

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.10.002

· 基础研究 ·

过表达 miR-520d 通过抑制自噬蛋白 Beclin1 逆转三阴性乳腺癌细胞化疗耐药性

刘欢¹, 李红昌², 陈亚峰¹, 徐可³, 李劼¹, 奉典旭¹ (1. 上海中医药大学附属普陀医院 普外科, 上海 200062; 2. 上海市闵行区中心医院 普外科, 上海 201100; 3. 上海中医药大学附属普陀医院 中心实验室, 上海 200062)

[摘要] **目的:** 探讨 miR-520d 通过调控自噬逆转三阴性乳腺癌 (TNBC) 细胞化疗耐药的作用及分子机制。**方法:** 以人 TNBC 细胞系 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 为亲本株细胞构建多西他赛 (Doc) 耐药细胞株 MDA-MB-231/Doc 和 MDA-MB-468/Doc, 实验分为空白组 (亲本细胞)、对照组 (耐药细胞组) 和过表达 miR-520d 组。用 qPCR 检测空白组和耐药细胞组细胞中 miR-520d 的表达水平, MTT 实验检测过表达 miR-520d 的耐药细胞对 Doc 的敏感性, MDC 染色后荧光显微镜观察细胞中自噬小体的发生情况、共聚焦显微镜观察过表达 miR-520d 的耐药细胞中自噬相关蛋白 LC3 阳性的细胞数。用荧光素酶报告基因实验验证 miR-520d 与 Beclin1 的靶向关系。用 WB 实验检测过表达 miR-520d 对细胞中自噬相关蛋白 Beclin1 和 LC3I、LC3II 表达的影响。**结果:** TNBC 耐药细胞中 miR-520d 的表达水平明显低于空白组细胞 ($P < 0.01$)。过表达 miR-520d 的耐药细胞对 Doc 的敏感性显著提高 ($P < 0.01$)、细胞的自噬活性明显降低 ($P < 0.01$)。荧光素酶报告基因实验证明 Beclin1 是 miR-520d 可能的靶分子。Doc 与 miR-520d mimics 联合使用可降低 TNBC 耐药细胞中 LC3-II/I 比值和自噬蛋白 Beclin1 的表达水平 (均 $P < 0.05$)。**结论:** 通过调控 miR-520d 水平可能改变自噬蛋白 Beclin1 表达, 从而逆转 TNBC 细胞 Doc 化疗耐药性。

[关键词] miR-520d; 三阴性乳腺癌; Beclin1; 自噬; 多西他赛; 化疗耐药

[中图分类号] R737.9; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)10-1062-06

miR-520d over-expression reverses chemotherapy resistance of TNBC via inhibiting autophagy protein Beclin1

LIU Huan¹, LI Hongchang², CHEN Yafeng¹, XU Ke³, LI Jie¹, FENG Dianxu¹ (1. Department of General Surgery, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China; 2. Department of General Surgery, Minhang District Central Hospital, Shanghai 201100, China; 3. Central Laboratory, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China)

[Abstract] Objective: To investigate the role and molecular mechanism of miR-520d in reversing the chemoresistance of triple negative breast cancer (TNBC) by regulating autophagy. **Methods:** Docetaxel (Doc) resistant cell lines MDA-MB-231/Doc and MDA-MB-468/Doc were constructed by using human TNBC cell lines MDA-MB-231 and MDA-MB-468 as parental cells, and the cells were divided into blank group (parental cells), control group (drug-resistant group), and miR-520d over-expression group. The expression levels of miR-520d in cells of the blank and drug-resistant groups were detected by qPCR. The Doc-sensitivity of resistant cells over-expressing miR-520d was detected by MTT assay. After MDC staining, the generation of autophagosome in cells was observed under fluorescence microscopy; the number of miR-520d over-expressed resistant cells with positive LC3 expression was observed under confocal microscopy. The luciferase reporter gene assay was used to verify the targeting relationship between miR-520d and Beclin1. The effect of miR-520d mimics on the expression of autophagy-associated protein Beclin1, and LC3I, LC3II in cells was detected by WB assay. **Results:** The results of qPCR showed that the expression of miR-520d in the drug-resistant TNBC cells was significantly lower than that of normal cells ($P < 0.01$). In drug-resistant cells over-expressing miR-520d, the Doc-sensitivity was significantly improved, while the autophagy activity was significantly reduced (all $P < 0.01$). At the same time, luciferase experiments demonstrated that Beclin1 was a possible target molecule of miR-520d ($P < 0.05$). WB results showed that the combination of docetaxel and miR-520d mimics reduced the LC3-II/I ratio and the expression of autophagy protein Beclin1 in drug-resistant TNBC cells (all $P < 0.05$). **Conclusion:** The

