

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.03.005

线粒体 E3 泛素连接酶 MARCH5 表达上调促进肝癌生长 *

耿西林¹ 张 静¹ 李 晖¹ 杨宇宇² 张 煜¹ 常虎林^{1Δ}

(1 陕西省人民医院肝胆外科 陕西 西安 710068; 2 通用环球西安西航医院外一科 陕西 西安 710021)

摘要 目的:膜相关锌指蛋白 MARCH5(membrane-associated RING-CH 5)是定位于线粒体外膜的 E3 泛素连接酶,在调控线粒体分裂融合相关蛋白的表达中发挥重要作用。以往研究在多种肿瘤中证实了线粒体分裂融合的异常,但目前 MARCH5 在肝癌中的表达与生物学作用均不清楚。本研究旨在探讨 MARCH5 在肝癌组织与细胞系中的表达及其在肿瘤生长中的调控作用。**方法:**1). 利用免疫组化实验检测 62 对肝癌癌与癌旁组织中 MARCH5 表达,以明确 MARCH5 在肝癌中的表达是否发生了异常改变。2). 利用 qRT-PCR 与 Western blot 实验检测 4 株肝癌细胞(SNU-354、SNU-368、HLE 与 HLF)与 1 株正常肝细胞 HL7702 中 MARCH5 表达,进一步分析 MARCH5 在肝癌细胞系中的表达改变。3). 下调肝癌细胞中 MARCH5 表达后,利用 EDU 实验与克隆形成实验分析对肝癌细胞增殖与克隆形成能力的影响。**结果:**1). MARCH5 在肝癌组织中表达显著高于癌旁组织。2). MARCH5 在 4 株肝癌细胞中的表达均显著高于正常肝细胞。3). 下调 MARCH5 表达可显著抑制肝癌细胞的增殖与克隆形成。**结论:** MARCH5 在肝癌中表达显著上调并通过诱导增殖与克隆形成而促进肝癌的生长。

关键词: MARCH5; 线粒体; 增殖; 克隆形成; 肝癌

中图分类号: R-33; Q244; R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2021)03-424-05

Over-expression of MARCH5 Promotes Tumor Growth in Liver Cancer*

GENG Xi-lin¹, ZHANG Jing¹, LI Hui¹, YANG Yu-yu², ZHANG Yu¹, CHANG Hu-lin^{1Δ}

(1 Department of Hepatobiliary Surgery, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China;

2 Department of general surgery, Xi'an Xihang hospital, Xi'an, Shaanxi, 710021, China)

ABSTRACT Objective: MARCH5 (membrane-associated RING-CH 5) is an E3 ubiquitin-protein that localized in mitochondrial membrane and functions as a regulator of mitochondrial morphology. Previous studies have indicated the close link between mitochondrial dynamic dysfunction and cancer. However, the expression and biological functions of MARCH5 in liver cancer remains unclear. The present study aims to explore the expression and tumor growth promotive role of MARCH5 in liver cancer. **Methods:** 1. Immunohistochemistry analysis was applied to evaluate the expression of MARCH5 in 62-paired tumor and peritumor tissues of liver cancer. 2. MARCH5 expression was further evaluated in four human liver cancer cell lines (SNU-354, SNU-368, HLE and HLF) and one normal liver cell line HL-7702. 3. The effects of MARCH5 knockdown on the proliferation and colony formation were determined by EDU (5-Ethynyl-2'- deoxyuridine) and colony formation assays in liver cancer SNU-368 cells. **Results:** 1. MARCH5 expression was significantly increased in tumor tissues of liver cancer when compared with peritumor tissues ($P<0.001$). 2. MARCH5 expression was significantly higher in four liver cancer cell lines than in normal liver cancer cell. 3. MARCH5 knockdown suppressed both proliferation and colony formation in liver cancer cells. **Conclusion:** MARCH5 over-expression promotes liver cancer growth through increasing cell proliferation and colony formation.

Key words: MARCH5; Mitochondrial; Proliferation; Colony formation; Liver cancer

Chinese Library: R-33; Q244; R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)03-424-05

前言

线粒体在细胞能量代谢、凋亡、钙离子与氧化还原稳态调控中发挥重要作用^[1-4]。线粒体通过不间断的分裂与融合对自身形态与功能进行调控,以适应细胞内外环境的改变。线粒体的

分裂与融合主要受到多个位于线粒体内外膜上线粒体分裂与融合相关蛋白的调控,其中线粒体分裂主要受线粒体动力相关蛋白 DRP1 (dynamin-related protein)、线粒体分裂因子 MFF (Mitochondrial Fission factor) 与线粒体分裂蛋白 FIS1 (Mitochondrial fission 1) 的调控,而线粒体融合主要受线粒体融合蛋

