

miR-195 表达在乳腺癌细胞对阿霉素药物敏感性中的意义*

杨 舸^{1,2}, 蒋 鸥¹, 吴道全¹, 袁平衷¹, 李传达¹, 翁亚光², 朱 静², 田 杰² (1. 泸州医学院附属内江市第二人民医院, 四川内江 641000; 2. 重庆医科大学检验医学院, 重庆 400014)

【摘要】 目的 调控 miR-195 在乳腺癌细胞中的表达对阿霉素药物 (ADR) 敏感性的影响及其作用机制进行研究。方法 利用脂质体将成熟 miR-195 模拟物 (miR-195 mimic) 及阴性对照转染至乳腺癌细胞 MCF-7, 采用实时定量聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测细胞中 miR-195 的表达变化; 采用 MTT 比色法及流式细胞术 (FCM) 检测转染 miR-195 模拟物及其对照经 ADR 作用后细胞的增殖及凋亡; Western-blot 检测细胞中 Raf-1、P-gp、Bcl-2 蛋白的表达。结果 转染 miR-195 mimic 后, 明显上调了细胞中 miR-195 的表达水平 ($P < 0.01$); 在 miR-195 mimic 与 ADR 联合作用后, 明显抑制了细胞的增殖, 其敏感性与对照组相比, 提高近 2.5 倍 ($P < 0.05$), 同时促进了细胞的凋亡 ($P < 0.05$); Western-blot 检测发现在转染 miR-195 mimic 后, 细胞中 Raf-1 蛋白及 BCL-2、P-gp 蛋白的表达显著降低 ($P < 0.01$)。结论 在乳腺癌细胞中, miR-195 作为抑癌基因, 能够有效促进乳腺癌细胞对 ADR 所介导的化疗敏感性, 其作用机制至少部分是通过 miR-195 负性调控 Raf-1 蛋白的表达来实现。

【关键词】 乳腺癌细胞; 阿霉素; 药物敏感性; 微小 RNA

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.15.002 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)15-2043-04

Significance of microRNA-195 expression in breast cancer cells to adriamycin drug sensitivity YANG Ge^{1,2}, JIANG Ou¹, WU Dao-quan¹, LI Chuan-da¹, WENG Ya-guang², ZHU Jing², TIAN Jie² (1. Clinical Laboratory, the Second People's Hospital Affiliated to Luzhou Medical College in Neijiang City, Sichuan, 641000, China; 2. College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

【Abstract】 **Objective** Study on the possibility of regulating Micro RNA(miRNA)195 expression to increase the sensitivity of the breast cancer cell (MCF-7) to adriamycin (ADR) and its mechanism. **Methods** Transfect through liposome the mature Micro RNA(miRNA)195 mimic and its negative contrast into MCF-7 and detect changes of Micro RNA(miRNA)195 in the cells by Real-time PCR; detect Micro RNA(miRNA)195 mimic and its contrast by MTT colorimetric method and FCM, and detect cells' reproduction and apoptosis after the effect of ADR; detect by Western-blot the protein expression of Raf-1, P-gp and Bcl-2 in the cells. **Results** The Micro RNA(miRNA)195 expression in the cells increases significantly ($P < 0.01$) after the transfection of Micro RNA(miRNA)195 mimic; the combined effect of Micro RNA(miRNA)195 mimic and ADR significantly suppresses the cell reproduction, its sensitivity increases almost 2.5 times ($P < 0.05$) in comparison with the control group, and the apoptosis rate of the cells increases; it is observed that, by Western-blot detection, the protein expressions of Raf-1, Bcl-2 and P-gp in the cells decrease significantly ($P < 0.01$) after the transfection of Micro RNA(miRNA)195 mimic. **Conclusion** Micro RNA(miRNA)195, as the tumor suppressor gene in breast cancer cells, can effectively increase the chemotherapy sensitivity of breast cancer cells to ADR mediation. Its mechanism is realized at least partly by Micro RNA(miRNA)195's negative regulation on Raf-1 protein.

