doi:10.11659/jjssx.05E023060

·基础研究·

miR-519e-5p靶向ANXA5对脊索瘤U-CH1细胞生物学行为的影响

李 轶[1],黄小平[2],王 玮[3] (1.西安市第九医院血管介入科,陕西 西安 710054;2.西安市第九医院消化内科,陕西 西安 710054;3.西安市第九医院肿瘤血液科,陕西 西安 710054)

[摘 要] **目的** 探讨miR-519e-5p靶向膜联蛋白A5(ANXA5)对脊索瘤U-CH1细胞生物学行为的影响。**方法** 以qRT-PCR测定人脊索瘤组织和癌旁组织中miR-519e-5p和ANXA5的表达。体外培养U-CH1细胞,并分为miR-519e-5p mimics组、miR-519e-5p mimics阴性对照+空载组、miR-519e-5p mimics+ANXA5过表达组、对照组。平板集落形成实验、MTT实验检测各组U-CH1细胞增殖;流式细胞术检测各组U-CH1细胞凋亡;划痕实验、Transwell实验分别检测各组U-CH1细胞迁移与侵袭;Western blot检测各组U-CH1细胞ANXA5蛋白、凋亡相关蛋白(Bcl-2、Bax)及迁移上皮-间充质转化相关蛋白(Claudin-1、Vimentin、E-cadherin)表达;qRT-PCR法检测各组U-CH1细胞miR-519e-5p及ANXA5 mRNA表达;双荧光素酶报告基因实验检验miR-519e-5p与ANXA5在U-CH1细胞中的相互作用。**结果** 与癌旁组织相比,脊索瘤组织miR-519e-5p表达降低($P<0.05$),ANXA5 mRNA表达升高($P<0.05$)。与对照组相比,miR-519e-5p mimics组细胞增殖率、集落生成率、迁移率、侵袭数、ANXA5 mRNA及ANXA5、Bcl-2、Claudin-1、Vimentin蛋白表达降低($P<0.05$),miR-519e-5p mRNA表达、凋亡率及Bax、E-cadherin蛋白表达增高($P<0.05$)。与miR-519e-5p mimics组相比,miR-519e-5p mimics+ANXA5过表达组细胞集落生成率、增殖率、侵袭数、迁移率、ANXA5 mRNA及ANXA5、Bcl-2、Vimentin、Claudin-1蛋白表达升高($P<0.05$),凋亡率及Bax、E-cadherin蛋白表达下降($P<0.05$)。miR-519e-5p可靶向下调U-CH1细胞中ANXA5表达。**结论** miR-519e-5p通过靶向抑制ANXA5表达降低脊索瘤U-CH1细胞迁移、增殖和侵袭活力,促进其凋亡。

[关键词] miR-519e-5p;ANXA5;脊索瘤;U-CH1细胞;生物学行为

[中图分类号] R738.1 [文献标志码] A [收稿日期] 2023-05-12

Effect of miR-519e-5p targeting ANXA5 on the biological behavior of chordoma U-CH1 cells

LI Yi[1], HUANG Xiao-ping[2], WANG Wei[2] (1.Department of Vascular Intervention, Xi'an Ninth Hospital, Xi'an Shaanxi 710054, China; 2.Department of Gastroenterology, Xi'an Ninth Hospital, Xi'an Shaanxi 710054, China; 3.Department of Oncology and Hematology, Xi'an Ninth Hospital, Xi'an Shaanxi 710054, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of miR-519e-5p targeting Annexin A5 (ANXA5) on the biological behavior of chordoma U-CH1 cells. **Methods** The expressions of miR-519e-5p and ANXA5 in human chordoma tissues and adjacent tissues were detected by qRT-PCR. U-CH1 cells were cultured in vitro and divided into miR-519e-5p mimics group, miR-519e-5p mimics negative control + empty vector group, miR-519e-5p mimics + ANXA5 overexpression group, and control group. The proliferation of U-CH1 cells in each group was detected by plate colony formation assay and MTT assay; flow cytometry was used to detect the apoptosis of U-CH1 cells in each group; the migration and invasion of U-CH1 cells in each group were detected by scratch would healing assay and Transwell assay respectively; the expression of ANXA5 protein, apoptosis-related proteins (Bcl-2, Bax) and migration epithelial-mesenchymal transition-related proteins (Claudin-1, Vimentin, E-cadherin) of U-CH1 cells in each group were detected by Western blot; the expression of miR-519e-5p and ANXA5 mRNA of U-CH1 cells in each group was detected by qRT-PCR; and the interaction between miR-519e-5p and ANXA5 in U-CH1 cells was examined by dual-luciferase reporter gene assay. **Results** Compared with the adjacent tissues, the expression of miR-519e-5p in chordoma tissues decreased ($P<0.05$), and the expression of ANXA5 mRNA increased ($P<0.05$). Compared with the control group, the cell proliferation rate, colony formation rate, migration rate, invasion number, expressions of ANXA5 mRNA and ANXA5, Bcl-2, Claudin-1, and Vimentin proteins in the miR-519e-5p mimics group decreased ($P<0.05$), the expression of miR-519e-5p mRNA, the apoptosis rate, and the expression of Bax and E-cadherin proteins increased ($P<0.05$). Compared with the miR-519e-5p mimics group, the colony formation rate, cell proliferation rate, invasion number, migration rate, expressions of ANXA5 mRNA and ANXA5, Bcl-2, Vimentin, and Claudin-1 proteins in the miR-519e-5p mimics+ANXA5 overexpression group increased($P<0.05$), and the apoptosis rate, the expression of Bax and E-cadherin proteins decreased ($P<0.05$). MiR-519e-5p can target and down-regulate the expression of ANXA5 in U-CH1 cells. **Conclusion** MiR-519e-5p reduces the migration, proliferation and invasion viability of chordoma U-CH1 cells, and promotes apoptosis by targeting the inhibition of ANXA5 expression.