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No.81703881)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81703881)

[作者简介] 刘欢 (1993-), 女, 硕士, 主要从事乳腺癌化疗耐药的研究, E-mail: importlh@163.com

[通信作者] 奉典旭 (FENG Dianxu, corresponding author), 博士, 主任医师, 博士生导师, 主要从事中西医结合防治急性胰腺炎的研究, E-mail: fdi-anxu@sohu.com

regulation of miR-520d levels may alter the expression of autophagy protein Beclin1, thereby reversing Doc chemotherapy resistance in TNBC cells.

[Key words] miR-520d; triple-negative breast cancer (TNBC); Beclin1; autophagy; docetaxel (Doc); chemotherapy resistance

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(10): 1062-1067. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.10.002]

三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 是指雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和人表皮生长因子受体-2(HER-2)均为阴性的一类乳腺癌,其预后差、复发转移率高、病死率高^[1]。化疗耐药是影响 TNBC 疗效的重要原因^[2]。过度自噬是肿瘤耐药发生的机制之一。Beclin1 是自噬激活/启动的一个标志蛋白,在肿瘤细胞中 Beclin1 可以通过调控自噬参与肿瘤细胞耐药发生^[3]。多西他赛(docetaxel, Doc)作为肿瘤的主要化疗药物之一,其耐药已被证实与自噬相关^[4]。miRNA 作为一类非编码单链小分子,可以与其靶基因的 3'非编码区(3'UTR)特异性结合,抑制靶基因表达。研究^[5]显示,miRNA 可以通过调控自噬相关基因转录后表达水平,进而调控细胞自噬水平,影响肿瘤细胞耐药。但在 TNBC 中其具体机制尚未明了。本研究通过探讨 miRNA-自噬信号轴对 TNBC 细胞耐药的影响,旨在为临床治疗耐药性 TNBC 提供实验依据和新的策略。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

TNBC 细胞系 MDA-MB-231、MDA-MB-468 购自中国科学院上海细胞库。

DMEM 培养基和 0.25% 胰蛋白酶购自上海源培生物科技股份有限公司,胎牛血清购自 Gibco 公司,Doc 购自江苏恒瑞制药,MTT 试剂购自 Sangon Biotech 公司,qPCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司,DMSO 购自 Sigma 公司,兔抗人 Beclin1、LC3 和 β -actin(内参照)单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG 购自美国 Abcam 公司,miR-520d mimics 购自美国 Qiagen 公司,MDC 染液、GFP-LC3 试剂盒购自上海普盛生物科技有限公司,pGL3-Beclin1 3'UTR-promotor 重组质粒构建由上海基科生物有限公司设计完成。

1.2 细胞培养、转染与分组

MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养液,在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。取对数生长期细胞在 10 nmol/L Doc 培养基中培养 2~3 个月,以构建 Doc 耐药细胞株 MDA-MB-231/Doc 和 MDA-MB-468/Doc。

耐药细胞株构建成功后,选取对数生长期的细胞,胰酶消化后,将用 DMEM 培养基调整密度为

1 \times 10⁵ 个/ml 的细胞接种到 6 孔板(2 ml/孔),于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养 24 h。按照说明书进行 miR-520d mimics 转染,转染 48 h 后于荧光显微镜下观察细胞的转染效果。实验分为空白组(亲本细胞)、对照组(耐药细胞组)和过表达 miR-520d 组。