【Key words】 breast cancer cell; adriamycin; drug sensitivity; microRNA

乳腺癌是妇女中最为常见的恶性肿瘤。作为传统的化疗药物阿霉素 (ADR) 仍然被认为是最常用和有效的药物。然而, 如何提高阿霉素药物对癌细胞的敏感性目前已成为一个重要的临床问题。微小 RNA(miRNA) 是真核细胞中一类参与基因转录后调控的非编码小分子 RNA, 也是一类近年来新发现的非编码小 RNA 分子。随着 miRNA 所介导的肿瘤细胞增殖或凋亡等相关研究成果的积累, 将 miRNA 的靶向调控作为化疗干预的一个新手段现在获得了更多关注。Iorio 等^[1] 对乳腺癌患者的癌组织 miRNA 表达谱进行了系统地分析, 发现这些 miRNA 表达异常可能诱发乳腺癌, 并在肿瘤的分类及预后方面起着重要的潜在作用。同时也有研究发现, 通过调控

miRNA 的表达可影响细胞周期蛋白 D1 以及抗细胞凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 增强乳腺癌细胞对化疗药物的敏感性^[2]。miR-195 属于 miR-15 家族成员, 定位于染色体 17p13.1 位点。研究表明在多种实体肿瘤组织中, miR-195 作为一种抑癌基因也参与到肿瘤细胞的增殖或凋亡过程中。过表达 miR-195 能够明显抑制肿瘤的侵袭, 同时能够提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[3-4]。但是, 对于 miRNA 所涉及的乳腺癌细胞对 ADR 药物敏感性方面的研究报道较少, 特别是 miR-195 在参与肿瘤药物敏感性的调控机制方面还没有被广泛研究。因此, 针对特定 miRNA 进行调控, 上调其在肿瘤细胞中的表达, 对于有效提高化疗药物对肿瘤细胞的细胞毒性并针对性治疗具有重要作用。

* 基金项目: 四川省卫生计生科研课题 (2012120293); 重庆市科委基金基础项目 (2011jjA10060)。

作者简介: 杨舸, 男, 博士, 主管检验技师, 主要从事微环境中 microRNA 的调控对肿瘤细胞增殖、分化的影响研究。

△ 通讯作者, E-mail: alexindraY@hotmail.com。

1 材料与与方法

1.1 仪器与试剂 乳腺癌细胞株 MCF-7 购自上海生工生物研究所;PRMI-1640 及胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司;阿霉素药物(ADR)购自浙江海正药业公司;小鼠抗人 Raf-1、BCL-2 及 P-gp 单克隆抗体均购自美国 Abcam 公司;HR 标记的羊抗小鼠 IgG(二抗)购自美国 Abcam 公司;MTT 及二甲基亚砜(DMSO)购自美国 BD 公司;脂质体转染试剂 Lipofectamine™ 2000 及 TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;microRNA 检测试剂盒购自 Takara 公司;流式检测用 AV/PI 双标试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;蛋白印迹电转仪(Bio-Rad 美国);凝胶图像分析仪(Bio-Rad 美国);流式细胞检测仪(BD Bioscience 美国);酶标仪((Bio-Rad 美国);全自动荧光定量 PCR 仪(Eppendorf 美国)。

1.2 细胞培养 人类乳腺癌细胞株(MCF-7)购自中科院上海生物工程研究所。细胞在含有 10% 胎牛血清 RPMI-1640 完全培养液中培养,37 °C,5% CO₂ 培养箱孵育,每隔 3 d 传代 1 次。

