·论 著·

miR-933调控*KLF*6基因影响非小细胞肺癌的作用研究

李海洲[1]，张艳炜[2]，许英杰[1]，杨　门[1]，张　磊[1]，韩京军[1]

1. 中山大学附属第八医院心胸外科，广东 深圳 518000 ；
2. 深圳市疾病预防和控制中心免疫规划科，广东 深圳 518055

［摘要］　背景与目的：miRNA被认为参与肿瘤的发生、发展过程，但miRNA与肺癌的关系仍不完全清楚，探讨miR-933调控Kruppel样锌指转录因子6（Kruppel-like zinc finger transcription factor 6，*KLF*6）对肺癌细胞系增殖、迁移侵袭和诱导凋亡的影响。方法：采用实时荧光定量聚合酶链反应（real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction，RTFQ-PCR）检测正常支气管上皮细胞BEAS-2B细胞、肺癌细胞系A549、H460细胞中miR-933的表达。采用RTFQ-PCR和蛋白质印迹法（Western blot）检测*KLF*6 mRNA表达和蛋白水平。采用细胞计数试剂盒-8（cell counting kit-8，CCK-8）和EdU法检测细胞增殖，采用transwell小室实验检测细胞迁移和侵袭，采用Annexin V-异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate，FITC）/碘化丙啶（propidium iodide，PI）染色法检测细胞凋亡。结果：肺癌细胞系转染miR-933 mimic组*KLF*6 mRNA表达水平明显上调（$P<0.05$）。与阴性对照组相比，高表达miR-933能增加A549、H460细胞KLF6蛋白的相对表达水平（$P<0.05$）。过表达miR-933可抑制A549、H460细胞的增殖、迁移和侵袭能力，差异均有统计意义（$P<0.05$）。转染miR-933 mimc后，A549和H460细胞的凋亡率均显著高于各阴性对照组（$P<0.001$）。结论：miR-933通过调控*KLF*6基因的表达，诱导肺癌细胞的凋亡，抑制肺癌细胞的增殖，降低肺癌细胞的迁移和侵袭能力，影响肺癌的发生、发展。

［关键词］　miRNA；非小细胞肺癌；细胞增殖；细胞凋亡；Kruppel样锌指转录因子6

miR-933 inhibits proliferation, migration and invasion of lung cancer cell lines by regulation of *KLF*6 gene

LI Haizhou[1], ZHANG Yanwei[2], XU Yingjie[1], YANG Men[1], ZHANG Lei[1], HAN Jingjun[1]　(1. Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, The Eighth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China; 2. Department of Immune-Planning, Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, Guangdong Province, China)

Correspondence to: HAN Jingjun E-mail: kkkjjhan@foxmail.com

［Abstract］　**Background and purpose:** miRNA is supposed to be involved in the occurrence and progression of tumors. However, studies are still inadequate. This study aimed to investigate whether miR-933 can inhibit cell proliferation, migration and invasion and induce apoptosis of lung cancer cell lines A549 and H460 by regulating Kruppel-like zinc finger transcription factor 6 (*KLF*6). **Methods:** Expression of miR-933 in lung cancer cell lines (A549, H460) and bronchial epithelial cells (BEAS-2B) was detected using real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR). Lung cancer cells were transfected with miR-933 mimic and mimic NC, respectively. RTFQ-PCR and Western blot were performed to detect expression of *KLF*6 in A549 and H460. Cell proliferation was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) assay and EdU assay, migration and invasion were detected by transwell assay, and apoptosis was detected by Annexin Ⅴ-fluorescein isothiocyanate (FITC)/propidium iodide (PI) staining. **Results:** Results of RTFQ-PCR showed that the expression of KLF6 in lung cancer cell lines transfected with miR-933 mimic was obviously upregulated ($P<0.05$). Western blot assay displayed that expression of *KLF*6 protein increased in A549 and H460 transfected with

miR-933 mimic separately ($P<0.05$). Compared with negative control, the abilities of cell proliferation, migration and invasion in both A549 and H460 cells were significantly inhibited by overexpression of miR-933 ($P<0.05$). Annexin Ⅴ-FITC/PI staining results showed that apoptotic rates were 48.3%±1.0% and 6.1%±0.2% respectively in A549 and H460 cells after transfection of miR-933 mimic, compared with negative control (37.6%±0.9%, 2.7%±0.01%) ($P<0.001$). **Conclusion:** By regulating *KLF*6, miR-933 induces apoptosis, inhibits cell proliferation, reduces abilities of migration and invasion of lung cancer cells and delays the occurrence and development of lung cancer.

