

DOI:10. 11798/j. issn. 1007-1520. 201803009

· 鼻咽癌专栏 ·

miR-375 通过靶向 NLK 影响鼻咽癌的增殖及迁移

李彩红,汪建,徐夏

(广州军区广州总医院耳鼻咽喉科,广东广州 510010)

摘要: **目的** 探讨 miR-375 在鼻咽癌患者中表达的临床意义及其对鼻咽癌细胞的影响。**方法** 收集 67 例鼻咽癌组织标本和 53 例慢性鼻咽炎症组织标本,采用 qRT-PCR 检测组织标本和鼻咽癌细胞株 CNE1、CNE2、C666-1 及人永生化鼻咽上皮细胞株(NP69)中 miR-375 的表达水平;分别转染 miR-375 的模拟物或抑制物,CCK8 法检测细胞的增殖,Transwell 实验检测细胞的迁移;生物信息学靶基因预测 miR-375 的靶基因,并经双荧光素酶及蛋白质印迹法(Western blotting)验证靶基因。**结果** 鼻咽癌组织中 miR-375 表达水平与慢性鼻咽炎症组织相比明显下调($P < 0.05$);miR-375 的表达水平与患者的临床分期、区域淋巴结受累情况以及肿瘤大小有关($P < 0.05$),但与患者年龄、性别、吸烟史、分化程度及组织类型无关($P > 0.05$);鼻咽癌细胞与 NP69 相比较,miR-375 的表达水平均显著低于 NP69($P < 0.05$);miR-375 过表达后 C666-1 细胞增殖、迁移显著低于慢性鼻咽炎-模拟物组($P < 0.05$),Nemo 样激酶(Nemo-like kinase, NLK)的表达下调。miR-375 抑制后 CNE1 细胞增殖、迁移显著高于慢性鼻咽炎-抑制物组($P < 0.05$),miR-375 对 NLK 具有直接靶向调控作用。**结论** miR-375 在鼻咽癌中呈低表达,并与患者的临床分期、区域淋巴结受累情况以及肿瘤大小有关,其可能是通过下调靶基因 NLK,从而抑制鼻咽癌的增殖及迁移。

关键词:鼻咽癌;miR-375;增殖;迁移;NLK

中图分类号:R739. 63 文献标识码:A [中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2018,24(3):236-242]

miR-375 inhibits the growth and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells by targeting nemo-like kinase

LI Cai-hong, WANG Jian, XU Xia

(Department of Otolaryngology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China)

Abstract: **Objective** To investigate the clinical significance of microRNA-375 (miR-375) expression in nasopharyngeal carcinoma (NPC) and its impact on NPC cells. **Methods** 67 NPC specimens and 53 chronic pharyngitis specimens were collected. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression of miR-375 in the specimens, CNE1, CNE2, C666-1 and NP69 (an immortalized nasopharyngeal epithelial cells line) cells lines. All the cells were transfected with miR-375 mimics or inhibitors respectively. Cell proliferation was detected by CCK-8 assay kit and cell migration by transwell assay. Bioinformatics software was adopted to predict the target gene of miR-375, and the expression of the target gene was verified by Western blot and dual luciferase assay. **Results** The expression of miR-375 in NPC specimens was markedly down-regulated compared to that in the chronic pharyngitis tissues ($P < 0.05$). The expression level of miR-375 was correlated with the size, lymph node metastasis and clinic stage of tumor (all $P < 0.05$), but had no correlation with the patients' age, gender and smoking history, histologic type and differentiation degree of the tumor (all $P > 0.05$). The expression levels of miR-375 in the 4 types of NPC cells were significantly lower than that in the NP69 cell (all $P < 0.05$). After overexpression of miR-375, proliferation and migration abilities of C666-1 cell were significantly lower than those of the chronic pharyngitis tissues (both $P < 0.05$), and NLK expression was down-regulated. After suppression of miR-375, the abilities of CNE1 cell were significantly higher than those of the chronic pharyngitis tissues (both $P < 0.05$), and NLK expression was up-regulated. The miR-375 targeted regulation on the NLK directly. **Conclusion** The expression of miR-375 is down-regulated in NPC, which is correlated

基金项目:广东省自然科学基金(2014A030310032)。
作者简介:李彩红,女,技师。
通信作者:汪建,Email:13889909318@139.com

with the size, regional lymph node involvement and clinic stage of the tumor. miR-375 may inhibit the proliferation and migration of NPC cells by down-regulating its target NLK gene.

