

山奈酚通过调控 miR21 抑制非小细胞肺癌 A549 细胞增殖的研究

杨生辉, 黄琰菁, 莫安薇, 邱纯, 孙达统, 李向璐, 盛莉, 李赛, 陈邓林, 邢雪花, 王琳* (海南省人民医院肿瘤内科, 海口 570311)

摘要:目的 研究山奈酚(kaempferol, KA)对非小细胞肺癌 A549 细胞增殖的抑制作用及其作用机制。方法 运用 CCK-8 细胞活力检测法和集落形成实验研究不同浓度的 KA 对非小细胞肺癌 A549 细胞存活率的影响, 确定给药浓度; 将 A549 细胞分为对照组及 KA 各剂量组, 采用 qPCR 检测不同浓度 KA 对 A549 细胞中 miR21 表达的影响; 运用 miR21 mimc 转染 A549 细胞过表达 miR21, 采用 qPCR 和 Western blotting 检测 miR21 和不同浓度 KA 给药作用后对 PTEN/AKT 信号通路的影响。结果 CCK-8 和集落形成实验证实 KA 可抑制非小细胞肺癌 A549 细胞的增殖; 30, 90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KA 处理 24 h 均可降低 A549 细胞中 miR21 水平和 p-AKT、c-Myc、Cyclin D1 的表达水平, 升高 PTEN 水平, 而 miR21 mimc 转染后 p-AKT、c-Myc、Cyclin D1 的表达水平均升高, 而 PTEN 水平降低, 并经 rescue 实验证实 miR21 mimc 转染后可阻断 KA 抑制 A549 细胞增殖的作用。结论 KA 能够通过调控 miR21/PTEN/AKT 信号通路抑制非小细胞肺癌 A549 细胞增殖。

关键词: 山奈酚; miR21; 非小细胞肺癌; 增殖

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2020)13-1557-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.13.004

引用本文: 杨生辉, 黄琰菁, 莫安薇, 等. 山奈酚通过调控 miR21 抑制非小细胞肺癌 A549 细胞增殖的研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(13): 1557-1562.

Effect of Kaempferol on the Proliferation of Non-small Cell Lung Cancer A549 Cells by Regulating miR21

YANG Shenghui, HUANG Yanjing, MO Anwei, QIU Chun, SUN Datong, LI Xianglu, SHENG Li, LI Sai, CHEN Denglin, XING Xuehua, WANG Lin* (Department of Oncology, Hainan General Hospital, Haikou 570311, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the inhibitory effect of kaempferol(KA) on the proliferation of non-small cell lung cancer A549 cells and its mechanism. **METHODS** CCK-8 cell viability assay and colony formation assay were used to study the effect of KA on the survival rate of A549 cells and determine the treatment concentration of KA. A549 cells were divided into control group and different doses of KA group, and the effects of different concentrations of KA on the expression of microRNA in A549 cells were detected by qPCR. A549 cells were transfected by miR21 mimc. Overexpression of miR21 in A549 cells was detected by qPCR. The effects of miR21 and KA on PTEN/AKT signaling pathway were detected by Western blotting and qPCR. **RESULTS** CCK-8 and colony formation assays demonstrated that KA could inhibit the proliferation of non-small cell lung cancer A549 cells. KA treatment for 24 h at 30, 90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ obviously reduced the expression of miR21 and p-AKT, c-Myc, Cyclin D1 in A549 cells, and increased the expression of PTEN. However, the expression of p-AKT, c-Myc and Cyclin D1 was upregulated and PTEN was downregulated after miR21 mimc transfection. Finally the rescue experiment confirmed that KA induced inhibitory proliferation effect of A549 cells could be blocked by miR21 mimc transfection. **CONCLUSION** KA can inhibit the proliferation of non-small cell lung cancer A549 cells via regulating the miR21/PTEN/AKT signaling pathway.

