

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.02.002

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.02.002

miR-26 靶向 MTHFR 通过 JAK/STAT 通路调控 肺癌细胞增殖与侵袭

关耀武

(驻马店市中心医院胸外科, 河南 驻马店 463000)

[摘要] 目的: 探讨miR-26靶向亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)通过JAK/STAT信号通路调控肺癌细胞增殖与侵袭的机制。方法: 以免疫组织化学检测法检测MTHFR在肺癌组织与正常肺组织中的表达; 以PCR法检测miR-26在肺癌组织中的表达; 使用双荧光素酶报告基因系统检测miR-26对MTHFR转录活性的影响; 以肿瘤细胞成球实验检测miR-26的表达对肺癌细胞H1650增殖能力的影响; 以Transwell侵袭实验检测miR-26的表达对肺癌H1650细胞侵袭能力的影响; 以CM-H2DCFDA细胞荧光染色法检测肺癌细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平; 以Western印迹检测过表达miR-26后JAK/STAT信号通路的蛋白表达水平。结果: 与正常肺组织相比, 在肺癌组织中MTHFR表达较高, miR-26表达明显降低。双荧光素酶报告基因系统检测结果显示: miR-26可直接调控MTHFR的转录活性; 过表达miR-26后, 肺癌细胞H1650的增殖与侵袭能力明显降低; 过表达miR-26后, 肺癌细胞内ROS水平降低; 过表达miR-26后, MTHFR的表达水平下调, p-JAK与p-STAT蛋白表达下调。结论: miR-26靶向MTHFR可通过JAK/STAT通路调控肺癌细胞的增殖与侵袭能力。

[关键词] 活性氧; miR-26; 亚甲基四氢叶酸还原酶; JAK/STAT

MiR-26 targeting MTHFR regulates the invasion and proliferation of lung cancer by JAK/STAT signaling pathway

GUAN Yaowu

(Department of Thoracic Surgery, Central Hospital of Zhumadian, Zhumadian Henan 463000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect of miR-26 targeting methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) by JAK/STAT signaling pathway on invasion and proliferation of lung cancer. **Methods:** The expression of MTHFR in lung cancer tissues was detected by immunohistochemistry. The expression of miR-26 in lung cancer cell line was detected by PCR. The effect of miR-26 on the expression of MTHFR was examined by the dual luciferase gene system. Effect of miR-26 on the proliferation ability of H1650 were detected by tumor in ball assays. Transwell

收稿日期 (Date of reception): 2017-10-24

通信作者 (Corresponding author): 关耀武, Email: markdoctor@126.com

基金项目 (Foundation item): 河南省自然科学基金 (102300417675)。This work was supported by the Henan Provincial Natural Science Foundation, China (102300417675).

invasion assay was used to detect the ability of invasion in the lung cancer cell line H1650 after overexpression of miR-26. Detection of reactive oxygen species in lung cancer cells by CM-H2DCFDA fluorescent staining cells. Western blot was used to detect the protein expression of JAK/STAT signal pathway after overexpression of miR-26. **Results:** The expression of miR-26 in lung cancer tissues was significantly lower than that in normal lung tissues. The dual luciferase reporter gene system showed that miR-26 could directly regulate the transcriptional activity of MTHFR after expression of miR-26, the proliferation and invasion ability of lung cancer cell H1650 were significantly decreased, and the reactive oxygen level in lung cancer cells decreased. After expression of miR-26, the expression level of MTHFR was down-regulated, and p-JAK and p-STAT protein were down-regulated. **Conclusion:** miR-26 targeted MTHFR can regulate the proliferation and invasion of lung cancer cells by the JAK/STAT pathway.