Key words: Nasopharyngeal neoplasm; miR-375; Proliferation; Migration; Nemo-like kinase (NLK)

[Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery, 2018, 24(3): 236-242]

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是发生于鼻咽部黏膜上皮细胞的恶性肿瘤^[1],其恶性程度较高,早期即可出现淋巴结转移^[2-3]。鼻咽癌的发病因素是多方面的,如EB病毒感染、环境因素及遗传因素等^[4]。随着影像学水平和放疗技术的提高,仍有许多患者出现远处转移^[5]。因此,寻找与鼻咽癌相关的抗肿瘤分子并探究其抗肿瘤机制,有望成为改善 NPC 患者的关键方法之一。

miRNA(microRNA, miRNA)是一类非编码小分子单链 RNA,在转录后水平调控基因的表达。miRNA 与鼻咽癌的发生、发展有着密切的关系。有研究表明,miR-26a 通过下调 Zeste 基因增强子同源物 2(enhancer of zeste homolog 2, EZH2)影响鼻咽癌细胞的增殖和克隆形成^[6];miR-144 通过下调抑癌基因张力蛋白同源基因(PTEN)促进鼻咽癌的发生发展^[7]。以上研究表明 miRNA 在鼻咽癌中发挥着癌基因或者抑癌基因的作用,可以作为潜在的治疗靶点。大量研究表明,miR-375 表达情况与肿瘤有着密切关系,在头颈肿瘤、肝癌、胰腺癌、卵巢癌、结肠癌^[8-12]等中低表达,但在乳腺癌中高表达^[13],miR-375 作用于多条信号通路,通过异常表达影响肿瘤的生长、增殖。通过高通量测序对 12 例鼻咽癌组织和 8 例鼻咽非癌对照组织进行差异 miRNA 检测,发现在鼻咽癌组织中 miR-34c-5p、miR-375、miR-92b-3p、miR-449c-5p 表达下调^[14]。Hui 等^[15]发现 miR-375 可能通过靶向异黏蛋白(metadherin, MTDH)抑制鼻咽癌的转移,其表达异常与患者的预后不良相关。miR-375 在 NPC 中发挥着重要作用,其机制有待更进一步的研究。

Nemo 样激酶(nemo-like kinase, NLK)是一种进化上保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,通过磷酸化不同的转录因子,在不同的信号通路中扮演着重要作用^[16]。NLK 在不同的肿瘤发生和发展中扮演着促癌和抑癌的双重作用^[17]。卵巢癌中 NLK 的下调表达与预后不良相关^[18]。而在肝癌、胆囊癌、口腔鳞腺癌^[19-20]中 NLK 的高表达能促进肿瘤的进展。Chen 等^[21]发现在鼻咽癌中 NLK 阳性表达与患者的预后不良相关,下调 NLK 的表达能减少细胞的克隆形成,抑制细胞迁移。

通过检测 NPC 患者中 miR-375 的表达情况,探

讨 miR-375 与 NPC 临床病理特征的相关性;并通过体外实验初步研究 miR-375 对鼻咽癌细胞增殖和迁移的影响,及其与潜在靶点 NLK 之间的关系,这将有助于明确鼻咽癌癌变机制。

1 资料和方法

1.1 研究对象及临床特征

收集 2014 年 1 月~2015 年 12 月在广州军区广州总医院的鼻咽癌患者组织标本 67 例,均为首发,且术前未进行任何放疗或化疗。同期排除重大系统性疾病及肿瘤病史的慢性鼻咽炎症组织标本 53 例作为非肿瘤对照组(normal conl, NC)。所有鼻咽癌患者均于我院住院完成全程常规标准治疗,均有完整的临床及随访资料。67 例鼻咽癌患者中男 31 例,女 36 例;年龄 > 60 岁 31 例, ≤ 60 岁 36 例。既往有吸烟史 37 例,无吸烟史 < 30 例;病理类型:低分化 + 未分化 43 例,中分化 + 高分化 24 例;确诊时原发肿块大小: T1、T2 38 例, T3、T4 29 例;确诊时淋巴结转移情况: N0、N1 33 例, N2、N3 34 例;根据 AJCC 分期标准: I、II 期 39 例, III、IV 期 28 例。所有纳入病例的资料完整。

1.2 细胞培养与转染

人永生鼻咽上皮细胞株(NP69)及人鼻咽癌细胞株 CNE1、CNE2、C666-1 购自中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库。人鼻咽癌细胞株培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中,人永生鼻咽上皮细胞株用 KSFM 培养基和 EpiLife 培养基按 1:1 混合培养,置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。当细胞融合度大约为 80% 时用胰酶消化进行传代。取对数生长期的细胞进行转染,将细胞接种于 6 孔板中,待细胞融合度达 60% ~ 70% 左右,每孔加入 20 μmol 的 miR-375 模拟物/抑制物和 5 μl 转染试剂,对照组加入相应的阴性对照和转染试剂;miR-204 模拟物/抑制物由广州瑞博生物公司设计合成。细胞转染试剂脂质体 2000 购自美国 Life Technology 公司。