Keywords: miR-519e-5p; ANXA5; chordoma; U-CH1 cells; biological behavior

[基金项目] 西安市第九医院科研项目(2020-7)

[通信作者] 王 玮,E-mail:sanghaiht81@163.com

脊索瘤是起源于胚胎时期脊索残存组织的骨肿瘤,起病隐匿,确诊时往往已发展到后期,具有局部侵袭性及高复发性,对放化疗均不敏感,手术难以完整切除,患者大多预后不佳[1-3]。miR-519是具有抗癌作用的微小RNA分子,miR-519e-5p属于miR-519家族成员,与miR-519作用相似,过表达miR-519e-5p可抑制宫颈癌[4-6]。但目前miR-519e-5p在脊索瘤中的作用及机制尚不清楚。通过检索Starbase数据库发现膜联蛋白A5(Annexin A5,ANXA5)是miR-519e-5p的潜在靶点。ANXA5作为一种调控癌细胞膜修复、凋亡、迁移和侵袭过程的重要蛋白,在侵袭性癌细胞中高度表达,沉默ANXA5可导致癌细胞死亡,发挥抑制肿瘤生长及转移的作用[7-8]。本研究通过观察miR-519e-5p在人脊索瘤组织中的表达,探讨miR-519e-5p与其下游潜在靶点ANXA5对人脊索瘤U-CH1细胞恶性生物学行为的影响,为脊索瘤患者提供可能的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

人脊索瘤细胞U-CH1(上海钦诚生物公司);MTT细胞增殖检测试剂盒、TRIzol试剂、miR-519e-5p inhibitor及其阴性对照、miR-519e-5p mimics及其阴性对照、一步法反转录荧光定量试剂盒、突变型ANXA5 3′-UTR报告质粒、野生型ANXA5 3′-UTR报告质粒(上海生工生物公司);Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);兔抗人ANXA5、E-cadherin、Bcl-2、Bax、Claudin-1、Vimentin、β-actin一抗(上海碧云天生物技术有限公司);双荧光素酶报告基因检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)。

Attune NxT流式细胞仪(赛默飞世尔科技有限公司);ML41倒置生物光学显微镜(广州市明美光电技术有限公司);荧光定量PCR仪(型号MA-688,济南泰医生物技术有限公司);酶标仪(型号Elx800,美国伯乐公司)。

1.2 qRT-PCR检测人脊索瘤组织中miR-519e-5p和ANXA5表达

选取本院2020年1月至2022年4月收治的脊索瘤患者9例,取其手术切除的骶骨脊索瘤组织和癌旁组织,通过病理检查确诊为脊索瘤。本研究经本院伦理委员会批准(伦理批号:2019-1061),患者均签署对本研究的知情同意书。采用TRIzol提取组织和细胞总RNA,通过一步法进行反转录及qRT-PCR反应,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法分析miR-519e-5p和ANXA5的相对表达,以U6为miR-519e-5p内参,以GAPDH为ANXA5内参,基因引物序列见表1。

表1 基因引物序列

引物	方向	序列(5′-3′)
miR-519e-5p	正向	CACATTGCTTACACCATTAGGC
	反向	TTCATTCTGATTTAGTAGGCTG
U6	正向	CTCGCTTCGGCAGCACA
	反向	AACGCTTCACGAATTTGCGT
ANXA5	正向	CTCTGTTTGGCAGGGACCTT
	反向	GGCATCGTAGAGTCGTGAGG
GAPDH	正向	AAGAAGGTGGTGAAGCAGGC
	反向	TCCACCACCCAGTTGCTGTA

