

甲基化调控 microRNA 表达影响胰腺癌 细胞增殖、迁移、侵袭的研究

胡开锋, 杨秋韵, 董婧颖, 杨晓龙, 彭 恒, 陈利弘, 孙 艺, 马兰枝, 刘 戟[△]

四川大学华西基础医学与法医学院 生物化学与分子生物学教研室 (成都 610041)

【摘要】 目的 研究基因启动子区甲基化对胰腺癌相关 microRNA(miR34a、miR34b、miR148a、miR203a)表达水平的调控, 及其对胰腺癌细胞增殖、迁移、侵袭能力的影响。**方法** 通过 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)去甲基化处理胰腺癌细胞 MIAPaca-2, 使用甲基化特异性 PCR (methylation-specific PCR, MSP) 法检测 60 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR 处理组及 0 $\mu\text{mol/L}$ 对照组 MIAPaca-2 细胞目标 microRNA 启动子甲基化水平的变化; 用荧光实时定量 PCR 检测处理组及对照组目标 microRNA 表达水平的改变; CCK-8 法、划痕实验以及 Transwell 法检测胰腺癌细胞去甲基化处理后处理组和对对照组增殖、迁移、侵袭能力的变化。**结果** MSP 法结果显示处理组较未处理组目标 microRNA 甲基化 M 条带灰度值减弱, 非甲基化 U 条带灰度值增强, 处理组目标 microRNA 启动子甲基化程度较对照组减弱。荧光实时定量 PCR 结果显示处理组较未处理组目标 microRNA 相对表达量升高($P<0.05$), 处理组 microRNA 的表达水平随去甲基化处理而升高。CCK-8 法显示随着药物处理浓度的增加, 处理组细胞抑制率增高, 去甲基化处理抑制了胰腺癌细胞的增殖能力。划痕实验结果显示处理组较未处理组细胞伤口愈合率降低($P<0.01$), 去甲基化处理降低了胰腺癌细胞的迁移能力。Transwell 法结果显示处理组较未处理组穿膜细胞数减少($P<0.01$), 去甲基化处理降低了胰腺癌细胞的侵袭能力。**结论** 肿瘤细胞去甲基化处理, 导致 4 种目标 microRNA 高表达, 抑制了胰腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

【关键词】 microRNA 甲基化 5-Aza-CdR 胰腺癌 增殖 迁移

The Study of Methylated Regulation MicroRNA in Pancreatic Carcinoma Cell and Its Effect on Cell Proliferation, Migration and Invasion HU Kai-feng, YANG Qiu-yun, DONG Jing-ying, YANG Xiao-long, PENG Heng, CHEN Li-hong, SUN Yi, MA Lan-zhi, LIU Ji[△]. Department of Biochemistry and Molecular Biology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: liuji6103@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the epigenetic regulation of pancreatic carcinoma related microRNA (miR34a, miR34b, miR148a and miR203a) expression by gene promoter methylation, and its effect on the proliferation, migration and invasion of pancreatic carcinoma cells. **Methods** The pancreatic carcinoma cells were divided into two groups: control group and treatment group. Control group was treated with 0 $\mu\text{mol/L}$ DNA methyltransferase inhibitor 5-Aza-CdR and treatment group was treated with 60 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR. The methylation status of microRNA gene promoter regions was detected by MSP (methylation-specific PCR). The microRNAs' expression levels were evaluated by real-time PCR. The CCK-8 assay, wound healing assay and Transwell assay were employed to study the proliferation, migration and invasion of pancreatic carcinoma cells, respectively. **Results** The results of MSP showed that the methylated band of the treated group was weaker than that of the untreated group and the unmethylated band of the treated group was stronger than that of the untreated group. Real-time PCR results showed that the relative expression levels of microRNAs in the treatment group were higher than those in the control group ($P<0.05$). The CCK-8 assay showed that inhibition rate of the treatment group showed dose-dependent effect with the increase of drug concentration. Wound healing assay showed that the wound healing rate of Treatment group was lower than that of untreated group ($P<0.01$). The results of transwell assay showed that the number of migrated cells in the treated group was less than that in the untreated group ($P<0.01$). **Conclusion** Decreased methylation levels in microRNA promoter region caused by 5-Aza-CdR treatment increased the expression of miR34a, miR34b, miR148a and miR203a, leading to inhibition of the proliferation, migration and invasion of pancreatic carcinoma cells.

