

基础研究

DOI: 10.11699/cyxb20130906

MicroRNA-494 通过下调 Survivin 诱导神经胶质瘤细胞凋亡

殷俊, 陈磊, 翟国锁, 朱少锋

(江苏省泰兴市中医院神经外科, 泰兴 225400)

【摘要】目的:观察 microRNA-494(miR-494)对人神经胶质瘤 SNB19 和 LN229 细胞中 Survivin 的表达调控及对细胞增殖和凋亡的影响。**方法:**收集 12 例神经胶质瘤及瘤旁组织,运用 qRT-PCR 技术检测 miR-494 在神经胶质瘤及瘤旁组织中的表达情况;应用 miR-494 mimic 转染人神经胶质瘤细胞系 SNB19 和 LN229,通过 qRT-PCR、Western blot、MTT 和流式细胞仪检测转染前后 Survivin mRNA 及蛋白的表达差异以及细胞增殖和细胞凋亡变化。**结果:**miR-494 在神经胶质瘤组织中的表达低于对应的瘤旁组织($t=13.78, P=0.000$);SNB19 和 LN229 细胞株中过表达 miR-494 明显下调 Survivin mRNA 及蛋白表达,并导致细胞增殖活力降低和细胞凋亡增加。**结论:**神经胶质瘤组织中 miR-494 表达下调,其可能通过下调 Survivin 表达而诱导神经胶质瘤 SNB19 和 LN229 细胞凋亡。

【关键词】microRNA-494;神经胶质瘤;凋亡;增殖;Survivin

【中国图书分类法分类号】R730.264

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-04-27

Apoptosis of glioma cells induced by microRNA-494 through
Survivin down-regulation

YIN Jun, CHEN Lei, ZHAI Guosuo, ZHU Shaofeng

(Department of Neurosurgery, Taixing Hospital of Traditional Chinese Medicine of Jiangsu Province)

【Abstract】Objective: To investigate the regulation of microRNA-494(miR-494) on Survivin expression and its effect on cell proliferation and apoptosis in human glioma cell lines SNB19 and LN229. **Methods:** Twelve samples of neuroglioma and tumor-adjacent tissues were collected and miR-494 expressions in the samples were detected by qRT-PCR. miR-494 mimic was transfected into SNB19 and LN229 cells. Cell viability and apoptosis were analyzed by MTT and flow cytometry. Survivin, a potential target of miR-494, was detected by qRT-PCR and Western blot. **Results:** Expressions of miR-494 in neuroglioma tissues were significantly downregulated compared with those of tumor-adjacent tissues($t=13.78, P=0.000$). Ectopic expression of miR-494 in SNB19 and LN229 cells obviously suppressed Survivin mRNA and protein expression as well as decreased cell viability and increased cell apoptosis($P<0.05$, respectively). **Conclusions:** Expression of miR-494 is downregulated in neuroglioma tissues and miR-494 may induce cell apoptosis in neuroglioma cell lines SNB19 and LN229 by downregulating Survivin expression.

【Key words】microRNA-494; glioma; apoptosis; proliferation; Survivin

恶性神经胶质瘤如多形性胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)是最常见和高侵袭性的脑原发性恶性肿瘤,尽管在过去的 20 年里手术、放疗和化疗取得了一定的进展,但 GBM 患者的预后仍没有明显的改善^[1]。microRNAs(miRNAs)是一类小的、进化的、保守的非编码 RNA 分子,最近的研究发现在许多种肿瘤中 miRNAs 表达失调,包括淋巴瘤、结直肠癌、肺癌、乳腺癌、甲状腺癌、肝癌和胶质母细胞瘤^[2-8]。研究证实 miR-494 在胃肠道间质瘤、

胆管上皮癌和前列腺癌中表达下调,并通过调控 KIT、CDK6 和 Survivin 等靶蛋白阻滞细胞周期进展以及抑制增殖和诱导凋亡^[9-11]。Survivin 是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)家族成员之一,由于其在肿瘤组织和肿瘤细胞系中高表达而备受关注。Survivin 在神经胶质瘤中也高表达^[12],其高表达与肿瘤恶性程度更高和预后更差相关^[13-15]。目前 miR-494 在神经胶质瘤中的表达情况及其功能研究尚不清楚,本实验通过检测 miR-494 在神经胶质瘤及对应瘤旁组织中的表达情况,并在神经胶质瘤细胞株中过表达 miR-494 从而研究其功能,初步

