

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.13.007

文章编号: 1005-8982(2017)13-0033-06

MicroRNA-20b 在卵巢癌细胞中的表达 及对增殖和凋亡的影响*

姜慧君, 贺漪

(湖北省武汉市第一医院 妇产科, 湖北 武汉 430022)

摘要:目的 探讨 microRNA-20b(miR-20b)在卵巢癌细胞系中的表达及对增殖和凋亡的影响。**方法** 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)测定 miR-20b 在卵巢癌细胞系 A431、SKOV3 及正常卵巢上皮细胞系 Hose 中的相对表达量,将 SKOV3 细胞系分成未转染对照、阴性对照及 miR-20b 模拟物组,用 Lipofectamine 2000 分别不转染、转染 miR-20b scramble 和 miR-20b mimics,CCK8 实验测定 3 组细胞增殖能力,流式细胞术测定 3 组细胞凋亡,Western blot 测定张力蛋白同源在 10 号染色体有缺失的磷酸酶(PTEN)、裂解型聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)的相对表达量。**结果** qRT-PCR 示 A431、SKOV3 细胞系 miR-20b 相对表达量较 Hose 细胞系低;miR-20b 模拟物组在 0、24、48、72 及 96 h 的 OD45 nm 值低于未转染对照组和阴性对照组;miR-20b 模拟物组凋亡率高于阴性对照组和未转染对照组;miR-20b 模拟物组 PTEN 相对表达量低于阴性对照组,裂解型 PARP 蛋白相对表达量高于阴性对照组。**结论** miR-20b 抑制卵巢癌细胞增殖并促进凋亡,其机制可能与下调 PTEN 和上调 PARP 蛋白表达有关。

关键词: miR-20b; 卵巢癌; 增殖; 凋亡

中图分类号: R737.31

文献标识码: A

Expression of miR-20b in ovarian carcinoma cell line and its effect on proliferation and apoptosis*

Hui-jun Jiang, Yi He

(Department of Gynecology and Obstetrics, Wuhan No.1 Hospital, Wuhan, Hubei 430022, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of miR-20b in ovarian carcinoma cell line and its effect on proliferation and apoptosis. **Methods** The relative expression levels of miR-20b in A431, SKOV3 and Hose cell lines were measured by qRT-PCR. The SKOV3 cell line was divided into non-transfection control group without transfection, negative control group transfected with miR-20b scramble and miR-20b mimics group transfected with miR-20b mimics by Lipofectamine 2000. The proliferation ability was tested by CCK8 assay. The apoptosis rate was measured by flow cytometry. The expression levels of phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 (PTEN) and cleaved poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) were measured by Western blot. **Results** The expression levels of miR-20b in the A431 and SKOV3 cell lines were significantly lower than that in the Hose cell line. The value of OD 450 nm in the miR-20b mimics group was significantly lower than that in the non-transfection control and negative control groups at 0, 24, 48, 72 and 96 h. The apoptosis rate of the miR-20b mimics group was significantly higher than that of the negative control and non-transfection control groups. Compared to the negative control group, the expression level of PTEN was down-regulated and the cleaved PARP was up-regulated in the miR-20b mimics group. **Conclusions** miR-20b inhibits proliferation and promotes apoptosis of ovarian carcinoma cells, the mechanism may be associated with down-regulation of PTEN and up-regulation of cleaved PARP.

Keywords: miR-20b; ovarian carcinoma cell; proliferation; apoptosis

收稿日期: 2016-12-10

* 基金项目: 武汉市卫计委课题(No: WX15C32)

