

• 论 著 •

miR-224 靶向抑制 ECRG4 表达对非小细胞肺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响

张 辉¹, 赵寅生¹, 吴晓燕²

(1. 青海省心脑血管病专科医院胸外科, 青海西宁 810012; 2. 青海省交通医院病理科, 青海西宁 810008)

摘要:目的 研究微小 RNA-224(miR-224)及其靶基因食管癌相关基因 4(ECRG4)在非小细胞肺癌(NSCLC)中的表达和对 A549 细胞增殖、迁移、侵袭的影响。方法 利用原位杂交、荧光定量 PCR、免疫组织化学和 Western blot 检测 NSCLC 临床标本和细胞系中 miR-224 和 ECRG4 的表达水平;通过 microRNA.org 网站预测 miR-224 与 ECRG4 的靶向关系,并行双荧光素酶报告基因实验和 Western blot 进行验证;分析抑制 miR-224 及联合抑制 ECRG4 对 A549 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。结果 NSCLC 癌组织中 miR-224 表达水平明显高于癌旁组织,ECRG4 mRNA 和 ECRG4 蛋白表达水平均明显低于癌旁组织,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与健康人肺支气管上皮细胞系 HBE 相比,NSCLC 细胞系 L78、A549、H460 中 miR-224 表达水平明显升高,ECRG4 mRNA 和 ECRG4 蛋白表达水平明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。经 microRNA.org 网站预测、双荧光素酶报告基因实验和 Western blot 证实,ECRG4 是 miR-224 的靶基因。抑制 miR-224 可抑制 A549 细胞增殖、迁移和侵袭($P < 0.05$),而联合抑制 ECRG4 则可逆转抑制 miR-224 对 A549 细胞的抑制作用($P < 0.05$)。结论 miR-224 可通过靶向 ECRG4 促进 NSCLC 细胞 A549 增殖、迁移和侵袭,提示 miR-224 和 ECRG4 可能成为诊断和治疗 NSCLC 的靶点。

关键词:微小 RNA-224; 食管癌相关基因 4; 非小细胞肺癌; 增殖; 迁移; 侵袭

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.17.018

中图法分类号:R734.2

文章编号:1673-4130(2020)17-2129-05

文献标识码:A

Effects of miR-224 targeted inhibition of ECRG4 expression on the proliferation, migration and invasion of human non-small cell lung cancer cells

ZHANG Hui¹, ZHAO Yinsheng¹, WU Xiaoyan²

(1. Department of Thoracic Surgery, Qinghai Province Cardiovascular and Cerebrovascular Disease Specialist Hospital, Xining, Qinghai 810012, China; 2. Department of Pathology, Qinghai Communications Hospital, Xining, Qinghai 810008, China)

Abstract: Objective To study the expression of microRNA-224 (miR-224) and its target gene esophageal cancer-related gene 4 (ECRG4) in non-small cell lung cancer (NSCLC), and their effects on the proliferation, migration and invasion of A549 cells. **Methods** Fluorescence in situ hybridization, fluorescence quantitative PCR, immunohistochemistry and Western blot were used to detect the expression levels of miR-224 and ECRG4 in clinical specimens and cell lines of NSCLC. MicroRNA.org was used to predict the targeted relationship between miR-224 and ECRG4, and double luciferase reporter gene experiment and Western blot were used for verification. The effects of miR-224 and ECRG4 on proliferation, migration and invasion of A549 cells were analyzed. **Results** The expression level of miR-224 in NSCLC cancer tissues was significantly higher than that in adjacent tissues, and the expression levels of ECRG4 mRNA and ECRG4 protein were significantly lower than those in adjacent tissues, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with healthy human lung bronchial epithelial cell line HBE, the expression levels of miR-224 in the NSCLC cell lines L78, A549 and H460 were significantly increased, and the expression levels of ECRG4 mRNA and ECRG4 protein were significantly reduced, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Predicted by the microRNA.org website, double luciferase reporter gene experiment and Western blot confirmed that ECRG4 was the target gene of miR-224. Inhibition of miR-224 inhibited proliferation, migration and invasion

