

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.07.004

miR-21 靶向调节 MARCKS 基因影响人乳腺癌细胞多西紫杉醇敏感性的研究 *

赵 杨^{1,3} 钟山亮² 张晓慧² 赵建华^{2Δ} 李晓平³

(1 南京医科大学附属肿瘤医院 江苏 南京 210009;

2 南京医科大学附属肿瘤医院 / 江苏省肿瘤医院 / 江苏省肿瘤防治研究所 江苏 南京 210009;

3 吴江区第一人民医院检验科 江苏 苏州 215200)

摘要 目的:探讨 miR-21 对 MARCKS 基因表达的调控及其与乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株多西紫杉醇耐药的关系。**方法:**通过基因芯片筛选到 miR-21 在亲代敏感细胞株(MDA-MB-231/S)与多西紫杉醇耐药细胞株(MDA-MB-231/Doc)中存在差异表达,应用实时荧光定量(RT-qPCR)方法验证此差异,同时分别检测 MDA-MB-231/S 细胞和 MDA-MB-231/Doc 细胞转染 miR-21 模拟物和抑制物后的表达变化;通过靶基因预测软件预测 miR-21 与 MARCKS 基因的关系;采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法、流式细胞术、RT-qPCR 和蛋白质印迹法检测 miR-21 表达变化对三阴性乳腺癌细胞多西紫杉醇耐药性的影响,并探讨其与 MARCKS 基因表达的关系。**结果:**与 MDA-MB-231/S 相比,miR-21 在 MDA-MB-231/Doc 中的表达水平明显升高(2.03 ± 0.06)倍($P < 0.05$)。与阴性对照组比,MDA-MB-231/S 细胞转染 miR-21 mimics 后 miR-21 表达水平明显增高(2.26 ± 0.07)倍($P < 0.05$),而 MARCKS 基因在 mRNA 和蛋白水平上均明显下调。MDA-MB-231/Doc 细胞转染 miR-21 inhibitors 后,miR-21 表达水平是阴性对照组的 (0.36 ± 0.03)倍($P < 0.05$),MARCKS 基因的 mRNA 和蛋白水平高于其阴性对照组。转染 miR-21 mimics 后的 MDA-MB-231/S 细胞 IC50 显著高于其阴性对照组($P < 0.05$),相反,与阴性对照组相比,MDA-MB-231/Doc 细胞转染 miR-21 inhibitors 后,其 IC50 显著降低($P < 0.05$)。MDA-MB-231/S 转染 miR-21 mimics 后,miR-21 表达量明显上调,MARCKS 基因分别是阴性对照组的 (3.564 ± 0.336) 倍和 (2.019 ± 0.268)倍($P < 0.05$)。**结论:**miR-21 可能通过靶向调节 MARCKS 基因增强乳腺癌细胞对多西紫杉醇的耐药性。

关键词:乳腺癌;miR-21;耐药;多西紫杉醇

中图分类号:R-33;R737.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)07-1217-05

Effect of MiR-21 Targeting MARCKS Gene on the Sensitivity of Human Breast Cancer Cells to Docetaxel*

ZHAO Yang^{1,3}, ZHONG Shan-liang², ZHANG Xiao-hui², ZHAO Jian-hua^{2Δ}, LI Xiao-ping³

(1 Tumor Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 210009, China; 2 Tumor Hospital Affiliated to Nanjing Medical University/Jiangsu Tumor Hospital/Jiangsu Institute of Tumor control and prevention, Nanjing, Jiangsu, 210009, China; 3