1.3 实时荧光定量 RT-PCR 检测

采用实时荧光定量 RT-PCR 检测 miR-375 在癌组织、炎症组织以及细胞中的表达情况。按 RNA 提取试剂盒说明书方法提取组织或细胞的总 RNA,然后反转录成 cDNA,以所得 cDNA 为模板,利用 miR-

375 特异性引物和 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒进行 PCR 扩增。以 U6 基因为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 方法计算 miR-375 的相对表达量。

1.4 Western blot 检测

采用 RIPA 试剂提取转染后的各组细胞的总蛋白,BCA 法测定总蛋白量。10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白样品,电泳结束后采用 Bio-Rad 湿转系统转印到 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入 NLK 一抗(购自美国 Sigma 公司)及 GAPDH 一抗(购自美国 Sigma 公司),4℃ 孵育过夜。TBST 漂洗后再分别加入相应的二抗孵育。在暗室内,采用化学发光法取得图像。

1.5 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖

取对数生长期的细胞以 5×10^4 个/ml 接种于 96 孔板中,按上述方法转染后取不同的时间点,去掉旧培养基,将 CCK-8 试剂:培养基 = 1: 10 比例混合,按 100 μ l/孔加入,37℃ 孵育 1 h 后用酶标仪在 450 nm 波长处测定其吸光度(OD)值。

1.6 细胞迁移实验

将 Transwell 小室置入 24 孔板中,在 Transwell 小室下室加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基。按上述方法转染后的细胞重悬(无 FBS 的 DMEM 培养基),重悬液 8×10^5 个细胞到 Transwell 小室上室,细胞培养 14 h,取出小室,用棉签将上室内部擦干净,小室的下表面用 PBS 浸泡清洗。4% 多聚甲醛溶液固定细胞 30 min,控干 10 min,然后 0.1% 结晶紫染色液染色 20 min,PBS 冲洗 3 次,显微镜下拍照,并随机选取 6 个不同区域,计算每个视野下的细胞数,取平均数为迁移细胞数。

1.7 双荧光素酶试验

利用生物信息学软件(TargetScan Human、PicT-

ar)预测发现 NLK 是 miR-375 可能的靶基因之一。分别将 NLK 3' UTR 中 miR-375 结合位点序列(野生型序列,WT 序列)及突变型序列(MU 序列,突变 miR-375 结合位点序列)插入到 pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega, USA)的报告载体中。双荧光素酶检测详细操作步骤参见双荧光报告分析系统(dual luciferase reporter assay system)。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。组间比较采用 *t* 检验,多组间计量资料比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 组织标本和细胞中的 miR-375 表达情况

检测 67 例鼻咽癌组织标本和 53 例慢性鼻咽炎症组织标本中 miR-375 的表达情况,发现在鼻咽癌患者标本中 miR-375 明显低于慢性鼻咽炎症组织组,差异具有统计学意义(图 1A, $P < 0.05$)。鼻咽癌细胞株与人永生化鼻咽上皮细胞株的 miR-375 的表达差异也存在统计学意义(图 1B, $P < 0.05$),其中在人永生化鼻咽上皮细胞株 NP69 中高表达。

2.2 miR-375 的表达与鼻咽癌患者临床因素的关系

以癌组织中 miR-375 表达的平均值,将鼻咽癌患者分为两组,分析 miR-375 表达与鼻咽癌患者临床因素的关系发现:miR-375 表达的高低与肿瘤的大小、淋巴结转移情况及临床分期有关(均 $P < 0.05$),而与患者的年龄、性别、吸烟史、分化程度无明显相关性(均 $P > 0.05$),具体结果见表 1。