作者简介:张辉,男,主治医师,主要从事胸廓畸形矫治及高海拔地区肺减容方面的临床研究。

本文引用格式:张辉,赵寅生,吴晓燕. miR-224 靶向抑制 ECRG4 表达对非小细胞肺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(17): 2129-2133.

of A549 cells ($P < 0.05$), and combined inhibition of ECRG4 could reverse the inhibitory effect of miR-224 on A549 cells ($P < 0.05$). **Conclusion** miR-224 can promote the proliferation, migration and invasion of NSCLC A549 cells by targeting ECRG4, suggesting that miR-224 and ECRG4 may be the targets for the diagnosis and treatment of NSCLC.

Key words: microRNA-224; esophageal cancer related gene 4; non-small cell lung cancer; proliferation; migration; invasion

非小细胞肺癌(NSCLC)占有所有肺癌的 80%^[1]。微小 RNA(miRNA)是一类非蛋白编码 RNA,可通过负调节信使 RNA 的稳定性或抑制其翻译来实现转录后对基因的表达调控^[2]。研究表明,miRNA 在细胞的生长、凋亡、分化和发育过程中起重要的作用^[3]。此外,miRNA 的表达谱被证实于肝癌、肺癌等多种肿瘤中具有原癌基因或抑癌基因的功能^[2]。据报道,miR-224 在乳腺癌、胆管癌和 NSCLC 中高表达^[4-6]。然而,miR-224 在 NSCLC 中的作用和分子机制仍未完全阐明。食管癌相关基因 4(ECRG4)位于染色体 2q12.2 处,最初被认为是食管癌中的抑癌基因^[7]。有研究表明,ECRG4 在其他多种肿瘤中也是候选的抑癌基因^[8]。最近研究表明,自噬基因 Beclin-1 可通过上调 ECRG4 通路,抑制 A549 肺癌细胞增殖,并促进其凋亡^[9-10]。然而,ECRG4 在 NSCLC 中的作用机制仍不明确。本研究通过探讨 miR-224、ECRG4 在 NSCLC 中的表达,以及 miR-224 靶向 ECRG4 对 NSCLC 细胞 A549 增殖、迁移和侵袭的影响,来进一步揭示 NSCLC 发生、发展的分子机制,以期临床诊断治疗提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2016 年 1 月至 2018 年 12 月于青海省心脑血管病专科医院行手术切除治疗的 NSCLC 患者癌组织和癌旁组织标本共 68 例,其中男 39 例,女 29 例;年龄 37~75 岁,平均(48.5±11.2)岁;高分化 28 例,中低分化 40 例;TNM 分期 I~II 期 25 例,III~IV 例 43 例。所有患者均经病理诊断证实为 NSCLC,且术前未接受任何放疗或化疗。本研究经青海省心脑血管病专科医院伦理委员会审核批准,所有研究对象或其家属均签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 Lipofectmine 2000 转染试剂(批号:11668019)购自美国 Invitrogen 公司;RNAiso plus(批号:9108)、PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser(批号:RR047A)、SYBR[®] Premix Ex TaqTM(批号:DRR081A)、TakaRa 点突变试剂盒(批号:R401)均购自大连 TaKaRa 公司;放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液(批号:C1053)、二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒(批号:P0009)均购自上海碧云天生物技术有限公司;Dual Luciferase[®] Reporter Assay System 试剂盒(批号:E1960)购自美国 Promega 公司;

