四川大学学报（医学版） 2026，57（4）：1042－1051
J Sichuan Univ（Med Sci） DOI: 10.12182/20260760605

在线全文

miR-429靶向*HMOX1*调控肺腺癌细胞侵袭、迁移和铁死亡的分子机制研究*

高馨宇[1]，龚秀莹[2]，侯顺福[2]，张致涵[3]，李洪利[4]，王雪净[5△]

1. 山东第二医科大学康复医学院（潍坊 261000）；2. 山东第二医科大学基础医学院（潍坊 261000）；3. 山东第二医科大学生命科学与技术学院（潍坊 261000）；4. 山东第二医科大学医学实验研究中心（潍坊 261000）；5. 山东第二医科大学医学影像学院（潍坊 261000）

【摘要】 目的 探讨microRNA-429（miR-429）对肺腺癌细胞侵袭、迁移及铁死亡的影响，为临床抑制肺腺癌侵袭迁移、促进铁死亡提供新思路。**方法** 利用starBase数据库分析miR-429在肺腺癌组织中的表达谱。采用实时荧光定量PCR（quantitative real-time PCR, qRT-PCR）检测miR-429在正常肺支气管上皮细胞BEAS-2B及肺腺癌细胞系A549、H1975中的表达水平，并评估质粒转染效率。通过5-乙炔基-2′-脱氧尿苷（EdU）增殖实验、划痕愈合实验和Transwell侵袭实验评估miR-429对A549细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。基于生物信息学数据库预测miR-429潜在靶向的铁死亡相关蛋白，利用双荧光素酶报告基因实验验证miR-429与血红素氧合酶1（heme oxygenase 1, *HMOX1*）的靶向结合关系。进一步通过上述功能实验验证miR-429靶向*HMOX1*对A549细胞恶性表型的影响。检测活性氧（reactive oxygen species, ROS）及脂质活性氧（lipid reactive oxygen species, L-ROS）水平，分析miR-429及*HMOX1*对肺腺癌细胞氧化应激状态的调节作用。测定丙二醛（malondialdehyde, MDA）、谷胱甘肽（glutathione, GSH）及Fe^{2+}含量，评估miR-429和*HMOX1*对肺腺癌细胞铁死亡关键指标的影响。**结果** miR-429在肺腺癌细胞系A549、H1975中的表达显著高于正常BEAS-2B细胞，其中A549细胞表达水平最高。功能实验表明，miR-429可促进A549细胞增殖、迁移和侵袭。双荧光素酶实验证实miR-429可直接靶向结合*HMOX1*，二者在肺腺癌细胞中表达呈负相关。*HMOX1*过表达可抑制A549细胞的增殖、侵袭和迁移，而miR-429过表达可逆转这一抑制效应。机制上，miR-429通过靶向抑制*HMOX1*，降低A549细胞内ROS、L-ROS、MDA及Fe^{2+}水平，同时升高GSH含量，从而降低细胞对铁死亡的敏感性。**结论** miR-429通过靶向抑制*HMOX1*，促进肺腺癌细胞侵袭和迁移，并抑制铁死亡的发生。

【关键词】 miR-429 侵袭 迁移 铁死亡 肺腺癌 *HMOX1*基因

Molecular Mechanism of microRNA-429 Targeting *HMOX1* to Regulate Invasion, Migration, and Ferroptosis in Lung Adenocarcinoma Cells

Gao Xinyu[1], *Gong Xiuying*[2], *Hou Shunfu*[2], *Zhang Zhihan*[3], *Li Hongli*[4], *Wang Xuejing*[5△]. 1. *School of Rehabilitation Medicine, Shandong Second Medical University, Weifang 261000, China*; 2. *School of Basic Medicine, Shandong Second Medical University, Weifang 261000, China*; 3. *School of Life Sciences and Technology, Shandong Second Medical University, Weifang 261000, China*; 4. *Medical Experimental Research Center, Shandong Second Medical University, Weifang 261000, China*; 5. *School of Medical Imaging, Shandong Second Medical University, Weifang 261000, China*

△ Corresponding author

This study was supported by the Shandong Provincial Natural Science Foundation (General Program, No. ZR2022MH311), the National Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students (No. 202310438044), the Weifang Science and Technology Development Plan (Soft Science) Project (No. 2024RKX007), and the Shandong Second Medical University Education and Teaching Reform Research Project (No. 2024YB039).

[Abstract] Objective To investigate the effects of microRNA-429 (miR-429) on the invasion, migration, and ferroptosis of lung adenocarcinoma (LUAD) cells, and to provide new insights into the clinical inhibition of LUAD invasion and migration and the promotion of ferroptosis. **Methods** The expression profile of miR-429 in LUAD tissues was analyzed using the starBase database. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed to assess miR-429 expression levels in normal human bronchial epithelial cells (the BEAS-2B cell line) and LUAD cells (the A549 and H1975 cell lines), and to evaluate the plasmid transfection efficiency. The effects of miR-429 on A549 cell proliferation,

* 山东省自然科学基金面上项目（No. ZR2022MH311）、2023年国家级大学生创新创业训练计划项目（No. 202310438044）、2024年潍坊市科技发展计划（软科学）项目（No. 2024RKX007）和山东第二医科大学2024年校级教育教学改革与研究课题（No. 2024YB039）资助

△ 通信作者

出版日期：2026-07-20

migration, and invasion were assessed using 5-ethynyl-2′-deoxyuridine (EdU) incorporation assay, scratch wound healing assay, and Transwell invasion assay, respectively. Potential ferroptosis-related proteins targeted by miR-429 were predicted using bioinformatics databases, and the targeting relationship between miR-429 and heme oxygenase 1 (*HMOX1*) was validated by a dual-luciferase reporter assay. Further functional experiments were performed to examine the effect of miR-429 targeting *HMOX1* on the malignant phenotypes of A549 cells. The levels of reactive oxygen species (ROS) and lipid ROS (L-ROS) were measured to analyze the regulatory effects of miR-429 and *HMOX1* on oxidative stress in LUAD cells. The contents of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), and ferrous ion (Fe^{2+}) were measured to evaluate evaluate the effects of miR-429 and *HMOX1* on key ferroptosis-associated indicators in LUAD cells. **Results** miR-429 expression was significantly higher in LUAD cell lines (A549 and H1975) compared with that in normal cells (BEAS-2B), with the highest expression level observed in A549 cells. Functional experiments demonstrated that miR-429 promoted A549 cell proliferation, migration, and invasion. The dual-luciferase assay confirmed that miR-429 directly targeted *HMOX1*, and their expression levels were negatively correlated in LUAD cells. *HMOX1* overexpression inhibited the proliferation, invasion, and migration of A549 cells, while miR-429 overexpression reversed these inhibitory effects. Mechanistically, miR-429 targeted and inhibited *HMOX1*, which led to reduced intracellular levels of ROS, L-ROS, MDA, and Fe^{2+} and increased GSH levels in A549 cells, thereby decreasing cellular sensitivity to ferroptosis. **Conclusion** miR-429 promotes the invasion and migration of LUAD cells and inhibits ferroptosis by targeting and inhibiting *HMOX1*.