【Key words】 microRNA Methylation 5-Aza-CdR Pancreatic carcinoma Proliferation Migration

胰腺癌是一种临床常见的恶性肿瘤,其发病率高、预后较差,临床实践中尚无有效的手段能够控制、治愈这种消化系统常见的恶性肿瘤^[1]。深入研究探讨胰腺癌发生发展的具体分子机制,对实现胰腺癌的早期诊断和有效治疗、改善胰腺癌患者的临床预后具有十分重要的意义。

微小 RNA (microRNA) 是近年来发现的一类进化十分保守、长度约为 15~25 nt 的非编码 RNA 家族,在肿瘤研究中,根据其下游作用的靶基因的不同,可将其分为类似癌基因或抑癌基因性质的两大类 microRNA^[2]。DNA 的甲基化造成的基因表达沉默是一种调节基因表达重要的表观遗传调控方式。部分 microRNA 的表达同样也受这种方式的调控^[3]。近年来很多研究报道 DNA 异常甲基化造成一些 microRNA 的表观遗传沉默可能是一些恶性肿瘤发生发展的重要原因^[4-6]。

本研究以胰腺癌细胞 MIAPaca-2 为对象,通过甲基化特异性 PCR(MSP)法检测去甲基化药物 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)处理胰腺癌细胞后甲基化状态的变化,检测甲基化状态的改变所引起的 microRNA 基因表达水平的变化,以及去甲基化处理后胰腺癌细胞增殖迁移能力的变化,旨在阐明基因组甲基化状态对 microRNA 表达的调节及 microRNA 表达水平变化后,对胰腺癌细胞增殖迁移能力的影响,从表观遗传学的角度探讨了胰腺癌发生发展可能的分子机制,为胰腺癌的早期诊断和有效治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料

人胰腺癌细胞 MIAPaca-2 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化,EZ 甲基化试剂盒购自 Zymo Research,PCR Master Mix 和 SYBR Green PCR Mix 购自 TaKaRa 公司,TRE-Trizol 购自 Invitrogen 公司,Mir-x RNA 逆转录试剂盒购自购自 Clontech。胎牛血清(FBS)DMEM-F12 培养基购自 BI 公司,5-Aza-CdR 购自 Sigma 公司,Transwell 小室购自 Corning 公司,CCK-8 试剂购自日本同仁公司。其余化学分析纯试剂均购自成都科龙化工。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 MIAPaca-2 胰腺癌细胞使用含 10% FBS 和含 1% 双抗的 DMEM-F12 培养基于

37 °C、体积分数 5% CO₂ 的细胞培养箱培养。

1.2.2 MSP 法检测 MIAPaca-2 胰腺癌细胞中 4 个 microRNA 启动子甲基化水平 将 MIAPaca-2 细胞分为两组(对照组和处理组),分别用 5-Aza-CdR 浓度为 0 μmol/L(对照组)、60 μmol/L(处理组)的 DMEM-F12 培养基处理 72 h,然后提取细胞基因组 DNA,进行亚硫酸盐处理转化(使用 EZ 甲基化试剂盒)使未发生甲基化的 C 碱基转化为 U 碱基,发生甲基化的 C 碱基则不发生改变。取处理转化后的 DNA 模板 2 μL 进行 PCR 扩增检测。使用文献验证的特异性甲基化引物,通过甲基化与非甲基化引物条带扩增情况,反映几个 microRNA 甲基化水平的变化。具体引物序列及退火温度^[7-9]参见表 1。PCR 总反应体系 25 μL,其中 PCR Mix 12.5 μL,ddH₂O 8.5 μL,上、下游引物各 1 μL,DNA 模板 2 μL,反应程序设定为 95 °C 预变性 5 min;变性 95 °C 30 s,退火 30 s,各引物退火温度如表 1 所示;延伸 72 °C 30 s;共计 35 个循环;72 °C 10 min。PCR 反应结束后取产物 10 μL 进行 20 g/L 琼脂糖电泳,凝胶成像仪检测电泳条带灰度值。