anti-miR-NC、anti-miR-224、si-NC 和 si-ECRG4 均购自广州锐博生物技术有限公司;ECRG4(批号:ab224077)、GAPDH(批号:ab181602)抗体均购自美国 abcam 公司;5'和 3'-双地高辛标记的 MIRURY LNA microRNA Detection Probe 试剂盒(批号:10000-89999-15)购自 EXIQON 公司。健康人肺支气管上皮细胞系 HBE 和 NSCLC 细胞系 H460、A549、L78 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,于实验室的液氮罐中保存备用。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与转染 HBE、L78 用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养,A549 用含 10%胎牛血清的 F-12k 培养基培养,H460 用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养,并置于 37℃、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中。用 Lipofectmine 2000 分别将 miR-NC、miR-224、anti-miR-NC、anti-miR-224、anti-miR-224 联合 si-NC 及 anti-miR-224 联合 si-ECRG4 转入 A549 细胞中,分别记为 miR-NC 组、miR-224 组、anti-miR-NC 组、anti-miR-224 组、anti-miR-224+si-NC 组和 anti-miR-224+si-ECRG4 组,培养 48 h 后,提取 RNA 和蛋白进行后续研究。

1.3.2 荧光定量 PCR 检测 根据 RNAiso plus 说明书提取 NSCLC 癌组织、癌旁组织标本和细胞系总 RNA,采用 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒进行反转录,SYBR[®] Premix Ex TaqTM 试剂盒检测上述标本中 miR-224 和 ECRG4 的表达水平,分别以 U6 和 β -actin 作为内参。miR-224 正向引物为 5'-GAGCCAAGTCACTAGTGGT-3',反向引物为 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3';U6 正向引物为 5'-TGCGGGTGCTCGCTTCGGCAGC-3',反向引物为 5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGT-3';ECRG4 正向引物为 5'-CCGGTTCTCCCTCGCAGCAC-3',反向引物为 5'-CGCTTCTGGCGCTTCAGGCT-3'; β -actin 正向引物为 5'-GAACCCCAAGGC-CAACCGCGAGA-3',反向引物为 5'-TGACCCCGT-CACCGGAGTCCATC-3'。每个细胞系设置 3 个复孔,重复检测 3 次。

1.3.3 Western blot 检测 用 RIPA 裂解液提取 NSCLC 癌组织、癌旁组织标本和细胞系总蛋白,采用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白水平。采用 SDS-

PAGE 电泳分离蛋白标本,并转至 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶封闭 2 h,加入 ECRG4 和 GAPDH 抗体,置于摇床上 4 °C 孵育过夜,然后用辣根过氧化物酶偶联二抗室温孵育 2 h,ECL 发光液孵育条带并置于化学发光成像系统中进行曝光显影,ImageJ 软件分析相应蛋白的相对表达水平。每个细胞系设置 3 个复孔,重复检测 3 次。

1.3.4 原位杂交和免疫组织化学检测 采用 5'和 3'-双地高辛标记的 MIRURY LNA microRNA Detection Probe 试剂盒进行原位杂交分析。采用 VENTANA BenchMark XT 染色系统对切片中的 ECRG4 蛋白进行孵育显色。

1.3.5 双荧光素酶报告基因实验 采用 PCR 扩增 ECRG4 的 3'UTR,并将其克隆至 pmirGLO 报告质粒中构建 pmirGLO-ECRG4-Wt 重组质粒。采用 TakaRa 点突变试剂盒将 pmirGLO-ECRG4-Wt 中 miR-224 的结合位点进行突变,构建 pmirGLO-ECRG4-Mut 重组质粒。采用 Lipofectmine 2000 将 miR-NC 或 miR-224 分别与 pmirGLO-ECRG4-Wt 和 pmirGLO-ECRG4-Mut 共转至 A549 细胞中,48 h 后用 Dual Luciferase® Reporter Assay System 试剂盒检测各转染细胞荧光素酶活性。

1.3.6 细胞增殖检测 取对数生长期的各组细胞各 3 000 个接种于 96 孔板中,每组设置 3 个复孔,分别于 24、48、72 h 时每孔加入 20 μL 的 5 mg/mL 噻唑蓝溶液,孵育 4 h 后弃去废液,每孔加入 150 μL 二甲基亚砜,然后用酶标仪震荡 10 min 以溶解结晶,检测 490 nm 处各孔吸光度值。

