

• 研究论文 •

下调 miR-205-5p 增强鼻咽癌细胞 HNE1/DDP 对顺铂诱导凋亡的敏感性

赵伟曼, 董智勇, 时宗芬, 鲁星月, 刘浩, 张配*

(蚌埠医学院药学院, 安徽 蚌埠 233030)

摘要: 探讨下调 miR-205-5p 增强鼻咽癌耐药细胞 HNE1/DDP 对顺铂诱导凋亡的敏感性及其可能机制。qRT-PCR 检测 HNE1、HNE1/DDP 细胞中 miR-205-5p 的表达差异及 HNE1/DDP 细胞转染 miR-205-5p 抑制剂后 miR-205-5p 的变化; MTT 法检测顺铂 (DDP) 和 miR-205-5p 抑制剂对 HNE1/DDP 或 HNE1 细胞的增殖抑制作用; PI 单染流式技术检测细胞凋亡情况; DAPI 染色观察细胞核的形态; Western blot 检测 Bax、Bak、Mcl-1、Bcl-2 蛋白的表达水平。结果显示, 相比于 HNE1 细胞, HNE1/DDP 高表达 miR-205-5p, 转染 miR-205-5p 抑制剂后其表达明显下降。下调 miR-205-5p 可显著提高 HNE1/DDP 细胞对顺铂的敏感性 ($P < 0.05$)。PI 单染结果显示, 转染 miR-205-5p 抑制剂可增强 HNE1/DDP 细胞对顺铂的诱导凋亡作用。miR-205-5p 抑制剂联合 DDP ($8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用 HNE1/DDP 细胞 24 h 的凋亡率为 (28.93 ± 2.50)%, 相比单用 miR-205-5p 抑制剂 (9.83 ± 1.31)% 或 DDP 的凋亡率 (10.83 ± 1.70)% 显著升高 ($P < 0.05$)。联合作用组细胞表现为细胞核明显皱缩聚集呈碎片状。miR-205-5p 抑制剂与 DDP 合用能上调 Bax 的表达和下调 Bcl-2 的表达。提示下调 miR-205-5p 可增强 HNE1/DDP 细胞对 DDP 的敏感性, 其作用机制可能是促凋亡蛋白 Bax 的升高和抗凋亡蛋白 Bcl-2 的下降。

关键词: 鼻咽癌细胞; 顺铂; miR-205-5p; 耐药性; 凋亡

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)07-1200-07

Down-regulation of miR-205-5p sensitizes HNE1/DDP to cisplatin induced apoptosis *in vitro*

ZHAO Wei-man, DONG Zhi-yong, SHI Zong-fen, LU Xing-yue, LIU Hao, ZHANG Pei*

(School of Pharmacy, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China)

Abstract: This study aims to investigate the effect of down-regulation of miR-205-5p by transfection of miR-205-5p inhibitor on the sensitivity of HNE1/DDP cells to cisplatin (DDP) induced apoptosis and explore the underlying mechanism. qRT-PCR was used to detect the expression of miR-205-5p in HNE1 or HNE1/DDP cells. The expression level of miR-205-5p was analyzed after transfecting HNE1/DDP cells with miR-205-5p inhibitor. MTT assay was used to evaluate the inhibitory effect of DDP alone or in combination with miR-205-5p inhibitor on the proliferation of HNE1/DDP or HNE1 cells. Apoptosis of cells treated with miR-205-5p inhibitor alone or in combination with DDP ($8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) was assessed using flow cytometry with PI staining, with the nucleus was counterstained with DAPI staining. The expression of Bax, Bak, Mcl-1, or Bcl-2 was analyzed by Western blot. HNE1/DDP cells showed a high level of expression of miR-205-5p, and the expression of miR-205-5p was significantly decreased by transfection of miR-205-5p inhibitor. Down-regulation of miR-205-5p significantly increased the sensitivity of HNE1/DDP cells to DDP ($P < 0.05$). Transfection of miR-205-5p inhibitor enhanced the sensitivity

收稿日期: 2018-12-24; 修回日期: 2019-01-23.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603155); 蚌埠医学院自然科学基金资助项目 (BYKY1763).

