doi:10.11659/jjssx.09E018065

·基础研究·

miR-195 靶向调控 CHEK1 对非小细胞肺癌细胞增殖、转移及侵袭的作用

罗 雷,杨彦辉,李 季,王 毅,李晓亮,谢晓阳 (内江市第一人民医院胸外科,四川 内江 641000)

[摘 要] **目的** 研究 miR-195 靶向调控细胞周期检测点激酶 1(CHEK1)对非小细胞肺癌细胞增殖、凋亡、侵袭和转移能力的影响。**方法** 选取非小细胞肺癌 A549、H1299、H197 细胞株为研究对象,分别转染 miR-195 及 RNA 阴性对照序列。采用实时荧光定量 PCR 法检测细胞中 miR-195 的表达水平;MTT 检测转染 miR-195 对肿瘤细胞分裂增殖能力的影响;Transwell 侵袭实验分析 miR-195 对细胞侵袭能力的作用;细胞划痕实验检测 miR-195 对细胞迁移能力的作用;流式细胞仪检测并评价转染 miR-195 对肿瘤细胞分裂周期的影响;Western blot 探究 miR-195 对肿瘤细胞 CHEK1 表达的调节;采用 Spearman 相关分析法分析 miR-195 及 CHEK1 表达的相关性。**结果** MTT 实验表明高表达 miR-195 可明显抑制肺癌 A549、H1299、H1975 细胞的体外增殖能力;Transwell 侵袭实验结果提示转染 miR-195 可导致肺癌 A549、H1299、H1975 细胞侵袭能力明显降低;流式细胞术结果表明,转染 miR-195 后 A549、H1299、H1975 细胞系的 G1 和 G2 期细胞增加,S 期细胞减少;划痕实验结果表明,转染 miR-195 可以抑制细胞的迁移能力;Western blot 结果显示,转染 miR-195 后 A549、H1299、H1975 细胞中 CHEK1 蛋白水平显著降低,上述差异均具有统计学意义($P<0.05$)。Spearman 相关分析显示细胞 miR-195 mRNA 水平与 CHEK1 蛋白含量呈负相关($r=-0.464\ 8$,$P=0.00$)。**结论** miR-195可靶向调控 CHEK1 抑制非小细胞肺癌细胞增殖、转移及侵袭。

[关键词] miR-195;CHEK1;非小细胞肺癌;转移;侵袭

[中图分类号] R734.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2018-09-21

Effects of miR-195 suppresses proliferation, metastasis and invasion on non-small cell lung cancer cells by targeting CHEK1

LUO Lei, YANG Yan-hui, LI Ji, WANG Yi, LI Xiao-liang, XIE Xiao-yang (Department of Thoracic Surgery, First People's Hospital of Neijiang, Neijiang Sichuan 641000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of miR-195 on the proliferation, apoptosis, invasion and metastasis on non-small cell lung cancer (NSCLC) by targetedly suppressed CHEK1. **Methods** Non-small cell lung cancer cell lines A549, H1299 and H197 were transfected with miR-195 and RNA-negative control sequences respectively. The expression of miR-195 in NSCLC cells was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The effect of transfected miR-195 on the proliferation of tumor cells was detected by MTT assay. Cell invasion and metastasis were detected by transwell invasion test and cell scratch test. Cell apoptosis was detected by flow cytometry, the protein levels of CHEK1 were determined by Western blot, the correlation between the expressions of miR-195 and CHEK1 were analyzed by Spearman.

[基金项目] 四川省卫生和计划生育委员会科研课题(17PJ192)

[通信作者] 谢晓阳,E-mail:13990559066@163.com

[25] Kim MS, Bak Y, Park YS, et al. Wogonin induces apoptosis by suppressing E6 and E7 expressions and activating intrinsic signaling pathways in HPV-16 cervical cancer cells[J]. Cell Biol Toxicol, 2013, 29(4): 259-272. doi:10.1007/s10565-013-9251-4.

[26] Palomero T, Ferrando A. Therapeutic targeting of NOTCH1 signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Clin Lymphoma Myeloma, 2009, 9(Suppl 3): S205-S210. doi:10.3816/CLM.2009.s.013.

[27] Afshar Y, Stanculescu A, Miele L, et al. The role of chorionic gonadotropin and Notch1 in implantation[J]. J Assist Reprod Genet, 2007, 24(7): 296-302. doi:10.1007/s10815-007-9149-2.

[28] Psyrri A, Seiwert TY, Jimeno A. Molecular pathways in head and neck cancer: EGFR, PI3K, and more[J]. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2013: 246-255. doi:10.1200/EdBook_AM.2013.33.246.