* 基金项目:陕西省自然科学基金青年项目(2020JQ-948)

作者简介:耿西林(1981-),男,副主任医师,研究方向:主要从事肝胆疾病临床诊治与肝癌发病分子机理研究,

E-mail: gengxilin001@163.com,电话:15529519125

Δ 通讯作者:常虎林(1988-),男,博士,主治医师,研究方向:主要从事肝胆疾病临床诊治与慢性肝疾病发病分子机理研究,

E-mail: hulinchang008@163.com,电话:029-85251331-2899

(收稿日期:2020-05-28 接受日期:2020-06-24)

白 MFN1/2(Mitofusion 1/2)与视神经萎缩蛋白 OPA1(optic atrophy 1)的调控^[9]。以往研究已在包括肝癌在内多种类型的恶性肿瘤中证实了线粒体分裂融合的异常^[6-8],并证实分裂融合蛋白的表达改变是导致肿瘤线粒体分裂融合异常的主要原因^[9-12]。但目前,导致肿瘤线粒体分裂融合蛋白表达异常的机制仍不十分清楚,有待进一步阐明。

膜相关锌指蛋白 MARCH5 (membrane-associated RING-CH 5)是定位于线粒体外膜的 E3 泛素连接酶,在调控线粒体分裂融合相关蛋白的表达中发挥重要作用^[13]。以往研究发现,MARCH5 在乳腺癌、卵巢癌与宫颈癌组织中表达显著上调并促进了上述肿瘤的恶性进展^[14-16]。但目前,MARCH5 在包括肝癌在内其它类型肿瘤中的表达与生物学作用均尚不清楚。本研究旨在利用肝癌临床组织样本与肝癌细胞系,分析 MARCH5 在肝癌中的表达,并进一步分析其在肝癌生长中的促进作用。

1 材料与方法

1.1 肝癌临床组织样本与肝癌细胞系

共收集 62 例 2015 年 1 月至 2016 年 12 月间于西安交通大学第三附属医院(陕西省人民医院)肝胆外科进行肝癌手术病人的癌与癌旁组织,所有患者均事先签署了知情同意书,62 例肝癌患者临床病理资料见表一。

表 1 62 例肝癌患者临床病理资料

Table 1 The clinical pathological characteristics of 62 patients with HCC

Variables	No. of cases (%)
All	62
Age	
<55	26 (41.9%)
≥55	36 (58.1%)
Gender	
Female	14 (22.6%)
Male	48 (77.4%)
HBV	
Negative	11 (17.7%)
Positive	51 (82.3%)
AFP (μg/mL)	
<200	33 (53.2%)
≥200	29 (46.8%)
Maximum diameter	
<5	49(79.0%)
≥5	13 (21.0%)
PVTT	
No	56 (90.3%)
Yes	6 (9.7%)
TNM stage	
I+ II	47 (75.8%)
III+ IV	15 (24.2%)

人肝癌细胞 SNU-354、SNU-368、HLE 与 HLF 均购自日本 JCRRB 细胞库 (Japanese Cancer Research Resources Bank),人正常肝细胞 HL-7702 购自中科院上海细胞库。细胞培养液为含 10%胎牛血清(Hyclone)的 DMEM 培养液,细胞置于 37 °C 与 5%浓度的 CO₂ 培养箱中培养。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫组织化学染色 手术切除的肝癌癌与癌旁组织置于液氮保存,随后于福尔马林固定 24 h,石蜡包埋与切片后即可进行组化染色。切片依次经烤片、两个重复二甲苯、梯度酒精水化、柠檬酸高压抗原修复、内源性过氧化物酶去除后,即可进行 MARCH5 一抗、二抗与三抗孵育。最后,加入 DAB 显色并用苏木素对细胞核进行复染,切片经脱水、封片、晾干后即可置于显微镜下对染色结果进行观察。

1.2.2 siRNA 转染肝癌 HLE 细胞 首先,设计合成两条靶向 MARCH 不同位置的 siRNA 片段 (siMARCH5#1:: 5'-GCACU-UGGGAGUAAUUUGA-3'; siMARCH5#2: 5'-GCACACGUGU-CCGAUUUUAU-3')。用不含血清的 DMEM 培养液分别稀释 siRNA 与 lip2000,随后将二者混合并加入 6 孔板细胞中,培养箱中培养 6 h 后更换新鲜含 10%血清的 DMEM 培养液继续培养,siRNA 转染 24 h 后即可用于后续实验。