[通信作者] 贺漪, E-mail: heyi879@126.com

卵巢癌是女性常见的恶性肿瘤,在发达国家,年龄标化发病率为十万分之 9.1,年龄标化死亡率为十万分之 5.0;在发展中国家,年龄标化发病率为十万分之 5.0,年龄标化死亡率为十万分之 3.1^[1]。在卵巢癌早期,经手术、化疗等综合治疗后,5 年生存率可达 90%,而对于晚期卵巢癌,5 年生存率则降至 50%^[2]。目前,对于卵巢癌的发病机制尚不十分清楚,深入研究卵巢癌的发病机制对设计合理的药物具有重要的意义。microRNA 是一类长度约 19~22 nt 的微小 RNA,其通过与靶基因结合介导转录后的负调控^[3],在肿瘤增殖、凋亡、侵袭、转移等过程中起着重要的作用^[4]。microRNA-20b (miR-20b) 属于 miRNA-17 大家族中 miRNA 106a-363 cluster 亚家族成员^[5],miR-20b 被报道参与调节骨肉瘤^[6]、膀胱癌^[7]、乳腺癌^[8]、食管癌^[9]、胃癌^[10]的增殖、自噬、迁移和侵袭等肿瘤生物学过程。然而,miR-20b 对卵巢癌的增殖和凋亡的影响,目前尚未见报道,本研究在体外研究 miR-20 对卵巢癌增殖和凋亡的影响,并揭示其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料及设备

卵巢癌细胞系 A431、SKOV3 及正常卵巢上皮细胞系 Hose (美国 ATCC 公司),DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司),Trizol(美国 Invitrogen 公司),Western blot 所用一抗(美国 BD 公司),HRP 标记的二抗(美国 Invitrogen 公司),miR-20b mimics 及 scramble 均由广州锐博公司合成。Lipofectamine 2000 reagent (美国 Invitrogen 公司),ABI Prism 7700 系统的 SYBR Green Reagents (日本 TaKaRa 公司)。

1.2 细胞培养及转染

将卵巢癌细胞系 A431、SKOV3 及正常卵巢上皮细胞系 Hose 加入 DMEM 培养基,培养于 37℃、5%二氧化碳 CO₂ 培养箱中,培养 48 h 后消化传代。将卵巢癌 SKOV3 细胞系分成未转染对照组、阴性对照及 miR-20b 模拟物组,阴性对照组及 miR-20b 模拟物组采用 Lipofectamine 2000 reagent 分别转染 miR-20b scramble 和 miR-20b mimics,未转染对照组用 PBS 处理,作为空白对照,miR-20b 模拟物组转染序列:miR-20b mimics 正向引物:5'-CAAAGUCUCAUAGUGCAGGUAG-3',miR-20b mimics 反向引物:5'-ACCUGCACUAUGAGCACUUUGUU-3';阴

性对照组转染序列:miR-20b NC 正向引物:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',miR-20b NC 反向引物:5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。

1.3 RNA 提取及实时定量聚合酶链反应

用 All-in-One microRNA 抽提试剂盒和 All-in-One miRNA 实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测试剂盒提取和分离 miRNAs,ABI Prism 7700 系统的 SYBR Green Reagents qRT-PCR,在 ABI 7500 实时定量 PCR 仪中,以 U6 小核 RNA 作为内参,使用 2^{-ΔΔCt} 方法定量,量化 miR-20b 相对表达水平。

1.4 细胞增殖实验

采用 CCK-8 法,将 3 组细胞消化成单细胞悬液,在 96 孔板上以 2 × 10³ 个 / 孔接种,每孔培养基体积 200 μl。在分别培养 0、24、48、72、96 h 后,每孔加入 20 μl CCK-8 溶液,继续培养 1 h 后,用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔吸光值,以时间为横坐标,吸光值为纵坐标绘制卵巢癌细胞增殖曲线。

1.5 细胞凋亡实验

采用流式细胞术,用 Annexin V/PI 染色检测,将 3 组细胞消化成单细胞悬液后,PBS 清洗 2 次,并使用 Binding Buffer 重悬,加入相应比例的 Annexin V 抗体,避光染色 10 min 后加入适量 PBS 溶液以及 PI 染料,流式细胞仪检测 Annexin V 阳性细胞比例来确定细胞凋亡的变化。