1.3 KT-PCR 检测转染 miR-195 mimic 后,细胞中 miR-195 的表达 miR-195 模拟物(miR-195 mimic)及对照分别用脂质体 lip2000 转染进入 MCF-7 细胞中,48 h 后抽提细胞总 RNA 用于 PCR 检测。按照 TaqMan microRNA Isolation Kit 试剂盒说明书提取细胞总的 RNA,采用紫外分光光度计检测 RNA 稀释液在 A260 和 A280 比值,计算 miR-195 的含量。根据文献报道中的方法,设计茎环结构(Stem-loop)的 mRNA 逆转录引物,其中包含 40 bp 的茎环结构,所用各个基因引物序列如下所示,所有引物均用 Primer 5.0 软件设计,并由上海生物工程有限公司合成。其特异性引物序列为,目的基因 miR-195 RT primer:GCG CGT GAG CAG GCT GGA GAA ATT AAC CAC GCG CGC CAA T; miR-195 F: CCT AGC AGC ACA GAA A;R:GAG CAG GCT GGA GAA;U6-1(内参基因)U6 RT primer:CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT;U6 F: CTC GCT TCG GCA GCA CAT A;U6 R: CGC TTC ACG AAT TTG CGT G。反转录反应条件的设置:25 °C 10 min,42 °C 60 min,85 °C 5 min;扩增条件的设置:94 °C 4 min;94 °C 20 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s 循环 35 次,72 °C 检测信号。反应完成后得到目的基因 miR-195 及内参基因 U6 的 CT 值,根据公式计算目的基因相对含量,mRNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm SE$ 表示。

1.4 转染 miRNA mimic 入细胞 转染前一天,取对数生长的 MCF-7 细胞,胰蛋白酶消化细胞后调整细胞浓度以 5×10^5 个/孔密度接种至 6 孔细胞培养板中,再加入不含抗生素的培养基入培养板,使转染时的细胞密度能够达 50% 左右。分别取 miR-195 mimic 及对照各 20 nmol/L,与脂质体 lipo2000 1 μL 组成混合液后加入含有细胞的 400 μL 培养基的培养孔中,轻轻混匀;培养 6 h 后,将孔中含 miRNA-lipo2000 混合液的培养基移去,更换新鲜含血的完全培养基,将培养板置于 37 °C 的 CO₂ 培养箱中培养。

1.5 MTT 比色法检测细胞存活力 将转染 miR-195 mimic 或对照 24 h 后的 MCF-7 细胞,以细胞密度为 1×10^5 /孔并接种于 96 孔板,待细胞贴壁生长后,分别加入终浓度为 0、10、50、100、200、500、1 500 ng/mL 的 ADR 药物,每个浓度设置 4 个复孔,并设置调零孔及空白对照孔。37 °C,5% CO₂ 培养箱孵育 48 h,弃去原培养液,每孔加入无血清的 RPMI-1640 培养液 90 μL,再加入 MTT 液(5 mg/mL,0.5% MTT)20 μL,放入 37 °C,5% CO₂ 培养箱分别孵育 4 h,弃去孔内培养液终止培

养。每孔加入 DMSO 200 μL,置摇床振荡 10 min,使结晶重复溶解,在自动酶标仪上 A570 nm 处测得各孔吸光度值。

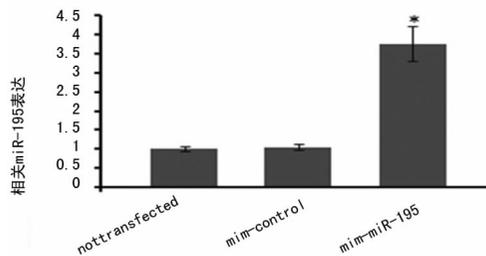
1.6 Annexin V-APC/PI 双标法流式细胞仪(FCM)检测细胞的凋亡 取对数生长的 MCF-7 细胞,以细胞密度为 2×10^5 /孔接种于 24 孔板,待细胞生长至密度为 50% 时,转染 miR-195 mimic 或对照,37 °C,5% CO₂ 孵育 24 h 后弃去原培养基,加入含 500 ng/mL ADR 药物的无血培养基作用 48 h 后去掉原培养基,无酶消化液(0.02% EDTA)处理细胞制成细胞悬液,再加入 Binding buffer 漂洗并重新悬浮细胞,取 100 μL 约 1×10^6 个细胞数,分别加入 5 μL 的 Annexin V-APC 和 10 μL 20 μg/mL 的 PI,充分混匀后室温下避光孵育 10 min;采用 Annexin V-APC/PI 双标法,流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.7 蛋白印迹分析 配制 8% 分离胶和 12% 浓缩胶;待检蛋白溶液与 2× 蛋白上样缓冲液等体积混匀,沸水加热 3~5 min 后加样电泳;将滤纸、胶、PVDF 膜、滤纸按顺序半干转膜 1 h;取出 PVDF 膜放入封闭液中,置于摇床室温缓慢振荡 1 h 后,分别以小鼠抗人 Raf-1、P-gp 及 Bcl-2 单克隆抗体作为一抗,再置 4 °C 孵育 12 h;磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 PVDF 膜后加入辣根过氧化物酶(HR)标记二抗;应用化学发光增强试剂盒反应 1 min,采用 Image-Pro Plus 5.1 软件对凝胶电泳图进行分析。