作者简介:殷俊, Email: yj_mn120@163.com,

研究方向:神经外科。

探讨 miR-494 在神经胶质瘤发生、发展中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

神经胶质瘤及对应瘤旁组织来源于本院手术切除标本,共 12 例,其中男 4 例,女 8 例,年龄 32~68 岁,平均年龄 (45 ± 12) 岁。其中星形胶质细胞瘤 7 例,GBM 3 例,间变型星形细胞瘤 1 例,少突胶质细胞瘤 1 例。所有组织标本经术后病理学证实,所有标本于术中离体 30 min 内取材,立即置入液氮中保存。

1.2 实验方法

1.2.1 qRT-PCR 检测 miR-494 在 12 例神经胶质瘤及瘤旁组织中的表达 引物:miR-494 引物(RT 引物:5-GTCGTA-TCCAGTGCAGGTCCTGAGGTATTCGCACTGGATACGACGA-GGTTTC-3;上游:5-GCGCGCGCTGAAACATAC-3;下游:5-GGGTCCGAGGTATTCGCACT-3)、Survivin 引物(上游:5-GC-ATGGGTGCCCCGACGTTG-3;下游:5-GCTCCGGCCAGAGG-CTCAA-3)、内参 U6 引物(RT 引物:5-AAAATATGGAACG-CTTCACGAATTTG-3;上游:CTCGCTTCGGCAGCACATATA-CT;下游:5-ACGCTTCACGAATTTGCGTGTC-3)以及 β -actin 内参引物(上游:5-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3;下游:5-GGGCAGCAAGGCTCATCATT-3)均购自广州市锐博生物科技有限公司。操作:按照 Trizol 试剂(Invitrogen,USA)说明书步骤提取收集组织中的总 RNA, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 在 1.8~2.0 之间的 RNA 标本进行逆转录。按照 MicroRNA 逆转录试剂盒(Ncode™ VILO™ mRNA cDNA Synthesis Kit,Invitrogen,USA)说明书操作,取 20 μl 逆转录体系,包括 1 μl 总 RNA、4 μl 5 $\times$ Reaction Mix 和 2 μl 10 $\times$ SuperScript Enzyme Mix,然后加入 DEPC 水补足至 20 μl ,混匀,离心。反应条件 37 $^{\circ}\text{C}$ 60 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,然后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。Real-time PCR 反应体系:依照 real-time PCR 试剂盒(EXPRESS SYBR GreenER™ mRNA qRT-PCR Kit,Invitrogen,USA)说明书,20 μl 反应体系包括:10 μl EXPRESS SYBR GreenER™ qPCR Super Mix,0.4 μl 10 $\mu\text{mol/L}$ miR-494 引物、内参 U6 引物、Survivin 引物和 β -actin 引物,0.4 μl 10 $\mu\text{mol/L}$ 通用 qPCR 引物,0.04 μl ROX,2 μl cDNA 和 7.16 μl DEPC 处理水,混匀,离心。每个样本均做 4 个复孔。反应条件 50 $^{\circ}\text{C}$ 预孵育 2 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 1 min,扩增 40 个循环。60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸时采集荧光信号,计算:反应结束后直接得到样本的域值循环数,每一标本均计算平均值,通过平均值计算相对含量。miR-494 的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算。高度保守的小 nRNA U6 作为内参^[6]。

1.2.2 SNB19 和 LN229 细胞培养 人神经胶质瘤细胞系 SNB19 和 LN229 购自于中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。细胞培养于含 100 ml/L 胎牛血清(四季青,浙江天杭生物科技有限公司)的 DMEM 培养基(HyClone,USA)中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、50 ml/L CO_2 细胞培养箱中,饱和湿度下培养。稳定传代 2、3 代后,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.3 miR-494 mimic 转染 SNB19 和 LN229 细胞 miR-494 mimic 及其阴性对照购自广州市锐博生物科技有限公司。实验分组:(1)miR-494 mimic 转染组,加入化学合成的 miR-494 mimic,脂质体和培养液;(2)阴性对照组,加入无义序列 miRNA mimic,脂质体和培养液。实验步骤:用无抗生素、含 10% FBS 的 DMEM 培养液将细胞接种于培养瓶中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养至细胞融合度 50%~70%;A 液:360 μl DMEM 培养液,加入终浓度 100 nmol/L miR-494 mimic 10 μl 匀混;B 液:22 μl DMEM 培养液,加入 8 μl Oligofectamine(Invitrogen,USA),轻混后室温放置 5~10 min。将上述 A 液和 B 液混合,室温放置 15~20 min,加入到细胞中,并补充无血清、无抗生素 DMEM 培养液至总体积 2 ml;37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 4 h 后,加入无抗生素、含 30% FBS 的 DMEM 培养基 1 ml,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 继续培养。