[29] Sakamoto K. Notch signaling in oral squamous neoplasia[J]. Pathol Int, 2016, 66(11): 609-617. doi:10.1111/pin.12461.

[30] Demehri S, Turkoz A, Kopan R. Epidermal Notch1 loss promotes skin tumorigenesis by impacting the stromal microenvironment[J]. Cancer Cell, 2009, 16(1): 55-66. doi:10.1016/j.ccr.2009.05.016.

[31] Wang Z, Liu L, Wang M, et al. NOTCH1 regulates migration and invasion of skin cancer cells by E-cadherin repression[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 362(1-2): 35-41. doi:10.1007/s11010-011-1125-6.

[32] Shu Q, Zhuang H, Fan J, et al. Wogonin induces retinal neuron-like differentiation of bone marrow stem cells by inhibiting Notch-1 signaling[J]. Oncotarget, 2017, 8(17):28431-28441. doi:10.18632/oncotarget.16085.

(编辑:陈庆利)

Results MTT assay showed that overexpression of miR-195 could significantly inhibite the proliferation of lung cancer cells A549,H1299 and H1975 in vitro. Transwell invasion assay showed that miR-195 could significantly reduce the invasive ability of lung cancer cells A549,H1299 and H1975. Flow cytometry showed that the G1 and G2 phase cells of A549,H1299 and H1975 cell lines increased and S phase cells decreased after transfection of miR-195. The scratch test showed that miR-195 could inhibit cell migration. Western blot results showed that the level of CHEK1 protein decreased significantly after transfection of miR-195. The above differences were statistically significant ($P<0.05$). Spearman correlation analysis showed that there was a negative correlation between the mRNA level of miR-195 and the content of CHEK1 protein ($r=-0.464\ 8$, $P=0.00$). **Conclusion** miR-195 can inhibit the proliferation,metastasis and invasion of NSCLC cells by targeting CHEK1.

Keywords: miR-195; CHEK1; non-small cell lung cancer; metastasis; invasion

非小细胞肺癌是人类常见的恶性肿瘤,近年来其发病率逐年上升,严重影响人们的生活质量和生命安全。很多肺癌发现时已发展到晚期,预后不良[1]。microRNAs(miRNAs)是内源性23 nts RNAs,通过与蛋白质编码基因的mRNA配对参与基因调控。miR-195属于miRNA-15/16/195家族,在多种肿瘤中可通过靶向不同的基因发挥抑癌作用[2-3]。有研究发现,miR-195在喉癌组织中低表达,靶向bcl-2基因抑制喉癌细胞Hep-2的增殖并促进其凋亡;miR-195在肺癌中低表达,与肺癌的淋巴转移及临床分级密切相关;miR-195可以靶向HMGA2基因,调控H1299细胞的增殖和转移[4-6]。编码丝氨酸/苏氨酸激酶的细胞周期检测点激酶1(CHEK1)被认为是治疗肿瘤的潜在靶向基因,miR-195与CHEK1相关的信号通路在多种肿瘤中得到证实[7]。然而,目前鲜见miR-195靶向CHEK1与非小细胞肺癌细胞的增殖、转移及侵袭相关性的报道。本研究分析了miR-195靶向CHEK1与非小细胞肺癌细胞增殖、转移及侵袭的相关性,旨在了解非小细胞肺癌癌变机制,为非小细胞肺癌患者的早期评估预后和术后随访提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

RPMI-1640培养液,牛胎血清(FBS),胰蛋白酶,青霉素-链霉素双抗购自美国Gibco公司;miR-195引物序列,miR-195 mimics(模拟物),miR-NC对照质粒)均由上海吉玛公司合成设计;RNA提取Trizol试剂,转染试剂盒LipofectamineTM 2000购自美国Invitrogen公司;AnnexinV-FITC、MTT试剂盒购自上海碧云天生物研究所;Transwell小室购自美国Corning公司;SYBR Green PCR Master Mix试剂盒购自美国ABI公司;酶标仪SpectraMax M5购自上海美谷分子;ABI 7900PCR扩增仪购自美国ABI公司;流式细胞计数仪CytoFLEX LX购自美国Beckman公司。