1.3 qPCR 检测各组乳腺癌细胞中 miR-520d miRNA 的表达水平

培养对照组和过表达 miR-520d 组细胞至汇合度达 40% 时,用 TRIzol 提取细胞中总 RNA,用 TaqMan miRNA 逆转录试剂盒进行逆转录,用 PCR 进行扩增,根据试剂盒说明书用 qPCR 试剂盒进行定量分析。PCR 所需引物序列:miR-520d F 为 ACACTCCAGCTGGGCTACAAAGGGAAGC, R 为 CTCAACTGGTGTCGTGGA; β -actin F 为 ATTGCCGACAGGATGCAGAA, R 为 GCTGATCCACATCTGCTGGAA。PCR 反应条件:50 $^{\circ}$ C 孵育 2 min,95 $^{\circ}$ C 反应 10 min,共 40 个循环,以 β -actin 作为内参。每个样本做 3 个复孔,取平均值为 Ct 值,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 miR-520d 的表达水平。

1.4 MTT 法检测不同浓度 Doc 对乳腺癌耐药细胞增殖的影响

取对数生长期空白组和对照组细胞,以 5 \times 10³/孔接种于 96 孔板(100 μ l/孔),贴壁生长 12 h 后加入不同浓度(0、3.125、6.25、12.5、25、50、100 μ mol/L)的 Doc 继续培养 24 h,每孔加入 100 μ l(0.5 mg/L) MTT 液,置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱培养 4 h,吸弃旧的培养液,加入 100 μ l/孔甲臞溶解液,充分混匀后置入 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 4 h,后于酶标仪测定波长 490 nm 处的光密度(D)值。计算细胞的增殖率(实验组 D 值/对照组 D 值),确定药物 IC₅₀。

1.5 MDC 染色法检测过表达 miR-520d 对耐药细胞自噬小体形成的影响

MDC 染色检测过表达 miR-520d 组细胞自噬的影响。离心,收集对照组和过表达 miR-520d 组细胞;用 1 \times 清洗缓冲液清洗细胞后重悬至 1 \times 10⁶ 个细胞/ml。取适量细胞至新 EP 管内,加入 MDC 染液轻轻混匀,避光孵育细胞 30~45 min,然后用 1 \times 冲洗缓冲液清洗细胞 2~3 次。加入抗荧光淬灭封片剂,荧光显微镜下观察细胞中自噬小体的形成情况。

1.6 共聚焦显微镜观察过表达 miR-520d 对耐药细胞自噬相关蛋白 LC3 的影响

取对照组和过表达 miR-520d 组细胞,以 5 \times 10⁴ 细

胞/孔的密度接种于6孔板,置入细胞培养箱中过夜培养。次日细胞完全贴壁后,更换新鲜培养基,加入GFP-LC3。24 h后,吸出培养液,PBS清洗后,4 °C离心收集细胞,在4%多聚甲醛中4 °C固定15 min,吸出,PBS洗涤两次后,防淬灭封片剂封片,在共聚焦显微镜下观察自噬相关蛋白LC3阳性的细胞数。

1.7 WB检测过表达miR-520d对耐药细胞自噬相关蛋白表达的影响

分别收集处于对数生长期的各组细胞 5×10^6 个,加入300 μ l RIPA裂解液提取细胞总蛋白,用BCA试剂盒检测各组总蛋白浓度,调平蛋白浓度后,取等量蛋白用10% SDS-PAGE分离,转移至PVDF膜,5%脱脂牛奶室温封闭PVDF膜1 h,随后分别加入兔抗人Beclin1、LC3和 β -actin单克隆抗体(1:1 000),4 °C封闭过夜,第2天弃去一抗,加入HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(1:3 000)室温封闭1 h,滴加ECL显色液显色,在凝胶成像系统中显影并获取蛋白质条带图片,以目的蛋白LC3、Beclin1与内参(β -actin)蛋白的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.8 荧光素酶报告基因实验验证Beclin1与miR-520d的靶向关系

