

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.01.013

· 临床研究 ·

## miR-375 靶向调控 YAP 表达对肝癌细胞增殖和侵袭能力的影响

张小路<sup>a</sup>, 杜梅红<sup>b</sup>, 陈红跃<sup>c</sup>, 张建刚<sup>a</sup>, 魏光亚<sup>d</sup>, 赵林<sup>d</sup>, 郭伟胜<sup>d</sup>(河南省中医院/河南中医药大学第二附属医院  
a. 普外一科; b. 放射科; c. 甲乳科, d. 普外二科, 河南 郑州 450002)

**[摘要]** **目的:** 探讨 miR-375 靶向调控 Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)的表达对肝癌细胞增殖和侵袭能力的影响。**方法:** 收集 2015 年 1 月至 2016 年 12 月河南中医药大学第二附属医院普外二科行手术切除的 70 例肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者的癌组织及对应的癌旁组织标本,以及肝癌细胞系 SMMC-7721、Hb611、HepG2 和 BEL-7405,用 qPCR 法检测 HCC 癌组织和肝癌细胞中 miR-375 的表达水平。双荧光素酶报告基因检测 miR-375 与 YAP 的相互作用;分析 miR-375 和 HCC 患者的临床病理特征之间的关系,MTT 法检测 miR-375 对肝癌细胞增殖能力的影响,Transwell 小室法检测抑制 miR-375 表达后 HCC 细胞侵袭能力的变化;Western blotting 检测 HepG2 细胞中 YAP 的表达。建立裸鼠肝癌皮下移植瘤模型,观察抑制 miR-375 表达后移植瘤体积和质量的变化,免疫组化法和 Western blotting 检测裸鼠移植瘤中 YAP 的表达情况。**结果:** HCC 组织中 miR-375 和 YAP 表达水平明显高于癌旁组织(均  $P < 0.05$ ),肝癌 HepG2 细胞中 miR-375 的表达水平最高( $P < 0.05$ )。miR-375 能与 YAP 的 3' UTR 特异性结合,调控 YAP 的表达活性。抑制 miR-375 的表达后,HepG2 细胞增殖、侵袭的能力显著减弱(均  $P < 0.05$ ),裸鼠移植瘤体积和质量都明显减小(均  $P < 0.05$ ),移植瘤组织细胞中 YAP 的表达水平相应下调( $P < 0.05$ )。**结论:** miR-375 在肝癌的发生发展过程中起重要作用,可以通过靶向调控 YAP 的表达影响肝癌细胞的恶性生物学行为。

**[关键词]** 肝细胞癌;肝癌细胞系;miR-375;Yes 相关蛋白;增殖;侵袭

**[中图分类号]** R735.7;R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)01-0079-06

## miR-375 affects the proliferation and invasion of hepatoma cells *via* targeting YAP

ZHANG Xiaolu<sup>a</sup>, DU Meihong<sup>b</sup>, CHEN Hongyue<sup>c</sup>, ZHANG Jiangang<sup>a</sup>, WEI Guangya<sup>d</sup>, ZHAO Lin<sup>d</sup>, GUO Weisheng<sup>d</sup> (a. The First Department of General Surgery; b. Department of Radiology; c. Thyroid & Mammary Surgerg; d. The Second Department of General Surgery, Henan Province Hospital of TCM & The Second Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, Henan, China)

**[Abstract] Objective:** To investigate the mechanisms of miR-375 affecting the proliferation and invasion of hepatoma cells *via* targeting YAP (Yes-associated protein). **Methods:** The cancerous tissues and corresponding para-cancerous tissues of 70 patients with hepatocellular carcinoma (HCC) who underwent surgical resection at the Second Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine from January 2015 to December 2016, as well as the hepatoma cell lines SMMC-7721, Hb611, HepG2 and BEL-7405 were collected for this study. qPCR method was used to detect the expression level of miR-375 in collected HCC tissues and different hepatoma cell lines; Dual luciferase reporter gene assay was used to verify the interaction between miR-375 and YAP; The relationship between miR-375 and clinicopathological features of HCC patients was also analyzed; MTT assay was used to detect the effect of miR-375 on the proliferation of hepatoma cells; Transwell invasion assay was used to detect the invasive ability of hepatoma cells after inhibiting the expression of miR-375; Western blotting was used to detect the expression of YAP in HepG2 cells. The nude mouse model of subcutaneously transplanted xenograft was established, and the tumor volume and mass of transplanted hepatoma cells were detected after inhibiting the expression of miR-375. The expression of YAP in xenograft of nude mice was detected by immunohistochemistry and Western blotting. **Results:** The expression of miR-375 and YAP in HCC tissues was significantly higher than that in para-cancerous tissues (all  $P < 0.05$ ). The expression of miR-375 in HepG2 cells was the highest ( $P < 0.05$ ). miR-375 could specifically bind to the 3' UTR of YAP and regulate the expression activity of YAP. After inhibiting the expression of miR-375, the proliferation and invasion abilities of HepG2 cells were reduced (all  $P < 0.05$ ); The tumor volume and mass of transplanted xenografts were significantly reduced (both  $P <$