1.6 Western blot

将阴性对照组和 miR-20b 模拟物组两组细胞用 RIPA 细胞裂解液冰上裂解 30 min 后,变性、上样,以每孔 30 μg 总蛋白上样,浓缩胶 80 V 电泳 40 min,分离胶 100 V 电泳 2 h。常规湿法转膜,加入 10 号染色体有缺失的磷酸酶(phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10,PTEN)、裂解型聚腺苷二磷酸核糖聚合酶[Poly(ADP-ribose)polymerase,PARP]一抗,浓度为 1 : 200,37℃ 孵育 4 h,二抗(1 : 500)孵育过夜,ECL 液显影,Quantity One 1-D 分析软件对蛋白质印迹条带进行定量。目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白测定值 / GAPDH,实验重复 3 次,取平均值。

1.7 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件分析数据,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,3 组间比较先行方差分析,在方差分析有意义的基础上,再行 LSD-*t* 或 SNK-*q* 检验进行两两比较,以 *P* < 0.05 为差异有统

计学意义。

2 结果

2.1 miR-20b 在卵巢癌细胞系中低表达

qRT-PCR 检测 miR-20b 在 A431 细胞系中相对表达量为(0.300 ± 0.050),在 SKOV3 细胞系中相对表达量为(0.100 ± 0.020),在正常卵巢上皮细胞系 Hse 中相对表达量为 1.000,提示 3 组间 miR-20b 的表达量经方差分析,差异有统计学意义($F = 155.814, P = 0.000$);A431 细胞系中 miR-20b 相对表达量与 Hse 细胞系比较,行 LSD-*t* 检验,差异有统计学意义 ($t = -0.700, P = 0.000$),A431 细胞系中 miR-20b 相对表达量低于正常卵巢上皮细胞系 Hse;SKOV3 细胞系中 miR-20b 相对表达量与 Hse 细胞系比较,行 LSD-*t* 检验,差异有统计学意义($t = -0.900, P = 0.000$),SKOV3 细胞系中 miR-20b 相对表达量低于正常卵巢上皮细胞系 Hse。见图 1。

2.2 miR-20b 过表达抑制 SKOV3 细胞增殖

转染 miR-20b 模拟物 24 h 后,qRT-PCR 示,miR-20b 模拟物组的 miR-20b 表达量是 (45 ± 2.800),阴性对照组为 1.000,未转染对照组为 1.000,3 组比较差异有统计学意义 ($F = 5.389, P = 0.000$);miR-20b 模拟物组与阴性对照组比较,差异有统计学意义($t = -0.872, P = 0.000$),miR-20b 模拟物组 miR-20b 相对表达量高于阴性对照组,提示转染成功。见图 2A。

转染后 0 h,miR-20b 模拟物组 OD 450 nm 值为 (0.330 ± 0.030),阴性对照组为(0.350 ± 0.040),未转染对照组为(0.390 ± 0.030),3 组 OD 450 nm 值差异无统计学意义($F = 2.471, P = 0.164$)。

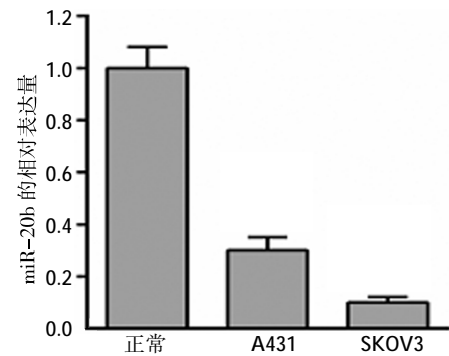
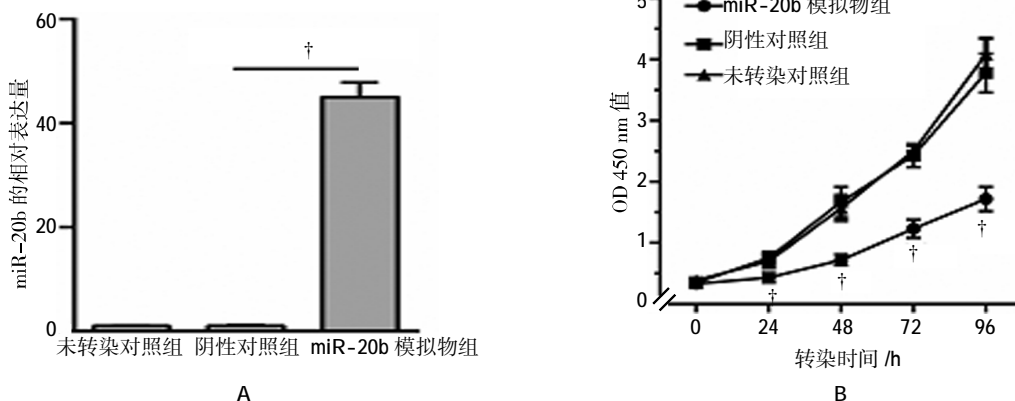