KEYWORDS: kaempferol; miR21; non-small cell lung cancer; proliferation

肺癌包括鳞状细胞癌、腺癌、大细胞癌等, 是世界上最常见的恶性肿瘤之一^[1-2]。肺癌已经成为全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤, 每年全球超过 100 万人死于肺癌^[3-4]。非小细胞肺癌约占所有肺癌的 80%^[5], 大部分患者临床被确诊时已经处于中晚期, 生存率低, 严重威胁人类生命健康。

目前化疗仍然是非小细胞肺癌的主要治疗方法。近年来, 研究调控肿瘤细胞生长、增殖的靶基因抑制肿瘤细胞增殖成为了肿瘤预防和治疗的新思路。因此寻找有效抑制肿瘤增殖靶基因的药物对于防治非小细胞肺癌具有重要意义。

山奈酚(kaempferol, KA)是一种黄酮类化合

基金项目: 海南省自然科学基金项目(813218)

作者简介: 杨生辉, 女, 硕士, 主治医师 Tel: 17789850156
Tel: (0898)68642120 E-mail: wanglin7209@163.com

E-mail: 3324851803@qq.com *通信作者: 王琳, 男, 博士, 主任医师

物,主要存在于姜科植物山奈的根茎中,研究表明其具有防癌、抗癌、抗炎、抗氧化、抗菌、抗病毒等多种功效^[6-8]。MicroRNA 是一种细胞内天然生成的高度保守非编码小 RNA,参与细胞增殖、分化、凋亡等多种生命活动进程^[9-10]。Zhang 等^[11]研究表明 miR21 对非小细胞肺癌 A549 细胞增殖具有促进作用。大量研究^[12-13]表明 KA 能够通过抑制 miR21 的表达抑制多种肿瘤细胞增殖。但是关于 KA 调控 miR21 抑制非小细胞肺癌增殖的研究报道较少,因此本实验以非小细胞肺癌 A549 细胞作为研究对象,探讨 KA 对非小细胞肺癌 A549 细胞增殖的抑制作用及其作用机制,为 KA 防治非小细胞肺癌提供参考。

1 材料

1.1 细胞

非小细胞肺癌 A549 细胞株购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。

1.2 药品与试剂

KA(上海阿拉丁试剂有限公司,批号:K107144;纯度>98%); miR21 precursor 由汉恒生物科技有限公司构建;胎牛血清(批号:10099-141-FBS)、DMEM 高糖培养基(批号:12491-015)、青-链霉素(批号:15070063)均购自美国 Gibco 公司;胰蛋白酶(鼎国试剂公司,批号:CC-0101);CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所,批号:CK04); miR21、c-Myc、Cyclin D1、 β -actin 上下游引物和探针由 InvitrogenTM 公司设计并合成; miR21 mimc(上海吉玛生物技术有限公司);荧光定量 PCR 试剂(DBI 公司,批号:DBI-2073); PTEN(货号:9552S)兔单克隆抗体、p-AKT(Thr308)(货号:13038)兔单克隆抗体、c-Myc(货号:5605)兔单克隆抗体、Cyclin D1(货号:2978)兔单克隆抗体、 β -actin(货号:4970)兔单克隆抗体、辣根过氧化物酶-羊抗兔 IgG 二抗(货号:7074)均购自美国 CST 公司;BCA 蛋白定量试剂盒(批号:23227)、ECL 超敏化学发光液(批号:34580)、细胞蛋白提取试剂(批号:78501)、RNA 提取试剂(批号:15596026)均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;PAGE-SDS 凝胶快速制备试剂盒(美国 EpiZyme Scientific 公司,批号:18D250);其余试剂均为实验室常用规格,水为超纯水。

1.3 仪器

MCO-18AC CO₂ 培养箱(日本三洋公司);酶标

仪(xMark)、Trans-Blot 蛋白转膜系统、TC20 细胞计数器、CFX96 Real-time PCR 仪均来自美国伯乐公司;3-5N 医用离心机(湖南恒诺仪器设备有限公司);MS-TS 分析天平(梅特勒-托利多公司);G:BOX 化学成像分析系统(英国 Syngene 公司);CKX31 倒置显微镜(日本奥林巴斯公司);涡旋仪(Vortex Mixer);DZKW-S-8 恒温水浴锅(苏州江东精密仪器有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