将Beclin1 3' UTR克隆连接入pGK-Gluc载体上,构建pGK-Gluc-Beclin1 3' UTR载体,将其与miR-520d mimics共转染TNBC细胞,检测荧光素酶活性。通过生物信息学方法预测Beclin1上存在的miR-520d结合位点。用qPCR扩增Beclin1上含有miR-520d结合位点的3'UTR区域基因片段,将该片段插入pGL3-promoter荧光素酶载体,构建Beclin1 3'UTR

野生(Wt)质粒;再利用基因位点突变技术对结合位点的部分核苷酸进行突变,构建Beclin1 3'UTR突变(Mut)质粒。用Beclin1 3'UTR Wt质粒或Beclin1 3'UTR Mut质粒、海肾荧光素酶对照质粒pRL-SV40与miR-520d mimics对MDA-MB-231/Doc细胞进行共转染,将构建的质粒及不同浓度(0、20、40、80 μ mol/L)的miR-520d mimics共转染进入MDA-MB-231/Doc细胞中。根据双荧光素报告基因试剂盒说明书避光测定荧光素酶活性。

1.9 统计学处理

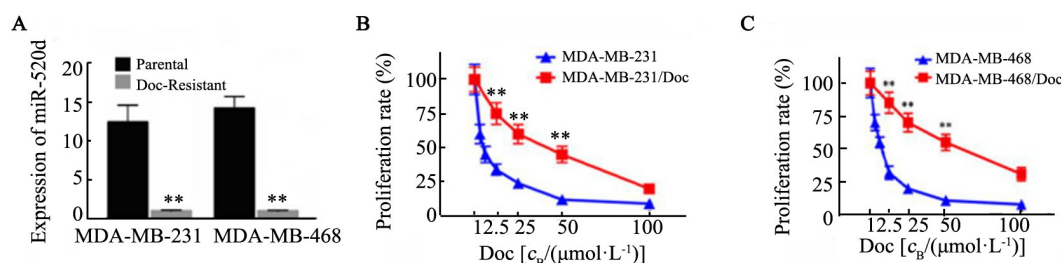
qPCR、WB、MTT等实验均重复3次。采用SPSS 24.0版软件进行数据处理,用GraphPad Prism 7软件绘制图片。组间比较方差齐且服从正态分布时用One-Way ANOVA检验,反之则用非参数检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建Doc耐药细胞系

qPCR实验结果(图1A)表明,不同浓度的Doc处理形成的耐药细胞MDA-MB-231/Doc和MDA-MB-468/Doc中miR-520d相对表达水平显著低于空白组细胞(均 $P < 0.01$)。结果提示,Doc耐药细胞中miR-520d呈低表达。

MTT实验结果(图1B、C)表明,耐药细胞组MDA-MB-231/Doc($IC_{50} = 38 \mu$ mol/L)、MDA-MB-468/Doc($IC_{50} = 60 \mu$ mol/L)细胞的增殖率显著高于空白组MDA-MB-231($IC_{50} = 3.8 \mu$ mol/L)、MDA-MB-468($IC_{50} = 6 \mu$ mol/L)(均 $P < 0.01$)。



** $P < 0.01$ vs Parental or MDA-MB-231/MDA-MB-468 group

图1 TNBC细胞中miR-520d的表达(A)及不同浓度Doc对空白组和耐药组细胞增殖(B、C)的影响

Fig.1 The expression of miR-520d (A) in TNBC cells and effects of different concentrations of Doc on proliferation of cells in the blank and drug-resistant groups (B,C)

2.2 过表达miR-520d增加耐药细胞对Doc的敏感性

MTT实验结果(图2)显示,过表达miR-520d后,过表达组MDA-MB-231/Doc($IC_{50} = 13.25$)和MDA-MB-468/Doc($IC_{50} = 18.54$)对Doc的敏感性显著高于对照组MDA-MB-231/Doc($IC_{50} = 44.76$)和MDA-MB-468/Doc($IC_{50} = 63.43$)细胞(均 $P < 0.01$)。结果提示,提