［**Key words**］ miRNA; Non-small cell lung cancer; Cell proliferation; Cell apoptosis; Kruppel-like zinc finger transcription factor 6

miRNA是一类广泛分布于多细胞生物中的非编码RNA，通过与靶基因mRNA 3'非翻译区（3'-untranslated region，3'-UTR）结合使其降解或抑制翻译，在蛋白质的合成过程中发挥调节作用[1]。研究[1-3]证实，miRNA通过调控基因表达，发挥多种生物学功能，影响细胞的增殖、分化、发育、凋亡和代谢，miRNA不仅参与机体的生长发育等正常生理过程，还参与肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭和肿瘤血管形成等过程。研究[4]显示，miR-933过表达对肺癌的增殖、侵袭具有抑制作用。miRNA具有肿瘤特异性，在不同肿瘤中有特定的表达水平，通过肿瘤组织与正常组织的miRNA表达谱对比分析，可发现不同肿瘤特定的异常表达miRNA，对肿瘤的早期诊断有重要意义[5]。Kruppel样锌指转录因子6（Kruppel-like zinc finger transcription factor 6，*KLF*6）是KLFs家族的重要成员，是已被证实的抑癌基因[6]，在前列腺癌[7]、结直肠癌[8]、鼻咽癌[9]等肿瘤中发挥着抑癌基因的作用。本研究旨在明确miR-933对*KLF*6基因的调控作用，以及对肺癌细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡等过程的影响并探讨相关机制。

1 材料和方法

1.1 细胞来源及主要试剂

人肺癌细胞系H460、A549，以及正常人肺支气管上皮细胞系BEAS-2B均购自中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库。

DMEM培养基和胎牛血清购自美国Gibco公司，Lipofectamine™2000转染试剂购自美国Invitrogen公司，TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司，实时荧光定量聚合酶链反应（real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction，RTFQ-PCR）试剂盒购自日本Takara

公司，细胞计数试剂盒-8（cell counting kit-8，CCK-8）购自日本Dojindo公司，miR-933 mimic和mimic NC购自生工生物工程（上海）股份有限公司，Annexin Ⅴ-异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate，FITC）/碘化丙啶（propidium iodide，PI）细胞凋亡检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及传代

将人肺癌细胞系H460、A549，以及正常人肺支气管上皮细胞系BEAS-2B加入含10%胎牛血清的DMEM培养基中，于37 ℃、CO_2体积分数为5%的培养箱中培养，当细胞融合度达到80%~90%，将生长状态良好的细胞进行传代和铺板。

1.2.2 miR-933及*KLF*6 mRNA表达水平检测

采用TRIzol法提取细胞的总RNA，反转录成cDNA，RTFQ-PCR反应体系及程序参考试剂盒说明书。以*U*6、*GAPDH*作为*KLF*6内参对照，测定miR-933、*KLF*6的相对表达量，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法分析。引物序列见表1。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequence

Primer	Sequence (5'-3')
miR-933	Forward: CGTGTGCGCAGGGAGACC
	Reverse: GTGCAGGGTCCGAGGTATT
*U*6	Forward: AGAGAAGATTAGCATGGCCCCTG
	Reverse: ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG
*KLF*6	Forward: CTGCCGTCTCTGGAGGAGT
	Reverse: TCCACAGATCTTCCTGGCTGTC
GAPDH	Forward: CCTGGTATGACAACGAATTTG
	Reverse: CAGTGAGGGTCTCTCTCTTCC

1.2.3 分组及瞬时转染miR-933

实验分为miR-933 mimic阴性对照组（mimic NC）和miR-933 mimic组。每孔以$5×10^4$个细胞铺于6孔板内培养至细胞汇合度达到40%~50%，

转染miR-933 mimic和mimic NC，培养6 h后，换成完全培养基继续培养48 h，收集各组细胞用于后续实验。

1.2.4 细胞增殖检测

取1×10^3个转染后细胞铺于96孔板中，分别培养0、24、48、72、96 h，根据CCK-8说明书，测定每孔吸光度（D）值，实验重复3次。

1.2.5 EdU细胞增殖实验

根据EdU试剂盒说明书，对转染后各组细胞进行固定、染色，使用荧光显微镜拍照成像，随机取5个视野计数，实验重复3次。

1.2.6 细胞迁移能力检测

收集转染后细胞，用无血清培养基制成3×10^5个细胞/mL的细胞悬液加入上室，下室加入完全培养基。培养24 h后，细胞固定、染色，使用荧光显微镜拍照成像，随机取10个视野计数，实验重复3次。

1.2.7 细胞侵袭检测

采用matrigel基质胶包埋transwell小室，用无血清培养基制成4×10^5个细胞/mL的转染后细胞悬液加入小室，下室加入完全培养基。培养48 h后，细胞固定、染色，使用荧光显微镜拍照成像，随机取10个视野计数，实验重复3次。

1.2.8 细胞凋亡能力检测

根据Annexin Ⅴ-FITC/PI凋亡试剂盒说明书，在转染后的细胞加入Annexin Ⅴ-FITC和PI混匀，采用流式细胞仪上机检测。

1.2.9 KLF6表达水平检测

提取转染后细胞的总蛋白，采用二喹啉甲酸（bicinchoninic acid，BCA）蛋白浓度检测试剂盒测定蛋白浓度，进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE），加入KLF6抗体、GAPDH抗体温育，发光成像。采用Image J软件分析各组细胞KLF6蛋白条带总灰度值，计算蛋白表达水平。