1.8 统计学方法 用 SPSS10.0 软件处理,所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两个样本均数间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

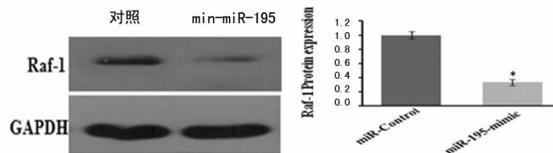
2.1 miRNA mimic 对细胞中 miR-195 的表达的影响 在转染 miR-195 mimic 进入 MCF-7 后,采用 KT-PCR 检测细胞中 miR-195 的表达,结果在转染 miR-195 mimic 组与对照组相比,miR-195 的表达明显上调近 3 倍,差异有统计学意义($P < 0.01$),说明转染 miR-195 mimic 能够有效调控细胞中 miR-195 的表达。见图 1。



注:n=3,* $P < 0.01$,与对照细胞,t-实验。

图 1 MCF-7 细胞转染 miR-195 mimic 后 miR-195 的表达

2.2 乳腺癌 MCF-7 细胞 miRNA mimic 转染前后,细胞中 Raf-1 蛋白的表达 Western-blot 检测细胞转染前后 Raf-1 蛋白的表达情况,结果在转染 miR-195 mimic 模拟物至 MCF-7 细胞后,与阴性对照组相比,Raf-1 蛋白的表达水平则是明显下降,其水平下降达到 68.7%,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 2。



注:n=3,* $P < 0.01$,与对照细胞,t-实验。

图 2 MCF-7 细胞转染 miR-195 mimic 及对照后 Raf-1 蛋白的表达

2.3 转染 miRNA mimic 后, MTT 法测定对细胞增殖的影响 采用 MTT 比色分析, 细胞的增殖活力随着 ADR 浓度的增加呈现明显降低的趋势。同时在采用 miR-195 mimic + ADR 联合作用后, 与 miR-Control + ADR 对照组相比, 细胞的增殖活力明显受抑, 在对照组中细胞的 IC₅₀ 为 500 ng/mL; 而通过 miR-195 mimic + ADR 联合作用后, 细胞的 IC₅₀ 则为 200 ng/mL, 增敏倍数达到 2.5 倍, 明显抑制了细胞的增殖活力, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 3。