高miR-520d的表达水平可逆转TNBC耐药细胞对Doc的耐药性。

2.3 过表达miR-520d可降低细胞的自噬活性

MDC染色结果(图3A)显示,与对照组比较,miR-520d mimics组自噬小体显著减少,提示过表达miR-520d可以抑制耐药细胞的自噬能力。GFP-LC3

检测结果(图 3B)表明,与对照组比较,过表达 miR-520d 组细胞中自噬相关蛋白 GFP-LC3 被抑制($P < 0.01$)。实验结果表明,过表达 miR-520d 可以抑制 TNBC 耐药细胞的自噬能力。

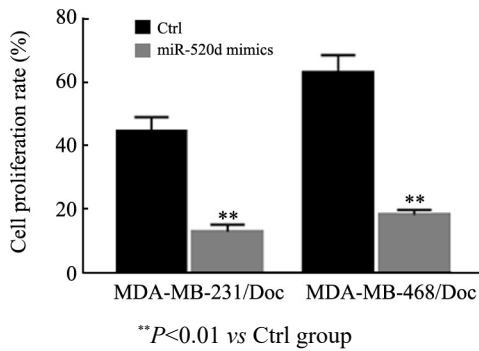
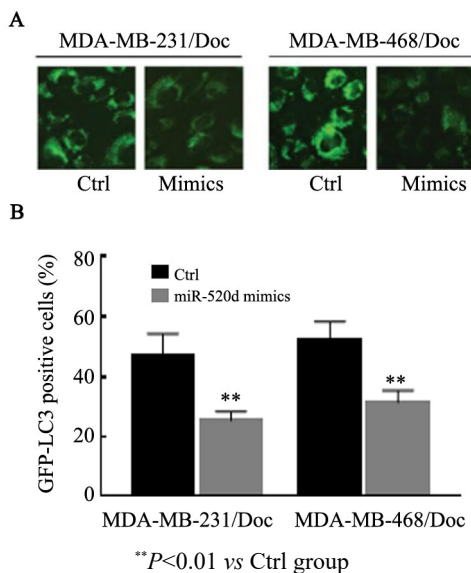


图 2 Doc 对耐药细胞组和过表达 miR-520d 组细胞增殖的影响

Fig.2 Effects of Doc on proliferation of cells in the drug-resistant group and miR-520d mimics group



A: MDC stained cytolysosomes ($\times 600$);
B: GFP-LC3 stained cells

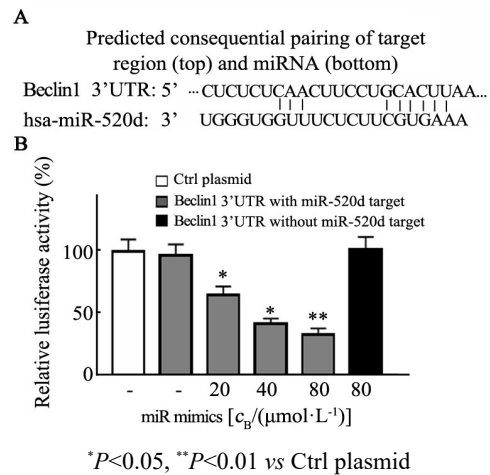
图 3 MDC 染色法和共聚焦显微镜检测过表达 miR-520d 对 TNBC 耐药细胞自噬的影响

Fig. 3 MDC staining and congregated microscopy were used to detect the effect of miR-520d over-expression on the autophagy of drug-resistant TNBC cells

