

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.07.011

· 基础研究 ·

## 稳定过表达 miR-224 的胰腺黏液性囊腺癌 MCC1 细胞株的建立

彭小波<sup>1</sup>, 郭承涛<sup>1</sup>, 应明真<sup>1</sup>, 李洁<sup>1</sup>, 宋乐乐<sup>2</sup>, 吴燕君<sup>2</sup>, 詹丽杏<sup>2</sup>, 湛先保<sup>1</sup> (1. 第二军医大学 长海医院 肿瘤科, 上海 200433; 2. 中国科学院上海生命科学研究院 营养所, 上海 200031)

**[摘要]** **目的:** 构建 hsa-microRNA-224(miR-224) 过表达慢病毒载体, 建立稳定过表达 miR-224 的胰腺黏液性囊腺癌 MCC1 细胞株。**方法:** 设计 miR-224 前体过表达基因片段, 应用 qRT-PCR 法扩增目的基因片段, 通过基因重组技术将目的基因片段插入 GV369 慢病毒载体中, 进行 PCR 鉴定及 DNA 测序比对分析。用 GV369-miR-224 慢病毒感染胰腺黏液性囊腺癌 MCC1 细胞, 建立稳定过表达 miR-224 的 MCC1 细胞株。荧光显微镜下观察 GV369-NC 及 GV369-miR-224 慢病毒表达载体的转染效果, 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 MCC1、GV369-miR-224-MCC1 和 GV369-NC-MCC1 组细胞中 miR-224 的表达水平。**结果:** 成功构建 GV369-miR-224 慢病毒表达载体质粒。GV369-miR-224-MCC1、GV369-NC-MCC1 细胞在荧光显微镜下均发出绿色荧光。miR-224 表达水平在 GV369-miR-224-MCC1 细胞中显著高于阴性对照 GV369-NC-MCC1 细胞和空白对照 MCC1 细胞 ( $23.45 \pm 1.94$  vs  $2.11 \pm 0.38$ ,  $1.46 \pm 0.11$ , 均  $P < 0.01$ ), 而两组对照组之间 miR-224 表达水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。**结论:** 成功构建稳定过表达 miR-224 的胰腺黏液性囊腺癌 MCC1 细胞株, 为探讨 miR-224 在胰腺黏液性囊腺癌中的功能及发病机制提供新的细胞模型。

**[关键词]** miR-224; 慢病毒载体; 胰腺黏液性囊腺癌细胞株

**[中图分类号]** R735.9; R730 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)07-0721-05

## Establishment of pancreatic mucinous cystadenocarcinoma cell line MCC1 with stable overexpression of miR-224

PENG Xiaobo<sup>1</sup>, GUO Chengtao<sup>1</sup>, YING Mingzhen<sup>1</sup>, LI Jie<sup>1</sup>, SONG Lele<sup>2</sup>, WU Yanjun<sup>2</sup>, ZHAN Lixing<sup>2</sup>, ZHAN Xianbao<sup>1</sup> (1. Department of Oncology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai, 200433, China; 2. Institute for Nutritional Science, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, 200031, China)

**[Abstract]** **Objective:** To construct a hsa-microRNA-224(miR-224) lentiviral expression vector and to establish pancreatic mucinous cystadenocarcinoma MCC1 cell line with stable miR-224 over-expression. **Methods:** Pri-miR-224 gene fragment was designed and amplified by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), and then loaded into GV369 lentiviral vectors (GV369-miR-224) by gene recombination technology. GV369-miR-224 lentiviral expression vectors were then identified by PCR and DNA sequencing. The GV369-miR-224 vector fluid was then used to infect pancreatic mucinous cystadenocarcinoma MCC1 cell line to establish the MCC1 cell line stably over-expressing miR-224. The transfection efficiency of GV369-NC and GV369-miR-224 was observed under fluorescence microscopy; and the expression levels of miR-224 in MCC1, GV369-miR-224-MCC1 and GV369-NC-MCC1 cell lines were detected by RT-PCR. **Results:** The GV369-miR-224 lentiviral vectors were successfully constructed. GV369-miR-224-MCC1 and GV369-NC-MCC1 cells all emit green fluorescence under the fluorescence microscope. The expression level of miR-224 in GV369-miR-224-MCC1 cell group was significantly higher than that in negative control GV369-miR-224-MCC1 group and blank control MCC1 cell group ( $23.45 \pm 1.94$ ,  $1.46 \pm 0.1$  and  $2.11 \pm 0.38$ ,  $P < 0.01$ ), however, there was no significant difference between the two control groups ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** A pancreatic mucinous cystadenocarcinoma MCC1 cell line with stable miR-224 over-expression was successfully established, and this will provide a new cell model for exploring the function and pathogenesis of miR-224 in pancreatic mucinous cystadenocarcinoma.