Department of clinical laboratory, Wujiang first people's Hospital, Suzhou, Jiangsu, 215200, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of miR-21 on expression of MARCKS, and their influence on chemosensitivity of MDA-MB-231 breast cancer cells to docetaxel. **Methods:** MicroRNAs microarray and RT-qPCR were conducted to explore the signature of miR-21 between MDA-MB-231/S and MDA-MB-231/Doc. The potential target gene of miR-21 was predicted by online bioinformatic softwares. miR-21 mimics were transfected to MDA-MB-231/S, and inhibitors were transfected to MDA-MB-231/Doc respectively. The IC50 in each group was tested by MTT. The expression of MARCKS was detected by RT-qPCR and Western blot. **Results:** Compared with control MDA-MB-231/S, the relative expression level of miR-21 in MDA-MB-231/Doc was significantly up-regulated 2.03 ± 0.06 fold, $P < 0.05$. MARCKS is predicted as a target of miR-21 by TargetScan and plays an important role in drug resistance. Drug resistance in mimics-transfected MDA-MB-231/S cells was significantly increased. The expression level of MARCKS was down-regulated. Compared with control MDA-MB-231/Doc, drug resistance in inhibitors-transfected MDA-MB-231/Doc cells was significantly decreased. The expression level of MARCKS was up-regulated. The expression of mir-21 was significantly increased after mda-mb-231/S transfection miR-21 mimics, and MARCKS genes were negative control (3.564 ± 0.336) and (2.019 ± 0.268), $P < 0.05$. **Conclusion:** miR-21 confers breast cancer cells resistant to docetaxel by targeting MARCKS.

Key words: Breast cancer; miR-21; Chemoresistance; Docetaxel

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)07-1217-05

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81272470)

作者简介:赵杨(1981-),主管检验师,研究方向:分子生物学,电话:13606251734, E-mail: zy20160217@163.com

Δ 通讯作者:赵建华,研究员,硕士生导师,主要从事乳腺癌的基础与临床研究工作, E-mail: jhzhao2838@sina.com

(收稿日期:2017-11-03 接受日期:2017-11-28)

前言

乳腺癌作为全世界成年女性中最常见的恶性肿瘤之一,近年来其发病率及死亡率均呈上升趋势。10年来,我国主要城市乳腺癌发病率上升37%,而死亡率上升了38.9%^[1]。化疗在乳腺癌的治疗中起着至关重要的作用,然而临床上原发性和获得性化疗耐药普遍存在,严重制约了肿瘤的治疗效果。作为新型紫杉醇类抗肿瘤药物,多西紫杉醇(Docetaxel, Doc)适用于非小细胞癌和乳腺癌,其结构和作用机制与紫杉醇类似,通过加强微管蛋白的聚合并且抑制其解聚,继而抑制肿瘤细胞的分裂增殖过程。此外,Doc具有溶解性好、易与微管亲和力及持续时间长等特点,临床上单独使用多西紫杉醇的或与其他抗肿瘤药物联合应用是乳腺癌治疗的一线选择^[2-4]。

MicroRNA(miRNAs)是一群微小的、无编码的RNA,其作用是通过抑制靶mRNA的转录、翻译或影响mRNA的稳定性从而抑制靶基因的表达。miRNAs在生理学和病理学上扮演着非常广泛及重要的作用,包括肿瘤的发生。大量的研究显示人类的癌症中miRNAs的表达失调的,在肿瘤发生过程中发挥至关重要的作用^[5,6]。miRNAs作为调节者,充当着癌基因或者肿瘤抑制基因。近年来,miRNAs介导的基因调控获得了突破性进展,也为耐药性的研究提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞株MDA-MB-231购自中国科学院上海细胞

生物所。耐药株MDA-MB-231/Doc由本实验室以同系亲本MDA-MB-231/S细胞为基础,采用低浓度逐步加量诱导法成功建立;DMEM高糖培养基、胎牛血清购自Hyclone公司;多西紫杉醇注射液购自江苏恒瑞医药;MTT和二甲亚砜(DMSO)均购自德国Sigma公司;逆转录试剂盒购自Bionique公司;转染试剂Lipofectamine 2000、TRIzol提取试剂购自Invitrogen公司;miR-21 mimics(模拟物)和inhibitors(抑制物)购自上海吉玛公司;抗MARCKS羊一抗购自美国Abcam公司;抗 β -actin鼠一抗购自德国Sigama公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠IgG购自北京康为生物科技公司。NanoDrop2000紫外分光光度计购自英国Thermo Scientific公司;电转仪和垂直电泳槽购自美国BIO-RAD公司;PCR扩增仪(LightCycler[®] 480)购自美国ABI公司;CliniBio 128酶标仪购自ASYS-Hitech公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MDA-MB-231/S和MDA-MB-231/Doc细胞均培养于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的DMEM高糖培养基中,置37 $^{\circ}$ C、5% CO₂饱和湿度条件下培养,经2-3次传代后至指数生长期进行实验。

