅有 1/30 不同。这

一实验结果不仅提示,芯片检测的检测精度和特异性存在主观和客观的误差,还提示拥有不同遗传背景的肿瘤细胞在缺氧介导的 microRNAs 表达上会有一定差异。

在以往的研究中,有研究组发现 miR-9-5p 和 miR-137 能通过调节癌基因调控非小细胞肺癌的生长,但未见与缺氧相关的研究报道^[17-19]。本研究发现在缺氧环境下的 A549 及 GLC-82 中, miR-9-5p 和 miR-137 均高表达,而其他差异表达的 microRNA 均显示降低表达趋势。值得提出的是,本课题组既往研究证实人 Ras 同源物基因家族成员 A (ras homolog gene family, member A, RhoA) 是缺氧诱导因子 HIF 的上游调控因子,本研究结果显示 RhoA 是 miR-9-5p 和 miR-98-3p 的靶基因,这与本课题组前期研究中发现缺氧环境下头颈鳞癌细胞中 RhoA 调控 HIF-1 表达的结果一致^[20]。结合 KOBAS 在线

预测网站预测,肺癌细胞缺氧时,microRNAs 分子出现差异表达,其靶基因参与的信号调节通路与肿瘤的发展及有氧应答功能相关。本研究结果提示,缺氧对肺癌细胞的 microRNAs 表达谱产生影响,microRNAs 能通过调控靶基因的转录继而影响癌细胞的生长。本研究初步探讨了缺氧微环境下肺癌细胞 microRNAs 表达差异谱及其可能调控的靶基因,为揭示肺癌细胞缺氧微环境下的变化和适应机制从 microRNA 水平寻找新的思路。

参 考 文 献

- [1] Hu K, Babapoor-Farrokhran S, Rodrigues M, et al. Hypoxia-inducible factor 1 upregulation of both VEGF and ANGPTL4 is required to promote the angiogenic phenotype in uveal melanoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(7): 7816–7828.
- [2] Wei YL, Dong HM, Xie ZF, et al. Role of reactive oxygen species in hypoxia-induced non-small cell lung cancer migration[J]. *Chinese Journal of Oncology*, 2017, 97(40): 3174–3178.
- [3] Wang JS, Jing CQ, Shan KS, et al. Semaphorin 4D and hypoxia-inducible factor-1 α overexpression is related to prognosis in colorectal carcinoma[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2015, 21(7): 2191–2198.
- [4] Zhou H, Yang YH, Binmadi NO, et al. The hypoxia-inducible factor-responsive proteins semaphorin 4D and vascular endothelial growth factor promote tumor growth and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma[J]. *Experimental Cell Research*, 2012, 318(14): 1685–1698.
- [5] Zhang X, Liu J, Wan L, et al. Up-regulated expressions of HIF-1 α , VEGF and CD34 promote synovial angiogenesis in rats with adjuvant arthritis[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2015, 31(8): 1053–1056.
- [6] Zhang L, Lv Z, Xu J, et al. MicroRNA-134 inhibits osteosarcoma angiogenesis and proliferation by targeting the VEGFA/VEGFR1 pathway[J]. *FEBS*, 2018, 285(7): 1359–1371.
- [7] Nana-Sinkam SP, Croce CM. MicroRNAs as therapeutic targets in cancer[J]. *Transl Res*, 2011, 157(4): 216–225.
- [8] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(9): 2999–3004.
- [9] Lebanony D, Benjamin H, Gilad S, et al. Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2009, 27(12): 2030–2037.
- [10] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. *Cell Res*, 2008, 18(10): 997–1006.
- [11] Matsubara H, Takeuchi T, Nishikawa E, et al. Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressing miR-17-92[J]. *Oncogene*, 2007, 26(41): 6099–6105.
- [12] Du L, Schageman JJ, Subauste MC, et al. miR-93, miR-98, and miR-197 regulate expression of tumor suppressor gene FUS1[J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(8): 1234–1243.
- [13] Fukui N, Kageyama Y, Higashi Y, et al. Development of a novel interferon- α 2b gene construct with a repetitive hypoxia-inducible factor binding site and its suppressive effects on human renal cell carcinoma cell lines in vitro[J]. *International Journal of Clinical Oncology*, 2014, 19(3): 497–504.
- [14] Mu L, Wang J, Chen Y, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α and semaphorin4D genes involved with tumor-associated macrophage-induced metastatic behavior and clinical significance in colon cancer[J]. *Chinese Medical Journal*, 2014, 127(20): 3568–3575.
- [15] Birner P, Schindl M, Obermair A, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer[J]. *Cancer Research*, 2000, 60(17): 4693–4696.
- [16] Evans CE, Bendahl PO, Belting M, et al. Diverse roles of cell-specific hypoxia-inducible factor 1 in cancer-associated hypercoagulation[J]. *Blood*, 2016, 127(10): 1355–1360.
- [17] Chang TH, Tsai MF, Gow CH, et al. Upregulation of microRNA-137 expression by Slug promotes tumor invasion and metastasis of non-small cell lung cancer cells through suppression of TFAP2C[J]. *Cancer Lett*, 2017, 402: 190–202.
- [18] Jiang H, Zhang H, Hu X, et al. Knockdown of long non-coding RNA XIST inhibits cell viability and invasion by regulating miR-137/PXN axis in non-small cell lung cancer[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 111: 623–631.
- [19] Li G, Wu F, Yang H, et al. MiR-9-5p promotes cell growth and metastasis in non-small cell lung cancer through the repression of TGFBR2[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 96: 1170–1178.
- [20] Sun Q, Zhou H, Binmadi NO, et al. Hypoxia-inducible factor-1-mediated regulation of semaphorin 4D affects tumor growth and vascularity[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(46): 32066–32074.

(责任编辑:唐秋姗)