1.2.4 蛋白质提取及 Western blot 取转染 48 h 后的 SNB19 和 LN229 细胞,弃培养基,用 0.01 mol/L 的 PBS 冲洗 3 次后加入裂解缓冲液液(RIPA 200 μl +PI 8 μl +PMSF 4 μl)充分裂解,15 000 r/min 离心 10 min 后取上清,BCA 法测定总蛋白浓度。电泳前将蛋白样品按 3:1 比例加入 4 $\times$ 上样缓冲液,煮沸 5 min 后即用 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 125 V 电压湿转 1.5~2.0 h。5% 脱脂奶粉(TBST 溶解)室温封闭 10 min 后加入 1:2 500 稀释的鼠抗人 Survivin 单克隆抗体(sc-17779,Santa Cruz,USA),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 漂洗 5 min $\times$ 2 次后加入适当(1:5 000)浓度的二抗,室温孵育 1.5~2.0 h。TBST 漂洗 5 min $\times$ 3 次。暗室内浸入 ECL 液显色,并使胶片曝光,全自动 X 光洗片机洗片。运用 Quantity One(Bio-Rad,USA)软件分析条带灰度值,Survivin 蛋白相对表达量=目的条带灰度值/内参条带灰度值。每个独立实验重复 6 次。

1.2.5 MTT 检测 SNB19 和 LN229 细胞增殖活力 离心、收集 SNB19 和 LN229 细胞,用 DMEM 培养基重悬制成单细胞悬液。调节细胞密度约为 2×10^5 个/ml,以 200 μl /孔接种于 96 孔板。96 孔板的左上孔设为空白孔,只加培养基,不加 MTT(Roche,USA)及细胞,用于设备调零,每组设 6 个复孔。每孔加 5 mg/ml MTT 溶液 20 μl ,继续避光培养 4 h,弃上清,每孔加 DMSO 150 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育 20 min 至颗粒溶解。于酶标仪上测定各孔 570 nm 的吸光度(absorbance,A)值,计算各处理组细胞活性:细胞活性=miR-494 mimic 转染组 A 均值/阴性对照组 A 均值。

1.2.6 流式细胞仪检测 SNB19 和 LN229 细胞凋亡 Annexin-V-FLUOS 凋亡检测试剂盒购自美国 Roche 公司。SNB19 和 LN229 细胞转染 miR-494 mimic 36 h 后,用 PBS 洗涤细胞 1 次,再用胰酶消化液解离细胞,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清收集细胞。用 PBS 重新悬浮细胞,并计数。取 $(1\sim5) \times 10^5$ 个细胞悬液,1 500 r/min,5 min 离心后弃上清,加入 500 μl 的 1 $\times$ 结合缓冲液。加入 5 μl Annexin V-FITC,再加入 10 μl 碘化丙啶,移液器轻轻吹打混匀。在室温下,避光反应 5~15 min,在 1 h 内进行流式细胞仪检测。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。2 组间比较,采用两独立样本 t 检验,配

对资料采用配对 t 检验;具有重复测量性质的时点资料则行重复测量资料的方差分析和处理组内时点间的多重比较 (LSD- t 法), 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 神经胶质瘤及对应瘤旁组织中 miR-494 的表达

qRT-PCR 结果显示 miR-494 在神经胶质瘤组织中的表达水平低于对应的瘤旁组织 (6.05 ± 1.30 vs. 20.93 ± 3.86 , 差值为: 14.88 ± 3.74 , 经配对 t 检验: $t=13.78$, $P=0.000$, 图 1), 提示 miR-494 在神经胶质瘤中表达缺失或下调。