图 1 miR-20b 在卵巢癌及正常卵巢上皮细胞系中的表达

转染后 24 h,miR-20b 模拟物组 OD 450 nm 值为(0.430 ± 0.080),阴性对照组为(0.750 ± 0.100),未转染对照组为 (0.700 ± 0.100),3 组 OD 450 nm 值有统计学差异 ($F = 10.102, P = 0.012$);MiR-20b 模拟物组与阴性对照组比较,差异有统计学意义($t = -0.320, P = 0.000$),与未转染对照组比较,差异有统计学意义($t = -0.270, P = 0.000$)。

转染后 48 h,miR-20b 模拟物组 OD 450 nm 值为(0.720 ± 0.090),阴性对照组为(1.670 ± 0.250),未转染对照组为 (1.570 ± 0.200),3 组 OD 450 nm 值比较差异有统计学意义 ($F = 22.175, P = 0.001$);MiR-20b 模拟物组与阴性对照组比较,差异有统计学意义($t = -0.950, P = 0.000$),与未转染对照组比较,差异有统计学意义($t = -0.850, P = 0.000$)。

转染后 72 h,miR-20b 模拟物组 OD 450 nm 值为(1.230 ± 0.150),阴性对照组为(2.430 ± 0.190),未转染对照组为(2.5 ± 0.1),3 组 OD 450 nm 值比较差异有统计学意义($F = 66.862, P = 0.000$);MiR-20b 模拟物组与阴性对照组比较,差异有统计学意义($t = -1.200, P = 0.000$),与未转染对照组比较,差异有统计学意义($t = -1.270, P = 0.000$)。



A:3 组转染效率的测定;B:3 组增殖曲线的比较,† $P < 0.05$

图 2 miR-20b 过表达抑制 SKOV3 细胞增殖

转染后 96 h, miR-20b 模拟物组 OD 450 nm 值为(1.720 ± 0.200), 阴性对照组为(3.780 ± 0.320), 未转染对照组为(4.080 ± 0.270), 3 组 OD 450 nm 值比较差异有统计学意义($F=68.996, P=0.000$), miR-20b 模拟物组与阴性对照组比较, 差异有统计学意义($t=-2.060, P=0.000$); 与未转染对照组比较, 差异有统计学意义($t=-2.360, P=0.000$)。miR-20b 模拟物组在转染后 24、48、72 和 96 h OD450 nm 值低于阴性对照组和未转染对照组。见图 2B。