1.2 细胞培养与转染

A549、H1299、H197细胞购自上海生命科学研究所。将3种细胞置于RPMI-1640培养基(10% FBS,1%青霉素-链霉素双抗)中,在37 ℃,5% CO_2 恒温培养箱中培养,观察细胞生长情况,当细胞贴壁生长,细胞融合达到80% ~ 90%时收集细胞,PBS洗涤,0.25%胰酶消化,消化完成后加入RPMI-1640培养液(10% FBS)中培养,进行传代。取对数生长期细胞进行转染实验,转染前分为2组,miR-NC(NC组)转染空质粒,miR-195-mimics(模拟组)转入模拟序列。按照LipofectamineTM 2000试剂盒说明书对细胞进行转染,转染48 h收集各组细胞进行后续实验。

1.3 RT-PCR检测miR-195 mRNA表达情况

使用Trizol试剂对未转染的A549、H1299、H1975细胞与转染后48 h的各组细胞进行总RNA的提取,使用紫外分光光度计对RNA的浓度进行检测,使用试剂盒将总RNA转录成cDNA,转录方法按照厂商试剂盒说明书进行操作。使用转录后的cDNA进行PCR扩增,PCR扩增体系按照说明书进行配置。PCR反应条件:95 ℃预变性10 min,95 ℃变性30 s,60 ℃退火30 s,74 ℃延伸30 s,共进行40次循环,本次研究采用ABI7900实时PCR扩增仪进行实时荧光定量PCR检测,使用U6作为内参,各组相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算,对每个样品进行3次反应。引物序列见表1。

表1 RT-PCR特异性引物序列

基因	上游引物	下游引物
miR-195	5′-ACACTCCAGCTGGGTAG-CAGCACAGAAAT-3′	5′-TGGTGTCGTGGAGTCG-3′
U6	5′-CTCGCTTCGGCAGCACA-3′	5′-AACGCTTCACGAATTT-GCGT-3′

1.4 MTT检测细胞增殖能力

收集转染后48 h各组细胞,将细胞接种在96孔板中培养24 h,每孔接种细胞 5×10^3 个,当细胞贴壁生长后记录为第1天,分别在1,2,3,4,5 d加入MTT溶液(每孔20 μL),试剂加完后放入培养箱(37 ℃,5% CO_2)培养4 h后使用SpectraMax M5酶标仪在450 nm下测量OD值以检测细胞增殖情况,并绘制生长曲线。实验重复3次。细胞生长抑制率(IC)=(1-实验组平均

OD 值/对照组平均 OD 值)×100%。

1.5 流式细胞术测定细胞周期

取转染后 48 h 各组细胞,制成单细胞悬液,使用 PBS 进行冲洗,离心弃去上清液,再次重悬,室温孵育,使用等体积乙醇(75%)固定 20 min,使用 PBS 冲洗,加入 10 mL PI 在避光中 4 ℃下孵育 60 min。用流式细胞仪检测激发光 Ex = 488 nm 处的荧光强度。实验重复 3 次。

1.6 Transwell 小室检测细胞侵袭能力

收集转染后48 h 各组细胞,分别接种于24 孔板中,将细胞密度调整至 5×10^4 细胞/孔加入含有 200 μL 无血清培养液的上室,下室中加入含有 400 μL 含有 10% FBS PRMI-1640 的培养液,在 37 ℃和 5% CO_2 条件下孵育 12 h,培养结束时,用棉签去除膜上未迁移的细胞,然后用 PBS 洗涤。用 4% 多聚甲醛溶液对膜底部迁移细胞固定 10 min,用 PBS 清洗,0.5% 结晶紫染色 10 min。以 95% 乙醇为溶剂,室温下轻轻摇动 6 h,对迁移细胞在光镜下进行定量,计算 5 个视野细胞侵袭情况,取平均值进行比较。实验重复 3 次。

1.7 细胞划痕实验检测细胞转移能力

marker 笔在孔板背面划线,加入转染后 48 h 各组细胞,无菌移液器枪头(200 μL)呈“一”字形沿培养孔底部划痕,用 DMEM 培养液培养 72 h,观察划痕区细胞迁移情况。

1.8 Western blot 检测 CHEK1 蛋白量表达

PBS 漂洗各组转染后细胞,加 2 mL RIPA 组织裂解液,匀浆,冰浴 30 min,40 ℃,转速为 1 000 r/min,离心3 min,取上清,超声 5 s×4 次破碎细胞核,40 ℃,转速为 12 000 r/min,离心 5 min,吸取上清 10 μL 用于测定蛋白质浓度。配制分离胶、浓缩胶,上样,电泳(电压为 120 V),转膜,转膜完毕后,切去膜多余的部分,切角标记方向,加封闭液 1 h 后加入兔抗人 CHEK1 单克隆抗体(1∶1 000)、HRP 标记的第二抗体(1∶3 000)进行免疫印迹检测。Bio-Rad 成像仪曝光成像,Image Lab Software(Version 2.0.1,Bio-Rad)测定条带光密度。