Keywords reactive oxygen; miR-26; MTHFR; JAK/STAT

肺癌是呼吸系统发病率最高且最常见的原发性肿瘤之一，国内发病率约为0.26%，大约占所有呼吸系统肿瘤的68%^[1-2]。目前主要的治疗方法是手术或手术加放疗，部分化疗效果不佳。然而，即便患者接受手术治疗，其术后生存期也相对有限。由于在手术过程中无法完全切除肺部肿瘤，肺癌的术后复发率也相对较高，且复发后患者的平均生存期将缩短至3~6个月^[3]。随着对肺癌发病相关基因与分子机制的认识不断深入，寻求调控肺癌的分子已经成为肺癌治疗与预后改善新的研究方向。

MiR-26位于人体3号染色体，全长21核苷酸，在多种组织中广泛表达，其表达不存在针对特异性^[4]。有研究^[5]报道：miR-26在胃癌、鼻咽癌、乳腺癌及肝癌中均存在表达降低的情况。目前miR-26在肺癌中的作用机制尚未明确，有报道^[5]称miR-26可通过调控下游的靶向基因来抑制肺癌细胞的增殖与扩散。因此，本研究考虑到miR-26与肿瘤相关性非常高，miR-26或可作为肺癌治疗的分子靶点，拟通过研究肺癌细胞与肺癌组织标本中miR-26的表达水平，进一步探讨肺癌进程的干预机制与临床治疗的可行度。

MTHFR基因编码的亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)在叶酸代谢过程中的起关键作用，它将5,10-亚甲基四氢叶酸(5,10-MTHF)转变成5-甲基四氢叶酸(5-MTHF)，参与蛋氨酸循环与各种基因DNA的甲基化^[6]。研究^[7]表明：MTHFR的活性可影响5-氟尿嘧啶(5-FU)的抗肿瘤作用。同时也有研究^[8]报道：MTHFR在体内叶酸代谢过程中起关键作用，其作为叶酸依赖性酶，在叶酸代谢甚至是结直肠癌的发生发展过程中可起到一定的调节作用。MTHFR

677TT基因还可增加肺癌的发病风险，但许多研究^[9-10]报道其差异无统计学意义。因此，MTHFR基因是否与肺癌相关，以及能否作为肺癌新的分子标志物，是当下热门的研究方向。

JAK/STAT信号通路在细胞生长、分化、免疫功能及造血等多种生理过程中起重要作用^[11]。在正常细胞中，STAT介导的基因调节短暂且受到严密调控。近年来，越来越多的研究^[12-13]发现：JAK/STAT信号通路在多种肿瘤组织中异常激活。Calvisi等^[12]发现：在肝癌组织中JAK-3与STAT-3被持续性激活。Clevenger等^[13]发现：乳腺癌敏感基因能够与JAK/STAT信号通路中的重要成员(JAK-1, JAK-2和STAT-3)发生相互作用并调节其表达，说明该通路与乳腺癌的进展相关。本研究以肺癌H1650细胞作为研究对象，通过转染miR-26-mimic下调MTHFR的蛋白表达，观察肺癌细胞生物学行为及JAK/STAT信号通路蛋白水平的变化，探讨miR-26通过MTHFR调控肺癌细胞的生物学行为及其相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺癌细胞株H1650购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。细胞培养条件：含10%胎牛血清的RPMI 1640，37℃，5% CO₂条件下培养。胎牛血清、RPMI 1640培养基均购自美国Gibco公司。MTHFR兔单克隆抗体购自美国Abcam公司(ab55530)。Transwell小室购自美国Millipore公司。Matrigel购自美国BD公司。miR-26-mimic转染试剂盒购自上海吉凯制药技术有限公司。miR-26 qPCR引物及RNA提取试剂盒、反转录试剂盒、

PCR试剂盒均购自广州复能基因有限公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学

常规石蜡包埋, 组织切片厚5 μm , HE染色后可在镜下观察到的典型肺癌组织者为入选标本。免疫组织化学步骤按免疫组织化学S-P试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司)说明书操作: 载玻片脱蜡、水化, 然后在枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0; 美国Sigma公司)中运用微波炉抗原修复20 min, 自然冷却至室温。PBS洗3次, 每次3 min, 3% H_2O_2 室温孵育15 min, PBS洗3次, 每次3 min, 5%羊血清(ab7475, 美国Abcam公司)37 $^\circ\text{C}$ 水浴30 min, 兔抗人MTHFR多克隆抗体(1:100), 37 $^\circ\text{C}$ 水浴2 h, PBS洗3次, 每次3 min, 辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG(1:500, 北京博奥森生物技术有限公司), PBS洗3次, 每次3 min, 辣根酶标记链酶卵白素工作液(北京博奥森生物技术有限公司)37 $^\circ\text{C}$ 水浴30 min, PBS洗3次, 每次3 min, 二氨基联苯胺(DAB)显色。阴性对照用PBS代替一抗。