[Key words] microRNA-429　Invasion　Migration　Ferroptosis　Lung adenocarcinoma　*HMOX1* gene

肺癌是全球癌症相关死亡的首要原因[1]。在所有肺癌患者中，约85%被诊断为非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer, NSCLC），其中肺腺癌（lung adenocarcinoma, LUAD）和肺鳞状细胞癌（lung squamous cell carcinoma, LUSC）是NSCLC最主要的两种组织学亚型[2]。近年来，LUAD病例约占肺癌总数的50%，其发病率持续上升主要与该亚型的高度侵袭和迁移特性密切相关[3]。因此，阐明LUAD侵袭和迁移的分子机制，对于发现有效治疗靶点具有重要的临床意义。

微小RNA（microRNA, miRNA）是一类内源性非编码小RNA，长度约为22个核苷酸，在真核生物中广泛存在。它们通过与其靶基因mRNA的互补序列相结合，诱导靶mRNA翻译抑制或降解，从而在基因表达调控及细胞分化、增殖和存活等生物学过程中发挥关键调控作用[4]。大量研究表明，miRNAs参与多种恶性肿瘤（如甲状腺癌[5]、肺腺癌[6]、食管癌[7]等）的侵袭和转移。既往研究显示，miR-429可促进乳腺癌细胞的侵袭和转移[8]，提示其可能通过多种机制驱动肿瘤进展。然而，miR-429是否影响LUAD细胞的侵袭和迁移，目前尚未见报道。

铁死亡是一种铁依赖性程序性细胞死亡形式，以脂质过氧化物蓄积及细胞膜损伤为主要特征，其调控失调与多种恶性肿瘤的发生发展及治疗反应密切相关[9]。已有研究表明，miR-144-3p可通过调控锌指E盒结合同源盒1（Zinc-finger E box-binding homeobox 1, ZEB1）诱导铁死亡，从而抑制骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭[10]；此外，miR-214-3p亦可通过靶向转录激活因子4（activating transcription factor 4, ATF4）增强erastin在肝癌细胞中诱导的铁死亡效应[11]。上述发现提示，诱导铁死亡作为一种极具前景的治疗策略，在肺癌治疗中具有广阔的临床应用潜力。本研究旨在探究miR-429通过调控LUAD细胞铁死亡而影响其侵袭和迁移的分子机制，为LUAD临床治疗及侵袭转移的预防提供新靶点和新思路。

1　材料与方法

1.1　主要试剂

1.1.1　细胞系来源及伦理声明

人正常肺支气管上皮细胞系BEAS-2B、人肺腺癌细胞系A549和H1975均购自美国典型培养物保藏中心（ATCC）。所有实验操作均遵循山东第二医科大学生物安全委员会及伦理委员会的指导原则。本研究不涉及人体组织样本或动物实验，故免于伦理审查。

1.1.2　主要试剂

胎牛血清（货号：164250）及RPMI-1640培养基（货号：PM150110）购自武汉普诺赛生命科技有限公司；EdU细胞增殖检测试剂盒（货号：C0078L）购自上海碧云天生物技术有限公司；吉姆萨染液（货号：G1010）购自北京索莱宝科技有限公司；Transwell小室（货号：GLS3413）购自美国康宁公司。

1.2　主要方法

1.2.1　细胞转染及分组

A549细胞按武汉普诺赛生命科技有限公司提供的培养条件进行培养。miR-429模拟物（mimic）、miR-429阴性对照（negative control, NC）、miR-429抑制剂（inhibitor）及抑制剂阴性对照（inhibitor NC）均购自Sigma-Aldrich上海基因制药有限公司（中国上海）。将A549细胞分为以下8组进行转染：（1）oe-CON组：转染miR-429过表达对照质粒；

(2)oe-miR-429组:转染miR-429过表达质粒;(3)inhibitor CON组:转染miR-429抑制剂对照质粒;(4)miR-429 inhibitor组:转染miR-429特异性抑制剂质粒;(5)oe-CON+oe-NC组:共转染miR-429过表达对照质粒与HMOX1过表达对照质粒;(6)oe-miR-429+oe-NC组:共转染miR-429过表达质粒与HMOX1过表达对照质粒;(7)oe-CON+oe-*HMOX1*组:共转染miR-429过表达对照质粒与HMOX1过表达质粒;(8)oe-miR-429+oe-*HMOX1*组:共转染miR-429过表达质粒与HMOX1过表达质粒。

1.2.2 qRT-PCR实验

采用茎环法qRT-PCR检测正常肺上皮细胞BEAS-2B及肺腺癌细胞H1975、A549中miR-429的表达水平。将A549细胞按oe-CON组和oe-miR-429组进行转染,以检测miR-429过表达质粒的转染效率。收集细胞,加入TRIzol试剂提取总RNA,取1 μL反转录产物作为模板,以*U6*为内参,使用QS1 Plus荧光定量PCR仪进行扩增。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算相对表达量。引物序列如下:miR-429上游引物5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3',下游5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCA-3';*U6*上游引物5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',下游5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

1.2.3 EdU细胞增殖实验

将转染后的各组A549细胞接种于爬片上培养24 h,待细胞融合度达约90%时进行EdU检测。具体操作如下:EdU工作液孵育细胞2 h,PBS洗涤3次;甲醇固定15 min,PBS洗涤3次;0.2% Triton X-100透膜处理1 h,PBS洗涤3次;避光条件下加入Click反应液孵育20 min,PBS洗涤3次;Hoechst染液染核10 min,PBS洗涤3次后封片。于荧光显微镜下观察并随机拍照,计数EdU阳性细胞,计算增殖率。

1.2.4 细胞划痕实验

将转染后的各组A549细胞接种于含10%胎牛血清(FBS)的RPMI-1640培养基的6孔板中,培养24 h至细胞汇合度达70%~80%。用200 μL无菌枪头尖端在单层细胞上划一道直线划痕。PBS轻柔洗涤孔板3次,去除划痕产生的细胞碎片与未贴壁细胞。更换无血清RPMI-1640培养基,继续培养24 h。分别于0 h和24 h时随机选取3个不同视野拍照,测量划痕间距,计算细胞迁移距离。

1.2.5 Transwell迁移实验

收集对数生长期转染后的各组A549细胞,用无血清培养基重悬,计数并调整细胞浓度至2.5×10^5个/mL。取200 μL细胞悬液接种于基质胶包被的Transwell小室上室,下室加入600 μL含10%胎牛血清(FBS)的RPMI-1640培养基以形成趋化梯度。细胞于37 ℃、5%CO_2条件下培养24 h后,PBS清洗小室,4 ℃预冷甲醇固定20 min,PBS再次清洗。Giemsa染液染色1 h,PBS清洗。室温干燥小室膜后,于光学显微镜下随机选取视野拍照,计数迁移至膜下表面的细胞数,并进行统计学分析。

1.2.6 双荧光素酶报告基因实验

将HEK293T细胞接种于24孔板中培养24 h,随后进行无血清同步化处理30 min。将miR-429过表达质粒(或对照质粒)分别与HMOX1野生型(*HMOX1*-3'-UTR-WT)或突变型(*HMOX1*-3'-UTR-Mut)报告基因质粒共转染至细胞中。转染48 h后,加入PLB裂解液裂解细胞15 min,收集裂解上清液。按照双荧光素酶检测试剂盒说明书测定荧光素酶活性,计算相对荧光素酶活性值。

1.2.7 Western blot实验

细胞转染后提取总蛋白,经SDS-PAGE电泳分离后转移至PVDF膜,封闭后依次加入一抗和二抗孵育,TBST洗膜,最后曝光显影。

1.2.8 活性氧(ROS)含量检测

将转染后的各组A549细胞以2×10^5个/皿的密度接种于共聚焦培养皿中。待细胞生长至70%~80%汇合度时,移除原培养基,加入1 mL用无血清培养基稀释的DCFH-DA工作液(稀释比例1∶1 000,终浓度10 μmol/L)。避光孵育20 min。用预温的无血清培养基轻柔洗涤细胞3次,更换为含血清的完全培养基后,立即于共聚焦显微镜下观察并采集图像。