1.2.2 生物信息学软件进行靶基因预测 用PicTar^[7]、TargetScan^[8]和miRDB^[9-11]预测软件预测出miR-21的靶基因。

1.2.3 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)分析 TRIzol法提取细胞总RNA,利用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳鉴定其浓度和质量。检测中引物序列见表1,相关步骤参照逆转录和PCR试剂盒。3次独立样本经过实验后得到的数据通过比较CT值法($2^{-\Delta\Delta C_T}$)进行相对定量分析。

表1 RT-qPCR引物序列
Table1 RT-qPCR primer sequences

Prime	Sequence(5'-3')
U6snRNA	RT:GCGCGTGAGCAGGCTGGAGAAATTAACCACGCGCGGAACG
	Forward: CGCAAGGATGACACG
	Reverse: GAGCAGGCTGGAGAA
miR-21	RT:GTCGTATCCAGTGCCTGTCTGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACTCAACAT
	Forward: CCCTAGCTTATCAGACTGA
	Reverse: CAGTGCCTGTCTGGAGT
β -actin	RT: random primers
	Forward: CACCTTCTACAATGAGCTGCGTGTG
	Reverse: ATAGCACAGCCTGGATAGCAACGTAC
MARCKS	RT: random primers
	Forward: CCAACCCGAGGCTCTTTGTT
	Reverse: CACGTGGCCATTCTCTCTGTC

1.2.4 细胞转染 将对数生长期细胞消化处理后计数,加适量无双抗培养基制成细胞悬液,取90 μ L细胞悬液(1×10^6 细胞)至无RNA酶EP管中,加入10 μ L miR-21 mimics(10 nM)或inhibitors (50 nM)按照说明书步骤进行细胞转染,每种细胞(MDA-MB-231/S或MDA-MB-231/Doc)各分为3组:阴性对照组(NC1或NC2转染)、空白对照组(仅含载体)和实验组(miR-21 mimics或miR-21 inhibitors转染)。以取对数生长期的MDA-MB-231/S细胞,消化处理后计数,按 3×10^4 /孔接种于6孔板,用无双抗完全培养基补至2 mL/孔,24 h后进行转染试

验。每管加250 μ L无血清培养基,分别加浓度为20 μ M的mimics negative control和目的miR-mimics 2 μ L,轻轻混匀,室温孵育5分钟。取1支1.5 mL的EP管,加500 μ L无血清培养基和9 μ L转染试剂,轻轻混匀,室温孵育5分钟。得到的两管500 μ L溶液分别加至6孔板的两个孔中,第3孔加500 μ L无血清培养基做空白对照。轻轻摇动6孔板,置37 $^{\circ}$ C 5% CO₂饱和湿度条件下继续培养。然后利用荧光倒置显微镜对转染效率进行观察发现转染效率达80%。

1.2.5 MTT比色法检测药物敏感性实验 将试验组和对照组

的细胞按设定的浓度梯度分别加入 Doc。MDA-MB-231/S 细胞对应的药物浓度依次为 0.026、0.128、0.64 和 3.2 μM ，MDA-MB-231/Doc 细胞对应的药物浓度依次为 0.625、1.25、2.5 和 5 μM ；每种药物浓度均设 4 个复孔，同时对无药对照组和试剂空白组分别设 4 孔，并继续培养 48 h 后，将 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL)加入到每孔中，置入 CO_2 培养箱继续培养 4 h 后，弃上清，将 150 μL DMSO 加入到每孔中，用微量震荡器震荡 10 分钟，让结晶物充分溶解，利用酶标仪检测波长 550 nm 处每个孔中的吸光度(A)值。采用空白对照孔调零，计算生长抑制率：生长抑制率=1-(加药组平均吸光度值/无药对照组平均吸光度值) $\times 100\%$ ；根据生长抑制率计算半数致死浓度(IC_{50})。每组独立重复 3 次。