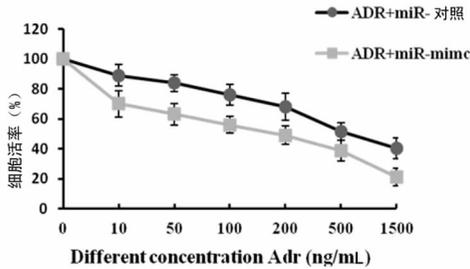


图 3 加入不同浓度的 ADR 药物作用后细胞增殖的比较

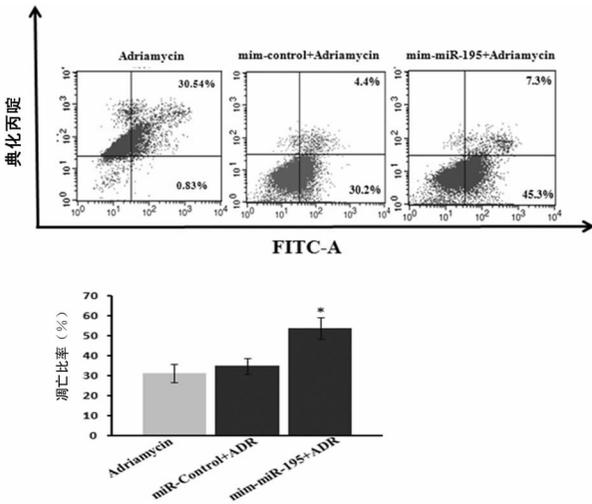


图 4 加入 500 ng/mL 的 ADR 药物作用后 FCM 检测对细胞凋亡的影响

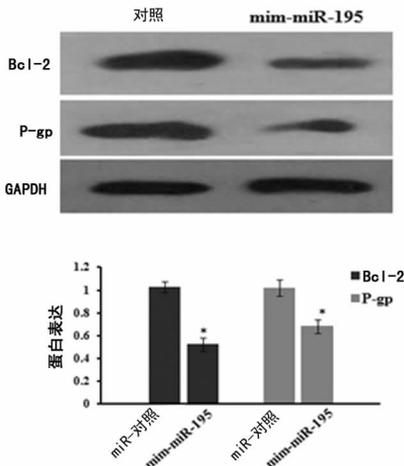


图 5 MCF-7 细胞转染 miR-195 mimic 及对照后 BCL-2 和 P-gp 蛋白的表达

2.4 转染 miRNA mimic 后促进了 ADR 药物介导的细胞凋

亡 MCF-7 细胞经转染 miR-195 mimic 并经 500 ng/mL 的 ADR 药物作用后, 利用 Annexin V-APC 及 PI 双重染色进行流式细胞仪分析的方法检测细胞的凋亡情况。结果显示, 在采用 miR-195 mimic + ADR 联合作用后, 与 miR-Control + ADR 对照组相比, 细胞的凋亡水平明显增加, 细胞凋亡比率从 (34 ± 3)% 提高至 (53 ± 6)% , 凋亡比率提高近 20% , 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 4。

2.5 转染 miRNA mimic 后, 细胞中 Bcl-2 及 P-gp 蛋白的表达 MCF-7 细胞经转染 miRNA mimic 后, Western-blot 检测细胞中抗细胞凋亡蛋白 Bcl-2 及多重耐药相关糖蛋白 P-gp (P-glycoprotein) 的表达变化。结果可见在转染 miR-195 mimic 抑制 Raf-1 后, 两种细胞中 Bcl-2 及 P-gp 蛋白的表达与对照组相比, 均呈现明显下降的趋势, 以 NC 组蛋白的表达为 1, 则在转染 miR-195 mimic 后, Bcl-2 及 P-gp 蛋白分别下降近 58% 和 32% , 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 5。

3 讨论

肿瘤细胞耐药性是导致化疗失败的主要障碍。研究者最近发现, 在当前的化疗过程中, 异常的 miRNA 表达可能参与了肿瘤细胞的耐药^[5-6]。因此, 认为 miRNA 作为肿瘤治疗的一个靶点, 通过调控肿瘤细胞中 miRNA 的表达, 不仅能够产生直接的抗肿瘤作用, 还能够有效改善化疗药物的治疗效果。当前一些 miRNAs 已经与多种实体瘤中的抗癌治疗作用及耐药性相联系, 例如通过调控 miR34a 或 miR-451 在乳腺癌细胞中的表达, 能够有效提高乳腺癌细胞对紫杉醇药物的敏感性^[7-8]。而在胃癌细胞中, 由于 miR-15 和 miR-16 对 Bcl-2 的负性调控, 能够增强化疗药物长春新碱所诱导的细胞凋亡^[9]。还有研究也发现, miR-195 在许多实体瘤中处于低表达状态, 并且扮演着抑癌基因的角色^[10-11]。但是 miR-195 在参与肿瘤药物敏感性的调控机制还没有被广泛研究。近年来信号通路作为抗癌药物的靶点受到广泛关注, 而与 Ras/Raf/MEK/ERK 相关的细胞内信号转导途径被认为是经典 MAPK 信号转导途径。Raf-1 是丝裂原激酶家族中重要的成员, 参与细胞增殖、凋亡和分化。研究表明在多种实体瘤中高 Raf-1 蛋白激酶活性与肿瘤细胞对化疗药物的耐受有关^[12]。因此, 在乳腺癌中通过调控 miR-195 的表达, 对影响乳腺癌细胞的生物学功能以及细胞对阿霉素药物敏感性的作用机制进行研究具有重要意义。