1.3 细胞培养及分组

将人脊索瘤U-CH1细胞解冻后以RPMI 1640培养基(加入10%胎牛血清和1%青链霉素)复苏培养,传代后接种在24孔板中,分为miR-519e-5p mimics组(转染miR-519e-5p mimics)、miR-519e-5p mimics阴性对照+空载组(转染miR-519e-5p mimics阴性对照和空载质粒)、miR-519e-5p mimics+ANXA5过表达组(转染miR-519e-5p mimics和ANXA5过表达质粒)和对照组。对照组细胞正常培养,其余各组细胞分别转染上述质粒,具体步骤参照脂质体2000说明书操作,转染24 h后,收集各组细胞。

1.4 细胞增殖检测

平板集落形成实验:U-CH1细胞接种在6孔板中(50个/孔),24 h后依据1.3的分组处理24 h,弃去旧培养基,添加新RPMI 1640培养基培养3周,集落形成后,经固定、结晶紫染色,并用光学显微镜计数大于50个细胞的集落数。集落生成率=转染组细胞集落数/对照组细胞集落数×100%。

MTT实验:U-CH1细胞传代后接种在96孔板中(5 000个/孔),培养24 h后遵照1.3中方法分组处理24 h,每孔中加入MTT工作液,培养2 h后,每孔加入200 μL二甲基亚砜,用酶标仪测量吸光值,计算细胞增殖率。细胞增殖率=转染组吸光值/对照组吸光值×100%。

1.5 细胞凋亡检测

取1.3中各组U-CH1细胞,PBS洗涤、重悬后计数,每组取出约含1×10^5个细胞的细胞悬液,以1 000 g离心5 min后加入PBS混匀,通过Annexin V-FITC/PI双染法检测各组细胞凋亡率。

1.6 细胞迁移检测

取1.3中分组处理24 h的U-CH1细胞,每组取1×10^5个细胞分别接种在24孔板中培养,待细胞铺满孔底后,以1 mL无菌枪头于每孔中央划线,洗去多余细胞,再培养24 h,用光学显微镜和Image J软件观察和分析划痕宽度(记为$L_{0\,h}$),继续培养细胞24 h后再次定量划痕宽度(记为$L_{24\,h}$),计算迁移率。迁移率=($L_{0\,h}$-$L_{24\,h}$)/$L_{0\,h}$×100%。

1.7 细胞侵袭检测

收集U-CH1细胞，以1×10^{5}个/孔接种于包被基质胶的Transwell上室，将含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基加入下室，24 h后，4%多聚甲醛固定细胞，结晶紫染色，光学显微镜下计数侵袭细胞数。

1.8 Western blot检测各组细胞相关蛋白表达

RIPA裂解液提取各组细胞总蛋白，测定其浓度后，每组取20 μg总蛋白跑电泳分离，并转膜，脱脂牛奶封闭后，将膜与一抗Bax、Bcl-2、Claudin-1、Vimentin、E-cadherin、ANXA5及内参β-actin孵育过夜，分别孵育山羊抗兔二抗后，显影，Image J软件分析各蛋白条带灰度值，计算其表达量。

1.9 双荧光素酶报告基因检测

U-CH1细胞接种至24孔板中，24 h后分别将野生型ANXA5 3′-UTR报告质粒、突变型ANXA5 3′-UTR报告质粒与miR-519e-5p mimics及其阴性对照共转染，24 h后测量荧光素酶活性。

1.10 统计分析

采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析，计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，采用t检验比较两组间差异；采用单因素方差分析和*SNK-q*检验比较多组间差异。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-519e-5p和ANXA5在人脊索瘤组织和癌旁组织中的表达

HE染色证实，在光学显微镜下，脊索瘤组织由中等大小的条索状和簇状肿瘤细胞组成，显示出典型的气泡状细胞，细胞质丰富，胞核含空泡状，见图1。与癌旁组织相比，脊索瘤组织miR-519e-5p表达降低（$P<0.05$），ANXA5表达升高（$P<0.05$），见表2。

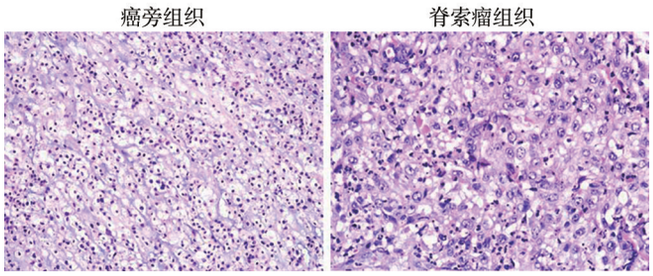


图1 脊索瘤肿瘤组织和癌旁组织的HE染色(×200)