2.4 Beclin1 与 miR-520d 的靶向调控关系

通过 miRanda 网站 (<http://www.microrna.org/microrna/getDownloads.do>) 预测与 Beclin1 相关的 miRNA 结果(图 4A)发现,miR-520d 与其 3' UTR 结合,其可能是 miR-520d 的靶分子。荧光素酶报告基因实验结果(图 4B)显示,miR-520d mimics 呈浓度依赖性降低 Doc 耐药细胞的相对荧光素酶活性($P < 0.05$ 或 $P <$

0.01)。结果提示,miR-520d 能够抑制 Beclin1 3' UTR 区域活性;同时在不含有结合位点的质粒组中,耐药细胞的荧光活性未受到抑制,表明 miR-520d 仅通过该位点抑制 Beclin1 的表达,进而降低细胞的自噬水平,逆转 TNBC 耐药细胞对 Doc 的耐药。



A: miR-520d contains 1 action site in the 3' UTR of Beclin1;
B: Detection of fluorescence activity intensity of MDA-MB-231/Doc

图 4 荧光素酶报告基因检测 miR-520d 与 Beclin1 3' UTR 序列的结合

Fig.4 miR-520d bound to 3' UTR of Beclin1 verified by luciferase reporter gene assay

2.5 过表达 miR-520d 降低耐药细胞中自噬相关蛋白的表达水平

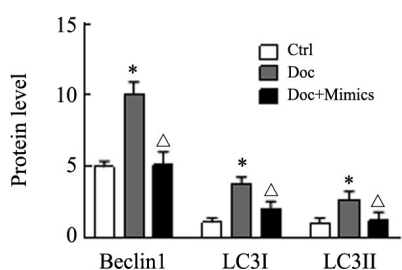
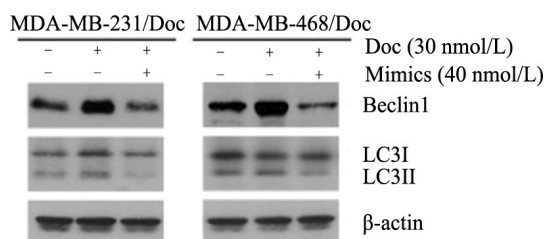
WB 检测结果(图 5)显示,在 Doc 的作用下,细胞中自噬相关蛋白 Beclin1 表达水平明显上升(均 $P < 0.05$),说明 Beclin1 的高表达可能是 TNBC 细胞耐药的主要原因之一;Doc+过表达 miR-520d 组细胞中 Beclin1 和 LC3II/LC3I 相对表达水平显著下降(均 $P < 0.05$),提高了耐药株对 Doc 的敏感性。结果表明,过表达 miR-520d 能够抑制耐药细胞中自噬相关蛋白的表达,而 miR-520d 可能通过作用于 Beclin1 影响耐药细胞的自噬过程。

3 讨论

TNBC 作为一类难治性、病死率高的乳腺癌,内分泌治疗效果不佳,化疗为其重要治疗手段,Doc 为其常用化疗药,然而,TNBC 容易对化疗药物产生耐药性,严重影响其疗效^[6]。因此,研究 TNBC 的化疗耐药机制对提高其疗效具有重要意义。

在肿瘤细胞中,Beclin1 可以通过调控自噬参与肿瘤细胞耐药发生^[7]。研究^[8]发现,Doc 诱发细胞内质网应激,轻微应激可促进应激活化信号分子 c-Jun

氨基末端激酶-1介导的 Bcl-2 磷酸化, 进而导致 Beclin1 的释放促进自噬发生; 同时释放的 Beclin1 可与 Bax 结合抑制细胞凋亡, 使得肿瘤细胞拮抗凋亡, 最终导致肿瘤耐药。GU 等^[9]研究证实, 在乳腺癌细胞中降低 Beclin1 表达水平可提高其化疗敏感性。