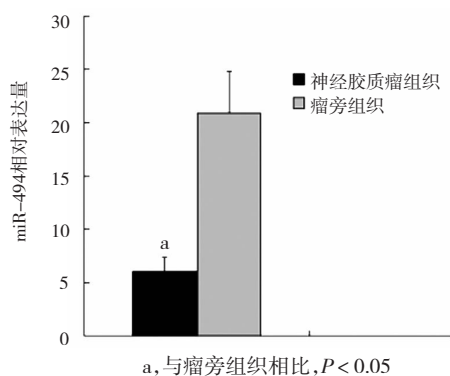


图 1 miR-494 在神经胶质瘤及对应瘤旁组织中的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Fig.1 Expression level of miR-494 in glioma and normal tumor-adjacent tissues ($\bar{x} \pm s, n=12$)

表 1 不同时间点 miR-494 转染组和 control 组 SNB19 和 LN229 细胞增殖率比较

Tab.1 Comparison of SNB19 and LN229 cell proliferation rate between miR-494 mimic group and control group in different checkpoints

SNB19细胞	例数(<i>n</i>)	0 h	24 h	48 h	72 h
阴性对照组	6	1.00	2.08 ± 0.15	3.23 ± 0.26	5.65 ± 0.19
miR-494 mimic 转染组	6	1.00	1.50 ± 0.14	2.00 ± 0.18	2.72 ± 0.31
两组比较 <i>t</i> , <i>P</i> 值			6.92, 0.000	9.53, 0.000	19.74, 0.000
两因素重复测量整体分析			miR-494 mimic 转染组 重复测量多重比较 (Ti-Tj, <i>p</i>)		
变异来源	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值	24 h	48 h	72 h
组别	656.808	0.000	0 h	-0.517, 0.000	-0.983, 0.000
时间	550.399	0.000	24 h	-0.467, 0.007	-1.200, 0.001
组别 × 时间	120.619	0.000	48 h		-0.733, 0.001
LN229细胞	<i>n</i>	0 h	24 h	48 h	72 h
control	6	1.00	2.12 ± 0.19	3.27 ± 0.35	5.85 ± 0.30
miR-494 mimic	6	1.00	1.53 ± 0.10	2.02 ± 0.21	2.77 ± 0.37
两组比较 <i>t</i> , <i>P</i> 值			6.73, 0.000	7.50, 0.000	15.84, 0.000
两因素重复测量整体分析			miR-494 mimic 转染组 重复测量多重比较 (Ti-Tj, <i>p</i>)		
变异来源	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值	24 h	48 h	72 h
组别	0.002	0.966	0 h	-1.917, 0.035	-1.983, 0.023
时间	16.957	0.000	24 h	-0.067, 0.715	-0.017, 0.899
组别 × 时间	0.004	0.969	48 h		0.050, 0.807

注 1: 单独进行 SNB19 和 LN229 细胞增殖率资料的组间比较, 成组 t 检验 (常规 t 检验); 0 h 时点值为基准参照值; 注 2: 再进行两因素重复测量资料方差分析, 其中 SNB19 细胞数据不符合球形性检验, 采用 Greenhouse-Geisser 法调整自由度, 调整系数为 0.616; LN229 细胞数据不符合球形性检验, 采用 Greenhouse-Geisser 法调整自由度, 调整系数为 0.386

2.2 miR-494 抑制 SNB19 和 LN229 细胞增殖

研究报道 miR-494 与细胞增殖和凋亡相关^[9-11], 为了验证 miR-494 与神经胶质瘤细胞增殖的相关性, 现对 miR-494 mimic 转染 SNB19 和 LN229 细胞, MTT 检测转染 24、48 h 和 72 h 后细胞增殖率变化资料进行比较, 见表 1。

首先对阴性对照组及 miR-494 mimic 转染组的 SNB19 细胞、LN229 细胞的增殖率变化资料进行组间比较, 即成组 t 检验, 见表 1 中标记各细胞名区域的上半部分。结果显示: miR-494 mimic 转染组的细胞增殖率较阴性对照组降低 ($P < 0.05$, 表 1, 图 2), 提示 miR-494 抑制神经胶质瘤细胞增殖。