1.2.3 qRT-PCR 实验 细胞 RNA 提取试剂盒购自 OMEGA 公司(货号 R6688),RNA 提取过程严格按说明书进行,提取获得细胞总 RNA 后用反转录试剂盒 (TAKARA 公司,货号 RR037A)合成 cDNA。随后进行 MARCH5 表达检测。MARCH5 分子 PCR 引物序列为:F-5'-GTCCAGTGGTTTACGTCT-TGG-3';R-5'-CCGACCATTATTCCTGCTGC-3')。内参分子 β-actin 的 PCR 引物序列为:F-5'-TCGCCTTTGCCGATCCG-3; R-5'-ATGATCTGGGTCATCTTCTCG-3'。

用 2^{-ΔΔCt} 法对各组细胞中 MARCH5 的相对表达量进行计算。

1.2.4 Western Blot 实验 首先,用裂解液裂解细胞并离心收集上清蛋白,加入上样缓冲液后于沸水中煮沸 5 min 使蛋白变性,将变性的蛋白加入事先配好的凝胶中进行电泳分离,随后将凝胶中分离的蛋白转印至 PVDF 膜上并于 5%脱脂牛奶中封闭 1 h,随后加入稀释过的 MARCH5 抗体(Novus 公司,货号 NBP2-21583)并于 4 °C 孵育 10 h,PBS 洗 3 次后加入二抗并于室温孵育 2 h,PBS 洗 3 次后在发光仪下对结果进行观察。

1.2.5 EdU 增殖实验 首先,对肝癌细胞中的 MARCH5 表达进行 siRNA 干涉处理,之后消化并离心收集细胞,将 1× 10⁵ 个细胞接种至激光共聚焦显微镜专用皿中培养过夜,细胞贴壁后依次经 4%多聚甲醛固定与 BSA 孵育后加入 0.1 mL 的 EdU 染液(苏州宇恒生物公司,货号 C6017)避光孵育 30 min,PBS 洗 3 次后用 DAPI 对细胞核进行衬染。最后,置于激光共聚焦显微镜下对结果进行观察拍照。

1.2.6 克隆形成实验 同样,首先需对肝癌细胞中 MARCH5 表达进行 siRNA 干涉处理,随后消化并离心收集细胞,将 1× 10³ 个细胞接种至 6 孔板并置于细胞培养箱中培养 14 d,弃去培养上清后将细胞用 PBS 洗两次,随后用结晶紫染色 5 min,PBS 洗 3 次后对细胞克隆进行拍照与计数。

1.2.7 统计分析 实验结果用均数 $\pm$ 标准误 (mean $\pm$ SD) 展示, 组间差异采用单因素方差分析, 将 $P<0.05$ 定义为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MARCH5 在肝癌组织中表达显著高于癌旁组织

利用免疫组化, 对 62 对肝癌癌与癌旁组织中 MARCH5 表达进行检测后发现(图 1): MARCH5 在肝癌组织中的表达显著高于癌旁正常肝组织($P<0.01$)。

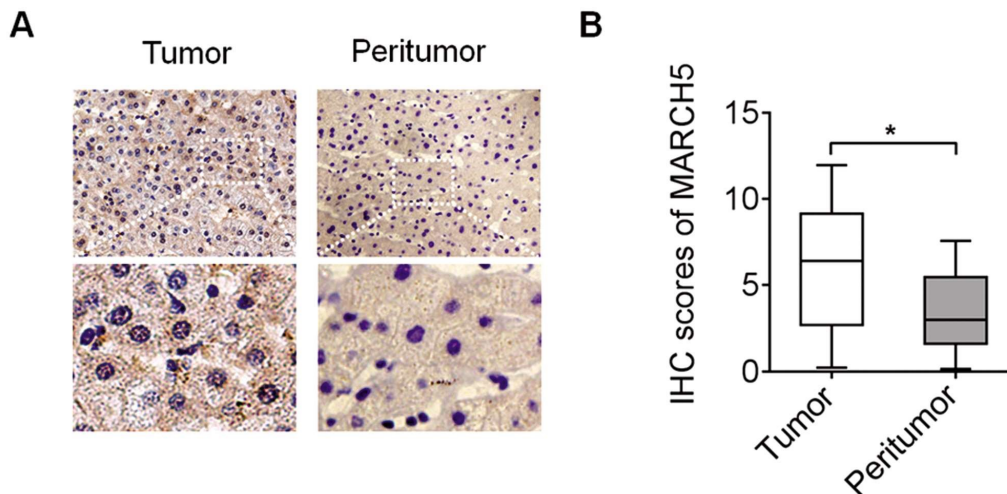


图 1 免疫组化分析 MARCH5 在 62 对肝癌癌与癌旁组织中的表达

Fig.1 Immunohistochemistry analysis for expression of MARCH5 in 62-paired tumor and peritumor tissues of liver cancer

