

泌尿生殖器肿瘤

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.002425

miR-496 在卵巢浆液性癌中的表达及与 SIX1 的靶向关系研究

夏娜,蔡鸿宁,谭文福,高晗,李艳丽,吴绪峰

(湖北省妇幼保健院妇科,武汉 430070)

【摘要】目的:检测卵巢浆液性癌中微小 RNA-496(miRNA-496, miR-496)的表达,关注其表达意义及与同源异型蛋白 SIX1 (homologous heteroprotein SIX1, SIX1)的靶向关系。**方法:**选择 75 例卵巢浆液性癌作为观察组,选择 75 例卵巢浆液性囊腺瘤作为对照组,应用实时荧光定量 PCR 法检测 2 组中 miR-496 的表达,应用免疫组化法检测观察组中增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)和 B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, BAX)的表达,应用 Western blot 检测观察组中 SIX1 的表达。选择人卵巢浆液性癌细胞系 SKOV-3,设置空白对照组、miR-496 转染组、miR-496 和 SIX1 共转染组,采用双荧光素酶基因实验验证 miR-496 与靶基因 SIX1 的关系。**结果:**miR-496 在观察组的表达量明显低于对照组(1.52 ± 0.36 vs. 2.03 ± 0.25 , $t=7.56$, $P=0.001$), miR-496 的表达在不同肿瘤最大径(1.65 ± 0.36 vs. 1.42 ± 0.33 , $t=5.32$, $P=0.012$)、病理分级(1.64 ± 0.35 vs. 1.43 ± 0.40 , $t=5.11$, $P=0.010$)、有无脉管累犯(1.60 ± 0.44 vs. 1.35 ± 0.43 , $t=5.11$, $P=0.011$)、是否双侧发生(1.61 ± 0.36 vs. 1.40 ± 0.32 , $t=5.11$, $P=0.010$)、有无淋巴结转移(1.62 ± 0.42 vs. 1.35 ± 0.41 , $t=5.66$, $P=0.008$)和不同 TNM 分期(1.70 ± 0.37 vs. 1.42 ± 0.39 , $t=5.65$, $P=0.009$)的分组中有统计学差异。miR-496 与生存时间有关($\chi^2=4.13$, $P=0.010$), miR-496 与 PCNA($r=-0.54$, $P=0.0186$)、miR-496 与 SIX1($r=-0.58$, $P=0.0130$)均具有负相关性, miR-496 与 BAX($r=0.52$, $P=0.0110$)具有正相关性。双荧光素酶基因实验显示, miR-496 能引起转染 pGL3-SIX1-WT 的细胞系中荧光素酶活性明显降低。**结论:**卵巢浆液性癌中 miR-496 的表达下降,是促进肿瘤形成和进展的重要分子因素,检测 miR-496 对判断预后可能有一定价值。miR-496 可能通过负向调节靶基因 SIX1 调控肿瘤细胞的增殖和凋亡。

【关键词】卵巢;浆液性癌;miR-496;SIX1;增殖;凋亡;生存分析

【中图分类号】R737.31

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-08-18

Expression of miR-496 in ovarian serous carcinoma and its targeting correlation with SIX1

Xia Na, Cai Hongning, Tan Wenfu, Gao Han, Li Yanli, Wu Xufeng

(Department of Gynaecology, Hubei Maternity and Child Healthcare Hospital)