**[Key words]** miR-224; lentiviral expression vector; pancreatic mucinous cystadenocarcinoma

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(7): 721-725. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.07.011]

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 81672892)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81672892)

**[作者简介]** 彭小波(1984-), 男, 博士生, 主要从事上消化道肿瘤基础及临床研究, E-mail: pxb023@126.com

**[通信作者]** 湛先保(ZHAN Xianbao, corresponding author), 主任医师, 博士生导师, 主要从事上消化道肿瘤精准、免疫及微创介入治疗的研究, E-mail: zhanxianbao@126.com

胰腺黏液性囊性肿瘤 (mucinous cystic neoplasms, MCN) 是一种较为罕见的肿瘤, 起源于胰腺导管上皮细胞<sup>[1-4]</sup>。伴随着影像学技术的发展, MCN 的诊断水平较过去有了明显的提高, 同时对它也有了更为全面和深刻的认识。MCN 有潜在恶性, 癌变机率很高, 尤其是病程较长、肿瘤较大者。长期随访证实, MCN 可恶变为癌, 即胰腺黏液性囊腺癌 (mucinous cystic carcinoma, MCC)。其诊治瓶颈在于恶变机制不明, 有学者认为 MCC 起源于胰腺的大导管上皮细胞, 亦有学者认为是由 MCN 发展而来。

MicroRNA(miRNA) 是大小约 20~22 nt 的内源性非编码单链小分子 RNA, 广泛存在于包含动植物在内的多种真核生物中, 通过结合特定靶基因 mRNA 的 3' 非编码区, 调控基因转录后的表达, 在翻译水平实现对靶基因表达的负调控, 并可以通过特定机制, 参与肿瘤的发生演进<sup>[5-8]</sup>。在恶性肿瘤发生发展中, miRNA 扮演着“癌基因”或“抑癌基因”的重要角色, miRNA 可能成为肿瘤治疗的新靶点<sup>[9-11]</sup>。

非编码 RNA, 尤其是 miRNA 的研究为胰腺恶性肿瘤的调控机制研究开辟了新的途径。本研究通过构建 miR-224 慢病毒表达载体, 建立稳定过表达 miR-224 的胰腺黏液性囊腺癌 MCC1 细胞株, 为研究 miR-224 在胰腺黏液性囊腺癌 MCC1 中的功能及发病机制提供新的细胞模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

人肾胚细胞系 HEK-293T 细胞购自 ATCC, 胰腺黏液性囊腺癌 MCC1 细胞株由意大利维罗纳大学 Claudio Sorio 教授馈赠。GV369 载体、E.Coli DH5 $\alpha$  购置于上海吉凯基因公司, RPMI 1640 和 DMEM 培养基购自 Hyclone 公司, 胎牛血清 (FBS) 购自 BI 公司, Trypin-EDTA 和 Penicillin-streptomycin 为 Gibco 公司产品, Puromycin 购自 Sigma 公司, TRIzol RNA 提取试剂购自 Invitrogen 公司, RT-PCR 试剂盒和 SYBR<sup>®</sup>Premix Taq 购自 TaKaRa 公司, 分子克隆用限制性内切酶购自 NEB 公司, 质粒小提制备试剂盒、去内毒素质粒大量制备试剂盒、PCR 产物纯化以及琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购自天根生物有限公司。

### 1.2 细胞培养

MCC1 细胞采用 RPMI 1640 培养液 (含 10% 胎牛血清), 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中传代培养, 实验用细胞均在其对数生长期。