2.2 MARCH5 在肝癌细胞中的表达显著高于正常肝细胞

为验证肝癌组织中 MARCH5 表达上调的结果, 我们进一步利用 qRT-PCR 与 Western blot 实验, 对 4 株肝癌细胞 (SNU-354、SNU-368、HLE 与 HLF) 与 1 株正常肝细胞

HL-7702 中 MARCH5 表达水平进行检测, 进而分析 MARCH5 表达是否在肝癌细胞系中高于正常肝细胞, 结果发现(图 2): MARCH5 在 4 株肝癌细胞中的表达均显著高于正常肝细胞, 进一步说明 MARCH5 表达在肝癌中显著上调。

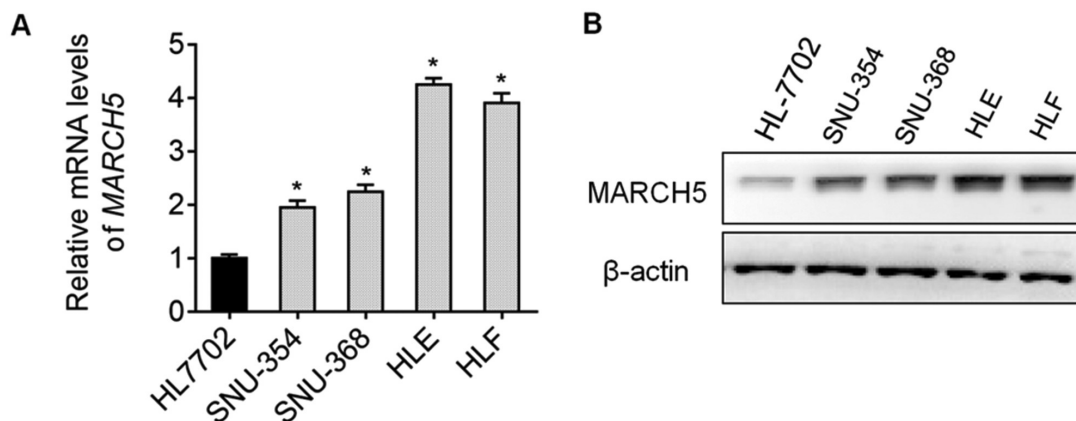


图 2 qRT-PCR(A)与 Western blot(B)检测 4 株肝癌细胞与 1 株正常肝细胞中 MARCH5 的表达

Fig. 2 qRT-PCR and Western blot analysis for expression of MARCH5 in four liver cancer cell lines and one normal liver cells.

2.3 干涉 MARCH5 可显著抑制肝癌细胞增殖与克隆形成

首先, 对合成的两条 siRNA 片段下调肝癌 HLE 细胞中 MARCH5 表达的效率进行 qRT-PCR 与 Western Blot 实验分析, 结果证实(图 3): 两条 siRNA 均可显著下调肝癌 HLE 细胞中 MARCH5 的表达, 可满足后续 MARCH5 在肝癌增殖与克隆形成中调控作用的研究。

siRNA 下调 MARCH5 表达后用 EdU 细胞增殖实验检测对肝癌细胞增殖的影响, 结果发现(图 4): 干涉 MARCH5 表达后, 肝癌细胞 EdU 染色阳性率显著降低, 表明下调 MARCH5 抑制了肝癌细胞的增殖。

进一步用平板克隆形成实验检测下调 MARCH5 对肝癌细胞克隆形成能力的影响, 结果发现(图 5): 干涉 MARCH5 表达后, 细胞克隆形成数显著减少, 表明下调 MARCH5 抑制了肝癌细胞的克隆形成能力。

3 讨论

线粒体是细胞内参与能量与物质代谢、细胞凋亡、钙离子与氧化还原稳态调控的多拷贝胞器, 通过高度频繁的分裂与融合维持自身形态、数量与功能的稳态^[9,17]。线粒体分裂与融合主要受一系列具有 GTP 酶活性蛋白的调控。其中, 线粒体分裂主

要受线粒体动力相关蛋白 Drp1、线粒体分裂因子 MFF 与分裂蛋白 FIS1 的调控，而线粒体融合则主要受线粒体融合蛋白 MFN1 与 MFN2、视神经萎缩蛋白 OPA1 的调节^[18,19]。上述分裂