【Abstract】Objective: To detect the expression of microRNA-496(miR-496) in ovarian serous carcinoma, so as to observe its expression significance, and to analyze its correlation with homologous heteroprotein sine oculis homeobox homolog 1(SIX1). **Methods:** A total of 75 patients with ovarian serous carcinoma were selected as the observation group, and another 75 patients with ovarian serous cystic adenoma were selected as the control group. Expression of miR-496 in two groups was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. Expression of proliferating cell nuclear antigen(PCNA) and Bcl-2 associated X protein(BAX) in the observation group was detected by immunohistochemical method. Expression of SIX1 in the observation group was detected by Western blot. Ovarian serous cystic adenoma cell lines were selected; blank control group, miR-496 transfection group, and miR-496 and SIX1 co-transfection group were set up. Relationship between miR-496 and target gene SIX1 was verified by applying double luciferase gene experiment. **Results:** Expression of miR-496 in the observation group was significantly lower than that in the control group(1.52 ± 0.36 vs. 2.03 ± 0.25 , $t=7.56$, $P=0.001$). The expression of miR-496 was statistically significant in different groups of tumor maximum diameter(1.65 ± 0.36 vs. 1.42 ± 0.33 , $t=5.32$, $P=0.012$), histological grade(1.64 ± 0.35 vs. 1.43 ± 0.40 , $t=5.11$, $P=0.010$), vascular involvement(1.60 ± 0.44 vs. 1.35 ± 0.43 , $t=5.11$, $P=0.011$), bilateral occurrence(1.61 ± 0.36 vs. 1.40 ± 0.32 , $t=5.11$, $P=0.010$), lymph node metastasis(1.62 ± 0.42 vs. 1.35 ± 0.41 , $t=5.66$, $P=0.008$) and different TNM stages(1.70 ± 0.37 vs. 1.42 ± 0.39 ,

作者介绍:夏娜, Email: 1301756637@qq.com,

研究方向:妇科肿瘤分子病理学。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20200331.2124.012.html>

(2020-04-02)

$t=5.65, P=0.009$). Expression of miR-496 was related with survival time ($\chi^2=4.13, P=0.010$); it had negative correlation with PCNA ($r=-0.54, P=0.019$) and SIX1 ($r=-0.58, P=0.013$); it had positive correlation with BAX ($r=0.52, P=0.011$). Double luciferase gene experiment results showed that miR-496 was able to significantly reduce the luciferase activity in pGL3-SIX1-WT transfected cell lines. **Conclusion:** Expression of miR-496 in ovarian serous carcinoma is decreased, which is the molecular factor for accelerating tumors' formation and development. Detection of miR-496 has a certain significance for judging the prognosis. MiR-496 may regulate cell proliferation and apoptosis by negatively regulating the expression of SIX1.

[Key words] ovaries; serous carcinoma; miR-496; sine oculis homeobox homolog 1 (SIX1); proliferation; apoptosis; survival analysis

卵巢浆液性癌临床上多见,好发于中老年人^[1]。癌细胞具有高增殖活性,并伴有凋亡受抑制的特征,尤其是高级别浆液性癌^[2]。近年学者认识到DNA、微小RNA(miRNA)参与卵巢浆液性癌的发展^[3]。在实验前本课题组应用TCGA数据库进行基因筛选,并进行差异性分析,参考相关文献后选择尚未在卵巢浆液性腺癌中进行研究的微小RNA-496(mi-croRNA-496, miR-496)作为候选基因。应用miRNA基因预测网站miRwalk、miRtarbase预测到同源异型蛋白SIX1可能是miR-496调节的靶因子。基于此,本实验检测miR-496在卵巢浆液性癌术后组织和细胞系中的表达,分析miR-496与增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)和凋亡因子B细胞淋巴瘤-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, BAX)的关系,关注miR-496与靶因子SIX1的关系,以期研究肿瘤的形成和进展提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 样本量的估计

应用两样本均数比较的评估方法:即 $n_1=n_2=2[(u_\alpha+u_\beta)/\delta/\sigma]^2+1/4u_\alpha^2$, 依据实验数据及查阅文献,正常组织中表达的阳性率约10%,肿瘤组织中表达的阳性率约50%,两者的差值是40%,如果 $\sigma=60, \delta/\sigma=0.50, \alpha$ 取0.05, 计算 $n_1=n_2 \approx 75$ 例。

1.2 临床资料

收集2013年1月至2013年12月在湖北省妇幼保健院确诊为卵巢浆液性癌并行根治手术的患者75例作为观察组。纳入标准:①临床资料完整、随访相关资料齐全;②符合WHO中的病理诊断标准。排除标准:①合并其他器官的恶性肿瘤;②病理形态中伴有其他组织学特征;③术前行放、化疗。收集同期75例卵巢浆液性囊腺瘤的标本作为对照组。均留取术后新鲜组织(术后立即取材并于-80℃冰箱中冻存)和石蜡包埋组织。