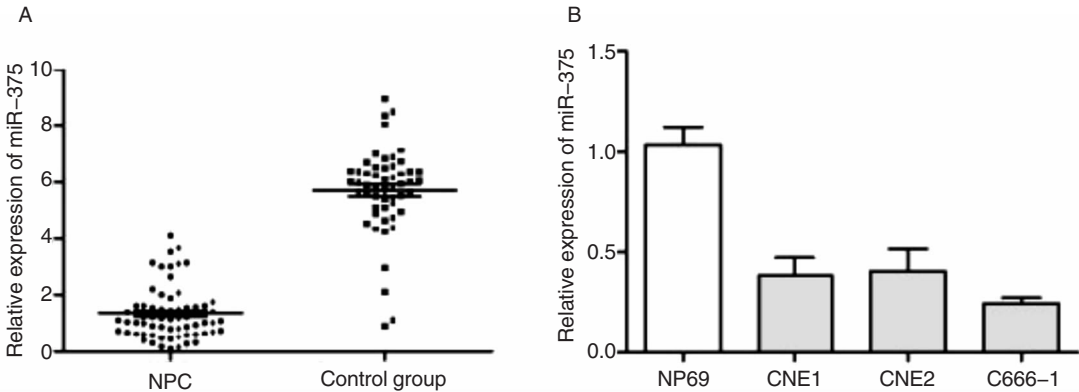


图 1 qRT-PCR 检测组织标本及细胞株中 miR-375 的表达 A:鼻咽癌组织标本及慢性鼻咽炎症组织标本中 miR-375 的表达 ($P < 0.05$);B:鼻咽癌细胞株中 miR-375 的表达($P < 0.05$)

表 1 miR-375 的表达与 NPC 患者临床因素的相关性(例)

临床因素	例数	miR-375 表达/例		χ^2	<i>P</i>
		高表达组	低表达组		
性别					
男	31	14	17	0.083	0.773
女	36	15	21		
年龄(岁)					
≤60	36	16	20	0.043	0.836
>60	31	13	18		
吸烟史					
有	37	15	22	0.253	0.615
无	30	14	16		
分化程度					
高、中分化	24	10	14	0.04	0.842
低、未分化	43	19	24		
原发灶大小					
T1,T2	38	20	18	12.09	0.001
T3,T4	29	9	20		
淋巴结转移					
N0,N1	33	23	10	18.48	0.001
N2,N3	34	6	28		
临床分期					
I+II	39	23	16	9.35	0.002
III+IV	28	6	22		

2.3 模拟或抑制 miR-375 在鼻咽癌细胞中的表达

采用脂质体 2000 将 miR-375 抑制物和模拟物分别转染进 CNE 细胞和 C666-1 细胞中,48 h 后通过 qRT-PCR 验证转染效果,显示在 CNE 细胞中 miR-375 下调了(0.43 ± 0.11)倍,在 C666-1 细胞中 miR-375 上调了(16.14 ± 1.5)倍,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。表明在 CNE 细胞中成功下调了 miR-375,在 C666-1 细胞中成功上调了 miR-375。详见图 2。

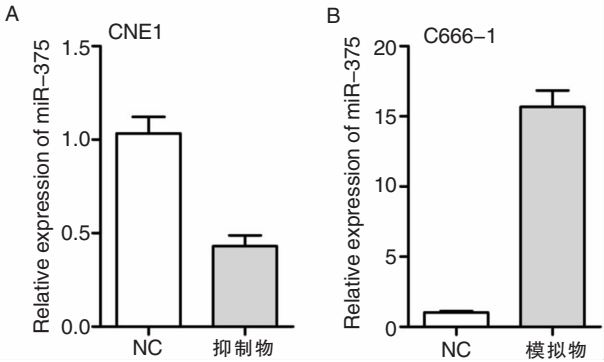


图 2 qRT-PCR 检测 miR-375 在 CNE(A) 和 C666-1(B) 中的调控效率的表达($P < 0.05$)

2.4 miR-375 对鼻咽癌细胞增殖的影响

miR-375 模拟物或抑制物转染鼻咽癌细胞后,用 CCK-8 法测定细胞在各个时间点(24、48、72 h)的增殖水平。结果显示:24 h 后,沉默 miR-375 可明显促进细胞增殖,而过表达 miR-375 则抑制细胞的

增殖,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。详见图 3。

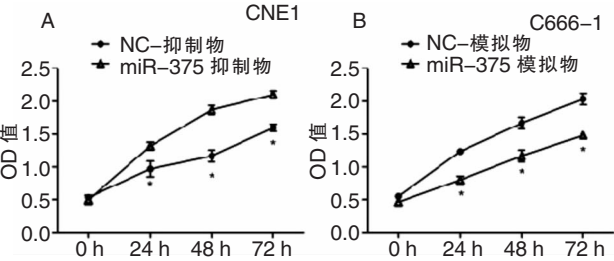


图 3 CNE1 和 C666-1 细胞中 miR-375 对增殖的影响 A: 在 CNE1 细胞中,沉默 miR-375 促进细胞的增殖能力;B: 在 C666-1 细胞中,表达 miR-375 则抑制细胞的增殖能力

2.5 miR-375 对鼻咽癌细胞的影响

miR-375 模拟物或抑制物转染鼻咽癌细胞后,用 Transwell 小室检测细胞的迁移能力。结果显示:与 NC-抑制物组相比,沉默 miR-375 组的迁移细胞数明显增多($P < 0.05$),与 NC-模拟物组相比,而过表达 miR-375 组迁移细胞数明显减少;差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。详见图 4。