*通讯作者 Tel: 86-552-3175452, E-mail: zhangpei880204@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-1142

of HNE1/DDP cells to DDP induced apoptosis. Treatment of HNE1/DDP cells with miR-205-5p inhibitor combined with DDP ($8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h resulted in an apoptotic rate of $28.93\% \pm 2.50\%$, significantly higher than that treated with miR-205-5p inhibitor ($9.83\% \pm 1.31\%$) or DDP alone ($10.83\% \pm 1.70\%$) ($P < 0.05$). DAPI staining showed that HNE1/DDP cell nucleus became significantly condensed and fragmented in miR-205-5p inhibitor combined with DDP group. The combined group up-regulated the expression of Bax and down-regulated the expression of Bcl-2 in HNE1/DDP cells. Therefore, down-regulation of miR-205-5p can enhance the sensitivity of HNE1/DDP cells to cisplatin induced apoptosis, and the mechanism may involve up-regulation of Bax and down-regulation of Bcl-2 expression.

Key words: nasopharyngeal carcinoma cell; cisplatin; miR-205-5p; drug resistance; apoptosis

鼻咽癌 (NPC) 是耳鼻喉科常见的头颈部恶性肿瘤, 多发病于中国南方、东南亚和北非等地区。生活环境、家族遗传和一些病毒的慢性感染等多种因素共同作用导致鼻咽癌的发病原因较为复杂^[1,2]。目前临床上鼻咽癌的首选治疗方法是放疗。然而, 由于易发生局部或远处转移, 放疗的优势仅限于原位癌的早期阶段。目前放疗和顺铂辅助化疗已成为鼻咽癌的标准治疗方法^[3]。但化疗中顺铂会诱导耐药, 容易引起肿瘤的复发和转移, 所以鼻咽癌患者的总体预后仍然较差。因此, 了解鼻咽癌转移及耐药的分子机制, 有助于寻找新的治疗药物, 提高临床治疗效果, 改善患者的预后。

微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 是一类存在于生物体内的高度保守的非编码内源性小 RNA 分子, 长度通常在 18~25 bp 之间, 通过与目标 mRNA 的 3' 非编码区域结合, 调节其转录后表达水平。近年来, miRNA 在肿瘤发生发展和耐药中的作用得到了深入的研究^[4,5], miRNA 表达水平的改变可通过调节目的基因的转录, 影响靶蛋白表达水平, 并最终影响肿瘤细胞对药物的敏感性。分析耐药肿瘤细胞中 miRNA 表达的差异, 对阐明耐药机制及逆转化疗耐药具有重要意义^[6,7]。课题组前期利用 miRNA 芯片 (miRNA microarray) 研究顺铂耐药 (HNE1/DDP) 和顺铂敏感 (HNE1) 的鼻咽癌细胞中 miRNA 差异性, 发现 miR-205-5p 在耐顺铂的鼻咽癌细胞中显著高表达。目前虽已有关于 miRNA 在鼻咽癌中的作用研究报道^[8], 但未有 miR-205-5p 与顺铂耐药性的相关研究。

因此, 本研究拟采用 miRNA 转染技术通过转染 miR-205-5p 抑制剂下调鼻咽癌细胞 HNE1/DDP 中 miR-205-5p 的表达, 探究其对顺铂诱导凋亡敏感性的作用及可能的机制, 为提高鼻咽癌的治愈率寻求新的思路。

材料与方法

主要试剂 二甲基亚砜 (DMSO)、碘化丙啶 (PI), Sigma 公司; RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶, 美国 Gibco

公司; 顺铂 (DDP), 齐鲁制药有限公司; 胎牛血清 (FBS), 杭州四季青公司; Trizol 试剂、Lipofectamine™ 2000, Invitrogen 公司; 兔抗人 Bax、Bak、Mcl-1、Bcl-2 抗体和鼠抗人 β -actin 抗体, Santa Cruz 公司; miR-205-5p 抑制剂, 上海吉玛制药技术有限公司。

细胞株和细胞培养 人鼻咽癌细胞 HNE1、HNE1/DDP 细胞株购自中南大学湘雅医学院, 由蚌埠医学院药理实验室保存, 培养于 RPMI 1640 培养基中 (含 10% 胎牛血清、青霉素 $100 \text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、链霉素 $100 \text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$), HNE1/DDP 细胞培养基需另外含 $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DDP, 所有细胞置 37°C 、5% CO_2 的细胞培养箱中^[9]。