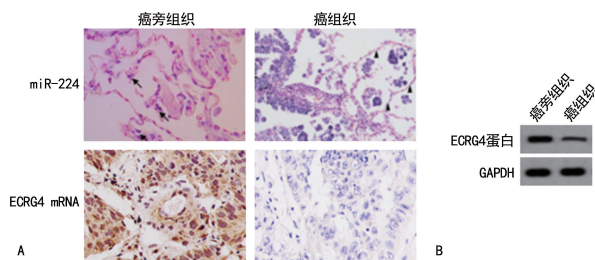
1.3.7 细胞迁移、侵袭检测 Transwell 小室分为两种,1 种有预铺基质胶用于检测细胞侵袭,1 种无预铺基质胶用于检测细胞迁移。取对数生长期的各组细胞,每组各取 200 μL 含 1×10⁵ 个细胞的细胞悬液加入 Transwell 小室上室中,下室中加入 600 μL 完全培养液,每组设置 3 个复孔。培养 48 h 后,经 0.1% 结晶紫染色后显微镜下观察并拍照,计数各组迁移、侵袭细胞数。

1.4 统计学处理 采用 SPSS21.0 软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NSCLC 癌组织及癌旁组织中 miR-224 和 ECRG4 的表达水平比较 与癌旁组织相比,癌组织中 miR-224 表达水平明显升高,差异有统计学意义 (*P* < 0.05),见图 1A、表 1。癌组织中 ECRG4 mRNA 和 ECRG4 蛋白表达水平明显低于癌旁组织,差异有

统计学意义 (*P* < 0.05),图 1A、1B、表 1。



注:A 为原位杂交和免疫组织化学分别检测 NSCLC 癌组织及癌旁组织中 miR-224 和 ECRG4 mRNA(200×);B 为 Western blot 检测 NSCLC 癌组织及癌旁组织中 ECRG4 蛋白。

图 1 NSCLC 癌组织及癌旁组织中 miR-224 和 ECRG4 的表达情况

表 1 NSCLC 癌组织和癌旁组织中 miR-224 和 ECRG4 的表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	miR-224	ECRG4 mRNA	ECRG4 蛋白
癌旁组织	68	1.01 ± 0.16	1.04 ± 0.15	0.98 ± 0.21
癌组织	68	3.21 ± 1.47	0.39 ± 0.13	0.41 ± 0.16
<i>t</i>		12.35	27.32	17.77
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 miR-224 和 ECRG4 在各细胞系中的表达水平比较 与健康人肺支气管上皮细胞系 HBE 相比,NSCLC 细胞系 L78、A549、H460 中 miR-224 表达水平明显升高,ECRG4 mRNA 和 ECRG4 蛋白表达水平明显降低,差异有统计学意义 (*P* < 0.05),见图 2、表 2。

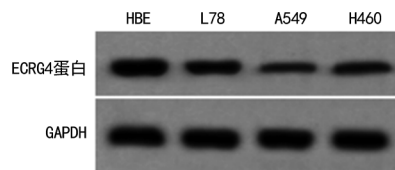


图 2 Western blot 检测细胞系 HBE、L78、A549、H460 中 ECRG4 蛋白

表 2 细胞系 HBE、L78、A549、H460 中 miR-224 和 ECRG4 的表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	miR-224	ECRG4 mRNA	ECRG4 蛋白
HBE	9	1.02 ± 0.08	1.01 ± 0.09	1.00 ± 0.11
L78	9	2.21 ± 0.22*	0.48 ± 0.05*	0.56 ± 0.06*
A549	9	3.14 ± 0.32*	0.39 ± 0.04*	0.27 ± 0.03*
H460	9	2.28 ± 0.23*	0.42 ± 0.04*	0.44 ± 0.05*
<i>F</i>		130.05	223.04	183.38
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