1.3 细胞培养

人卵巢浆液性癌细胞系SKOV-3购自中国科学院细胞库。用10%的胎牛血清DMEM进行培养,接种于12孔板,将细胞密度调至 3×10^5 个/孔,设置空白对照组、miR-496转染组、miR-496和SIX1共转染组,采用Lipofectamine 2000试剂盒按说明书将序列转至细胞中,以备后续实验。相关试剂购自上海吉玛基因技术有限公司。

1.4 方法

1.4.1 实时荧光定量PCR法 留取术后新鲜冻存的组织,首先提取总RNA。miR-496引物上游:5'-AATCCGACT-GCGTACGCTG-3',下游:5'-TCACTGCGTGACCCGTCATCGTT-3'。选择U6作为内参,引物上游:5'-GGAACCAGAAAGATTAGC-3'下游:5'-TTGGAACGCACGAATTC-3'。引物由苏州睿赢生物技术有限公司合成。应用实时荧光定量PCR法检测组织中miR-496的表达,相关试剂购自美国ABI公司。严格按说明书进行操作。反应体系:95℃ 5 min,循环1次;95℃ 25 s,64℃ 20 s,72℃ 20 s,循环15次;93℃ 25 s,60℃ 35 s,72℃ 20 s,循环35次。于60℃收集信号。读取Ct值,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对水平。 $\Delta\Delta Ct=[Ct_{目的基因}(未知样品)-Ct_{GAPDH}(未知样品)]-[Ct_{目的基因}(校正样品)-Ct_{GAPDH}(校正样品)]$ 。

1.4.2 免疫组化法 标本及时应用福尔马林固定,由病理医生常规取材,固定,脱水,石蜡包埋,切片。应用免疫组化法检测肿瘤中PCNA和BAX的表达。试剂购自苏州睿赢生物技术有限公司。试剂为浓缩液,按不同比例稀释后行预实验,选择PCNA为1:150, BAX为1:250显色最理想的浓度用于正式实验。正式实验均为手工操作,严格按实验步骤进行, DAB显色,做好质控工作,减少人为误差。结果判定:PCNA的阳性部位是细胞核, BAX的阳性部位是细胞质,以染成黄色或棕黄色为阳性,选择肿瘤细胞分布的热点区共5个(400倍)进行计数,计算阳性率,取平均值。PCNA的阳性率也称为增殖指数。

1.4.3 Western blot 应用Western blot检测肿瘤中SIX1的表达。应用新鲜冻存标本,严格按说明书操作,步骤依次为蛋白提取、浓度测定、变性、加样、电泳、电转、免疫杂交后,取出膜加入超敏发光液,发光时间2 min。将膜取出放入X胶片盒曝光3 min,显影20 s。应用Image J软件分析,以目的蛋白

与 GAPDH 的灰度比值计为 SIX1 的相对表达量。

1.4.4 双荧光素酶基因实验 双荧光素酶基因实验检测 miR-496 对 SIX1 3'UTR 区的结合情况。构建 SIX1 的 3'UTR 基因序列和双荧光报告基因表达载体,将生长对数期的细胞接种到 96 孔板,培养 16 h 后,共转染荧光素酶报告基因质粒及 miR-496 模拟物(mimics),转染 6 h 后更换新的培养基,避光裂解细胞,检测荧光素酶表达,判断 miR-496 能否与 SIX1 的 3'UTR 结合。

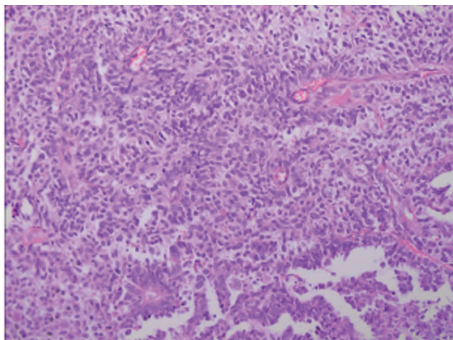
1.5 统计学处理

采用 SAS 6.12 软件进行统计学处理,率的比较应用卡方检验,定量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间比较行 *t* 检验,应用 Pearson 相关性检验及 K-M 生存分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 基线资料