1.2.2 qPCR检测miR-26的表达

用Trozel(GIBCO公司)抽提组织总RNA, 反转录, PCR扩增miR-26, 使用U6作为对照。反应条件: 预变性95 $^\circ\text{C}$ 10 min, 95 $^\circ\text{C}$ 10 s, 60 $^\circ\text{C}$ 20 s, 72 $^\circ\text{C}$ 10 s, 重复40个循环。阴性对照以无RNA酶的水代替cDNA模板, 每例样品及对照均设3个平行复孔, 取平均值。反应结束后, 由GraphPad Prism软件自动得出荧光反应曲线及每个标本反应体系的扩增效率及Ct值, 实验不同时间重复3次。miR-26的引物序列: 3'-GCGGTAGCGATGCGTAGCGGA-5', 5'-CGTAGGGGCGAGGGCTGAGC-3'。

1.2.3 双荧光素酶实验

从人基因组DNA扩增miR-26启动子序列, 随后插入萤光素酶报道载体pGL3增强子并指定为pGL3-miR-26, 使用报道质粒miR-26或对照载体共转染到293T细胞中, 培养24 h后, 将293T细胞在裂解缓冲液中裂解, 并通过萤光素酶测定系统测量野生型MTHFR-3'UTR与突变型MTHFR-3'UTR萤光素酶活性的变化, 将其归一化至裂解物蛋白质浓度并计算其相对值, 实验过程重复3次。

1.2.4 细胞增殖实验

使用细胞计数试剂盒-8(cell count kit-8, CCK-8)评估细胞增殖能力。将 5×10^3 个肺癌H1650细胞使用缓冲液处理后培育24 h, 将10 μL 的CCK-8溶液加

入到各孔中, 将细胞在培养箱中孵育2 h(37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2)。使用微板读数器在450 nm处测量吸光度, 参考波长为570 nm。根据HepG3的吸光度值绘制细胞增殖曲线。实验重复3次。

1.2.5 肿瘤细胞成球实验

肿瘤细胞具有自我更新与无限增殖能力, 其增殖能力可用细胞球的体积大小来反映。肺癌中含有大量干细胞, 根据干细胞可在无血清培养基中正常生长的特性, 常规培养肺癌H1650细胞, 经胰酶消化后, 1 000 r/min离心3 min, 弃去上清液。加入5 mL无菌PBS溶液, 轻轻吹散洗涤细胞沉淀并再次离心。反复洗涤3次后加入培养基, 制备成单细胞悬液。测定干细胞浓度并调整为1 000个/mL, 将单细胞悬液均匀地种植在无菌6孔板内, 进行肿瘤成球培养, 将其分为miR-26-mimic实验组与NC对照组。每3 d更换1次培养基, 14 d后观察肿瘤成球情况。

1.2.6 Transwell侵袭实验检测肺癌细胞迁移能力

所有试剂及器材均于冰上预冷, 将Transwell小室置于24孔板内, 在Transwell小室内膜均匀涂抹Matrigel胶50 μL (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 37 $^\circ\text{C}$ 孵育15 min, 使胶凝固; 消化、离心、计数细胞后, 按照 2.5×10^4 个/mL用无血清培养基稀释细胞, 制成细胞悬液; 按照每孔200 μL , 将细胞悬液加入Transwell上室, 同时在Transwell下室加入10%FBS+培养基600 μL , 放入37 $^\circ\text{C}$ 孵箱培养; 甲醛固定, 结晶紫染色10 min, 然后用棉签轻轻擦拭内膜上的细胞。显微镜下计数4个高倍视野($\times 40$)下穿过滤膜的细胞数。实验重复3次。

1.2.7 细胞活性氧(ROS)检测

细胞在氯甲基二乙酸中37 $^\circ\text{C}$ 孵化1 h, 浓度为10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$, 1 h后, 通过免疫荧光测定线粒体活性氧(reactive oxygen species, ROS)的水平。细胞ROS用CM-H2DCFDA试剂测定。实验重复3次。