1.2.6 细胞凋亡检测 使用 Annexin-V-FITC 凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡，细胞铺在六孔板中培养 24 h，每孔加一定浓度的 Doc 再孵育 24 h。收集上清中和消化的黏附细胞，用预冷的 PBS 洗两次，并用 $1\times$ 结合缓冲液重悬。加入 5 μL Annexin-V-FITC 和 10 μL 荧光染料 PI(碘化丙啶)，室温下暗室孵育 15 min。上机检测，分析细胞凋亡率。

1.3 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析，独立重复 3 次各组实验，以($\bar{x} \pm s$)表示计量数据，两组间比较采用 t 检验；多组间均数的比较采用单因素方差分析，以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 筛选并验证 miR-21 在 MDA-MB-231/Doc 中的表达

应用 Affymetrix miRNA 2.0 芯片检测 MDA-MB-231/S、MDA-MB-231/Doc 组中 miRNA 表达的差异，结果显示 miR-21

在 MDA-MB-231/Doc 中高表达。RT-PCR 证实了芯片结果：与 MDA-MB-231/S 相比，miR-21 在 MDA-MB-231/Doc 中的表达水平升高了(2.03 ± 0.06)倍，其差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 转染后 miR-21 表达的变化

经电转染后，细胞的转染效率高达 80%以上。与阴性对照组相比，MDA-MB-231/S 转染 miR-21 mimics 后，miR-21 的表达增高了(2.26 ± 0.07)倍($P < 0.05$)；而转染 miR-21 inhibitors 后，MDA-MB-231/Doc 细胞中 miR-21 表达水平是阴性对照组的(0.36 ± 0.03)倍($P < 0.05$)；各种细胞空白对照组和阴性对照组间相比较差异无明显统计学意义(均 $P > 0.05$)。

2.3 miR-21 对乳腺癌细胞药物敏感性的影响

MDA-MB-231/S 阴性对照组、空白对照组和实验组(miR-21 mimics)对 Doc 的 IC_{50} 分别为 (0.660 ± 0.240) μM 、(0.578 ± 0.060) μM 、(1.626 ± 0.179) μM 。与阴性对照相比，转染 miR-21 mimics 后细胞的 IC_{50} 显著增高 ($P < 0.05$)，提示上调 miR-21 的表达抑制了 MDA-MB-231/S 细胞对 Doc 的敏感性。

MDA-MB-231/Doc 阴性对照组、空白对照组和实验组(miR-21 inhibitors)对 Doc 的 IC_{50} 分别为(3.076 ± 0.361) μM 、(2.842 ± 0.273) μM 、(3.745 ± 0.250) μM 。与阴性对照相比，转染 miR-21 inhibitors 后细胞的 IC_{50} 显著降低($P < 0.05$)，说明下调 miR-21 的表达增加耐药 MDA-MB-231/Doc 细胞对 Doc 的敏感性。

2.4 转染后 miR-21 对 Doc 诱导的细胞凋亡的影响

细胞凋亡检测结果见图 1，MDA-MB-231/S 细胞转染 miR-21 mimics 后，降低了 Doc 诱导的细胞凋亡率，而 MDA-MB-231/S 细胞转染转染 miR-21 inhibitors 后，增加了 Doc 诱导的细胞凋亡，提示 miR-21 的表达能影响三阴性乳腺癌细胞对 Doc 的药物抗性。