1.2.3 Real-time PCR 检测 4 个 microRNA 表达水平 分组培养 72 h 后,使用 Trizol 提取对照组和处理组细胞总 RNA,提取后的总 RNA 使用 Mir-x RNA 逆转录试剂盒通过 Poly A 加尾法逆转录为 cDNA。以 U6 基因作为内参,取逆转录的 cDNA 进行 Real-time PCR。U6 引物序列上游:5'-GGAAC GATACAGAGAAGATTAGC-3',下游:5'-TGGA ACGCTTCACGAA TTTGCG -3'。通用下游引物为 Mir-x RNA 逆转录试剂盒试剂盒自带,上游特异性引物序列 miR34a:5'-GTGGCAGTGTCTTAGC TGGTTGT-3'; miR34b: 5'-GGTAGGCAGTGTC ATTAGCTGATTG-3'; miR148a: 5'-GGCTCAG TGC ACTACAGAACTTTG-3'; miR203a: 5'-GCG TGAAATGTTT TAG GACCACTAG-3'。总反应体系 25 μL,其中 SYBR Green PCR Mix 12.5 μL,ddH₂O 8.5 μL,上、下游引物各 1 μL,cDNA 模板 2 μL,Real-time PCR 反应条件为试剂盒推荐两步法反应程序 95 °C 预变性 30 s;变性 95 °C 5 s,退火延伸 60 °C 30 s;共计 40 个循环。用 2^{-ΔΔC_t} 法进行结果统计。

1.2.4 CCK-8 法检测胰腺癌细胞增殖能力 将对数生长期的 MIAPaca-2 细胞用胰酶消化后,进行细胞计数,调整细胞密度至 1.5×10⁴ mL⁻¹,以每孔

表 1 MSP 引物序列

Table 1 Primers used in the methylation-specific PCR			
Gene	Primer sequence (5'-3')	Length/ bp	Annealing temperature/℃
miR34a	MF;GGGGATGAGGATTAGGATTTC	155	62
	MR;ACAAAAACGCATAAAAAACGACG		
	UF;GGGGATGAGGATTAGGATTTT	157	60, 5
miR34b	UR;CAAAACAAAACATAAAAAACAACA	158	55
	MR;ACTACAACCTCCCAACGATC		
	UF;TGGTTTAGTTATGTGTGTGTGT	162	56
miR148a	UR;CAACTACAACCTCCAAACAATCC	103	55
	MF;TTTAAAGGGAATTGGTTAAGTTTTC		
	MR;CGAATAACCCCTAATAACACGTC	103	57
miR203a	UF;TAAGGGAATTGGTTAAGTTTGT	131	60
	UR;ACCAATAAACCTAATAACACATC		
	MF;AGGTGCGTTTAGGTTAGGC	131	62
	MR;CATAAATCCCGCGACTAATC		
	UF;GTTAGGTGTGTTTAGGTTAGGT		
	UR;CCCATAAATCCCACTAATCC		

MF: Methylated forward primer; MR: Methylated reverse primer; UF: Unmethylated forward primer; UR: Unmethylated reverse primer

100 μ L 细胞悬液接种至 96 孔板,共接种 4 块板,待培养 24 h 细胞贴壁后将培养基替换为 5-Aza-CdR 浓度分别为 0 μ mol/L、20 μ mol/L、40 μ mol/L、60 μ mol/L 的培养基,每个药物浓度设 4 个平行复孔。将 96 孔板放入培养箱于 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO_2 条件继续培养,分别于 24 h、48 h、72 h 后各取出一板,每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂继续培养 3 h 后置于酶标仪,于 450 nm 波长处进行比色,测定吸光度,计算细胞抑制率,绘制生长曲线。