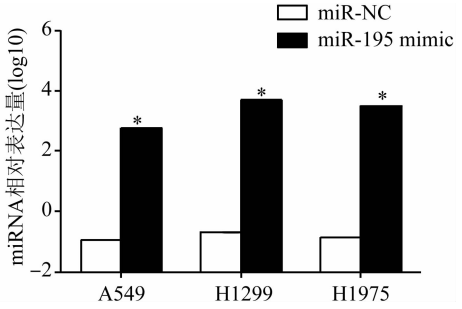
1.9 统计学分析

使用 SPSS 20.0 软件包(上海卡贝)对收集到的数据进行统计学分析,使用 GraphPad Prism 7 软件对本次实验所有图片进行绘制,计量资料使用均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)进行表示,2 组间比较使用 t 检验,多组间比较使用方差分析,计数资料用例和百分率(%)表示,组间比较用 χ^2 检验,两两比较采用 χ^2 分割检验。CHEK1 蛋白及 miRNA-195 表达的相关性分析,采用 Pearson 相关分析法。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞 miRNA-195 表达情况

RT-PCR 结果显示,与 miR-NC 组比较,转染 miR-195-mimics 后 A549、H1299、H1975 细胞中 miR-195 明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$),表明转染成功,可用于后续的试验(图 1)。



*:与 miR-NC 组比较,$P<0.05$

图 1 转染前后各细胞系中 miR-195 mRNA 相对含量

2.2 miR-195 过表达对细胞增殖、凋亡的影响

MTT 实验发现,与 miR-NC 组比较,转染 miR-195 mimics 后 A549、H1299、H1975 细胞系的细胞第 2、3、4、5 d 细胞活力明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$),提示细胞增殖明显受到 miR-195 抑制(图 2a~c)。

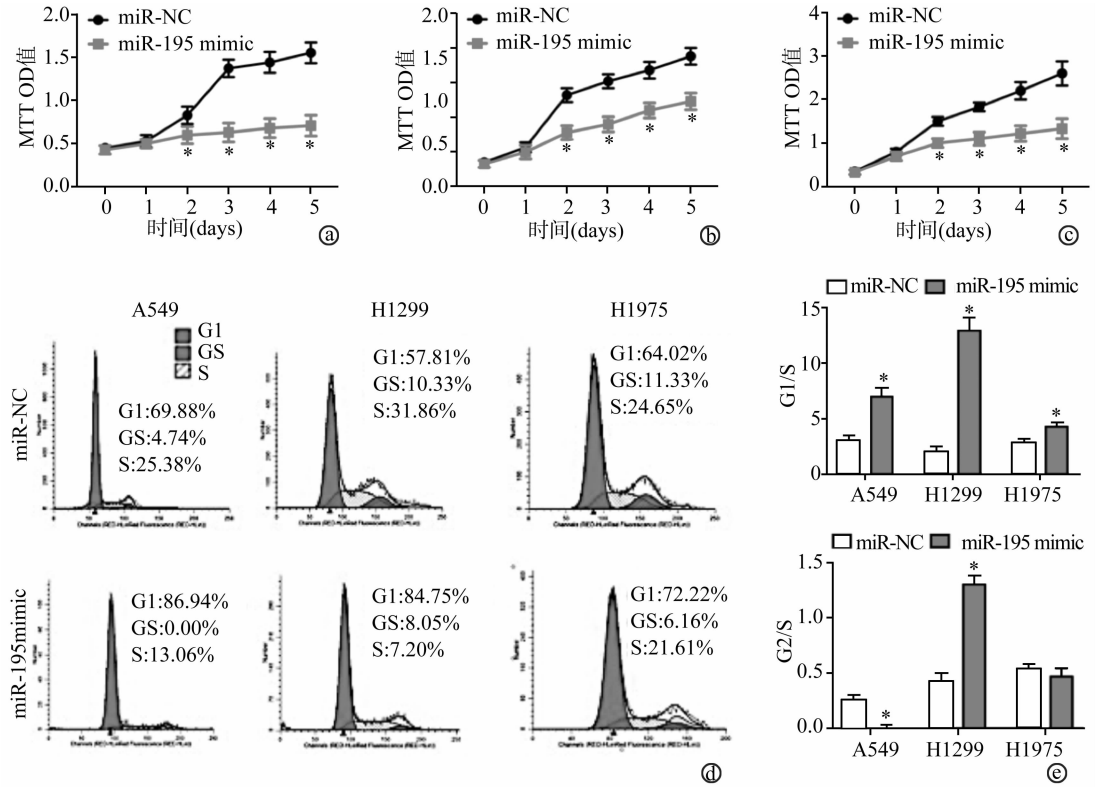
流式细胞术结果表明,与 miR-NC 组比较,转染 miR-195 mimics 后 A549、H1299、H1975 细胞系的 G1 和 G2 期细胞增加,S 期细胞减少,三种细胞系的 G1/S 期细胞比值转染前后差异有统计学意义($P<0.05$),A549、H1299 细胞系的 G2/S 期细胞比值转染前后差异有统计学意义($P<0.05$),H1975 细胞系的 G2/S 期细胞比值转染前后差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2d、e。