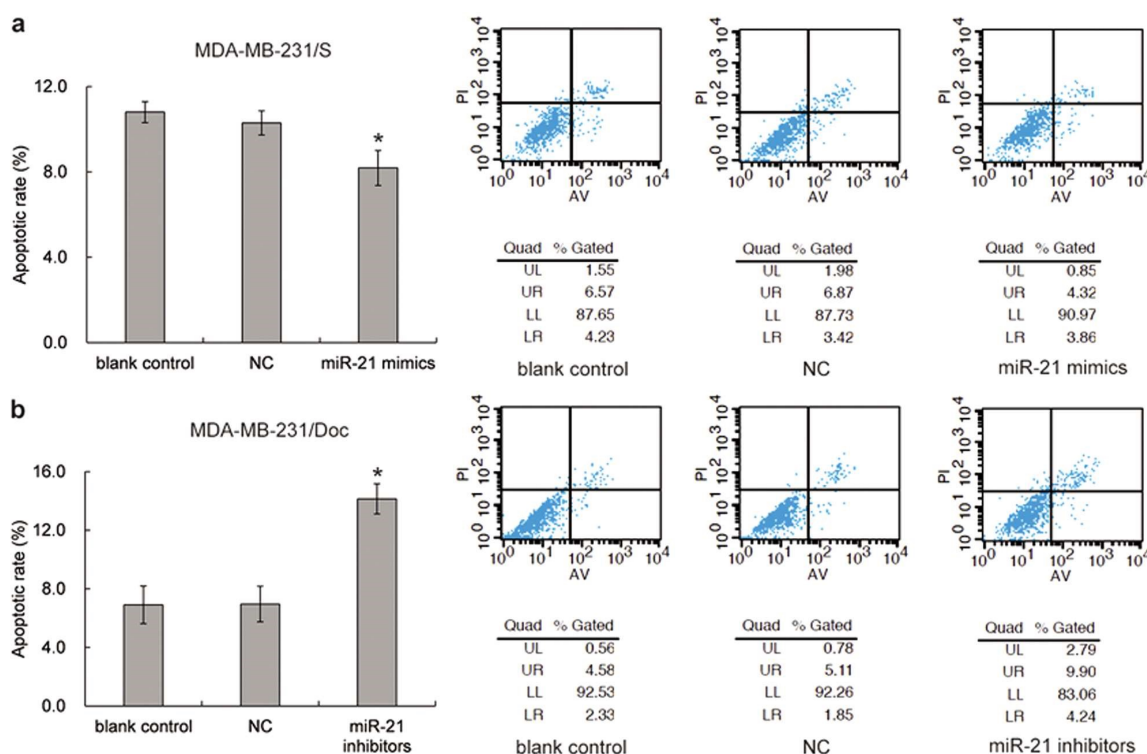


图 1 miR-21 对 Doc 诱导的细胞凋亡的影响

Fig.1 Effect of mir-21 on the apoptosis induced by Doc

2.5 miR-21 对预测靶基因的影响

MDA-MB-231/S 转染 miR-21 mimics 后,miR-21 表达量明显上调,针对 MARCKS 的基因表达分析显示:其 mRNA 和蛋白的表达水平均下降,分别是阴性对照的 (0.362 ± 0.076) 倍和 (0.386 ± 0.020) 倍($P < 0.05$);而另一方面,MDA-MB-231/Doc 转染 miR-21 inhibitors 后,miR-21 表达量明显下调,MARCKS 基因表达分析显示:其 mRNA 和蛋白的表达均明显上调,分别是阴性对照组的 (3.564 ± 0.336) 倍和 (2.019 ± 0.268) 倍($P < 0.05$);阴性对照和空白对照组间均无差异($P > 0.05$)。通过预测分析,抑癌基因 MARCKS 可能为 miR-21 的特异性靶基因。

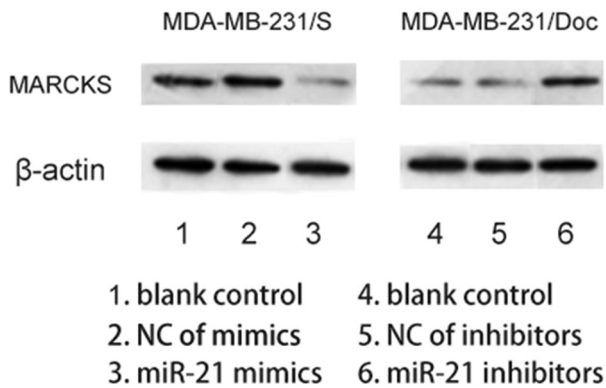


图2 蛋白质印迹法检测各组细胞 MARCKS 蛋白的表达

Fig.2 Detection the expression of MARCKS protein in each group by western blotting