miRNA 转染 将生长良好的 HNE1/DDP 细胞按照每孔 3×10^5 细胞接种于 6 孔板, 培养过夜, 采用脂质体 Lipofectamine™ 2000 作为转染试剂, 选择 miRNA 与 Lipofectamine™ 2000 的最佳比例按照说明书进行转染, 培养箱中继续培养 4~6 h 后, 更换新鲜含血清的培养基。所使用的基因从上海吉玛公司购买, 基因的序列 (5'→3'): miRNA inhibitor negative control (inhibitor NC): CAGUACUUUUGUGUAGUACAA; miR-205-5p inhibitor: CAGACUCCGGUGGAAUGAAGGA。转染 24 h 后收集细胞进行后续实验。给药组在转染 24 h 后加 $8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DDP 处理细胞。

qRT-PCR 检测 miR-205-5p 表达 依据 miRNeasy® Mini Kit (德国 Qiagen 公司) 使用说明书提取细胞总 miRNA, NanoVue™ Plus 光度仪检测 RNA 浓度和纯度, A_{260}/A_{280} 比值需在 1.9~2.1 之间。利用 miScriptRT Kit (Qiagen 公司) 逆转录 RNA, 选择 U6 作为内参, 引物 (Qiagen 公司) 序列 (5'→3') 如下: miR-205-5p: F: CTT GTCCTTCATTCCACCGGA, R: TGCCGCCTGAACT TCACTCC; U6: F: CTCGCTTCGGCAGCACATA, R: AACGCTTCACGAATTTGCGT。依据 miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen 公司) 说明书在 ABI StepOne™ Real-Time PCR 仪进行 q-PCR, 每组设 3 个复孔, 计算复孔的 C_t 平均值, 按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量计算公式得到相对定量结果。

MTT法检测细胞存活率 取生长良好的HNE1细胞和miR-205-5p抑制剂转染前后的HNE1/DDP细胞按照每孔 7×10^3 细胞, 种于96孔细胞培养板中, 培养24 h后, 将原培养液更换为含DDP的培养液, DDP的浓度为2、4、8、16、32 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 另设空白组和只加培养液的阴性对照(不含细胞), 每组5个复孔。加药培养24 h后, 每孔加入15 μL MTT溶液(以PBS配成5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 培养4 h, 弃去96孔板中培养液, 每孔加150 μL DMSO, 37 $^{\circ}\text{C}$ 环境中放置30 min, 酶标仪测定490 nm处每孔吸光度值(A)。计算细胞存活率, 实验重复3次。

PI单染检测细胞凋亡 将生长良好的HNE1/DDP和HNE1细胞以每孔 1×10^5 的细胞量种于6孔培养板, 分为DDP组(8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、转染组(转染miR-205-5p抑制剂)及联合作用组(转染miR-205-5p抑制剂+8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DDP)。待HNE1/DDP细胞生长汇合至80%左右转染, 联合作用组是先转染miR-205-5p抑制剂, 24 h后更换为含8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 顺铂的培养液, 培养24 h后收集各组细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存的冷PBS洗3遍, 离心后舍去上清液并转移至离心管中。加入70%冰乙醇固定, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存过夜, 舍去上清, PBS洗2遍, 加入配制的PI染色液染色4 h, 流式细胞仪检测分析细胞凋亡率。

DAPI染色检测细胞核变化 细胞分组同PI实验。给药培养24 h舍去培养液, 冰冷PBS洗涤2遍, 每孔加入4%多聚甲醛1 mL固定细胞10 min, PBS洗涤3次, 每孔加入800 μL DAPI染色液避光反应20 min, 荧光显微镜观察细胞核形态学变化。

Western blot检测凋亡蛋白表达 消化收集各组HNE1/DDP细胞, 加适量的蛋白裂解液转移至1.5 mL离心管, 冰上裂解半小时, 低温离心(12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 30 min), 提取蛋白, 用BCA试剂盒(碧云天)测定蛋白

浓度, 并将各组蛋白稀释配平等浓度。经过12% SDS-PAGE电泳(70 V, 30 min; 120 V, 90 min), 转膜(50 V, 150 min); 5%脱脂牛奶封闭2 h, 一抗室温孵育2 h, 洗膜后二抗孵育2 h; ECL试剂盒暗处显影; Bio-Rad凝胶成像系统获取图像。

统计学方法 使用SPSS 13.0统计软件对数据进行分析, 所有实验数据以均数 \pm 标准差表示, Dunnett-*t*双侧检验进行组间比较, $P < 0.05$ 认为有统计学差异。