2.3 miR-195 过表达对 CHEK1 蛋白的影响

Western blot 结果显示,与 miR-NC 组比较,转染 miR-195 mimics 后 A549、H1299、H1975 细胞中 CHEK1 蛋白水平显著降低($P<0.05$)。Pearson 相关分析显示细胞 miR-195 mRNA 水平与 CHEK1 蛋白含量呈负相关($r=-0.464\ 8$,$P=0.00$),见图 3。

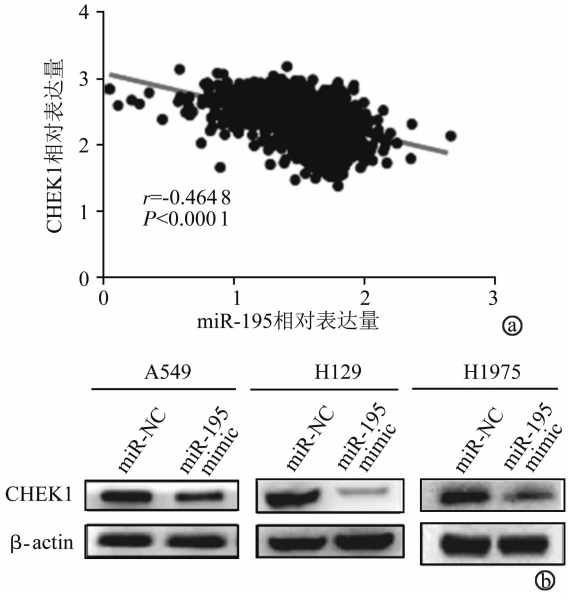
2.4 miR-195 过表达对细胞迁移、侵袭能力的影响

划痕实验结果表明,与 miR-NC 组比较,转染miR-195 mimics 后 A549、H1299、H1975 细胞系细胞划痕距离较大,差异具有统计学意义($P<0.05$),表明 miR-195 可以抑制细胞的迁移能力(图 4a)。Transwell 实验结果显示,与 miR-NC 组比较,转染 miR-195 mimics 后 A549、H1299、H1975 细胞的侵袭率减少($P<0.05$),表明过表达 miR-195 可明显抑制肺癌 A549、H1299、H1975 细胞的侵袭能力(图 4b、c)。



a~c:MTT 检测 miR-195 mimics 转染后 A549、H1299、H1975 细胞系细胞增殖能力;d:流式细胞术 miR-195 mimics 转染后 A549、H1299、H1975 细胞系细胞凋亡情况;e:miR-195 mimics 转染后 A549、H1299、H1975 细胞系的 G1/S、G2/S 期细胞比值
*:与 miR-NC组比较,$P<0.05$