1.2.5 细胞划痕实验检测胰腺癌细胞迁移能力
将对数生长期 MIAPaca-2 细胞用胰酶消化后并计数,以每孔 1.5×10^5 个细胞密度接种于 6 孔板中,待孔中细胞生长至完全融合后,用 10 μ L 枪头进行划痕,划痕后将每孔中原有培养基分别更换为 5-Aza-CdR 浓度为 0 μ mol/L、60 μ mol/L 的无血清培养基,置于倒置显微镜 40 倍镜下观察拍照并测量记录细胞伤口宽度。培养箱 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO_2 条件继续培养 48 h 后取出培养板于相同位置拍照记录伤口宽度,计算伤口 48 h 愈合率,愈合率 = [(0 h 伤口宽度 - 48 h 伤口宽度) / 0 h 伤口宽度] $\times$ 100%。

1.2.6 Transwell 实验检测胰腺癌细胞侵袭能力
将对数生长期 MIAPaca-2 胰腺癌细胞用胰酶消化后并计数,分别用 5-Aza-CdR 浓度为 0 μ mol/L、60 μ mol/L 的 0.5% 血清培养基将细胞重悬,两种细胞悬液分别取 300 μ L,以每孔 1.8×10^5 个细胞密度分别接种于 Transwell 小室上室中,下室加入 700 μ L 20% 血清培养基。培养箱 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO_2 条件继续培养 48 h 后取出小室吸去原有培养基并用 PBS 清洗干净,用棉签擦去上室未穿

膜残留细胞。将上室置于体积分数 10% 甲醇溶液中固定 5 min,室温晾干小室后将上室置于 0.1% 结晶紫染液中染色 30 min,洗去染液待上室晾干后置于倒置显微镜 100 倍镜下,随机选取 5 个视野观察并记录穿膜细胞数。

1.3 统计学方法

组间比较采用配对样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MSP 法检测 5-Aza-CdR 处理后 microRNA 启动子甲基化结果

结果(图 1)显示,处理组细胞相对于对照组细胞甲基化引物扩增条带(M 条带)灰度值减弱,miR34b、miR148a、miR203a 差异有统计学意义($P < 0.05$),miR34a M 条带灰度变化差异无统计学意义($P > 0.05$)。非甲基化引物扩增条带(U 条带)灰度值增强,miR34a、miR34b、miR148a、miR203a 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。提示 5-Aza-CdR 处理细胞 72 h 后这 4 个 microRNA 甲基化水平降低,其中 miR34a 转变为部分甲基化状态,miR34b、miR148a、miR203a 转变为低甲基化状态。

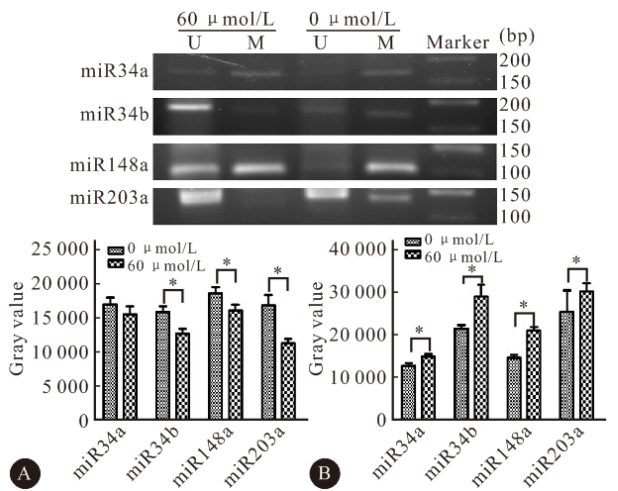


图 1 5-Aza-CdR 处理 MIAPaca-2 细胞 72 h 后 4 个 microRNA 的甲基化状态

Fig 1 The methylation status of microRNAs in MIAPaca-2 cells treated with 5-Aza-CdR for 72 h (A: M band; B: U band)