结果

1 细胞中miR-205-5p表达分析

利用qRT-PCR检测HNE1和HNE1/DDP细胞中miR-205-5p的表达, 与敏感株细胞HNE1相比, 耐药株细胞HNE1/DDP中miR-205-5p的相对表达量明显升高(图1A, $P < 0.05$)。提示miR-205-5p可能在耐DDP鼻咽癌细胞中发挥了一定作用。在高表达miR-205-5p的HNE1/DDP细胞中, 转染miR-205-5p抑制剂, 转染24 h收集细胞, 采用qRT-PCR检测细胞中miR-205-5p的相对表达量, 结果表明, 与对照组相比, HNE1/DDP细胞转染miR-205-5p抑制剂后miR-205-5p表达量明显降低(图1B, $P < 0.05$), 表明转染成功, miR-205-5p抑制剂可以抑制miR-205-5p的表达。

2 下调miR-205-5p增加HNE1/DDP细胞对DDP的敏感性

使用不同浓度的DDP(2、4、8、16、32 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理HNE1和转染前后的HNE1/DDP细胞。MTT结果显示, 与敏感株细胞HNE1相比, HNE1/DDP表现出明显的耐药性(图2A); 随着浓度的增加, 与DDP单独处理相比, miR-205-5p联合DDP明显增加耐药株细胞对DDP的敏感性(图2B, $P < 0.05$)。提示鼻咽癌细胞对DDP的耐药性与miR-205-5p表达有关, 下调miR-205-5p可部分逆转鼻咽癌细胞对DDP的耐药。

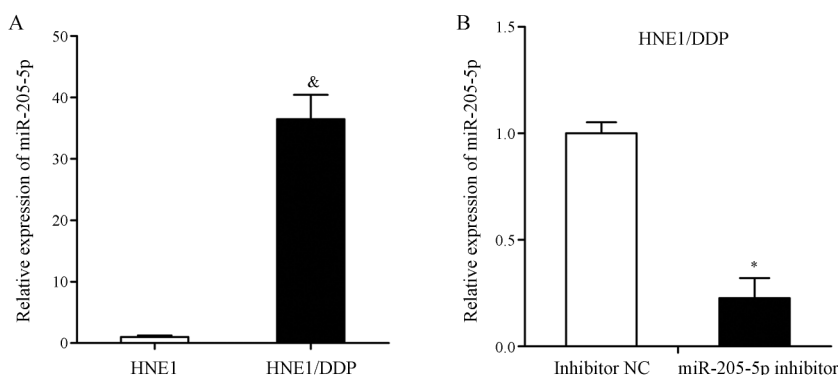


Figure 1 Expression analysis of miR-205-5p in cells by qRT-PCR. A: HNE1 and HNE1/DDP cells; B: HNE1/DDP cells transfected with miR-205-5p inhibitor. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $\&P < 0.05$ vs HNE1 cells; $*P < 0.05$ vs inhibitor NC. DDP: Cisplatin; NC: Negative control

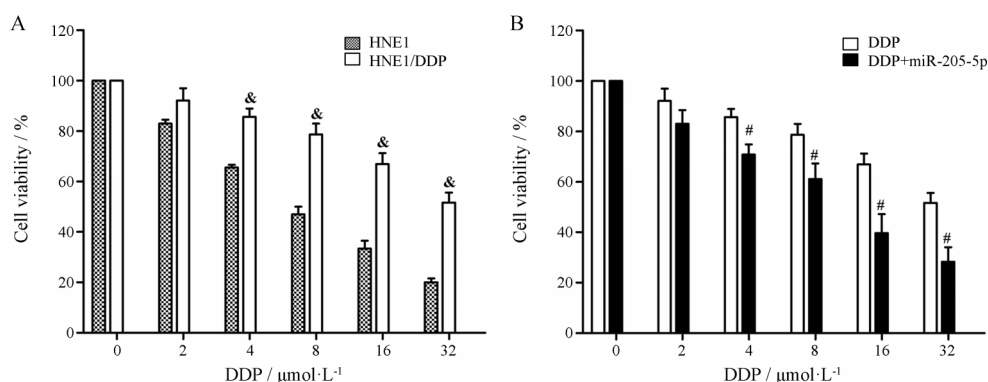


Figure 2 Effects of DDP on cells viability. A: HNE1/DDP and HNE1 cells; B: HNE1/DDP cells before or after transfection with miR-205-5p inhibitor. $n = 3, \bar{x} \pm s$. & $P < 0.05$ vs HNE1 cells; # $P < 0.05$ vs DDP alone