A549 细胞用含 10%胎牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素、100 μ g·mL⁻¹链霉素的 DMEM 高糖培养基(以下简称“培养基”),在 37 °C,CO₂ 浓度为 5% 的培养箱中培养,观察并记录细胞的生长状态。

2.2 KA 溶液配制

精密称取 KA 对照品 28.6 mg 溶于 1 mL 培养基中,配成浓度为 100 mmol·L⁻¹ 的 KA 对照品母液,-20 °C 保存,用时取适量 KA 对照品母液加培养基稀释至浓度为 10 mmol·L⁻¹ 的 KA 对照品工作液,过 0.22 μ m 微孔滤膜即可。

2.3 细胞活性检测

取对数生长期细胞,经胰酶消化后制成细胞悬液并用细胞计数器计数,以每孔 4 000 个,每孔体积 100 μ L,铺于 96 孔板中,设置对照组和不同浓度的药物组,同时仅加入 100 μ L DMEM 培养基作为空白组,每组设置 6 个复孔。培养 24 h 后,弃去完全培养基,药物组分别给予含 KA(15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150 μ mol·L⁻¹)的培养基,空白组和对照组给予等体积的 DMEM 培养基,培养 24 h 后每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,37 °C 孵育 2 h,采用酶标仪 450 nm 波长处测定吸光度(A),计算各组细胞存活率和 IC₅₀ 值。再次铺板接种细胞,采用 IC₅₀ 值为 KA 的作用浓度,持续培养 24, 48, 72, 96, 120 h 后,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率}(\%) = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

2.4 集落形成试验

分别向 6 孔板中接入 200 个 A549 细胞,分别加入等量的 KA 和 DMEM 培养基,连续培养 14 d,采用 0.1%结晶紫染色 10 min, PBS 冲洗干净,观察集落形成数,集落形成率=(集落形成数/200)×100%。

2.5 KA 对 A549 细胞中 miR21 表达的影响

取对数生长期细胞,以每孔 6×10⁵ 个接种于 6

孔培养板中, 设对照组和 KA 给药组(30, 90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 每组 3 个复孔。培养 24 h 后, KA 给药组加入终浓度为 30, 90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 KA 药物干预作用, 对照组给予同体积的培养基, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。运用 RNA 提取试剂盒提取 A549 细胞中的 RNA, 逆转录酶将 RNA 逆转录成 cDNA 后运用 qPCR 检测 miR21 及 mRNA 的表达水平。PCR 扩增条件(反应体系为 10 μL): 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s, 共 40 个循环, 以 β -actin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相关基因 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因名称	引物序列	序列长度/ bp
miR21	正向: 5'-GGGGGTAGCTTATCAGATGA-3'	80
	反向: 5'-AGTGCCTGTCGTGGAGTC-3'	
c-Myc	正向: 5'-TCGGAAGGACTATCCTGCTG-3'	133
	反向: 5'-GTGTGTTTCGCCTCTTGACATT-3'	
Cyclin D1	正向: 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'	196
	反向: 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'	
PTEN	正向: 5'-TCCCGTGTGCTGCTATGAT-3'	180
	反向: 5'-CTCTTTAGGCTGTTTCCAGCAT-3'	
β -actin	正向: 5'-GTCCACCGCAAATGCTTCTA-3'	190
	反向: 5'-TGCTGTCACCTTCACCGTTC-3'	

2.6 qPCR 检测 miR21、c-Myc、Cyclin D1 mRNA 的表达水平

取对数生长期细胞, 以每孔 6×10^5 个接种于 6 孔培养板中, 设对照组和 KA 高、低剂量组(30, 90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 每组 3 个复孔。KA 给药组可进一步分为 miR21 precursor 转染的 miR21 过表达组(miR21-mimic 组)和转染阴性对照组(miR21-NC 组)。KA 高、低剂量组给予相应浓度药物进行干预作用, 对照组给予同体积的培养基, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。按“2.5”项下方法检测 miR21 及 PTEN、c-Myc、Cyclin D1 mRNA 的表达水平。