1.2.10 数据库分析

利用UALCAN（http://ualcan.path.uab.edu/index.html）、GEO（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/）和Kaplan-Meier Plotter（https://kmplot.com/analysis/）等公共数据库分析KLF6对肺癌临床病理学参数的影响。

1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0软件对数据进行统计学分析。计量资料结果用$\bar{x} \pm s$表示，对于符合正态分布的两组比较采用t检验，$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 miR-933在BEAS-2B、A549、H460细胞中的表达水平

RTFQ-PCR检测结果见图1，miR-933在A549细胞中的相对表达量为0.458 ± 0.029，在H460细胞中的相对表达量为0.295 ± 0.014，与BEAS-2B细胞相比，差异有统计学意义（A549：$t=32.29$，$P<0.001$；H460：$t=85.61$，$P<0.001$）。
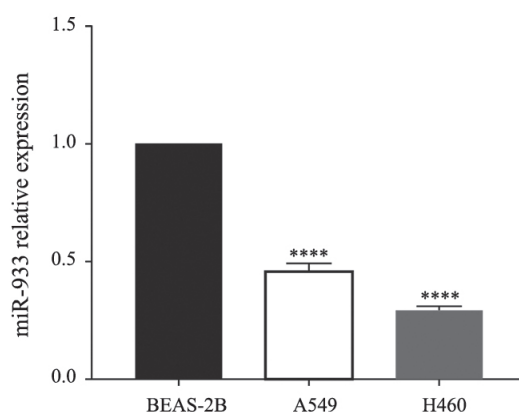

图 1 miR-933在正常肺支气管上皮细胞和肺癌细胞系中的表达水平

Fig. 1 Expression of miR-933 in lung bronchial epithelial cells and lung cancer cell lines

Expression of miR-933 in three cell lines was examined by RTFQ-PCR. ****: $P<0.001$, compared with BEAS-2B

2.2 miR-933转染效率以及KLF6基因mRNA表达和蛋白水平

在A549和H460构建miR-933过表达的细胞模型中，通过RTFQ-PCR检测转染效率。miR-933 mimic组A549和H460细胞中miR-933的表达水平比mimic NC组显著提高（A549：$t=62.03$，$P<0.000\ 1$；H460：$t=50.49$，$P<0.000\ 1$，

图2A）。转染后，A549和H460细胞的*KLF*6基因mRNA相对表达水平均显著提高（A549：$t=12.34$，$P<0.001$；H460：$t=9.472$，$P<0.05$，图2B）。与mimic NC组相比，mimic组的A549和H460细胞的*KLF*6蛋白相对表达水平均显著提高（A549：$t=4.233$，$P<0.05$；H460：$t=7.63$，$P<0.05$，图2C）。

2.3　miR-933对A549和H460细胞增殖的影响

CCK-8实验结果见图3，mimic组A549和H460细胞在48、72、96 h的增殖能力均低于mimic NC组（$P<0.05$）。EdU实验结果见图4，结果显示，转染miR-933显著抑制A549和H460细胞的增殖能力（A549：$t=42.28$，$P<0.001$；H460：$t=5.631$，$P<0.01$）。
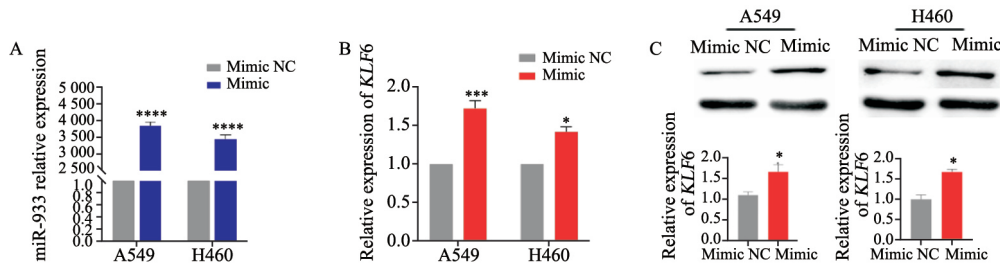