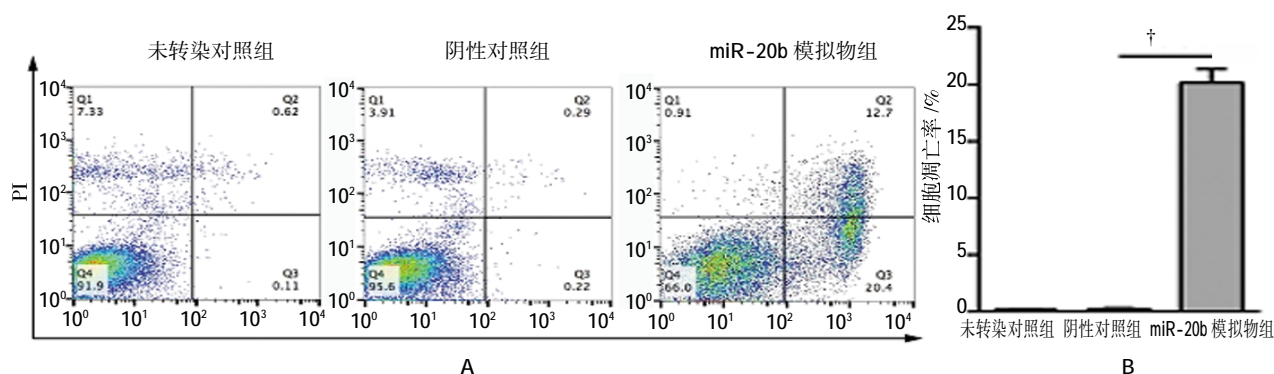
2.3 miR-20b 过表达促进细胞凋亡

流式细胞术测细胞凋亡率, 示 miR-20b 模拟物组的凋亡率为(20.150 ± 1.200)%, 阴性对照组为(4.000 ± 0.700)%, 未转染对照组为(2.800 ± 0.500)%, 3 组凋亡率比较差异有统计学意义($F=387.581, P=0.000$), miR-20b 模拟物组与阴性对照组比较, 差异

有统计学意义($t=16.150, P=0.000$), 与未转染对照组比较, 差异有统计学意义($t=17.350, P=0.000$), miR-20b 模拟物组凋亡率高于阴性对照组和未转染对照组。见图 3。

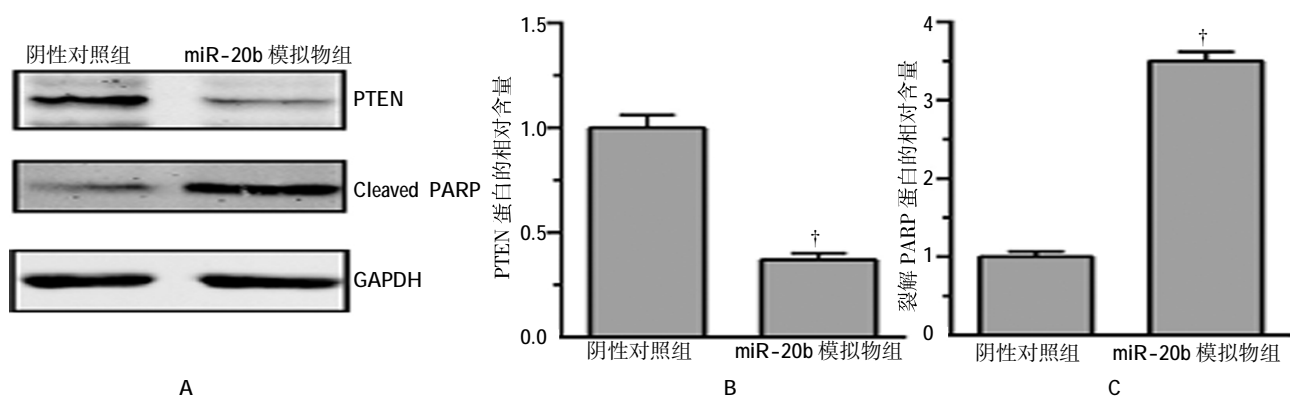
2.4 miR-20b 抑制增殖并促进凋亡的机制

Western blot 检测了 PTEN 蛋白和与凋亡发生相关的蛋白 Cleaved PARP, miR-20b 模拟物组 PTEN 蛋白相对表达量为(0.370 ± 0.030), 阴性对照组为 1.000, 差异有统计学意义($t=-36.370, P=0.000$), miR-20b 模拟物组 PTEN 蛋白相对表达量低于阴性对照组; miR-20b 模拟物组 Cleaved PARP 蛋白相对表达量为(3.500 ± 0.120), 阴性对照组为 1.000, 差异有统计学意义($t=36.080, P=0.000$), miR-20b 模拟物组 Cleaved PARP 蛋白相对表达量高于阴性对照组。见图 4。



A: 3 组流式细胞术比较; B: 3 组凋亡率比较, † $P<0.05$

图 3 miR-20b 过表达促进 SKOV3 细胞凋亡



A: miR-20b 模拟物组下调 PTEN、上调 PARP 表达; B: PTEN 蛋白的相对表达量比较; C: PARP 蛋白的相对表达量比较; † 与阴性对照组比较, $P<0.05$