融合调控蛋白的表达与活性异常已在多种恶性肿瘤中被证实^[9,20]，其中包括肝癌、乳腺癌、大肠癌、肺癌、胰腺癌等^[21-27]。

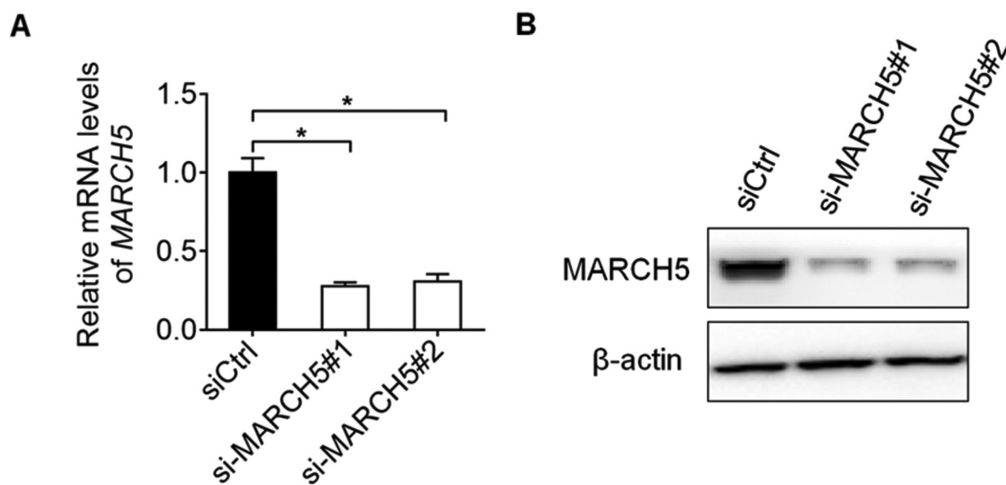


图3 siRNA 下调肝癌细胞中 MARCH5 表达的效率分析

A. qRT-PCR 检测 mRNA 水平; B. Western blot 检测蛋白水平

Fig.3 Knockdown efficiency of MARCH5 in liver cancer cells

A. qRT-PCR analysis for mRNA level; B. Western blot analysis for protein level

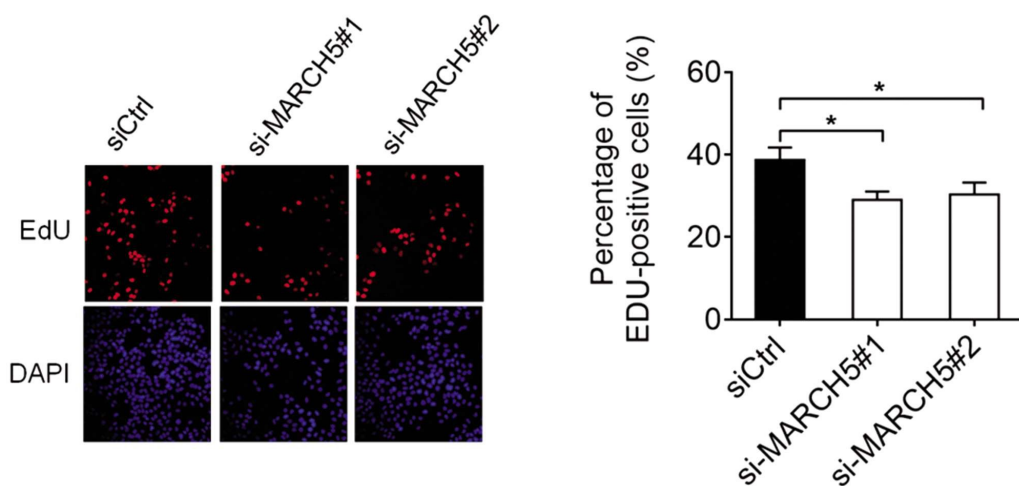


图4 EDU 染色检测下调 MARCH5 表达对肝癌细胞增殖的影响

Fig.4 EDU assay for effect of MARCH5 knockdown on cell proliferation of liver cancer

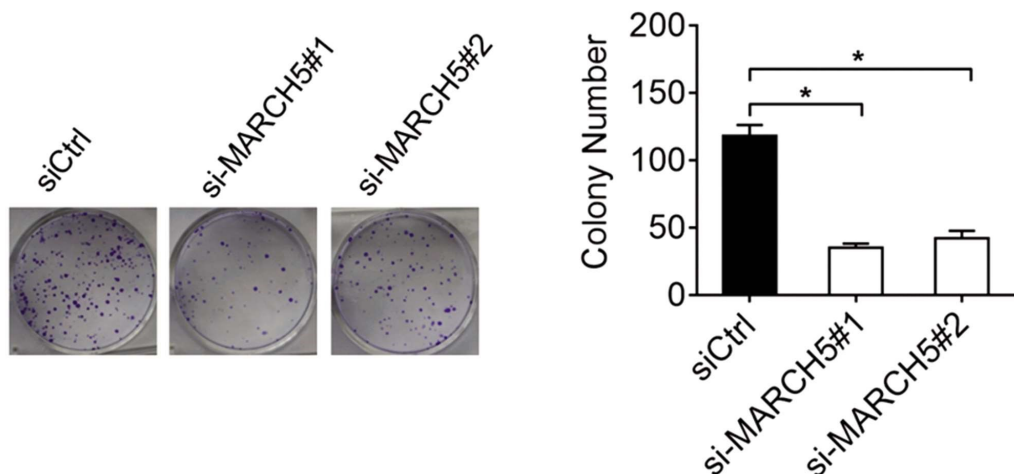


图5 平板克隆实验检测下调 MARCH5 表达对肝癌细胞克隆形成能力的影响

Fig.5 Effect of MARCH5 knockdown on colony formation ability of liver cancer cells