### 1.3 慢病毒表达载体 GV369-miR-224 的构建与鉴定

通过 GV369 载体酶切位点及 Sanger miRNA 序

列数据库提供的 miR-224 前体及成熟体序列, 设计上游引物序列 (5'端加入 AgeI 酶切位点, 下划线标记): 5'-GAGGATCCCCGGGTACCGGCCAGCTAACCATGGGCCTGCCTC-3', 下游引物序列 (5'端加入 NheI 酶切位点, 下划线标记): 5'-CACACATTCCACAGGC-TAGAGGAGAAAGAAGACCTCTTTTC-3'。目的基因的预期长度为 320 bp, 将相关引物退火后形成二聚体, 再以人的基因组序列为模板进行扩增。PCR 扩增 miRNA 反应条件为: 98 °C 预变性 5 min; 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 8 min, 4 °C 保存。

琼脂糖凝胶电泳回收目的条带, 将过表达载体与目的片段连接后, 加入 DH5 $\alpha$  感受态细胞中进行转化。挑出若干个单菌落行菌液 PCR 鉴定, 上游鉴定引物: 5'-GGAAAGAATAGTAGACATAATAGC-3', 下游鉴定引物: 5'-GTAATACGGTTATCCACGCG-3'。反应条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 22 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。PCR 阳性克隆片段由上海吉凯基因化学技术有限公司进行测序, 并进行比对分析目的序列与测序结果。

### 1.4 包装慢病毒与测定滴度

酶切和测序鉴定正确的过表达载体菌液加至 5 ml LB 培养液中, 37 °C 过夜, 制备质粒, 转染 293T 细胞: 配备 DNA 溶液 (GV369 载体质粒 20  $\mu$ g、pHelper 1.0 载体质粒 15  $\mu$ g、pHelper2.0 载体质粒 10  $\mu$ g), 与转染试剂混合均匀, 在室温下温育 15 min; 混合液缓慢滴加至 293T 细胞培养液中, 混匀, 放入细胞培养箱中进行培养; 根据细胞状态, 收集转染后 48 h 的 293T 细胞上清液, 于 4 °C 4 000 $\times$ g 离心 10 min, 除去细胞碎片; 将带有病毒的上清液以 7 $\times$ 10<sup>5</sup> $\times$ g、4 °C 离心 2 h (离心半径 10 cm); 包装含有 miR-224 序列的慢病毒 GV369-miR-224 和含有空载体对照的慢病毒 GV369-NC。通过荧光法测定检测其病毒滴度, 根据荧光图片中 GFP 表达情况, 病毒滴度=荧光细胞数/病毒原液量 (TU/ml)。包装病毒液分装保存于 -80 °C 冰箱。

### 1.5 建立稳定过表达 miR-224 的胰腺黏液性囊腺癌 MCC1 细胞株

解冻包装病毒液, 用含基因转染增强剂聚凝胺的新鲜培养基按感染复数 (MOI) 值等于 10 稀释病毒原液, 吸弃原有的培养基, 对慢病毒感染实验进行分组: 处理组加入 GV369-miR-224 慢病毒液, 阴性对照组加入 GV369-NC 载体慢病毒。感染 72 h 后利用荧光显微镜观察各组 GFP 发光情况。将慢病毒感染过的细胞用 2  $\mu$ g/ml 嘌呤霉素作用 1 周, 筛选出抗嘌呤霉素的对应 GV369-miR-224 和 GV369-NC 载体细

胞。

### 1.6 qRT-PCR 检测各组 MCC1 细胞 miR-224 表达量

收集培养转染 miR-224 后的 MCC1 细胞、空载体 MCC1 细胞以及未转染的空白 MCC1 细胞, 根据 TRIzol 试剂盒说明书步骤提取细胞总 RNA, 然后进行逆转录及聚合酶链反应。采用 U6 作为内参照, 运用 ABI7900qRT-PCR 仪自带软件分析, 获得扩增产物 Ct 值, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 mRNA 的相对表达量 (relative quantity, RQ)。