图2　miR-933调控*KLF*6基因的表达

Fig. 2　*KLF*6 gene regulated by miR-933

A: Overexpression of miR-933 in A549 and H460 was examined by RTFQ-PCR. B: The mRNA level of *KLF*6 in A549 and H460 cells after transfection with miR-933 mimic. C: The protein level of KLF6 in A549 and H460 cells after transfection with miR-933 mimic. *: $P<0.05$, compared with mimic NC group; ***: $P<0.001$, compared with mimic NC group; ****: $P<0.000\,1$, compared with mimic NC group
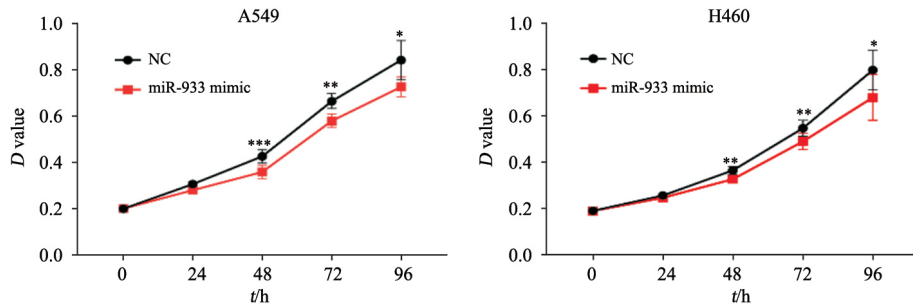

图3　CCK-8检测转染miR-933 mimic对A549和H460细胞增殖能力的影响

Fig. 3　CCK-8 assay for assessing the effect of miR-933 on proliferation of A549 and H460 cells after transfection with miR-933 mimic

*: $P<0.05$, compared with miR-933 mimic group; **: $P<0.01$, compared with miR-933 mimic group; ***: $P<0.001$, compared with miR-933 mimic group
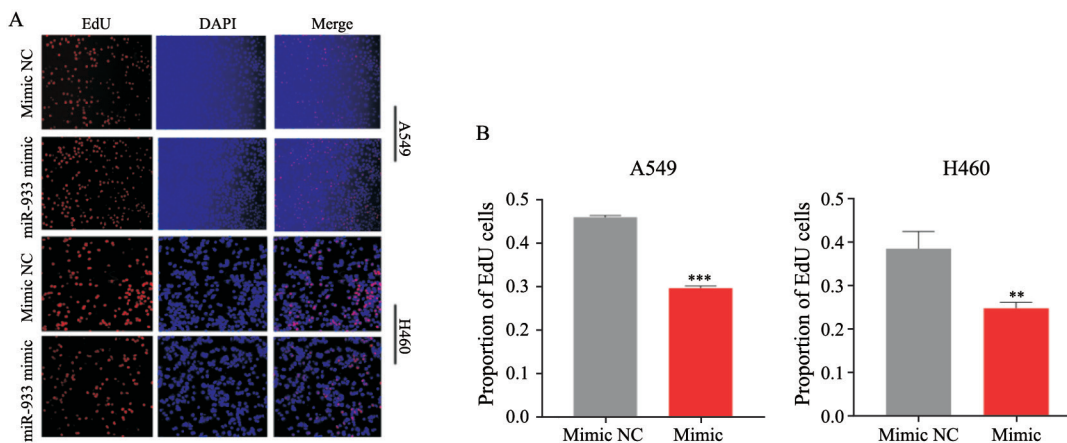

图4　EdU检测转染miR-933 mimic对A549和H460细胞增殖能力的影响

Fig. 4　EdU assay for assessing the effect of miR-933 on proliferation of A549 and H460 cells

A: The EdU-positive cells (number of cell proliferation) in A549 and H460 cells were shown after transfection with miR-933 mimic. B: The proportion of EdU-positive cells in two different groups was analyzed. **: $P<0.01$, compared with mimic NC group; ***: $P<0.001$, compared with mimic NC group

2.4 miR-933对A549和H460细胞迁移和侵袭能力的影响

迁移实验结果见图5，与mimic NC组相比，miR-933 mimic组A549和H460细胞的迁移率均显著降低（A549：$t=25.21$，$P<0.01$；H460：$t=13.87$，$P<0.01$）。Transwell侵袭实验结果见图6，miR-933 mimic组A549和H460细胞的侵袭能力、侵袭率均低于mimic NC组（A549：$t=23.18$，$P<0.01$；H460：$t=21.02$，$P<0.01$）。

2.5 miR-933对A549和H460细胞凋亡的影响

miR-933 mimic组A549和H460细胞凋亡率分别为48.30%±1.00%和6.10%±0.20%，均显著高于mimic NC对照组（37.60%±0.90%和2.70%±0.01%），差异均有统计学意义（A549：$t=13.18$，$P<0.001$；H460：$t=29.41$，$P<0.000\,1$，图7）。
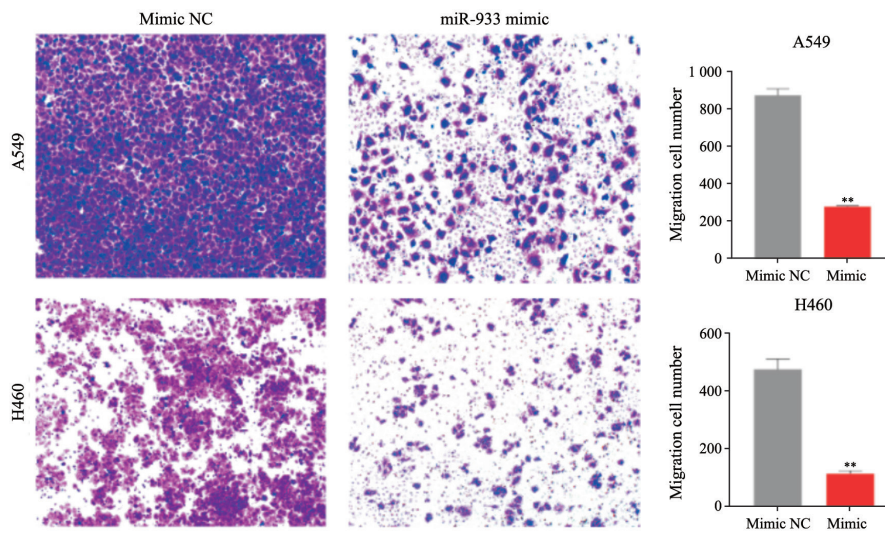

