

miR-150-5p 在甲状腺癌中的表达及其生物学功能研究

吴彬,陶娟,佟萌,聂琛

(大连大学附属中山医院,辽宁 大连 116001)

摘要: [目的] 探讨微小 RNA-150-5p(miR-150-5p)在甲状腺癌组织中的表达水平及其通过 PI3K/Akt 信号通路对甲状腺癌细胞增殖和凋亡能力的影响。[方法] qRT-PCR 检测 68 例甲状腺癌患者病变组织及其相应癌旁组织中 miR-150-5p 的表达水平。将 miR-150-5p 抑制剂和阴性对照转染至人甲状腺癌 TPC-1 细胞株,以空脂质体作为对照,qRT-PCR 检测转染结果,MTT 法检测细胞增殖能力,流式细胞术检测细胞凋亡,生物信息学网站 Targetscan 预测 miRNA-150-5p 与 PI3K 的靶向结合情况,荧光素酶试验验证 miR-150-5p 与 PI3K 的靶向关系,Western blotting 检测 Cleaved caspase-3、PI3K、Akt、p-Akt 蛋白的表达。[结果] 68 例甲状腺癌患者病变组织及相应癌旁组织中 miR-150-5p 的相对表达水平分别为 0.96 ± 0.06 和 1.66 ± 0.11 ,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);空白对照组和阴性对照组中 miR-150-5p 的表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$),miR-150-5p 抑制剂组中 miR-150-5p 的相对表达量为 0.12 ± 0.02 ,明显低于空白对照组和阴性对照组 ($P < 0.05$)。空白对照组和阴性对照组 24、48 和 72h 细胞增殖率的差异无统计学意义 ($P > 0.05$),而 miR-150-5p 抑制剂组 24、48 和 72h 细胞增殖率分别为 $9.56\% \pm 1.38\%$ 、 $24.36\% \pm 4.66\%$ 和 $33.63\% \pm 5.32\%$,同一时间点均明显低于空白对照组和阴性对照组 ($P < 0.05$)。空白对照组和阴性对照组 48h 细胞凋亡率的差异无统计学意义 ($P > 0.05$),而 miR-150-5p 抑制剂组的细胞凋亡率为 $16.25\% \pm 2.98\%$,明显高于空白对照组和阴性对照组 ($P < 0.01$)。TargetScan 网站预测结果显示,miR-150-5p 可与 PI3K 互补结合,荧光素酶报告基因分析证实 miR-150-5p 与 PI3K 存在靶向结合位点。空白对照组和阴性对照组间 PI3K、p-Akt 和 Cleaved caspase3 蛋白表达的差异无统计学意义 ($P > 0.05$),miR-150-5p 抑制剂组 PI3K、p-Akt 蛋白表达低于空白对照组和阴性对照组 ($P < 0.01$),Cleaved caspase3 蛋白表达高于空白对照组和阴性对照组 ($P < 0.01$),3 组间 Akt 蛋白表达的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。[结论] miR-150-5p 在甲状腺癌组织中表达异常升高,干扰 miR-150-5p 表达能够抑制甲状腺癌 TPC-1 细胞株的增殖,并通过上调 Cleaved caspase-3 促进细胞凋亡,其调控作用可能与 PI3K/Akt 信号通路有关。

关键词: 甲状腺肿瘤;微小 RNA-150;PI3K/Akt 信号通路;增殖;凋亡

中图分类号: R736.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)06-0503-07

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.06.B004

Expression and Biological Function of miR-150-5p in Thyroid Cancer

WU Bin,TAO Juan,TONG Meng,NIE Chen

(Zhongshan Hospital Affiliated to Dalian University,Dalian 116001,China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression and biological function of microRNA-150-5p (miR-150-5p) in thyroid cancer. [Methods] The expression of miR-150-5p in cancer and adjacent tissues of 68 patients with thyroid cancer was detected by qRT-PCR. MiR-150-5p inhibitor and negative control were transfected into human thyroid cancer TPC-1 cells, and empty liposome was used as control. Transfection result was detected by qRT-PCR. After transfection, cell proliferation was determined by MTT, cell apoptosis as determined by flow cytometry. Targeted binding of miR-150-5p to PI3K was predicted through bioinformatics website TargetScan, and the targeting relationship between miR-150-5p and PI3K was verified by luciferase assay. Cleaved caspase-3, PI3K, Akt, p-Akt protein expression was determined by Western blotting. [Results] The relative expression levels of miR-150-5p in the cancer and adjacent tissues were 0.96 ± 0.06 and 1.66 ± 0.11 respectively ($P < 0.05$). The miR-150-5p expression in blank control group and negative control group was not significantly different ($P > 0.05$), and the relative expression of miR-150-5p in miR-150-5p inhibitor group was 0.12 ± 0.02 , significantly lower than that of blank control group and negative control groups ($P < 0.01$). There were no significant differences in cell proliferation rates of miR-150-5p at 24, 48 and 72h in blank and negative groups ($P > 0.05$), while those in miR-150-5p