2.7 Western blotting 检测 PTEN、p-AKT (Thr308)、c-Myc、Cyclin D1 等蛋白的表达

将生长状态良好的 A549 细胞按“2.5”项下方法进行分组给药后, 提取细胞蛋白, BCA 试剂盒测定蛋白含量。取 40 μg 蛋白样品经过 SDS-PAGE 电泳分离后, 转至 PVDF 膜(0.45 μm)上, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后, PTEN、p-AKT (Thr308)、

c-Myc、Cyclin D1 等一抗(1 : 1 000)在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下摇床孵育过夜, TBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 二抗(1 : 10 000)室温孵育 1 h, 用 TBST 清洗 3 次, 每次 10 min, ECL 显色后运用 G:BOX 成像分析系统获得条带, 以 β -actin 作为内参。采用 Image J 图像软件进行灰度值分析。

2.8 miR21 mimc 转染 A549 细胞

将 1×10^6 A549 细胞接种至 6 孔板中, 确保次日汇合度至 60%~80%, 采用 lipo3000 分别转染 miR21 的阴性对照和 miR21 mimc, 转染后 48 h 分别提取 microRNA, 采用 qPCR 检测 miR21 的过表达效果。

2.9 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验进行组间比较。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 KA 抑制 A549 细胞的增殖

采用 CCK-8 细胞活力检测法观察 KA 的作用, KA 处理 24 h, 随着其作用浓度的增大, A549 细胞存活率依次降低, 呈明显的剂量依赖性, 据此计算 24 h 培养时 IC_{50} 值= $56.27\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。以此为作用浓度, 持续培养 24, 48, 72, 96, 120 h, A549 的细胞存活率依次降低, 呈明显的时间依赖性。进一步采用集落形成实验观察 KA 对细胞增殖的抑制作用, 作用浓度采用 IC_{50} 值, 发现 KA 处理后 A549 细胞的集落形成率显著低于对照组($P<0.001$)。结果见图 1。

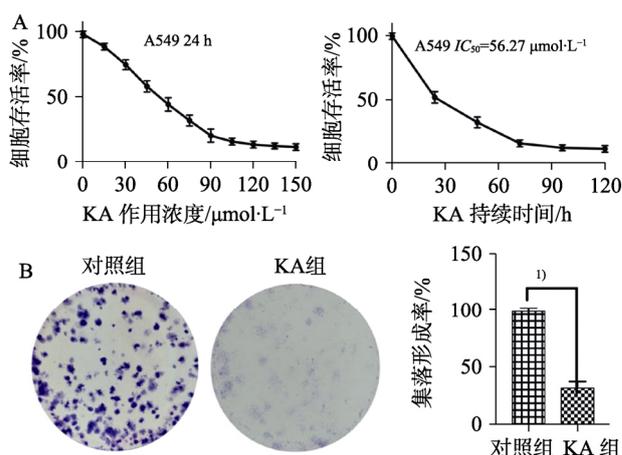


图 1 KA 对 A549 细胞存活率的影响($n=3$)

A-细胞活性检测; B-集落形成试验; 与对照组相比, $^{1)}P<0.001$ 。

Fig. 1 Effect of KA on the survival rate of A549 cells($n=3$)

A-test of cell viability; B-colony formation assay; compared with the control group, $^{1)}P<0.001$.

3.2 KA 抑制 A549 细胞中 miR21 表达

为全面分析 KA 给药后的抗肿瘤作用,本研究根据 KA24 h 处理的 IC_{50} 值及增殖曲线选择低处理剂量($30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和高处理剂量($90 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),对照组给予等剂量的 DMEM 培养基。运用 qPCR 检测 miR21 的表达水平,与对照组比较,30, $90 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 KA 处理后均能降低 A549 细胞中 miR21 的表达水平($P<0.01$ 或 $P<0.001$),而且高剂量 KA 处理后, A549 细胞中 miR21 的表达水平明显低于低剂量 KA 处理组。结果见图 2。

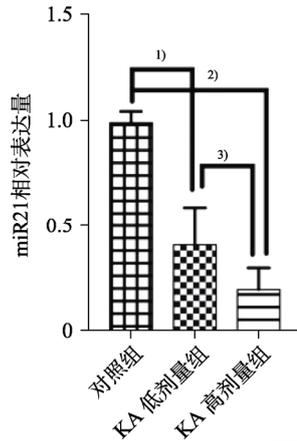


图 2 KA 对 A549 细胞中 miR21 表达的影响
与对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$; 与 KA 低剂量组相比, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 2 Effects of KA on miR21 expression in A549 cells
Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$; compared with KA low-dose group, ³⁾ $P<0.01$.