1.2.9 脂质活性氧(L-ROS)含量检测

将转染后的各组A549细胞以2×10^5个/皿的密度接种于共聚焦培养皿中。待细胞生长至70%~80%汇合度时,移除原培养基,加入1 mL用无血清培养基新鲜稀释的C11-BODIPY™ 581/591探针工作液(稀释比例1∶1 000,终浓度10 μmol/L)。避光孵育30 min,用预温的无血清培养基轻柔洗涤细胞3次,更换为含血清的完全培养基,立即于共聚焦显微镜下观察并采集图像。

1.2.10 MDA含量检测

收集转染后的各组A549细胞(1×10^4个),离心后于冰浴中超声破碎。随后于4 ℃、8 000×*g*条件下离心10 min。取上清液与MDA检测试剂混合,沸水浴处理60 min。分别测定450 nm、532 nm和600 nm波长处的吸光度,计算MDA含量。

1.2.11 GSH含量检测

收集转染后的各组A549细胞(1×10^4个),离心后于冰浴中超声破碎。裂解液于4 ℃、8 000×*g*条件下离心10 min,取上清液。将上清液与GSH检测试剂混合,室温避光显

色。测定412 nm波长处的吸光度，计算GSH含量。

1.2.12　Fe^{2+}含量检测

收集转染后的各组A549细胞（1×10^6个），离心后于冰浴中超声破碎。裂解液于4 ℃、8000 ×*g*条件下离心10 min，取上清液。将上清液与Fe^{2+}检测试剂混合，4 ℃避光显色。测定593 nm波长处的吸光度，计算Fe^{2+}含量。

1.3　统计学方法

使用 GraphPad Prism 软件进行统计分析。实验数据以$\bar{x}\pm s$表示。多组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA）。若ANOVA结果差异有统计学意义（$P<0.05$），则进一步采用最小显著差异法（LSD-*t*检验）进行事后两两比较。所有两两比较均在ANOVA显著的条件下进行，未对多重比较的Ⅰ型错误率进行额外校正（如Bonferroni法），但在结果解释中保持审慎。

2　结果

2.1　miR-429在LUAD组织和细胞中表达上调

通过分析LUAD组织的miRNA微阵列基因芯片数据集GSE74190、GSE135918和GSE63805（图1A），以adj. $P<0.05$且$|\log_2FC|\geq1$为筛选条件取交集，获得2个共有的差异表达miRNA，分别为miR-429和miR-210（图1B）。结果显示，miR-429在LUAD组织与正常肺组织间的表达差异具有统计学意义（$P<0.05$）。进一步利用starBase数据库分析20例正常肺组织和512例LUAD组织中miR-429的表达情况，结果显示LUAD组织中miR-429表达显著上调（图1C）。qRT-PCR检测BEAS-2B、A549和H1975细胞中miR-429的表达水平，结果显示，A549和H1975细胞中miR-429表达均高于BEAS-2B，差异有统计学意义（$P<0.05$）；其中A549细胞中miR-429表达水平最高，故选择A549细胞进行后续功能实验（图1D）。qRT-PCR检测转染后A549细胞中miR-429的表达水平，结果显示，与oe-CON组相比，oe-miR-429组miR-429表达水平显著升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）（图1E），提示转染成功。

2.2　miR-429促进LUAD细胞的增殖、迁移与侵袭

划痕实验结果显示，oe-miR-429组细胞迁移率较oe-CON组升高，而miR-429 inhibitor组细胞迁移率较inhibitor CON组降低，表明miR-429可促进LUAD A549细胞迁移（$P<0.05$）（图2A）。Transwell侵袭实验结果显示，oe-miR-429组细胞侵袭数量较oe-CON组增多，而miR-429 inhibitor

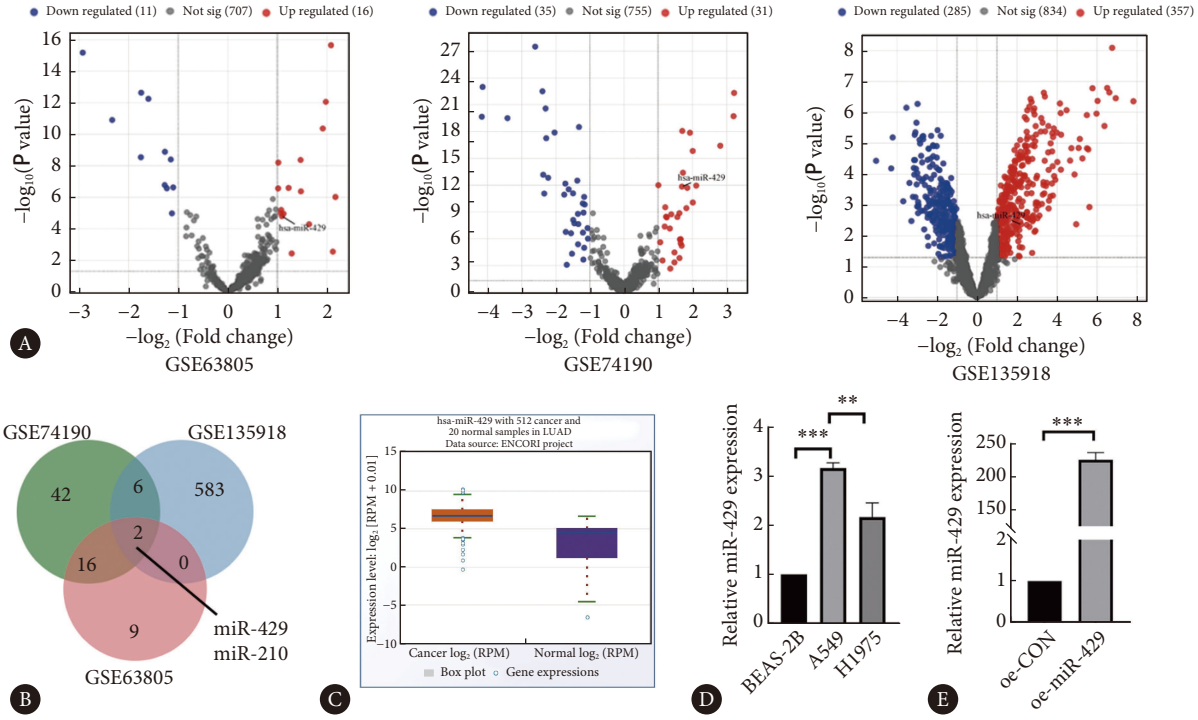


图 1　miR-429在LUAD组织和细胞中表达上调

Fig 1　Upregulation of miR-429 expression in LUAD tissues and cells

LUAD: lungadenocarcinoma. A, Volcano plots of differentially expressed miRNAs in datasets GSE74190, GSE135918, and GSE63805; B, Venn diagram showing the overlap between the three datasets; C, miR-429 expression levels in normal lung tissues (n=20) and LUAD tissues (n=512) from the Starbase database; D, qRT-PCR measurement of miR-429 in normal lung bronchial epithelial cells BEAS-2B and lung adenocarcinoma cell lines A549 and H1975; E: qRT-PCR checking the transfection efficiency in A549 cells after being transfected with a miR-429 overexpression plasmid. $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$. $n=3$.