图 5 转染miR-933mimic抑制A549和H460细胞迁移能力

Fig. 5 The inhibited migration of A549 and H460 cells after transfection of miR-933 mimic
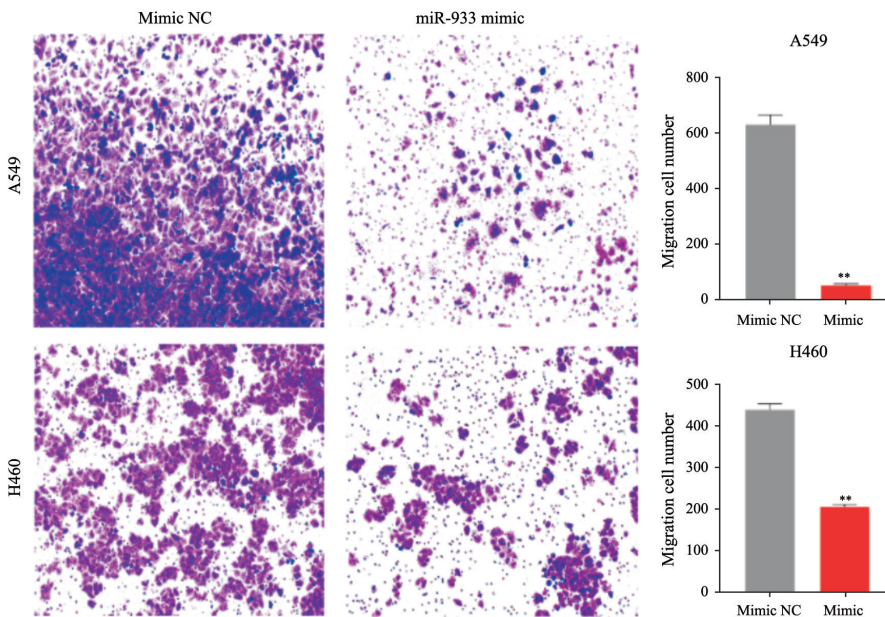
**: $P<0.01$, compared with mimic NC group

图 6 转染miR-933 mimic抑制A549和H460细胞侵袭能力

Fig. 6 The inhibited invasive ability of A549 and H460 cells after transfection of miR-933 mimic

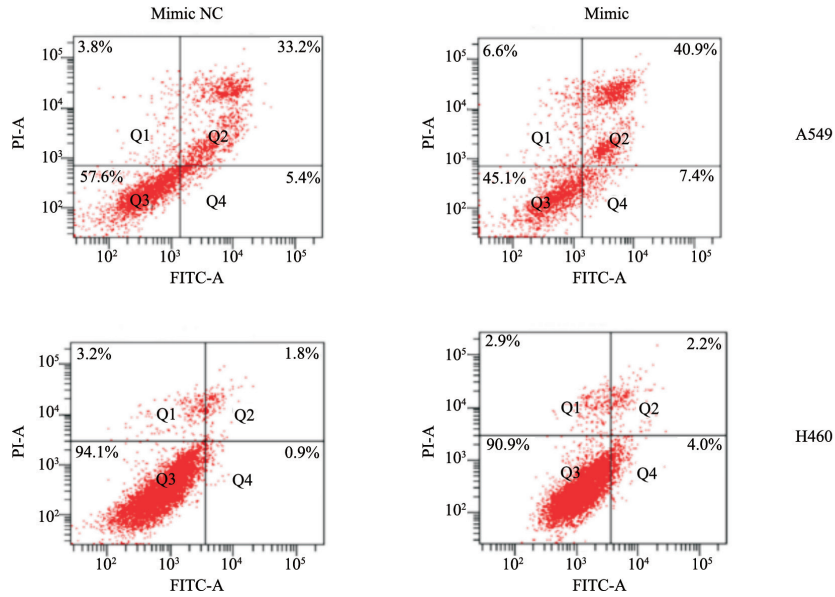**: $P<0.01$, compared with mimic NC group