75 例患者的年龄为 35~87 岁,平均年龄(64.8 ± 11.2)岁。其中高级别 42 例,低级别 33 例。有淋巴结转移 30 例,无淋巴结转移 45 例。双侧发生 32 例,单侧发生 43 例。TNM 分期 I 期 5 例,II 期 19 例,III 期 31 例,IV 期 20 例。病变形态如图 1 所示。



注:肿瘤细胞排列成腺样及乳头样,细胞异型性明显,细胞核深染

图 1 卵巢浆液性癌(HE 染色,200 ×)

2.2 2 组中 miR-496 表达的比较

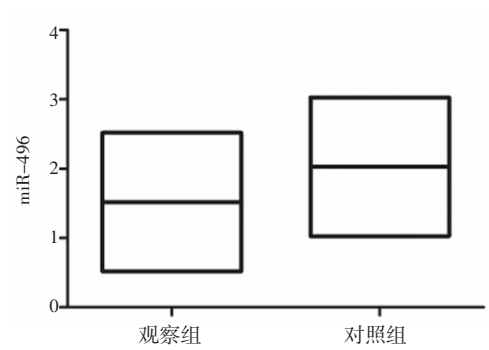
观察组中 miR-496 的表达明显低于对照组($P<0.05$),见表 1、图 2。

表 1 miR-496 在 2 组中表达的比较($\bar{x} \pm s$)

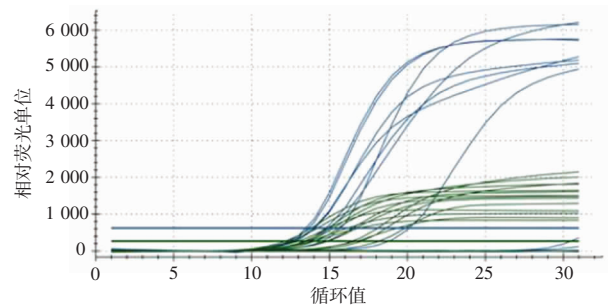
组别	miR-496	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
观察组 (<i>n</i> =75)	1.52 ± 0.36	7.56	0.001
对照组 (<i>n</i> =75)	2.03 ± 0.25		

2.3 观察组不同临床特征分组中 miR-496 表达的比较

观察组中 miR-496 的表达在不同肿瘤最大径、病理分级、有无脉管累犯、是否双侧发生、有无淋巴结转移和不同 TNM 分期的分组中差异有统计学意义($P<0.05$),而与年龄、间质炎细胞浸润程度无明显相关性($P>0.05$)(表 2)。



A. 2 组中 miR-496 的表达比较



B. miR-496 的表达

图 2 2 组中 miR-496 的表达

表 2 观察组不同临床特征分组中 miR-496 表达的比较($\bar{x} \pm s$)

临床特征	例数	miR-496	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
年龄/岁			0.99	0.560
<60	21	1.44 ± 0.34		
≥60	54	1.55 ± 0.34		
病理分级			5.73	0.007
低级别	33	1.64 ± 0.35		
高级别	42	1.43 ± 0.40		
双侧发生			5.11	0.010
否	43	1.61 ± 0.36		
是	32	1.40 ± 0.32		
TNM 分期			5.65	0.009
I~II 期	24	1.70 ± 0.37		
III~IV 期	51	1.42 ± 0.39		
最大径/cm			5.32	0.012
<6	35	1.65 ± 0.36		
≥6	40	1.42 ± 0.33		
淋巴结转移			5.66	0.008
无	45	1.62 ± 0.42		
有	30	1.35 ± 0.41		
脉管累犯			5.11	0.011
无	53	1.60 ± 0.44		
有	22	1.35 ± 0.43		
间质炎细胞浸润程度/%			0.98	0.564
<25	41	1.46 ± 0.43		
≥25	34	1.56 ± 0.35		

2.4 miR-496 表达的生存分析

患者均进行 60 个月的随访。随访终点时存活 16 例,死亡 57 例,失访 2 例。生存时间为 4~60 个月,中位生存时间为 17 个月。生存分析显示 miR-496 的表达与生存时间有关 ($\chi^2=4.13, P=0.010$)(图 3)。