通信作者: 吴彬,主治医师,硕士;大连大学附属中山医院乳腺甲状腺外科,辽宁省

大连市中山区解放路 6 号(116001);E-mail: wubin0862@163.com

收稿日期: 2019-03-25; **修回日期:** 2019-05-15

inhibitors group was $9.56\% \pm 1.38\%$, $24.36\% \pm 4.66\%$ and $33.63\% \pm 5.32\%$ respectively, which were significantly lower than those in blank and negative control groups at the same time points ($P < 0.05$). The apoptosis rates of blank and negative control groups had no significant difference ($P > 0.05$), while the apoptosis rate of miR-150-5p inhibitors group was $16.25\% \pm 2.98\%$, significantly higher than that of blank control group and negative control group ($P < 0.01$). TargetScan website predicted that miR-150-5p might be complementary to PI3K, and luciferase reporter gene analysis confirmed targeted binding sites between miR-150-5p and PI3K. There was no significant difference in the expression of PI3K, p-Akt and Cleaved caspase-3 protein between blank control group and negative control group ($P > 0.05$). The protein expression of PI3K and p-AKT in miR-150-5p inhibitor group was significantly lower than that of blank and negative control groups ($P < 0.01$), and Cleaved caspase-3 protein was significantly higher than that of blank and negative control groups ($P < 0.01$). The expression of Akt protein had no difference among the three groups ($P > 0.05$). [Conclusion] MiR-150-5p is abnormally expressed in thyroid cancer tissues. The expression of miR-150-5p can significantly inhibit the proliferation of thyroid cancer TPC-1 cells, and promote cell apoptosis by raising cleaved caspase-3. Its regulative function may be associated with PI3K/AKT signal pathway.

Subject words: thyroid cancer; microRNA-150 (miR-150-5p); PI3K/Akt signaling pathway; proliferation; apoptosis

甲状腺癌是人体内分泌器官中最为常见的肿瘤类型,发病率逐年递增,具有隐匿性强、进展缓慢的特点,部分患者在初次诊断时已发生转移^[1]。文献报道,甲状腺癌的发生和癌基因的活化表达相关,因此揭示甲状腺癌相关的基因和调控机制对治疗甲状腺癌具有重要意义^[2]。研究表明微小RNA(miRNA)对基因表达具有非常重要的调控作用^[3],miR-150-5p是非编码小分子RNA,由22个核苷酸构成,在多种肿瘤中呈现异常高表达,可能通过特定的信号通路参与肿瘤的发生和发展^[4]。PI3K/Akt作为重要的信号通路,在多种肿瘤中处于激活状态,参与增殖和凋亡过程。文献报道,阻断该通路能够提高肿瘤治疗效果^[5],而miR-150-5p通过PI3K/Akt信号通路调控甲状腺癌细胞增殖凋亡的机制尚少见研究报道。因此本研究通过沉默miR-150-5p的表达,探讨通过PI3K/Akt信号通路影响甲状腺癌细胞增殖、凋亡的相关机制,以期为临床治疗甲状腺癌提供新的靶点奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集2015年4月至2017年3月在我院就诊的甲状腺癌患者68例。纳入标准:(1)所有患者为初次

诊断;(2)经病理检测确认为甲状腺癌;(3)在我院经手术切除甲状腺标本。排除标准:(1)患者在术前接受过放化疗治疗;(2)由其他部位癌变转移至甲状腺者。其中男、女性比例为28:40,年龄22~65周岁,平均 43.54 ± 6.75 岁,患者病变组织切除后,立即在距离肿瘤2cm位置处切下0.6cm大小的正常甲状腺组织,同时留取同样大小的癌组织样本,快速放入RN-sae的冷存管液氮保存,样本留取过程中注意交叉污染。本实验经医院伦理委员会批准,所有研究参与患者均签署知情同意书。

1.2 细胞来源和培养

甲状腺癌TPC-1细胞株由本实验室液氮冷冻保存。TPC-1细胞株经取出后,37℃水浴溶解,加入含有10%胎牛血清的DMEM培养基,离心去上清,加入细胞培养液悬浮细胞,接种于培养瓶中,37℃、5%CO₂培养,融合度到80%时,用0.25%的胰蛋白酶消化,采用完全培养基传代。传代次数一致且细胞处于对数期,用于后续研究。