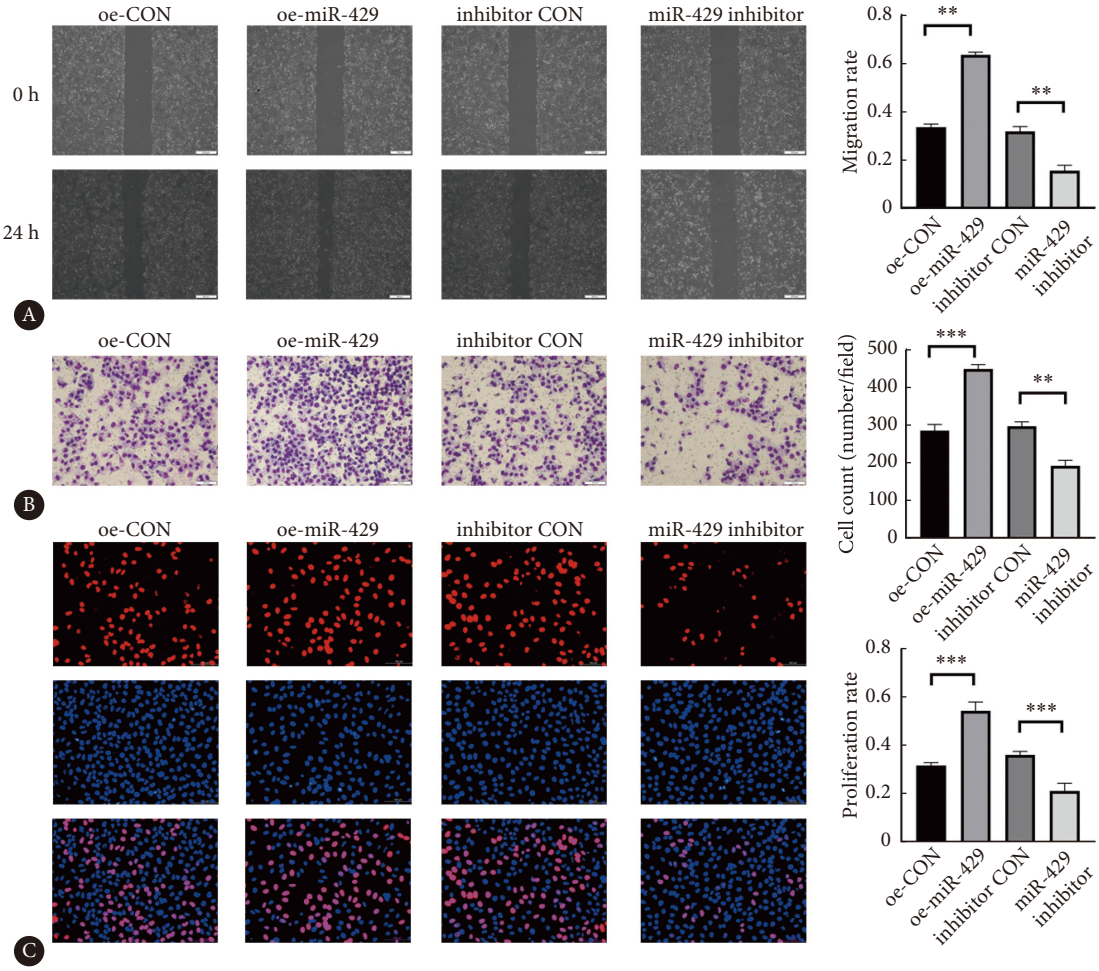


图 2 miR-429促进LUAD细胞的迁移、侵袭和增殖

Fig 2 miR-429 promotes the migration, invasion, and proliferation of LUAD cells

A, Scratch healing assay evaluating the effect of miR-429 on the migration ability of A549 cells. Scale bar: 200 μm; magnification: ×40 (bright-field, inverted microscope). B, Transwell invasion assay assessing the impact of miR-429 on the invasion ability of A549 cells. Scale bar: 100 μm; magnification: ×100 (bright-field, inverted microscope). C, EdU proliferation assay examining the influence of miR-429 on the proliferation of A549 cells. Scale bar: 50 μm; magnification: ×200 (fluorescence microscope). $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$. $n = 3$.

组较inhibitor CON组减少，表明miR-429可促进LUAD A549细胞侵袭(P<0.05)(图2B)。EdU细胞增殖实验结果显示，oe-miR-429组EdU阳性细胞率较oe-CON组升高，而miR-429 inhibitor组较inhibitor CON组降低，表明miR-429可促进LUAD A549细胞增殖(P<0.05)(图2C)。

2.3 双荧光素酶验证*HMOX1*与miR-429靶向结合并受其调控

通过starBase生物信息学数据库预测miR-429的下游靶基因，将其与GeneCards下载的铁死亡相关基因集取交集，筛选出55个与铁死亡相关的miR-429潜在下游靶基因(图3A)。利用String数据库预测miR-429靶基因编码蛋白间的相互作用，构建蛋白-蛋白互作网络(PPI)(图3B)。将相关数据导入Cytoscape软件，通过CytoHubba插件进行MCC拓扑算法分析，筛选Degree值排名前10的枢纽基因，分别为*JUN*、*EGFR*、*KRAS*、*SIRT1*、*HMOX1*、*MAPK1*、*EPAS1*、*SLC7A11*、*NCOA4*及*BNIP3*(图3C)。进一步分析上述基因与miR-429的相关性及在LUAD组织中的差异表达情况，结果显示仅有*HMOX1*在LUAD组织中的表达低于癌旁正常组织(图3D)，且*HMOX1*与miR-429呈负相关(图3E)，差异有统计学意义(P<0.05)。Western blot检测结果显示，miR-429 inhibitor组HMOX1蛋白表达水平高于inhibitor CON组(图3F)，进一步证实二者在A549细胞中呈负相关。因此，选取*HMOX1*作为miR-429的候选靶基因进行后续验证。双荧光素酶报告基因实验结果显示，miR-429过表达可显著抑制*HMOX1*-3'-UTR-WT报告基因的荧光素酶活性，而对*HMOX1*-3'-UTR-Mut报告基因无显著影响(P<0.05)(图3G)，提示*HMOX1*-3'-UTR区是miR-429的直接结合位点。上述结果表明，miR-429可通过靶向结合*HMOX1*负向调控其在LUAD细胞中的表达。