表2 miR-519e-5p和ANXA5在人脊索瘤组织和癌旁组织中的表达($\bar{x}\pm s$)

组别	miR-519e-5p	ANXA5
癌旁组织	1.00±0.11	0.99±0.15
脊索瘤组织	0.32±0.05*	2.07±0.23*

*：与癌旁组织相比，$P<0.05$

2.2 各组U-CH1细胞增殖与凋亡比较

与对照组相比，miR-519e-5p mimics组细胞集落生成率、增殖率下降，凋亡率增加（$P<0.05$），miR-519e-5p mimics阴性对照+空载组上述各指标无明显差异（$P>0.05$）；与miR-519e-5p mimics组相比，miR-519e-5p mimics+ANXA5过表达组细胞增殖率、集落生成率升高（$P<0.05$），凋亡率降低（$P<0.05$），见表3及图2、3。

表3 各组U-CH1细胞增殖率、集落生成率与凋亡率($\bar{x}\pm s$,%)

组别	增殖率	集落生成率	凋亡率
对照组	100.00±0.00	100.00±0.00	4.64±1.07
miR-519e-5p mimics组	39.87±5.68*	42.59±7.15*	63.14±9.48*
miR-519e-5p mimics阴性对照+空载组	94.25±13.52	96.54±18.32	5.30±1.34
miR-519e-5p mimics+ANXA5过表达组	90.63±17.92#	93.42±16.83#	7.92±2.01#

*：与对照组相比，$P<0.05$；#：与miR-519e-5p mimics组相比，$P<0.05$

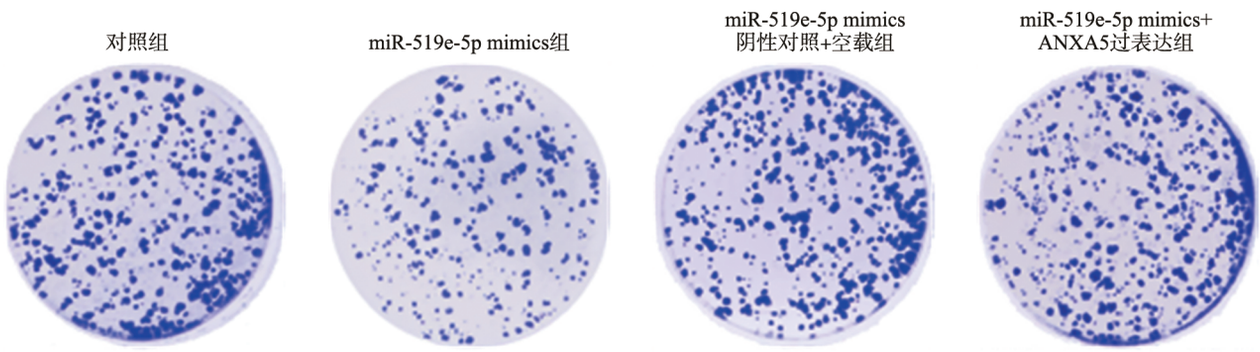


图2 结晶紫染色测定各组U-CH1细胞集落生成(×200)

2.3 各组U-CH1细胞迁移和侵袭比较

与对照组相比，miR-519e-5p mimics组细胞侵袭数、迁移率下降（$P<0.05$），miR-519e-5p mimics阴性对照+空载组细胞迁移率、侵袭数无明显差异（$P>0.05$）；与miR-519e-5p mimics组相比，miR-519e-5p mimics+ANXA5过表达组上述指标增加（$P<0.05$），见图4、5及表4。