3 讨论

三阴性乳腺癌(Triple-negative breast cancer, TNBC)是乳腺癌的一种特殊类型,其具体指标为孕激素受体(PR)、雌激素受体(ER)和人表皮生长因子受体(Her-2)表达均呈阴性。由于缺乏内分泌及抗 Her-2 治疗的靶点,至今对于 TNBC 患者仍无标准化治疗方案,而仍以化疗为主^[12-15]。多西紫杉醇作为目前最为有效的单药对乳腺癌具有明显的抗癌活性,尤其是对复发或转移性乳腺癌患者。

在本研究中,MDA-MB-231 细胞属于人三阴性乳腺癌细胞株。基于亲本 MDA-MB-231 细胞,我们制备了针对 Doc 产生抗性的耐药株(MDA-MB-231/Doc),通过分析 MDA-MB-231/S 和 MDA-MB-231/Doc 细胞中差异表达的 miRNA,筛选出了与耐药明显相关的 miR-21,并进行了耐药调控机制的研究。miR-21 作为 MicroRNA 中研究最为热门的原癌基因,与肿瘤的发生、发展及转移及其一系列病理改变密切相关,参与了抑癌基因的调控。在临床医学研究中,miR-21 被看作在实体肿瘤及非实体肿瘤中一种重要的生物学预警指标。miR-21 的高表达可增加胃癌、肾癌、大肠癌以及肝癌的耐药,而在乳腺癌中报道极少。我们的研究显示 miR-21 在乳腺癌耐药株 MDA-MB-231/Doc 中显著上调,通过转染 miR-21 抑制剂下调乳腺癌耐药细胞中 miRNA 的表达可有效逆转细胞耐药性,提示 miR-21 是乳腺癌细胞导致多西紫杉醇耐药的主要原因。

MARCKS 是重要的肿瘤抑制基因,分子量为 32 ku,其蛋白包括 3 个高度保守区域:MH 2、豆蔻酰化的 N 端、磷酸化位点效应域(effector domain, ED)。MARCKS 与细胞膜的结合通过

两种机制与细胞膜和肌动蛋白细胞骨架结合,一是豆蔻酰化的 N 端插入细胞膜脂双层;二是磷酸化位点效应域中的碱性残基与膜上的酸性磷脂的结合^[16,17]。MARCKS 在组织中广泛表达,但主要高表达在脑内的轴突、树突以及树突棘、生殖组织和巨噬细胞^[18,19]。目前研究表明大多数实体瘤如乳腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、前列腺癌等都存在 MARCKS 基因的突变、低表达或缺失^[20-22]。可见,MARCKS 蛋白在细胞生长信号通路中起重要作用。新近研究还显示 MARCKS 可能参与了乳腺癌对多西紫杉醇耐药的发生,推测可能直接与 MARCKS 作用抑制其表达,导致肌动蛋白结构发生改变,从而引起癌细胞活力以及侵袭力等增强^[23-26]。另外有研究显示 MARCKS 与一些异常表达 miRNAs 有关,如 Buurman、Rivera 等^[27-29]研究发现 miR-21 通过靶向作用于 MARCKS 从而影响乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的化疗耐药。Wind 等^[30]发现 MDA-MB-231 在乳腺癌细胞株中通过拮抗 miR-21 可以使上皮间叶转化为肿瘤干细胞表型进程发生改变。本研究结果显示 miR-21 和 MARCKS 之间存在密切关系。我们通过转染 miR-21-mimics 上调乳腺癌敏感细胞株 MDA-MB-231/S 中 miR-21 的表达水平,通过转染 miR-21-inhibitors 下调耐药细胞 MDA-MB-231/Doc 中 miR-21 的表达水平,发现提高 miR-21 表达可以下调 MARCKS 的 mRNA 和蛋白表达水平,而降低 miR-21 表达可以上调 MARCKS 的 mRNA 和蛋白表达水平,说明 miR-21 可能通过与靶基因 MARCKS mRNA 的 3'UTR 区的结合,对其进行转录后的抑制性调控。进一步采用各种生物信息学软件分析,预测分析 miR-21 靶基因,结果提示 MARCKS 很可能是该 miRNA 异常表达从而导致耐药的原因。当然,由于单个 miRNA 可以由多个靶基因调节或者单个靶基因可以受到多种 miRNA 的调控,因而不能排除 miR-21 可作用于其它靶基因或靶基因 MARCKS 与其它 miRNAs 协同影响乳腺癌细胞对多西紫杉醇敏感性的可能,这些值得进一步研究。