1.3 试剂和仪器

胎牛血清、胰蛋白酶、DMEM培养基、青霉素和链霉素均购自美国Gibco公司;miR-150-5p inhibitors(抑制剂)和阴性对照(货号B04005)由上海吉玛制药技术有限公司代为合成,PI3K/Akt信号通路抑制剂LY294002购自美国Cell Signaling Tech-

nology 公司;Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司;兔抗人 cleaved caspase3 抗体、辣根过氧化物标记的羊抗兔 IgG 采购自美国 Abcam 公司、兔抗人 PI3K、Akt、p-Akt 多克隆抗体;MTT 试剂盒、BCA 蛋白浓度检测试剂盒、TRIzol 试剂、PrimeScrip 反转录试剂盒采购自上海经科化学科技有限公司,细胞培养箱购自上海三腾仪器有限公司。

1.4 方法

1.4.1 qRT-PCR 检测

采用 TRIzol 试剂提取总 RNA,按照 PrimeScrip 反转录试剂盒进行反转录成 cDNA,采用 SYBR Premix Ex Taq 说明书配置 PCR 反应体系,反应条件为:95℃预变性 10min,然后 95℃ 10s,60℃ 30s,72℃ 10s,40 个循环;95℃ 5s,60℃ 1min,95℃ 30s。U6 作为内参(上游引物为 5'-CTCGCTTCG-GCAGCACA-3',下游引物为 5'-AACGCTTCAC-GAATTTGCGT-3'),miR-150-5p(上游引物为 5'-ACTGTCTCCCAACCCTTGTA-3',下游引物为 5'-GT-GCAGGGTCCGAGGT-3')相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示。每个样本独立重复实验 3 次。

1.4.2 细胞转染

调整甲状腺癌 TPC-1 细胞株浓度至 1×10^6 个/ml,取 2ml 接种于 6 孔板中,培养过夜,采用 Lipofectamine 2000 将浓度均为 100 nmol/L 的 miR-150-5p 抑制剂和阴性对照转染至细胞,以空脂质体作为空白对照。

1.4.3 MTT 法检测

将 1.3.2 中的两组细胞转染 48h 后,调整细胞浓度至 3×10^4 个/ml 接种于 96 孔板中,每孔加入 200μl 的细胞悬液,37℃、5%CO₂ 分别培养 24、48 和 72h,加入 MTT 试剂 10μl,37℃孕育 4h,在 490nm 处检测吸光值(A),计算细胞增殖率。细胞增殖率=转染组 A/空白组 A×100%。

1.4.4 流式细胞术检测

将 1.4.2 中的两组细胞转染 48h 后,采用预冷的 PBS 洗涤细胞,加入 300μl 的缓冲液悬浮细胞,调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml,取 100μl 置于流式管中,加入 Annexin V-FITC 及 PI 各 5μl,混匀室温孕育 15min,加入 400μl PBS,上机检测细胞凋亡情况。

1.4.5 生物信息学预测和荧光素酶报告基因分析

通过检索生物信息学网站 Targetscan (<http://www.targetscan.org/>) 预测 miRNA-150-5p 与 PI3K 的靶向结合情况。在此基础上,用 PCR 从大鼠星形胶质细胞基因组 DNA 中扩增 PI3K 的 3'-非翻译区(3'-untranslated region,3'-UTR)序列,构建至荧光素酶报告基因载体 pGL3(pGL3-PI3K-WT)中,同时构建突变型重组质粒(pGL3-PI3K-MUT),将 HEK293T 细胞按 30%左右密度铺 25 孔板,将 miRNA-21-5p mimic 及 mimic control 分别与空载质粒及上述质粒共转染至 HEK293T 细胞。转染后 25h,根据双荧光素酶测定试剂盒说明书检测荧光素酶活性,萤火虫荧光素酶/海肾荧光素酶活性值即为报告基因活性。

1.4.6 Western blotting 检测

取转染 48h 的 TPC-1 细胞,加入适量的 RIPA 裂解液,裂解 30min,12 000/min 4℃离心 10min,收集上清,采用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度,将蛋白样品和 Loading buffer 混合,100℃水浴变性 5min,然后加入至制备好的 SDS-PAGE 凝胶(5%浓缩胶,10%分离胶)上样孔中,每孔 25μl,浓缩胶时调整电压为 60V,分离胶电压为 120V,结束后取出凝胶,4℃转膜 1.5h,采用 5%脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 2h,加入 Cleaved caspase-3、PI3K(P110 亚基)、Akt、p-Akt 一抗,4℃过夜,TBST 洗膜后加入辣根过氧化物标记的羊抗兔 IgG,37℃孕育 2h 后加入 ECL 显影,采用自动凝胶成像系统采集图像,以 GAPDH