* $P < 0.05$; M: Methylation; U: Unmethylation

2.2 Real-time PCR 检测 5-Aza-CdR 处理细胞后 microRNA 表达结果

见图 2。处理组 4 个 microRNA 的相对表达量均较对照组高($P < 0.05$)。

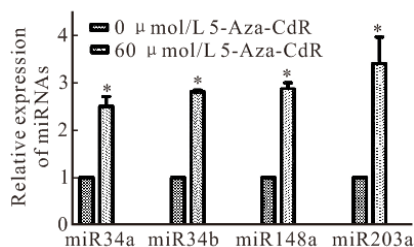


图2 5-Aza-CdR 处理 MIAPaca-2 细胞 72 h 后 4 个 microRNA 的表达水平

Fig 2 The expression levels of microRNAs in MIAPaca-2 cells treated with 5-Aza-CdR for 72 h

* $P < 0.05$, vs. 0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR group

2.3 CCK-8 法检测 5-Aza-CdR 处理后胰腺癌细胞增殖结果

结果如图 3 所示, MIAPaca-2 细胞经含不同浓度 5-Aza-CdR 的培养基处理后, 细胞增殖受到抑制, 且随着药物浓度和作用时间的增加, 细胞抑制率逐渐升高。不同浓度 5-Aza-cdR 作用各时间点抑制率差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

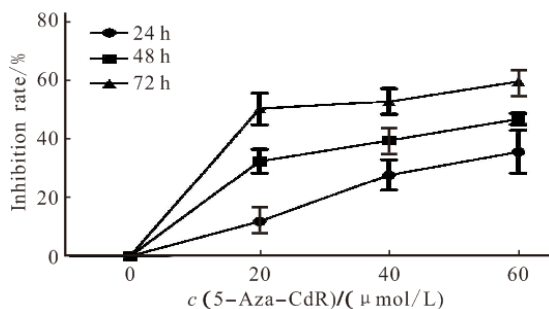


图3 5-Aza-CdR 处理后 MIAPaca-2 细胞的增殖抑制率

Fig 3 Inhibition rate of MIAPaca-2 cell treated with 5-Aza-CdR

2.4 划痕实验检测 5-Aza-CdR 处理后胰腺癌细胞迁移结果

划痕实验结果显示, 相对于 0 $\mu\text{mol/L}$ 对照组, MIAPaca-2 细胞经含 60 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR 的培养基处理 48 h 后, 愈合率明显降低 [(62.13 $\pm$ 2.17)% vs. (36.00 $\pm$ 3.00)%], 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 结果如图 4 所示。提示 5-Aza-CdR 去甲基化处理造成的 microRNA 表达增高, 抑制了胰腺癌细胞的迁移生长能力。

2.5 Transwell 实验检测 5-Aza-CdR 处理后胰腺癌细胞侵袭结果

Transwell 实验结果 (图 5) 显示, 相对于 0 $\mu\text{mol/L}$ 对照组, MIAPaca-2 细胞经含 60 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR 的培养基处理 48 h 后, 穿膜细胞数明显减少 [(53.8 $\pm$ 4.60)/HP vs. (30.00 $\pm$ 3.40)/HP],

差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

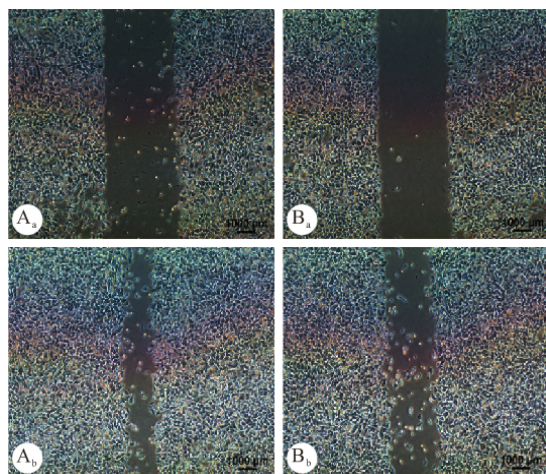


图4 划痕实验检测 5-Aza-CdR 处理后 MIAPaca-2 细胞的迁移能力

Fig 4 The migration of MIAPaca-2 cell treated with 5-Aza-CdR detected by wound healing assay