综上所述,本研究结果表明 miR-21 在乳腺癌耐药细胞株中的表达明显高于其敏感株,与乳腺癌细胞对多西紫杉醇的药物敏感性有关;miR-21 可能通过下调肿瘤抑制基因 MARCKS 的表达从而使乳腺癌细胞对多西紫杉醇产生耐药。但本研究仅局限于细胞水平,其涉及的分子机制仍需大量研究来进行证明。在后续研究中,我们将继续分析 miR-21 在临床标本中的表达变化及与体内化疗敏感性的关系,miR-21 作为重要的分子标志必定会为乳腺癌诊断、治疗、疗效预测以及预后判断发挥越来越重要的作用。

参考文献(References)

- [1] 刘玉红. 女性乳腺癌疾病状况及乳腺癌发生危险因素分析[J]. 现代预防医学, 2011, 38(3): 468-469
- [2] Liu Yu-hong. Status of female breast cancer and risk factors for breast cancer[J]. Modern Preventive Medicine, 2011, 38(3): 468-469
- [3] Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, et al. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature [J]. Nucleic Acids Res 2006, 34(Database issue): D140-144
- [4] 李文静,张磊,赖娅娜,等.人乳腺癌多西紫杉醇耐药细胞株的建立及特性[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(21): 2297
- [5] Li Wen-jing, Zhang Lei, Lai Ya-na, et al. Establishment and charac-