以往在肝癌中的研究发现,与癌旁正常肝组织相比,肝癌组织中线粒体线粒体融合蛋白 MFN1 的表达显著下调,导致线粒体融合减弱,使线粒体发生显著片段化并促进肿瘤的转移^[28]。但目前,导致肝癌细胞中 MFN1 表达下调的机制尚不十分清楚。MARCH5(membrane-associated RING-CH E3)是定位于线粒体外膜的 E3 泛素连接酶。以往研究证实 MARCH5 可通过泛素化调节 DRP1、MFN1 与 MFN2 等线粒体分裂融合蛋白的表达而参与细胞线粒体分裂与融合的调控^[29,30]。本研究首次在肝癌细胞中证实了 MARCH5 表达的显著上调,提示 MARCH5 上调可能是导致肝癌中线粒体融合蛋白 MFN1 表达下调进而促进肿瘤恶性进展的主要原因。对 MARCH5 在肝癌细胞中的生物学作用的研究进一步发现,下调 MARCH5 表达可显著抑制肝癌细胞的增殖与克隆形成,表明 MARCH4 发挥了促进肝癌生长的作用。与我们在肝癌中的研究结果类似,以往在肝癌之外其它几个类型肿瘤中的研究也报道了 MARCH5 表达的异常改变及其促肿瘤作用。如以往在乳腺癌中研究发现,MARCH5 在乳腺癌组织中的表达显著高于癌旁组织,MARCH5 表达上调促进了乳腺癌细胞在体内外的增殖与转移^[14]。卵巢癌中的研究也发现,MARCH5 在卵巢癌组织中表达显著高于正常卵巢组织,下调 MARCH5 显著抑制了转化生长因子 TGF- β 介导的细胞自噬与肿瘤转移^[15]。此外,鼻咽癌中研究也证实了 MARCH5 的表达上调,并发现 miR-373 表达下调是导致鼻咽癌细胞中 MARCH5 上调的主要原因,miR-373 通过上调 MARCH5 而促进鼻咽癌细胞的侵袭转移^[16]。以上研究提示,MARCH5 在促进肿瘤生长与转移中均发挥了重要的促进作用。以往在乳腺癌中的研究也证实,下调 MARCH5 可抑制乳腺癌细胞的增殖与克隆形成,该研究还发现 MARCH5 促进乳腺癌增殖是通过诱导细胞周期发生 G1-S 期转换而实现的^[14]。我们的 EDU 染色结果发现,下调 MARCH5 后处于增殖周期的肝癌细胞比例显著降低,提示 MARCH5 促进肝癌细胞增殖与克隆形成同样可能是由加速的细胞周期进程所介导。

总之,本研究首次在肝癌中证实了线粒体 E3 泛素连接酶 MARCH5 的表达上调及其在促进肿瘤生长中的作用,提示 MARCH5 是潜在的肝癌治疗分子靶标。本研究尚存在如下两个科学问题有待未来的研究进一步阐明。第一,MARCH5 表达上调是否介导了肝癌与其它肿瘤细胞中线粒体分裂融合蛋白的表达异常。第二,MARCH5 除参与肝癌增殖与生长调控外是否也参与了肝癌恶性转移的调控。

参考文献(References)