2.6 miR-375 靶向调控 NLK

为了研究 miR-375 的潜在靶基因,我们利用 miRNAs 靶基因预测网站 TargetScan Human (<http://www.Targetscan.org>) 及 PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>) 对 miR-375 的靶基因进行预测,发现 NLK 是 miR-375 可能的靶基因之一(图 5A)。通过双荧光素酶报告基因检测,验证 miR-375 与 NLK 基因的靶向关系。结果显示:与 NC-抑制物组进行比较,共转染野生型 LUCI-NLK-3' UTR-WT 的 miR-375 抑制物组,荧光素酶活性上升为 1.843 ± 0.078 ;共转染野生型 LUCI-NLK-3' UTR-WT 的 miR-375 NC-模拟物组,荧光素酶活性下降到 0.745 ± 0.032 。而共转染突变型 LUCI-NLK-3' UTR-MU,对荧光素酶活性影响较小,不具有统计学意义($P > 0.05$),说明 NLK 的 3' UTR 结合位点突变后,miR-375 不能调控 NLK 的蛋白翻译过程(图 5B)。

通过双荧光素酶报告基因实验,发现 miR-375 与 NLK 具有直接靶向关系。进一步 Western blotting 结果显示:在 CNE1 细胞中,转染 miR-375 抑制物能促进 NLK 蛋白水平的表达;在 C666-1 细胞中,转染 miR-375 模拟物能抑制 NLK 蛋白水平的表达(图 5C);综上所述,miR-375 对 NLK 具有直接靶向调控作用。

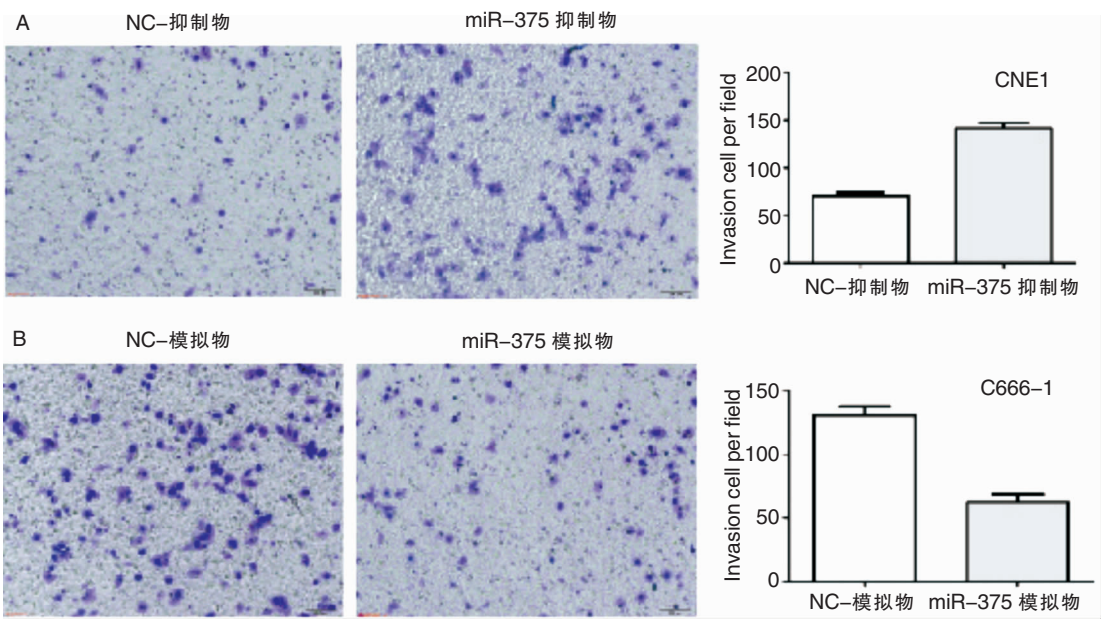


图 4 CNE1 和 C666-1 细胞中 miR-375 对迁移的影响 A:在 CNE1 细胞中,沉默 miR-375 促进细胞的迁移能力;B:在 C666-1 细胞中,过表达 miR-375 则抑制细胞的迁移能力 (结晶紫 ×200)