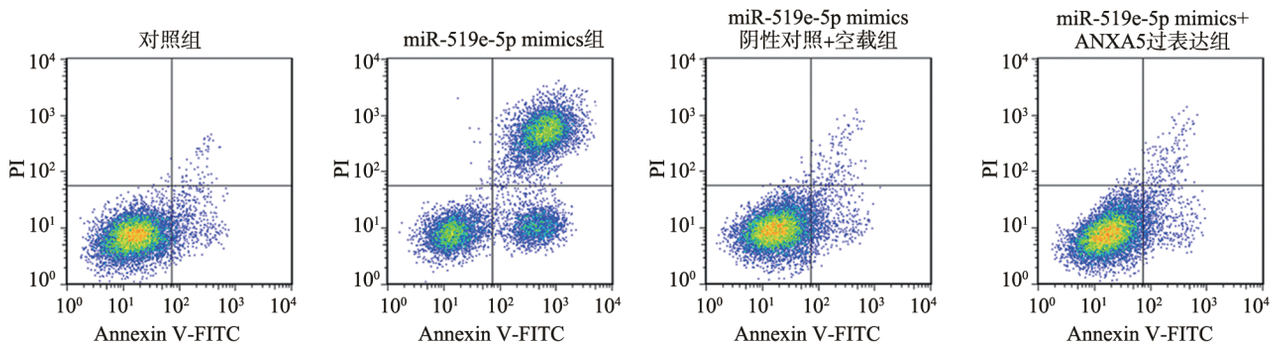


图3　流式细胞术检测各组U-CH1细胞凋亡

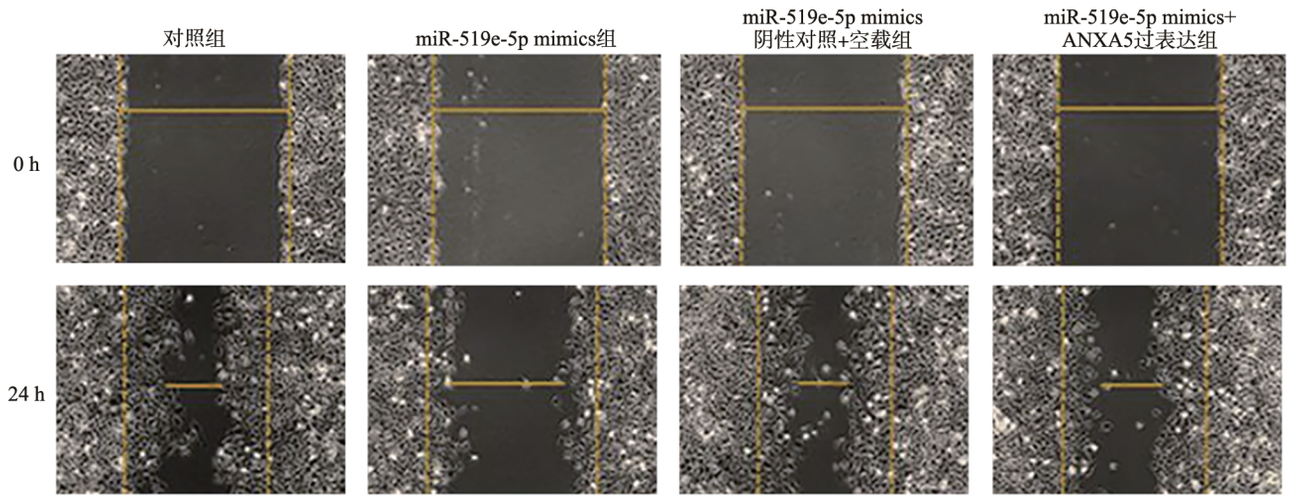


图4　划痕实验测定各组U-CH1细胞迁移(×100)

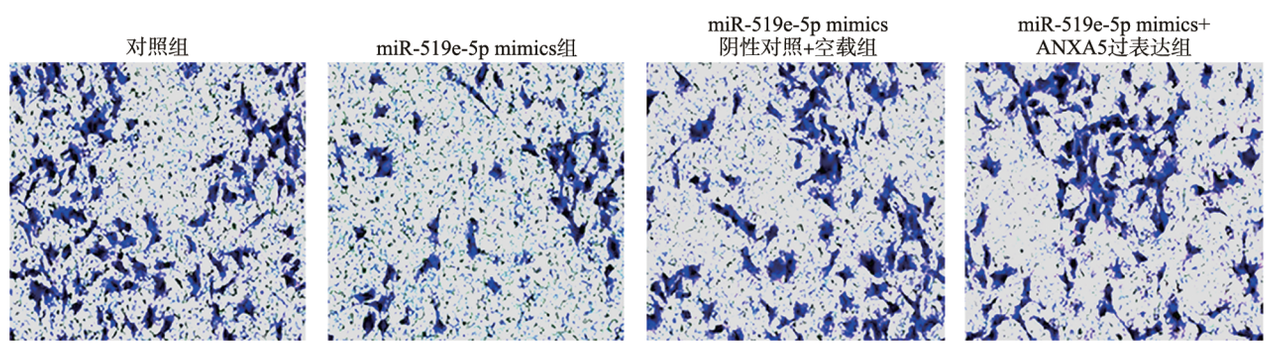


图5　Transwell实验检测各组U-CH1细胞侵袭(×200)