再对 SNB19 细胞及 LN229 细胞的增殖率资料做整体两因素重复测量整体分析 (不同组别之独立影响因素, 不同时间点观测之重复测量影响因素) 及 miR-494 mimic 转染组组内的重复测量多重比较 (LSD- t 法), 结果见表 1 中标记各细胞名区域的下半部分。两因素重复测量整体分析结果显示: 组别因素差异有统计学意义, 佐证了前述成组 t 检验的结果; 时点因素差异有统计学意义, 提示各时点间比较有明显的差别。并且, 组别和时点的交互作用, 也有统计学意义, 结合数据看: 随着观测时间的增加, 细胞增殖率变化幅度, 2 组的差异愈来愈大。这就进一步验证了 miR-494 与神经胶质瘤细胞增殖有较强的相关性。

2.3 miR-494 诱导 SNB19 和 LN229 细胞凋亡率

为了进一步验证 miR-494 是否诱导胶质瘤细胞凋亡, SNB19 和 LN229 细胞转染 miR-494 mimic 36 h 后, 流式细胞仪检测发现 miR-494 mimic 转染组与阴性对照组相比, 细胞凋亡率均增加。如图 3 所示, 提示 miR-494 促进神经胶质

瘤细胞凋亡;LN229 细胞凋亡率分别是 8.23 ± 0.92 和 2.41 ± 0.35 (miR-494 mimic 转染组与阴性对照组),2 组比较 $t=14.48$, $P=0.000$;SNB19 细胞凋亡率分别是 9.05 ± 1.16 和 3.32 ± 0.42 (miR-494 mimic 转染组与阴性对照组),2 组比较 $t=11.38$, $P=0.000$ 。

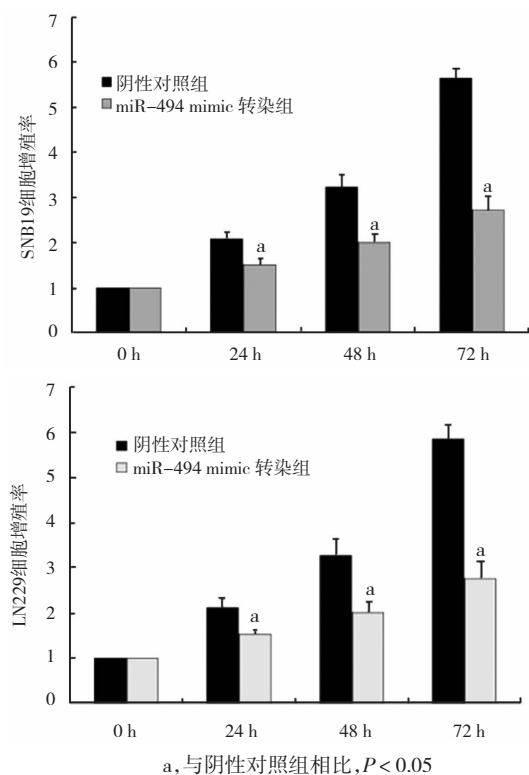


图2 miR-494 抑制 SNB19 和 LN229 细胞增殖活力 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.2 Suppress of SNB19 and LN229 cell proliferation by miR-494 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

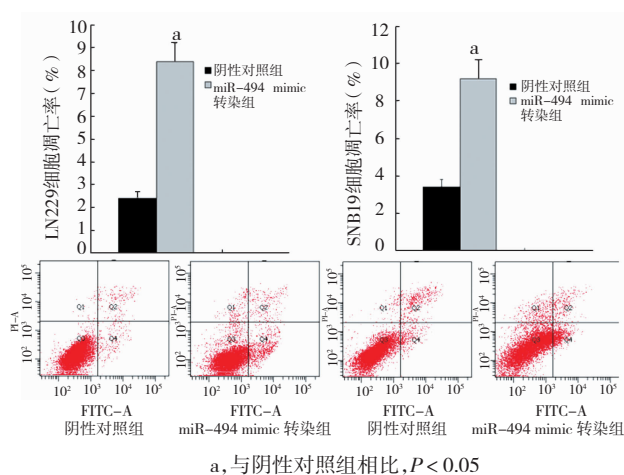


图3 miR-494 诱导 SNB19 和 LN229 细胞凋亡 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.3 SNB19 and LN229 cell apoptosis induced by miR-494 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.4 miR-494 下调 SNB19 和 LN229 细胞中 Survivin 表达