1.2.8 Western印迹检测JAK/STAT信号通路相关蛋白

根据细胞量加入适量RIPA细胞裂解液, 提取miR-26-mimic组与NC组胞质蛋白和核蛋白, BCA法测定蛋白浓度, 加入缓冲液后变性蛋白。配制10% SDS-PAGE, 每孔加入30 μg 蛋白样品, 经SDS-PAGE(80 V恒压25 min, 120 V恒压至溴酚蓝溢出胶底为止)。使用湿转法电转至PVDF膜, 5%脱脂奶粉封闭2 h, 1:1 000 TBST稀释一抗, 4 $^\circ\text{C}$ 过夜; 加入羊抗兔二抗1:2 000稀释, 室温孵育2 h; ECL发光。实验重复3次。

1.3 统计学处理

采用SPSS 22.0软件进行统计学分析,所有计量数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间均数比较采用t检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-26 与 MTHFR 在肺癌组织中的表达情况

40例肺癌及癌旁正常肺组织免疫组织化学结果显示:MTHFR定位在细胞质中,细胞核中含量较少。MTHFR在肺癌组织中呈强阳性表达,在正常肺组织中呈弱阳性表达;正常组织中miR-26的表达水平显著高于肺癌组织,差异均具有统计学意义($P<0.05$,图1)。

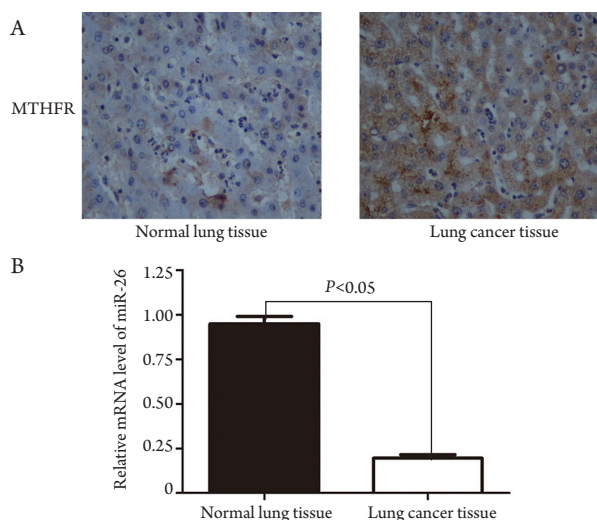


图1 免疫组织化学法检测MTHFR(A)和miR-26(B)在肺癌组织与正常肺癌旁组织中的表达情况(DAB, $\times 40$)

Figure 1 Expression of MTHFR (A) and miR-26 (B) in lung cancer detected using immunohistochemical staining (DAB, $\times 40$)

2.2 MTHFR 是 miR-26 的直接靶点

通过生物信息学网站监测miR-26与MTHFR相似的结合位点,运用H1650细胞转染miR-26-mimic。结果显示:与对照组相比,转染miR-26-mimics后,MTHFR表达降低,这提示MTHFR是miR-26的直接靶点,miR-26可调控MTHFR的直接表达情况(图2)。

2.3 转染 miR-26-mimic 后肺癌细胞 H1650 的增殖能力变化

细胞成球实验(图3A)显示:与NC对照组相

比,miR-26-mimic实验组的肿瘤细胞球体积明显减小 $[(48.87\pm 5.36)\mu\text{m}^3 \text{ vs } (215.68\pm 16.36)\mu\text{m}^3]$,差异有统计学意义($P<0.05$),表明过表达miR-26后,肺癌H1650细胞的成球能力受到抑制,故miR-26可抑制肺癌H1650细胞的增殖能力。CCK-8细胞增殖实验(图3B)显示:过表达miR-26-mimic后,H1650细胞的增殖能力受到明显抑制,与上述肿瘤成球实验结果趋势一致。