* $P < 0.05$ vs Ctrl group; [△] $P < 0.05$ vs or Doc group

图5 Doc 和 miR-520d mimics 对 TNBC 耐药细胞自噬相关蛋白的影响

Fig.5 Effects of Doc and miR-520d mimics on autophagy-associated proteins in drug-resistant TNBC cells

miRNA 可以通过靶向自噬相关的基因调控人类肿瘤细胞中的自噬水平^[10]。研究^[11]证明, miRNA 可以通过调控细胞自噬相关基因转录后表达水平, 进而调控细胞的自噬水平。有研究者^[12]发现, miRNA 可以通过调控细胞自噬水平进而影响肿瘤细胞的耐药。体内外实验研究结果^[13]证实, miR-381 靶向 Wnt 信号通路抑制 TNBC 的发展。DENG 等^[14]阐述了 hsa-miRNA-143-3p/CIAPIN1 耐药途径的潜在机制。hsamiRNA-143-3p 作为肿瘤抑制性 miRNA, 可能是有效逆转 TNBC 细胞耐药的新靶点。近年来, miR-520d 与肿瘤的关系也逐渐被重视。miR-520d 通过下调 EphA2 的表达能够抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[15]。尽管现有一部分针对 miR-520d 的报道, 但是对 miR-520d 逆转 TNBC 细胞化疗耐药的研究仍然不足, 尤其是其在细胞自噬中的调控作用机制尚未明了, 因此探讨 miR-520d 表达调控机制对 TNBC 化疗耐药的影响有极其重要的临床意义。

本研究发现, 成功构建的 TNBC 耐药株 MDA-MB-231/Doc 和 MDA-MB-468/Doc 中 miR-520d 的表达明显低于非耐药的 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞, 提示 miR-520d 可能是 TNBC 治疗潜在的靶点。

miR-520d 在 Doc 耐药细胞中的低表达, 表明 miRNA 表达水平在肿瘤发生中可能发挥着关键作用。有研究^[16]发现, miR-520d 可能是诊断乳腺癌的一个特异性生物标志物, 其在乳腺癌中高表达, 尤其是 HER-2 阴性乳腺癌; 在 TNBC MDA-MB-231 细胞研究^[17]中发现, 过表达 miR-520d 可以减弱细胞的增殖和迁移, 然而却没有进一步探索其具体机制。本研究发现, 过表达 miR-520d 的 TNBC 耐药细胞对 Doc 的敏感性显著提高, 说明 miR-520d 可能通过某些机制逆转 TNBC 细胞的耐药; MDC 和 GFP-LC3 染色结果同时证实, 在过表达 miR-520d 的 TNBC 耐药细胞中自噬活性明显降低; 同时生物信息学软件预测和荧光素酶基因实验证明 Beclin1 是 miR-520d 的可能靶分子; WB 结果再次验证了 Doc 与 miR-520d mimics 联合使用可降低 TNBC 细胞中自噬相关蛋白 Beclin1 的表达和 LC3-II/I 比值。

总之, 本研究证实人在 TNBC 细胞中上调 miR-520d 水平可抑制自噬相关蛋白 Beclin1 的表达, 导致 LC3II/LC3I 比值的下降, 从而逆转 TNBC 细胞化疗耐药。miR-520d 在 TNBC 细胞自噬调控中的作用和分子机制为 TNBC 细胞化疗耐药提供了新的靶点。

[参考文献]

- [1] BHATTACHARYA R, BANERJEE K, MUKHERJEE N, et al. From molecular insight to therapeutic strategy: The holistic approach for treating triple negative breast cancer[J]. *Pathol Res Pract*, 2017, 213(3): 177-182. DOI:10.1016/j.prp.2017.01.001.
- [2] WU Z H, LIN C, LIU M M, et al. Src inhibition can synergize with gemcitabine and reverse resistance in triple negative breast cancer cells via the AKT/c-Jun pathway[J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0169230[2019-05-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5201240/>. DOI:10.1371/journal.pone.0169230.
- [3] KUMAR A, SINGH U K, CHAUDHARY A. Targeting autophagy to overcome drug resistance in cancer therapy[J]. *Future Med Chem*, 2015, 7(12): 1535-1542. DOI:10.4155/fmc.15.88.
- [4] BATTISTA R A, RESNATI M, FACCHI C, et al. Autophagy mediates epithelial cancer chemoresistance by reducing p62/SQSTM1 accumulation[J/OL]. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0201621[2019-05-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6070274/>. DOI:10.1371/journal.pone.0201621.
- [5] PAN B Z, YI J, SONG H Z. MicroRNA-mediated autophagic signaling networks and cancer chemoresistance[J/OL]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2013, 28(8): 573-578[2019-05-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3777549/>. DOI: 10.1089/cbr.2012.1460.
- [6] AFGHAHI A, TIMMS K M, VINAYAK S, et al. TumorBRCA1 reversion mutation arising during neoadjuvant platinum-based chemotherapy in triple-negative breast cancer is associated with therapy resistance[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(13): 3365-3370. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-16-2174.
- [7] WANG S M, LI X H, XIU Z L. Over-expression of Beclin-1 facili-