图 2 miR-195 过表达对 A549、H1299、H1975 细胞增殖、凋亡的影响

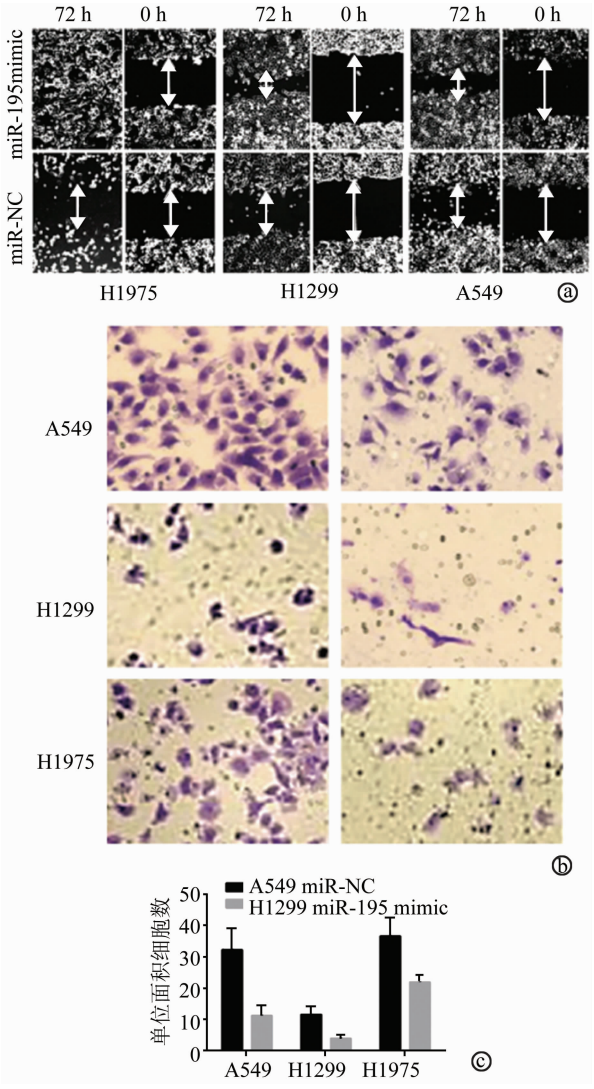


a:NSCLC 中 miR-195 与 CHEK1B 呈负相关;b:转染 miR-195 mimics 后 A549、H1299、H1975 细胞中 CHEK1 的蛋白水平降低

图 3 CHEK1 的表达及其与 miR195 的相关性

3 讨论

miRNAs 作为一类内源非编码单链小 RNA,主要存在于真核生物中,可以通过转录对靶基因进行调节,并根据可识别靶 mRNA3′-UTR 与其靶基因特异性结合,从而降解靶基因 mRNA 或抑制靶基因的翻译,调控其转录后的表达[8-9]。随着研究的深入,越来越多的研究结果证明 miRNAs 在多种癌症的发生发展中发挥重要作用[10]。研究特异性 miRNAs 在 NSCLC 发展过程中的作用机制,可为探索肿瘤发生、发展的分子机制开辟新渠道,为治疗提供新方向。由于 miRNAs 的表达具有器官特异性,并且与器官功能的调节有关,因此 miRNAs 可作为许多疾病的生物标志物。有研究表明,miR-195 基因位于 17 号常染色体长臂上,是 miR-15a/15b/16/195/497 家族中的重要成员,并且在多种肿瘤组织中特异性表达,如乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌、肝癌等[11-15]。另有研究显示,miR-195 在非小细胞肺癌组织中降低,可抑制肺癌 A549 细胞的生长和迁移,促进其凋亡[16]。本研究通过对 3 种肺癌细胞系细胞转染 miR-195mimics 后发现,miR-195 组细胞中 miR-195含量显著高于 miR-NC 组。促进细胞凋亡抑制细胞增殖是目前临床治疗肿瘤的重要思路,通过检测转染后各组细胞,CCK-8 结果显示细胞最大生长抑制率发生在 48 h,与 NC 组相比,不同细胞株中 miR-195 组细胞增殖均明显被抑制,与上述研究中 miR-195



a:转染 miR-195 mimics 后 A549、H1299、H1975 细胞系的细胞划痕距离大于 miR-NC 组;b、c:miR-195 mimics 组细胞穿过 Matrigel 膜并贴在膜底面的细胞数低于 miR-NC 组

图 4 miR-195 过表达对细胞迁移、侵袭能力的影响

抑制肺癌 A549 细胞的生长和迁移结果一致[16]。

此外,在非小细胞肺癌的治疗过程中,miR-195 能够促进微管靶向治疗药物 Microtubule-targeting agents(MTAs)的利用效率,且可作为非小细胞肺癌 MTAs 治疗的潜在生物标志物[17]。非小细胞肺癌具有较强的侵袭性生物学特性,因此有效阻断其远处侵袭转移也是治疗的关键环节。本研究通过 Transwell 侵袭实验发现,转染 miR-195 mimics 后 A549、H1299、H1975 细胞系细胞的侵袭率减少;流式细胞仪检测显示,肺癌 A549、H1299、H1975 细胞在 G1/G2 期细胞数目明显增加,而 S 期细胞显著减少,提示上调 miR-195 表达可使肺癌细胞阻滞于 G1/G2 期。癌症转移作为癌症后期病情加重的主要原因,本次划痕实验结果表明,与 miR-NC 组比较,转染 miR-195 mimics 后 A549、H1299、H1975 细胞系的细胞划痕距离较大,表明 miR-195 可以抑制细胞的迁移能力,与临床上其他研究 miR-195 与非小细胞肺癌细胞迁移关系结果基本一致[17-18]。