注:与 HBE 比较,* *P* < 0.05。

2.3 ECRG4 是 miR-224 的靶基因 利用 microRNA.org 网站预测发现,ECRG4 可能是 miR-224 的潜在靶基因,见图 3。与 miR-NC 组 A549 细胞中 miR-

224 的表达水平(1.00±0.08)比较,miR-224 组 A549 细胞中 miR-224 的表达水平(4.15±0.46)明显升高,差异有统计学意义($t=11.69, P<0.05$)。miR-224 和 pmirGLO-ECRG4-Wt 共同转染的 A549 细胞中 ECRG4-Wt 荧光素酶活性(0.42±0.05)低于 miR-NC 和 pmirGLO-ECRG4-Wt 共同转染的 A549 细胞(1.00±0.11),差异有统计学意义($t=8.31, P<0.05$);而 miR-224 和 pmirGLO-ECRG4-Mut 共同转染的 A549 细胞中 ECRG4-Mut 荧光素酶活性(1.03±0.09)与 miR-NC 和 pmirGLO-ECRG4-Mut 共同转染的 A549 细胞(0.96±0.10)比较,差异无统计学意义($t=0.90, P>0.05$)。

2.4 抑制 miR-224 可上调 A549 细胞中 ECRG4 蛋白表达 与 anti-miR-NC 组 A549 细胞中 ECRG4 蛋白表达水平(0.35±0.04)比较,anti-miR-224 组 A549 细胞中 ECRG4 蛋白表达水平(0.96±0.09)明显增加,差异有统计学意义($t=10.73, P<0.05$)。anti-miR-224+si-ECRG4 组 A549 细胞中 ECRG4 蛋白表达水平(0.13±0.01)明显低于 anti-miR-224+si-NC 组(0.94±0.09),差异有统计学意义($t=15.49, P<0.05$),见图 4。

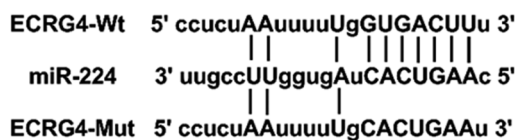


图 3 预测的 miR-224 与 ECRG4 3'UTR 结合位点

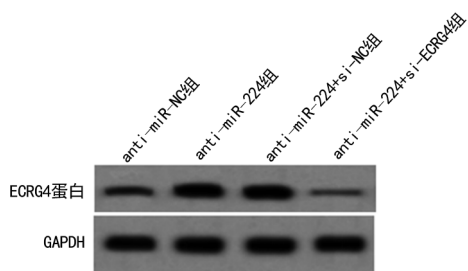


图 4 抑制 miR-224 及联合抑制 ECRG4 后 A549 细胞中 ECRG4 蛋白表达情况

2.5 抑制 miR-224 对 A549 细胞增殖的影响 48 h 和 72 h 时 anti-miR-224 组 A549 细胞吸光度值明显低于 anti-miR-NC 组,差异有统计学意义($P<0.05$);48 h 和 72 h 时 anti-miR-224+si-ECRG4 组 A549 细胞吸光度值明显高于 anti-miR-224+si-NC 组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

2.6 抑制 miR-224 对 A549 细胞迁移、侵袭的影响 anti-miR-224 组迁移、侵袭细胞数均明显低于 anti-miR-NC 组,差异有统计学意义($P<0.05$);anti-miR-224+si-ECRG4 组迁移、侵袭细胞数均明显高于 anti-miR-224+si-NC 组,差异有统计学意义($P<0.05$),

见表 4。

表 3 抑制 miR-224 及联合抑制 ECRG4 后 A549 细胞的吸光度值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	24 h	48 h	72 h
anti-miR-NC 组	3	0.21±0.02	0.37±0.04	0.65±0.07
anti-miR-224 组	3	0.22±0.02	0.26±0.03*	0.36±0.04*
anti-miR-224+si-NC 组	3	0.19±0.02	0.25±0.03	0.38±0.04
anti-miR-224+si-ECRG4 组	3	0.21±0.22	0.34±0.03 [#]	0.57±0.06 [#]
F		1.188	9.767	20.85
P		0.374	0.005	<0.001

注:与 anti-miR-NC 组比较,* $P<0.05$;与 anti-miR-224+si-NC 组比较,[#] $P<0.05$ 。

表 4 抑制 miR-224 及联合抑制 ECRG4 后 A549 细胞迁移和侵袭细胞数($\bar{x}\pm s$,个)