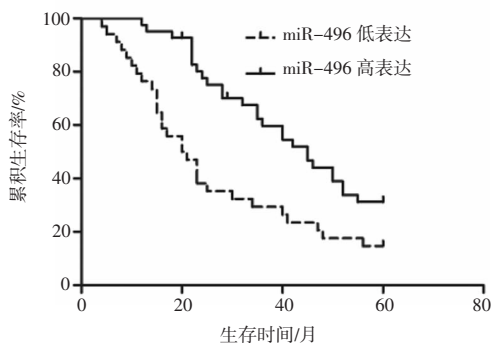
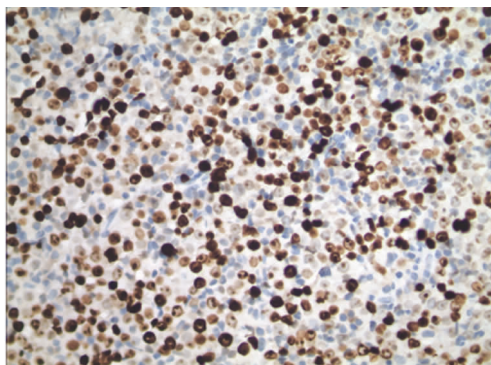


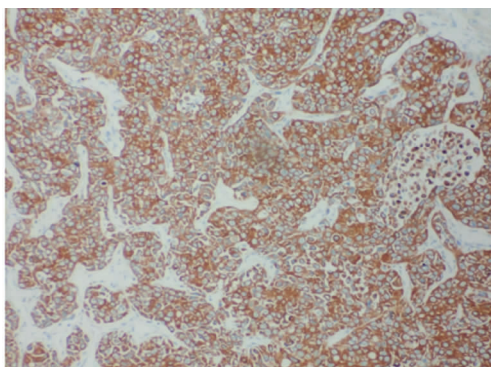
图 3 miR-496 生存分析图

2.5 miR-496 与 PCNA、BAX 的相关性

PCNA 增殖指数的表达范围为 10%~90%,平均为 40.7%。相关分析显示观察组中 miR-496 与 PCNA 标记的增殖指数 ($r=-0.54, P=0.019$) 呈负相关性。BAX 的阳性率表达范围为 8%~75%,平均为 30.9%。miR-496 与 BAX 的阳性率 ($r=0.52, P=0.011$) 呈正相关性(图 4、图 5)。



A. PCNA 的表达



B. BAX 的表达

图 4 免疫组化图 (IHC, 200 ×)

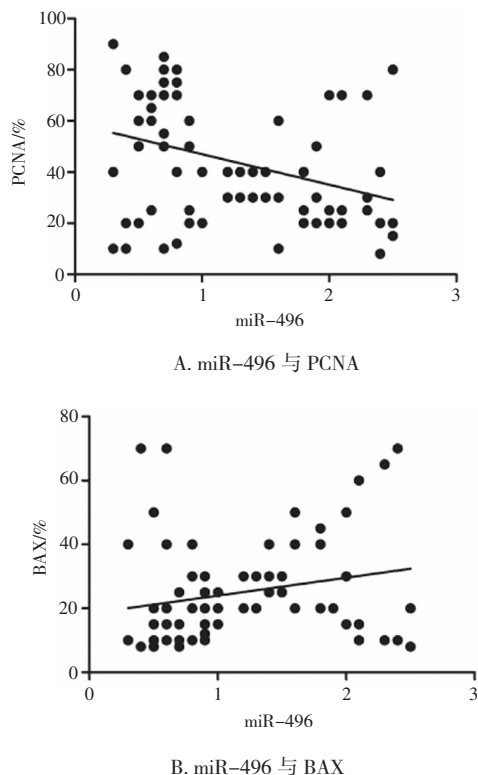


图 5 miR-496 与 PCNA 和 BAX 的相关分析图

2.6 miR-496 与 SIX1 的相关性

SIX1 的相对表达量是 0.6~3.1,平均为 2.0。相关分析显示 miR-496 与 SIX1 呈负相关性 ($r=-0.58, P=0.013$)(图 6、图 7)。