1.5 统计学处理

采用 SPSS 16.0 版软件处理数据。多组间比较采用单因素分析,两两比较采用独立样本 *t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-150-5p 在甲状腺癌组织和相应癌旁组织中的表达

qRT-PCR 检测结果显示,68 例甲状腺癌患者病变组织及相应癌旁组织中 miR-150-5p 的相对表达水平分别为 0.96 ± 0.06 和 1.66 ± 0.11 ,差异有统计学意义($t=9.676, P<0.001$)。见 Figure 1。

2.2 转染后 miR-150-5p 在甲状腺癌 TPC-1 细胞株中的表达

miR-150-5p 抑制剂、阴性对照和空脂质体转染甲状腺癌 TPC-1 细胞 48h 后,qRT-PCR 检测显示,

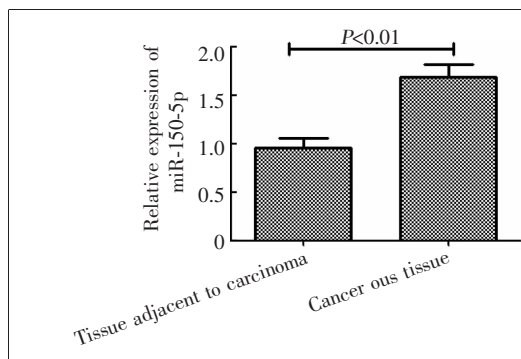


Figure 1 Expression of miR-150-5p in thyroid cancer tissues and corresponding paracancer tissues

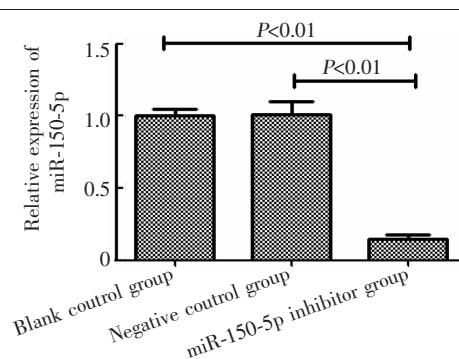


Figure 2 Expression of miR-150-5p in TPC-1 cell line of thyroid carcinoma

空白对照组和阴性对照组 miR-150-5p 的相对表达量分别为 0.96 ± 0.04 和 1.02 ± 0.06 , 组间比较差异无统计学意义 ($t=1.441, P=0.209$); miR-150-5p 抑制剂组中 miR-150-5p 的相对表达量为 0.12 ± 0.02 , 明显低于空白对照组和阴性对照组 ($t=32.533, P<0.001$; $t=24.648, P<0.001$)。见 Figure 2。

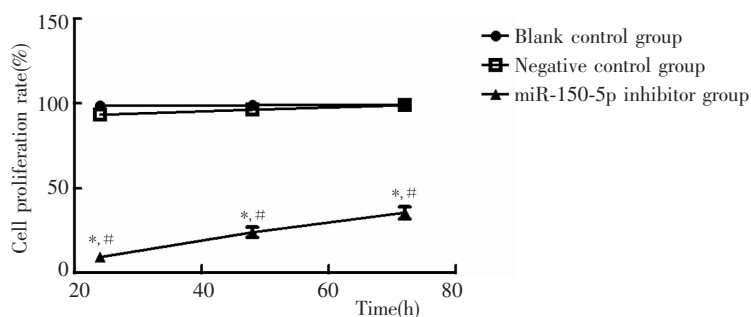
2.3 转染 miR-150-5p 抑制剂对甲状腺癌 TPC-1 细胞株增殖能力的影响

MTT 法检测转染 miR-150-5p 抑制剂后对甲状腺癌 TPC-1 细胞株增殖能力的影响, 结果显示, 空白对照组和阴性对照组 24h、48h 和 72h 细胞增殖率的差异无统计学意义 ($t=0.726, P=0.328$; $t=0.573, P=0.385$; $t=0.438, P=0.462$); miR-150-5p 抑制剂组 24h、48h、72h 细胞增殖率分别为 $9.56\% \pm 1.38\%$ 、 $24.36\% \pm 4.66\%$ 和 $33.63\% \pm 5.32\%$, 同一时间点均明显低于空白对照组 ($t=32.465, P<0.001$; $t=26.865, P<0.001$; $t=24.698, P<0.001$) 和阴性对照组 ($t=31.569, P<0.001$; $t=25.698, P<0.001$; $t=22.974, P<0.001$)。见