**[基金项目]** 河南省科技攻关项目(No. 142102310040)。Project supported by the Science and Technology Breakthrough Project of Henan Province (No. 142102310040)

**[作者简介]** 张小路(1976-),男,硕士,副主任医师,主要从事肝胆胰脾疾病的发生机制研究及临床治疗,E-mail:happy\_lud@163.com

**[通信作者]** 杜梅红(DU Meihong, corresponding author),硕士,主治医师,主要从事肝胆胰脾疾病的影像学诊断的研究,E-mail:happyzhangxl@163.com

0.05); The expression of YAP protein in the transplanted xenografts was down-regulated ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** miR-375 plays an important role in the occurrence and development of liver cancer, and can influence the malignant biological behaviors of hepatoma cells by targeting and regulating the expression of YAP.

**[Key words]** hepatocellular carcinoma; hepatoma cell line; miRNA-375; Yes-associated protein (YAP); proliferation; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(1): 79-84. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.01.013]

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是世界范围内发病率较高的恶性肿瘤之一, 术后伴有不良反应患者的5年生存率只有5%左右<sup>[1]</sup>, 其主要原因是晚期HCC的手术机会少、术后复发率高<sup>[2]</sup>。寻找HCC的新型生物治疗靶点是目前研究热点。微小RNA (miRNA) 是基因在转录后表达水平的重要调控因子, 监管众多的致癌基因或肿瘤抑制因子<sup>[3]</sup>, 例如, 抑制肿瘤的10号染色体缺失的磷酸酶张力蛋白同源物 (phosphatase tension homology deleted on chromosome ten, PTEN) 由 miR-21 转录调控<sup>[4]</sup>, 致癌基因 RAS 和 HMGA2 的转录翻译由 miR-let-7 家族调控<sup>[5]</sup>。miRNA 可以通过调控部分转录因子或蛋白活性在肿瘤的发生发展中起重要的调控或信号转导作用。Hippo 信号通路被证明与 HCC 的发生发展有一定关联, Yes 相关蛋白 (Yes-associated protein, YAP) 是 Hippo 信号通路的下游转录激活效应因子, 当 Hippo 信号被抑制时, YAP 的磷酸化表达减少, 导致其结合不同的转录因子对肝癌细胞的增殖和凋亡产生影响<sup>[6]</sup>。同时研究<sup>[7]</sup>表明, 在小鼠模型中过表达 YAP 可以导致小鼠肝癌模型的形成。本课题组前期的研究<sup>[8]</sup>显示, 62% 的 HCC 患者中 YAP 呈现过度表达的状态, 可以作为独立的预测患者生存的因子。然而, YAP 在 HCC 中的转录调控机制尚未被阐明。所以, 本实验探索及验证 miR-375 是否可以调控致癌基因 YAP 对肝癌细胞增殖和侵袭行为产生影响。

## 1 资料与方法

### 1.1 组织标本、细胞系、主要试剂及实验动物

采用2015年1月至2016年12月在河南中医药大学第二附属医院普外二科手术切除的70例肝癌患者的癌及对应的癌旁组织标本, 经病理切片确诊为HCC, 其中男性55例, 女性15例。患者及家属均签署知情同意书, 研究方案获得所在医院伦理委员会批准。人肝癌细胞系 SMMC-7721、Hb611、HepG2 和 BEL-7405 是从中山大学细胞研究库获得。RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司, Lipofectamine 2000 转染质粒和 siRNA 购自日本 TaKaRa 公司, miR-375-siRNA 购自美国 Sigma 公司, 一抗 YAP 兔抗人抗体购自 Abcam 公司, 二抗辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔 IgG 购自碧云天公司。PCR 引物由 Promega 公司设计。实验用 BALB/c 雌性4周龄的裸鼠 (动物