3.3 KA 抑制 PTEN/AKT 信号通路

本研究进一步检测 KA 处理 A549 细胞后 PTEN/AKT 信号通路的变化,与对照组比较,30, $90 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 KA 处理后均能降低 A549 细胞中 p-AKT、c-Myc 和 Cyclin D1 的表达水平,升高 PTEN 水平($P<0.01$ 或 $P<0.001$),而且高剂量处理

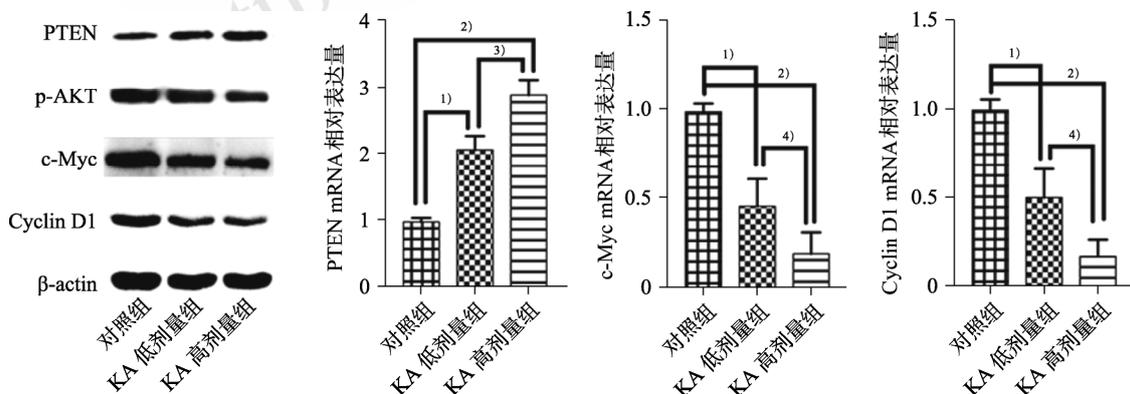


图 3 KA 对 PTEN/AKT 信号通路的调控作用($n=3$)
与对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$; 与 KA 低剂量组相比, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Regulation of KA on PTEN/AKT signaling pathway($n=3$)
Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$; compared with KA low-dose group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$.

后, A549 细胞中 p-AKT、c-Myc 和 Cyclin D1 的表达水平明显低于低剂量组,而 PTEN 表达水平明显高于低剂量处理组,表明 KA 可抑制 PTEN/AKT 信号通路。结果见图 3。

3.4 miR21 激活 A549 细胞中的 PTEN/AKT 信号通路

基于 KA 具有抑制 A549 细胞中 miR21 表达的作用,本研究进一步针对 miR21 的作用机制进行了分析。首先通过转染 miR21 mimc 构建 miR21 稳定过表达的 A549 细胞,并采用 qPCR 检测证实 A549 细胞转染后具有较高的 miR21 表达水平。随后,通过 qPCR 和 Western blotting 检测 miR21 过表达后 PTEN/AKT 信号通路的变化,发现 miR21 过表达后 PTEN 的 mRNA 和蛋白水平均升高,而 p-AKT 的蛋白水平, c-Myc、Cyclin D1 的蛋白和 mRNA 表达水平均明显降低,表明 miR21 具有激活 A549 细胞中 PTEN/AKT 信号通路的作用。结果见图 4。