3 下调 miR-205-5p 对 HNE1/DDP 细胞中 DDP 诱导凋亡的影响

PI 染色后流式细胞技术检测凋亡情况, 如图 3 所示, DDP 作用于 HNE1/DDP 细胞的凋亡率明显低于 HNE1, 进一步证明 HNE1/DDP 细胞对 DDP 的耐药性 ($P < 0.05$)。miR-205-5p 抑制剂和 DDP ($8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 单独

作用于 HNE1/DDP 细胞的凋亡率分别为 (9.83 ± 1.31)%、(10.83 ± 1.70)%, 与对照组 (未转染抑制剂未加药) 相比有统计学差异 ($P < 0.05$)。miR-205-5p 抑制剂联合 DDP ($8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组细胞凋亡率为 (28.93 ± 2.50)%, 与对照组和单独处理组相比都有统计学差异 ($P < 0.05$), 且高于单独处理组之和, 提示 DDP 与下调 miR-205-5p

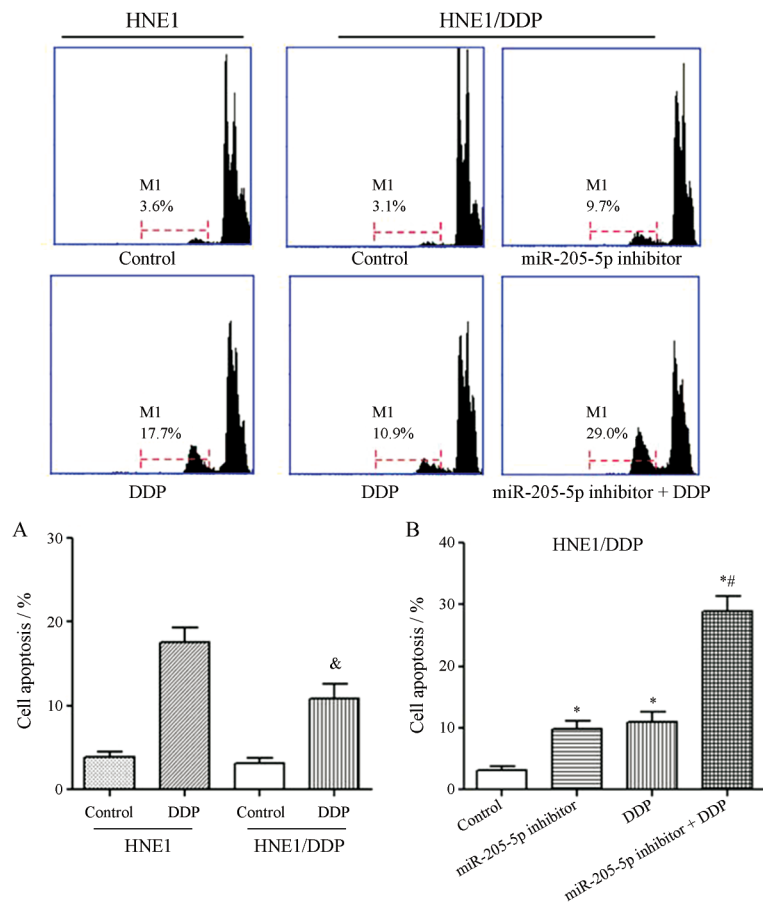


Figure 3 The effect of down-regulation of miR-205-5p on DDP-induced cell apoptosis. A: Effect of DDP on apoptosis of HNE1 and HNE1/DDP cells; B: Effects of miR-205-5p inhibitor, DDP, either alone or in combination, on apoptosis of HNE1/DDP cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$. & $P < 0.05$ compared to DDP in HNE1 cells; * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs DDP or miR-205-5p inhibitor treatment alone

具有协同诱导凋亡作用。

4 下调 miR-205-5p 对 HNE1/DDP 细胞核形态的影响

DAPI 染色后可用荧光显微镜观察细胞核的变化。图 4 结果显示: 下调 miR-205-5p 联合 DDP (8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 作用于 HNE1/DDP 细胞 24 h, 细胞核皱缩浓集, 呈现亮蓝色荧光, 细胞核呈分叶、碎片状, 且明显多于对照组和单独处理组。