A, B; 0, 60 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR group; a, b; 0, 48 h

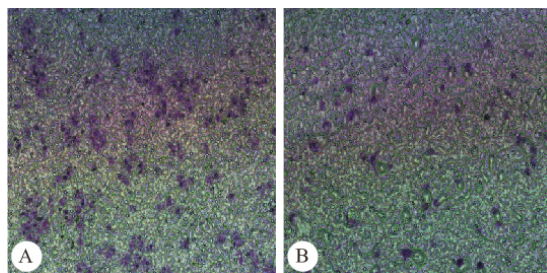


图5 Transwell 实验检测 5-Aza-CdR 处理后 MIAPaca-2 细胞的侵袭能力

Fig 5 The invasion of MIAPaca-2 cell treated with 5-Aza-CdR detected by Transwell

A, B; 0, 60 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR group

3 讨论

胰腺癌是一种危害人类健康的重大疾病, 其发病人数约占目前已知恶性肿瘤的 2%, 其具有早期诊断难度大, 传统放化疗不敏感, 预后差等特点。病死率接近 100%, 总体 5 年生存率小于 5%^[10]。且近年发病率呈逐渐上升的趋势, 故阐明胰腺癌发生发展的分子机制, 对于胰腺癌的早期诊断和治疗具有重大意义。

microRNA 是一类重要的非编码 RNA, 其可以调控细胞的生长、分化、增殖等、发挥重要的生理功能。近年的研究表明 microRNA 与众多的肿瘤发生有关, 其可以在恶性肿瘤的发生发展中起到类似癌基因或抑癌基因的作用, 参与恶性肿瘤的发病过程^[11-12]。很多常见恶性肿瘤中都可以检测到

microRNA 的表达异常,而 DNA 的甲基化修饰则是影响 microRNA 表达的重要因素^[13-14]。SAITO 等^[15]使用 DNA 甲基转移酶(DNMT)抑制剂 5-Aza-CdR 处理肿瘤细胞,发现 miR127 恢复表达,首次证明了表观遗传调控如 DNA 的甲基化修饰可以影响 microRNA 的表达。

在本研究中我们选取了 4 个目标 microRNA (miR34a, miR34b, miR148a, miR203a)作为研究对象,miR34a、miR34b 属于 miR34 家族成员,这一家族成员表达受表观遗传修饰的调控,可被 P53 激活表达,在肿瘤发生发展中起着重要作用。miR148a 与 miR203a 均可作用于其下游靶基因 DNMTs,影响 DNMTs 的转甲基作用,且其自身也受甲基化调控,在 DNA 甲基化修饰中发挥着重要作用。本研究使用甲基转移酶抑制剂 5-Aza-CdR 处理胰腺癌细胞 MIAPaca-2,通过 CCK-8 法确定了合适的药物处理浓度,药物处理浓度在 60 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞生长受到了明显抑制,同时通过显微镜下观察未发现细胞有明显的漂浮死亡及变性等形态的异常改变,排除了药物本身毒性作用对细胞的影响。然后通过 MSP 法检测 5-Aza-CdR 处理组及未处理对照组细胞几个目标 microRNA 启动子区域的甲基化水平。同时本研究通过 Real-time PCR 检测了处理组及未处理对照组细胞几个目标 microRNA 的表达情况,并通过 CCK-8、划痕实验、Transwell 检测了胰腺癌细胞经 5-Aza-CdR 去甲基化处理后其增殖、迁移、侵袭能力的变化。划痕实验中由于 MIAPaca-2 细胞自身生长速度很快,48 h 后即出现对照组伤口先于实验组愈合,之后处理组与对照组细胞呈复数生长,可能无法检测组间迁移生长能力差异,故后续实验中我们选择 48 h 为检测时间。