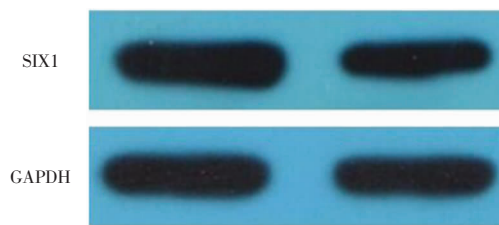


图 6 SIX1 的表达 (Western blot)

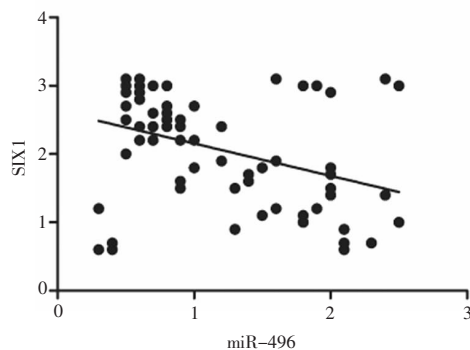
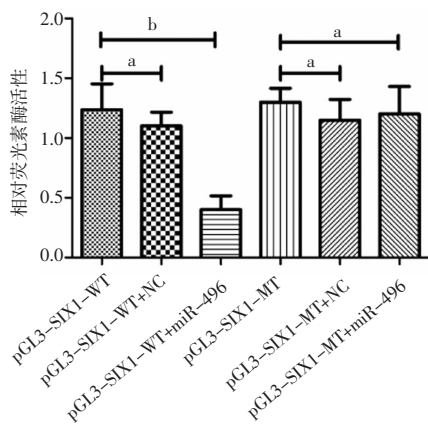


图 7 miR-496 与 SIX1 的相关分析图

2.7 SIX1 mRNA 的 3'UTR 是 miR-496 的靶点

生物信息学检索显示 SIX1 mRNA 的 3'UTR 中有 miR-496 结合位点。构建野生型 SIX1 mRNA 3'-UTR 序列的 pGL3-basic 质粒 (pGL3-SIX1-WT) 和 miR-496 结合位点缺失的突变型 SIX1 mRNA 3'-UTR 序列的质粒 (pGL3-SIX1-MT), 分别与空白对照组、miR-496 转染组的细胞培养 24 h, 检测荧光素酶水平。结果显示 miR-496 转染组能引起转染 pGL3-SIX1-WT 荧光素酶活性降低, 而 pGL3-SIX1-MT 的荧光素酶活性无明显影响, 提示 miR-496 可以与 SIX1 的 3'UTR 结合 (图 8)。

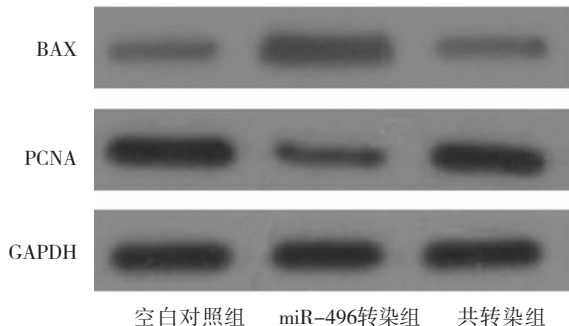


注:a,无统计学意义;b: $P<0.05$;共转染 miR-496 质粒和 pGL3-SIX1-WT 质粒、miR-496 位点缺失的突变型 SIX1 mRNA-3'-UTR 序列的 pGL3-SIX1-MT 后,miR-496 能抑制 pGL3-SIX1-WT 组细胞中荧光素酶的活性

图 8 不同组别荧光素酶活性的比较

2.8 miR-496 靶向 SIX1 调控细胞表达的验证

Western blot 结果显示,miR-496 转染组 PCNA 的表达下降,BAX 的表达升高,共转染组中 PCNA 和 BAX 的表达恢复正常,提示 miR-496 负性调节 SIX1 介导 PCNA 和 BAX 的表达 (图 9)。



注:miR-496 转染组中 PCNA 的表达明显低于空白对照组,共转染组中 PCNA 的表达明显高于 miR-496 转染组;miR-496 转染组中 BAX 的表达明显高于空白对照组,共转染组中 BAX 的表达明显低于 miR-496 转染组