图 7　流式细胞术检测转染miR-933 mimic对A549和H460细胞凋亡的影响

Fig. 7　The effect of transfection of miR-933 mimic on apoptosis of A549 and H460 cells detected by flow cytometry

2.6　*KLF*6基因对肺癌患者预后的影响

在TCGA数据库59例正常组织样本和515例肺癌组织样本中，*KLF*6基因较正常组织显著下调（图8A）。在GEO数据库[10]10例正常组织样本和82例肺癌组织样本中，与正常肺组织相比，肺癌组织中*KLF*6基因明显下调（$P<0.001$，图8B）。在不同临床分期的肺癌组织（正常组织59例，Ⅰ期病例277例，Ⅱ期病例125例，Ⅲ期病例85例，Ⅳ期病例28例）中，*KLF*6基因表达无明显差异（$P>0.05$，图8C）。Kaplan-Meier生存曲线显示，高表达*KLF*6与肺癌患者的生存率呈正相关（$P<0.05$，图8D）。
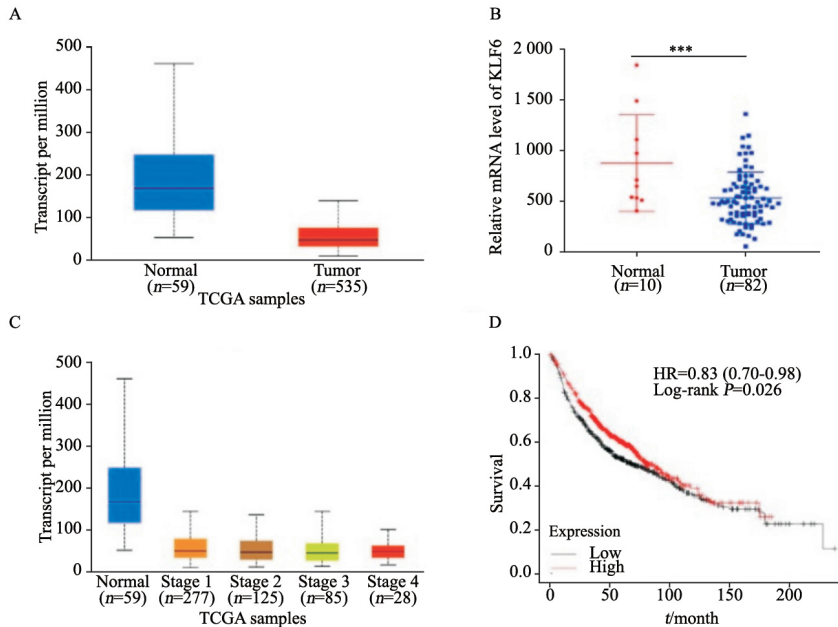

图 8　*KLF*6表达与肺癌临床病理学参数的关系

Fig. 8　Study of the clinical association of *KLF*6 with the clinicopathologic parameters of lung cancer

A: TCGA database was used to analyze the differential expression between lung normal and tumor tissue. B: GEO database was utilized to analyze the differential expression between lung normal and tumor tissue. C: The expression of *KLF*6 in different clinical stages was analyzed by TCGA database. D: Kaplan-Meier plots was used to estimate the overall survival in lung cancer cases with high or low level of *KLF*6. ***: $P<0.01$, compared with lung normal tissue

3 讨 论

肺癌是中国癌症致死的首要原因，严重威胁着中国国民健康和社会经济的发展。肺癌作为一种高发病率、高死亡率的全球性慢性疾病，仍然是人类面临的严峻安全问题之一[11]。国际癌症研究机构2018年最新报告显示，全球有1 810万癌症新增病例和960万例癌症死亡病例，其中肺癌新增病例数为200多万（11.6%）、死亡病例数170多万（18.4%）排在首位[12]。中国肿瘤登记中心数据显示，2015年肺癌新增病例78.7万例、死亡病例63.1万例[13]，肺癌已成为危害人类健康的最大"杀手"。因此，研究肺癌发生、发展的分子调控机制并寻找有效的治疗靶点，有利于优化现有肺癌治疗手段。

miRNA是一类长度为18~22 nt的非编码RNA，广泛参与基因的表达和调控[1]。miRNA在肿瘤中表达失调，肿瘤组织中部分miRNA表达上调或下调，发挥着癌基因或抑癌基因的作用[3]。Fang等[14]研究发现，miR-20a-5p在非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer，NSCLC）组织中表达上调，在A549细胞中过表达miR-20a-5p能够增强细胞的增殖和侵袭能力，促进肿瘤的进展。miR-199的表达与肺癌患者的临床分期、淋巴结和远处转移密切相关，低表达miR-199与预后不良呈正相关，miR-199表达越低，预后越差，miR-199可以作为肺癌预后的生物标志物[15]。过表达miR-199可以增强H1299和SPCA1肺癌细胞的增殖能力，促进其迁移和侵袭能力[15]。Xu等[16]研究发现，在肺癌细胞中过表达miR-129-5p可下调YWHAB，诱导细胞的凋亡。本研究发现，miR-933在肺癌细胞A549和H460中均显著下调，而且过表达miR-933能抑制A549和H460细胞的增殖，降低其迁移和侵袭能力，诱导细胞凋亡。因此，miR-933可能是NSCLC潜在的抑癌基因。同时，越来越多的miRNA被证实在结直肠癌[17-18]、肝癌[19-20]、肾细胞癌[19-20]等多种肿瘤中表达异常，从而引起靶基因和蛋白的表达失调。