- tates acquired resistance to histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(18): 7913-7917. DOI:10.7314/apjcp.2014.15.18.7913.
- [8] YANG Y, WEN F B, DANG L F, et al. Insulin enhances apoptosis induced by cisplatin in human esophageal squamous cell carcinoma EC9706 cells related to inhibition of autophagy[J]. *Chin Med J*, 2014, 127(2): 353-358. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20130996.
- [9] GU Y, CHEN T X, LI G L, et al. Lower Beclin 1 downregulates HER2 expression to enhance tamoxifen sensitivity and predicts a favorable outcome for ER positive breast cancer[J/OL]. *Oncotarget*, 2017, 8(32): 52156-52177[2019-05-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5581020/>. DOI:10.18632/oncotarget.11044.
- [10] 卢岩岩, 姚楠, 许学猛, 等. miRNA-140 靶向结合自噬相关基因 ULK1 的验证[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(24): 3831-3836. DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0799.
- [11] BORTNIK S, CHOUTKA C, HORLINGS H M, et al. Identification of breast cancer cell subtypes sensitive to ATG4B inhibition[J/OL]. *Oncotarget*, 2016, 7(41): 66970-66988[2019-05-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5341851/>. DOI:10.18632/oncotarget.11408.
- [12] PAN B Z, YI J, SONG H Z. MicroRNA-mediated autophagic signaling networks and cancer chemoresistance[J/OL]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2013, 28(8): 573-578[2019-05-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3777549/>. DOI: 10.1089/cbr.2012.1460.
- [13] MOHAMMADI-YEGANEH S, HOSSEINI V, PARYAN M. Wnt pathway targeting reduces triple-negative breast cancer aggressiveness through miRNA regulation in vitro and in vivo[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 18317-18328. DOI:10.1002/jcp.28465.
- [14] DENG Y W, HAO W J, LI Y W, et al. Hsa-miRNA-143-3p reverses multidrug resistance of triple-negative breast cancer by inhibiting the expression of its target protein cytokine-induced apoptosis inhibitor 1 in vivo[J/OL]. *J Breast Cancer*, 2018, 21(3): 251-258[2019-05-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6158160/>. DOI:10.4048/jbc.2018.21.e40.
- [15] LI R X, YUAN W J, MEI W J, et al. MicroRNA 520d-3p inhibits gastric cancer cell proliferation, migration, and invasion by downregulating EphA2 expression[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 396(1/2): 295-305. DOI:10.1007/s11010-014-2164-6.
- [16] SAVAD S H, MEHDIPOR P, SHIRDAS H, et al. MiR-520d expression analysis in breast cancer[J]. *Tehran Uni Med J*, 2013, 71(2): 90-95.
- [17] TSUKERMAN P, YAMIN R, SEIDEL E, et al. MiR-520d-5p directly targets TWIST1 and downregulates the metastamiR miR-10b[J/OL]. *Oncotarget*, 2014, 5(23): 12141-12150[2019-05-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4323010/>. DOI:10.18632/oncotarget.2559.

[收稿日期] 2019-05-31

[修回日期] 2019-09-06

[本文编辑] 党瑞山