图 9 不同组别 PCNA 和 BAX 的表达

3 讨论

卵巢浆液性肿瘤的发生与腺上皮异型增生和肿瘤性增殖有关,病变可进一步发展为癌。高级别的肿瘤恶性程度高^[3]。病理学上病变呈高增殖状态。基因表达的失调是浆液性癌的重要分子因素^[4]。越来越多的研究显示,miRNAs 的异常表达在肿瘤的形成中有重要的调节作用^[5]。

本研究结果显示,肿瘤中 miR-496 低表达,miR-496 与肿瘤最大径、有无脉管累犯、是否双侧发生、有无淋巴结转移有关,提示 miR-496 低表达参与肿瘤的形成、生长、侵袭、播散和转移。MiR-496 的表达与病理分级和 TNM 分期有关。由于以上因素均是临床判断肿瘤生物行为的重要指标,因此检测 miR-496 的表达对判断肿瘤的生物行为可能有重要价值。生存分析证实了 miR-496 的表达与生存时间的关系,即 miR-496 低表达患者的生存时间短。MiR-496 可能有助于病理分级。MiR-496 在人体组织中有不同程度的表达,而在肿瘤性病变中表达下调,因此 miR-496 可能具有抑癌基因的作用^[6]。研究显示,miR-496 的表达与 PCNA 增殖指数相关,提示 miR-496 低表达可以促进肿瘤细胞的增殖。PCNA 是表达于细胞核的抗体,被认为是 DNA 聚合酶的辅助因子,与 DNA 复制有关。在细胞分裂的 G₀ 期 PCNA 表达极低,在 G₁ 后期表达明显增加,到细胞增殖的 S 期达高峰。目前认为 PCNA 是标记增殖较特异的蛋白,能反映肿瘤的增殖状态及预后,也是临床中常用的重要指标^[7]。本实验检测到 miR-496 异常表达对增殖的作用确切,使细胞失控性增生的作用增强,引起肿瘤向周围组织生长,对局部组织和周围邻近器官形成破坏。BAX 是最理想的标记凋亡的因子。本实验发现,miR-496 与凋亡存在相关性,因此 miR-496 低表达时可能对肿瘤细胞凋亡有一定的抑制作用,使肿瘤细胞具有永生化的特点。Yao X 等^[8]也在脑损伤中发现 miR-496 异常表达可以通过 Bcl-2 途径调控细胞凋亡,与本研究结果具有一致性。

对 miR-496 下游靶因子进行筛选,发现 SIX1 是关联性最强的因子,因此本实验选择 SIX1 进行研究。结果显示,miR-496 与 SIX1 具有负向协同作用,通过双荧光素酶基因实验证实了 miR-496 与

SIX1 存在靶向负向调控的作用,因此 miR-496 通过调控下游靶因子 SIX1 发挥生物学作用。本实验在 miR-496 转染组显示 PCNA 的表达下调,BAX 表达上调,共转染的 miR-496 与 SIX1 细胞系能逆转上述表达,提示 miR-496 可以靶向负调控 SIX1 调节肿瘤细胞的增殖和凋亡。SIX1 在正常上皮中的表达较低,当细胞异型增生或肿瘤性病变时,表达明显升高。MiR-496 作为上游因子引起 SIX1 活化后启动多种细胞调节通路:①使 PCNA 上调,促进肿瘤细胞增殖^[9];②增强 TGF- β 信号通路的调节作用,诱导上皮细胞间质转化^[10];③激活血管内皮生长因子,调控肿瘤间质的脉管生成^[11];④调控 SIX1 对上皮细胞的黏附作用,引起细胞间连接的不稳定^[12],肿瘤细胞易于离开原发灶,定植于远隔器官;⑤对基质金属蛋白酶的相关蛋白进行调控,为肿瘤细胞的转移提供直接通路^[13-14]。MiR-496 作为上游信号,使保守的 SIX1 活化后引起肿瘤细胞的凋亡障碍,使细胞出现所谓的“永生性”特征^[15-18],但是其机制复杂,后期对 miR-496 的深入研究有重要意义。