合格证号: xmsp20171118221259) 购自郑州大学医学院实验动物中心。

### 1.2 细胞培养

人肝癌细胞在10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素钠和100 μg/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养基中, 于5%CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温箱中培养。将培养至对数生长期的细胞用于后续实验。

### 1.3 qPCR法检测HCC组织和细胞中miR-375表达

将细胞接种在12孔板中, 生长至50%汇合度时进行 siRNA 转染, 90% 用于质粒转染。根据制造商的方案, 使用 Lipofectamine 2000 转染质粒和 siRNA。转染后第3天收获细胞, 并使用 TRIzol 试剂提取总 RNA。用 ImProm-II™ 逆转录系统对总 RNA 水平进行 qPCR 核酸扩增检测系统分析。反应条件: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 32 s, 循环 50 次后检测其溶解曲线, 通过计算机系统自动分析各样本 Ct 值, 用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 计算 miRNA 的相对表达量。所有反应用 Step-One Plus 实时定量 PCR 系统进行, 实验重复 3 次。引物序列: miR-375 F 为 5'-ACTTTG-TAGTCGTAGTCGTA-3', R 为 5'-UCGUAGUC-GUAUGCUAGCUAGA-3'; YAP F 为 5'-CGG GTTT-GTGTCTAGTCGTAAC-3', R 为 5'-UGACGGAG-GCUUAUUUCAUCAGGA-3'。

### 1.4 双荧光素酶报告基因检测miR-375的靶基因

从人基因组 DNA 扩增 DANCR 启动子序列, 随后插入萤光素酶报道载体 pGL3 增强子并指定为 pGL3-DANCR, 使用报道质粒 DANCR 或对照载体共转染 293U 细胞中, 培养 28 h 后, 将 293T 细胞在裂解缓冲液中裂解, 并通过萤光素酶测定系统测量野生型 YAP-3' UTR 和突变型 YAP-3' UTR 的萤光素酶活性的变化、裂解物蛋白质浓度并计算其相对值。实验重复 3 次。

### 1.5 MTT法检测肝癌HepG2细胞的增殖

将对数生长期肝癌 HepG2 细胞用胰蛋白酶消化后, 加入 MTT 液混合均匀, 在 37 °C 下孵育 4~6 h。后吸出上清液, 每孔加入 150 μl 二甲基亚砷形成单细胞悬浮液并以 1×10<sup>3</sup> 细胞/孔的密度接种到 24 孔板中。培养 7 d 后, 加入 20 μl DMSO, 在室温下搅拌 10 min 使晶体充分溶解。分别在 24、48、72 和 96 h 于酶标仪上测定波长 490 nm 处的光密度 (D) 值, 计算细胞的增殖情况。实验重复 3 次。

### 1.6 Transwell 小室法检测肝癌 HepG2 细胞的侵袭

将 HepG2 细胞制成细胞悬液, 以 50  $\mu$ l 接种于 Transwell 小室的上室( $2 \times 10^4$  个/室)中, 下室中加入血清培养基, 培养 24 h 后, 取出 Transwell 小室, 置于甲醇固定渗透膜并用 0.5% 结晶紫染色, 在光学显微镜下( $\times 40$ )随机选取数个视野, 计数穿膜细胞数。实验重复 3 次。

### 1.7 Western blotting 检测肝癌 HepG2 细胞中 YAP 的表达

使用 RIPA 缓冲液提取总细胞裂解物, 通过 12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质, 并转移到 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶粉封闭, 并在 4  $^{\circ}$ C 下加入 YAP 一抗(1:1 000)孵育过夜。次日, 充分洗涤后加入 HRP 标记的羊兔 IgG 二抗(1:5 000), 室温下孵育 2 h, PBS 洗涤, ECL 发光液显色、显影、拍照, 用 ProtParam 软件对灰度值进行分析, 计算蛋白相对表达量。实验重复 3 次。