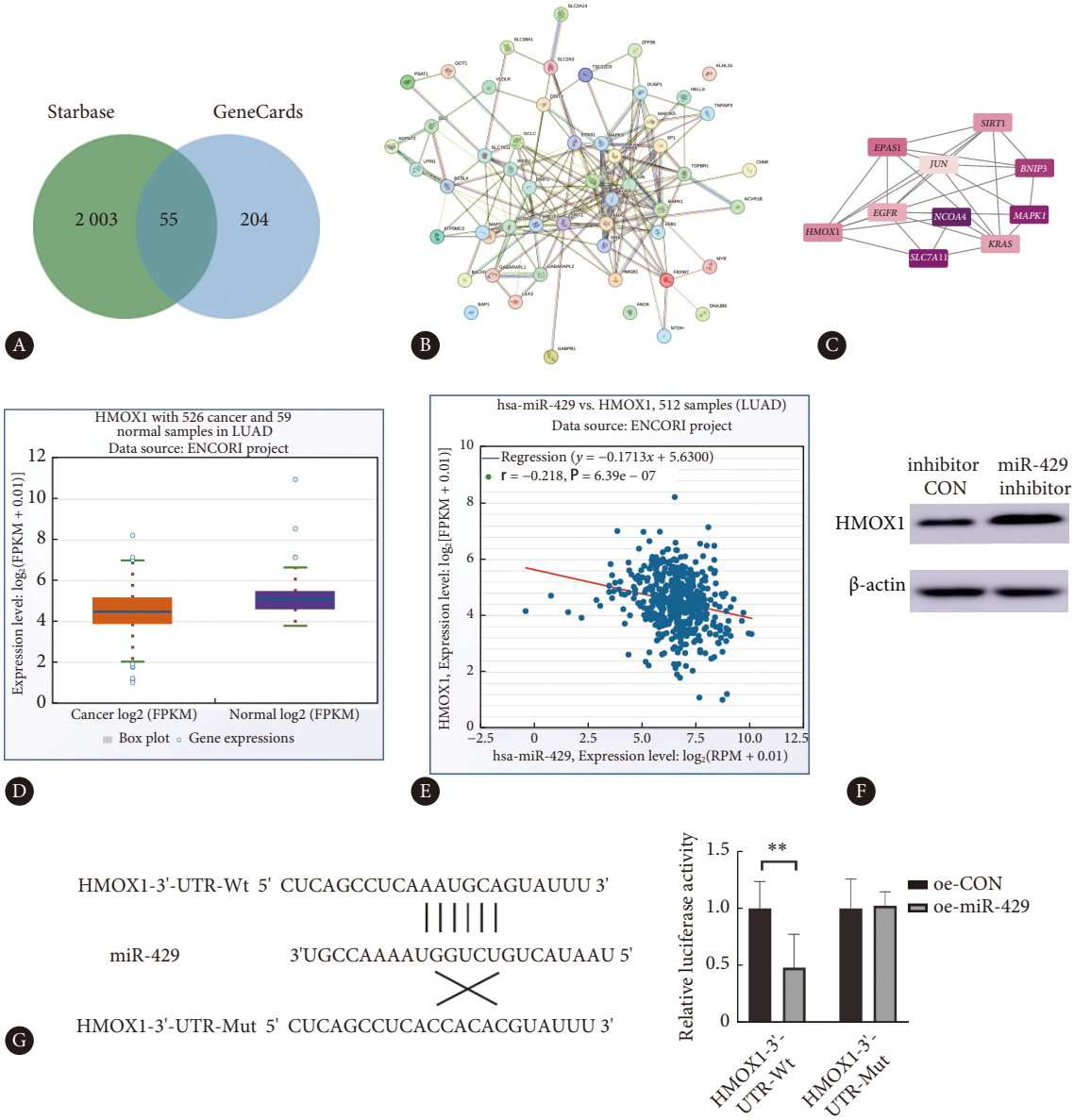


图 3　HMOX1与miR-429靶向结合并受其调控

Fig 3　HMOX1 binds to and is regulated by miR-429

A, Venn diagram showing the intersection of Starbase and GeneCard databases. B:Protein-protein interaction network of miR-429 ferroptosis target genes. C: Hub target gene map of miR-429. D: Expression of miR-429 in normal tissues and lung adenocarcinoma tissues. E: Correlation between HMOX1 and miR-429 in lung adenocarcinoma. F: Western blot analysis of HMOX1 protein expression levels after miR-429 inhibition. G:Dual-luciferase reporter assay detecting luciferase activity in different groups of cells. ***P*<0.05. *n* = 3.

2.4　miR-429 通过靶向*HMOX1*促进LUAD细胞的增殖、迁移与侵袭

划痕实验结果显示, 与oe-CON+oe-NC组相比, oe-CON+oe-*HMOX1*组细胞迁移率降低; 而与oe-CON+oe-*HMOX1*组相比, oe-miR-429+oe-*HMOX1*组细胞迁移率升高, 表明HMOX1过表达可抑制A549细胞迁移, 而miR-429过表达可逆转该抑制作用(*P*<0.05)(图4A)。Transwell侵袭实验结果显示, oe-CON+oe-*HMOX1*组细胞侵袭数量较oe-CON+oe-NC组减少, 而oe-miR-429+oe-*HMOX1*组较oe-CON+oe-*HMOX1*组增多, 表明*HMOX1*过表达可抑制A549细胞侵袭, 而miR-429过表达可逆转该抑制作用(*P*<0.05)(图4B)。EdU增殖实验结果(图4C)显示, oe-CON+oe-*HMOX1*组EdU阳性细胞率较oe-CON+oe-NC组降低, 而oe-miR-429+oe-*HMOX1*组较oe-CON+oe-*HMOX1*组升高, 表明*HMOX1*过表达可抑制A549细胞增殖, 而miR-429过表达可逆转该抑制作用(*P*<0.05)。