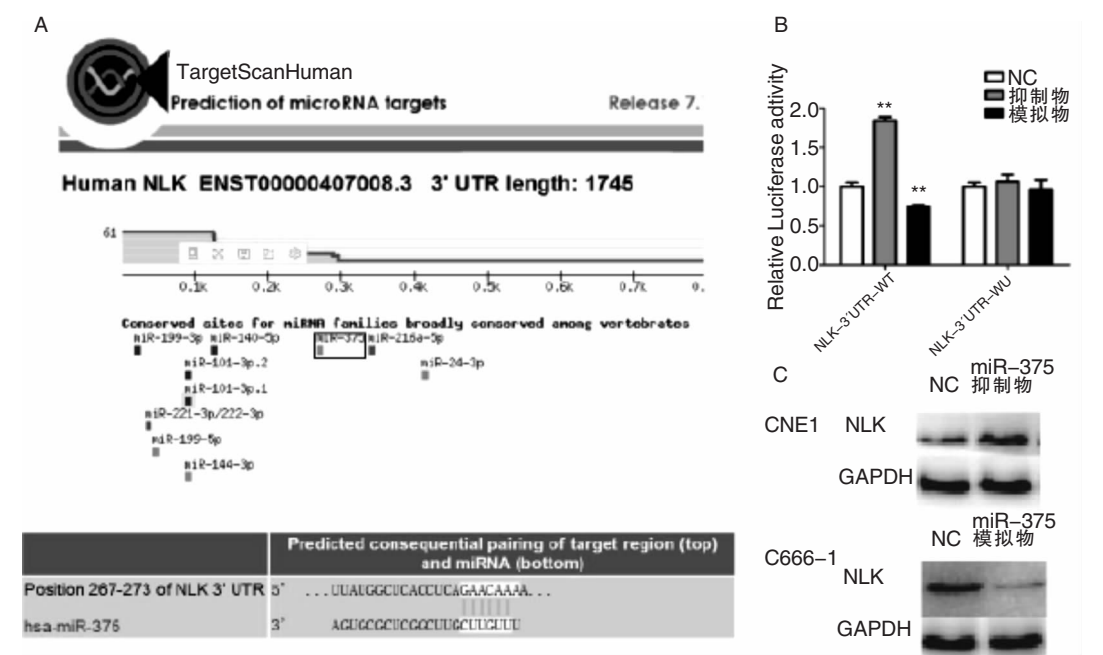


图 5 miR-375 直接靶向调控 NLK A:生物信息学软件 TargetScan Human 对 miR-375 靶基因的预测及其相互作用位点;B:双荧光素酶报告基因检测(* * $P < 0.01$); C:Western blotting 证明 miR-375 对 NLK 具有直接靶向调控作用

3 讨论

近年来,多项研究报道了鼻咽癌中异常表达 miRNA。Chen 等^[22]发现,潜伏膜蛋白 1 (latent membrane protein 1, LMP1) 可以通过下调 miR-1 从而调控 K-ras (Kirsten rat sarcoma viral oncogene) 的

表达,进而促进鼻咽癌细胞的增殖和转移。miR-14b 通过靶向肿瘤转移基因 (metastasis associated gene, MTA) 抑制鼻咽癌细胞的增殖、迁移及侵袭^[23]。miR-92a 通过下调抑癌基因 PTEN/AKT 通路达到促进鼻咽癌发生发展的目的^[24]。miR-214 通过靶向 Bim 抑制鼻咽癌细胞凋亡并促进增殖^[25]。这些研究结果均提示 miRNA 在肺癌的发病机制中扮演重

要角色。

miR-375 在人体组织内广泛存在,位于人 2 号染色体 q35,2 个编码基因 cryba2 (β A2 Crystallin Gene, cryba2) 和 CFAP65 之间^[26]。近年来关于 miR-375 在肿瘤中表达的研究报道日益增多,在头颈肿瘤、肝癌、胰腺癌、卵巢癌、结肠癌^[8-12] 等中低表达,提示 miR-375 的缺失或低表达,失去了对其靶基因的调控可能是诱发癌变的重要原因之一。Hong 等^[13] 发现,在乳腺癌中高表达 miR-375 抑制上皮间质化(EMT)过程。本研究结果表明,与炎症组织相比,miR-375 在鼻咽癌中的表达明显降低;与永生化鼻咽上皮细胞相比,miR-375 在鼻咽癌细胞中低表达和以往的研究相似^[14]。这表明 miR-375 在鼻咽癌发生、发展中起重要作用,但其具体的机制有待进一步研究。