5 下调 miR-205-5p 对细胞凋亡蛋白表达的影响

DDP、转染 miR-205-5p 抑制剂、二者联合作用于 HNE1/DDP 后, 蛋白印迹检测 Bax、Bak、Mcl-1、Bcl-2 蛋白的表达。结果表明, 与对照组和单独处理组相比, miR-205-5p 抑制剂联合 DDP (8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 能够明显上调促凋亡蛋白 Bax 的表达, 并下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达 ($P<0.05$), 而促凋亡蛋白 Bak 和抗凋亡蛋白 Mcl-1 的表达无显著变化 (图 5), 提示下调 miR-205-5p 对 HNE1/DDP 细胞中 DDP 诱导凋亡作用可能与上调 Bax 和下调 Bcl-2 有关。

讨论

对于大多数癌症患者, 化疗是一个非常重要的治疗手段, 但是化疗过程中引起的肿瘤复发、转移及耐药限制了它的发展。尽管过去的 50 年, 人们对肿瘤耐药的分子机制进行了深入的研究, 但是产生耐药的分子机制是复杂的, 很多还是未知的。化疗治疗肿瘤失败的一个主要原因是由于治疗过程中肿瘤细胞产生肿瘤多药耐药。所以, 研究鼻咽癌细胞耐药机制对鼻咽癌的治疗有着重要的意义。本研究选择鼻咽癌对顺铂耐药细胞 (HNE1/DDP 细胞) 作为主要研究对象, 探究鼻咽癌的耐药机制, 最终提高鼻咽癌的治愈率。

近年来, 越来越多的研究发现 miRNA 可作为癌基因或抑癌基因在肿瘤的发生、发展及耐药中发挥消极或积极的作用^[10,11]。miRNA 作为非编码小分子 RNA, 主要通过碱基配对与相应的靶 mRNA 的 3'非编码区结合, 调控靶基因, 从而影响细胞的增殖、凋亡、侵袭、迁移^[12,13]。此外, miRNA 在包括癌症在内的许多疾病中异常表达^[14]。本课题组前期基因芯片研究发现, 顺铂

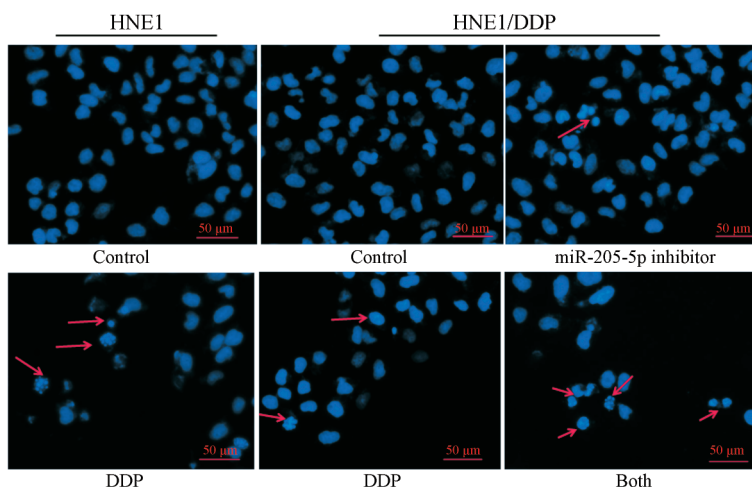


Figure 4 Effects of miR-205-5p inhibitor and DDP (8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 24 h), either alone or in combination, on HNE1/DDP or HNE1 cell nuclei by DAPI staining ($\times 200$)

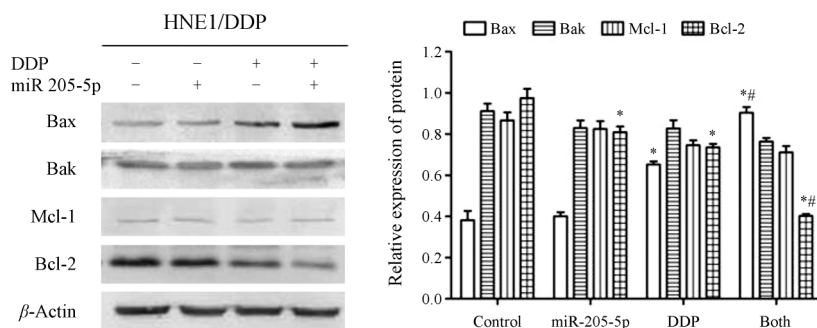


Figure 5 Western blot analysis to determine the protein abundance of Bax, Bak, Mcl-1 and Bcl-2 in HNE1/DDP cells treated with DDP, miR-205-5p inhibitor individually or in combination. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P<0.05$ vs control; # $P<0.05$ vs DDP or miR-205-5p inhibitor treatment alone