本次研究发现, 采用 ADR 药物与 miR-195 mimic 联合作用, 经转染 miR-195 mimic 上调细胞中 miR-195 的表达, 明显抑制了 ADR 药物所介导的乳腺癌细胞的增殖, 同时促进了细胞的凋亡。结果表明, 转染 miR-195 mimic 上调 miR-195 在细胞中的表达, 提高了乳腺癌细胞对 ADR 的敏感性。细胞对 ADR 作用的 IC₅₀ 由 500 ng/mL 降低至 200 ng/mL, 细胞的增殖活力明显降低, 同时促进 ADR 所介导的细胞凋亡比率从 (31 ± 3)% 提高至 (53 ± 6)%。这些结果或许说明针对肿瘤细胞中特定的 miRNA, 调控其在肿瘤细胞中的表达, 对于有效提高化疗药物对肿瘤细胞的细胞毒性具有重要作用。本次研究也发现, 在乳腺癌 MCF-7 细胞中, miR-195 参与了对 Raf-1 的调控作用。转染 miR-195 mimic 上调 miR-195 在细胞中的表达后, 细胞中 Raf-1 蛋白的表达水平明显受抑, 其下降水平与对照相比达到 68.7%。结果说明 miR-195 能够互补结合到 Raf-1 的 mRNA 的 3' 端非编码区域, 导致 mRNA 翻译的受抑, 从而降低细胞中 Raf-1 蛋白的表达, 这也与 Flavin 等^[13] 的研究报道相一致。他们通过在构建的针对 Raf-1 的荧光素酶报告载体中发现, miR-195 能够直接靶向作用于 Raf-1 的表达。并且 Li 等^[14] 证实 miR-195 对 Raf-1 蛋白的负性调控, 与乳

腺癌细胞增殖、细胞周期停滞甚至与凋亡有关。这或许说明采用 miR-195 的负性调控 Raf-1 蛋白的表达后,细胞药物敏感性的增加是由于抑制了 Raf-1 蛋白的表达,解除了 Raf/MEK/ERK 信号通路对促细胞凋亡相关的下游靶效应因子的抑制作用,从而增加了细胞的凋亡比率。因此,进一步研究 miR-195 负性调控 Raf-1 蛋白的表达如何影响细胞对药物的敏感性的作用机制显得尤为重要。本次研究结果也表明,miR-195 负性调控 Raf-1 蛋白的表达,细胞中耐药相关蛋白 Bcl-2 及 P-gp 的表达也明显受抑,分别下降近 58% 和 32%,而这两种蛋白的表达增强是影响乳腺癌细胞对 ADR 药物敏感性的重要因素。Bcl-2 是最重要的细胞凋亡抑制基因,该基因的过表达可以促进细胞的生存,同时抑制细胞对化疗药物产生的凋亡作用。而 P-gp 糖蛋白是一种药物转运蛋白,位于细胞膜表面,具有药物结合和转运功能,将药物从细胞内泵出细胞外,降低细胞内药物浓度并减轻细胞毒作用,从而减低细胞对药物的敏感性^[15]。相关研究也表明,Raf-1 蛋白激酶在细胞中的过表达会导致下游靶激酶所介导的转录因子磷酸化,这些转录因子结合在 Bcl-2 及 P-gp 基因的启动子序列会刺激转录的发生,从而上调乳腺癌细胞中 Bcl-2 及 P-gp 这两种蛋白在细胞中的表达水平^[16]。因此,通过提高 miR-195 在细胞中的表达水平,不仅能够下调 P-gp 和 Bcl-2 蛋白在细胞中的表达,同时也能够有效提高乳腺癌细胞对阿霉素药物的敏感性。

综上所述,通过采用 miR-195 的负性调控 Raf-1 蛋白的表达,提高乳腺癌细胞对 ADR 的药物敏感性的作用机制部分或至少是通过作用于 Raf-1 蛋白信号的途径来实现,这可能为临床提高乳腺癌的化疗效果提供新的策略。随着对 miRNA 参与调节乳腺的发生和发展的作用机制研究的不断深入,今后有望能将 miRNA 作为乳腺癌早期诊断和治疗的有效手段及新的思路。

参考文献

[1] Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast Cancer[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(16): 7065-7070.