2.5　miR-429靶向*HMOX1*调节ROS和L-ROS含量

利用DCFH-DA探针检测各组A549细胞的ROS水平,

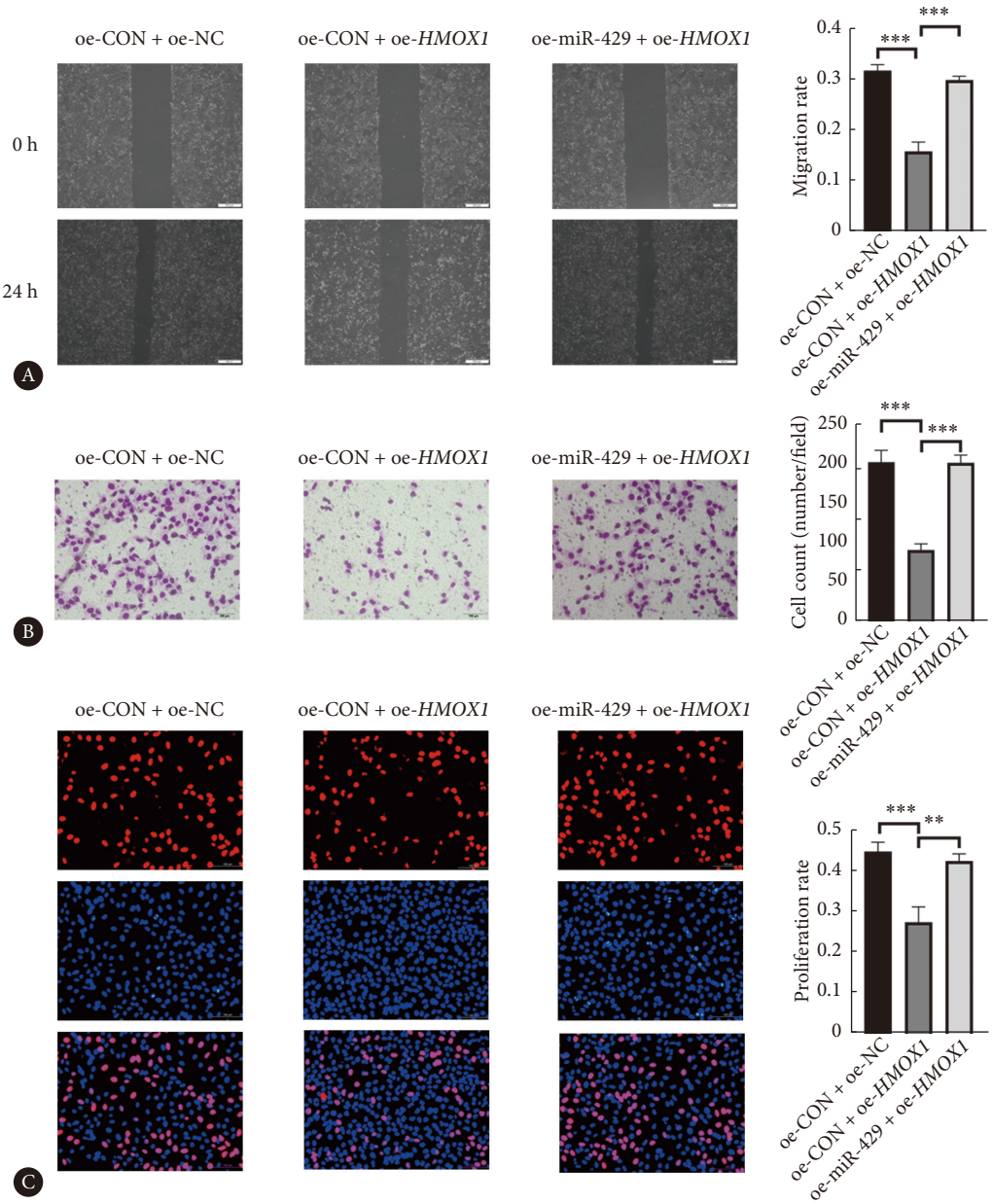


图 4 miR-429靶向*HMOX1*促进LUAD细胞的迁移、侵袭和增殖

Fig 4 miR-429 targets *HMOX1* to promote migration, invasion, and proliferation of LUAD cells

A, Scratch healing assay evaluating the effect of miR-429 targeting HMOX1 on the migration ability of A549 cells. Scale bar: 200 μm; magnification: ×40 (bright-field, inverted microscope). B, Transwell invasion assay assessing the impact of miR-429 targeting HMOX1 on the invasion ability of A549 cells. Scale bar: 100 μm; magnification: ×100 (bright-field, inverted microscope). C, EdU proliferation assay examining the influence of miR-429 targeting HMOX1 on the proliferation of A549 cells. Scale bar: 50 μm; magnification: ×200 (fluorescence microscope). $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$. $n = 3$.

以评估细胞氧化应激状态。结果显示，与oe-CON+oe-NC组相比，oe-miR-429+oe-NC组荧光强度降低，而oe-CON+oe-*HMOX1*组荧光强度升高；与oe-CON+oe-*HMOX1*组相比，oe-miR-429+oe-*HMOX1*组荧光强度降低。上述结果表明，miR-429过表达可逆转*HMOX1*过表达所致的ROS水平升高，即miR-429可通过靶向HMOX1降低LUAD A549细胞ROS含量($P<0.05$)(图5A)。

采用C11-BODIPY 581/591探针检测A549细胞脂质过氧化水平，未氧化状态呈红色荧光，氧化后转变为绿色荧光。结果显示，与oe-CON+oe-NC组相比，oe-miR-429+oe-NC组红色荧光强度升高、绿色荧光强度降低，而oe-CON+oe-*HMOX1*组绿色荧光强度升高、红色荧光强度显著降低；与oe-CON+oe-*HMOX1*组相比，oe-miR-429+oe-*HMOX1*组红色荧光强度升高、绿色荧光强度降低。上述结果表明，miR-429过表达可逆转HMOX1过表达所致的L-ROS水平升高，即miR-429可通过靶向*HMOX1*

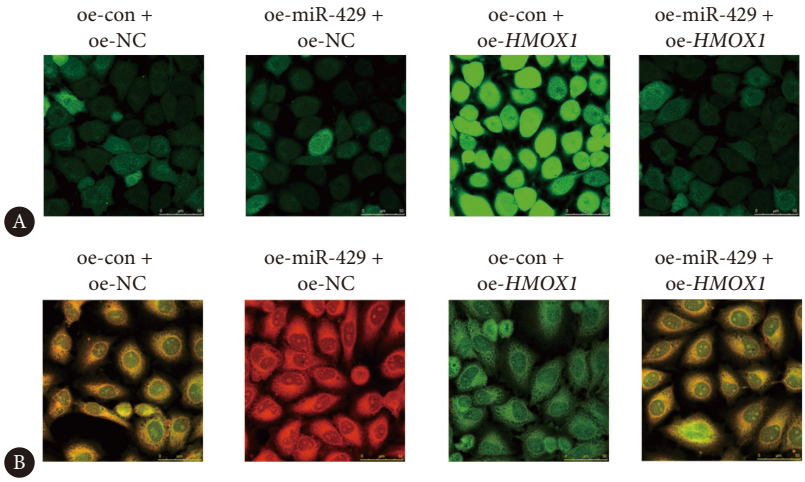


图 5　miR-429靶向*HMOX1*影响LUAD细胞ROS和L-ROS含量

Fig 5　miR-429 targets *HMOX1* to affect ROS and L-ROS levels in LUAD cells

A, DCFH-DA fluorescent probe detecting ROS levels in A549 cells in each group. Scale bar: 50 μm. B,C11-BODIPY 581/591 fluorescent probe detecting L-ROS levels in A549 cells in each group. Scale bar: 50 μm.

降低LUAD A549细胞L-ROS含量(P<0.05)(图5B)。

2.6　miR-429靶向*HMOX1*调节MDA、GSH和Fe^{2+}含量抑制铁死亡敏感性

脂质过氧化物过度积累是铁死亡发生的标志。为明确miR-429/*HMOX1*轴对铁死亡关键指标的影响，分别检测了各组A549细胞中MDA、GSH及Fe^{2+}含量。MDA检测结果(图6A)显示，相较于oe-CON+oe-NC组，oe-miR-429+oe-NC组MDA含量降低，oe-CON+oe-*HMOX1*组MDA含量升高；相较于oe-CON+oe-HMOX1组，oe-miR-429+oe-*HMOX1*组MDA含量降低。上述结果说明：过表达miR-429可以逆转过表达HMOX1所引起的MDA大量生成，即miR-429可以通过靶向*HMOX1*降低LUAD A549细胞MDA含量，差异有统计学意义(P<0.05)。GSH检测结果(图6B)显示，相较于oe-CON+oe-NC组，oe-miR-429+oe-NC组GSH含量升高，oe-CON+oe-*HMOX1*组GSH含量降低；相较于oe-CON+oe-*HMOX1*组，oe-miR-429+oe-*HMOX1*组GSH含量升高。上述结果说明：过表达miR-429可以逆转过表达HMOX1所引起的GSH含量降低，即miR-429可以通过靶向*HMOX1*增加LUAD A549细胞GSH含量，差异有统计学意义(P<0.05)。Fe^{2+}检测结果(图6C)显示，相较于oe-CON+oe-NC组，oe-miR-429+oe-NC组Fe^{2+}含量降低，oe-CON+oe-*HMOX1*组Fe^{2+}含量升高；相较于oe-CON+oe-*HMOX1*组，oe-miR-429+oe-*HMOX1*组Fe^{2+}含量降低。上述结果说