组别	n	迁移细胞数	侵袭细胞数
anti-miR-NC 组	3	129±18	106±15
anti-miR-224 组	3	55±10*	41±8*
anti-miR-224+si-NC 组	3	74±12	47±9
anti-miR-224+si-ECRG4 组	3	138±24 [#]	98±14 [#]
F		36.66	44.14
P		<0.001	<0.001

注:与 anti-miR-NC 组比较,* $P<0.05$;与 anti-miR-224+si-NC 组比较,[#] $P<0.05$ 。

3 讨论

肺癌是全球肿瘤相关死亡的主要原因^[11]。尽管近年来在手术和药物治疗方面取得了进展,但 NSCLC 患者的 5 年生存率仍然很低,其发病机制未完全阐明^[12]。因此,深入研究 NSCLC 进展的分子机制将有助于发现潜在的治疗靶标并优化现有的治疗方法。

近年来,越来越多的研究集中于 miRNA 在肿瘤中的异常表达。相关研究表明,miRNA 在大多数恶性肿瘤的发病机制中起重要作用,部分 miRNA 在肿瘤中作为原癌基因或抑癌基因发挥作用,并参与调控多种生物过程^[13]。干扰 miRNA 的功能被认为是肿瘤治疗的新策略。在 NSCLC 中,miR-326 可通过靶向细胞周期蛋白 D1 抑制肿瘤进展,miR-22 可通过靶向 ATP 柠檬酸裂解酶抑制骨肉瘤、前列腺癌、宫颈癌和肺癌的生长和转移^[14-15]。有研究发现,miR-224 可通过靶向抑制 SMAD4 和人肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 1 促进 NSCLC 细胞生长和侵袭^[11,16]。此外,miR-224 在结直肠癌、肝细胞癌和肾癌等多种肿瘤类型中表达上调^[17-19]。上述研究均表明,miR-224 是一个促癌 miRNA。本研究发现,miR-224 在 NSCLC 癌组织和细胞中高表达,抑制其表达可抑制 NSCLC 细胞增殖、迁移和侵袭,与 CUI 等^[11]和 ZHU 等^[16]的研究结果

一致。

ECRG4 是 NF- κ B 等主要生长因子信号通路的调节因子,可参与调控细胞周期进程、细胞迁移、衰老、祖细胞存活、分化及炎症等^[8]。大量研究发现,ECRG4 在包括乳腺癌在内的多种肿瘤中表达下调或缺失^[8,20]。有研究表明,低水平的 ECRG4 mRNA 可能与乳腺癌无病生存和远处转移的发生密切相关^[21]。1 项 Meta 分析表明,ECRG4 mRNA 表达水平是乳腺癌无病生存率和总生存率的影响因素^[22]。此外,在鼻咽癌中,ECRG4 通常因启动子过度甲基化而低表达,并且恢复其表达后可通过诱导自噬增强顺铂介导的细胞死亡^[8]。上述研究表明,ECRG4 可能作为一个抑癌基因在多种肿瘤中发挥作用。本研究发现,在 NSCLC 癌组织和细胞中 ECRG4 低表达,ECRG4 是 miR-224 的靶基因,联合抑制 ECRG4 可明显逆转抑制 miR-224 对 NSCLC 细胞 A549 细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用。

4 结 论

本研究证实,在 NSCLC 组织和细胞中 miR-224 高表达,ECRG4 低表达,miR-224 可通过靶向 ECRG4 来促进 NSCLC A549 细胞增殖、迁移和侵袭,进一步揭示了 NSCLC 发病的分子机制,可能为 NSCLC 的诊断和治疗提供新的靶点。