表4　各组U-CH1细胞迁移率、侵袭数($\bar{x}\pm s$)

组别	迁移率(%)	侵袭数(个)
对照组	85.01±13.25	252.36±35.82
miR-519e-5p mimics组	24.96±5.12*	85.76±19.63*
miR-519e-5p mimics阴性对照+空载组	86.12±15.63	244.85±32.74
miR-519e-5p mimics+ANXA5过表达组	76.87±12.49#	238.24±41.23#

*:与对照组相比,$P<0.05$;#:与miR-519e-5p mimics组相比,$P<0.05$

2.4　各组U-CH1细胞凋亡及上皮-间充质转化相关蛋白表达比较

与对照组相比,miR-519e-5p mimics组Claudin-1、Bcl-2、Vimentin蛋白表达下降,Bax、E-cadherin蛋白表达升高($P<0.05$),miR-519e-5p mimics阴性对照+空载组各蛋白表达无明显差异($P>0.05$)。与miR-519e-5p mimics组相比,miR-519e-5p mimics+ANXA5过表达组上述蛋白均相反表达($P<0.05$),见表5、图6。

2.5　各组U-CH1细胞miR-519e-5p和ANXA5表达比较

与对照组相比,miR-519e-5p mimics组miR-519e-5p mRNA表达水平升高($P<0.05$),ANXA5 mRNA及蛋白表达下降($P<0.05$),miR-519e-5p mimics阴性对照+空载组细胞miR-519e-5p mRNA、ANXA5 mRNA及蛋白表达水平无明显差异($P>0.05$)。与miR-519e-5p

mimics组相比，miR-519e-5p mimics+ANXA5过表达组细胞miR-519e-5p mRNA表达水平无显著差异（$P>0.05$），ANXA5 mRNA及蛋白表达增加（$P<0.05$），见图7、表6。

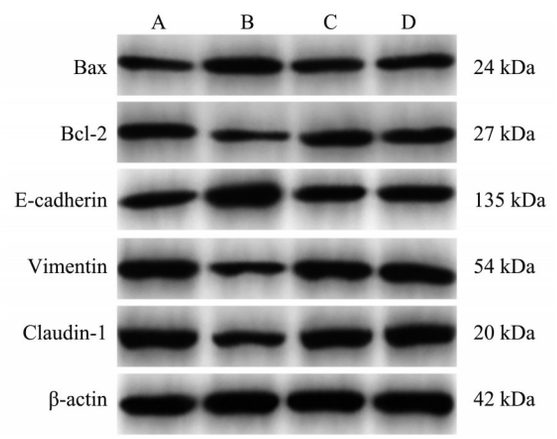
表5 各组U-CH1细胞Bcl-2、Bax、Claudin-1、Vimentin、E-cadherin蛋白相对表达水平（$\bar{x}\pm s$）

组别	Bcl-2	Bax	Claudin-1	Vimentin	E-cadherin
对照组	0.68±0.08	0.30±0.05	1.01±0.20	0.98±0.18	0.51±0.11
miR-519e-5p mimics组	0.22±0.03*	0.76±0.09*	0.38±0.08*	0.35±0.05*	1.14±0.20*
miR-519e-5p mimics阴性对照+空载组	0.69±0.10	0.31±0.06	0.97±0.15	0.99±0.16	0.52±0.09
miR-519e-5p mimics+ANXA5过表达组	0.63±0.07#	0.34±0.04#	0.95±0.22#	0.93±0.19#	0.56±0.08#

*：与对照组相比，$P<0.05$；#：与miR-519e-5p mimics组相比，$P<0.05$

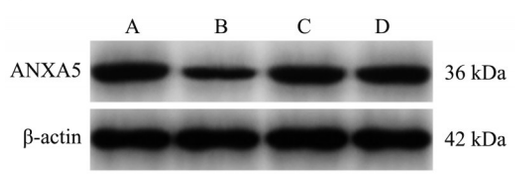
2.6 miR-519e-5p与ANXA5在U-CH1细胞中的靶向作用

Starbase数据库显示，miR-519e-5p和ANXA5有作用位点（图8）。与ANXA5野生+miR-519e-5p mimics阴性对照组比较，ANXA5野生+miR-519e-5p mimics组相对荧光素酶活性下降（$P<0.05$）；ANXA5突变+miR-519e-5p mimics阴性对照组与ANXA5突变+miR-519e-5p mimics组相对荧光素酶活性差异无统计学意义（$P>0.05$），见表7。



A：对照组；B：miR-519e-5p mimics组；C：miR-519e-5p mimics阴性对照+空载组；D：miR-519e-5p mimics+ANXA5过表达组