Figure 3。

2.4 转染 miR-150-5p 抑制剂对甲状腺癌 TPC-1 细胞株凋亡的影响

流式术检测显示, 空白对照组和阴性对照组细胞凋亡率分别为 $0.75\% \pm 0.11\%$ 和 $1.78\% \pm 0.23\%$, 差异无统计学意义 ($t=0.998, P=0.124$); 而 miR-150-5p 抑制剂组细胞凋亡率为 $16.25\% \pm 2.98\%$, 明显高于空白对照组 ($t=9.003, P<0.001$) 和阴性对照组 ($t=8.385, P<0.001$)。见 Figure 4。



Note: Compared with the blank control group, * $P<0.05$. Compared with the negative control group, # $P<0.05$

Figure 3 Effect of silencing miR-150-5p on the proliferation of TPC-1 cell lines of thyroid cancer

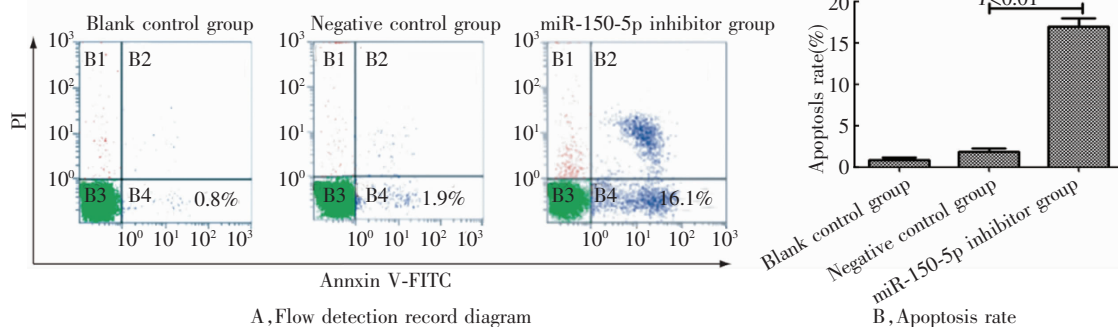
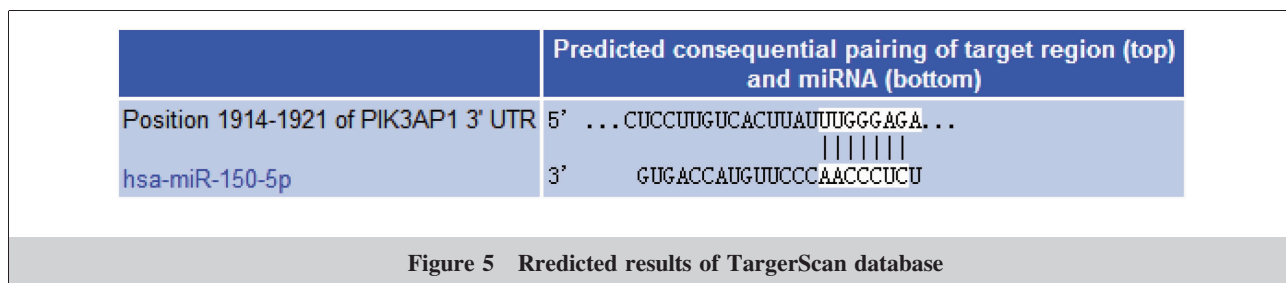


Figure 4 Effect of silencing miR-150-5p on the apoptosis of TPC-1 cell line of thyroid cancer

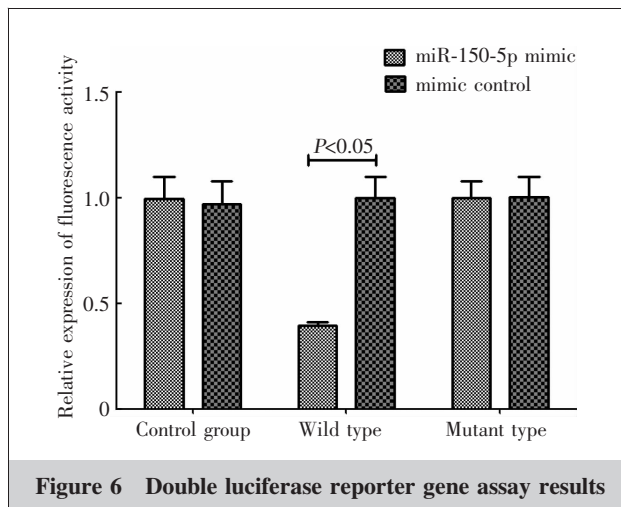


2.5 PI3K 与 miRNA-150-5p的作用关系

经 TargetScan 数据库分析发现 PI3K 的 3'-UTR 存在 miRNA-150-5p 的结合位点, 推测两者可能具有靶向调控关系。双荧光素酶报告基因结果显示, 转染 miRNA-150-5p 后, 野生型 PI3K 的荧光素酶活性被抑制($t=26.365, P<0.001$), 突变型 PI3K 的荧光素酶活性无明显变化($t=0.754, P=0.558$), 说明 PI3K 与 miRNA-150-5p 具有靶向调控关系, 见 Figure 5、6。