### 1.8 裸鼠肝癌皮下移植瘤模型的建立及其观察

将  $1 \times 10^6$  个细胞/ml 的对照组和 miR-375-siRNA 组

HepG2 细胞分别注射于 20 只 4 周龄裸鼠的腋窝皮下。饲养 8 周后处死动物, 取出皮下移植瘤标本, 测量瘤的体积和质量。取移植瘤组织行免疫组化染色及 Western blotting 检测移植瘤组织中 YAP 的表达情况。

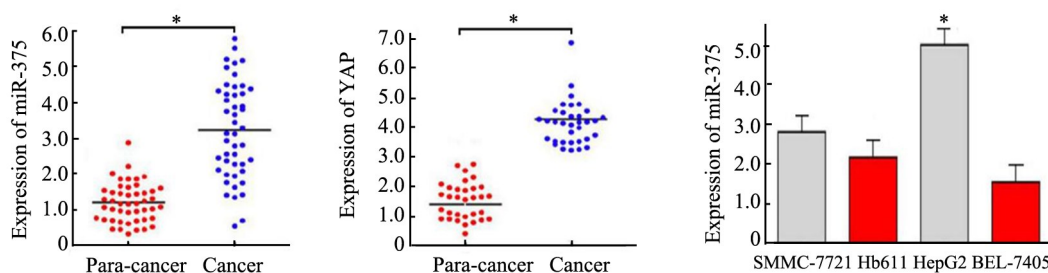
### 1.9 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计学软件对数据进行分析, 用 Wilcoxon 秩和检验分析 miR-375 在肝癌细胞中的差异表达, 细胞增殖和侵袭实验各组之间差异采用 *t* 检验和单因素方差分析。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HCC 组织和 HepG2 细胞中 miR-375 和 YAP 均高表达

qPCR 检测结果显示, HCC 组织中 miR-375 和 YAP 的表达水平均显著高于癌旁组织(均  $P < 0.05$ ; 图 1A、B); 在不同肝癌细胞中, 以 HepG2 细胞 miR-375 的表达水平最高( $P < 0.05$ ; 图 1C)。所以, 后续实验选取 HepG2 细胞。



\* $P < 0.05$  vs Paracancer tissues or Other cancer cells

图 1 HCC 组织(A,B)和肝癌细胞(C)中 miR-375 和 YAP 的表达

Fig. 1 Expression of miR-375 and YAP in HCC tissues(A, B) and liver cancer cell lines(C)

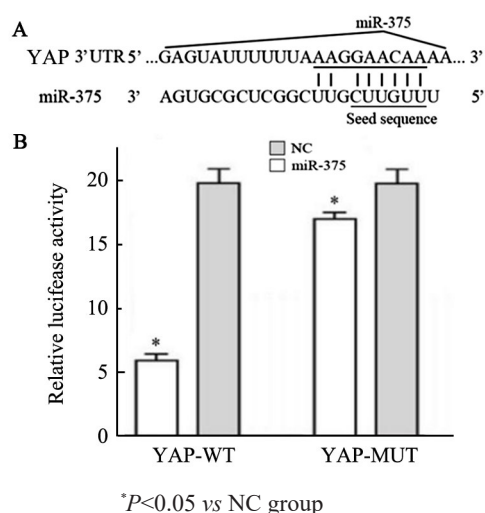
### 2.2 YAP 是 miR-375 的靶基因

生物信息学网站(TargetScan 4.2)预测结果显示, YAP 基因与 miR-375 的碱基序列存在部分互补, 推测 YAP 可能是 miR-375 的靶向因子(图 2A)。

双荧光素酶报告基因测定结果(图 2B)显示, 共转染 miR-375 进入 293U 细胞后, 野生型 YAP 3'UTR 报告基因的相对荧光素酶活性显著增强( $P < 0.05$ ), 突变型 YAP 3'UTR 报告基因的荧光素酶活性不受 miR-375 共转染的影响( $t = 13.52, P > 0.05$ )。结果表明, miR-375 可以结合 YAP 的 3'UTR 处序列上调其蛋白的表达, 提示 miR-375 可直接影响 YAP 表达及活性。

### 2.3 miR-375 表达与 HCC 患者临床病理特征的关系

为证实 miR-375 在 HCC 组织标本中的表达与患者临床病理特征的关系, 将 miR-375 在 HCC 组织中表达  $\geq 70\%$  定义为高表达水平,  $< 70\%$  为低表达水