图 4 miR-20b 下调 PTEN、上调 PARP 的表达

3 讨论

卵巢癌是起源于卵巢上皮的恶性肿瘤, 依据病理类型可分为卵巢肉瘤和浆液性卵巢癌, 96% ~ 99% 为浆液性卵巢癌, 先手术再化疗比单独手术或

者单独化疗效果更佳, 但卵巢癌预后仍较差, 据报道 IV 期卵巢癌 5 年生存率仅 20.3%^[11]。在肿瘤演进的过程中, 会涉及到一系列重要的分子或信号通路变异, 包括 EMT^[12]、miRNA^[13]、LncRNA^[14]、P21^[15]、P53^[16]等

分子。

miRNA 是含有茎环结构的 miRNA 前体,经过 Dicer 加工之后一类非编码的小 RNA 分子(18~25 个核苷酸),通过与靶基因的种子区序列相互配对抑制其基因的转录或翻译行使其功能,广泛存于真核生物体中^[7]。在肿瘤发生发展的过程中,多种 miRNA 发生表达异常,并广泛参与了增殖、凋亡、自噬、侵袭、转移等过程。比如:miR-124 被报道在结肠癌细胞系中下调表达,通过下调 ROCK1 蛋白表达,miR-124 抑制结肠癌细胞增殖、侵袭和转移^[8]。Wnt/b-catenin 信号通路激活 miR-30a-5p 并通过抑制 NCAM 表达促进胶质瘤细胞侵袭^[9]。miR-20b 在肿瘤中所起的作用不尽相同,在骨肉瘤组织和细胞系中,miR-20b 较正常骨组织和细胞系下调表达,miR-20b 可靶向调节 HIF-1a 的表达,上调 miR-20b 可抑制 HIF-1a 的表达,下调 VEGF 信号通路蛋白,抑制骨肉瘤细胞增殖和侵袭,是个抑癌基因^[6]。在膀胱癌中,miR-20b 在膀胱癌细胞系中低表达,过表达 miR-20b 抑制膀胱癌细胞系 EJ 的增殖,通过下调 cyclin D1,CDK2 和 CDK6 的表达,诱导 G₁ 细胞周期阻滞,并抑制膀胱癌细胞迁移和侵袭,起抑癌基因的作用^[7]。在甲状腺乳头状癌中,miR-20b 低表达,且与淋巴结转移和 TNM 分期相关,上调 miR-20b 表达通过抑制 MAPK/ERK 信号通路抑制甲状腺 K1 和 TPC-1 细胞系活动性和迁移侵袭能力,起抑癌基因的作用^[20]。与之相反,在乳腺癌中,miR-20b 在乳腺癌组织和细胞中上调表达,且 miR-20b 可与 PTEN 3'UTR 靶向结合,上调 miR-20b 可促进乳腺癌细胞增殖和克隆形成,起促癌基因的作用^[6]。miR-20b 在乳腺癌脑转移的病人中的表达水平较无脑转移的病人要高^[21],在胃癌中,miR-20b 在胃癌组织中高表达,且与淋巴结转移等恶性生物学特征相关,起促癌基因的作用^[6]。在食管癌中,miR-20b 高表达于食管癌组织和细胞,且通过靶向结合 PTEN 3'-UTR 而促进食管癌增殖、迁移和侵袭,为促癌基因^[6]。在肝癌中,miR20b 上调表达,且与肝癌预后差相关^[22]。

在本研究中,miR-20b 在卵巢癌细胞系 A431、SKOV3 的相对表达量较正常卵巢上皮细胞系降低,通过对 SKOV3 细胞系外源性转染 miR-20b mimics 后,发现 miR-20b 模拟物组的 miR-20b 相对表达量较未转染对照组和阴性对照组升高,表示转染成功;进一步采用 CCK-8 法测定 3 组细胞增殖能力,发现

miR-20b 模拟物组 OD450 nm 值低于对照组和未转染对照组,提示 miR-20b 可抑制 SKOV3 细胞增殖。对 miR-20b 模拟物组、未转染组和阴性对照组行流式细胞术测定凋亡,发现 miR-20b 组凋亡率高于未转染组和阴性对照组,表明 miR-20b 可诱导 SKOV3 细胞凋亡,表明在卵巢癌中,miR-20b 起抑癌基因的作用,这与骨肉瘤、膀胱癌、甲状腺癌中的结果一致,而与乳腺癌、胃癌、食管癌、肝癌中所起的作用相反。