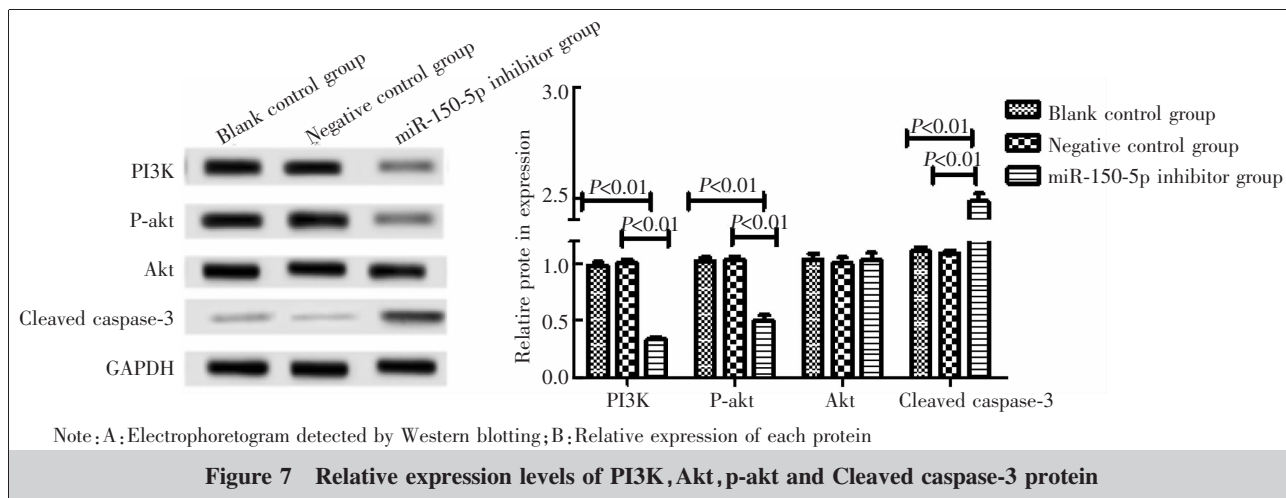
2.6 转染 miR-150-5p 抑制剂对 PI3K、Akt、p-Akt 和 Cleaved caspase-3 蛋白表达的影响

各组细胞转染后培养 48h, Western blotting 检测 PI3K、Akt、p-Akt 和 cleaved caspase-3 蛋白表达, 结果显示, 空白对照组和阴性对照组 PI3K、p-Akt 及 Cleaved caspase-3 蛋白表达差异无统计学意义 ($t=0.816, P=0.451; t=0.306, P=0.772; t=0.271, P=0.795$); miR-150-5p 抑制剂组 PI3K、p-Akt 蛋白表达显著低于空白对照组 ($t=31.225, P<0.001; t=14.066, P<0.001$) 和阴性对照组 ($t=32.186, P<0.001; t=14.337, P<0.001$), Cleaved caspase-3 蛋白高于空白对照组 ($t=35.548, P<0.001$) 和阴性对照组 ($t=32.600, P<0.001$); 3 组间 Akt 蛋白表达差异无统计学意义 ($F=0.854, P=0.402$)。见 Figure 7。



3 讨 论

甲状腺癌具有复杂的发病机制, 从分子病理角度看, 其发生、发展与其他恶性肿瘤存在相似之处, 与致癌基因、抑癌基因在不同阶段的异常表达存在相关性^[6]。miRNA 是近年来发现的长度在 21~25nt 的非编码单链小分子 RNA, 广泛存在于真核细胞中。可以通过碱基不完全互补的方式和靶基因的 3'