\* $P < 0.05$  vs NC group

图 2 双荧光素酶实验检测 miR-375 和 YAP 之间的调控关系  
Fig. 2 Regulatory relationship between miR-375 and YAP detected by double luciferase assay

平<sup>[13]</sup>。miR-375 的表达与年龄无明显统计学差异( $t=14.62, P>0.05$ ;表 1)。miR-375 的表达与 HCC 患者病理分期相关以及淋巴结转移情况有关,随着分期期

别增高,miR-375 在 HCC 组织中表达水平越高( $P<0.05$ ;表 1)。

表 1 miR-375 表达与 HCC 患者临床病理特征的关系 [n (%)]

Tab. 1 The relationship between expression of miR-375 and clinicopathological features of HCC patients [n (%)]

Clinicopathological feature	N	High expression of miR-375	Low expression of miR-375	P
Gender				0.468
Male	55	32 (58.18)	23 (41.82)	
Female	15	8 (53.33)	7 (46.67)	
Age(t/a)				0.865
≤55	18	10 (55.56)	8 (44.44)	
>55	52	31 (59.62)	21 (40.38)	
Pathological stage				0.006
I	15	7 (46.47)	8 (53.33)	
II	13	8 (78.85)	5 (11.15)	
III	35	30 (85.71)	5 (14.29)	
IV	7	6 (85.71)	1 (14.29)	
Lymph node metastasis				0.005
No	41	9 (21.95)	32 (78.05)	
Yes	29	19 (65.52)	10 (34.48)	

2.4 抑制 miR-375 表达降低 HepG2 细胞的增殖能力

MTT 细胞增殖实验检测结果(图 3)显示,随时间的推进,96 h 时 miR-375-siRNA 组的肝癌 HepG2 细胞的增殖率明显低于 NC 组( $t=12.65, P<0.05$ )。实验结果表明,抑制 miR-375 的表达后可以降低肝癌 HepG2 细胞的增殖能力。

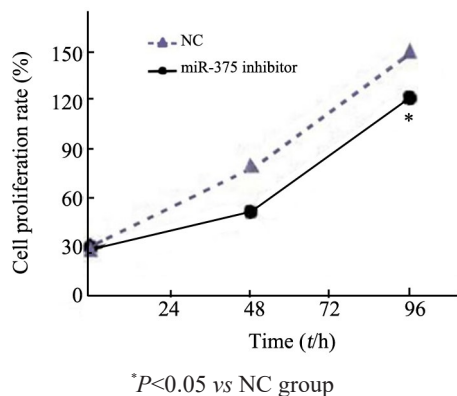


图 3 miR-375 对 HepG2 细胞增殖能力的影响

Fig. 3 Effect of miR-375 on proliferation of HepG2 cells

2.5 抑制 miR-375 表达降低 HepG2 细胞的侵袭能力

Transwell 侵袭实验结果(图 4)显示,miR-375-siRNA 组肝癌 HepG2 细胞穿膜细胞数明显低于 NC 对照组细胞[(48.8±8.29) vs (225.3±18.6)个,  $t=15.12, P<0.05$ ]。实验结果表明,抑制 miR-375 的表达后可以降低 HepG2 细胞的侵袭能力。

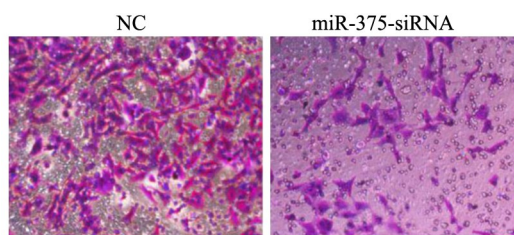


图 4 miR-375 对 HepG2 细胞侵袭能力的影响(结晶紫染色,×40)

Fig. 4 The effect of miR-375 on invasive ability of HepG2 cells(Crystal violet staining,×40)

2.6 抑制 miR-375 表达降低裸鼠肝癌体内成瘤能力

裸鼠肝癌体内成瘤实验结果(图 5)显示,miR-375-siRNA 组裸鼠成瘤受到一定程度的限制,瘤体体积和质量都小于 NC 组裸鼠(体积: $t=14.02, P<0.05$ ;质量: $t=12.96, P<0.05$ )。结果表明,抑制 miR-375 的表达对肝癌细胞的体内成瘤能力具有一定程度的影响作用。