有研究显示,CHEK1 作为一个中心成分,参与 DNA 损伤反应,CHEK1 还调控细胞周期,协调细胞活动,参与 DNA 修复[19]。CHEK1 在乳腺癌、结肠癌、肝癌、胃癌和鼻咽癌等很多肿瘤中高表达,通常被认为是潜在的癌症治疗靶基因。在小鼠胸腺和乳腺中有条件的敲除 CHEK1 基因,结果表明 CHEK1 的减少不会增加肿瘤的发生率。在 TP53 突变或致癌物质暴露的情况下,CHEK1 的减少会降低肿瘤的致瘤性,说明 CHEK1(或 ATR-CHEK1 轴)抑制肿瘤能力较弱,ATR-CHEK1 轴或 CHEK1 能促进肿瘤细胞生长。高表达的 CHEK1 所处的肿瘤细胞相比低表达的肿瘤细胞具有更高的生存优势,能够更好地适应严酷的肿瘤微环境和放化疗引起的 DNA 损伤反应,致使 CHEK1 占优势的细胞将在肿瘤内生长并成为主体,有利于恶性肿瘤细胞的产生,最终导致耐药克隆体的产生及肿瘤的复发[20-21]。CHEK1 抑制剂已被作为多种癌症的治疗剂,有研究表明 miR-195 通过 CHEK1 相关信号通路影响多种肿瘤(乳腺癌、喉癌、结直肠癌等)对放化疗的敏感性,提示 CHEK1 是 miR-195 的潜在靶点[22-23]。Kim 等[24]研究发现在结肠癌 HCT-116 细胞株中,miR-195 下调能够增强结肠癌细胞对 5-氟尿嘧啶的化疗敏感性,且 CHEK1 作为其下游靶基因参与了这一调控过程。在本研究中,对 miR-195 mRNA 水平与 CHEK1 蛋白含量进行相关性分析显示,两者呈负相关,该结果提示 miR-195 可能通过下调 CHEK1 水平,对肺癌细胞生物学行为进行调控,但其具体的作用途径尚不完全明确,仍需进一步研究。

综上所述,miR-195的高表达通过下调 CHEK1 水平抑制肺癌细胞的增殖、转移和侵袭,促进其凋亡,有望成为肺癌生物治疗的潜在靶点。本研究还存在一定缺陷,首先我们是体外实验,细胞数量少;其次我们并未进行更深入的研究,对其他靶基因与相关通路未进行检测与验证。在今后的研究中,希望通过收集临床标本来验证我们的结果,并对其他靶基因及通路进行检测,深入探讨其机制,为肺癌的临床治疗与诊断奠定基础。

[参考文献]

[1] Albaba H, Lim C, Leighl NB. Economic considerations in the use of novel targeted therapies for lung cancer: review of current literature[J]. Pharmacoeconomics, 2017, 35(12): 1195 - 1209. doi: 10.1007/s40273 - 017 - 0563 - 8.

[2] Yu N, Zhang Q, Liu Q, et al. A meta-analysis: microRNAs'prognostic

function in patients with nonsmall cell lung cancer[J]. Cancer Med, 2017,6(9):2098 - 2105. doi:10.1002/cam4.1158.

[3] Du X,Zhang J,Wang J,et al. Role of miRNA in lung cancer-potential biomarkers and therapies[J]. Curr Pharm Des,2018,23(39):5997 - 6010. doi:10.2174/1381612823666170714150118.

[4] Chabre O,Libe R,Assie G,et al. Serum miR-483-5p and miR-195 are predictive of recurrence risk in adrenocortical cancer patients[J]. Endocr Relat Cancer,2013,20(4):579 - 594. doi:10.1530/ERC - 13 - 0051.

[5] Wu D,Li Y,Zhang H,et al. Knockdown of lncrna PVT1 enhances radiosensitivity in non-small cell lung cancer by sponging mir-195[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42 (6): 2453 - 2466. doi: 10.1159/000480209.

[6] Singh R,Yadav V,Kumar S,et al. MicroRNA-195 inhibits proliferation, invasion and metastasis in breast cancer cells by targeting FASN, HMGCR,ACACA and CYP27B1[J]. Sci Rep,2015,3(5):17454. doi:10.1038/srep17454.