由于 Survivin 蛋白在神经胶质瘤形成和进展中发挥重要的功能^[12-15],为了初步探讨 miR-494 抑制肿瘤细胞增殖和

促进细胞凋亡的机制,qRT-PCR 及 Western blot 检测显示,与阴性对照组比较,人神经胶质瘤细胞系,SNB19 和 LN229 过表达 miR-494 后 Survivin mRNA 及蛋白的表达水平分别为 SNB19:1.00 和 0.36 ± 0.03 (阴性对照组和 miR-494 mimic 转染组);LN229:1.00 和 0.39 ± 0.04 (阴性对照组和 miR-494 mimic 转染组)(图 4)。

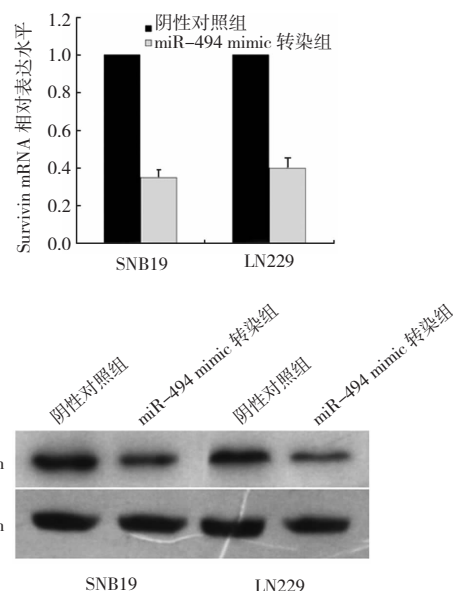


图4 miR-494 下调 SNB19 和 LN229 细胞中 Survivin mRNA 及蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.4 Down-regulation of Survivin mRNA and protein expression in SNB19 and LN229 cells by miR-494 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

GBM 患者的中位生存时间在过去的 20 年里没有明显的改善,仍然只有 12~15 个月,肿瘤的高侵袭特性、最佳切除术无法实施以及对放疗和化疗的抵抗导致其 5 年生存率 $<2\%$,这种不寻常的高病死率使得寻求新的以及更特异性的治疗方法成为研究热点^[17]。鉴于 miRNAs 在肿瘤中的功能,毫无疑问 miRNAs 在肿瘤形成和进展中发挥关键作用,一些特异的 miRNAs 已经被证实调控已知的癌基因或肿瘤抑制基因或者直接通过靶向调控其他基因发挥功能而被称为癌 miRs 或肿瘤抑制 miRs,其在多种肿瘤中参与细胞分化、增殖、侵袭、凋亡和血管发生^[18]。

miR-494 在胃肠道间质瘤中作为 KIT 的负向调控因子,抑制肿瘤细胞生长和刺激凋亡^[9]。在胆管上皮癌组织标本中 miR-494 下调,过表达 miR-494 通过调控涉及 G1~S 转换的多个靶点诱导肿瘤细胞生长迟缓^[10]。本研究发现 miR-494 在神经胶质瘤组

织中的表达低于对应的瘤旁组织,这与 miR-494 在其他恶性肿瘤中的表达趋势一致^[9-11]。为了探讨 miR-494 在神经胶质瘤中的功能,本研究在人神经胶质瘤细胞系 SNB19 和 LN229 中过表达 miR-494,MTT 和流式细胞仪检测发现过表达 miR-494 能抑制肿瘤细胞增殖并促进细胞凋亡。

一项大规模的比较人类肿瘤组织和正常组织中转录本差异的研究发现 Survivin 是肿瘤组织中表达最高的 4 个基因之一^[19]。Survivin 通过其杆状病毒 IAP 重复序列结合活化的 caspases 从而发挥抗凋亡功能,在神经胶质瘤细胞中沉默 Survivin 表达导致细胞凋亡和增殖受损,聚乙烯亚胺介导的外源性导入针对 Survivin 的 siRNA 被认为是一种治疗神经胶质瘤有希望的手段^[20]。Survivin 是 miR-494 的靶点之一,在前列腺癌中 miR-494 通过抑制 Survivin 诱导细胞凋亡^[11]。本研究应用 miR-494 mimic 转染人神经胶质瘤细胞系 SNB19 和 LN229,qRT-PCR 和 Western blot 发现 Survivin mRNA 及蛋白表达明显下调,提示在神经胶质瘤中 miR-494 也可以下调 Survivin 表达。