综上所述,miR-496 在卵巢浆液性癌组织中表达下调,是肿瘤形成和进展的重要分子事件,检测 miR-496 的表达对判断肿瘤预后有一定价值。MiR-496 可能通过负向调节靶基因 SIX1 调控肿瘤细胞的增殖和凋亡。

参 考 文 献

- [1] Krishnapriya S, Sidhanth C, Manasa P, et al. Cancer stem cells contribute to angiogenesis and lymphangiogenesis in serous adenocarcinoma of the ovary[J]. *Angiogenesis*, 2019, 22(3): 441-455.
- [2] Hatano Y, Tamada M, Asano N, et al. High-grade serous ovarian carcinoma with mucinous differentiation; report of a rare and unique case suggesting transition from the “SET” feature of high-grade serous carcinoma to the “STEM” feature[J]. *Diagn Pathol*, 2019, 14(1): 4.
- [3] 朱彦贺, 祁晓莉, 王春艳, 等. 卵巢肿瘤 1332 例临床病理分析[J]. *诊断病理学杂志*, 2016, 23(1): 62-64.
- [4] Jia XN, Yin SD, Wei Y, et al. MiR-182-5p inhibited proliferation and migration of ovarian cancer cells by targeting BNIP3[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(8): 3270-3276.
- [5] Lu QC, Rui ZH, Guo ZL, et al. LncRNA-DANCR contributes to lung adenocarcinoma progression by sponging miR-496 to modulate mTOR expression[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(3): 1527-1537.
- [6] Qi NN, Tian S, Li X, et al. Up-regulation of microRNA-496 suppresses proliferation, invasion, migration and *in vivo* tumorigenicity of human osteosarcoma cells by targeting eIF4E[J]. *Biochimie*, 2019, 163: 1-11.
- [7] Abike F, Tapisiz OL, Zegeroglu S, et al. PCNA and Ki-67 in endometrial hyperplasias and evaluation of the potential of malignancy[J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2011, 32(1): 77-80.
- [8] Yao X, Yao R, Yi J, et al. Upregulation of miR-496 decreases cerebral ischemia/reperfusion injury by negatively regulating BCL2L14[J]. *Neurosci Lett*, 2019, 696: 197-205.
- [9] Behbakht K, Qamar L, Aldridge CS, et al. Six1 overexpression in ovarian carcinoma causes resistance to TRAIL-mediated apoptosis and is associated with poor survival[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(7): 3036-3042.
- [10] 马小斌, 宋雅璐, 陈洪志, 等. 乳腺癌患者血清中 Six1 的检测及临床意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2015, 23(17): 2450-2452.
- [11] Zhu Z, Rong Z, Luo Z, et al. Circular RNA circNHS1 promotes gastric cancer progression through the miR-1306-3p/SIX1/vimentin axis[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 126.
- [12] Ng KT, Lee TK, Cheng Q, et al. Suppression of tumorigenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma by shRNA interference targeting on homeoprotein Six1[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(4): 859-872.
- [13] Ng K, Man K, Sun CK, et al. Clinicopathological significance of homeoprotein Six1 in hepatocellular carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2006, 95(8): 1050-1055.
- [14] Zhang Y, Wang S, Liu Z, et al. Increased Six1 expression in macrophages promotes hepatocellular carcinoma growth and invasion by regulating MMP-9[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(7): 4523-4533.
- [15] Li YM, Li XJ, Yang HL, et al. MicroRNA-23b suppresses cervical cancer biological progression by directly targeting six1 and affecting epithelial-to-mesenchymal transition and AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(11): 4688-4697.
- [16] Hu J, Liu T, Zhang Z, et al. Oxidized low-density lipoprotein promotes vascular endothelial cell dysfunction by stimulating miR-496 expression and inhibiting the Hippo pathway effector YAP[J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(5): 528-538.
- [17] Wang L, Liu H. microRNA-188 is downregulated in oral squamous cell carcinoma and inhibits proliferation and invasion by targeting SIX1[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(3): 4105-4113.
- [18] Rubie C, Kolsch K, Halajda B, et al. microRNA-496: a new, potentially aging-relevant regulator of mTOR[J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(8): 1108-1116.

(责任编辑:张辉洁)