miR-375 作用于多条信号通路,通过异常表达影响肿瘤的生长、增殖。在胃癌及胰腺癌中,肿瘤细胞中 miR-375 低表达会导致 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1 (PDK1) 表达增高,从而使蛋白激酶 B (PKB, 也称 Akt) 信号通路的磷酸化作用增强,抑制细胞凋亡^[27-28]。在结肠癌中,有研究表明,miR-375 能够抑制 Kruppel 样因子 4 (Kruppel like factor 4, KLF4) 的表达从而抑制结肠癌的增殖^[29],通过 Bcl-2 通路抑制结肠癌细胞的进展及转移^[30],能够抑制 PHLPP1 (Pleckstrin Homology Domain Leucine-rich Repeat Protein Phosphatases1, PHLPP1) 的表达而抑制结肠癌西妥昔单抗耐药性^[31]。在乳腺癌,miR-375 高表达提示预后不良,miR-375 促进靶基因矮小同源盒基因 2 (short stature homobox 2, SHOX2) 的表达,进而促进肿瘤生长^[13]。一个靶基因可能受多个 miRNA 调控,同时一个 miRNA 也可以作用于多个不同靶基因。在不同肿瘤中,通过靶向不同的分子起到不同的作用,因此,对 miR-375 研究有待更进一步提高。

NLK 在生物体内中有着广泛的功能,在肿瘤中发挥着癌基因或抑癌基因的作用,在乳腺癌中发现 NLK 表达降低^[18],而在肝癌、胆囊癌、口腔鳞腺癌,鼻咽癌^[19-21] 中表达上调,并与患者预后不良相关。Chen 等^[21] 研究表明,在鼻咽癌中下调 NLK 的表达能减少细胞的克隆形成,抑制细胞迁移。通过生物信息学分析表明 NLK 为 miR-375 的潜在的作用靶点,目前对 miR-375 和 NLK 的关系未见报道。本研究通过荧光素酶和 Western blotting 试验发现,miR-375 只能与野生型 NLK 3' UTR 结合,使荧光素酶活性降低,最后抑制 NLK 蛋白的表达,从而证实 miR-

375 可直接靶向调控 NLK。

本研究发现 miR-375 在鼻咽癌中呈低表达,体外实验证实 miR-375 通过靶向调控 NLK 影响鼻咽癌的增殖和迁移。后续会对体内实验佐证上述的体外实验,并寻找其可能的下游调控网络,有助于我们了解鼻咽癌的分子机制,为治疗提供新的研究方向。

参考文献:

- [1] Wu Z, Weng D, Li G. Quantitative proteome analysis of overexpressed Cripto-1 tumor cell reveals 14 - 3 - 3 γ as a novel biomarker in nasopharyngeal carcinoma[J]. J Proteomics, 2013,83(1): 26 - 36.
- [2] Chang ET, Adami HO. The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006, 15(10): 1765 - 1777.
- [3] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69 - 90.
- [4] Hildesheim A, Wang CP. Genetic predisposition factors and nasopharyngeal carcinoma risk: A review of epidemiological association studies,2000 - 2011: Rosetta Stone for NPC: genetics, viral infection, and other environmental factors [J]. Semin Cancer Biol, 2012, 22(2): 107 - 116.
- [5] Tang L, Li L, Mao Y, et al. Retropharyngeal lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma detected by magnetic resonance imaging: prognostic value and staging categories [J]. Cancer, 2008,131(2): 347 - 354.
- [6] Lu J, He ML, Wang L, et al. MiR-26a inhibits cell growth and tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma through repression of EZH2[J]. Cancer Res,2011,71(1):225 - 233.
- [7] Zhang LY, Ho-Fun Lee V, Wong AM, et al. MicroRNA-144 promotes cell proliferation, migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma through repression of PTEN[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(2):454 - 463.
- [8] vissar M, Christensen BC, Kelsey KT, et al. MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2009,15(8): 2850 - 2855.
- [9] Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, et al. MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene / tumor suppressor gene mutations[J]. J Hepatol,2008,47(6): 1955 - 1963.
- [10] Song S, Zhou J, He S, et al. Expression levels of microRNA-375 in pancreatic cancer[J]. Biomed Rep,2013,1(3): 393 - 398.
- [11] De A, Powers B, De A, et al. Emblica officinalis extract downregulates proangiogenic molecules via upregulation of cellular and exosomal miR-375 in human ovarian cancer cells [J]. Oncotarget, 2016,7(21): 31484 - 31500.
- [12] Xu L, Li M, Min W, et al. The expression of microRNA-375 in plasma and tissue is matched in human colorectal cancer[J]. BMC Cancer, 2014, 14(1): 1 - 11.
- [13] Hong S, Noh H, Teng Y, et al. SHOX2 is a direct miR-375 target