KLF6是一种锌指转录因子，调节细胞增殖、分化、发育和程序性死亡，其功能改变与许多人类疾病的病理学过程有关，包括心血管疾病、代谢紊乱和癌症[19-20]，KLF6已被证明是多种肿瘤的抑癌基因[6, 8]。Ito等[21]研究表明，KLF6在NSCLC组织中经常下调，并通过诱导NSCLC细胞凋亡来抑制肿瘤生长，表明KLF6是NSCLC的肿瘤抑制因子。另外，KLF6基因多态性与肺癌的发病风险有关联性[22]。本研究结果显示，过表达miR-933提高了KLF6 mRNA表达和KLF6蛋白的水平，过表达miR-933能诱导肺癌细胞凋亡，抑制细胞增殖，提示miR-933可能通过调控KLF6表达发挥抑癌基因的作用。相比正常组织，KLF6在肺癌组织中的表达量显著下调，提示KLF6是诱导肺癌发生的重要因子。而且，由Kaplan-Meier生存曲线可知，高表达KLF6的肺癌患者的总生存率高于低表达KLF6的患者，因此，KLF6可作为判断肺癌患者预后的重要指标。Tahara等[23]研究发现，KLF6与佛波酯（phorbol myristate acetate，PMA）相互作用，引起NSCLC细胞生长阻滞，KLF6基因表达缺失可以促进肺癌细胞H358的生长，而且KLF6还通过诱导CDKIs、p21和p27参与PMA调节细胞生长，从而抑制肺癌细胞的增殖能力。miR-24-3p通过调控靶向KLF6基因，间接调节IL-6/STAT3信号通路影响食管癌细胞的生长和凋亡，沉默miR-24-3p使KLF6基因的表达水平上调，从而抑制食管癌细胞的增殖活力，促进其凋亡[24]。吴鑫等[25]研究发现，KLF6在结直肠癌组织、癌前病变组织中的表达水平低于癌旁正常组织，并与肿瘤分化程度、淋巴结转移、TNM分期有一定相关性。高表达miR-543靶向结合KLF6的3'-UTR并抑制KLF6的表达，通过靶向调控KLF6的表达来调控p21的表达，从而调控肾透明细胞癌的增殖和侵袭，影响肾透明细胞癌的发生、发展[26]。

本研究证实miR-933过表达可以抑制肺癌细胞A549和H460的增殖、迁移和侵袭能力，同时miR-933能诱导肺癌细胞系的凋亡。而miR-933过表达可以提高KLF6 mRNA表达和KLF6蛋白的水平，说明miR-933可以调控KLF6表达，发挥抑制肺癌发生、发展的作用。本研究进一步揭示了miRNA在NSCLC发病中的分子机制，发现miR-933可能为NSCLC的诊断和治疗提供新的靶点。

［参　考　文　献］

［1］ GEBERT L F R, MACRAE I J. Regulation of microRNA function in animals ［J］. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(1): 21–37.

［2］ CELIÀ-TERRASSA T, LIU D D, CHOUDHURY A, et al. Normal and cancerous mammary stem cells evade interferon-induced constraint through the miR-199a-LCOR axis ［J］. Nat Cell Biol, 2017, 19(6): 711–723.

［3］ GORBEA C, MOSBRUGER T, CAZALLA D. A viral Sm-class RNA base-pairs with mRNAs and recruits microRNAs to inhibit apoptosis ［J］. Nature, 2017, 550(7675): 275–279.

［4］ 韩京军, 张艳炜, 张　磊, 等. 微小RNAs对肺癌细胞系侵袭、迁移及凋亡的影响［J］. 解剖学报, 2020, 51(3): 392–397.
HAN J J, ZHANG Y W, ZHANG L, et al. Effects of microRNAs on invasion, migration and apoptosis of lung cancer cell lines ［J］. Acta Anat Sin, 2020, 51(3): 392–397.

［5］ RUPAIMOOLE R, CALIN G A, LOPEZ-BERESTEIN G, et al. miRNA deregulation in cancer cells and the tumor microenvironment ［J］. Cancer Discov, 2016, 6(3): 235–246.

［6］ NARLA G, HEATH K E, REEVES H L, et al. *KLF*6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer ［J］. Science, 2001, 294(5551): 2563–2566.