耐药的 NPC 细胞中 miR-205-5p 特异性高表达。因此, 课题组猜测 miR-205-5p 可能参与顺铂耐药鼻咽癌的调控。近来的研究表明, miR-205 与多种肿瘤具有密切关系^[15,16]。miR-205-5p 可以通过抑制靶基因 Bcl-2 的表达, 抑制人皮肤鳞癌细胞的增殖, 诱导凋亡^[17]。miR-205-5p 通过作用于靶点 ZEB 1 抑制前列腺癌的细胞迁移和侵袭^[18]。

qRT-PCR 结果进一步证实, 与 HNE1 细胞相比, HNE1/DDP 中 miR-205-5p 相对表达显著升高。通过转染 miR-205-5p 抑制剂调控 miR-205-5p 的表达水平, qRT-PCR 结果显示转染后, HNE1/DDP 细胞中 miR-205-5p 表达量降低。MTT 结果显示, miR-205-5p 抑制剂联合 DDP 组细胞存活率明显降低, 下调 miR-205-5p 逆转鼻咽癌细胞对 DDP 的耐药。

细胞凋亡是涉及一系列基因激活、表达及调控等活动的主动适应环境的死亡过程。大多数的抗肿瘤药物也是通过诱导凋亡发挥抗肿瘤作用。细胞凋亡时形态会发生显著改变, 表现为细胞体积缩小、核质浓缩、核膜核仁破碎和凋亡小体形成。本研究通过流式单染和 DAPI 染色检测 HNE1/DDP 的凋亡情况, 结果发现下调 miR-205-5p 可增强鼻咽癌细胞 HNE1/DDP 对 DDP 诱导凋亡的作用。下调 miR-205-5p 联合 DDP 作用 HNE1/DDP 细胞, 细胞核凝缩呈亮蓝色荧光, 核分叶和碎裂明显增加。

Bcl-2 家族调控细胞凋亡, 它包括促凋亡蛋白 Bak、Bax 和抗凋亡蛋白 Mcl-1、Bcl-2^[19], 当细胞受到外部刺激后, 可促进线粒体膜通透性增加^[20]。促凋亡蛋白 Bak 和 Bax 主要通过调控细胞色素 C、凋亡诱导因子 (AIF) 发挥作用^[21,22]。Mcl-1 和 Bcl-2 可以保护线粒体膜的完整性, Bcl-2 还能够增强线粒体膜电位, 抑制线粒体钙离子的释放, 阻止内切酶活化, 最终抑制肿瘤细胞凋亡^[23,24]。本研究发现, 转染 miR-205-5p 抑制剂联合 DDP 可以使 HNE1/DDP 细胞促凋亡蛋白 Bax 的表达显著升高, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达显著降低。提示下调 miR-205-5p 增强 HNE1/DDP 对顺铂诱导凋亡的敏感性, 可能是通过升高 Bax 的表达和降低 Bcl-2 的表达实现。

综上所述, 本研究证明了下调 miR-205-5p 可增强鼻咽癌耐药细胞 (HNE1/DDP) 对 DDP 诱导凋亡的敏感性, 其作用机制可能与促凋亡蛋白 Bax 的升高和抗凋亡蛋白 Bcl-2 的下降有关, 但 miR-205-5p 调节凋亡蛋白表达的具体通路有待于进一步研究。该研究结果可以为提高鼻咽癌临床治疗效果提供新的思路和策略。