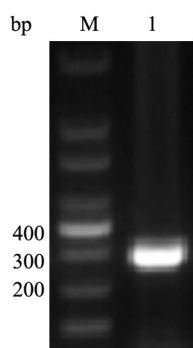
### 1.7 统计学处理

计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 GraphPad Prism 5.0 统计软件分析, 采用 *t* 检验对组间数据进行比较, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功构建 miR-224 慢病毒表达载体

PCR 扩增 miR-224 前体片段, 将反应产物进行凝胶电泳分析, 纯化后的 miR-224 与载体 GV369 进行酶切、连接, 构建 GV369-miR-224 重组质粒, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 并进行 PCR 鉴定, 载体大小与预期一致, 见图 1。



M: Marker; 1: GV369-miR-224

图 1 GV369-miR-224 重组质粒鉴定

Fig.1 Identification of GV369-miR-224 recombinant plasmid

### 2.2 miR-224 慢病毒表达载体鉴定

将初步鉴定阳性的菌落, 每个克隆挑选 2 个样品进行测序, 测序结果经过比对, 重组克隆中插入片段序列与目的片段序列完全一致, 未见碱基缺失或突变等异常。克隆碱基序列为: GGCCGTTTTGGCTTTTTGTTAGACGAAGCTTGGGCTGCAGGTC GACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGGCCAGCTA ACCATGGGCCTGCCTCTTGGTTTTCTGCACCTC AGCTTTTCCCGGATAGGTGGGGACCCATCATCAAAGTGACAGAGAAGATAAGGCCAGGGGCTT TCAAGTCACTAGTGGTTCCGTTTAGTAGATGATT

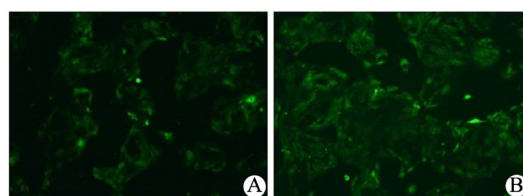
GTGCATTGTTTTCAAATGGTGCCCTAGTGACTA CAAAGCCCCAGAGCCAGCATCATCAAAGC AATGACAGTAGGTAAGCACCAGACCTCCTTGG GAGTGAGGAGGATTCTTGAGGAGAAAAGAGG TCTTCTTTCTCCTCTAGCCTGTGGAATGTGTGT CAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCC AGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCA ATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCA GGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCAT GCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCC CCTAACTCCGCCATCCCGCCCCCTAACTCCGCC CAGTTCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACT AATTTTTTTTTATTATGCAGAGGCCGAGGCCGC CTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGG AGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTTGCAAAA AGCTCCCGGGAGCTT。

### 2.3 慢病毒包装与病毒滴度测定

慢病毒载体 GV369、pHelper 1.0 载体、pHelper 2.0 的 3 种质粒共同转染 293T 细胞, 利用荧光显微镜观察 293T 细胞发出的绿色荧光。荧光法测定浓缩后的慢病毒浓度, 得到病毒滴度为  $1 \times 10^9$  TU/ml。

### 2.4 成功建立稳定过表达 miR-224 的 MCC1 细胞株

荧光显微镜下观察转染 GV369-miR-224 慢病毒表达载体的 MCC1 细胞和转染 GV369-NC 的 MCC1 细胞, 显微镜视野下可见绿色荧光标记的细胞。依据耐嘌呤霉素的特点, 利用嘌呤霉素筛选出抗嘌呤霉素的对应 GV369-miR-224 和 GV369-NC 载体细胞 (图 2)。



A: GV369- miR-224-NC-MCC1; B: GV369- miR-224-MCC1

图 2 转染 GV369-miR-224-NC 和 GV36-miR-224 慢病毒载体的 MCC1 细胞 ( $\times 200$ )

Fig.2 MCC1 cells transfected with GV369-miR-224-NC and GV369 miR-224 lentivirus vector ( $\times 200$ )