PTEN 分子是被广泛研究的抑癌分子,其在多种肿瘤中缺乏表达^[23],其通过对磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸肌醇(PIP3)脱磷酸化负调控 PI3K/Akt 信号通路,最终参与调控细胞周期、增殖、凋亡、迁移和侵袭等肿瘤生物学过程^[24]。LI 等^[25]报道 miR-20b 可靶向调节 PTEN 表达,且 miR-20b 上调可抑制 PTEN 蛋白的表达,进而促进肝癌肿瘤发生。ZHU 等^[26]在结肠癌中也发现 miR-20b 可靶向下调 PTEN 的表达,在乳腺癌中,ZHOU 等^[6]通过荧光素酶实验发现 miR-20b 与 PTEN 靶向结合,并通过下调 PTEN 表达促进乳腺癌细胞系 ZR-75-30 和 MCF-7 增殖和克隆形成。在本研究中,miR-20b 模拟物组 PTEN 相对表达量较阴性对照组低,miR-20b 抑制增殖的机制可能与 miR-20b 下调 PTEN 表达有关。

细胞凋亡的通路主要包括内源性途径和外源性途径,外源性途径由肿瘤坏死因子受体 1、Fas/CD95、DR3 和 TRAIL-R1 等死亡受体介导,进而激活 caspase-3、8 诱导凋亡^[20];内源性途径,即线粒体途径,主要通过激活 caspase-3、8、9、PARP,并将 DNA 裂解为 180~200 bp 大小的片段,进而诱导细胞发生凋亡^[27],PARP 剪切被认为是细胞凋亡的一个重要指标,被认为是 Caspase 3 激活的指标。本研究发现 miR-20b 模拟物组裂解型 PARP 表达量高于阴性对照组,提示 miR-20b 诱导细胞凋亡的机制可能与 PARP 升高有关,为内源性通路所介导。

综上所述,本研究发现 miR-20b 在卵巢癌细胞系中低表达,且上调 miR-20b 的表达可抑制卵巢癌细胞增殖,并诱导凋亡,其机制可能与 PTEN 下调、PARP 上调有关,这更深入的阐明了卵巢的发病机制,可能成为卵巢癌治疗的新治疗靶点,值得进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA: a Cancer Journal for Clinicians, 2015, 65