参 考 文 献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30.
- [2] WANG L, LIU W, ZHANG Y P, et al. The miR-224 promotes non-small cell lung cancer cell proliferation by directly targeting RASSF8[J]. Eur Rev for Med Pharmacol Sci, 2017, 21(14): 3223-3231.
- [3] 宋莹, 吕春梅, 王娇, 等. MicroRNA 与卵巢功能关系的研究进展[J]. 解剖科学进展, 2017, 23(6): 645-648.
- [4] 林文科, 吴吉芳, 郑志昂. 非小细胞肺癌患者血清 miR-141 及 miR-224 的表达及其临床意义[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(2): 46-50.
- [5] 王小磊, 刘小方. microRNA-224 在胆管癌患者中的表达及其临床病理学意义[J]. 亚洲肿瘤科病例研究, 2018, 7(2): 9-15.
- [6] LIU F, LIU Y, SHEN J, et al. MicroRNA-224 inhibits proliferation and migration of breast cancer cells by down-regulating fizzled 5 expression[J]. Oncotarget, 2016, 7(31): 49130-49142.
- [7] KUMAR A M, NAYAK R. Esophageal cancer-related gene 4 at the interface of injury, inflammation, infection, and malignancy[J]. Gastrointest Cancer, 2014, 84(4): 131-142.
- [8] 李赛, 阳学风, 胡甜, 等. 循环 microRNA-1268 在肺癌血浆中检测分析及临床意义[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2017, 14(2): 16-20.
- [9] 王文玉, 樊红琨, 李晓燕, 等. 自噬基因 Beclin-1 通过食管癌相关基因 4 通路抑制 A549 肺癌细胞增殖[J]. 中华实验外科杂志, 2016, 33(4): 1005-1007.
- [10] 高立伟, 兰守丽, 闫江涛, 等. 上调 miRNA-335 表达对肺癌细胞增殖、凋亡及对 survivin 表达的影响[J]. 癌症进展, 2018, 16(4): 425-427.
- [11] CUI R, MENG W, SUN H L, et al. MicroRNA-224 promotes tumor progression in nonsmall cell lung cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(31): 4288-4297.
- [12] 马丽梅, 吴勇, 郭香君. HIF-1 α 、TIMP-1 在非小细胞肺癌中的表达及意义[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2018, 15(5): 10-13.
- [13] 张自立, 王金亮, 孟祥朝. miRNA-183 家族在恶性肿瘤中作用的研究[J]. 天津医药, 2017, 45(12): 1337-1340.
- [14] SUN C, HUANG C, LI S, et al. Hsa-miR-326 targets CCND1 and inhibits non-small cell lung cancer development[J]. Oncotarget, 2016, 7(7): 8341-8359.
- [15] XIN M, QIAO Z, LI J, et al. miR-22 inhibits tumor growth and metastasis by targeting ATP citrate lyase: evidence in osteosarcoma, prostate cancer, cervical cancer and lung cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(28): 44252-44265.
- [16] ZHU D, CHEN H, YANG X, et al. Decreased microRNA-224 and its clinical significance in non-small cell lung cancer patients[J]. Diagn Pathol, 2014, 9(1): 1-8.
- [17] 罗海涛, 梁彩霞, 古伟光, 等. 肺癌组织中细胞角蛋白 7 和细胞角蛋白 20 的表达及其与预后的关系[J]. 肿瘤基础与临床, 2018, 31(5): 438-440.
- [18] 郭雷鸣. EGFR-TKI 联合放疗对晚期非小细胞肺癌 EGFR-TKI 治疗后新发骨转移的临床疗效[J]. 肿瘤基础与临床, 2017, 30(5): 403-406.
- [19] PAN Y, HU J, MA J, et al. MiR-193a-3p and miR-224 mediate renal cell carcinoma progression by targeting alpha-2,3-Sialyltransferase IV and the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway[J]. Mol Carcinog, 2018, 57(8): 1067-1077.
- [20] 王亚飞, 宋小天, 宋长亮, 等. 上调微小 RNA-200a 表达对非小细胞肺癌紫杉醇化疗敏感度的影响及其机制[J]. 癌症进展, 2018, 16(9): 1103-1107.
- [21] 田玲, 吴桂新, 余慧青. 非小细胞肺癌组织中 Oct4 的表达及其与临床病理参数的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(11): 1352-1355.
- [22] 霍红日, 杨智勇, 朱玲莉. miRNA-193a 在胰腺癌患者体内的表达水平及意义[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(13): 1773-1775.