### 2.5 转染 GV369-miR-224 的 MCC1 细胞中 miR-224 表达量显著增高

qRT-PCR 结果显示, 转染 GV-369-miR-224 的 MCC1 细胞中 miR-224 表达水平显著高于空白对照组和阴性对照组 ( $23.45 \pm 1.94$  vs  $2.11 \pm 0.38$ ,  $1.46 \pm 0.11$ ; 均  $P < 0.01$ ), 而空白对照组与阴性对照组之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。



### 3 讨论

后基因组时代主要表现为 RNA 的调控, 其中 miRNA 发挥重要的作用, 在转录后水平或翻译水平调控基因表达<sup>[12]</sup>。哺乳动物中, miRNA 控制 30% 左右编码蛋白基因的表达。据统计, miRNAs 调节着人类约 1/3 的基因, 对人类生命现象发挥着巨大的作用。

作为具有多种调控功能的小分子非编码 RNA, miR-224 的表达具有组织和时空特异性。研究<sup>[13]</sup>发现, 外泌体中的细胞外 miR-224 表达水平影响肾透明细胞癌患者预后, 是肾透明细胞癌患者的潜在预后指标。在原发性肝细胞癌中, miR-224-HOXD10-P-PAK4/MMP-9 和 miR-224-PPP2R1B-AKT 是发生侵袭、转移的潜在途径<sup>[14]</sup>; 而在胃癌细胞中, miR-224 可通过负调控 RKIP 表达调控细胞增殖, 促进肿瘤进展<sup>[15]</sup>; 在结直肠癌中, miR-224 通过靶向作用于 Smad4 调节结直肠癌 HCT116 细胞的增殖<sup>[16]</sup>。研究<sup>[17]</sup>证实, miR-224 下调联合 TR1B1 上调和前列腺癌转移、高 PSA、高 Gleason 评分常相关; 此外, miR-224 在多种组织和细胞内广泛表达, 可以直接调控多种肿瘤相关信号通路介导增殖、分化、凋亡和细胞间黏附。MCC 可由胰腺囊腺瘤恶变而来, 本病在临床上罕见, 仅占胰腺恶性肿瘤的 1%, 临床研究以个案报道形式多见, 基础研究更是很少。本课题组前期运用 Agilent 16.0 版 miRNAs 表达谱芯片对 MCN(黏液性囊腺瘤-交界性黏液性囊性肿瘤-非浸润性癌-浸润性癌) 组织、囊液和血清 miRNA 分别进行差异基因筛选并通过 qPCR 验证, 在 miRNA 数据库中锚定关键分子 miR-224。

实现生物体内源性 miRNAs 过表达主要有两种方法, 分别为化学合成 miRNA 片段的转染和 miRNA 过表达载体的转染。相对于化学合成 miRNA 片段的转染而言, 构建载体可实现 miRNA 在培养细胞或者动物体内的稳定过表达, 并且费用更低廉, 其中慢病毒载体为理想选择之一。慢病毒载体作为真核系统基因转移的工具, 可以在细胞中长期稳定表达目的基因, 而且通过改造后极大降低了其自我复制的能力, 不会引起细胞损伤及免疫反应, 是一种理想的基因转移载体<sup>[18]</sup>。本实验采用的慢病毒载体 GV369, 其多克隆位点中含有 Age I/Nhe I, 经限制性内切酶酶切后, 将 miR-224 定向克隆入慢病毒表达载体 GV369 的 Age I 和 Nhe I 酶切位点之间, 从而使得 miR-224 能稳定正确地表达。同时因为慢病毒载体上表达 GFP, 荧光显微镜可以观察到感染后的 293T 细胞发出绿色荧光; 进一步转染至 MCC1 细胞中,

qRT-PCR 结果显示, 与空白对照组和阴性对照组比较, GV369-miR-224 组的 miR-224 表达明显上调, 证实构建 miR-224 重组慢病毒成功, 为探讨 miR-224 在 MCC 中的功能及发病机制提供新的细胞模型。