[2] Kastl L, Brown I, Schofield AC. miRNA-34a is associated with docetaxel resistance in human breast Cancer cells[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 131(2): 445-454.

[3] Zhang QQ, Xu H, Huang MB, et al. MicroRNA-195 plays a tumor-suppressor role in human glioblastoma cells by targeting signaling pathways involved in cellular proliferation and invasion[J]. *Neuro Oncol*, 2012, 14(3): 278-287.

[4] Fei X, Qi M, Wu B, et al. MicroRNA-195-5p suppresses glucose uptake and proliferation of human bladder Cancer T24 cells by regulating GLUT3 expression[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(4): 392-397.

[5] Ellis LM, Hicklin DJ. Resistance to targeted therapies: re-

fining anticancer therapy in the era of molecular oncology[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(24): 7471-7478.

[6] Foekens JA, Sieuwerts AM, Smid M, et al. Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast Cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(35): 13021-13026.

[7] Kastl L, Brown I, Schofield AC. miRNA-34a is associated with docetaxel resistance in human breast Cancer cells[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 131(2): 445-454.

[8] Kovalchuk O, Filkowski J, Meservy J, et al. Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast Cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(7): 2152-2159.

[9] Xia L, Zhang D, Du R, et al. miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric Cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(2): 372-379.

[10] Liu L, Chen L, Xu Y, et al. microRNA-195 promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity of human colorectal Cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 400(2): 236-240.

[11] 赵志强, 阴彬, 彭小忠. miR-195 过表达促进人神经胶质瘤细胞 T98G 凋亡[J]. *基础医学与临床*, 2012(7): 783-787.

[12] Abrams SL, Steelman LS, Shelton JG, et al. The Raf/MEK/ERK pathway can govern drug resistance, apoptosis and sensitivity to targeted therapy[J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(9): 1781-1791.

[13] Flavin RJ, Smyth PC, Laios A, et al. Potentially important microRNA cluster on chromosome 17p13. 1 in primary peritoneal carcinoma[J]. *Mod Pathol*, 2009, 22(2): 197-205.

[14] Li D, Zhao Y, Liu C, et al. Analysis of MiR-195 and MiR-497 expression, regulation and role in breast Cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(7): 1722-1730.

[15] Aliabadi HM, Mahdipoor P, Uludağ H. Polymeric delivery of siRNA for dual silencing of Mcl-1 and P-glycoprotein and apoptosis induction in drug-resistant breast Cancer cells[J]. *Cancer Gene Ther*, 2013, 20(3): 169-177.

[16] Watanabe M, Miyajima N, Igarashi M, et al. Sodium phenylacetate inhibits the Ras/MAPK signaling pathway to induce reduction of the c-Raf-1 protein in human and canine breast Cancer cells[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 118(2): 281-291.

(收稿日期: 2013-11-25 修回日期: 2014-04-30)

(上接第 2042 页)

[9] 李小华, 王俊然, 冬国友, 等. 高危型人乳头瘤样病毒 DNA 检测在宫颈癌早期筛查中的作用[J]. *重庆医学*, 2013, 42(8): 939-940.

[10] 金红雁, 黄惠娟, 陆红梅. HPV、TCT 及阴道镜对宫颈癌筛查的意义[J]. *中国妇幼保健*, 2010, 25(29): 4307-4308.

[11] 徐惠. 阴道镜在宫颈病变诊断中的应用[J]. *中国医药导报*, 2011, 8(5): 151-152.

[12] Gupta N, John D, Dudding N, et al. Factors contributing to false-negative and potential false-negative cytology reports in SurePath? liquid-based cervical cytology[J]. *Cytopathology*; Official Journal of the British Society for Clinical Cytology, 2013, 24(1): 39-43.

(收稿日期: 2013-11-20 修回日期: 2014-01-23)