3.5 miR21 mimc 阻断 KA 抑制 A549 细胞增殖的作用

为进一步证实 KA 通过下调 miR21、抑制 PTEN/AKT 信号通路抑制 A549 细胞的增殖,本研究采用 rescue 试验和 miR21 mimc 转染回复 KA 处理后的 A549 细胞中 miR21 表达, CCK-8 试验和集落形成试验均表明转染 miR21 NC 的 A549 细胞给予 KA 处理,其细胞活性和集落形成率均低于 DMEM 处理 miR21 NC 转染组,但转染 miR21 mimc 后,细胞活性和集落形成率均显著升高,与 DMEM 处理的 miR21 NC 转染组无明显差异,表明 KA 的抑制 A549 细胞增殖作用被 miR21 mimc 阻断。结果见图 5。

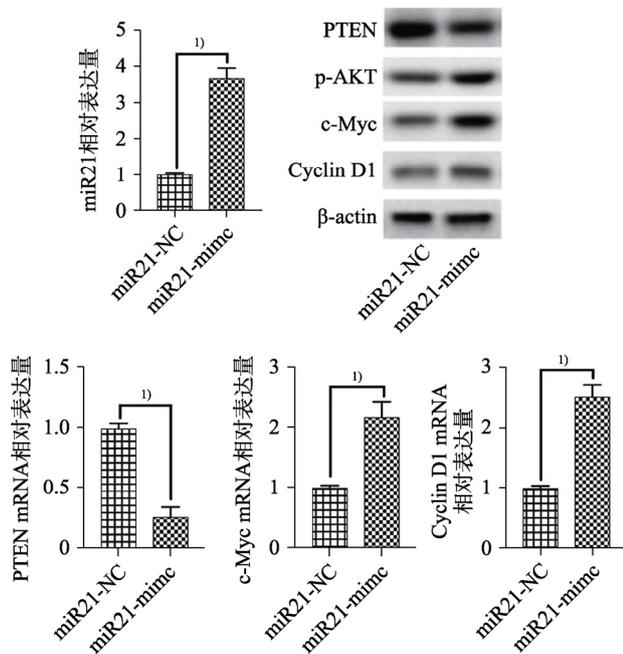


图4 miR21对PTEN/AKT信号通路的调控作用($n=3$)与miR21-NC组相比, $^{1)}P<0.001$ 。

Fig. 4 Effects of miR21 on regulation of PTEN/AKT signaling pathway($n=3$) Compared with the miR21-NC group, $^{1)}P<0.001$.

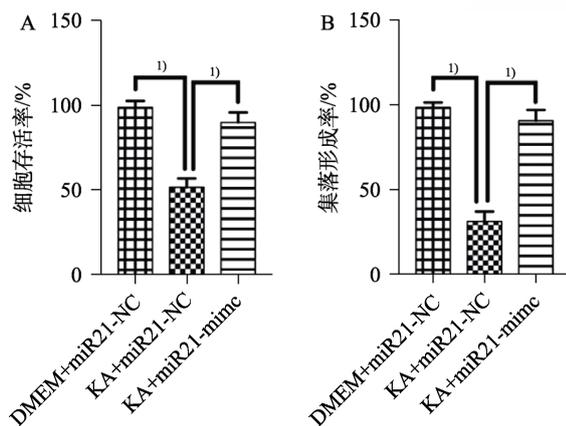


图5 miR21 mimic阻断KA抑制A549细胞增殖的作用($n=3$)

A-细胞活性检测; B-集落形成试验; 与KA+miR21-NC组相比, $^{1)}P<0.001$ 。

Fig. 5 Inhibitory effect of KA on proliferation of A549 cells was blocked by microRNA21 mimic($n=3$)

A-test of cell viability; B-colony formation assay; compared with the KA+miR21-NC group, $^{1)}P<0.001$.