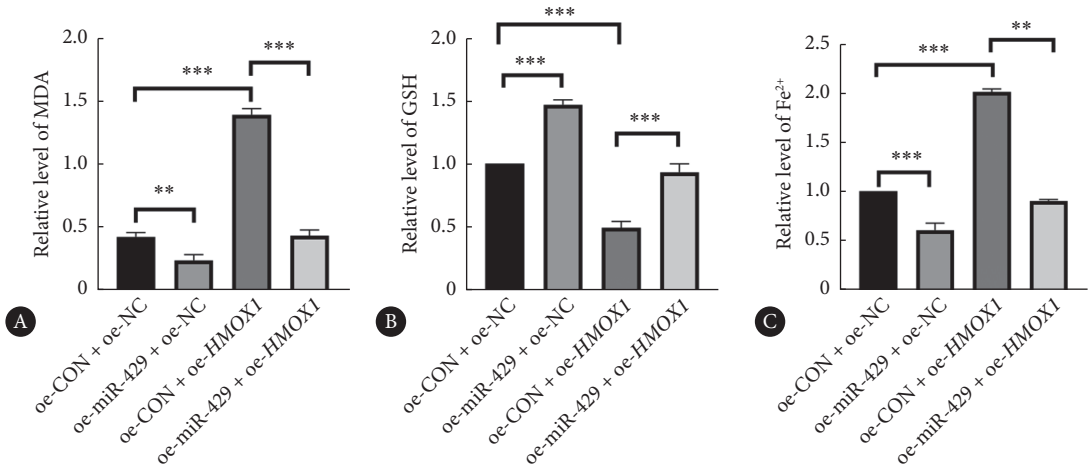


图 6　miR-429靶向*HMOX1*影响LUAD细胞MDA、GSH和Fe^{2+}含量

Fig 6　miR-429 targets *HMOX1* to affect MDA, GSH, and Fe^{2+} levels in LUAD cells

A, miR-429 targets *HMOX1* to affect MDA content in LUAD cells; B, miR-429 targets *HMOX1* to affect the GSH content of LUAD cells; C, miR-429 targets *HMOX1* to affect Fe^{2+} content in LUAD cells. ** P < 0.01, *** P < 0.001. n = 3.

明：过表达miR-429可以逆转过表达HMOX1所引起的Fe^{2+}大量生成，即miR-429可以通过靶向*HMOX1*降低LUAD A549细胞Fe^{2+}含量，差异有统计学意义（$P<0.05$）。

3 讨论

肺癌是全球癌症相关死亡的首要原因，主要分为NSCLC和小细胞肺癌（SCLC）两大类[12]。其中，NSCLC约占肺癌总病例的85%，而LUAD是NSCLC中发病率最高的组织学亚型[13]。LUAD的侵袭和转移涉及多种基因、信号通路及细胞因子的异常调控。近年来，miRNA在LUAD发生发展中的作用受到广泛关注。深入阐明miRNA调控LUAD侵袭转移的分子机制，不仅有助于理解其病理生理基础，还可为LUAD的临床诊断与治疗提供新的生物标志物和潜在干预靶点。

miRNA是一类小分子单链非编码RNA，通过调控基因表达参与多种生命活动[14]。研究表明，miRNA在LUAD的发生、发展及转移中发挥关键作用。例如，致癌性miR-21在LUAD中显著上调，通过抑制*PTEN*、*PDCD4*等肿瘤抑制基因的表达，促进肿瘤细胞增殖和侵袭[15-16]。此外，miR-155在LUAD中高表达，通过靶向调控*SOCS1*、*TP53INP1*等基因，参与肿瘤免疫逃逸和化疗耐药[17-18]。虽然miR-429已被证明可影响多种恶性肿瘤的细胞增殖和侵袭，但其在LUAD中的功能及分子机制尚不明确。本研究通过分析GEO数据库（GSE74190、GSE135918、GSE63805）及starBase数据库，发现miR-429在LUAD组织中表达上调。qRT-PCR检测进一步证实，与正常肺支气管上皮细胞BEAS-2B相比，miR-429在肺腺癌细胞系A549、H1975中表达显著升高，且在A549细胞中表达水平最高，提示其可能发挥癌基因作用。后续功能实验证实，miR-429可促进LUAD细胞的增殖、迁移和侵袭。

铁死亡是一种铁依赖性程序性细胞死亡形式，以脂质过氧化物蓄积为主要特征[9]，被视为癌症治疗的潜在策略。miRNA在调控铁死亡中发挥重要作用，其核心机制涉及细胞内氧化还原稳态失衡，关键通路包括：*GPX4*介导的脂质过氧化物修复、*SLC7A11*介导的胱氨酸/谷氨酸逆向转运（影响谷胱甘肽合成），以及*NCOA4*介导的铁蛋白自噬（ferritinophagy）释放储存铁[19-20]。例如，miR-137可通过抑制*GPX4*表达促进脂质过氧化物蓄积，诱导铁死亡[21]；miR-214则通过下调铁转运蛋白1（*FPN1*）增加细胞内铁水平，进而促进铁死亡[22]。上述研究表明，miRNA可通过调控铁代谢及抗氧化防御系统影响铁死亡的发生。

HMOX1（血红素氧合酶-1）是一种关键的抗氧化酶，参与细胞氧化应激反应。一方面，HMOX1被认为具有细胞保护作用：通过降解具有促氧化作用的血红素，生成胆绿素（随后转化为强抗氧化剂胆红素）和一氧化碳（CO），从而缓解氧化应激，这可能在某些情况下抑制铁死亡[23-24]。另一方面，大量研究证实HMOX1亦具有促铁死亡作用：其酶解血红素的过程会释放大量游离铁，通过Fenton反应急剧增加细胞内活性氧水平，加剧脂质过氧化，从而直接促进铁死亡的发生[23, 25]。这种双重性可能取决于细胞类型、应激信号的强度与持续时间及肿瘤微环境的具体背景。本研究通过生物信息学预测及双荧光素酶报告基因实验证实，miR-429可直接靶向结合*HMOX1*的3'非翻译区（3'UTR），抑制其表达，降低*HMOX1*蛋白水平。细胞功能实验及铁死亡相关指标检测进一步表明，miR-429通过靶向抑制*HMOX1*促进LUAD细胞的增殖、迁移和侵袭，并抑制铁死亡的发生。因此，miR-429/*HMOX1*轴可能构成LUAD中一个关键的调控节点，通过整合对细胞死亡（铁死亡）、代谢（铁/血红素代谢）及微环境（免疫）的多重影响，驱动肿瘤进展。

在本研究中，我们观察到过表达HMOX1可显著升高A549细胞内Fe^{2+}、ROS、L-ROS及MDA水平，同时降低GSH含量，这一系列指标变化一致指向铁死亡进程的激活。这表明，在肺腺癌A549细胞中，HMOX1的促铁死亡功能占据主导地位。这一发现具有重要的生物学意义，它揭示了miR-429在肺腺癌中扮演癌基因的一个新机制，即通过抑制HMOX1这一关键的“铁死亡开关”，帮助肿瘤细胞逃避铁死亡这一重要的肿瘤抑制机制。这不仅将miR-429与肿瘤代谢重编程（铁代谢）相关联，也提示miR-429/*HMOX1*轴可能通过调控细胞死亡命运，进而影响肿瘤的恶性进展及治疗抵抗。

本研究存在若干局限性。第一，主要功能实验仅在A549细胞系中开展，虽补充了H1975细胞的简化验证，但不同肺腺癌细胞系可能存在异质性，结论的外推性尚需在更多细胞系（如PC-9、HCC827）及原代细胞中进一步验证。第二，缺乏体内动物实验验证miR-429/*HMOX1*轴对肿瘤生长及转移的作用。第三，HMOX1在铁死亡中的功能具有细胞类型依赖性，其在肺腺癌中的确切角色仍需后续联合使用铁死亡诱导剂（如erastin）或抑制剂（如Ferrostatin-1）进行干预实验，以进一步确认。后续研究将针对上述局限开展深入探讨。

* * *

作者贡献声明 高馨宇负责论文构思、正式分析、研究方法、软件、可视化、初稿写作和审读与编辑写作，龚秀莹和侯顺福负责调查研究和项目管理，张致涵负责论文构思和数据审编，李洪利负责经费获取、提供资源和监督指导，王雪净负责正式分析、经费获取、研究方法、软件、可

视化、初稿写作和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊, 且对将要发表的版本进行最终定稿, 并同意对工作的所有方面负责。

Author Contribution　Gao Xinyu is responsible for conceptualization, formal analysis, methodology, software, visualization, writing--original draft, and writing--review and editing. Gong Xiuying and Hou Shunfu are responsible for investigation and project administration. Zhang Zhihan is responsible for conceptualization and data curation. Li Hongli is responsible for funding acquisition, resources, and supervision. Wang Xuejing is responsible for formal analysis, funding acquisition, methodology, software, visualization, writing--original draft, and writing--review and editing. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

Declaration of Conflicting Interests　All authors declare no competing interests.