实验结果表明胰腺癌细胞经过药物去甲基化处理后,几个目标 microRNA 启动子区域甲基化水平相对于未处理对照组细胞降低,同时几个目标 microRNA 的基因表达水平较未处理对照组升高。CCK-8、划痕实验、Transwell 的结果显示胰腺癌细胞经过去甲基化药物处理药物后,其增殖、迁移、侵袭能力减弱。综合上述实验结果我们可以推断:5-Aza-CdR 处理抑制了甲基转移酶的活性,使几个目标 microRNA 启动子区域甲基化水平降低,甲基化造成的基因表达沉默作用减弱,基因表达恢复。几个目标 microRNA 可能在胰腺癌的发生发展中起类似抑癌基因的作用,其 DNA 异常甲基化被药物减弱后,表达重新恢复,致使胰腺癌细胞的增殖、迁

移、侵袭能力减弱。XIAO 等^[16]使用 5-Aza-CdR 处理肺癌细胞 A549 与 SPCA1,发现了与本研究类似的结果,表明部分 microRNA 在肿瘤细胞中的表达受到 DNA 甲基化的调控,从而对肿瘤细胞的行为产生影响。

本研究从表观遗传角度入手,阐述了胰腺癌细胞中几个目标 microRNA 异常表达与 DNA 甲基化调控之间的关系及其对胰腺癌细胞增殖、迁移、侵袭能力的影响。有助于从表观遗传及 microRNA 角度寻找新的肿瘤标志物及治疗方法,可为胰腺癌的早期分子诊断及有效治疗提供一定理论基础。

参 考 文 献

- [1] JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, *et al.* Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*, 2009, 59(4):225-249.
- [2] LI XQ, GUO YY, DE W. DNA methylation and microRNAs in cancer. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(9):882-888.
- [3] IORIO MV, PIOVAN C, CROCE CM. Interplay between microRNAs and the epigenetic machinery: an intricate network. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1799(10/11/12):694-701.
- [4] BANDRES E, AGIRRE X, BITARTE N, *et al.* Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer. *Int J Cancer*, 2009, 125(11):2737-2743.
- [5] TSAI KW, LIAO YL, WU CW, *et al.* Aberrant hypermethylation of miR-9 genes in gastric cancer. *Epigenetics*, 2011, 6(10):1189-1197.
- [6] WONG KY, SO CC, LOONG F, *et al.* Epigenetic inactivation of the miR-124-1 in haematological malignancies. *PLoS One*, 2011, 6(4):e19027[2017-01-18]. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0019027>.
- [7] 胡 芝, 胡飞红, 许践刚, 等. 启动子甲基化下调宫颈鳞癌组织 miR-34a 表达. *温州医科大学学报*, 2013, 43(5):311-314.
- [8] 邵 佳, 何爱琴, 张玉泉, 等. miRNA-34 甲基化与卵巢癌临床病理特征及预后的关系. *江苏大学学报(医学版)*, 2014, 24(6):513-516.
- [9] CHENG XD, HU HM, GUAN XY, *et al.* CpG island methylation status of miRNAs in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 2012, 130(7):1607-1613.
- [10] HIDALGO M. Pancreatic cancer. *N Engl J Med*, 2010, 362(17):1605-1617.
- [11] HAMMOND SM, SHARPLESS NE. HMGA2, microRNAs, and stem cell aging. *Cell*, 2008, 135(6):1013-1016.
- [12] HE L, HE X, LIM LP, *et al.* A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*, 2007, 447(7148):1130-1134.
- [13] AGIRRE X, VILAS-ZORNOZA A, JIMENEZ-VELASCO A, *et al.* Epigenetic silencing of the G tumor suppressor microRNA Hsa-miR-124a regulates CDK6 expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*, 2009, 69(10):4443-4453.
- [14] LUJAMBIO A, ROPERO S, BALLESTAR E, *et al.* Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res*, 2007, 67(4):1424-1429.
- [15] SAITO Y, LIANG G, EGGER G, *et al.* Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*, 2006, 9(6):435-443.

(2017-03-23 收稿, 2017-08-29 修回)

编辑 汤 洁