UTR 结合,从而引起靶基因在 mRNA 水平降解或引起蛋白翻译抑制^[7]。众多研究报道,miRNAs 参与到了肿瘤的增殖、凋亡过程,扮演着抑癌或促癌的角色^[8]。miR-150-5p 定位于人类染色体 19q13.33, Dinh 等^[9]研究发现 miR-150-5p 在肺癌细胞中表达上调,并且可能通过调控下游的 p53 基因影响细胞表型改变。Suetsugu 等^[10]通过检测胃癌细胞株和组织中 miR-150-5p 的表达,发现其处于高表达状态。Inoue 等^[11]基于 miRNA 图谱,采用 QPCR 检测发现 miR-150-5p 在胃癌中异常高表达。RNA 干扰是由双链 DNA 引起的特异性基因沉默,抑制率高,且对细胞毒性小,是目前研究基因功能主要采用的工具。Zhang 等^[12]通过小分子 RNA 干扰 miR-150-5p 在鼻咽癌细胞中的表达,发现细胞的侵袭能力显著下降;Li 等^[13]通过小分子 RNA 干扰 miR-150-5p 在多发性骨髓瘤细胞中的表达,发现细胞的增殖能力明显受到抑制,凋亡能力明显增强。本研究也采用小分子 RNA 干扰 miR-150-5p 在甲状腺癌细胞株 TPC-1 中的表达,结果显示,空白对照组和阴性对照组 24、48 和 72h 细胞增殖率的差异无统计学意义,而 miR-150-5p 抑制剂组 24、48 和 72h 细胞增殖率均明显低于空白对照组和阴性对照组。转染 48h,空白对照组和阴性对照组细胞凋亡率的差异无统计学意义,而 miR-150-5p 抑制剂组细胞凋亡率明显高于空白对照组和阴性对照组,提示 miR-150-5p 在甲状腺癌的发生、发展过程中可能起重要作用。

研究 miRNA-150-5p 与甲状腺癌之间的相关性,对于理解病理机制及寻找疾病的治疗靶点具有重要的意义。研究表明^[14],miRNA 是通过碱基互补配对对于目标蛋白靶向结合发挥生物学功能。本研究应用 TargetScan 数据库预测,miR-150-5p 与 PI3K 存在结合位点,经双荧光素酶报告基因分析显示,PI3K 与 miR-150-5p 具有靶向调控关系。Wei 等^[15]研究发现,下调结肠癌细胞 miR-150-5p 的表达,PI3K 表达受到抑制,从而促进肿瘤细胞的凋亡。本研究中,抑制甲状腺癌细胞 TPC-1 中 miR-150-5p 的表达后,PI3K 表达量明显下调,与预测结果及既往研究相符。

PI3K/Akt 信号通路通过胞内信号传递在细胞迁移、动员、分化和抗凋亡等细胞生存调节过程中发挥重要的作用,在近年来的研究中越来越受到重视^[16]。

作为重要的靶蛋白,PI3K 在多种生物学效应的介导中发挥重要的作用,PI3K 通过 PDK1 使 Akt 磷酸化,随着 Akt 磷酸化水平的增高,促进下游通路中 caspase 蛋白的表达,caspase 可将自身底物水解传递至凋亡通路,引起蛋白酶级联反应导致细胞程序性死亡。Cleaved caspase3 是 caspases 级联反应中下行的最关键蛋白酶,在凋亡程序中起到中枢作用^[17]。PI3K/Akt/Cleaved caspase3 信号通路与细胞凋亡的关系已被广泛证实。Liu 等^[18]发现,在肺癌细胞中该通路受到明显增强,Cleaved caspase3 蛋白表达下降,而通过 PI3K/Akt 信号通路抑制剂 LY294002 处理后,Cleaved caspase3 蛋白表达量明显升高,癌细胞凋亡率明显增加。在本次实验中,miR-150-5p inhibitor 组 TPC-1 细胞中 Akt 的磷酸化程度明显下降,Cleaved caspase3 蛋白表达明显升高。因此推测,miRNA-150-5p 可能通过调节 PI3K/Akt/Cleaved caspase3 信号通路影响甲状腺癌的进展。

综上所述,干扰 miR-150-5p 的表达能够显著抑制甲状腺癌 TPC-1 细胞株的增殖,并通过上调 Cleaved caspase-3 来促进细胞凋亡,其调控作用可能与 PI3K/Akt 信号通路有关。

参考文献:

- [1] Ancker O, Wehland M, Bauer J, et al. The adverse effect of hypertension in the treatment of thyroid cancer with multi-kinase inhibitors[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(3):625.
- [2] Gong L, Xu Y, Wen SS, et al. The role of SATB1 in the initiation of PI3K /Akt signaling pathway in thyroid carcinoma[J]. *Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2016, 15(14):1352-1356.[龚龙, 许颖, 温飒飒, 等. SATB1 在甲状腺癌启动 PI3 K/Akt 信号通路中的作用研究[J]. *临床和实验医学杂志*, 2016, 15(14):1352-1356.]
- [3] Mei JY, Zhang MJ, Wang YY, et al. The positive clinical therapeutically effects of Escin on advanced thyroid cancer[J]. *Cancer Med*, 2017, 6(5):937-943.
- [4] Zhang BN, Yan RY, Zhou JL, et al. Expression and function of miRNA in thyroid carcinoma[J]. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*, 2018, 38 (3):167-170. [张倍宁, 闫如意, 周金莲, 等. 甲状腺癌中 miRNA 的表达及作用[J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2018, 38(3):167-170.]
- [5] Luo Y, Li X, Dong J, et al. MicroRNA-137 is downregulated in thyroid cancer and inhibits proliferation and invasion by targeting EGFR[J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(6):7749-7755.