参　考　文　献

[1] Denisenko T V, Budkevich I N, Zhivotovsky B. Cell death-based treatment of lung adenocarcinoma[J/OL]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 117. https://www.nature.com/articles/s41419-017-0063-y. DOI: 10.1038/s41419-017-0063-y.

[2] Chen M, Zhang S, Wang F, *et al*. DLGAP5 promotes lung adenocarcinoma growth via upregulating PLK1 and serves as a therapeutic target[J/OL]. J Transl Med, 2024, 22(1): 209. https://doi.org/10.1186/s12967-024-04982-8.

[3] Shan J, An Y, Bues M, *et al*. Robust optimization in IMPT using quadratic objective functions to account for the minimum MU constraint[J]. Med Phys, 2018, 45(1): 460. DOI: 10.1002/mp.12674.

[4] Volovat S R, Volovat C, Hordila I, *et al*. MiRNA and LncRNA as potential biomarkers in triple-negative breast cancer: a review[J/OL]. Front Oncol, 2020, 10: 526850. https://doi.org/10.3389/fonc.2020.526850.

[5] Rogucki M, Buczyńska A, Krętowski A J, *et al*. The importance of miRNA in the diagnosis and prognosis of papillary thyroid cancer[J/OL]. J Clin Med, 2021, 10(20): 4737. https://doi.org/10.3390/jcm10204737.

[6] Xu J, Wu K J, Jia Q J, *et al*. Roles of miRNA and lncRNA in triple-negative breast cancer[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2020, 21(9): 673. DOI: 10.1631/jzus.B2000181.

[7] Murrone A, Cantini L, Pecci F, *et al*. BRCA-associated protein 1 (BAP1) and miR-31 combination predicts outcomes in epithelioid malignant pleural mesothelioma[J]. J Thorac Dis, 2021, 13(10): 5741. DOI: 10.21037/jtd-21-899.

[8] Zhang L, Liu Q, Mu Q, *et al*. MiR-429 suppresses proliferation and invasion of breast cancer via inhibiting the Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Thorac Cancer, 2020, 11(11): 3126. DOI: 10.1111/1759-7714.13628.

[9] Wei X, Li X, Hu S, *et al*. Regulation of ferroptosis in lung adenocarcinoma[J/OL]. Int J Mol Sci, 2023, 24(19): 14614. https://doi.org/10.3390/ijms241914614.

[10] Jiang M, Jike Y, Liu K, *et al*. Exosome-mediated miR-144-3p promotes ferroptosis to inhibit osteosarcoma proliferation, migration, and invasion through regulating ZEB1[J/OL]. Mol Cancer, 2023, 22(1): 113. https://doi.org/10.1186/s12943-023-01823-2.

[11] Bai T, Liang R, Zhu R, *et al*. MicroRNA-214-3p enhances erastin-induced ferroptosis by targeting ATF4 in hepatoma cells[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(7/8): 5637. DOI: 10.1002/jcp.29502.

[12] Schabath M B, Cote M L. Cancer progress and priorities: lung cancer[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2019, 28(10): 1563. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-19-0221.

[13] Wang J, Gong M, Fan X, *et al*. Autophagy-related signaling pathways in non-small cell lung cancer[J]. Mol Cell Biochem, 2022, 477(2): 385. DOI: 10.1007/s11010-021-04287-0.

[14] Jaszczuk I, Koczkodaj D, Kondracka A, *et al*. The role of miRNA-210 in pre-eclampsia development[J]. Ann Med, 2022, 54(1): 1350. DOI: 10.1080/07853890.2022.2070273.

[15] Lu Y, Liu Z, Zhang Y, *et al*. METTL3-mediated m6A RNA methylation induces the differentiation of lung resident mesenchymal stem cells into myofibroblasts via the miR-21/PTEN pathway[J/OL]. Respir Res, 2023, 24(1): 300. https://doi.org/10.1186/s12931-023-02604-7.

[16] Liao Y W, Tsai L L, Lee Y H, *et al*. miR-21 promotes the fibrotic properties in oral mucosa through targeting PDCD4[J]. J Dent Sci, 2022, 17(2): 677. DOI: 10.1016/j.jds.2021.11.009.

[17] Zhang W, Ji W, Zhao X. MiR-155 promotes anaplastic thyroid cancer progression by directly targeting SOCS1[J/OL]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 1093. https://doi.org/10.1186/s12885-019-6319-5.

[18] Liu F, Kong X, Lv L, *et al*. MiR-155 targets TP53INP1 to regulate liver cancer stem cell acquisition and self-renewal[J]. FEBS Lett, 2015, 589(4): 500. DOI: 10.1016/j.febslet.2015.01.005.

[19] Jiang X, Stockwell B R, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(4): 266. DOI: 10.1038/s41580-020-00324-8.

[20] Doll S, Freitas F P, Shah R, *et al*. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor[J]. Nature, 2019, 575(7784): 693. DOI: 10.1038/s41586-019-1707-0.

[21] Wu L, Li N, Zhu L, *et al*. CircPDSS1 (hsa_circ_0017998) silencing induces ferroptosis in non-small-cell lung cancer cells by modulating the miR-137/SLC7A11/GPX4/GCLC axis[J/OL]. Toxicol In Vitro, 2024, 99: 105887. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0887233324001176?via%3Dihub#section-snippets. DOI: 10.1016/j.tiv.2024.105887.

[22] Luo J, Song G, Chen N, *et al*. Ferroptosis contributes to ethanol-induced hepatic cell death via labile iron accumulation and GPx4 inactivation[J/OL]. Cell Death Discov, 2023, 9(1): 311. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10457354/. DOI: 10.1038/s41420-023-01613-x.

[23] Zhou Y, Zeng L, Cai L, *et al*. Cellular senescence-associated gene IFI16 promotes HMOX1-dependent evasion of ferroptosis and radioresistance in glioblastoma[J/OL]. Nat Commun, 2025, 16(1): 1212. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11785807/. DOI: 10.1038/s41467-025-56522-7.

[24] Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, *et al*. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism[J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(17): 3221. DOI: 10.1007/s00018-016-2223-0.

[25] Chau L Y. Heme oxygenase-1: emerging target of cancer therapy[J/OL]. J Biomed Sci, 2015, 22(1): 22. https://doi.org/10.1186/s12929-015-0130-z.

（2025 – 06 – 29收稿, 2026 – 06 – 01修回）

编辑　刘　华

开放获取　本文使用遵循知识共享署名—非商业性使用4.0国际许可协议（CC BY-NC 4.0），详细信息请访问https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/。

OPEN ACCESS　This article is licensed for use under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC 4.0). For more information, visit https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

© 2026《四川大学学报(医学版)》编辑部

Editorial Office of *Journal of Sichuan University (Medical Sciences)*