### [参考文献]

- [1] DEL C M, BESSELINK M G, SCHOLTEN L, et al. European evidence-based guidelines on pancreaticcystic neoplasms[J]. Gut, 2018, 67(5): 789-804. DOI: 10.1136/gutjnl-2018-316027.
- [2] IPI K, MORTELE K J, PREVEDELLO L M, et al. Focal cystic pancreatic lesions: assessing variation in radiologists' management recommendations[J]. Radiology, 2011, 259(1): 136-141. DOI:10.1148/radiol.10100970.
- [3] KANG C M, MATSUSHITA A, HWANG H K, et al. Experience-based surgical approach to pancreatic mucinous cystic neoplasms with ovarian-type stroma[J]. Oncol Lett, 2018, 15(2): 2451-2458. DOI: 10.3892/ol.2017.7627.
- [4] DEL C M, SEGERSVÄRD R, POZZI M R, et al. Comparison of preoperative conferencebased diagnosis with histology of cystic tumors of the pancreas[J]. Ann Surg Oncol, 2014, 21(5): 1539-1544. DOI:10.1245/s10434-013-3465-9.
- [5] LU J, GETZ G, MISKA E A, et al. MicroRNA expression profiles classify humancancers[J]. Nature, 2005, 435(7043): 834-838. DOI: 10.1038/nature03702.
- [6] AMBROS V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004, 431(7006): 350-355. DOI: 10.1038/nature02871.
- [7] EBERT M S, SHARP P A. Roles for microRNAs in conferring robustness to biologicalprocesses[J]. Cell, 2012, 149(3): 515-524. DOI: 10.1016/j.cell.2012.04.005.
- [8] HAGAN J P, CROCE C M. MicroRNAs in carcinogenesis[J]. Cytogenet Genome Res, 2007, 118(2/4):252-259. DOI: 10.1159/000108308.
- [9] TAZAWA H, KAGAWA S, FUJIWARA T. Micrnas as potential targetgene in cancer gene therapy of gastrointestinal tumors[J]. Expert Opin Biol Ther, 2011, 11(2): 145-155. DOI: 10.1517 / 14712598.2011.542749.
- [10] SUN F, YU M, YU J, et al. miR-338-3p functions as a tumor suppressor in gastric cancer by targeting PTP1B[J]. Cell Death and Disease, 2018, 9(5): 522-535. DOI:10.1038/s41419-018-0611-0.
- [11] CHEN H, YANG Y, WANG J, et al. miR-130b-5p promotes proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells via targeting RASAL1[J]. Oncol Lett, 2018, 15(5):6361-6367. DOI: 10.3892/ol.2018.8174.
- [12] INUI M, MARTELLO G, PICCOLO S. Microna control of signal transduction[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010, 11(4): 252-263. DOI: 10.1038/nrm2868.
- [13] FUJII N, HIRATA H, UENO K, et al. Extracellular miR-224 as a prognostic marker for clear cell renalcell carcinoma[J]. Oncotarget, 2017, 8(66): 109877-109888. DOI: 10.18632. oncotarget. 22436.
- [14] LI Q, DING C, CHEN C, et al. miR-224 promotion of cell migration and invasion by targeting Homeobox D 10 gene in human hepatocellular carcinoma[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2014, 29(4): 835-842. DOI: 10.1111/jgh.12429.
- [15] LIU H, LI P, LI B, et al. RKIP suppresses gastric cancer cell prolifer-

- eration and invasion and enhances apoptosis regulated by microRNA-224[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(10): 10095-10103. DOI: 10.1007/s13277-014-2303-4.
- [16] ZHOU J, HU M, WANG F, et al. miR-224 controls human colorectal cancer cell line HCT116 proliferation by targeting Smad4[J]. *Int J Med Sci*, 2017, 14(10): 937-942. DOI: 10.7150/ijms.19565.
- [17] LIN Z Y, HUANG Y Q, ZHANG Y Q, et al. MicroRNA-224 inhibits progression of human prostate cancer by downregulating TRIB 1 [J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(3): 541-550. DOI: 10.1002/ijc.28707.
- [18] UPMTI D, PATHAK A, KUNG S K. Lentiviral vector-based therapy in head and neck cancer (Review)[J]. *Oncol Lett*, 2014, 7(1): 3-9. DOI: 10.3892/ol.2013.1652.
- [收稿日期] 2018-02-27 [修回日期] 2018-05-11  
[本文编辑] 韩丹, 阮芳铭