2.7 抑制 miR-375 表达降低裸鼠肝癌移植瘤组织中 YAP 的表达

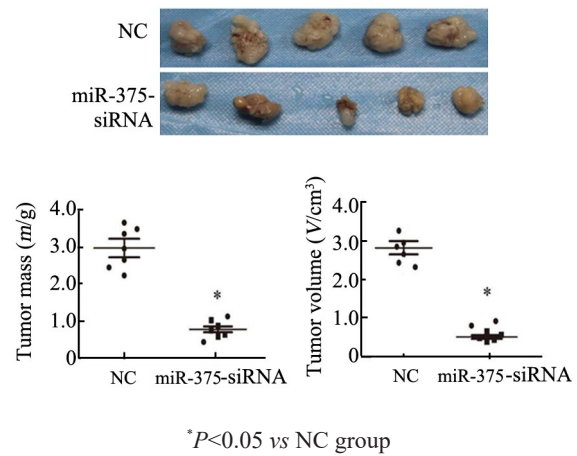
免疫组化染色结果(图 6A)显示,miR-375-siRNA 组裸鼠移植瘤组织中的 YAP 的表达水平显著低于 NC 组裸鼠。Western blotting 实验结果印证了免疫组化的结果(图 6B),即 miR-375-siRNA 组裸鼠移植瘤组织中 YAP 的表达水平显著低于对照组[(0.244±

0.032) vs (0.923±0.056);  $t=13.62, P<0.05$ ]. 实验结果表明,抑制 miR-375 表达后移植瘤组织中 YAP 水平相应下调,miR-375 可能通过调控 YAP 的表达影响肝癌细胞的增殖和侵袭能力。

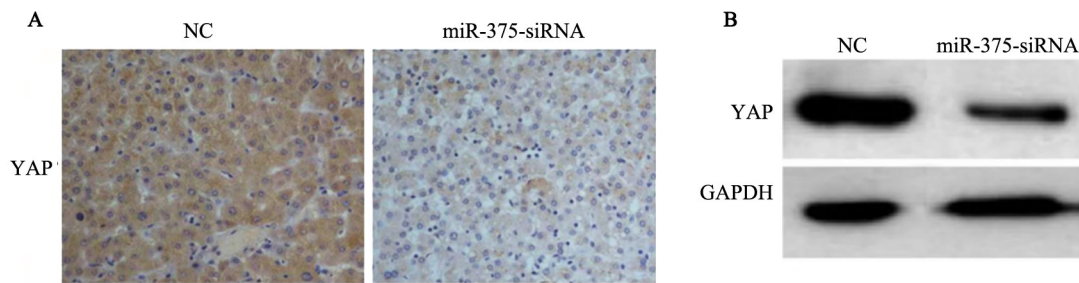
### 3 讨论

本研究分析了 miR-375 在 HCC 组织和肝癌细胞系中的表达差异,qPCR 检测结果发现 miR-375 在肝癌 HepG2 细胞中表达明显上调、YAP 在肝癌组织中表达水平相应上调。有研究<sup>[10-12]</sup>报道,miR-375 在头颈部肿瘤、胃癌和结肠癌中表达相对上调,但其在肝癌中的作用尚待确定。本研究结果显示,抑制 miR-375 的表达可以减弱肝癌细胞增殖和侵袭能力,从而抑制肝癌细胞的转移能力。由此结果可以推测,miR-375 的表达在肝癌发生发展过程中起一定的促癌作用。SELTH 等<sup>[13]</sup>提出,miR-375 有可能通过调控 YAP 激活相关通路达到相应的目的,所以本研究通

过进一步的研究来印证这一结论的可能性。



\* $P<0.05$  vs NC group  
图5 miR-375-siRNA 对裸鼠 HepG2 细胞体内成瘤的影响  
Fig. 5 Effect of miR-375-siRNA on tumor formation of HepG2 cells in nude mice



A: Immunohistochemical staining,  $\times 40$ ; B: Western blotting assay  
图6 miR-375-siRNA 对裸鼠 HepG2 移植瘤组织中 YAP 表达的影响  
Fig. 6 Effect of miR-375-siRNA on the expression of YAP in HepG2 tissues of nude mice