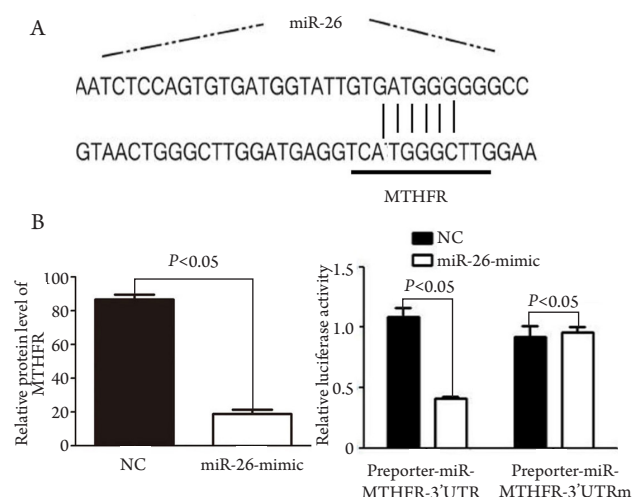


图2 MTHFR为miR-26的直接靶点

Figure 2 MTHFR is the direct target of miR-26

2.4 转染 miR-26-mimic 后肺癌细胞 H1650 侵袭能力的变化

细胞侵袭穿过Matrigel基质胶的能力可反映细胞的侵袭能力。Transwell实验结果表明:过表达miR-26后,肺癌细胞H1650通过Matrigel基质胶的细胞数量分别为 (45.54 ± 6.76) 个与 (50.65 ± 4.63) 个,明显少于感染阴性的H1650细胞 (310.90 ± 21.86) 个,差异有统计学意义($P<0.05$,图4),表明过表达miR-26可抑制肺癌H1650细胞的侵袭能力。

2.5 转染 miR-26-mimic 后细胞 ROS 水平

细胞内ROS水平可影响细胞的增殖及代谢水平。siRNA转染H1650后使用CM-H2DCFDA试剂检测过表达miR-26的肺癌H1650细胞内的ROS水平,结果显示:过表达miR-26后CM-H2DCFDA细胞内ROS水平降低 $[(19.8\pm 2.28)\% \text{ vs } (77.5\pm 3.93)\%]$,差异有统计学意义($P<0.05$)。荧光强度变弱证实过表达miR-26可降低细胞内的ROS水平(图5),表明过表达miR-26可抑制细胞的过度增殖与代谢。

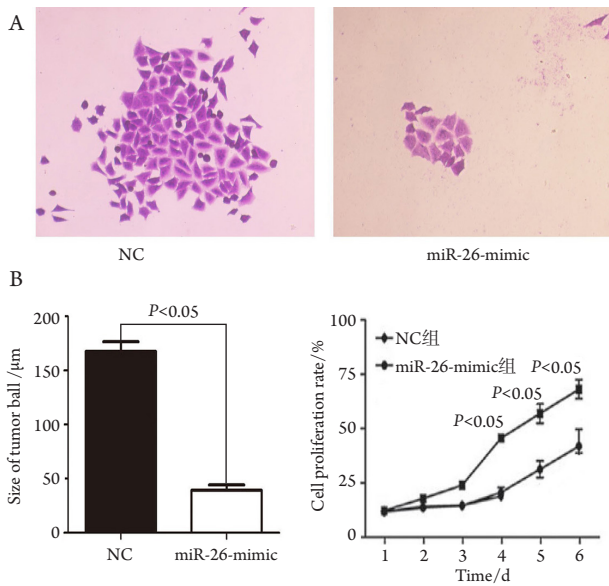


图3 肿瘤细胞成球实验检测miR-26对肺癌细胞H1650增殖能力的影响

Figure 3 Effect of miR-26 on the proliferation ability of lung cell detected by tumor into ball assays

(A) 肿瘤细胞成球实验检测miR-26对肺癌细胞增殖能力的影响(Crystal violet, × 40); (B) CCK-8细胞增殖实验检测miR-26对肺癌细胞增殖能力的影响。

(A) The tumor cells were spheroidized to test the effect of miR-26 on the proliferation of lung cancer cells (Crystal violet, × 40). (B) CCK-8 cell proliferation assay to detect the impact of miR-26 on the proliferation of lung cancer cells.