- [1] R. E. Koch, C. C. Josefson, G. E. Hill. Mitochondrial function, ornamentation, and immunocompetence [J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2017, 92: 1459-1474
- [2] A. M. Sterea, Y. El Hiani. The Role of Mitochondrial Calcium Signaling in the Pathophysiology of Cancer Cells [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1131: 747-770
- [3] M. Idelchik, U. Begley, T. J. Begley, et al. Mitochondrial ROS control of cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2017, 47: 57-66
- [4] G. Lopez-Lluch, J. D. Hernandez-Camacho, D. J. M. Fernandez-Ayala, et al. Mitochondrial dysfunction in metabolism and ageing: shared mechanisms and outcomes?[J]. *Biogerontology*, 2018, 19: 461-480
- [5] D. Senft, Z. A. Ronai. Regulators of mitochondrial dynamics in cancer [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2016, 39: 43-52
- [6] L. Chen, J. Zhang, Z. Lyu, et al. Positive feedback loop between mitochondrial fission and Notch signaling promotes survivin-mediated survival of TNBC cells[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9: 1050
- [7] L. Simula, F. Nazio, S. Campello. The mitochondrial dynamics in cancer and immune-surveillance[J]. *Semin Cancer Biol*, 2017, 47: 29-42
- [8] J. Hagenbuchner, A. V. Kuznetsov, P. Obexer, et al. BIRC5/Survivin enhances aerobic glycolysis and drug resistance by altered regulation of the mitochondrial fusion/fission machinery [J]. *Oncogene*, 2013, 32: 4748-4757
- [9] A. P. Trotta, J. E. Chipuk. Mitochondrial dynamics as regulators of cancer biology[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74: 1999-2017
- [10] D. C. Altieri. Mitochondrial dynamics and metastasis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76: 827-835
- [11] A. Ferreira-da-Silva, C. Valacca, E. Rios, et al. Mitochondrial dynamics protein Drp1 is overexpressed in oncogenic thyroid tumors and regulates cancer cell migration[J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0122308
- [12] M. Li, L. Wang, Y. Wang, et al. Mitochondrial Fusion Via OPA1 and MFN1 Supports Liver Tumor Cell Metabolism and Growth [J]. *Cells*, 2020, 9[Epub ahead of print]
- [13] Y. Y. Park, O. T. Nguyen, H. Kang, et al. MARCH5-mediated quality control on acetylated Mfn1 facilitates mitochondrial homeostasis and cell survival [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1172
- [14] H. Tang, S. Peng, Y. Dong, et al. MARCH5 overexpression contributes to tumor growth and metastasis and associates with poor survival in breast cancer[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 201-215
- [15] J. Hu, Y. Meng, Z. Zhang, et al. MARCH5 RNA promotes autophagy, migration, and invasion of ovarian cancer cells [J]. *Autophagy*, 2017, 13: 333-344
- [16] Z. Huang, S. Zhang, J. Wang, et al. miR-373 inhibits nasopharyngeal carcinoma cell migration and invasion by targeting MARCH5[J]. *Int J Clin Exp Pathol*. 2019, 12: 2646-2652
- [17] L. Chen, A. J. Winger, A. A. Knowlton. Mitochondrial dynamic changes in health and genetic diseases [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41: 7053-7062
- [18] L. Tilokani, S. Nagashima, V. Paupe, et al. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms [J]. *Essays Biochem*, 2018, 62: 341-360
- [19] H. Lee and Y. Yoon. Mitochondrial fission and fusion [J]. *Biochem Soc Trans*, 2016, 44: 1725-1735
- [20] S. Srinivasan, M. Guha, A. Kashina, et al. Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics-The cancer connection[J]. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 2017, 1858: 602-614
- [21] Q. Huang, L. Zhan, H. Cao, et al. Increased mitochondrial fission promotes autophagy and hepatocellular carcinoma cell survival through the ROS-modulated coordinated regulation of the NF κ B and TP53 pathways[J]. *Autophagy*, 2016, 12: 999-1014
- [22] Q. Tang, W. Liu, Q. Zhang, et al. Dynamin-related protein 1-mediated mitochondrial fission contributes to IR-783-induced apoptosis in human breast cancer cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22: 4474-4485
- [23] A. Inoue-Yamauchi, H. Oda. Depletion of mitochondrial fission factor DRP1 causes increased apoptosis in human colon cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 421: 81-85