- terization of human docetaxel resistant breast cancer cell lines [J]. Journal of Third Military Medical University, 2011, 33(21): 2297
- [4] Krek A, Grun D, Poy MN, et al. Combinatorial microRNA target predictions[J]. Nat Genet, 2005, 37(5): 495-500
- [5] Kim SJ, Wang YG, Lee HW, et al. Up-regulation of neogenin-1 increases cell proliferation and motility in gastric cancer[J]. Oncotarget, 2014, 5(10): 3386-3398
- [6] Ren J, Huang HJ, Gong Y, et al. MicroRNA-206 suppresses gastric cancer cell growth and metastasis[J]. Cell Biosci, 2014, 4: 26
- [7] Li Q, Wang JX, He YQ, et al. MicroRNA-185 regulates chemotherapeutic sensitivity in gastric cancer by targeting apoptosis repressor with caspase recruitment domain[J]. Cell Death Dis, 2014, 5: e1197
- [8] Ishiguro H, Kimura M, Takeyama H. Role of microRNAs in gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(19): 5694-5699
- [9] Chen H, Lin YW, Mao YQ, et al. MicroRNA-449a acts as a tumor suppressor in human bladder cancer through the regulation of pocket proteins[J]. Cancer Lett, 2012, 320(1): 40-47
- [10] Chen P, Huang Y, Zhang B, et al. EphA2 enhances the proliferation and invasion ability of Lncap prostate cancer cells [J]. Oncol Lett, 2014, 8(1): 41-46
- [11] Herszenyi L, Tulassay Z. Epidemiology of gastrointestinal and liver tumors[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2010, 14(4): 249-258
- [12] Liu T, Hou L, Huang Y. Ezh2-specific microRNA-98 inhibits human ovarian cancer stem cell proliferation via regulating the prb-e2f pathway[J]. Tumour Biol, 2014, 35(7): 7239-7247
- [13] Iyer G, Milowsky MI. Fibroblast growth factor receptor-3 in urothelial tumorigenesis[J]. Urol Oncol, 2013, 31(3): 303-311
- [14] Tian L, Li M, Ge J, et al. Mir-203 is downregulated in laryngeal squamous cell carcinoma and can suppress proliferation and induce apoptosis of tumours[J]. Tumour Biol, 2014, 35(6): 5953-5963
- [15] Ye W, Xue J, Zhang Q, et al. Mir-449a functions as a tumor suppressor in endometrial cancer by targeting cdc25a[J]. Oncol Rep, 2014, 32(3): 1193-1199
- [16] Ren XS, Yin MH, Zhang X, et al. Tumor-suppressive microRNA-449a induces growth arrest and senescence by targeting e2f3 in human lung cancer cells[J]. Cancer Lett, 2014, 344(2): 195-203
- [17] Hu J, Fang Y, Cao Y, et al. Mir-449a regulates proliferation and chemosensitivity to cisplatin by targeting cyclin d1 and bcl2 in sgc7901 cells[J]. Dig Dis Sci, 2014, 59(2): 336-345
- [18] Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, et al. miRBase: tools for microRNA genomics[J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(Database issue): D154-158
- [19] Zhang S, Yu D. Pi(3)king apart pten's role in cancer[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(17): 4325-4330
- [20] Chen Y, Sun Y, Chen L, et al. Mirna-200c increases the sensitivity of breast cancer cells to doxorubicin through the suppression of e-cadherin-mediated pten/akt signaling [J]. Mol Med Rep, 2013, 7(5): 1579-1584
- [21] Tanic N, Milovanovic Z, Tanic N, et al. The impact of pten tumor suppressor gene on acquiring resistance to tamoxifen treatment in breast cancer patients[J]. Cancer Biol Ther, 2012, 13(12): 1165-1174
- [22] Barbareschi M, Cuorvo LV, Girlando S, et al. Pi3kca mutations and/or pten loss in her2-positive breast carcinomas treated with trastuzumab are not related to resistance to anti-her2 therapy [J]. Virchows Arch, 2012, 461(2): 129-139
- [23] Meunier L, Siddeek B, Vega A, et al. Perinatal programming of adult rat germ cell death after exposure to xenoestrogens: Role of microRNA mir-29 family in the down-regulation of DNA methyltransferases and mcl-1[J]. Endocrinology, 2012, 153(4): 1936-1947
- [24] Ji N, Yuan J, Liu J, et al. Developing multidrug-resistant cells and exploring correlation between bcrp/abcg2 over-expression and DNA methyltransferase[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2010, 42(12): 854-862
- [25] Fletcher CE, Dart DA, Sita-Lumsden A, et al. Androgen-regulated processing of the oncomir mir-27a, which targets prohibitin in prostate cancer[J]. Hum Mol Genet, 2012, 21(14): 3112-3127
- [26] Jeon HS, Lee SY, Lee EJ, et al. Combining microRNA-449a/b with a hdac inhibitor has a synergistic effect on growth arrest in lung cancer [J]. Lung Cancer, 2012, 76(2): 171-176
- [27] Buurman R, Gurlevik E, Schaffer V, et al. Histone deacetylases activate hepatocyte growth factor signaling by repressing microRNA-449 in hepatocellular carcinoma cells [J]. Gastroenterology, 2012, 143(3): 811-820 e811-815
- [28] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. Cell, 2005, 120(1): 15-20
- [29] Rivera E, Gomez H. Chemotherapy resistance in metastatic breast cancer[J]. The evolving role of ixabepilone[J]. Breast Cancer Res, 2010, 12(Suppl 2): S2
- [30] Wind NS, Holen I. Multidrug resistance in breast cancer: From in vitro models to clinical studies[J]. Int J Breast Cancer, 2011, 2011: 967419

(上接第 1216 页)

- [18] Srivastav S, Walitza S, Grunblatt E. Emerging role of miRNA in attention deficit hyperactivity disorder: a systematic review [J]. Atten Defic Hyperact Disord, 2017[Epub ahead of print]
- [19] Voon D C, Huang R Y, Jackson R A, et al. The EMT spectrum and therapeutic opportunities[J]. Mol Oncol, 2017, 11(7): 878-891
- [20] Banday M Z, Sameer A S, Mir A H, et al. Matrix metalloproteinase (MMP) -2, -7 and -9 promoter polymorphisms in colorectal cancer in ethnic Kashmiri population - A case-control study and a mini review [J]. Gene, 2016, 589(1): 81-89
- [21] Singh D, Srivastava S K, Chaudhuri T K, et al. Multifaceted role of matrix metalloproteinases (MMPs)[J]. Front Mol Biosci, 2015, 2: 19