- [6] Ramírez-Moya J, Wert-Lamas L, Santisteban P. MicroRNA-146b promotes PI3K/AKT pathway hyperactivation and thyroid cancer progression by targeting PTEN [J]. *Oncogene*, 2018, 37(25):3369–3383.
- [7] Zhao JY, Wang X, Li YH, et al. Bioinformatics method in screening of potential miRNAs biological marker, target gene function and signal pathways in thyroid cancer [J]. *Medical and Pharmaceutical Journal Chian PLA*, 2017, 29(12):5–9. [赵建英, 王玄, 李云慧, 等. 生物信息学方法筛选甲状腺癌潜在的 miRNAs 生物学标志物及靶基因功能和信号通路分析 [J]. *解放军医药杂志*, 2017, 29(12):5–9.]
- [8] Pishkari S, Paryan M, Hashemi M, et al. The role of microRNAs in different types of thyroid carcinoma: a comprehensive analysis to find new miRNA supplementary therapies [J]. *J Endocrinol Invest*, 2018, 41(3):269–283.
- [9] Dinh TKT, Fendler W, Chabubńska-Fendler J, et al. Circulating miR-29a and miR-150 correlate with delivered dose during thoracic radiation therapy for non-small cell lung cancer [J]. *Radiat Oncol*, 2016, 11(1):61.
- [10] Suetsugu T, Koshizuka K, Seki N, et al. Downregulation of matrix metalloproteinase 14 by the antitumor miRNA, miR-150-5p, inhibits the aggressiveness of lung squamous cell carcinoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2018, 52(3):913–924.
- [11] Inoue T, Iinuma H, Ogawa E, et al. Clinicopathological and prognostic significance of microRNA-107 and its relationship to DICER1 mRNA expression in gastric cancer [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(6):1759–1764.
- [12] Zhang XF, Huang YJ, Xiao J, et al. Mechanism research of miR-150 promoting the proliferation and invasion of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Chinese General Practice*, 2016, 19(21):2513–2517. [张先锋, 黄远见, 肖娟, 等. MiR-150 促进鼻咽癌细胞增殖和侵袭的机制研究 [J]. *中国全科医学*, 2016, 19(21):2513–2517.]
- [13] Li YZ, Qian Y, Shan Y, et al. Role of microRNA-150 in proliferation, migration and invasion of conjunctival mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma [J]. *Academic Journal of Second Military Medical University*, 2017, 38(6):727–733. [李玉珍, 钱昱, 单彧, 等. MicroRNA-150 在结膜黏膜相关淋巴组织淋巴瘤增殖, 迁移及侵袭中的作用 [J]. *第二军医大学学报*, 2017, 38(6):727–733.]
- [14] Sambandan S, Akbalik G, Kochen L, et al. Activity-dependent spatially localized miRNA maturation in neuronal dendrites [J]. *Science*, 2017, 355(6325):634–637.
- [15] Wei X, Wang W, Wang L, et al. Micro RNA-21 induces 5-fluorouracil resistance in human pancreatic cancer cells by regulating PTEN and PDCD 4 [J]. *Cancer Med*, 2016, 5(4):693–702.
- [16] Shi XP, Li J, Ran JH, et al. Ginsenoside Rh2 induced human colorectal cancer cell apoptosis through PI3K/AKT/GSK-3 β pathway [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2017, 33(1):114–119. [石雪萍, 李静, 冉建华, 等. 人参皂苷 Rh2 调控 PI3 K/AKT/GSK-3 β 信号通路诱导人结肠癌细胞凋亡 [J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(1):114–119.]
- [17] Tang Q, Tian Y, Ye T, et al. Effects of Acupuncture-rehabilitation therapy on apoptosis and expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein and cleaved-caspase-9 in ischemic penumbra of rats with cerebral ischemia [J]. *Chinese Journal of Rehabilitation Theory and Practice*, 2017, 23(12):1365–1371. [唐强, 田源, 叶涛, 等. 针康法对脑缺血大鼠缺血半暗区细胞凋亡及 X 连锁凋亡抑制蛋白和 cleaved-caspase-9 蛋白表达的影响 [J]. *中国康复理论与实践*, 2017, 23(12):1365–1371.]
- [18] Liu F, Gao S, Yang Y, et al. Antitumor activity of curcumin by modulation of apoptosis and autophagy in human lung cancer A549 cells through inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(3):1523–1531.