综上所述,本研究推测 miR-494 可能通过下调 Survivin 表达从而诱导神经胶质瘤细胞凋亡,但是 miRNAs 调控机制比较复杂,下游靶点往往不止 1 个,因此在神经胶质瘤中 miR-494 的功能及调控机制仍需进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Louis D N.Molecular pathology of malignant gliomas[J].Annu Rev Pathol,2006,1:97-117.
- [2] Ciafrè S A,Galardi S,Mangiola A,et al.Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma[J].Biochem Biophys Res Commun,2005,334(4):1351-1358.
- [3] He H,Jazdzewski K,Li W,et al.The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma[J].Proc Natl Acad Sci USA,2005,102(52):19075-19080.
- [4] Iorio M V,Ferracin M,Liu C G,et al.MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer[J].Cancer Res,2005,65(16):7065-7070.
- [5] Metzler M,Wilda M,Busch K,et al.High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma[J].Genes Chromosomes Cancer,2004,39(2):167-169.
- [6] Michael M Z,O'Connor S M,van Holst Pellekaan N G,et al.Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia[J].Mol Cancer Res,2003,1(12):882-891.
- [7] Murakami Y,Yasuda T,Saigo K,et al.Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues[J].Oncogene,2006,25(17):2537-2545.
- [8] Takamizawa J,Konishi H,Yanagisawa K,et al.Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival[J].Cancer Res,2004,64(11):3753-3756.
- [9] Kim W K,Park M,Kim Y K,et al.MicroRNA-494 downregulates KIT and inhibits gastrointestinal stromal tumor cell proliferation[J].Clin Cancer Res,2011,17(24):7584-7594.
- [10] Olaru A V,Ghiaur G,Yamanaka S,et al.MicroRNA down-regulated in human cholangiocarcinoma control cell cycle through multiple targets involved in the G1/S checkpoint[J].Hepatology,2011,54(6):2089-2098.
- [11] 王礼平,阳东荣,单玉喜,等.微小 RNA-494 通过抑制 Survivin 诱导前列腺癌 PC-3 细胞凋亡[J].中华实验外科杂志,2012,29(6):1043-1046.
- [12] Wang L P,Yang D R,Shan Y X,et al.Tiny RNA-494 induce apoptosis in prostate cancer PC-3 cells through the inhibition of Survivin gene[J].Chinese Journal of Experimental Surgery,2012,29(6):1043-1046.
- [12] Das A,Tan W L,Teo J,et al.Expression of survivin in primary glioblastomas[J].J Cancer Res Clin Oncol,2002,128(6):302-306.
- [13] Chakravarti A,Noll E,Black P M,et al.Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas[J].J Clin Oncol,2002,20(4):1063-1068.
- [14] Kajiwar Y,Yamasaki F,Hama S,et al.Expression of survivin in astrocytic tumors:correlation with malignant grade and prognosis[J].Cancer,2003,97(4):1077-1083.
- [15] Saito T,Arifin M T,Hama S,et al.Survivin subcellular localization in high-grade astrocytomas:simultaneous expression in both nucleus and cytoplasm is negative prognostic marker[J].J Neurooncol,2007,82(2):193-198.
- [16] 周海燕,王宽松,胡忠良,等.miR-193b 对胃癌细胞浸润和转移的影响[J].中国普通外科杂志,2011,20(4):377-382.
- [17] Zhou H Y,Wang K S,Hu Z L,et al.Effect of miR-193b on gastric cancer cell invasion and metastasis[J].Chinese Journal of General Surgery,2011,20(4):377-382.
- [17] Quick A,Patel D,Hadziahmetovic M,et al.Current therapeutic paradigms in glioblastoma[J].Rev Recent Clin Trials,2010,5(1):14-27.
- [18] Jia Z,Wang K,Wang G,et al.MiR-30a-5p antisense oligonucleotide suppresses glioma cell growth by targeting SEPT7[J].PLoS One,2013,8(1):e55008.
- [19] Velculescu V E,Madden S L,Zhang L,et al.Analysis of human transcriptomes[J].Nat Genet,1999,23(4):387-388.
- [20] Hendruschk S,Wiedemuth R,Aigner A,et al.RNA interference targeting survivin exerts antitumoral effects in vitro and in established glioma xenografts in vivo[J].Neuro Oncol,2011,13(10):1074-1089.

(责任编辑:冉明会)