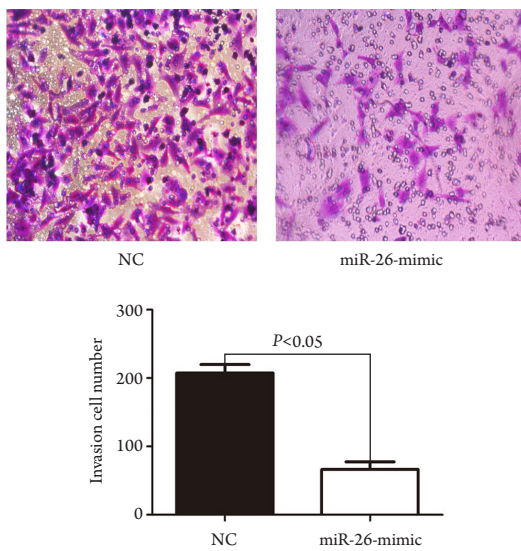


图4 Transwell侵袭实验检测miR-26过表达对肺癌细胞侵袭能力的影响(Crystal violet, × 40)

Figure 4 Effect of overexpression miR-26 on the invasion ability of lung cells detected by Transwell matrigel invasion assays (Crystal violet, × 40)

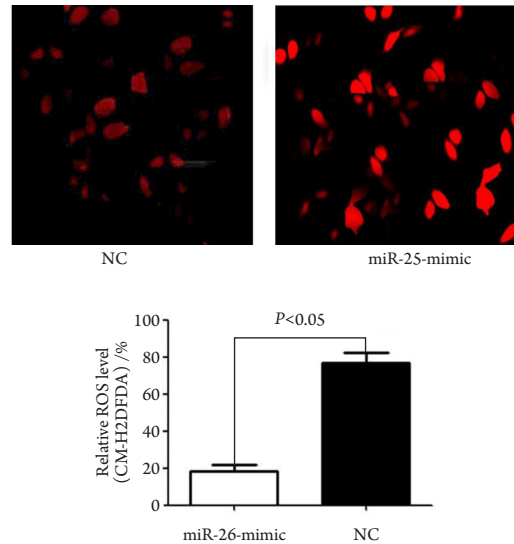


图5 过表达miR-26抑制肺癌H1650细胞内ROS水平(IFC, × 40)

Figure 5 Overexpression of miR-26 inhibits the level of ROS in H1650 cells in lung cancer (IFC, × 40)

2.6 转染 miR-26-mimic 后 JAK/STAT 信号通路蛋白表达情况

Western印迹实验结果(图6)显示: 过表达miR-26后JAK/STAT信号通路中的p-JAK与p-STAT蛋白表达水平与NC对照组相比明显降低 [(18.52±1.62)% vs (82.29±2.93)%; (22.94±1.34)% vs (79.49±2.02)%; P<0.05], 磷酸化的JAK和STAT蛋白水平变化明显, 非磷酸化的JAK和STAT蛋白水平无明显变化。表明过表达miR-26后肺癌H1650细胞生物学行为的改变可能是通过JAK/STAT信号通路调控的。

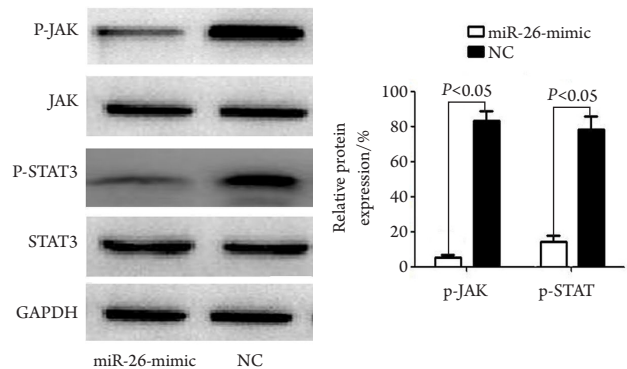


图6 Western印迹示过表达miR-26抑制JAK/STAT信号通路蛋白的表达

Figure 6 Western blot showing overexpression of miR-26 inhibits the protein expression of JAK/STAT signal pathway