References

- [1] McDermott AL, Dutt SN, Watkinson JC. The aetiology of nasopharyngeal carcinoma [J]. Clin Otolaryngol Allied Sci, 2001, 26: 82-92.
- [2] Bensouda Y, Kaikani W, Ahbeddou N, et al. Treatment for metastatic nasopharyngeal carcinoma [J]. Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis, 2011, 128: 79-85.
- [3] Bossi P, Orlandi E, Bergamini C, et al. Docetaxel, cisplatin and 5-fluorouracil-based induction chemotherapy followed by intensity modulated radiotherapy concurrent with cisplatin in locally advanced EBV-related nasopharyngeal cancer [J]. Ann Oncol, 2011, 22: 459-500.
- [4] Guan H, Li W, Li Y, et al. MicroRNA-93 promotes proliferation and metastasis of gastric cancer *via* targeting TIMP2 [J]. PLoS One, 2017, 12: e0189490.
- [5] Zhang Z, Shen S. Combined low miRNA-29s is an independent risk factor in predicting prognosis of patients with hepatocellular carcinoma after hepatectomy: a Chinese population-based study [J]. Medicine, 2017, 96: e8795.
- [6] Abba M, Patil N, Allgayer H. MicroRNAs in the regulation of MMPs and metastasis [J]. Cancers, 2014, 6: 625-645.
- [7] Port M, Glaesener S, Ruf C, et al. Micro-RNA expression in cisplatin resistant germ cell tumor cell lines [J]. Mol Cancer, 2011, 10: 52.
- [8] Luo Z, Dai Y, Zhang L, et al. miR-18a promotes malignant progression by impairing microRNA biogenesis in nasopharyngeal carcinoma [J]. Carcinogenesis, 2013, 34: 415-425.
- [9] Zhang P, Liu F, Gao J, et al. Small interfering RNA-mediated monocarboxylate transporter 1 silencing enhances sensitivity of nasopharyngeal carcinoma HNE1/DDP cells to cisplatin-induced apoptosis [J]. J South Med Univ (南方医科大学学报), 2017, 37: 883-888.
- [10] Philippidou D, Schmitt M, Moser D, et al. Signatures of microRNAs and selected microRNA target genes in human melanoma [J]. Cancer Res, 2010, 70: 4163-4173.
- [11] Di LG, Croce CM. miRNA profiling of cancer [J]. Curr Opin Genet Dev, 2013, 23: 3-11.
- [12] Baffa R, Fassan M, Volinia S, et al. MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets [J]. J Pathol, 2009, 219: 214-221.
- [13] Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing [J]. Cell, 2003, 113: 673-676.
- [14] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers [J]. Nature, 2005, 435: 834-838.
- [15] Chaudhary AK, Mondal G, Kumar V, et al. Chemosensitization and inhibition of pancreatic cancer stem cell proliferation by overexpression of microRNA-205 [J]. Cancer Lett, 2017, 402: 1-8.
- [16] Zhang QL. Expression and clinical significance of miR-205 in

- plasma of patients with breast cancer [J]. Med Innov China (中国医学创新), 2018, 15: 5-8.
- [17] Tao YF, Qiang J, Bao JW, et al. miR-205-5p negatively regulates hepatic acetyl-CoA carboxylase β mRNA in lipid metabolism of *Oreochromis niloticus* [J]. Gene, 2018, 660: 1-7.
- [18] Li L, Li S. miR-205-5p inhibits cell migration and invasion in prostatic carcinoma by targeting ZEB1 [J]. Oncol Lett, 2018, 16: 1715-1721.
- [19] Kim IS, Ko HM, Koppula S, et al. Protective effect of *Chrysanthemum indicum* Linne against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion and lipopolysaccharide-induced cytotoxicity in cellular model of Parkinson's disease [J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49: 963-973.
- [20] Liu M, Li SJ, Xin YN, et al. Ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA)-induced reactive oxidative species protects human hepatic stellate cells from apoptosis by regulating Bcl-2 family proteins and mitochondria membrane potential [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8: 18074-18081.
- [21] Bénit P, Pelhaître A, Saunier E, et al. Paradoxical inhibition of glycolysis by pioglitazone opposes the mitochondriopathy caused by AIF deficiency [J]. EBioMedicine, 2017, 17: 75-87.
- [22] Kwak GH, Kim TH, Kim HY. Down-regulation of MsrB3 induces cancer cell apoptosis through reactive oxygen species production and intrinsic mitochondrial pathway activation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 483: 468-474.
- [23] Su CH, Kuo CL, Lu KW, et al. Fisetin-induced apoptosis of human oral cancer SCC-4 cells through reactive oxygen species production, endoplasmic reticulum stress, caspase-, and mitochondria-dependent signaling pathways [J]. Environ Toxicol, 2017, 32: 1725-1741.
- [24] Pal MK, Jaiswar SP, Srivastav AK, et al. Synergistic effect of piperine and paclitaxel on cell fate *via* cyt-c, Bax/Bcl-2-caspase-3 pathway in ovarian adenocarcinomas SKOV-3 cells [J]. Eur J Pharmacol, 2016, 791: 751-762.