［7］ CHEN C, HYYTINEN E R, SUN X, et al. Deletion, mutation, and loss of expression of *KLF*6 in human prostate cancer ［J］. Am J Pathol, 2003, 162(4): 1349–1354.

［8］ REEVES H L, NARLA G, OGUNBIYI O, et al. Kruppel-like factor 6 (*KLF*6) is a tumor-suppressor gene frequently inactivated in colorectal cancer ［J］. Gastroenterology, 2004, 126(4): 1090–1103.

［9］ CHEN H K, LIU X Q, LIN J, et al. Mutation analysis of *KLF*6 gene in human nasopharyngeal carcinomas ［J］. Chin J Cancer, 2002, 21(10): 1047–1050.

［10］ BEER D G, KARDIA S L, HUANG C C, et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma ［J］. Nat Med, 2002, 8(8): 816–824.

［11］ CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 ［J］. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115–132.

［12］ BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries ［J］. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394–424.

［13］ 孙可欣, 郑荣寿, 张思维, 等. 2015年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析［J］. 中国肿瘤, 2019, 28(1): 1–11.
SUN K X, ZHENG R S, ZHANG S W, et al. Report of cancer incidence and mortality in different areas of China, 2015 ［J］. China Cancer, 2019, 28(1): 1–11.

［14］ FANG Q Y, DENG Q F, LUO J, et al. MiRNA-20a-5p accelerates the proliferation and invasion of non-small cell lung cancer by targeting and downregulating KLF9 ［J］. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(5): 2548–2556.

［15］ SU W Z, REN L F. MiRNA-199 inhibits malignant progression of lung cancer through mediating RGS17 ［J］. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(8): 3390–3400.

［16］ XU C S, DU Z L, REN S M, et al. MiR-129-5p sensitization of lung cancer cells to etoposide-induced apoptosis by reducing YWHAB ［J］. J Cancer, 2020, 11(4): 858–866.

［17］ YU Y J, NANGIA-MAKKER P, FARHANA L, et al. A novel mechanism of lncRNA and miRNA interaction: CCAT2 regulates miR-145 expression by suppressing its maturation process in colon cancer cells ［J］. Mol Cancer, 2017, 16(1): 155.

［18］ ROKAVEC M, HORST D, HERMEKING H. Cellular model of colon cancer progression reveals signatures of mRNAs, miRNA, lncRNAs, and epigenetic modifications associated with metastasis ［J］. Cancer Res, 2017, 77(8): 1854–1867.

［19］ ZHAO H Y, WANG M H, XIONG X H, et al. Simultaneous fluorescent detection of multiplexed miRNA of liver cancer based on DNA tetrahedron nanotags ［J］. Talanta, 2020, 210: 120677.

［20］ YAO L L, ZHOU Y D, SUI Z H, et al. HBV-encoded miR-2 functions as an oncogene by downregulating TRIM35 but upregulating RAN in liver cancer cells ［J］. EBioMedicine, 2019, 48: 117–129.

［21］ ITO G, UCHIYAMA M, KONDO M, et al. Krüppel-like factor 6 is frequently down-regulated and induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells ［J］. Cancer Res, 2004, 64(11): 3838–3843.

［22］ SPINOLA M, LEONI V P, GALVAN A, et al. Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis of lung cancer risk detects the *KLF*6 gene ［J］. Cancer Lett, 2007, 251(2): 311–316.

［23］ TAHARA E, KADARA H, LACROIX L, et al. Activation of protein kinase C by phorbol 12-myristate 13-acetate suppresses the growth of lung cancer cells through *KLF*6 induction ［J］. Cancer Biol Ther, 2009, 8(9): 801–807.

［24］ 张　倬, 熊　飞, 陈天佑, 等. miR-24-3p靶向*KLF*6基因调控IL-6/STAT3信号通路影响食管癌细胞的活力和凋亡［J］. 中国病理生理杂志, 2020, 36(1): 97–103.
ZHANG Z, XIONG F, CHEN T Y, et al. miR-24-3p targeting *KLF*6 gene affects viability and apoptosis of esophageal cancer cells via IL-6/STAT3 signaling pathway ［J］. Chin J Pathophysiol, 2020, 36(1): 97–103.

［25］ 吴　鑫, 张义胜, 赵海远, 等. 结直肠癌、癌前病变中*KLF*6 mRNA与蛋白表达的研究［J］. 皖南医学院学报, 2016, 35(6): 555–558.
WU X, ZHANG Y S, ZHAO H Y, et al. *KLF*6 mRNA and protein expression levels in colorectal cancer and precancerous lesions ［J］. Acta Acad Med Wannan, 2016, 35(6): 555–558.

［26］ 杨　帆. miR-543通过靶向*KLF*6调控肾透明细胞癌细胞增殖和侵袭的机制研究［D］. 西安: 空军军医大学, 2018.
YANG F. miR-543 regulates proliferation and invasion of renal clear cell carcinoma cells by targeting *KLF*6 ［D］. Xi'an: Air Force Medical University, 2018.