有较多研究揭示了 miRNA 在调控肿瘤细胞增殖和迁移中发挥重要作用。例如,miR-21 在多种恶性肿瘤中呈过表达状态,促进肿瘤细胞增殖<sup>[9]</sup>。另一方面,miR-10b 参与乳腺癌细胞的侵袭和转移行为<sup>[14]</sup>。有研究<sup>[15-16]</sup>指出,3'-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1(3'-phosphate dependent protein kinase-1, PDK-1)是 miR-375 的另一直接作用靶标,且 PDK-1 是 AKT 信号通路中的关键组成部分,其可调控肿瘤细胞的增殖和迁移,在 HCC 和胰腺癌中存在异常表达。除了其在恶性肿瘤中的作用外,miR-375 也是哺乳动物胰岛细胞发育和调控胰岛素分泌的重要调节因子<sup>[17]</sup>。miR-375 在肝癌细胞中过表达状态可以促进细胞增殖和侵袭行为,这表明 miR-375 在 HCC 的发展中的发挥一定的促癌作用。根据上述研究发现,miR-375 在 HCC 的发展和预后过程中均有特殊作用,所以研究其具体作用机制具有重要的意义。

本研究首先确定了 YAP 基因的 3'UTR 序列位点

和 miR-375 相似,可以受 miR-375 负调控表达。此外,miR-375 在 HCC 患者的肿瘤组织中存在高表达状态。以往的研究结果表明,YAP 的基因组扩增和 miR-375 的表达下调可导致 YAP 的表达下调,从而促进 HCC 的发生发展过程。YAP 是细胞增殖中的高效调节因子,很多研究<sup>[18-19]</sup>支持其在哺乳动物细胞中存在明显的致癌作用。例如,YAP 的异常表达可以诱导 EMT,进而参与细胞凋亡抑制过程和细胞增殖行为<sup>[20]</sup>。有学者<sup>[21]</sup>指出,结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是 YAP 的下游靶点,抑制 CTGF 表达可以阻断 YAP 介导的细胞增殖行为,并在软琼脂细胞集落形成实验中降低了 YAP 诱导的细胞集落形成。本研究发现,miR-375 的异常表达可以抑制 YAP 的表达,说明 miR-375 可以直接干扰 YAP 的信号输出。在裸鼠肝癌成瘤实验中发现,YAP 在移植瘤组织中相应表达降低。因此,可推测 miR-375 是靶向针对 YAP 的潜在调控因子,可用于干预 HCC 的

发生发展。

本研究针对 miR-375 在 HCC 中的作用及其相关作用靶点进行了上述初步探讨, 并通过验证肝癌 HepG2 细胞的增殖和侵袭能力受 miR-375 和 YAP 的相应的调控。miR-375 的靶基因可能通过不同的细胞机制协同作用。本实验鉴定 YAP 作为 miR-375 的靶标, 为 miR-375 的分子网络提供了新的见解。深入探讨 miR-375 在肿瘤发生过程中的作用机制和其他信号通路的联合作用情况将是课题组下一步的研究方向。

综上所述, 本实验证实了 miR-375 和 YAP 在 HCC 发生发展中的潜在作用, 拓展了对 miR-375 在肿瘤发展过程中的作用认识, 为进一步研究 miR-375 在肝癌中的作用提供了一定的理论支持。