- miR-145, miR-182, and miR-221 with clinicopathologic parameters of prostate cancer in patients diagnosed with low-risk disease [J]. *Prostate*, 2019, 79(10): 1125-1132
- [9] 李佩, 胡静, 张莹, 等. miR-182 通过靶向抑制腺瘤性息肉病基因 (APC) 促进宫颈癌细胞增殖[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2018, 34(2): 148-153
- [10] 郝雁冰, 王丽, 容宇, 等. E-钙黏蛋白在食管癌组织中的表达及其与食管癌术后复发的相关性 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 33(23): 2357-2360
- [11] Huang FL, Yu SJ. Esophageal cancer: Risk factors, genetic association, and treatment[J]. *Asian J Surg*, 2018, 41(3): 210-215
- [12] 何刚, 王洪斌, 刘海林, 等. 右胸入路三野清扫淋巴结治疗中晚期胸中段食管癌的疗效及预后观察[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(29): 5728-5731
- [13] Zhang M, Wu AJ. Radiation techniques for esophageal cancer [J]. *Chin Clin Oncol*, 2017, 6(5): 45
- [14] Khan AQ, Ahmed EI, Elareer NR, et al. Role of miRNA-Regulated Cancer Stem Cells in the Pathogenesis of Human Malignancies [J]. *Cells*, 2019, 8(8): 840
- [15] Sun Z, Shi K, Yang S, et al. Effect of exosomal miRNA on cancer biology and clinical applications[J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 147
- [16] Zhao MY, Wang LM, Liu J, et al. MiR-21 Suppresses Anoikis through Targeting PDCD4 and PTEN in Human Esophageal Adenocarcinoma[J]. *Curr Med Sci*, 2018, 38(2): 245-251
- [17] Chen H, Xu L, Wang L. Expression of miR-182 and Foxo3a in patients with bladder cancer correlate with prognosis [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(11): 4193-4203
- [18] Chen F, Zhou H, Wu C, et al. Identification of miRNA profiling in prediction of tumor recurrence and progress and bioinformatics analysis for patients with primary esophageal cancer: Study based on TCGA database[J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(12): 2081-2086
- [19] Zhang HC, Tang KF. Clinical value of integrated-signature miRNAs in esophageal cancer[J]. *Cancer Med*, 2017, 6(8): 1893-1903
- [20] Wang J, Chu Y, Xu M, et al. miR-21 promotes cell migration and invasion of hepatocellular carcinoma by targeting KLF5[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(2): 2221-2227
- [21] Yao SS, Han L, Tian ZB, et al. Celastrol inhibits growth and metastasis of human gastric cancer cell MKN45 by down-regulating microRNA-21[J]. *Phytother Res*, 2019, 33(6): 1706-1716
- [22] Shen KH, Hung JH, Chang CW, et al. Solasodine inhibits invasion of human lung cancer cell through downregulation of miR-21 and MMPs expression[J]. *Chem Biol Interact*, 2017, 268(9): 129-135
- [23] Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis[J]. *Cell*, 2017, 168(4): 670-691
- [24] Xia Y, Wang Y, Wang Q, et al. Increased miR-203-3p and reduced miR-21-5p synergistically inhibit proliferation, migration, and invasion in esophageal cancer cells [J]. *Anticancer Drugs*, 2019, 30(1): 38-45
- [25] Baumann B, Acosta AM, Richards Z, et al. Association of High miR-182 Levels with Low-Risk Prostate Cancer [J]. *Am J Pathol*, 2019, 189(4): 911-923
- [26] Chen G, Yu L, Dong H, et al. MiR-182 enhances radioresistance in non-small cell lung cancer cells by regulating FOXO3 [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2019, 46(2): 137-143
- [27] Chiang CH, Chu PY, Hou MF, et al. MiR-182 promotes proliferation and invasion and elevates the HIF-1 α -VEGF-A axis in breast cancer cells by targeting FBXW7 [J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6(8): 1785-1798
- [28] Itatani Y, Kawada K, Yamamoto T, et al. Resistance to Anti-Angiogenic Therapy in Cancer-Alterations to Anti-VEGF Pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4): 1232
- [29] Liu Y, Qiang W, Xu X, et al. Role of miR-182 in response to oxidative stress in the cell fate of human fallopian tube epithelial cells[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(36): 38983-38998
- [30] Klaunig JE. Oxidative Stress and Cancer [J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(40): 4771-4778
- (上接第 428 页)
- [24] L. Yu, Z. Xiao, H. Tu, et al. The expression and prognostic significance of Drp1 in lung cancer: A bioinformatics analysis and immunohistochemistry[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98: e18228
- [25] J. Liang, Y. Yang, L. Bai, et al. DRP1 upregulation promotes pancreatic cancer growth and metastasis through increased aerobic glycolysis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2019[Epub ahead of print]
- [26] S. Nagdas, J. A. Kashatus, A. Nascimento, et al. Drp1 Promotes KRas-Driven Metabolic Changes to Drive Pancreatic Tumor Growth [J]. *Cell Rep*, 2019, 28: 1845-1859, e1845
- [27] S. Kitamura, T. Yanagi, K. Imafuku, et al. Drp1 regulates mitochondrial morphology and cell proliferation in cutaneous squamous cell carcinoma[J]. *J Dermatol Sci*, 2017, 88: 298-307
- [28] Z. Zhang, T. E. Li, M. Chen, et al. MFN1-dependent alteration of mitochondrial dynamics drives hepatocellular carcinoma metastasis by glucose metabolic reprogramming [J]. *Br J Cancer*, 2020, 122: 209-220
- [29] Y. Y. Park, S. Lee, M. Karbowski, et al. Loss of MARCH5 mitochondrial E3 ubiquitin ligase induces cellular senescence through dynamin-related protein 1 and mitofusin 1 [J]. *J Cell Sci*, 2010, 123: 619-626
- [30] L. Fang, J. Li, J. Flammer, et al. MARCH5 inactivation supports mitochondrial function during neurodegenerative stress [J]. *Front Cell Neurosci*, 2013, 7: 176