图6 Western blot测定各组U-CH1细胞凋亡及上皮-间充质转化相关蛋白表达



A：对照组；B：miR-519e-5p mimics组；C：miR-519e-5p mimics阴性对照+空载组；D：miR-519e-5p mimics+ANXA5过表达组

图7 Western blot检测各组U-CH1细胞ANXA5蛋白表达

3 讨论

手术切除是治疗脊索瘤的首选方式，但患者就诊时大多已发生转移，手术难以完全清除肿瘤组织，复发率极高，预后差，因此，探究脊索瘤有关的致病机制，开发更有效的疗法具有重要临床价值[9]。

表6 各组U-CH1细胞miR-519e-5p、ANXA5 mRNA及蛋白相对表达水平（$\bar{x}\pm s$）

组别	miR-519e-5p mRNA	ANXA5 mRNA	ANXA5
对照组	1.03±0.14	1.04±0.15	0.82±0.13
miR-519e-5p mimics组	1.86±0.22*	0.42±0.06*	0.27±0.08*
miR-519e-5p mimics阴性对照+空载组	1.01±0.12	1.05±0.17	0.84±0.14
miR-519e-5p mimics+ANXA5过表达组	1.85±0.14	0.97±0.18#	0.78±0.11#

*：与对照组相比，$P<0.05$；#：与miR-519e-5p mimics组相比，$P<0.05$

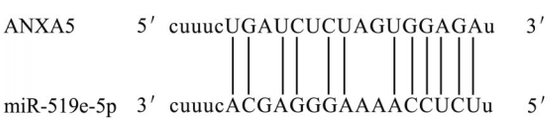


图8 miR-519e-5p和ANXA5之间的结合位点

表7 各组U-CH1细胞相对荧光素酶活性值（$\bar{x}\pm s$）

组别	相对荧光素酶活性
ANXA5野生+miR-519e-5p mimics阴性对照组	1.03±0.13
ANXA5野生+miR-519e-5p mimics组	0.34±0.06*
ANXA5突变+miR-519e-5p mimics阴性对照组	1.02±0.14
ANXA5突变+miR-519e-5p mimics组	0.99±0.18

*：与ANXA5野生+miR-519e-5p mimics阴性对照组比较，$P<0.05$

miR-519表达异常与乳腺癌[10]、胰腺癌[11]等肿瘤的发生发展有关，过表达miR-519可发挥肿瘤抑制作用。miR-519e-5p作为miR-519的家族成员之一，与miR-519功能相似，也具有明显抗癌活性[5-6]。据报道，miR-519e-5p过表达可诱导甲状腺癌细胞凋亡，抑制细胞侵袭、迁移和增殖[12]。本研究结果显示，上调U-CH1细胞miR-519e-5p表达可降低细胞集落生成率、增殖率、Bcl-2蛋白表达，增加细胞凋亡率和Bax蛋白表达，与李轶等[13]的研究结果一致，表明过表达miR-519e-5p可促进U-CH1细胞凋亡，降低其增殖活性。上皮-间充质转化是肿瘤迁移、侵袭的关键生物过程，E-cadherin、N-cadherin、Vimentin和Claudin-1是其主要标志蛋白，在脊索瘤的体内转移中发挥着主要作用[14-15]。本研究发现，上调miR-519e-5p后，U-CH1细胞侵袭数、迁移率及Claudin-1、Vimentin蛋白表达下降，E-cadherin蛋白表达增高，表明miR-519e-5p过表

达可抑制U-CH1细胞侵袭、迁移及上皮-间充质转化，提示miR-519e-5p在脊索瘤中发挥抗癌作用。

作为一种膜修复蛋白，ANXA5在肿瘤产生及转移过程中起到重要调控作用[16-17]。本研究通过生物信息学分析发现ANXA5可能是miR-519e-5p的下游靶点，双荧光素酶报告基因实验证实miR-519e-5p可靶向调节ANXA5表达，推测ANXA5参与miR-519e-5p对脊索瘤U-CH1细胞增殖、迁移和侵袭等生物学行为的调控过程。为了验证此推测，本文以miR-519e-5p mimics和ANXA5过表达质粒联合处理U-CH1细胞，结果显示，过表达ANXA5可减弱miR-519e-5p的促凋亡活性，拮抗其对脊索瘤U-CH1细胞增殖、迁移、侵袭和上皮-间充质转化的抑制作用，提示miR-519e-5p抑制脊索瘤U-CH1细胞的生物学行为是通过靶向下调ANXA5实现的。

总之，miR-519e-5p可靶向抑制ANXA5表达诱导脊索瘤U-CH1细胞凋亡，并抑制迁移、侵袭和增殖。本研究为脊索瘤有关致病机制的阐明提供了新的理论依据，并为其分子靶向治疗提供了新的候选作用靶点，其具体分子机制会在后续研究中进行深入探讨。

[参考文献]

[1] Ulici V, Hart J. Chordoma[J]. Arch Pathol Lab Med, 2022, 146(3): 386-395. doi:10.5858/arpa.2020-0258-RA.