### [参考文献]

- [1] YOSHIMOTO S, LOO T M, ATARASHI K, et al. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome[J]. *Nature*, 2013, 499(7456): 97-101. DOI: 10.1038/nature12347.
- [2] 郑荣寿, 左婷婷, 曾红梅, 等. 中国肝癌死亡状况与生存分析[J]. *中华肿瘤杂志*, 2015, 37(9): 697. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2015.09.014.
- [3] CALLEGARI E, GRAMANTIERI L, DOMENICALI M, et al. MicroRNAs in liver cancer: a model for investigating pathogenesis and novel therapeutic approaches[J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(1): 46-57. DOI:10.1038/cdd.2014.136.
- [4] SHEN H, ZHU F, LIU J, et al. Alteration in miR-21/PTEN expression modulates gefitinib resistance in non-small cell lung cancer[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e103305[2018-04-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4110008/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0103305.
- [5] MOHANTY V, SHAH A, ALLENDER E, et al. Folate receptor alpha upregulates Oct4, Sox2 and Klf4 and downregulates miR-138 and miR-let-7 in cranial neural crest cells[J]. *Stem Cell*, 2016, 34(11): 2721-2732. DOI:10.1002/stem.2421.
- [6] JOHNSON R, HALDER G. The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(1): 63-79. DOI: 10.1038/nrd4161.
- [7] 蔡芸芸, 高嵩, 刘鲁明, 等. 半枝莲提取物通过 Hippo/YAP 通路抑制胰腺癌 PANC-1 细胞的增殖, 侵袭转移和成瘤能力的研究[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 2017(7): 2947-2951.
- [8] WANG J, WANG H, ZHANG Y, et al. Mutual inhibition between YAP and SRSF1 maintains long non-coding RNA, Malat1-induced tumorigenesis in liver cancer[J]. *Cell Signal*, 2014, 26(5): 1048-1059. DOI: 10.1016/j.cellsig.2014.01.022.
- [9] 陈彭, 刘利. miR-21 作用于 PTEN 与肿瘤耐药关系的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2015, 23(13): 1917-1920. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2015.13.42.
- [10] JIMENEZ L, SHARMA V P, LIM J, et al. MicroRNA-375 impairs head and neck squamous cell carcinoma invasion by suppressing invadopodia activity[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2015, 139(11): 1349-1361. DOI: 10.5858/arpa.2014-0471-OA.
- [11] MIAO L, LIU K, XIE M, et al. miR-375 inhibits Helicobacter pylori-induced gastric carcinogenesis by blocking JAK2-STAT3 signaling[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2014, 63(7): 699-711. DOI: 10.1007/s00262-014-1550-y.
- [12] MUSSNICH P, ROSA R, BIANCO R, et al. MiR-199a-5p and miR-375 affect colon cancer cell sensitivity to cetuximab by targeting PHLPP1[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2015, 19(8): 1017-1026. DOI: 10.1517/14728222.2015.1057569.
- [13] SELTH L A, DAS R, TOWNLEY S L, et al. A ZEB1-miR-375-YAP1 pathway regulates epithelial plasticity in prostate cancer[J]. *Oncogene*, 2017, 36(1): 24-34. DOI: 10.1038/onc.2016.185.
- [14] HAN X, YAN S, WEIJIE Z, et al. Critical role of miR-10b in transforming growth factor- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer[J]. *Cancer Gene Ther*, 2014, 21(2): 60-67. DOI: 10.1038/cgt.2013.82.
- [15] ZHOU J, SONG S, HE S, et al. MicroRNA-375 targets PDK1 in pancreatic carcinoma and suppresses cell growth through the Akt signaling pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(4): 950-956. DOI: 10.3892/ijmm.2014.1638.
- [16] HU S, ZHANG M, SUN F, et al. miR-375 controls porcine pancreatic stem cell fate by targeting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (Pdk1)[J]. *Cell Prolif*, 2016, 49(3): 395-406. DOI:10.1111/cpr.12263.
- [17] 杨进, 魏蕊, 洪天配, 等. miR-375 在人胚胎干细胞定向分化为胰岛素分泌细胞过程中对肝细胞核因子 1 $\beta$  表达的调控作用[J]. *中华糖尿病杂志*, 2015, 7(12): 730-734. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-5809.2015.12.004.
- [18] MOROISHI T, HANSEN C G, GUAN K L. The emerging roles of YAP and TAZ in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(2): 73-79. DOI:10.1038/nrc3876.
- [19] LIN L, SABNIS A J, CHAN E, et al. The Hippo effector YAP promotes resistance to RAF-and MEK-targeted cancer therapies[J]. *Nat Genet*, 2015, 47(3): 250-256. DOI: 10.1038/ng.3218.
- [20] THONGON N, CASTIGLIONI I, ZUCAL C, et al. The GSK3 $\beta$  inhibitor BIS I reverts YAP-dependent EMT signature in PDAC cell lines by decreasing SMADs expression level[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(18): 26551-26566. DOI:10.18632/oncotarget.8437.
- [21] DI BENEDETTO A, MOTTOLESE M, SPERATI F, et al. The Hippo transducers TAZ/YAP and their target CTGF in male breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28): 43188-43198. DOI:10.18632/oncotarget.9668.

[收稿日期] 2018-08-18

[修回日期] 2018-09-20

[本文编辑] 党瑞山