- (2): 87-108.
- [2] DINKELSPIEL H E, CHAMPER M, HOU J, et al. Long-term mortality among women with epithelial ovarian cancer[J]. *Gynecologic Oncology*, 2015, 138(2): 421-428.
- [3] LEE R C, AMBROS V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Science*, 2001, 294(5543): 862-864.
- [4] KROL J, LOEDIGE I, FILIPOWICZ W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(9): 597-610.
- [5] TANZER, A, STADLER, P. F. Molecular evolution of a microRNA cluster[J]. *J. Mol. Biol.*, 339(2): 327-335.
- [6] LIU M, WANG D, LI N. MicroRNA-20b Downregulates HIF-1 α and inhibits the proliferation and invasion of osteosarcoma cells[J]. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 2016, 23(5): 257-266.
- [7] PARK S L, CHO T M, WON S Y, et al. MicroRNA-20b inhibits the proliferation, migration and invasion of bladder cancer EJ cells via the targeting of cell cycle regulation and Sp-1-mediated MMP-2 expression [J]. *Oncology Reports*, 2015, 34 (3): 1605-1612.
- [8] ZHOU W, SHI G, ZHANG Q, et al. MicroRNA-20b promotes cell growth of breast cancer cells partly via targeting phosphatase and tensin homologue(PTEN)[J]. *Cell & Bioscience*, 2014, 4(1): 1.
- [9] WANG B, YANG J, XIAO B. MicroRNA-20b(miR-20b) Promotes the proliferation, migration, invasion, and tumorigenicity in esophageal cancer cells via the regulation of phosphatase and tensin homologue expression[J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0164105.
- [10] XUE T, LI-DE TAO M Z, XU G, et al. miR-20b overexpression is predictive of poor prognosis in gastric cancer [J]. *Oncotargets and Therapy*, 2015, 8: 1871.
- [11] GEORGE E M, HERZOG T J, NEUGUT A I, et al. Carcinosarcoma of the ovary: natural history, patterns of treatment, and outcome[J]. *Gynecol Oncol*, 2013, 131(1): 42-44.
- [12] 刘芃芃, 陈永孜, 任秀宝, 等. 肝细胞肝癌 NTS 的表达与炎症微环境形成和肿瘤上皮间质转化及预后的相关性研究 [J]. *中国肿瘤临床*, 2013, 40(19): 1150-1154.
- [13] 宋世铎, 周健, 何宋兵, 等. miRNA-375 对胰腺癌细胞 Panc-1 增殖和凋亡的影响[J]. *中国肿瘤临床*, 2013, 40(1): 21-24.
- [14] 徐天蔚, 王朝霞. 长链非编码 RNA 与胃癌诊断预后及耐药性研究进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2015, 42(1): 71-76.
- [15] 王飞, 李建国, 吴巧斌, 等. P21 活化激酶 6 在结肠癌组织中的表达及其意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(28): 7-11.
- [16] 郝玉琴, 康春义, 张鑫, 等. 人 A431 皮肤鳞状细胞癌中丝裂原活化蛋白激酶 / 细胞外信号调节激酶信号通路对 P53 的调节作用[J]. *中国现代医学杂志*, 2016, 26(1): 24-29.
- [17] IAVELLO A, FRECH V S L, GAI C, et al. Role of Alix in miRNA packaging during extracellular vesicle biogenesis [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(4): 958-966.
- [18] ZHOU L, XU Z, REN X, et al. MicroRNA-124 (MiR-124) inhibits cell proliferation, metastasis and invasion in colorectal cancer by downregulating Rho-associated protein kinase 1 (ROCK1)[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2016, 38 (5): 1785-1795.
- [19] WANG Z, DAI X, CHEN Y, et al. MiR-30a-5p is induced by Wnt/ β -catenin pathway and promotes glioma cell invasion by repressing NCAM [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 465(3): 374-380.
- [20] HONG S, YU S, LI J, et al. MiR-20b displays tumor-suppressor functions in papillary thyroid carcinoma by regulating the MAPK/ERK signaling pathway [J]. *Thyroid*, 2016, 26 (12): 1733-1743.
- [21] AHMAD A, GINNEBAUGH K R, SETHI S, et al. miR-20b is up-regulated in brain metastases from primary breast cancers[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(14): 12188.
- [22] XUE T, TAO L, ZHANG M, et al. Clinicopathological Significance of MicroRNA-20b expression in hepatocellular carcinoma and regulation of HIF-1 α and VEGF effect on cell biological behaviour[J]. *Disease Markers*, 2015(3): 325176.
- [23] LI J, YEN C, LIAW D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer[J]. *Science*, 1997, 275: 1943-1947.
- [24] CHALHOUB N, BAKER S J. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer[J]. *Annual Review of Pathology*, 2009, 4: 127.
- [25] LI D, ILNYTSKY Y, KOVALCHUK A, et al. Crucial role for early growth response-1 in the transcriptional regulation of miR-20b in breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2013, 4(9): 1373-1387.
- [26] ZHU J, CHEN L, ZOU L, et al. MiR-20b,-21, and-130b inhibit PTEN expression resulting in B7-H1 over-expression in advanced colorectal cancer[J]. *Human Immunology*, 2014, 75(4): 348-353.
- [27] TAIT S W G, GREEN D R. Mitochondrial regulation of cell death [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013, 5 (9): a008706.
- [28] MCILWAIN D R, BERGER T, MAK T W. Caspase functions in cell death and disease[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013, 5(4): a008656.

(张蕾 编辑)