4 讨论

非小细胞肺癌是临床上常见的恶性肿瘤,发病率高,严重危害人类健康。近年来microRNA在肿瘤等疾病发生发展过程中的生物学作用逐渐被发现,大量研究表明microRNA可以与多个靶基因的3'-UTRs结合,参与细胞内包括发育、分化、增殖、凋亡等多种细胞生命活动进程^[14-15]。研究

表明,超过30%的编码蛋白基因能够被microRNA调控。因此通过改变特异性microRNA的表达成为了抑制肿瘤发生发展的新思路。凋亡相关蛋白PTEN是一种肿瘤抑癌基因,具有脂质和蛋白质双重磷酸酶活性,在细胞生长、增殖、凋亡等方面发挥着重要作用^[16-17]。PTEN在肿瘤中表达下调或者缺失突变能够激活Pi3K/AKT信号通路从而促进c-Myc、Cyclin D1等细胞增殖相关调节因子大量释放,促进肿瘤细胞恶性增殖^[18]。Wu等^[19]研究表明miR21对非小细胞肺癌的发生发展具有重要的调节作用,Zhu等^[20]研究表明,抑制miR21的表达能够抑制肿瘤的发生发展。研究表明,激活miR21能够抑制PTEN的表达从而促进肿瘤细胞增殖^[21-22]。

KA作为一种植物生物活性成分,具有显著的抗炎及抑制肿瘤的作用。虽然已有研究报道了KA对非小细胞肺癌的可能作用,如通过下调ERR α 抑制A549细胞的侵袭和迁移,下调UBF的磷酸化水平影响rDNA的转录和细胞的增殖,提示KA可能存在多种抑制非小细胞肺癌增殖作用,但可否通过miRNA发挥抑制作用尚无研究报道。Wang等^[23]研究表明KA在肝细胞癌中通过抑制miR21的表达抑制增殖,进一步提示了KA在非小细胞肺癌中可能存在的miRNA调控作用。

因此本实验考察不同浓度KA对非小细胞肺癌A549细胞增殖的抑制作用及对miR21/PTEN信号通路相关基因的调节作用。研究结果表明KA对A549细胞增殖具有抑制作用,同时KA能够抑制A549细胞中miR21的表达。为了进一步验证KA能够通过抑制miR21的表达抑制A549细胞增殖,采用miR21 mimic转染A549细胞使miR21在A549细胞中高表达,然后给予KA干预。结果表明,miR21 mimic转染能够抑制PTEN的表达,激活PTEN/AKT信号通路,KA可调节miR21、PTEN、p-AKT(Thr308)、c-Myc、Cyclin D1等miR21/PTEN信号通路相关基因的表达,表明KA能够通过调节miR21/PTEN信号通路抑制非小细胞肺癌A549细胞增殖。

综上所述,本研究进一步完善了KA的抗肿瘤增殖作用机制,可通过调节miR21/PTEN信号通路抑制非小细胞肺癌A549细胞增殖,为KA治疗肺癌及其他肿瘤疾病提供了新的作用机制。