3 讨论

miRNAs与靶基因的相互作用是目前肿瘤领域的研究热点之一,因miRNA分子质量较小,在肿瘤基因组中与其互相识别的靶基因有很多,本研究选择MTHFR基因是因为此基因在肺癌的研究^[14]中尚未被明确报道。通过研究肺癌组织标本及癌旁组织中miR-26和MTHFR的表达情况,本研究发现两者间可能存在一定负性调控的可能。通常miRNAs通过与靶向基因3'UTR端转录相结合,进而参与调控靶基因的降解或合成^[15]。本研究采用TargetScan生物学软件分析miR-26与MTHFR的关系^[16],可见miR-26与MTHFR的3'UTR之间的碱基呈完全互补,并发现MTHFR的3'UTR中存在4个碱基突变位点,为研究设定对照提供了十分理想的参照物。本研究结果显示:转染miR-26a可显著抑制MTHFR-3'UTR基因质粒的双荧光素酶活性,而对MTHFR的3'UTR突变序列基因质粒的性质改变并不明显。而转染miR-26-mimic可显著下调MTHFR-3'UTR基因质粒的双荧光素酶活性。这些研究结果表明:miR-26可直接作用于MTHFR。曾有研究^[17-18]报道:在肝癌和乳腺癌中,MTHFR也具有类似的负调控关系,但没有肺癌细胞相关的研究报道。JAK/STAT信号通路在人类很多恶性肿瘤中被激活,包括乳腺癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌及子宫内膜癌等,因此本研究探讨miR-26调控肺癌H1650细胞是否与JAK/STAT信号通路相关。

本研究发现过表达miR-26后的肺癌细胞基本无法形成完整的细胞球,形成细胞球的能力远弱于未作处理的对照组细胞,这些结果提示:肺癌细胞的增殖能力受到miR-26基因调控,且该基因起关键作用。通过细胞内ROS水平与细胞侵袭实验,分别验证miR-26对肺癌细胞生物学行为的影响,结果表明:miR-26的过表达状态可抑制肿瘤细胞的增殖与侵袭。相关研究^[19]证明MTHFR蛋白可通过多种途径参与肿瘤的进展。MTHFR可能与MAPK受体结合,激活多种信号通路^[20]。研究^[21]发现:MTHFR在人乳腺癌中发挥重要作用,可维持乳腺癌中的关键蛋白活性,说明MTHFR在肿瘤发生发展过程中的作用至关重要。在肺癌细胞中,下调MTHFR的表达可有效减少肺癌细胞增殖与侵袭的数量,通过细胞增殖与侵袭实验^[22]发现:MTHFR在细胞生长的过程中有一定抑制增殖的作用。Bueno等^[23]研究证明:MTHFR的缺失可减弱线粒体启动效应,诱导细胞加速凋亡,增加

对细胞毒性药物的敏感性。因此,MTHFR作为一个促癌因子,在肺癌发展过程中,可通过调控线粒体启动效应,加速细胞增殖进程,干扰JAK/STAT信号通路激活,进而促进肿瘤细胞的过度增殖侵袭^[24]。

综上所述,本研究结果表明:miR-26在肺癌细胞株H1650中可靶向下调MTHFR的表达,并通过JAK/STAT信号通路抑制肺癌细胞的增殖与侵袭迁移。进一步研究结果显示:miR-26可能通过调控JAK/STAT信号通路蛋白的表达,从而调控肺癌细胞增殖侵袭迁移,提示miR-26与MTHFR可能参与了肺癌的进展过程,或将成为预测肺癌发展、治疗效果及预后的生物标志物。本研究后续将继续深入研究miR-26与MTHFR在体内对肺癌的作用机制,以期为临床应用新的生物学标志物提供理论基础。

参考文献

1. Lortet-Tieulent J, Soerjomataram I, Ferlay J, et al. International trends in lung cancer incidence by histological subtype: adenocarcinoma stabilizing in men but still increasing in women[J]. *Lung Cancer*, 2014, 84(1): 13-22.
2. Park SJ, Kim HT, Lee DH, et al. Efficacy of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors for brain metastasis in non-small cell lung cancer patients harboring either exon 19 or 21 mutation[J]. *Lung Cancer*, 2012, 77(3): 556-560.
3. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(2): 123-135.
4. Tan S, Ding K, Li R, et al. Identification of miR-26 as a key mediator of estrogen stimulated cell proliferation by targeting CHD1, GREB1 and KPNA2[J]. *Breast Cancer Res*, 2014, 16(2): R40.
5. Icli B, Dorbala P, Feinberg MW. An emerging role for the miR-26 family in cardiovascular disease[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2014, 24(6): 241-248.
6. Clarke R, Bennett DA, Parish S, et al. Homocysteine and coronary heart disease: meta-analysis of MTHFR case-control studies, avoiding publication bias[J]. *PLoS Med*, 2012, 9(2): e1001177.
7. Owen SA, Lunt M, Bowes J, et al. MTHFR gene polymorphisms and outcome of methotrexate treatment in patients with rheumatoid arthritis: analysis of key polymorphisms and meta-analysis of C677T and A1298C polymorphisms[J]. *Pharmacogenomics J*, 2013, 13(2): 137-147.
8. Loganayagam A, Arenas Hernandez M, Corrigan A, et al.