[2] Meng T, Huang R, Jin J, et al. A comparative integrated multi-omics analysis identifies CA2 as a novel target for chordoma[J]. Neuro Oncol, 2021, 23(10): 1709-1722. doi:10.1093/neuonc/noab156.

[3] Lee S, Halpern JL, Liang J. Pediatric extra-axial chordoma: case report and literature review[J]. Pediatr Dev Pathol, 2021, 24(6): 585-591. doi:10.1177/10935266211027429.

[4] Xu J, You Q, Wei Z, et al. miR-519 inhibits epithelial-mesenchymal transition and biologic behavior of gastric cancer cells by down-regulating FOXQ1[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2020, 13(3): 425-436.

[5] Chen Z, Li Y, Tan B, et al. Long non-coding RNA ASNR targeting miR-519e-5p promotes gastric cancer development by regulating FGFR2[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 679176-679191. doi: 10.3389/fcell.2021.679176.

[6] Ou R, Lv M, Liu X, et al. HPV16 E6 oncoprotein-induced upregulation of lncRNA GABPB1-AS1 facilitates cervical cancer progression by regulating miR-519e-5p/Notch2 axis[J]. FASEB J, 2020, 34(10): 13211-13223. doi:10.1096/fj.202000762R.

[7] Bouvet F, Ros M, Bonedeau E, et al. Defective membrane repair machinery impairs survival of invasive cancer cells[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 21821-21836. doi:10.1038/s41598-020-77902-5.

[8] Yang J, Liu P, Ma D, et al. Glucocorticoid resistance induced by ANXA5 overexpression in B-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Pediatr Hematol Oncol, 2021, 38(1): 36-48. doi:10.1080/08880018.2020.1810182.

[9] Logarajah S, Darwish MB, Jeyarajah DR. Pelvicchordoma: a multidisciplinary surgical effort[J]. J Gastrointest Surg, 2022, 26(4): 987-988.

[10] Ren L, Li Y, Zhao Q, et al. miR-519 regulates the proliferation of breast cancer cells via targeting human antigen R[J]. Oncol Lett, 2020, 19(2): 1567-1576. doi:10.3892/ol.2019.11230.

[11] Nong K, Zhang D, Chen C, et al. MicroRNA-519 inhibits hypoxia-induced tumorigenesis of pancreatic cancer by regulating immune checkpoint PD-L1[J]. Oncol Lett, 2020, 19(2): 1427-1433. doi:10.3892/ol.2019.11234.

[12] Zhou Y, Liu S, Luo Y, et al. lncRNA MAPKAPK5-AS1 promotes proliferation and migration of thyroid cancer cell lines by targeting miR-519e-5p/YWHAH[J]. Eur J Histochem, 2020, 64(4): 3177-3185. doi:10.4081/ejh.2020.3177.

[13] 李 轶，王程阳，刘顺帆，等. LncRNA ZFPM2-AS1靶向miR-519e-5p对脊索瘤U-CH1细胞生物学行为的影响[J]. 广西医科大学学报, 2023, 40(2): 268-274. doi: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2023.02.013.

[14] Han M, Li N, Li F, et al. MiR-27b-3p exerts tumor suppressor effects in esophageal squamous cell carcinoma by targeting Nrf2[J]. Hum Cell, 2020, 33(3): 641-651. doi:10.1007/s13577-020-00329-7.

[15] Yuan W, Wei F, Ouyang H, et al. CMTM3 suppresses chordoma progress through EGFR/STAT3 regulated EMT and TP53 signaling pathway[J]. Cancer Cell Int, 2021, 21(1): 510-527. doi: 10.1186/s12935-021-02159-5.

[16] Shapanis A, Lai C, Smith S, et al. Identification of proteins associated with development of metastasis from cutaneous squamous cell carcinomas (cSCCs) via proteomic analysis of primary cSCCs[J]. Br J Dermatol, 2021, 184(4): 709-721. doi:10.1111/bjd.19485.

[17] Sun X, Liu S, Wang J, et al. Annexin A5 regulates hepatocarcinoma malignancy via CRKI/II-DOCK180-RAC1 integrin and MEK-ERK pathways[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(6): 637-652. doi: 10.1038/s41419-018-0685-8.

（编辑：贺绍梅）