REFERENCES

- [1] WANG W, LIU Y Z, LI L. Effects of physalin B on proliferation, migration and apoptosis of human non-small cell lung cancer cells [J]. J Shandong Univ Heal Sci[山东大学学报(医学版)], 2019, 57(3): 13-18.
- [2] LIN L Y, CHENG K L, HE Z, et al. A polysaccharide from *Hedyotis diffusa* interrupts metastatic potential of lung adenocarcinoma A549 cells by inhibiting EMT via EGFR/Akt/ERK signaling pathways [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 129: 706-714.
- [3] PEI X D, XIAO J S, WEI G J, et al. Oenothien B inhibits human non-small cell lung cancer A549 cell proliferation by ROS-mediated PI₃K/Akt/NF-κB signaling pathway [J]. Chem Biol Interact, 2019, 298: 112-120.
- [4] HU J H, WANG H T, LIU Z A, et al. Establishment of primary tumor cell line from pleural effusion of non-small cell lung cancer and its clinical application value of drug susceptibility test [J]. Chin J Clin Lab Sci(临床检验杂志), 2019, 37(2): 133-136.
- [5] LIN A Q, CHEN Y Q, CHEN X R, et al. Lorlatinib: a third generation ALK inhibitor for treatment of non-small cell lung carcinoma [J]. Acta Pharm Sin(药理学学报), 2019, 54(4): 601-610.
- [6] WANG H J, CHEN L Y, ZHANG X Y, et al. Kaempferol protects mice from d-GalN/LPS-induced acute liver failure by regulating the ER stress-Grp78-CHOP signaling pathway [J]. Biomed Pharmacoth, 2019, 111(12): 468-475.
- [7] HAN X, LIU C F, GAO N, et al. Kaempferol suppresses proliferation but increases apoptosis and autophagy by up-regulating microRNA-340 in human lung cancer cells [J]. Biomed Pharmacoth, 2018, 108: 809-816.
- [8] ZHONG X M, ZHANG L, LI Y M, et al. Kaempferol alleviates ox-LDL-induced apoptosis by up-regulation of miR-26a-5p via inhibiting TLR4/NF-κB pathway in human endothelial cells [J]. Biomed Pharmacoth, 2018, 108(17): 1783-1789.
- [9] BUTTERWORTH M B, ALVAREZ DE LA ROSA D. Regulation of aldosterone signaling by microRNAs [J]. Vitam Horm, 2019, 109(52): 69-103.
- [10] DU J, LI M L, HUANG Q, et al. The critical role of microRNAs in stress response: Therapeutic prospect and limitation [J]. Pharmacol Res, 2019, 142(10): 294-302.
- [11] ZHANG W, BAI W, ZHANG W. MiR-21 suppresses the anticancer activities of curcumin by targeting PTEN gene in human non-small cell lung cancer A549 cells [J]. Clin Transl Oncol, 2014, 16(8): 708-713.
- [12] ZHONG X M, ZHANG L, LI Y M, et al. Kaempferol alleviates ox-LDL-induced apoptosis by up-regulation of miR-26a-5p via inhibiting TLR4/NF-κB pathway in human endothelial cells [J]. Biomed Pharmacoth, 2018, 108(3): 1783-1789.
- [13] KIM K, KIM S, MOH S H, et al. Kaempferol inhibits vascular smooth muscle cell migration by modulating BMP-mediated miR-21 expression [J]. Mol Cell Biochem, 2015, 407(1/2): 143-149.
- [14] LU J, GETZ G, MISKA E A, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers [J]. Nature, 2005, 435(7043): 834-838.
- [15] RUPAIMOOLE R, SLACK F J. MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases [J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(3): 203-222.
- [16] TAY Y, PANDOLFI P P. Posttranscriptional regulation of PTEN by competing endogenous RNAs [J]. Methods Mol Biol, 2016, 1388(15): 139-154.
- [17] LEE Y R, CHEN M, PANDOLFI P P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: New modes and prospects [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018, 19(9): 547-562.
- [18] CHANG T M, SHAN Y S, CHU P Y, et al. The regulatory role of aberrant Phosphatase and Tensin Homologue and Liver Kinase B1 on AKT/mTOR/c-Myc axis in pancreatic neuroendocrine tumors [J]. Oncotarget, 2017, 8(58): 98068-98083.
- [19] WU D, SHI M, FAN X D. Mechanism of miR-21 via Wnt/β-catenin signaling pathway in human A549 lung cancer cells and Lewis lung carcinoma in mice [J]. Asian Pac J Trop Med, 2015, 8(6): 479-484.
- [20] ZHU G L, LIU X L, LI H J, et al. Kaempferol inhibits proliferation, migration, and invasion of liver cancer HepG2 cells by down-regulation of microRNA-21 [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2018, 32(12): 1680-1689.
- [21] HE C J, DONG X S, ZHAI B, et al. MiR-21 mediates sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting autophagy via the PTEN/Akt pathway [J]. Oncotarget, 2015, 6(30): 28867-28881.
- [22] PERALTA-ZARAGOZA O, DEAS J, MENESES-ACOSTA A, et al. Relevance of miR-21 in regulation of tumor suppressor gene PTEN in human cervical cancer cells [J]. BMC Cancer, 2016, 16(11): 215-223.
- [23] WANG W P, HUANG S N, YUAN J X, et al. Reverse multidrug resistance in human HepG2/ADR by anti-mir-21 combined with hyperthermia mediated by functionalized gold nano-cages [J]. Mol Pharm, 2018, 15(9): 3767-3776.

收稿日期: 2019-08-14
(本文责编: 沈倩)