- Pharmacogenetic variants in the DPYD, TYMS, CDA and MTHFR genes are clinically significant predictors of fluoropyrimidine toxicity[J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(12): 2505-2515.
9. Yilmaz M, Kacan T, Sari I, et al. Lack of association between the MTHFR C677T polymorphism and lung cancer in a Turkish population[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(15): 6333-6337.
 10. Liu NB, Li J, Qi JF, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype may be associated with an increased lung cancer risk in North China: an updated meta-analysis[J]. *Med Sci Monit*, 2014, 20: 2817-2823.
 11. Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. JAK-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins[J]. *Science*, 1994, 264(5164): 1415-1420.
 12. Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, et al. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC[J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(4): 1117-1128.
 13. Clevenger CV. Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer[J]. *Am J Pathol*, 2004, 165(5): 1449-1460.
 14. Grosswendt S, Filipchuk A, Manzano M, et al. Unambiguous identification of miRNA: target site interactions by different types of ligation reactions[J]. *Mol Cell*, 2014, 54(6): 1042-1054.
 15. Bosson AD, Zamudio JR, Sharp PA. Endogenous miRNA and target concentrations determine susceptibility to potential ceRNA competition[J]. *Mol Cell*, 2014, 56(3): 347-359.
 16. Seifert KR, McCauley C. Suicide bombers in Iraq, 2003–2010: disaggregating targets can reveal insurgent motives and priorities[J]. *Terrorism and Political Violence*, 2014, 26(5): 803-820.
 17. Liang TJ, Liu H, Zhao XQ, et al. Quantitative assessment of the association between MTHFR rs1801131 polymorphism and risk of liver cancer[J]. *Tumor Biol*, 2014, 35(1): 339-343.
 18. Deroo LA, Bolick SC, Xu Z, et al. Global DNA methylation and one-carbon metabolism gene polymorphisms and the risk of breast cancer in the Sister Study[J]. *Carcinogenesis*, 2013, 35(2): 333-338.
 19. Vijayan M, Chinniah R, Ravi PM, et al. MTHFR (C677T) CT genotype and CT-apoE3/3 genotypic combination predisposes the risk of ischemic stroke[J]. *Gene*, 2016, 591(2): 465-470.
 20. Wang XB, Qiao C, Wei L, et al. Associations of polymorphisms in MTHFR gene with the risk of age-related cataract in Chinese Han population: a genotype-phenotype analysis[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0145581.
 21. Gonzales MC, Shiao SP, Lie A. MTHFR and health behaviors: a meta-analysis of epigenetic risks for breast cancer prevention[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(19 Suppl): Abstract nr 5058.
 22. Mehlig K, Leander K, de Faire U, et al. The association between plasma homocysteine and coronary heart disease is modified by the MTHFR 677C>T polymorphism[J]. *Heart*, 2013, 99(23): 1761-1765.
 23. Bueno O, Molloy AM, Fernandez-Ballart JD, et al. Common polymorphisms that affect folate transport or metabolism modify the effect of the MTHFR 677C polymorphism on folate status[J]. *J Nutr*, 2016, 146(1): 1-8.
 24. Reilly R, McNulty H, Pentieva K, et al. MTHFR 677TT genotype and disease risk: is there a modulating role for B-vitamins?[J]. *Proc Nutr Soc*, 2014, 73(1): 47-56.

本文引用: 关耀武. miR-26靶向MTHFR通过JAK/STAT通路调控肺癌细胞增殖与侵袭[J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(2): 232-238. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.02.002

Cite this article as: GUAN Yaowu. MiR-26 targeting MTHFR regulates the invasion and proliferation of lung cancer by JAK/STAT signaling pathway[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(2): 232-238. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.02.002