- and a novel epithelial-to-mesenchymal transition inducer in breast cancer cells[J]. *Neoplasia*, 2014, 16(4) : 1-5.
- [14] 王凡. 鼻咽癌组织差异 miRNA 表达谱筛选和调控网络分析[D]. 广州:南方医科大学,2016:7-9.
- Wang F. Screening of differentially expressed miRNAs and integrated analysis of MicroRNA regulatory network in nasopharyngeal carcinoma tissue[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2016:7-9.
- [15] Hui AB, Bruce JP, Alajez NM, et al. Significance of dysregulated metadherin and microRNA-375 in head and neck cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(24) :7539-7550.
- [16] Ishitani T, Ishitani S. Nemo-like kinase, a multifaceted cell signaling regulator[J]. *Cell Signal*, 2013, 25(1) :190-197.
- [17] Ohkawara B, Shirakabe K, Hyodo-Miura J, et al. Role of the TAK1-NLK-STAT3 pathway in TGF-beta-mediated mesoderm induction[J]. *Genes Dev*, 2004, 18(4) :381-386.
- [18] Zhang Y, Peng C, Wu G, et al. Expression of NLK and its potential effect in ovarian cancer chemotherapy[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2011, 21(8) :1380-1387.
- [19] Li M, Zhang S, Wang Z, et al. Prognostic significance of nemo-like kinase (NLK) expression in patients with gallbladder cancer[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(6) :3995-4000.
- [20] Zhang B, Li KY, Chen HY, et al. Lentivirus-based RNA silencing of Nemo-like kinase (NLK) inhibits the CAL 27 human adenocarcinoma cells proliferation and blocks G0/G1 phase to S phase[J]. *Int J Med Sci*, 2013, 10(10) :1301-1306.
- [21] Chen S, Ma Z, Chen X, et al. Prognostic significance of nemo-like kinase in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(1) :131-136.
- [22] Chen X, Shi J, Zhong J, et al. miR-1, regulated by LMP1, suppresses tumour growth and metastasis by targeting K-ras in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Int J Exp Pathol*, 2015, 96(6) : 427-432.
- [23] Wu M, Ye X, Wang S, et al. MicroRNA-148b suppresses proliferation, migration, and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells by targeting metastasis-associated gene 2[J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10:2815-2822.
- [24] Zhang H, Cao H, Xu D, et al. MicroRNA-92a promotes metastasis of nasopharyngeal carcinoma by targeting the PTEN/AKT pathway[J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9:3579-88.
- [25] Zhang ZC, Li YY, Wang HY, et al. Knockdown of miR-214 promotes apoptosis and inhibits cell proliferation in nasopharyngeal carcinoma[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1) :e86149.
- [26] Baroukh NN, Obberghen EV. Function of microRNA-375 and microRNA-124a in pancreas and brain[J]. *Febs Journal*, 2009, 276(22) : 6509-6521.
- [27] Tsukamoto Y, Nakada C, Noguchi T, et al. MicroRNA-375 is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell survival by targeting PDK1 and 14-3-3[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(6) : 2339-2349.
- [28] Zhou J, Song S, He S, et al. MicroRNA-375 targets PDK1 in pancreatic carcinoma and suppresses cell growth through the Akt signaling pathway[J]. *Int J Mole Med*, 2014, 33(4) : 950-956.
- [29] Mao Q, Quan T, Luo B, et al. MiR-375 targets KLF4 and impacts the proliferation of colorectal carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(1) :463-471.
- [30] Zaharie F, Muresan MS, Petrushev B, et al. Exosome-carried microRNA-375 inhibits cell progression and dissemination via Bcl-2 blocking in colon cancer[J]. *J Gastrointestinal Liver Dis*, 2015, 24(4) : 435-443.
- [31] Mussnich P, Rosa R, Bianco R, et al. MiR-199a-5p and miR-375 affect colon cancer cell sensitivity to cetuximab by targeting PHLPP1[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2015, 19(8) :1017-1026.

(收稿日期:2017-09-19)

· 消息 ·

《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》2018 年征订启事

《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》是中华人民共和国教育部主管、中南大学及中南大学湘雅医院主办、国内外公开发行的医学学术性期刊,是中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)。本刊以耳鼻咽喉颅底外科工作者为主要读者对象,重点报道耳鼻咽喉颅底外科领域内领先的科研成果、基础理论研究及先进的临床诊疗经验。本刊设有述评、专家论坛、专家笔谈、论著、临床报道、病案报道、技术与方法、教学园地、综述等栏目。本刊为双月刊,定价12.00元,全年72.00元,全国各地邮局均可订阅,邮发代号42-171。本刊编辑部可免费为读者代办邮购。通讯地址:湖南省长沙市湘雅路87号中南大学湘雅医院《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》编辑部(湘雅医院内),邮编:410008,投稿网址: <http://www.xyosbs.com>, Email: xyent@126.com, 电话:0731-84327469;0731-84327210。欢迎踊跃投稿、积极订阅。