[7] McNeely S,Beckmann R,Bence Lin AK. CHEK again:revisiting the development of Chk1 inhibitors for cancer therapy[J]. Pharmacol Ther, 2014,142(15):1 - 10. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.10.005.

[8] Fan L,Qi H,Teng J,et al. Identification of serum miRNAs by nanoquantum dots microarray as diagnostic biomarkers for early detection of non-small cell lung cancer [J]. Tumour Biol,2016,37(6):7777 - 7784. doi:10.1007/s13277 - 015 - 4608 - 3.

[9] Shi GL,Chen Y,Sun Y,et al. Significance of serum microRNAs in the auxiliary diagnosis of non-small cell lung cancer[J]. Clin Lab,2017,63(1):133 - 140. doi:10.7754/Clin.Lab.2016.160710.

[10] Song R,Cong L,Ni G,et al. MicroRNA-195 inhibits the behavior of cervical cancer tumors by directly targeting HDGF[J]. Oncol Lett, 2017,14(1):767 - 775. doi:10.3892/ol.2017.6210.

[11] Yu X,Zhang Y,Cavazos D,et al. miR-195 targets cyclin D3 and survivin to modulate the tumorigenesis of non-small cell lung cancer[J]. Cell Death Dis,2018,9(2):193. doi:10.1038/s41419 - 017 - 0219 - 9.

[12] Li Y,Di C,Li W,et al. Oncomirs miRNA-221 /222 and tumor suppressors miRNA-199a/195 are crucial miRNAs in liver cancer:a systematic analysis[J]. Dig Dis Sci,2016,61(8):2315 - 2327. doi:10.1007/s10620 - 016 - 4156 - 8.

[13] Luo Q,Zhang Z,Dai Z,et al. Tumor-suppressive microRNA-195-5p regulates cell growth and inhibits cell cycle by targeting cyclin dependent kinase 8 in colon cancer[J]. Am J Transl Res,2016,8(5):2088 - 2096.

[14] Wang N,Wei H,Yin D,et al. MicroRNA-195 inhibits proliferation of cervical cancer cells by targeting cyclin D1a[J]. Tumour Biol,2016,37(4):4711 - 4720. doi:10.1007/s13277 - 015 - 4292 - 3.

[15] Zhu J,Ye Q,Chang L,et al. Upregulation of miR-195 enhances the radiosensitivity of breast cancer cells through the inhibition of Bcl-2[J]. Int J Clin Exp Med,2015,8(6):9142 - 9148.

[16] Yu X,Zhang Y,Ma X,et al. miR-195 potentiates the efficacy of microtubule-targeting agents in non-small cell lung cancer[J]. Cancer Lett, 2018,427(13):85 - 93. doi:10.1016/j.canlet.2018.04.007.

[17] Su K,Zhang T,Wang Y,et al. Diagnostic and prognostic value of plasma microRNA-195 in patients with non-small cell lung cancer[J]. World J Surg Oncol,2016,14(1):224. doi:10.1186/s12957 - 016 - 0980 - 8.

[18] 王 依,詹 蓉,高建生,等. miR-195 对肺癌 A549 细胞生物学行为的调控作用[J]. 中国病理生理杂志,2018,34(3):458 - 463. doi:10.3969/j.issn.1000 - 4718.2018.03.013.

[19] 黄申晖,隋 超,刘佳鑫,等. miR-195 对肺癌 A549 细胞生物学行为的影响及其机制[J]. 肿瘤药学,2018,8(2):153 - 157. doi:10.3969/j.issn.2095 - 1264.2018.02.06.

[20] Zhang Y,Hunter T. Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy [J]. Int J Cancer,2014,134(5):1013 - 1023. doi:10.1002/ijc.28226.

[21] Rundle S,Bradbury A,Drew Y,et al. Targeting the ATR-Chk1axis in cancer therapy[J]. Cancers,2017,9(5):41. doi:org/10.3390/cancers9050041.

[22] Carrassa L,Damia G. Unleashing Chk1 in cancer therapy[J]. Cell Cycle,2011,10(3):2121 - 2128. doi:10.4161/cc.10.13.16398.

[23] Liu B,Qu J,Xu F,et al. MiR-195 suppresses non-small cell lung cancer by targeting CHEK1[J]. Oncotarget,2015,6(11):9445 - 9456. doi:10.18632/oncotarget.3255.

[24] Kim C,Hong Y,Lee H,et al. MicroRNA-195 desensitizes HCT116 human colon cancer cells to 5-fluorouracil[J]. Cancer Lett,2018,4(4):264 - 271. doi:10.1016/j.canlet.2017.10.022.

(编辑:陈庆利)